

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ba_3 -κυτοχρωμική οξειδάση, ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των οξειδασών της αίμης και έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus thermophilus*. Είναι ένα ένζυμο της τάξης των 85 kDa, το οποίο αποτελείται από 764 κατάλοιπα, μία αίμη b , μία αίμη α_3 , τρία άτομα χαλκού, κανάλια μεταφοράς πρωτονίων, ηλεκτρονίων και οξυγόνου, μια δέσμη από 15 διαμεμβρανικές έλικες και ένα μικρό περιπλασμικό τομέα. Αποτελεί το βασικότερο ένζυμο της πρωτεϊνικής μεμβράνης του αναπνευστικού συμπλέγματος σε αερόβιους μικροοργανισμούς, καθώς έχει την ικανότητα να καταλύει την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό, την ίδια στιγμή που οξειδώνεται. Η αναγωγή του οξυγόνου είναι συζευγμένη με την παραγωγή μίας κινητικής δύναμης πρωτονίων που οδηγεί στην σύνθεση του ATP.

Στόχος της παρούσας φασματοσκοπικής μελέτης, είναι η παρατήρηση της δέσμευσης του μεθανικού και του αιθανικού ανιόντος στο διπυρηνικό κέντρο του κυτοχρώματος ba_3 . Η δέσμευση του μεθανικού ανιόντος σε άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες είναι ακόμα αμφιλεγόμενη και ως προς τον τρόπο, αλλά και ως προς την οξειδωτική κατάσταση του ενζύμου. Μέσω της χρήσης φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) και υπερύθρου (FTIR) είμαστε σε θέση να παρατηρήσουμε την πιθανή συναρμογή των υποκαταστατών, ως δέσμευση είτε στο ενεργό κέντρο, είτε σε μία δευτεροταγή περιοχή (κοιλότητα) ασθενούς δέσμευσης. Τέτοιου είδους κοιλότητες παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση του ενζύμου, καθώς ελέγχουν θερμοδυναμικά και κινητικά την εξέλιξη της αντίδρασης. Οι δύο υποκαταστάτες που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μελέτη, μπορούν να αποτελέσουν ανιχνευτές των ηλεκτροστατικών και δυναμικών αλληλεπιδράσεων που υφίστανται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι στο ορατό-υπεριώδες και στο υπέρυθρο, αποτελούν αντίστοιχα τις πλέον διαδεδομένες και αξιόπιστες τεχνικές ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, ικανές να δώσουν επιλεκτικές απαντήσεις στην διερεύνηση της δομής της ύλης, όχι μόνο σε μοριακό, αλλά ακόμα και σε ατομικό επίπεδο.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μέσω της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) δείχνουν μία αλληλεπίδραση τόσο του μεθανικού, όσο και του αιθανικού ανιόντος με το διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου. Οι ενδείξεις είναι ίδιες τόσο για την

ανηγμένη, όσο και την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου και αποδίδονται στην ασθενή δέσμευση των υποκαταστατών σε μία εσωτερική περιοχή-κοιλότητα της πρωτεΐνης. Τα FTIR αποτελέσματα, μέσω της ανίχνευσης χαρακτηριστικών δονήσεων, είναι συμβατά με την αποπρωτονιωμένη μορφή των δύο υποκαταστατών, οι οποίοι υπόκεινται σε ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται περιμετρικά αυτής της κοιλότητας. Οι δύο αυτοί υποκαταστάτες, μέσω των παρατηρούμενων μετατοπίσεων των δονήσεων έκτασης στο υπέρυθρο φάσμα, λειτουργούν ως ανιχνευτές αυτών των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δίνουν σημαντικές πληροφορίες για το εγγύς περιβάλλον του διπυρηνικού κέντρου του ενζύμου.

Λέξεις κλειδιά: $\beta\alpha_3$ -κυτοχρωμική οξειδάση, μεθανικό ανιόν, αιθανικό ανιόν, φασματοσκοπία υπεριώδους, φασματοσκοπία υπέρυθρου, συναρμογή, υποκαταστάτης.

ABSTRACT

The ba_3 -cytochrome oxidase, belongs to the superfamily of heme-copper oxidases that has been isolated from the bacterium *Thermus thermophilus*. It is an enzyme of approximately 85 kDa, which is composed of 764 residues, one heme b , one heme a_3 , three atoms of copper, proton transport channels, electrons and oxygen, a set of 15 transmembrane helices and a small periplasmic domain. It is the most important enzyme of the respiratory membrane protein complex of aerobic microorganisms, since it has the ability to catalyze the four electron reduction of molecular oxygen to water, at the same time it being oxidized. The reduction of oxygen is coupled to produce a kinetic power proton leading to the synthesis of ATP.

The aim of this spectroscopic study is the observation of the binding of methanic and ethanoic anion to the binuclear center of cytochrome ba_3 . Methane anion binding to other cytochrome oxidases is still controversial as far as the way, but also the oxidation state of the enzyme. Through the use of Ultraviolet-visible spectroscopy (UV/Vis) and infrared (FTIR) we are able to observe the possible joining of ligands (substituents), either as a commitment to the active site, or to a secondary area (cavity) capture patient. Such kinds of cavities are essential to the catalytic activity of the enzyme, as they control thermodynamic and kinetic progress of the reaction. The two substituents used in this study may serve as detectors of the electrostatic and dynamics interactions present in the active site of the protein. The spectrophotometric methods in the visible-ultraviolet and infrared, are respectively the most widely used and reliable techniques for qualitative and quantitative analysis, capable to give selective responses to investigate the structure of matter at molecular and individual level.

The results of the study through Ultraviolet-visible (UV/Vis) spectroscopy, show an interaction of both methane and ethane anion with the binuclear site of the enzyme. The indications are the same for both reduced and oxidized form of the enzyme and are attributed to weak binding of ligands to an inner-cavity area of the protein. The FTIR results, by detecting characteristic vibrations, are compatible with the deprotonated form of the two substituents which are subjected to interactions of electrostatic nature with amino acid residues located around this cavity. The two ligands, via the observed vibrational shifts in the infrared spectrum, operate as

detectors of these electrostatic interactions and give important information about the immediate environment of the active binuclear center of the enzyme.

Keywords: *b_α3*-cytochrome oxidase, methane anion, ethane anion, ultraviolet spectroscopy, infrared spectroscopy, coordination, ligand.