



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μελέτη των Αντιδράσεων Οξειδασών του
Κυτοχρώματος *c* με CN^- , N_3^- και NO_2^- με τη Χρήση
Φασματοσκοπίας Υπερύθρου και Συντονισμού Raman

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΛΛΗΣ

2015



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μελέτη των Αντιδράσεων Οξειδασών του
Κυτοχρώματος *c* με CN^- , N_3^- και NO_2^- με τη Χρήση
Φασματοσκοπίας Υπερύθρου και Συντονισμού Raman

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΛΛΗΣ

Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού
τίτλου σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κύπρου

2015

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΛΛΗΣ

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

Υποψήφιος Διδάκτορας: Ανδρέας Λουλλής

Τίτλος Διατριβής: “ Μελέτη των Αντιδράσεων Οξειδασών του Κυτοχρώματος c με CN^- , N_3^- και NO_2^- με τη Χρήση Φασματοσκοπίας Υπερύθρου και Συντονισμού Raman ”

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού διπλώματος στο Τμήμα Χημείας και εγκρίθηκε στις 14 Οκτωβρίου 2015 από τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ερευνητική Σύμβουλος: Επίκ. Καθηγήτρια Ευτυχία Πινακουλάκη, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

Μέλος Επιτροπής: Αναπλ. Καθηγητής Ιωάννης Πασχαλίδης (Πρόεδρος), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

Μέλος Επιτροπής: Αναπλ. Καθηγήτρια Σοφία Χαραλάμπους-Hayes, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου

Υπογραφή:

Μέλος Επιτροπής: Επίκ. Καθηγητής Αλέξιος Βλάμης (Εξωτερικό Μέλος), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Υπογραφή:

Μέλος Επιτροπής: Επίκ. Καθηγητής Νίκος Κουρκουμέλης (Εξωτερικό Μέλος), Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Υπογραφή:

Υπεύθυνη δήλωση

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοφυσικής και Βιοαναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου.

Ανδρέας Λουλλής

.....

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν κατά τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών, έτσι ώστε να καταφέρω να πραγματοποιήσω τον προσωπικό αυτό στόχο.

Πρώτο απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική μου σύμβουλο Επίκουρη Καθηγήτρια Δρ. Ευτυχία Πινακουλάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, παραχωρώντας μου την ευκαιρία να εργαστώ στο Εργαστήριο Βιοφυσικής και Βιοαναλυτικής Χημείας για την εκπλήρωση των διδακτορικών μου σπουδών. Την ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια, τόσο κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής. Οι ανεκτίμητες συμβουλές της με βοήθησαν να μάθω τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί το εργαστήριο και να δουλέω πάντοτε για το καλύτερο αποτέλεσμα. Επίσης, η υποστήριξη και η συμπαράσταση που μου πρόσφερε τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο ήταν καταλυτικός παράγοντας στο να γίνω καλύτερος ερευνητής και άνθρωπος και να καταφέρω να επιτύχω τους στόχους μου.

Αξίζει να ευχαριστήσω τα μέλη της εσωτερικής εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Πασχαλίδη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σοφία Χαραλάμπους-Hayes του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου για τη συμμετοχή τους στις επιτροπές αξιολόγησης της ερευνητικής προόδου μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Επίκουρο Καθηγητή Αλέξιο Βλάμη του Πανεπιστημίου Πατρών και Επίκουρο Καθηγητή Νίκο Κουρκουμέλη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την αποδοχή τους να συμμετάσχουν ως εξωτερικά μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Tewfik Soulimane από το Πανεπιστήμιο του Limerick στην Ιρλανδία, για την τρίμηνη φιλοξενία στο εργαστήριό του έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν τα πειράματα απομόνωσης των πρωτεϊνών. Επίσης, ευχαριστώ το μεταδιδακτορικό φοιτητή Dr. Mohamed Noor για την καθοδήγηση και το καλό κλίμα συνεργασίας που είχαμε κατά τη διάρκεια της παραμονής μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στις συμφοιτήτριές μου στο εργαστήριο, Άντρη Ιωάννου, Αλεξία Λάμπρου, Αντιγόνη Ανδρέου και Μαριλένα Πήττα για την άψογη συνεργασία που είχαμε και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Άντρη Ιωάννου για την υποστήριξη που μου πρόσφερε αυτά τα χρόνια και που ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει με όποιο τρόπο μπορούσε. Επίσης, ευχαριστώ την Αλεξία Λάμπρου για τη νότα χαράς που έδινε με το δικό της τρόπο στο εργαστήριο. Περισσότερο θα ήθελα

να ευχαριστήσω τον πολύ καλό μου φίλο και συμφοιτητή, Ιωάννη Σταύρου για τις συζητήσεις που είχαμε τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και τις λύσεις που μου πρότεινε επί των θεμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Αρτέμη, Δημήτρη, Μαρία, Νατάσα, Κατερίνα και Ιωάννα που ο καθένας με το δικό του τρόπο προσφέρει χαρά στη ζωή μου, καθώς επίσης και όλα τα παιδιά στα γειτονικά εργαστήρια της πτέρυγας για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου. Ευχαριστώ τη μητέρα μου Μαρία και τον πατέρα μου Σταύρο για την πίστη που έχουν σε εμένα και που υποστηρίζουν τις επιλογές που κάνω. Τους ευχαριστώ για τη ψυχική και οικονομική υποστήριξη καθώς επίσης και για τις αξίες και το ήθος που μου δίδαξαν. Επίσης, ευχαριστώ τα αδέρφια μου Χρυστάλλα, Παναγιώτη, Παρασκευή και Ειρήνη και το γαμπρό μου Δημήτρη που είναι πάντα δίπλα μου και προσφέρουν το καλύτερο περιβάλλον στο σπίτι.

Περίληψη

Η κυτταρική αναπνοή είναι μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες των ζώντων οργανισμών, καθώς οδηγεί στην παραγωγή ATP. Η οξειδάση του κυτοχρώματος *c* αποτελεί το τελικό ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας, καταλύοντας την αντίδραση αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό και αντλώντας ταυτόχρονα πρωτόνια διαμέσου της μεμβράνης για τη δημιουργία ηλεκτροχημικού δυναμικού. Στην οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών ανήκουν οι οξειδάσες *ba₃* από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus* (κατηγορία B) και *cbb₃* από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* (κατηγορία C).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη των αντιδράσεων εξωγενών υποκαταστατών (CN^- , N_3^- , NO_2^-) με την *ba₃* οξειδάση και στη μελέτη της αντίδρασης της *cbb₃* οξειδάσης με το NO_2^- με τη χρήση φασματοσκοπίας απορρόφησης UV/Vis, FTIR και συντονισμού Raman.

Στη μελέτη της αντίδρασης του CN^- με την οξειδωμένη *ba₃* οξειδάση, τα πειράματα FTIR αποκάλυψαν τον αρχικό σχηματισμό γέφυρας μεταξύ του CN^- και των δύο μετάλλων του ενεργού κέντρου (αίμη $a_3 \text{Fe}^{3+}\text{-C}\equiv\text{N-Cu}_B^{2+}$) με χαρακτηριστική συχνότητα δόνησης $\nu(\text{CN})$ στους 2152 cm^{-1} . Η αρχικά σχηματιζόμενη γέφυρα αντικαθίσταται από το σύμπλοκο αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}\text{-CN}^-$, το οποίο χαρακτηρίστηκε από τη δόνηση $\nu(\text{CN})$ στους 2074 cm^{-1} . Φωτοδιάσπαση του συμπλόκου αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}\text{-CN}^-$ οδήγησε στην εμφάνιση κορυφής στους 2146 cm^{-1} , η οποία αποδόθηκε στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $\text{Cu}_B^{2+}\text{-CN}^-$. Περαιτέρω, αναλύθηκε η επίδραση του περιβάλλοντος του ενεργού κέντρου στα σχηματιζόμενα σύμπλοκα.

Η μελέτη της αντίδρασης του N_3^- με την οξειδωμένη μορφή της *ba₃* οξειδάσης, φανέρωσε το σχηματισμό του συμπλόκου $\text{Cu}_B^{2+}\text{-N}_3^-$, το οποίο χαρακτηρίζεται από την ασύμμετρη δόνηση $\nu(\text{N}=\text{N}=\text{N})^{\text{asym}}$ στους 2061 cm^{-1} . Από τα πειράματα της ανταγωνιστικής δέσμευσης N_3^-/CN^- επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός του συμπλόκου $\text{Cu}_B^{2+}\text{-N}_3^-$, καθώς επίσης και η δέσμευση του N_3^- σε κατάλοιπα της πρωτεΐνης.

Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* των θηλαστικών διαθέτουν δραστηριότητα αναγωγής του NO_2^- σε υποξικές και ανοξικές συνθήκες, ανάγωντας το NO_2^- σε NO. Στην προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού δράσης των αιμοχαλκοξειδασών ως αναγωγάσες των νιτρωδών, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός της δομής του συμπλόκου της *ba₃* οξειδάσης με το NO_2^- με φασματοσκοπία συντονισμού Raman. Τα αποτελέσματα μας απέδειξαν το σχηματισμό ενός νίτρο-συμπλόκου της αίμης a_3 στο ενεργό διμεταλλικό κέντρο αίμης/ Cu_B με χαρακτηριστικές δονήσεις $\nu(\text{Fe-NO}_2^-)$ και

$\delta(\text{ONO})$ στους 568 και 786 cm^{-1} , αντίστοιχα. Επιπλέον, αναλύθηκε ο ρόλος του εγγύς και του μακρινού περιβάλλοντος της αίμης a_3 στη δομή και δραστηριότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου.

Η μελέτη της αντίδρασης της cb_3 οξειδάσης με το NO_2^- με φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR απέδειξε ότι το NO_2^- ανάγεται σε N_2O μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}\text{-NO}$, που χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις $\delta(\text{Fe-N-O})$ και $\nu(\text{NO})$ στους 555 και 1592 cm^{-1} , αντίστοιχα. Η cb_3 οξειδάση είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών που αναγνωρίστηκε ότι διαθέτει δραστηριότητα αναγωγής των νιτρικών και του μονοξειδίου του αζώτου.

Abstract

Cytochrome *c* oxidase is the terminal enzyme in the respiratory chain. The enzyme catalyzes the reduction of molecular oxygen to water and uses the free energy that is produced to translocate protons across the inner mitochondrial (or bacterial) membrane generating the transmembrane electrochemical potential that is used by ATP synthase. The *ba*₃ oxidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* (B-family) and *cbb*₃ oxidase from *Pseudomonas stutzeri* (C-family) are members of the heme/copper oxidase superfamily.

The research goal of the present PhD thesis was to investigate the reactions of *ba*₃ oxidase from *T. thermophilus* with a variety of exogenous ligands (CN⁻, N₃⁻, NO₂⁻) and the reaction of *cbb*₃ oxidase from *P. stutzeri* with NO₂⁻ by employing UV/Vis, FTIR and RR spectroscopies.

In the reaction of oxidized *ba*₃ oxidase with cyanide the FTIR experiments revealed that the initially formed heme *a*₃ Fe³⁺-C≡N-Cu_B²⁺ species with $\nu(\text{CN})$ frequency at 2152 cm⁻¹ was replaced by a photolabile complex with a frequency at 2075 cm⁻¹ characteristic of heme *a*₃ Fe²⁺-CN⁻. Photolysis of the heme *a*₃ Fe²⁺-CN⁻ adduct produced a band at 2146 cm⁻¹ attributed to the formation of a transient Cu_B²⁺-CN⁻ complex. The role of the active site protein environment in the formation of the characterized species has been discussed.

The study of the reaction of oxidized *ba*₃ oxidase with N₃⁻ showed the formation of the Cu_B²⁺-N₃⁻ complex, characterized by the $\nu(\text{N}=\text{N}=\text{N})^{\text{asym}}$ at 2061 cm⁻¹. A secondary protein binding site for N₃⁻ has been determined by the N₃⁻/CN⁻ ligand competition experiments.

Recent studies indicate that the mitochondrial cytochrome *c* oxidase is able to catalyze the reduction of nitrite to nitric oxide in mammals. In an effort to investigate the nitrite reductase function of cytochrome *c* oxidases, we have investigated the reaction of *ba*₃ oxidase with NO₂⁻. The resonance Raman results revealed the formation of a ferrous heme *a*₃-nitro complex in the binuclear heme *a*₃/Cu_B center that is characterized by the Fe-NO₂ stretching vibration at 568 cm⁻¹ and bending NO₂ mode at 786 cm⁻¹. The distinct roles of the distal and proximal heme protein environments in determining the structure of the heme-bound nitrite species are outlined.

We have investigated the reaction of nitrite with the C-family *cbb*₃ oxidase from *P. stutzeri* under reducing anaerobic conditions by employing resonance Raman and FTIR spectroscopy. We provide experimental evidence that *cbb*₃ oxidase catalyzes the reduction of NO₂⁻ to N₂O through the formation of a six-coordinate ferrous heme *b*₃ Fe²⁺-NO adduct characterized by the $\delta(\text{Fe-N-O})$ and $\nu(\text{NO})$ at 555 and 1592 cm⁻¹, respectively. The *cbb*₃

oxidase is the first member of the heme/copper oxidase family identified as capable of functioning both as nitrite and nitric oxide reductase.

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΜΗΤΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Υπεύθυνη Δήλωση	i
Ευχαριστίες	ii
Περίληψη	iv
Abstract	vi
Περιεχόμενα	viii
Κατάλογος Σχημάτων	xi
Κατάλογος Πινάκων	xxiii
Πίνακας Συντμήσεων και Συμβόλων	xxiv
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή - Στόχος και Πρωτοτυπία	1
1.1 Εισαγωγή	2
1.2 Στόχος και Πρωτοτυπία	3
1.3 Βιβλιογραφία	3
Κεφάλαιο 2 – Θεωρητικό Υπόβαθρο	7
2.1 Οξειδάσες του Κυτοχρώματος <i>c</i>	8
2.1.1 Δομή Οξειδασών του Κυτοχρώματος <i>c</i>	9
2.1.2 Κανάλια Άντλησης Πρωτονίων	11
2.1.3 Καταλυτικός Κύκλος	15
2.2 Κυτοχρωμική Οξειδάση <i>ba₃</i>	18
2.3 Κυτοχρωμικές Οξειδάσες <i>cbb₃</i>	25
2.4 Δράση Οξειδασών του Κυτοχρώματος <i>c</i> ως Αναγωγάσες των Νιτρωδών	30
2.5 Βιβλιογραφία	35
Κεφάλαιο 3 – Μεθοδολογία	42
3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου	43
3.2 Φασματοσκοπία Raman	47
3.2.1 Κλασσική Θεωρία Φαινομένου Raman	48
3.2.2 Κβαντική Θεωρία Φαινομένου Raman	51
3.2.3 Σκέδαση Συντονισμού Raman	51
3.2.4 Εφαρμογή Φασματοσκοπίας Συντονισμού Raman στη Μελέτη Αιμοπρωτεϊνών	54
3.3 Βιβλιογραφία	56
Κεφάλαιο 4 – Πειραματικό Μέρος	59
4.1 Χημικές Ενώσεις και Ρυθμιστικά Διαλύματα	60
4.2 Έκφραση και Απομόνωση Πρωτεϊνών	60

4.2.1. Κυτοχρωμική Οξειδάση ba_3	60
4.2.2 Κυτοχρωμική Οξειδάση cbb_3	61
4.3 Πειραματικές Διατάξεις	58
4.3.1 Πειραματική Διάταξη FTIR	62
4.3.2 Πειραματική Διάταξη Raman	63
4.4 Πειραματικές Διαδικασίες	64
4.4.1 Μελέτη της Αντίδρασης ba_3 Οξειδάσης/ CN^-	64
4.4.2 Μελέτη Δέσμευσης N_3^- στην ba_3 Οξειδάση	65
4.4.3 Μελέτη της Αντίδρασης ba_3 Οξειδάσης/ NO_2^-	65
4.4.4 Μελέτη της Δράσης Αναγωγάσης NO_2^- και NO της cbb_3 Οξειδάσης	66
4.5 Βιβλιογραφία	66
Κεφάλαιο 5 – Μεταφορά Υποκαταστατών στο Διπυρηνικό Ενεργό Κέντρο της ba_3 Οξειδάσης από το Βακτήριο <i>T. thermophilus</i>: FTIR Ανίχνευση των Συμπλόκων Αίμης a_3^{2+}-CN και Cu_B^{2+}-CN	
	67
5.1 Εισαγωγή	68
5.2 Αποτελέσματα	70
5.3 Συζήτηση	75
5.4 Βιβλιογραφία	80
Κεφάλαιο 6 – Μελέτη Δέσμευσης N_3^- στην ba_3 Οξειδάση με Φασματοσκοπία FTIR και Συντονισμού Raman	
	84
6.1 Εισαγωγή	85
6.2 Αποτελέσματα	87
6.3 Συζήτηση	91
6.4 Βιβλιογραφία	93
Κεφάλαιο 7 –Χαρακτηρισμός της Δομής του Συμπλόκου Νίτρο-Αίμης a_3 στην ba_3 Οξειδάση με Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman	
	95
7.1 Εισαγωγή	96
7.2 Αποτελέσματα	97
7.3 Συζήτηση	103
7.4 Βιβλιογραφία	106
Κεφάλαιο 8 – Μελέτη της Δράσης Αναγωγάσης του Νιτρώδους Ιόντος και του Μονοξειδίου του Αζώτου της cbb_3 Οξειδάσης	
	109
8.1 Εισαγωγή	110

8.2 Αποτελέσματα	111
8.3 Συζήτηση	119
8.4 Βιβλιογραφία	123
Κεφάλαιο 9 – Συμπεράσματα - Μελλοντική Εργασία	127
9.1 Συμπεράσματα	128
9.2 Μελλοντική Εργασία	129

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΛΙΗΣ

Κατάλογος Σχημάτων	Σελ.
Σχήμα 2.1.1 Σχηματική αναπαράσταση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που περιλαμβάνει τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Complexes I-IV) και της ATP-συνθάσης (Complex V). Η οξειδάση του κυτοχρώματος <i>c</i> αναφέρεται ως Complex IV.	8
Σχήμα 2.1.1.1 Κρυσταλλική δομή της A . aa_3 βόειας οξειδάσης με τις 13 υπομονάδες και της B . aa_3 από το βακτήριο <i>R. sphaeroides</i> με τις 4 υπομονάδες. C . και D . Διάταξη του διμεταλλικού κέντρου (υψηλού σπιν αίμη α_3 και Cu_B), της χαμηλού σπιν αίμης α και του διπυρηνικού κέντρου Cu_A στην aa_3 βόεια οξειδάση (C) και στην aa_3 οξειδάση από το βακτήριο <i>R. sphaeroides</i> (D). Οι υπομονάδες I, II και III που σχηματίζουν τον κύριο πυρήνα του ενζύμου απεικονίζονται με κόκκινο, πράσινο και μπλε αντίστοιχα. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από τα αρχεία PDB 1OCC και PDB 1M56.	10
Σχήμα 2.1.2.1 Κρυσταλλική δομή της οξειδάσης του κυτοχρώματος <i>c</i> από βόεια καρδιά όπου επισημαίνονται τα τρία κανάλια άντλησης πρωτονίων K, D και H. Τα κανάλια σχηματίζονται από τα κατάλοιπα αμινοξέων που αναγράφονται και τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους και με μόρια νερού που απεικονίζονται με τελείες. Οι ομάδες αίμης απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και τα ιόντα χαλκού με πορτοκαλί. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1OCC.	12
Σχήμα 2.1.2.2 Φυλογενετικό δέντρο των αιμοχαλκοξειδασών όπου παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των οξειδασών του κυτοχρώματος στις κατηγορίες A (A1 και A2), B και C με βάση την ακολουθία των αμινοξέων τους και τα κανάλια άντλησης πρωτονίων που περιέχουν. Η κατηγορία A περιέχει τα D και K κανάλια, όπου στην υποκατηγορία A1	

παρατηρείται το κατάλοιπο γλουταμινικού, Ε το οποίο αντικαθίσταται από τα κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης, YS στην υποκατηγορία A2. Οι κατηγορίες Β και C περιέχουν ένα κανάλι που αναγράφεται σε εισαγωγικά για να δείξει ότι είναι ανάλογο του Κ καναλιού.

13

Σχήμα 2.1.2.3 Σχηματική αναπαράσταση των **A. aa₃** (κατηγορία A) και **B. ba₃** (κατηγορία B) οξειδασών όπου επισημαίνονται τα κατάλοιπα αμινοξέων που σχηματίζουν τα κανάλια άντλησης πρωτονίων στις δύο κατηγορίες καθώς επίσης η πορεία μεταφοράς πρωτονίων από την αρνητική πλευρά της μεμβράνης προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Στην κατηγορία A αιμοχαλκοξειδασών η μεταφορά και η άντληση πρωτονίων επιτυγχάνεται μέσω των D και K καναλιών ενώ στην κατηγορία B γίνεται μέσω του K καναλιού που σχηματίζεται σε ανάλογη θέση με αυτή της κατηγορίας A αλλά από διαφορετικά αμινοξέα. Με καφέ χρώμα απεικονίζεται η υπομονάδα I που περιέχει το διμεταλλικό κέντρο και τη χαμηλού σπιν αίμη. Με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζεται η υπομονάδα II που περιέχει το διπυρηνικό κέντρο Cu_A και με πορτοκαλί απεικονίζεται το κυτόχρωμα *c*. Επίσης, παρουσιάζεται η πορεία που ακολουθούν τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c* προς το ενεργό κέντρο.

14

Σχήμα 2.1.3.1 Στάδια του καταλυτικού κύκλου των αιμοχαλκοξειδασών με τις πιθανές δομές των ενδιάμεσων ανά στάδιο. Στα πλαίσια των πιθανών δομών οι μεταβολές των ομάδων του ενεργού κέντρου (αίμη *a₃* και Cu_B) επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα και οι μεταβολές των υπόλοιπων ομάδων (αίμη *a*, Cu_A και Tyr) με πράσινο.

16

Σχήμα 2.2.1 A. Κρυσταλλική δομή της *ba₃* οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* όπου επισημαίνονται οι υπομονάδες I, II και

	<p>Πα, από τις οποίες αποτελείται. Η υπομονάδα I απεικονίζεται με κόκκινο, η υπομονάδα II με μπλε και η υπομονάδα Πα με πράσινο B. Κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδάσης όπου επισημαίνεται η διάταξη του διμεταλλικού κέντρου (υψηλού σπιν αίμη a_3 και Cu_B), της χαμηλού σπιν αίμης b και του διπυρηνικού κέντρου Cu_A. Οι ομάδες αίμης a_3 και b και ο Cu_B βρίσκονται στην υπομονάδα I, και το διπυρηνικό κέντρο Cu_A στην υπομονάδα II. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.</p>	18
Σχήμα 2.2.2	Δομή αιμών a , a_3 και b .	19
Σχήμα 2.2.3	Σχηματική αναπαράσταση του διμεταλλικού κέντρου αίμης a_3/Cu_B της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες του. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.	19
Σχήμα 2.2.4	Σχηματική αναπαράσταση A . της αίμης b και B . του Cu_A της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες τους. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.	20
Σχήμα 2.2.5	Κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδάσης όπου επισημαίνονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν το ανάλογο K κανάλι και η πορεία που ακολουθούν τα πρωτόνια προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι ομάδες αίμης και με πορτοκαλί τα ιόντα χαλκού. Η υπομονάδα I απεικονίζεται με ασθενές κόκκινο, η υπομονάδα II με ασθενές μπλε και η υπομονάδα Πα με ασθενές πράσινο. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.	22
Σχήμα 2.2.6	Κοιλότητες μεταφοράς O_2 προς το ενεργό κέντρο A . της ba_3 οξειδάσης από το βακτήριο <i>T. thermophilus</i> και B . της aa_3 οξειδάσης από το βακτήριο <i>R. sphaeroides</i> . Τα σημεία	

εισόδου του O₂ επισημαίνονται με τόξα. Η κοιλότητα στην ba₃ οξειδάση έχει σχήμα Y, παρουσιάζει δυο σημεία εισόδου και δεν εμφανίζει στένωση. Στην aa₃ οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides* υπάρχει μόνο ένα σημείο εισόδου του O₂ και παρουσιάζεται στένωση λόγω της παρουσίας των καταλοίπων Phe282 και Trp172.

23

Σχήμα 2.3.1

A. Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων CcoNOPQ που απαρτίζουν τις cbb₃ οξειδάσες **B.** Διάταξη των προσθετικών ομάδων αίμης και Cu_B στις υπομονάδες CcoNOP. Η υπομονάδα CcoN περιέχει το διμεταλλικό κέντρο υψηλού σπιν αίμης b₃/Cu_B και τη χαμηλού σπιν αίμη b. Η υπομονάδα CcoO περιέχει μια ομάδα αίμης c και η υπομονάδα CcoP δύο ομάδες αίμης c.

26

Σχήμα 2.3.2

A. Κρυσταλλική δομή της cbb₃ οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* όπου επισημαίνονται οι υπομονάδες CcoNOPQ. Η υπομονάδα CcoN απεικονίζεται με κόκκινο, η CcoO με μπλε, η CcoP με πράσινο και η CcoQ με κίτρινο. **B.** Κρυσταλλική δομή της cbb₃ οξειδάσης όπου επισημαίνεται η διάταξη των ομάδων αίμης και Cu_B. Οι ομάδες αίμης b₃ και b και ο Cu_B βρίσκονται στην υπομονάδα CcoN. Η υπομονάδα CcoO περιέχει μια ομάδα αίμης c και η υπομονάδα CcoP δύο ομάδες αίμης c. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.

27

Σχήμα 2.3.3

Σχηματική αναπαράσταση **A.** του διμεταλλικού κέντρου αίμης b₃/Cu_B της υπομονάδας CcoN, **B.** της χαμηλού σπιν αίμης b της υπομονάδας CcoN, **C.** της ομάδας αίμης c της υπομονάδας CcoO και **D.** των ομάδων αίμης c της υπομονάδας CcoP της cbb₃ οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* με τους υποκαταστάτες τους. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.

28

Σχήμα 2.3.4	Δομή κοιλοτήτων μεταφοράς O_2 , πρωτονίων και απελευθέρωσης νερού μεταξύ του ενεργού κέντρου, του περιπλάσματος και της μεμβράνης.	29
Σχήμα 2.3.5	Κρυσταλλική δομή της <i>cbb₃</i> οξειδάσης από το βακτήριο <i>P. stutzeri</i> όπου επισημαίνονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν το ανάλογο K κανάλι και η πορεία που ακολουθούν τα πρωτόνια προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι ομάδες αίμης και με πορτοκαλί τα ιόντα χαλκού. Η υπομονάδα CcoN απεικονίζεται με ασθενές κόκκινο, η υπομονάδα CcoO με ασθενές μπλε και η υπομονάδα CcoP με ασθενές πράσινο. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.	30
Σχήμα 2.4.1	Καταλυτικός κύκλος του αζώτου	31
Σχήμα 2.4.2	Σχηματική αναπαράσταση της <i>N</i> -νίτριτο δέσμευσης στις <i>cd₁NiR</i> και <i>O,O</i> -διδοντικής νίτριτο δέσμευσης στις <i>CuNiR</i> αναγωγάσες των νιτροδών.	32
Σχήμα 2.4.3	Τα δύο μονοπάτια σχηματισμού του NO στα θηλαστικά. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) καταλύουν την αντίδραση οξείδωσης της L-αργινίνης για να παραχθεί NO. Σε συνθήκες υποξίας η δράση των NOS αναστέλλεται και το NO παράγεται από την αναγωγή του NO_2^- .	33
Σχήμα 2.4.4	Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης αναγωγής του NO_2^- που καταλύεται από διάφορες πρωτεΐνες των θηλαστικών.	33
Σχήμα 2.4.4	Σχηματική αναπαράσταση της <i>O</i> -νίτρο δέσμευσης στη μυοσφαιρίνη.	34

Σχήμα 3.1.1	Σχηματική αναπαράσταση A. του αρμονικού και B. του μη αρμονικού μοντέλου της δυναμικής ενέργειας διατομικού μορίου.	44
Σχήμα 3.1.2	Σχηματική αναπαράσταση του συμβολομέτρου Michelson	45
Σχήμα 3.1.3	Φάσεις των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων από το στατικό και κινητό κάτοπτρο σε διαφορετικές τιμές οπτικής καθυστέρησης: (a) μηδενική διαφορά, (b) διαφορά $\frac{1}{2}$ μήκους κύματος, (c) διαφορά ενός μήκους κύματος.	46
Σχήμα 3.2.1.1	Σχηματικό διάγραμμα της σχέσης μεταξύ των διαδικασιών απορρόφησης υπερύθρου (IR), σκέδασης Rayleigh και Raman (Stokes και anti-Stokes) και σκέδασης συντονισμού Raman. Η απορρόφηση υπερύθρου είναι διαδικασία ενός φωτονίου ενώ οι υπόλοιπες είναι διαδικασίες δύο φωτονίων. Τα ν_0 και ν_{vib} αναφέρονται στη συχνότητα της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, αντίστοιχα.	49
Σχήμα 3.2.4.1	Σχηματικό διάγραμμα των ενεργειακών επιπέδων με τις μεταβάσεις τους και φάσμα απορρόφησης υπεριώδους-οράτου ομάδας αίμης όπου επισημαίνονται οι μεταβάσεις στην περιοχή Soret, B και στη ζώνη Q, Q_1 και Q_0 .	55
Σχήμα 3.2.4.2	Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων δονήσεων του πορφυρινικού δακτυλίου.	56
Σχήμα 4.3.1.1	Πειραματική διάταξη IR που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αντιδράσεων της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες και των πειραμάτων φωτοδιάσπασης των συμπλόκων.	62
Σχήμα 4.3.2.1	Πειραματική διάταξη Raman που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αντιδράσεων των ba_3 και cbb_3 οξειδασών με τους υποκαταστάτες.	63

- Σχήμα 5.2.1** Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (πλαίσιο A, φάσμα a), της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (πλαίσιο A, φάσμα b), της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης (πλαίσιο B, φάσμα a) και της αντίδρασης της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (πλαίσιο B, φάσμα b) σε pH 7,5. 71
- Σχήμα 5.2.2** Φάσματα FTIR της χρονικής εξέλιξης της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε χρόνους 2, 4, 8, 18 και 24 ωρών (φάσματα A-E) μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο, σε pH 7,5. Το φάσμα F αναφέρεται στην αντίδραση με το $^{13}C^{14}N^-$, 8 ώρες μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο. Το ένθετο απεικονίζει τα αντίστοιχα, σε χρόνους, φάσματα οπτικής απορρόφησης. 72
- Σχήμα 5.2.3** Φάσματα FTIR της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 (φάσμα A), pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pH 7,5 (φάσμα G), που λήφθηκαν 24 ώρες μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο. Τα παράγωγα με το $^{13}C^{14}N^-$, το $^{12}C^{15}N^-$ και το $^{13}C^{15}N^-$ φαίνονται στα φάσματα C, D και E αντίστοιχα. Το ένθετο παρουσιάζει τα φάσματα της αντίδρασης της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ (φάσμα a) και το $^{13}C^{14}N^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5. 73
- Σχήμα 5.2.4** Φάσματα FTIR διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 (φάσμα A), pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pH 7,5 (φάσμα G). Τα φάσματα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων με το $^{13}C^{14}N^-$, το $^{12}C^{15}N^-$ και το $^{13}C^{15}N^-$ φαίνονται στα φάσματα C, D και E, αντίστοιχα. Τα φάσματα H και I παρουσιάζουν τα φάσματα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ και το CO, αντίστοιχα. Το μήκος

	κύματος της ακτινοβολίας για τη φωτόλυση των παραγώγων ήταν στα 447 nm και η ενέργεια της ακτινοβολίας στο δείγμα στα 30 mW.	74
Σχήμα 5.3.1	Σχηματική απεικόνιση των δομών του δεσμευμένου CN^- στην ba_3 οξειδάση και του προϊόντος φωτόλυσης.	79
Σχήμα 6.2.1	Οπτικά φάσματα απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a) και της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}_3^-$ σε pH 7,5 και σε χρόνους 2 ωρών (φάσμα b) και 24 ωρών (φάσμα c) μετά την προσθήκη N_3^- στο ένζυμο.	87
Σχήμα 6.2.2	Φάσματα FTIR των αντιδρασεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}_3^-$ (φάσμα A), και το $^{15}\text{N}_3^-$ (φάσμα B) σε pH 7,5. Στο ένθετο εμφανίζονται τα FTIR φάσματα του ελεύθερου $^{14}\text{N}_3^-$ (φάσμα a) και $^{15}\text{N}_3^-$ (φάσμα b).	88
Σχήμα 6.2.3	Φάσματα FTIR των αντιδρασεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}_3^-$ (φάσμα A), και το $^{15}\text{N}_3^-$ (φάσμα B) σε pH 7,5 μετά την προσθήκη CN^- και χρόνο επώασης 3 μέρες.	90
Σχήμα 6.2.4	Φάσματα RR στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών συχνοτήτων (πλαίσιο B), της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a) και των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}_3^-$ (φάσμα b) και το $^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2^-$ (φάσμα c) σε pH 7,5. Το φάσμα b-c αντιστοιχεί στο φάσμα διαφοράς των παραγώγων $ba_3\text{-}^{14}\text{N}_3^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2^-$.	91
Σχήμα 7.2.1	Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a), μετά από προσθήκη NO_2^- (φάσμα b), 2 ώρες μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με NO_2^- ένζυμο (φάσμα c) και c-b το φάσμα διαφοράς σε pH 6,0	

(πλαίσιο A), σε pH 7,5 (πλαίσιο B) και σε pH 9,0 (πλαίσιο C). 97

Σχήμα 7.2.2 Φάσματα RR της ba_3 οξειδάσης στην οξειδωμένη (φάσμα a) και στην ανηγμένη (φάσμα b) μορφή στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και χαμηλών συχνοτήτων (πλαίσιο B). Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκη κύματος διέγερσης στα 405 nm και 441 nm για την οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή της ba_3 οξειδάσης, αντίστοιχα και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4mW. 99

Σχήμα 7.2.3 Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων των παραγώγων της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης $ba_3\text{-NO}_2^-$ με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσματα a, c, e) και το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσματα b, d, f) σε pH 6,0 (φάσματα a, b), pH 7,5 (φάσματα c, d) και pH 9,0 (φάσματα e,f). Τα φάσματα a-b, c-d και e-f αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ σε pH 6,0, 7,5 και 9,0, αντίστοιχα. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 99

Σχήμα 7.2.4 Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της κυτοχρωμικής οξειδάσης $ba_3\text{-NO}_2^-$ μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a), $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b), $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα c) ένζυμο σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C). Τα φάσματα a-b και a-c αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ και $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$, αντίστοιχα. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 101

- Σχήμα 7.2.5** Φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της κυτοχρωμικής οξειδάσης $ba_3\text{-NO}_2^-$ μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a), $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b), $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα c) ένζυμο σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C). Τα φάσματα a-b και a-c αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ και $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$, αντίστοιχα και είναι μεγενθυμένα κατά 2 φορές. Το ένθετο στο πλαίσιο B παρουσιάζει τα φάσματα διαφοράς $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a') και $ba_3\text{-}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ μείον $ba_3\text{-}^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα b') σε pD 7,5. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 101
- Σχήμα 7.3.1** Σχηματική αναπαράσταση του παραγώγου αίμης a_3 -νίτρο της ba_3 οξειδάσης. Τα δομικά χαρακτηριστικά του διμεταλλικού κέντρου αίμης a_3/Cu_B λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK. 104
- Σχήμα 8.2.1** Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης cbb_3 οξειδάσης (φάσμα a), της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης (φάσμα b) και μετά την προσθήκη NO_2^- στην ανηγμένη cbb_3 οξειδάση (φάσμα c) σε pH 7,5. Το φάσμα c' στο ένθετο δείχνει μεγενθυμένη την περιοχή 500 – 700 nm του φάσματος c και το φάσμα c-b στο ένθετο παρουσιάζει το φάσμα διαφοράς. 112
- Σχήμα 8.2.2** Φάσματα RR της cbb_3 οξειδάσης στην οξειδωμένη (φάσμα a) και στην ανηγμένη από κυστεΐνη (φάσμα b) μορφή στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκη κύματος διέγερσης στα 405 nm και 441 nm για την οξειδωμένη και την ανηγμένη μορφή της cbb_3 οξειδάσης, αντίστοιχα. Η ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα ήταν στα 4mW. 113

- Σχήμα 8.2.3** Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a) και $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 114
- Σχήμα 8.2.4** Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a) και $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστοιχο φάσμα διαφοράς σε pH 9,0. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW 115
- Σχήμα 8.2.5** Φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a), $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) και $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα c) σε pH 7,5. Τα φάσματα a-b και a-c αναφέρονται στα φάσματα διαφοράς και είναι μεγενθυμένα κατά 2 φορές. Στο ένθετο παρουσιάζονται τα αντίστοιχα φάσματα διαφοράς σε pH 9,0. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 116
- Σχήμα 8.2.6** Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από διθειονικά cbb_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ (φάσμα a) και το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές στην περιοχή των υψηλών και κατά 2 φορές στην

- περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW. 118
- Σχήμα 8.2.7** Φάσμα FTIR της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη *cbb*₃ οξειδάσης με το ¹⁴N¹⁶O₂⁻ συγκέντρωσης 6mM. Στο ένθετο παρουσιάζεται η αντίστοιχη αντίδραση με το ¹⁵N¹⁶O₂⁻. 118
- Σχήμα 8.2.8** Καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης της δόνησης στους 2230 cm⁻¹ συναρτήσει της συγκέντρωσης του N₂O. Με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές επισημαίνεται η απορρόφηση στους 2230 cm⁻¹ που λήφθηκε από την αντίδραση *cbb*₃/NO₂⁻ και η αντίστοιχη συγκέντρωση N₂O που παράχθηκε. 119
- Σχήμα 8.3.1** Σχηματική αναπαράσταση του παραγώγου αίμης *b*₃-νιτρόζυλ της *cbb*₃ οξειδάσης. Τα δομικά χαρακτηριστικά του διμεταλλικού κέντρου αίμης *b*₃/Cu_B λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7. 121

Κατάλογος Πινάκων	Σελ
Πίνακας 2.1.2.1 Κατηγορίες A (A1 και A2), B και C αιμοχαλκοξειδασών με παραδείγματα χαρακτηριστικών αντιπροσώπων, τις λειτουργικές υπομονάδες με τις ομάδες αίμης και ιόντων χαλκού, τα κανάλια άντλησης πρωτονίων που περιέχουν και τη στοιχειομετρία άντλησης πρωτονίων σε κάθε κατηγορία.	15
Πίνακας 5.3.1 Συχνότητες των δονήσεων τάσης (cm^{-1}) του δεσμού C-N στα σύμπλοκα $\text{Cu}^+\text{-CN}^-$ και $\text{Cu}^{2+}\text{-CN}^-$.	77
Πίνακας 6.2.1 Συχνότητες των δονήσεων τάσης (cm^{-1}) του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο αιμοπρωτεϊνών.	89
Πίνακας 8.3.1 Συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe-NO})/\delta(\text{Fe-N-O})$ και $\nu(\text{N-O})$ (cm^{-1}) των νιτρόζυλ-συμπλόκων σε αιμοχαλκοξειδάσες και στη μυοσφαιρίνη.	120

Πίνακας Συντμήσεων και Συμβόλων

<i>a</i>	Πολωσιμότητα
<i>a</i>	Αίμη <i>a</i>
<i>aa₃</i>	<i>aa₃</i> οξειδάση
AEBSF	4-(2-aminoethyl)-benzylsulphonyl fluoride
Ala	Αλανίνη
Anti-Stokes	Σκέδαση anti-Stokes
AO	Αλδεϋδική οξειδάση
Arg	Αργινίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
<i>b</i>	αίμη <i>b</i>
<i>ba₃</i>	<i>ba₃</i> οξειδάση
BaF₂	Φθοριούχο βάριο
γ_s^2	Ανισοτροπία
γ_{as}^2	Αντισυμμετρία
γ_o^2	Μέση πολωσιμότητα
Γ_e	Παράγοντας απόσβεσης
<i>c₅₅₂</i>	Κυτόχρωμα <i>c₅₅₂</i>
<i>caa₃</i>	<i>caa₃</i> οξειδάση
CaCl₂	Χλωριούχο ασβέστιο
<i>cbb₃</i>	<i>cbb₃</i> οξειδάση
Cb	Κυτοσφαιρίνη
Cc, cyt <i>c</i>	Κυτόχρωμα <i>c</i>
CcO	Οξειδάση του κυτοχρώματος <i>c</i>
<i>cd₁NiR</i>	Αναγωγή των νιτροδών που περιέχει αίμη στο ενεργό κέντρο
Cu_A	Διπυρηνικό κέντρο Cu _A
Cu_B	Ιόν Cu _B που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο των αιμογαλκοξειδασών
CHES	2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
CN⁻	Κυάνιο
CO	Μονοξείδιο του άνθρακα
CuCl₂	Χλωριούχος χαλκός
δ	Καθυστέρηση

Δr	Ενδομοριακή απόσταση
D	Ασπαρτικό οξύ
D₂O	Δευτεριωμένο νερό
DEAE	Αιθυλαινοδιαμινοτετραοξικό οξύ
DM	<i>n</i> -decyl- β -D-maltopyranoside
e	Δονητική κατάσταση διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης
e⁻	Ηλεκτρόνιο
ϵ_{354}	Συντελεστής απορροφητικότητας στα 354nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ENDOR	Electron Nuclear Double Resonance
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
<i>f</i>	Τελική δονητική κατάσταση
Fe	Σίδηρος
far-IR	Άπω υπέρυθρο
FeCl₃·6H₂O	Ένυδρος χλωριούχος σίδηρος
Gln	Γλουταμίνη
Glu	Γλουταμινικό Οξύ
h	Σταθερά του Planck
H⁺	Πρωτόνιο
H₂O	Νερό
His	Ιστιδίνη
Hb	Αιμοσφαιρίνη
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
i	Θεμελειώδης δονητική κατάσταση
Ile	Ισολευκίνη
I₀	Ισχύς ακτινοβολίας
I_⊥	Ένταση σκεδαζόμενου φωτός κάθετα στην πολωσιμότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
I_∥	Ένταση σκεδαζόμενου φωτός παράλληλα στην πολωσιμότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
k	Σταθερά του ελατηρίου
K	Λυσίνη

KCN	Κυανιούχο κάλιο
KH₂PO₄	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
Kr	Κρυπτόν
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
μ	Ανηγμένη μάζα
Mb	Μυοσφαιρίνη
MCT	Mercury-Cadmium-Telluride, ανιχνευτής Υδραργύρου-Καδμίου-Τελλουρίου
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
Met	Μεθειονίνη
mid-IR	Μέσο υπέρυθρο
MgSO₄·7H₂O	Ένυδρο θειϊκό μαγνήσιο
ν	Συχνότητα δόνησης, cm ⁻¹
ν	Συχνότητα, cm ⁻¹
ν_e, ν_{vib}	Συχνότητα Διέγερσης, cm ⁻¹
ν_{ei}	Συχνότητα ηλεκτρονιακής μετάπτωσης
ν_o	Συχνότητα προσπίπτουσας ακτινοβολίας
N₂	Άζωτο
N₂O	Μονοξείδιο του διαζώτου
N₃⁻	Αζίδιο
NaN₃	Αζίδιο του νατρίου
NaNO₂	Νιτρώδες νάτριο
Na₂S₂O₄	Διθειονικό νάτριο
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
Na₃citrate·H₂O	Ένυδρο κιτρικό νάτριο
Nb	Νευροσφαιρίνη
near-IR	Εγγύς υπέρυθρο
NiRs	Αναγωγάσες των νιτρωδών
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
NO₂⁻	Νιτρώδες ιόν
NO₃⁻	Νιτρικό ιόν
NOS	Nitric oxide synthase, συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

<i>o</i>	Αίμη <i>o</i>
O₂	Οξυγόνο
Phe	Φαινυλαλανίνη
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
P	λόγος αποπόλωσης
RR	Resonance Raman, Συντονισμός Raman
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
Rayleigh	σκέδαση Rayleigh
S₀	Θεμελιώδης δονητική κατάσταση
S₁	Διεγερμένη δονητική κατάσταση
Ser	Σερίνη
Soret	Απορρόφηση Soret στην περιοχή του ορατού
Stokes	σκέδαση Stokes
Thr	Θρεονίνη
TMAE	Triethylaminoethyl
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Trp	Τρυπτοφάνη
Tyr	Τυροσίνη
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
UV/Vis	Φασματοσκοπία Υπεριώδους/Ορατού
w/v	Όγκος κατά βάρος
x	Μετατόπιση
Xe	Ξένο
XD	Αφυδρογονάση της ξανθίνης
x_m	Σταθερά μη αρμονικότητας
XO	Οξειδάση της ξανθίνης
 <i>a</i>⟩	Διεγερμένη κατάσταση
 <i>v_i</i>⟩	Αρχική δονητική κυματοσυνάρτηση
 <i>v_f</i>⟩	Τελική δονητική κυματοσυνάρτηση
 <i>v_e</i>⟩	Διεγερμένη δονητική κυματοσυνάρτηση
 <i>e_f</i>⁰⟩	Ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση τελικής κατάστασης
 <i>e_e</i>⁰⟩	Ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση διεγερμένης κατάστασης
 <i>e_i</i>⁰⟩	Ηλεκτρονιακή κυματοσυνάρτηση αρχικής κατάστασης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή – Στόχος και Πρωτοτυπία

1.1 Εισαγωγή

Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* συγκροτούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της αναπνευστικής αλυσίδας. Η ικανότητά τους να συζεύγνουν την καταλυτική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό με την ταυτόχρονη άντληση πρωτονίων δια μέσου της ενδομιτοχονδριακής (ή βακτηριακής) μεμβράνης, οδηγεί στην παραγωγή διαμεμβρανικού δυναμικού, το οποίο απαιτείται για τη σύνθεση ATP. Οι διαφορετικοί τύποι αιμοχαλκοξειδασών μπορεί να έχουν διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων και διαφορετική σύσταση υπομονάδων και τύπου αιμών. Παρόλ' αυτά χαρακτηρίζονται από μια κεντρική υπομονάδα, η οποία περιέχει μια χαμηλού σπιν αίμη (*a* ή *b*) και ένα διμεταλλικό κέντρο υψηλού σπιν αίμης (a_3 , o_3 ή b_3)/χαλκού (Cu_B) όπου πραγματοποιείται η αναγωγή του οξυγόνου (O_2). Η διαφοροποίηση που παρατηρείται έχει επίδραση στις ιδιότητες του ενεργού κέντρου των αιμοχαλκοξειδασών.¹⁻⁴ Η σύγκριση μεταξύ των βακτηριακών οξειδασών και των οξειδασών των θηλαστικών επιτρέπει την κατανόηση των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων τους και παρέχει τον τρόπο αναγνώρισης των χαρακτηριστικών που καθορίζουν τις θεμελιώδεις λειτουργίες τους. Τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των αιμοχαλκοξειδασών μπορούν να μελετηθούν με κρυσταλλογραφικές, φασματοσκοπικές και υπολογιστικές μεθόδους εξετάζοντας τη δέσμευση μικρών εξωγενών υποκαταστατών που δρουν ως αναστολείς του ενζύμου όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (CO),⁵⁻⁹ το κυάνιο (CN⁻),¹⁰⁻²⁰ το μονοξείδιο του αζώτου (NO),²¹⁻²⁴ και το αζίδιο (N₃⁻)²⁵⁻²⁹. Η χρήση των εναλλακτικών υποκαταστατών προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης του ενζύμου σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις των μετάλλων του ενεργού κέντρου.

Πρόσφατα, περιγράφηκε μια επιπρόσθετη αντίδραση για τις αιμοχαλκοξειδάσες και συγκεκριμένα η αντίδραση αναγωγής των νιτρωδών (NO₂⁻) προς μονοξείδιο του αζώτου (NO). Η αντίδραση αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς το NO λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο στα θηλαστικά και επηρεάζει πληθώρα λειτουργιών τους.³⁰⁻³¹ Επίσης, οι βακτηριακές οξειδάσες έχουν την ικανότητα να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO σε μονοξείδιο του διαζώτου (N₂O), καθώς μοιράζονται φυλογενετικά χαρακτηριστικά με τις αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου. Η ικανότητά τους να ανάγουν O₂ και NO υποστηρίζει την πιθανή ταυτόχρονη εξέλιξη της αερόβιας αναπνοής και της απονιτροποίησης.²²

Από τις τεχνικές που προσφέρονται για τη μελέτη της δέσμευσης υποκαταστατών στις αιμοπρωτεΐνες είναι η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV/Vis), υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και συντονισμού Raman (RR). Με τη

φασματοσκοπία απορρόφησης UV/Vis μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για την οξειδωτική κατάσταση των μετάλλων, καθώς επίσης και για το σχηματισμό συμπλόκων των μετάλλων του ενεργού κέντρου με τους υποκαταστάτες. Επιπλέον, οι φασματοσκοπίες FTIR και RR είναι τεχνικές ευαίσθητες στη δομή και την ισοτοπική αντικατάσταση, προσφέροντας πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων.

1.2 Στόχος και Πρωτοτυπία Διατριβής

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση των αντιδράσεων εξωγενών υποκαταστατών με τη θερμοφιλή *ba*₃ οξειδάση (κατηγορία B) από το βακτήριο *T. thermophilus* και τη μεσόφιλη *cbb*₃ οξειδάση (κατηγορία C) από το βακτήριο *P. stutzeri*. Συγκεκριμένα μελετώνται οι αντιδράσεις της *ba*₃ οξειδάσης με το CN⁻, το N₃⁻ και το NO₂⁻ και της *cbb*₃ οξειδάσης με το NO₂⁻, με εφαρμογή των φασματοσκοπικών τεχνικών απορρόφησης UV/Vis, FTIR και RR.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιείται η μελέτη με φασματοσκοπία FTIR των αλληλεπιδράσεων του CN⁻ με το μεικτού σθένους (Fe²⁺/Cu_B²⁺) και ανηγμένου (Fe²⁺/Cu_B⁺) ενεργού κέντρου της *ba*₃ οξειδάσης. Επίσης, η οξειδωμένη μορφή (Fe³⁺/Cu_B²⁺) του ενεργού κέντρου της *ba*₃ οξειδάσης μελετάται μέσω της αντίδρασης με το N₃⁻. Οι αντιδράσεις του NO₂⁻ με τις *ba*₃ και *cbb*₃ οξειδάσες μελετώνται για πρώτη φορά με μεθόδους δονητικής φασματοσκοπίας, ώστε να διερευνηθεί εάν δρουν ως αναγωγάσες των νιτρωδών όπως το μιτοχονδριακό ένζυμο και να χαρακτηριστούν τα σύμπλοκα αίμης-νιτρωδών ή χαλκού-νιτρωδών που πιθανόν σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις.

1.3 Βιβλιογραφία

1. Belevich, I.; Verkhovsky, M. I., Molecular Mechanism of Proton Translocation by Cytochrome c Oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, *10* (1), 1-30.
2. Siletsky, S. A.; Konstantinov, A. A., Cytochrome c oxidase: Charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (4), 476-488.
3. Michel, H., Respiratory Chain Complex IV. *In Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier New York **2004**, pp 688-694.
4. Brzezinski, P.; Adelroth, P., Cytochrome Oxidases, Bacterial. *In Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier New York **2004**, pp 539-543.

5. Koutsoupakis, C.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Ligand Binding in a Docking Site of Cytochrome c Oxidase: A Time-Resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared Study. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14728-14732.
6. Koutsoupakis, C.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Probing the Q-proton pathway of *ba*₃-cytochrome c oxidase by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophysical Journal* **2004**, *86* (4), 2438-2444.
7. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Observation of the Equilibrium Cu_B-CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme *a*₃ Propionates in Cytochrome *ba*₃-CO from *Thermus thermophilus*: FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) AND TIME-RESOLVED STEP-SCAN FTIR STUDIES. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (36), 32860-32866.
8. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Oxygen-linked Equilibrium Cu_B-CO Species in Cytochrome *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*: IMPLICATIONS FOR AN OXYGEN CHANNEL AT THE Cu_B SITE. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (17), 14893-14896.
9. Ohta, T.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of a Photostable Five-Coordinate Heme *a*₃-Fe-CO Species and Functional Implications of His384/α10 in CO-Bound *ba*₃-Cytochrome c Oxidase from *Thermus thermophilus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (18), 5489-5491.
10. Kim, Y.; Babcock, G. T.; Surerus, K. K.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H.; Oertling, W. A., Cyanide binding and active site structure in heme-copper oxidases: Normal coordinate analysis of iron-cyanide vibrations of *a*₃²⁺CN⁻ complexes of cytochromes *ba*₃ and *aa*₃. *Biospectroscopy* **1998**, *4* (1), 1-15.
11. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdottir, O.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H., Spectroscopic characterization of cytochrome *ba*₃, a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the *a*₃/Cu_B site to that of bovine cytochrome *aa*₃. *Biochemistry* **1994**, *33* (10), 3128-3141.
12. Surerus, K. K.; Oertling, W. A.; Fan, C.; Gurbiel, R. J.; Einarsdóttir, O.; Antholine, W. E.; Dyer, R. B.; Hoffman, B. M.; Woodruff, W. H.; Fee, J. A., Reaction of cyanide with cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the Fe(II)_{a3}-CN·Cu(II)_B-CN complex suggests four 14N atoms are coordinated to Cu_B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89* (8), 3195-3199.

13. Yoshikawa, S.; Mochizuki, M.; Zhao, X.-J.; Caughey, W. S., Effects of Overall Oxidation State on Infrared Spectra of Heme a_3 Cyanide in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase: EVIDENCE OF NOVEL MECHANISTIC ROLES FOR Cu_B . *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (9), 4270-4279.
14. Tsubaki, M.; Yoshikawa, S., Fourier-transform infrared study of cyanide binding to the Fe_{a_3} - Cu_B binuclear site of bovine heart cytochrome c oxidase: implication of the redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry* **1993**, *32* (1), 164-173.
15. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H.; Sato-Watanabe, M.; Anraku, Y., Infrared and EPR Studies on Cyanide Binding to the Heme-Copper Binuclear Center of Cytochrome bo -type Ubiquinol Oxidase from *Escherichia coli*: RELEASE OF A Cu -CYANO COMPLEX IN THE PARTIALLY REDUCED STATE. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (8), 4017-4022.
16. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S., Infrared evidence of cyanide binding to iron and copper sites in bovine heart cytochrome c oxidase. Implications regarding oxygen reduction. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (14), 7945-58.
17. Pinakoulaki, E.; Vamvouka, M.; Varotsis, C., The Active Site Structure of Heme $a_3^{3+}\text{C}\equiv\text{NCu}_B^{2+}$ of Cytochrome aa_3 Oxidase as Revealed from Resonance Raman Scattering. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (36), 9865-9868.
18. Pinakoulaki, E.; Vamvouka, M.; Varotsis, C., Resonance Raman Detection of the Fe^{2+} -C-N Modes in Heme-Copper Oxidases: A Probe of the Active Site. *Inorganic Chemistry* **2004**, *43* (16), 4907-4910.
19. Lim, B. S.; Holm, R. H., Molecular Heme-Cyanide-Copper Bridged Assemblies: Linkage Isomerism, Trends in νCN Values, and Relation to the Heme- a_3/Cu_B Site in Cyanide-Inhibited Heme-Copper Oxidases. *Inorganic Chemistry* **1998**, *37* (19), 4898-4908.
20. Loullis, A.; Noor, M. R.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., Observation of Ligand Transfer in ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus*: Simultaneous FTIR Detection of Photolabile Heme a_3^{2+} -CN and Transient Cu_B^{2+} -CN Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (30), 8955-8960.
21. Varotsis, C.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The Structure of the Hyponitrite Species in a Heme Fe-Cu Binuclear Center. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (13), 2210-2214.
22. Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sarti, P.; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T., The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction

- of nitric oxide: Evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (26), 14718-14723.
23. Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A., The cytochrome *cbb*₃ from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *European Journal Of Biochemistry / FEBS* **2001**, *268* (24), 6486-6491.
24. Butler, C. S.; Forte, E.; Maria Scandurra, F.; Arese, M.; Giuffrè, A.; Greenwood, C.; Sarti, P., Cytochrome *bo*₃ from *Escherichia coli*: the binding and turnover of nitric oxide. *Biochemichal and Biophysical Research Communications* **2002**, *296* (5), 1272-1278.
25. Tsubaki, M.; Yoshikawa, S., Fourier-transform infrared study of azide binding to the Fe_{a3}-Cu_B binuclear site of bovine heart cytochrome *c* oxidase: new evidence for a redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry* **1993**, *32* (1), 174-182.
26. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S., Infrared evidence of azide binding to iron, copper, and non-metal sites in heart cytochrome *c* oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (14), 9757-9766.
27. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J., Cytochrome *bo* from *Escherichia coli*: Binding of Azide to Cu_B. *Biochemistry* **1996**, *35* (43), 13780-13787.
28. Vamvouka, M.; Müller, W.; Ludwig, B.; Varotsis, C., Fourier Transform Infrared and Resonance Raman Studies of the Interaction of Azide with Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (15), 3030-3034.
29. Varotsis, C.; Vamvouka, M., Resonance Raman and Fourier Transform Infrared Detection of Azide Binding to the Binuclear Center of Cytochrome *bo*₃ Oxidase from *Escherichia coli*. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (19), 3942-3946.
30. Gladwin, M. T.; Schechter, A. N.; Kim-Shapiro, D. B.; Patel, R. P.; Hogg, N.; Shiva, S.; Cannon, R. O.; Kelm, M.; Wink, D. A.; Espey, M. G.; Oldfield, E. H.; Pluta, R. M.; Freeman, B. A.; Lancaster, J. R.; Feelisch, M.; Lundberg, J. O., The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1* (6), 308-314.
31. Lundberg, J. O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M. T., The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7* (2), 156-167.

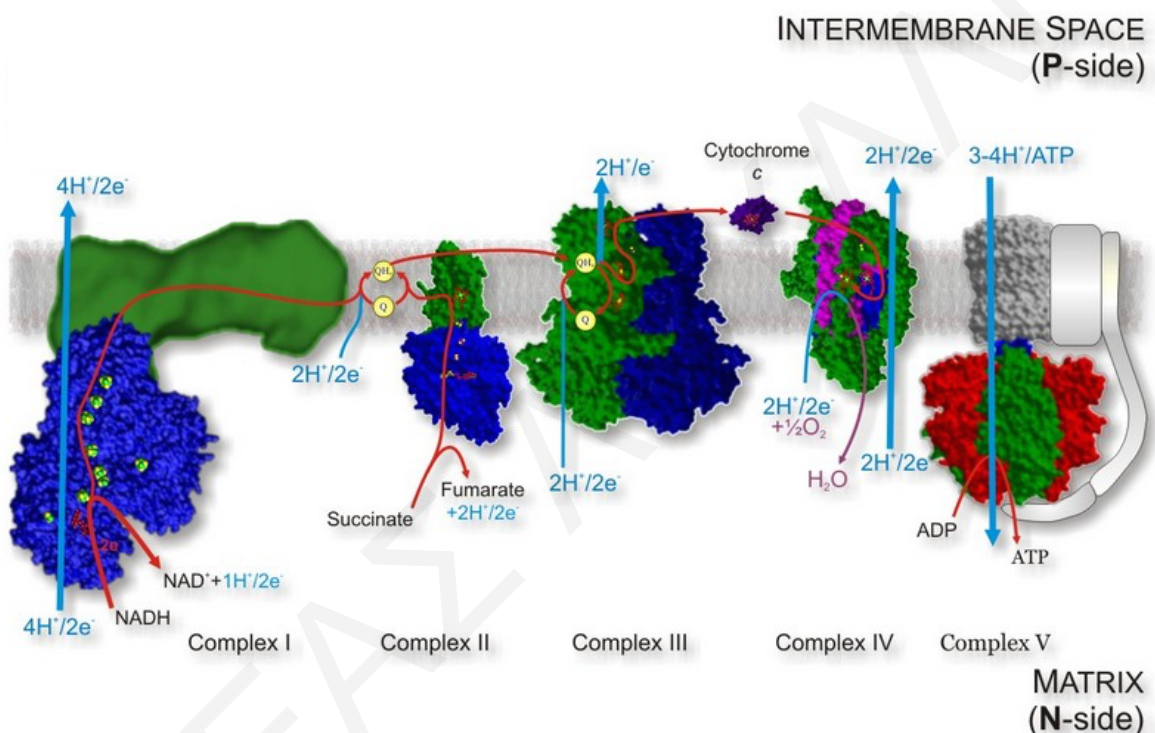
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρητικό Υπόβαθρο

ΑΝΔΡΕΑΣ ΛΟΥΛΗΣ

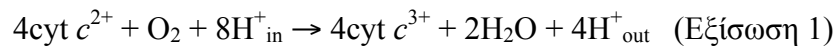
2.1 Οξειδάσες του Κυτοχρώματος *c*

Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων στα ευκαρυωτικά και την κυτταροπλασματική μεμβράνη των αερόβιων βακτηρίων στα προκαρυωτικά. Αποτελούν το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας, γι' αυτό και συχνά αναφέρονται ως τελικές οξειδάσες. (Σχήμα 2.1.1)¹ Ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών, των οποίων η λειτουργία είναι να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό.



Σχήμα 2.1.1: Σχηματική αναπαράσταση της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης που περιλαμβάνει τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας (Complexes I-IV) και της ATP-συνθάσης (Complex V). Η οξειδάση του κυτοχρώματος *c* αναφέρεται ως Complex IV.¹

Τα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την αντίδραση παρέχονται από το κυτόχρωμα *c*, το οποίο βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (διαμεμβρανικός χώρος μιτοχονδρίων ή περίπλασμα βακτηρίων) ενώ τα πρωτόνια που απαιτούνται για το σχηματισμό του νερού λαμβάνονται από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (μήτρα μιτοχονδρίων) ή από το κυτταρόπλασμα των βακτηρίων. Η αντίδραση αυτή είναι ισχυρά εξώεργη και η ενέργεια που απελευθερώνεται χρησιμοποιείται για την άντληση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης. Έτσι, για κάθε ηλεκτρόνιο, ένα επιπλέον πρωτόνιο μετακινείται δια μέσου της μεμβράνης. Η συνολική αντίδραση δίδεται στην Εξίσωση 1.



Η άντληση επιπλέον πρωτονίων έχει ως αποτέλεσμα την άνιση κατανομή φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης. Περισσότερα θετικά φορτία βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης (P positive) και λιγότερα στην εσωτερική (N negative), οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό διαμεμβρανικού δυναμικού. Το παραγόμενο διαμεμβρανικό δυναμικό χρησιμοποιείται από την ATP-συνθάση για τη σύνθεση ATP.¹⁻⁵

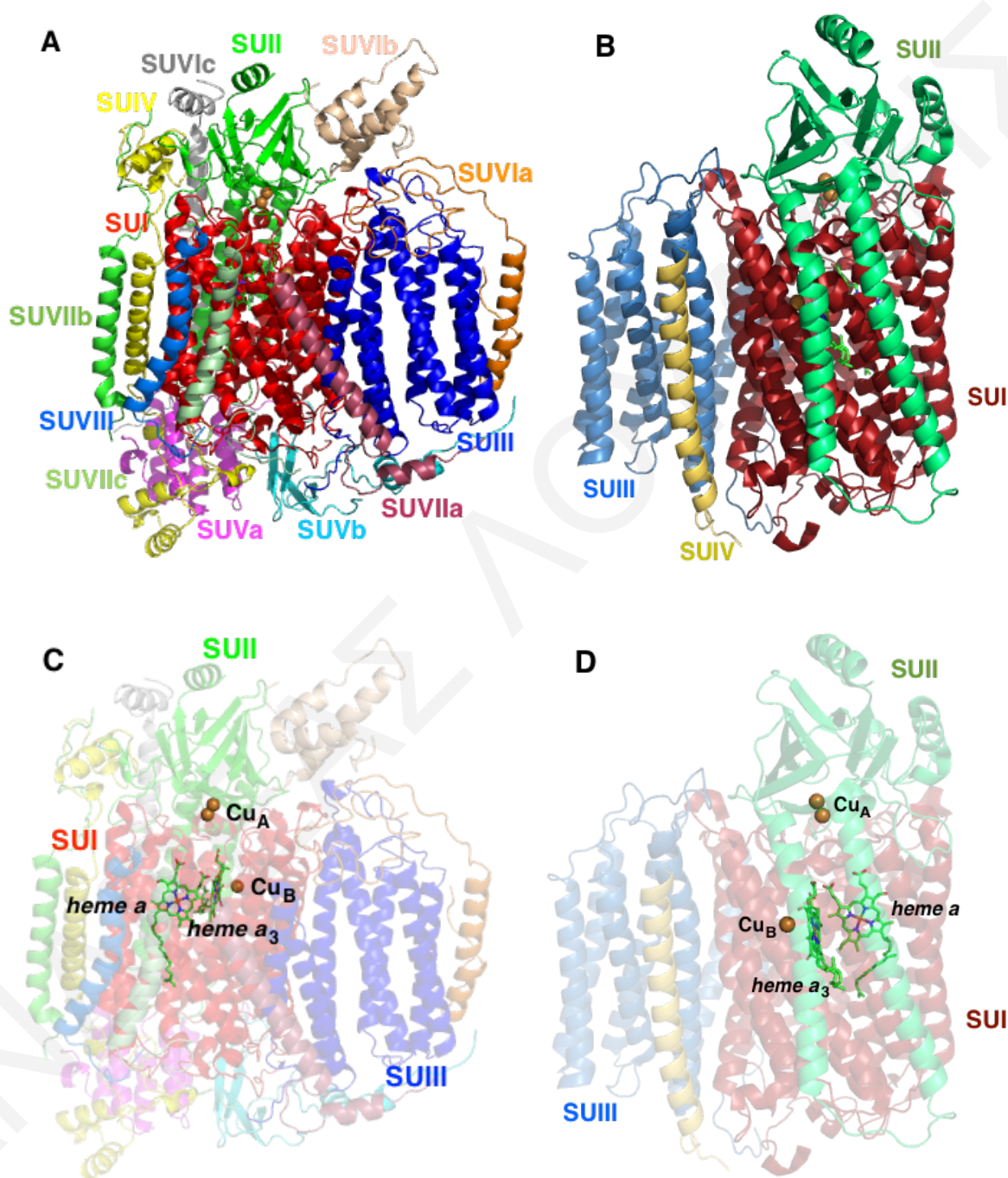
Στα ευκαρυωτικά παρουσιάζεται μόνο ένας τύπος οξειδασών του κυτοχρώματος *c*, ενώ στα προκαρυωτικά εμφανίζονται πολλαπλοί τύποι οξειδασών. Οι διάφοροι τύποι οξειδασών του κυτοχρώματος *c* δίνουν τη δυνατότητα στα βακτήρια να προσαρμόζονται καλύτερα σε διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης ανάλογα με το περιβάλλον που βρίσκονται. Με τους διαφορετικούς τύπους τελικών οξειδασών προκύπτει διαφοροποίηση στη δομή τους, η οποία αντικατοπτρίζεται στον αριθμό των υπομονάδων και το είδος των προσθετικών ομάδων που περιέχουν, καθώς επίσης και στην αλληλουχία τους.^{1,6}

2.1.1 Δομή Οξειδασών του Κυτοχρώματος *c*

Οι δομές αιμοχαλκοξειδασών από διαφορετικούς οργανισμούς έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφικές μεθόδους.⁷⁻¹¹ Με βάση αυτές τις κρυσταλλικές δομές αποκαλύφθηκε ότι οι μιτοχονδριακές οξειδάσες αποτελούνται από 13 υπομονάδες⁷⁻⁸ (Σχήμα 2.1.1.1A), ενώ οι βακτηριακές είναι πιο απλές στη δομή και έχουν 3-4 υπομονάδες⁹⁻¹¹ (Σχήμα 2.1.1.1B). Οι κυριότερες υπομονάδες είναι οι υπομονάδες I, II και III, οι οποίες σχηματίζουν τον κύριο πυρήνα του ενζύμου (Σχήμα 2.1.1.1 C και D). Επίσης, παρουσιάζονται σημαντικές ομοιότητες, όσον αφορά την αλληλουχία, μεταξύ μιτοχονδριακών και βακτηριακών οξειδασών.^{1,4,6}

Η υπομονάδα I είναι η μεγαλύτερη και συνίσταται από 12 διαμεμβρανικές έλικες. Σε αυτήν περιέχονται δύο προσθετικές ομάδες αίμης και ένα ιόν χαλκού (Cu_B). Στις μιτοχονδριακές οξειδάσες οι αίμες είναι τύπου *a*, ενώ στις βακτηριακές οξειδάσες μπορούν να είναι του τύπου *a*, *b*, *o* ή παράγωγα των αιμών *a* και *o* και οι δυο αίμες μπορούν να είναι του ίδιου ή διαφορετικού τύπου. Η μια ομάδα αίμης μαζί με το ιόν χαλκού σχηματίζουν το διμεταλλικό καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, όπου πραγματοποιείται όλη η χημεία αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό (Σχήμα 2.1.1.1 C και D, heme *a*₃/Cu_B). Η ομάδα αίμης του διμεταλλικού κέντρου είναι υψηλού σπιν τόσο στην ανηγμένη όσο και στην οξειδωμένη της μορφή και συμβολίζεται αναγράφοντας τον τύπο αίμης και το δείκτη 3, π.χ αίμη *a*₃. Στην πέμπτη θέση ένταξής της βρίσκεται δεσμευμένο ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, ενώ η έκτη θέση ένταξης είναι διαθέσιμη για

δέσμευση υποκαταστατών όπως το οξυγόνο (O_2), το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το κυάνιο (CN^-) και το αζίδιο (N_3^-). Το ιόν χαλκού (Cu_B) είναι δεσμευμένο με τρεις υποκαταστάτες ιστιδίνης, εκ των οποίων η μια είναι ομοιοπολικά δεσμευμένη με ένα κατάλοιπο τυροσίνης.^{1,4-6}



Σχήμα 2.1.1.1: Κρυσταλλική δομή της **A.** aa_3 βόειας οξειδάσης με τις 13 υπομονάδες και της **B.** aa_3 από το βακτήριο *R. sphaeroides* με τις 4 υπομονάδες. **C.** και **D.** Διάταξη του διμεταλλικού κέντρου (υψηλού σπιν αίμη a_3 και Cu_B), της χαμηλού σπιν αίμης a και του διπυρηνικού κέντρου Cu_A στην aa_3 βόεια οξειδάση (**C**) και στην aa_3 οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides* (**D**). Οι υπομονάδες I, II και III που σχηματίζουν τον κύριο πυρήνα του ενζύμου απεικονίζονται με κόκκινο, πράσινο και μπλε αντίστοιχα. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από τα αρχεία PDB 1OCC⁸ και PDB 1M56¹⁰.

Η δεύτερη ομάδα αίμης είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ηλεκτρονίων προς το ενεργό κέντρο (Σχήμα 2.1.1.1 C και D, heme *a*). Τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην ανηγμένη της μορφή βρίσκεται σε κατάσταση χαμηλού σπιν και είναι δεσμευμένη με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης στην πέμπτη και έκτη θέση ένταξης της.^{1, 4-6} Οι αιμοχαλκοξειδάσες ονομάζονται με βάση τις ομάδες αίμης που περιέχουν. Αναγράφονται με πλάγια γράμματα και πρώτα γράφεται η χαμηλού σπιν αίμη και μετά η υψηλού σπιν αίμη του διμεταλλικού κέντρου με το δείκτη της, π.χ *aa*₃, *ba*₃. Κάποιες από τις οξειδάσες μπορούν να περιέχουν ομοιοπολικά δεσμευμένο κυτόχρωμα *c*. Σε αυτή την περίπτωση αναγράφεται πρώτα η ομάδα αίμης *c* και μετά οι υπόλοιπες ομάδες αίμης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, π.χ *caa*₃, *ccb*₃.

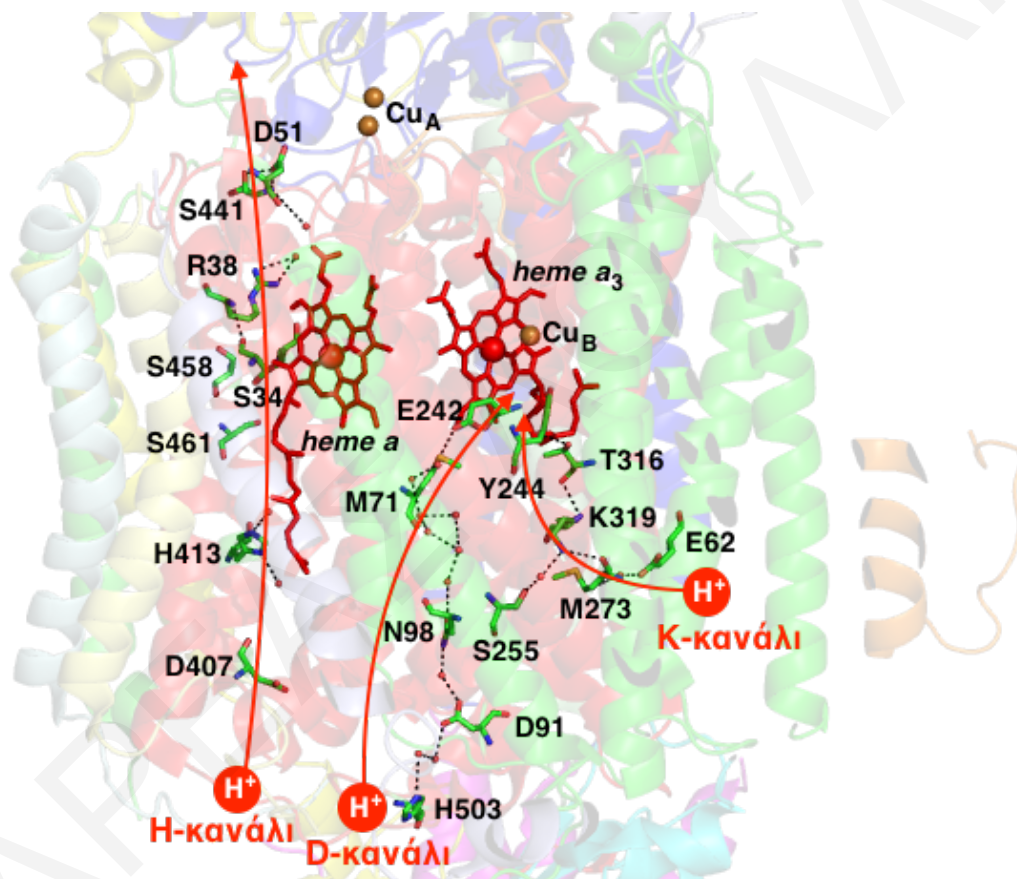
Η υπομονάδα II σχηματίζει δύο διαμεμβρανικές έλικες και συμπεριλαμβάνει ένα οξειδοαναγωγικό κέντρο (Σχήμα 2.1.1.1 A και B). Το οξειδοαναγωγικό αυτό κέντρο αποτελεί τον πρωταρχικό δέκτη ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c*. Αποτελείται από δύο ιόντα χαλκού και αναγράφεται ως Cu_A (Σχήμα 2.1.1.1 C και D). Το κέντρο Cu_A έχει έξι υποκαταστάτες εκ των οποίων δύο είναι κατάλοιπα κυστεΐνης, δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, ένα κατάλοιπο μεθειονίνης και ένα κατάλοιπο γλουταμινικού. Οι σουλφιδικές ομάδες των καταλοίπων κυστεΐνης λειτουργούν ως γέφυρα και συνδέουν τα δύο ιόντα χαλκού μεταξύ τους. Όταν το ένζυμο βρίσκεται στην οξειδωμένη του μορφή το διπυρηνικό κέντρο Cu_A έχει διαμόρφωση μεικτού σθένους [Cu^{1.5+}-Cu^{1.5+}] ενώ στην ανηγμένη μορφή έχει διαμόρφωση [Cu⁺-Cu⁺] και το ηλεκτρόνιο που λαμβάνει κατανέμεται μεταξύ των δύο ατόμων χαλκού. Κάποιες, όμως, από τις οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* δεν περιέχουν κέντρο Cu_A αλλά μια υπομονάδα κυτοχρώματος *c*, η οποία λειτουργεί ως πρωταρχικός δέκτης ηλεκτρονίων.^{1, 4-6}

Η υπομονάδα III αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές έλικες (Σχήμα 2.1.1.1 A και B) και η λειτουργία της είναι άγνωστη, καθώς δεν περιέχει κάποια προσθετική ομάδα και δεν συμβάλει στην άντληση πρωτονίων. Παρ' όλ' αυτά είναι απαραίτητη, καθώς εμπλέκεται στη σταθερότητα της δομής της οξειδάσης, εξασφαλίζοντας τη σωστή διάταξη του ενζύμου και τη δομική προσαρμογή των ομάδων αίμης.^{1, 4-5} Η μεταφορά πρωτονίων από την αρνητική πλευρά της μεμβράνης προς το ενεργό κέντρο, καθώς επίσης και η άντληση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης επιτυγχάνεται μέσω των καναλιών άντλησης πρωτονίων.

2.1.2 Κανάλια Άντλησης Πρωτονίων

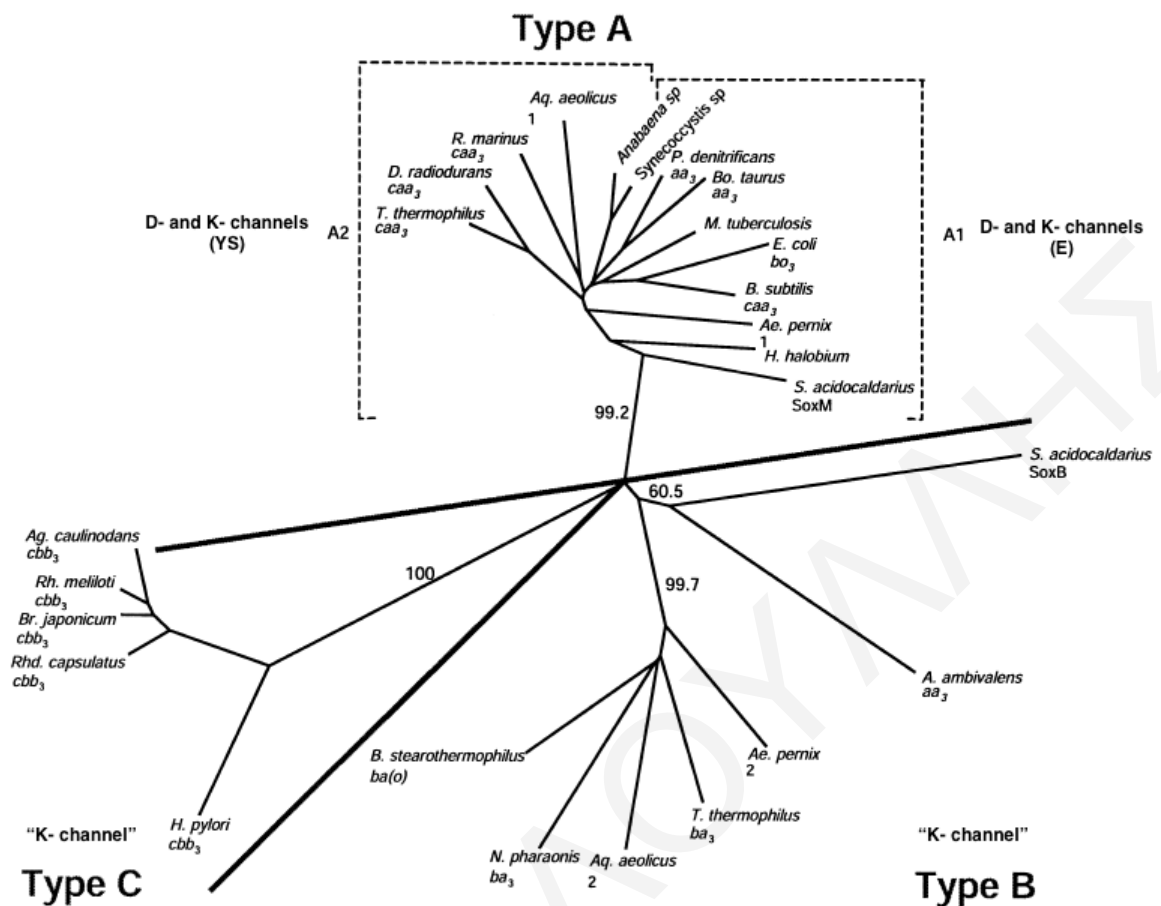
Τα κανάλια άντλησης πρωτονίων σχηματίζονται από πολικά και πρωτονιωμένα κατάλοιπα αμινοξέων και από μόρια νερού. Με βάση τις κρυσταλλικές δομές προτάθηκαν δύο

κανάλια πρωτονίων, τα K και D, τα οποία βρίσκονται στην υπομονάδα I. Τα ονόματά τους προκύπτουν από το κατάλοιπο λυσίνης (K319, αρίθμηση με βάση τη βόεια κυτοχρωμική οξειδάση) που βρίσκεται στο κέντρο του K καναλιού και από το κατάλοιπο ασπαρατικού οξέος (D91, αρίθμηση με βάση τη βόεια κυτοχρωμική οξειδάση) που βρίσκεται στην είσοδο του D καναλιού. Ένα τρίτο κανάλι, το H, παρατηρήθηκε μόνο στις οξειδάσες των θηλαστικών και δεν παρουσιάζεται στις οξειδάσες των προκαρυωτικών. Το H κανάλι βρίσκεται πλησίον της χαμηλού σπιν αίμης και σχετίζεται μόνο με την άντληση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης^{1-2, 4-5, 12} (Σχήμα 2.1.2.1).



Σχήμα 2.1.2.1: Κρυσταλλική δομή της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* από βόεια καρδιά όπου επισημαίνονται τα τρία κανάλια άντλησης πρωτονίων K, D και H. Τα κανάλια σχηματίζονται από τα κατάλοιπα αμινοξέων που αναγράφονται και τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους και με μόρια νερού που απεικονίζονται με τελείες. Οι ομάδες αίμης απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και τα ιόντα χαλκού με πορτοκαλί. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1OCC⁸.

Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* κατηγοριοποιούνται με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας τους και τα κατάλοιπα που σχηματίζουν τα κανάλια άντλησης πρωτονίων. Προκύπτουν έτσι τρεις κατηγορίες αιμοχαλκοξειδασών, οι A, B και C, εκ των οποίων η A χωρίζεται στις υποκατηγορίες A1 και A2 (Σχήμα 2.1.2.2)¹³.

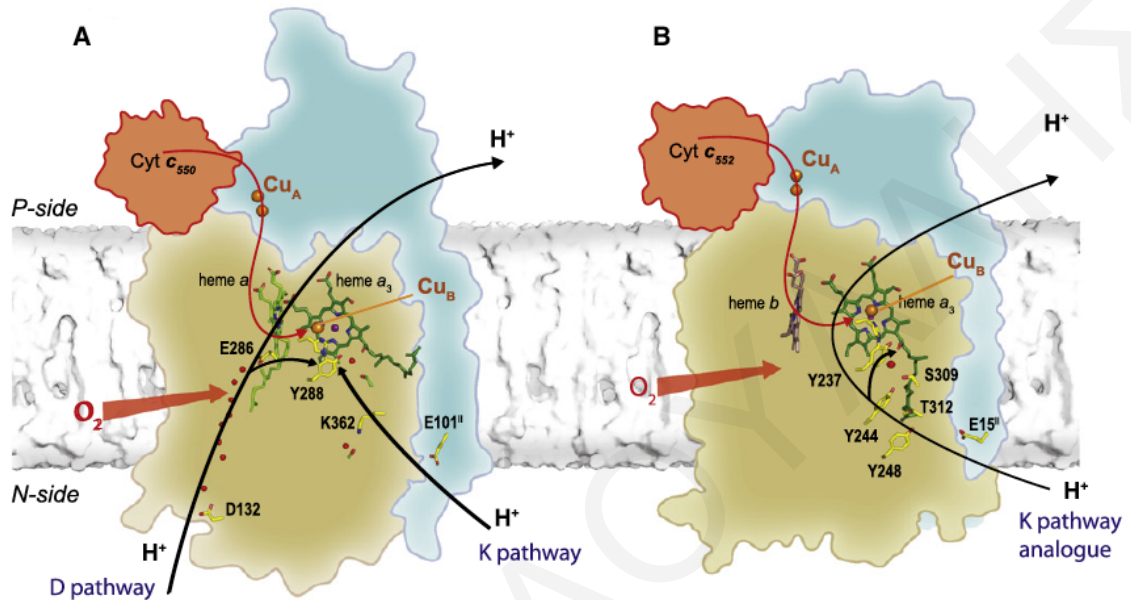


Σχήμα 2.1.2.2: Φυλογενετικό δέντρο των αιμοχαλκοξειδασών όπου παρουσιάζεται η κατηγοριοποίηση των οξειδασών του κυτοχρώματος στις κατηγορίες A (A1 και A2), B και C με βάση την ακολουθία των αμινοξέων τους και τα κανάλια άντλησης πρωτονίων που περιέχουν. Η κατηγορία A περιέχει τα D και K κανάλια, όπου στην υποκατηγορία A1 παρατηρείται το κατάλοιπο γλουταμινικού, E το οποίο αντικαθίσταται από τα κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης, YS στην υποκατηγορία A2. Οι κατηγορίες B και C περιέχουν ένα κανάλι που αναγράφεται σε εισαγωγικά για να δείξει ότι είναι ανάλογο του K καναλιού.¹³

Στην κατηγορία A ανήκουν οι μιτοχondριακές οξειδάσες και μερικές βακτηριακές οξειδάσες. Σε αυτήν την κατηγορία οι οξειδάσες μεταφέρουν πρωτόνια μέσω των δύο καναλιών άντλησης πρωτονίων, D και K και αντλούν πρωτόνια με στοιχειομετρία $1\text{H}^+/1\text{e}^-$ (Σχήμα 2.1.2.3A)¹⁴. Οι υποκατηγορίες προκύπτουν λόγω διαφοροποίησης που παρατηρείται σε κατάλοιπο του υδρόφοβου άκρου του D καναλιού. Στην υποκατηγορία A1 παρατηρείται ένα κατάλοιπο γλουταμινικού (E) στο D κανάλι, το οποίο αντικαθίσταται από κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης (YS) στην υποκατηγορία A2^{13, 15-17} (Πίνακας 2.1.2.1)¹⁵⁻¹⁶.

Μέλη της κατηγορίας B αποτελούν οι οξειδάσες που εκφράζονται κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 και παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια για το O_2 . Το D κανάλι απουσιάζει πλήρως ενώ περιέχουν ένα K κανάλι, ανάλογο με αυτό της κατηγορίας A, που

σχηματίζεται σε παρόμοια θέση αλλά από διαφορετικά κατάλοιπα (Σχήμα 2.1.2.3B)¹⁴. Η άντληση πρωτονίων πραγματοποιείται σε χαμηλότερη στοιχειομετρία $0,5\text{H}^+/\text{1e}^-$. Ένα αντιπροσωπευτικό μέλος αυτής της κατηγορίας είναι η *ba*₃ οξειδάση από το βακτήριο *T. thermophilus*¹³⁻¹⁸ (Πίνακας 2.1.2.1)¹⁵⁻¹⁶.



Σχήμα 2.1.2.3: Σχηματική αναπαράσταση των **A.** *aa*₃ (κατηγορία A) και **B.** *ba*₃ (κατηγορία B) οξειδάσων όπου επισημαίνονται τα κατάλοιπα αμινοξέων που σχηματίζουν τα κανάλια άντλησης πρωτονίων στις δύο κατηγορίες καθώς επίσης η πορεία μεταφοράς πρωτονίων από την αρνητική πλευρά της μεμβράνης προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Στην κατηγορία A αιμοχαλκοξειδάσων η μεταφορά και η άντληση πρωτονίων επιτυγχάνεται μέσω των D και K καναλιών ενώ στην κατηγορία B γίνεται μέσω του K καναλιού που σχηματίζεται σε ανάλογη θέση με αυτή της κατηγορίας A αλλά από διαφορετικά αμινοξέα. Με καφέ χρώμα απεικονίζεται η υπομονάδα I που περιέχει το διμεταλλικό κέντρο και τη χαμηλού σπιν αίμη. Με γαλάζιο χρώμα παρουσιάζεται η υπομονάδα II που περιέχει το διπυρηνικό κέντρο Cu_A και με πορτοκαλί απεικονίζεται το κυτόχρωμα *c*. Επίσης, παρουσιάζεται η πορεία που ακολουθούν τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c* προς το ενεργό κέντρο.¹⁴

Η κατηγορία C συνίσταται από τις κυτοχρωμικές οξειδάσες του τύπου *cbh*₃, οι οποίες απαντώνται κυρίως σε βακτήρια. Όπως και στις οξειδάσες της κατηγορίας B, οι οξειδάσες της κατηγορίας C δεν έχουν D κανάλι και η άντληση πρωτονίων πραγματοποιείται σε στοιχειομετρία $0,5\text{H}^+/\text{1e}^-$. Η διαφορά της κατηγορίας C εμφανίζεται στο K κανάλι, το οποίο είναι ανάλογο του K καναλιού της κατηγορίας B και σχηματίζεται από μικρότερο αριθμό καταλοίπων. Επίσης, σε αντίθεση με τις αιμοχαλκοξειδάσες των κατηγοριών A και B, οι κυτοχρωμικές οξειδάσες της κατηγορίας C δεν περιέχουν διπυρηνικό κέντρο Cu_A αλλά *c* τύπου αίμες υπεύθυνες για τη μεταφορά ηλεκτρονίων προς το ενεργό κέντρο^{13, 15-18} (Πίνακας 2.1.2.1).¹⁵⁻¹⁶

Πίνακας 2.1.2.1: Κατηγορίες A (A1 και A2), B και C αιμογαλκοξειδασών με παραδείγματα χαρακτηριστικών αντιπροσώπων, τις λειτουργικές υπομονάδες με τις ομάδες αίμης και ιόντων χαλκού, τα κανάλια άντλησης πρωτονίων που περιέχουν και τη στοιχειομετρία άντλησης πρωτονίων σε κάθε κατηγορία.¹⁵⁻¹⁶

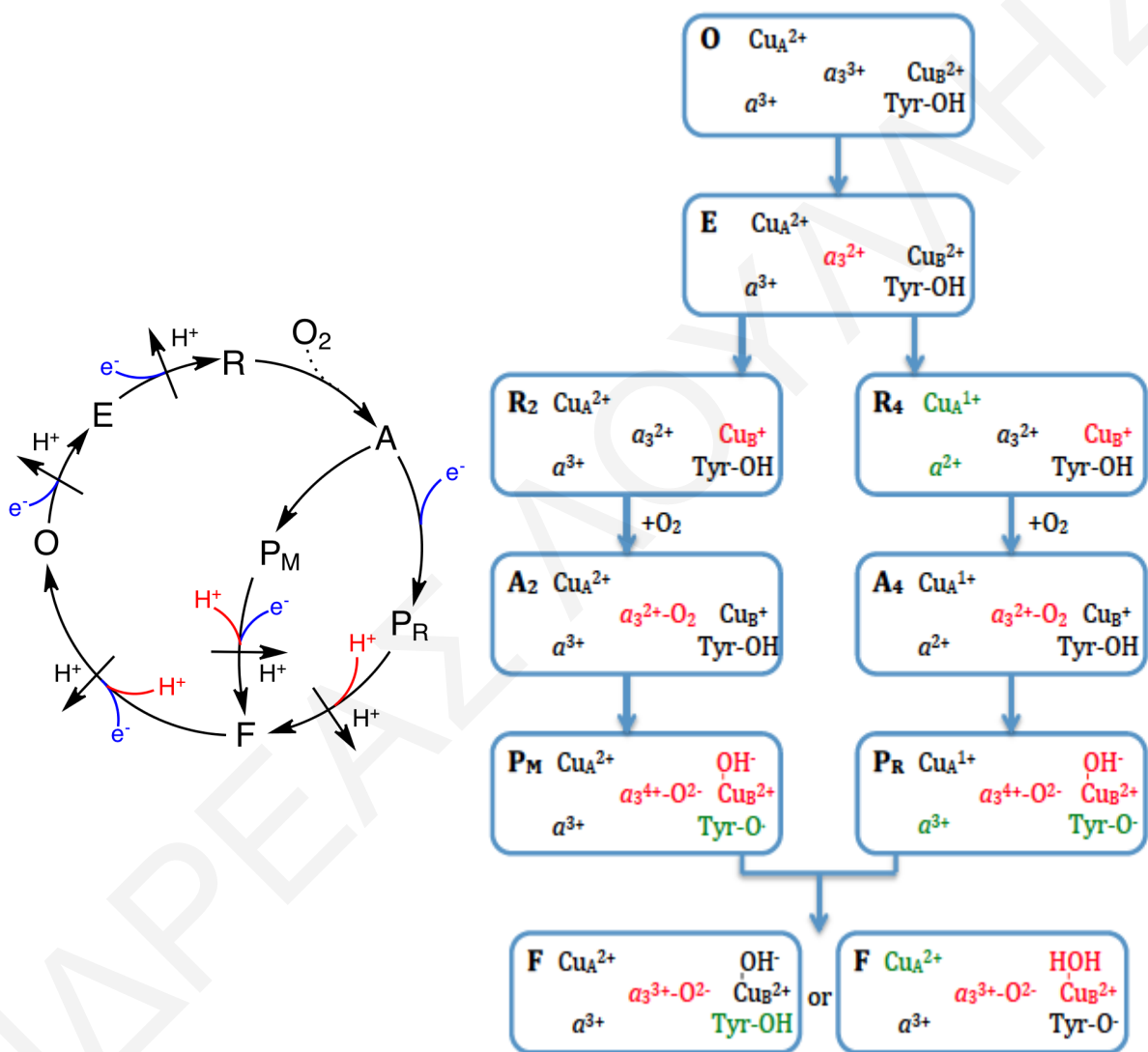
Κατηγορίες	A		B	C
	A1	A2		
Παραδείγματα	<i>aa₃ P. denitrificans</i> <i>bo₃ E. coli</i> <i>aa₃ bovine</i>	<i>caa₃ T. thermophilus</i> <i>caa₃ R. marinus</i> <i>aa₃ Synechocystis sp</i>	<i>ba₃ T. thermophilus</i> <i>aa₃ A. ambivalens</i> <i>ba₃ R. marinus</i>	<i>cbb₃ V. cholerae</i> <i>cbb₃ P. stutzeri</i> <i>cbb₃ R. sphaeroides</i>
Λειτουργικές Υπομονάδες	Υπομονάδα I	Υπομονάδα I	Υπομονάδα I	Υπομονάδα CsoN
υψηλού σπιν αίμη	<i>a₃ ή o₃</i>	<i>a₃</i>	<i>a₃</i>	<i>b₃</i>
χαμηλού σπιν αίμη	<i>Cu_B</i>	<i>Cu_B</i>	<i>Cu_B</i>	<i>Cu_B</i>
	<i>a ή b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	Υπομονάδα II	Υπομονάδα II	Υπομονάδα II	Υπομονάδα CsoO
	<i>Cu_A</i>	<i>Cu_A</i>	<i>Cu_A</i>	αίμη <i>c</i>
	Υπομονάδα III	Υπομονάδα III	Υπομονάδα III	Υπομονάδα CsoO
	Χωρίς προσθετική ομάδα	Χωρίς προσθετική ομάδα	Χωρίς προσθετική ομάδα	2 αίμες <i>c</i>
Κανάλια άντλησης H⁺	D (E), K (βακτήρια) D (E), K, H (μιτοχόνδρια)	D (YS), K	Ανάλογο K κανάλι	Ανάλογο K κανάλι
Στοιχειομετρία άντλησης H⁺	1H ⁺ /e ⁻	1H ⁺ /e ⁻	0,5H ⁺ /e ⁻	0,5H ⁺ /e ⁻

Παρόλο που υπάρχει διαφοροποίηση στη δομή των κυτοχρωμικών οξειδασών ανάμεσα στα ευκαρυωτικά και τα προκαρυωτικά, εν τούτοις όλες οι οξειδάσες καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό και αντλούν πρωτόνια δια μέσου της μεμβράνης. Η αναγωγή του O₂ και η άντληση πρωτονίων γίνεται μέσω διαδοχικών σταδίων που συνιστούν τον καταλυτικό κύκλο των αιμογαλκοξειδασών.

2.1.3 Καταλυτικός Κύκλος

Ο καταλυτικός κύκλος των αιμογαλκοξειδασών έχει μελετηθεί εντατικά και τα ενδιάμεσα του έχουν χαρακτηριστεί με φασματοσκοπικές μεθόδους. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμα αντικρουόμενες προτάσεις για ορισμένα από τα στάδιά του. Σύμφωνα με τις επικρατέστερες μελέτες των τελευταίων ετών τα βασικά στάδια του καταλυτικού κύκλου περιγράφονται παρακάτω.^{1-2, 4-5}

Ο καταλυτικός κύκλος (Σχήμα 2.1.3.1) ξεκινά από το πλήρως οξειδωμένο ένζυμο, **O** κατάσταση, όπου όλα τα οξειδοαναγωγικά κέντρα (Cu_A , Cu_B , υψηλού και χαμηλού σπιν αίμες) βρίσκονται στην οξειδωμένη τους μορφή. Η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το κυτόχρωμα *c* στο ενεργό κέντρο οδηγεί στο σχηματισμό της κατάστασης **E**, η οποία συνοδεύεται με άντληση πρωτονίου μέσω του K καναλιού.



Σχήμα 2.1.3.1: Στάδια του καταλυτικού κύκλου των αιμοχαλκοξειδασών (δεξιά) με τις πιθανές δομές των ενδιάμεσων ανά στάδιο (αριστερά). Στα πλαίσια των πιθανών δομών οι μεταβολές των ομάδων του ενεργού κέντρου (αίμη a_3 και Cu_B) επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα και οι μεταβολές των υπόλοιπων ομάδων (αίμη a , Cu_A και Tyr) με πράσινο.

Στη συνέχεια ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο μεταφέρεται με την ίδια διαδικασία στο ενεργό κέντρο σχηματίζοντας την κατάσταση **R₂** (μεικτού σθένους), όπου μόνο τα μέταλλα του ενεργού κέντρου (υψηλού σπιν αίμη και Cu_B) είναι ανηγμένα, αντλώντας ταυτόχρονα

πρωτόνιο μέσω του K καναλιού. Με προσθήκη ακόμα δύο ηλεκτρονίων δημιουργείται η κατάσταση \mathbf{R}_4 (πλήρως ανηγμένη) όπου όλα τα οξειδοαναγωγικά κέντρα βρίσκονται στην ανηγμένη τους μορφή.

Όταν το ένζυμο βρίσκεται στην κατάσταση \mathbf{R} μπορεί να δεσμεύσει ένα μόριο οξυγόνου στο σίδηρο της υψηλού σπιν αίμης. Η διαμόρφωση που προκύπτει ονομάζεται \mathbf{A} . Με τη δέσμευση του οξυγόνου, ο δεσμός O-O διασπάται και το ένζυμο μεταβαίνει στην κατάσταση \mathbf{P} . Το ένα άτομο οξυγόνου είναι δεσμευμένο στο σίδηρο της υψηλού σπιν αίμης σχηματίζοντας οξο-φερυλ δομή ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) ενώ το άλλο άτομο οξυγόνου είναι δεσμευμένο στο Cu_B υπό τη μορφή ιόντος υδροξειδίου. Για τη διάσπαση του δεσμού απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια. Τα δύο από αυτά προέρχονται από την υψηλού σπιν αίμη ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{4+}$) και ένα από το Cu_B ($\text{Cu}_B^{2+} \rightarrow \text{Cu}_B^+$). Το τέταρτο ηλεκτρόνιο μπορεί να προέλθει από δύο πηγές, ανάλογα με την κατάσταση που βρισκόταν το ένζυμο (μεικτού σθένους \mathbf{R}_2 ή πλήρως ανηγμένη \mathbf{R}_4). Στην περίπτωση του πλήρως ανηγμένου ενζύμου σχηματίζεται η κατάσταση \mathbf{P}_R και το τέταρτο ηλεκτρόνιο λαμβάνεται από τη χαμηλού σπιν αίμη. Απαιτείται επιπλέον η λήψη πρωτονίου, το οποίο λαμβάνεται πιθανόν από το κατάλοιπο τυροσίνης που βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένο σε έναν από τους υποκαταστάτες ιστιδίνης του Cu_B . Στην περίπτωση του μεικτού σθένους, έχει προταθεί ότι, τόσο το τέταρτο ηλεκτρόνιο όσο και το πρωτόνιο λαμβάνονται από το κατάλοιπο τυροσίνης, σχηματίζοντας ρίζα τυροσίνης, οδηγώντας στη δημιουργία της κατάστασης \mathbf{P}_M . Οι μεταβάσεις $\mathbf{R} \rightarrow \mathbf{A} \rightarrow \mathbf{P}$ δεν συνοδεύονται από άντληση πρωτονίων.

Ακολούθως, σχηματίζεται το \mathbf{F} ενδιάμεσο με ταυτόχρονη άντληση πρωτονίου δια μέσου της μεμβράνης. Για τη μετάβαση από τη \mathbf{P}_R στην \mathbf{F} κατάσταση απαιτείται ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο ενώ από τη \mathbf{P}_M στην \mathbf{F} απαιτείται μόνο ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο λαμβάνεται από τη θετική πλευρά της μεμβράνης μέσω του D καναλιού και έχει προταθεί ότι χρησιμοποιείται είτε για να πρωτονιώσει το κατάλοιπο τυροσίνης, είτε για να σχηματίσει νερό με την υδροξυλομάδα που είναι δεσμευμένη στο Cu_B . Το ηλεκτρόνιο προέρχεται από το κατάλοιπο τυροσίνης.

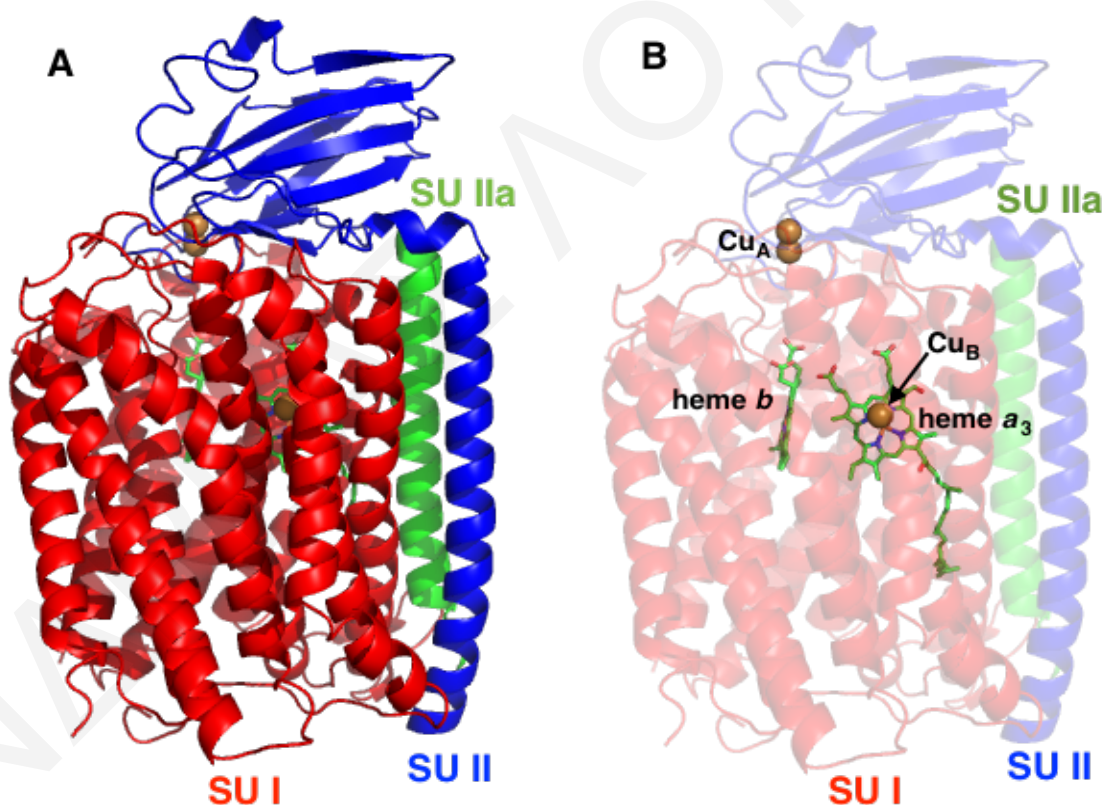
Ο κύκλος ολοκληρώνεται με το ένζυμο να επιστρέφει πίσω στην οξειδωμένη του μορφή. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, τα οποία λαμβάνονται μέσω του D καναλιού και της χαμηλού σπιν αίμης, αντίστοιχα, ενώ παράλληλα, πραγματοποιείται άντληση πρωτονίου.^{1-2, 4-5, 17}

Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της αναπνευστικής αλυσίδας τόσο στα ευκαρυωτικά όσο και στα προκαρυωτικά. Η διαφοροποίηση ως προς τη δομή και τη δραστηκότητά τους προς διαφορετικά υποστρώματα καθιστά απαραίτητη τη

συγκριτική τους μελέτη. Στην παρούσα εργασία επικεντρωθήκαμε σε χαρακτηριστικούς εκπροσώπους οξειδάσων της κατηγορίας B (ba_3 οξειδάση από το βακτήριο *T. thermophilus*) και της κατηγορίας C (cbb_3 οξειδάση από το βακτήριο *P. stutzeri*).

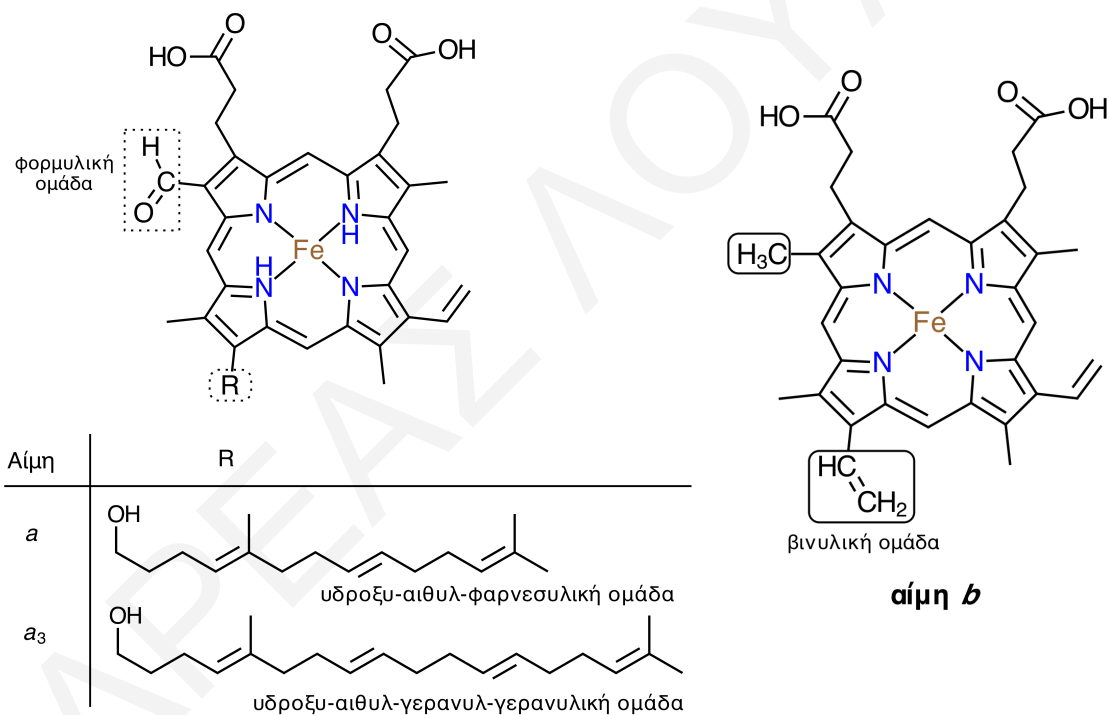
2.2 Κυτοχρωμική Οξειδάση ba_3

Το αρνητικό κατά Gram θερμόφιλο βακτήριο *Thermus thermophilus* εκφράζει, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται, *c*- και *b*- τύπου κυτοχρώματα, καθώς επίσης δύο τελικές οξειδάσες, τις ba_3 και caa_3 οξειδάσες.¹⁹⁻²⁰ Η ba_3 οξειδάση εκφράζεται κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το O_2 . Αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ένζυμο που περιέχει μόνο μια υπομονάδα²⁰ αλλά στη συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι αποτελείται από τρεις υπομονάδες, τις υπομονάδες I, II και IIa (Σχήμα 2.2.1A).¹¹



Σχήμα 2.2.1: **A.** Κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* όπου επισημαίνονται οι υπομονάδες I, II και IIa, από τις οποίες αποτελείται. Η υπομονάδα I απεικονίζεται με κόκκινο, η υπομονάδα II με μπλε και η υπομονάδα IIa με πράσινο **B.** Κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδάσης όπου επισημαίνεται η διάταξη του διμεταλλικού κέντρου (υψηλού σπιν αίμη a_3 και Cu_B), της χαμηλού σπιν αίμης *b* και του διπυρηνικού κέντρου Cu_A . Οι ομάδες αίμης a_3 και *b* και ο Cu_B βρίσκονται στην υπομονάδα I, και το διπυρηνικό κέντρο Cu_A στην υπομονάδα II. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.¹¹

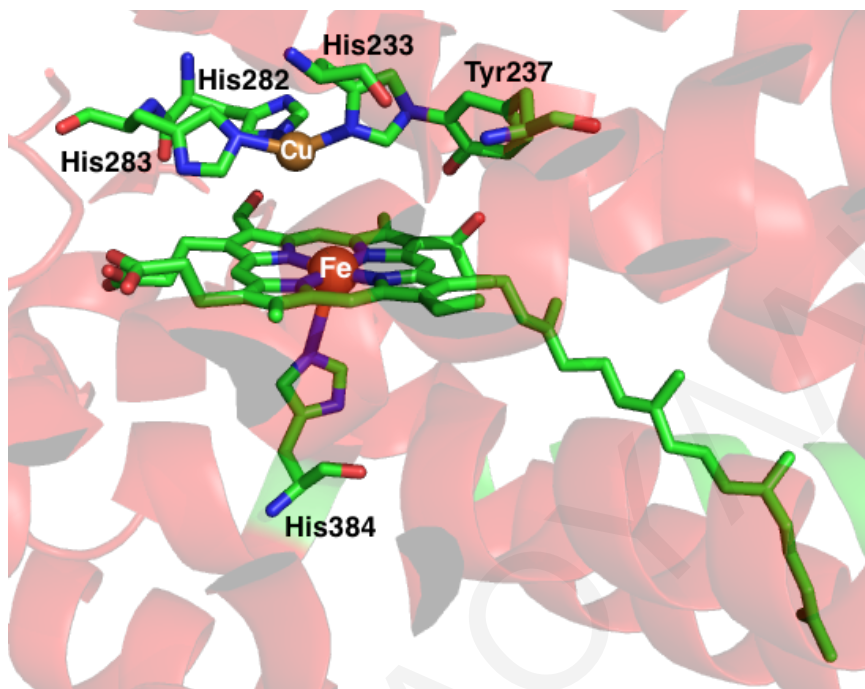
Η υπομονάδα I αποτελείται από 13 διαμεμβρανικές έλικες σε αντίθεση με τις υπομονάδες I των αιμοχαλκοξειδασών της κατηγορίας A που συνίστανται από 12 διαμεμβρανικές έλικες.²¹ Οι αλυσίδες που ενώνουν μεταξύ τους τις έλικες είναι κοντύτερες έτσι ώστε να μειώνεται η εντροπία αποδιάταξης των ελίκων και να αυξάνεται η θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης.²²⁻²³ Στην υπομονάδα I περιέχονται τα τρία από τα τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα, οι χαμηλού και υψηλού σπιν αίμες και το ιόν Cu_B (Σχήμα 2.2.1B). Η υψηλού σπιν αίμη είναι τύπου *a* και μαζί με το ιόν Cu_B σχηματίζουν το διμεταλλικό ενεργό κέντρο ενώ η χαμηλού σπιν αίμη είναι τύπου *b* (Σχήμα 2.2.2). Η αίμη a_3 της ba_3 οξειδάσης χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας φορμυλομάδας στον C8 και μιας υδροξυ-αιθυλ-γερανυλ-γερανυλικής ομάδας στον C2, αντί για υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσυλικής ομάδα που παρατηρείται στην τυπική δομή της αίμης *a* (Σχήμα 2.2.2).



Σχήμα 2.2.2: Δομή αιμών *a*, a_3 και *b*.

Η υδροξυ-αιθυλ-γερανυλ-γερανυλική ομάδα είναι ευθύγραμμη και εκτείνεται μέχρι το κυτταρόπλασμα χωρίς να παρεμβάλλεται στα κανάλια άντλησης πρωτονίων. Η υψηλή υδροφοβικότητα που παρουσιάζει πιθανόν να σταθεροποιεί την αίμη στις υψηλές θερμοκρασίες που διατηρείται το ένζυμο. Με βάση την κρυσταλλική δομή, το κατάλοιπο His384/ α 10 (Σχήμα 2.2.3) είναι δεσμευμένο στην πέμπτη θέση ένταξης του σιδήρου της αίμης a_3 .^{11, 21, 24} Ο Cu_B έχει τρεις υποκαταστάτες ιστιδίνης, His283/ α 7, His282/ α 7 και

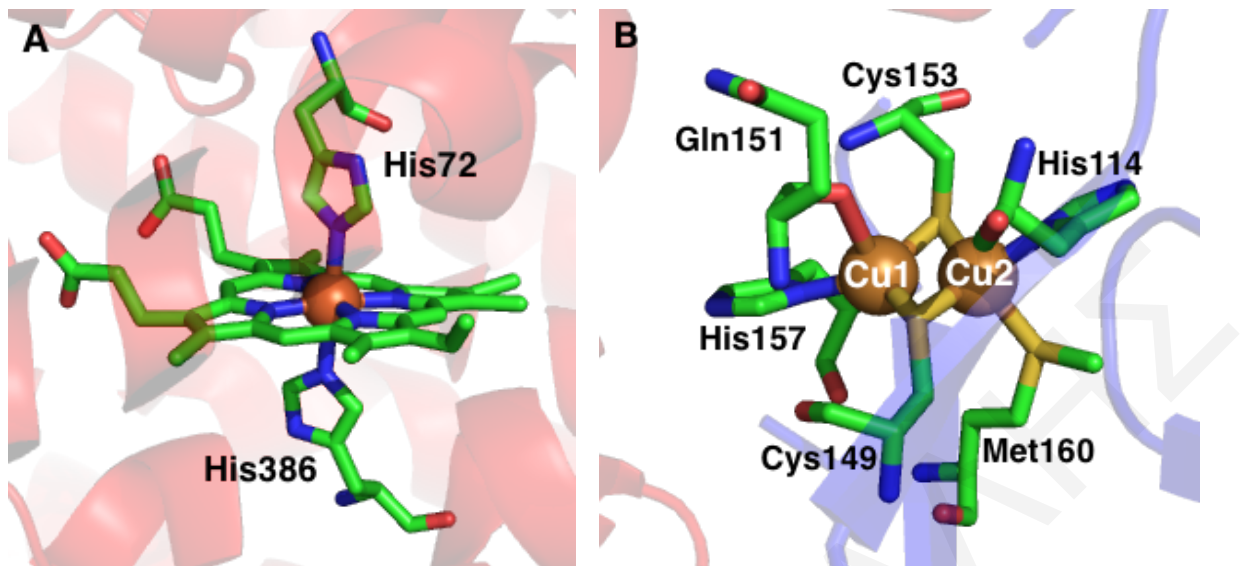
His233/α6, εκ των οποίων η His233 είναι ομοιοπολικά δεσμευμένη με το κατάλοιπο Tyr237/α6^{11, 21} (Σχήμα 2.2.3).



Σχήμα 2.2.3: Σχηματική αναπαράσταση του διμεταλλικού κέντρου αίμης a_3/Cu_B της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες του. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.¹¹

Στη χαμηλού σπιν αίμη b τα κατάλοιπα His72/α2 και His386/α10 λειτουργούν ως αξονικοί υποκαταστάτες στην πέμπτη και έκτη θέση ένταξης (Σχήμα 2.2.4A).^{11, 21}

Η υπομονάδα II σχηματίζει μόνο μια διαμεμβρανική έλικα και περιέχει το τέταρτο οξειδοαναγωγικό κέντρο, το διπυρηνικό κέντρο Cu_A (Σχήμα 2.2.1B). Η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων χαλκού είναι 2,4 Å. Στο ένα άτομο Cu ($Cu1$) βρίσκονται ενταγμένα τα κατάλοιπα Cys149, Cys153, His157 και Gln151 ενώ στο δεύτερο άτομο ($Cu2$) τα κατάλοιπα Cys149, Cys153, His114 και Met160. Οι σουλφιδικές ομάδες των καταλοίπων Cys149 και Cys153 λειτουργούν ως γέφυρα που συνδέει τα δύο άτομα χαλκού (Σχήμα 2.2.4B).^{11, 21, 25} Η μεταφορά ηλεκτρονίων προς το Cu_A πραγματοποιείται μέσω του κυτοχρώματος c_{552} . Η περιοχή της υπομονάδας II όπου δεσμεύεται το κυτόχρωμα c_{552} περιέχει υδρόφοβα αμινοξέα και ως εκ τούτου η δέσμευση πραγματοποιείται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.²⁶⁻²⁷ Αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με τις μεσόφιλες οξειδάσες, όπου η δέσμευση του κυτοχρώματος c γίνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Στην ba_3 οξειδάση απουσιάζουν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εφόσον σε ψηλές θερμοκρασίες γίνονται σημαντικά ασθενέστερες.²⁸



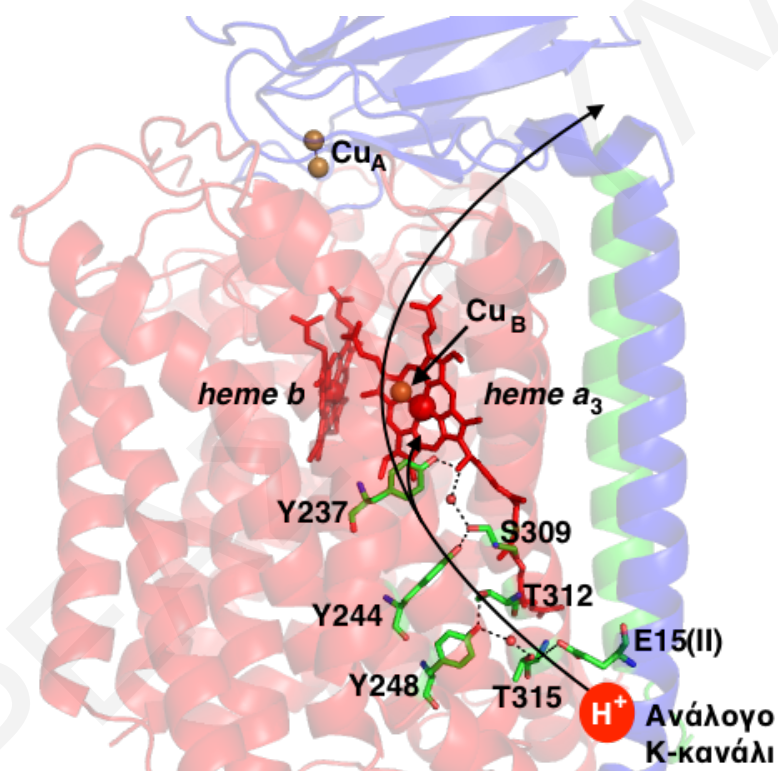
Σχήμα 2.2.4: Σχηματική αναπαράσταση **A.** της αίμης *b* και **B.** του διπυρηνικού κέντρου Cu_A της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες τους. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.¹¹

Η υπομονάδα Πα σχηματίζει μια διαμεμβρανική έλικα με αντίθετη πολικότητα και είναι σημαντική για τη λειτουργία της ba_3 οξειδάσης (Σχήμα 2.2.1B). Ο κανονικός αριθμός διαμεμβρανικών ελίκων της υπομονάδας Π είναι δύο. Ως εκ τούτου, η υπομονάδα Πα πιθανόν να είναι η δεύτερη έλικα της υπομονάδας Π και να λειτουργεί συμπληρωματικά και δομικά της υπομονάδας Π.^{11, 21, 29}

Η μεταφορά ηλεκτρονίων προς το ενεργό κέντρο επιτυγχάνεται μέσω καταλοίπων που είναι σημαντικά για τη λειτουργία της κυτοχρωμικής οξειδάσης, όπως οι υποκαταστάτες των αιμών και των ιόντων Cu καθώς επίσης και από κατάλοιπα πλησίον αυτών των υποκαταστατών. Το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c_{552} στο Cu_A μελετήθηκε με τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και προτείνεται ότι τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τον πορφυρινικό δακτύλιο της αίμης του κυτοχρώματος c_{552} διαδοχικά μέσω των καταλοίπων Ala87, Phe88 και His114 για να καταλήξουν στο άτομο CU2 του διπυρηνικού κέντρου Cu_A .³⁰ Μετά το Cu_A , τα ηλεκτρόνια μπορούν να ακολουθήσουν δύο πορείες. Στην πρώτη περίπτωση το ηλεκτρόνιο μεταβαίνει από το Cu_A διαδοχικά στα κατάλοιπα Arg450, Arg449, Phe385 καταλήγοντας στην αίμη a_3 . Εναλλακτικά, στη δεύτερη περίπτωση, το ηλεκτρόνιο μεταφέρεται μέσω των καταλοίπων Gln151, Tyr136, Trp229 και His283 (υποκαταστάτης του Cu_B) καταλήγοντας στο Cu_B .^{11, 21}

Με βάση την κρυσταλλική δομή έχει προταθεί ότι υπάρχουν τρία πιθανά κανάλια άντλησης πρωτονίων.¹¹ Ως μέλος της κατηγορίας B, η ba_3 οξειδάση περιέχει το K κανάλι που είναι ανάλογο αυτού των αιμοχαλκοξειδασών της κατηγορίας A. Για την ταυτοποίηση

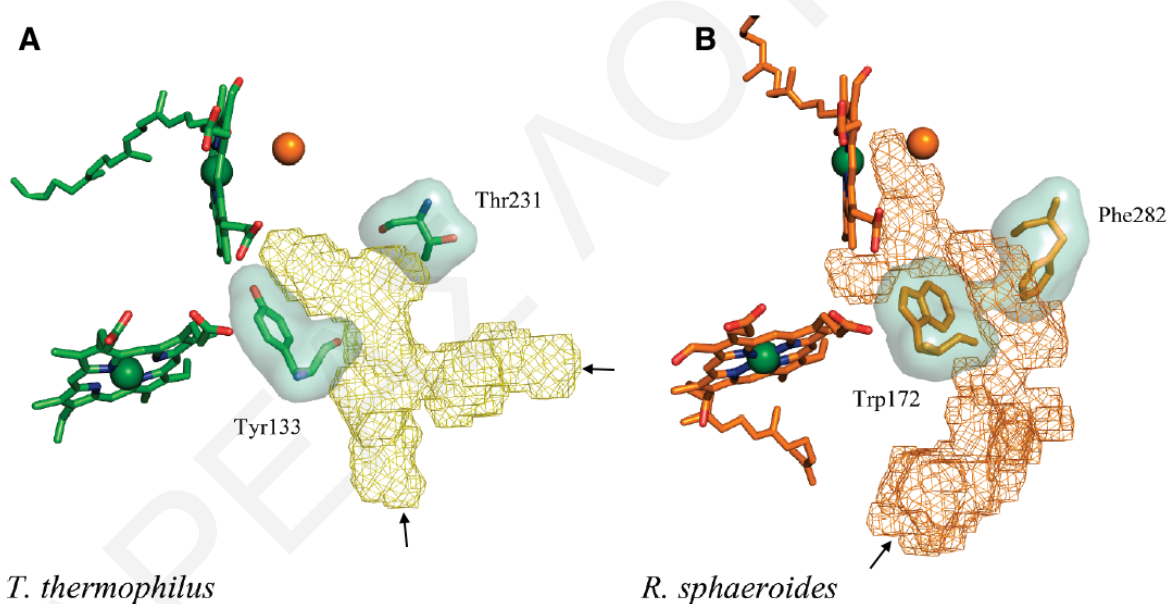
των καταλοίπων που σχηματίζουν το ανάλογο αυτό κανάλι, πραγματοποιήθηκε σειρά μελετών μετάλλαξης αμινοξέων. Τα κατάλοιπα του K καναλιού μεταλλάχθηκαν με μη πολικά αμινοξέα έτσι ώστε να εξαλειφθεί η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Από τις μελέτες αυτές εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι το ανάλογο K κανάλι ξεκινά από το κατάλοιπο Glu15 στην υπομονάδα II και συνεχίζει στα κατάλοιπα της υπομονάδας I, Thr315, Tyr248, Thr312, Ser309, Tyr244 και Tyr237 (Σχήμα 2.2.5). Επιπλέον, με τις μεταλλάξεις, μειώθηκε σημαντικά η ικανότητα αναγωγής του O_2 , καθώς επίσης και η μεταφορά και άντληση πρωτονίων, υποδεικνύοντας το κανάλι K ως απαραίτητο για την καταλυτική δράση της ba_3 οξειδάσης.³¹



Σχήμα 2.2.5: Κρυσταλλική δομή της ba_3 οξειδάσης όπου επισημαίνονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν το ανάλογο K κανάλι και η πορεία που ακολουθούν τα πρωτόνια προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι ομάδες αίμης και με πορτοκαλί τα ιόντα χαλκού. Η υπομονάδα I απεικονίζεται με ασθενές κόκκινο, η υπομονάδα II με ασθενές μπλε και η υπομονάδα III με ασθενές πράσινο. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.¹¹

Το δεύτερο κανάλι που προτάθηκε είναι παρόμοιο με το D κανάλι ενώ το τρίτο, Q κανάλι, οδηγεί από το κατάλοιπο Gln254 στην His384 της αίμης a_3 .¹¹ Παρόμοια πειράματα μετάλλαξεων πραγματοποιήθηκαν για τα D και Q κανάλια αλλά κανένα δεν επηρέαζε την καταλυτική δράση ή την άντληση πρωτονίων της αιμοχαλκοξειδάσης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αυτά τα δύο κανάλια δεν λειτουργούν ως κανάλια άντλησης πρωτονίων.³¹

Αξιοπρόσεκτο στην ba_3 οξειδάση είναι ότι το κατάλοιπο Glu278 (αρίθμηση με βάση την κυτοχρωμική οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides*), αντικαθίσταται από το κατάλοιπο Ile235. Το Glu278 ανήκει στο D κανάλι και είναι ένα από τα απαραίτητα κατάλοιπα για την άντληση πρωτονίων στις αιμοχαλκοξειδάσες της κατηγορίας A. Η αντικατάστασή του με το Ile235 ίσως να ευθύνεται για την μειωμένη άντληση πρωτονίων ($0,5H^+/e^-$) που παρατηρείται στην ba_3 οξειδάση. Η παρουσία του καταλοίπου Ile235 βελτιστοποιεί το σχηματισμό υδρόφοβης κοιλότητας από το μέσο της μεμβράνης στο διμεταλλικό κέντρο. Η υδρόφοβη κοιλότητα αποτελεί σημείο εισόδου του O_2 και ως εκ τούτου λειτουργεί ως το μονοπάτι μεταφοράς του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Αυτό δείχνει ότι η εξασφάλιση ικανοποιητικής ποσότητας υποστρώματος είναι σημαντικότερη από την άντληση πρωτονίων για τη λειτουργία του ενζύμου κάτω από τις χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 στις οποίες αναπτύσσεται το βακτήριο.¹¹



Σχήμα 2.2.6: Κοιλότητες μεταφοράς O_2 προς το ενεργό κέντρο **A.** της ba_3 οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* και **B.** της aa_3 οξειδάσης από το βακτήριο *R. sphaeroides*. Τα σημεία εισόδου του O_2 επισημαίνονται με τόξα. Η κοιλότητα στην ba_3 οξειδάση έχει σχήμα Y, παρουσιάζει δυο σημεία εισόδου και δεν εμφανίζει στένωση. Στην aa_3 οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides* υπάρχει μόνο ένα σημείο εισόδου του O_2 και παρουσιάζεται στένωση λόγω της παρουσίας των καταλοίπων Phe282 και Trp172.³²

Το μέγεθος και το σχήμα της υδρόφοβης κοιλότητας της ba_3 οξειδάσης διευκρινίστηκε μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών δέσμευσης Xe και Kr. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι η κοιλότητα έχει σχήμα Y, οπότε έχει δύο πλευρές εισόδου του υποστρώματος, και ο όγκος που καταλαμβάνει είναι $\sim 390 \text{ \AA}^3$ (Σχήμα 2.2.6A).³² Σε αντίθεση, οι υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες έχουν μόνο μια πλευρά εισόδου, μικρότερο όγκο και εμφανίζουν ένα

σημείο όπου υπάρχει στένωση στην κοιλότητα, που προκύπτει από την παρουσία των καταλοίπων Phe282 και Trp172 (αρίθμηση με βάση την κυτοχρωμική οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides*) (Σχήμα 2.2.6B). Στην περίπτωση της ba_3 οξειδάσης, στη θέση των καταλοίπων Phe282 και Trp172 βρίσκονται τα κατάλοιπα Thr231 και Tyr133 που είναι μικρότερα σε μέγεθος και έτσι δεν εμφανίζεται στένωση στην κοιλότητα (Σχήμα 2.2.6A). Οι δύο πλευρές εισόδου και ο μεγάλος όγκος που παρουσιάζει η υδρόφοβη κοιλότητα στην ba_3 οξειδάση διευκολύνουν τη μεταφορά του O_2 από τη μεμβράνη στο διμεταλλικό κέντρο. Αυτό είναι αναγκαίο, καθώς το βακτήριο *T. thermophilus* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες $70\text{ }^\circ\text{C}$ και η συγκέντρωση του διαλυμένου O_2 στο νερό σε αυτή τη θερμοκρασία είναι περίπου η μισή της συγκέντρωσης στους $25\text{ }^\circ\text{C}$.³²

Η ba_3 οξειδάση εκτός από τη δραστηριότητα που παρουσιάζει ως προς το O_2 , που είναι το φυσικό της υπόστρωμα, παρουσιάζει επίσης ασυνήθιστη δραστηριότητα ως προς τους εξωγενείς υποκαταστάτες της αίμης a_3 , όπως είναι το CN^- ,³³⁻³⁶ το CO ,³⁷⁻³⁸ και το NO .³⁹⁻⁴⁰ Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν μοναδική ανάμεσα στις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες και σημαντική προς μελέτη.

Η δραστηριότητα της ba_3 οξειδάσης αλλά και άλλων βακτηριακών οξειδασών ως προς το NO αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Το ένζυμο που φυσιολογικά ανάγει το NO σε N_2O είναι οι αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου. Οι οξειδάσες του κυτοχρώματος c παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου. Επίσης, το ενεργό κέντρο και στα δύο ένζυμα είναι ένα διμεταλλικό κέντρο που αποτελείται από το Fe της υψηλού σπιν αίμης και ένα δεύτερο μέταλλο, που στις οξειδάσες είναι Cu ενώ στις αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου είναι Fe .⁴¹⁻⁴² Από αυτές τις ομοιότητες αναμένεται ότι ο μηχανισμός αναγωγής του O_2 και του NO θα παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά και πιθανόν το O_2 και το NO να χρησιμοποιούνται ως εναλλακτικά υποστρώματα από τα δύο ένζυμα.⁴³

Η ομάδα του A. Giuffrè μελέτησε τη δράση των ba_3 και caa_3 οξειδασών από το βακτήριο *T. thermophilus*.⁴³ Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάτω από αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες, τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν δράση αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου, καταλύοντας την αντίδραση αναγωγής του NO σε N_2O . Η καταλυτική δράση των ba_3 και caa_3 οξειδασών βρέθηκε $3,0 \pm 0,7\text{ mol NO/mol } ba_3 \times \text{min}$ και $32 \pm 8\text{ mol NO/mol } caa_3 \times \text{min}$ σε $[NO] \approx 50\mu\text{M}$, η οποία είναι σημαντικά μικρότερη από την καταλυτική δράση των αναγωγασών του μονοξειδίου του αζώτου ($300\text{-}4500\text{ mol NO/mol ενζύμου} \times \text{min}$). Η μικρότερη καταλυτική δράση των αιμοχαλκοξειδασών είναι αναμενόμενη, καθώς το ενεργό τους κέντρο έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να αντιδρά με το O_2 . Από τη μελέτη

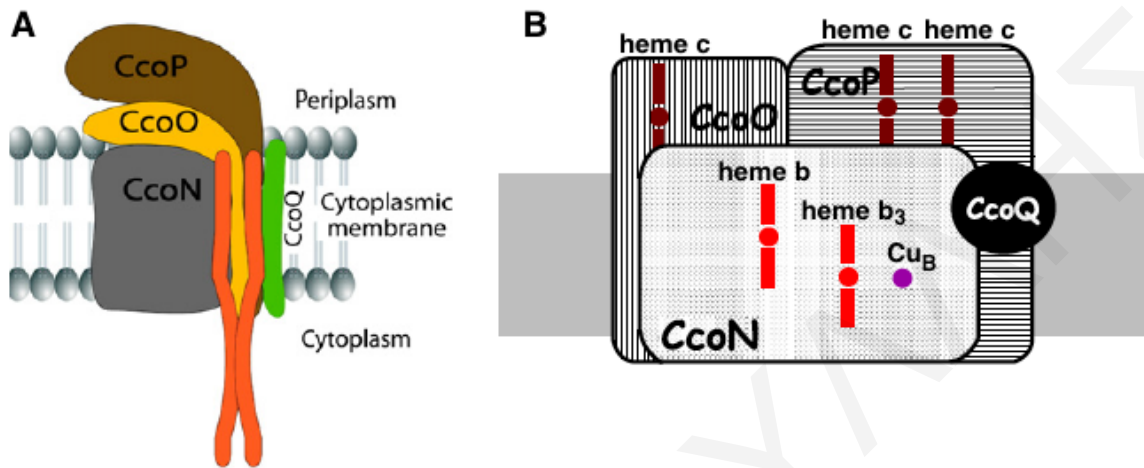
προτάθηκε ότι δύο μόρια NO αντιδρούν με την πλήρως ανηγμένη ba_3 οξειδάση. Το ένα δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια στο Fe^{2+} της αίμης a_3 ενώ το δεύτερο δεσμεύεται με πολύ μικρότερη συγγένεια στο Cu_B^+ , ο οποίος παρέχει ένα ηλεκτρόνιο στο NO και ανάγεται στη συνέχεια από τη χαμηλού σπιν αίμη b .⁴³ Αντίθετα, στην ανηγμένη βόεια aa_3 οξειδάση, σχηματίζεται το σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}$ -NO χωρίς να πραγματοποιείται καταλυτική αναγωγή του NO.⁴⁴ Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι η εξελικτική μετάβαση μεταξύ κυτοχρωμικών οξειδασών και αναγωγασών του μονοξειδίου του αζώτου εκτός από την αντικατάσταση του Fe με Cu πιθανόν να οδήγησε στην εμφάνιση ενζύμων με ενδιάμεσες ιδιότητες. Από τις μελέτες προτείνεται ότι οι αιμοχαλκοξειδάσες και οι αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου πιθανόν να εξελίχθηκαν από κοινό πρόγονο και υποστηρίζεται η πιθανή ταυτόχρονη εξέλιξη της αερόβιας αναπνοής και της απονιτροποίησης.⁴³

2.3 Κυτοχρωμικές Οξειδάσες cbb_3

Οι cbb_3 τύπου κυτοχρωμικές οξειδάσες απαντώνται μόνο στα βακτήρια και συνιστούν την κατηγορία C των αιμοχαλκοξειδασών. Αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα μετά τις aa_3 τύπου, περιλαμβάνοντας περίπου το 20% των αιμοχαλκοξειδασών.⁴⁵ Εκφράζονται κυρίως κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 ⁴⁵ και χαρακτηρίζονται από την υψηλή συγγένεια που παρουσιάζουν για το O_2 ,⁴⁶ τη μειωμένη άντληση πρωτονίων δια μέσου της μεμβράνης⁴⁷ και την ικανότητά τους να ανάγουν το NO σε N_2O , παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη δραστικότητα αναγωγής NO από όλες τις γνωστές αιμοχαλκοξειδάσες.⁴⁸ Οι ιδιότητες αυτές αξιοποιούνται από διάφορα παθογόνα πρωτεοβακτήρια και τους δίνουν τη δυνατότητα να αποικίσουν μικροαερόβιο περιβάλλον. Επίσης, αξιοποιούνται από αγρονομικά συμβιωτικές διαζωτροφίνες που μπορούν να εκτελούν ταυτόχρονα τις λειτουργίες της αερόβιας αναπνοής και της καθήλωσης αζώτου.⁴⁹⁻⁵¹ Η μεγάλη δραστικότητα αναγωγής μονοξειδίου του αζώτου που παρουσιάζουν δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς οι cbb_3 οξειδάσες είναι στενοί συγγενείς των αναγωγασών του μονοξειδίου του αζώτου και μοιράζονται πολλά φυλογενετικά και δομικά χαρακτηριστικά με αυτές.^{13, 52-54}

Η σχεδόν αποκλειστική παρουσία των cbb_3 οξειδασών στα βακτήρια αντιτίθεται με τη γενική κατανομή των αιμοχαλκοξειδασών σε όλους τους τομείς της ζωής. Προτείνεται ότι οι cbb_3 οξειδάσες εξελίχθηκαν πριν από περίπου 2 δισεκατομύρια χρόνια και αντιπροσωπεύουν ένα μοντέρνο ένζυμο, το οποίο έχει εξελιχθεί ανεξάρτητα για να εκπληρώσει τον εξειδικευμένο ρόλο του μικροαερόβιου μεταβολισμού ενέργειας.⁴⁵ Οι cbb_3 οξειδάσες απαρτίζονται συνήθως από τέσσερις υπομονάδες (Σχήμα 2.3.1A)⁵⁵, τις

CcoN (υπομονάδα I), CcoO (υπομονάδα II), CcoP (υπομονάδα III) και CcoQ (υπομονάδα IV) αλλά υπάρχουν πολλές περιπτώσεις που αποτελούνται από τρεις υπομονάδες (CcoNOP).



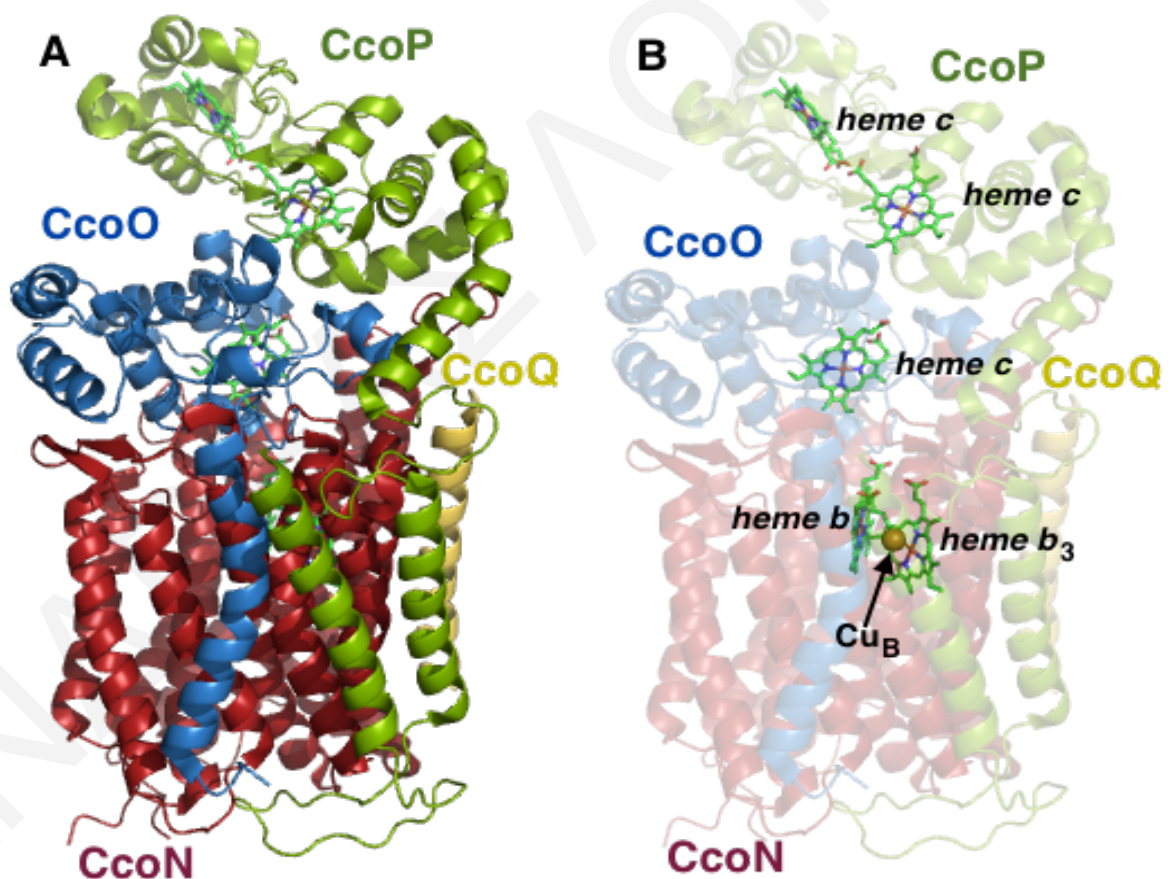
Σχήμα 2.3.1: A. Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων CcoNOPQ που απαρτίζουν τις *cbb₃* οξειδάσες⁵⁵ B. Διάταξη των προσθετικών ομάδων αίμης και Cu_B στις υπομονάδες CcoNOP.⁴⁵ Η υπομονάδα CcoN περιέχει το διμεταλλικό κέντρο υψηλού σπιν αίμης b₃/Cu_B και τη χαμηλού σπιν αίμη b. Η υπομονάδα CcoO περιέχει μια ομάδα αίμης c και η υπομονάδα CcoP δύο ομάδες αίμης c.

Η υπομονάδα CcoN είναι ανάλογη της υπομονάδας I της κατηγορίας A των αιμοχαλκοξειδασών αλλά παρουσιάζει πολύ μικρή ομολογία αλληλουχίας (μικρότερη από 20%). Αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και περιέχει τη χαμηλού σπιν αίμη b και το διμεταλλικό κέντρο υψηλού σπιν αίμης b₃-Cu_B (Σχήμα 2.3.1B)⁴⁵. Στα οξειδοαναγωγικά κέντρα βρίσκονται δεσμευμένοι, υποκαταστάτες ιστιδίνης όπως παρατηρείται σε όλες τις αιμοχαλκοξειδάσες. Αξιοσημείωτη, είναι η παρουσία της αίμης b στο ενεργό κέντρο. Σε αντίθεση με τις αίμες a και o, η αίμη b δεν περιέχει την υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσουλκή ομάδα στον πορφυρινικό δακτύλιο, γεγονός που μπορεί να επιφέρει επιπτώσεις στη δομή του ενεργού κέντρου και να επηρεάζει τη μεταφορά πρωτονίων.

Παρόλο που οι *cbb₃* οξειδάσες χρησιμοποιούν ως ηλεκτρονιοδότη το κυτόχρωμα c, το διπυρηνικό κέντρο Cu_A απουσιάζει. Αντί αυτού, περιέχουν c-τύπου αίμες στις δύο υπομονάδες, CcoO και CcoP (Σχήμα 2.3.1B)⁴⁵. Η υπομονάδα CcoO σχηματίζει μια διαμεμβρανική έλικα και περιέχει μια ομάδα αίμης c. Μαζί με την υπομονάδα CcoN σχηματίζουν τον κύριο πυρήνα του ενζύμου. Η τρίτη υπομονάδα, CcoP έχει βρεθεί ότι αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες και περιέχει δύο ομάδες αίμης c (Σχήμα 2.3.1B)⁴⁵. Με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά προτείνεται ότι η υπομονάδα CcoP λειτουργεί ως ο αρχικός δέκτης ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c. Η μακρινή ομάδα αίμης

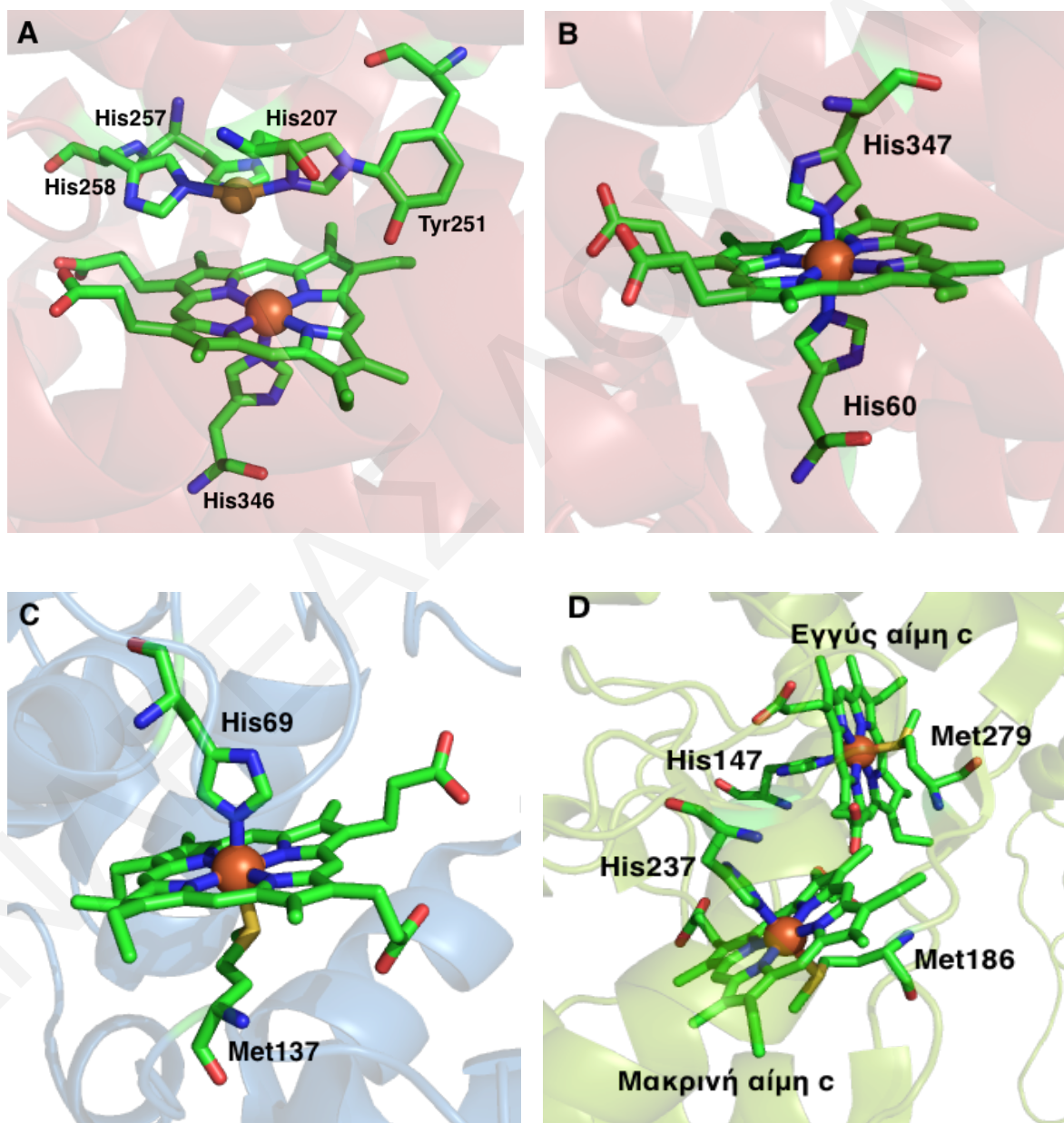
c λαμβάνει ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c* του περιπλάσματος και τα μεταφέρει στην εγγύς ομάδα αίμης *c* της υπομονάδας. Η τελευταία διαβιβάζει τα ηλεκτρόνια στην ομάδα αίμης *c* της υπομονάδας CcoO για να μεταφερθούν τελικά στο καταλυτικό κέντρο της υπομονάδας CcoN. Η τέταρτη υπομονάδα, CcoQ σχηματίζει μια διαμεμβρανική έλικα και δεν παρουσιάζεται σε όλες τις *cbb*₃ οξειδάσες. Δεν περιέχει κάποιο οξειδοαναγωγικό κέντρο και η απουσία της δεν αναστέλλει πλήρως τη δράση του ενζύμου.^{45, 49-51, 55}

Όπως και στα ένζυμα της κατηγορίας B, οι αιμοχαλκοξειδάσες της κατηγορίας C περιέχουν μόνο ένα κανάλι άντλησης πρωτονίων ανάλογο του K καναλιού. Συγκεκριμένα, το D κανάλι μπλοκάρεται από υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων ενώ το ανάλογο K κανάλι δεν περιέχει κανένα από τα αμινοξέα που παρατηρούνται στις αιμοχαλκοξειδάσες της κατηγορίας A. Ωστόσο, παρατηρούνται κάποια από τα αμινοξέα που σχηματίζουν το ανάλογο K κανάλι της κατηγορίας B.^{45, 55}



Σχήμα 2.3.2: **A.** Κρυσταλλική δομή της *cbb*₃ οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* όπου επισημαίνονται οι υπομονάδες CcoNOPQ. Η υπομονάδα CcoN απεικονίζεται με κόκκινο, η CcoO με μπλε, η CcoP με πράσινο και η CcoQ με κίτρινο. **B.** Κρυσταλλική δομή της *cbb*₃ οξειδάσης όπου επισημαίνεται η διάταξη των ομάδων αίμης και Cu_B. Οι ομάδες αίμης *b*₃ και *b* και ο Cu_B βρίσκονται στην υπομονάδα CcoN. Η υπομονάδα CcoO περιέχει μια ομάδα αίμης *c* και η υπομονάδα CcoP δύο ομάδες αίμης *c*. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.⁵⁰

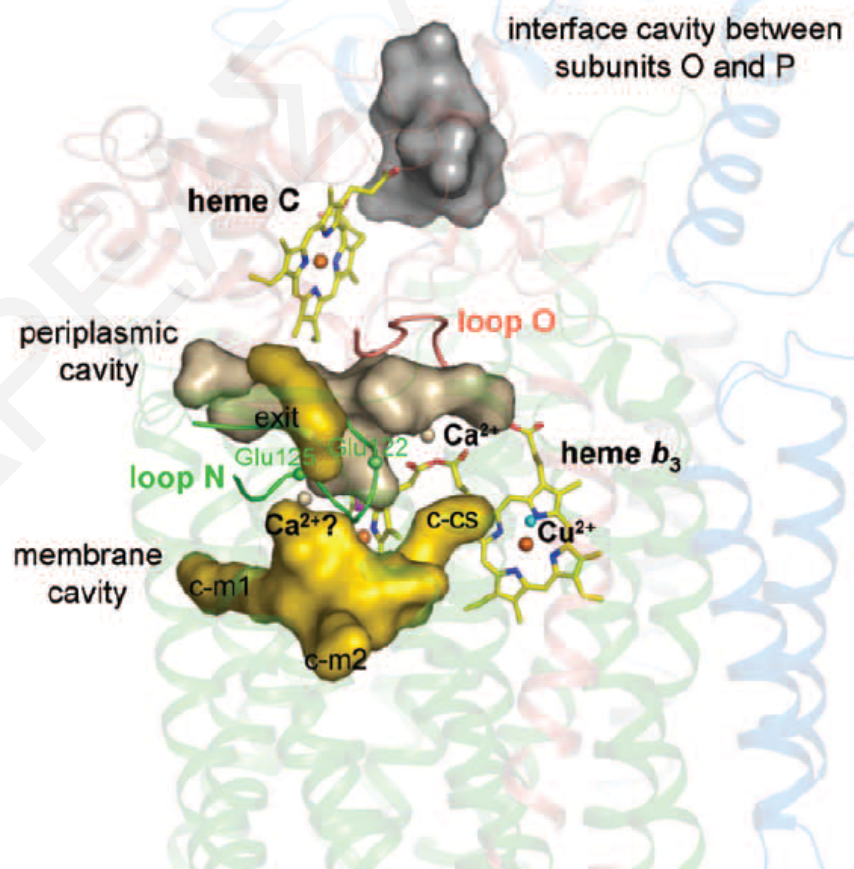
Από τις *cbb₃* οξειδάσες επιλύθηκε μόνο η κρυσταλλική δομή της *cbb₃* οξειδάσης από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* (Σχήμα 2.3.2A)⁵⁰. Το βακτήριο *P. stutzeri* είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια των Pseudomonaceae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει ένα αριθμό επίγειων και υδατικών ειδών καθώς επίσης και παθογενών βακτηρίων στα ζώα και τα φυτά.^{51,56} Με βάση την κρυσταλλική δομή, η *cbb₃* οξειδάση από το βακτήριο *P. stutzeri* αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, CcoNOPQ (Σχήμα 2.3.2A) με τα οξειδοαναγωγικά κέντρα να βρίσκονται στις υπομονάδες όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως^{49-50,56} (Σχήμα 2.3.2B).



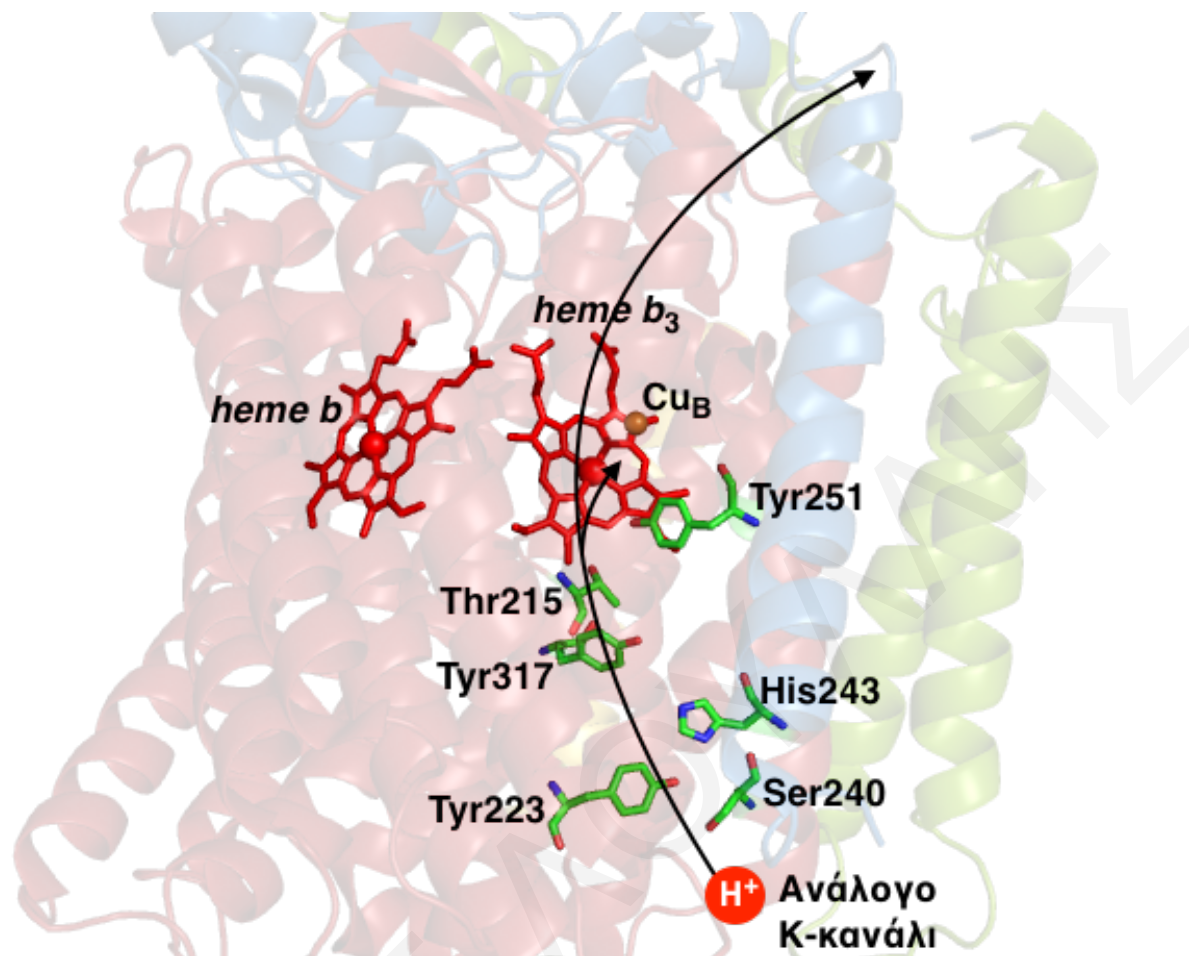
Σχήμα 2.3.3: Σχηματική αναπαράσταση **A.** του διμεταλλικού κέντρου αίμης b_3/Cu_B της υπομονάδας CcoN, **B.** της χαμηλού σπιν αίμης b της υπομονάδας CcoN, **C.** της ομάδας αίμης c της υπομονάδας CcoO και **D.** των ομάδων αίμης c της υπομονάδας CcoP της *cbb₃* οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* με τους υποκαταστάτες τους. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.⁵⁰

Η υψηλού σπιν αίμη b_3 έχει στην πέμπτη θέση ένταξης της δεσμευμένο το κατάλοιπο His346 ενώ ο Cu_B έχει τρεις υποκαταστάτες ιστιδίνης, His258, His257 και His207, εκ των οποίων η His207 είναι ομοιοπολικά δεσμευμένη με το κατάλοιπο Tyr251 (Σχήμα 2.3.3A). Οι υποκαταστάτες της χαμηλού σπιν αίμης b είναι τα κατάλοιπα His345 και His60 (Σχήμα 2.3.3B). Σε αντίθεση, οι ομάδες αίμης c των υπομονάδων CcoO και CcoP είναι δεσμευμένες με κατάλοιπα Met/His. Στην περίπτωση της αίμης c της υπομονάδας CcoO, οι υποκαταστάτες είναι τα κατάλοιπα Met137 και His69 (Σχήμα 2.3.3C), ενώ της υπομονάδας CcoP τα κατάλοιπα Met279/His147 στην εγγύς ομάδα αίμης c και τα κατάλοιπα Met186/His237 στη μακρινή ομάδα αίμης c^{50} (Σχήμα 2.3.3D).

Η κρυσταλλική δομή φανερώνει την παρουσία κοιλοτήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά O_2 , πρωτονίων και την απελευθέρωση νερού μεταξύ του ενεργού κέντρου, του περιπλάσματος και της μεμβράνης (Σχήμα 2.3.4)⁵⁰. Η μεταφορά πρωτονίων από το κυτταρόπλασμα στο ενεργό κέντρο πραγματοποιείται από ανάλογο K κανάλι το οποίο σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Ser240, Tyr223, His243, Tyr317, Thr215 και της ομοιοπολικά δεσμευμένης Tyr251⁵⁰ (Σχήμα 2.3.5).



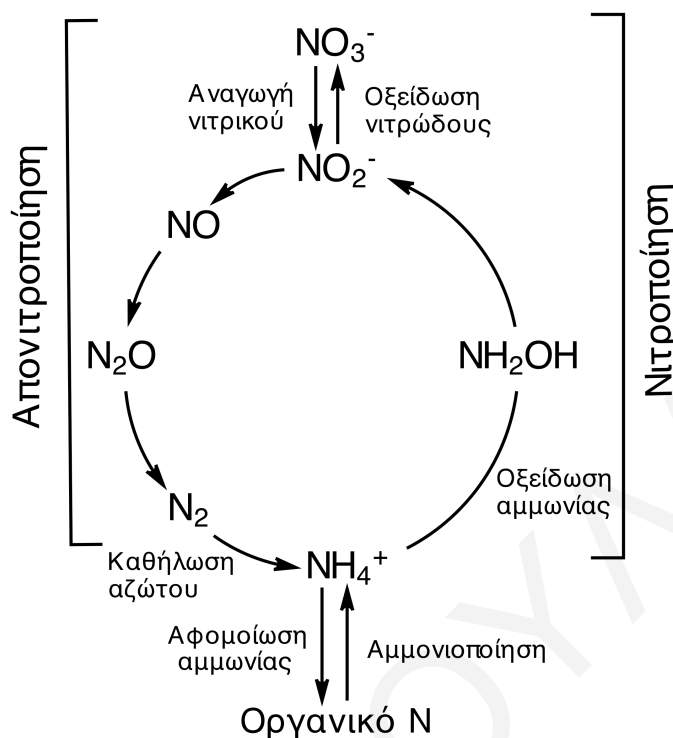
Σχήμα 2.3.4: Δομή κοιλοτήτων μεταφοράς O_2 , πρωτονίων και απελευθέρωσης νερού μεταξύ του ενεργού κέντρου, του περιπλάσματος και της μεμβράνης.⁵⁰



Σχήμα 2.3.5: Κρυσταλλική δομή της *cbb3* οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* όπου επισημαίνονται τα αμινοξέα που σχηματίζουν το ανάλογο K κανάλι και η πορεία που ακολουθούν τα πρωτόνια προς το ενεργό κέντρο και δια μέσου της μεμβράνης. Με κόκκινο απεικονίζονται οι ομάδες αίμης και με πορτοκαλί τα ιόντα χαλκού. Η υπομονάδα CsoN απεικονίζεται με ασθενές κόκκινο, η υπομονάδα CsoO με ασθενές μπλε και η υπομονάδα CsoP με ασθενές πράσινο. Τα δομικά χαρακτηριστικά λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.⁵⁰

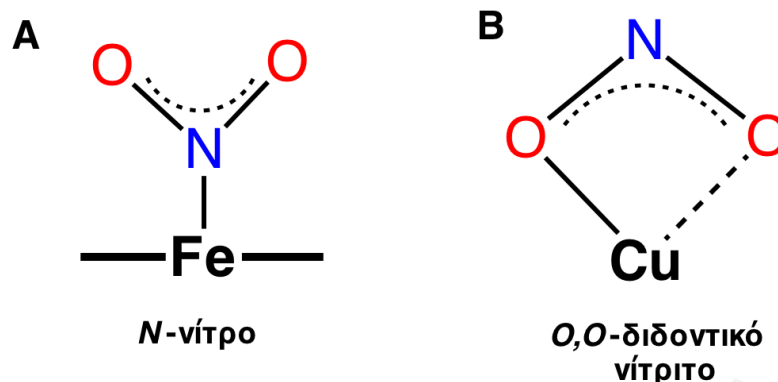
2.4 Δράση Οξειδασών του Κυτοχρώματος *c* ως Αναγωγάσες των Νιτρωδών

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μέλη της οικογένειας των οξειδασών του κυτοχρώματος *c* μπορούν να δράσουν επίσης ως αναγωγάσες των νιτρωδών.⁵⁷ Καταλύουν, δηλαδή την αντίδραση αναγωγής του NO_2^- σε NO . Η αντίδραση αυτή αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο του βιογεωχημικού κύκλου του αζώτου (Σχήμα 2.4.1). Στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου, το μοριακό άζωτο μετατρέπεται μέσω ενζυματικών αντιδράσεων σε ενώσεις του αζώτου, οι οποίες χρησιμοποιούνται από τους οργανισμούς για τη σύνθεση αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και άλλων βιολογικών ενώσεων. Ο κύκλος του αζώτου χωρίζεται σε δύο κύριες διεργασίες, τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση. Στο οξειδωτικό στάδιο της νιτροποίησης, το μοριακό άζωτο (N_2) μετατρέπεται σταδιακά σε NO_2^- και τελικά σε NO_3^- . Στο αναγωγικό στάδιο της απονιτροποίησης, το NO_2^- ανάγεται διαδοχικά σε N_2 .⁵⁸⁻⁵⁹



Σχήμα 2.4.1: Καταλυτικός κύκλος του αζώτου.

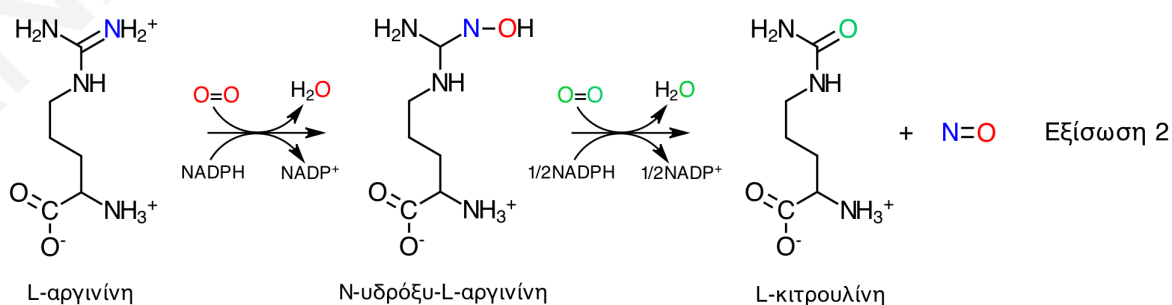
Η αναγωγή του NO_2^- σε NO αποτελεί το δεύτερο βήμα του σταδίου της απονιτροποίησης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από δύο τύπους αναγωγασών των νιτρωδών (NiRs) αυτές που περιέχουν αίμη και αυτές που περιέχουν χαλκό (Cu) στο καταλυτικό τους κέντρο.⁵⁹ Οι οργανισμοί που περιέχουν ένζυμα με αίμη βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στη φύση, ενώ οι οργανισμοί που περιέχουν ένζυμα με Cu καταλαμβάνουν μεγαλύτερο εύρος στη φύση αλλά βρίσκονται σε μικρότερη αφθονία. Τα ένζυμα που περιέχουν αίμη στην ενεργή θέση ($cd_1\text{NiR}$) λαμβάνουν τα ηλεκτρόνια που χρειάζονται από κυτοχρώματα *c* (c_{550} , c_{551} , c_{554}) και από χαλκοπρωτεΐνες (αζουρίνες και ψευδοαζουρίνες). Τα ένζυμα που περιέχουν Cu (CuNiR) χωρίζονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το χρώμα τους, μπλε ή πράσινα. Τα μπλε ένζυμα έχουν ως ηλεκτρονιοδότες τις αζουρίνες και το κυτόχρωμα c_{551} ενώ τα πράσινα τις ψευδοαζουρίνες.⁵⁸⁻⁵⁹ Από την επίλυση κρυσταλλικών δομών παραγώγων των αναγωγασών των νιτρωδών με NO_2^- αποκαλύφθηκε ότι στα ένζυμα που περιέχουν αίμη η πρόσδεση του NO_2^- πραγματοποιείται μέσω το ατόμου του αζώτου (*N*-νίτρο δέσμευση) στο Fe της αίμης⁶⁰ (Σχήμα 2.4.2A). Στην περίπτωση των ενζύμων που περιέχουν Cu η δέσμευση πραγματοποιείται μέσω των δύο ατόμων οξυγόνου του NO_2^- (*O,O*-διδοντική νίτριτο δέσμευση)⁶¹ (Σχήμα 2.4.2B). Ο τρόπος αυτός δέσμευσης δεν έχει παρατηρηθεί σε οποιαδήποτε αιμοπρωτεΐνη.



Σχήμα 2.4.2: Σχηματική αναπαράσταση της **A.** N-νίτριτο δέσμησης στις *cd1NiR* και **B.** O,O-διδοντικής νίτριτο δέσμησης στις *CuNiR* αναγωγάσες των νιτροδών.

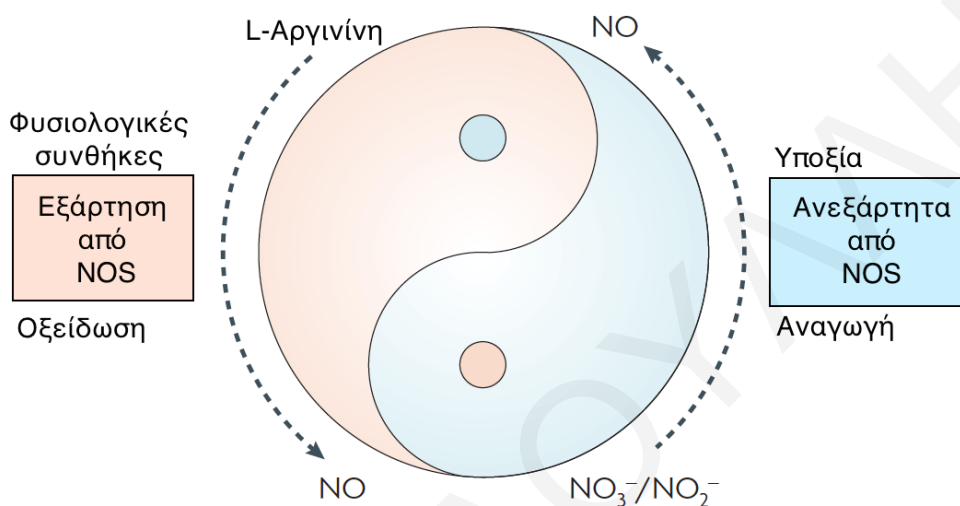
Η αντίδραση αναγωγής του NO_2^- σε NO , εκτός από το ότι αποτελεί ενδιάμεσο στάδιο του κύκλου του αζώτου, παρουσιάζει σημαντική βιολογική σημασία και στα θηλαστικά. Το NO_2^- θεωρείτο μέχρι πρόσφατα ως ανεπιθύμητο κατάλοιπο της διατροφικής αλυσίδας με πιθανές καρκινογόνες συνέπειες και ως ανενεργό οξειδωτικό τελικό προϊόν του ενδογενούς μεταβολισμού του NO στα θηλαστικά. Πρόσφατες μελέτες όμως έδειξαν ότι το NO_2^- που βρίσκεται σε αφθονία στο αίμα και στους ιστούς ανακυκλώνεται, για να σχηματίσει NO και άλλα βιοδραστικά οξειδία του αζώτου.⁶²⁻⁶³ Ως εκ τούτου, το NO_2^- λειτουργεί ως εναλλακτική πηγή του NO . Το NO λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο στα θηλαστικά και συμβάλλει σε διάφορες λειτουργίες που επηρεάζουν την υγεία τους, όπως αγγειοδιαστολή, ρύθμιση της κυτταρικής αναπνοής και άλλες.^{58, 62-63}

Σε φυσιολογικές συνθήκες, όταν η συγκέντρωση του O_2 είναι ικανοποιητική και το pH του αίματος φυσιολογικό, οι συνθάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) καταλύουν τη δύο σταδίων αντίδραση οξείδωσης της L-αργινίνης (Εξίσωση 2) για να απελευθερωθεί NO (Σχήμα 2.4.3).



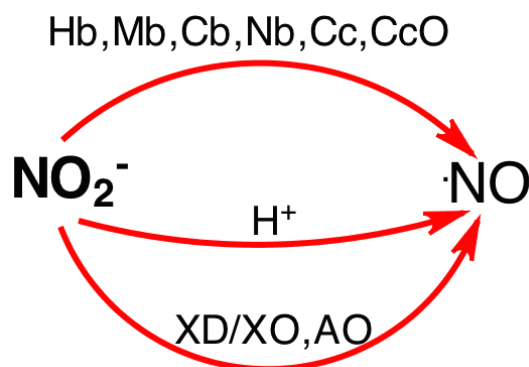
Η δράση των NOS εξαρτάται από τη συγκέντρωση του O_2 στο αίμα. Σε συνθήκες φυσιολογικής ή παθολογικής υποξίας τα επίπεδα του O_2 μειώνονται και το pH του αίματος

μειώνεται, με αποτέλεσμα η δράση των NOS να αναστέλλεται. Σε αυτήν την περίπτωση, ενεργοποιείται ο εναλλακτικός μηχανισμός αναγωγής του NO_2^- , έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ο σχηματισμός και η ικανοποιητική συγκέντρωση NO (Σχήμα 2.4.3). Επομένως, το NO_2^- αποτελεί την κύρια πηγή NO κάτω από υποξικές συνθήκες, αναπληρώνοντας τη δράση των NOS.⁶²⁻⁶³



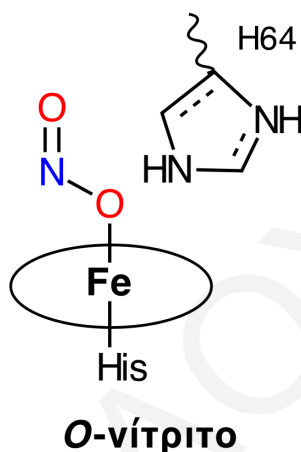
Σχήμα 2.4.3: Τα δύο μονοπάτια σχηματισμού του NO στα θηλαστικά. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) καταλύουν την αντίδραση οξείδωσης της L-αργινίνης για να παραχθεί NO. Σε συνθήκες υποξίας η δράση των NOS αναστέλλεται και το NO παράγεται από την αναγωγή του NO_2^- .

Αυξανόμενα στοιχεία αποδεικνύουν ότι το NO_2^- ανάγεται ενζυματικά, κάτω από υποξικές συνθήκες, από διάφορες μεταλλοπρωτεΐνες των θηλαστικών, όπως η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη καθώς επίσης και από ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας^{57, 62, 64-65} (Σχήμα 2.4.4).



Σχήμα 2.4.4: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης αναγωγής του NO_2^- που καταλύεται από διάφορες πρωτεΐνες των θηλαστικών.

Η ομάδα του G.B. Richter-Addo μελέτησε τη δέσμευση του NO_2^- στην αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη με κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το NO_2^- προσδένεται μέσω του ενός ατόμου οξυγόνου (*O*-νίτριτο δέσμευση)⁶⁶⁻⁶⁷ (Σχήμα 2.4.5). Ο ασυνήθιστος αυτός τρόπος δέσμευσης οφείλεται στην επίδραση του καταλοίπου της μακρινής ιστιδίνης στις αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη. Ο δεσμός υδρογόνου της μακρινής ιστιδίνης κατευθύνει τη δέσμευση μέσω του ενός ατόμου οξυγόνου και επηρεάζει την κινητική της αναγωγής του NO_2^- .⁶⁸



Σχήμα 2.4.5: Σχηματική αναπαράσταση της *O*-νίτριτο δέσμευσης στη μυοσφαιρίνη.

Η αντιστρεπτή αναστολή των οξειδασών του κυτοχρώματος *c* εμπλέκεται επίσης, κατά τη μεσολάβηση του NO_2^- στην προστασία των κυττάρων μετά από συνθήκες ισχαιμίας/επανεμάτωσης.⁶⁹ Για τις μιτοχονδριακές αιμοχαλκοξειδάσες βρέθηκε ότι μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση αναγωγής του NO_2^- σε NO κάτω από υποξικές συνθήκες.⁵⁷ Το NO δεσμεύεται στο διμεταλλικό κέντρο των αιμοχαλκοξειδασών αποκλείοντας τη δέσμευση O_2 και αναστέλλοντας τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής. Ο τρόπος αυτός αναστολής της κυτταρικής αναπνοής επιτυγχάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό όσο μειώνεται η συγκέντρωση του O_2 και είναι πλήρως αντιστρεπτός όταν η συγκέντρωση του O_2 επανέλθει στα φυσιολογικά επίπεδα.⁶⁹

Σε συνδιασμό με φασματοσκοπικές μελέτες, έχουν προταθεί διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί για την αναγωγή του NO_2^- και πρόσφατα περιγράφηκε η αντίδραση του NO_2^- με μοντέλα αίμησ/χαλκού.⁷⁰ Παρόλ' αυτά ο τρόπος με τον οποίο το NO_2^- αλληλεπιδρά με τις αιμοχαλκοξειδάσες, καθώς επίσης και ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO_2^- δεν έχει ακόμα μελετηθεί.

Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της δραστηριότητας της ba_3 οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* και της cbb_3 οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri*, που είναι οι χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι των αιμοχαλκοξειδασών των κατηγοριών Β και C, αντίστοιχα, ως προς το NO_2^- .

2.5 Βιβλιογραφία

1. Belevich, I.; Verkhovsky, M. I., Molecular Mechanism of Proton Translocation by Cytochrome *c* Oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling* **2007**, *10* (1), 1-30.
2. Gennis, R. B., Coupled Proton and Electron Transfer in Cytochrome Oxidase. *Frontiers in Bioscience* **2004**, *9*, 581-591.
3. Siletsky, S. A.; Konstantinov, A. A., Cytochrome *c* oxidase: Charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (4), 476-488.
4. Michel, H., Respiratory Chain Complex IV. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier New York **2004**, pp 688-694.
5. Brzezinski, P.; Ädelroth, P., Cytochrome Oxidases, Bacterial. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier New York, **2004**, pp 539-543.
6. García-Horsman, J. A.; Barquera, B.; Rumbley, J.; Ma, J.; Gennis, R. B., The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *Journal of Bacteriology* **1994**, *176* (18), 5587-5600.
7. Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; et al., Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **1995**, *269* (5227), 1069.
8. Tsukihara, T. A., H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S., The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **1996**, *272* (5265), 1136-1144.
9. Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H., Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **1995**, *376* (6542), 660-669.
10. Svensson-Ek, M.; Abramson, J.; Larsson, G.; Törnroth, S.; Brzezinski, P.; Iwata, S., The X-ray Crystal Structures of Wild-type and EQ(I-286) Mutant Cytochrome *c* Oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Molecular Biology* **2002**, *321* (2), 329-339.

11. Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Than, M. E., Structure and mechanism of the aberrant *ba*₃-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO Journal* **2000**, *19* (8), 1766-1776.
12. Yoshikawa, S.; Muramoto, K.; Shinzawa-Itoh, K., Proton-Pumping Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase. *Annual Review of Biophysics* **2011**, *40* (1), 205-223.
13. Pereira, M. M.; Santana, M.; Teixeira, M., A novel scenario for the evolution of haem–copper oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2001**, *1505* (2–3), 185-208.
14. von Ballmoos, C.; Ädelroth, P.; Gennis, R. B.; Brzezinski, P., Proton transfer in *ba*₃ cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (4), 650-657.
15. Pereira, M. M.; Sousa, F. L.; Veríssimo, A. F.; Teixeira, M., Looking for the minimum common denominator in haem–copper oxygen reductases: Towards a unified catalytic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2008**, *1777* (7–8), 929-934.
16. Yoshikawa, S.; Shimada, A., Reaction Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (4), 1936-1989.
17. Lee, H. J.; Reimann, J.; Huang, Y.; Ädelroth, P., Functional proton transfer pathways in the heme–copper oxidase superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (4), 537-544.
18. Han, H.; Hemp, J.; Pace, L. A.; Ouyang, H.; Ganesan, K.; Roh, J. H.; Daldal, F.; Blanke, S. R.; Gennis, R. B., Adaptation of aerobic respiration to low O₂ environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (34), 14109-14114.
19. Fee, J. A.; Choc, M. G.; Findling, K. L.; Lorence, R.; Yoshida, T., Properties of a copper-containing cytochrome *c*₁*aa*₃ complex: a terminal oxidase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1980**, *77* (1), 147-151.
20. Zimmermann, B. H.; Nitsche, C. I.; Fee, J. A.; Rusnak, F.; Münck, E., Properties of a copper-containing cytochrome *ba*₃: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85* (16), 5779-5783.
21. Radzi Noor, M.; Soulimane, T., Bioenergetics at extreme temperature: *Thermus thermophilus* *ba*₃- and *caa*₃-type cytochrome *c* oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (4), 638-649.

22. Thompson, M. J.; Eisenberg, D., Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *290* (2), 595-604.
23. Razvi, A.; Scholtz, J. M., Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Science* **2006**, *15* (7), 1569-1578.
24. Lübben, M.; Morand, K., Novel prenylated hemes as cofactors of cytochrome oxidases. Archaea have modified hemes A and O. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (34), 21473-21479.
25. Williams, P. A.; Blackburn, N. J.; Sanders, D.; Bellamy, H.; Stura, E. A.; Fee, J. A.; McRee, D. E., The Cu_A domain of *Thermus thermophilus* ba₃-type cytochrome c oxidase at 1.6 Å resolution. *Nature Structural Biology* **1999**, *6* (6), 509-516.
26. Than, M. E.; Hof, P.; Huber, R.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Buse, G.; Soulimane, T., *Thermus thermophilus* cytochrome-c₅₅₂: A new highly thermostable cytochrome-c structure obtained by MAD phasing. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *271* (4), 629-644.
27. Soulimane, T.; von Walter, M.; Hof, P.; Than, M. E.; Huber, R.; Buse, G., Cytochrome-c₅₅₂ from *Thermus thermophilus*: a functional and crystallographic investigation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *237* (3), 572-576.
28. Giuffrè, A.; Forte, E.; Antonini, G.; D'Itri, E.; Brunori, M.; Soulimane, T.; Buse, G., Kinetic Properties of ba₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*: Effect of Temperature. *Biochemistry* **1999**, *38* (3), 1057-1065.
29. Soulimane, T.; Buse, G.; Dewor, M.; Than, M. E.; Huber, R., Primary structure of a novel subunit in ba₃-cytochrome oxidase from *Thermus thermophilus*. *Protein Science* **2000**, *9* (11), 2068-2073.
30. Muresanu, L.; Pristovsek, P.; Löhr, F.; Maneg, O.; Mukrasch, M. D.; Rüterjans, H.; Ludwig, B.; Lücke, C., The Electron Transfer Complex between Cytochrome c₅₅₂ and the Cu_A Domain of the *Thermus thermophilus* ba₃ Oxidase: A COMBINED NMR AND COMPUTATIONAL APPROACH. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (20), 14503-14513.
31. Chang, H.-Y.; Hemp, J.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Gennis, R. B., The cytochrome ba₃ oxygen reductase from *Thermus thermophilus* uses a single input channel for proton delivery to the active site and for proton pumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (38), 16169-16173.

32. Luna, V. M.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Stout, C. D., Crystallographic Studies of Xe and Kr Binding within the Large Internal Cavity of Cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: Structural Analysis and Role of Oxygen Transport Channels in the Heme-Cu Oxidases. *Biochemistry* **2008**, *47* (16), 4657-4665.
33. Loullis, A.; Noor, M. R.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., Observation of Ligand Transfer in ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus*: Simultaneous FTIR Detection of Photolabile Heme a_3^{2+} -CN and Transient Cu_B^{2+} -CN Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (30), 8955-8960.
34. Surerus, K. K.; Oertling, W. A.; Fan, C.; Gurbiel, R. J.; Einarsdóttir, O.; Antholine, W. E.; Dyer, R. B.; Hoffman, B. M.; Woodruff, W. H.; Fee, J. A., Reaction of cyanide with cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the $Fe(II)_{a_3}$ -CN· $Cu(II)_B$ -CN complex suggests four 14N atoms are coordinated to Cu_B . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, *89* (8), 3195-3199.
35. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdottir, O.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H., Spectroscopic characterization of cytochrome ba_3 , a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the a_3/Cu_B site to that of bovine cytochrome aa_3 . *Biochemistry* **1994**, *33* (10), 3128-3141.
36. Kim, Y.; Babcock, G. T.; Surerus, K. K.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H.; Oertling, W. A., Cyanide binding and active site structure in heme-copper oxidases: Normal coordinate analysis of iron-cyanide vibrations of $a_3^{2+}CN^-$ complexes of cytochromes ba_3 and aa_3 . *Biospectroscopy* **1998**, *4* (1), 1-15.
37. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Observation of the Equilibrium Cu_B -CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme a_3 Propionates in Cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*: FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) AND TIME-RESOLVED STEP-SCAN FTIR STUDIES. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (36), 32860-32866.
38. Ohta, T.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of a Photostable Five-Coordinate Heme a_3 -Fe-CO Species and Functional Implications of His384/α10 in CO-Bound ba_3 -Cytochrome c Oxidase from *Thermus thermophilus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (18), 5489-5491.
39. Pinakoulaki, E.; Ohta, T.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of the His-Heme Fe^{2+} -NO Species in the Reduction of NO to N_2O by ba_3 -Oxidase from

- Thermus thermophilus*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (43), 15161-15167.
40. Varotsis, C.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The Structure of the Hyponitrite Species in a Heme Fe-Cu Binuclear Center. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (13), 2210-2214.
41. Cheesman, M. R.; Zumft, W. G.; Thomson, A. J., The MCD and EPR of the Heme Centers of Nitric Oxide Reductase from *Pseudomonas stutzeri*: Evidence That the Enzyme Is Structurally Related to the Heme-Copper Oxidases. *Biochemistry* **1998**, *37* (11), 3994-4000.
42. Hendriks, J.; Warne, A.; Gohlke, U.; Haltia, T.; Ludovici, C.; Lübben, M.; Saraste, M., The Active Site of the Bacterial Nitric Oxide Reductase Is a Dinuclear Iron Center. *Biochemistry* **1998**, *37* (38), 13102-13109.
43. Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sarti, P.; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T., The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (26), 14718-14723.
44. Stubauer, G.; Giuffrè, A.; Brunori, M.; Sarti, P., Cytochrome *c* Oxidase Does Not Catalyze the Anaerobic Reduction of NO. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *245* (2), 459-465.
45. Pitcher, R. S.; Watmough, N. J., The bacterial cytochrome *cbb*₃ oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2004**, *1655* (0), 388-399.
46. Preisig, O.; Zufferey, R.; Thöny-Meyer, L.; Appleby, C. A.; Hennecke, H., A high-affinity *cbb*₃-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **1996**, *178* (6), 1532-1538.
47. Arslan, E.; Kannt, A.; Thöny-Meyer, L.; Hennecke, H., The symbiotically essential *cbb*₃-type oxidase of *Bradyrhizobium japonicum* is a proton pump. *FEBS Letters* **2000**, *470* (1), 7-10.
48. Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A., The cytochrome *cbb*₃ from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *European Journal Of Biochemistry / FEBS* **2001**, *268* (24), 6486-6491.
49. Pitcher, R. S.; Cheesman, M. R.; Watmough, N. J., Molecular and Spectroscopic Analysis of the Cytochrome *cbb*₃ Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (35), 31474-31483.

50. Buschmann, S.; Warkentin, E.; Xie, H.; Langer, J. D.; Ermler, U.; Michel, H., The Structure of *cbb₃* Cytochrome Oxidase Provides Insights into Proton Pumping. *Science* **2010**, *329* (5989), 327-330.
51. Xie, H.; Buschmann, S.; Langer, J. D.; Ludwig, B.; Michel, H., Biochemical and Biophysical Characterization of the Two Isoforms of *cbb₃*-Type Cytochrome *c* Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Bacteriology* **2014**, *196* (2), 472-482.
52. Saraste, M.; Castresana, J., Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Letters* **1994**, *341* (1), 1-4.
53. van der Oost, J.; De Boer, A. P. N.; de Gier, J.-W. L.; Zumft, W. G.; Stouthamer, A. H.; Van Spanning, R. J. M., The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiology Letters* **1994**, *121* (1), 1-9.
54. Grönberg, K. L. C.; Roldán, M. D.; Prior, L.; Butland, G.; Cheesman, M. R.; Richardson, D. J.; Spiro, S.; Thomson, A. J.; Watmough, N. J., A Low-Redox Potential Heme in the Dinuclear Center of Bacterial Nitric Oxide Reductase: Implications for the Evolution of Energy-Conserving Heme-Copper Oxidases. *Biochemistry* **1999**, *38* (42), 13780-13786.
55. Ekici, S.; Pawlik, G.; Lohmeyer, E.; Koch, H.-G.; Daldal, F., Biogenesis of *cbb₃*-type cytochrome *c* oxidase in *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2012**, *1817* (6), 898-910.
56. Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M., Properties of the detergent solubilised cytochrome *c* oxidase (cytochrome *cbb₃*) purified from *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Letters* **2001**, *508* (1), 29-35.
57. Castello, P. R.; David, P. S.; McClure, T.; Crook, Z.; Poyton, R. O., Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism* **2006**, *3* (4), 277-287.
58. Maia, L. B.; Moura, J. J. G., How Biology Handles Nitrite. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (10), 5273-5357.
59. Averill, B. A., Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (7), 2951-2964.
60. Williams, P. A.; Fulop, V.; Garman, E. F.; Saunders, N. F. W.; Ferguson, S. J.; Hajdu, J., Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* **1997**, *389* (6649), 406-412.

61. Antonyuk, S. V.; Strange, R. W.; Sawers, G.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S., Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (34), 12041-12046.
62. Lundberg, J. O.; Weitzberg, E.; Gladwin, M. T., The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7* (2), 156-167.
63. Gladwin, M. T.; Schechter, A. N.; Kim-Shapiro, D. B.; Patel, R. P.; Hogg, N.; Shiva, S.; Cannon, R. O.; Kelm, M.; Wink, D. A.; Espey, M. G.; Oldfield, E. H.; Pluta, R. M.; Freeman, B. A.; Lancaster, J. R.; Feelisch, M.; Lundberg, J. O., The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1* (6), 308-314.
64. Gladwin, M. T.; Grubina, R.; Doyle, M. P., The New Chemical Biology of Nitrite Reactions with Hemoglobin: R-State Catalysis, Oxidative Denitrosylation, and Nitrite Reductase/Anhydrase. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (1), 157-167.
65. Shiva, S.; Sack, M. N.; Greer, J. J.; Duranski, M.; Ringwood, L. A.; Burwell, L.; Wang, X.; MacArthur, P. H.; Shoja, A.; Raghavachari, N.; Calvert, J. W.; Brookes, P. S.; Lefer, D. J.; Gladwin, M. T., Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *The Journal of Experimental Medicine* **2007**, *204* (9), 2089-2102.
66. Yi, J.; Safo, M. K.; Richter-Addo, G. B., The Nitrite Anion Binds to Human Hemoglobin via the Uncommon O-Nitrito Mode. *Biochemistry* **2008**, *47* (32), 8247-8249.
67. Yi, J.; Orville, A. M.; Skinner, J. M.; Skinner, M. J.; Richter-Addo, G. B., Synchrotron X-ray-Induced Photoreduction of Ferric Myoglobin Nitrite Crystals Gives the Ferrous Derivative with Retention of the O-Bonded Nitrite Ligand. *Biochemistry* **2010**, *49* (29), 5969-5971.
68. Yi, J.; Heinecke, J.; Tan, H.; Ford, P. C.; Richter-Addo, G. B., The Distal Pocket Histidine Residue in Horse Heart Myoglobin Directs the O-Binding Mode of Nitrite to the Heme Iron. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (50), 18119-18128.
69. Shiva, S., Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology* **2013**, *1* (1), 40-44.
70. Hematian, S.; Siegler, M. A.; Karlin, K. D., Heme/Copper Assembly Mediated Nitrite and Nitric Oxide Interconversion. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (46), 18912-18915.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Μεθοδολογία

3.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η περιοχή του υπερύθρου καλύπτει την περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μεταξύ $\sim 10\text{--}12800\text{ cm}^{-1}$. Χωρίζεται σε τρεις περιοχές, τις άπω, μέση και εγγύς. Η άπω περιοχή (far-IR) καλύπτει το εύρος μεταξύ $10\text{--}200\text{ cm}^{-1}$, η μέση (mid-IR) μεταξύ $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ και η εγγύς (near-IR) μεταξύ $4000\text{--}12800\text{ cm}^{-1}$. Οι περιοχές της υπερύθρου ακτινοβολίας χωρίζονται με βάση το διαφορετικό χαρακτήρα των μεταβάσεων που εμπλέκονται σε κάθε περίπτωση, και ως εκ τούτου παίζουν διαφορετικό ρόλο στην ανάλυση των ενώσεων.

Τα φάσματα υπερύθρου είναι το αποτέλεσμα των μεταβάσεων μεταξύ κβαντισμένων δονητικών ενεργειακών καταστάσεων. Η ακτινοβολία του μέσου υπερύθρου προκαλεί διεγέρσεις από τη χαμηλότερης ενέργειας δονητική κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη δονητική κατάσταση, οι οποίες ονομάζονται θεμελιώδεις μεταβάσεις.¹

Για να μπορεί ένα μόριο να απορροφήσει υπερύθρη ακτινοβολία πρέπει να κατέχει διπολική ροπή, η οποία να μεταβάλλεται καθώς δονείται το μόριο.²⁻³ Η μεταβολή της διπολικής ροπής προκύπτει λόγω συστολής και διαστολής του δεσμού (πλάτος του δεσμού) μεταξύ των ατόμων του μορίου.² Όταν ένα μόριο με διπολική ροπή δονείται, υπάρχει μια σταθερή αλλαγή στη διπολική ροπή και δημιουργείται πεδίο, το οποίο αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο της ακτινοβολίας. Εάν η συχνότητα της ακτινοβολίας συμπίπτει με τη συχνότητα μιας κανονικής δόνησης του μορίου, θα ακολουθήσει μια καθαρή μεταφορά ενέργειας. Η μεταφορά αυτή θα προκαλέσει αλλαγή στο πλάτος της μοριακής δόνησης, οπότε θα πραγματοποιηθεί απορρόφηση ακτινοβολίας.³

Τα χαρακτηριστικά των δονήσεων μπορούν να προσεγγιστούν με τη χρήση του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή, το οποίο απεικονίζει ένα διατομικό μόριο με δύο σφαίρες που ενώνονται μεταξύ τους με ένα ελατήριο. Με βάση το νόμο του Hook η ενέργεια του

συστήματος δίνεται από την εξίσωση $E = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, όπου h η σταθερά του Planck, k η

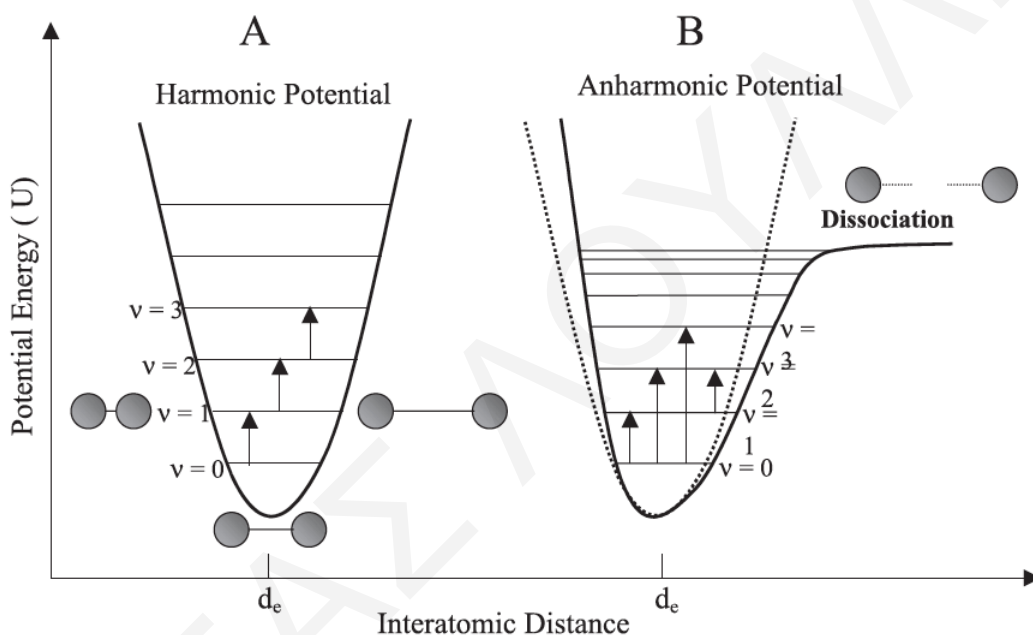
σταθερά του ελατηρίου και μ η ανηγμένη μάζα, $\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}$. Η συχνότητα δόνησης του

μορίου εκφράζεται από την εξίσωση $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$. Η δυναμική ενέργεια του συστήματος

δίνεται από την εξίσωση $V = \frac{1}{2} kx^2$ και η μεταβολή της δυναμικής ενέργειας συναρτήσει

της μετατόπισης, x των ατόμων από τη θέση ισορροπίας φαίνεται στο σχήμα 3.1.1A⁴. Τα μοριακά συστήματα μπορούν να έχουν μόνο διακριτά ενεργειακά επίπεδα, όπως προκύπτει από την κβαντομηχανική, έτσι η εξίσωση της ενέργειας του συστήματος παίρνει τη μορφή

$E_v = (v + \frac{1}{2}) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, όπου v είναι ο κβαντικός αριθμός δόνησης, ο οποίος μπορεί να αποκτήσει μόνο θετικές τιμές και το μηδέν. Επιπλέον, υπάρχει ο περιορισμός (κανόνας επιλογής) ότι οι μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν, είναι αυτές στις οποίες οι κβαντικοί αριθμοί δόνησης διαφέρουν κατά μία μονάδα, $\Delta v = \pm 1$. Η ενέργεια της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που μπορεί να απορροφηθεί για να μεταβεί ένα μόριο στη διεγερμένη κατάσταση πρέπει να είναι ίση με τη διαφορά μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων, $\Delta E = E_{v2} - E_{v1} = \Delta v h \nu$.⁴

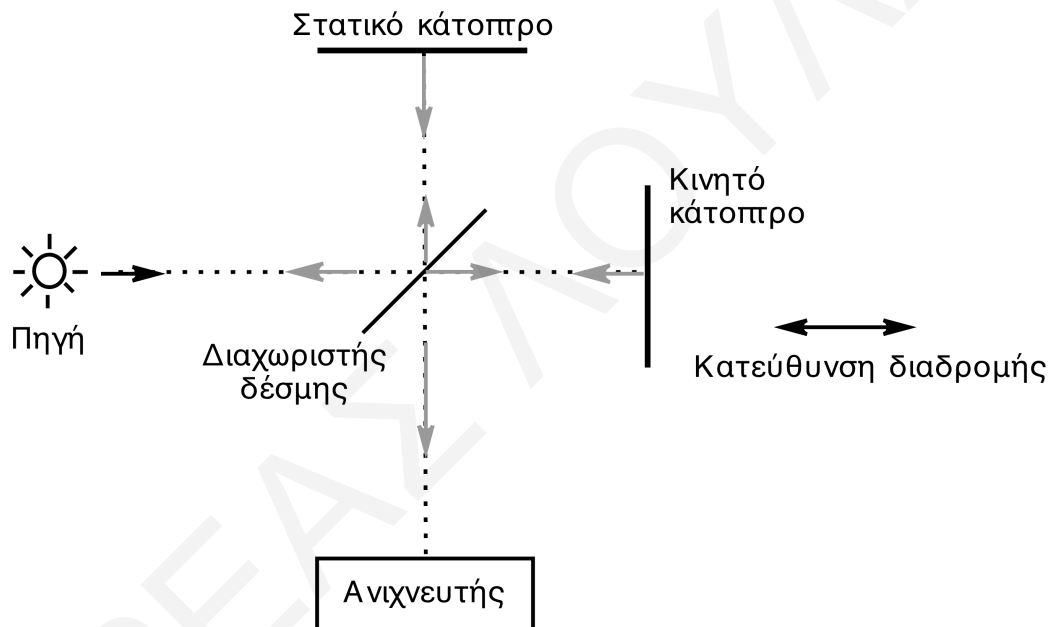


Σχήμα 3.1.1: Σχηματική αναπαράσταση **A.** του αρμονικού και **B.** του μη αρμονικού μοντέλου της δυναμικής ενέργειας διατομικού μορίου.⁴

Παρόλο που το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή περιγράφει τη δόνηση των μορίων, εν τούτοις τα μοριακά συστήματα αποκλίνουν από την αρμονικότητα. Αυτό οφείλεται στο ότι, όταν δύο άτομα πλησιάζουν μεταξύ τους καθώς το μόριο ταλαντώνεται, εμφανίζεται απωστική δύναμη Coulomb μεταξύ των δύο ατόμων, η οποία ενεργεί στην ίδια κατεύθυνση με τη δύναμη επαναφοράς του δεσμού. Επομένως, η δυναμική ενέργεια αυξάνει ταχύτερα απ' ό,τι προβλέπεται από το προσεγγιστικό μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Στο άλλο άκρο της ταλάντωσης, όταν η απόσταση μεταξύ των δύο ατόμων προσεγγίζει αυτή στην οποία ο δεσμός διασπάται, η δύναμη επαναφοράς μειώνεται και επομένως μειώνεται η δυναμική ενέργεια (Σχήμα 3.1.1B)^{4,3} Με εφαρμογή της κβαντομηχανικής, τα ενεργειακά επίπεδα των δονήσεων των μορίων περιγράφονται από

την εξίσωση $E = h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right) + x_m h\nu \left(v + \frac{1}{2} \right)^2$, όπου x_m η σταθερά μη αρμονικότητας.⁴ Η μη αρμονικότητα οδηγεί σε δύο ειδών αποκλίσεις: (α) σε μεγαλύτερους κβαντικούς αριθμούς το ΔE γίνεται μικρότερο και (β) παρατηρούνται μεταπτώσεις με $\Delta v = \pm 2$ ή ± 3 (υπέρτονες).³

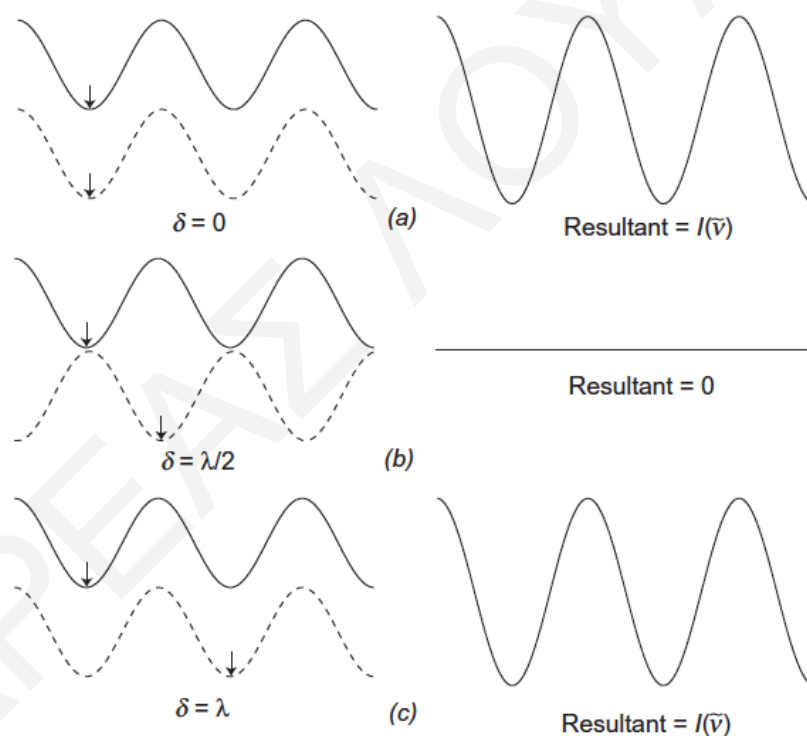
Η ανάλυση της αλληλεπίδρασης των μορίων με την υπέρυθη ακτινοβολία μπορεί να γίνει με τη χρήση φασματοφωτόμετρου με μετασχηματισμό Fourier. Τα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier αποτελούνται από την πηγή υπέρυθρου, το συμβολόμετρο Michelson και τον ανιχνευτή σήματος. Το βασικότερο τμήμα είναι το συμβολόμετρο Michelson (Σχήμα 3.1.2)



Σχήμα 3.1.2: Σχηματική αναπαράσταση του συμβολομέτρου Michelson.

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια συσκευή, η οποία μοιράζει τη δέσμη της ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και στη συνέχεια τις ανασυνθέτει, έτσι ώστε να μετρούνται ως συνάρτηση των διαφορών των οπτικών διαδρομών των δύο δεσμών. Η διαφορά της οπτικής διαδρομής των δύο δεσμών επιτυγχάνεται από την παρουσία ενός στατικού και ενός κινητού κατόπτρου. Καθώς η δέσμη της ακτινοβολίας μοιράζεται από το διαμοιραστή δέσμης, το 50% της ακτινοβολίας κατευθύνεται στο στατικό κάτοπτρο και το υπόλοιπο 50% στο κινητό κάτοπτρο. Ανάλογα με τη θέση που βρίσκεται το κινητό κάτοπτρο, προκαλείται διακύμανση της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή, κατά ένα προβλέψιμο τρόπο. Όταν τα δύο κάτοπτρα ισαπέχουν από το διαμοιραστή, τα δύο μέρη της δέσμης έχουν την ίδια φάση κατά την ανασύνθεση. Ως εκ τούτου, οι δύο δέσμες

συμβάλλουν ενισχυτικά και η ένταση της δέσμης που περνά στον ανιχνευτή είναι το άθροισμα των συχνοτήτων των δύο δεσμών^{3, 5} (Σχήμα 3.1.3a)⁵. Επίσης, οι δέσμες συμβάλλουν ενισχυτικά στις περιπτώσεις όπου το κινούμενο κάτοπτρο βρίσκεται σε θέσεις όπου η διαμοιρασμένη δέσμη έχει μήκος κύματος ίσο με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας της πηγής (Σχήμα 3.1.3c)⁵. Όταν το κινούμενο κάτοπτρο βρίσκεται σε θέση ίση με το $\frac{1}{2}$ του μήκους κύματος της ακτινοβολίας της πηγής, τότε οι δύο δέσμες συμβάλλουν καταστροφικά κατά την ανασύνθεση (Σχήμα 3.1.3b)⁵. Σε αυτήν την περίπτωση, η ανασυνθετημένη δέσμη επιστρέφει πίσω στην πηγή. Η διαφορά στην οπτική διαδρομή των δύο δεσμών ονομάζεται καθυστέρηση, δ . Το διάγραμμα της έντασης του σήματος εξόδου του ανιχνευτή ως προς την καθυστέρηση ονομάζεται συμβολόγραμμα και έχει συνημιτονοειδή μορφή.^{3, 5}



Σχήμα 3.1.3: Φάσεις των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων από το στατικό και κινητό κάτοπτρο σε διαφορετικές τιμές οπτικής καθυστέρησης: (a) μηδενική διαφορά, (b) διαφορά $\frac{1}{2}$ μήκους κύματος, (c) διαφορά ενός μήκους κύματος.⁵

Η συνημιτονοειδής μορφή του συμβολογραφήματος περιγράφεται από την Εξίσωση 1

$$P(\delta) = B(\nu)\cos 2\pi\delta\nu \quad (\text{Εξίσωση 1})$$

η οποία εκφράζει το μέγεθος του σήματος του συμβολογραφήματος ως συνάρτηση του συντελεστή καθυστέρησης και του κυματαριθμού του οπτικού σήματος εισόδου.

Για πηγή συνεχούς ακτινοβολίας το συμβολόγραμμα μπορεί να παρουσιαστεί ως το άθροισμα ενός απείρου αριθμού συνημιτονικών όρων (Εξίσωση 2)

$$P(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\nu) \cos 2\pi \delta \nu \quad (\text{Εξίσωση 2})$$

Ο μετασχηματισμός Fourier του πιο πάνω ολοκληρώματος δίνεται από την Εξίσωση 3

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(\delta) \cos 2\pi \nu \delta \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

Η οπτική φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier περιλαμβάνει καταγραφή του $P(\delta)$ ως συνάρτηση του δ (Εξίσωση 2) και μετά τον μαθηματικό μετασχηματισμό αυτής της σχέσης σε μια άλλη σχέση, η οποία παρέχει το $B(\nu)$ ως συνάρτηση του ν (φάσμα συχνότητας), όπως δείχνει η εξίσωση 3.^{3,5}

Η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου καθίσταται σημαντική στη μελέτη βιολογικών μορίων καθώς μπορεί να βοηθήσει στη διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες για να εκτελέσουν τις βιολογικές τους λειτουργίες υιοθετούν διάφορες διαμορφώσεις. Οι δομικές αλλαγές προκαλούνται από τη δέσμευση του υποστρώματος στην πρωτεΐνη ή/και αλληλεπιδράσεις με συμπαράγοντες και άλλους εξωγενείς υποκαταστάτες και μπορούν να ανιχνευθούν με τη φασματοσκοπία FTIR. Τα δεδομένα που προκύπτουν για τις πρωτεΐνες με τη φασματοσκοπία υπερύθρου συμπληρώνουν και δίνουν επιπλέον στοιχεία από τα δεδομένα που λαμβάνονται από τις κρυσταλλογραφικές μεθόδους και τη φασματοσκοπία NMR.⁶⁻⁷

3.2 Φασματοσκοπία Raman

Το φαινόμενο Raman βασίζεται στη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, που προκαλείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων που συνιστούν μια ένωση και των φωτονίων που συνιστούν την ακτινοβολία. Η μέθοδος ονομάστηκε έτσι μετά από τον Ινδό φυσικό C.V Raman, ο οποίος μαζί με τον K.S Krishnan ανέφεραν, το 1928, για πρώτη φορά το φαινόμενο σε υδατικά διαλύματα. Από τις πειραματικές τους μελέτες, ανακάλυψαν ότι το μήκος κύματος ενός μικρού κλάσματος της ορατής ακτινοβολίας, που σκεδάζεται από ορισμένα μόρια, διαφέρει από αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και επιπλέον οι μετατοπίσεις στο μήκος κύματος εξαρτώνται από τη χημική δομή των μορίων που προκαλούν τη σκέδαση.^{3,8}

Όταν το φως αλληλεπιδρά με την ύλη, τα φωτόνια που το συνθέτουν μπορούν να απορροφηθούν ή να σκεδαστούν ή να μην αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά της ύλης και να περάσουν δια μέσου της. Στην περίπτωση της απορρόφησης, που είναι διαδικασία ενός

φωτονίου, παρατηρείται το φαινόμενο IR ενώ στην περίπτωση της σκέδασης, που είναι διαδικασία δύο φωτονίων, παρατηρείται το φαινόμενο Raman.⁸⁻¹⁰

Το φαινόμενο Raman μπορεί να περιγραφεί με την κλασσική και την κβαντική θεωρία. Η κλασσική θεωρία βασίζεται στην κυματοειδή φύση του φωτός και μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη φύση του φαινομένου Raman.⁹

3.2.1 Κλασσική Θεωρία Φαινομένου Raman

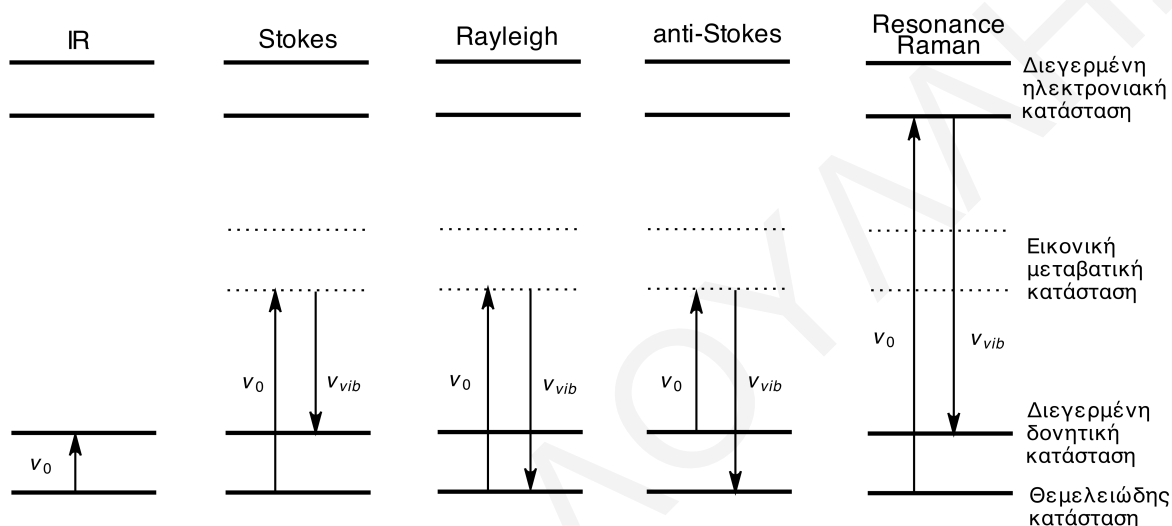
Το φως συνίσταται από μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία, εκ των οποίων μόνο το ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί το φαινόμενο Raman. Το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός τείνει να μετατοπίσει τα ηλεκτρόνια από τις θέσεις που βρίσκονται γύρω από το θετικά φορτισμένο πυρήνα. Η επίδραση αυτή, οδηγεί στο σχηματισμό μιας, μικρού χρόνου ημιζωής, κατάστασης (εικονική κατάσταση), η οποία είναι ασταθής και το φωτόνιο επανεκπέμπεται γρήγορα. Οι μετατοπίσεις των ηλεκτρονίων έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επαγόμενου διπόλου, μ στο μόριο, το οποίο είναι ανάλογο της ισχύος του ηλεκτρικού πεδίου, $\mu = \alpha E$, όπου α η ηλεκτρική πολωσιμότητα του μορίου. Με προσθήκη των όρων του ηλεκτρικού πεδίου συναρτήσει του χρόνου $E(t) = E_{max} \cos(2\pi\nu_0 t)$ και της ενδομοριακής απόστασης συναρτήσει του χρόνου $\Delta r(t) = \Delta r_{max} \cos(2\pi\nu_{vib} t + \varphi)$ η εξίσωση $\mu = \alpha E$ μετατρέπεται στην

$$\mu(t) = \alpha_0 E_{max} \cos 2\pi\nu_0 t + \frac{1}{2} \frac{d\alpha}{dr} \Delta r_{max} E_{max} \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t + \frac{1}{2} \frac{d\alpha}{dr} \Delta r_{max} E_{max} \cos 2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t.$$

Η τελευταία εξίσωση εκφράζει το επαγόμενο δίπολο που σχηματίζεται και υποδεικνύει ότι τα σκεδαζόμενα φωτόνια που παράγονται είναι τριών ειδών. Ο πρώτος όρος δείχνει ότι το σκεδαζόμενο φωτόνιο έχει την ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία (Σχήμα 3.2.1.1). Ο τρόπος αυτός σκέδασης ονομάζεται Rayleigh και συμβαίνει όταν παραμορφώνεται μόνο το ηλεκτρονιακό νέφος χωρίς να μετακινείται ο πυρήνας του μορίου. Ο τρόπος αυτός σκέδασης είναι ελαστικός, δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στην ενέργεια του φωτονίου και είναι η πιο έντονη μορφή σκέδασης.

Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στα σκεδαζόμενα φωτόνια όπου η συχνότητά τους είναι μεγαλύτερη από αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, $\nu_0 + \nu_{vib}$ και ο τρίτος όρος στα σκεδαζόμενα φωτόνια με συχνότητα μικρότερη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, $\nu_0 - \nu_{vib}$. Οι τρόποι αυτοί σκέδασης ονομάζονται anti-Stokes και Stokes, αντίστοιχα και μαζί αποτελούν τη σκέδαση Raman. Η σκέδαση Raman είναι ανελαστική σκέδαση και συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία εκτός από παραμόρφωση του ηλεκτρονιακού νέφους, προκαλεί και μετακίνηση του πυρήνα. Καθώς ο πυρήνας είναι βαρύτερος από τα

ηλεκτρόνια, υπάρχει σημαντική αλλαγή στην ενέργεια του φωτονίου, που μπορεί να είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ανάλογα αν η διαδικασία ξεκινά με το μόριο να βρίσκεται στη θεμελιώδη δονητική κατάσταση (σκέδαση Stokes) ή σε διεγερμένη δονητική κατάσταση (σκέδαση anti-Stokes) (Σχήμα 3.2.1.1). Σε θερμοκρασία δωματίου, η πλειονότητα των μορίων βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση και ως εκ τούτου η σκέδαση που παρατηρείται περισσότερο είναι η σκέδαση Stokes.^{3, 8-9, 11}



Σχήμα 3.2.1.1: Σχηματικό διάγραμμα της σχέσης μεταξύ των διαδικασιών απορρόφησης υπέρυθρου (IR), σκέδασης Rayleigh και Raman (Stokes και anti-Stokes) και σκέδασης συντονισμού Raman. Η απορρόφηση υπέρυθρου είναι διαδικασία ενός φωτονίου ενώ οι υπόλοιπες είναι διαδικασίες δύο φωτονίων. Τα ν_0 και ν_{vib} αναφέρονται στη συχνότητα της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Ένα φάσμα Raman που λαμβάνεται, εκφράζει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συναρτήσει της μετατόπισης Raman. Για να εξαχθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες από τα φάσματα Raman, απαιτείται λεπτομερής ανάλυση των χαρακτηριστικών του φάσματος. Οι σημαντικότερες φασματικές παράμετροι είναι η μετατόπιση Raman, $\Delta\nu$ και οι εντάσεις των κορυφών, καθώς επίσης και οι λόγοι αποπόλωσης.

Η ένταση των κορυφών Raman εξαρτάται από την πολωσιμότητα του μορίου, την ένταση της πηγής, τη συγκέντρωση της δραστικής ομάδας και άλλους παράγοντες και ορίζεται από την εξίσωση $I = KI_0\alpha^2\omega^4$, όπου K είναι σταθερά, I_0 η ισχύς της ακτινοβολίας, α η πολωσιμότητα του μορίου και ω η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η πολωσιμότητα του σκεδαζόμενου φωτός ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία καθορίζεται από τον προσανατολισμό των σκεδαζόμενων μορίων και τη συμμετρία των δονήσεων. Η παράμετρος που χρησιμοποιείται για να περιγραφεί η πολωσιμότητα της

σκέδασης Raman που παράγεται από την πολωμένη προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι ο λόγος αποπόλωσης. Ο λόγος αποπόλωσης ορίζεται από την εξίσωση $\rho = I_{\perp}/I_{\parallel}$, όπου I_{\perp} και I_{\parallel} οι εντάσεις του σκεδαζόμενου φωτός κάθετα και παράλληλα στην πολωσιμότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα. Η εξάρτηση των λόγων αποπόλωσης από τη συμμετρία των δονήσεων, τους καθιστά χρήσιμους στη λήψη πληροφοριών για τη συμμετρία των δονήσεων και στην ταυτοποίηση κορυφών. Η σχέση μεταξύ του λόγου αποπόλωσης, ρ και της πολωσιμότητας, α εκφράζεται από την εξίσωση

$$\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{3\gamma_s^2 + 5\gamma_{as}^2}{45\gamma_0^2 + 4\gamma_s^2}$$

όπου γ_s^2 , γ_{as}^2 και γ_0^2 η ανισοτροπία, η αντισυμμετρία και η μέση πολωσιμότητα, αντίστοιχα.

$$\gamma_s^2 = \frac{1}{2} \sum_{ij} (a_{ii} + a_{jj})^2 + \frac{3}{4} \sum_{ij} (a_{ij} - a_{ji})^2$$

$$\gamma_{as}^2 = \frac{3}{4} \sum_{ij} (a_{ij} - a_{ji})^2$$

$$\gamma_0^2 = \frac{1}{3} \sum_i \alpha_{ii}$$

Τα i και j αντιπροσωπεύουν τις αξονικές διευθύνσεις του καρτεσιανού συστήματος συντεταγμένων. Η αποπόλωση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι αποτέλεσμα της οπτικής ανισοτροπίας των ενώσεων. Στη σκέδαση Raman, ο τανυστής πολωσιμότητας είναι συμμετρικός, $a_{ij} = a_{ji}$ και συνεπώς $\gamma_{as} = 0$. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρούνται οι πλήρως συμμετρικές δονήσεις, όπου έχουν μη μηδενικά στοιχεία τανυστή διαγώνιας πολωσιμότητας και ο λόγος αποπόλωσης τους κυμαίνεται μεταξύ 0 (όταν $\gamma_0 \neq 0$) και 3/4 (όταν $\gamma_0 = 0$), $0 < \rho < 3/4$. Γι' αυτούς του λόγους οι πλήρως συμμετρικές δονήσεις ονομάζονται πολωμένες. Οι υπόλοιπες δονήσεις δεν είναι πλήρως συμμετρικές ($\gamma_0 = 0$) και έτσι παρατηρούνται αποπολωμένες δονήσεις που έχουν λόγο αποπόλωσης, $\rho=3/4$. Στην περίπτωση της σκέδασης συντονισμού Raman, οι τανυστές πολωσιμότητας συγκεκριμένων δονήσεων μπορούν να γίνουν μη συμμετρικοί ($a_{ij} \neq a_{ji}$). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ανώμαλα πολωμένων δονήσεων, οι οποίες έχουν $\gamma_{as}^2 \neq 0$ και $\rho > 3/4$. Ο λόγος αποπόλωσης των δονήσεων Raman είναι ιδιαίτερα βοηθητικός στην ταυτοποίηση κορυφών σε ένα φάσμα Raman.^{10,12}

Η κλασική θεωρία μπορεί να εξηγήσει τη φύση της σκέδασης Raman αλλά υστερεί στο σημείο ότι δεν λαμβάνει υπόψη την κβαντική φύση του φωτός. Επίσης, δεν μπορεί να

εξηγήσει τη σχέση μεταξύ των μοριακών ιδιοτήτων μια ένωσης και της σκέδασης Raman και έτσι παρέχει περιορισμένες πληροφορίες για τις δονήσεις Raman.

3.2.2 Κβαντική Θεωρία Φαινομένου Raman

Με την κβαντική θεωρία εισάγεται η κυματική και σωματιδιακή φύση του φωτός και λαμβάνεται υπόψη ότι η ακτινοβολία αποτελείται από κβάντα φωτός. Επιπλέον, λαμβάνονται υπόψη ότι τα μοριακά ενεργειακά επίπεδα είναι κβαντισμένα και αυτό δίνει τη δυνατότητα να υπολογιστεί η πολωσιμότητα, α και κατά συνέπεια οι εντάσεις της σκέδασης Raman ως προς τις ηλεκτρονικές ιδιότητες του μορίου.

Η πολωσιμότητα του μορίου μπορεί να εκφραστεί ως το άθροισμα των συνεισφορών των κυματοσυναρτήσεων όλων των διεγερμένων καταστάσεων μέσω της εξίσωσης Kramers-Heisenberg-Dirac:

$$\alpha_{fi}^{\rho,\sigma} = \frac{2\pi}{h} \sum_e \left(\frac{\langle f|\mu_\rho|e\rangle\langle e|\mu_\sigma|i\rangle}{\nu_{ei} - \nu_0 + i\Gamma_e} + \frac{\langle f|\mu_\sigma|e\rangle\langle e|\mu_\rho|i\rangle}{\nu_{ei} + \nu_0 + i\Gamma_e} \right)$$

όπου α η πολωσιμότητα του μορίου, ρ και σ οι κατευθύνσεις της προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης πολωσιμότητας, αντίστοιχα και Σ το άθροισμα όλων των δονητικών καταστάσεων του μορίου. Οι όροι i , f και e είναι σταθερές. Ο όρος i αναφέρεται στη θεμελιώδη δονητική κατάσταση, ο f στην τελική δονητική κατάσταση της θεμελιώδους κατάστασης και ο e στη δονητική κατάσταση μιας διεγερμένης ηλεκτρονικής κατάστασης. Ο όρος Γ_e είναι ο παράγοντας απόσβεσης που εξασφαλίζει το πεπερασμένο εύρος ζώνης για τη διεγερμένη κατάσταση.^{8-10, 12}

Η σκέδαση Raman είναι πολύ ασθενής καθώς, μόνο ένα στα 10^6 - 10^8 φωτόνια που σκεδάζονται παρουσιάζει σκέδαση Raman. Σημαντική ενίσχυση του φαινομένου επιτυγχάνεται με την τεχνική συντονισμού Raman.¹¹

3.2.3 Σκέδαση Συντονισμού Raman

Η σκέδαση συντονισμού Raman πραγματοποιείται όταν μια ένωση ακτινοβολείται με ακτινοβολία μήκους κύματος που να αντιστοιχεί στην ενέργεια ηλεκτρονικής μετάβασης μιας συγκεκριμένης χρωμοφόρας ομάδας του μορίου. Όταν η διέγερση πλησιάζει ή είναι στα επίπεδα ηλεκτρονικής απορρόφησης, τότε αυξάνεται η δονητική σύζευξη με την ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση (Σχήμα 3.2.1.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των εντάσεων των κορυφών Raman κατά παράγοντα 10^3 μέχρι 10^5 και της

εκλεκτικότητας των δονητικών πληροφοριών που λαμβάνονται, αφού μόνο οι δονήσεις που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη χρωμοφόρα ομάδα ενισχύονται.^{10, 12-13}

Η βάση του φαινομένου συντονισμού Raman ακολουθεί την εξίσωση Kramers-Heisenberg-Dirac. Καθώς η συχνότητα διέγερσης, ν_e προσεγγίζει τη συχνότητα ηλεκτρονιακής μετάβασης, ν_{ei} η τιμή του πρώτου όρου της εξίσωσης αυξάνεται ενώ ο δεύτερος όρος γίνεται ασήμαντος. Όταν φτάσει στα επίπεδα της ηλεκτρονιακής μετάβασης, τότε η συνεισφορά των υπόλοιπων ηλεκτρονιακών μεταβάσεων στον πρώτο όρο γίνεται ασήμαντη και η εξίσωση μετατρέπεται

$$\alpha_{fi}^{\rho,\sigma} = \frac{2\pi}{h} \sum_{\nu_e} \left(\frac{\langle f | \mu_\rho | e \rangle \langle e | \mu_\sigma | i \rangle}{\nu_{\nu_e i} - \nu_0 + i\Gamma_e} \right)$$

Περισσότερες πληροφορίες λαμβάνονται εκφράζοντας τις κυματοσυναρτήσεις ως παράγωγα των ηλεκτρονιακών και δονητικών κυματοσυναρτήσεων. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την προσέγγιση Born-Oppenheimer ακολουθούμενη από τη σειρά Herzberg-Taylor, οπότε η εξίσωση Kramers-Heisenberg-Dirac παίρνει τη μορφή

$$\alpha_{fi}^{\rho,\sigma} = A + B + C$$

$$A = \frac{2\pi}{h} M_0^\rho M_0^\sigma \sum_{\nu_e} \left(\frac{\langle \nu_f | \nu_e \rangle \langle \nu_e | \nu_i \rangle}{\nu_{\nu_e \nu_i} - \nu_0 + i\Gamma_{\nu_e}} \right)$$

$$B = \frac{2\pi}{h} (M_0^\rho M^{\sigma'} \sum_{\nu_e} \left(\frac{\langle \nu_f | \nu_e \rangle \langle \nu_e | Q | \nu_i \rangle}{\nu_{\nu_e \nu_i} - \nu_0 + i\Gamma_{\nu_e}} \right) + M^{\rho'} M_0^\sigma \sum_{\nu_e} \left(\frac{\langle \nu_f | Q | \nu_e \rangle \langle \nu_e | \nu_i \rangle}{\nu_{\nu_e \nu_i} - \nu_0 + i\Gamma_{\nu_e}} \right))$$

$$C = \frac{2\pi}{h} M^{\rho'} M^{\sigma'} \sum_{\nu_e} \left(\frac{\langle \nu_f | Q | \nu_e \rangle \langle \nu_e | Q | \nu_i \rangle}{\nu_{\nu_e \nu_i} - \nu_0 + i\Gamma_{\nu_e}} \right)$$

όπου $M^\rho = \langle e_f^0 | \mu_\rho | e_e^0 \rangle$ και $M^{\rho'} = M_\alpha^0 \langle \alpha | \partial M^\rho / \partial Q | e \rangle / (\nu_\alpha - \nu_s)$, με το $|\alpha\rangle$ να είναι ακόμα μια διεγερμένη κατάσταση που σχετίζεται με το μεταβατικό δίπολο M_α^0 και την ενέργεια ν_α . Οι όροι $|\nu_i\rangle$ και $|\nu_f\rangle$ είναι η αρχική και τελική δονητική κυματοσυνάρτηση, αντίστοιχα για τη θεμελιώδη κατάσταση και $|\nu_e\rangle$ για τη διεγερμένη και οι όροι $|e_f^0\rangle$, $|e_e^0\rangle$, $|e_i^0\rangle$ είναι οι ηλεκτρονιακές κυματοσυναρτήσεις της τελικής, διεγερμένης και αρχικής κατάστασης, αντίστοιχα.

Ο κάθε όρος A, B, C περιγράφει τις συνεισφορές που σχετίζονται με τις ηλεκτρονιακές και δονητικές κυματοσυναρτήσεις και την ενέργεια διέγερσης. Η συνεισφορά των δονητικών κυματοσυναρτήσεων στους A- και B- όρους εκφράζεται από τις μεταβλητές Frank-Condon, $\langle \nu_f | \nu_e \rangle$ και $\langle \nu_e | \nu_i \rangle$ και στους όρους B- και C- από τις Q-εξαρτώμενες

μεταβλητές, $\langle \nu_f | Q | \nu_e \rangle$ και $\langle \nu_e | Q | \nu_i \rangle$. Αυτές οι μεταβλητές συσχετίζουν τη συμμετρία των δονήσεων με την ενεργότητά τους στο Raman και είναι η πηγή των κανόνων επιλογής στη σκέδαση Raman.

Για τις πλήρως επιτρεπτές μεταβάσεις, που έχουν μεγάλες τιμές M_0 , ο μηχανισμός ενίσχυσης του συντονισμού προκύπτει από τον A- όρο. Ο A- όρος γίνεται μεγαλύτερος καθώς ο παρονομαστής γίνεται μικρότερος σε συνθήκες συντονισμού. Για να μην είναι μηδέν ο A- όρος πρέπει να επιτρέπεται η ηλεκτρονιακή μετάβαση $i \leftrightarrow e$ και το αποτέλεσμα των μεταβλητών $\langle \nu_f | \nu_e \rangle$ και $\langle \nu_e | \nu_i \rangle$ πρέπει να μην είναι μηδέν. Η παράμετρος αυτή εκπληρώνεται όταν πραγματοποιείται μετατόπιση της θέσης ισορροπίας κατά τη μετάβαση. Οι πλήρως συμμετρικές δονήσεις τείνουν να ενισχύονται σε συνθήκες συντονισμού μέσω του A- όρου, καθώς τείνουν να μετατοπίζουν τη θέση ισορροπίας κατά την ηλεκτρονιακή διέγερση. Ως εκ τούτου, ο A- όρος χαρακτηρίζει τις πολωμένες δονήσεις.

Όταν η ηλεκτρονιακή μετάβαση στο συντονισμό είναι ασθενής και $M' > M_0$, τότε η συνεισφορά από το B- όρο είναι κυρίαρχη. Παρόλο που ο παρονομαστής στο B- όρο είναι ο ίδιος με αυτόν του A- όρου, ο αριθμητής του B- όρου περιέχει τα Q- εξαρτώμενα ολοκληρώματα, που δεν εξαλείφονται ακόμα και όταν δεν μετατοπίζεται η θέση ισορροπίας. Επειδή ο B- όρος περιλαμβάνει δονητική ανάμειξη δύο διεγερμένων ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων, η συνεισφορά του B- όρου ευνοείται όταν η ασθενής δονητική μετάβαση είναι δονητικά συζευγμένη με μια ισχυρή. Έτσι, ο B- όρος προκαλεί κυρίως, ενίσχυση μέσω συντονισμού των μη πλήρως συμμετρικών δονήσεων και ελαφρώς, των πλήρως συμμετρικών δονήσεων.

Ο αριθμητής του C-όρου περιέχει δύο Q-εξαρτώμενες μεταβλητές. Επειδή η κάθε μια συνδέει δονητικά επίπεδα που διαφέρουν μεταξύ τους κατά ένα κβάντο, το τελευταίο επίπεδο θα διαφέρει από το αρχικό κατά δύο κβάντα. Συνεπώς, μόνο οι υπέρτονες δονήσεις ενισχύονται από τον C- όρο και η συνεισφορά του C- όρου γίνεται σημαντική όταν $M' \geq M_0$. Επειδή, οι υπέρτονες δονήσεις προκύπτουν από μετάβαση σε διεγερμένη κατάσταση με ενέργεια μεγαλύτερη από την πρώτη διεγερμένη κατάσταση, ο C- όρος δεν λαμβάνεται υπόψη.^{10, 12, 14}

Το κυριότερο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman είναι η εκλεκτικότητα που παρουσιάζει, ως προς το ότι μόνο συγκεκριμένες δονήσεις της χρωμοφόρας ομάδας που μελετάται ενισχύονται. Οι συχνότητες των δονήσεων είναι ευαίσθητες, όσον αφορά, την ισχύ του δεσμού, τον αριθμό των ατόμων, τη γεωμετρία και το βαθμό ένταξης. Η μεταβολές αυτών των χαρακτηριστικών μπορούν να δώσουν

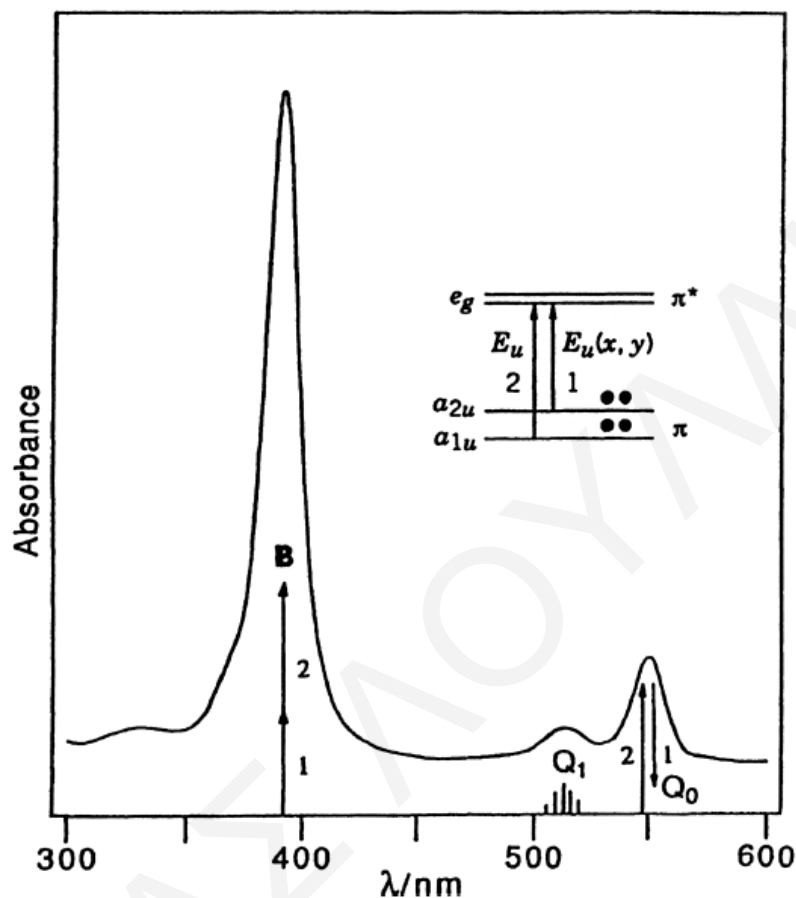
πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία των βιομορίων. Ως εκ τούτου, η τεχνική συντονισμού Raman βρίσκει σημαντική εφαρμογή στη μελέτη βιολογικών μορίων.¹⁵

3.2.4 Εφαρμογή Φασματοσκοπίας Συντονισμού Raman στη Μελέτη Αιμοπρωτεϊνών

Τα φάσματα συντονισμού Raman των πρωτεϊνών οφείλονται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τις χρωμοφόρες ομάδες που περιέχουν οι πρωτεΐνες. Οι χρωμοφόρες ομάδες των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν: α) τον πεπτιδικό δεσμό (αμιδικός δεσμός), β) τις πλευρικές αλυσίδες αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, τρυπτοφάνη) και γ) τις προσθετικές ομάδες και συνένζυμα, που στην περίπτωση των αιμοπρωτεϊνών είναι η προσθετική ομάδα αίμης. Ο πεπτιδικός δεσμός παρουσιάζει δύο μεταβάσεις στα 190 και 210-220 nm οι οποίες οφείλονται στις μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$, αντίστοιχα. Τα αμινοξέα, τυροσίνη και τρυπτοφάνη παρουσιάζουν μεταβάσεις στα 274 και 280 nm, αντίστοιχα οι οποίες οφείλονται στον αρωματικό τους δακτύλιο.¹⁶ Η προσθετική ομάδα αίμης που αποτελεί το ενεργό κέντρο σε μεγάλο εύρος αιμοπρωτεϊνών παρουσιάζει ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον.

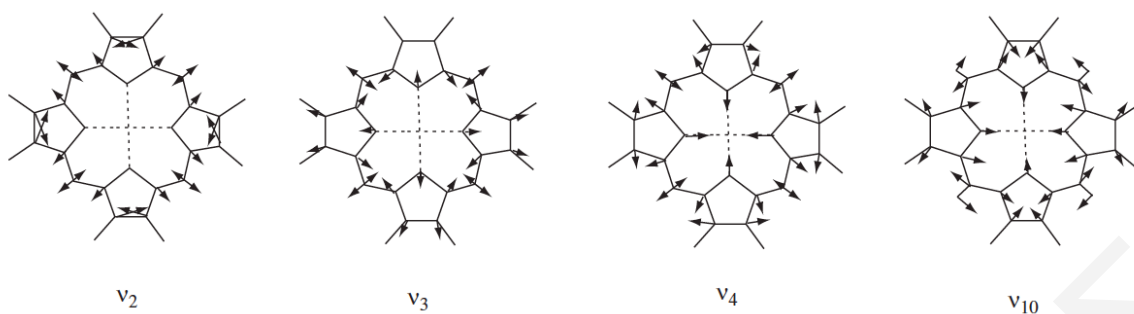
Οι ηλεκτρονιακές ιδιότητες της αίμης προκύπτουν από το π συζυγιακό σύστημα του πορφυρινικού δακτυλίου. Με βάση τη θεωρία των μοριακών τροχιακών, οι κορυφές που παρατηρούνται στο φάσμα απορρόφησης των πορφυρινικών συστημάτων, προέρχονται από τις μεταβάσεις μεταξύ των δύο HOMO και των δύο LUMO μοριακών τροχιακών. Εξαιτίας του εκτεταμένου π συζυγιακού συστήματος του πορφυρινικού δακτυλίου, η ενεργειακή διαφορά μεταξύ HOMO-LUMO είναι σχετικά μικρή. Τα δύο HOMO μοριακά τροχιακά έχουν a_{1u} και a_{2u} συμμετρία και έχουν περίπου ίδια ενέργεια ενώ τα LUMO τροχιακά είναι διπλά εκφυλισμένα με συμμετρία e_g . Κατά συνέπεια, προκύπτουν δύο μεταβάσεις, $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ και $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$, ίδιας συμμετρίας, E_u και παρόμοιας ενέργειας, οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Σχήμα 3.2.4.1)¹⁴. Για την υψηλής ενέργειας μετάβαση, τα μεταβατικά δίπολα προστίθενται μεταξύ τους ενώ για τη χαμηλής ενέργειας μετάβαση τα μεταβατικά δίπολα αφαιρούνται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την εμφάνιση έντονης ζώνης απορρόφησης περίπου στα 400 nm, η οποία ονομάζεται Soret ή B- ζώνη και μιας δεύτερης ασθενέστερης ζώνης απορρόφησης, περίπου στα 550 nm, ονομαζόμενη Q_0 ή α - ζώνη (Σχήμα 3.2.4.1)¹⁴. Ωστόσο, η χαμηλής ενέργειας μετάβαση μπορεί να ανακτήσει μέρος της έντασης της υψηλότερης ενέργειας μετάβασης (~10%) μέσω δονητικής ανάμειξης, οδηγώντας στην εμφάνιση ακόμα μιας ζώνης απορρόφησης περίπου στα 530 nm, που ονομάζεται Q_1 ή β - ζώνη.^{12, 14, 17-18} Τα χαρακτηριστικά αυτά, δίνουν το πλεονέκτημα της εύκολης και ακριβούς παρακολούθησης

των διαδικασιών δέσμευσης υποκαταστατών στις ομάδες αίμης των αιμοπρωτεϊνών μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης UV/Vis.¹⁹



Σχήμα 3.2.4.1: Σχηματικό διάγραμμα των ενεργειακών επιπέδων με τις μεταβάσεις τους και φάσμα απορρόφησης υπεριώδους-οράτου ομάδας αίμης όπου επισημαίνονται οι μεταβάσεις στην περιοχή Soret, B και στη ζώνη Q, Q₁ και Q₀.¹⁴

Η υψηλή συμμετρία που παρουσιάζουν οι μεταλλοπορφυρίνες διευκολύνει τη δονητική ανάλυσή τους. Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman, καθώς μπορεί να διεγείρει συγκεκριμένες ομάδες των βιομορίων ανάλογα με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (Soret ή Q) που χρησιμοποιείται, μπορεί να βοηθήσει στο χαρακτηρισμό της πορφυρίνης και των συμπλόκων της με διάφορους υποκαταστάτες. Διάφορες αιμοπρωτεΐνες και μοντέλα πορφυρινών μελετήθηκαν με στόχο την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών δονήσεων που παρουσιάζονται στα φάσματά τους.²⁰⁻²³ Αυτές οι δονήσεις ονομάζονται ζώνες-δείκτες και είναι χαρακτηριστικές, λόγω του ότι παρουσιάζουν ευαισθησία στην ηλεκτρονιακή δομή και την κατάσταση δέσμευσης του κεντρικού μεταλλικού ιόντος και τη γεωμετρία του πορφυρινικού δακτυλίου.¹⁰ Οι σημαντικότερες είναι οι δονήσεις, ν_4 , ν_2 , ν_3 και ν_{10} (Σχήμα 3.2.4.2)¹³.



Σχήμα 3.2.4.2: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων δονήσεων του πορφυρινικού δακτύλιου.¹³

Η δόνηση ν_4 μεταβάλλεται έντονα, σε σύγκριση με άλλες δονήσεις, όταν η κατάσταση οξειδωσης του κεντρικού μεταλλικού ιόντος στο δακτύλιο αλλάζει, γι' αυτό και αποτελεί το δείκτη της οξειδωτικής κατάστασης του κεντρικού μεταλλικού ιόντος. Αυτό οφείλεται στις μεγάλες μετατοπίσεις των τεσσάρων ατόμων αζώτου του πορφυρινικού δακτύλιου που είναι δεσμευμένα με το κεντρικό μεταλλικό ιόν. Τα άτομα αζώτου μετακινούνται συμμετρικά προς τα μέσα ή προς τα έξω ανάλογα με το μέγεθος του μεταλλικού ιόντος. Καθώς το μέγεθος του μεταλλικού ιόντος αλλάζει ανάλογα με την κατάσταση οξειδωσής του, η συχνότητα της συγκεκριμένης δόνησης επηρεάζεται σημαντικά.

Οι δονήσεις ν_2 , ν_3 και ν_{10} αποτελούν τους δείκτες της κατάστασης σπιν του κεντρικού μεταλλικού ιόντος. Η δόνηση ν_2 επιβεβαιώνει την κατάσταση σπιν. Οι ν_3 και ν_{10} , εκτός από την κατάσταση σπιν, δίνουν επιπλέον πληροφορίες για τον αριθμό ένταξης και την οξειδωτική κατάσταση του μεταλλικού ιόντος, αντίστοιχα.

Εκτός από τις πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τις χαρακτηριστικές δονήσεις, σημαντικές πληροφορίες μπορούν να ληφθούν επίσης, από την ανάλυση των δονήσεων μετάλλου-υποκαταστάτη. Από την ανάλυση αυτών των δονήσεων μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για το μήκος, τη γωνιά και την ισχύ των δεσμών.^{10, 13}

3.3 Βιβλιογραφία

1. Griffiths, P. R., INFRARED SPECTROSCOPY Overview. *In Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*, Elsevier Oxford **2005**, pp 385-402.
2. Stuart, B. H., Introduction. *In Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons **2005**, pp 1-13.
3. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A., *Principles of instrumental analysis : Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman*. 5th ed Philadelphia : Saunders College Pub. **1998**.

4. Pasquini, C., Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2003**, *14*, 198-219.
5. Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A., Theoretical Background. In *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, John Wiley & Sons **2006**, pp 19-55.
6. Radu, I.; Schleege, M.; Bolwien, C.; Heberle, J., Time-resolved methods in biophysics. 10. Time-resolved FT-IR difference spectroscopy and the application to membrane proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2009**, *8* (11), 1517-1528.
7. Kötting, C.; Gerwert, K., Proteins in Action Monitored by Time-Resolved FTIR Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (5), 881-888.
8. Van Duyne, R. P.; Haynes, C. L., Raman Spectroscopy. In *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)*, Academic Press New York **2003**, pp 845-866.
9. Smith, E.; Dent, G., The Theory of Raman Spectroscopy. In *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons **2005**, pp 71-92.
10. Wang, Y.; Van Wart, H. E., Raman and resonance Raman spectroscopy. In *Methods in Enzymology*, Academic Press **1993**, *226*, pp 319-373.
11. Smith, E.; Dent, G., Introduction, Basic Theory and Principles. In *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons **2005**, pp 1-21.
12. Ferraro, J. R.; Nakamoto, K.; Brown, C. W., Chapter 1 - Basic Theory. In *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*, Academic Press San Diego, **2003**, pp 1-94.
13. Smith, E.; Dent, G., Resonance Raman Scattering. In *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons **2005**, pp 93-112.
14. Nakamoto, K., Applications in Coordination Chemistry. In *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, John Wiley & Sons **2008**, pp 1-273.
15. Spiro, T. G.; Czernuszewicz, R. S., Resonance Raman spectroscopy of metalloproteins. In *Methods in Enzymology*, Academic Press **1995**, *246*, pp 416-460.
16. Hofmann, A., Spectroscopic Techniques: I Spectrophotometric Techniques. In *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7th Ed., Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, **2010**.
17. Spiro, T. G.; Czernuszewicz, R. S.; Li, X.-Y., Metalloporphyrin structure and dynamics from resonance raman spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews* **1990**, *100* (0), 541-571.

18. Siebert, F.; Hildebrandt, P., Heme Proteins. *In Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Wiley **2008**, pp 227-282.
19. Giovanetti, R., The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. *In Macro to Nano Spectroscopy* **2012**, pp 87-108.
20. Spiro, T. G., Resonance raman spectroscopic studies of heme proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **1975**, *416* (2), 169-189.
21. Spiro, T. G., Biological Applications of Resonance Raman Spectroscopy: Haem Proteins. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1975**, *345* (1640), 89-105.
22. Spiro, T. G.; Stong, J. D.; Stein, P., Porphyrin core expansion and doming in heme proteins. New evidence from resonance Raman spectra of six-coordinate high-spin iron(III) hemes. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101* (10), 2648-2655.
23. Spiro, T. G.; Streckas, T. C., Resonance Raman spectra of heme proteins. Effects of oxidation and spin state. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (2), 338-345.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματικό Μέρος

4.1 Χημικές Ενώσεις και Ρυθμιστικά Διαλύματα

Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι: κυανιούχο κάλιο ($\text{KCN} \geq 98,0\%$ Fluka, K^{13}CN 99 atom % ^{13}C ISOTEC, KC^{15}N 98+ atom % ^{15}N ISOTEC, $\text{K}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ 99 atom % ^{13}C - ^{15}N ISOTEK), αζίδιο του νατρίου (NaN_3 99% Riedel-de Haën, $\text{Na-}^{15}\text{N}=\text{N}=\text{N}$ 98 atom % ^{15}N terminal N ISOTEK), νιτρώδες νάτριο (NaNO_2 Sigma Aldrich, $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ 98 atom % ^{15}N Sigma-Aldrich, $\text{Na}^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2$ 98;90 atom % $^{15}\text{N};^{18}\text{O}$ Sigma-Aldrich), διθειονικά άλατα ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \geq 98\%$ Sigma-Aldrich), L-κυστεΐνη ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S} \geq 98,5\%$ Sigma-Aldrich), δευτεριωμένο νερό (D_2O , 99,9 atom % D Sigma-Aldrich), άλατα των ρυθμιστικών διαλυμάτων Tris (reagent grade, Sigma-Aldrich) CHES (ultrol grade, Calbiochem), MES (ultrol grade, Calbiochem), αέριο CO (99,999%, Linde) και αέριο N_2O (100%, Linde).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικά διαλύματα 50 mM Tris pH και pD 7,5, 50 mM CHES pH 5,5-6,0 και 50 mM MES pH 9,0-9,5.

4.2 Έκφραση και Απομόνωση Πρωτεϊνών

4.2.1 Κυτοχρωμική Οξειδάση *ba*₃

Η έκφραση και απομόνωση της *ba*₃ οξειδάσης πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Limerick στην Ιρλανδία στο Τμήμα Χημικών και Περιβαλλοντικών Επιστημών. Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε από εμένα κατά την τρίμηνη επίσκεψη μου στο εργαστήριο του Καθηγητή Dr. Tewfik Soulimane καθώς και από τον Dr. Mohamed R. Noor.

Για την έκφραση της *ba*₃ οξειδάσης από το βακτήριο *T. thermophilus* HB8 (ATCC27634) τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 70 °C σε 100 mL μέσου καλλιέργειας χρησιμοποιώντας αντιδραστήρα ζύμωσης σε συνθήκες 0,05 V/V·min (όγκος αέρα ανά όγκο μέσου καλλιέργειας ανά λεπτό). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατά την πρόιμη με μέση εκθετική φάση ανάπτυξης. Στη συνέχεια, 100 g των κυττάρων αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 500 mL με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 200 mM KCl και 800 mg λυσοζύμη. Το διάλυμα αναδεύθηκε για μια ώρα και έπειτα φυγοκεντρήθηκε. Για τη διαλυτοποίηση των συμπλεγμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας, το ίζημα που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση επαναδιαλύθηκε σε τελικό όγκο 500 mL, με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM Tris-HCl pH 7,6, 5% Triton X-100, αναδεύθηκε για 3 ώρες και φυγοκεντρήθηκε στα 17700xg σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα από τη φυγοκέντρηση αραιώθηκε σε 5 L νερού και εισήχθηκε σε στήλη χρωματογραφίας DEAE-Biogel Agarose, η οποία προηγουμένως είχε ισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris pH 7,6, 0.1% Triton X-100. Τα κλάσματα της *ba*₃ οξειδάσης που λήφθηκαν από τη χρωματογραφία,

ομαδοποιήθηκαν, συγκεντρώθηκαν και ξαναπραγματοποιήθηκε διπλή χρωματογραφία σε στήλη χρωματογραφίας Fractogel EMD TMAE-650 (S), χρησιμοποιώντας 0,05% dodecyl β -D-maltoside αντί 0,1% Triton X-100 στο ρυθμιστικό διάλυμα. Τα κλάσματα από τις χρωματογραφίες συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία gel σε στήλη Superdex 200 χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1% dodecyl β -D-maltoside. Η απομονωμένη *ba*₃ οξειδάση συγκεντρώθηκε με υπερδιήθηση (Centricon 10000, Amicon) και απομακρύνθηκε η περίσσεια άλατος με στήλη Sephadex G-25. Μετά την απομάκρυνση του άλατος, η ποσότητα του ενζύμου που απομονώθηκε ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.¹

4.2.2 Κυτοχρωμική Οξειδάση *cbb*₃

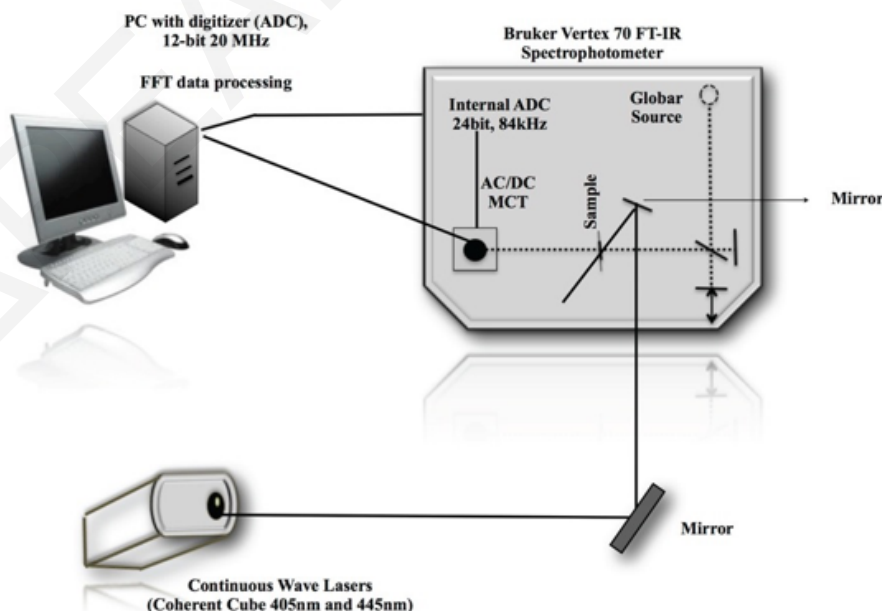
Τα κύτταρα από το βακτήριο *P. stutzeri* strain ZoBell καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 32 °C κάτω από συνθήκες χαμηλού αερισμού σε ανακινούμενες φιάλες. Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των κυττάρων ήταν το ακόλουθο: 2,0 g/L L-αργινίνη, 7,0 g/L Na₃citrate·H₂O, 2,0 g/L KH₂PO₄, 2,0 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,1 g/L CaCl₂·2H₂O, 10 g/L NaCl, 25 mg/L FeCl₃·6H₂O, 0,17 mg/L CuCl₂·2H₂O με όλα τα διαλύματα να είναι ρυθμισμένα σε pH 8,0. Μετά από 30 λεπτά ανάδευσης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά στις 4500 στροφές ανά λεπτό και σε θερμοκρασία 4 °C. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το παρακάτω ρυθμιστικό διάλυμα: 20 mM Tris pH 7,5, 2 mM MgCl₂, ~1 mM 4-(2-aminoethyl)-benzyl-sulphonyl fluoride (AEBSF), 0,1 mg/g κύτταρα δεοξυριβονουκλεάσης I και 500 mM NaCl pH 7,5. Στο μίγμα προστέθηκαν 5 mM EDTA σε χρόνο 5-10 λεπτών μετά τη λύση των κυττάρων. Το διάλυμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 2,5 ώρες, στα 10000xg και στους 4 °C. Η διαλυτοποίηση της μεμβρανικής πρωτεΐνης επιτεύχθηκε επωάζοντας, για 5 λεπτά σε πάγο, τις ομογενοποιημένες μεμβράνες με DM σε αναλογία 2,5 g DM ανά γραμμάριο πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε: 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 10% w/v γλυκερόλη, 50 mM NaCl και ~1 mM AEBSF. Το υπερκείμενο διάλυμα που λήφθηκε μετά από τη φυγοκέντρηση του πιο πάνω διαλύματος, για 1 ώρα, στα 100000xg, στους 4 °C, εισήχθηκε σε ανιονανταλλακτική στήλη DEAE Toyopearl 650C. Η στήλη είχε προηγουμένως ισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα: 20 mM Tris, 0,05 mM EDTA, 10% w/v γλυκερόλη, 50 mM NaCl και 0,02% DM. Η έκλουση του δείγματος πραγματοποιήθηκε με γραμμική βαθμίδωση 0-25% σε 290 mL διαλύματος 20 mM Tris, 10% w/v γλυκερόλη, 1 M NaCl και 0,02% DM. Τα πλούσια σε αίμες *c* και *b* κλάσματα, εκλούστηκαν μεταξύ των συγκεντρώσεων 100-160 mM NaCl και εισήχθηκαν σε

μυνοδιοξική ακινητοποιημένη ρητίνη (Fast Flow Chelating Sepharose). Η στήλη προηγουμένως κορέστηκε με διάλυμα CuSO_4 και ισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris, 10% w/v γλυκερόλη, 200 mM NaCl, 0,02% DM. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούστηκαν με 440 mL γραμμικής βαθμίδωσης 0-8 mM ιμιδαζολίου σε ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την ισορρόπηση της στήλης. Η εξέλιξη της έκλυσης παρατηρήθηκε με βάση τις απορροφήσεις στα 280 και 405 nm και τα κλάσματα στο τέλος της βαθμίδωσης του ιμιδαζολίου, συλλέχθηκαν, αραιώθηκαν και εισήχθηκαν σε ανιονανταλλακτική στήλη. Η ανιοναταλλακτική στήλη DEAE Toyopearl 650C είχε ισορροπηθεί με διάλυμα 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 0,02% DM και η έκλυση επιτεύχθηκε με 470 mL διαλύματος 20 mM Tris, 1 M NaCl, 0,5 mM EDTA και 0,02% DM και βαθμίδωση 0-30%. Τα κλάσματα που περιείχαν cb_3 οξειδάση συγκεντρώθηκαν, ψύχθηκαν με υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους -80°C .²

4.3 Πειραματικές Διατάξεις

4.3.1 Πειραματική Διάταξη FTIR

Τα φάσματα υπερύθρου καταγράφηκαν με τη χρήση φασματομέτρου FTIR Bruker Vertex 70 εξοπλισμένο με φωτοαγωγίμο ανιχνευτή Υδραργύρου-Καδμίου-Τελλουρίου (MCT), ο οποίος ψύχθηκε με υγρό άζωτο (Σχήμα 4.3.1.1).

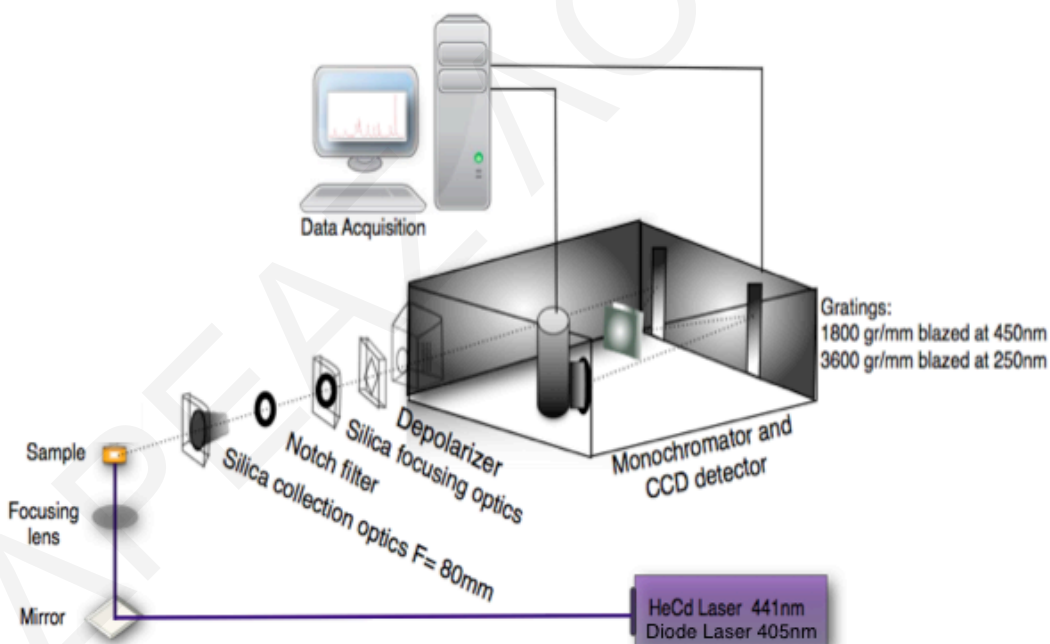


Σχήμα 4.3.1.1: Πειραματική διάταξη IR που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αντιδράσεων της ba_3 οξειδάσης με τους υποκαταστάτες και των πειραμάτων φωτοδιάσπασης των συμπλόκων.

Η φωτοδιάσπαση των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση laser διόδου συνεχούς κύματος (Coherent, Cube) και μήκους κύματος στα 447 nm. Η ενέργεια της ακτινοβολίας του laser στο δείγμα ήταν στα 30 mW. Τα φάσματα λήφθηκαν στη μέση περιοχή υπερόθρου $4000-850\text{ cm}^{-1}$ με φασματική ανάλυση 4 cm^{-1} , ταχύτητα σάρωσης 20 kHz, ανάλυση φάσης 32, διόρθωση φάσης Mertz/No Peak Search και λειτουργία αποδισμού Blackman-Harris 4-Term. Για τη λήψη των απόλυτων φασμάτων καταγράφονταν 100 σαρώσεις του δείγματος αφού αρχικά είχε ληφθεί με 100 σαρώσεις το φάσμα αναφοράς χωρίς δείγμα.

4.3.2 Πειραματική Διάταξη Raman

Τα φάσματα RR λήφθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) με φασματογράφο Raman μήκους εστίασης 640 mm (Horiba T64000) εξοπλισμένο με 1800 g/mm holographic grating και ανιχνευτή Horiba Symphony BIUV 1024x256 CCD (Σχήμα 4.3.2.1).



Σχήμα 4.3.2.1: Πειραματική διάταξη Raman που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αντιδράσεων των ba_3 και cbb_3 οξειδίων με τους υποκαταστάτες.

Τα δείγματα ετοιμάζονταν σε σωλήνες quartz και περιστρέφονταν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η τοπική θέρμανση του δείγματος. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία λαμβανόταν υπό γωνία 90° . Για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν laser μήκους κύματος 405 nm Ondax SureLock LM-405 με ενσωματωμένο φίλτρο CleanLine ACE και laser Kimmon HeCd μήκους κύματος 441.6 nm. Η απομάκρυνση της σκέδασης

Rayleigh επιτεύχθηκε με τη χρήση φίλτρων Semrock StopLine 405 nm και Semrock 442 nm, αντίστοιχα. Η ενέργεια στο δείγμα ήταν 4 mW και το κάθε φάσμα λαμβανόταν σε συνολικό χρόνο 10-20 λεπτών. Οι μετατοπίσεις Raman βαθμονομήθηκαν χρησιμοποιώντας τολουόλιο.

4.4 Πειραματικές Διαδικασίες

4.4.1 Μελέτη της Αντίδρασης ba_3 Οξειδάσης/ CN^-

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της αντίδρασης της ba_3 οξειδάσης με το CN^- χρησιμοποιήθηκαν δείγματα του ενζύμου συγκέντρωσης ~ 1 mM στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5,5 MES, pH 7,5-9,5 Tris και pD 7,5 Tris). Το pD των διαλυμάτων μετρήθηκε με πεχάμετρο και υπολογίστηκε υποθέτωντας ότι $pD = pH$ (παρατηρούμενο) + 0,4. Τα παράγωγα CN^- της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης ετοιμάστηκαν, προσθέτωντας διάλυμα κυανιούχου καλίου, τελικής συγκέντρωσης ~ 20 mM, στην πρωτεΐνη. Τα παράγωγα CN^- της πλήρως ανηγμένης ba_3 οξειδάσης ετοιμάστηκαν κάτω από αναερόβιες συνθήκες, προσθέτωντας διάλυμα κυανιούχου καλίου, τελικής συγκέντρωσης ~ 10 mM, στην ανηγμένη από διθειονικά άλατα, πρωτεΐνη. Για το παράγωγο της ba_3 οξειδάσης με το CO, η ανηγμένη, από διθειονικά άλατα, πρωτεΐνη εκτέθηκε σε ατμόσφαιρα CO μέσα σε γυάλινο φιαλίδιο υπο κενό. Για τη λήψη των φασμάτων υπερέυθρου των παραγώγων του CN^- και του παραγώγου του CO, τα δείγματα εισήχθησαν σε σφραγισμένη FTIR κυψελίδα κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα παράθυρα της κυψελίδας ήταν φθοριούχου βαρίου (BaF_2) και το πάχος της κυψελίδας καθορίστηκε με τη χρήση spacer 0,015mm. Τα στατικά φάσματα FTIR καταγράφηκαν με την πειραματική διάταξη που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.3.1. Αρχικά λήφθηκαν τα απόλυτα φάσματα των παραγώγων, από τα οποία αφαιρέθηκε το φάσμα του υδροκυανίου (HCN) έτσι ώστε να εξαλειφθεί η συνεισφορά του ελεύθερου υποκαταστάτη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φωτοδιάσπαση των συμπλόκων. Για τη φωτοδιάσπαση των συμπλόκων καταγράφηκαν αρχικά 100 σαρώσεις του δείγματος έτσι ώστε να ληφθεί το σκοτεινό φάσμα αναφοράς. Στη συνέχεια καταγράφηκαν 100 σαρώσεις του δείγματος κατά την ακτινοβολήσή του, λαμβάνοντας τελικά το φάσμα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό. Το τελικό φάσμα του φωτοπροϊόντος προέκυψε από το μέσο όρο 30-50 φασμάτων διαφοράς φωτεινού-μείον-σκοτεινού. Με το μήκος κύματος του laser στα 447 nm και την ενέργεια της ακτινοβολίας του laser στα 30 mW, επιτεύχθηκαν ποσοστά φωτόλυσης στα 30% και 5% για τα σύμπλοκα της οξειδωμένης ba_3-CN^- και της ανηγμένης ba_3-CN^- , αντίστοιχα. Τα οπτικά φάσματα απορρόφησης των παραγώγων λήφθηκαν με

φασματομέτρο UV/Vis πριν και μετά της μετρήσεις FTIR, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός και η σταθερότητα των παραγώγων κυανίου.

4.4.2 Μελέτη Δέσμευσης N_3^- στην ba_3 Οξειδάση.

Τα παράγωγα οξειδωμένης $ba_3\text{-N}_3^-$ προετοιμάστηκαν με το ίδιο τρόπο όπως τα παράγωγα CN^- , σε συγκέντρωση ενζύμου ~ 1 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH 7,5 και μετέπειτα προσθήκη διαλύματος αζιδίου του νατρίου (NaN_3), τελικής συγκέντρωσης ~ 20 mM στην πρωτεΐνη. Τα παράγωγα μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία FTIR και RR. Τα FTIR φάσματα λήφθηκαν χρησιμοποιώντας τις ίδιες παραμέτρους όπως και στην περίπτωση της μελέτης των παραγώγων CN^- . Τα RR φάσματα λήφθηκαν με την πειραματική διάταξη που περιγράφηκε στην παράγραφο 4.3.2. Για τη μελέτη FTIR της ανταγωνιστικής δέσμευσης του N_3^- με το CN^- , αρχικά ετοιμάστηκε το παράγωγο N_3^- και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα CN^- τελικής συγκέντρωσης ~ 20 mM.

4.4.3 Μελέτη της Αντίδρασης ba_3 Οξειδάσης/ NO_2^-

Τα δείγματα της ba_3 οξειδάσης που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων οπτικής απορρόφησης και RR, αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις 5 μM και 50 μM , αντίστοιχα, στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 6,0 MES, pH 7,5 Tris, pH 9,0 CHES, pD 7,5 Tris). Το pD των διαλυμάτων μετρήθηκε με πεχάμετρο και υπολογίστηκε υποθέτοντας ότι $\text{pD} = \text{pH}$ (παρατηρούμενο) + 0,4. Τα παράγωγα του NO_2^- προετοιμάστηκαν με επώαση, αρχικά, του οξειδωμένου ενζύμου με 500 φορές περίσσεια νιτρώδους νατρίου (NaNO_2) για 5 ώρες και μετέπειτα προστέθηκε περίσσεια κυστεΐνης (300 φορές) κάτω από αναερόβιες συνθήκες.

Τα φάσματα οπτικής απορρόφησης λήφθηκαν με φασματομέτρο UV/Vis. Όλα τα δείγματα προετοιμάστηκαν κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε κυψελίδα quartz. Φάσματα οπτικής απορρόφησης λήφθηκαν, επίσης κατά την προσθήκη 15 mM κυστεΐνης σε διάλυμα 25 mM NO_2^- , έτσι ώστε να ελεγχθεί εάν το NO_2^- ανάγεται από την κυστεΐνη κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες. Η απορρόφηση του NO_2^- στα 354 nm ($\epsilon_{354} = 22,7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) παραμένει σταθερή για 2 ώρες, επιβεβαιώνοντας ότι το NO_2^- δεν ανάγεται από την κυστεΐνη. Τα RR φάσματα λήφθηκαν με τις ίδιες παραμέτρους που περιγράφηκαν στην παράγραφο 4.3.2. Πριν και μετά από κάθε μέτρηση RR λαμβάνονταν τα οπτικά φάσματα απορρόφησης των δειγμάτων για να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός και η σταθερότητα των παραγώγων $ba_3\text{-NO}_2^-$.

4.4.4 Μελέτη της Δράσης Αναγωγάσης NO_2^- και NO της cbb_3 Οξειδάσης

Τα δείγματα της cbb_3 οξειδάσης προετοιμάστηκαν σε συγκέντρωσεις 5 μM και 50 μM για να ληφθούν τα φάσματα οπτικής απορρόφησης και RR, αντίστοιχα. Για την αντίδραση της ανηγμένης cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- , τα δείγματα ετοιμάστηκαν με την προσθήκη περίσσειας κυστεΐνης (300 φορές) στο ένζυμο και τη μετέπειτα προσθήκη περίσσειας NO_2^- (500 φορές) κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Για τα παράγωγα του NO , αρχικά ετοιμάστηκε διάλυμα NO_2^- στο οποίο προστέθηκε διάλυμα διθειονικών αλάτων, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αναγωγή του NO_2^- σε NO . Στη συνέχεια, το διάλυμα προστέθηκε στην ανηγμένη, από διθειονικά άλατα, πρωτεΐνη κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Τα RR φάσματα λήφθηκαν με τις ίδιες παραμέτρους που περιγράφηκαν στην παράγραφο 4.3.2. Για τη μελέτη FTIR της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- , τα δείγματα ετοιμάστηκαν σε συγκέντρωση 200 μM cbb_3 οξειδάσης με την προσθήκη περίσσειας κυστεΐνης (100 φορές) και τη μετέπειτα προσθήκη 6 mM NO_2^- κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραγόμενου N_2O από τα FTIR δεδομένα. Αρχικά εισήχθη σε σφραγισμένο φιαλίδιο των 4 mL, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris pH 7,5 και από το διάλυμα αφαιρέθηκε, με την εφαρμογή κενού, ο άερας που περιείχε. Έπειτα, εισήχθη αέριο N_2O και το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 ώρες έτσι ώστε να σχηματιστεί κορεσμένο διάλυμα N_2O (25 mM). Το κορεσμένο διάλυμα αραιώθηκε ανάλογα για τη λήψη των φασμάτων FTIR των συγκεντρώσεων 1, 2, 3, 4 και 5 mM N_2O . Τα φάσματα FTIR λήφθηκαν με τις παραμέτρους που περιγράφηκαν στην παράγραφο 4.3.1.

4.4 Βιβλιογραφία

1. Soulimane, T.; Kiefersauer, R.; Than, M. E., *Ba₃-Type Cytochrome c Oxidase from *Thermus thermophilus*: Purification, Crystallization and Crystallization and Crystal Transformation. In *Membrane Protein Purification and Crystallization (Second Edition)*, Academic Press San Diego **2003**, pp 229-251.*
2. Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M., Properties of the detergent solubilised cytochrome c oxidase (cytochrome cbb_3) purified from *Pseudomonas stutzeri*. *FEBS Letters* **2001**, 508 (1), 29-35.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**Μεταφορά Υποκαταστατών στο Διπυρηνικό Κέντρο της ba_3 Οξειδάσης
από το Βακτήριο *T. thermophilus*: FTIR Ανίχνευση των Συμπλόκων
Αίμης a_3^{2+} -CN και Cu_B^{2+} -CN**

5.1 Εισαγωγή

Οι δομικές και λειτουργικές ιδιότητες του ενεργού κέντρου της ba_3 οξειδάσης, καθώς επίσης και των υπόλοιπων αιμοχαλκοξειδασών, έχουν μελετηθεί με πλήθος φασματοσκοπικών και υπολογιστικών μεθόδων, εξετάζοντας τη δέσμευση εξωγενών υποκαταστατών όπως το CO , το CN^- και το NO .¹⁻²⁷ Καθώς, το ενεργό κέντρο της ba_3 οξειδάσης παρουσιάζει ασυνήθιστες ιδιότητες ως προς τη δέσμευση υποκαταστατών, η ba_3 οξειδάση καθίσταται μοναδική ανάμεσα στις αιμοχαλκοξειδάσες.²⁸⁻³⁰ Ως εκ τούτου, κρίνεται απαραίτητη η εκτεταμένη μελέτη και ανάλυση της δυναμικής δέσμευσης των υποκαταστατών στο ενεργό της κέντρο.

Με τη χρήση φασματοσκοπιών απορρόφησης UV/Vis, RR, ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) και Electron Nuclear Double Resonance (ENDOR) μελετήθηκε η αντίδραση της ba_3 οξειδάσης με το CN^- .¹⁵⁻¹⁷ Οι μελέτες έδειξαν ότι η ba_3 οξειδάση αντιδρά αργά με περίσσεια HCN σε pH 7,4 και σχηματίζει μια μορφή όπου τα οξειδοαναγωγικά κέντρα Cu_A , χαμηλού σπιν αίμης b και Cu_B παραμένουν στην οξειδωμένη τους μορφή ενώ η υψηλού σπιν αίμη a_3 ανάγεται από ένα ηλεκτρόνιο. Το ηλεκτρόνιο πιθανότατα παρέχεται από το CN^- , το οποίο οξειδώνεται σχηματίζοντας κυανογόνο.¹⁷ Έχει προταθεί ότι το προϊόν που σχηματίζεται από αυτήν την αντίδραση είναι το σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN \cdot Cu_B^{2+}-CN$, όπου ένα άτομο CN^- δεσμεύεται μέσω του ατόμου του άνθρακα στο Fe^{2+} της αίμης a_3 , ο οποίος λαμβάνει χαμηλού σπιν διάταξη ($S = 0$). Επίσης, προτάθηκε ότι ο Cu_B έχει τέσσερις υποκαταστάτες ιστιδίνης σε ισημερινή θέση καθιστώντας τις αξονικές θέσεις ελεύθερες για τη δέσμευση ενός δευτέρου ιόντος CN^- .¹⁷ Η υπόθεση των τεσσάρων υποκαταστάτων ιστιδίνης καταρρίφθηκε με την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της ba_3 οξειδάσης όπου βρέθηκε ότι ο Cu_B έχει μόνο τρεις υποκαταστάτες ιστιδίνης.³¹ Ο σχηματισμός γέφυρας μεταξύ του CN^- και των δύο μετάλλων φαίνεται να είναι ασθενής ή να μην σχηματίζεται καθόλου.¹⁷

Η δέσμευση του CN^- μελετήθηκε σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις των αιμοχαλκοξειδασών με τις φασματοσκοπίες FTIR και RR.^{6-7, 21-27} Στην οξειδωμένη μορφή της ba_3 οξειδάσης παρατηρήθηκε ότι δεν πραγματοποιείται δέσμευση του CN^- . Αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με τις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες, στις οποίες προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο οδηγεί στο σχηματισμό του χαμηλού σπιν αίμης $Fe^{3+}-CN-Cu_B^{2+}$ συμπλόκου.^{6, 15-17, 23-25} Τα παράγωγα των ανηγμένων μορφών των οξειδάσων με το CN^- παρουσιάζουν διαφορές και οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Μετά από μελέτη με τη φασματοσκοπία FTIR, αναφέρθηκαν οι δονήσεις στους 2058 και 2045 cm^{-1} για την ανηγμένη βόεια κυτοχρωμική οξειδάση. Στο

μερικώς ανηγμένο ένζυμο, οι δονήσεις στους 2131 και 2093 cm^{-1} αποδόθηκαν σε οξειδοαναγωγικές αλλαγές του κέντρου αίμης Fe-Cu_B ή σε αλλαγή στην κατάσταση πρωτονίωσης.^{22,24} Αξιοσημείωτη, είναι η αναφορά των δονήσεων που παρατηρήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις CN^- στους 2093 και 2037 cm^{-1} , οι οποίες αποδόθηκαν στη δέσμευση ενός δεύτερου μορίου CN^- στο Cu_B.²² Υπάρχουν επίσης, μερικά ενδιαφέροντα δεδομένα σχετικά με τις ιδιότητες δέσμευσης του CN^- στο διπυρηνικό κέντρο των bo_3 και ba_3 οξειδασών. Στο παράγωγο της ανηγμένης bo_3 με το CN^- , η δόνηση $\nu(CN)$ παρατηρήθηκε στους 2035 cm^{-1} .²⁵ Η συχνότητα της δόνησης είναι 23 cm^{-1} μικρότερη από την αντίστοιχη στο παράγωγο της βόειας οξειδάσης και φαίνεται να προκύπτει από το διαφορετικό χαρακτήρα δέσμευσης του CN^- στο διμεταλλικό κέντρο της bo_3 οξειδάσης. Η διαφοροποίηση της δόνησης τάσης C-N(Fe), η οποία παρατηρείται στους 2058 cm^{-1} κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη a_3^{2+} της βόειας οξειδάσης και στους 2035 cm^{-1} στην αίμη o_3^{2+} της bo_3 οξειδάσης, προτείνει ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στο ενεργό κέντρο των a_3^{2+}/Cu_B^+ και o_3^{2+}/Cu_B^+ κατά τη δέσμευση του CN^- .⁷

Σύμφωνα με μελέτη της αντίδρασης της ba_3 οξειδάσης με το CN^- με τη φασματοσκοπία RR, το σύμπλοκο Fe²⁺-CN χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις στους 512, 485 και 473 cm^{-1} όταν ο Fe της αίμης a_3 βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή ενώ τα υπόλοιπα μέταλλα βρίσκονται στην οξειδωμένη μορφή (Cu_B²⁺, Cu_A²⁺, b³⁺).¹⁵ Με βάση την ισοτοπική αντικατάσταση η δόνηση στους 512 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση τάσης του δεσμού Fe-C, ενώ οι δονήσεις στους 485 και 473 cm^{-1} σε δονήσεις κάμψης του δεσμού Fe-C-N.¹⁵ Οι δονήσεις αυτές παραμένουν οι ίδιες ή αλλάζουν ελάχιστα με αναγωγή των υπόλοιπων μετάλλων, υποδηλώνοντας ότι η δομή του συμπλόκου αίμης a_3 Fe²⁺-CN παραμένει αμετάβλητη και δεν επηρεάζεται από την οξειδωτική κατάσταση των υπόλοιπων μετάλλων.¹⁵⁻¹⁶ Στην περίπτωση του συμπλόκου της ανηγμένης βόειας aa_3 οξειδάσης με το CN^- παρατηρήθηκαν μόνο δύο ισοτοπικά ευαίσθητες δονήσεις στους 503 και 469 cm^{-1} αποδιδόμενες στις δονήσεις κάμψης $\delta(Fe-C-N)$ και τάσης $\nu(Fe-C)$, αντίστοιχα.¹⁵ Σύγκριση των αποτελεσμάτων από τις δύο πρωτεΐνες, έδειξε ότι η σειρά των δονήσεων τάσης και κάμψης των παραγώγων της aa_3 οξειδάσης είναι αντίστροφες από αυτές των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης. Η δόνηση τάσης, στο παράγωγο του CN^- του βακτηριακού ενζύμου, εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα απ' ότι οι δύο δονήσεις κάμψης, ενώ στο ένζυμο από θηλαστικά η δόνηση κάμψης παρατηρείται σε μεγαλύτερη συχνότητα από τη δόνηση τάσης. Η σημαντική αυτή παρατήρηση επισημαίνει ότι η γεωμετρία του δεσμού Fe-C-N είναι διαφορετική στα παράγωγα των δύο ενζύμων. Στην περίπτωση της ba_3 οξειδάσης, η γωνιά Fe-C-N είναι 180° και είναι γραμμική ενώ στην aa_3 οξειδάση έχει βρεθεί ότι έχει

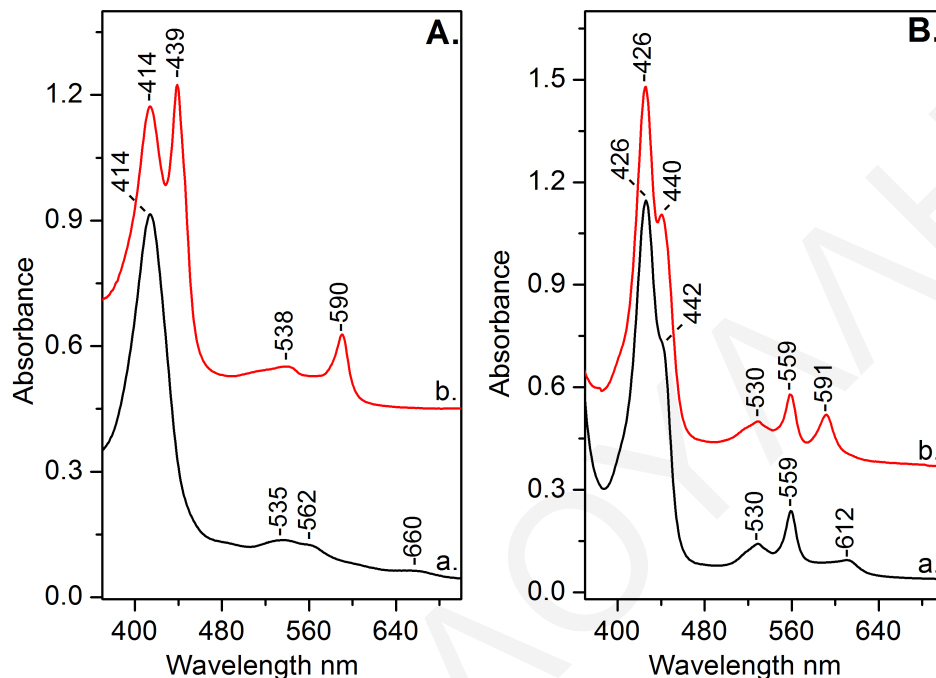
γωνία 170° . Τα γραμμικά σύμπλοκα έχουν την τάση να παρουσιάζουν δονήσεις τάσης σε μεγαλύτερες συχνότητες από τις δονήσεις κάμψης ενώ τα σύμπλοκα που αποκλίνουν από τη γραμμικότητα παρουσιάζουν το αντίθετο μοτίβο στις ανάλογες συχνότητες.¹⁵ Εκτός από τη γραμμικότητα του συμπλόκου, τις δονήσεις τάσης και κάμψης, επηρεάζει και η ισχύς του δεσμού μετάλλου-υποκαταστάτη. Ο Kim και οι συνεργάτες του μελέτησαν την ισχύ του δεσμού μετάλλου-υποκαταστάτη στο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ στην ba_3 οξειδάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο δεσμός Fe-C στο σύμπλοκο παρουσιάζει σχετικά υψηλή ισχύ και επιβεβαιώνει την εμφάνιση της δόνησης τάσης σε μεγαλύτερες συχνότητες από αυτές των δονήσεων κάμψης.¹⁵

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία FTIR οι αντιδράσεις της οξειδωμένης και ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- , όπως επίσης τα φάσματα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των σχηματιζόμενων συμπλόκων και συγκρίθηκαν με τα δονητικά χαρακτηριστικά των παραγώγων του CN^- που αναφέρθηκαν προηγουμένως για τις aa_3 και bo_3 οξειδάσες. Κατά την προσθήκη CN^- στην οξειδωμένη ba_3 οξειδάση παρατηρήθηκε ο σχηματισμός γέφυρας (αίμης $a_3 Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$), η οποία αντικαθίσταται από το φωτοευαίσθητο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$. Η φωτόλυση του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ οδηγεί στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $Cu_B^{2+}-CN^-$. Η ανίχνευση των μεταβατικών συμπλόκων αίμης $a_3 Fe^{2+}/Cu_B^{2+}-CN^-$ και αίμης $a_3 Fe^{2+}/Cu_B^+-CO$ επιτρέπει το χαρακτηρισμό του μεταλλικού κέντρου της ba_3 οξειδάσης στην ανηγμένη κατάσταση (Fe^{2+}/Cu_B^+) και στην κατάσταση μεικτού σθένους (Fe^{2+}/Cu_B^{2+}).

5.2 Αποτελέσματα

Το φάσμα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (Σχήμα 5.2.1, πλαίσιο A, φάσμα a) παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 414 nm και στη ζώνη Q στα 535, 562 και 660 nm. Στο φάσμα του συμπλόκου της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (Σχήμα 5.2.1, πλαίσιο A, φάσμα b) εμφανίζονται Soret μέγιστα στα 414 και 439 nm και στην περιοχή των Q-bands στα 538 και 590 nm. Η ανηγμένη, από διθειονικά, ba_3 οξειδάση (Σχήμα 5.2.1 πλαίσιο B, φάσμα a) εμφανίζει μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 426 nm, οφειλόμενο στην αίμη b^{2+} και στα 442 nm, οφειλόμενο στην αίμη a_3^{2+} . Επίσης, στη ζώνη Q παρουσιάζονται μέγιστα στα 530/559 nm για την αίμη b^{2+} και στα 612 nm για την αίμη a_3^{2+} . Στο σύμπλοκο της ανηγμένης ba_3-CN^- (Σχήμα 5.2.1, πλαίσιο B, φάσμα b) παρατηρούνται Soret μέγιστα στα 426 και 440 nm και στη ζώνη Q στα 530, 559 και 591 nm. Οι κορυφές που παρατηρούνται στα 439/590 nm στην αντίδραση της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- και οι κορυφές

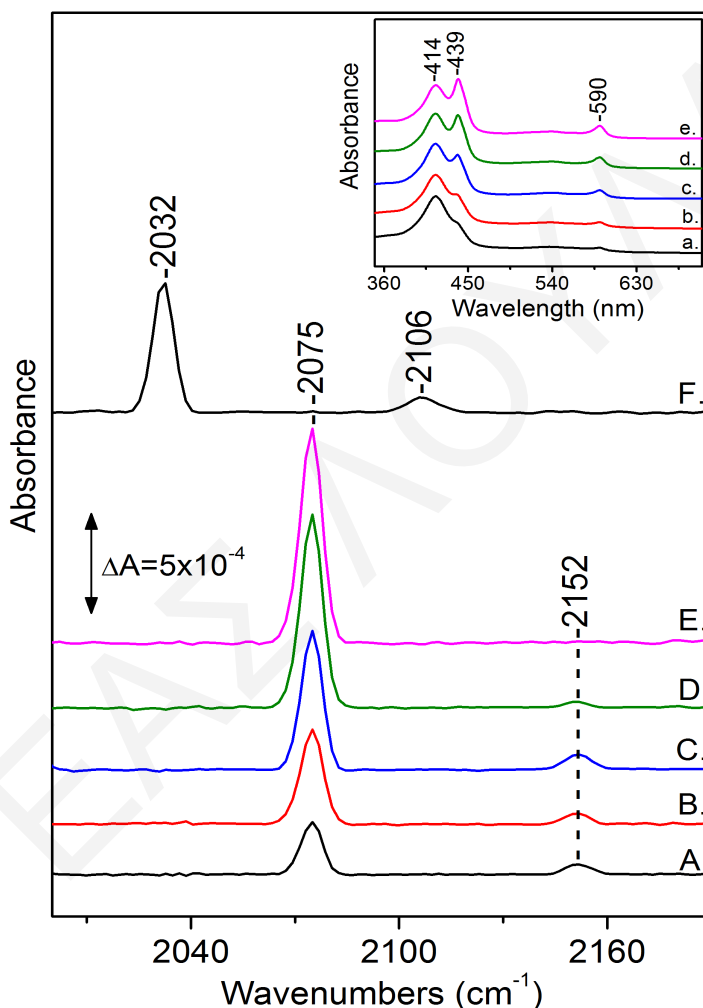
στα 440/591 nm στην αντίδραση της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- , υποδεικνύουν το σχηματισμό ενός χαμηλού σπιν εξα-υποκατεστημένης αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ συμπλόκου, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.¹⁷



Σχήμα 5.2.1: Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (πλαίσιο A, φάσμα a), της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (πλαίσιο A, φάσμα b), της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης (πλαίσιο B, φάσμα a) και της αντίδρασης της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (πλαίσιο B, φάσμα b) σε pH 7,5.

Στο σχήμα 5.2.2 παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR της χρονικής εξέλιξης της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- , σε χρόνους 2, 4, 8, 18 και 24 ωρών (φάσματα A-E) μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο, σε pH 7,5. Στο ένθετο απεικονίζονται τα αντίστοιχα φάσματα οπτικής απορρόφησης της αντίδρασης, ενώ το φάσμα F αναφέρεται στο φάσμα της αντίδρασης που λήφθηκε 8 ώρες μετά την προσθήκη $^{13}C^{14}N^-$. Οι δονήσεις στους 2152 και 2075 cm^{-1} που παρατηρούνται στα φάσματα A-E μετατοπίζονται στους 2106 και 2032 cm^{-1} , αντίστοιχα, στο φάσμα F, καθώς αυξάνεται η μάζα του CN^- . Η συχνότητα και η ισοτοπική μετατόπιση της δόνησης στους 2152 cm^{-1} είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στην πλειονότητα των αιμοχαλκοξειδασών και έχει αποδοθεί στο σχηματισμό δομής γέφυρας $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$ μεταξύ του κυανίου και των δύο μετάλλων του ενεργού κέντρου.²²⁻²⁴ Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει το σχηματισμό ανάλογης γέφυρας, αίμης $a_3 Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$ στην ba_3 οξειδάση. Η ένταση της δόνησης στους 2152 cm^{-1} είναι ασθενής, σε σύγκριση με την ένταση της δόνησης

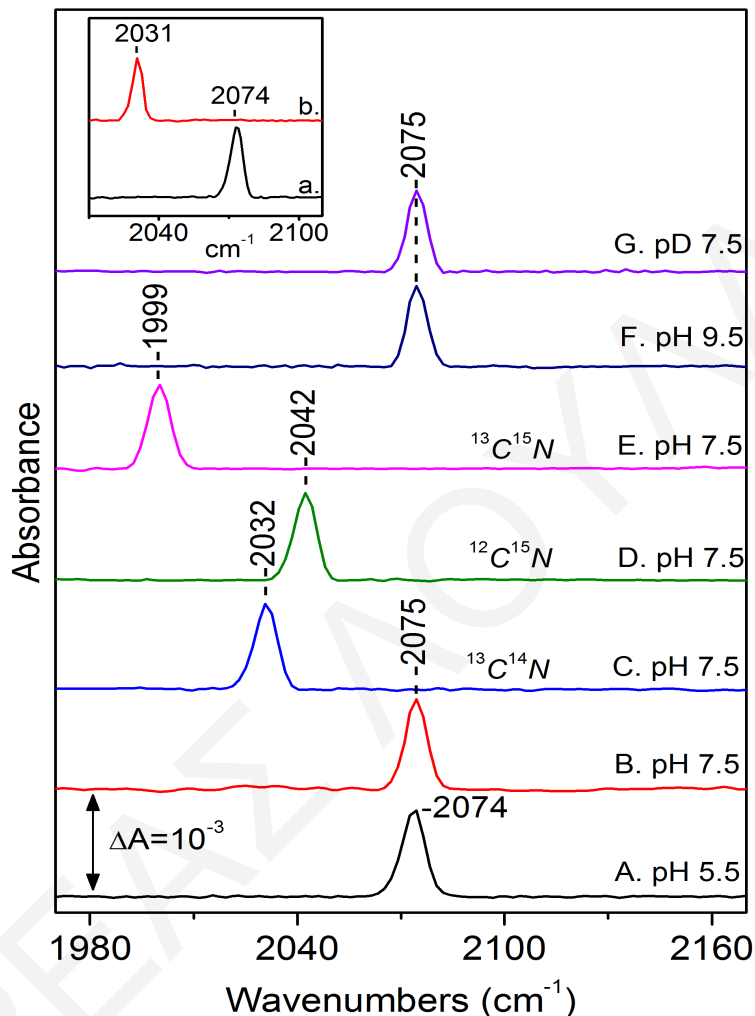
στους 2075 cm^{-1} , και εξαφανίζεται σε μεταγενέστερους χρόνους (φάσμα E). Με βάση τη συχνότητα και την ισοτοπική μετατόπιση, η δόνηση στους 2075 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N όταν το CN^- βρίσκεται δεσμευμένο στο Fe^{2+} της αίμης a_3 . Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες Raman που αναφέρουν τις δονήσεις $\nu(Fe^{2+}-CN)$ και $\delta(Fe^{2+}-C-N)$ στην αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το CN^- επισημαίνοντας ότι η αίμη a_3 ανάγεται κατά την αντίδραση.¹⁵⁻¹⁷



Σχήμα 5.2.2: Φάσματα FTIR της χρονικής εξέλιξης της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε χρόνους 2, 4, 8, 18 και 24 ωρών (φάσματα A-E) μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο, σε pH 7,5. Το φάσμα F αναφέρεται στην αντίδραση με το $^{13}C^{14}N^-$, 8 ώρες μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο. Το ένθετο απεικονίζει τα αντίστοιχα, σε χρόνους, φάσματα οπτικής απορρόφησης.

Τα φάσματα FTIR των αντιδράσεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- σε εύρος pH 5,5-9,5 και σε pD 7,5 παρουσιάζονται στο σχήμα 5.2.3. Το φάσμα A αναφέρεται στο παράγωγο $ba_3-^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 και εμφανίζει μια δόνηση στους 2074 cm^{-1} , η οποία μετατοπίζεται στους 2075 cm^{-1} σε pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pD 7,5

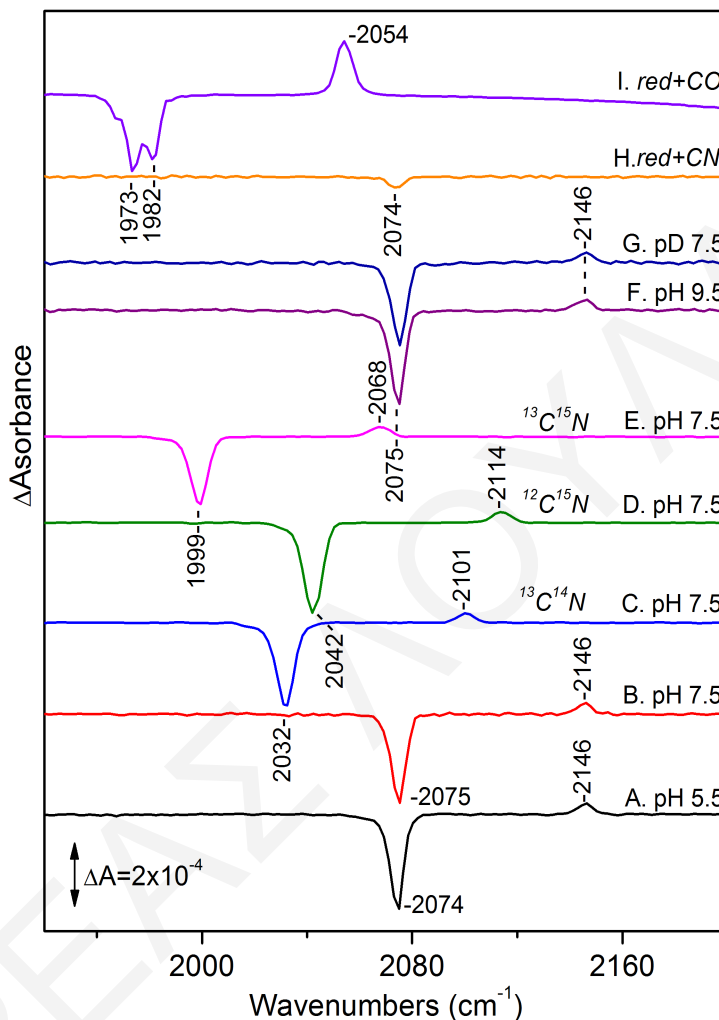
(φάσμα G). Επίσης, η δόνηση στους 2075 cm^{-1} μετατοπίζεται στους 2032 cm^{-1} στο φάσμα του παραγώγου με το $^{13}C^{14}N^-$ (φάσμα C), στους 2042 cm^{-1} στο παράγωγο με το $^{12}C^{15}N^-$ (φάσμα D) και στους 1999 cm^{-1} στο παράγωγο με το $^{13}C^{15}N^-$ (φάσμα E).



Σχήμα 5.2.3: Φάσματα FTIR της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 (φάσμα A), pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pD 7,5 (φάσμα G), που λήφθηκαν 24 ώρες μετά την προσθήκη CN^- στο οξειδωμένο ένζυμο. Τα παράγωγα με το $^{13}C^{14}N^-$, το $^{12}C^{15}N^-$ και το $^{13}C^{15}N^-$ φαίνονται στα φάσματα C, D και E αντίστοιχα. Το ένθετο παρουσιάζει τα φάσματα της αντίδρασης της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ (φάσμα a) και το $^{13}C^{14}N^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η συχνότητα της δόνησης και η ισοτοπική της μετατόπιση, επιτρέπει την απόδοσή της στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N στο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN$. Στο ένθετο παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των παραγώγων της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ (φάσμα a) και το $^{13}C^{14}N^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5, όπου εμφανίζεται η δόνηση $\nu(C-N)$ του παραγώγου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN$ στους 2074 cm^{-1} .

Στο σχήμα 5.2.4 απεικονίζονται τα φάσματα FTIR διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 (φάσμα A), pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pD 7,5 (φάσμα G).



Σχήμα 5.2.4: Φάσματα FTIR διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ σε pH 5,5 (φάσμα A), pH 7,5 (φάσμα B), pH 9,5 (φάσμα F) και pD 7,5 (φάσμα G). Τα φάσματα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων με το $^{13}C^{14}N^-$, το $^{12}C^{15}N^-$ και το $^{13}C^{15}N^-$ φαίνονται στα φάσματα C, D και E, αντίστοιχα. Τα φάσματα H και I παρουσιάζουν τα φάσματα διαφοράς φωτεινό-μείον-σκοτεινό των παραγώγων της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{12}C^{14}N^-$ και το CO, αντίστοιχα. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας για τη φωτόλυση των παραγώγων ήταν στα 447 nm και η ενέργεια της ακτινοβολίας στο δείγμα στα 30 mW.

Η αρνητική κορυφή στους 2074 cm^{-1} στο φάσμα A και στους 2075 cm^{-1} στα φάσματα B, F και G, υποδεικνύει ότι το CN^- αποδεσμεύεται από το Fe^{2+} της αίμης a_3 , ενώ η ταυτόχρονη εμφάνιση της θετικής κορυφής στους 2146 cm^{-1} αποδίδεται στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $Cu_B^{2+}-CN^-$. Η δόνηση στους 2146 cm^{-1} μετατοπίζεται στους 2101

cm^{-1} στο φωτοπαράγωγο $ba_3-^{13}C^{14}N^-$ (φάσμα C) και στους 2114 και 2068 cm^{-1} στα φωτοπαράγωγα $ba_3-^{12}C^{15}N^-$ (φάσμα D) και $ba_3-^{13}C^{15}N^-$ (φάσμα E), αντίστοιχα. Η συχνότητα της δόνησης στους 2146 cm^{-1} , υποδεικνύει ότι ο Cu_B παραμένει στην οξειδωμένη του μορφή, καθώς έχει αναφερθεί ότι οι δονήσεις $\nu(Cu_B^+C-N)$ εμφανίζονται στους 2037 και 2093 cm^{-1} .²² Το ποσοστό σχηματισμού του φωτοπροϊόντος ήταν 30% για τα παράγωγα της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- . Το φάσμα H αναφέρεται στο φάσμα FTIR διαφοράς φωτεινό-μειον-σκοτεινό του παραγώγου της ανηγμένης ba_3-CN^- . Η ένταση της αρνητικής κορυφής στους 2074 cm^{-1} είναι πολύ μικρή (5% σε σύγκριση με το αρχικό φάσμα), υποδηλώνοντας ότι το φωτοπαράγωγο σχηματίζεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό. Συγκριτικά, παρατίθεται το φάσμα FTIR διαφοράς φωτεινό-μειον-σκοτεινό του παραγώγου της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CO, το οποίο δείχνει τη μεταφορά του CO από το Fe^{2+} της αίμης a_3 (αρνητικές κορυφές στους 1973 και 1982 cm^{-1}) στο Cu_B^+ (θετική κορυφή στους 2054 cm^{-1}) κατά τη φωτόλυση του παραγώγου με ακτινοβολία στα 447 nm.

5.3 Συζήτηση

Η ba_3 οξειδάση παρουσιάζει σημαντικές διαφορές, όσον αφορά τις ιδιότητες δέσμευσης υποκαταστατών, σε σύγκριση με άλλες αιμοχαλκοξειδάσες. Παρόλ' αυτά, η συχνότητα της δόνησης στους 2152 cm^{-1} είναι παρόμοια με τις συχνότητες των δονήσεων που παρατηρήθηκαν στην πλειονότητα των αιμοχαλκοξειδάσων και έχουν αποδοθεί σε σχηματισμό δομής γέφυρας $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$, με βάση πειράματα ισοτοπικής αντικατάστασης.^{6, 22-24} Όπως φαίνεται στο σχήμα 5.2.3 (φάσματα A, B, F, G), η συχνότητα της δόνησης $\nu(CN)$ στο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ παραμένει ανεπηρέαστη σε εύρος pH 5,5-9,5 και με ανταλλαγή H/D, υποδηλώνοντας ότι οι ομάδες που βρίσκονται πλησίον του CN^- , δεν υφίστανται αλλαγές στην κατάσταση πρωτονίωσής τους κατά τις πειραματικές μας συνθήκες. Επίσης, παρατηρείται ότι η συχνότητα της δόνησης $\nu(CN)$ στο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ είναι 16 και 37 cm^{-1} μεγαλύτερη από τις παρατηρούμενες δονήσεις των αντίστοιχων συμπλόκων στις aa_3 και bo_3 οξειδάσες.^{22, 25} Όπως φαίνεται, υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συχνότητα των ισοτοπικά ευαίσθητων δονήσεων του CN^- στα σύμπλοκα των ανηγμένων αιμών a_3 και o_3 με το CN^- , παρόλο που οι συχνότητες των δονήσεων της δομής γέφυρας στο οξειδωμένο ένζυμο παρουσιάζουν σημαντική ομοιότητα. Ως εκ τούτου, προκύπτει ότι η περιοχή της αίμης και της ιστιδίνης στην πέμπτη θέση ένταξης (εγγύς ιστιδίνη) στην ba_3 οξειδάση, υφίσταται σημαντικές αλλαγές σε σύγκριση με τις αιμοχαλκοξειδάσες από θηλαστικά και από το βακτήριο *E.coli*, αλλαγές οι οποίες επηρεάζουν τη συχνότητα του δεσμευμένου CN^- .

Η εγγύς ιστιδίνη αποτελεί καλό σ και π δότη ηλεκτρονίων προς το Fe^{2+} της αίμης, ενώ η αίμη είναι π δέκτης. Το CN^- είναι ασθενής π δέκτης και καλός σ δότης. Η δονητική ανάλυση προβλέπει ότι, με εξασθένηση του τρανς-αξονικού δεσμού του υποκαταστάτη αναμένεται να προκληθεί ισχυρή σ συνεισφορά προς το CN^- μέσω τρανς επίδρασης. Αναλόγως, η ασθενής π συνεισφορά από την εγγύς ιστιδίνη θα τείνει να εξασθενήσει τον d_{π} δεσμό επαναφοράς του συμπλόκου $Fe-CN^-$, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της συχνότητας της δόνησης $\nu(CN)$.^{7, 15-16} Επομένως, οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση της δόνησης του δεσμευμένου CN^- στην ba_3 οξειδάση σε μεγαλύτερες συχνότητες σε σύγκριση με τις ανάλογες δονήσεις στις aa_3 και bo_3 οξειδάσες είναι: α) οι αλληλεπιδράσεις της εγγύς ιστιδίνης με το περιβάλλον της πρωτεΐνης, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά τη βασικότητα της ιστιδίνης και β) η απομάκρυνση ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τις φορμυλομάδες της αίμης a_3 , καθώς επίσης και η κατάσταση πρωτονίωσης των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 κατά τη δέσμευση του υποκαταστάτη.^{15-16, 32-33} Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες, μπορούν να επηρεάσουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του Fe της αίμης, κάνοντάς τον φτωχότερο ηλεκτρονιακά και ως εκ τούτου πιο ευαίσθητο στο να αυτοαναχθεί από το CN^- .¹⁶ Επομένως, η αρχικά σχηματιζόμενη δομή γέφυρας $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$, μετατρέπεται στο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ λόγω των ιδιοτήτων του Fe της αίμης που αναφέρθηκαν πιο πάνω, με το Cu_B^{2+} να μη συμμετέχει πλέον στην αντίδραση. Συγκρίνοντας τη συχνότητα της δόνησης $\nu(CN)$ του συμπλόκου από την αντίδραση με το οξειδωμένο ένζυμο ($a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^{2+}$) (Σχήμα 5.2.3, φάσμα Β) με τη συχνότητα της δόνησης του συμπλόκου από την αντίδραση με το ανηγμένο ένζυμο ($a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^+$) (Σχήμα 5.2.3, φάσμα b, ένθετο) παρατηρείται ότι είναι η ίδια. Αυτό δείχνει ότι η οξειδωτική κατάσταση του Cu_B δεν επηρεάζει την ισχύ του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$, καθώς επίσης ότι η επίδραση της εγγύς ιστιδίνης είναι η ίδια, ανεξάρτητα από τον τρόπο σχηματισμού του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$.

Στον πίνακα 5.3.1 συνοψίζονται οι συχνότητες των δονήσεων του δεσμευμένου CN^- στο Cu^+ και Cu^{2+} στις αιμοχαλκοξειδάσες, στις αναγωγάσες των νιτροδών που περιέχουν Cu στο ενεργό τους κέντρο ($CuNiR$) και σε μοντέλα χαλκού.^{22, 34-35} Μια προσεκτική αξιολόγηση των συχνοτήτων της δόνησης $\nu(CN)$ προτείνει ότι, η δόνηση που παρατηρείται στους 2146 cm^{-1} οφείλεται στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $Cu_B^{2+}-CN^-$. Οι παρατηρούμενες δονήσεις για το σύμπλοκο $Cu_B^+-CN^-$ στις αιμοχαλκοξειδάσες, τις αναγωγάσες των νιτροδών και σε μοντέλα χαλκού κυμαίνονται μεταξύ των 2037 με 2093 cm^{-1} .^{22, 34} Επίσης, τα φάσματα υπερύθρου του στερεού κυανιούχου χαλκού ($CuCN$) παρουσιάζουν τη δόνηση $\nu(CN)$ στους 2170 cm^{-1} .³⁵

Πίνακας 5.3.1: Συχνότητες των δονήσεων τάσης (cm^{-1}) του δεσμού C-N στα σύμπλοκα Cu^+-CN^- και $Cu^{2+}-CN^-$.

	$^{12}C^{14}N^-$	$^{12}C^{15}N^-$	$^{13}C^{14}N^-$	$^{13}C^{15}N^-$
Συχνότητες δονήσεων τάσης C-N των συμπλόκων $Cu^{1+}-CN^-$				
Βόεια aa_3 οξειδάση ²²	2093	2060	2049	2016
	2037	2006	1995	1964
Αναγωγή των νιτρωδών (<i>Alcaligenes faecalis</i>) ^a	2065			
$(Et_4N)[Cu(HB(Me_2pz)_3(CN))]^{34}$	2077			
Συχνότητες δονήσεων τάσης C-N των συμπλόκων $Cu^{2+}-CN^-$				
Υπεροξειδική δισμουτάση Cu/Zn ³⁵	2137			
$[Cu(Npy_3)(CN)]^{34}$	2142			
ba_3 οξειδάση (<i>T. Thermophilus</i>) ^b	2146	2114	2101	2068
^a Pinakoulaki et al, αδημοσίευτα αποτελέσματα. ^b Παρούσα εργασία				

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι, όταν το CN^- δεσμεύεται στο Cu μέσω του ατόμου του άνθρακα, επηρεάζεται από τους υποκαταστάτες ιστιδίνης του Cu και έτσι μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για την κατάσταση υποκατάστασης του Cu. Η σχέση μεταξύ της συχνότητας της δόνησης $\nu(CN)$ και του περιβάλλοντος υποκατάστασης του Cu καθορίζεται από τον τρόπο δέσμευσης του CN^- στο Cu. Ο δεσμός Cu-C σχηματίζεται από την παροχή δύο ηλεκτρονίων που εντοπίζονται στο άτομο του άνθρακα. Καθώς το CN^- είναι καλός σ δότης και ασθενής π δέκτης, τα δύο ηλεκτρόνια που είναι ασθενώς αντιδεσμικά στον ελεύθερο υποκαταστάτη, μετατρέπονται σε δεσμικά κατά τη δέσμευση του στο Cu. Συνεπώς, η συχνότητα δόνησης του CN^- αναμένεται να αυξηθεί κατά τη δέσμευση του στο Cu_B^{2+} . Η συχνότητα θα αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η βασικότητα ή η σ συνεισφορά από τους υποκαταστάτες ιστιδίνης του Cu_B .³⁴ Όπως παρατηρείται, η συχνότητα του δεσμευμένου CN^- στο Cu_B^{2+} εμφανίζεται στους 2146 cm^{-1} , που είναι 66 cm^{-1} υψηλότερη από αυτή του ελεύθερου CN^- . Η κορυφή στους 2146 cm^{-1} είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην υπεροξειδική δισμουτάση Cu/Zn στους 2137 cm^{-1} και στο μοντέλο χαλκού $[Cu(Npy_3)(CN)]$ στους 2142 cm^{-1} , το οποίο μιμείται τις αλληλεπιδράσεις του CN^- με το Cu στις αιμοχαλκοξειδάσες.³⁴⁻³⁵

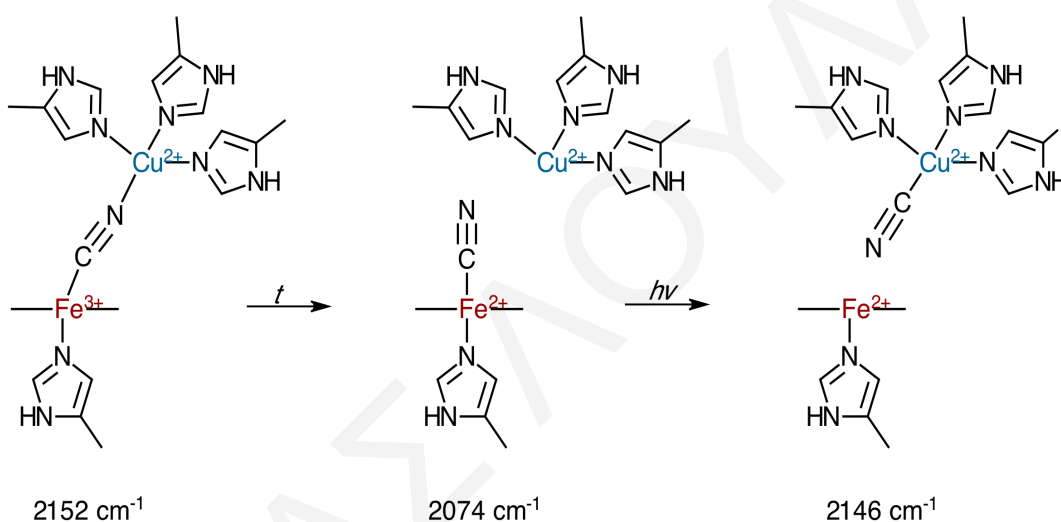
Με βάση τη συχνότητα της δόνησης $\nu(CN)$ στο σύμπλοκο $Cu_B^{2+}-CN^-$ μπορούν να ληφθούν δομικές πληροφορίες για τους υποκαταστάτες ιστιδίνης του Cu_B όταν ο Cu_B βρίσκεται στην οξειδωμένη του μορφή (Σχήμα 8.2.4, φάσματα A-G), όπως επίσης και όταν βρίσκεται στην ανηγμένη του μορφή από το σύμπλοκο Cu_B^+-CO με βάση τη συχνότητα της δόνησης $\nu(CO)$ (Σχήμα 8.2.4, φάσμα H). Εάν πραγματοποιούνταν αλλαγή στην κατάσταση

πρωτονίωσης ενός από τους υποκαταστάτες ιστιδίνης του Cu_B , τότε θα επηρεάζονταν η βασικότητα τους και ως εκ τούτου η συχνότητα δόνησης του δεσμευμένου CN^- . Ωστόσο, η συχνότητα δόνησης του CN^- παραμένει ανεπηρέαστη μετά από ανταλλαγή H_2O/D_2O και σε εύρος pH 5,5-9,5, υποδεικνύοντας ότι το περιβάλλον των υποκαταστατών ιστιδίνης και του Cu_B είναι άκαμπτο και δεν υπόκειται σε δομικές μεταβολές που να σχετίζονται με αλλαγές στην κατάσταση πρωτονίωσης των υποκαταστατών ιστιδίνης του Cu_B^{2+} . Παρόμοια συμπεράσματα εξήχθησαν και στην περίπτωση του συμπλόκου Cu_B^+-CO .³⁻⁴ Ως εκ τούτου, το περιβάλλον του Cu_B και των υποκαταστατών ιστιδίνης είναι άκαμπτο και στις δύο οξειδωτικές καταστάσεις του μετάλλου.

Η μελέτη της δυναμικής δέσμευσης και αποδέσμευσης του υποκαταστάτη στις αιμοχαλκοξειδάσες, μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τη δραστηριότητα του ενεργού κέντρου, καθώς επίσης και πληροφορίες για το πως ελέγχει η πρωτεΐνη τη δραστηριότητα και την πορεία που ακολουθεί ο υποκαταστάτης. Η πορεία που ακολουθεί ο υποκαταστάτης στις αιμοχαλκοξειδάσες μπορεί να μελετηθεί με τη χρήση υποκαταστατών όπως CO , O_2 , NO και CN^- και μετά από φωτόλυση του δεσμού Fe -υποκαταστάτη. Μετά τη φωτόλυση, ο υποκαταστάτης είτε θα επαναδεσμευτεί γρήγορα στο Fe , είτε θα δεσμευτεί μεταβατικά στο Cu_B και στη συνέχεια θα επαναδεσμευτεί πίσω στο Fe . Η αργή επαναδέσμευση εξαρτάται από τη δραστηριότητα του υποκαταστάτη με το Fe της αίμης και την ικανότητά του να δεσμεύεται στο Cu_B ή να διαχέεται μακριά από το διμεταλλικό κέντρο. Ο ρόλος του Cu_B μετά τη φωτόλυση έχει μελετηθεί κατά τη δέσμευση του CO στην ba_3 οξειδάση.¹⁻⁴ Τα δεδομένα που λήφθηκαν από τη μελέτη της θερμοδυναμικής και της κινητικής δέσμευσης/επαναδέσμευσης του CO δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική χημική διαφορά μεταξύ της ba_3 οξειδάσης και των υπόλοιπων αιμοχαλκοξειδασών.²⁹⁻³⁰

Στα φάσματα FTIR φωτόλυσης που παρουσιάζονται στο σχήμα 5.2.4 (φάσματα A-G) φαίνονται οι διαφορές μεταξύ του μεικτού σθένους $a_3 Fe^{2+}/Cu_B^{2+}$ ενεργού κέντρου όταν το CN^- βρίσκεται δεσμευμένο στο Fe της αίμης και του μεικτού σθένους $a_3 Fe^{2+}/Cu_B^{2+}$ ενεργού κέντρου όταν το CN^- βρίσκεται δεσμευμένο στο Cu_B^{2+} . Από αυτά προκύπτει ότι δεν υπάρχει οποιοδήποτε εμπόδιο που να επηρεάζει τη μεταφορά του CN^- από το Fe^{2+} της αίμης a_3 στο Cu_B^{2+} . Το αντίστοιχο φάσμα FTIR φωτόλυσης του παραγώγου της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- (φάσμα H), δείχνει τη διαφορά που υπάρχει μεταξύ του ανηγμένου ενζύμου, όταν το CN^- είναι δεσμευμένο στο Fe^{2+} της αίμης και του ανηγμένου ενζύμου όταν το CN^- δεν είναι δεσμευμένο. Επομένως, η μεταφορά του CN^- από το ένα μέταλλο στο άλλο (τα δύο μέταλλα απέχουν μεταξύ τους 4-5 Å) πραγματοποιείται μόνο

στην περίπτωση που το διμεταλλικό κέντρο βρίσκεται στην κατάσταση μεικτού σθένους. Η φωτόλυση του παραγώγου του CN^- στο μεικτού σθένους ένζυμο $a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^{2+}$ διαφέρει από αυτή στο παράγωγο του ανηγμένου ενζύμου $a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^+$ και η επαναδέσμευση του CN^- πίσω στο Fe της αίμης είναι ουσιαστικά πιο αργή στην πρώτη περίπτωση. Η διαφορετική συγγένεια που παρουσιάζει ο Cu_B^{2+} έναντι του Cu_B^+ ως προς το CN^- μπορεί να προταθεί ως το στάδιο που περιορίζει τη γρήγορη επαναδέσμευση του CN^- . Στο σχήμα 5.3.1 παρουσιάζεται σχηματική απεικόνιση των δομών του δεσμευμένου με CN^- ενεργού κέντρου και του φωτοπροϊόντος. Η παρατηρούμενη φωτοχημική δραστηκότητα προκαλεί έκπληξη και δεν ήταν κάτι που αναμενόταν.



Σχήμα 5.3.1: Σχηματική απεικόνιση των δομών του δεσμευμένου CN^- στην ba_3 οξειδάση και του προϊόντος φωτόλυσης.

Συνοψίζοντας, κατά την προσθήκη CN^- στην οξειδωμένη ba_3 οξειδάση, σχηματίζεται γέφυρα αίμης $a_3 Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$ μεταξύ του κυανίου και των δύο μετάλλων του ενεργού κέντρου, η οποία στη συνέχεια αντικαθίσταται από το φωτοευαίσθητο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$. Ο σχηματισμός γέφυρας πριν το σχηματισμό του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$, στην ba_3 οξειδάση παρατηρήθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά, καθώς προηγούμενες μελέτες απέτυχαν να το ανιχνεύσουν. Φωτόλυση του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ οδηγεί στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $Cu_B^{2+}-CN^-$. Το ενεργό κέντρο δεσμεύει μόνο ένα μόριο CN^- και ο Cu_B παραμένει στην οξειδωμένη του μορφή κατά το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $a_3 Fe^{2+}/Cu_B^{2+}-CN^-$ όπου το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε κατάσταση μεικτού σθένους. Η παρατήρηση των συμπλόκων αίμης $a_3 Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$, αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^{2+}$, αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-/Cu_B^+$ και του μεταβατικού συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{3+}/Cu_B^{2+}-CN^-$ συγκροτούν τη βάση για την κατανόηση του

περιβάλλοντος του Cu_B και του μηχανισμού των αντιδράσεων φωτοδιάσπασης στην ba_3 οξειδάση.

5.4 Βιβλιογραφία

1. Koutsoupakis, C.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Ligand Binding in a Docking Site of Cytochrome *c* Oxidase: A Time-Resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared Study. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14728-14732.
2. Koutsoupakis, C.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Probing the Q-proton pathway of ba_3 -cytochrome *c* oxidase by time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophysical journal* **2004**, *86* (4), 2438-2444.
3. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Observation of the Equilibrium Cu_B -CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme a_3 Propionates in Cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*: FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) AND TIME-RESOLVED STEP-SCAN FTIR STUDIES. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (36), 32860-32866.
4. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Oxygen-linked Equilibrium Cu_B -CO Species in Cytochrome ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus*: IMPLICATIONS FOR AN OXYGEN CHANNEL AT THE Cu_B SITE. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (17), 14893-14896.
5. Pinakoulaki, E.; Ohta, T.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of the His-Heme Fe^{2+} -NO Species in the Reduction of NO to N_2O by ba_3 -Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (43), 15161-15167.
6. Pinakoulaki, E.; Vamvouka, M.; Varotsis, C., The Active Site Structure of Heme $a_3^{3+}C\equiv NCu_B^{2+}$ of Cytochrome aa_3 Oxidase as Revealed from Resonance Raman Scattering. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (36), 9865-9868.
7. Pinakoulaki, E.; Vamvouka, M.; Varotsis, C., Resonance Raman Detection of the Fe^{2+} -C-N Modes in Heme-Copper Oxidases: A Probe of the Active Site. *Inorganic Chemistry* **2004**, *43* (16), 4907-4910.
8. Pinakoulaki, E.; Varotsis, C., Resonance Raman Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase and cbb_3 Heme-Copper Oxidase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (6), 1851-1857.

9. Varotsis, C.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The Structure of the Hyponitrite Species in a Heme Fe-Cu Binuclear Center. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (13), 2210-2214.
10. Ohta, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Characterization of a Bimetallic-Bridging Intermediate in the Reduction of NO to N_2O : a Density Functional Theory Study. *Inorganic Chemistry* **2006**, *45* (8), 3187-3190.
11. Koutsoupakis, C.; Kolaj-Robin, O.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Probing Protonation/Deprotonation of Tyrosine Residues in Cytochrome ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus* by Time-resolved Step-scan Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (35), 30600-30605.
12. Hayashi, T.; Lin, I. J.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Moënné-Loccoz, P., Fourier Transform Infrared Characterization of a Cu_B -Nitrosyl Complex in Cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: Relevance to NO Reductase Activity in Heme-Copper Terminal Oxidases. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (48), 14952-14958.
13. Porrini, M.; Daskalakis, V.; Farantos, S. C.; Varotsis, C., Heme Cavity Dynamics of Photodissociated CO from ba_3 -Cytochrome c Oxidase: The Role of Ring-D Propionate. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (35), 12129-12135.
14. Pilet, E.; Nitschke, W.; Rappaport, F.; Soulimane, T.; Lambry, J.-C.; Liebl, U.; Vos, M. H., NO Binding and Dynamics in Reduced Heme-Copper Oxidases aa_3 from *Paracoccus denitrificans* and ba_3 from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* **2004**, *43* (44), 14118-14127.
15. Kim, Y.; Babcock, G. T.; Surerus, K. K.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H.; Oertling, W. A., Cyanide binding and active site structure in heme-copper oxidases: Normal coordinate analysis of iron-cyanide vibrations of $a_3^{2+}CN^-$ complexes of cytochromes ba_3 and aa_3 . *Biospectroscopy* **1998**, *4* (1), 1-15.
16. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdóttir, O.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H., Spectroscopic characterization of cytochrome ba_3 , a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the a_3/Cu_B site to that of bovine cytochrome aa_3 . *Biochemistry* **1994**, *33* (10), 3128-3141.
17. Surerus, K. K.; Oertling, W. A.; Fan, C.; Gurbiel, R. J.; Einarsdóttir, O.; Antholine, W. E.; Dyer, R. B.; Hoffman, B. M.; Woodruff, W. H.; Fee, J. A., Reaction of cyanide with cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the $Fe(II)_{a_3}\text{-}CN\cdot Cu(II)_B\text{-}CN$ complex suggests four ^{14}N atoms are coordinated to Cu_B .

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1992**, *89* (8), 3195-3199.

18. Luna, V. M.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Stout, C. D., Crystallographic Studies of Xe and Kr Binding within the Large Internal Cavity of Cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: Structural Analysis and Role of Oxygen Transport Channels in the Heme–Cu Oxidases. *Biochemistry* **2008**, *47* (16), 4657-4665.

19. Kalinovich, A. V.; Azarkina, N. V.; Vygodina, T. V.; Soulimane, T.; Konstantinov, A. A., Peculiarities of cyanide binding to the ba_3 -type cytochrome oxidase from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Biochemistry (Moscow)* **2010**, *75* (3), 342-352.

20. Nicholls, P.; Soulimane, T., The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome ba_3 differs from classical aa_3 in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2004**, *1655*, 381-387.

21. Hirota, S.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T., Observation of Multiple CN-Isotope-Sensitive Raman Bands for CN- Adducts of Hemoglobin, Myoglobin, and Cytochrome c Oxidase: Evidence for Vibrational Coupling between the Fe-C-N Bending and Porphyrin In-Plane Modes. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100* (37), 15274-15279.

22. Tsubaki, M.; Yoshikawa, S., Fourier-transform infrared study of cyanide binding to the Fe_{a_3} - Cu_B binuclear site of bovine heart cytochrome c oxidase: implication of the redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry* **1993**, *32* (1), 164-173.

23. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S., Infrared evidence of cyanide binding to iron and copper sites in bovine heart cytochrome c oxidase. Implications regarding oxygen reduction. *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265* (14), 7945-58.

24. Yoshikawa, S.; Mochizuki, M.; Zhao, X.-J.; Caughey, W. S., Effects of Overall Oxidation State on Infrared Spectra of Heme a_3 Cyanide in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase: EVIDENCE OF NOVEL MECHANISTIC ROLES FOR Cu_B . *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270* (9), 4270-4279.

25. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H.; Sato-Watanabe, M.; Anraku, Y., Infrared and EPR Studies on Cyanide Binding to the Heme-Copper Binuclear Center of Cytochrome bo -type Ubiquinol Oxidase from *Escherichia coli*: RELEASE OF A Cu-CYANO COMPLEX IN THE PARTIALLY REDUCED STATE. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (8), 4017-4022.

26. Rich, P. R.; Breton, J., FTIR Studies of the CO and Cyanide Adducts of Fully Reduced Bovine Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry* **2001**, *40* (21), 6441-6449.
27. Parul, D.; Palmer, G.; Fabian, M., Ligand Trapping by Cytochrome *c* Oxidase: IMPLICATIONS FOR GATING AT THE CATALYTIC CENTER. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (7), 4536-4543.
28. Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sarti, P.; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T., The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (26), 14718-14723.
29. Goldbeck, R. A.; Einarsdottir, O.; Dawes, T. D.; O'Connor, D. B.; Surerus, K. K.; Fee, J. A.; Kliger, D. S., Magnetic circular dichroism study of cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: spectral contributions from cytochromes *b* and a_3 and nanosecond spectroscopy of carbon monoxide photodissociation intermediates. *Biochemistry* **1992**, *31* (39), 9376-9387.
30. Giuffrè, A.; Forte, E.; Antonini, G.; D'Itri, E.; Brunori, M.; Soulimane, T.; Buse, G., Kinetic Properties of ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus*: Effect of Temperature. *Biochemistry* **1999**, *38* (3), 1057-1065.
31. Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Than, M. E., Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO Journal* **2000**, *19* (8), 1766-1776.
32. Xu, C.; Ibrahim, M.; Spiro, T. G., DFT analysis of axial and equatorial effects on heme-CO vibrational modes: applications to CooA and H-NOX heme sensor proteins. *Biochemistry* **2008**, *47* (8), 2379-2387.
33. Pavlou, A.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., Evidence for the Presence of Two Conformations of the Heme a_3 -Cu_B Pocket of Cytochrome caa_3 from *Thermus thermophilus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115* (39), 11455-11461.
34. Lim, B. S.; Holm, R. H., Molecular Heme-Cyanide-Copper Bridged Assemblies: Linkage Isomerism, Trends in ν_{CN} Values, and Relation to the Heme- a_3 /Cu_B Site in Cyanide-Inhibited Heme-Copper Oxidases. *Inorganic Chemistry* **1998**, *37* (19), 4898-4908.
35. Han, J.; Blackburn, N. J.; Loehr, T. M., Identification of the cyanide stretching frequency in the cyano derivative of copper/zinc-superoxide dismutase by IR and Raman spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31* (15), 3223-3229.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Μελέτη Δέσμευσης N_3^- στην ba_3 Οξειδάση με Φασματοσκοπία FTIR και
Συντονισμού Raman

6.1 Εισαγωγή

Η κατανόηση του τρόπου λειτουργίας του ενεργού κέντρου των αιμοχαλκοξειδασών επιτυγχάνεται με τη μελέτη της δέσμευσης εναλλακτικών εξωγενών υποκαταστατών στο ενεργό τους κέντρο. Ένας εκ των υποκαταστατών που ενδείκνυται για τέτοιου είδους μελέτες είναι το αζίδιο (N_3^-), το οποίο είναι ένας ικανός αναστολέας των αιμοχαλκοξειδασών. Η αναστολή που προκαλεί, θεωρείται ότι οφείλεται στην ικανότητα του να δεσμεύεται στα μέταλλα του ενεργού κέντρου.¹⁻⁸ Παρόλ' αυτά η δέσμευση του N_3^- παρουσιάζει διαφορετική επίδραση στο ενεργό κέντρο σε σύγκριση με τη δέσμευση του CO και του CN^- . Συγκεκριμένα, το N_3^- έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των δομικών/λειτουργικών ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου των αιμοχαλκοξειδασών στην οξειδωμένη του μορφή σε αντίθεση με το CO, το οποίο χρησιμοποιείται για τη μελέτη του ενεργού κέντρου στην ανηγμένη του μορφή.

Η δέσμευση του N_3^- μελετήθηκε σε διαφορετικές αιμοπρωτεΐνες, όπως την αιμοσφαιρίνη, τη μυοσφαιρίνη⁹⁻¹¹ και τις οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* από θηλαστικά¹⁻⁴ και βακτήρια.⁵⁻⁸ Μελέτες δέσμευσης του N_3^- με τη φασματοσκοπία FTIR, στην αιμοσφαιρίνη και στη μυοσφαιρίνη έδειξαν ότι το N_3^- δεσμεύεται στο Fe της αίμης, όταν ο Fe βρίσκεται στην οξειδωμένη του μορφή, με δύο τρόπους, ομοιοπολικά και με ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Οι δύο αυτοί τρόποι δέσμευσης εμφανίζονται ως δύο ασύμμετρες δονήσεις τάσης με συχνότητες στους 2047 και 2025 cm^{-1} για την αιμοσφαιρίνη και στους 2045 και 2023 cm^{-1} για τη μυοσφαιρίνη. Η δόνηση με τη μικρότερη συχνότητα οφείλεται στο παράγωγο όπου το N_3^- δεσμεύεται ομοιοπολικά και σχηματίζει χαμηλού σπιν σύμπλοκο, ενώ η δόνηση με τη μεγαλύτερη συχνότητα δόνησης οφείλεται στο παράγωγο όπου το N_3^- δεσμεύεται μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων και επομένως το σύμπλοκο είναι υψηλού σπιν.⁹⁻¹⁰ Επίσης, το χαμηλού σπιν σύμπλοκο χαρακτηρίζεται, με βάση τη φασματοσκοπία RR, από τις κορυφές στους 413 και 570 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στη δόνηση τάσης του δεσμού Fe- N_3^- και στην δόνηση κάμψης του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στο Fe^{3+} της αίμης, αντίστοιχα.¹¹

Στην περίπτωση των αιμοχαλκοξειδασών παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση του N_3^- στην οξειδωμένη μορφή της βόειας και ba_3 οξειδάσης προκαλεί ασθενή αλλαγή στο φάσμα οπτικής απορρόφησης.^{1,7} Περαιτέρω, στα φάσματα FTIR του παραγώγου της οξειδωμένης βόειας οξειδάσης με το N_3^- , εμφανίζονται δύο κορυφές στους 2051 και 2041 cm^{-1} . Η δόνηση στους 2051 cm^{-1} έχει μεγάλη ένταση και μετατοπίζεται στους 2039 cm^{-1} με χρήση $^{15}N^{14}N^{14}N^-$ ενώ η δόνηση στους 2041 cm^{-1} έχει μικρή ένταση και διαχωρίζεται στους 2035 και 2024 cm^{-1} με τη χρήση ισοτόπου.¹⁻² Το γεγονός ότι η μια από τις δύο δονήσεις

διαχωρίζεται μετά από ισοτοπική αντικατάσταση δηλώνει ότι προέρχονται από διαφορετικό τρόπο δέσμευσης. Η δόνηση στους 2041 cm^{-1} αποδόθηκε στο σχηματισμό γέφυρας μεταξύ του αζιδίου και των δύο μετάλλων του ενεργού κέντρου, $Fe^{3+}-N=N=N-Cu_B^{2+}$. Η ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού N-N είναι διαφορετική, αφού οι δεσμοί Cu_B-N και $Fe-N$ έχουν διαφορετική ισχύ και έτσι παρατηρείται ο διαχωρισμός της δόνησης μετά από ισοτοπική αντικατάσταση. Η απόδοση του σχηματισμού γέφυρας ενισχύθηκε περαιτέρω, με την προσθήκη CN^- στο σύμπλοκο της οξειδάσης με το N_3^- . Παρατηρήθηκε η εξαφάνιση της δόνησης στους 2041 cm^{-1} και ο σχηματισμός γέφυρας $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$ ($\nu(CN) = 2151\text{ cm}^{-1}$), οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το CN^- εκτόπισε το N_3^- .² Επιπλέον, ο σχηματισμός γέφυρας ($Fe^{3+}-N_3-Cu_B^{2+}$) επιβεβαιώθηκε πλήρως με την αποκάλυψη της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου στη βόεια οξειδάση.⁴ Η δόνηση στους 2051 cm^{-1} , καθώς δεν παρουσιάζει διαχωρισμό μετά από ισοτοπική αντικατάσταση και δεν επηρεάζεται από την προσθήκη CN^- , προτάθηκε ότι οφείλεται σε δέσμευση του N_3^- σε περιοχή της πρωτεΐνης κοντά στο ενεργό κέντρο.¹⁻² Από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου εξακριβώθηκε ότι το N_3^- σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Asn422 και Tyr379 και σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις οφείλεται η εμφάνιση της δόνησης στους 2051 cm^{-1} , οι οποίες πιθανόν είναι πολύ ασθενείς και γι' αυτό δεν παρουσιάζεται διαχωρισμός της δόνησης μετά από ισοτοπική αντικατάσταση.⁴

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην aa_3 οξειδάση από το βακτήριο *P. denitrificans*. Τα FTIR φάσματα των παραγώγων N_3^- χαρακτηρίζονται από δύο κορυφές στους 2056 cm^{-1} (με μεγάλη ένταση) και 2038 cm^{-1} (με μικρή ένταση) εκ των οποίων η 2056 διαχωρίζεται μετά από ισοτοπική αντικατάσταση. Σε αντίθεση με τη βόεια οξειδάση, οι δύο κορυφές αποδόθηκαν στη δόνηση $\nu(N_3)^{asym}$ όταν το N_3^- βρίσκεται δεσμευμένο στα δύο μέταλλα του ενεργού κέντρου υπό μορφή γέφυρας, $Fe^{3+}-N_3-Cu_B^{2+}$ και οφείλονται στο ότι υπάρχουν δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του ενζύμου, οι οποίες προκύπτουν λόγω αλλαγής της θέσης του Cu_B και στις οποίες δεσμεύεται το N_3^- . Επίσης, τα παράγωγα μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία συντονισμού Raman και χαρακτηρίζονται από την κορυφή στους 417 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης $\nu(Fe-N_3-Cu_B)$.⁸

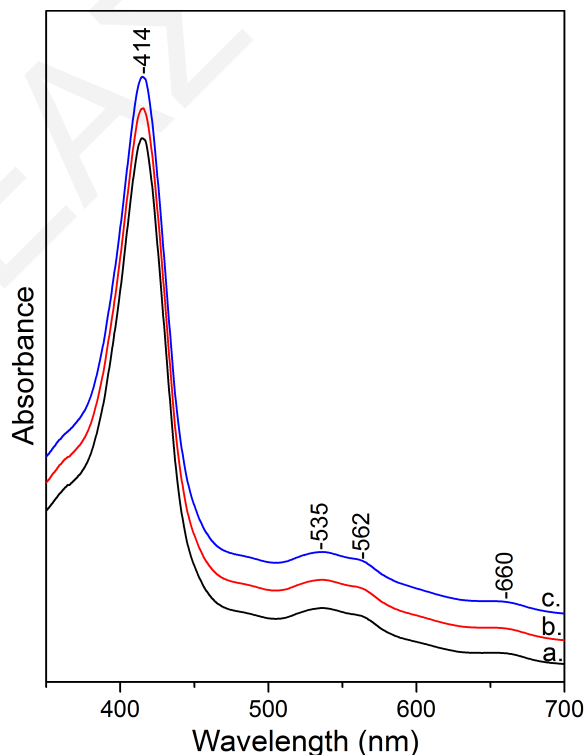
Στην περίπτωση της bo_3 οξειδάσης από το βακτήριο *E.coli*, τα παράγωγα N_3^- χαρακτηρίζονται από την κορυφή στους 419 cm^{-1} με τη φασματοσκοπία Raman και από τις κορυφές στους 2040 και 2061 cm^{-1} με τη φασματοσκοπία FTIR. Η κορυφή στους 419 cm^{-1} αποδόθηκε στη δόνηση $\nu(Fe-N_3-Cu_B)$ και οι κορυφές στους 2040 και 2061 cm^{-1} στη δόνηση $\nu(N_3)^{asym}$ όταν το N_3^- βρίσκεται δεσμευμένο στα δύο μέταλλα του ενεργού κέντρου υπό μορφή γέφυρας, $Fe^{3+}-N_3-Cu_B^{2+}$. Αξιοσημείωτο είναι ότι η κορυφή στους 2040 cm^{-1}

εχεί μεγάλη ένταση ενώ η δόνηση στους 2061 cm^{-1} μικρή σε αντίθεση με τις εντάσεις των κορυφών στη βόεια και στην aa_3 οξειδάση από το βακτήριο *P. denitrificans* όπου παρατηρείται το αντίστροφο. Ακόμα μια διαφορά είναι ότι η κορυφή στους 2061 cm^{-1} δεν παρουσιάζει διαχωρισμό μετά από ισοτοπική αντικατάσταση επισημαίνοντας ότι η ισχύς των δεσμών Fe-N και Cu_B-N είναι η ίδια στην bo_3 οξειδάση.⁷

Προκειμένου να συγκριθεί η δέσμευση του N_3^- στην ba_3 οξειδάση με τις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- με τις φασματοσκοπίες απορρόφησης UV/Vis, FTIR και RR. Επίσης, μελετήθηκε η ανταγωνιστική δέσμευση CN⁻/ N_3^- στην ba_3 οξειδάση.

6.2 Αποτελέσματα

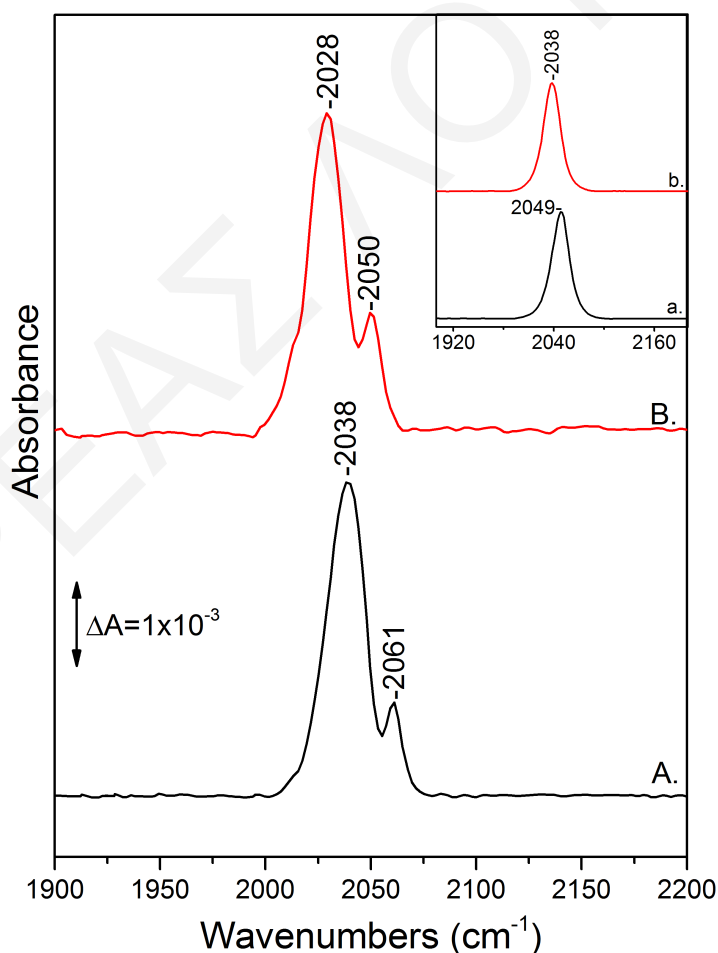
Στο φάσμα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (Σχήμα 6.2.1, φάσμα a) παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 414 nm και στη ζώνη Q στα 535, 562 και 660 nm. Μετά από επώαση του οξειδωμένου ενζύμου με N_3^- για δύο ώρες (Σχήμα 6.2.1, φάσμα b), δεν προκαλείται οποιαδήποτε αλλαγή και τα μέγιστα απορρόφησης παραμένουν αμετάβλητα ακόμα και μετά από 24 ώρες επώασης του ενζύμου με N_3^- (Σχήμα 6.2.1, φάσμα c).



Σχήμα 6.2.1: Οπτικά φάσματα απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a) και της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ σε pH 7,5 και σε χρόνους 2 ωρών (φάσμα b) και 24 ωρών (φάσμα c) μετά την προσθήκη N_3^- στο ένζυμο.

Το γεγονός ότι τα φάσματα παραμένουν αμετάβλητα μετά την προσθήκη N_3^- , βρίσκεται σε αντίθεση με μελέτες άλλων αιμοχαλκοξειδάσων, όπου παρατηρήθηκε μικρή μετατόπιση της κορυφής στην περιοχή Soret ^{1,7}, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν να μην πραγματοποιείται δέσμευση του N_3^- στο Fe^{3+} της αίμης a_3 στην ba_3 οξειδάση.

Τα φάσματα FTIR της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- σε pH 7,5 και χρόνο επώασης δύο ώρες, παρουσιάζονται στο σχήμα 6.2.2. Το φάσμα A αναφέρεται στο παράγωγο με το $^{14}N_3^-$ και παρουσιάζει δύο δονήσεις στους 2038 και 2061 cm^{-1} , οι οποίες μετατοπίζονται στους 2028 και 2050 cm^{-1} με ισοτοπική αντικατάσταση με $^{15}N^{14}N_2^-$ (φάσμα B). Στο ένθετο εμφανίζονται οι δονήσεις του ελεύθερου N_3^- στους 2049 cm^{-1} για το $^{14}N_3^-$ και στους 2038 cm^{-1} για το σημασμένο $^{15}N^{14}N_2^-$. Οι συχνότητες των δονήσεων του ελεύθερου N_3^- είναι διαφορετικές από τις συχνότητες των δονήσεων που παρατηρούνται στις αντιδράσεις, επισημαίνοντας ότι πραγματοποιείται δέσμευση του N_3^- .



Σχήμα 6.2.2: Φάσματα FTIR των αντιδράσεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ (φάσμα A), και το $^{15}N_3^-$ (φάσμα B) σε pH 7,5. Στο ένθετο εμφανίζονται τα FTIR φάσματα του ελεύθερου $^{14}N_3^-$ (φάσμα a) και του $^{15}N_3^-$ (φάσμα b).

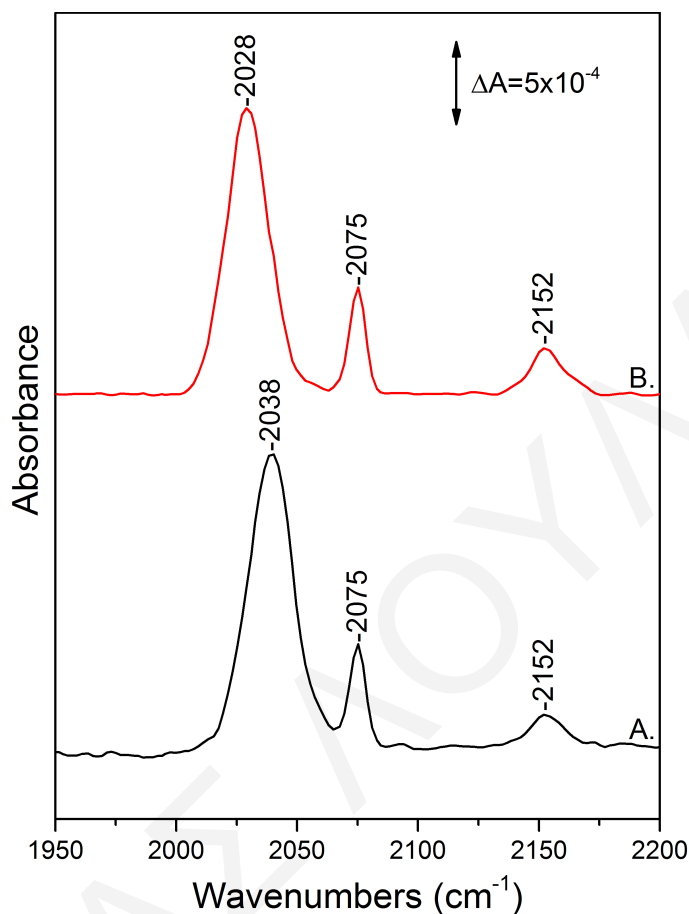
Οι παρατηρούμενες δονήσεις στους 2038 και 2061 cm^{-1} παρουσιάζουν το ίδιο μοτίβο με άλλες αιμοχαλκοξειδάσες^{1-2, 7-8} (Πίνακας 6.2.1) υποδεικνύοντας ότι πραγματοποιείται δέσμευση του N_3^- στο ενεργό κέντρο, καθώς επίσης και πιθανή αλληλεπίδραση του N_3^- με κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Επίσης, οι κορυφές είναι σχεδόν όμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην bo_3 οξειδάση από το βακτήριο *E. coli* (2040 και 2061 cm^{-1})⁷ και η κορυφή στους 2061 cm^{-1} δεν παρουσιάζει διαχωρισμό μετά από ισοτοπική αντικατάσταση, όμοια με την bo_3 οξειδάση και σε αντίθεση με τις υπόλοιπες οξειδάσες του κυτοχρώματος *c*, επισημαίνοντας τον πιθανό σχηματισμό γέφυρας μεταξύ του αζιδίου και το μετάλλων του ενεργού κέντρου.

Πίνακας 6.2.1: Συχνότητες των δονήσεων τάσης (cm^{-1}) του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στο ενεργό κέντρο αιμοπρωτεϊνών.

	$^{14}N_3^-$	$^{15}N^{14}N_2^-$
Μυοσφαιρίνη ⁹	2045	-
	2023	-
Αιμοσφαιρίνη ⁹	2047	-
	2025	-
Βόεια aa_3 οξειδάση ¹⁻²	2051	2039
	2041	2035, 2024
aa_3 οξειδάση (<i>P. denitrificans</i>) ⁸	2056	2043, 2037
	2038	2032
bo_3 οξειδάση (<i>E. coli</i>) ⁷	2061	2051
	2040	2024
ba_3 οξειδάση (<i>T. thermophilus</i>) ^{Παρούσα μελέτη}	2061	2050
	2038	2028

Στο Σχήμα 6.2.3 απεικονίζονται τα φάσματα FTIR των αντιδράσεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ (φάσμα Α) και το $^{15}N^{14}N_2^-$ (φάσμα Β) σε pH 7,5 μετά την προσθήκη CN^- και χρόνο επώασης 3 μέρες. Το φάσμα Α του παραγώγου με το $^{14}N_3^-$ και το CN^- εμφανίζει τρεις δονήσεις στους 2038, 2075 και 2152 cm^{-1} εκ των οποίων μόνο η δόνηση στους 2038 cm^{-1} μετατοπίζεται στους 2028 cm^{-1} λόγω ισοτοπικής αντικατάστασης με το $^{15}N^{14}N_2^-$ (φάσμα Β). Η ένταση της δόνησης στους 2038 cm^{-1} παραμένει αμετάβλητη σε σύγκριση με το φάσμα Α του σχήματος 6.2.2 ενώ η δόνηση στους 2061 cm^{-1} εξαφανίζεται και εμφανίζονται δύο νέες κορυφές στους 2075 και 2152 cm^{-1} . Η εξαφάνιση της δόνησης στους 2061 cm^{-1} υποδηλώνει ότι το N_3^- αποδεσμεύεται από μέταλλο του ενεργού κέντρου, ενώ η εμφάνιση των δονήσεων στους 2075 και 2152 cm^{-1} υποδεικνύει τη δέσμευση του

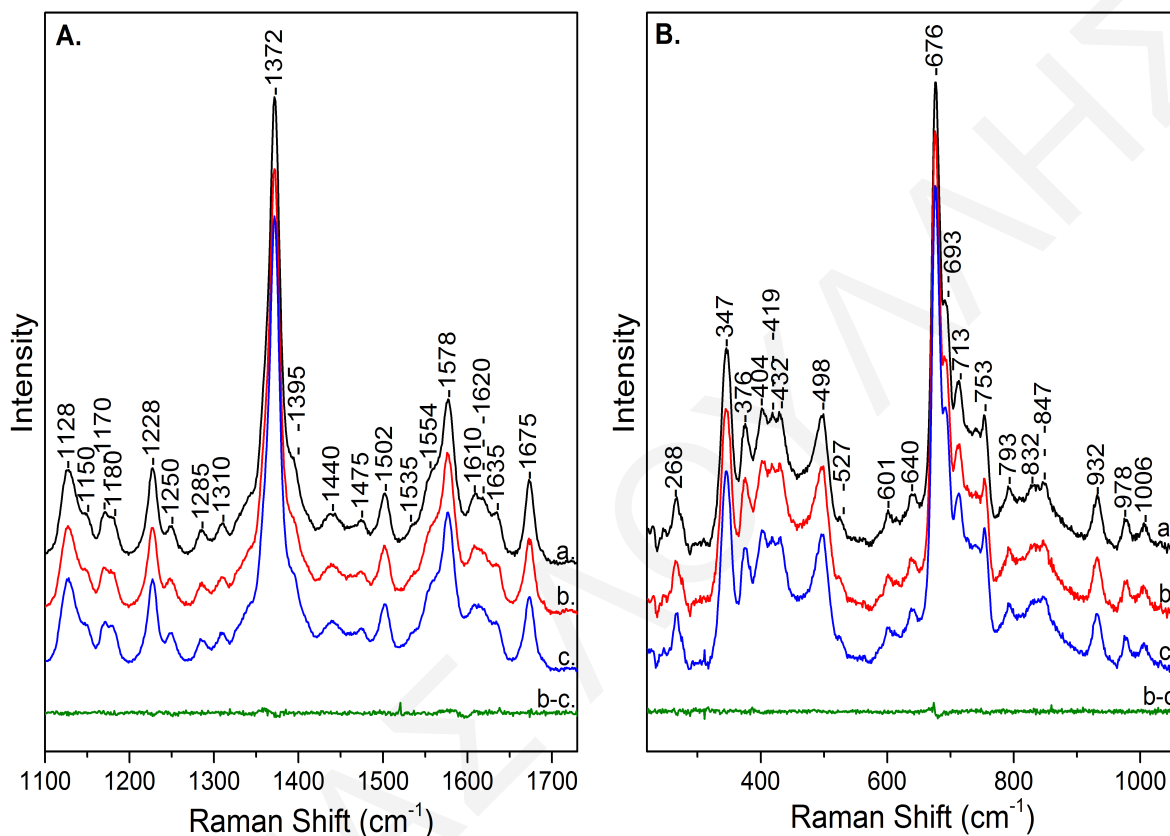
CN^- στο Fe^{2+} της αίμης a_3 και το σχηματισμό γέφυρας αίμης a_3 $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$, αντίστοιχα όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 5.



Σχήμα 6.2.3: Φάσματα FTIR των αντιδρασεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ (φάσμα A), και το $^{15}N_3^-$ (φάσμα B) σε pH 7,5 μετά την προσθήκη CN^- και χρόνο επώασης 3 μέρες.

Στο σχήμα 6.2.4 εμφανίζονται τα φάσματα RR των παραγώγων $ba_3-N_3^-$ στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων (πλαίσιο A) και των χαμηλών συχνοτήτων (πλαίσιο B). Το φάσμα a αναφέρεται στο φάσμα της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης, το οποίο είναι όμοιο με αυτό που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία και χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις της χαμηλού σπιν αίμης b^{3+} στους 1372 (ν_4), 1578 (ν_2) και 1635 (ν_{10}) cm^{-1} και της υψηλού σπιν αίμης a_3^{3+} στους 1372 (ν_4), 1578 (ν_2) και 1610 (ν_{10}) cm^{-1} .¹² Τα φάσματα b και c αναφέρονται στα παράγωγα της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ και το $^{15}N^{14}N_2^-$, αντίστοιχα, ενώ το φάσμα b-c στο φάσμα διαφοράς των παραγώγων $ba_3-^{14}N_3^-$ μείον $ba_3-^{15}N^{14}N_2^-$. Τα απόλυτα φάσματα των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης με το N_3^- φαίνονται να είναι τα ίδια με το φάσμα της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης, τόσο στην περιοχή των υψηλών όσο και στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Επίσης, τα φάσματα διαφοράς των δύο περιοχών δεν παρουσιάζουν κάποιο μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής που να μπορεί να αποδοθεί στην

παρουσία ισοτοπικά ευαίσθητης δόνησης, υποδεικνύοντας ότι το N_3^- δεν δεσμεύεται στο Fe^{3+} της αίμης a_3 στην ba_3 οξειδάση. Η παρατήρηση αυτή, επιβεβαιώνει τα φάσματα οπτικής απορρόφησης όπου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή μετά την προσθήκη N_3^- στο οξειδωμένο ένζυμο.



Σχήμα 6.2.4: Φάσματα RR στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών συχνοτήτων (πλαίσιο B), της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a) και των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης με το $^{14}N_3^-$ (φάσμα b) και το $^{15}N^{14}N_2^-$ (φάσμα c) σε pH 7,5. Το φάσμα b-c αντιστοιχεί στο φάσμα διαφοράς των παραγώγων ba_3 - $^{14}N_3^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{14}N_2^-$.

6.3 Συζήτηση

Η παρουσία των δονήσεων στους 2038 και 2061 cm^{-1} στα φάσματα FTIR της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- (Σχήμα 6.2.2 φάσμα A) υποδεικνύει ότι πραγματοποιείται δέσμευση του N_3^- , καθώς και οι δύο δονήσεις διαφέρουν από τη συχνότητα δόνησης του ελεύθερου N_3^- . Το ίδιο μοτίβο δονήσεων παρατηρήθηκε στην πλειονότητα των αιμογαλκοξειδασών και σε παρόμοιες συχνότητες και αποδόθηκαν σε δομή γέφυρας Fe- N_3 -Cu_B και αλληλεπίδραση του N_3^- με κατάλοιπα του ενζύμου στη βόεια οξειδάση² και σε δομή γέφυρας στις aa_3 και bo_3 οξειδάσες από τα βακτήρια *P. denitrificans* και *E. coli*, αντίστοιχα.⁷⁻⁸ Με βάση τις παρατηρούμενες συχνότητες και τις

αναφορές των προηγούμενων μελετών, η δόνηση στους 2038 cm^{-1} πιθανόν να οφείλεται σε αλληλεπίδραση του N_3^- με κατάλοιπα της πρωτεΐνης ή σε σχηματισμό γέφυρας μεταξύ του N_3^- και των μετάλλων του ενεργού κέντρου. Η πιθανότητα η δόνηση να οφείλεται σε σχηματισμό γέφυρας αποκλείεται καθώς δεν επηρεάζεται από την προσθήκη CN^- παρομοίως με την περίπτωση της βόειας οξειδάσης² και έτσι αποδίδεται σε αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου του N_3^- με κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Η δεύτερη δόνηση στους 2061 cm^{-1} αποδίδεται στη δέσμευση του N_3^- στο ενεργό κέντρο. Στην πληθώρα των αιμοχαλκοξειδασών, η συγκεκριμένη δόνηση παρουσιάζει διαχωρισμό μετά από ισοτοπική αντικατάσταση με $^{15}N^{14}N_2^-$ εκτός από την περίπτωση της bo_3 οξειδάσης και έχει αποδοθεί στο σχηματισμό γέφυρας μεταξύ του N_3^- και των μετάλλων του ενεργού κέντρου, $Fe^{3+}-N=N=N-Cu^{2+}$. Ο διαχωρισμός της δόνησης προκύπτει από το γεγονός ότι η δόνηση του δεσμού N-N διαφοροποιείται καθώς η ισχύς των δονήσεων Fe-N και Cu-N διαφέρει, ενώ στην περίπτωση της bo_3 οξειδάσης όπου δεν παρατηρείται διαχωρισμός οφείλεται στο ότι η ισχύς των δεσμών είναι παρόμοια.^{2, 7-8} Στην ba_3 οξειδάση, δεν παρατηρείται διαχωρισμός της δόνησης μετά από ισοτοπική αντικατάσταση (Σχήμα 6.2.2, φάσμα B), ομοίως με την bo_3 οξειδάση, προτείνοντας τον πιθανό σχηματισμό ανάλογης γέφυρας και στην ba_3 οξειδάση. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των κορυφών στους 2038 και 2061 cm^{-1} πραγματοποιήθηκε η ανταγωνιστική δέσμευση CN^- στην αντίδραση της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- . Από το φάσμα A του σχήματος 6.2.3 παρατηρείται ότι η δόνηση στους 2061 cm^{-1} εξαφανίζεται ενώ εμφανίζονται δύο νέες κορυφές στους 2075 cm^{-1} και 2152 cm^{-1} . Οι δονήσεις στους 2075 και 2152 cm^{-1} οφείλονται στο σχηματισμό του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ και της δομής γέφυρας $Fe^{3+}-C\equiv N-Cu^{2+}$, αντίστοιχα.¹³ Η εξαφάνιση της δόνησης στους 2061 cm^{-1} μετά την προσθήκη CN^- , επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη δόνηση οφείλεται στη δόνηση τάσης του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στα μέταλλα του ενεργού κέντρου. Το CN^- εκτοπίζει το N_3^- και δεσμεύεται στα μέταλλα υπό τις μορφές που προαναφέρθηκαν. Η δόνηση στους 2038 cm^{-1} παραμένει αμετάβλητη μετά την προσθήκη CN^- , επιβεβαιώνοντας ότι η δόνηση στους 2038 cm^{-1} δεν προέρχεται από το N_3^- όταν είναι δεσμευμένο σε μέταλλο του ενεργού κέντρου αλλά επειδή είναι δεσμευμένο σε άλλη περιοχή της πρωτεΐνης.

Τα φάσματα οπτικής απορρόφησης της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- (Σχήμα 6.2.1) δεν παρουσιάζουν οποιαδήποτε μεταβολή. Το γεγονός αυτό αντιτίθεται στα αποτελέσματα από μελέτες άλλων αιμοχαλκοξειδασών όπου παρατηρήθηκε μικρή αλλαγή του φάσματος οπτικής απορρόφησης, κυρίως στην περιοχή Soret.^{1, 7} Το ότι τα φάσματα παραμένουν αμετάβλητα, προτείνει ότι η δέσμευση του N_3^- πιθανόν να μην

πραγματοποιείται στο Fe^{3+} της αίμης a_3 . Η υπόθεση επιβεβαιώνεται από τα RR φάσματα των παραγώγων της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- στο σχήμα 6.2.4. Τα απόλυτα φάσματα των αντιδράσεων είναι τα ίδια με της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης. Επίσης, στα φάσματα διαφοράς δεν παρατηρείται κάποιο μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής που να μπορεί να αποδοθεί σε ισοτοπικά ευαίσθητη δόνηση. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται ότι το N_3^- δεν δεσμεύεται στο Fe^{3+} της αίμης a_3 και δεν σχηματίζεται δομή γέφυρας μεταξύ του N_3^- και των μετάλλων του ενεργού κέντρου. Ως εκ τούτου συμπεραίνεται, ότι κατά την αντίδραση της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- σχηματίζεται το σύμπλοκο $Cu_B^{2+}-N_3^-$ και η δόνηση στους 2061 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στο Cu_B , ενώ η δόνηση στους 2038 cm^{-1} στη δόνηση τάσης του N_3^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο σε περιοχή της πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, το N_3^- δεσμεύεται με δύο τρόπους στην οξειδωμένη ba_3 οξειδάση. Όπως και στις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες δεσμεύεται μέσω δεσμών υδρογόνου σε κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Σε αντίθεση όμως με την πλειονότητα των αιμοχαλκοξειδάσων δεν σχηματίζει δομή γέφυρας και δεν δεσμεύεται στο Fe^{3+} της αίμης a_3 αλλά δεσμεύεται στο Cu_B , σχηματίζοντας το σύμπλοκο $Cu_B^{2+}-N_3^-$.

6.4 Βιβλιογραφία

1. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S., Infrared evidence of azide binding to iron, copper, and non-metal sites in heart cytochrome *c* oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267 (14), 9757-9766.
2. Tsubaki, M.; Yoshikawa, S., Fourier-transform infrared study of azide binding to the Fe_{a_3} - Cu_B binuclear site of bovine heart cytochrome *c* oxidase: new evidence for a redox-linked conformational change at the binuclear site. *Biochemistry* **1993**, 32 (1), 174-182.
3. Li, W.; Palmer, G., Spectroscopic characterization of the interaction of azide and thiocyanate with the binuclear center of cytochrome oxidase: Evidence for multiple ligand sites. *Biochemistry* **1993**, 32 (7), 1833-1843.
4. Fei, M. J.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Yamaguchi, H.; Tsukihara, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yoshikawa, S., X-ray structure of azide-bound fully oxidized cytochrome *c* oxidase from bovine heart at 2.9 Å resolution. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* **2000**, 56 (Pt 5), 529-535.

5. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J., Cytochrome *bo* from *Escherichia coli*: Binding of Azide to Cu_B . *Biochemistry* **1996**, *35* (43), 13780-13787.
6. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H., Fourier-transform infrared studies on azide-binding to the binuclear center of the *Escherichia coli bo*-type ubiquinol oxidase. *FEBS Letters* **1999**, *449* (2-3), 191-195.
7. Varotsis, C.; Vamvouka, M., Resonance Raman and Fourier Transform Infrared Detection of Azide Binding to the Binuclear Center of Cytochrome *bo*₃ Oxidase from *Escherichia coli*. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (19), 3942-3946.
8. Vamvouka, M.; Müller, W.; Ludwig, B.; Varotsis, C., Fourier Transform Infrared and Resonance Raman Studies of the Interaction of Azide with Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (15), 3030-3034.
9. Alben, J. O.; Fager, L. Y., Infrared studies of azide bound to myoglobin and hemoglobin temperature dependence of ionicity. *Biochemistry* **1972**, *11* (5), 842-847.
10. Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H.-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G., FTIR Analysis of the Interaction of Azide with Horse Heart Myoglobin Variants. *Biochemistry* **1994**, *33* (24), 7600-7608.
11. Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T., Temperature dependence of resonance Raman spectra of metmyoglobin and methemoglobin azide. Detection of resonance-enhanced bound azide vibrations and iron-azide stretch. *Biochemistry* **1981**, *20* (4), 946-952.
12. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdottir, O.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H., Spectroscopic characterization of cytochrome *ba*₃, a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the a_3/Cu_B site to that of bovine cytochrome *aa*₃. *Biochemistry* **1994**, *33* (10), 3128-3141.
13. Loullis, A.; Noor, M. R.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., Observation of Ligand Transfer in *ba*₃ Oxidase from *Thermus thermophilus*: Simultaneous FTIR Detection of Photolabile Heme a_3^{2+} -CN and Transient Cu_B^{2+} -CN Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (30), 8955-8960.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Χαρακτηρισμός της Δομής του Συμπλόκου Νίτρο-Αίμης a_3 στην ba_3
Οξειδάση με Φασματοσκοπία Raman

7.1 Εισαγωγή

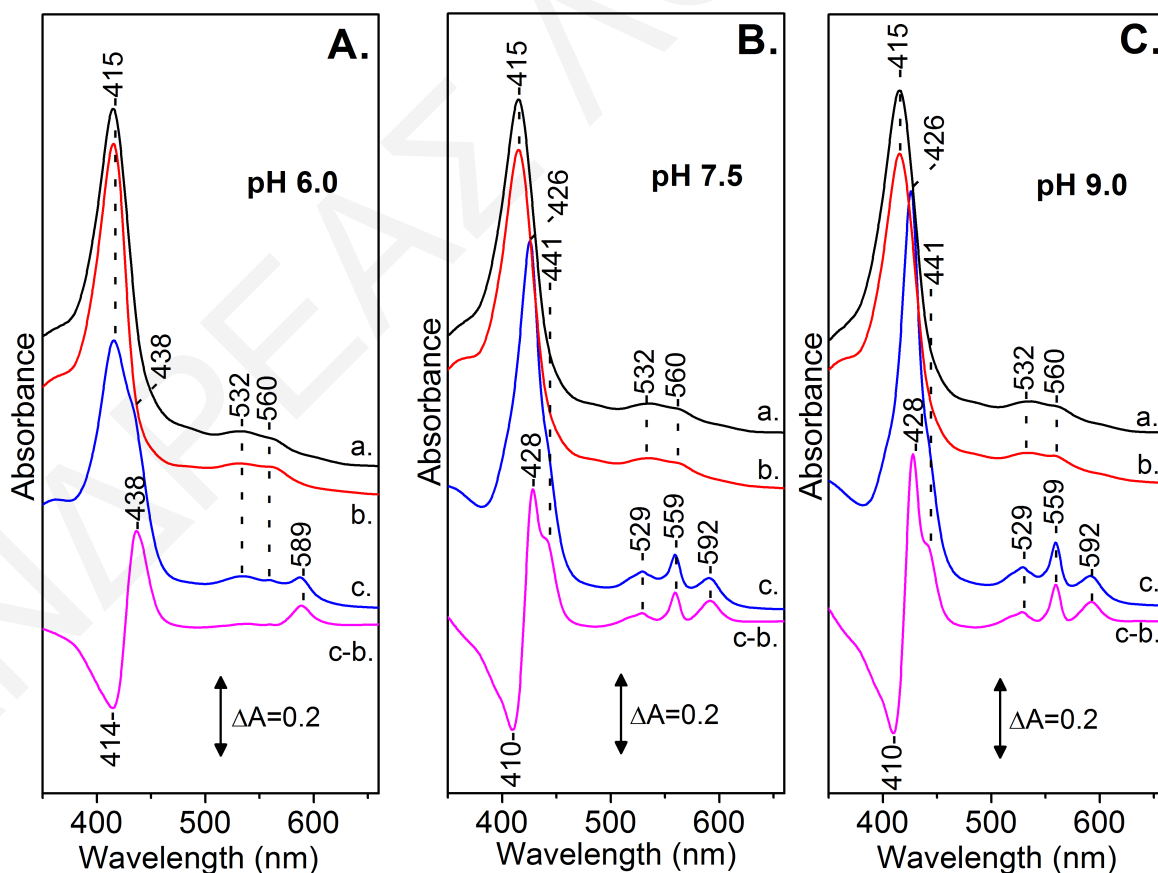
Τα τελευταία χρόνια, η βιολογία του νιτρώδους ιόντος (NO_2^-) έχει λάβει μεγάλο ενδιαφέρον και μελετάται εκτεταμένα. Το NO_2^- εκτός από το ρόλο που παρουσιάζει στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου, έχει βρεθεί ότι συμμετέχει σε μονοπάτια σηματοδότησης στα θηλαστικά.¹⁻⁴ Η σημαντικότητα του NO_2^- στα θηλαστικά παρουσιάζεται στις περιπτώσεις υποξίας και ανοξίας. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η δραστηριότητα της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου αναστέλλεται και ενεργοποιείται η καταλυτική αναγωγή του NO_2^- προς NO , καθιστώντας το NO_2^- την κύρια πηγή NO σε υποξικές και ανοξικές συνθήκες. Η πραγματοποίηση της καταλυτικής αναγωγής του NO_2^- υποστηρίζεται από το μεγάλο αριθμό μελετών, που διερεύνησαν τη δράση μεταλλοπρωτεϊνών των θηλαστικών, ως αναγωγάσες των νιτρωδών, και αναφέρουν ότι πολλές από αυτές είναι ικανές να ανάγουν το NO_2^- σε NO . Μεταξύ αυτών των μεταλλοπρωτεϊνών είναι η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη και η οξειδάση του κυτοχρώματος *c*.¹⁻⁴ Επίσης, η αναγωγή του NO_2^- αποτελεί ενδιάμεσο βήμα κατά το στάδιο της απονιτροποίησης, στον κύκλο του αζώτου.⁵ Το στάδιο της απονιτροποίησης είναι το τμήμα του βιοχημικού κύκλου του αζώτου, κατά τον οποίο πραγματοποιείται αναγωγή των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) σε μοριακό άζωτο (N_2) σε τέσσερα διαδοχικά βήματα ($NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$) και απαντάται σε μεγάλο εύρος οργανισμών, από αρχαία σε ευβακτήρια, ακόμα και σε μερικά ευκαρυωτικά.^{1,5} Το δεύτερο βήμα, η αναγωγή του NO_2^- προς NO , καταλύεται από δύο διαφορετικού τύπου αναγωγάσες των νιτρωδών (NiRs) αυτές που περιέχουν αίμη στο ενεργό τους κέντρο (cd_1NiR) και αυτές που περιέχουν Cu ($CuNiR$).⁵

Ο μηχανισμός αναγωγής του NO_2^- από τις *bona fide* αναγωγάσες των νιτρωδών, καθώς επίσης και από τις αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη, έχει μελετηθεί με φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Μέσω των διαθέσιμων κρυσταλλικών δομών αποδεικνύεται ότι η δέσμευση του NO_2^- στις cd_1NiR πραγματοποιείται μέσω του ατόμου του αζώτου (*N*-νίτρο δέσμευση), στις $CuNiR$ μέσω των δύο ατόμων οξυγόνου του NO_2^- (*O,O*-διδοντική νίτριτο δέσμευση) και στις αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη μέσω του ενός ατόμου οξυγόνου (*N*-νίτριτο δέσμευση).⁶⁻¹⁰ Σε συνδιασμό με φασματοσκοπικές μελέτες, έχει προταθεί αριθμός μοριακών μηχανισμών αναγωγής του NO_2^- .⁶⁻¹⁴ Παρόλ' αυτά, ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρά το NO_2^- με τις οξειδάσες του κυτοχρώματος *c*, οι οποίες περιέχουν Fe και Cu στο ενεργό τους κέντρο, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Πρόσφατα, περιγράφηκε η αντίδραση του NO_2^- με μοντέλα αίμης/χαλκού.¹⁵

Με βάση την αναφορά ότι οι οξειδάσες του κυτοχρώματος *c* παρουσιάζουν δραστηριότητα αναγωγής των νιτρωδών και την υπόθεση της κοινής εξέλιξης της αερόβιας αναπνοής και της απονιτροποίησης, μελετήθηκαν στον παρόν κεφάλαιο, οι αλληλεπιδράσεις του NO_2^- με το διμεταλλικό κέντρο της ba_3 οξειδάσης με τη χρήση των φασματοσκοπιών απορρόφησης UV/Vis και RR.

7.2 Αποτελέσματα

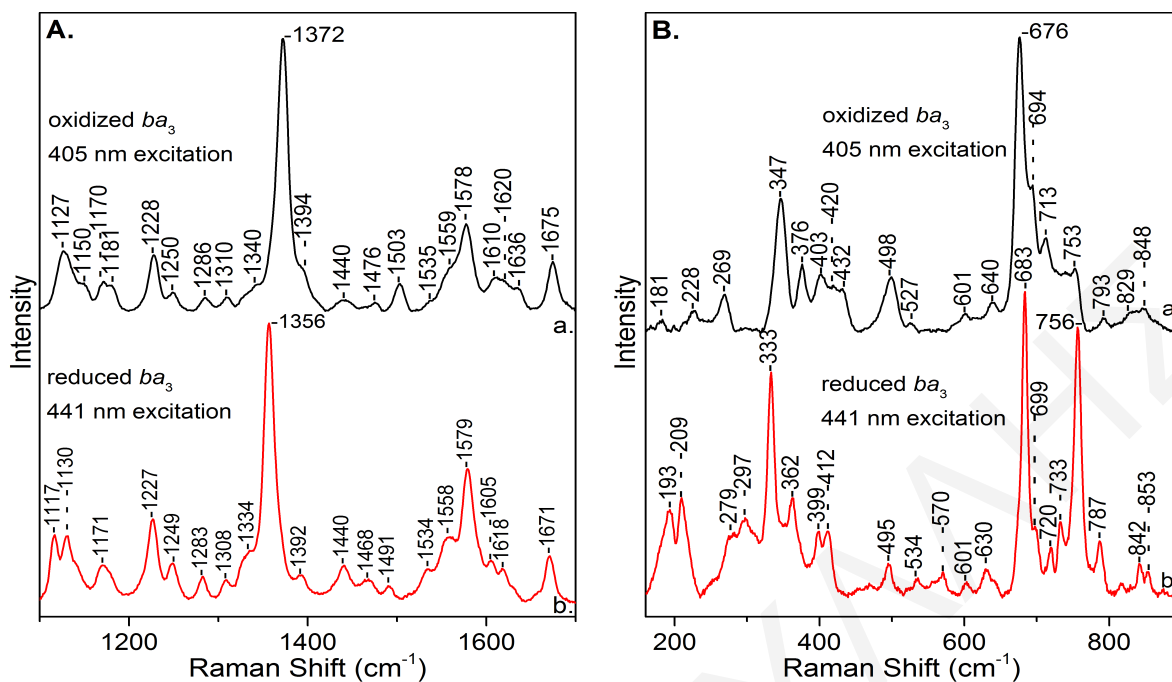
Στο φάσμα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (Σχήμα 7.2.1 πλαίσια A-C, φάσμα a) παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 415 nm (αίμη b^{3+} και αίμη a_3^{3+}) και στη ζώνη Q στα 532 και 560 nm (αίμη b^{3+}).¹⁶⁻¹⁷ Όπως παρατηρείται, τα φάσματα παραμένουν τα ίδια σε εύρος pH 6,0-9,0. Η ανηγμένη μορφή της ba_3 οξειδάσης παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 426 nm (αίμη b^{2+}) και 444 nm (αίμη a_3^{2+}) και στη ζώνη Q στα 529, 559 nm για την αίμη b^{2+} και στα 614 nm για την αίμη a_3^{2+} .¹⁸



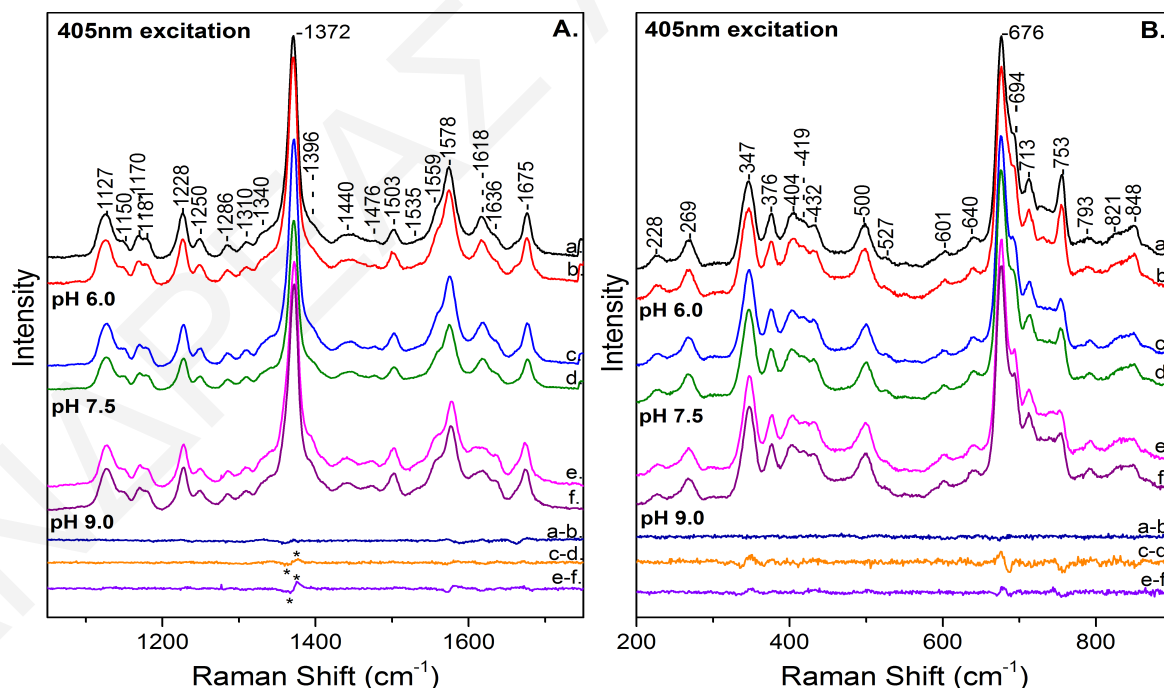
Σχήμα 7.2.1: Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης (φάσμα a), μετά από προσθήκη NO_2^- (φάσμα b), 2 ώρες μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με NO_2^- ένζυμο (φάσμα c) και c-b το φάσμα διαφοράς σε pH 6,0 (πλαίσιο A), σε pH 7,5 (πλαίσιο B) και σε pH 9,0 (πλαίσιο C).

Κατά την προσθήκη του NO_2^- στο οξειδωμένο ένζυμο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα φάσματα απορρόφησης σε pH 6,0-9,0 (Σχήμα 7.2.1, πλαίσια A-C, φάσμα b). Σε pH 6,0 η μετέπειτα προσθήκη κυστεΐνης, η οποία είναι ήπιο αναγωγικό, προκαλεί μετατόπιση των μεταβάσεων της αίμης a_3 στα 438 και 589 nm (Σχήμα 7.2.1, πλαίσιο A, φάσμα c), υποδηλώνοντας το σχηματισμό ενός συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}$, πιθανόν του παραγώγου αίμης $a_3 Fe^{2+}-NO_2$. Ο σχηματισμός του συγκεκριμένου παραγώγου παρατηρείται ξεκάθαρα στο οπτικό φάσμα διαφοράς (Σχήμα 7.2.1, πλαίσιο A, φάσμα c-b), το οποίο είναι διαφορετικό από το σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-NO$ ($Fe-N=O$), καθώς το σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-NO$ χαρακτηρίζεται από μέγιστα απορρόφησης στα 423 και 599 nm.¹⁸ Οι κορυφές της αίμης b παραμένουν αμετάβλητες μετά την προσθήκη κυστεΐνης, υποδηλώνοντας ότι σε pH 6,0, δεν πραγματοποιείται αναγωγή της αίμης b . Ως αναγωγικό χρησιμοποιήθηκε η κυστεΐνη, η οποία είναι ήπιο αναγωγικό, αντί άλλα αναγωγικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, όπως διθειονικά ή ασκορβικά άλατα, για να αποφευχθούν μη ενζυματικές αντιδράσεις αναγωγής του NO_2^- . Κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες, δεν παρατηρήθηκε αναγωγή του NO_2^- από την κυστεΐνη. Σε pH 7,5 (Σχήμα 7.2.1, πλαίσιο B, φάσμα c) η προσθήκη κυστεΐνης στην αντίδραση της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- οδηγεί στη μετατόπιση των μεταβάσεων της αίμης a_3 , στα 441 και 592 nm και σε μερική μετατόπιση των μεταβάσεων της αίμης b^{3+} στα 426 και 559 nm, υποδεικνύοντας ότι η αίμη b ανάγεται σε σημαντικό ποσοστό. Παρόμοιες μεταβολές παρατηρήθηκαν και σε pH 9,0 (Σχήμα 7.2.1 πλαίσιο C, φάσμα c) και σε αυτή την περίπτωση η αίμη b ανάχθηκε πλήρως μετά την προσθήκη κυστεΐνης. Κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες το σύμπλοκο της αίμης a_3 με χαρακτηριστικές μεταβάσεις στα 441/592 nm παραμένει σταθερό, υποδηλώνοντας ότι το NO_2^- δεν ανάγεται σε NO σε σημαντικό ποσοστό.

Τα φάσματα RR της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής της ba_3 οξειδάσης φαίνονται στο σχήμα 7.2.2 και είναι όμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.¹⁷ Οι χαρακτηριστικές δονήσεις της υψηλού σπιν πεντα-ενταγμένης αίμης a_3^{2+} στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο εντοπίζονται στους 1356 cm^{-1} (ν_4), 1579 cm^{-1} (ν_2) και 1605 cm^{-1} (ν_{10}). Στο σχήμα 7.2.3 παρουσιάζονται τα φάσματα RR στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων, των αντιδράσεων της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- (φάσματα a, c, e) και το $^{15}NO_2^-$ (φάσματα b, d, f) σε pH 6,0 (φάσματα a, b), pH 7,5 (φάσματα c, d) και pH 9,0 (φάσματα e, f). Τα φάσματα a-b, c-d και e-f αναφέρονται στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων $ba_3-NO_2^-$ μείον $ba_3-^{15}NO_2^-$ σε pH 6,0, 7,5 και 9,0, αντίστοιχα.



Σχήμα 7.2.2: Φάσματα RR της ba_3 οξειδάσης στην οξειδωμένη (φάσμα a) και στην ανηγμένη (φάσμα b) μορφή στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και χαμηλών συχνοτήτων (πλαίσιο B). Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκη κύματος διέγερσης στα 405 nm και 441 nm για την οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή της ba_3 οξειδάσης, αντίστοιχα και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4mW.



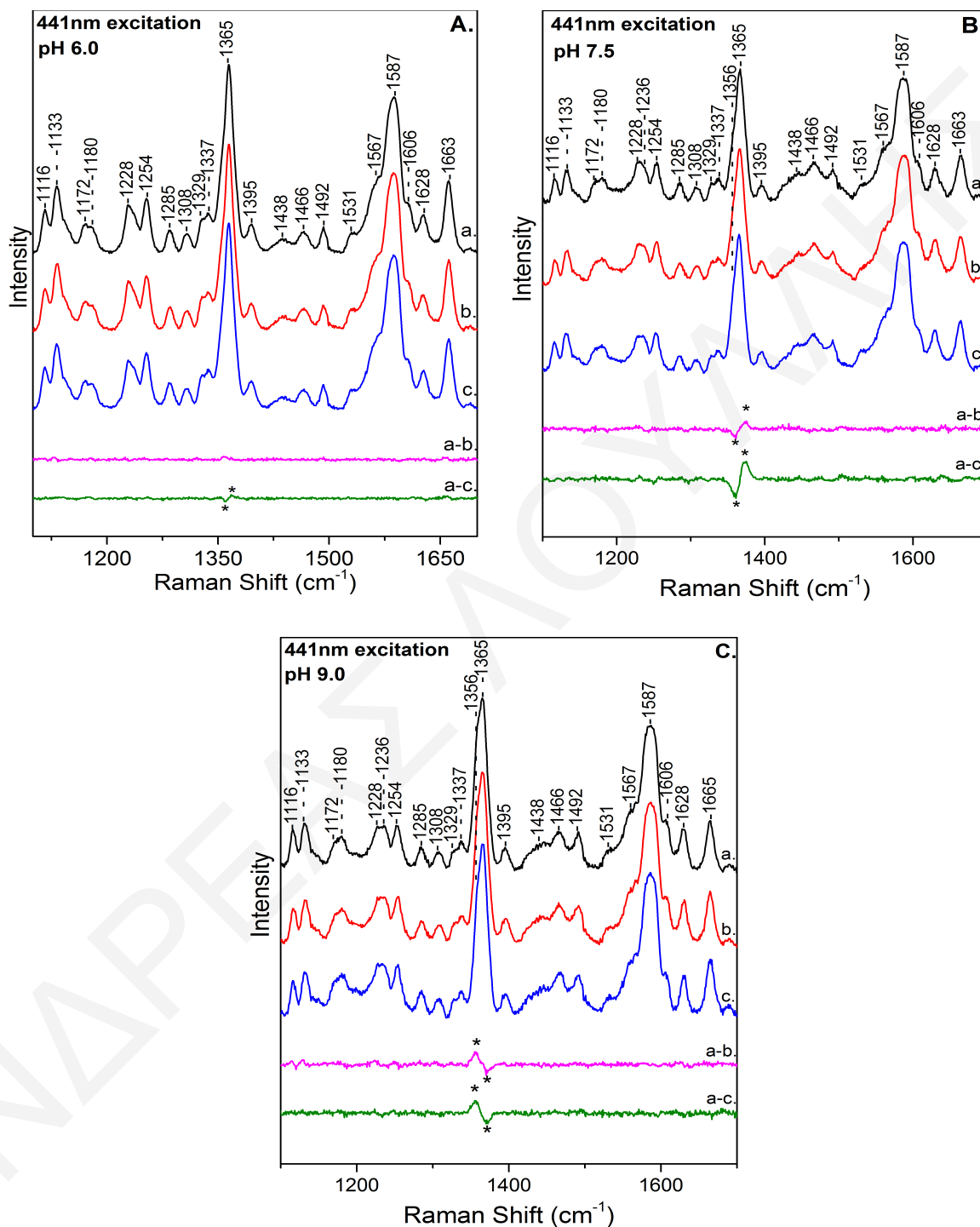
Σχήμα 7.2.3: Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων των παραγώγων της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης $ba_3-NO_2^-$ με το $^{14}N^{16}O_2^-$ (φάσματα a, c, e) και το $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσματα b, d, f) σε pH 6,0 (φάσματα a, b), pH 7,5 (φάσματα c, d) και pH 9,0 (φάσματα e, f). Τα φάσματα a-b, c-d και e-f αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων $ba_3-^{14}N^{16}O_2^-$ μείον $ba_3-^{15}N^{16}O_2^-$ σε pH 6,0, 7,5 και 9,0, αντίστοιχα. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.

Τα απόλυτα φάσματα των αντιδράσεων σε όλα τα pH είναι όμοια μεταξύ τους και παρουσιάζουν πολύ μικρές διαφορές σε σύγκριση με το φάσμα της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης. Επίσης, στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων δεν παρατηρείται κάποιο μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής που να μπορεί να αποδοθεί σε ισοτοπικά ευαίσθητη δόνηση, υποδηλώνοντας ότι δεν πραγματοποιείται δέσμευση του NO_2^- στο οξειδωμένο ένζυμο.

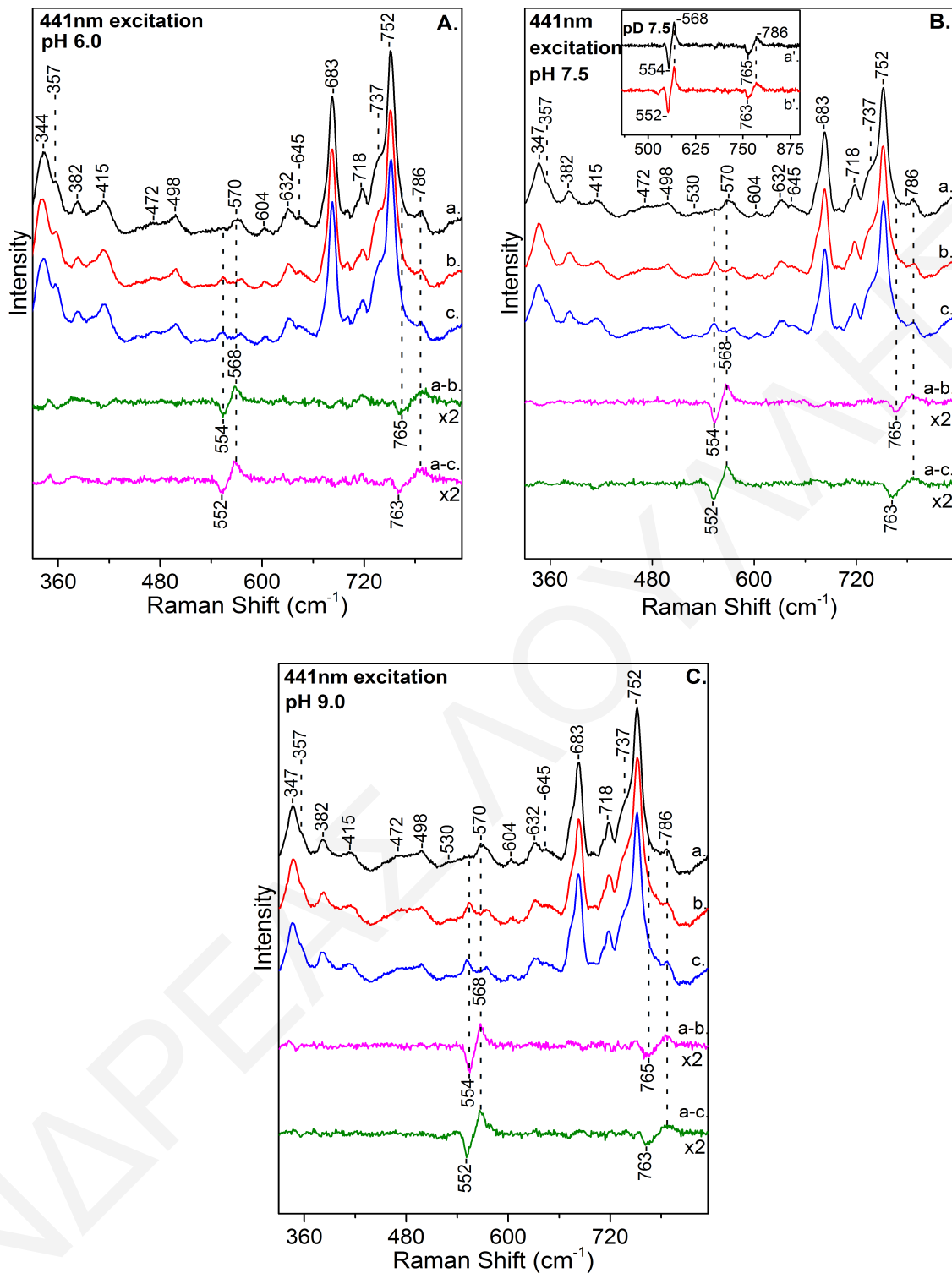
Στο σχήμα 7.2.4 παρουσιάζονται τα φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με NO_2^- ένζυμο σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C). Τα φάσματα a, b, και c αναφέρονται στα παράγωγα με το $^{14}N^{16}O_2^-$, το $^{15}N^{16}O_2^-$ και το $^{15}N^{18}O_2^-$, αντίστοιχα. Η παρουσία των δονήσεων στους 1365 cm^{-1} (ν_4), 1492 cm^{-1} (ν_3), 1587 cm^{-1} (ν_2) και 1628 cm^{-1} (ν_{10}) στα φάσματα RR της αντίδρασης της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- παρουσία κυστεΐνης, δείχνουν το σχηματισμό ενός χαμηλού σπιν εξα-υποκατεστημένου αίμης a_3 Fe^{2+} συμπλόκου.¹⁷⁻¹⁸ Μια αξιοσημείωτη διαφορά στα φάσματα είναι η παρουσία της δόνησης στους 1356 cm^{-1} σε pH 7,5 και pH 9,0, η οποία αποδίδεται στη δόνηση ν_4 της ανηγμένης αίμης b^{2+} . Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα φάσματα οπτικής απορρόφησης και αποδεικνύουν την αναγωγή της αίμης b σε pH 7,5 και 9,0 ενώ σε pH 6,0 η αίμη b παραμένει οξειδωμένη. Τα φάσματα διαφοράς των παραγώγων ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a-b) και ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα a-c) δεν παρουσιάζουν κάποιο μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί σε ισοτοπικά ευαίσθητες δονήσεις. Οι κορυφές που επισημαίνονται με αστεράκι στα φάσματα διαφοράς οφείλονται σε διαφορές στην ένταση της δόνησης ν_4 . Η συμμετρική δόνηση τάσης του ελεύθερου NO_2^- εντοπίζεται στους 1335 cm^{-1} και η αντίστοιχη ασύμμετρη στους 1250 cm^{-1} , ενώ όταν το NO_2^- βρίσκεται δεσμευμένο μέσω του ατόμου του αζώτου (N-νίτρο δέσμευση) σε μέταλλο, οι παραπάνω δονήσεις εμφανίζονται σε εύρος $1300\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$.¹⁹⁻²⁰ Ως εκ τούτου, από τα δεδομένα μας φαίνεται ότι οι δονήσεις τάσης του NO_2^- όταν βρίσκεται δεσμευμένο στο Fe^{2+} της αίμης a_3 δεν ενισχύονται με διέγερση στα 441 nm.

Τα φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ba_3 οξειδάσης μετά την προσθήκη κυστεΐνης σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C) εμφανίζονται στο σχήμα 7.2.5. Τα φάσματα a, b και c αντιστοιχούν στα παράγωγα με το $^{14}N^{16}O_2^-$, το $^{15}N^{16}O_2^-$ και το $^{15}N^{18}O_2^-$, αντίστοιχα. Στο φάσμα a, του παραγώγου ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$, στα πλαίσια A-C του σχήματος 7.2.5, παρατηρείται η δόνηση στους 570 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζει ισοτοπική ευαισθησία με υποκατάσταση του αζώτου

και του οξυγόνου και μετατοπίζεται στους 554 και 552 cm^{-1} στα παράγωγα ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα b) και ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα c), αντίστοιχα.



Σχήμα 7.2.4: Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 - NO_2^- μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με $^{14}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a), $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα b), $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα c) ένζυμο σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C). Τα φάσματα a-b και a-c αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ και ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$, αντίστοιχα. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.



Σχήμα 7.2.5: Φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της κυτοχρωμικής οξειδάσης ba_3 - NO_2^- μετά την προσθήκη κυστεΐνης στο επωασμένο με $^{14}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a), $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα b), $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα c) ένζυμο σε pH 6,0 (πλαίσιο A), pH 7,5 (πλαίσιο B) και pH 9,0 (πλαίσιο C). Τα φάσματα a-b και a-c αντιστοιχούν στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ και ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$, αντίστοιχα και είναι μεγενθυμένα κατά 2 φορές. Το ένθετο στο πλαίσιο B παρουσιάζει τα φάσματα διαφοράς ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a') και ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα b') σε pD 7,5. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.

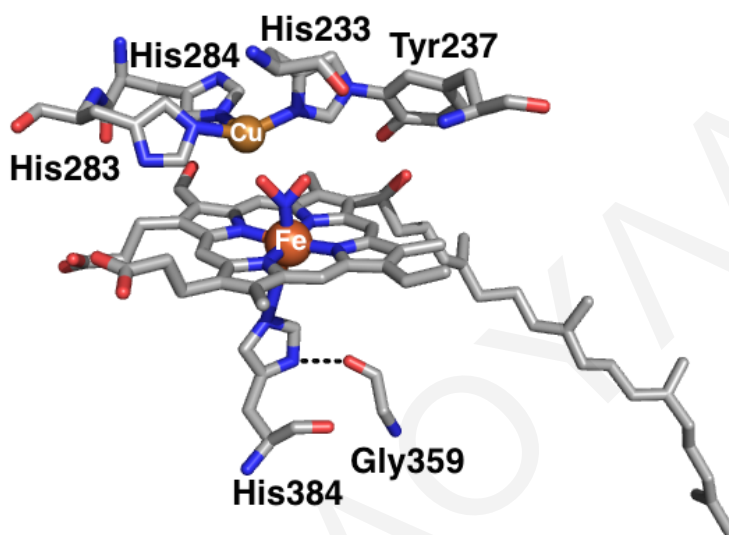
Στα φάσματα διαφοράς των παραγώγων ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a-b) και ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα a-c) παρουσιάζονται μοτίβα θετικής/αρνητικής κορυφής στους $568/554\text{ cm}^{-1}$ και $568/552\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την παρουσία ισοτοπικά ευαίσθητης δόνησης. Επιπλέον, στο φάσμα διαφοράς ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{16}O_2^-$ (φάσμα a-b) εμφανίζεται μια δεύτερη ισοτοπικά ευαίσθητη δόνηση. Η δόνηση αυτή παρατηρείται σαν θετική/αρνητική κορυφή στους $786/765\text{ cm}^{-1}$, αλλά δεν παρατηρείται στα απόλυτα φάσματα επειδή επικαλύπτεται από άλλες δονήσεις. Αυτό το χαρακτηριστικό μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής παρουσιάζεται και στο φάσμα διαφοράς ba_3 - $^{14}N^{16}O_2^-$ μείον ba_3 - $^{15}N^{18}O_2^-$ (φάσμα a-c), με την αρνητική κορυφή να εμφανίζεται στους 763 cm^{-1} .

Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές για το χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων αίμης-νιτρωδών με μεθόδους δονητικής φασματοσκοπίας. Ωστόσο, με βάση τις παρατηρούμενες συχνότητες και τις ισοτοπικές μετατοπίσεις, η δόνηση στους 568 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης $\nu(\text{Fe-NO}_2)$ και η δόνηση στους 786 cm^{-1} στη δόνηση κάμψης $\delta(\text{ONO})$. Η δόνηση τάσης Fe-N του παραγώγου ba_3 - NO_2^- βρίσκεται σε εύρος συχνοτήτων που έχουν αναφερθεί για τη δόνηση Fe-N των εξα-υποκατεστημένων νιτρόζυλ συμπλόκων Fe^{2+} -N=O, τα οποία έχουν μελετηθεί εκτεταμένα²¹⁻²² και είναι 29 cm^{-1} μεγαλύτερη από την αντίστοιχη δόνηση $\nu(\text{Fe-N})$ του νιτρόζυλ συμπλόκου (αίμη a_3 Fe^{2+} -NO) της ba_3 οξειδάσης.¹⁸ Επιπρόσθετα, η δόνηση κάμψης του NO_2^- εμφανίζεται στους 825 cm^{-1} στο ελεύθερο ιόν και σε εύρος $790-850\text{ cm}^{-1}$ σε διάφορα σύμπλοκα μετάλλων-νιτρωδών.¹⁹⁻²⁰ Ως εκ τούτου, με βάση τις παρατηρούμενες ισοτοπικές μετατοπίσεις και για τις δύο δονήσεις που ανιχνεύθηκαν, η δέσμευση του NO_2^- μέσω του ατόμου του οξυγόνου μπορεί να αποκλειστεί. Για τις συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe-NO}_2)$ και $\delta(\text{ONO})$, παρατηρείται ότι, παραμένουν αμετάβλητες σε εύρος pH 6,0-9,0 (Σχήμα 7.2.5, πλαίσια A-C, φάσματα a-b και a-c) και μετά από αντικατάσταση H_2O/D_2O (Σχήμα 7.2.5, πλαίσιο B, ένθετο), υποδηλώνοντας ότι η δομή του συμπλόκου αίμης a_3 Fe^{2+} - NO_2^- παραμένει ανεπηρέστη. Συνεπώς, η οξειδωτική κατάσταση της αίμης b (b^{3+} σε pH 6,0 και b^{2+} σε pH 7,5 και pH 9,0) δεν έχει καμία επίδραση στις ιδιότητες του συμπλόκου αίμης a_3 Fe^{2+} - NO_2^- .

7.3 Συζήτηση

Η ταυτοποίηση των δονήσεων $\nu(\text{Fe-NO}_2)$ και $\delta(\text{ONO})$ μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε τη δομή και τις ιδιότητες του παραγώγου αίμης a_3 Fe^{2+} - NO_2^- της ba_3 οξειδάσης (Σχήμα 7.3.1). Η ανίχνευση της δόνησης τάσης $\nu(\text{Fe-NO}_2)$ στους 568 cm^{-1} υποδεικνύει ότι το NO_2^-

δεσμεύεται, στο Fe^{2+} της αίμης a_3 , μέσω του ατόμου του αζώτου στην ba_3 οξειδάση (*N*-νίτρο δέσμευση). Αυτός ο τρόπος ένταξης έχει παρατηρηθεί στις αναγωγάσες των νιτροδών, cd_1NiR και σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου του δεσμευμένου NO_2^- στην αίμη d_1 και των δύο καταλοίπων ιστιδίνης που είναι σημαντικά για τη δραστηκότητα του ενζύμου.^{6, 13}



Σχήμα 7.3.1: Σχηματική αναπαράσταση του παραγώγου αίμης a_3 -νίτρο της ba_3 οξειδάσης. Τα δομικά χαρακτηριστικά του διμεταλλικού κέντρου αίμης a_3/Cu_B λήφθηκαν από το αρχείο PDB 1EHK.²³

Σε αντίθεση, στην αιμοσφαιρίνη και στη μυοσφαιρίνη σχηματίζονται νίτριτο σύμπλοκα.⁷⁻⁹ Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ότι κατά τη μετάλλαξη του κατάλοιπου της μακρινής ιστιδίνης (H64V) στη μυοσφαιρίνη, αλλάζει ο τρόπος δέσμευσης από νίτριτο σε νίτρο και χάνεται η δραστηκότητα της ως αναγωγάση των νιτροδών. Ως εκ τούτου, το κατάλοιπο της μακρινής ιστιδίνης θεωρείται ότι κατευθύνει και ελέγχει τη δέσμευση του NO_2^- μέσω του ατόμου του οξυγόνου στο Fe της αίμης στη μυοσφαιρίνη και την αιμοσφαιρίνη.⁸

Υπάρχει γενική ομοφωνία ότι το εγγύς και μακρινό περιβάλλον της αίμης ελέγχει τις ιδιότητες των δεσμευμένων, στην αίμη, υποκαταστατών στις αιμοπρωτεΐνες. Στη μυοσφαιρίνη το κατάλοιπο της μακρινής ιστιδίνης κατευθύνει τη δέσμευση του NO_2^- στο Fe της αίμης μέσω του ατόμου του οξυγόνου.⁸ Στο νιτρόζυλ σύμπλοκο της ανηγμένης μυοσφαιρίνης, Mb-NO ($\nu_{Fe-NO}=558\text{ cm}^{-1}$, $\nu_{N-O}=1613\text{ cm}^{-1}$) η γωνία Fe-N-O και κατ'επέκταση η ισχύς των δεσμών Fe-N και N-O επηρεάζονται από την ισχύ του δεσμού μεταξύ του Fe και της εγγύς ιστιδίνης (Fe-His93) και από πολικές και στεरिकές αλληλεπιδράσεις στη μακρινή θέση της αίμης.²¹⁻²² Ωστόσο, στην ba_3 οξειδάση έχει φανεί ότι οι δονήσεις $\nu(Fe^{2+}-NO)$ και $\nu(N-O)$ παρατηρούνται στους 539 και 1620 cm^{-1} ,

αντίστοιχα και παραμένουν ανεπηρέαστες μετά από ανταλλαγή H_2O/D_2O και σε εύρος pH 6,0-9,0, υποδηλώνοντας ότι το άμεσο περιβάλλον του δεσμευμένου NO στο Fe της αίμης δεν συμβάλλει στην αποδυνάμωση του δεσμού $Fe_{a_3}-NO$.¹⁸ Περαιτέρω, μελέτες με φασματοσκοπία FTIR των παραγώγων CN^- της ba_3 οξειδάσης έχουν αποκαλύψει ότι το περιβάλλον του Cu_B και των υποκαταστατών ιστιδίνης του, συμπεριλαμβανομένης και της ομοιοπολικά δεσμευμένης Tyr237 είναι άκαμπτο και δεν υπόκειται σε αλλαγές στη διαμόρφωση που να συνδέονται με αλλαγή στην κατάσταση πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης των υποκαταστατών του Cu_B^{2+} .²⁴ Παρόμοια συμπεράσματα εξήχθησαν και στην περίπτωση του συμπλόκου Cu_B^+-CO .²⁵ Επομένως, το περιβάλλον του Cu_B είναι άκαμπτο και στις δύο οξειδωτικές καταστάσεις του μετάλλου και το περιβάλλον του διπυρηνικού κέντρου (pH/pD = 6,0-9,0) της ba_3 οξειδάσης δεν μεταβάλλει την κατάσταση πρωτονίωσης των πολικών καταλοίπων ιστιδίνης και της Tyr237, τα οποία είναι υποκαταστάτες του Cu_B . Η ομοιότητα της δόνησης $\nu(Fe^{2+}-NO_2^-)$ σε εύρος pH 6,0-9,0 και με ανταλλαγή H_2O/D_2O υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει κάποια πολική επίδραση από το περιβάλλον του Cu_B που θα μπορούσε να επηρεάσει το δεσμό $Fe-NO_2^-$ και έτσι η δομή του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-NO_2^-$ παραμένει αμετάβλητη. Λαμβάνοντας υπόψη τα πιο πάνω, τα δεδομένα μας καθώς και αυτά που έχουν αναφερθεί προηγουμένως αποδεικνύουν ότι το μακρινό περιβάλλον της αίμης a_3 δεν επηρεάζει σημαντικά την ισχύ και τον τρόπο δέσμευσης των υποκαταστατών στην αίμη a_3 .¹⁸

Όπως φαίνεται από τα φάσματα RR της ανηγμένης ba_3 οξειδάσης στο φάσμα b του σχήματος 7.2.2, παρατηρούνται δύο δονήσεις του δεσμού Fe-εγγύς ιστιδίνης, $\nu(Fe-His)$, στους 193 και 209 cm^{-1} .^{17, 26} Η εγγύς ιστιδίνη, His384 στην ba_3 οξειδάση, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Gly359 (Σχήμα 7.3.1). Η μεταβολή στην κατάσταση του συγκεκριμένου δεσμού, έχει χρησιμοποιηθεί για να εξηγήσει το διαχωρισμό της δόνησης Fe-His. Ως εκ τούτου, η δόνηση $\nu(Fe-His)$ στους 193 cm^{-1} αποδίδεται σε διαμόρφωση όπου σχηματίζεται πολύ ασθενής δεσμός υδρογόνου, ενώ η δόνηση $\nu(Fe-His)$ στους 209 cm^{-1} οφείλεται σε διαμόρφωση με μερική αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου μεταξύ της His384 και της Gly359.²⁶ Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον της εγγύς ιστιδίνης ελέγχει την ισχύ του δεσμού Fe-His384 κατά τη δέσμευση υποκαταστατών (CO vs NO).^{18, 26} Με αυτόν τον τρόπο, η χαμηλή συχνότητα της δόνησης τάσης του δεσμού Fe-NO που ανιχνεύθηκε στην ba_3 οξειδάση, σε σύγκριση με τη μυοσφαιρίνη, αποδόθηκε στο σχηματισμό ασθενέστερου δεσμού Fe-His στην ba_3 οξειδάση.¹⁸ Τα RR δεδομένα μας αποδεικνύουν ξεκάθαρα το σχηματισμό μιας διαμόρφωσης στο παράγωγο της αίμης $a_3-NO_2^-$, εφόσον ανιχνεύεται μια μόνο δόνηση

$\nu(Fe-NO_2^-)$ στους 568 cm^{-1} και ότι ο δεσμός Fe-His384 παραμένει άθικτος στο σύμπλοκο αυτό.

Συνοψίζοντας, κατά την αντίδραση της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- παρουσία κυστεΐνης σχηματίζεται το σύμπλοκο αίμης $a_3\text{ Fe}^{2+}-NO_2^-$, το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε φασματοσκοπικά για πρώτη φορά. Το σύμπλοκο έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες, υποδηλώνοντας πιθανή διαφορετική δραστικότητα ως προς το NO_2^- μεταξύ βακτηριακών οξειδασών και οξειδασών των θηλαστικών. Επίσης, αποδείχθηκε ότι τα πολικά κατάλοιπα του Cu_B , σε αντίθεση με τη μυοσφαιρίνη, δεν κατευθύνουν τη δέσμευση του NO_2^- (νίτρο έναντι νίτριτο δέσμευσης) στο Fe της αίμης. Επιπλέον, προτείνεται ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον της εγγύς ιστιδίνης ελέγχει το δεσμό Fe-His384 κατά τη δέσμευση υποκαταστατών στην ba_3 οξειδάση.

7.4 Βιβλιογραφία

1. Maia, L. B.; Moura, J. J. G., How Biology Handles Nitrite. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (10), 5273-5357.
2. Gladwin, M. T.; Kim-Shapiro, D. B., The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. **2008**, *112*, 2636-2647.
3. Gladwin, M. T.; Grubina, R.; Doyle, M. P., The New Chemical Biology of Nitrite Reactions with Hemoglobin: R-State Catalysis, Oxidative Denitrosylation, and Nitrite Reductase/Anhydrase. *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42* (1), 157-167.
4. Castello, P. R.; David, P. S.; McClure, T.; Crook, Z.; Poyton, R. O., Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism* **2006**, *3* (4), 277-287.
5. Averill, B. A., Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (7), 2951-2964.
6. Williams, P. A.; Fulop, V.; Garman, E. F.; Saunders, N. F. W.; Ferguson, S. J.; Hajdu, J., Haem-ligand switching during catalysis in crystals of a nitrogen-cycle enzyme. *Nature* **1997**, *389* (6649), 406-412.
7. Yi, J.; Safo, M. K.; Richter-Addo, G. B., The Nitrite Anion Binds to Human Hemoglobin via the Uncommon O-Nitrito Mode. *Biochemistry* **2008**, *47* (32), 8247-8249.
8. Yi, J.; Heinecke, J.; Tan, H.; Ford, P. C.; Richter-Addo, G. B., The Distal Pocket Histidine Residue in Horse Heart Myoglobin Directs the O-Binding Mode of Nitrite to the Heme Iron. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (50), 18119-18128.

9. Yi, J.; Orville, A. M.; Skinner, J. M.; Skinner, M. J.; Richter-Addo, G. B., Synchrotron X-ray-Induced Photoreduction of Ferric Myoglobin Nitrite Crystals Gives the Ferrous Derivative with Retention of the O-Bonded Nitrite Ligand. *Biochemistry* **2010**, *49* (29), 5969-5971.
10. Antonyuk, S. V.; Strange, R. W.; Sawers, G.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S., Atomic resolution structures of resting-state, substrate- and product-complexed Cu-nitrite reductase provide insight into catalytic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (34), 12041-12046.
11. George, S. J.; Allen, J. W. A.; Ferguson, S. J.; Thorneley, R. N. F., Time-resolved Infrared Spectroscopy Reveals a Stable Ferric Heme-NO Intermediate in the Reaction of *Paracoccus pantotrophus* Cytochrome cd_1 Nitrite Reductase with Nitrite. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275* (43), 33231-33237.
12. Sam, K. A.; Strampraad, M. J. F.; de Vries, S.; Ferguson, S. J., Very Early Reaction Intermediates Detected by Microsecond Time Scale Kinetics of Cytochrome cd_1 -catalyzed Reduction of Nitrite. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283* (41), 27403-27409.
13. Cutruzzolà, F.; Brown, K.; Wilson, E. K.; Bellelli, A.; Arese, M.; Tegoni, M.; Cambillau, C.; Brunori, M., The nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*: Essential role of two active-site histidines in the catalytic and structural properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (5), 2232-2237.
14. Brenner, S.; Heyes, D. J.; Hay, S.; Hough, M. A.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S.; Scrutton, N. S., Demonstration of Proton-coupled Electron Transfer in the Copper-containing Nitrite Reductases. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (38), 25973-25983.
15. Hematian, S.; Siegler, M. A.; Karlin, K. D., Heme/Copper Assembly Mediated Nitrite and Nitric Oxide Interconversion. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (46), 18912-18915.
16. Varotsis, C.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The Structure of the Hyponitrite Species in a Heme Fe-Cu Binuclear Center. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (13), 2210-2214.
17. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdottir, O.; Fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H., Spectroscopic characterization of cytochrome ba_3 , a terminal oxidase from *Thermus thermophilus*: Comparison of the a_3/Cu_B site to that of bovine cytochrome aa_3 . *Biochemistry* **1994**, *33* (10), 3128-3141.

18. Pinakoulaki, E.; Ohta, T.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of the His-Heme Fe^{2+} -NO Species in the Reduction of NO to N_2O by ba_3 -Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (43), 15161-15167.
19. Nakamoto, K., *In Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination Chemistry, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Son, 6th Ed. **2008**, pp 1-273.
20. Novozhilova, I. V.; Coppens, P.; Lee, J.; Richter-Addo, G. B.; Bagley, K. A., Experimental and Density Functional Theoretical Investigations of Linkage Isomerism in Six-Coordinate $\{FeNO\}^6$ Iron Porphyrins with Axial Nitrosyl and Nitro Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (6), 2093-2104.
21. Tomita, T.; Hirota, S.; Ogura, T.; Olson, J. S.; Kitagawa, T., Resonance Raman Investigation of Fe-N-O Structure of Nitrosylheme in Myoglobin and Its Mutants. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (33), 7044-7054.
22. Coyle, C. M.; Vogel, K. M.; Rush, T. S.; Kozlowski, P. M.; Williams, R.; Spiro, T. G.; Dou, Y.; Ikeda-Saito, M.; Olson, J. S.; Zgierski, M. Z., FeNO Structure in Distal Pocket Mutants of Myoglobin Based on Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42* (17), 4896-4903.
23. Soulimane, T.; Buse, G.; Bourenkov, G. P.; Bartunik, H. D.; Huber, R.; Than, M. E., Structure and mechanism of the aberrant ba_3 -cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J* **2000**, *19* (8), 1766-1776.
24. Loullis, A.; Noor, M. R.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., Observation of Ligand Transfer in ba_3 Oxidase from *Thermus thermophilus*: Simultaneous FTIR Detection of Photolabile Heme a_3^{2+} -CN and Transient Cu_B^{2+} -CN Complexes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (30), 8955-8960.
25. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Varotsis, C., Observation of the Equilibrium Cu_B -CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme a_3 Propionates in Cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*: FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) AND TIME-RESOLVED STEP-SCAN FTIR STUDIES. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277* (36), 32860-32866.
26. Ohta, T.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of a Photostable Five-Coordinate Heme a_3 -Fe-CO Species and Functional Implications of His384/α10 in CO-Bound ba_3 -Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus thermophilus*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (18), 5489-5491.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

**Μελέτη της Δράσης Αναγωγής του Νιτρώδους Ιόντος και του
Μονοξειδίου του Αζώτου της cb_3 Οξειδάσης**

8.1 Εισαγωγή

Ο μοριακός μηχανισμός λειτουργίας των αιμοχαλκοξειδασών, όσον αφορά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό και την άντληση πρωτονίων, έχει διερευνηθεί εκτεταμένα και τα βασικά στοιχεία του έχουν διευκρινιστεί.¹⁻³ Εκτός από την αναγωγή του O_2 , κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών έχουν περιγραφεί επιπρόσθετες καταλυτικές λειτουργίες των αιμοχαλκοξειδασών. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι οι μιτοχονδριακές οξειδάσες έχουν την ικανότητα να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO_2^- σε NO ($\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$) κάτω από υποξικές συνθήκες. Η ικανότητα αυτή, περιγράφει τον πιθανό ρόλο των αιμοχαλκοξειδασών σε μονοπάτια σηματοδότησης, καθώς το NO λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο και αποτελεί μόριο εξαιρετικής σημασίας στους ζωντανούς οργανισμούς, αφού ρυθμίζει μεγάλο εύρος λειτουργιών τους.⁴⁻⁵ Περαιτέρω, οι βακτηριακές οξειδάσες, συμπεριλαμβανομένου των caa_3 και ba_3 οξειδασών από το βακτήριο *T. thermophilus*, της cbb_3 οξειδάσης από το βακτήριο *P. stutzeri* και της bo_3 κινολικής οξειδάσης από το βακτήριο *E. coli*, είναι ικανές να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO σε N_2O ($\text{NO} + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$) σε αντίθεση με τις αιμοχαλκοξειδάσες των θηλαστικών.⁶⁻⁸ Η αναγωγή του NO_2^- σε NO και του NO σε N_2O αποτελούν ενδιάμεσα βήματα του σταδίου της απονιτροποίησης, στον κύκλο του αζώτου. Το στάδιο της απονιτροποίησης είναι το τμήμα του βιοχημικού κύκλου του αζώτου, κατά τον οποίο πραγματοποιείται αναγωγή των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) σε μοριακό άζωτο (N_2) σε τέσσερα διαδοχικά βήματα ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) και απαντάται σε μεγάλο εύρος οργανισμών, από αρχαία σε ευβακτήρια, ακόμα και σε μερικά ευκαρυωτικά.^{5,9} Επιπλέον, είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα βακτήρια είναι αναγκαίο να ανταποκρίνονται σε διάφορες εξωτερικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένου του NO , κατά τη διάρκεια ζωής τους. Αυτό παρατηρείται στους παθογόνους οργανισμούς, οι οποίοι υποβάλλονται στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος των θηλαστικών.

Οι ποικίλοι βιολογικοί ρόλοι του NO_2^- και του NO υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα της διαλεύκανσης της θεμελιώδους χημείας που πραγματοποιείται κατά την αναγωγή αυτών των μικρών μορίων. Η αναγωγή των υποστρωμάτων (NO_2^- και NO) πραγματοποιείται στο διμεταλλικό κέντρο αίμης/χαλκού των αιμοχαλκοξειδασών, ωστόσο ο ρόλος του κάθε μετάλλου και τα ενδιάμεσα που σχηματίζονται κατά τις αντιδράσεις δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί. Πρόσφατα έχουν συντεθεί μοντέλα δομών αίμης/χαλκού και οι αντιδράσεις τους με το NO_2^- έχουν μελετηθεί.¹⁰ Στο κεφάλαιο 7 πραγματοποιήθηκε η μελέτη της αντίδρασης της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Κατά την αντίδραση σχηματίστηκε το παράγωγο αίμης $a_3\text{Fe}^{2+}\text{-NO}_2^-$, το οποίο χαρακτηρίστηκε με τη

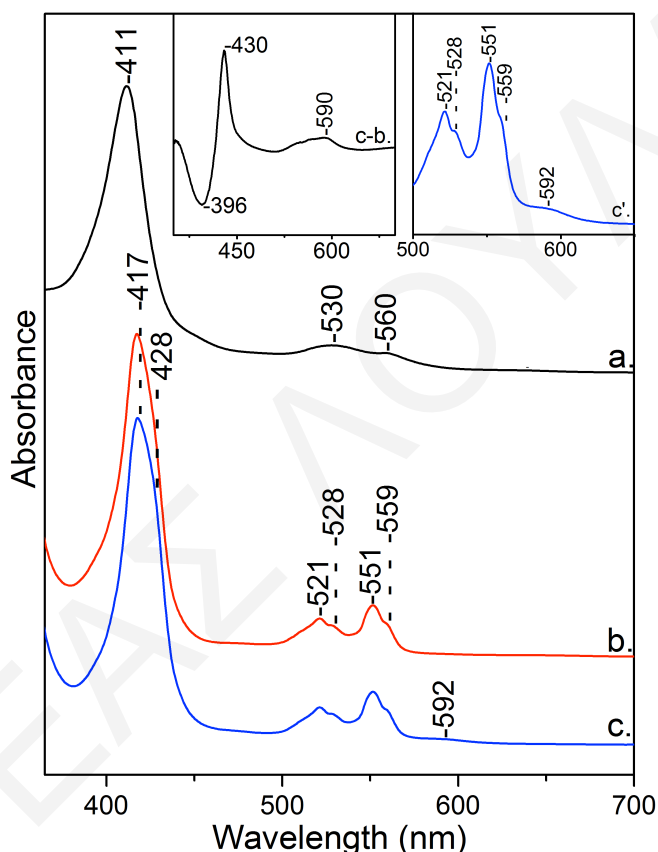
φασματοσκοπία RR, υποδεικνύοντας ότι οι βακτηριακές οξειδάσες και οι οξειδάσες των θηλαστικών πιθανόν να παρουσιάζουν διαφορετική δραστικότητα ως προς το NO_2^- .¹¹ Η διαφορετική δραστικότητα ως προς τα πιθανά υποστρώματα δεν προκαλεί εκπλήξη καθώς, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι βακτηριακές οξειδάσες (ba_3 , caa_3 και bo_3) έχουν την ικανότητα να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO σε N_2O σε αντίθεση με τις οξειδάσες των θηλαστικών.⁶⁻⁸ Αξιοσημείωτο, είναι ότι ο μοριακός μηχανισμός αναγωγής του NO σε N_2O από τις αιμοχαλκοξειδάσες δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί, καθώς παρατηρήθηκαν διαφορετικά ενδιάμεσα ανάλογα με το κάθε μέλος της αιμοχαλκοξειδάσης που μελετήθηκε. Κατά την αντίδραση της οξειδωμένης cbb_3 οξειδάσης με το NO σχηματίζεται το εξα-υποκατεστημένο αίμης b_3 -νιτρόζυλ σύμπλοκο $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$, ενώ κάτω από αναγωγικές συνθήκες ο δεσμός της εγγύς His- Fe_{b_3} διασπάται και σχηματίζεται το πεντα-υποκατεστημένο αίμης b_3 -νιτρόζυλ σύμπλοκο $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$.¹²⁻¹³ Από μελέτη της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το NO , με φασματοσκοπία UV και Vis συντονισμού Raman, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του συμπλόκου αίμης a_3 -υπονιτρόδους (HO-N=NO^-).¹⁴⁻¹⁵ Περαιτέρω, κάτω από αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες ανιχνεύθηκε το εξα-υποκατεστημένο αίμης a_3 -νιτρόζυλ σύμπλοκο $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ και προτάθηκε ότι το υπονιτρόδες παράγωγο σχηματίζεται μεταβατικά.¹⁶ Ο ρόλος του Cu_B παραμένει ασαφής, καθώς τα πειράματα φωτόλυσης σε χαμηλή θερμοκρασία των παραγώγων $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ στις ba_3 και bo_3 οξειδάσες που μελετήθηκαν με φασματοσκοπία FTIR φανέρωσαν ότι κατά τη φωτοδιάσπαση του δεσμού Fe-NO σχηματίζεται το παράγωγο $\text{Cu}_B\text{-NO}$ στην ba_3 οξειδάση, το οποίο δεν σχηματίζεται στην bo_3 οξειδάση.¹⁷⁻¹⁸

Στον παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε με τις φασματοσκοπίες RR και FTIR, η αντίδραση του NO_2^- με την cbb_3 οξειδάση από το βακτήριο *P. stutzeri* κάτω από αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η cbb_3 οξειδάση καταλύει την αναγωγή του NO_2^- σε N_2O μέσω του σχηματισμού του παραγώγου αίμης b_3 $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$. Με βάση τις παρατηρήσεις μας, η cbb_3 οξειδάση είναι το πρώτο μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδάσων που αναγνωρίζεται ότι παρουσιάζει δραστικότητα αναγωγής των νιτροδών και αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου.

8.2 Αποτελέσματα

Στο φάσμα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης cbb_3 οξειδάσης (Σχήμα 8.2.1, φάσμα a) παρατηρούνται μέγιστα απορρόφησης στα 411, 530 και 560 nm. Η ανηγμένη από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάση (Σχήμα 8.2.1, φάσμα b) παρουσιάζει μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή Soret στα 417 και 428 nm και στην περιοχή των Q-bands στα 521, 528, 551 και

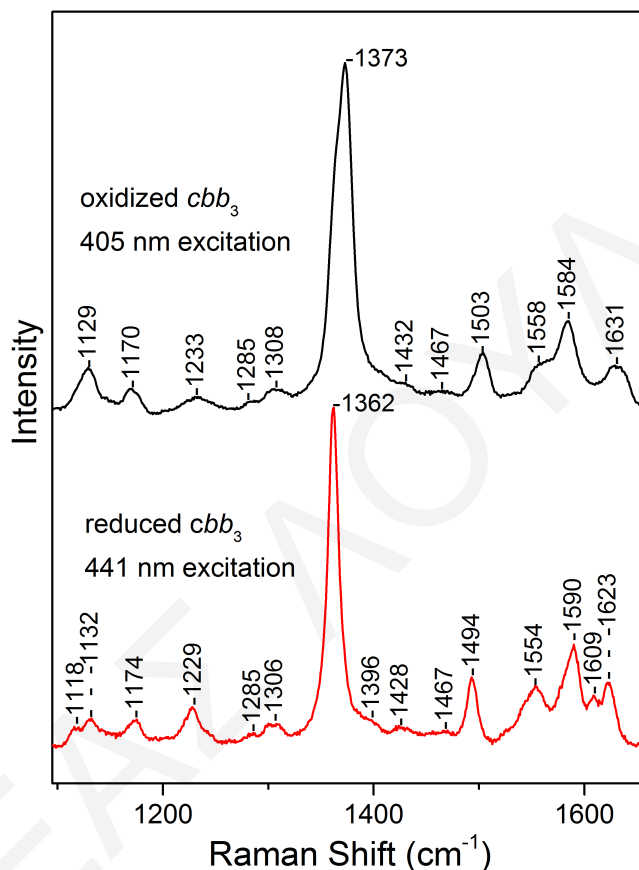
559 nm. Οι κορυφές στα 417, 521 και 551 nm είναι χαρακτηριστικές της αίμης c^{2+} ενώ οι ώμοι στα 428, 528 και 559 nm οφείλονται στις αίμες b^{2+} και b_3^{2+} . Μετά την προσθήκη NO_2^- στο ανηγμένο ένζυμο (Σχήμα 8.2.1, φάσμα c και φάσμα c' στο ένθετο) παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της κορυφής στα 428 nm και εμφάνιση ώμου στα 592 nm υποδηλώνοντας το σχηματισμό ενός συμπλόκου αίμης $b_3\text{Fe}^{2+}$. Ο σχηματισμός συμπλόκου επιβεβαιώνεται από το οπτικό φάσμα διαφοράς (Σχήμα 8.2.1, φάσμα c-b, ένθετο), το οποίο χαρακτηρίζεται από τις κορυφές στα 430 και 590 nm.



Σχήμα 8.2.1: Φάσματα οπτικής απορρόφησης της οξειδωμένης cbb_3 οξειδάσης (φάσμα a), της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης (φάσμα b) και μετά την προσθήκη NO_2^- στην ανηγμένη cbb_3 οξειδάση (φάσμα c) σε pH 7,5. Το φάσμα c' στο ένθετο δείχνει μεγενθυμένη την περιοχή 500 – 700 nm του φάσματος c και το φάσμα c-b στο ένθετο παρουσιάζει το φάσμα διαφοράς.

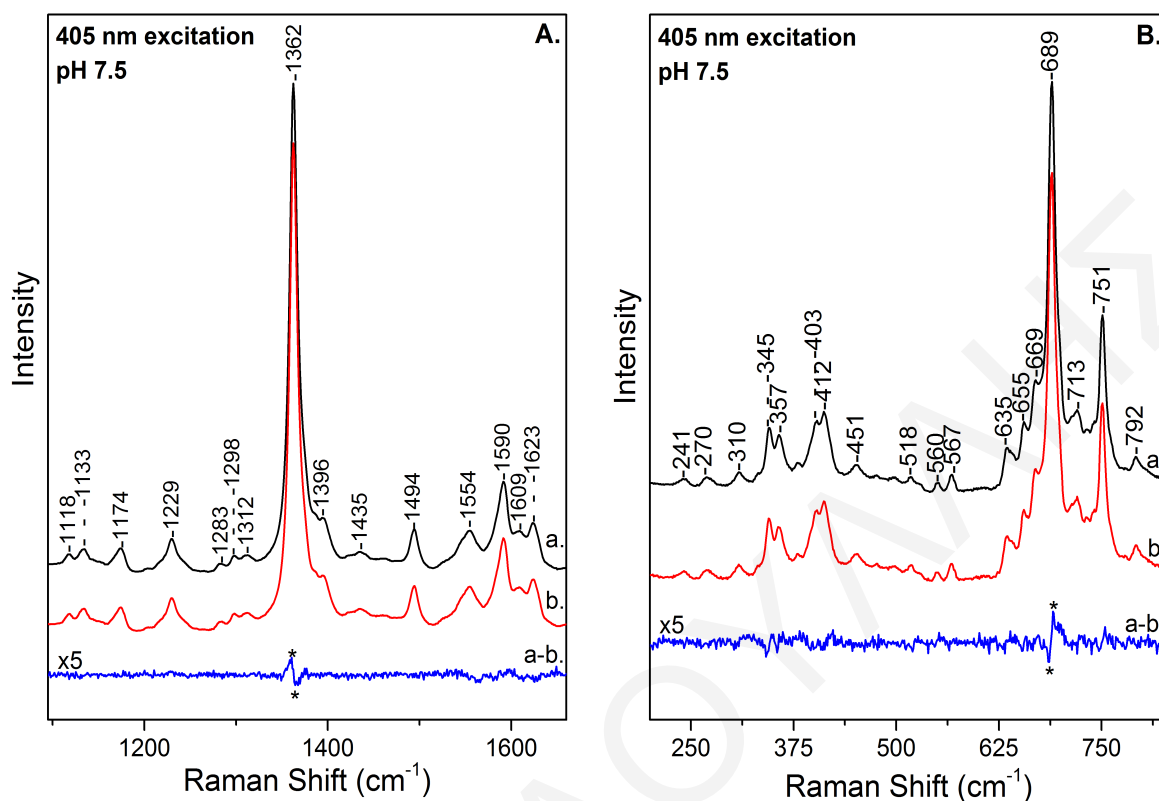
Τα RR φάσματα της οξειδωμένης και της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων παρουσιάζονται στο σχήμα 8.2.2 και είναι όμοια με αυτά από προηγούμενες αναφορές.¹⁹ Συνοπτικά, η δόνηση ν_4 που αναφέρεται στην π^* ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πορφυρινικού δακτυλίου, παρατηρείται στους 1362 cm^{-1} υποδεικνύοντας ότι οι αίμες βρίσκονται στην ανηγμένη κατάσταση. Οι δονήσεις ν_3 στους 1494 cm^{-1} και ν_2 στους 1590 cm^{-1} προέρχονται από τις χαμηλού σπιν αίμες c και b, ενώ η

αντίστοιχη δόνηση ν_2 για την αίμη b_3 παρατηρείται στους 1467 cm^{-1} . Για τη μελέτη της αντίδρασης της ανηγμένης cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- χρησιμοποιήθηκε κυστεΐνη, η οποία όπως αναφέρθηκε στο κεφ. 7 είναι ήπιο αναγωγικό, αντί άλλα αναγωγικά που χρησιμοποιούνται ευρέως, όπως διθειονικά ή ασκορβικά άλατα, έτσι ώστε να αποφευχθεί η μη ενζυματική αναγωγή του NO_2^- .



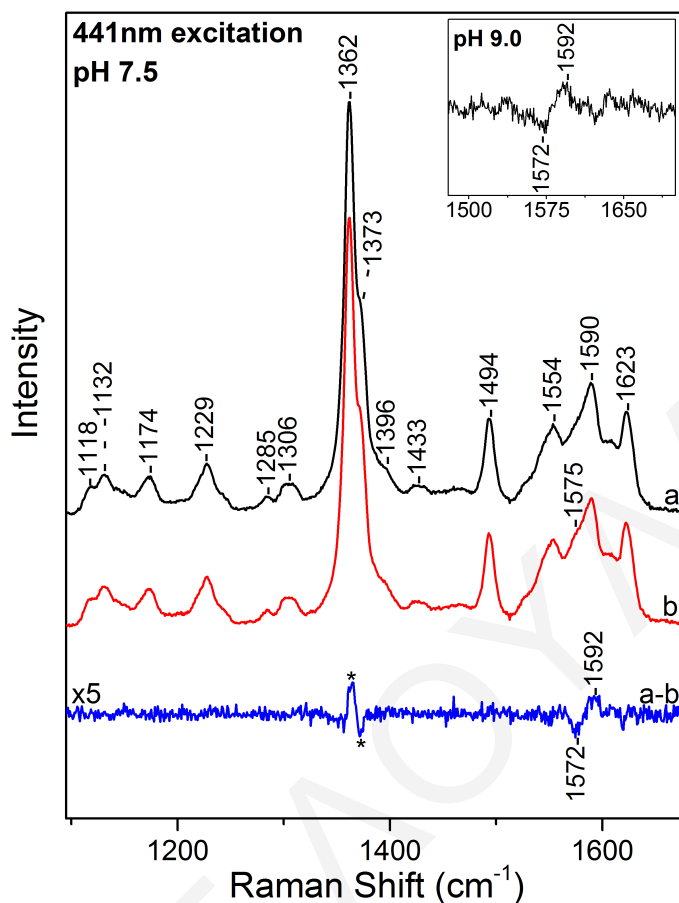
Σχήμα 8.2.2: Φάσματα RR της cbb_3 οξειδάσης στην οξειδωμένη (φάσμα a) και στην ανηγμένη από κυστεΐνη (φάσμα b) μορφή στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκη κύματος διέγερσης στα 405 nm και 441 nm για την οξειδωμένη και την ανηγμένη μορφή της cbb_3 οξειδάσης, αντίστοιχα. Η ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα ήταν στα 4mW.

Στο σχήμα 8.2.3 παρουσιάζονται τα RR φάσματα, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων των αντιδράσεων της ανηγμένης cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- που λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm. Όπως παρατηρείται τα φάσματα των δύο παραγώγων είναι όμοια μεταξύ τους τόσο στην περιοχή των υψηλών όσο και στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Επίσης, δεν παρατηρείται κάποιο μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής στα φάσματα διαφοράς, που να μπορεί να αποδοθεί σε ισοτοπικά ευαίσθητη δόνηση, υποδεικνύοντας ότι οι δονήσεις του παραγώγου που σχηματίζεται δεν ενισχύονται με διέγερση στα 405 nm.



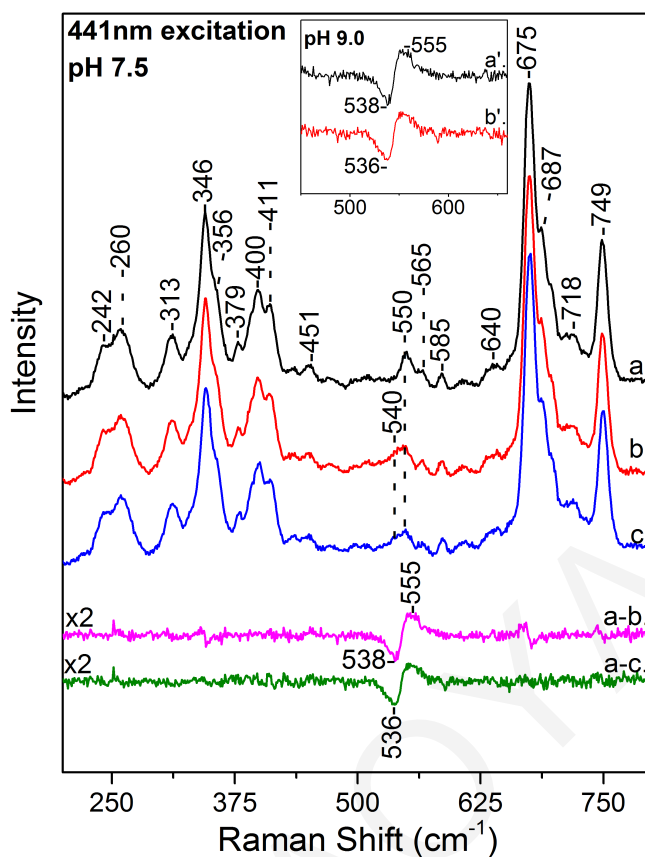
Σχήμα 8.2.3: Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a) και $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 405 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.

Στο σχήμα 8.2.4 παρουσιάζονται τα φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a) και το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5 που λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm. Οι πιο αξιοπρόσεκτες αλλαγές που παρατηρούνται στα φάσματα RR της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης μετά την προσθήκη NO_2^- , είναι η εμφάνιση ώμου στους 1373 cm^{-1} (ν_4) και η μετατόπιση της δόνησης ν_2 της αίμης b_3 στους 1494 cm^{-1} . Οι δονήσεις στους 1373 και 1494 cm^{-1} συμπίπτουν με τις αντίστοιχες δονήσεις των χαμηλού σπιν αιμών c και b , υποδεικνύοντας το σχηματισμό ενός εξα-υποκατεστημένου χαμηλού σπιν αίμης b_3 συμπλόκου. Επιπρόσθετα, παρατηρείται αύξηση της έντασης της δόνησης στους 1575 cm^{-1} στο φάσμα b (αντίδραση με το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$) σε σύγκριση με το φάσμα a (αντίδραση με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$). Στο φάσμα διαφοράς (φάσμα a-b) παρατηρείται μοτίβο θετικής/αρνητικής κορυφής στους $1592/1572\text{ cm}^{-1}$, φανερώοντας την παρουσία ισοτοπικά ευαίσθητης δόνησης, η οποία παραμένει αμετάβλητη σε pH 9,0 (Σχήμα 8.2.4, ένθετο).



Σχήμα 8.2.4: Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a) και $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστοιχο φάσμα διαφοράς σε pH 9,0. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.

Τα φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, της αντίδρασης της ανηγμένης cbb_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a), το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) και το $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα c) σε pH 7,5, που λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm, παρουσιάζονται στο σχήμα 8.2.5. Στο φάσμα a (αντίδραση με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$) παρατηρείται η δόνηση στους 550 cm^{-1} , η οποία μετατοπίζεται στους 540 cm^{-1} με τη χρήση $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ και $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσματα b και c, αντίστοιχα). Η παρουσία των μοτίβων θετικής/αρνητικής κορυφής στους $555/538\text{ cm}^{-1}$ και $555/536\text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα διαφοράς a-b και a-c, αντίστοιχα, επιβεβαιώνουν την ευαισθησία της δόνησης στους 550 cm^{-1} με την ισοτοπική αντικατάσταση αζώτου και οξυγόνου. Οι ίδιες συχνότητες παρατηρούνται και στα αντίστοιχα φάσματα διαφοράς σε pH 9,0 (Σχήμα 8.2.5, ένθετο).



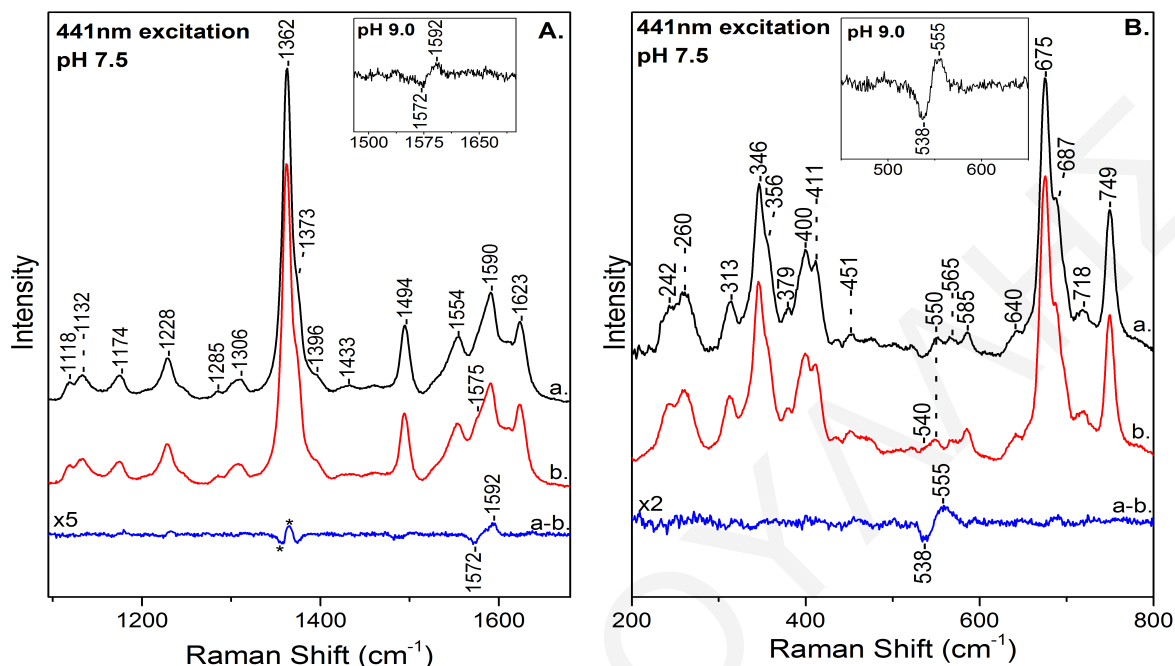
Σχήμα 8.2.5: Φάσματα RR, στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης που σχηματίζονται μετά την προσθήκη $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα a), $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ (φάσμα b) και $^{15}\text{N}^{18}\text{O}_2^-$ (φάσμα c) σε pH 7,5. Τα φάσματα a-b και a-c αναφέρονται στα φάσματα διαφοράς και είναι μεγενθυμένα κατά 2 φορές. Στο ένθετο παρουσιάζονται τα αντίστοιχα φάσματα διαφοράς σε pH 9,0. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.

Στη μελέτη της αντίδρασης της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ανίχνευση του νίτρο-συμπλόκου στο διμεταλλικό της κέντρο. Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε από τις δονήσεις τάσης $\nu(\text{Fe}^{2+}-\text{NO}_2^-)$ και κάμψης $\delta(\text{ONO})$ στους 568 και 786 cm^{-1} , αντίστοιχα.¹¹ Παρόλο που η δόνηση στους 555 cm^{-1} στην αντίδραση της cbb_3 οξειδάσης με NO_2^- εμφανίζεται σε συχνότητα πλησίον της δόνησης τάσης $\nu(\text{Fe}-\text{NO}_2)$ του νίτρο-παραγώγου της ba_3 οξειδάσης, εμπίπτει επίσης και στο εύρος των συχνοτήτων της δόνησης τάσης $\nu(\text{Fe}-\text{NO})$ των νιτρόζυλ-συμπλόκων. Συγκεκριμένα, η δόνηση τάσης $\nu(\text{Fe}-\text{NO})$ των εξα-υποκατεστημένων νιτρόζυλ-συμπλόκων στις ba_3 και bo_3 οξειδάσες έχει αναφερθεί στους 539 και 534 cm^{-1} , αντίστοιχα,^{16, 18} και του αντίστοιχου συμπλόκου στη μυοσφαιρίνη στους 551 cm^{-1} .²⁰ Επίσης πρέπει να επισημανθεί ότι πρόσφατες μελέτες δονητικής φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού (NRVS) των νιτρόζυλ-συμπλόκων της μυοσφαιρίνης και μοντέλων εξα-υποκατεστημένης αίμης-νιτρόζυλ συμπλόκων,

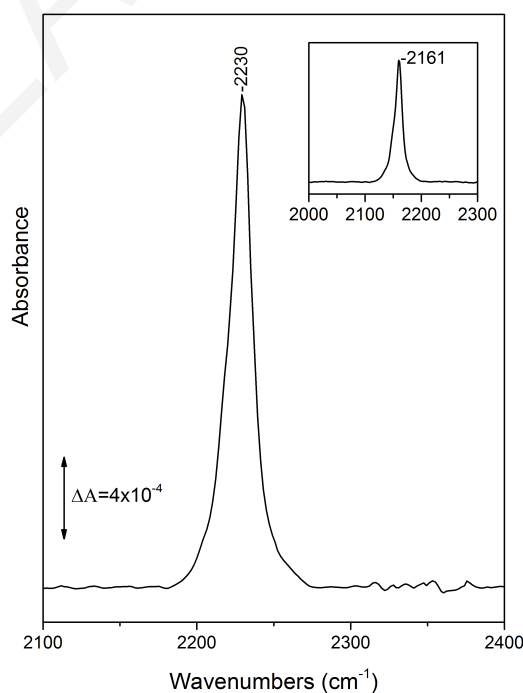
υποστηρίζουν ότι η δόνηση στους $\sim 550 \text{ cm}^{-1}$ (υψηλότερη συχνότητα δόνησης), που συνήθως αποδίδεται στη δόνηση τάσης $\nu(\text{Fe-NO})$ σε μελέτες RR, έχει σημαντική συνεισφορά από τη δόνηση κάμψης Fe-N-O και η χαμηλότερη συχνότητα δόνησης στους $\sim 450 \text{ cm}^{-1}$ μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης Fe-NO .²¹⁻²⁶ Με βάση τις μελέτες NRVS και εφόσον οι παρατηρούμενες ισοτοπικές μετατοπίσεις των παραγώγων ^{15}NO και $^{15}\text{N}^{18}\text{O}$ είναι σχεδόν παρόμοιες, η δόνηση στους 555 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση κάμψης $\delta(\text{Fe-N-O})$, λαμβάνοντας υπόψη ότι περιέχει σημαντική συνεισφορά από τη δόνηση τάσης Fe-NO . Εάν η δόνηση στους 555 cm^{-1} οφειλόταν κατά κύριο λόγο στη δόνηση τάσης Fe-NO τότε θα αναμενόταν μεγαλύτερη ισοτοπική μετατόπιση για το παράγωγο του $^{15}\text{N}^{18}\text{O}$ σε σύγκριση με το παράγωγο του ^{15}NO .²¹⁻²³ Για τη διαλεύκανση του συμπλόκου που σχηματίζεται λαμβάνεται υπόψη η δεύτερη ισοτοπικά ευαίσθητη δόνηση που παρατηρήθηκε στους 1592 cm^{-1} . Η δόνηση στους 1592 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση τάσης N-O του εξα-υποκατεστημένου συμπλόκου αίμης $b_3 \text{ Fe}^{2+}\text{-NO}$, καθώς η $\nu(\text{NO})$ εμφανίζεται σε εύρος $1590\text{-}1640 \text{ cm}^{-1}$ στα εξα-υποκατεστημένα νιτρόζυλ-σύμπλοκα και σε μεγαλύτερες συχνότητες ($1660\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$) στα πεντα-υποκατεστημένα παράγωγα,^{21-23, 27-29} ενώ οι συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης του δεσμευμένου στην αίμη NO_2^- αναμένονται σε εύρος $1300\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ στα νίτριτο-σύμπλοκα.³⁰ Ως εκ τούτου, αποδίδουμε τις δονήσεις στους 555 και 1592 cm^{-1} στις $\delta(\text{Fe-N-O})$ και $\nu(\text{N-O})$, αντίστοιχα του συμπλόκου αίμης $b_3 \text{ Fe}^{2+}\text{-NO}$. Οι ίδιες κορυφές ανιχνεύονται και στην περίπτωση της αντίδρασης της ανηγμένης cbb_3 οξειδάσης με το NO (Σχήμα 8.2.6) επιβεβαιώνοντας ότι το ίδιο σύμπλοκο αίμης $b_3 \text{ Fe}^{2+}\text{-NO}$ σχηματίζεται στις αντιδράσεις $\text{cbb}_3/\text{NO}_2^-$ και cbb_3/NO . Τα αποτελέσματά μας συνεπώς δείχνουν ότι η cbb_3 οξειδάση έχει την ικανότητα να ανάγει το NO_2^- σε NO σε σημαντικό ποσοστό και παρουσιάζει δραστηριότητα αναγωγάσης των νιτροδών.

Μετά την ανίχνευση του σχηματισμού του εξα-υποκατεστημένου αίμης b_3 -νιτρόζυλ-συμπλόκου $\text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ κατά την αντίδραση της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- , εξετάστηκε κατά πόσο σχηματίζεται N_2O ως τελικό προϊόν. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας FTIR έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί κατά πόσο η cbb_3 οξειδάση διατηρεί την ικανότητά της να λειτουργεί ως αναγωγάση του μονοξειδίου του αζώτου κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες. Στο σχήμα 8.2.7 παρουσιάζεται το φάσμα FTIR της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- , το οποίο εμφανίζει μια δόνηση στους 2230 cm^{-1} . Η δόνηση οφείλεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης N-N-O του N_2O ,¹⁷ και μετατοπίζεται στους 2161

cm^{-1} με τη χρήση $^{15}\text{NO}_2^-$ (Σχήμα 8.2.7, ένθετο). Στο αντίστοιχο πείραμα, απουσία του ενζύμου (επώαση NO_2^- με κυστεΐνη) δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός N_2O .

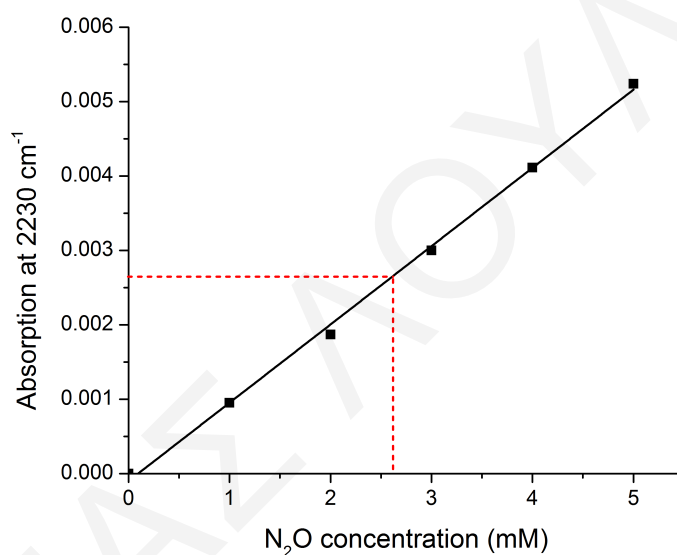


Σχήμα 8.2.6: Φάσματα RR, στην περιοχή των υψηλών (πλαίσιο A) και των χαμηλών (πλαίσιο B) συχνοτήτων, των παραγώγων της ανηγμένης από διθειονικά cbb_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ (φάσμα a) και το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$ (φάσμα b) σε pH 7,5. Το φάσμα a-b αναφέρεται στο φάσμα διαφοράς και είναι μεγενθυμένο κατά 5 φορές στην περιοχή των υψηλών και κατά 2 φορές στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Τα φάσματα λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm και ενέργεια ακτινοβολίας στο δείγμα στα 4 mW.



Σχήμα 8.2.7: Φάσμα FTIR της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το $^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$ συγκέντρωσης 6mM. Στο ένθετο παρουσιάζεται η αντίστοιχη αντίδραση με το $^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^-$.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραγώμενου N_2O κατά την αντίδραση $\text{cbb}_3/\text{NO}_2^-$ κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης της δόνησης στους 2230 cm^{-1} συναρτήσει της συγκέντρωσης του N_2O (Σχήμα 8.2.8). Από την απορρόφηση της δόνησης στους 2230 cm^{-1} της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- παρατηρείται ότι σχεδόν όλη η ποσότητα του NO_2^- μετατρέπεται σε N_2O υποδεικνύοντας ότι η cbb_3 οξειδάση καταλύει ποσοτικά την αναγωγή του NO_2^- σε N_2O . Ως εκ τούτου, αποδεικνύεται ότι η cbb_3 οξειδάση είναι ικανή να λειτουργεί ως αναγωγάση των νιτρωδών και του μονοξειδίου του αζώτου κάτω από αναγωγικές αναερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 8.2.8: Καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης της δόνησης στους 2230 cm^{-1} συναρτήσει της συγκέντρωσης του N_2O . Με κόκκινες διακεκομμένες γραμμές επισημαίνεται η απορρόφηση στους 2230 cm^{-1} που λήφθηκε από την αντίδραση $\text{cbb}_3/\text{NO}_2^-$ και η αντίστοιχη συγκέντρωση N_2O που παράχθηκε.

8.3 Συζήτηση

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στα σύμπλοκα του NO με αιμοπρωτεΐνες όταν ο Fe της αίμης βρίσκεται στην ανηγμένη κατάσταση, Fe^{2+} το NO δρα ως σ -δότης/ π -δέκτης.²¹⁻²⁹ Η διαφορά στην ισχύ του σ δεσμού οδηγεί σε απευθεία συσχέτιση των δονήσεων τάσης $\nu(\text{Fe}-\text{NO})$ και $\nu(\text{N}-\text{O})$, ενώ η αλλαγή στον π δεσμό επαναφοράς οδηγεί σε αντίστροφη σχέση των δονήσεων.²¹⁻²⁹ Ως εκ τούτου, ανάλογα με το πως επηρεάζεται ο δεσμός από τις αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου αίμης- NO με το πρωτεϊνικό περιβάλλον, προκαλείται διαφοροποίηση των δονήσεων $\text{Fe}-\text{N}-\text{O}$. Οι συχνότητες των δονήσεων τάσης $\nu(\text{Fe}-\text{NO})/\nu(\text{N}-\text{O})$ στα παράγωγα αίμης Fe^{2+} - NO στις ba_3 και bo_3 οξειδάσες αναφέρθηκαν στους $539/1620\text{ cm}^{-1}$ και $534/1616\text{ cm}^{-1}$, αντίστοιχα.¹⁶⁻¹⁷ Τα σύμπλοκα που ανιχνεύθηκαν

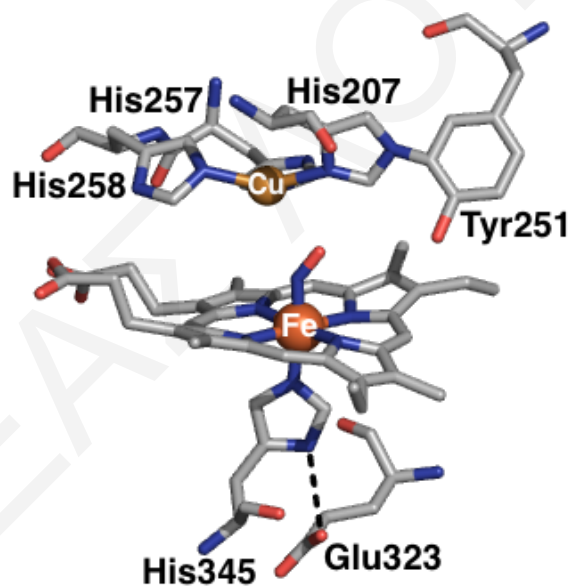
στις αντιδράσεις της cbb_3 οξειδάσης παρουσιάζουν αρκετά διαφορετική δομή, καθώς η δόνηση τάσης $\delta(\text{Fe-N-O})$ που εμφανίζεται στους 555 cm^{-1} είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες συχνότητες των ba_3 και bo_3 οξειδασών, ενώ η δόνηση τάσης $\nu(\text{N-O})$ στους 1592 cm^{-1} είναι σημαντικά μικρότερη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι συχνότητες του νιτρόζυλ-συμπλόκου της cbb_3 οξειδάσης βρίσκονται πιο κοντά σε αυτές του εξαυποκατεστημένου αίμης-νιτρόζυλ παραγώγου της φυσικού τύπου μυσφαιρίνης ($551/1612 \text{ cm}^{-1}$) και ιδιαίτερα σε αυτές του παραγώγου της μεταλλαγμένης μυσφαιρίνης V68N ($551/1595 \text{ cm}^{-1}$).²⁰ Τα RR δεδομένα της φυσικού τύπου και διαφόρων μεταλλάξεων στη μακρινή περιοχή της μυσφαιρίνης, καθώς και υπολογισμοί DFT υποδεικνύουν ότι το δεσμευμένο στην αίμη NO σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μέσω του ατόμου του αζώτου με το κατάλοιπο His64. Στο παράγωγο της μεταλλαγμένης μυσφαιρίνης V68N έχει προταθεί ότι η ασπαραγίνη σχηματίζει ισχυρότερο δεσμό υδρογόνου, μειώνοντας περαιτέρω τη συχνότητα $\nu(\text{N-O})$.^{20, 27-29} Οι υπολογισμοί DFT έχουν δείξει ότι οι δεσμοί Fe-N και N-O εξασθενούν όταν δέκτης δεσμού υδρογόνου είναι το N, ενώ όταν δέκτης δεσμού υδρογόνου είναι το O, ο δεσμός Fe-N ενισχύεται και ο δεσμός N-O εξασθενεί.²⁷⁻²⁹ Στην ba_3 οξειδάση, οι διαφορές στις συχνότητες των δονήσεων Fe-N-O σε σύγκριση με τη μυσφαιρίνη έχουν αποδοθεί στο πρωτεϊνικό περιβάλλον της εγγύς στην αίμη α_3 His384, που έχει προταθεί ότι ελέγχει την ισχύ του δεσμού Fe-His384 και καθορίζει τη δομή του αίμης α_3 -νιτρόζυλ συμπλόκου.¹⁶ Οι συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe-NO})/\delta(\text{Fe-N-O})$ και $\nu(\text{N-O})$ εξαυποκατεστημένων συμπλόκων αίμης-νιτρόζυλ διαφόρων αιμοχαλκοξειδασών και της μυσφαιρίνης συνοψίζονται στον Πίνακα 8.3.1.

Πίνακας 8.3.1: Συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe-NO})/\delta(\text{Fe-N-O})$ και $\nu(\text{N-O})$ (cm^{-1}) νιτρόζυλ-συμπλόκων σε αιμοχαλκοξειδάσες και στη μυσφαιρίνη.

	$\nu(\text{Fe-NO})/\delta(\text{Fe-N-O})$	$\nu(\text{N-O})$
ba_3 οξειδάση (<i>T.thermophilus</i>) ¹⁶	539 $\nu(\text{Fe-NO})$	1620
bo_3 οξειδάση (<i>E.coli</i>) ⁸	534 $\nu(\text{Fe-NO})$	1616
Mb φυσικού τύπου ²⁰	550 $\nu(\text{Fe-NO})$	1612
Mb V68N ²⁰	551 $\nu(\text{Fe-NO})$	1595
cbb_3 οξειδάση (<i>P.stutzeri</i>) ^{Παρούσα εργασία}	555 $\delta(\text{Fe-N-O})$	1592

Για την εξήγηση της ιδιαίτερης δομής του νιτρόζυλ-παραγώγου της cbb_3 οξειδάσης, σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα των ba_3 και bo_3 οξειδασών λαμβάνεται υπόψη η επίδραση του εγγύς και μακρινού περιβάλλοντος της αίμης (Σχήμα 8.3.1). Ωστόσο, η περίπλοκη και ισχυρά μεικτή φύση των δονήσεων τάσης Fe-NO και κάμψης Fe-N-O,

καθώς επίσης και οι αντιθέσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων των μελετών NRVS και RR για τα εξα-υποκατεστημένα αίμης Fe^{2+} -NO σύμπλοκα καθιστά περίπλοκη την αξιολόγηση της συνεισφοράς του κάθε παράγοντα.²⁰⁻²⁹ Στην cbb_3 οξειδάση, η αίμη b_3 είναι υποκατεστημένη με το κατάλοιπο His345, το οποίο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Glu323 αντί με κατάλοιπο γλυκίνης όπως στις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες.³ Ο δεσμός υδρογόνου με το κατάλοιπο γλουταμινικού αυξάνει τη βασικότητα της εγγύς ιστιδίνης και ενισχύει το δεσμό Fe-N_{His} της ανηγμένης αίμης b_3 . Ο ισχυρότερος δεσμός Fe-N_{His} στην cbb_3 οξειδάση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες οξειδάσες, αναμένεται να εξασθενήσει τους δεσμούς Fe-NO και N-O καθώς τα σ τροχιακά του NO και της ιστιδίνης συναγωνίζονται για τα d_z^2 τροχιακά του Fe (τρανς φαινόμενο).²⁴⁻²⁶ Αντίστροφα, η ισχυρή τρανς επίδραση του NO πιθανόν να εξασθενεί σημαντικά το δεσμό Fe-N_{His} κατά τη δέσμευση του NO στην αίμη b_3 .²⁴⁻²⁶



Σχήμα 8.3.1: Σχηματική αναπαράσταση του παραγώγου αίμης b_3 -νιτρόζυλ της cbb_3 οξειδάσης. Τα δομικά χαρακτηριστικά του διμεταλλικού κέντρου αίμης b_3/Cu_B λήφθηκαν από το αρχείο PDB 3MK7.³

Η εξήγηση αυτή συνάδει με την ανίχνευση του πεντα-υποκατεστημένου συμπλόκου αίμης b_3 -νιτρόζυλ σε προηγούμενη μελέτη RR.¹³ Στο μακρινό περιβάλλον της αίμης b_3 στην cbb_3 οξειδάση, παρατηρείται η ομοιοπολικά δεσμευμένη Tyr251 στο κατάλοιπο His207 του Cu_B , όπως παρατηρείται σε όλα τα μέλη της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδάσων.³ Ωστόσο, η πλευρική ομάδα της τυροσίνης προεξέχει προς την έλικα a7 και όχι προς την έλικα a8 και βρίσκεται $\sim 4 \text{ \AA}$ μακριά από τη θέση δέσμευσης του υποκαταστάτη, σε θέση που θα μπορούσε να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με το δεσμευμένο, στην αίμη, NO . Οι

πολικές αλληλεπιδράσεις στη μακρινή περιοχή από την Tyr251 μπορούν να αιτιολογήσουν τις συχνότητες που παρατηρήθηκαν για το σύμπλοκο αίμης b_3 -NO, με βάση τις ομοιότητες με το αντίστοιχο παράγωγο MbNO της μεταλλαγμένης μυοσφαιρίνης V68N.^{20, 27-29}

Η αντίδραση της cbb_3 οξειδάσης με NO_2^- παρουσία αναγωγικού οδηγεί στο σχηματισμό του εξα-υποκατεστημένου συμπλόκου αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO. Ο σχηματισμός του νίτρο- (δέσμευση του NO_2^- μέσω του ατόμου του αζώτου) ή του νίτριτο- (δέσμευση του NO_2^- μέσω του ατόμου του οξυγόνου) συμπλόκου δεν παρατηρήθηκε, πιθανόν λόγω του ότι το αρχικό ενδιάμεσο έχει μικρό χρόνο ημιζωής. Εξαιτίας αυτού, προτείνεται ότι κατά τη δέσμευση του NO_2^- στην αίμη b_3 πραγματοποιείται μεταφορά ηλεκτρονίου από την αίμη στον υποκαταστάτη με ταυτόχρονη διπλή πρωτονίωση που οδηγεί στην αναγωγή του NO_2^- σε NO και στην απελευθέρωση νερού. Η αίμη b_3 ταυτόχρονα επανανάγεται με μεταφορά ηλεκτρονίου είτε από το Cu_B είτε από την αίμη b , η οποία, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες, παρουσιάζει αλληλεπιδράσεις Van den Waals με την αίμη b_3 υποδεικνύοντας υψηλή ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο αιμών. Με αυτόν τον τρόπο, σχηματίζεται το εξα-υποκατεστημένο σύμπλοκο αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO που ανιχνεύθηκε, παγιδεύοντας το NO για τη μετέπειτα καταλυτική αντίδραση. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στην προηγούμενη μελέτη RR της αναγωγής του NO από την cbb_3 οξειδάση, ανιχνεύθηκε και χαρακτηρίστηκε το σύμπλοκο πεντα-υποκατεστημένης αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO ($\nu_{\text{Fe-NO}}=524 \text{ cm}^{-1}$ και $\nu_{\text{NO}}=1679 \text{ cm}^{-1}$) με μήκος κύματος διέγερσης στα 413 nm.¹³ Στην παρούσα μελέτη το εξα-υποκατεστημένης αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO σύμπλοκο ανιχνεύθηκε με μήκος κύματος διέγερσης στα 441 nm, τόσο στην αντίδραση της cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- όσο και στην αντίδραση με το NO. Τα δύο σύμπλοκα (πεντα- και εξα-υποκατεστημένης αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO) μπορούν επομένως να βρίσκονται σε ισορροπία στην αντίδραση της cbb_3 οξειδάσης με το NO, να ανιχνεύονται με διαφορετικό μήκος κύματος διέγερσης και η αναλογία τους να εξαρτάται από τις πειραματικές συνθήκες. Η αναγωγή του NO πραγματοποιείται με την προσβολή του δεσμευμένου, στην αίμη, NO από ένα δεύτερο μόριο NO. Στη συνέχεια πραγματοποιείται πρωτονίωση οδηγώντας στο σχηματισμό του μεταβατικού υπονιτρώδους συμπλόκου (HO-N=NO^-), το οποίο παρατηρήθηκε στις αντιδράσεις του NO με τις ba_3 και caa_3 οξειδάσες και τις βακτηριακές αναγωγάσες του μονοξειδίου του αζώτου.^{14-15, 31} Ως εκ τούτου σχηματίζεται ο δεσμός N-N. Με προσθήκη ακόμα ενός πρωτονίου και διάσπαση του δεσμού N-O σχηματίζεται N_2O και απελευθερώνεται νερό.

Συμπερασματικά, κατά την αντίδραση της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- σχηματίζεται το εξα-υποκατεστημένο σύμπλοκο αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}$ -NO, υποδεικνύοντας

τη δραστηριότητα της cbb_3 οξειδάσης ως αναγωγάση των νιτρωδών. Επιπλέον, το σχηματιζόμενο NO ανάγεται από την cbb_3 οξειδάση σε N_2O , αποδεικνύοντας ότι η cbb_3 οξειδάση διατηρεί την ικανότητά της ως αναγωγάση του NO κάτω από τις πειραματικές μας συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά, παρέχουν τη φασματοσκοπική απόδειξη ότι η cbb_3 οξειδάση έχει την ικανότητα να λειτουργεί ως αναγωγάση των νιτρωδών και του μονοξειδίου του αζώτου. Επίσης, περιγράφουν ένα πιθανό ρόλο, πέραν της αναγωγής του οξυγόνου στα βακτήρια συγκρίσιμο με το ρόλο των αιμοχαλκοξειδασών των θηλαστικών σε μονοπάτια σηματοδότησης με το NO .

8.4 Βιβλιογραφία

1. Yoshikawa, S.; Shimada, A., Reaction Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (4), 1936-1989.
2. Brzezinski, P.; Gennis, R., Cytochrome *c* oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *J Bioenerg Biomembr* **2008**, *40* (5), 521-531.
3. Buschmann, S.; Warkentin, E.; Xie, H.; Langer, J. D.; Ermler, U.; Michel, H., The Structure of cbb_3 Cytochrome Oxidase Provides Insights into Proton Pumping. *Science* **2010**, *329* (5989), 327-330.
4. Castello, P. R.; David, P. S.; McClure, T.; Crook, Z.; Poyton, R. O., Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metabolism* **2006**, *3* (4), 277-287.
5. Maia, L. B.; Moura, J. J. G., How Biology Handles Nitrite. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (10), 5273-5357.
6. Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sarti, P.; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T., The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: Evolutionary implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (26), 14718-14723.
7. Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A., The cytochrome cbb_3 from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity. *European Journal Of Biochemistry / FEBS* **2001**, *268* (24), 6486-6491.
8. Butler, C. S.; Forte, E.; Maria Scandurra, F.; Arese, M.; Giuffrè, A.; Greenwood, C.; Sarti, P., Cytochrome bo_3 from *Escherichia coli*: the binding and turnover of nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *296* (5), 1272-1278.

9. Averill, B. A., Dissimilatory Nitrite and Nitric Oxide Reductases. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (7), 2951-2964.
10. Hematian, S.; Siegler, M. A.; Karlin, K. D., Heme/Copper Assembly Mediated Nitrite and Nitric Oxide Interconversion. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (46), 18912-18915.
11. Loullis, A.; Noor, M. R.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The structure of a ferrous heme-nitro species in the binuclear heme a_3/Cu_B center of ba_3 -cytochrome c oxidase as determined by resonance Raman spectroscopy. *Chemical Communications* **2015**, *51* (2), 286-289.
12. Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Urbani, A.; Varotsis, C., Fourier Transform Infrared Evidence for a Ferric Six-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas Stutzeri* at Ambient Temperature. *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106* (50), 12860-12862.
13. Pinakoulaki, E.; Stavrakis, S.; Urbani, A.; Varotsis, C., Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex in Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (32), 9378-9379.
14. Varotsis, C.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Soulimane, T.; Pinakoulaki, E., The Structure of the Hyponitrite Species in a Heme Fe-Cu Binuclear Center. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (13), 2210-2214.
15. Ohta, T.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Nitric oxide activation by caa_3 oxidoreductase from *Thermus thermophilus*. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (16), 10894-10898.
16. Pinakoulaki, E.; Ohta, T.; Soulimane, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Detection of the His-Heme Fe^{2+} -NO Species in the Reduction of NO to N_2O by ba_3 -Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (43), 15161-15167.
17. Hayashi, T.; Lin, M. T.; Ganesan, K.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Gennis, R. B.; Moënne-Loccoz, P., Accommodation of Two Diatomic Molecules in Cytochrome bo_3 : Insights into NO Reductase Activity in Terminal Oxidases. *Biochemistry* **2009**, *48* (5), 883-890.
18. Hayashi, T.; Lin, I. J.; Chen, Y.; Fee, J. A.; Moënne-Loccoz, P., Fourier Transform Infrared Characterization of a Cu_B -Nitrosyl Complex in Cytochrome ba_3 from *Thermus thermophilus*: Relevance to NO Reductase Activity in Heme-Copper Terminal Oxidases. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (48), 14952-14958.

19. Pinakoulaki, E.; Varotsis, C., Resonance Raman Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase and cbb_3 Heme-Copper Oxidase. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (6), 1851-1857.
20. Coyle, C. M.; Vogel, K. M.; Rush, T. S.; Kozlowski, P. M.; Williams, R.; Spiro, T. G.; Dou, Y.; Ikeda-Saito, M.; Olson, J. S.; Zgierski, M. Z., FeNO Structure in Distal Pocket Mutants of Myoglobin Based on Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42* (17), 4896-4903.
21. Zeng, W.; Silvernail, N. J.; Wharton, D. C.; Georgiev, G. Y.; Leu, B. M.; Scheidt, W. R.; Zhao, J.; Sturhahn, W.; Alp, E. E.; Sage, J. T., Direct Probe of Iron Vibrations Elucidates NO Activation of Heme Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (32), 11200-11201.
22. Paulat, F.; Berto, T. C.; DeBeer George, S.; Goodrich, L.; Praneeth, V. K. K.; Sulok, C. D.; Lehnert, N., Vibrational Assignments of Six-Coordinate Ferrous Heme Nitrosyls: New Insight from Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (24), 11449-11451.
23. Lehnert, N.; Sage, J. T.; Silvernail, N.; Scheidt, W. R.; Alp, E. E.; Sturhahn, W.; Zhao, J., Oriented Single-Crystal Nuclear Resonance Vibrational Spectroscopy of [Fe(TPP)(MI)(NO)]: Quantitative Assessment of the trans Effect of NO. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49* (15), 7197-7215.
24. Praneeth, V. K. K.; Näther, C.; Peters, G.; Lehnert, N., Spectroscopic Properties and Electronic Structure of Five- and Six-Coordinate Iron(II) Porphyrin NO Complexes: Effect of the Axial N-Donor Ligand. *Inorganic Chemistry* **2006**, *45* (7), 2795-2811.
25. Berto, T. C.; Praneeth, V. K. K.; Goodrich, L. E.; Lehnert, N., Iron-Porphyrin NO Complexes with Covalently Attached N-Donor Ligands: Formation of a Stable Six-Coordinate Species in Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (47), 17116-17126.
26. Goodrich, L. E.; Paulat, F.; Praneeth, V. K. K.; Lehnert, N., Electronic Structure of Heme-Nitrosyls and Its Significance for Nitric Oxide Reactivity, Sensing, Transport, and Toxicity in Biological Systems. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49* (14), 6293-6316.
27. Ibrahim, M.; Xu, C.; Spiro, T. G., Differential Sensing of Protein Influences by NO and CO Vibrations in Heme Adducts. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (51), 16834-16845.

28. Spiro, T. G.; Soldatova, A. V.; Balakrishnan, G., CO, NO and O₂ as Vibrational Probes of Heme Protein Interactions. *Coordination chemistry reviews* **2013**, 257 (2), 511-527.
29. Xu, C.; Spiro, T. G., Ambidentate H-bonding by heme-bound NO: structural and spectral effects of -O vs -N H-bonding. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13 (4), 613-621.
30. Nakamoto, K., *In Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part B: Applications in Coordination Chemistry, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Son, 6th Ed. **2008**, pp 1-273.
31. Daskalakis, V.; Ohta, T.; Kitagawa, T.; Varotsis, C., Structure and properties of the catalytic site of nitric oxide reductase at ambient temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2015**, 1847 (10), 1240-1244.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Συμπεράσματα-Μελλοντική Εργασία

9.1 Συμπεράσματα

Από τις μελέτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα, όσον αφορά τη δραστικότητα των ba_3 και cbb_3 οξειδασών.

Η μελέτη της αντίδρασης της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το CN^- οδήγησε στην εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων:

- Κατά την αντίδραση σχηματίζεται αρχικά γέφυρα μεταξύ του CN^- και των δύο μετάλλων, αίμη $a_3 Fe^{3+}-C\equiv N-Cu_B^{2+}$, η οποία απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά.
- Η αρχικά σχηματιζόμενη γέφυρα αντικαθίσταται από το φωτοευαίσθητο σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$.
- Φωτόλυση του συμπλόκου αίμης $a_3 Fe^{2+}-CN^-$ οδηγεί στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $Cu_B^{2+}-CN^-$, το οποίο σχηματίζεται σε μεγάλο ποσοστό και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής.
- Το ενεργό κέντρο δεσμεύει μόνο ένα μόριο κυανίου και ο Cu_B παραμένει στην οξειδωμένη του μορφή κατά το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου $a_3^{2+}/Cu_B^{2+}-CN^-$ όπου το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε κατάσταση μεικτού σθένους.
- Το περιβάλλον του Cu_B είναι άκαμπτο και δεν υποβάλλεται σε δομικές αλλαγές που να σχετίζονται με αλλαγή στην κατάσταση πρωτονίωσης των υποκαταστατών ιστιδίνης του Cu_B .

Από τη μελέτη της οξειδωμένης ba_3 οξειδάσης με το N_3^- συμπεραίνεται:

- Το N_3^- αλληλεπιδρά με δύο τρόπους με την ba_3 οξειδάση σχηματίζοντας δύο διαμορφώσεις.
- Στη μια διαμόρφωση το N_3^- δεσμεύεται μέσω δεσμών υδρογόνου με κατάλοιπα της πρωτεΐνης.
- Στη δεύτερη διαμόρφωση το N_3^- δεσμεύεται στο Cu_B σχηματίζοντας το σύμπλοκο $Cu_B^{2+}-N_3^-$.

Συμπερασματικά από τη μελέτη της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- :

- Κατά την αντίδραση της ba_3 οξειδάσης με το NO_2^- παρουσία ήπιου αναγωγικού σχηματίζεται το σύμπλοκο αίμης $a_3 Fe^{2+}-NO_2^-$, το οποίο απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε φασματοσκοπικά για πρώτη φορά.
- Ανάλυση του συμπλόκου με φασματοσκοπία συντονισμού Raman φανερώνει την παρουσία δύο ισοτοπικά ευαίσθητων δονήσεων, στους 568 και 786 cm^{-1} , οι οποίες αποδίδονται στη δόνηση τάσης $\nu(Fe-NO_2^-)$ και κάμψης $\delta(ONO)$, αντίστοιχα.

- Η δέσμευση του NO_2^- στο Fe της αίμης a_3 πραγματοποιείται μέσω του ατόμου του αζώτου (N-νίτρο-δέσμευση).
- Το περιβάλλον του Cu_B δεν επηρεάζει σημαντικά τη δομή του συμπλόκου και τα πολικά κατάλοιπά του δεν κατευθύνουν τη δέσμευση του NO_2^- (νίτρο έναντι νίτριτο δέσμευσης) στο Fe της αίμης a_3 .
- Το σύμπλοκο αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}\text{-NO}_2^-$ είναι σταθερό και έχει μεγάλο χρόνο ημιζώης υποδηλώνοντας πιθανή διαφορετική δραστηριότητα ως προς το NO_2^- μεταξύ βακτηριακών οξειδασών και οξειδασών των θηλαστικών.

Από την αντίστοιχη μελέτη της αντίδρασης της ανηγμένης από κυστεΐνη cbb_3 οξειδάσης με το NO_2^- συμπεραίνεται:

- Πραγματοποιείται καταλυτική αναγωγή του NO_2^- σε N_2O από την cbb_3 οξειδάση μέσω του μεταβατικού αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ συμπλόκου.
- Το σύμπλοκο αίμης $b_3 \text{Fe}^{2+}\text{-NO}$ χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις στους 555 και 1592 cm^{-1} αποδιδόμενες στις δονήσεις κάμψης $\delta(\text{Fe-N-O})$ και τάσης $\nu(\text{N-O})$, αντίστοιχα.
- Η cbb_3 οξειδάση παρουσιάζει δραστηριότητα αναγωγής των νιτροδών και του μονοξειδίου του αζώτου.

9.2 Μελλοντική Εργασία

Τα σύμπλοκα αίμης $a_3 \text{Fe}^{3+}\text{-C}\equiv\text{N-Cu}_B^{2+}$, αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}\text{-CN}^-/\text{Cu}_B^{2+}$, αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}\text{-CN}^-/\text{Cu}_B^+$, αίμης $a_3 \text{Fe}^{2+}/\text{Cu}_B^{2+}\text{-CN}^-$ και $\text{Cu}_B^{2+}\text{-N}_3^-$ που παρατηρήθηκαν θέτουν τις βάσεις για τη κατανόηση του περιβάλλοντος του Cu_B και του μηχανισμού των αντιδράσεων φωτοδιάσπασης στην ba_3 οξειδάση. Η μελέτη των μεταβατικών συμπλόκων με διαφορετικές τεχνικές θα βοηθήσει στην αποκάλυψη του μηχανισμού των αντιδράσεων φωτοδιάσπασης. Επίσης, θα είναι ενδιαφέρον αν πραγματοποιηθεί η μελέτη των συμπλόκων στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του βακτηρίου που είναι 70 °C, καθώς μελέτες σε αυτές τις θερμοκρασίες σπανίζουν στη βιβλιογραφία.

Οι μελέτες των αντιδράσεων της ba_3 οξειδάσης (κατηγορία B) και της cbb_3 οξειδάσης (κατηγορία C) έδειξαν τη διαφορετική δραστηριότητα ως προς το NO_2^- διαφορετικών μελών της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών. Η μελέτη της αντίδρασης με διαφορετικού τύπου οξειδάσες με φασματοσκοπικές τεχνικές χρονικής ανάλυσης θα δώσει πληροφορίες για τα ενεργά ενδιάμεσα που σχηματίζονται και θα βοηθήσει στη διαλεύκανση του μηχανισμού αναγωγής του NO_2^- από τα μέλη της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών.