

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

*FTIR και Time-Resolved Step-Scan FTIR μελέτες
της αντίδρασης του κυτοχρώματος cbb_3 με το CO
και το NO.*

ΣΤΑΥΡΟΣ ΣΤΑΥΡΑΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Εξεταστική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Βαρότσης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Δημήτριος Γανωτάκης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Αθανάσιος Κουτσολέλος
Καθηγητής Τμήματος Χημείας

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΤΑΥΡΑΚΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
71 409 Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα
Τηλέφωνο: 30-2810-393603, 6937191034
Fax: 30-2810-393601

e-mail: chem443@edu.uoc.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

1999-σήμερα

Εισαγωγή στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Βιοφυσικής Χημείας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Βαρώτση.

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «*Time-Resolved FTIR και Ηλεκτροχημικές μελέτες των cbb_3 , aa_3-600 και ba_3 οξειδασών*».

1995-1999

Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Βαθμός πτυχίου 7.5/10.

1990-1993

Λύκειο «Εστία Νέας Σμύρνης». Βαθμός απολυτηρίου 17 και 7/10.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

1999-2000

Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ με θέμα «Δομή και λειτουργία της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου».

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1999-2000

Βοηθός στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας Ι. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

1999-2000

Βοηθός στα Εργαστήρια Ανόργανης Χημείας Ι. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2001-2002

Βοηθός στην προετοιμασία των εργαστηρίων Βιοχημείας Ι. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

2001-2002 Βοηθός στα Εργαστήρια Βιοχημείας Ι . Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ Υποτροφία Τμήματος Χημείας για το ακαδημαϊκό έτος
2003-2004

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας “Μελέτες δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου αιμη b_3 -Cu_B του κυτοχρώματος cbb_3 ”. Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. Ηράκλειο Κρήτη, 6-10 Νοεμβρίου 2002.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- (1) Decay of the Transient Cu_B-CO Complex Is Accompanied by Formation of the Heme Fe-CO Complex of Cytochrome cbb_3 -CO at Ambient Temperatures: Evidence from Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3814-3815.
- (2) Direct 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*: FTIR and Time-Resolved Step-Scan FTIR Studies. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; and Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 32860–32866
- (3) Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex in Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. Pinakoulaki, E.; Stavrakis, S.; Urbani, A.; Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9378- 9379
- (4) Fourier Transform Infrared Evidence for a Six Coordinate Ferric Nitrosylheme b_3 Complex of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri* at Ambient Temperature. Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Urbani, A.; Varotsis, C. *J Phys. Chem. B* **2002**, 106,12860-12862
- (5) 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. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Soulimane, T.; and Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 14893-14896
- (6) Time-Resolved Fourier Transform Infrared Investigation of Heme-Copper Oxidases: Implications for an Oxygen Input and H₂O/H⁺ Output Channels. Koutsoupakis, K.;

Pinakoulaki, E.; Stavrakis, S.; Daskalakis V.; and Varotsis, C *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 347-352

- (7) A Novel Mixed Valence Heme *b* Fe³⁺/Cu¹⁺-CO Complex at Ambient Temperature
Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., and Varotsis, C *To be submitted*
- (8) Time-Resolved Resonance Raman and Time-Resolved Step-scan FTIR Studies of
Cytochrome *aa*₃-600 from *Bacillus Subtilis*. Stavrakis, S., and Varotsis, C *To be submitted*
- (9) A Spectroelectrochemical Study of a Six Coordinate Ferrous Nitrosylheme *a*₃ Complex of
Cytochrome *ba*₃ Oxidase from *Thermus Thermophilus*. Stavrakis, S., Chaniotakis, N., and
Varotsis, C *To be submitted*

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Άριστη (Certificate of Proficiency, University of Michigan).

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Γνώση και χρήση H/Y σε περιβάλλον Windows 98 και 2000.

Προγράμματα: Word, Excel, Power-Point, Microcal Origin, Photoshop, Corel Draw, Isis Draw, Ras-mol

CURRICULUM VITAE

STAVRAKIS STAVROS
University of Crete
Department of Chemistry
71409 Heraklion, Crete, Greece
Tel: 30-2810-393603, 6937191034
Fax: 30-2810-393601

e-mail: chem443@edu.uoc.gr

EDUCATION

1999-today

Ph.D. dissertation in Biophysical Chemistry under the supervision of Prof. Constantinos Varotsis. Department of Chemistry, University of Crete, Greece.

Thesis: «*Time-Resolved FTIR και Electrochemical studies of cbb₃, aa₃-600 και ba₃ oxidases*».

1995-1999

Bachelor in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Greece. Grade 7.5/10.

PARTICIPATION IN RESEARCH PROGRAMS

1999-2000

National Research Program PENED “Structure and function of the *NO reductase*”.

TEACHING EXPERIENCE

1999-2000

Teaching assistant in undergraduate laboratory exercises of Analytical Chemistry I. Department of Chemistry, University of Crete.

1999-2000

Teaching assistant in undergraduate laboratory exercises of Inorganic Chemistry I. Department of Chemistry, University of Crete.

2001-2002

Assistant in the preparation of Biochemistry I undergraduate laboratory exercises. Department of Chemistry, University of Crete.

2001-2002 Teaching assistant in the preparation of Biochemistry I, undergraduate laboratory exercises. Department of Chemistry, University of Crete.

SCHOLARSHIP

Department of Chemistry, University of Crete 2003-2004

PARTICIPATION IN CONFERENCES

Dynamic Studies of the Binuclear Center Heme b_3 -Cu_B of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri* Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. 19th National Chemistry Conference”, Iraklion, Crete, GREECE, 6-10 November 2002.

PUBLICATIONS

- (1) Decay of the Transient Cu_B-CO Complex Is Accompanied by Formation of the Heme Fe-CO Complex of Cytochrome cbb_3 -CO at Ambient Temperatures: Evidence from Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3814-3815.
- (2) Direct 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*: FTIR and Time-Resolved Step-Scan FTIR Studies. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; and Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 32860–32866
- (3) Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex in Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*. Pinakoulaki, E.; Stavrakis, S.; Urbani, A.; Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9378- 9379
- (4) Fourier Transform Infrared Evidence for a Six Coordinate Ferric Nitrosylheme b_3 Complex of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri* at Ambient Temperature. Stavrakis, S.; Pinakoulaki, E.; Urbani, A.; Varotsis, C. *J Phys. Chem. B* **2002**, 106,12860-12862
- (5) 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. Koutsoupakis, K.; Stavrakis, S.; Soulimane, T.; and Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 14893-14896

- (6) Time-Resolved Fourier Transform Infrared Investigation of Heme-Copper Oxidases: Implications for an Oxygen Input and H₂O/H⁺ Output Channels. Koutsoupakis, K.; Pinakoulaki, E.; Stavrakis, S.; Daskalakis V.; and Varotsis, C *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 347-352
- (7) A Novel Mixed Valence Heme *b* Fe³⁺/Cu¹⁺-CO Complex at Ambient Temperature Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., and Varotsis, C *To be submitted*
- (8) Time-Resolved Resonance Raman and Time-Resolved Step-scan FTIR Studies of Cytochrome *aa*₃-600 from *Bacillus Subtilis*. Stavrakis, S., and Varotsis, C *To be submitted*
- (9) A Spectroelectrochemical Study of a Six Coordinate Ferrous Nitrosylheme *a*₃ Complex of Cytochrome *ba*₃ Oxidase from *Thermus Thermophilus*. Stavrakis, S., Chaniotakis, N., and Varotsis, C *To be submitted*

FOREIGN LANGUAGES

English: Excellent (Certificate of Proficiency, University of Michigan).

EXPERIENCE IN PCs

Operating system: Windows 98, 2000, XP.

Programs: Word, Excel, Power-Point, Microcal Origin, Photoshop, Corel Draw, Isis Draw, Ras-mol.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της δομής και της δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών

Σε αυτή την εργασία περιγράφεται η κινητική μελέτη του συμπλόκου *cbb*₃-CO με την τεχνική της step-scan FTIR φασματοσκοπίας. Το κυτόχρωμα *cbb*₃ είναι η μοναδική αιμοχαλκοξειδάση στην οποία η διάσπαση του Cu_B-CO συμπλόκου συνοδεύεται από το σχηματισμό του Fe-CO συμπλόκου. Τα time-resolved FT-IR φάσματα της φωτοδιάσπασης του CO στη *cbb*₃ κυτοχρωμική οξειδάση δείχνουν ότι η ν(CO) δόνηση τάσης του Cu_B στους 2064 cm⁻¹ είναι ίδια με εκείνη του κυτοχρώματος *aa*₃ παρόλο που το κυτόχρωμα *cbb*₃ δεν περιέχει το cross-link His-Tyr244 και τη φαρνεσυλική αλυσίδα. Οι ταχύτητες που υπολογίσαμε για τη διάσπαση του CO από το Cu_B ($t_{1/2} = 120 \mu\text{s}$) και την επαναδέσμευση του στην αίμη *b*₃ ($t_{1/2} = 150 \mu\text{s}$) δείχνουν ότι το καθοριστικό στάδιο για την επαναδέσμευση του CO στην αίμη *b*₃ είναι ο αποσχηματισμός του Cu_B-CO συμπλόκου.

Σαν ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της αντίδρασης του κυτοχρώματος *cbb*₃ με το NO είναι ο χαρακτηρισμός του διπυρηνικού κέντρου κατά τη δέσμευση του NO. Γι αυτό το λόγο μελετήσαμε με φασματοσκοπία UV-Vis και FTIR τη δομή του υποκατεστημένου με NO κυτοχρώματος *cbb*₃ και τη συγκρίνουμε με αυτή των NO-συμπλόκων της αναγωγής του NO (NOR) και της μυοσφαιρίνης. Τα δεδομένα δείχνουν ότι το NO δεσμεύεται αποκλειστικά στην αίμη *b*₃ και όχι στο Cu_B. Αυτή είναι η πρώτη δονητική μελέτη της δέσμευσης του NO σε αιμοχαλκοξειδάση που βρίσκεται στην οξειδωμένη κατάσταση. Η απελευθέρωση του NO από την αίμη *b*₃ του *cbb*₃ δείχνει ότι το περιβάλλον της αίμης *b*₃ στο *cbb*₃ είναι λιγότερο πολικό από αυτό της NOR και ότι η ανοιχτή δομή του διπυρηνικού κέντρου *b*₃/Cu_B, συγκρινόμενη με τη κλειστή δομή του διπυρηνικού κέντρου *b*₃/μη-αιμικός Fe του NOR, διευκολύνει την θερμική απελευθέρωση του.

ABSTRACT

The aim of the present dissertation is the characterization of the structural and dynamic properties of the binuclear center upon binding of exogenous ligands as well as the determination of reduction potentials of cytochrome and quinol oxidases.

FTIR and time-resolved step scan FTIR have been applied for the investigation of the structure and dynamics of the binuclear site of cytochrome *cbb*₃-CO complex. The rates for the Cu_B-CO dissociation ($t_{1/2} = 120 \mu\text{s}$) and heme *b*₃-CO recombination ($t_{1/2} = 150 \mu\text{s}$) we have determined in this study suggest that the rate limiting step for the heme *b*₃ recombination of CO is the half-life of the Cu_B-CO complex. The time-resolved FTIR data reveal that in this *cbb*₃-type oxidase the decay of the transient Cu_B-CO complex is concurrent with the formation of the heme *b*₃-CO complex, and the $\nu(\text{CO})$ of Cu_B at 2064 cm^{-1} , despite the lack of the cross-link tyrosine 280, is similar to that observed in cytochrome *aa*₃.

As a first step in understanding the cytochrome *cbb*₃/NO reaction is the characterization of the binuclear center upon NO binding. In this work we report the NO-bound form of oxidized *cbb*₃ by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and compare it with that of the heme *b*₃³⁺-NO complex of NOR, and the NO complex of metmyoglobin. The data reported here demonstrate that NO binding occurs exclusively at the heme *b*₃ center and not at Cu_B. The absence of a negative charge in the binuclear center of heme *b*₃-Cu_B in conjunction with a more open pocket than in other heme-copper oxidases, lowers the energy barrier optimizing the efficiency of NO escape

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 1999-2002, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Χημείας Κωνσταντίνου Βαρώτση τον οποίο ευχαριστώ για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και τη συνεργασία σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ επίσης το Τμήμα Χημείας για την συμμετοχή μου στο μεταπτυχιακό του πρόγραμμα και για την χορήγηση υποτροφίας κατά το τελευταίο έτος των σπουδών μου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Dr κ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, τη Dr Εφη Πινακουλάκη και τη Dr Μαγδαληνή Βάμβουκα για τη συνεργασία και τη συναδελφικότητα τους.

Επίσης, ευχαριστώ τον Matti Saraste για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εργαστώ στο Εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Germany). Επίσης, ευχαριστώ την Sabine Gemeinhardt για την τεχνική υποστήριξη τους στην απομόνωση του κυτοχρώματος *cbb₃* από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* και της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *P. Denitrificans*. Επίσης, ευχαριστώ τον Dr. Andrea Urbani για την φιλιά και τη συνεργασία του κατά την διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Καθηγητές, Δ. Γανωτάκη, Α Κουτσολέλο, Μ. Ορφανόπουλο, Σ. Φαράντο, για την συμμετοχή τους σε αυτή.

Οι πιο θερμές μου ευχαριστίες απευθύνονται στη Σοφία Σωτηροπούλου, τη Μαίρη Φουσκάκη, το Βαγγέλη Δημάκη, τη Βίκυ Βαμβακάκη, το Μαρκο Τρικεριώτη και την Γεωργία Παγώνα για τη πολύτιμη φίλια και συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Σοφία Σωτηροπούλου για την ψυχολογική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε οικονομικά από υποτροφίες της Γ.Γ.Ε.Τ. (ΠΕΝΕΔ 99) και του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη στην διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	13
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Σύγκριση μεταξύ της δομής της κυτοχρωμικής οξειδάσης aa_3 και του κυτοχρώματος cbb_3	14
1.3 Τα ενδιάμεσα κατά την αναγωγή του O_2 από την κυτοχρωμική οξειδάση.....	17
1.4 Ο ρόλος της Tyrosine 244 στην ενεργοποίηση και αναγωγή του O_2	19
1.5 Διαφορές μεταξύ των περόξυ (P) και φερύλ (F) ενδιάμεσων.....	22
1.6 Μελέτες δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου αίμη a_3 -CuB σε χρονική κλίμακα απο picosecond σε kilosecond.....	23
Βιβλιογραφία.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	28
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ IR ΚΑΙ RAMAN.....	28
2.1 Εισαγωγή.....	28
2.2 Φαινόμενο Raman.....	28
2.3 Κβαντομηχανική περιγραφή της φασματοσκοπίας Raman.....	30
2.3.2 Δονητική Resonance Raman σκέδαση.....	32
2.4 Εισαγωγή στην τεχνική της φασματοσκοπίας Resonance Raman.....	34
2.4.1 Time-resolved Resonance Raman πειραματική διάταξη.....	36
2.4.2 Περιγραφή της τεχνικής συνεχούς ροής (Continuous Flow).....	39
2.5 Φασματοσκοπία IR.....	41
2.5.1 Η αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson.....	43
2.5.2 Περιγραφή της τεχνικής step-scan.....	45
2.5.3 Περιγραφή της Step-Scan FT-IR πειραματικής διάταξης.....	47
Βιβλιογραφία.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	49
ΨΥΛΙΚΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ CBB_3	49
3.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων και προετοιμασία μεμβρανών.....	49
3.2 Διαλυτοποίηση των μεμβρανών και απομόνωση του κυτοχρώματος cbb_3	50
3.3 Ηλεκτροφόρηση gel πολυακρυλαμίδιου.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	53
ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΤΟΥ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΑΙΜΗ B_3 -Cu _B ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ CBB_3	53
4.1 Μελέτες για τη φωτοδυναμική του υποκατεστημένου με CO κυτοχρώματος cbb_3	53
3.2 Μελέτες για δραστικότητα του κυτοχρώματος cbb_3 ως προς το O_2	60
Βιβλιογραφία.....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	66
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ CBB_3 ΩΣ NO-ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ.....	66
5.1 Εισαγωγή.....	66
5.2 Μελέτες της αντίδρασης του οξειδωμένου και ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO.....	70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

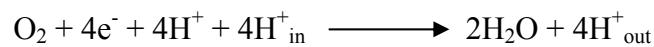
1.1 Εισαγωγή

Η απαρχή της αερόβιας βιολογίας σημειώθηκε δύο δισεκατομμύρια χρόνια πριν, όταν τα αρχέγονα κυανοβακτήρια ανέπτυξαν την ικανότητα να φωτοξειδώνουν το νερό. Το οξυγόνο απελευθερωνόταν ως προϊόν με αποτέλεσμα τα επίπεδα του ατμοσφαιρικού οξυγόνου να ανεβαίνουν πολύ γρήγορα. Αυτή η απότομη αλλαγή προς μια οξυγονωμένη ατμόσφαιρα οδήγησε σε μια καταστροφική ρύπανση, αλλά οι οργανισμοί εξελίχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να εκμεταλλευθούν την ικανότητά τους ως προς την αναγωγή του οξυγόνου. Οι ενεργές θέσεις των ενζύμων που ήταν ικανές να προσδένουν και να ενεργοποιούν το οξυγόνο εξελίχθηκαν και η αποτελεσματικότητα του μεταβολισμού της τροφής άλλαξε δραματικά. Για παράδειγμα το ποσό του ATP το οποίο παράγεται από την αερόβια μεταβολή της γλυκόζης αυξήθηκε κατά 20%. Οι ευκαρυώτικοι οργανισμοί εμφανίστηκαν λίγο μετά την αύξηση των επιπέδων του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα και ακολουθήθηκαν από τη ποικιλότητα των πολυκυτταρικών οργανισμών που υπάρχουν ως σήμερα. Στο τομέα της αερόβιας βιοχημείας το O₂ χρησιμοποιείται σε μια πληθώρα συνθετικών αντιδράσεων οι οποίες είναι απαραίτητες για διαδικασίες όπως, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή των κυττάρων

Το 95% του οξυγόνου το οποίο καταναλώνουμε χρησιμοποιείται στην αναπνοή. Υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από την τροφή διασχίζουν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια δημιουργώντας μια σειρά από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Αυτές οι μεταφορές ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη χημειοσυνθετικής πρωτονιακής διαβάθμισης η οποία μετέπειτα οδηγεί στην σύνθεση του ATP. Το ATP, η τριφωσφορική αδενοσίνη, αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για την κίνηση, τη βιοσύνθεση και την ενεργό μεταφορά των ιόντων και μορίων στα βιολογικά συστήματα. Το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων σε αυτή την αναπνευστική διαδικασία και η αναγωγή του σε νερό χρησιμοποιείται σαν μια διαδικασία καταστροφής των χαμηλής ενέργειας ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα αναπνοής έτσι ώστε να συμβαίνει συνεχής μεταφορά ηλεκτρονίων και μετατροπή ελεύθερης ενέργειας. Η παραπάνω διαδικασία

καταλύεται απο μια οικογένεια μεμβρανικών ενζύμων, τις τελικές οξειδάσες (κινολικές και κυτοχρωμικές) οι οποίες βρίσκονται σε ορισμένη διάταξη στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Χρησιμοποιώντας το οξυγόνο σαν υπόστρωμα η παραγωγή ελεύθερης ενέργειας είναι σημαντική εξαιτίας του υψηλού δυναμικού αναγωγής του οξυγόνου (0.815 V σε pH 7)

Οι κινολικές και κυτοχρωμικές οξειδάσες χρησιμοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την αναγωγή του O_2 σε H_2O για να μεταφέρουν τέσσερα H^+ από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης έξω στο διαμεμβρανικό χώρο λειτουργώντας έτσι ως οξειδοαναγωγικές αντλίες. Έτσι η συνολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές οξειδάσες έχει ως εξής



Ο όρος $4H^+$ αναφέρεται στα H^+ που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του νερού, ενώ οι όροι $4H^+_{in}$ και $4H^+_{out}$ συμβολίζουν τα H^+ που μετατοπίζονται μέσα και έξω απο την μεμβράνη αντίστοιχα. Η ταυτόχρονη μετατόπιση $4H^+$ ανά μόριο O_2 που ανάγεται, αυξάνει ακόμη περισσότερο τη διαμεμβρανική διαβάθμιση των H^+ και του φορτίου και διπλασιάζει την ενεργειακή απόδοση της αντίδρασης. Με αυτό το τρόπο οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες συνεισφέρουν μέγιστα στο ηλεκτροχημικό δυναμικό της μεμβράνης και επομένως στη διατήρηση της ενέργειας στο κύτταρο.

Η κυτοχρωμική οξειδάση ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα προσδένει, ενεργοποιεί και ανάγει μέχρι και 200 μόρια οξυγόνου ανά δευτερόλεπτο και συζεύγει την ενέργεια η οποία απελευθερώνεται από τη παραπάνω διαδικασία με την άντληση των πρωτονίων τα οποία συνεισφέρουν στη χημειοσμωτική διαβάθμιση.

1.2 Σύγκριση μεταξύ της δομής της κυτοχρωμικής οξειδάσης aa_3 και του κυτοχρώματος cbb_3

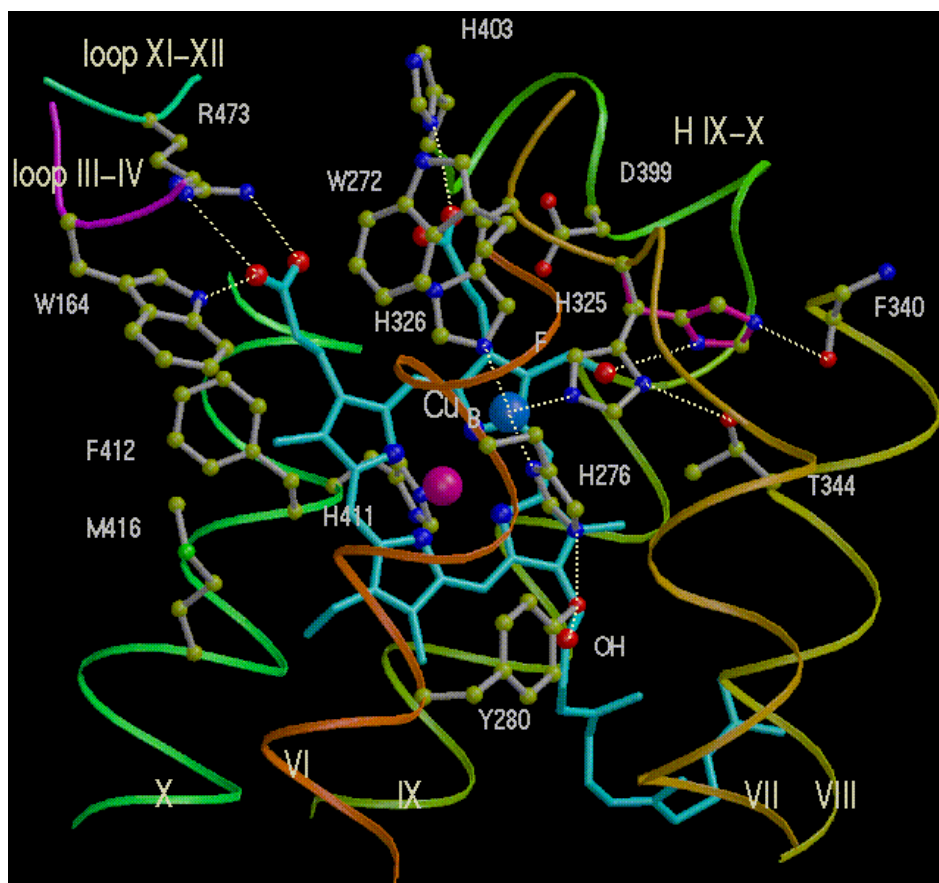
Οι κυτοχρωμικές οξειδάσεις έχουν τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα :δύο κέντρα χαλκού, το Cu_A και Cu_B και δύο ομάδες αίμης μια χαμηλού spin αίμη α και μια υψηλού spin αίμη α_3 . Η αίμη α_3 και ο Cu_B απέχουν μεταξύ τους 4.9 Å και σχηματίζουν ένα spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο (σχήμα 1.1) το οποίο αποτελεί τη θέση δέσμευσης και αναγωγής του O_2 .¹ Η εισροή των ηλεκτρονίων στο διπυρηνικό κέντρο

ξεκινά από το κυτόχρωμα c , στη συνέχεια μεταφέρονται σε ένα δεύτερο κέντρο χαλκού Cu_A . Τα ηλεκτρόνια από εκεί μεταφέρονται στην αίμη a και στη συνέχεια στο διπυρηνικό κέντρο. Η παρουσία του διπυρηνικού κέντρου αίμης $-Cu_B$ είναι ένα από τα κριτήρια συγγένειας μεταξύ των τελικών οξειδασών. Παρά τη μεγάλη απόσταση που χωρίζει εξελικτικά τους ευκαρυωτικούς από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς και την απλότητα που χαρακτηρίζει τις βακτηριακές τελικές οξειδάσες, η δομή του διπυρηνικού κέντρου διατηρείται πλήρως μέσα στην οικογένεια των τελικών οξειδασών.

Όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται κάτω από μικροαερόβιες ή φωτοσυνθετικές συνθήκες, τότε έχουμε τη έκφραση μια κυτοχρωμικής οξειδάσης ονομαζόμενη ως cbb_3 η οποία ανήκει στην οικογένεια των τελικών οξειδασών ή η οικογένεια των αιμοχαλκοοξειδασών. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από τρεις υπομονάδες (M_{app} 45, 35 και 29 kDa) έχοντας δύο αίμες c ομοπολικά δεμένες με τις υπομονάδες II και III.. Το κυτόχρωμα cbb_3 δεν παρουσιάζει ενεργότητα κινολικής οξειδάσης αλλά οξειδώνει το κυτόχρωμα c . Ο αριθμός μετατροπής (turnover number) της χρησιμοποιώντας το κυτόχρωμα c είναι μεγαλύτερος από 900 s^{-1} γεγονός που την καθιστά ως ένζυμο με υψηλή ενεργότητα. Με βάση τα οπτικά φάσματα οι *Garcia-Horsman et al*² έδειξαν ότι το κυτόχρωμα cbb_3 περιέχει δύο αίμες b μια χαμηλού και μια υψηλού σπιν και τρεις αίμες c χαμηλού σπιν. Οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης έχουν υπολογιστεί για τα ακόλουθα ζευγάρια 415 και 436 nm (δέσμευση CO), $\epsilon = 190\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ και 404 και 420 nm (δέσμευση CN^-) $\epsilon = 52\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Το οξειδωμένο ένζυμο δεν δίνει σήμα EPR με τιμή $g=2$ γεγονός που σημαίνει ότι δεν περιέχει Cu_A ο οποίος είναι παρών σε όλες τις άλλες τελικές οξειδάσες (οι οποίες δίνουν σήμα EPR $g = 2$). Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζεται από οπτικές μελέτες φασμάτων UV-Vis που δείχνουν απουσία ταινίας απορρόφησης στα 820 nm που οφείλεται σε ταινία μεταφοράς φορτίου του Cu_A και από μελέτες ανάλυσης μετάλλων του cbb_3 που δείχνουν τη παρουσία ενός μόνο χαλκού ανά μονάδα ενζύμου. Αυτός ο χαλκός αποτελεί το Cu_B του διπυρηνικού κέντρου αίμης $-Cu_B$ στο οποίο λαμβάνει χώρα η αναγωγή του O_2 σε H_2O και η άντληση των πρωτονίων. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των όλων των αιμοχαλκοοξειδασών είναι ότι η υψηλού σπιν αίμη που βρίσκεται στο διπυρηνικό κέντρο είναι αίμη τύπου a ή o έχοντας και οι δύο φαρνεσυλική πλευρική αλυσίδα. Σύμφωνα με τα παραπάνω το cbb_3 είναι «μοναδικό» ένζυμο σε σχέση με τις aa_3 οξειδάσες για τους εξής λόγους

- α) Περιέχει αίμη *b*, αντί για αίμη τύπου *a* ή *o*, στο διπυρηνικό κέντρο η οποία δεν περιέχει φαρνεσυλική πλευρική αλυσίδα πιστοποιώντας ότι η αυτή η πλευρική αλυσίδα δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του διπυρηνικού κέντρου. Συγκεκριμένα η υδροξυλομάδα της φαρνεσυλικής πλευρικής αλυσίδας σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με μια από τις His του Cu_B. Έχει προταθεί ότι με αυτό το τρόπο η φαρνεσυλική πλευρική αλυσίδα επηρεάζει (έμμεσα) την αναγωγή του οξυγόνου στο διπυρηνικό κέντρο αίμη –Cu_B.
- β) Δεν περιέχει Cu_A που αποτελεί τον δέκτη ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* όπως συμβαίνει σε όλες τις άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες.
- γ) Δεν περιέχει το πλέον διατηρημένο αμινοξύ στην οικογένεια των τελικών οξειδάσων, την Tyr244 για το οποίο έχει προταθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη σχάση του δεσμού O=O παρέχοντας ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο κατά την αναγωγή του O₂ σε H₂O από την κυτοχρωμική οξειδάση *aa*₃.

Η σύγκριση του *ccb*₃ με τις άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες ως προς τα διατηρημένα δομικά χαρακτηριστικά που αφορούν τις κύριες λειτουργίες όλων των αιμοχαλκοοξειδάσων.



Σχήμα 1.1 Η δομή του διπυρηνικού κέντρου στην κυτοχρωμική οξειδάση

1.3 Τα ενδιάμεσα κατά την αναγωγή του O₂ από την κυτοχρωμική οξειδάση

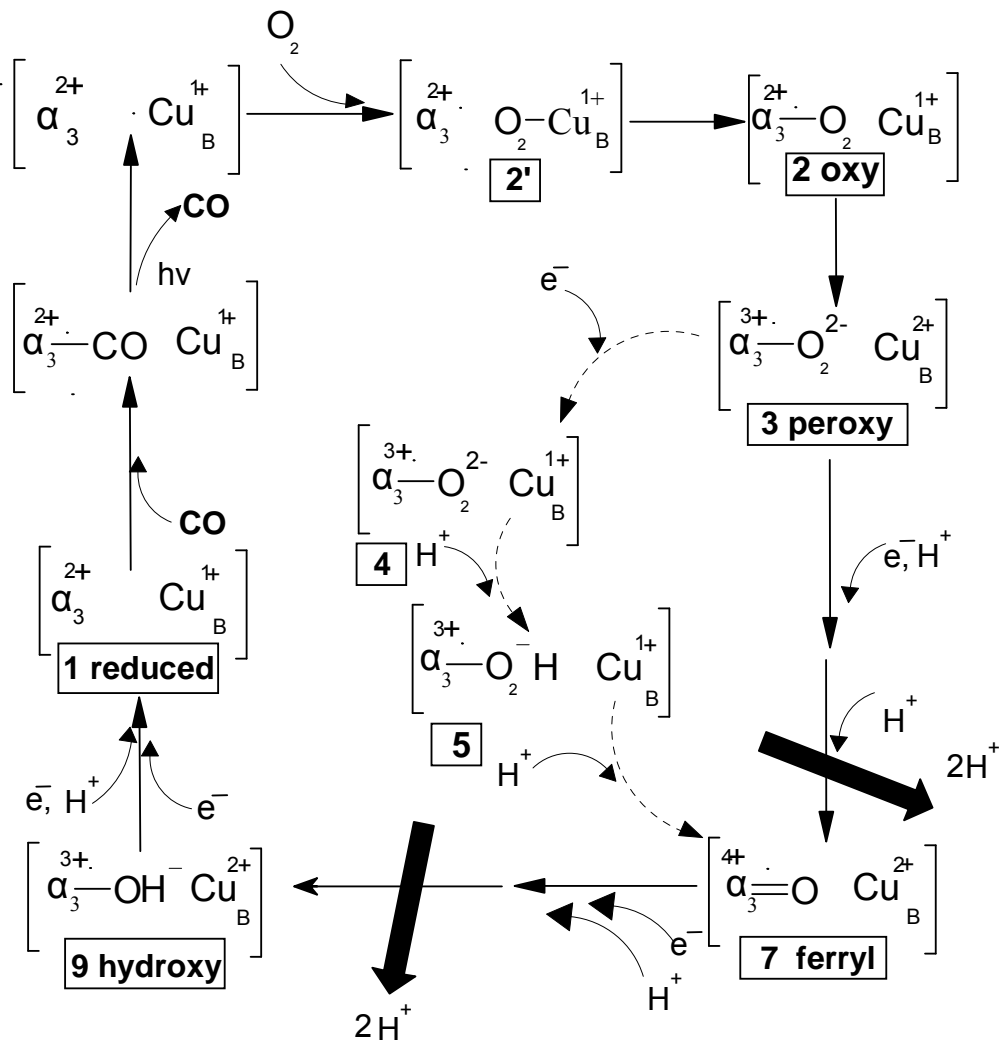
Η αναγωγή του οξυγόνου από την κυτοχρωμική οξειδάση πραγματοποιείται υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Η διαδικασία της αναγωγής του O₂ από την κυτοχρωμική οξειδάση λαμβάνει χώρα σε χαμηλό υπερδυναμικό (λιγότερο από 0.3 V), ο ρυθμός παραγωγής των μερικώς ανηγμένων ενδιάμεσων οξυγόνου (τα οποία σχηματίζονται από την αναγωγή του O₂) ιδιαίτερα τοξικών αν απελευθερωθούν στο κύτταρο, μειώνεται και η ενέργεια η οποία απελευθερώνεται από την αναγωγή είναι άμεσα συνυφασμένη με την μετατόπιση των πρωτονίων διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης.³ Το ένζυμο λειτουργεί υπό τις παραπάνω προϋποθέσεις χρησιμοποιώντας το διπυρηνικό του κέντρο, το οποίο αποτελείται από το Fe της υψηλού spin αίμης α₃ (S= 5/2 για το οξειδωμένο ένζυμο και S=2 για το ανηγμένο) και ένα ιόν χαλκού Cu_B, για την δέσμευση και την αναγωγή του O₂ .

Τα ενδιάμεσα της αναγωγής του οξυγόνου από την κυτοχρωμική οξειδάση εικονίζονται στο σχήμα 1.2.⁵ Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από δύο ξεχωριστές διαδικασίες.

Στην πρώτη διαδικασία τη λεγόμενη «γρήγορη» έχουμε δέσμευση του O₂ και μερική αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου φτάνοντας στο περόξυ ενδιάμεσο. Στη αρχή υποθέτουμε ότι έχουμε ολική και στιγμιαία φωτόλυση του CO από το Fe_{α3}⁺² διότι η κβαντική απόδοση του CO είναι μονάδα. Με αυτό το τρόπο έχουμε ολική και όχι μερική αντικατάσταση του CO από το O₂. Στη συνέχεια το O₂ δεσμεύεται στο Cu_B⁺¹ σχηματίζοντας το σύμπλοκο Cu_B⁺¹-O₂ (k₁= 3.5 x 10⁸ s⁻¹ , k₋₁= 5 x 10⁴ s⁻¹) και στη συνέχεια στο Fe_{α3}⁺² σχηματίζοντας το πρώτο ενδιάμεσο της χημείας οξυγόνου το ονομαζόμενο ως όξυ ενδιάμεσο (Fe_{α3}⁺²-O₂) (2) με σταθερά σχηματισμού k= 5 x 10⁴ s⁻¹. Η συχνότητα της ν(Fe_{α3}⁺²-O₂)⁴ στο φάσμα συντονισμού Raman εμφανίζεται στα 572 cm⁻¹ με ¹⁶O₂ και μετατοπίζεται στα 546 cm⁻¹ όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιηθεί ¹⁸O₂. Η δόνηση τάσης Fe_{α3}⁺²-O₂ είναι παρόμοια μ' εκείνη που έχει παρατηρηθεί για το όξυ προϊόν της Mb και Hb καθώς και για τα μοντέλα της όξυ-αίμης α με αριθμό συναρμογής 6, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο όξυ προϊόν της αντίδρασης το O₂ δεσμεύεται στην αίμη α₃ σε μία end-on διαμόρφωση και ότι δεν αλληλεπιδρά με το Cu_B.

Η μετατροπή του όξυ ενδιάμεσου Fe_{α3}⁺²-O-O⁻ Cu_B⁺¹ στο περόξυ Fe_{α3}⁺³-O⁻-O⁻ Cu_B⁺² (3) ενδιάμεσο απαιτεί ένα ηλεκτρόνιο. Ακολουθώντας τη στιγμιαία αυτή διαδικασία

παγίδευσης των ενδιάμεσων που σχετίζεται με την άντληση των πρωτονίων, το τρίτο και το τέταρτο ηλεκτρόνιο μεταφέρονται στα ενδιάμεσα περόξυ (3) και φερύλ (7) αντίστοιχα μέσω exergonic αντιδράσεων που οδηγούν την άντληση των πρωτονίων στη δεύτερη φάση της διαδικασίας αναγωγής του οξυγόνου. Τα βήματα άντλησης των πρωτονίων φαίνονται με τα μαύρα βέλη. Σε flow-flash πειράματα με το πλήρως ανηγμένο ένζυμο, εμφανίζεται μια μικρή κυκλική αντίδραση η οποία ξεκινά με την αναγωγή του ενδιάμεσου 3 από την αίμη α και οδηγεί στο σχηματισμό $\text{Fe}_{\alpha 3}^{+3}-\text{O}^- \text{Cu}_B^{+1}$ (4) με σταθερά σχηματισμού $k = 3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. Αυτό το κυκλικό μονοπάτι δεν σχετίζεται με την άντληση των πρωτονίων και φαίνεται στο σχήμα 1.2 με τα διακεκομμένα βέλη. Κάτω υπό αυτές τις συνθήκες, οι σταθερές ταχύτητας για το σχηματισμό και την διάσπαση του ανηγμένου κατά δύο ηλεκτρόνια περόξυ ενδιάμεσου



Σχήμα 1.2 Τα ενδιάμεσα κατά την αναγωγή του O_2 από την κυτοχρωμική οξειδασή κατά *Varotsis et al*⁶

3 είναι τέτοιες που κάνουν το ενδιάμεσο αυτό πληθυσμιακά να μη φτάνει σε επίπεδα ανίχνευσης

Ωστόσο οι *Proshlyakov et al*⁶ χρησιμοποιώντας H_2O_2 στο οξειδωμένο ένζυμο κατάφεραν να ανιχνεύσουν το περόξυ ενδιάμεσο με δομή ενός όξο-φερύλ $\text{Fe}_{\alpha 3}^{+4}-\text{O}^{-2}\text{Cu}_B^{+2} \leftrightarrow \text{Fe}_{\alpha 3}^{+4}=\text{O}\text{Cu}_B^{+2}$ στα 804 cm^{-1} το οποίο απορροφά στα 607 nm . Πειράματα που έγιναν μετέπειτα έδειξαν ότι η ίδια δόνηση παρατηρείται όταν το O_2 χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα στο μικτό σθένους (ανηγμένο κατά δύο ηλεκτρόνια) ένζυμο επιβεβαιώνοντας ότι η χημεία οξυγόνου και η χημεία υπεροξειδίου στη κυτοχρωμική οξειδάση πραγματοποιούνται μέσω κοινών ενδιάμεσων.⁷ Το ενδιάμεσο στα 607 nm με δομή ενός όξο-φερύλ παρατηρήθηκε από δύο άλλα γκρουπ, *Varotsis et al*⁸ και *Rousseau et al*⁹, όταν πραγματοποίησαν την αντίδραση του ανηγμένου ένζυμου με το O_2 σε δευτεριωμένο διαλύτη γεγονός που αποδεικνύει ότι το οξυγόνο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου στο όξο-φερύλ ενδιάμεσο. Στην απουσία ηλεκτρονιακής μεταφοράς από την αίμη α στο $\alpha_3\text{-Cu}_B$ κέντρο το επιπλέον ηλεκτρόνιο που χρειάζεται για να πάμε από το περόξυ ενδιάμεσο στο σχηματισμού του φερύλ πιθανόν να προέρχεται από ένα αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο μετατρέπεται σε ρίζα^{7,10} (βλέπε παράγραφος 1.4)

Με τη πρωτονείωση του ανηγμένου κατά τρία ηλεκτρόνια περόξυ ενδιάμεσου **4**, σημειώνεται η έναρξη της διαδικασίας σχάσης του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ η οποία παράγει το φερύλ ενδιάμεσο $\text{Fe}_{\alpha 3}^{+4}=\text{O}\text{Cu}_B^{+2}$ (**7**) το οποίο εμφανίζεται στους 786 cm^{-1} στο φάσμα συντονισμού Raman και έχει μέγιστο απορρόφησης στα 580 nm .⁸ Το φερύλ ενδιάμεσο προκύπτει μέσω της μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου από το $\alpha\text{-Cu}_A$ κέντρο και ενός άλλου ηλεκτρονίου από το Cu_B .

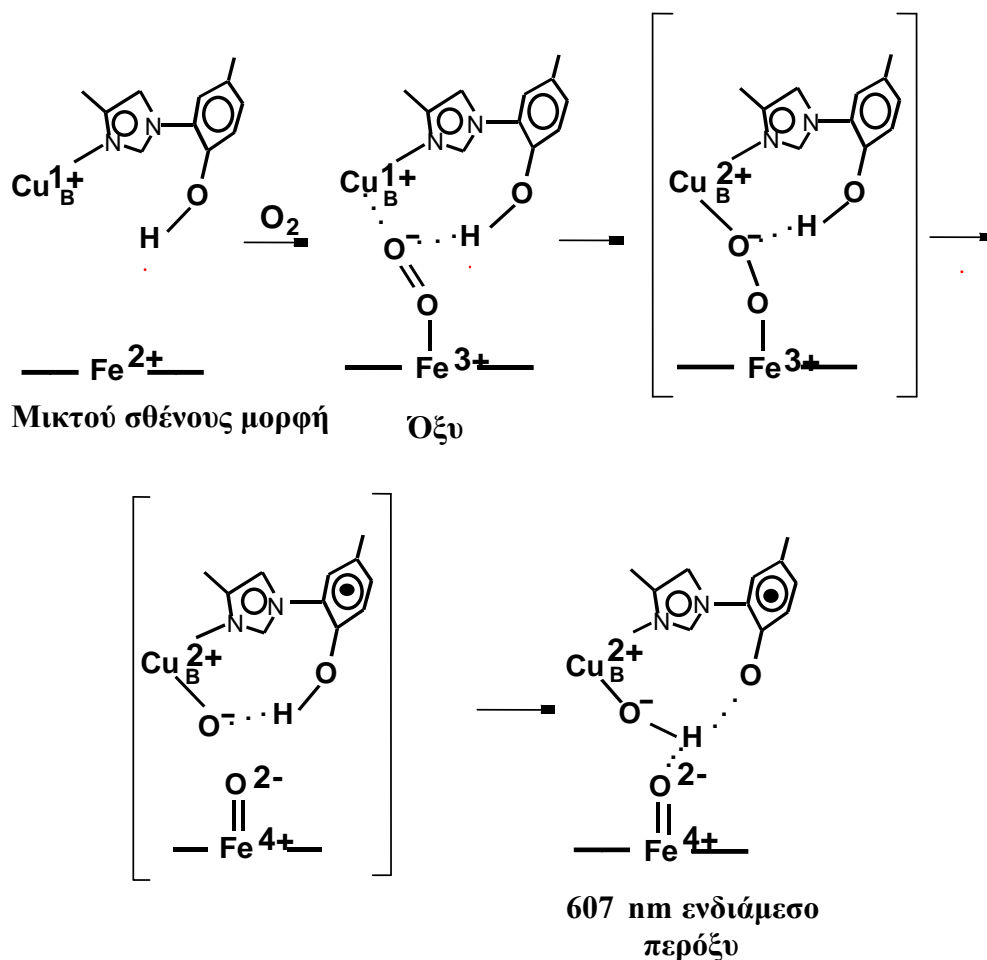
Το τελευταίο ενδιάμεσο που έχει παρατηρηθεί είναι το υδρόξυ ενδιάμεσο **Fe-OH** (**9**) το οποίο εμφανίζεται στα 450 cm^{-1} στο φάσμα συντονισμού Raman με ταχύτητα σχηματισμού $k = 8 \times 10^{-2}\text{ s}^{-1}$.⁹

1.4 Ο ρόλος της Tyrosine 244 στην ενεργοποίηση και αναγωγή του O_2

Το σημείο του καταλυτικού κύκλου στο οποίο πραγματοποιείται η σχάση του δεσμού $\text{O}=\text{O}$ κατά την αναγωγή του O_2 σε H_2O από την κυτοχρωμική οξειδάση είναι αντικείμενο πολλών αντιπαραθέσεων. Ο στιγμιαίος σχηματισμός του όξο-φερύλ ενδιάμεσου κατά την αντίδραση του μικτού σθένους ενζύμου με το O_2 υπογραμμίζει το γεγονός ότι η σχάση του δεσμού $\text{O}=\text{O}$ λαμβάνει χώρα όταν δύο ηλεκτρόνια προστίθενται στο ένζυμο.⁷ Για να συμβεί το παραπάνω, ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο πρέπει

να διατίθεται από το ένζυμο. Στις υπεροξειδάσες και στις καταλάσες η πηγή αυτού του ηλεκτρονίου είναι η αίμη κάτι που δεν συμβαίνει στην κυτοχρωμική οξειδάση αφού πειράματα UV και Raman δεν υποστηρίζουν το σχηματισμό μιας πορφυρινικής π-κατιοντικής ρίζας. Μια άλλη πηγή του επιπλέον ηλεκτρονίου μπορεί να είναι ο Cu_B ο οποίος μπορεί να οξειδωθεί στη +3 οξειδωτική κατάσταση. Η ύπαρξη ενός Cu_B^{+3} έχει παρατηρηθεί σε μοντέλα ενώσεων αλλά όχι σε πρωτεΐνες που περιέχουν χαλκό. Άρα η οξείδωση ενός αμινοξικού κατάλοιπου σε ρίζα είναι η πιο πιθανή περίπτωση της πηγής του επιπλέον ηλεκτρονίου. Η **Tyr244** η οποία απέχει 3.2 Å από το Fe_{a3} είναι ο πιθανός δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου. Κρυσταλλογραφικές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας οξειδοαναγωγικά ενεργής πλευρικής αλυσίδας. Η λειτουργικότητά της Tyr244 ως δότης πρωτονίου κατά την σχάση του δεσμού $\text{O}=\text{O}$ ισχυροποιείται από το γεγονός ότι οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι συνδέεται με τη His240 του Cu_B μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του C της Tyr244 και του N της His240 και ότι η φαινολική ομάδα της Tyr244 είναι διευθετημένη με τέτοιο τρόπο ώστε η υδροξυλική ομάδα OH να κατευθύνεται προς το διπυρηνικό κέντρο στο οποίο γίνεται η δέσμευση του O_2 .^{11,12} Με βάση τη προτεινόμενη λειτουργία της Tyr244 ως δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου για την ενεργοποίηση και την αναγωγή του O_2 από την κυτοχρωμική οξειδάση και την οξείδωση της σε ρίζα κατά την δημιουργία του P ενδιάμεσου, έχει προταθεί ο παρακάτω μηχανισμός (Σχήμα 1.3).⁷

Μετά την στιγμιαία δέσμευση στο Cu_B^{+1} το O_2 δεσμεύεται στο Fe_{a3}^{+2} για το σχηματισμό του όξυ ενδιάμεσου $\text{Fe}_{a3}^{+2}-\text{O}_2$. Με ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου από το Cu_B^{+1} σχηματίζεται το περόξυ ενδιάμεσο $\text{Fe}_{a3}^{+2}-\text{O}-\text{O}^-\text{Cu}_B^{+2}$ το οποίο είναι δεσμευμένο στο θετικά φορτισμένο Cu_B^{+2} για τη διατήρηση της ηλεκτροουδετερότητας και της τάξης των δεσμών. Αυτό το περόξυ ενδιάμεσο λόγω της αστάθειας του δεν ανιχνεύεται και αποσπά ακαριαία ένα πρωτόνιο από τη γειτονική Tyr244. Ταυτόχρονα ο δεσμός $\text{O}=\text{O}$ σχάζεται με ένα συντονισμένο τρόπο, το απομακρυσμένο οξυγόνο δεσμεύεται στο Cu_B^{+2} σχηματίζοντας μια υδρόξη δομή $\text{HO}-\text{Cu}_B^{+2}-\text{His-Tyr}^\bullet$ ενώ το πλησιέστερο στο Fe οξυγόνο οξειδώνει το Fe_{a3}^{+3} προς σχηματισμό του φερύλ ενδιάμεσου $\text{Fe}_{a3}^{+4}=\text{O}$. Δύο δεσμοί $\text{O}-\text{O}$ και $\text{H}-\text{O}_{\text{Tyr}}$ σχάζονται και δυο δεσμοί $\text{Fe}=\text{O}$ και $\text{H}-\text{O}^\bullet$ δημιουργούνται σε αυτό το στάδιο. Με τη σχάση του δεσμού $\text{O}-\text{O}$ σχηματίζεται το σταθερό ενδιάμεσο φερύλ $\text{Fe}_{a3}^{+4}=\text{O}$ με την χαρακτηριστική δόνηση στα 804 cm^{-1} στο Raman φάσμα η οποία ανιχνεύεται κατά την αντίδραση του μικτού σθένους ενζύμου με το O_2 και του οξειδωμένου ενζύμου με το H_2O_2 .



Σχήμα 1.3 Προτεινόμενος μηχανισμός για τη σχάση του δεσμού O=O κατά *Proshlyakov et al*⁷

Η πιο κλασσική μέθοδος για το χαρακτηρισμό ενός περόξυ ενδιάμεσου είναι η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιώντας ισότοπα οξυγόνου. Resonance Raman φάσματα μοντέλων κυτοχρωμικής οξειδάσης¹³ τα οποία αποτελούνται από γέφυρες O-O μεταξύ Fe και Cu (Fe-O-O-Cu) έδειξαν μια ισοτοπικά ευαίσθητη κορυφή στους 804 cm^{-1} για το υποκατεστήμενο με ^{16}O μοντέλο η οποία μετατοπίζεται στους 758 cm^{-1} όταν δεσμεύεται το ^{18}O . Η συχνότητα αυτής της δόνησης για το ^{16}O σύμπλοκο είναι παρόμοια με $\nu(\text{O-O})$ δόνηση τάσης του Cu-O-O-Cu περόξυ ενδιάμεσου στην αιμοκυανίνη. Τα αποτελέσματα από τις μελέτες των μοντέλων δείχνουν ότι η δόνηση στους 804 cm^{-1} αποδίδεται στη δομή γέφυρας Fe-O-O-Cu, ενώ σύμφωνα με το παραπάνω μηχανισμό (Σχήμα 1.3) οι *Proshlyakov et al*⁷ αποδίδουν τη δόνηση αυτή στη διαμόρφωση του περόξυ $\text{Fe}_{a3}^{+4}=\text{O}$ ενδιάμεσου το οποίο αποροφά στα 607 nm. Κατά συνέπεια βλέπουμε ότι δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί σε πιο ενδιάμεσο αντιστοιχεί η δόνηση στους 804 cm^{-1} όταν το πείραμα της αναγωγής του οξυγόνου

γίνει υπό διαφορετικές συνθήκες. Δηλαδή όταν το πείραμα γίνεται χρησιμοποιώντας O_2 στο μικτού σθένους ένζυμο ή H_2O_2 στο οξειδωμένο ένζυμο.

Με βάση το μηχανισμό του σχήματος 1.3 κάνουμε τις εξής παρατηρήσεις:

Η υδροξυλική ομάδα του υδρόξυ **HO-Cu_B⁺²** πιθανόν να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το φαινολικό οξυγόνο της ρίζας Tyr και με το οξυγόνο του φερύλ ενδιάμεσου **Fe_{a3}⁺⁴=O**. Ο Cu_B βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση +2 και η His-Tyr δομή συνυπάρχει σαν ελεύθερη ρίζα η οποία δεν είναι ανιχνεύσιμη από EPR μελέτες. Η όξο-φερύλ δομή βρίσκεται στην χαμηλού σπιν S=1 κατάσταση της και δεν είναι επίσης ανιχνεύσιμη από μελέτες EPR. Η απουσία σημάτων EPR από το S=1/2 Cu_B⁺² και από την S=1/2 Tyr οφείλεται στην σύζευξη των σπιν ανάμεσα στις δύο αυτές δομές η οποία προκαλείται από την His240 που συνδέεται ομοιοπολικά με την Tyr και το Cu_B⁺² (σχήμα 5). Η σύζευξη των σπιν επιτελεί και μια άλλη λειτουργία, στο να απεντοπίζει την ρίζα **Tyr[•]** έτσι ώστε ο Cu_B να υιοθετεί +3 οξειδωτικό χαρακτήρα. Με αυτή την παραδοχή η δομή του 607 ενδιάμεσου μπορεί να θεωρηθεί σαν μια μορφή συντονισμού ενός απεντοπισμένου ηλεκτρονιακού συστήματος που εμπεριέχει Cu_B, His240 και Tyr244.

1.5 Διαφορές μεταξύ των περόξυ (P) και φερύλ (F) ενδιάμεσων

Ο μηχανισμός που προτάθηκε παραπάνω για την σχάση του δεσμού O-O προτείνει ότι τα P και F ενδιάμεσα έχουν τη δομή φερύλ **Fe_{a3}⁺⁴=O**.⁶ Παρόλο την ομοιότητα στη δομή, έχουν όμως διαφορετικές οπτικές ιδιότητες. Το P στο φάσμα διαφοράς ως προς το οξειδωμένο ένζυμο έχει μέγιστο απορρόφησης στα 607 nm, ενώ το F ενδιάμεσο στο αντίστοιχο φάσμα έχει μέγιστο απορρόφησης στα 580 nm.¹⁴ Ηλεκτρονιακοί και δομικοί λόγοι συνεισφέρουν στη διαφορετικότητα των οπτικών ιδιοτήτων των P και F. Η δομή **Cu_B⁺²-His-Tyr[•]** η οποία παρουσιάζεται στο P ενδιάμεσο απορροφά στην περιοχή του ορατού. Η αναγωγή της προς σχηματισμού του F ενδιάμεσου θα μηδενίσει την παραπάνω απορρόφηση. Έτσι η πιθανότητα μιας ηλεκτρονιακής αλληλεπίδρασης μεταξύ του μετάλλου/ρίζας χρωμοφόρου (**Cu_B⁺²-His-Tyr[•]**) και της αίμης a_3 θα δημιουργεί μια διαταραχή στο οπτικό φάσμα του P ενδιάμεσου ενώ θα είναι απύσχα στο φάσμα του F.⁷ Τα distal και proximal effects συνεισφέρουν επίσης στη διαφορετικότητα της συχνότητας δόνησης του δεσμού **Fe_{a3}⁺⁴=O** που έχει παρατηρηθεί για τα δύο ενδιάμεσα P και F. Για το P ενδιάμεσο η συχνότητα δόνησης είναι $\nu(\text{Fe}=\text{O})=804 \text{ cm}^{-1}$ ενώ για το F ενδιάμεσο η συχνότητα δόνησης είναι $\nu(\text{Fe}=\text{O})=785$

cm⁻¹. Η παρουσία ενός ασθενούς δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο οξυγόνο του όξο-φερύλ ενδιάμεσου και την υδροξυλική ομάδα του υδρόξυ **HO-Cu_B⁺²** έχει προταθεί για το P ενδιάμεσο. Η μείωση της συχνότητας ν(Fe=O) στο F ενδιάμεσο προϋποθέτει την δημιουργία ενός δεύτερου δεσμού υδρογόνου στο οξυγόνο του όξο-φερύλ καθώς το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου επαναδιευθετείται κατά την μετάβαση από το P στο F. Η παροχή ενός πρωτονίου από το διαλύτη και η πρωτονίωση της Tyr244 κατά την παραπάνω μετάβαση είναι η πηγή για αυτή την επιπρόσθετη αλληλεπίδραση.⁷ Σύμφωνα με την παραπάνω ερμηνεία είναι και το γεγονός ότι η συχνότητα ν(Fe=O) στο F ενδιάμεσο παρουσιάζει σημαντική διαφορά ανάμεσα σε H₂O, D₂O.^{8,9} Μελέτες με μοντέλα έχουν δείξει ότι η ισχύς του δεσμού **Fe_{α3}⁺⁴=O** είναι συνάρτηση της βασικότητας του proximal υποκαταστάτη. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου στην Fe=O δομή του F ενδιάμεσου σε σχέση με το P, θα επηρεάσει τις οπτικές ιδιότητες της αίμης και τις δονητικές ιδιότητες της His-Fe⁺⁴=O δομής. Επίσης και η αλλαγή στην βασικότητα της proximal His θα συνεισφέρει στις διαφορετικές οπτικές και δονητικές ιδιότητες ανάμεσα στα δύο ενδιάμεσα. Η δονητική συχνότητα μειώνεται όσο ο proximal υποκαταστάτης γίνεται πιο ισχυρός ηλεκτρονιοδότης προς στο **Fe_{α3}⁺⁴=O** σύστημα. Συνοψίζοντας τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι διαφορές στους δεσμούς υδρογόνου και η αλλαγή ως προς τη βασικότητα του proximal υποκαταστάτη συνεισφέρουν στις διαφορετικές οπτικές και δονητικές ιδιότητες ανάμεσα στα P και F ενδιάμεσα

1.6 Μελέτες δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου αίμη α3-CuB σε χρονική κλίμακα από picosecond σε kilosecond

Πολλές από τις πληροφορίες που έχουμε για τη δομή και τη δυναμική του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών οξειδασών προέρχονται από τις μελέτες των δεσμευμένων με CO στο διπυρηνικό κέντρο οξειδασών. Το CO δεσμεύεται στα πλήρως ανηγμένα ένζυμα ως τελικός υποκαταστάτης στην αίμη του διπυρηνικού κέντρου. Οι δονήσεις ν(Fe-CO), δ(Fe-C-O) και ν(C-O) της Fe⁺²-CO μονάδας έχουν χαρακτηριστεί για αρκετές τελικές οξειδάσες χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR. Επιπλέον της γεωμετρίας δέσμευσης, οι μελέτες αυτές έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες της proximal ιστιδίνης και της αλληλεπίδρασης του CO με το γειτονικό περιβάλλον. Επίσης μελέτες της κινητικής της φωτοδιάσπασης του δεσμού Fe⁺²-CO και της επαναδέσμευσης του CO έχουν δώσει

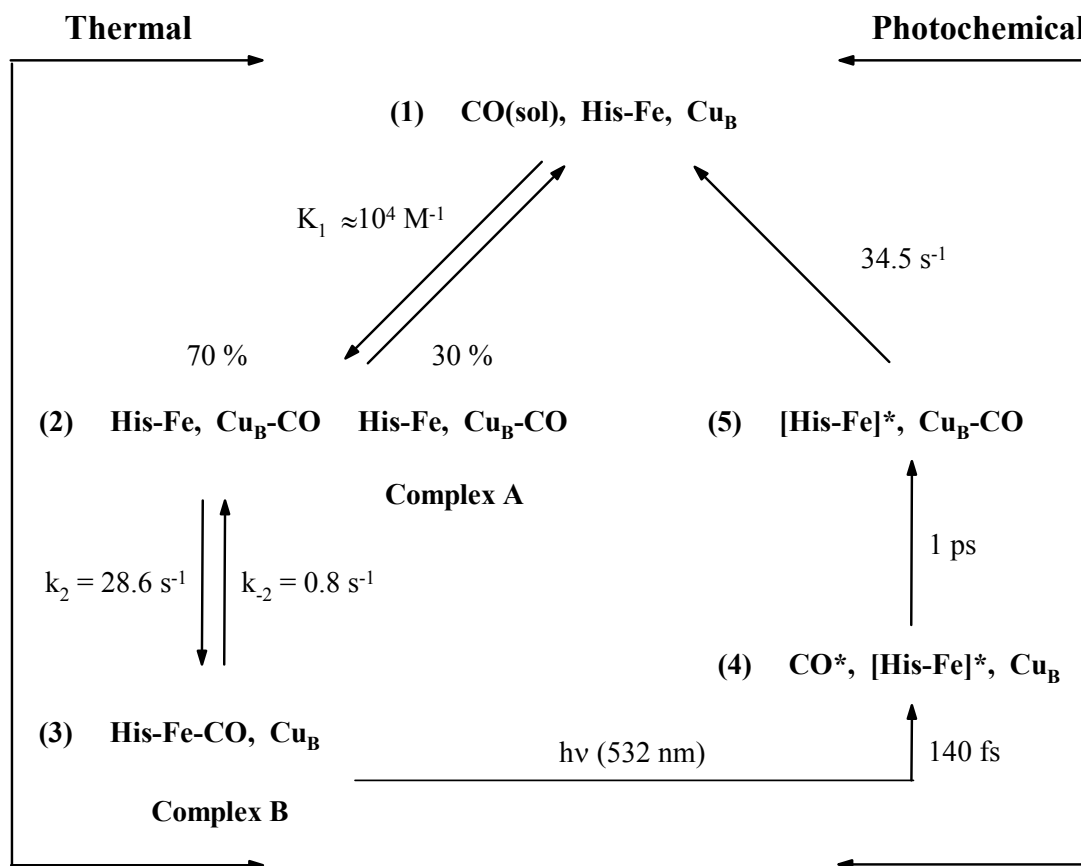
πληροφορίες για τη δυναμική του διπυρηνικού κέντρου και τις κινητικές ιδιότητες των σχηματιζόμενων ενδιάμεσων. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος *cbb₃* μελέτες Raman συντονισμού του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος *cbb₃* και του δεσμευμένου με CO ενζύμου έδειξαν ότι το διπυρηνικό κέντρο έχει μια μοναδική ενεργή διάταξη που παρασιάζεται πιο «ανοιχτή» σε σχέση με τις άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες.¹⁵ Αρα μελέτες για τη φωτοδυναμική του συμπλόκου -CO του κυτοχρώματος *cbb₃*¹⁶ σε συνδυασμό με αυτές της *aa₃* κυτοχρωμικής οξειδάσης μπορούν να δώσουν συγκεκριμένες πληροφορίες που αφορούν τις ηλεκτρονιακές και γεωμετρικές ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου αίμης/Cu_B και τις δεσμικές αλληλέπιδρασεις αίμης/Cu_B με τον αξονικό υποκαταστάτη.

Η θερμοδυναμικά επιθυμητή θέση δέσμευση του CO στα πλήρως ανηγμένα και μικτού σθένους ένζυμα είναι ο Fe⁺². Όμως FTIR μελέτες της φωτόλυσης του συμπλόκου Fe⁺²-CO έχουν δείξει ότι το CO δεσμεύεται προσωρινά στο Cu_B⁺¹ πριν την έξοδο του στο διαλύτη.^{15,16} Επίσης κινητικές μελέτες της φωτοδιάσπασης και επαναδέσμευσης του CO στην *aa₃* κυτοχρωμική οξειδάση αποδεικνύουν ότι το CO δεσμεύεται αρχικά στο Cu_B⁺¹ πριν τη δέσμευσή του στο Fe⁺².^{17,18} Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο Cu_B αποτελεί μια ενδιάμεση θέση δέσμευσης κατά την είσοδο και την έξοδο των υποκαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο. Αυτή η υπόθεση είναι σε συμφωνία με τα κινητικά δεδομένα για το όξυ ενδιάμεσο τα οποία προτείνουν δέσμευση του O₂ στο Cu_B⁺¹ πριν τη δέσμευση του στο Fe⁺².

Οι *Shelvis et al*²⁰ οι οποίοι αποδεικνύοντας τη μη σχάση του δεσμού ανάμεσα στο Fe της αίμης *a₃* και της proximal ιστιδίνης, απέκλεισαν την διαδικασία ανταλλαγής ligands¹⁹ στην εγγύς περιοχή και προτείνουν για τις μεταβολές που συμβαίνουν στο διπυρηνικό κέντρο, μετά τη φωτόλυση του CO, τον εξής μηχανισμό: Μετά τη φωτοδιάσπαση του CO η ν(Fe-His) μετατοπίζεται από τους 214 cm⁻¹ σε υψηλότερη συχνότητα στους 220-222 cm⁻¹ γεγονός που αντιπροσωπεύει ισχυροποίηση του δεσμού Fe-His και το CO επανέρχεται στη συχνότητα ισορροπίας σε χρόνο περίπου 1.5 μs. Κατά τον ίδιο χρονικό διάστημα το CO αποσπάται από το Cu_B και απελευθερώνεται στο διαλύτη με τον οποίο εξισορροπεί και αργότερα επαναδεσμεύεται στην αίμη *a₃* μέσω της θερμικής διαδικασίας σε χρονική κλίμακα των ms.

Σε μια πρόσφατη μελέτη οι *Koutsoupakis K, et al*²¹ πρότειναν τον μηχανισμό της φωτοδιάσπασης και επαναδέσμευσης του CO στο κυτόχρωμα *ba₃* ο οποίος απεικονίζεται στο σχήμα 1.4.

- Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται από δύο διαδικασίες ως προς τη δυναμική της δέσμευσης του CO στην αίμη α_3 , μία θερμική και μία φωτοχημική. Η θερμική



Σχήμα 1.4 Κινητική μελέτη της φωτοδιάσπασης και επαναδέσμευσης του CO στην ba_3 κυτοχρωμική οξειδάση κατά *Koutsouidakis et al*²¹

διαδικασία περιγράφει την ισορροπία κινητικής της δέσμευσης/επαναδέσμευσης και απόσπασης του CO προς και από το Cu_B και την αίμη α_3 . Παρόλο που δεν έχουμε πειραματικές αποδείξεις για τις φωτοχημικές ιδιότητες του συμπλόκου Cu_B^{+1} -CO (complex A), ωστόσο υιοθετούμε τον ισχυρισμό των Einarsson et al²² οι οποίοι έδειξαν ότι δεν υπάρχουν ηλεκτρονικές μεταβάσεις που να προέρχονται από το transient Cu_B^{+1} -CO σύμπλοκο του κυτοχρώματος aa_3 . Άρα υποθέτουμε ότι δεν έχουμε φωτοδιάσπαση του συμπλόκου Cu_B^{+1} -CO (complex A) με διέγερση στα 532 και 355 nm. Στο μηχανισμό του σχήματος 1.4 προτείνουμε τη διάκριση ανάμεσα σε δύο διαφορετικές Cu_B^{+1} -CO δομές. Η μια δομή προέρχεται από τη θερμική διαδικασία κατά την οποία η αίμη α_3 έχει επανέλθει στην συχνότητα ισορροπίας (state 2) και η άλλη από την φωτοχημική διαδικασία (state 5) στην οποία η αίμη α_3 δεν βρίσκεται σε θερμική ισορροπία. Μελέτες δυναμικής σε χρονική κλίμακα της τάξης των fs έχουν δείξει ότι στη φωτοχημική διαδικασία το CO αποσπάται από την αίμη α_3 μέσα σε 100 fs (state 4), διεγείρεται και μετέπειτα δεσμεύεται στο Cu_B^{+1} σε λιγότερο από 1 ps (state

5) προς σχηματισμό του μεταβατικού $\text{Cu}_B^{+1}\text{-CO}$ συμπλόκου.¹⁸ Τις ίδιες κλίμακες χρόνου αναμένουμε και για τα πρώιμα φαινόμενα της φωτοδυναμικής του κυτοχρώματος ba_3 . Έτσι στη φωτοχημική διαδικασία η αίμη a_3 βρίσκεται στην αρχή σε μία μη εξισορροπημένη διαμόρφωση (state 5) με την proximal ιστοιδίνη δεσμευμένη σε αυτή, έπειτα επανέρχεται στη διαμόρφωση ισορροπίας και το CO αποσπάται από το Cu_B και απελευθερώνεται στο διαλύτη με τον οποίο εξισορροπεί (state 1). Απευθείας επαναδέσμευση δεν παρατηρείται μετά τη φωτοδιάσπαση του CO, το οποίο σημαίνει ότι οι 4 και 5 δεν αντιπροσωπεύουν τις στιγμιαίες καταστάσεις μετά τη φωτόλυση του CO. Στις καταστάσεις αυτές το φωτοδιασπώμενο CO και το διπυρηνικό κέντρο εμπεριέχουν επιπλέον ενέργεια η οποία προέρχεται από τη φωτόλυση. Το ενεργοποιημένο CO δεσμεύεται στο Cu_B πριν επιτευχθεί η θερμική διαδικασία του διπυρηνικού κέντρου. Η υψηλή συγγένεια του CO για το Cu_B ($K_1 > 10^4 \text{ M}^{-1}$) εμποδίζει την στιγμιαία επαναδέσμευση. Μη στιγμιαία επαναδέσμευση του CO συμβαίνει μέσω της θερμικής διαδικασίας από τη κατάσταση 2 με μια παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας $k_2 = 28.6 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24.2 \text{ ms}$).

Με βάση τα παραπάνω είναι εμφανές ότι οι μεταβολές που συμβαίνουν στο proximal περιβάλλον της αίμης a_3 δεν επηρεάζουν την επαναδέσμευση του CO στην αίμη a_3 . Το κύριο ρόλο ως προς τη δυναμική του παραπάνω φαινομένου φαίνεται ότι ασκεί το distal περιβάλλον της αίμης a_3 . Επίσης τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι δεν υπάρχει κανένα εμπόδιο στην επαναδέσμευση του CO στην αίμη a_3 και ότι η απόσπαση του CO από το Cu_B συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης του στο διαλύτη πριν επαναδεσμευθεί στην αίμη a_3 .

Βιβλιογραφία

- (1) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, 269, 1069-1074.
- (2) (a) García-Horsman, J. A.; Berry, E.; Shapleigh, J. P.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1994**, 33, 3113-3119
- (3) Ferguson-Miller, S.; Babcock, G.T. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2889-2907
- (4) Varotsis, C.; Woodruff, W. H.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6439-6440
- (5) Varotsis, C.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 11260-11269

- (6) Proshlyakov, D. A.; Ogura, D.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appelman, E. H.; Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 29385-29388
- (7) Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. & Babcock G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 8020-8025
- (8) Varotsis, C.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1990**, 29, 7357-7362.
- (9) Han, S.; Ching, Y-C.; Rousseau, D. L. *Nature* **1990**, 348, 89-90
- (10) Proshlyakov, D. A.; Pressler, M. A.; DeMaso, C.; Leykam, J. F.; DeWitt, D. L.; Babcock G. T. (2000) *Science*, **290**, 1588-1591.
- (11) Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M.J.; Libeu, C.P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, 280, 1723-1729
- (12) Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. **1995** *Nature*, **1995**, **376**, 660-669.
- (13) Sasaki, T.; Nakamura, N.; and Naruta, Y. *Chemistry Letters*, **1998**, 351-352
- (14) Babcock, G. T. & Wikström, M. *Nature* **1992**, 356, 301-309
- (15) Wang, J., Gray, K. A., Daldal, F. & Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9363-9364.
- (16) Stavarakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3814-3815.
- (17) Dyer, R. B., Einarsdóttir, O., Killough, P. M., Lopez-Garriga, J. J. Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7657-7659
- (18) Dyer, R. B.; Peterson, K. A.; Stoutland, P. O.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6276-6277.
- (19) Woodruff, W. H.; Einarsdóttir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; Atherton, S. J.; Goldberck, R. A.; Dawes, T. D.; Kliger, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, 2588-2564.
- (20) Schelvis, J. P. M.; Deinum, G.; Varotsis, C.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8409-8416.
- (21) Koutsoupakis, K.; Stavarakis, S.; Pinakoulaki, E.; Soulimane, T.; and Varotsis, C. *J. Biol. Chem.* **2002** in press
- (22) Einarsdóttir, O.; Dawes, T. D.; and Georgiadis, K. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 6934-6937

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

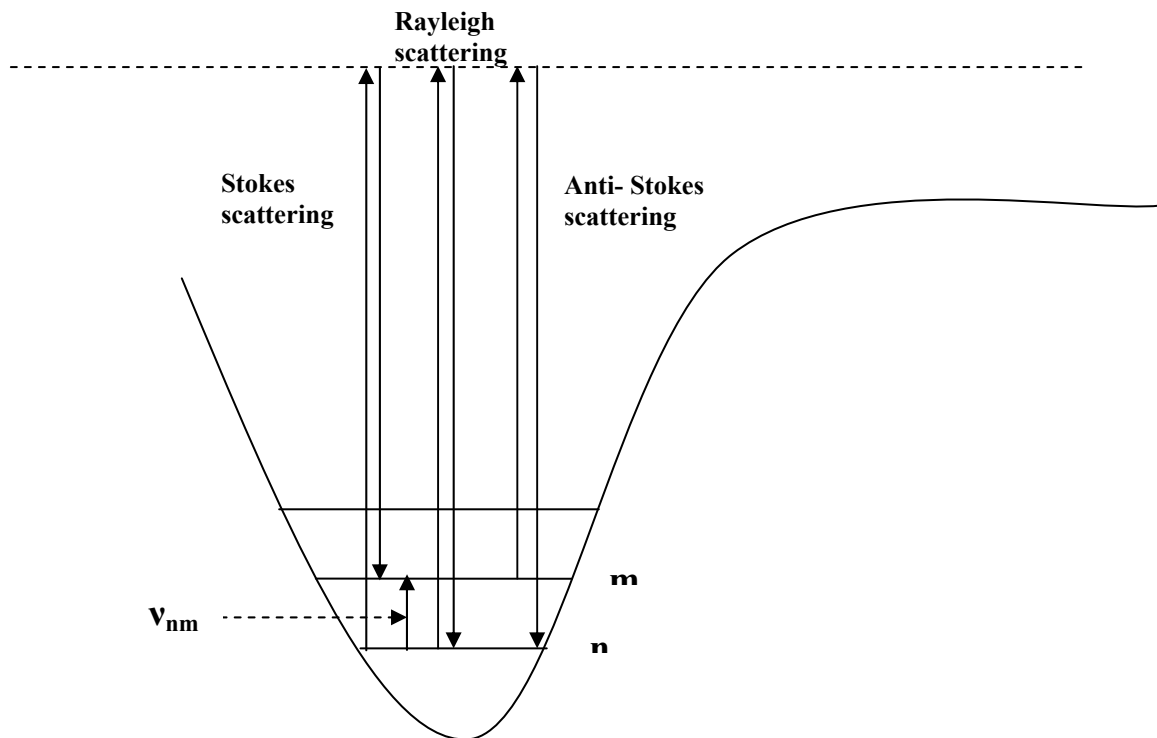
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ IR ΚΑΙ RAMAN

2.1 Εισαγωγή

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές IR και Raman παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις ενέργειες των δονήσεων των μορίων και επομένως και για τις δομές. Οι διαφορετικές αρχές όμως που τις διέπουν, δίνουν σε κάθε μια τεχνική τα δικά της χαρακτηριστικά. Η φασματοσκοπία υπερύθρου προκύπτει από την απορρόφηση IR ακτινοβολίας από τα δονούμενα μόρια ενώ η φασματοσκοπία Raman είναι το αποτέλεσμα της μη ελαστικής σκέδασης μονοχρωματικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα μόρια. Η Raman φασματοσκοπία δεν ταυτίζεται με την φασματοσκοπία υπερύθρου, όπου για να παρατηρηθεί μια ταινία απορρόφησης πρέπει να υπάρχει μεταβολή της μόνιμης διπολικής ροπής του τρόπου δόνησης του μορίου. Στην σκέδαση Raman η εκπομπή μιας Raman ταινίας πρόερχεται από την αλλαγή της πολωσιμότητας(επαγόμενης διπολικής ροπής) του μορίου σαν αποτέλεσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο μόριο. Για το λόγο αυτό συμμετρικοί τρόποι έκτασης τείνουν να είναι πιο έντονοι στα φάσματα Raman και ασύμμετροι στα φάσματα IR. Γι αυτό το λόγο η Raman φασματοσκοπία είναι ιδανική για τη μελέτη βιολογικών μορίων καθώς έχει το πλεονέκτημα ότι εφαρμόζεται σε υδατικά διαλύματα επειδή τα μόρια του νερού δεν σκεδάζουν σημαντικά ενώ απορροφούν ισχυρά στην περιοχή του IR.

2.2 Φαινόμενο Raman

Το φαινόμενο Raman βασίζεται στην αλλαγή της πολωσιμότητας ενός μορίου που προκαλείται κατά την μη ελαστική σκέδαση μονοχρωματικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μήκους κύματος στην περιοχή του ορατού ή του υπεριώδους. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία συχνότητας ν_0 προσπέσει σε ένα μόριο ένα μέρος της ακτινοβολίας σκεδάζεται. Η διαδικασία κατά την οποία το ποσοστό της ακτινοβολίας που σκεδάζεται ελαστικά, έχει συχνότητα ίδια με αυτή της προσπίπτουσας



Σχήμα 2.1 Ποιοτική περιγραφή του φαινομένου Raman

ακτινοβολίας σκεδάζεται ανελαστικά με αποτέλεσμα τα φωτόνια της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας προσπίπτουσας ακτινοβολίας ονομάζεται σκέδαση Rayleigh. Ένα μικρότερο ποσοστό να έχουν μετατοπισμένες συχνότητες $\nu_0 \pm \nu_{nm}$ αναλόγως του ποσοστού ενέργειας την οποία έχουν χάσει ή κερδίσει. Δηλαδή η συχνότητα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μπορεί να είναι είτε μικρότερη $\nu_0 - \nu_{nm}$ (γραμμές Stokes) είτε μεγαλύτερη $\nu_0 + \nu_{nm}$ (γραμμές anti-Stokes) από τη συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας κατά ν_{nm} όπου ν_{nm} η συχνότητα μετάβασης μεταξύ των δονητικών επιπέδων n, m της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης (Σχήμα 2.1). Στην περίπτωση που εμφανίζονται οι φασματικές γραμμές Stokes το μόριο από το βασικό δονητικό επίπεδο n διεγείρεται, απορροφώντας ενέργεια $h\nu_0$, σε ένα ενεργειακό εικονικό επίπεδο (virtual state) από το οποίο αποδιεγείρεται στο διεγερμένο δονητικό επίπεδο m της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης εκπέμποντας ακτινοβολία με συχνότητα $\nu_0 - \nu_{nm}$ με τα φωτόνια της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας να χάνουν ενέργεια ίση με τη συχνότητα μετάβασης μεταξύ των δονητικών επιπέδων n, m . Όταν το μόριο βρίσκεται ήδη στην διεγερμένη δονητική κατάσταση m και διεγείρεται σε ένα ενεργειακό εικονικό επίπεδο από το οποίο μεταβαίνει στο βασικό δονητικό επίπεδο n κατά την αποδιέγερση του, εκπέμποντας ακτινοβολία με συχνότητα $\nu_0 + \nu_{nm}$ τότε τα τα φωτόνια

της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας κερδίζουν ενέργεια ίση με τη συχνότητα μετάβασης μεταξύ των δονητικών επιπέδων n, m . Με αυτό το τρόπο εμφανίζονται οι anti-Stokes φασματικές γραμμές. Οι γραμμές Stokes θα έχουν μεγαλύτερη ένταση από τις anti-Stokes αφού μεγαλύτερο ποσοστό μορίων βρίσκεται στη βασική δονητική κατάσταση n παρά στην διεγερμένη δονητική κατάσταση m λόγω του ότι τα μόρια κατανέμονται στις ενεργειακές στάθμες με κατανομή Boltzman.

2.3 Κβαντομηχανική περιγραφή της φασματοσκοπίας Raman

Από τη θεωρία της ηλεκτροδυναμικής είναι γνωστό ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ανά γωνία σκεδαζόμενου φωτός, είναι ανάλογη του τετραγώνου της επαγόμενης διπολικής ροπής

$$I = \frac{M^2}{4\pi c^3} \sin^2 \theta \quad (2.1)$$

Η επαγόμενη διπολική ροπή η οποία εξάγεται μέσω της θεωρίας των διαταραχών, μπορεί να εκφραστεί σαν σειρά Taylor και αντικατάσταση της στην παραπάνω σχέση για μια μετάβαση μεταξύ δύο καταστάσεων i και f σε γωνία 90° ως προς τη διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας δίνει την παρακάτω σχέση

$$I(\pi/2) = \frac{10^8 \pi^2}{\epsilon_0^2} (\nu_0 \pm \nu_{fi})^4 I_0 \sum_{\rho\sigma} [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} [\alpha_{\rho\sigma}]_{fi}^* \quad (2.2)$$

όπου I_0 και ν_0 η ένταση και η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας αντίστοιχα, ν_{fi} η συχνότητα που αντιστοιχεί στην μετάβαση $i \rightarrow f$, ϵ_0 η διαπερατότητα του κενού και $[\alpha_{\rho\sigma}]_{fi}$ το $\rho\sigma$ στοιχείο του πίνακα που δίνει το τανυστή πολωσιμότητας για την παραπάνω μετάβαση οποίος δίνεται από τη σχέση

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{fi} = \frac{1}{hc} \sum_r \left[\frac{\langle f | \mu_\rho | r \rangle \langle r | \mu_\sigma | i \rangle}{\tilde{\nu}_{ri} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_r} + \frac{\langle f | \mu_\sigma | r \rangle \langle r | \mu_\rho | i \rangle}{\tilde{\nu}_{ri} + \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_r} \right] \quad (2.3)$$

όπου $\langle f | \mu_\rho | r \rangle$ η μεταβατική διπολική ροπή της μετάβασης $r \rightarrow f$ κατά την ρ διεύθυνση, $\langle r | \mu_\sigma | i \rangle$ η μεταβατική διπολική ροπή της μετάβασης $r \rightarrow g$ κατά την σ

διεύθυνση, μ_ρ ο τελεστής της διπολικής ροπής στην ρ διεύθυνση και $i\Gamma_r$ ένας παράγοντας απόσβεσης που σχετίζεται με το χρόνο ζωής της ενδιάμεσης κατάστασης r και εμποδίζει το παρονομαστή να πάρει τη τιμή μηδέν στην περίπτωση του συντονισμού. Το ολοκλήρωμα είναι πάνω από όλες τις καταστάσεις r με εξαίρεση τις αρχικές i και τελικές f καταστάσεις. Τα στοιχεία ρ, σ αναφέρονται στις καρτεσιανές συντεταγμένες x, y, z του σταθερού μή περιστρεφόμενου μορίου και αντιπροσωπεύουν τις πολωσιμότητες της προσπίπτουσας (σ) και σκεδαζόμενης (ρ) ακτινοβολίας, το οποίο συνεπάγεται ότι ο τανυστής πολωσιμότητας είναι δευτέρου βαθμού.

Χρησιμοποιώντας την αδιαβατική προσέγγιση Born-Oppenheimer οι ιδιοκαταστάσεις $|i\rangle, |f\rangle, |r\rangle$ μπορούν να διαχωριστούν σε γινόμενα ηλεκτρονιακών και δονητικών καταστάσεων και υποθέτοντας ότι το μόριο αρχικά βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση g , τότε έχουμε

$$\begin{aligned} |i\rangle &= |gm\rangle = |g\rangle|m\rangle \\ |f\rangle &= |an\rangle = |a\rangle|n\rangle \\ |r\rangle &= |eu\rangle = |e\rangle|u\rangle \end{aligned} \quad (2.4)$$

όπου $|a\rangle$ και $|e\rangle$ οι κυματοσυναρτήσεις των ηλεκτρονικά διεγερμένων καταστάσεων και m, n, u αντιπροσωπεύουν δονητικούς κβαντικούς αριθμούς. Σύμφωνα με τα παραπάνω ο τανυστής πολωσιμότητας μπορεί να γραφτεί με τη παρακάτω μορφή

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{an, gm} = \frac{1}{hc} \sum_{eu} \left[\frac{\langle n | [\mu_\rho]_{ae} | u \rangle \langle u | [\mu_\sigma]_{eg} | m \rangle}{\tilde{\nu}_{eu, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{eu}} + \frac{\langle n | [\mu_\sigma]_{ae} | u \rangle \langle u | [\mu_\rho]_{eg} | m \rangle}{\tilde{\nu}_{eu, an} + \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{eu}} \right] \quad (2.5)$$

όπου $[\mu_\rho]_{ae} = \langle a | \mu_\rho | e \rangle$ και $[\mu_\sigma]_{eg} = \langle e | \mu_\sigma | g \rangle$ είναι οι καθαρές ηλεκτρονικές ροπές μετάβασης που σχετίζονται με τις ηλεκτρονικές μεταβάσεις $e \rightarrow a$ και $g \rightarrow e$ κατά τις ρ και σ διευθύνσεις αντίστοιχα.. Κάτω από τις συνθήκες υπό τις οποίες η αδιαβατική προσέγγιση Born-Oppenheimer ισχύει, η εξάρτηση της μεταβατικής διπολικής ροπής από τις κανονικές συντεταγμένες του συστήματος Q_k είναι μικρή. Αρα η μεταβατική διπολική ροπή μπορεί να εκφραστεί σαν μια σειρά Taylor γύρω από τη θέση ισορροπίας που αποτελεί το φορμαλισμό *Herzberg-Teller* :

$$[\mu_\rho]_{ae} = [\mu_\rho]_{ae}^0 + \frac{1}{hc} \sum_{s \neq e} \sum_k [\mu_\rho]_{as}^0 \frac{h_{es}^k}{\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_e} Q_k + \dots \quad (2.6)$$

όπου $h_{es}^k = \langle e | \frac{\partial H}{\partial Q_k} | s \rangle_{k=0}$, $\langle e |$ μια δευτέρα διεγερμένη κατάσταση η οποία μπορεί να αναμιχθεί με την $\langle s |$, $\frac{\partial H}{\partial Q_k}$ ο τελεστής δονητρονιακής σύζευξης που συνδέει τις δύο διεγερμένες καταστάσεις $\langle e |, \langle s |$ και H η ηλεκτρονική Χαμηλτονιακή του συστήματος.

2.3.1 Resonance Raman σκέδαση (σκέδαση συντονισμού)

Μερικές σημαντικές απλοποιήσεις μπορούν να γίνουν για διέγερση μέσω συντονισμού διότι καθώς το $\tilde{\nu}_0$ πλησιάζει τη συχνότητα μετάβασης η $\tilde{\nu}_{eu, gm}$ σχετική διεγερμένη κατάσταση θα αποτελεί το σημαντικότερο όρο στο ολοκλήρωμα πάνω από όλες τις καταστάσεις της μεταβατικής πολωσιμότητας.. Αντικαθιστώντας την 2.6 στην εξίσωση 2.5 έχουμε

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{an, gm} = A + B \quad (2.7)$$

όπου A , οι τέσσερις συνεισφορές στην μεταβατική πολωσιμότητα κάτω από συνθήκες συντονισμού

$$A = \frac{1}{hc} [\mu_\rho]_{ae}^0 [\mu_\sigma]_{eg}^0 \sum_u \left[\frac{\langle n_a | u_e \rangle \langle u_e | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{eu, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{eu}} \right] \quad (2.8)$$

$$B = \frac{1}{h^2 c^2} [\mu_\rho]_{as}^0 [\mu_\sigma]_{eg}^0 \frac{h_{es}^k}{\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_e} \sum_{eu} \left[\frac{\langle n_a | Q_k | u_e \rangle \langle u_e | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{eu, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{eu}} \right] + \frac{1}{h^2 c^2} [\mu_\rho]_{ae}^0 [\mu_\sigma]_{sg}^0 \frac{h_{es}^k}{\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_e} \sum_{eu} \left[\frac{\langle n_a | u_e \rangle \langle u_e | Q_k | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{eu, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{eu}} \right] \quad (2.9)$$

2.3.2 Δονητική Resonance Raman σκέδαση

Το φαινόμενο της δονητικής Resonance Raman σκέδασης πραγματοποιείται όταν η Raman μετάβαση καταλήγει στην βασική ηλεκτρονική κατάσταση, δηλαδή όταν

$\alpha=g$. Ο όρος A περιλαμβάνει τους Franck-Condon παράγοντες $\langle n_g | u_e \rangle \langle u_e | m_g \rangle$ οι οποίοι είναι μη μηδενικοί αν η ορθογωνικότητα παραλείπεται ανάμεσα στα δονητικά επίπεδα m_g και n_g της βασικής κατάστασης και στα επίπεδα u_e της διεγερμένης κατάστασης. Παράλειψη της ορθογωνικότητας θα συμβεί όταν:

α) Υπάρχει διαφορά στην δονητική συχνότητα ανάμεσα στις βασικές και στις διεγερμένες καταστάσεις

β) Υπάρχει μετατόπιση της θέσης ισορροπίας (ενεργειακό ελάχιστο) των πυρήνων κατά μήκος οποιασδήποτε κανονικής συντεταγμένης κατά την ηλεκτρονική διέγερση.

Ο μηχανισμός α είναι λιγότερα αποτελεσματικός σε σχέση με το μηχανισμό β ο οποίος είναι λειτουργικός μόνο για ολικά συμμετρικές κανονικές δονήσεις στην περίπτωση που απουσιάζει το φαινόμενο Jahn-Teller των διεγερμένων καταστάσεων.

Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο του όρου σκέδαση A είναι η παρατήρηση αρμονικών προόδων σε ολικά συμμετρικές δονήσεις. Σε μη γραμμικά συστήματα μορίων που περιέχουν εκφυλισμένες διεγερμένες καταστάσεις εφαρμόζεται το φαινόμενο Jahn-Teller το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την άρση του εκφυλισμού. Η επίδραση του φαινομένου Jahn-Teller στα φάσματα συντονισμού Raman έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αρμονικών προόδων ολικά συμμετρικών δονήσεων. Αν η Jahn-Teller παραμόρφωση είναι αρκετά μεγάλη, τότε υπό συνθήκες Resonance Raman σκέδασης έχουμε και την εμφάνιση αρμονικών προόδων των Jahn-Teller ενεργών τρόπων δόνησης

Ο όρος B είναι μη μηδενικός στην σκέδαση εξαιτίας των ολικά συμμετρικών και μη ολικά συμμετρικών τρόπων δόνησης με την προϋπόθεση ότι αυτοί είναι υπεύθυνοι για τη δονητρονική σύζευξη των καταστάσεων s (μια δεύτερη διεγερμένη κατάσταση και e (ηλεκτρονική κατάσταση συντονισμού)). Το ολοκλήρωμα h_{es}^k που επιτρέπει την μίξη των s και e ηλεκτρονικών καταστάσεων κατά μήκος των Q συντεταγμένων δεν μηδενίζεται για ένα τρόπο δόνησης του οποίου η μη αναγωγίσιμη αναπαράσταση περιέχεται στο γινόμενο των μη αναγωγίσιμων αναπαραστάσεων των καταστάσεων e και s, $\Gamma_e \times \Gamma_s$. Γι αυτό το λόγο η λειτουργικότητα του όρου B για ένα ολικά συμμετρικό τρόπο δόνησης απαιτεί από τον τελευταίο να συζεύγει δονητρονικά δύο καταστάσεις της ίδιας συμμετρίας. Σύμφωνα με το κανόνα της μη διασταύρωσης, καταστάσεις της ίδιας συμμετρίας σπανίως βρίσκονται στο ίδιο ενεργειακό επίπεδο. Ωστόσο ο μηχανισμός σκέδασης σχετίζεται με μόρια κυβικής συμμετρίας όπου εκεί όλες οι επιτρεπτές ηλεκτρονικές μεταβάσεις είναι της ίδιας συμμετρίας. Ο όρος

σκέδασης B είναι φυσικά ασθενέστερος του όρου A εξαιτίας των $(\tilde{\nu}_s - \tilde{\nu}_e)^{-1}$ και h_{es}^k επιπρόσθετων παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν την ένταση των όρων σκέδασης. Γενικά όρος B είναι σημαντικός όταν μια ασθενής ηλεκτρονική μετάβαση μπορεί να κερδίσει, μέσω δονητρονιακής σύζευξης, ένταση από μια κοντινή, ισχυρά επιτρεπτή, ηλεκτρονική μετάβαση.

Στην περιοχή συντονισμού εκείνοι οι τρόποι δόνησης που επιφέρουν αλλαγή στη γεωμετρία του μορίου μετακινώντας το από τη βασική στην διεγερμένη κατάσταση, ή αυτοί που προκαλούν δονητρονιακή σύζευξη μεταξύ της ηλεκτρονικής κατάστασης συντονισμού και μιας άλλης ηλεκτρονικής κατάστασης με διαφορετική διπολική ροπή, θα ενισχύονται ισχυρά. Αυτή η επιλεκτική ενίσχυση είναι ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας Resonance Raman καθώς οδηγεί σε μια σημαντική απλοποίηση του παρατηρούμενου φάσματος. Τα Resonance Raman φάσματα αποτελούνται από ταινίες που προέρχονται από ολικά ή μη ολικά συμμετρικούς τρόπους δόνησης ανάλογα με τη φύση της συντονισμένης ηλεκτρονικής μετάβασης.

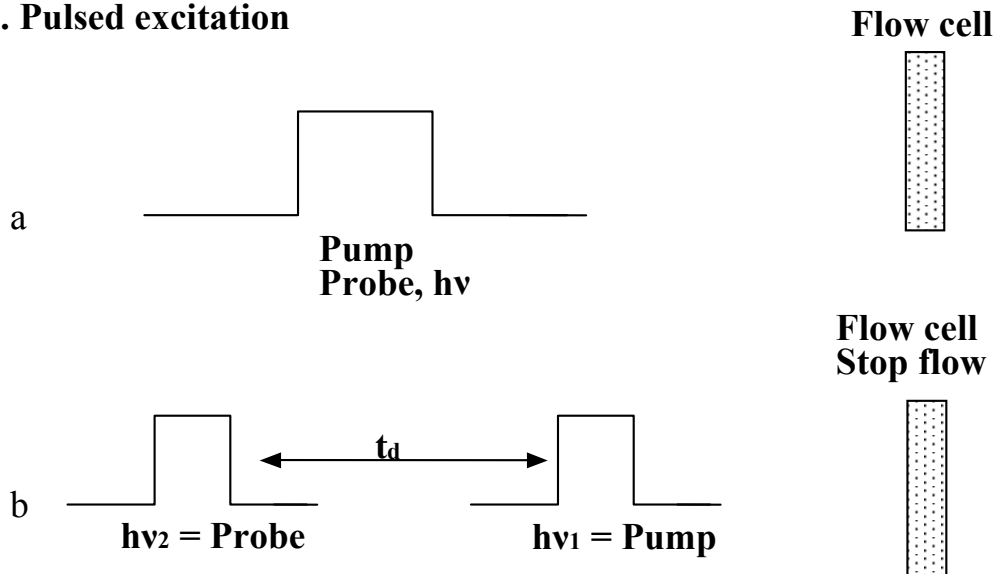
Στην περίπτωση των μεταλλοπορφυρινών και των αιμικών πρωτεϊνών, αν για τη διέγερση του μορίου χρησιμοποιείται ακτινοβολία με μήκος κύματος στην περιοχή του Soret, τότε ο συντονισμός Raman συμβαίνει μέσω του όρου A και επομένως στο φάσμα εμφανίζονται οι ταινίες των ολικά συμμετρικών δονήσεων. Όταν για τη διέγερση του μορίου χρησιμοποιείται ακτινοβολία με μήκος κύματος στην περιοχή των Q ταινιών τότε ο συντονισμός Raman συμβαίνει μέσω του όρου B λόγω της δονητρονιακής σύζευξης μεταξύ των Q ταινιών και του Soret. Επομένως στο φάσμα θα ενισχύονται οι ταινίες των μη ολικά συμμετρικών δονήσεων.

2.4 Εισαγωγή στην τεχνική της φασματοσκοπίας Resonance Raman

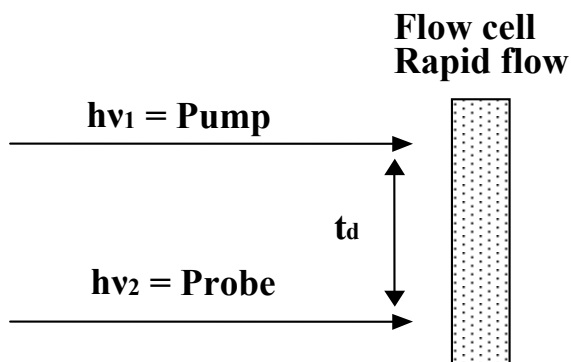
Η Resonance Raman φασματοσκοπία αποτελεί μια δυναμική τεχνική για την ανίχνευση μοριακών δονήσεων που σχετίζονται με ηλεκτρονικές μεταβάσεις. Μονοχρωματική ακτινοβολία η οποία εκπέμπεται από συνεχή ή παλμικά laser χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος και το φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αναλύεται για να προσδιοριστούν οι δονητικές πληροφορίες των μορίων στο δείγμα. Κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αποτελεί ο συντονισμός της συχνότητας του laser με κάποια ηλεκτρονική μετάβαση του μορίου που έχει ως αποτέλεσμα την δραματική ενίσχυση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Οι συχνότητες

των δονήσεων που παρατηρούνται σε ένα φάσμα Raman προέρχονται από τους κανονικούς τρόπους δόνησης των μορίων στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση ενώ οι εντάσεις των δονήσεων αντικατοπτρίζουν το χαρακτήρα της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης. Έχοντας σαν πλεονεκτήματα την υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία ως προς την ενίσχυση των εντάσεων των δονήσεων η Resonance Raman φασματοσκοπία προσφέρει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν ενδιάμεσα αντιδράσεων, διεγερμένες ηλεκτρονικές καταστάσεις και χρωμοφόρα μέρη των βιολογικών συστημάτων. Η time-resolved Resonance Raman (TR³) φασματοσκοπία εφαρμόζεται για την πιστοποίηση συγκεκριμένων δομικών και λειτουργικών στοιχείων καθώς και τις κινητικές ιδιότητες ενδιάμεσων προϊόντων. Η εφαρμογή της TR³ τεχνικής στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη χρήση CW laser είτε με τη χρήση ενός μονού παλμικού laser ή δύο παλμικών (σχήμα 2.2). Με τη χρήση των CW laser απαιτούνται μεγάλες ταχύτητες ροής και καλή εστίαση της δέσμης του laser για την επίτευξη υψηλής χρονικής ανάλυσης. Ο χρόνος που περνάει το δείγμα στη probe δέσμη προσδιορίζει το μικρότερο χρονικό εύρος που μπορεί να επιτευχθεί. Με την χρήση ενός μόνο παλμικού laser και ο χρόνος καθυστέρησης και η χρονική ανάλυση εξαρτώνται από τη διάρκεια του παλμού του laser. Υπάρχει βέβαια ένας βασικός περιορισμός στη τεχνική αυτή. Η δέσμη του laser είναι πολλή καλά εστιασμένη έτσι ώστε να παράγεται υψηλή πυκνότητα φωτονίων η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του φωτοπροϊόντος και τη ανίχνευση του. Ωστόσο εάν υψηλές πυκνότητες φωτονίων απαιτούνται για την έναρξη της αντίδρασης τότε μπορούν να συμβούν πολλαπλές διεγέρσεις του δείγματος οι οποίες παράγουν μη γραμμικές διαδικασίες. Η τεχνική δύο παλμών pump-probe επιτρέπει όχι μόνο το προσδιορισμό των σχηματιζόμενων ενδιάμεσων που εμπλέκονται σε μια διαδικασία αλλά και τη μελέτη της κινητικής τους ως προς το σχηματισμό και την κατανάλωση τους. Ο πρώτος παλμός το pump σημειώνει την έναρξη της αντίδρασης ή διεγείρει το μόριο σε μια διεγερμένη κατάσταση και ο δεύτερος παλμός το probe, έχοντας διαφορετική συχνότητα από το πρώτο, παράγει τη σκέδαση Raman. Η τεχνική αυτή προσφέρει τη δυνατότητα της καταγραφής real-time κινητικών φαινομένων καθώς και τη χρονική εξέλιξη των σχηματιζόμενων προϊόντων.

1. Pulsed excitation



2. Continuous wave excitation

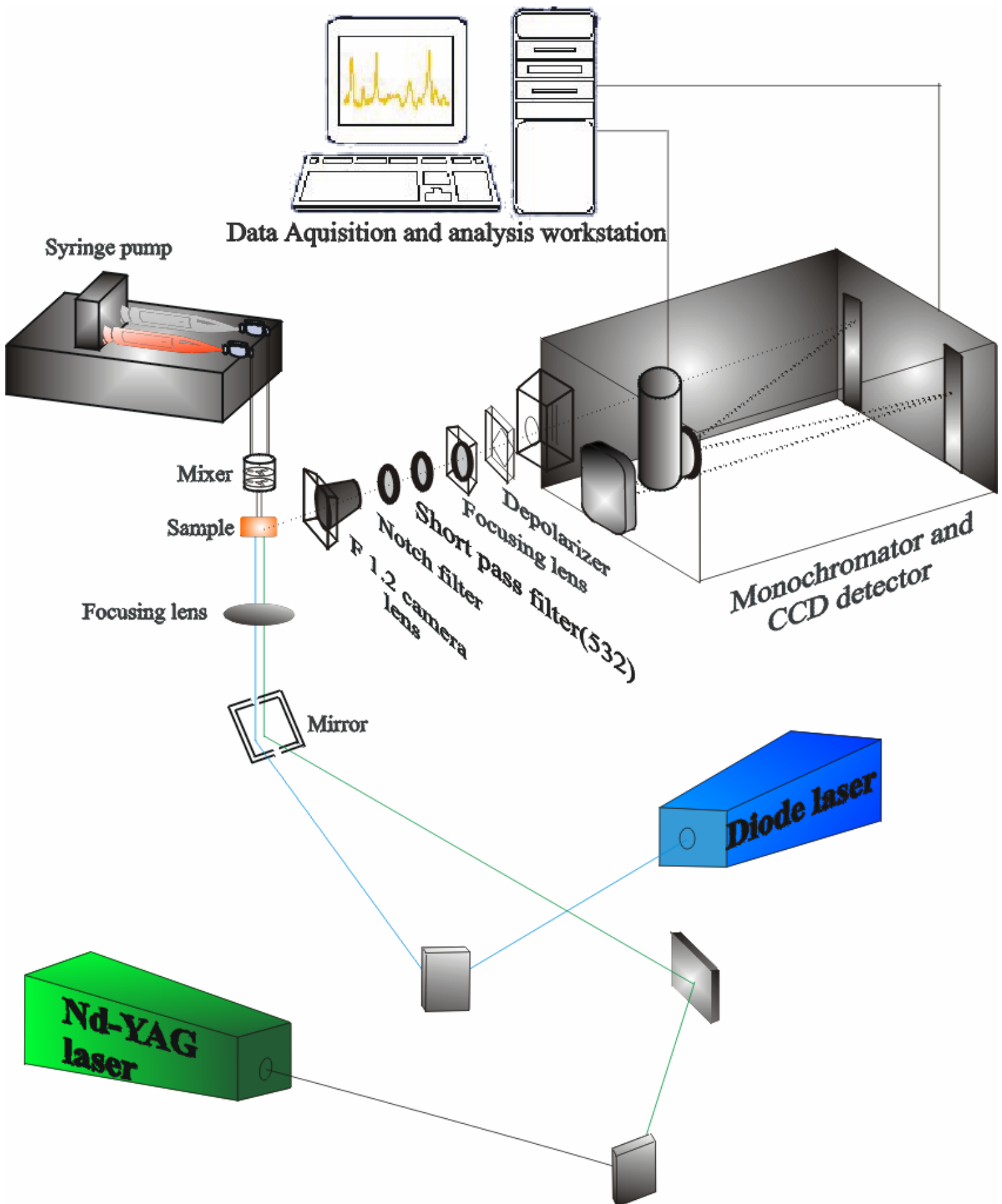


Σχήμα 2.2 Τρόποι διέγερσης του δείγματος κατά Resonance Raman τεχνική

2.4.1 Time-resolved Resonance Raman πειραματική διάταξη

Στο σχήμα 2.3 εικονίζεται η πειραματική διάταξη για Time-resolved Resonance Raman πειράματα. Η διάταξη αυτή αποτελείται από δύο laser, ένα παλμικό Nd:YAG laser με πλάτος παλμών 10 nsec, ρυθμό επανάληψης 1-15 Hz, μέγιστη ισχύ 240 mW και ένα laser διόδου με μέγιστη ισχύ 15 mW. Το Nd:YAG laser με θεμελιώδη συχνότητα η οποία εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος 1064 nm έχει ικανότητα παραγωγής αρμονικών συχνοτήτων με μήκος κύματος 532, 355 και 266 nm μέσω τη μή γραμμικής ανάμιξης οπτικών στοιχείων. Για παράδειγμα η δεύτερη αρμονική με

μήκος κύματος 532 nm παράγεται από υποδιπλασιασμό, με μη γραμμικό κρύσταλλο BBO, της θεμελιώδους συχνότητας με μήκος κύματος στα 1064 nm. Το laser διόδου παρέχει τη δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος στην περιοχή 413-417 nm . Στην περίπτωση μας θα χρησιμοποιηθεί από το Nd:YAG laser η δεύτερη αρμονική με μήκος κύματος 532 nm ως η pump-beam η οποία θα φωτοδιασπάσει το δεσμό Fe^{+2} -CO του συμπλόκου του πλήρους ανηγμένου κυτοχρώματος *cbh₃* με το CO πραγματοποιώντας με το τρόπο αυτό την έναρξη της αντίδρασης. Το εναρκτήριο βήμα για την αντίδραση πραγματοποιείται με τη φωτοδιάσπαση του CO από το Fe^{+2} έτσι ώστε στη θέση του CO να εισέλθει το μοριακό οξυγόνο και να ξεκινήσει η καταλυτική δράση του ενζύμου *cbh₃*. Αυτή η καταλυτική δράση θα παρατηρηθεί και θα ανιχνευθεί από τη probe beam 416 nm του laser διόδου. Το μήκος κύματος 416 nm που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του ενζύμου είναι σε συντονισμό με την απορρόφηση του στην περιοχή του Soret. Στη συνέχεια η σκεδαζόμενη από το δείγμα ακτινοβολία, αφού διέλθει από το μονοχρωμάτορα και αναλυθεί, φτάνει στον ανιχνευτή CCD (charge-coupled-device) όπου το σήμα πλέον καταγράφεται.



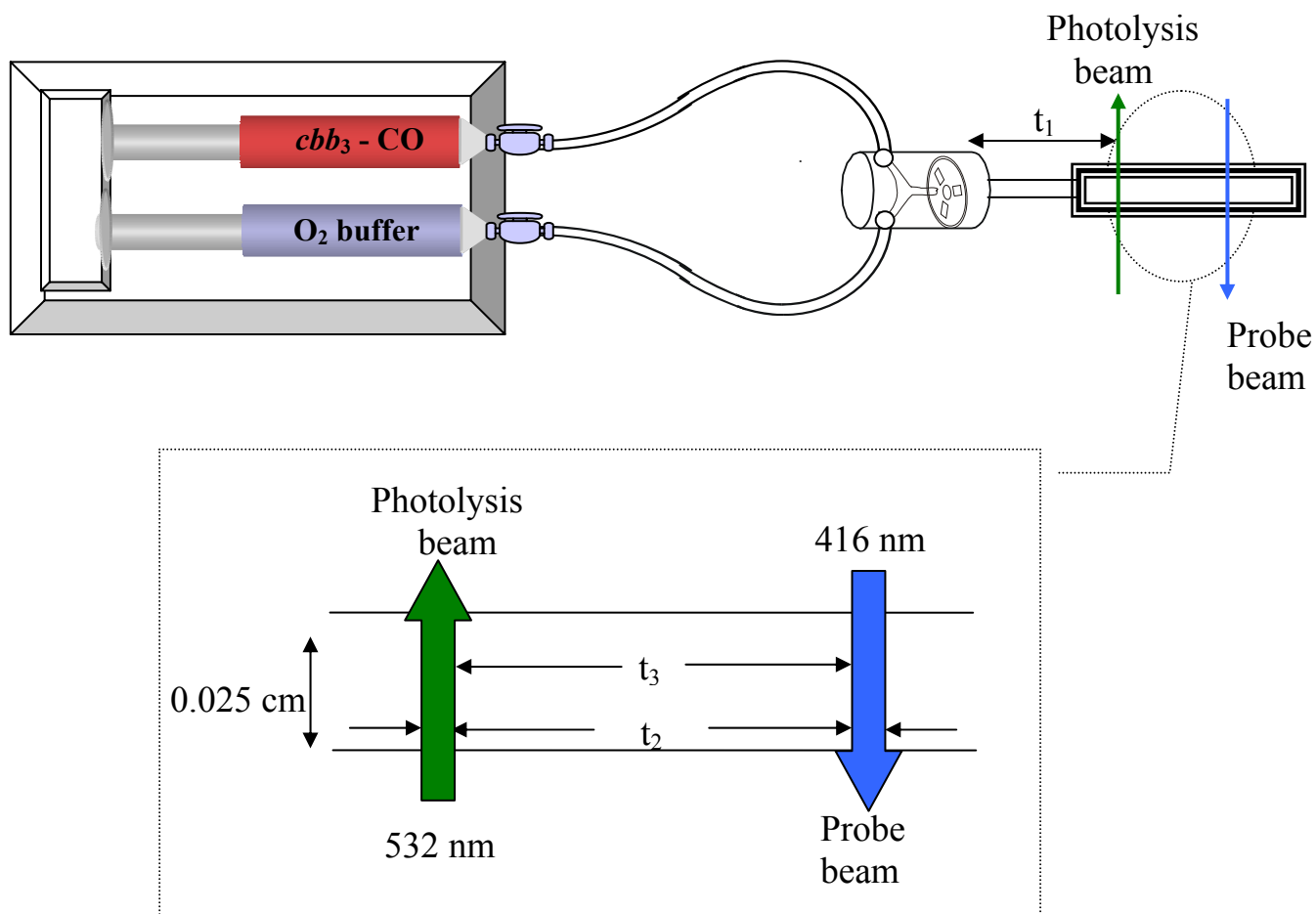
Σχήμα 2.3 Time-resolved Resonance Raman πειραματική διάταξη

2.4.2 Περιγραφή της τεχνικής συνεχούς ροής (Continuous Flow)

Για να μπορέσουμε να απομονώσουμε τα ποικίλα φαινόμενα μεταφοράς ηλεκτρονίου είναι ιδιαίτερα χρήσιμο να μελετήσουμε μορφές του ενζύμου στις οποίες μερικά οξειδοαναγωγικά κέντρα είναι οξειδωμένα άρα και ικανά να μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο οξυγόνο, και παράλληλα να τα συγκρίνουμε με άλλες μορφές του ενζύμου στις οποίες όλα τα οξειδοαναγωγικά κέντρα είναι ανηγμένα. Στη περίπτωση που το ένζυμο βρίσκεται στη μορφή του μικτού σθένους (mixed-valence) τα κυτόχρωμα b και c παραμένουν στην οξειδωμένη κατάσταση, ενώ το κυτόχρωμα b_3 και ο Cu_B που αποτελούν το διπυρηνικό κέντρο βρίσκονται στην ανηγμένη τους κατάσταση. Επιπλέον στη mixed-valence μορφή του ενζύμου η εξαφάνιση των πρώτων ενδιαμέσων που σχηματίζονται κατά την αναγωγή του οξυγόνου είναι πολύ πιο αργή σε σχέση με αυτή του ανηγμένου ενζύμου. Άρα συμπεραίνουμε ότι η mixed-valence μορφή αποτελεί ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη των πρώιμων ενδιαμέσων κατά την διαδικασία αναγωγής του οξυγόνου.

Για να ανιχνεύσουμε σε χρονική κλίμακα microsecond με millisecond την αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης cbb_3 με το μοριακό οξυγόνο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο flow-flash-probe, έχουμε κατασκευάσει μια συσκευή συνεχούς ροής η οποία εικονίζεται στο σχήμα 2.3 ως syringe-pump-mixer. Η μέθοδος flow-flash-probe πραγματοποιείται με τη χρήση δύο laser. Το ένα laser (pump beam) χρησιμοποιείται για την έναρξη της αντίδρασης φωτολύοντας κάποιον εξωγενή υποκαταστάτη από το ένζυμο, ώστε να εισέλθει στη θέση αυτού το μόριο που θα πραγματοποιήσει τη χημική αντίδραση. Το δεύτερο laser (probe beam) παρακολουθεί και ανιχνεύει την πρόοδο της χημικής αντίδρασης δίνοντας το τελικό φάσμα Raman. Στη δική μας περίπτωση η τεχνική flow-flash-probe με τη χρήση της συσκευής συνεχούς ροής (σχήμα 2.4) πραγματοποιείται ως εξής :

Η συσκευή συνεχούς ροής αποτελείται από δύο σύριγγες. Στη μία σύριγγα τοποθετούμε αναερόβια τη CO-υποκατεστημένη κυτοχρωμική οξειδάση cbb_3 (σύμπλοκο cbb_3 -CO) και στη άλλη σύριγγα τοποθετούμε το κορεσμένο από οξυγόνο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι δύο σύριγγες μετακινούνται συνεχώς από μία μηχανική αντλία έτσι ώστε να έχουμε την ανάμιξη των δύο διαλυμάτων καθώς αυτά διέρχονται από το mixer και το πέρασμα του μείγματος της αντίδρασης στο quartz flow-cell (κυψελίδα ροής από χαλαζία). Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται η έναρξη, η παρατήρηση και η ανίχνευση της χημικής αντίδρασης. Το εναρκτήριο βήμα για τη



Σχήμα 2.4 Πειραματική διάταξη της τεχνικής flow-flash-probe

αντίδραση πραγματοποιείται με τη χρήση της γραμμής 532 nm (pump beam) του laser Nd:YAG η οποία προκαλεί τη φωτοδιάσπαση του CO από το cbb_3 , έτσι ώστε να εισέλθει το οξυγόνο στη θέση του CO και να ξεκινήσει η αντίδραση του cbb_3 με το οξυγόνο. Μια δεύτερη γραμμή laser στα 416 nm που προέρχεται από το laser διόδου (probe beam) χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση και την ανίχνευση της αντίδρασης καθώς και το σχηματισμό των ενδιάμεσων της. Υπάρχουν τρεις χρονικές στιγμές οι οποίες είναι σημαντικές σε αυτή τη διαδικασία. Το χρονικό διάστημα t_1 είναι ο χρόνος που κάνει το δείγμα για να περάσει από το mixer στη δέσμη φωτόλυσης. Αυτός ο χρόνος πρέπει να είναι αρκετά μικρός της τάξης των millisecond, έτσι ώστε να αποφευχθεί σημαντική αυθόρμητη αντικατάσταση του CO από το οξυγόνο. Το δεύτερο χρονικό διάστημα t_2 είναι ο χρόνος που απαιτείται για να περάσει το δείγμα μέσα από τη δέσμη φωτόλυσης (pump beam) ή από τη probe δέσμη. Το τρίτο χρονικό διάστημα t_3 είναι ο χρόνος που χρειάζεται το δείγμα για να φτάσει από τη δέσμη φωτόλυσης στη probe δέσμη. Η χρονική ανάλυση του

συστήματος μας καθορίζεται από την ταχύτητα ροής, τις διαστάσεις της κυψελίδας και από την απόσταση ανάμεσα στις δύο δέσμες laser. Στην περίπτωση μας για ταχύτητα ροής 0,297 ml/min , κυλινδρική κυψελίδα μήκους 2 cm με ακτίνα βάσης 0,125 mm και απόσταση μήκους 20 μm ανάμεσα στις δύο δέσμες, επιτυγχάνουμε χρονική ανάλυση 200 μs. Η τεχνική flow-flash-probe που περιγράφεται παραπάνω έχει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις τεχνικές της απευθείας μίξης του ενζύμου με το οξυγόνο που πραγματοποιείται με μια μόνο γραμμή laser (pump beam). Χρησιμοποιώντας τη τεχνική απευθείας μίξης για τη μελέτη ενδιάμεσων τα οποία έχουν μεγάλο χρόνο ζωής , η ταχύτητα ροής του δείγματος πρέπει να είναι πολύ μικρή με αποτέλεσμα να συμβαίνει αυθόρμητη αντικατάσταση του CO από το οξυγόνο. Επιπλέον χρησιμοποιώντας μία μόνο δέσμη laser σε δείγμα του οποίου η ταχύτητα ροής είναι μικρή, ο χρόνος παραμονής του δείγματος στη δέσμη του laser είναι μεγάλος , ώστε να δημιουργούνται φωτοεπαγόμενα φαινόμενα στο δείγμα από τη δέσμη του laser.

2.5 Φασματοσκοπία IR

Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μια μετάβασης του μορίου μεταξύ δύο δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης. Για να συμβεί απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο πρέπει να υπάρξει αλλαγή στη διπολική ροπή που χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο τρόπο δόνησης. Δηλαδή το μόριο πρέπει να περιέχει ένα δίπολο το οποίο να δονείται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η μόνιμη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση

$$\mu_o = e \times r \quad (2.10)$$

όπου e το φορτίο, και r η απόσταση που χωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά φορτία.

Το ποσό της IR ακτινοβολίας που απορροφάται κατά τη διάρκεια μιας δόνησης καθώς και η ένταση της ταινίας στο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής (μεταβατική διπολική ροπή) που συμβαίνει κατά την μετάβαση. Θεωρούμε την περίπτωση ενός ετεροπυρηνικού διατομικού μορίου που βρίσκεται στην θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση στο n δονητικό επίπεδο. Η διπολική ροπή

μετάβασης για μετάβαση ηλεκτρικού διπόλου από το n δονητικό επίπεδο σε διαφορετικό δονητικό επίπεδο m της ίδιας ηλεκτρονιακής κατάστασης είναι

$$R_{nm} = \langle m | \mu | n \rangle \quad (2.11)$$

όπου μ η διπολική ροπή του μορίου στη βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση με μήκος δεσμού r . Η διπολική ροπή εξαρτάται από το μήκος δεσμού, άρα μπορεί να γραφτεί σαν άθροισμα όρων σε σειρά Taylor

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right)_0 q + \dots \quad (2.12)$$

όπου μ_0 η μόνιμη διπολική ροπή όταν $q=0$ και q η δονητική συντεταγμένη η οποία δίνεται από τη σχέση $q = r - r_e$ όπου r η ενδοπυρηνική απόσταση και r_e η απόσταση στην κατάσταση ισορροπίας. Αντικαθιστώντας το μ στο R_{nm} έχουμε

$$R_{nm} = \langle m | \mu | n \rangle = \mu_0 \langle m | n \rangle + \left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right)_0 \langle m | q | n \rangle \quad (2.13)$$

Ο πρώτος όρος είναι μηδέν λόγω της ορθογωνιότητας των καταστάσεων m , n . Ο δεύτερος όρος είναι μη μηδενικός εάν η διπολική ροπή εξαρτάται από τη μετατόπιση q δηλαδή όταν έχουμε μεταβολή της διπολικής ροπής $\left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right)_0 \neq 0$. Αυτό σημαίνει ότι

μια δόνηση ενός μορίου είναι ενεργή στο IR, όταν η διπολική του ροπή μεταβάλλεται. Η ένταση της $I \propto \left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right)^2$ απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής.

$$(2.14)$$

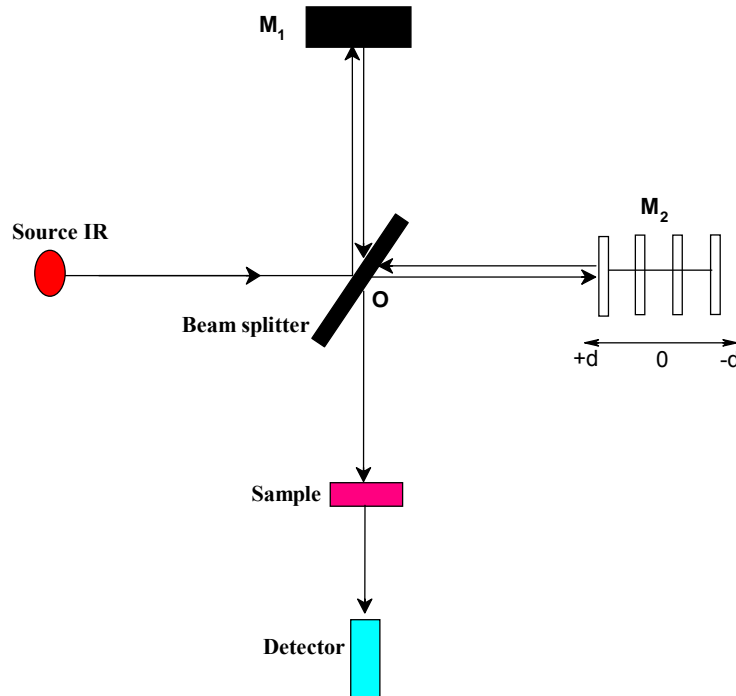
ενώ ποσοτικά καθορίζεται από το νόμο του *Beer-Lambert*:

$$I_v = I_0 10^{-\epsilon bc} \quad (2.15)$$

όπου I_v η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα μήκους b , συγκέντρωσης c , με συντελεστή μοριακής απορρόφησης ϵ και I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

2.5.1 Η αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson (σχήμα 2.5). Σε αυτού του είδους τα συμβολόμετρα



Σχήμα 2.5 Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson

μία δέσμη ακτινοβολίας IR που εκπέμπεται από την πηγή προσπίπτει σε ένα διαχωριστή δέσμης (beam-splitter) και διαχωρίζεται σε δύο δέσμες (δέσμη 1 και δέσμη 2). Το beam-splitter που επιτρέπει στο ένα μέρος της δέσμης να περνά ενώ αντανακλά το υπόλοιπο μέρος, τοποθετείται σε γωνία 45° ως προς την προσπίπτουσα δέσμη για να μεγιστοποιήσει τις εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που διαπερνά όσο και του μέρους που ανακλάται. Το μέρος της ακτινοβολίας που διαπερνά (δέσμη 2) προσπίπτει στον κινούμενο καθρέπτη M_2 , ο οποίος μετακινείται με σταθερή ταχύτητα από $-d$ σε $+d$ και ανακλάται προς τα πίσω προς το beam-splitter. Το ανακλώμενο από το beam-splitter μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (δέσμη 1) προσπίπτει στον ακίνητο καθρέπτη M_1 και ανακλάται και αυτό προς τα πίσω προς το beam-splitter. Η διαφορά διαδρομής μεταξύ των δύο δεσμών που προσπίπτουν στον κινούμενο M_2 και ακίνητο M_1 καθρέπτη είναι $\delta=2(OM_2-OM_1)$. Αυτή η διαφορά διαδρομής δ είναι γνωστή και ως retardation. Όταν οι δύο παραπάνω ανακλώμενες δέσμες συναντιόνται στο beam-splitter, συμβάλουν δηλαδή προστίθενται δίνοντας

συνεργετική συμβολή ή καταστροφική, ανάλογα με το αν τα δύο κύματα είναι σε φάση ή εκτός φάσης, το οποίο εξαρτάται από την θέση του κινούμενου καθρέπτη M_2 τη στιγμή της ανάκλασης. Το αποτέλεσμα της συμβολής των δύο κυμάτων είναι η δημιουργία κροσσών συμβολής, ενός δηλαδή συμβολογραφήματος (interferogram), το οποίο καταγράφεται από τον ανιχνευτή ως η εταβολή της έντασης $I(\delta)$ σε συνάρτηση με τη διαφορά διαδρομής δ η οποία δίνεται από τη παρακάτω σχέση

$$I(\delta) = 0,5I(\bar{\nu}) \left\{ 1 + \cos 2\pi \frac{\delta}{\lambda} \right\} = 0,5I(\bar{\nu}) \{ 1 + \cos 2\pi \bar{\nu} \delta \} \quad (2.16)$$

Η παραπάνω σχέση αποτελείται από δύο όρους, ένα σταθερό (dc) που είναι ίσος με $0,5I(\bar{\nu})$ και ένα μεταβαλλόμενο (ac) ο οποίος είναι ίσος με $0,5I(\bar{\nu}) \{ \cos 2\pi \bar{\nu} \delta \}$. Μόνο ο ac παράγοντας είναι σημαντικός για φασματοσκοπικές μετρήσεις γι αυτό και αναφέρεται σαν συμβολογράφημα $I(\delta)$ το οποίο για μονοχρωματική πηγή δίνεται από την εξίσωση

$$I(\delta) = 0,5I(\bar{\nu}) \cos 2\pi \bar{\nu} \delta \quad (2.17)$$

Στην πραγματικότητα, πολλοί παράγοντες επηρεάζουν το μέγεθος του σήματος που φτάνει στον ανιχνευτή. Είναι πρακτικά αδύνατο να βρεθεί διαχωριστής δέσμης (beam – splitter) που να έχει τα ιδανικά χαρακτηριστικά, 50% αντανάκλαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και 50% διαπερατότητα στο υπόλοιπο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Επίσης οι περισσότεροι IR ανιχνευτές δεν ανταποκρίνονται το ίδιο σε όλες τις συχνότητες. Άρα σύμφωνα με τα παραπάνω η εξίσωση μετατρέπεται στην

$$I(\delta) = B(\bar{\nu}) \cos 2\pi \bar{\nu} \delta \quad (2.18)$$

όπου $B(\bar{\nu})$ είναι μια παράμετρος που δίνει την ένταση της πηγής και είναι ίση με το γινόμενο της έντασης $I(\bar{\nu})$ της μονοχρωματικής ακτινοβολίας και ενός παράγοντα διόρθωσης $H(\bar{\nu})$ για τις αλλαγές του σήματος (ένταση ακτινοβολίας) που οφείλονται στα παραπάνω χαρακτηριστικά του οργάνου. Στα μαθηματικά η ένταση $I(\delta)$ αναφέρεται ως ο συνημιτονοειδής μετασχηματισμός Fourier του $B(\bar{\nu})$.

Στην περίπτωση που η πηγή είναι πολυχρωματική τότε η ένταση του συμβολογραφήματος δίνεται από το παρακάτω ολοκλήρωμα

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos 2\pi \bar{\nu} \delta \, d\bar{\nu} \quad (2.19)$$

το οποίο είναι το μισό ενός ζεύγους συνημιτονοειδούς μετασχηματισμού Fourier, με το άλλο μισό να είναι

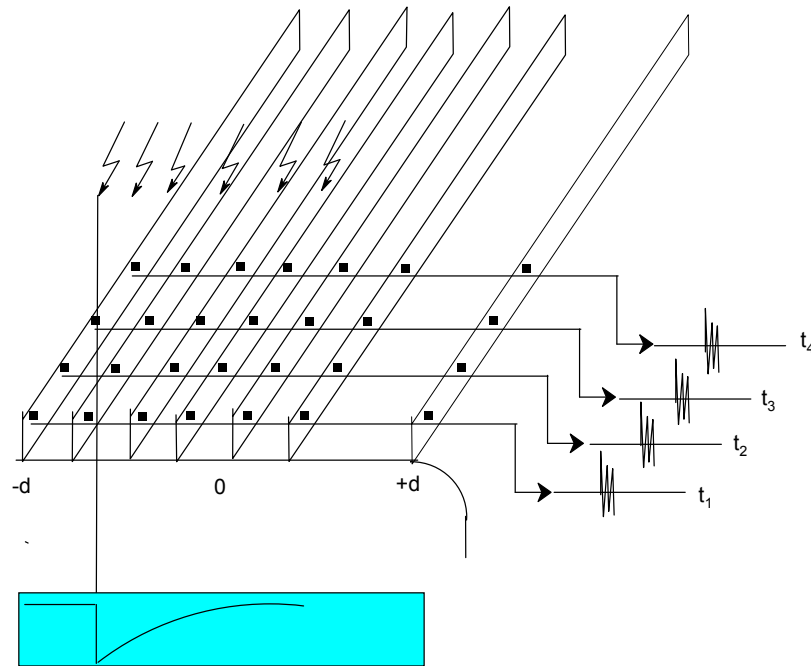
$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos 2\pi\bar{\nu}\delta \, d\delta \quad (2.20)$$

Το σήμα του ανιχνευτή είναι συνάρτηση της θέσης του κινούμενου φακού M_2 , της φασματικής πυκνότητας της πηγής καθώς και των ανακλαστικών ιδιοτήτων όλων των οπτικών συσκευών του συμβολομέτρου. Η διακριτική ικανότητα της παραπάνω οργανολογίας καθορίζεται από την απόσταση d την οποία ο κινούμενος καθρέπτης διανύει, ξεκινώντας από το σημείο 0 (ZPD zero-path-difference) στο οποίο οι δύο οπτικοί δρόμοι OM και OM_2 είναι ίσοι. Συγκεκριμένα αν η μέγιστη διαφορά διαδρομής του συμβολομέτρου είναι Δ_{\max} τότε η υψηλότερη διακριτική ικανότητα $\Delta(\bar{\nu})$ που μπορεί να επιτευχθεί είναι

$$\Delta(\bar{\nu}) = (\Delta_{\max})^{-1} \quad (2.21)$$

2.5.2 Περιγραφή της τεχνικής step-scan

Με την **step-scan** φασματοσκοπία είναι δυνατή η παρακολούθηση πειραματικών διαδικασιών που συμβαίνουν ταυτόχρονα σε μια περιοχή συχνοτήτων (frequency domain) και χρόνου (time domain). Η τεχνική της scan-scan FT-IR φασματοσκοπίας, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη χρονικά εξαρτημένων (time domain) πειραμάτων, επιτυγχάνεται κρατώντας σταθερό το κινούμενο καθρέπτη του συμβολομέτρου κατά την διάρκεια συλλογής των αποτελεσμάτων. Στην τεχνική αυτή η οποία παρουσιάζεται στο σχήμα 2.6 η διαδρομή (από $-d$ σε $+d$), που διανύει ο κινούμενος καθρέπτης, διαχωρίζεται σε πολλά τμήματα, με αποτέλεσμα αντί της συνεχούς κίνησης του καθρέπτη να έχουμε μία κίνηση βήμα προς βήμα. Σε κάθε βήμα ο κινούμενος καθρέπτης σταματά και το επαγόμενο, από το παλμό ενός laser, σήμα προκαλεί μια παροδική αλλαγή στην απορρόφηση του δείγματος η οποία οδηγεί σε μια περαιτέρω αλλαγή της έντασης στο συγκεκριμένο σημείο του συμβολογραφήματος. Συγκεκριμένα το συνολικό χρονικό προφίλ της φασματικής αλλαγής του δείγματος, η όποια προέρχεται από την εφαρμογή ενός παλμού, συλλέγεται και καταγράφεται ως ο μέσος όρος σε κάθε σημείο του καθρέπτη και σε κάθε χρονική στιγμή. Στη συνέχεια όλα τα δεδομένα τα οποία αντιστοιχούν σε κάθε σημείο του καθρέπτη σχηματίζουν μια σειρά από συμβολογραφήματα που το κάθε ένα αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο χρόνο. Το σήμα του συμβολογραφήματος



Σχήμα 2.6 Απεικόνιση της κίνησης του καθρέπτη κατά την step-scan τεχνική

παράγεται με την ολοκλήρωση του σήματος του ανιχνευτή κατά την διάρκεια του χρόνου στην οποία ο κινούμενος καθρέπτης παραμένει ακίνητος. Ο καθρέπτης επιτελεί το επόμενο βήμα και το συνολικά χρονικά εξαρτώμενο συμβολογραφίμα καταγράφεται λαμβάνοντας υπόψη τις παροδικές αλλαγές που συμβαίνουν σε όλα τα βήματα. Αυτό το σύνολο των δεδομένων μετασχηματίζεται σε χρονικά εξαρτώμενο φάσμα αφού επεξεργαστούν τα χρονικά εξαρτώμενα συμβολογραφήματα που προέρχονται από τις αλλαγές της έντασης. Στην step-scan TR FT-IR φασματοσκοπία η αλλαγή απορρόφησης που συμβαίνει στο δείγμα πρέπει να καταγράφεται με βάση ενός δείγματος αναφοράς (background). Με αυτό το τρόπο παίρνουμε τα φάσματα διαφοράς τα οποία υπολογίζονται από την εξής μαθηματική σχέση

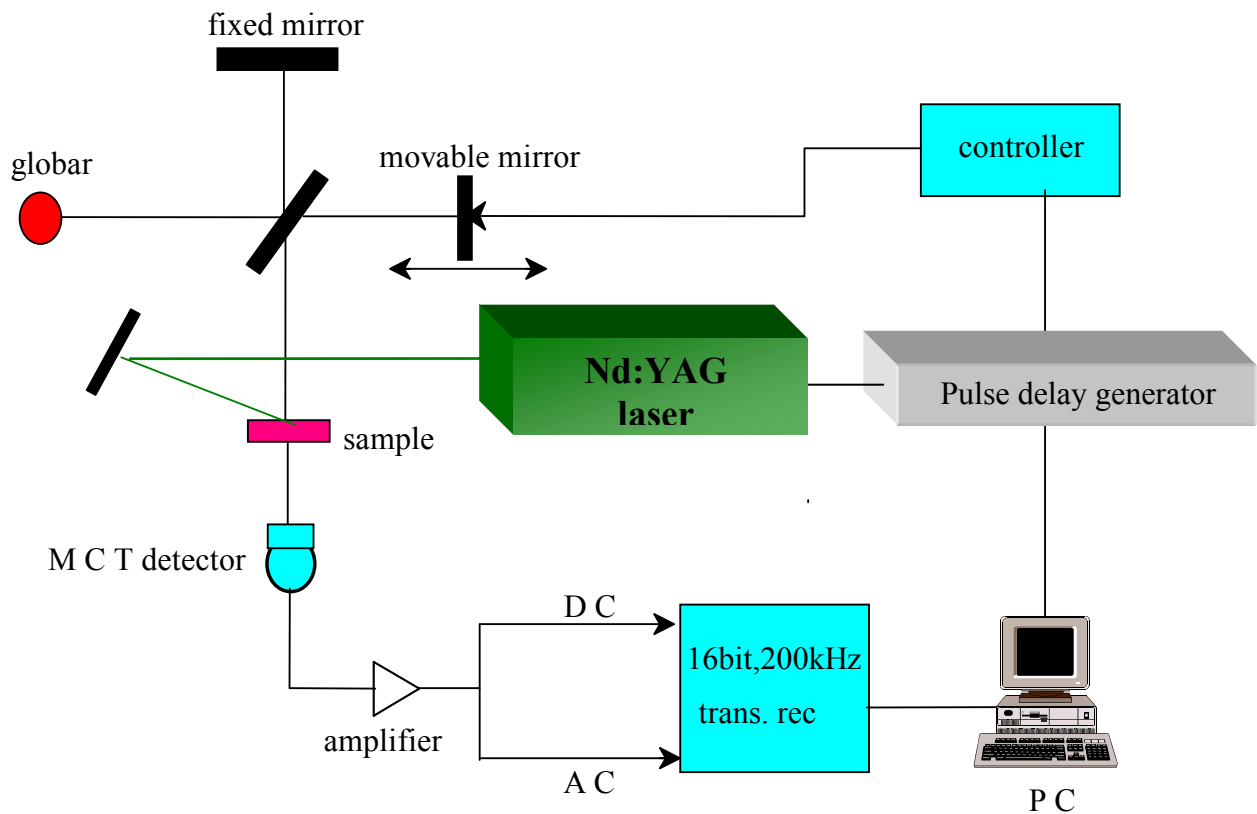
$$\Delta A = -\log(I_S/I_R) \quad (2.29)$$

όπου I_S , I_R οι εντάσεις του προς μελέτη δείγματος και του δείγματος αναφοράς αντίστοιχα. Ο κύριος περιορισμός της time-resolved step-scan FT-IR φασματοσκοπίας είναι η μη δυνατή επίτευξη να έχουμε την μέγιστη ευαισθησία και την μέγιστη χρονική διακριτική ικανότητα ταυτόχρονα. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή ένταση της

πηγής που έχει σαν συνέπεια τη χαμηλή ροή φωτονίων. Για σχετικά χαμηλές χρονικές διακριτικές ικανότητες της τάξης των μs , είναι απαραίτητοι 16-bit ADC μετατροπείς καθώς και MCT (Mercury Cadmium Telluride) ανιχνευτές που η μέγιστη απόκριση τους φτάνει το παραπάνω χρόνο. Για πολύ υψηλές χρονικές διακριτικές ικανότητες, πρέπει να χρησιμοποιούνται 12-bit (50ns) και 8-bit (5ns) ADC μετατροπείς καθώς και γρήγοροι φωτοβολταϊκοί MCT ανιχνευτές.

2.5.3 Περιγραφή της Step-Scan FT-IR πειραματικής διάταξης

Η πειραματική συσκευή που παρουσιάζεται στο σχήμα 2.7 αποτελείται από ένα συμβολόμετρο το οποίο περιέχει την λυχνία IR (globalar), τον διαχωριστή δέσμης (beamsplitter) , τον κινούμενο και ακίνητο καθρέπτη και ένα φωτοβολταϊκό MCT ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής αυτός, σαν ημιαγωγός, βασίζει τη λειτουργία του στην δημιουργία ενός ηλεκτρικού ρεύματος ανάλογου των φωτονίων που προσπίπτουν στην επιφάνεια του. Το σήμα του ανιχνευτή ενισχύεται από ένα προενισχυτή, ο οποίος διαθέτει δύο εξόδους μια αναλογική (AC) και μια ψηφιακή (DC) έξοδο. Η DC έξοδος παρέχει το στατικό συμβολογράφημα (δηλαδή πριν την φωτόλυση του δείγματος από το laser) και η AC παρέχει την επαγόμενη από το laser αλλαγή του συμβολογραφήματος. Τα AC και DC σήματα αφού ενισχυθούν από δύο προενισχυτές, ψηφιοποιούνται από ένα 16 bit 200 kHz digitizer. Η φωτόλυση του δείγματος επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τη δεύτερη αρμονική (532 nm) ενός Q-switched Nd:YAG laser. Το laser χρησιμοποιείται όχι μόνο για τη φωτόλυση του δείγματος αλλά και σαν σημείο αναφοράς για να ξεκινάει κάθε φορά ο κύκλος μέσα στον οποίο γίνεται η μέτρηση. Ο κύκλος της κάθε μέτρησης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο παλμών του laser. Η pulse delay generator συνδέεται με το φασματοφωτόμετρο και το laser με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να πραγματοποιείται ο χρονικός συντονισμός των δύο οργάνων. Η pulse delay generator πραγματοποιεί ρυθμιζόμενη πυροδότηση του Nd:YAG laser και ταυτόχρονα προγραμματίζει το χρόνο καταγραφής του φάσματος IR στέλνοντας τις απαραίτητες εντολές στο φασματοφωτόμετρο. Το χρονικό διάστημα στο οποίο παρατηρούμε την εξέλιξη της φωτοεπαγόμενης αντίδρασης οριοθετείται από το χρησιμοποιούμενο ρυθμό επανάληψης των παλμών του laser.



Σχήμα 2.7 Step-Scan FT-IR πειραματική διάταξη

Βιβλιογραφία

- (1) Varotsis, C.; Babcock, G. T. *Methods in Enzymology* **1993**, 226, 409 – 431
- (2) Clark R. J.; Dines T. J. *Raman Spectroscopy*, Wiley, **1982**.
- (3) Hollas J. M. *Modern Spectroscopy*, Wiley, **1996**.
- (4) Griffith P. R.; de Haseth J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*,
- (5) Han, S.; Ching, Y.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9445 – 9451.
- (6) Rousseau, D. L.; Han, S.; Song, S.; Ching, Y. *Journal of Raman Spectroscopy* **1992**, 23, 551 – 556.
- (7) Varotsis, C.; Oertling, W. A.; Babcock, G. T. *Applied Spectroscopy* **1990**, 44, 742 – 744.
- (8) Varotsis, C.; Babcock, G. T. *Methods in Enzymology* **1993**, 226, 409 – 431

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΨΥΛΙΚΑ: ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ *ccb₃*

3.1 Καλλιέργεια των βακτηρίων και προετοιμασία μεμβρανών

Για την καλλιέργεια του βακτηρίου *P. Stutzeri* χρησιμοποιήθηκε το strain ZoBell. Η προ-καλλιέργεια 0.5 lt αναπτύχθηκε με ολονύχτια επώαση κάτω από μικροαερόβιες συνθήκες στους 32°C σε Lucia-Bertani θρεπτικό μέσο. Η καλλιέργεια των βακτηρίων συνεχίστηκε με την προσθήκη 50 ml της προ-καλλιέργειας σε οκτώ φιάσκες οι οποίες περιέχουν 800 ml H₂O και 200 ml από το παρακάτω θρεπτικό υλικό: L-asparagine 2.0 g/l, Na₃citrate·2H₂O 7 g/l, KH₂PO₄ 2.0 g/l, MgSO₄·7H₂O, CaCl₂·2H₂O 0.1 g/l, NaCl 10 g/l, FeCl₃·6H₂O 25 mg/l, CuCl₂·2H₂O 0.17 mg/l, σε pH 8.0. Έπειτα οι οκτώ φιάσκες (κλεισμένες με πώμα) που περιέχουν την προ-καλλιέργεια επώαστηκαν υπό ανάδευση κάτω από μικροαερόβιες συνθήκες στους 32 °C για 30 ώρες. Μετά τη πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος, η επώαση των βακτηρίων σταμάτησε και τα κύτταρα συλλέχθηκαν (5-6 gr υγρά κύτταρα) με φυγοκέντρηση στις 4500 rpm για 30 min στους 4°C. Πριν τη φύλαξη τους στους -80 °C, πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5.

Για τη διαδικασία διάσπασης των κυττάρων τα 5-6 gr υγρών κυττάρων αρχικά διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 500 mM NaCl pH 7.5, 1 mM AEBSF μέχρι τελικού όγκου 200 ml και προστέθηκαν μερικοί κόκκοι DNAase I ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή πρωτεόλυση. Το διάλυμα ομογενοποιήθηκε για 1 min και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών με την βοήθεια υψηλών πιέσεων σε French press. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διάσπασης των κυττάρων προστέθηκε στο διάλυμα που περιέχει πλέον τις μεμβράνες, EDTA τελικής συγκέντρωσης 5 mM για τη συμπλοκοποίηση ελεύθερων μετάλλων. Το διάλυμα επώαστηκε για 5 min και στη συνέχεια ακολούθησε υπερφυγοκέντρηση του, στις 42000 rpm για 2:30 ώρες 4°C. Μετά την υπερφυγοκέντρηση συλλέχθηκαν οι μεμβράνες που αποτελούν το μαλακό μέρος και βρίσκονται εξωτερικά του διηθήματος, ενώ οι διασπασμένες κυτταρικές μεμβράνες που αποτελούν το σκληρό μέρος και βρίσκονται εσωτερικά του διηθήματος απορρίφθηκαν. Στη συνέχεια οι μεμβράνες ομογενοποιήθηκαν και

αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στις μεμβράνες προσδιορίστηκε με τη BCA μέθοδο και υπολογίστηκε γύρω στα 750 mg.

3.2 Διαλυτοποίηση των μεμβρανών και απομόνωση του κυτοχρωματος *cbh₃*

Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος FPLC P-50 Gradifac της Pharmacia, σε συνδυασμό με κολώνες πακεταρίσματος Tosohaas. Η εισαγωγή του δείγματος πραγματοποιήθηκε με την αντλία του συστήματος P-50 Gradifac, και η έκλυση της πρωτεΐνης με την υγρή χρωματογραφία παρακολούθηθηκε με ανιχνευτή ορατού/υπεριώδους ρυθμισμένο στα 280/405 nm αντίστοιχα.

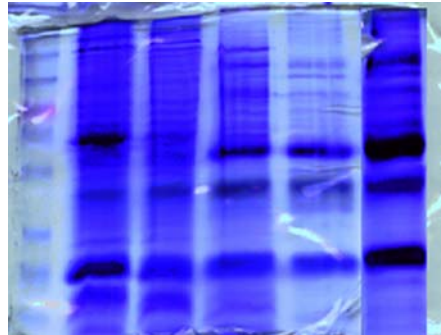
Για τη διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες συγκέντρωσης περίπου 9mg/ml με περιεκτικότητα 300-500 mg πρωτεΐνης. Αρχικά το διάλυμα των μεμβρανών διαλυτοποιήθηκε σε αναλογία 1:3 με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 10% w/v glycerol και 1 mM AEBSF pH 7.5 (ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή πρωτεόλυση) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης να κυμανθεί περίπου στα 3 mg/ml. Για τη διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη προστέθηκε το απορριπαντικό n-dodecyl β -D-maltoside (DM) σε αναλογία 2.5:1 ως προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Μετά απο ανάδευση και επώαση 5 min το διάλυμα των μεμβρανών φυγοκεντρήθηκε στις 40.000 rpm για μια 1 ώρα στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Το υπερκείμενο διάλυμα απο τη φυγοκέντρωση φορτώθηκε σε ανιοανταλλακτική στήλη 48 ml DEAE Toyopearl (Tosohaas) 650C η οποία είχε εξισορροπηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 10% w/v glycerol, 0.02% DM, pH 7.5. Η έκλυση απο τη στήλη πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή γραμμικής διαβάθμισης 0-25% 290 ml του ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl, 10% w/v glycerol, 0.02% DM, pH 7.5 με ταχύτητα ροής 7 ml/min. Τα κλάσματα που περιείχαν αίμες b και c, αφού εκλούστηκαν στο εύρος συγκέντρωσης 100-160 mM NaCl, συγκεντρώθηκαν προκειμένου να εισαχθούν στη δεύτερη χρωματογραφική στήλη. Σε αυτή τη στήλη (Fast Flow Chelating Sepharose, Pharmacia) των 40 ml είχε πραγματοποιηθεί κορεσμός της με CuSO_4 , έτσι ώστε να δεσμευτεί ο Cu^{2+} στο πληρωτικό υλικό της στήλης, και εξισορρόπηση της με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% w/v glycerol, 0.02% DM. Οι δεσμευμένες στο Cu^{2+} πρωτεΐνες

εκλούνται με την εφαρμογή γραμμικής διαβάθμισης 0-8 mM imidazole για 440 ml του ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% w/v glycerol, 8 mM imidazole, 0.02% DM, με ταχύτητα ροής 8 ml/min. Το προφίλ της έκλουσης παρακολουθήθηκε στα 280 και 405 nm και τα κλάσματα που εκλούστηκαν κατά το τέλος της γραμμικής διαβάθμισης του imidazole, συλλέχθηκαν και αραιώθηκαν σε αναλογία 1:4 με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% w/v glycerol, 0.02% DM για την απομάκρυνση του imidazole. Στη συνέχεια το αραιωμένο διάλυμα μεταφέρθηκε στη τρίτη χρωματογραφική στήλη των 20 ml (ανιοανταλλακτική DEAE Toyopearl 650C) η οποία είχε εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 0.02% DM, pH 7.5. Η έκλουση της πρωτεΐνης *cbb₃* επιτεύχθηκε με διαβάθμιση 0-30% 470 ml του ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA 0.02% DM, pH 7.5 με ταχύτητα ροής 10 ml/min. Τα κλάσματα που περιείχαν το *cbb₃* συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν σε pressure cell με φίλτρα που έχουν cut off 50 kDa και αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο.

3.3 Ηλεκτροφόρηση gel πολυακριλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση gel πολυακριλαμιδίου παρουσία SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε σε 12.5% πολυακρυλαμιδίου. Τα δείγματα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση αποδιατάχθηκαν με την προσθήκη σταθερή ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (loading buffer) που περιείχε 16% SDS, στους 23°C, για 5 min. Το απομονωμένο κυτόχρωμα *cbb₃* αποτελείται από τρεις υπομονάδες με μοριακά βάρη 41, 35 και 26 kDa, όπως φαίνεται στο SDS-PAGE gel στη στήλη 5. Μια επιπλέον μπάντα εμφανίζεται περίπου στα 90 kDa η οποία οφείλεται πιθανώς σε πολυμερισμό των αποδιαταγμένων υπομονάδων και η αλλαγή στην ένταση της εξαρτάται από τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζονται τα τρία κύρια στάδια της απομόνωσης του *cbb₃*.



M 1 2 3 4 5

Σχήμα 3.1 Στήλη 1: Οι υπομονάδες απο τις μεμβράνες. Στήλη 2 : διαλυτοποιημένες μεμβράνες. Στήλη 3 : Δείγμα απο τη πρώτη ανιοανταλλακτική DEAE κολώνα. Στήλη 4 : Δείγμα από τη Fast Flow Chelating Sepharose κολώνα Στήλη 5 : Δείγμα απο τη τρίτη (τελευταία) ανιοανταλλακτική DEAE κολώνα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

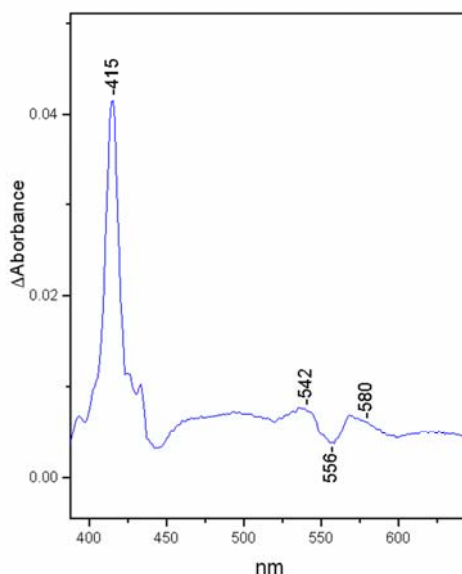
ΜΕΛΕΤΕΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΤΟΥ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ

ΑΙΜΗ b_3 -Cu_B ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ cbb_3

4.1 Μελέτες για τη φωτοδυναμική του υποκατεστημένου με CO κυτοχρώματος cbb_3

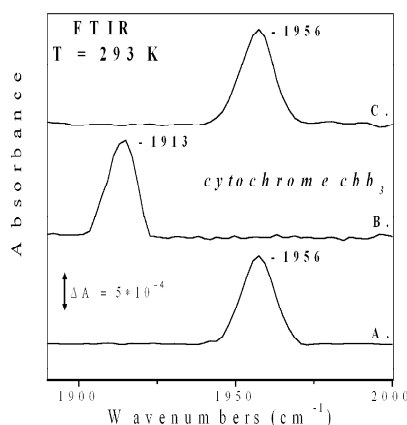
Μελέτες Resonance Raman συντονισμού του πλήρως ανηγμένου^{2b} και του δεσμευμένου με CO³ κυτοχρώματος cbb_3 ενζύμου έδειξαν ότι το διπυρηνικό κέντρο έχει μια μοναδική ενεργή διάταξη που παρουσιάζεται πιο «ανοιχτή» σε σχέση με τις άλλες κυτοχρωμικές οξειδάσες. Άρα μελέτες για τη φωτοδυναμική του συμπλόκου CO-κυτοχρώμα cbb_3 σε συνδυασμό με αυτές της aa_3 κυτοχρωμικής οξειδάσης μπορούν να δώσουν συγκεκριμένες πληροφορίες που αφορούν τις ηλεκτρονιακές και γεωμετρικές ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου αίμης/Cu_B και τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις αίμης/Cu_B με τον αξονικό υποκαταστάτη.

Η παρουσία των κορυφών στα 542 nm και 580 nm και ενός ώμου στα 556 nm στο Uv-Vis φάσμα διαφοράς του CO-υποκατεστημένου ενζύμου cbb_3 μείον το πλήρως ανηγμένο ένζυμο (σχήμα 4.1), πιστοποιούν τη συναρμογή του CO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο.^{2,3} Στην περιοχή του Soret το φάσμα διαφοράς παρουσιάζει ένα μέγιστο στα 415 nm που οφείλεται στη συναρμογή του CO στην αίμη b_3 δηλαδή το σχηματισμό του b_3 -CO συμπλόκου.



Σχήμα 4.1 Uv-Vis φάσμα διαφοράς του CO-υποκατεστημένου ενζύμου cbb_3 σε σχέση με το πλήρως ανηγμένο ένζυμο

Τα time-resolved FT-IR φάσματα της φωτοδιάσπασης του CO στη *cbb₃* κυτοχρωμική οξειδάση δείχνουν ότι η εκθετική μείωση του transient Cu_B-CO συμπλόκου συμβαίνει ταυτόχρονα με τη δημιουργία του b₃-CO συμπλόκου και ότι η ν(CO) δόνηση τάσης του Cu_B στους 2065 cm⁻¹ είναι ίδια με εκείνη του κυτοχρώματος *aa₃*^{4,5} και του κυτοχρώματος *bo₃*⁶, παρόλο που το κυτόχρωμα *cbb₃* δεν περιέχει το cross-link **His-Tyr244** και τη φαρνεσυλική αλυσίδα. Στο σχήμα 4.2 παρουσιάζονται τα FT-IR φάσματα του CO συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος *cbb₃*. Η δέσμευση του CO στο κυτόχρωμα *cbb₃* προκαλεί την εμφάνιση μιας απλής δόνησης στους 1956 cm⁻¹ (σχήμα 4.2-A), η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O του b₃-CO συμπλόκου και μετατοπίζεται στους 1913 cm⁻¹ κατά την ίδια αντίδραση με το ισοτοπικά υποκατεστημένο μόριο ¹³CO (σχήμα 4.2-B). Η συχνότητα της CO δόνησης παραμένει η ίδια όταν πραγματοποιηθεί η αντίδραση με το κυτόχρωμα *cbb₃* διαλυμένο σε δευτεριωμένο διαλύτη (σχήμα 4.2-C) πράγμα που δείχνει την μη ύπαρξη δεσμού υδρογόνου στο δεσμευμένο, με το κυτόχρωμα *b₃*, CO μόριο.

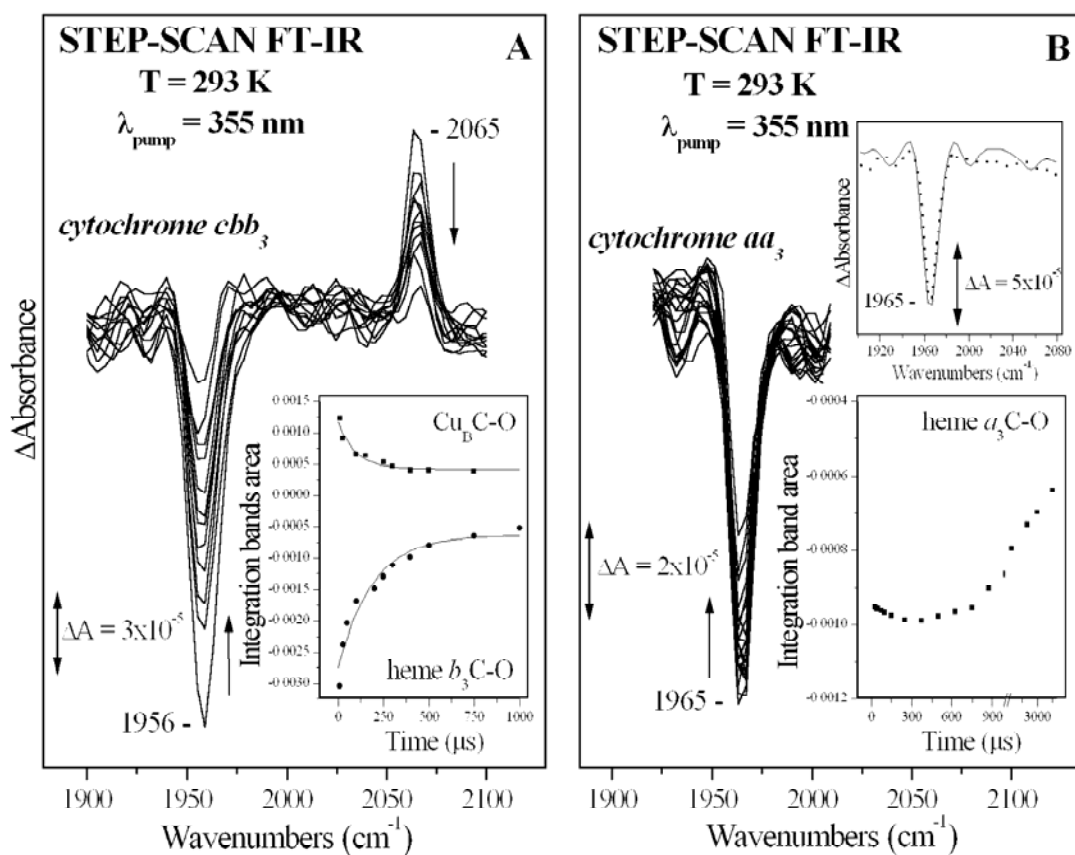


Σχήμα 4.2 FTIR φάσματα του συμπλόκου *cbb₃*-CO στους 293 K. (A) pH 7.5, (B) *cbb₃*-¹³CO, pH 7.5, (C) pH 7.5.

Η συχνότητα της παραπάνω δόνησης παρουσιάζεται πολύ κοντά σε εκείνες που έχουν παρατηρηθεί για τα CO σύμπλοκα των *aa₃* κυτοχρωμικών οξειδάσων^{4,5,7,8,10-14} και του κυτοχρώματος *bo₃*⁶ από το *E. coli*, αλλά και μετατοπισμένη κατά 6 cm⁻¹ ψηλότερα σε σχέση με αυτή του CO συμπλόκου του κυτοχρώματος *cbb₃* από το *Rh. Capsulatus* στους 15 K.^{2a} Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα Raman, στα οποία η δόνηση τάσης ν(Fe-CO) ανιχνεύεται στους 492 cm⁻¹, δείχνουν ξεκάθαρα ότι το CO δεσμεύεται σε μια μόνο

διαμόρφωση στην αίμη b_3 , στη λεγόμενη β -μορφή, η οποία αποτελεί και τη σταθερότερη διαμόρφωση για το ένζυμο σε συμφωνία με τους Wanget *al.*³

Στο σχήμα 4.3 απεικονίζονται τα time-resolved FT-IR φάσματα ($t_d = 5 \mu\text{s} - 1 \text{ms}$, 8cm^{-1} φασματική διακριτική ικανότητα) της φωτοδιάσπασης του CO του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 σε $\text{pD}=7.5$ από ένα nanosecond Nd:YAG laser το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία στα 355 nm. Συγκεκριμένα μετά τη διάσπαση του δεσμού $\text{Fe}^{+2}\text{-CO}$ το CO απομακρύνεται από την αίμη b_3 και δεσμεύεται στο Cu_B^{+1} σχηματίζοντας το σύμπλοκο $\text{Cu}_B^{+1}\text{-CO}$.



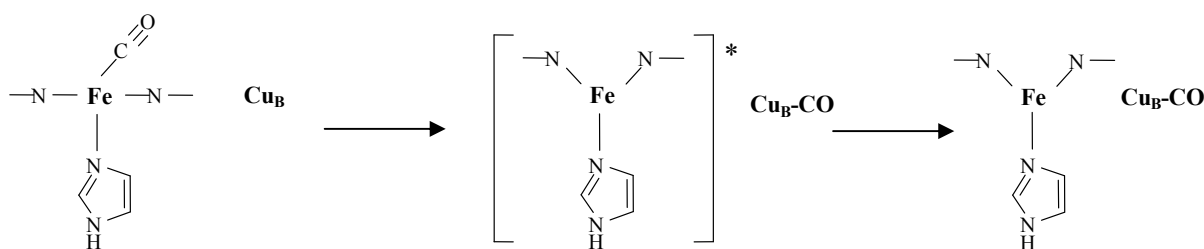
Σχήμα 4.3 (A) Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς του συμπλόκου $cbb_3\text{-CO}$ (pD 7.5) στα 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 και 1300 μs μετά τη φωτόλυση του CO, με φασματική διακριτική ικανότητα 8cm^{-1} και χρονική διακριτική ικανότητα 5 μs . Inset: Κινητική ανάλυση της $\nu_{\text{CO}(\text{Cu}_B)}=2065 \text{cm}^{-1}$ δόνησης και της $\nu_{\text{CO}(\text{Fe})}=1956 \text{cm}^{-1}$ σε συνάρτηση με το χρόνο μετά τη φωτόλυση του CO. (B) Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς του συμπλόκου $Cco\text{-CO}$ (pD 7.5) στα 30, 40, 50, 75, 100, 150, 250, 375, 500, 625, 750, 875, 1000, 1750, 2500, 3000 και 3765 μs μετά τη φωτόλυση του CO. (a) Κινητική ανάλυση της $\nu_{\text{CO}(\text{Fe})}=1956 \text{cm}^{-1}$ σε συνάρτηση με το χρόνο μετά τη φωτόλυση του CO. (b) Step-scan φάσμα διαφοράς του φωτοδιασπόμενου συμπλόκου $Cco\text{-CO}$ σε pD 7.5 (dot line) και σε pH 7.5 (solid line) στα 5 μs .

Η αρνητική κορυφή στους 1956 cm^{-1} προκύπτει από τη φωτόλυση του δεσμού $\text{Fe}^{+2}\text{-CO}$, και η θετική κορυφή η οποία εμφανίζεται στους 2065 cm^{-1} οφείλεται στη $\nu(\text{CO})$ δόνηση τάσης του Cu_B όπως έχει βρεθεί, κάτω από συνθήκες συνεχούς φωτόλυσης υπό χαμηλές θερμοκρασίες, από τους Carcia-Horsman *et al*^{2a}, και η ένταση παραμένει έως και το 1 ms. Οι συχνότητες των $\nu(\text{CO})$ δονήσεων τάσης του Cu_B στους 2064 και 2042 cm^{-1} στις a_3 τύπου οξειδάσες συσχετίζονται με την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του συμπλόκου $\text{Cu}_B^{+1}\text{-CO}$, την α και β μορφή αντίστοιχα.^{11,13} Στην περίπτωση μας οι συχνότητες των δονήσεων τάσης $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ του $cb_3\text{-CO}$ συμπλόκου δηλώνουν την παρουσία της β μορφής του ενζύμου με αποτέλεσμα αυτές να βρίσκονται πάνω στην $\nu(\text{Fe-CO})$ vs $\nu(\text{C-O})$ ευθεία συσχέτισης. Αντίθετα όμως η $\nu(\text{CO})$ δόνηση τάσης του συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-CO}$ υιοθετεί την α μορφή. Παρόλα αυτά τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι παρόλο που το κυτόχρωμα cb_3 δεν περιέχει το cross-link His-Tyr244^{2a}, οι $\nu(\text{C-O})$ συχνότητες που ανιχνεύσαμε είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες συχνότητες των CO-υποκατεστημένων τύπου aa_3 ^{4,5,7,11} και bo_3 ^{6,9} κυτοχρωμικών οξειδασών. Η εκθετική μείωση της κορυφής στους 2065 cm^{-1} με χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 130\text{ }\mu\text{s}$ και η εκθετική αύξηση της κορυφής στους 1956 cm^{-1} με χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 165\text{ }\mu\text{s}$ δείχνουν ότι ο σχηματισμός του $b_3\text{-CO}$ συμπλόκου συμβαίνει ταυτόχρονα με την εξαφάνιση του συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-CO}$.

Πειράματα IR και Uv-Vis του CO-υποκατεστημένης aa_3 κυτοχρωμικής οξειδάσης έδειξαν ότι το $\text{Cu}_B^{+1}\text{-CO}$ σύμπλοκο έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου $1.5\text{ }\mu\text{s}$ ($k_{-1} = 5 \times 10^5\text{ s}^{-1}$) πράγμα που σημαίνει ότι το CO εγκαταλείπει το Cu_B σε κλίμακα χρόνου της τάξης των μs , απελευθερώνεται στο διαλύτη, και έτσι επέρχεται μια θερμική ισορροπία μεταξύ του $\text{Cu}_B^{+1}\text{-CO}$ και του ελεύθερου CO που βρίσκεται στο διαλύτη ($K = 87\text{ M}^{-1}$).^{7,8,10} Η επαναδέσμευση του CO στην αίμη a_3 συμβαίνει με μια διαδικασία θερμική σε χρονική κλίμακα των ms ($k_2 = 1030\text{ s}^{-1}$).^{7,8,10} Στο σχήμα 3.3B απεικονίζονται τα time-resolved FT-IR φάσματα ($t_d = 5\text{ }\mu\text{s}$ -4 ms, 8 cm^{-1} φασματική διακριτική ικανότητα) της φωτοδιάσπασης του CO του πλήρως ανηγμένου μιτοχονδριακού κυτοχρώματος aa_3 σε D_2O . Δεν παρατηρήσαμε αλλαγές στην ένταση της κορυφής στους 1965 cm^{-1} κατά το χρονικό διάστημα $t_d = 5\text{ }\mu\text{s}$ -750 μs , το οποίο δείχνει ότι η επαναδέσμευση του CO στην αίμη a_3 δεν έχει πραγματοποιηθεί στο παραπάνω χρονικό διάστημα. Σε χρόνους μεγαλύτερους από 750 μs η αύξηση στην ένταση της κορυφής στους 1965 cm^{-1} οριοθετεί την έναρξη της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη a_3 . Αυτή η συμπεριφορά είναι παρόμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί

από τους *Ondrias et al*¹⁶ και *Dyer et al*^{7,8}. Οι ερευνητές αυτοί πρότειναν ότι στη χρονική κλίμακα που το CO εγκαταλείπει το Cu_B ($t_{1/2} = 1.5 \mu\text{s}$) δεν υπάρχουν ουσιαστικές παρεμποδίσεις από την αίμη ως προς την επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 διότι οι τυπικές ταχύτητες επαναδέσμευσης είναι σε κλίμακα χρόνου της τάξης των nanosecond. Γι αυτό το λόγο κάποια άλλου είδους παρεμποδίσεις πρέπει να υπάρχουν, ως προς την επαναδέσμευση του CO, οι οποίες να απορρέουν είτε από μια τοπική αλλαγή διαμόρφωσης στη πρωτεΐνη, είτε από τη δέσμευση ενός ενδογενούς υποκαταστάτη που μπλοκάρει τη distal θέση δέσμευσης. Time-resolved picosecond Resonance Raman πειράματα¹⁷ έδειξαν ότι η αίμη α_3^{+2} έχει αριθμό συναρμογής πέντε με τη proximal ιστιδίνη δεσμευμένη στην αίμη στους πρώτους χρόνους αμέσως μετά τη φωτόλυση του CO. Άρα κανένα ενδογενές υποκαταστάτη δεν μπλοκάρει τη distal θέση δέσμευσης.

Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για τη φωτοδιάσπαση και επαναδέσμευση του CO στην α_3 κυτοχρωμική οξειδάση προάγεται σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:



Η κατάσταση με τον αστερίσκο αντιπροσωπεύει μια μη εξισορροπημένη κατάσταση της αίμης α_3 και χαρακτηρίζεται από μια αύξηση στη μετατόπιση της Fe-His δόνησης τάσης.¹⁶ Το Cu_B⁺¹-CO σύμπλοκο δημιουργείται πλήρως μέσα σε 1 ps μετά τη φωτοδιάσπαση του CO από την αίμη α_3 , αποδεικνύοντας την απουσία ενεργών παρεμποδίσεων για τη μεταφορά του CO από την αίμη α_3 στο Cu_B.⁸ Η μη εξισορροπημένη κατάσταση της αίμης α_3 επανέρχεται στην εξισορροπημένη ανηγμένη κατάστασή της σε χρόνους μεγαλύτερους των 10 μs ¹⁶ μετά τη φωτοδιάσπαση και η επαναδέσμευση του CO αρχίζει να πραγματοποιείται σε χρόνους μεγαλύτερους των 500 μs . Η σταδιακή εξαφάνιση του συμπλόκου Cu_B-CO ($t_{1/2}=1.5 \mu\text{s}$) ακολουθείται από την εξισορρόπηση του Cu_B⁺¹-CO με το ελεύθερο CO που βρίσκεται στο διαλύτη η οποία συμβαίνει με μια σταθερά ταχύτητας $7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ και συνοδεύεται από την επαναφορά της αίμης α_3 στην αρχική της κατάσταση και όχι από την επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 .^{7,8,10}

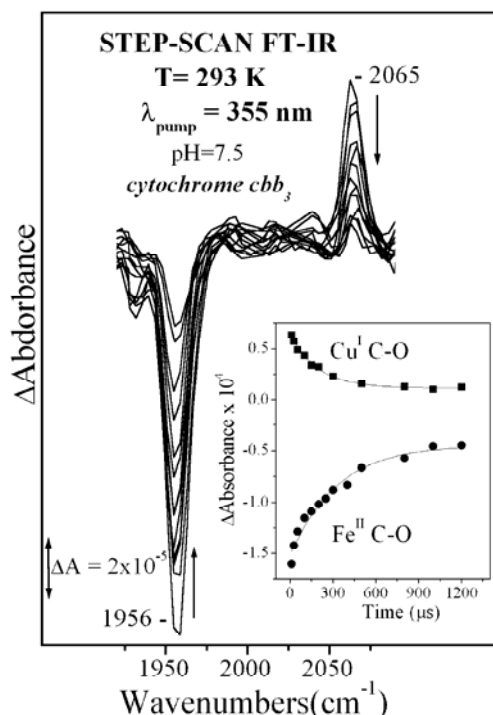
Η απευθείας επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 μπορεί να ενισχυθεί με την αναστολή της κίνησης του υποκαταστάτη μακριά από το άτομο του Cu_B, με την

τοποθέτηση παρεμποδίσεων διάχυσης και επίσης με την απομάκρυνση στερεοχημικών παρεμποδίσεων γύρω από το Fe της αίμης α_3 . Επίσης είναι αναμενόμενο ότι παροδικές κινήσεις της πρωτεΐνης απαιτούνται έτσι ώστε να γίνει δυνατή η είσοδος του υποκαταστάτη στο Fe της αίμης α_3 και η διαφυγή του από το Cu_B προς το περιβάλλον του διαλύτη. Βασιζόμενοι στην παραπάνω ανάλυση προτείνουμε ότι το περιβάλλον της πρωτεΐνης γύρω από το Cu_B κατευθύνει τον θερμικά διασπώμενο υποκαταστάτη, στο χρονικό διάστημα 5-750 μs , μακριά από το διπυρηνικό κέντρο α_3 - Cu_B , εμποδίζοντας τον έτσι από το να επαναδεσμευθεί στην αίμη α_3 με την απελευθέρωση του από το Cu_B . Γι αυτό το διπυρηνικό κέντρο αίμη α_3 - Cu_B είναι διευθετημένο με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να διευκολύνει την απευθείας απόσπαση και δέσμευση του φωτοδιασπώμενου CO από την αίμη α_3 στο Cu_B και την μετέπειτα αργή επαναδέσμευση του στην αίμη α_3 .

Το κυτόχρωμα cbb_3 είναι η μοναδική αιμοχαλκοξειδάση στην οποία η διάσπαση του Cu_B -CO συμπλόκου συνοδεύεται από το σχηματισμό του Fe-CO συμπλόκου. Είναι επίσης η μοναδική οξειδάση που παρουσιάζει ανοιχτή δομή διπυρηνικού κέντρου χωρίς να υιοθετεί την α -μορφή με αποτέλεσμα οι distal αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στο Cu_B να ελαχιστοποιούνται. Επίσης δεν υπάρχει δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδρόξυ-φαρνεσύλ και της υδρόξυ-τυροσίνης τα οποία συναρμόζουν την αίμη α_3 και το Cu_B . Οι ταχύτητες που υπολογίσαμε για τη διάσπαση του CO από το Cu_B και την επαναδέσμευση του στην αίμη b_3 δείχνουν ότι το καθοριστικό στάδιο για την επαναδέσμευση του CO στην αίμη b_3 , σε αντίθεση με την α_3 και b_{o3} , είναι το $t_{1/2}$ του Cu_B -CO συμπλόκου. Παρόλο που το διπυρηνικό κέντρο αίμη b_3 - Cu_B είναι -πιο ανοιχτό σε σχέση με το κέντρο αίμη α_3 - Cu_B , η διαδικασία επαναδέσμευσης είναι γρηγορότερη και πυροδοτείται από τη διάσπαση του Cu_B -CO συμπλόκου χωρίς να παρουσιάζει lag phase. Η τρισδιάστατη δομή της α_3 οξειδάσης δεν αποκαλύπτει μονοπάτια ή κανάλια για είσοδο και έξοδο υποκαταστατών. Γι αυτό εάν οι δομικές διαφοροποιήσεις του διπυρηνικού κέντρου του cbb_3 αντικατοπτρίζουν τα κινητικά δεδομένα που παρατηρήσαμε, τότε δεδομένα ως προς τη φωτοδυναμική του cbb_3 -CO σε χρόνους μικρότερους των 5 μs θα είναι σημαντικά για τη διευκρίνιση του μηχανισμού εισόδου και εξόδου υποκαταστατών στις αιμοχαλκοξειδάσες. Πειράματα προς αυτή τη κατεύθυνση βρίσκονται σε πρόοδο.

Επίσης μελετήθηκαν (σχήμα 4.4) τα time-resolved FT-IR φάσματα ($t_d = 5 \mu\text{s}$ -1 ms, 8 cm^{-1} φασματική διακριτική ικανότητα) της φωτοδιάσπασης του CO του πλήρως

ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 σε $\text{pH}=7.5$ από ένα nanosecond Nd:YAG laser το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία στα 355 nm.



Σχήμα 4.4 Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς του συμπλόκου cbb_3 -CO ($\text{pH} 7.5$) στα 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000 και 1300 μs μετά τη φωτόλυση του CO, με φασματική διακριτική ικανότητα 8 cm^{-1} και χρονική διακριτική ικανότητα 5 μs . Inset: Κινητική ανάλυση της $\nu_{\text{CO}(\text{Cu}_B)}=2065 \text{ cm}^{-1}$ δόνησης και της $\nu_{\text{CO}(\text{Fe})}=1956 \text{ cm}^{-1}$ σε συνάρτηση με το χρόνο μετά τη φωτόλυση του CO.

Η εκθετική μείωση της κορυφής στους 2065 cm^{-1} με χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 150 \mu\text{s}$ και η εκθετική αύξηση της κορυφής στους 1956 cm^{-1} με χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2} = 162 \mu\text{s}$ δείχνουν ότι σε $\text{pH}=7.5$ ο σχηματισμός του b_3 -CO συμπλόκου συμβαίνει ταυτόχρονα με την εξαφάνιση του συμπλόκου Cu_B -CO, σε χρόνους ημίσειας ζωής παρόμοιους με αυτούς του $\text{pD}=7.5$.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι, οι συχνότητες της $\nu(\text{C-O})$ δόνησης του δεσμού Fe^{+2} -CO στους 1956 cm^{-1} και του δεσμού Cu_B^{+2} -CO στους 2065 cm^{-1} είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες συχνότητες σε $\text{pD}=7.5$, το οποίο σημαίνει ότι η αλλαγή του διαλύτη από H_2O σε D_2O δεν προκαλεί μετατόπιση της $\nu(\text{C-O})$ δόνησης των συμπλόκων Fe^{+2} -CO και Cu_B^{+2} -CO. Με αυτό το τρόπο πιστοποιήσαμε την μη ύπαρξη δεσμών υδρογόνου στο υποκατεστημένο CO των παραπάνω συμπλόκων.

3.2 Μελέτες για δραστικότητα του κυτοχρώματος *cbh₃* ως προς το O₂

Από μελέτες συντονισμού Raman συμπλόκων CO-αιμοπρωτεϊνών, είναι γνωστό ότι οι ιδιότητες του υποκαταστάτη σε θέση trans ως προς το δεσμευμένο CO, μπορούν να επηρεάσουν το δεσμό Fe-CO, άρα και τη συχνότητα της δόνηση τάσης $\nu(\text{C-O})$.¹⁹ Το CO δεσμεύεται στο Fe της αίμης μέσω ενός π δεσμού επαναφοράς από το d_{π} τροχιακό του Fe στο π^* τροχιακό του CO και ενός σ δεσμού που σχηματίζεται από το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του CO και το d_z^2 τροχιακού του Fe. Αύξηση της αλληλοεπικάλυψης των d_{π}, π^* τροχιακών θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τάξης δεσμού του Fe-CO και τη ταυτόχρονη μείωση της τάξης του δεσμού C-O. Ωστόσο οι δύο αξονικοί υποκαταστάτες της αίμης (His,CO) ανταγωνίζονται για το ίδιο d_z^2 τροχιακού του Fe για το σχηματισμό του σ δεσμού με το Fe. Έτσι ισχυροποίηση του σ δεσμού Fe-His θα έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση του δεσμού Fe-CO. Αυτό το συμπέρασμα είναι σύμφωνο με μελέτες συντονισμού Raman μοντέλων πορφυρινικών ενώσεων, οι οποίες δείχνουν ότι αύξηση της ισχύος του δεσμού Fe-proximal υποκαταστάτη προκαλεί την εξασθένιση του δεσμού Fe-CO.

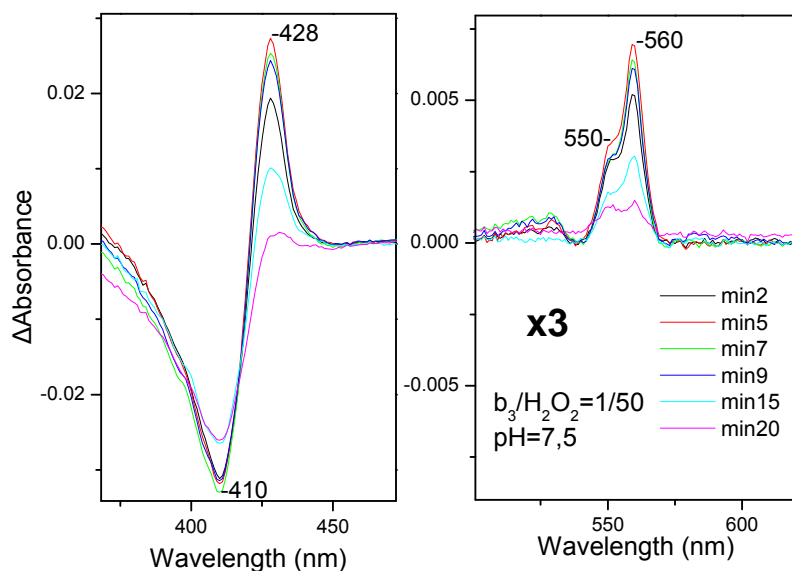
Σύμφωνα με το παραπάνω συλλογισμό η χαμηλή συχνότητα της $\nu(\text{Fe-CO})$ δόνησης του *cbh₃* σε σύγκριση με την οξειδάση *aa₃* από τα μιτοχόνδρια, αποδίδεται σε αύξηση του ανιονικού χαρακτήρα του ιμαδαζολίου της proximal ιστιδίνης. Όμως η αύξηση του ανιονικού χαρακτήρα της ιστιδίνης συνεπάγεται αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του Fe^{+2} της αίμης *b₃* και άρα ισχυροποίηση του π δεσμού επαναφοράς, από το Fe^{+2} στο CO, με αποτέλεσμα τη μείωση της δόνηση τάσης $\nu(\text{C-O})$ όπως πράγματι παρατηρείται από τα φάσματα FTIR. Ωστόσο, η αναμενόμενη αύξηση της τάξης του δεσμού $\text{Fe}^{+2}\text{-CO}$ αντισταθμίζεται από την ισχυρή αλληλεπίδραση του d_z^2 τροχιακού του Fe^{+2} με την ιστιδίνη για το σχηματισμό του σ δεσμού, με επακόλουθο τη μείωση της $\nu(\text{Fe}^{+2}\text{-CO})$ συχνότητας.¹²

Μελέτες συντονισμού Raman της δέσμευσης του CO στο κυτόχρωμα *aa₃* από το *Rh. Sphaeroides* έδειξαν ότι η αντικατάσταση της His333, η οποία είναι ένας ενδογενής υποκαταστάτης του Cu_B, με μια Asn έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της $\nu(\text{Fe}^{+2}\text{-CO})$ δόνησης 16 cm^{-1} χαμηλότερα από τη συχνότητα που παρατηρείται για το μη μεταλλαγμένο ένζυμο κάτι που δηλώνει τη παρουσία β-μορφής.²⁰ Ωστόσο στην περίπτωση αυτή το μεταλλαγμένο ένζυμο με τη β-μορφή δεν παρουσίασε καταλυτική δράση με υπόστρωμα το οξυγόνο.²¹ Επίσης σε μια άλλη μελέτη συντονισμού Raman στο κυτόχρωμα *aa₃* από το *Rh. Sphaeroides*, οι Rousseau *et al*²² πρότειναν ότι η

μετάλλαξη της Tyr288, η οποία σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με την His284 έναν ενδογενή υποκαταστάτη του Cu_B, με μια Phe οδηγεί στην καταστροφή του cross-link **His284-Tyr288** με αποτέλεσμα η δομή του διπυρηνικού κέντρου να «διαλύεται» καθιστώντας το ένζυμο μη δραστικό για την αναγωγή του οξυγόνου. Ο παραπάνω συλλογισμός δικαιολογήθηκε από το γεγονός ότι με την απουσία του cross-link **His284-Tyr288**, το διπυρηνικό κέντρο «ανοίγει» και μια από τις ιστιδίνες που είναι προσδεμένες στο Cu_B συναρμόζεται στο Fe της αίμης α₃, με αποτέλεσμα να εμποδίζει την πρόσδεση του οξυγόνου στο Fe. Ωστόσο οι Varotsis *et al*²³ με φασματοσκοπία Uv-Vis, FTIR και Raman συντονισμού έδειξαν ότι, με τη μετάλλαξη της Tyr280 (ονοματολογία κατά το *P. Denitrificans*) με μία His, το cross-link **His276-Tyr280** παύει να υφίσταται με αποτέλεσμα ο Cu_B να πλησιάζει πιο κοντά στην αίμη α₃ στο CO-υποκατεστημένο ένζυμο, επηρεάζοντας τις ιδιότητες των εξωγενών υποκαταστατών της αίμης α₃. Γι αυτό το λόγο στο το μεταλλαγμένο ένζυμο η αίμη α₃ διατηρεί την ενεργή της διαμόρφωση η οποία της επιτρέπει να δεσμεύσει και να ανάγει το οξυγόνο.

Με βάση τη προτεινόμενη λειτουργία της Tyr244 ως δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου για την ενεργοποίηση και την αναγωγή του O₂ από την κυτοχρωμική οξειδάση εξετάσαμε τη δραστηριότητα του κυτοχρώματος *cbb*₃ ως προς την αναγωγή του O₂, για το λόγο ότι το ένζυμο αυτό δεν περιέχει, το πλέον διατηρημένο αμινοξύ στην οικογένεια των τελικών οξειδασών, την Tyr άρα και το cross-link **His-Tyr**. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν συμφωνούν απόλυτα με αυτά των Varotsis *et al*²³, ότι δηλαδή χωρίς το cross-link **His-Tyr** το ένζυμο είναι δραστικό στην αναγωγή του O₂. Το κυτόχρωμα *cbb*₃ αποτελεί το μοναδικό παράδειγμα β-μορφής κυτοχρωμικής οξειδάσης που παρουσιάζει δραστηριότητα με υπόστρωμα το O₂ αποδεικνύοντας ότι οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου, των κυτοχρωμικών οξειδασών, που χαρακτηρίζουν την α-μορφή δεν είναι απαραίτητες για την ενζυμική δραστηριότητα ως προς το O₂. Στο σχήμα 4.5 φαίνεται το οπτικό φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος *cbb*₃ με το H₂O₂ σε σχέση με το οξειδωμένο ένζυμο σε χρονικό διάστημα της τάξης των 20 λεπτών. Το μόριο του H₂O₂ είναι ένα ανάλογο του μοριακού οξυγόνου. Από ηλεκτρονιακή άποψη το H₂O₂ χρειάζεται δύο ηλεκτρόνια για την πλήρη αναγωγή του ενώ για την αναγωγή του O₂ απαιτούνται τέσσερα ηλεκτρόνια, δύο για κάθε άτομο. Το H₂O₂ και παρά τις ομοιότητες που παρουσιάζει με το O₂ δίνει διαφορετικά προϊόντα όπως θα δούμε στα παρακάτω οπτικά φάσματα διαφοράς. Στην περιοχή του Soret παρουσιάζεται ελάχιστο στα 410

nm και μέγιστο στα 428 nm, ενώ στην περιοχή των Q bands εμφανίζονται δύο ταινίες απορρόφησης με μέγιστο στα 550 και 560 nm αντίστοιχα. Συγκεκριμένα παρατηρούμε μία αύξηση στην περιοχή του Soret και των Q bands μέχρι τα πέντε πρώτα λεπτά της αντίδρασης αφού ορίζουμε σαν χρόνο μηδέν το σημείο κατά το οποίο προσθέτουμε το H_2O_2 .

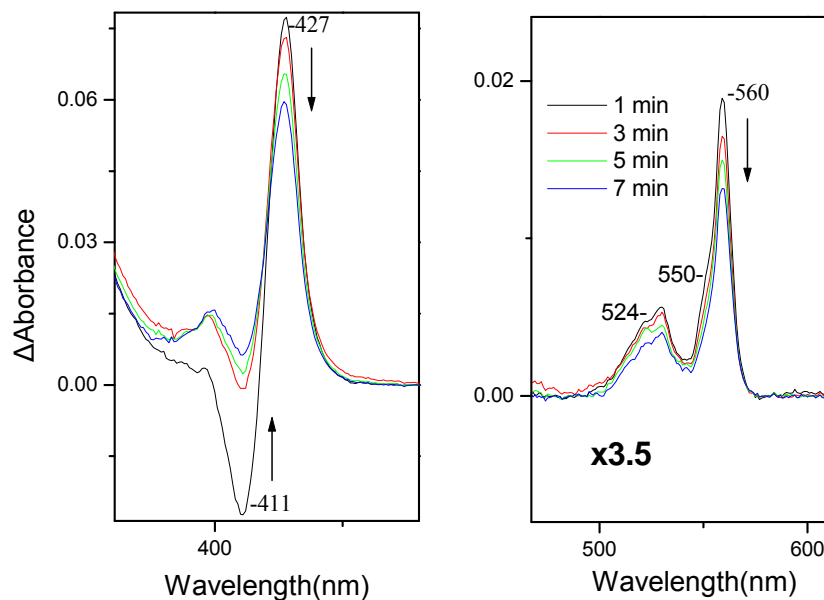


Σχήμα 4.5 UV-Vis φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το H_2O_2 σε σχέση με το οξειδωμένο ένζυμο

Μετά το πάροδο των πέντε λεπτών οι ταινίες απορρόφησης στις παραπάνω περιοχές αρχίζουν να φθίνουν και να μειώνεται η ένταση των απορροφήσεων τους. Ταυτόχρονα παρατηρούμε και την αρνητική ταινία απορρόφησης στα 410 nm, που οφείλεται στην απορρόφηση του οξειδωμένου ενζύμου, να μειώνεται σαν ένδειξη της αντίδρασης με το H_2O_2 και της συναρμογής του στο Fe της αίμης b_3 .

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντίδραση του μικτού σθένους κυτοχρώματος cbb_3 (c^{+3}, b^{+3}, b_3^{+2} -CO) με το μοριακό οξυγόνο ώστε να παρατηρηθεί η καταλυτική δράση του συμπλόκου. Στο σχήμα 4.6 παρουσιάζονται τα οπτικά φάσματα διαφοράς της αντίδρασης του μικτού σθένους κυτοχρώματος cbb_3 με το O_2 , σε σχέση με το οξειδωμένο ένζυμο, στο χρονικό διάστημα της τάξης των 10 λεπτών. Στην περιοχή του Soret παρουσιάζεται ελάχιστο στα 411 nm και μέγιστο στα 427 nm, ενώ στην περιοχή των Q bands εμφανίζονται δύο ταινίες απορρόφησης με μέγιστο στα 524 και 560 nm αντίστοιχα και ένας ώμος στα 550 nm. Παρατηρούμε ότι οι ταινίες

απορρόφησης στην περιοχή του Soret είναι παρόμοιες με εκείνες της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το H_2O_2 , ενώ στη περιοχή των Q bands οι ταινίες απορρόφησης είναι διαφορετικές.



Σχήμα 4.6 UV-Vis φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του μικτού σθένους κυτοχρώματος cbb_3 με το O_2 , σε σχέση με το οξειδωμένο ένζυμο

Βιβλιογραφία

- (1) (a) Saraste, M. *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 331-336. (b) Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M. *FEBS Lett.* **2001**, *508*, 29-35.
- (2) (a) García-Horsman, J. A.; Berry, E.; Shapleigh, J. P.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3113-3119. (b) Varotsis, C.; Babcock, G. T.; Garcia-Horsman, A.; Gennis, R. B. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 16817-16820.
- (3) Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9363-9364.
- (4) Park, S.; Pan, L-P.; Chan, S. I.; Alben, J. *Biophysical J.* **1996**, *71*, 1036-1047.
- (5) Iwase, T.; Varotsis, C.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1415-1416.

- (6) Puustinen, A; Bailey, J. A; Dyer, R. B.; Mecklenberg, S. L; Wikstrom, M.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13195-13200.
- (7) Dyer, R. B.; Einarsdóttir, O.; Killough, P. M.; Lopez-Garriga, J. J.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7657-7659.
- (8) Dyer, R. B.; Peterson, K. A.; Stoutland, P. O.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1994**, *33*, 500-507.
- (9) Lemon, D. D.; Calhoun, M. W.; Gennis, R. B.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11953-11956.
- (10) (a) Woodruff, W. H. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 177-188. (b) Woodruff, W. H.; Einarsdóttir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; Atherton, S. J.; Goldberck, R. A.; Dawes, T. D.; Kliger, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *88*, 2588-2564.
- (11) Rost, B.; Behr, J.; Hellwig, P.; Richter O.-M. H.; Ludwig, B.; Michel, H.; Mäntele, W. *Biochemistry* **1998**, *38*, 7565-7571.
- (12) Varotsis, C.; Vamvouka, M. *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 7670-7673.
- (13) Mitchell, D. M.; Shapleigh, J. P.; Archer A. M.; Alben, J. O.; Gennis R. B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9446-9450.
- (14) Wang, J.; Takahashi, S.; Hosler, P. H.; Mitchell, D. M.; Ferguson-Miller, S.; Gennis R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9819-9825.
- (15) Alben, J. O.; Moh, P. P.; Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 234-237.
- (16) Findsen, E. W.; Centeno, J.; Babcock, G. T.; Ondrias, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5367-5372.
- (17) Schelvis, J. P. M.; Deinum, G.; Varotsis, C.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8409-8416.
- (18) Argade, P.V, Ching, Y. C & Rousseau, D. **1984** *Science*, *225*, 329-331.
- (19) (a) Yu, N.-T., Kerr, E.A. *In Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Spiro, T. G., Ed., Wiley Intersciences: New York, 1998, Vol. 3, pp 39-95
(b) Wang, J., Ching, Y-C., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Hill, J. J. Rumbley, J. & Gennis R. B. **1993** *J. Am. Chem. Soc.* *115*, 3390-3391.
- (20) Hosler, J.P., Kim, Y., Shapleigh, J. P., Gennis R. B., Alben, J. O., Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. **1994** *J. Am. Chem. Soc.* *116*, 5515-5516.

- (21) Shapleigh, J. P., Hosler, J.P., Tecklenburg, M. M. J., Kim, Y., Babcock, G. T., Gennis R. B., Ferguson-Miller, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *89*, 4786-4790.
- (22) Das, T. K., Pecoraro, C., Tomson, F. L., Gennis, R. B. & Rousseau D. L. **1998** *Biochemistry* *37*, 14471-14476.
- (23) Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. **2002** *J. Biol.Chem.*, *277*, 13563-13568.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ cbb_3 ΩΣ NO-ΑΝΑΓΩΓΑΣΗ

5.1 Εισαγωγή

Οι αιμοχαλκοξειδάσες και οι βακτηριακές NO-αναγωγάσες προταθεί ότι προέρχονται, κατά την διάρκεια της εξέλιξης, από ένα κοινό πρόγονο¹. Η κοινή αυτή καταγωγή προτάθηκε εξαιτίας της ομοιότητας ως προς τα δομικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στα δύο αυτά ένζυμα και ειδικότερα ως προς τη μεγάλη καταλυτική υπομονάδα, η οποία περιέχει σημαντική ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων και διατήρηση των σημαντικών καταλοίπων (περιλαμβανομένων των έξι ιστιδινών οι οποίες είναι προσδεμένες στα μέταλλα). Τοπολογικές μελέτες της καταλυτικής υπομονάδας της NO-αναγωγάσης έδειξαν ότι αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες, όπως ακριβώς και η υπομονάδα I των αιμοχαλκοξειδασών^{2,3}. Το ενεργό κέντρο και στα δυο αυτά ένζυμα είναι ένα διπυρηνικό κέντρο το οποίο αποτελείται από ένα Fe αίμης και ένα δεύτερο μέταλλο που είναι Cu στις οξειδάσες και Fe στην NO-αναγωγάση⁴.

Με βάση τα παραπάνω κοινά δομικά χαρακτηριστικά, έχει προταθεί ότι οι μηχανισμοί της αναγωγής του O_2 και του NO περιέχουν κοινά χαρακτηριστικά και πιθανόν το O_2 και το NO να μπορούν να χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτικά υποστρώματα και από τις δύο οικογένειες ενζύμων. Οι αιμοχαλκοξειδάσες αποτελούν τα τελικά ένζυμα της αερόβιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και καταλύουν την αντίδραση του O_2 σε H_2O ενώ η NO-αναγωγάση καταλύει την αναγωγή NO σε N_2O ($2NO + 2e^- + 2H^+ \rightarrow N_2O + H_2O$) το οποίο αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο της αναερόβιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά την διαδικασία της απονιτροποίησης όπου τα νιτρικά (NO_3^-) μετατρέπονται σε N_2 . Ο μηχανισμός της αναγωγής του NO από τη NO-αναγωγάση δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη με αποτέλεσμα κάθε σύγκριση με το μηχανισμό της αναγωγής του O_2 από τις οξειδάσες, να είναι ανέφικτη. Ωστόσο είναι ενδιαφέρον ότι μια βακτηριακή NO-αναγωγάση απο το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* παρουσιάζει δυνατότητα αναγωγής του O_2 και επίσης ότι μερικές αιμοχαλκοξειδάσες καταλύουν την αναγωγή του NO σε N_2O δηλαδή παρουσιάζουν ενεργότητα NO-αναγωγάσης. Πρόσφατα οι Giuffrè et al⁵ έδειξαν ότι δύο τελικές οξειδάσες που απομονώθηκαν από το βακτήριο *Thermus thermophilus*, οι ba_3 και caa_3 , παρουσιάζουν χαμηλή αλλά υπολογίσιμη

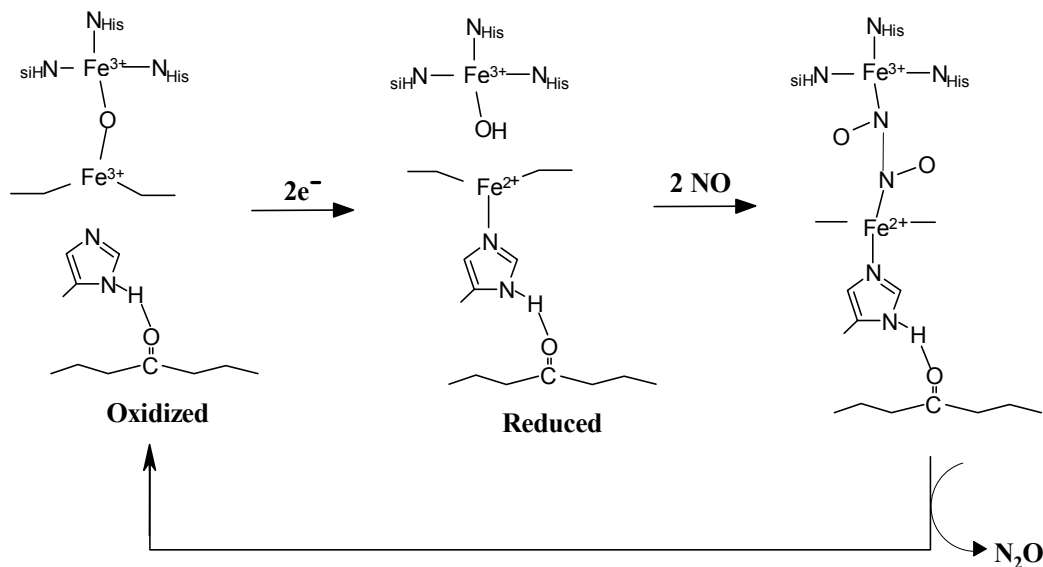
δραστηριότητα NO-αναγωγής, σε αντίθεση με την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια η οποία με τη παρουσία περίσσειας αναγωγικού δεν παρουσιάζει τέτοια δραστηριότητα⁶.

Οι συσχετίσεις μεταξύ της αναγωγής του O₂ και του NO ξεκίνησαν όταν η σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων της υπομονάδας NorB της NO-αναγωγής από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* με αυτή της πρωτογενούς δομής των *cbb₃* οξειδασών, αποκάλυψε μη αναμενόμενες ομοιότητες. Οι *cbb₃* οξειδάσες, οι οποίες εμφανίζουν την υψηλότερη ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων με την NO-αναγωγή, εκφράζονται κυρίως κάτω από μικροαερόβιες συνθήκες και παρουσιάζουν μια μη αναμενόμενη υψηλή συγγένεια για το οξυγόνο. Βασιζόμενοι στο παραπάνω έχει προταθεί ότι η απονιτροποίηση και η διαδικασία της αερόβιας αναπνοής μπορεί να προέρχονται από ένα κοινό παρονομαστή¹. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι στα πρώιμα χρόνια της γης, όταν το NO στην ατμόσφαιρα βρισκόταν σε αφθονία σε σχέση με το O₂, η NO-αναγωγή εμφανίστηκε πρώτα, και αργότερα όταν τα επίπεδα του ατμοσφαιρικού οξυγόνου άρχισαν να ανεβαίνουν, μικροαερόβιες οξειδάσες όπως το *cbb₃* εξελίχθηκαν, οι οποίες πιθανόν να απορρέουν από τη αρχέγονη NO-αναγωγή, προάγοντας έτσι την εμφάνιση των σημερινών αιμοχαλκοξειδασών όταν υψηλά επίπεδα O₂ είχαν επιτευχθεί στην ατμόσφαιρα εξαιτίας της φωτοσύνθεσης⁵. Η υπόθεση ότι υπάρχει ένας σύνδεσμος στην εξέλιξη μεταξύ των ενζύμων που ανάγουν το O₂ και το NO βασίζεται έως τώρα στις δομικές ομοιότητες των δύο αυτών ενζύμων. Μια ουσιαστική απόδειξη για τη παραπάνω υπόθεση δεν υπάρχει μέχρι σήμερα διότι ο μηχανισμός της αναγωγής του NO από τη NO-αναγωγή δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη ενώ αντίθετα αυτός των οξειδασών έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Ωστόσο αν η υπόθεση της από κοινού εξέλιξης των δύο ενζύμων είναι σωστή, αναμένεται ότι οι δύο αυτές αναγωγές (NO-αναγωγή και οξειδάση) να μπορούν να χρησιμοποιούν O₂ και το NO σαν εναλλακτικά υποστρώματα αλλά η κάθε μια με διαφορετική αποτελεσματικότητα

Τα δομικά χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν μια NO-αναγωγή από μια O₂ αναγωγή (κυτοχρωμική οξειδάση) δεν έχουν προσδιοριστεί ως τώρα επακριβώς. Η μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία των καταλυτικών υπομονάδων των δύο αυτών ενζύμων επιτρέπει το σχεδιασμό ενός τρισδιάστατου δομικού μοντέλου που συνδυάζει την αλληλουχία των αμινοξέων της υπομονάδας NorB της NO-αναγωγής από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* και τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της κυτοχρωμικής οξειδάσης από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans*.

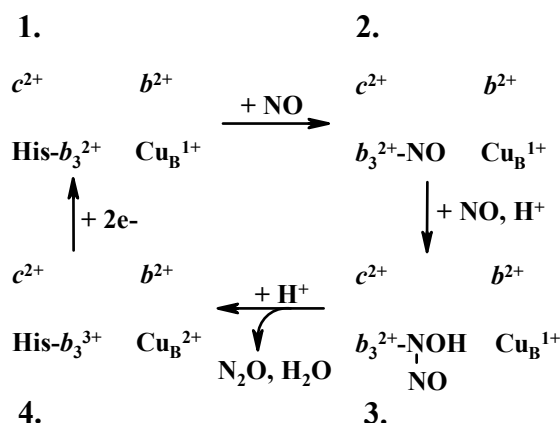
Αυτό το μοντέλο προτείνει ότι σε αυτές τις δύο οικογένειες ενζύμων, τα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου, το οποίο αποτελείται από ένα διμεταλλικό κέντρο που περιέχει ένα Fe αίμης και ένα δεύτερο μέταλλο που είναι Cu στις οξειδάσες και Fe στην NO-αναγωγή, είναι πλήρως διατηρημένα. Μελέτες μετάλλαξης σε συγκεκριμένες θέσεις έδειξαν ότι η παρουσία ενός μη αιμικού μετάλλου (Cu ή Fe) σαν μέρος του ενεργού κέντρου αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη καταλυτική ενεργότητα της NO-αναγωγής και της O₂ αναγωγής. Επίσης μελέτες αλληλουχίας έδειξαν ότι το cross-link μεταξύ μιας ιστιδίνης του Cu_B και μιας γειτονικής τυροσίνης, το οποίο συναντάμε σε όλες τις O₂ αναγωγάσες^{2,8} (κυτοχρωμικές οξειδάσες), δεν υφίσταται στην περίπτωση της NO-αναγωγής και του κυτοχρώματος *cbb*₃. Επομένως μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις NO και O₂ αναγωγάσες πρέπει να βρίσκεται στο περιβάλλον του μη αιμικού μεταλλικού κέντρου δέσμευσης το οποίο πιθανόν να αποτελεί το καθοριστικό παράγοντα για το αν το O₂ ή το NO θα είναι το προτεινόμενο υπόστρωμα. Επίσης λόγω της ομοιότητας του περιβάλλοντος του μη αιμικού μεταλλικού κέντρου που υπάρχει ανάμεσα στη NO-αναγωγή και το κυτόχρωμα *cbb*₃, αυτό του δίνει τη δυνατότητα στο τελευταίο να παρουσιάζει μια σημαντική δραστηριότητα NO-αναγωγής.⁷

Οι δύο μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την αναγωγή του NO σε N₂O περιλαμβάνουν δύο NO μόρια στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου. Στο μηχανισμό που έχει προταθεί, για τη καταλυτική αναγωγή του NO από το Nor, από τους *Monnoe-Loccoz et al.* η έναρξη της αντίδρασης σημειώνεται όταν το διπυρηνικό κέντρο είναι πλήρως ανηγμένο και ένα μόριο NO δεσμεύεται σε κάθε μεταλλικό κέντρο.



Με την αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου η μ-οχο γέφυρα μεταξύ αιμικού-μη αιμικού Fe διασπάται και σχηματίζεται ένας ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στον αιμικό Fe και την proximal ιστοιδίνη. Η δέσμευση του NO στον ανηγμένο Fe της αίμης b_3 έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση της proximal ιστοιδίνης από τον αιμικό Fe. Μετά το διμερισμό των NO μορίων προς σχηματισμό του δεσμού N-N, έχουμε την παραγωγή του N_2O και τον επανασχηματισμό της γέφυρας οξυγόνου ανάμεσα στον αιμικό και μη αιμικό Fe

Οι *Pinakoulaki et al* πρότειναν ένα δεύτερο μηχανισμό για τις πιθανές καταστάσεις που υιοθετεί το cbb_3 , μετά την προσθήκη του NO. Σύμφωνα με αυτόν η δέσμευση του NO στον ανηγμένο Fe της αίμης b_3 έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού της proximal ιστοιδίνης με το Fe της b_3 και το σχηματισμό του συμπλόκου b_3^{2+} -NO **2** με αριθμό συναρμογής 5. Ένα δεύτερο μόριο NO επιτίθεται στο άτομο του N της δομής Fe^{+2} -N=O⁻ δίνοντας ένα ενδιάμεσο hyponitrite (HONNO⁻) με αποτέλεσμα το σχηματισμό του N-N δεσμού. Σε αυτή τη μορφή του ενζύμου, με τη προσθήκη ενός H^+ σχηματίζεται μια μικτού σθένους μορφή του ένζυμου **4** και ταυτόχρονα έχουμε την παραγωγή N_2O και H_2O .



Με παρουσία αναγωγικού παράγοντα η μικτού σθένους μορφή επιστρέφει στην πλήρως ανηγμένη **1** και η καταλυτική λειτουργία ξεκινάει πάλι

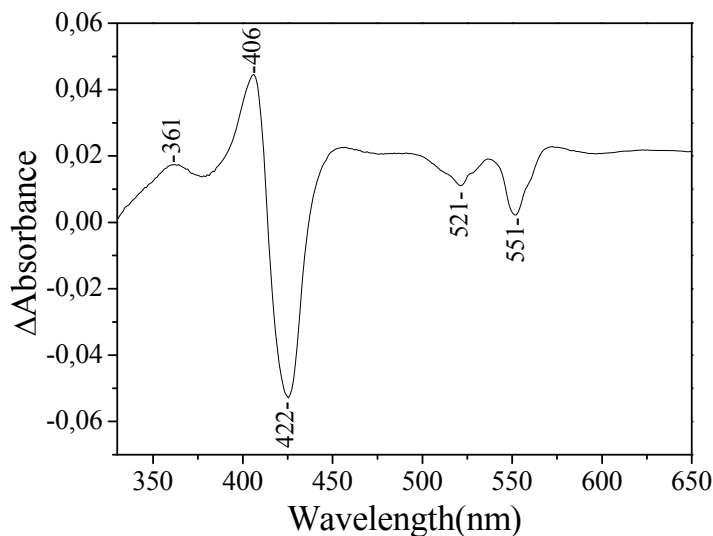
Η κατανόηση του μηχανισμού αυτού θα βοηθήσει να εξαχθούν συμπεράσματα για την εξελικτική σχέση μεταξύ της απονιτροποίησης και της διαδικασίας της αερόβιας αναπνοής αφού έχει προταθεί ότι οι αιμοχαλκοξειδάσες που καταλύουν την αντίδραση του O_2 σε H_2O και οι βακτηριακές NO-αναγωγάσες προέρχονται, κατά την διάρκεια της εξέλιξης, από ένα κοινό πρόγονο. Αν η αποτελεσματικότητα του καταλυτικού σχηματισμού του N_2O εξαρτάται από τη συγγένεια που παρουσιάζει το μη αιμικό μεταλλικό κέντρο για το NO, τότε ο μη

αιμικός Fe της NO-αναγωγής θα δεσμεύει το NO πολύ πιο ισχυρά απ' ό,τι ο Cu_B^+ της κυτοχρωμικής οξειδάσης, όπου στο μιτοχονδριακό ένζυμο δεσμεύει το NO μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Η εξελικτική μετάβαση από τις NO-αναγωγές στις οξειδάσεις, επισημαίνοντας ανάμεσα σε άλλα χαρακτηριστικά την αντικατάσταση του Fe από το Cu, θα έχει ως πιθανό αποτέλεσμα την δημιουργία ενζύμων με ενδιάμεσες ιδιότητες. Οι κυτοχρωμικές οξειδάσεις από το βακτήριο *Thermus thermophilus* αποτελούν παραδείγματα οξειδάσων στις οποίες το μη αιμικό μέταλλο είναι ο Cu που ωστόσο στην ανηγμένη κατάσταση του υιοθετεί μια αρκετά υψηλή συγγένεια για ligands αέριας φάσης έτσι ώστε να βοηθάει στην αναγωγή του NO.

5.2 Μελέτες της αντίδρασης του οξειδωμένου και ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO

Με βάση όλα τα παραπάνω σκοπός μας είναι να μελετήσουμε το μηχανισμό της αναγωγής του NO από το κυτόχρωμα cbb_3 χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπική τεχνική Time-resolved resonance Raman. Για αυτό και μελετήσαμε τη παραπάνω διαδικασία με φασματοσκόπια UV-Vis έτσι ώστε να δούμε αν όντως πραγματοποιείται η καταλυτική αναγωγή του NO. Παρακάτω (Σχήμα 5.1) φαίνεται το U-Vis φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του πλήρους ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO. Ο Fe^{II} της αίμης b_3 οξειδώνεται ταχύτατα από το NO όπως παρατηρούμε από την χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης στην περιοχή του Soret η οποία εμφανίζεται στα 406 nm και είναι ενδεικτική της οξείδωσης της αίμης b_3 .

Το γεγονός αυτό πιστοποιεί τη καταλυτική δράση του κυτοχρώματος cbb_3 όταν σαν υπόστρωμα χρησιμοποιηθεί το μονοξείδιο του αζώτου. Οι *Giuffre et al*⁷ μέτρησαν την ενεργότητα του cbb_3 ως NO-αναγωγής βρίσκοντας το μέγιστο turnover $V_{\text{max}} = 100 \pm 9 \text{ mol x NO mol cbb}_3^{-1} \text{ x min}^{-1}$ και $K_m = 12 \pm 2.5 \mu\text{M}$. Η υψηλή ενεργότητα του κυτοχρώματος cbb_3 ως NO-αναγωγής συσχετίζεται απόλυτα με τη ταχύτερη οξείδωση του ενζύμου από το NO όπως είδαμε στο παραπάνω φάσμα της αντίδρασης του πλήρους ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO. Στο φάσμα αυτό δεν παρατηρήσαμε πλήρη οξείδωση του κυτοχρώματος cbb_3 , το οποίο οφείλεται σε residual ανηγμένη αίμη c και/ή σε υψυλού σπιν αίμη b_3 η οποία μπορεί να βρίσκεται



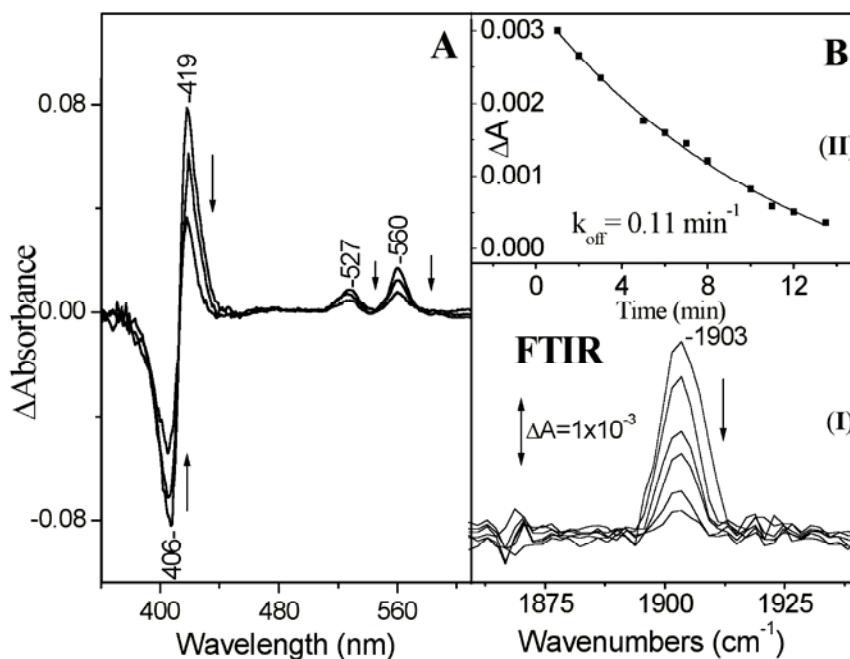
Σχήμα 5.1 UV-Vis φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του πλήρους ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO.

παγιδευμένη στην υποκατεστημένη με NO ανηγμένη μορφή. Η σταθερά ταχύτητας της οξειδωσης των χαμηλού σπιν κυτοχρωμάτων b του cbb_3 βρέθηκε ότι είναι ίση με $K=2 \text{ s}^{-1}$.

Σαν ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση της αντίδρασης του κυτοχρώματος cbb_3 με το NO είναι ο χαρακτηρισμός του διπυρηνικού κέντρου κατά τη δέσμευση του NO. Γιαυτό το λόγο μελετήσαμε με φασματοσκοπία UV-Vis και FTIR την αντίδραση του οξειδωμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το NO. Στη μελέτη αυτή αναφέρουμε τη δομή του υποκατεστημένου με NO κυτοχρώματος cbb_3 μέσω της φασματοσκοπίας FTIR και τη συγκρίνουμε με αυτή του συμπλόκου b_3^{+3} -NO της Νογ (αναγωγή του NO) και με την υποκατεστημένη με NO δομή της αιμοσφαιρίνης σε pH -4 και 7.5. Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα από τα οξειδωμένα και ανηγμένα σύμπλοκα του NO με αιμικές πρωτεΐνες καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η δομή του ασταθούς συμπλόκου το οποίο σχηματίζεται κατά την αντίδραση του NO με το οξειδωμένο κυτόχρωμα cbb_3 , είναι το αιμικό b_3^{+3} -NO σύμπλοκο. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί για τις aa_3 τύπου κυτοχρωμικές οξειδάσες¹⁰. Παρακολουθώντας την ένταση της απορρόφησης της NO δόνησης μέσω της δονητικής φασματοσκοπίας, υπολογίσαμε προσεγγιστικά ότι το NO απομακρύνεται από την αίμη b_3 με μια σταθερά $k_{\text{off}} = 0.11 \text{ min}^{-1}$. Αυτό το αποτέλεσμα προκαλεί το ερώτημα γιατί το περιβάλλον της αίμης b_3 του κυτοχρώματος cbb_3 , σε αντίθεση με την παρόμοια ως

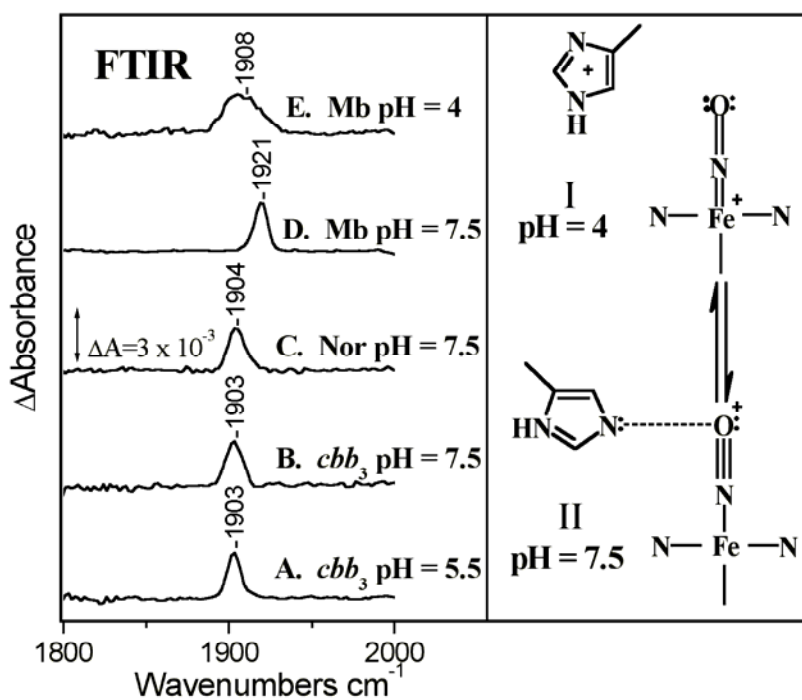
προς τις δομικές ιδιότητες αίμη b_3 του Nor, μειώνει το ενεργειακό φράγμα κάνοντας αποτελεσματικότερη την διαφυγή του NO, και επίσης πως το NO απελευθερώνεται απο το διπυρηνικό κέντρο του κυτοχρώματος cbb_3 .

Το οπτικό φάσμα διαφοράς του υποκατεστημένου με NO οξειδωμένου κυτοχρώματος cbb_3 ως προς το οξειδωμένο κυτόχρωμα cbb_3 στα 5, 8 και 10 min μετά την προσθήκη του NO, εικονίζεται στο σχήμα 5.2(A). Στο φασμα αυτό παρατηρούμε τρεις θετικές ταινίες απορρόφησης στα 419, 527 και 560 nm και μια αρνητική ταινία στα 406 nm. Στα 10 min με τα την προσθήκη του NO η ένταση της έχει εξαφανιστεί πράγμα το οποίο πιστοποιεί τη διάσπαση του συμπλόκου b_3^{+3} -NO. Τα FTIR φάσματα τα οποία φαίνονται στο σχήμα 5.2(B)(I) δείχνουν μια δόνηση στους 1903 cm^{-1} . Η δόνηση αυτή είναι παρόμοια με τη δόνηση τάσης $\nu(\text{NO})$ του Nor (σχήμα 4.3 φάσμα C), της οξικής μορφής της metMb-NO^{11a} (σχήμα 5.3 φάσμα E) αλλά 18 cm^{-1} χαμηλότερα απο αυτή της metMb-NO σε pH 7.5^{11a,b} (σχήμα 5.3 φάσμα D).Επιπλέον είναι παρόμοια με αυτή του κυτοχρώματος cd_1 (1910 cm^{-1}) και της Nitrophorin 1 (1904 cm^{-1}).^{12a,b} Σύμφωνα με τα παραπάνω αποδίδουμε τη δόνηση στους 1903 cm^{-1} στη δόνηση τάσης $\nu(\text{NO})$ του συμπλόκου $\text{Fe}^{3+}_{b_3} - \text{NO}$. Η χρονική εξέλιξη της NO δόνησης η οποία φαίνεται στο σχήμα 5.2(B)(I) δείχνει σε συμφωνία με τα οπτικά φάσματα, ότι το NO απομακρύνεται απο την αίμη με $k_{\text{off}} = 0.11\text{ min}^{-1}$ (σχήμα 5.2(B)(II)).



Σχήμα 5.2. (A) Οπτικό φάσμα διαφοράς του υποκατεστημένου με NO οξειδωμένου κυτοχρώματος cbb_3 ως προς το οξειδωμένο κυτόχρωμα cbb_3 στα 5, 8 και 10 min μετά την προσθήκη του NO. (B) (I) Χρονική εξέλιξη της NO δόνησης στο κυτόχρωμα cbb_3 . (II) Κινητική ανάλυση της δόνησης στους 1903 cm^{-1} .

Η $\nu(\text{NO})$ δόνηση τάσης του συμπλόκου metMb-NO εξαρτάται από το pH.^{11a} Όπως έχει προαναφερθεί από τους Miller *et al.*^{11b} και Tomita *et al.*^{11a} η σταθερότητα της δομής του αιμικού Fe-NO συμπλόκου εξαρτάται από την πρωτονεώση της distal ιστιδίνης. Οι δομές των metMb στα pH 4 και 7.5 εικονίζονται στο σχήμα 5.3. Σε χαμηλό pH η distal ιστιδίνη swings out into the solvent σταθεροποιώντας τη δομή I ($\nu_{\text{NO}} = 1908 \text{ cm}^{-1}$). Εάν το ασύζευκτο ζεύγος της distal ιστιδίνης βρίσκεται πολύ κοντά στο άτομο του οξυγόνου του δεσμευμένου (στο Fe) NO, τότε η διαμόρφωση II σταθεροποιείται και η ν_{NO} δόνηση αυξάνεται στους 1921 cm^{-1} . Επίσης οι Tomita *et al.*^{11a} ισχυρίστηκαν ότι σε τέσσερις αιμικές πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν ιστιδίνη σαν proximal υποκαταστάση η NO moiety είναι ηλεκτρονιακά πλούσια και ότι η επίδραση του π -δοτικού δεσμού από την proximal ιστιδίνη είναι μικρή. Η $\nu(\text{NO})$ δόνηση του cbb_3 είναι ανεξάρτητη από το pH (Σχήμα 5.3 φάσματα A και B) το οποίο σημαίνει ότι τα κοντινά στην αίμη b_3 αμινοξικά κατάλοιπα με ανταλλάξιμα πρωτόνια, τα οποία είναι οι ιστιδίνες του Cu_B , δεν ελέγχουν άμεσα τις ιδιότητες της αιμικού b_3



Σχήμα 5.3. FTIR φάσματα του cbb_3 -NO σε pH 5.5 (A) και pH 7.5 (B), Nor-NO (C), και της metMb-NO σε pH 7.5 (E) και pH 4 (D)

Fe-NO συμπλόκου. Σύμφωνα με το παραπάνω προτείνουμε ότι το σύμπλοκο cbb_3 -NO υιοθετεί τη δομή συντονισμού I αίμη $\text{Fe}^+ = \text{N}=\text{O}$ η οποία είναι σχεδόν παρόμοια με αυτή της οξικής μορφής του συμπλόκου MetMb-NO ($\nu(\text{NO}) = 1908 \text{ cm}^{-1}$) και

διαφορετική από τη δομή συντονισμού **II** της ουδέτερης μορφής MetMb-NO ($\nu(\text{NO}) = 1921 \text{ cm}^{-1}$).

Το αιμικό $b_3 \text{ Fe}^{+}=\text{N}=\text{O}$ σύμπλοκο του κυτοχρώματος cbb_3 υιοθετεί μια γραμμική διευθέτηση και παρουσιάζει μια αυξημένη συχνότητα στη $\nu(\text{NO})$ δόνηση τάσης, σε σχέση με το ελεύθερο NO (1875 cm^{-1}) και με το υποκαταστημένο με NO ανηγμένο κυτόχρωμα cbb_3 . Αυτή η γραμμική διευθέτηση του $\text{Fe}^{+}=\text{N}=\text{O}$ συμπλόκου σημαίνει ότι η μεταφορά φορτίου από το NO στο Fe^{+3} συμβαίνει κατά το σχηματισμό του δεσμού. Επιπλέον τα οπτικά φάσματα δείχνουν ότι το $b_3 \text{ Fe}^{+}=\text{N}=\text{O}$ σύμπλοκο, παρόλο που το NO είναι δότης 3 ηλεκτρονίων και σε συνδυασμό με ένα H^+ μπορεί να σχηματίσει μια Fe-N-O διαμόρφωση η οποία «σπρώχνει» τα ηλεκτρόνια διευκολύνοντας με το τρόπο αυτό την αναγωγή της αίμης b_3 , δεν μετατρέπεται στην ανηγμένη του μορφή $b_3 \text{ Fe}^{+2}-\text{N}=\text{O}$ αλλά επανέρχεται στην οξειδωμένη του μορφή $b_3 \text{ Fe}^{+3}$. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν αναφερθεί για τα υποκαταστημένα με NO σύμπλοκα των Nitrophorins (NP1-NP4)^{12a-d} και της Mb^{13a,b}

Το δεσμευμένο, στην αίμη b_3 , NO στο κυτόχρωμα cbb_3 και στο Nor μπορεί να έχει διαφορετικές καταλήξεις. Μπορεί να διαχυθεί έξω από το διπυρηνικό κέντρο αίμη b_3/Cu_B και προς το διαλύτη ή όπως έχει παρατηρηθεί στο Nor που το NO σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο της μορφής $b_3 \text{ Fe}^{+3}-\text{NO}$. Η τάξη δεσμού του NO στο cbb_3 είναι παρόμοια με αυτή του Nor, συνεπώς η διασπαση του NO που παρατηρούμε δεν οφείλεται στην ισχύς του δεσμού του NO ή σε δεσμό υδρογόνου. Επομένως αποδίδουμε τις διαφορές των συμπλόκων του NO στα δύο αυτά ένζυμα, στην πολικότητα του distal περιβάλλοντος. Το διπυρηνικό κέντρο του Nor βρίσκεται σε ένα περιβάλλον με χαμηλή διηλεκτρική σταθερά πράγμα που οδηγεί σε μια αύξηση του ηλεκτροστατικού δυναμικού.^{14a} Συνεπώς η παρουσία αρνητικών φορτίων κοντά στη $b_3 \text{ Fe}^{+3}-\text{NO}$ διαμόρφωση του Nor μπορεί να εμποδίσει την απελευθέρωση του NO. Πράγματι έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{14a,b} η παρουσία του Glu-198 στο εγγυές περιβάλλον του διπυρηνικού κέντρου του Nor και ο πιθανός του ρόλος στην χημεία των NO ριζών και /ή στη μεταφορά των καταλυτικών πρωτονίων.

Η απελευθέρωση του NO από την αίμη b_3 του cbb_3 δείχνει ότι το περιβάλλον της αίμης b_3 στο cbb_3 είναι λιγότερο πολικό από αυτό του Nor και ότι η ανοιχτή δομή του διπυρηνικού κέντρου b_3/Cu_B ^{15a}, συγκρινόμενη με τη κλειστή δομή του διπυρηνικού κέντρου $b_3/\mu\text{η-αιμικός Fe}$ του Nor^{15b}, διευκολύνει την θερμική απελευθέρωση του. Σε συμφωνία με το συλλογισμό αυτό είναι και η απουσία πολικών αμινοξέων στο distal περιβάλλον του cbb_3 ¹⁶. Άρα προτείνουμε ότι το καθοριστικό

στάδιο στην απελευθέρωση του NO από την αίμη b_3 είναι η πολικότητα του περιβάλλοντος της αίμης b_3 . Επίσης είναι άξιο αναφοράς ότι το καθοριστικό στάδιο στην απελευθέρωση του NO από τα NP ένζυμα είναι μια δομικά «κλειστή θηλεία» η οποία δημιουργείται από την δέσμευση του NO στο αιμικό Fe.^{12e}

Άλλες αιμικές πρωτεΐνες όπως η metMb^{15b} και οι NP's^{12a-d} μπορούν να δεσμεύσουν και να απελευθερώσουν NO. Επομένως μπορούμε να προσδώσουμε στο κυτόχρωμα cbb_3 το ρόλο του NO μεταφορέα. Ωστόσο η δέσμευση του NO στην αίμη b_3 του Nor είναι μή αντιστρεπτή. Η διαφορά ως προς τη κινητική ανάμεσα στα NO-σύμπλοκα του cbb_3 και του Nor δεν σχετίζεται με τη λειτουργία τους αφού και τα δυο ένζυμα καταλύουν την αναγωγή του NO σε N_2O . Ένα χαμηλό δυναμικό αναγωγής έχει μετρηθεί για την αίμη b_3 του κυτοχρώματος cbb_3 το οποίο δείχνει ότι πλήρης αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου είναι θερμοδυναμικά μή εφικτή.¹⁷ Για αυτό το λόγο είναι πιθανό η αναγωγή του NO στο cbb_3 να συμβαίνει μέσω μιας μικτού σθένους κατάστασης του ενζύμου στην οποία οι χαμηλού σπιν αίμες b και c είναι ανηγμένες και η αίμη b_3 βρίσκεται στην οξειδωμένη μορφή της. Με αυτό το τρόπο το NO δεσμεύεται στην αίμη b_3 και προσθήκη δύο ηλεκτρονίων στην αίμη b_3 Fe^+-NO δίνει το κατά δύο ηλεκτρόνια ανηγμένη δομή $Fe^{+2}-N=O^-$. Ένα δεύτερο μόριο NO επιτίθεται στο άτομο του N της δομής $Fe^{+2}-N=O^-$ δίνοντας ένα ενδιάμεσο hyponitrite ($HONNO^-$) με σχηματισμό του N-N δεσμού. Η διάσπαση του δεσμού N-O παραγεί το οξειδωμένο ένζυμο, N_2O και H_2O .

Τα δεδομένα δείχνουν ότι το NO δεσμεύεται αποκλειστικά στην αίμη b_3 και όχι στο Cu_B . Αυτή είναι η πρώτη δονητική μελέτη της δέσμευσης του NO σε αιμοχαλκοξειδάση που βρίσκεται στην οξειδωμένη κατάσταση. Η απουσία αρνητικών φορτίων στο διπυρηνικό κέντρο αίμη b_3 - Cu_B σε συνδυασμό με την ανοιχτή δομή που υιοθετεί το cbb_3 σε σχέση με τις άλλες οξειδάσες, χαμηλώνει το energy barrier κάνοντας αποτελεσματικότερη την απελευθέρωση του NO. Εάν οι διαφορές ως προς τη κινητική του δεσμευμένου NO στην αίμη b_3 του cbb_3 και του Nor, αντικατοπτρίζουν τις ιδιότητες του distal περιβάλλοντος της αίμης b_3 , τότε αντιδράσεις σχηματισμού και διάσπασης με το NO κάτω από διαφορετικές συνθήκες (pH, D_2O) σε συνδυασμό με δομικές μελέτες, θα επιτρέψουν ένα ποσοτικό προσδιορισμό της σημασίας που έχουν οι distal και οι proximal αλληλεπιδράσεις στην δέσμευση των υποκαταστατών και στις διαδικασίες απελευθέρωσης.^{13a} Πειράματα προς αυτή τη κατεύθυνση βρίσκονται σε πρόοδο.

Βιβλιογραφία

- (1) Hendriks, J., Gohlke, U. & Saraste, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, 30,15-24
- (2) Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. *Nature (London)* **1995**, 376, 660-669
- (3) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. *Science* **1996**, 272, 1136-1144
- (4) Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lübben, M. & Saraste, M. *Biochemistry* **1998**, 37, 13102-13109
- (5) (a) Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sart, P. ; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1999**, 96, 14718-14723.
- (6) Stubauer, G., Giuffrè, A., Brunori, M. & Sarti, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 245, 459-465
- (7) (b) Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, 268, 1-6.
- (8) Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., *et al.* *Science* **1998**, 280, 1723-1729
- (9) Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T. & Buse, G. *Biochemistry* **1999**, 38, 1057-1065
- (10) Torres, J.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 8756-8766.
- (11) (a) Tomita, T.; Haruta, N.; Aki, M.; Kitagawa, T.; Ikeda-Saito, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2666-2667. (b) Miller, L. M.; Pedraza, A. J.; Chance, M. R.
- (12) (a) Wang, Y.; Averill, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3972-3973. (b) Ding, X. D.; Weichsel, A.; Andersen, J. F.; Shokhireva, T. K.; Balfour, C.; Pierik, A. J.; Averill, B. A.; Montfort, W. R.; Walker, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 128-138. (c) Ribeiro, J. M. C; Hazzard, J. M. H.; Nussenzveig, R. H.; Champagne, D. E; Walker, F. A. *Science* **1993**, 260, 539-541. (d) Weichsel, A.; Andersen, J. F.; Roberts, S. A ; Montfort, W. R. *Nature Struct. Biol.* **2000**, 5, 551-554. (e) Andersen, J. F.; Ding, X. D.; Balfour, C.; Shokhireva, T. K.; Champagne, D. E; Walker, F. A.; Montfort, W. R. *Biochemistry* **2000**, 39, 10118-10131.

- (13) (a) Ikeda-Saito, M.; Dou, Y.; Yonetani, T.; Olson, J. S.; Li, T.; Regan, R.; Gibson, Q. H. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 13563-13568. (b) Leverman, L. E.; Wanat, A.; Oszajca, J.; Stochel, G.; Ford, P. C.; van Eldik, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 285-293.
- (14) (a) Grönberg, K. L. C., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J., Watmough, N. J. *Biochemistry* **1999**, 38, 13780-13786. (b) Butland, G.; Spiro, S.; Watmough, N. J.; Richardson, D. J. *J. Bacteriol.* **2001**, 183, 189-199.
- (15) (a) Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3814-3815. (b) Pinakoulaki, E.; Gemeinhardt, S.; Saraste, M.; Varotsis, C. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 23407-23413
- (16) Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M. *FEBS Lett.* **2001**, 508, 29-35.
- (17) Pereira, M. M.; Carita, J. N.; Anglin, R.; Saraste, M.; Teixeira, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2000**, 32, 143-152.