

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «UV/Vis και FTIR φασματοσκοπική μελέτη της αιμοσφαιρίνης (Hb), της οξειδάσης του θειώδους (SOR) και της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP)» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Είχε συνολική διάρκεια ενός έτους και διεξήχθη υπό την επίβλεψη των Δρ. Κωνσταντίνου Βαρώτση και Δρ. Κωνσταντίνου Κουτσοπάκη.

Σε έναν αρχικό φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό μελετήσαμε την δέσμευση του κυανίου (CN⁻) στην αιμοσφαιρίνη (Hb) με την χρήση της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) και υπερύθρου (FTIR), σε μία προσπάθεια προσομοίωσης της φυσιολογικής λειτουργίας της πρωτεΐνης η οποία είναι η δέσμευση και μεταφορά του μοριακού οξυγόνου (O₂) στο αίμα. Το κυάνιο δεσμεύεται ισχυρά στον αιμικό σίδηρο με έναν τρόπο ο οποίος είναι εξαρτώμενος της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη. Μέσω της μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας στην δημιουργία του συμπλόκου Hb-CN συμπεράναμε ότι η δέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη είναι μεγαλύτερη όσο η θερμοκρασία μειώνεται. Αυτό οφείλεται πιθανότατα σε θερμοδυναμικούς παράγοντες, όπως η εντροπία (ΔS) και η ενθαλπία (ΔH) σχηματισμού του συμπλόκου Hb-CN.

Βασικό αντικείμενο της εργασίας ήταν η φασματοσκοπική μελέτη της οξειδοαναγωγής του θειώδους (SOR) με την χρήση της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis). Η SOR οξειδάση καταλύει την μετατροπή του θειώδους σε θειικό, μίας αντίδρασης που συμβαίνει με τη χρήση του συμπαραγόντα του μολυβδαινίου (Moco). Σε έναν πρώτο οπτικό χαρακτηρισμό η SOR μπορεί και μετατρέπεται από την οξειδωμένη (Mo⁶⁺) στην ανηγμένη της (Mo⁴⁺) μορφή, αλλά δεν είναι ικανή να δεσμεύσει το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Αντίθετα δεσμεύει και σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), κάτι αναμενόμενο αφού είναι το φυσιολογικό υπόστρωμα του ενζύμου. Επιπλέον του H₂O₂, η SOR δεσμεύει και το μοριακό οξυγόνο O₂, αλλά το σχηματιζόμενο σύμπλοκο σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Συνοπτικά απαιτείται περαιτέρω φασματοσκοπικός (UV/Vis και FTIR) χαρακτηρισμός της οξειδοαναγωγής του θειώδους, καθώς η παρουσία του συμπαραγόντα

μολυβδαινίου (Moco) την καθιστά ως μία όχι «συνηθισμένη» αιμοπρωτεΐνη με ιδιαίτερη χημεία.

Δεύτερο βασικό μέρος της εργασίας ήταν η μελέτη της υπεροξειδάσης του χρένου (horseradish peroxidase, HRP) με την χρήση της δονητικής FTIR φασματοσκοπίας. Χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτη «ανιχνευτή» το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα CO αποκτήσαμε πληροφορίες για τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου του ενζύμου, τόσο σε κατάσταση ισορροπίας, όσο και σε μεταβατική κατάσταση (φωτόλυση του CO) σε ένα εύρος pH 7.0-9.8. Σε αυτό το εύρος αναμένουμε φαινόμενα αποπρωτονίωσης των distal αμινοξέων της αίμης His42 και Arg38, τα οποία πιθανότατα συμμετέχουν και στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεταβολές τόσο στην περιοχή απορρόφησης του δεσμού του CO ($1900-2200\text{ cm}^{-1}$), όσο και στην περιοχή απορρόφησης των αμινοξικών καταλοίπων ($1200-1700\text{ cm}^{-1}$). Αυτές οι μεταβολές είναι συμβατές με φαινόμενα πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης αμινοξέων. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη με την τεχνική step-scan FTIR για την κινητική μελέτη των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της HRP υπεροξειδάσης.