

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΔΙΚΕΥΣΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ N_3 , CN , CO
ΜΕ ΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ
ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ $c\alpha_3$ ΑΠΟ ΤΟ *P. denitrificans* ΚΑΙ
ΤΟΥ ΚΙΝΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ bo_3 ΑΠΟ ΤΟ *E.coli***

ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΒΑΜΒΟΥΚΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

MASTER OF SCIENCE IN BIOCHEMISTRY

**SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF THE
INTERACTION OF N₃, CN, CO WITH THE
BINUCLEAR CENTER OF CYTOCHROME *caa*₃
FROM *P. denitrificans* AND QUINOL
CYTOCHROME *bo*₃ FROM *E. coli***

MAGDALINI VAMVOUKA

HERAKLION 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες-Σύμβολα-Ορολογία	1
Περίληψη	2
Abstract	3
Κεφάλαιο 1	4
Εισαγωγή	
1.1 Δομή και λειτουργία της κυτοχρωμικής c οξειδάσης	5
1.2 Σπουδαιότητα του διπυρηνικού κέντρου στη λειτουργία της κυτοχρωμικής c οξειδάσης	8
1.3 Οι κινολικές και κυτοχρωμικές c οξειδάσες των βακτηρίων	10
1.4 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας	13
Αναφορές	14
Κεφάλαιο 2	
Βασικές αρχές των φασματοσκοπιών ορατού-υπεριώδους και υπερύθρου	
2.1 Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	15
2.2 Τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης των ομάδων αίμης	17
2.3 Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας υπερύθρου	17
Αναφορές	19
Κεφάλαιο 3	
Μελέτη της δέσμευσης του ιόντος αζιδίου στο κυτόχρωμα aa₃ από το βακτήριο <i>P. denitrificans</i> με χρήση φασματοσκοπιών UV-Vis και FTIR	
3.1 Εισαγωγή	20
3.2 Πειραματική διαδικασία	21
3.3 Αποτελέσματα	22
Αναφορές	27
Κεφάλαιο 4	
Μελέτη της δέσμευσης του ιόντος κυανίου στην κυτοχρωμική οξειδάση και τις κινολικές οξειδάσες bo₃ και aa₃-600 με χρήση φασματοσκοπιών UV-Vis και FTIR	
4.1 Εισαγωγή	29
4.2 Πειραματική διαδικασία	30
4.3 Αποτελέσματα	31
Αναφορές	40
Κεφάλαιο 5	
Προτεινόμενα πειράματα	42
Αναφορές	45

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΑ-ΟΡΟΛΟΓΙΑ

ATP	: τριφωσφορική αδενοσίνη
NADH	: νικοταμιδο-αδενινο-δινουκλουσιδίο (ανηγμένη μορφή)
<i>P. denitrificans</i>	: <i>Paracoccus denitrificans</i> βακτήριο
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i> βακτήριο
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i> βακτήριο
CcO ή aa_3	: η κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια και τα <i>P. denitrificans</i>
aa_3 -600	: η κινολική οξειδάση aa_3 -600 από το <i>B. subtilis</i> βακτήριο
bo_3	: η κινολική οξειδάση bo_3 από το <i>E. coli</i> βακτήριο
ba_3	: η κυτοχρωμική c οξειδάση ba_3 από το <i>T. thermophilus</i> βακτήριο
UV-Vis	: φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
FTIR	: φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
IR	: φασματοσκοπία υπερύθρου
EPR	: φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού
Å	: angstroem (10^{-10} m)
cm^{-1}	: κυματάρια
λ	: μήκος κύματος σε nm
λ_{max}	: το μήκος κύματος σε nm στο οποίο η απορρόφηση είναι μέγιστη
ν	: δόνηση τάσης
δ	: δόνηση κάμψης
His	: ιστιδίνη
Tyr	: τυροσίνη
Gly	: γλυκίνη
Glu	: γλουταμινικό
Hepes	: N-[2-υδροξυαιθυλ]πιπεράζινο-N'-2αιθανοσουλφονικό οξύ
Tris	: τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

Περίληψη

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες είναι τα τελικά ένζυμα στην αναπνευστική αλυσίδα του κυττάρου. Καταλύουν την πλήρη αναγωγή του O_2 σε νερό, ενώ χρησιμοποιούν την ενέργεια που ελευθερώνεται για την ταυτόχρονη άντληση πρωτονίων κατά μήκος της βιολογικής μεμβράνης που είναι βυθισμένα. Το ηλεκτροχημικό δυναμικό που δημιουργείται κατά μήκος της μεμβράνης αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας που παρουσιάζεται εδώ είναι η μελέτη της δομής και της δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών με χρήση φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis) και υπερύθρου (FTIR).

Συγκριμένα μελετάται η δέσμευση του ιόντος του αζιδίου στο πλήρως οξειδωμένο κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δέσμευση του αζιδίου σε δύο φάσεις, μία φάση υψηλής συγγένειας και μία φάση χαμηλής συγγένειας. Τα αποτελέσματα των FTIR πειραμάτων που παρουσιάζονται εδώ, προτείνουν ότι στη φάση χαμηλής συγγένειας το αζίδιο δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις σχηματίζοντας, πιθανότατα και στις δύο, σύμπλοκα της μορφής αίμη a_3^{3+} - N_3 - Cu_B^{2+} .

Εξετάζεται επίσης η αλληλεπίδραση του ιόντος του κυανίου με την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια (CcO) και τα κινολικά κυτόχρωμα aa_3 -600 από *B. subtilis* βακτήριο και bo_3 από το *E. coli*. Η παρούσα εργασία προτείνει ότι το κυάνιο σχηματίζει σύμπλοκα γέφυρας στο πλήρως οξειδωμένο διπυρηνικό κέντρο της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων (CcO), του κυτοχρώματος bo_3 και του κυτοχρώματος aa_3 -600. Επίσης, φαίνεται ότι σε pH 8.4, προσθήκη του κυανίου στην CcO προκαλεί την αναγωγή της αίμης a και του Cu_B , και προτείνεται ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες το κυάνιο δεσμεύεται στο $Fe_{a_3}^{3+}$ σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις ως τελικό ligand.

Βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων μας και προηγούμενων μελετών προτείνουμε μια σειρά πειραμάτων με χρήση στατικών και χρονοαναλυόμενων τεχνικών UV-Vis και FTIR με σκοπό 1) τον πλήρη χαρακτηρισμό της δέσμευσης εξωγενών ligands στο διπυρηνικό κέντρο των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών ως συνάρτηση του pH και της οξειδωτικής κατάστασης και 2) την κατανόηση της σχέσης εξάρτησης της θέσης αναγωγής και του μηχανισμού άντλησης των πρωτονίων.

Abstract

Cytochrome and quinol oxidases are the terminal enzymes of the respiratory chain. These enzymes catalyze the fully reduction of molecular oxygen, and use the free energy released in this reaction to translocate protons across the cell membrane. The proton gradient that is produced drives the synthesis of ATP.

The aim of this work is the study of the structure and dynamics of the binuclear center of cytochrome and quinol oxidases by using ultraviolet-visible and infrared spectroscopy.

We studied the binding of azide ion to fully oxidized cytochrome *aa*₃ the *P. denitrificans* bacterium. The results presented here show that azide binds in two phases, a high affinity and a low affinity phase. Furthermore, the FTIR suggest that, in the low affinity phase, azide binds in two different enzyme conformations, both forming bridging complexes with the oxidized heme Fe-Cu_B binuclear center.

We also examined the interaction of cyanide ion with the cytochrome *c* oxidase (CcO) from mitochondria and the cytochrome *aa*₃-600 from *B. subtilis* and cytochrome *bo*₃ from *E. coli* quinol oxidases. This work indicate that cyanide binds as bridging ligand within the binuclear center in CcO, cytochrome *aa*₃-600 and cytochrome *bo*₃. It also shows that, at pH 8.4, addition of cyanide to CcO causes the reduction of heme *a* and Cu_B. We proposed that under these conditions cyanide forms terminal complexes with Fe_{a3}³⁺.

Based on our results and previous studies we propose static and time resolved UV-Vis and FTIR experiments with the aim 1) to fully characterize the binding of external ligands to the binuclear center of the terminal oxidases and describe how the binding properties depend on the pH and the redox state of the enzyme and 2) to understand the role of the reduction site into the mechanism of proton translocation.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

Η σταδιακή αναγωγή του O_2 σε H_2O κατά την αναπνοή του κυττάρου μέσω μίας σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, έντονα εξεργονικών, αποτελεί τη βάση για τη διατήρηση της ενέργειας σ' όλους τους αερόβιους οργανισμούς καθώς το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP. Η διαδικασία αυτή που πραγματοποιείται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη των ευκαρυωτικών οργανισμών και την εσωτερική κυτταρική μεμβράνη των προκαρυωτικών οργανισμών, καταλύεται από μία αλληλουχία μεμβρανικών ενζυμικών συμπλόκων που δρουν ως οξειδοαναγωγικές αντλίες πρωτονίων και συγκροτούν την αναπνευστική αλυσίδα του κυττάρου (σχ. 1.1).

Ένζυμο	E(V)
NADH-Q αναγωγίαση	-0.320
κυτοχρωμική c αναγωγίαση	0.030
Κυτόχρωμα c	0.254
Κυτοχρωμική c οξείδωση	0.385
O_2	0.816
$O_2 + 4e^- + 4H^+ + 4H^+_{in} \rightarrow 2H_2O + 4H^+_{out}$	

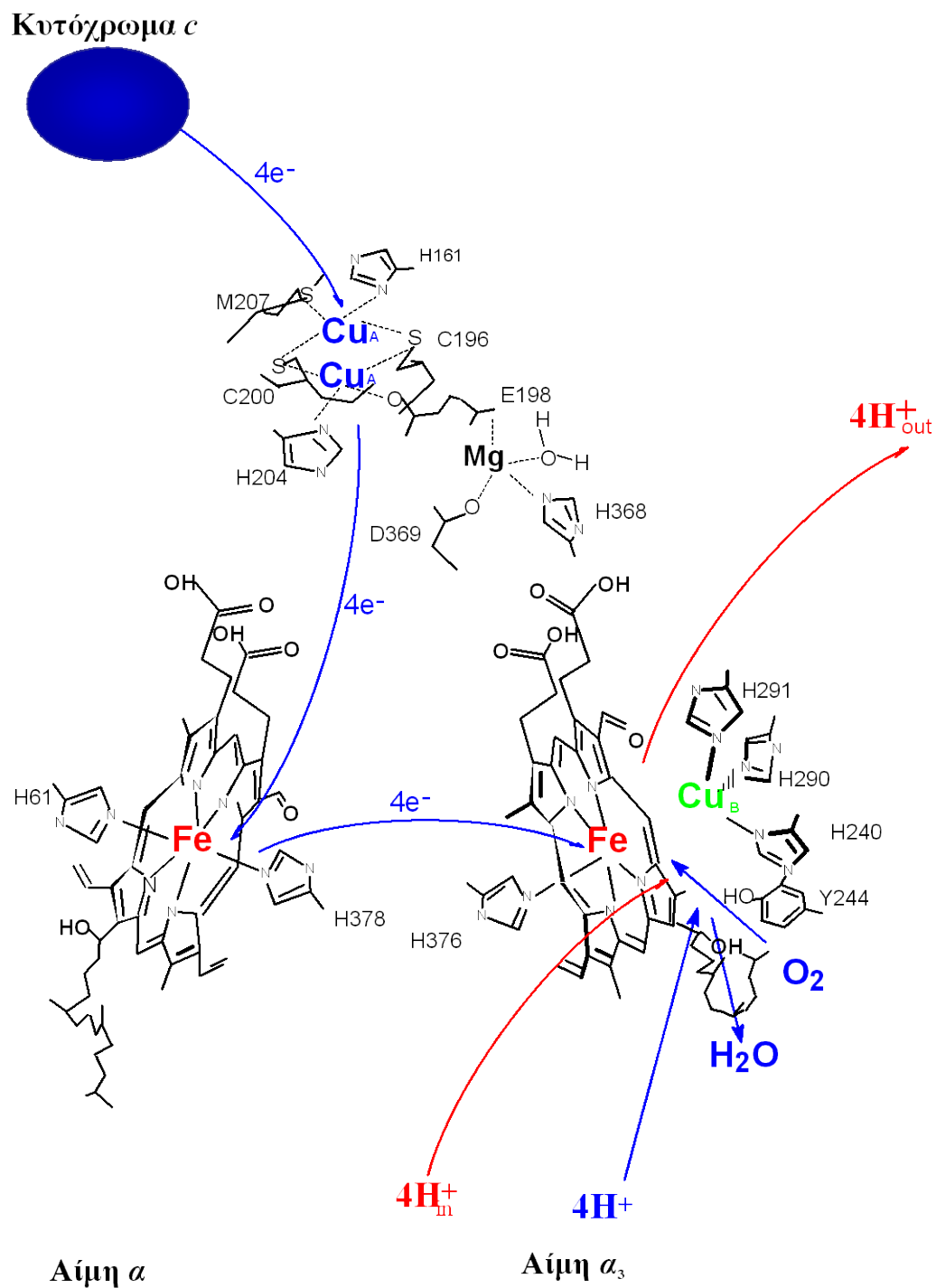
Σχήμα 1.1 Η αναπνευστική αλυσίδα των θηλαστικών

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση σ' όλους τους ευκαριωτικούς και σε ορισμένους προκαρυωτικούς οργανισμούς ή οι κινολικές οξειδάσες στους περισσότερους προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι το τελικό αναπνευστικό ενζυμικό σύμπλοκο, το οποίο δεσμεύει και ανάγει το O_2 , ενώ ταυτόχρονα αντλεί πρωτόνια κατά μήκος των βιολογικών μεμβρανών δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό που αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι, παρά τη μεγάλη απόσταση που χωρίζει εξελικτικά τους ευκαρυωτικούς (θηλαστικά) από τους προκαρυωτικούς (βακτήρια) οργανισμούς καθώς και την απλότητα που χαρακτηρίζει τις βακτηριακές τελικές οξειδάσες συγκριτικά με τις αντίστοιχες των μιτοχονδρίων, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα τόσο στη δομή όσο και τη λειτουργία τους.

1.1 Δομή και λειτουργία της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης

Η κυτοχρωμική οξειδάση [1] έχει τέσσερα ενεργά οξειδοαναγωγικά κέντρα: Cu_A , την αίμη $\alpha(Fe_\alpha)$, την αίμη $\alpha_3(Fe_{\alpha_3})$ και το Cu_B (σχ. 1.2). Η αίμη α_3 και ο Cu_B αποτελούν ένα σπιν συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο στο οποίο το O_2 δεσμεύεται και ανάγεται. Δύο επιπλέον μεταλλικά κέντρα υπάρχουν στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, ένα άτομο Zn και ένα άτομο Mg αλλά ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί. Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η κρυσταλλική δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια [2,3] και το *P. denitrificans* βακτήριο [4]. Παρά τη διαφορετική προέλευση των ενζύμων, οι δομές αυτές συμφωνούν μεταξύ τους και επιβεβαιώνουν τη δομή που είχε προβλεφθεί από τον επιτυχή συνδυασμό μεθόδων μοριακής βιολογίας και φασματοσκοπίας [5,6].

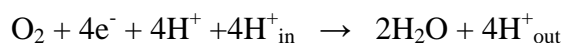
Ο Cu_A βρίσκεται στην υπομονάδα II και είναι ένα διμερές χαλκού ($Cu_{A1}-Cu_{A2}$). Τα δύο άτομα χαλκού συνδέονται με δύο γέφυρες θείου δύο κυστεϊνών. Δύο επιπλέον ligands υπάρχουν σε κάθε χαλκό: ο Cu_{A1} συνδέεται με μια ιστιδίνη και μία μεθειονίνη, ενώ ο Cu_{A2} ενώνεται με ένα γλουταμινικό οξύ και μία ιστιδίνη. Τα υπόλοιπα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα βρίσκονται όλα στην υπομονάδα I και 1\AA περίπου κάτω από την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Τα επίπεδα της αίμης α και της α_3 είναι σχεδόν



Σχήμα 1.2 Τα οξειδοαναγωγικά κέντρα στην κυτοχρωμική οξειδάση. Το O_2 δεσμεύεται και ανάγεται στο διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 - Cu_B . Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την αναπνευστική αλυσίδα μέσω του κυτοχρώματος c .

κάθετα στο επίπεδο της μεμβράνης και σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 104° , ενώ τα δύο άτομα σιδήρου απέχουν μεταξύ τους 1\AA . Η αίμη α είναι χαμηλού σπιν έχοντας δύο αξονικά ligands ιστιδίνης. Αντίθετα, η αίμη α_3 είναι υψηλού σπιν μ' ένα μόνο αξονικό ligand ιστιδίνης. Φασματοσκοπικές μελέτες δείχνουν ότι, όταν το ένζυμο βρίσκεται στην οξειδωμένη μορφή του, η αίμη α_3 σχηματίζει μαζί με το Cu_B ένα αντισιδηρομαγνητικά συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο πιθανόν μέσω ενός ligand γέφυρας, η ύπαρξη του οποίου δεν επιβεβαιώθηκε από την κρυσταλλική δομή. Ο Cu_B απέχει 4.5\AA από το Fe_{α_3} και συναρμόζεται με τρεις ιστιδίνες. Η κρυσταλλική δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης $\alpha\alpha_3$ από το *P. denitrificans* παρουσία 0.1% αζιδίου δείχνει ο Cu_B έχει μόνο δύο ligands ιστιδίνης [4].

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στην κυτοχρωμική c οξειδάση δείχνουν ότι η μεταφορά αυτή πραγματοποιείται μέσω μίας γραμμικής αλληλουχίας γεγονότων. Τα ηλεκτρόνια της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφέρονται μέσω του κυτοχρώματος c πρώτα στο Cu_A , στη συνέχεια στην αίμη α και από εκεί στο διπυρηνικό κέντρο $\alpha_3\text{-Cu}_B$ το οποίο δεσμεύει και ανάγει το οξυγόνο σε H_2O [8]. Παράλληλα, τέσσερα επιπλέον πρωτόνια αντλούνται από το εσωτερικό του μιτοχονδρίου και μεταφέρονται μέσω της κυτοχρωμικής οξειδάσης στο διαμεμβρανικό χώρο. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια διαβάθμιση στη συγκέντρωση των πρωτονίων και το δυναμικό κατά μήκος της βιολογικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP. Έτσι η ολική αντίδραση που καταλύει η κυτοχρωμική οξειδάση έχει ως εξής [9]:



Ο μέγιστος ρυθμός για το turnover του ενζύμου είναι περίπου $k_{\text{cat}}=1800\text{s}^{-1}$

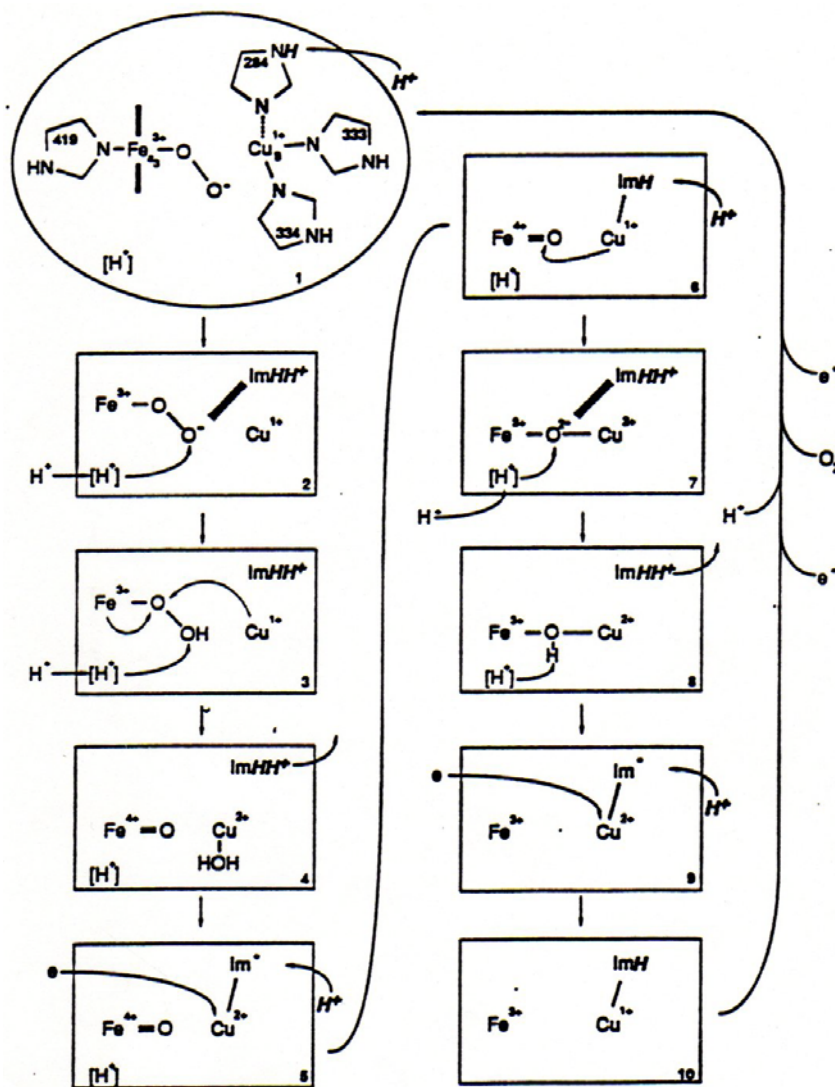
1.2 Σπουδαιότητα του διπυρηνικού κέντρου στη λειτουργία της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης

Η κυτοχρωμική οξειδάση λειτουργεί ουσιαστικά ως οξειδοαναγωγική αντλία πρωτονίων κατά την αναγωγή του O_2 σε H_2O . Η αντίδραση προχωράει μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων σταδίων μικρής χρονικής διάρκειας (μs - ms), τα περισσότερα από τα οποία έχουν χαρακτηριστεί με χρήση χρονο-εξαρτώμενης φασματοσκοπίας Raman [10-17]. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών συνιστούν ότι η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο O_2 γίνεται σταδιακά. Έτσι η δομή και η δυναμική του διπυρηνικού κέντρου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την αποτελεσματική λειτουργία του ενζύμου, αφού τα τοξικά προϊόντα που προκύπτουν από την μερική αναγωγή του O_2 δεν απελευθερώνονται στο κύτταρο. Παράλληλα έχει βρεθεί ότι η άντληση των H^+ γίνεται με την προσθήκη του τρίτου και τέταρτου ηλεκτρονίου [18]. Έτσι, η μεταφορά των πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης είναι συζευγμένη με τη μεταφορά των ηλεκτρονίων. Αρκετοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι διαφορετικές, οξειδοαναγωγικά εξαρτώμενες, διαμορφώσεις του ενζύμου πρέπει να υπάρχουν προκειμένου να ρυθμίζεται η εισαγωγή και η εξαγωγή των πρωτονίων κατά τη μεταφορά τους. Αυτή η υπόθεση έχει οδηγήσει στο να προταθούν πολλοί μηχανισμοί για τη σύζευξη της μεταφοράς των πρωτονίων και των ηλεκτρονίων και οι οποίοι συνδέουν αυτή τη δραστηριότητα με δομικές αλλαγές κοντά σ' ένα μεταλλικό κέντρο. Η ισχύουσα άποψη υποστηρίζει το διπυρηνικό κέντρο αίμης-χαλκού ως την πιο πιθανή θέση για τη σύζευξη. Έχει προταθεί ότι η άντληση των πρωτονίων πραγματοποιείται μέσω φαινομένων πρωτονίωσης/αποπρωτονίωσης ενός ligand (His284) του Cu_B και αλλαγών στη σφαίρα συναρμογής του Cu_B [19] (σχ.1.3).

Επιπλέον της φυσιολογικής λειτουργίας, το διπυρηνικό κέντρο μπορεί να δεσμεύσει και άλλα εξωγενή υποστρώματα, όπως CO , N_3 , CN , NO , H_2O_2 . Από μελέτες που έχουν γίνει, φαίνεται ότι η κυτοχρωμική *c* οξειδάση μπορεί να καταλύσει και άλλες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπως είναι η αναγωγή του NO σε N_2O , οι οξειδώσεις των CO σε CO_2 και NO σε NO_2 χωρίς όμως να έχουν διευκρινιστεί οι μηχανισμοί αυτοί [20-25].

Παράλληλα, υπάρχουν αποτελέσματα που δείχνουν ότι η δραστηριότητα του συγκεκριμένου διπυρηνικού κέντρου σχετίζεται με περισσότερες λειτουργίες του ενζύμου απ' ότι είχε αρχικά υποτεθεί και αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το Cu_B . Πιο

συγκεκριμένα: α) έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός ενός σταθερού $\text{Cu}_B\text{-CO}$ προϊόντος μετά τη φωτοδιάσπαση του συμπλόκου $\alpha_3^{2+}\text{-CO}$ στο πλήρες ανηγμένο ένζυμο [26] β) πρόσφατα κινητικά δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι εξωγενή αέρια ligands



Σχήμα 1.3 Ο κύκλος της Ιστιδίνης. Προτεινόμενο μοντέλο για την άντληση των πρωτονίων στις αναπνευστικές αιμαχαλοπρωτεΐνες [19]

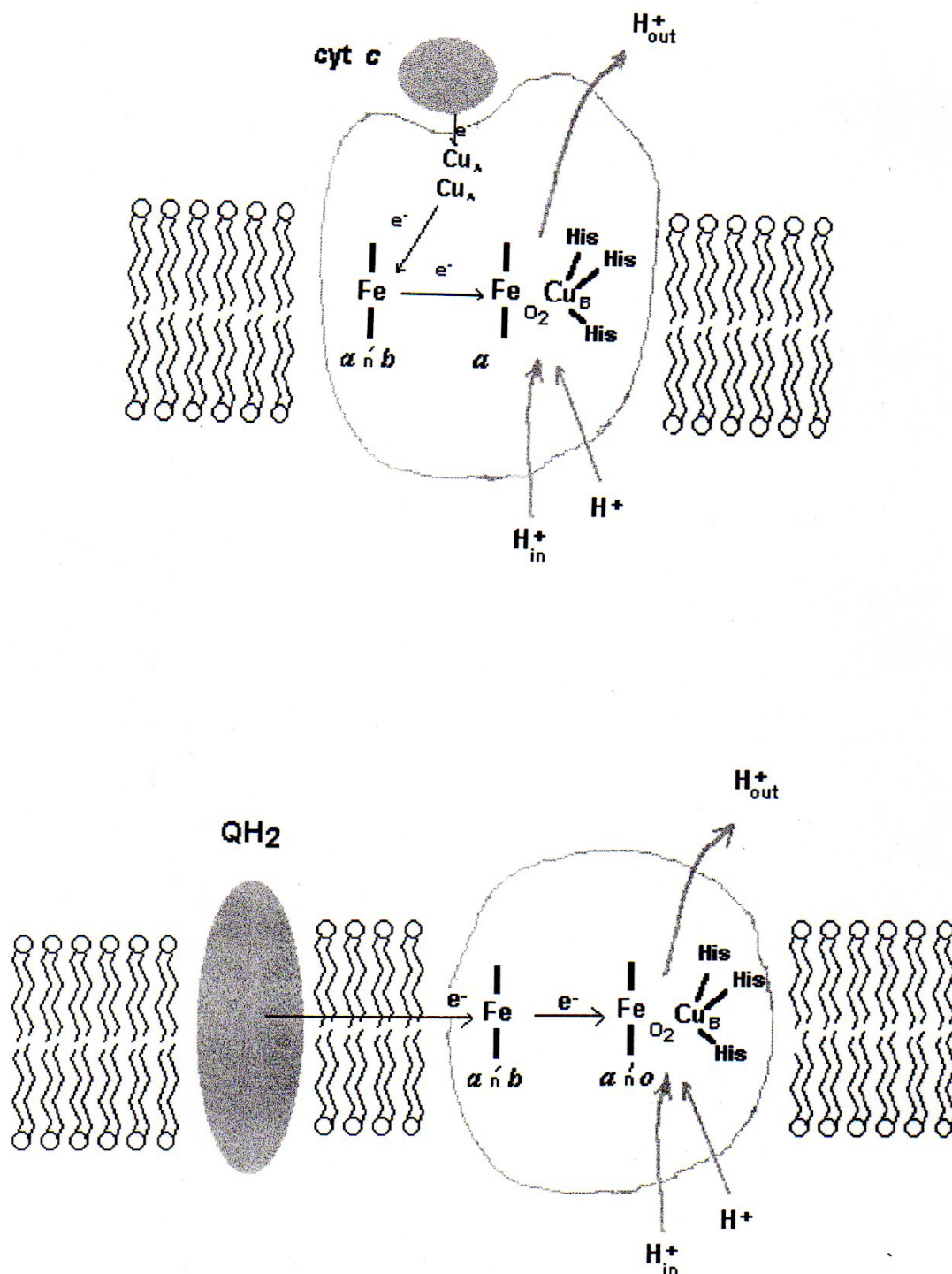
δεσμεύονται πρώτα στο Cu_B πριν «φθάσουν» στο Fe_{a3} [27], γ) έχει προταθεί ότι η μετάβαση από την αργή στη γρήγορη διαμόρφωση που επιδεικνύει το ένζυμο είναι συνέπεια της αλλαγής στη συναρμογή που συμβαίνει σ' αυτό το κέντρο του χαλκού δ) πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η δέσμευση του CO στο Cu_B μετά τη φωτοδιάσπαση του o_3 -CO στην πλήρως ανηγμένη κινολική οξειδάση ho_3 μπορεί να προκαλεί επαναδιευθετήσεις στη σφαίρα συναρμογής του Cu_B [28].

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο χαρακτήρας του διπυρηνικού κέντρου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

1.3 Οι κινολικές και κυτοχρωμικές c οξειδάσες των βακτηρίων

Οι τελικές αναπνευστικές οξειδάσες των βακτηρίων είναι πιο απλές σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των θηλαστικών όσον αφορά τον αριθμό των υπομονάδων τους και μπορούν να διακριθούν στις κυτοχρωμικές c οξειδάσες και τις κινολικές οξειδάσες (σχ. 1.4) [29, review paper]. Το κυτόχρωμα c είναι δότης ηλεκτρονίων όλων των κυτοχρωμικών c οξειδάσεων των βακτηρίων, οι οποίες έχουν τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα, όμοια με την κυτοχρωμική των μιτοχονδρίων. Αντίθετα μια κινόλη είναι ο δότης ηλεκτρονίων των κινολικών οξειδάσεων. Έτσι οι κινολικές οξειδάσεις δεν έχουν το Cu_A , διατηρούν όμως τα υπόλοιπα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα τα οποία βρίσκονται στην υπομονάδα I. Σε αντίθεση με την κυτοχρωμική c οξειδάση των μιτοχονδρίων, στις τελικές οξειδάσες της αναπνευστικής αλυσίδας των βακτηρίων η χαμηλού σπιν αίμη είναι αίμη a ή b , ενώ η υψηλού σπιν αίμη είναι a ή o και σχηματίζει με το Cu_B ένα σπιν-συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο. Το O_2 δεσμεύεται και ανάγεται στο διπυρηνικό κέντρο και ταυτόχρονα πρωτόνια αντλούνται από το εσωτερικό του κυττάρου προς τον εξωκυττάριο χώρο. Έτσι τα ένζυμα αυτά συμβάλουν στη διατήρηση της ενέργειας του κυττάρου δρώντας ως οξειδοαναγωγικές αντλίες πρωτονίων.

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των βακτηριακών οξειδάσεων, κυρίως λόγω της δυνατότητας να πάρουμε μεταλλαγμένες μορφές των ενζύμων για αμινοξέα τα οποία θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά για την ενζυμική δράση. Επιπλέον, η ομολογία σε μεγάλο βαθμό που



Σχήμα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση των βακτηριακών κυτοχρωμικών (πάνω μέρος) και κινολικών (κάτω μέρος) αναπνευστικών οξειδασών

επιδεικνύουν τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία με την οξειδάση των μιτοχονδρίων σε συνδυασμό με τις μικρές διαφορές που παρουσιάζουν όσον αφορά τον αριθμό των υπομονάδων και των οξειδοαναγωγικών κέντρων μας δίνει την δυνατότητα να προσδιορίσουμε τα ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά που ευθύνονται για τη διπλή λειτουργία των αναπνευστικών αιμοχαλκοοξειδασών. Πράγματι, πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή και τη λειτουργία επιμέρους ομάδων μέσα στο ένζυμο έχουν εξαχθεί από τον συνδυασμό μεθόδων μοριακής βιολογίας και βιοφυσικής [5,6,28].

Το κυτόχρωμα aa_3 από το *Paracoccus denitrificans*, το κυτόχρωμα bo_3 από το *Escherichia coli*, το κυτόχρωμα aa_3-600 από το *Bacillus subtilis*, είναι μερικές από τις πιο γνωστές και περισσότερο μελετημένες κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες βακτηρίων, στις οποίες θα αναφερθούμε παρακάτω.

Η κυτοχρωμική οξειδάση (κυτόχρωμα aa_3) από το *P. denitrificans* βακτήριο είναι μία από τις τελικές οξειδάσες της αναπνευστικής αλυσίδας του βακτηρίου και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c στο O_2 , ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης στην οποία είναι βυθισμένη. Το κυτόχρωμα aa_3 έχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα, όμοια με την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια.

Το κυτόχρωμα bo_3 είναι η τελική οξειδάση στην αερόβια αναπνευστική αλυσίδα του *Escherichia coli* και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη-8 στο O_2 . Το κυτόχρωμα bo_3 έχει μόνο τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα: τη χαμηλού spin αίμη b , την υψηλού spin αίμη o_3 και το Cu_B , με τα δύο τελευταία να σχηματίζουν ένα σπιν συζυγμένο διπυρηνικό κέντρο. Παρά τις εμφανείς διαφορές που υπάρχουν μεταξύ της CcO και του κυτοχρώματος bo_3 , όπως είναι η απουσία του Cu_A και η φύση του δότη ηλεκτρονίων, το κυτόχρωμα bo_3 δρα ως οξειδοαναγωγική αντλία πρωτονίων και ανάγει το O_2 μέσω ενδιάμεσων προϊόντων παρόμοιων εκείνων που έχουν βρεθεί για την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων.

Το κυτόχρωμα aa_3-600 αποτελεί την τελική οξειδάση της αναπνευστικής αλυσίδας του *Bacillus subtilis* κάτω από ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από την υδροκινόνη MQ-7 στο O_2 . Ως κινολική οξειδάση έχει μόνο τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα: την αίμη a , την αίμη a_3 και το Cu_B . Πρόσφατες φασματοσκοπικές μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό μετατοπίζει πρωτόνια κατά μήκος

της κυτταρικής μεμβράνης και καταλύει την αναγωγή του O_2 σε H_2O μέσω ενδιάμεσων προϊόντων, παρόμοιων εκείνων που σχηματίζονται κατά την αναγωγή του O_2 απ' την κυτοχρωμική οξειδάση.

1.4 Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας που παρουσιάζεται εδώ είναι η μελέτη της δομής και της δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών με χρήση φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis) και υπέρυθρου (FTIR).

Με την οπτική φασματοσκοπία (UV-Vis) προσδιορίζουμε τις θερμοδυναμικές σταθερές που χαρακτηρίζουν τις αντιδράσεις δέσμευσης των διαφόρων ligands στις τελικές αναπνευστικές οξειδάσες.

Επίσης χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία υπέρυθρου σε συνδυασμό με την οπτική φασματοσκοπία για τη μελέτη του διπυρηνικού κέντρου των αναπνευστικών αιμοχαλκοοξειδασών παίρνουμε ακριβείς πληροφορίες όσον αφορά 1) τη θέση και την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου στο οποίο δεσμεύεται ο υποκαταστάτης 2) την επίδραση πάνω στη θέση της υποκατάστασης όλων των οξειδοαναγωγικών επιπέδων αλλά και των ενδομοριακών αλληλοεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων θέσεων μέσα στο μόριο, 3) τη δομή και τη δυναμική γύρω από τη θέση της αναγωγής του O_2 καθώς και την επίδραση του pH και του μέσου στη δέσμευση του υποκαταστάτη, επειδή οι δονητικές ταινίες των υποκαταστατών επηρεάζονται όχι μόνο από τη μεταβολή του δεσμού μεταξύ του μετάλλου και του υποκαταστάτη αλλά και από τις στερικές και τις ηλεκτροστατιστικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με την εισαγωγή του υποκαταστάτη στο διπυρηνικό κέντρο. Οι δονήσεις που φανερώνουν δέσμευση του υποκαταστάτη προσδιορίζονται με ισοτοπική μετατόπιση.

Βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων μας και προηγούμενων μελετών προτείνουμε μια σειρά πειραμάτων με χρήση στατικών και χρονοαναλυόμενων τεχνικών UV-Vis και FTIR με σκοπό 1) τον πλήρη χαρακτηρισμό της δέσμευσης εξωγενών ligands στο διπυρηνικό κέντρο των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών ως συνάρτηση του pH και της οξειδωτικής κατάστασης και 2) την κατανόηση της σχέσης εξάρτησης της θέσης αναγωγής και του μηχανισμού άντλησης των πρωτονίων.

Αναφορές

1. Wikstrom, M., Krab, K., Saraste, M. 1981 in *Cytochrome Oxidase-A Synthesis* Academic Press, New York and London
2. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Iton, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. *Science* 1995, **269**, 1069-1074
3. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Iton, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. *Science* 1996, **272**, 1136-1144
4. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. *Nature* 1995, **376**, 660-669
5. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R.B, *J. Bacterio.* 1994, **176**, 5587
6. Calhoun, M.W., Thomas, J.W., Gennis R.B., *Trends Biochem. Sci.* 1994, **19**, 325
7. Hill, B.C. *J. Bionerg. Biomembr.* 1993, **25**, 115
8. Einarsdottir, O. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, **1229**, 129-147
9. Babcock, G.T., Wikstrom, M. *Nature* 1992, **356**, 301-309
10. Varotsis, C., Zhang, Y., Appelman, E.H., Babcock, G.T., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1993, **90**, 237-241
11. Han, H.S., Ching, Y.-cRousseau, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9445-9451
12. Oliveberg, M., Brzezinski, P., Malstrom, B.G. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **977**, 322-328
13. Verkhovsky, M., Morgan, J., Wikstrom, M., *Biochemistry* 1992, **31**, 11860-11863
14. Chance, B., Saronio, C., Leigh, J., Jr. *J. Biol. Chem.* 1975, **250**, 9226-9237
15. Morgan, J.E., Verkhovsky, M. I., Wikstrom, M., *Biochemistry*, 1996, **35**, 12235-12340
16. Varotsis, C.A., Woodruff, W.H., Babcock, G.T. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6439-6440
17. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc* **112**, 1990, 5630-5631
18. a) Wikstrom, M. *FEBS Lett*, 1988, **231**, 247-252
b) Wikstrom, M. *Chemica Scripta* **28A**, 71-74
19. Morgan, J. E., Verkhovsky, M.I., Wikstrom, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994, **26**, 599-608
20. Breckenridge, B. *Am. J. Physiol.* 1953, **173**, 61-69
21. Tzagoloff, A., Wharton, D.C. *J. Biol. Chem.* 1965, **240**, 2628-2633
22. Young, L.J., Choc, M.G., Caughey, W.S. in *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen* 1979 (Caughey, W.S., Ed.) pp355-362, Academic Press, New York.
23. Sampath, V., Zhao, X.-J., Caughey, W.S. *FASEB* 1993, **7**, A1114
24. a) Zhao, X.-J., Sampath, V., Caughey, W.S. *FASEB* 1993, **7**, A1115
b) Zhao, X.-J., Sampath, V., Caughey *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1995, **212(3)**, 1054-1060
26. Alben, J.O., Moh, P.P., Fiamingo, F., Altschuld, R.A, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 1981, **78**, 234-237
27. Woodruff, W.H., Einarsdottir, O., Dyer, R.B., Bagley, K.A., Palmer, G., Atherton, S.J., Goldbeck, R.A., Dawes, T.D., Kligler, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1991, **88**, 2588-2592
28. Puustinen, A., Baily, J., Dyer, R.B., Mecklenburg, S.L., Wikstrom, M., Woodruff, W.H. *Biochemistry* 1997, **36**, 13195-13200
29. Saraste, M., *O. Rev. Biophys.* 1990, **23**, 331-366

Κεφάλαιο 2

Βασικές αρχές των φασματοσκοπιών ορατού-υπεριώδους και υπερύθρου

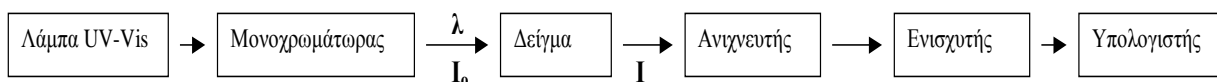
2.1 Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) οφείλονται σε μεταβάσεις του μορίου ή του ατόμου από τη βασική (θεμελιώδη) ηλεκτρονική κατάσταση στη διεργεμένη. Η ενέργεια που απαιτείται για να συμβεί μία ηλεκτρονική μετάβαση αντιστοιχεί σε ενέργεια φωτός κυρίως στην περιοχή του ορατού (400-750 nm) και του υπεριώδους (200-400 nm). [1-3]

Τα φάσματα UV-Vis λαμβάνονται ως οι μεταβολές της μοριακής απορροφητικότητας ϵ (συντελεστής απορρόφησης) ή της απορρόφησης A συναρτήσει του μήκους κύματος λ . Το ϵ ορίζεται από το νόμο Beer-Lambert, ο οποίος ισχύει κατά προσέγγιση και στην υπέρυθρο περιοχή:

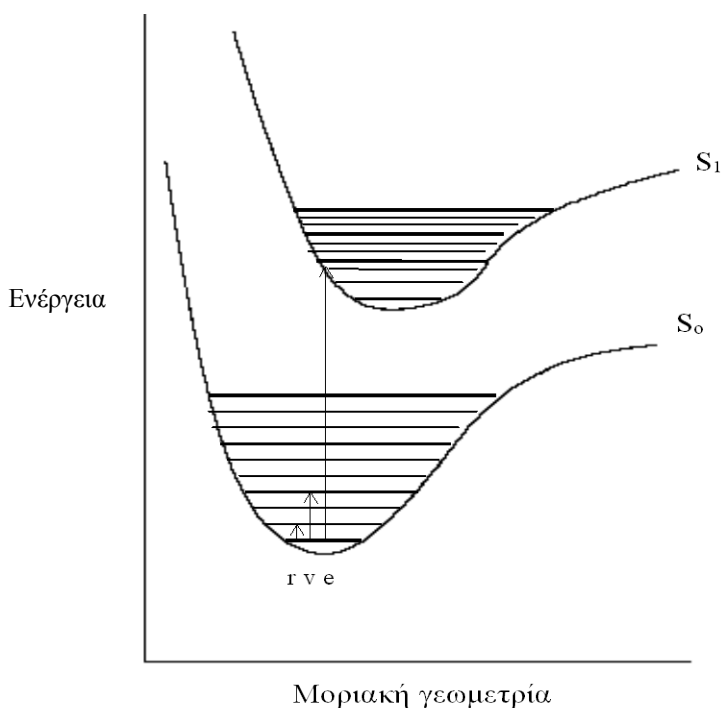
$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon c l$$

όπου I_0 και I είναι οι εντάσεις της προσπίπτουσας και της διερχόμενης ακτινοβολίας, l είναι η διαδρομή της ακτινοβολίας μέσα στο δείγμα και c είναι η συγκέντρωση των μορίων που απορροφούν (σχήμα 2.1). Ποιοτικά, το ϵ είναι ένα μέτρο της «ικανότητας» του μορίου να απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και σχετίζεται με την πιθανότητα να συμβεί η μετάβαση σε ένα ορισμένο μήκος κύματος λ .



Σχήμα 2.1. Σχηματικό διάγραμμα ενός πειράματος απορρόφησης UV-Vis.

Επειδή ταυτόχρονα με τις μεταβάσεις μεταξύ διαφορετικών ηλεκτρονικών καταστάσεων, πραγματοποιούνται και μεταβάσεις μεταξύ διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων (σχήμα 2.2) και επειδή λαμβάνουν χώρα και διάφορες αλληλεπιδράσεις με το διαλύτη, τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis είναι φάσματα ταινιών. Τα χαρακτηριστικά στοιχεία μίας ταινίας απορρόφησης είναι το μήκος κύματος λ_{\max} , στο οποίο παρουσιάζεται μέγιστο απορρόφησης και η αντίστοιχη τιμή του ϵ (ϵ_{\max}).

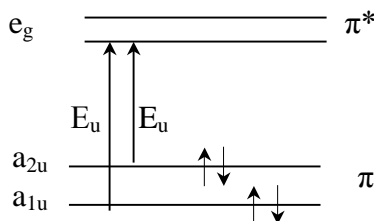


Σχήμα 2.2. Αναπαράσταση των ενεργειακών επιπέδων ενός μορίου και των ηλεκτρονικών (e), δονητικών (v) και περιστροφικών (r) μεταβάσεων.

Οι ηλεκτρονικές καταστάσεις περιγράφονται από τα μοριακά τροχιακά. Οι ηλεκτρονικές διεργασίες συχνά αντιστοιχούν σε ανύψωση ενός ηλεκτρονίου από ένα δεσμικό (σ , π) ή μη δεσμικό (n) τροχιακό σ' ένα αντιδεσμικό τροχιακό (σ^* , π^*).[1-3]

2.2 Τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης των ομάδων αίμης

Τα UV-Vis φάσματα των μεταλλοπορφυρινών και των ομάδων αίμης χαρακτηρίζονται από δύο ταινίες απορρόφησης, οι οποίες οφείλονται σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις του πορφυρινικού δακτυλίου (σχήμα 2.3). Και οι δύο μεταβάσεις είναι πολωμένες στο επίπεδο της αίμης (x,y) και είναι της ίδιας συμμετρίας E_u . Η υψηλότερης ενέργειας μετάβαση δίνει μία ιδιαίτερα έντονη ταινία γύρω στα 400 nm και έχει συντελεστή απορρόφησης της τάξης του $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Η ταινία αυτή ονομάζεται **Soret ή γ ταινία**. Η χαμηλότερης ενέργειας $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση δίνει μία αρκετά πιο ασθενή ταινία κοντά στα 600 nm. Αυτή η ταινία είναι γνωστή ως **α ταινία**. Μέσω δονητικών αλληλεπιδράσεων, η χαμηλής ενέργειας μετάβαση είναι δυνατό να «δανειστεί» ένα μέρος της έντασης της υψηλής ενέργειας μετάβασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας νέας ταινίας, περίπου 1300 cm^{-1} υψηλότερα από την α ταινία, η οποία ονομάζεται **β ταινία**.



Σχήμα 2.3. Σχηματικό διάγραμμα των π , π^* τροχιακών ενός πορφυρινικού δακτυλίου.

Στην περίπτωση των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών, οι δύο ομάδες αίμης που υπάρχουν έχουν διαφορετικές οπτικές ιδιότητες. Συνήθως όμως οι Soret και οι α ταινίες αυτών των ομάδων επικαλύπτονται με αποτέλεσμα τα UV-Vis φάσματα των αυτών των ενζύμων να εμφανίζουν δύο ταινίες: μία ευρεία ταινία 410-425 nm και μία δεύτερη στα 590-600 nm. Η δεύτερη παράγωγος του φάσματος μπορεί να αναλύσει αυτές τις ταινίες και να δείξει τα λ_{max} των δύο ομάδων αίμης.[5]

2.3 Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπερύθρου παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τις ενέργειες των δονήσεων των μορίων και επομένως για τις δομές των μορίων. Τα διατομικά μόρια αποτελούν το καλύτερο σημείο εκκίνησης για την περιγραφή των δονήσεων των πολυατομικών μορίων. Ένα διατομικό μόριο A-B μπορεί να προσεγγιστεί με το μοντέλο

του αρμονικού ταλαντωτή, στο οποίο δύο σημειακές μάζες m_1 και m_2 συνδέονται μέσω αβαρούς ελατηρίου σταθεράς k . [6,7] Τότε η συχνότητα της δόνησης του δεσμού A-B περιγράφεται από τη εξίσωση που δίνει τη συχνότητα ταλάντωσης του αρμονικού ταλαντωτή:

$$\nu = (1/2\pi)(k/\mu)^{1/2}$$

όπου μ είναι η ανηγμένη μάζα, όπως ορίζεται από την εξίσωση:

$$1/\mu = 1/m_1 + 1/m_2$$

Για την έκφραση της συχνότητας σε κυματάρια ν' (cm^{-1}) γίνεται η αντικατάσταση $\nu = (1/\lambda)c = \nu'c$, όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός, οπότε λαμβάνεται η εξίσωση:

$$\nu' = (1/2\pi c)(k/\mu)^{1/2}$$

Επειδή έχει καθιερωθεί ευρέως ο συμβολισμός του κυματάρια με το ελληνικό γράμμα ν , η παραπάνω εξίσωση μπορεί να γραφεί όπως παρακάτω:

$$\nu = (1/2\pi c)(k/\mu)^{1/2}$$

Σύμφωνα με αυτή τη σχέση, η συχνότητα δόνησης ενός δεσμού αυξάνεται με την ισχύ του δεσμού, η οποία εκφράζεται με τη σταθερά k .

Η φασματοσκοπία υπερύθρου προκύπτει από την απορρόφηση IR ακτινοβολίας από τα δονούμενα μόρια και αναφέρεται κατά κύριο λόγο στις θεμελιώδεις μεταβάσεις, δηλαδή εκείνες που συμβαίνουν μεταξύ της βασικής δονητικής κατάστασης $\nu=0$ και της κατάστασης $\nu=1$. Η μετάβαση αυτή ονομάζεται θεμελιώδης. Η ενέργεια που απαιτείται για τη μετάβαση δίνεται από τη σχέση:

$$E = h\nu$$

Οι ενέργειες των περισσότερων μοριακών δονήσεων είναι στην περιοχή της υπέρυθρης (IR) ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία, όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μίας δονητικής μετάβασης του μορίου. Η ακτινοβολία αυτή απορροφάται με την προϋπόθεση ότι το μόριο περιέχει ένα δίπολο, το οποίο πάλλεται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου του προσπίπτοντος κύματος.

Το ποσό της ακτινοβολίας IR που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της ταινίας στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα

της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης:[6,7,9]

$$I_{IR} \sim (\partial P / \partial q)^2$$

Αυτό σημαίνει ότι μία δόνηση είναι ενεργή στο IR όταν μεταβάλει τη διπολική ροπή.

Τα φάσματα υπερόθρου συνήθως λαμβάνονται ως η μεταβολή της απορρόφησης A συναρτήσει του ν (cm^{-1}). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την απορρόφηση στο IR ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert, ωστόσο ο συντελεστής απορρόφησης μίας δόνησης σπάνια χρησιμοποιείται, επειδή εξαρτάται ισχυρά από το περιβάλλον της δόνησης. Τα χαρακτηριστικά στοιχεία μίας ταινίας IR είναι η συχνότητα $\nu(\text{cm}^{-1})$, στην οποία η ταινία εμφανίζει μέγιστο και το πλάτος $\Delta(\nu)_{1/2}$ στο μισό του ύψους της.

Η ταυτοποίηση των δονήσεων γίνεται με τη χρήση των ισοτοπικών αναλόγων του μορίου (A-B, A*-B*). Εάν οι αντίστοιχες ανηγμένες μάζες είναι μ και μ^* , τότε σύμφωνα με το πρότυπο του αρμονικού ταλαντωτή ισχύει:

$$\nu/\nu^* = (\mu^*/\mu)$$

Αναφορές

1. Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. In *Biophysical Chemistry*; Freeman, W. H and Company: San Francisco 1980; Part II, pp 349-408.
2. Cambell, I. D.; Dwek, R. A. In *Biological Spectroscopy*; The Benjamin/Cummings Publing Company, Inc; Chapter 4, pp 61-90.
3. Κατάκης, Δ. και Πνευματικάκης, Γ. «Πανεπιστημιακή Ανόργανος Χημεία Α'». ΟΕΔΒ: Αθήνα 1988, κεφάλαιο 5, σελ. 186-190.
4. Gouterman, M. In *Porphyrins*; D. Dolphin, Ed.; Academic Press: New York, 1979; Part A, pp 1-156.
5. Sherman, D.; Kotake, S.; Inhibe, N.; Copeland, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1991, **88**, 4265-4269.
6. Cremlich, H-U, In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft, 1994; Vol B5, pp 429-469.
7. Nakamoto, L.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; Wiley& Sons, Inc: 1986; Part I.
8. Griffiths, P.; de Haseth, J. A. In *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; Willey: New York 1986; Chapter 1, pp 1-55.
9. Mantele. W. In *Biological Techniques in Photosynthesis*; Amesz & Hoff, A. J. Ed; Kluwer Academic Publishers; Netherlands, 1996; Chapter 9, pp 137-160.

Κεφάλαιο 3

Μελέτη της δέσμευσης του ιόντος αζιδίου στο κυτόχρωμα aa_3 από το βακτήριο *P. denitrificans* με χρήση φασματοσκοπιών UV-Vis και FTIR

3.1 Εισαγωγή

Το κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο είναι μία από τις τελικές οξειδάσες της αναπνευστικής αλυσίδας του βακτηρίου. Καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c στο O_2 , ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης στην οποία είναι βυθισμένη.[1-7] Το κυτόχρωμα aa_3 έχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: το Cu_A , τη χαμηλού spin αίμη α , την υψηλού spin αίμη α_3 και το Cu_B με τα δύο τελευταία να σχηματίζουν ένα spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο, στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου. Το διπυρηνικό αυτό κέντρο είναι η θέση δέσμευσης και αναγωγής του οξυγόνου.[8] Πρόσφατα δημοσιεύτηκε η κρυσταλλική δομή του ενζύμου παρουσία 0.1 % αζιδίου (NaN_3). Σ' αυτή τη δομή ο Cu_B διατηρεί μόνο τα δύο από τα τρία ligands ιστιδίνης με τα οποία συναρμόζεται απουσία του αναστολέα, ενώ τόσο η αίμη α όσο και η αίμη α_3 διατηρούν όλα τα ενδογενή ligands ιστιδίνης με τα οποία συναρμόζονται απουσία αναστολέα.[2a,b] Αυτή η δομή προτείνει ότι η παρουσία του αζιδίου προκαλεί μεταβολή στη σφαίρα συναρμογής του Cu_B , χωρίς ωστόσο να φανερώνει τη θέση δέσμευσης του αζιδίου μέσα στο ένζυμο.

Μεταβολές στη σφαίρα συναρμογής του ενεργού κέντρου έχουν επίσης προταθεί από προηγούμενες μελέτες με χρήση χρονοεξαρθρώμενων τεχνικών φασματοσκοπίας συντονισμού Raman, UV-Vis και MCD.[9] Σύμφωνα με αυτές τις εργασίες κατά τη δέσμευση του CO στο Cu_B^{1+} , μετά τη φωτοδιάσπαση του συμπλόκου Fe^{2+} -CO, ένα ενδογενές ligand του Cu_B^{1+} απομακρύνεται και δεσμεύεται στην έκτη θέση της αίμης α_3^{2+} , ενώ ταυτόχρονα απομακρύνεται η proximal His376 από την αίμη α_3 . [9] Παρόμοιες

αλλαγές στη σφαίρα συναρμογής της αίμης α_3 και του Cu_B έχουν προταθεί ότι ευθύνονται για τη σύζευξη της μεταφοράς των e^-/H^+ , η οποία πραγματοποιείται κατά τον καταλυτικό κύκλο των τελικών οξειδασών.[10]

Στην παρούσα εργασία μελετάται με χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis, FTIR η δέσμευση ενός εναλλακτικού ligands όπως είναι το αζίδιο με το κυτόχρωμα $\alpha\alpha_3$, ως ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση των φαινομένων απομάκρυνσης και ανταλλαγής των ligands, τα οποία έχουν προταθεί ότι συμβαίνουν στο διπυρηνικό κέντρο.

3.2 Πειραματική διαδικασία

Η κυτοχρωμική οξειδάση απομονώθηκε από το *P. denitrificans* βακτήριο σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο καθαρισμού [7]. Τα UV-Vis φάσματα καταγράφηκαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Η τιτλοδότηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με τη σταδιακή προσθήκη μικρού όγκου υδατικού διαλύματος NaN_3 . Τα UV-Vis φάσματα διαφοράς λαμβάνονταν 10 min μετά την προσθήκη του αζιδίου. Σ' όλα τα φάσματα έγινε διόρθωση της έντασης λόγω της αραίωσης του δείγματος. Η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από τη γραφική παράσταση του αντιστρόφου της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret ως προς το αντίστροφο της συγκέντρωσης του NaN_3 στο δείγμα (διάγραμμα Lineweaver-Burk). Για τη φάση υψηλής συγγένειας, όπου η συγκέντρωση του αζιδίου είναι μικρή, η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την κλίση της ευθείας που προκύπτει από το διάγραμμα Lineweaver-Burk. Στη φάση χαμηλής συγγένειας, η συγκέντρωση του αζιδίου είναι μεγάλη και η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την τετμημένη επί την αρχή στο αντίστοιχο διάγραμμα Lineweaver-Burk.

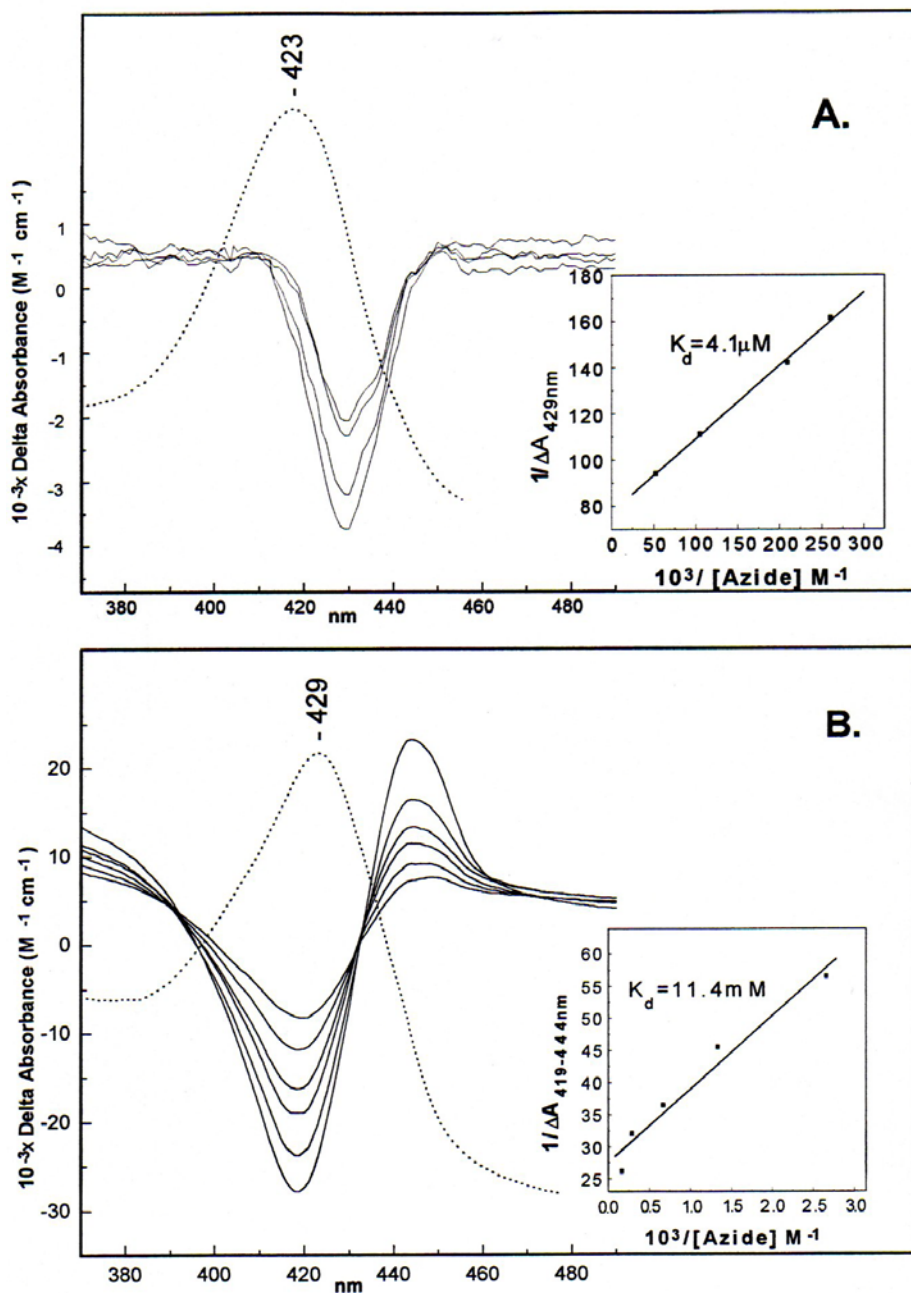
Για τα FTIR πειράματα παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα: α) $\alpha\alpha_3\text{-N}_3$: με αναλογία $[\alpha\alpha_3]:[\text{NaN}_3]$ ήταν 1:53, (φάση χαμηλής συγγένειας) β) $\alpha\alpha_3$ δείγμα αναφοράς με συγκέντρωση ενζύμου ίση με εκείνου του $\alpha\alpha_3\text{-N}_3$ δείγματος και γ) δείγμα αναφοράς ελεύθερου αζιδίου με συγκέντρωση αζιδίου ίση με εκείνη του $\alpha\alpha_3\text{-N}_3$ δείγματος. Τα ελήφθησαν σε IR κυψελίδα με CaF_2 παράθυρα και spacer 52 μm , με ένα BRUKER EQUINOX 55 FTIR φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με ένα MCT ανιχνευτή. Τα φάσματα των παραπάνω δειγμάτων και του ρυθμιστικού διαλύματος καταγράφηκαν ως προς τον αέρα. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν 2 cm^{-1} και για κάθε δείγμα

ελήφθησαν 2100 interferograms. Λόγω της έντονης απορρόφησης του νερού στην περιοχή $2000\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ και της ισχυρής και ευρείας δόνησης του ελεύθερου N_3^- στους 2048 cm^{-1} τα φάσματα επεξεργάστηκαν ως εξής: Από το φάσμα του ενζύμου-αζιδίου αφαιρέθηκε το αντίστοιχο φάσμα του ελεύθερου ενζύμου και από το αντίστοιχο φάσμα του ελεύθερου αζιδίου αφαιρέθηκε το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος. Στα φάσματα διαφοράς τα που προέκυψαν έγινε διόρθωση της baseline. Στη συνέχεια από το φάσμα διαφοράς του συμπλόκου ένζυμο-αζίδιο αφαιρέθηκε το φάσμα διαφοράς του ελεύθερου αζιδίου πολλαπλασιασμένο με ένα συντελεστή. Ο συντελεστής αυτός υπολογίστηκε βάσει του κλάσματος του αζιδίου που δεσμεύεται. Στο τελικό φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline.

3.3 Αποτελέσματα

Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζονται τα απόλυτα UV-Vis φάσματα απορρόφησης του οξειδωμένου μη υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο και του N_3 -συμπλόκου του ενζύμου, όπως και τα φάσματα διαφοράς του $aa_3\text{-N}_3$ συμπλόκου μείον το φάσμα του μη υποκατεστημένου ενζύμου κατά την τιλοδότηση με NaN_3 . Προσθήκη 5 mM NaN_3 σε 5.5 μM κυτοχρώματος aa_3 προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας από τα 423 nm στα 429 nm. Τα φάσματα διαφοράς χαρακτηρίζονται από δύο σειρές αλλαγών στην απορρόφηση. Σε συγκεντρώσεις αζιδίου μικρότερες από 0.4 mM παρατηρείται μηδενική διασταύρωση στα 410 nm και ελάχιστο απορρόφησης στα 429 nm, το οποίο δηλώνει μείωση της έντασης της Soret ταινίας. Το αντίστοιχο διάγραμμα Lineweaver-Burk δείχνει ότι η σταθερά διάστασης γι' αυτή τη φάση είναι 4.1 μM . Οι μικρές αλλαγές στην απορρόφηση και η μικρή τιμή της σταθεράς διάστασης προτείνουν δέσμευση του αζιδίου σε θέση υψηλής συγγένειας. Η φάση αυτή αντιστοιχεί στη φάση υψηλής συγγένειας με $K_d=64\text{ }\mu\text{M}$ που έχει παρατηρηθεί κατά τη δέσμευση του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων και pH 8.0 [16].

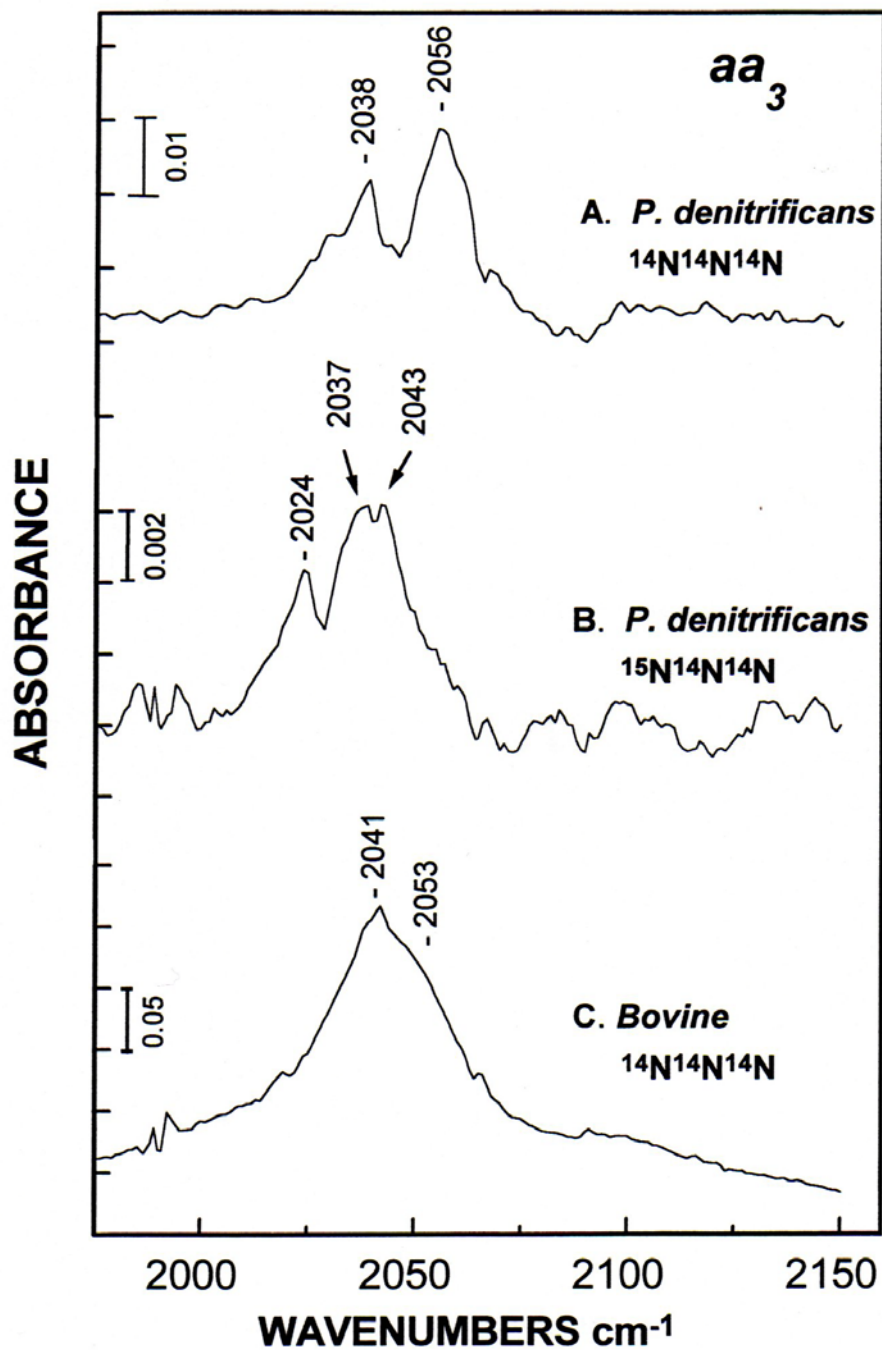
Αύξηση της συγκέντρωσης του αζιδίου οδηγεί σε σημαντικές αλλαγές στα UV-Vis φάσματα: τα φάσματα διαφοράς εμφανίζουν ελάχιστο στα 419 nm και μέγιστο στα 444 nm. Το διάγραμμα Lineweaver-Burk δίνει $K_d=11.4\text{ mM}$. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν δέσμευση του αζιδίου σε θέση χαμηλής συγγένειας.



Σχήμα 3.1 Τα απόλυτα UV-Vis φάσματα απορρόφησης του μη υποκατεστημένου οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (διάγραμμα A) και του N_3 -υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 (διάγραμμα B) και τα φάσματα διαφοράς του aa_3-N_3 μείον το φάσμα του aa_3 κατά τη σταδιακή προσθήκη του αζιδίου, σε $\text{pH}=7.4$. Στη φάση υψηλής συγγένειας (διάγραμμα A) η αναλογία των συγκεντρώσεων $[aa_3]:[\text{NaN}_3]$ είναι 1:0.8, 1:1.2, 1:2 και 1:4. Στη φάση χαμηλής συγγένειας (διάγραμμα B) η αναλογία των συγκεντρώσεων $[aa_3]:[\text{NaN}_3]$ είναι 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1200 και 1:2200. Στα ένθετα φαίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα Lineweaver-Burk, βάσει των οποίων υπολογίζονται οι σταθερές διάστασης των δύο φάσεων.

Τα UV-Vis φάσματα δε δίνουν πληροφορίες για τη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου. Προκειμένου να χαρακτηριστεί ο τρόπος δέσμευσης του N_3^- , ελήφθησαν επίσης τα FTIR φάσματα των συμπλόκων του ενζύμου με το $^{14}N_3$ και το $^{15}N^{14}N^{14}N$ κάτω από συνθήκες χαμηλής συγγένειας (σχ. 3.2). Η δέσμευση του αζιδίου στη φάση χαμηλής συγγένειας πιστοποιήθηκε απ' τη μετατόπιση του μεγίστου της ταινίας Soret στα 429 nm καταγράφοντας το UV-Vis φάσμα μέσα την IR κυψελίδα πριν και μετά το FTIR φάσμα.

Στο FTIR φάσμα του $^{14}N_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* παρατηρούνται δύο ασύμμετρες δονήσεις τάσης του αζιδίου (ν_{as}), μία στους 2038 cm^{-1} και μία στους 2056 cm^{-1} , οι οποίες μετατοπίζονται αντίστοιχα στους 2023 cm^{-1} και τους $2043\text{ cm}^{-1}/2037\text{ cm}^{-1}$, όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με την προσθήκη $Na^{15}N^{14}N_2$. Παρόμοιες δονήσεις, μία στους 2041 cm^{-1} και μία στους 2053 cm^{-1} παρατηρήσαμε για το σύμπλοκο της κυτοχρώματος aa_3 από τα μιτοχόνδρια (σχ. 3.2). Οι συχνότητες αυτές είναι πολύ κοντά στις συχνότητες 2039 cm^{-1} και 2051 cm^{-1} , έχουν δημοσιευτεί και από άλλους ερευνητές για τη δέσμευση του $^{14}N_3$ στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, ωστόσο υπάρχει διαφωνία ως προς τον χαρακτηρισμό τους. Οι Yoshikawa et al.[14] αποδίδουν τη δόνηση στους 2039 cm^{-1} σε δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στο Cu_B , και θεωρούν ότι η δόνηση στους 2051 cm^{-1} οφείλεται σε δέσμευση του αζιδίου σε μη μεταλλική θέση κοντά στο διπυρηνικό κέντρο. Αυτή η ερμηνεία αμφισβητήθηκε απ' τον Tsubaki [15], ο οποίος αποδίδει τη δόνηση στους 2051 cm^{-1} σε ένα σύμπλοκο γέφυρας αίμη $\alpha_3-N_3-Cu_B$, ενώ τη 2039 cm^{-1} σ' ένα τελικό σύμπλοκο $Fe-N_3$ υψηλού spin. Οι Li et al.[16] διαφωνούν με το χαρακτηρισμό της 2039 cm^{-1} και βάσει των FTIR, EPR και MCD αποτελεσμάτων τους θεωρούν ότι αυτή η δόνηση οφείλεται σε δέσμευση του αζιδίου στην αίμη α , η οποία συμβαίνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις αζιδίου (φάση χαμηλής συγγένειας). Επιπλέον αποδίδουν τη δόνηση στους 2051 cm^{-1} σε δέσμευση του N_3 στο διπυρηνικό κέντρο ως ligand γέφυρας, επειδή δεν παρατηρούν καμία από τις δύο $\nu_{as}(N_3)$ παρουσία μικρής συγκέντρωσης CN^- , το οποίο θεωρούν ότι δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο. Έτσι, το ιόν του αζιδίου θα πρέπει να δεσμεύεται στην ίδια θέση που δεσμεύεται και το ιόν του κυανίου ή σε κάποια θέση η οποία καλύπτεται απ' το δεσμευμένο CN^- .



Σχήμα 3.2 Τα FTIR φάσματα των (A) $^{14}\text{N}_3$ (B) $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ συμπλόκων του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* στη φάση χαμηλής συγγένειας (Γ) $^{14}\text{N}_3$ συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια

Η κρυσταλλική δομή του κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο παρουσία 0.1 % NaN_3 δείχνει ότι η αίμη α διατηρεί τα ligands ιστιδίνης στις δύο αξονικές θέσεις [2a]. Επομένως, ούτε η 2056 cm^{-1} ούτε η 2038 cm^{-1} δόνηση οφείλονται σε δέσμευση του αζιδίου στην αίμη α . Δέσμευση του αζιδίου στην αίμη α_3 ως τελικό ligand σε θέση trans ως προς την ιστιδίνη, θα είχε ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε χαμηλού σπιν. Ωστόσο τα προηγούμενες μελέτες με χρήση EPR και MCD τεχνικές δε δείχνουν να συμβαίνει μεταβολή της σπιν κατάστασης της αίμης α_3 [16]. Έτσι, καμμία απο τις παρατηρούμενες δονήσεις δεν μπορεί να αποδοθεί σε δόνηση ενός συμπλόκου $\alpha_3\text{-N}_3$ τελικής γεωμετρίας. Η δόνηση στους 2038 cm^{-1} δεν παρουσιάζει σχάση κατά την ισοτοπική αντικατάσταση. Αυτό προτείνει ότι η ισχύς των δύο $\text{N}=\text{N}$ δεσμών του αζιδίου είναι περίπου ίδια. Η συχνότητα αυτής της δόνησης είναι παρόμοια της ασύμμετρης δόνησης (ν_{as}) που παρατηρείται κατά τη δέσμευση του αζιδίου στη μυοσφαιρίνη [17-20]. Παρά την ομοιότητα αυτή, προτείνουμε ότι η δόνηση στους 2038 cm^{-1} χαρακτηρίζει δέσμευση του αζιδίου ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο αίμη $\alpha_3\text{-Cu}_B$. Αντίθετα με την 2038 cm^{-1} δόνηση, η δόνηση στους 2056 cm^{-1} παρουσιάζει σχάση 5 cm^{-1} κατά την ασύμμετρη ισοτοπική αντικατάσταση, γεγονός που δηλώνει διαφορά στην ισχύ των δύο $\text{N}=\text{N}$ δεσμών. Αν και με τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματά μας, δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε χωρίς αμφιβολία τη φύση της 2056 cm^{-1} δόνησης, προτείνουμε ότι αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε ένα τελικό σύμπλοκο της μορφής $\text{N}_3\text{-Cu}_B$ είτε σε ένα σύμπλοκο γέφυρας της μορφής αίμη $\alpha_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$. Για μια τέτοια δομή γέφυρας μπορεί να παρατηρηθεί σχάση κατά την ισοτοπική αντικατάσταση, λόγω διαφορετικής ισχύος των Fe-N και $\text{Cu}_B\text{-N}$ δεσμών. Ωστόσο, για ένα τελικό σύμπλοκο αναμένεται μεγαλύτερη σχάση. Παρόμοιες δονήσεις με την 2056 cm^{-1} δόνηση έχουν παρατηρηθεί κατά τη δέσμευση του αζιδίου τόσο σε χαλκοπρωτεΐνες, όπως είναι η υπεροξειδική δισμουτάση [22] και η νιτρική αναγωγή (Varotsis et al, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), όσο και για αιμοπρωτεΐνες, όπως η Mb από ελέφαντα. [19] Από τις δύο πιθανές ερμηνείες για την προέλευση της 2056 cm^{-1} δόνησης, προτιμούμε τη δεύτερη στην οποία το αζίδιο σχηματίζει γέφυρα στο διπυρηνικό κέντρο. Αυτή η ερμηνεία είναι σε συμφωνία με προηγούμενα αποτελέσματα για τη δέσμευση του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση (CcO) των μιτοχονδρίων [16]. Σύμφωνα μ' αυτά τόσο η 2039 cm^{-1} όσο και η 2051 cm^{-1} δόνηση που παρατηρούνται για την CcO αντικαθίστανται με μία δόνηση στους 2151

cm^{-1} όταν μικρή ποσότητα CN προστίθεται στο ήδη σχηματισμένο σύμπλοκο CuO-N_3 . Επειδή η 2151 cm^{-1} δόνηση έχει αποδοθεί σ' ένα σύμπλοκο γέφυρας της μορφής αίμη $\alpha_3\text{-C-N-Cu}_B$, προτάθηκε ότι το N_3 πρέπει να καταλαμβάνει την ίδια ή αλληλοκαπτόμενη θέση με τη γέφυρα κυανίου. Η μεγάλη διαφορά στη συχνότητα των 2056 cm^{-1} και 2038 cm^{-1} δονήσεων - και οι δύο αποδίδονται σε σύμπλοκα γέφυρας- μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του ενεργού κέντρου, που επιδρούν στην τάξη των δεσμών μέταλλο-N σε και $\text{N}=\text{N}$. Επίσης, η γωνία που σχηματίζουν η αίμη α_3 και/ή ο Cu_B με τα N άτομα του αζιδίου μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα της ασύμμετρης δόνησης του αζιδίου.

Συμπερασματικά, το αζίδιο δεσμεύεται στο κυτόχρωμα aa_3 σε δύο φάσεις, μία φάση υψηλής συγγένειας και μία φάση χαμηλής συγγένειας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων FTIR που παρουσιάζονται εδώ, προτείνουν ότι στη φάση στη φάση χαμηλής συγγένειας το αζίδιο δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις σχηματίζοντας, πιθανότατα και στις δύο, σύμπλοκα της μορφής αίμη $\alpha_3^{3+}\text{-N}_3\text{-Cu}_B^{2+}$. Επιπλέον πειράματα με χρήση φασματοσκοπίας Raman και FTIR απαιτούνται για τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό της 2056 cm^{-1} δόνησης και του τρόπου δέσμευσης του αζιδίου στη φάση υψηλής συγγένειας. Η κρυσταλλική δομή της aa_3 οξειδάσης από το *P. denitrificans* παρουσία αζιδίου δε δείχνει ηλεκτρονική πυκνότητα για την His325, γεγονός το οποίο προτείνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στο κυτόχρωμα aa_3 προκαλεί την απομάκρυνση της His325 από το Cu_B [2a]. Πρόσφατα, οι Puustinen et al.[21] πρότειναν ότι η δέσμευση του CO στο Cu_B , μετά τη φωτόλυση του δεσμού αίμη $\alpha_3^{2+}\text{-CO}$ προκαλεί την αντικατάσταση ενός ligand του Cu_B ή τη μεταβολή της οξύτητας κατά Lewis αυτού του ιόντος. Τα παραπάνω προτείνουν ότι τα φαινόμενα που παρατηρούνται κατά τη συναρμογή του αζιδίου είναι αντιπροσωπευτικά για τη δέσμευση και άλλων ligands όπως το CO και το O_2 . Προτείνουμε ότι οι δομικές που συμβαίνουν στη σφαίρα συναρμογής του Cu_B , είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας του ως ενδιάμεση θέση δέσμευσης κατά την «είσοδο» και την «έξοδο» των ligands από τη θέση αναγωγής του O_2 .

Αναφορές

1. Babcock, G. T.; Wikström, M. *Nature* **1992**, 356, 301-309.
2. a) Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. *Nature*, **1995**, 376, 660-669 b) Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H. *PNAS* **1997**, 94, 10547-10553
3. Ludwig, B. *FEMS Microbiol. Rev.* **1987**, 46, 41-56.

4. Gennis, R. B.; Trumpower, B. L. *Ann. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 675-716.
5. Steinrück, P.; Gerhus, E.; Ludwig, B. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7676-7681.
6. Capaldi, R. A. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 569-596.
7. Hendler, R. W.; Pardhasaradhi, K.; Reynafarje, B.; Ludwig, B. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 415-423.
8. Einarsdottir, O. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1229*, 129-147.
9. Woodruff, W. H.; Einarsdottir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; Atherton, S. J.; Goldbeck, R. A.; Dawes, T. D.; Kligler, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 2588-2592.
10. Morgan, J. E.; Verkhovsky, M. I.; Wikström, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994**, *26*, 599-608.
11. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13780-13787.
12. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol.3, p.293
13. (a) Asher, S. A.; Vickery, L.E.; Schuster, T.M.; Sauer, K. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5849-5855. (b) Asher, S. A.; Schuster, T. M. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5377-5382. (c) Desbois, A.; Lutz, M.; Banerjee, R. *Biochemistry* **1979**, *18*, 1510-1515. (d) Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T. *Biochemistry* **1979**, *18*, 946-952. (e) Czernuszewicz, R. S.; Wagner, W-D.; Ray, G. B.; Nakamoto, K. *J. Mol. Struct.* **1991**, *242*, 99-117.
14. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
15. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
16. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *322*, 1833-1843.
17. McCoy, S.; Caughey, W. S. *Biochemistry* **1970**, *9*, 2387-2392.
18. Alben, J. O.; Fager, L. Y. *Biochemistry* **1972**, *11*, 842-847.
19. Bormett, R. W.; Asher, S. A.; Larkin, P. J.; Gustafson, W. G.; Ragunathan, N.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A.; Balasubramanian, S.; Boxer, S. G.; Yu, N-T.; Gersonde, K.; Noble, R. W.; Springer, B. A.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6864-6867.
20. Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7600-7608.
21. Puustinen, A.; Baily, J. A.; Dyer, R. B.; Mecklenburg, S. L.; Wikström, M.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13195-13200.
22. Blackburn, N. J.; Reedy, B.; Zhou, E.; Carr, R.; Benkovic, S. J. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *47*, 8-16.

Κεφάλαιο 4

Μελέτη της δέσμευσης του ιόντος κυανίου στην κυτοχρωμική οξειδάση και τις κινολικές οξειδάσες *bo*₃ και *aa*₃-600 με χρήση φασματοσκοπιών UV-Vis και FTIR

4.1 Εισαγωγή

Μελέτες πρότυπων ενώσεων αίμης δείχνουν ότι το CN τείνει να δεσμεύεται κάθετα στο επίπεδο της αίμης απουσία στερικών παρεμποδίσεων [1]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τις αιμοπρωτεΐνες δείχνουν το CN έχει μία κεκλιμένη ή/και κεκαμμένη λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων από κατάλοιπα αμινοξέων στο μικροπεριβάλλον γύρω από τη θέση δέσμευσης ή/και το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου του κυανίου και γειτονικών αμινοξέων [2-4]. Επίσης, από μελέτες συντονισμού Raman και IR CN-συμπλόκων μοντέλων αίμης προκύπτει ότι η ισχύς των δεσμών Fe-C και C≡N επηρεάζεται από τη βασικότητα του ligand σε θέση trans ως προς το CN [5,6]. Η ύπαρξη αυτής της σχέσης έχει αποδοθεί στο σχηματισμό των σ και π δεσμών των δύο αξονικών ligands με το σίδηρο [5].

Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού των ιδιοτήτων των τελικών οξειδασών που αφορούν τη δέσμευση εξωγενών ligands, εξετάσαμε την αλληλεπίδραση του CN⁻ με την πλήρως οξειδωμένη CcO μιτοχονδρίων σε δύο διαφορετικά pH, 7.4 και 8.4, εφαρμόζοντας UV-Vis και FTIR φασματοσκοπία. Για την ύπαρξη μίας ολοκληρωμένης συγκριτικής μελέτης των ιδιοτήτων των τελικών οξειδασών, μελετήθηκε επίσης η αλληλεπίδραση του κυανίου με τα κινολικά κυτόχρωματα *aa*₃-600 από *B. subtilis* βακτήριο και *bo*₃ από το *E. coli*.

4.2 Πειραματική διαδικασία

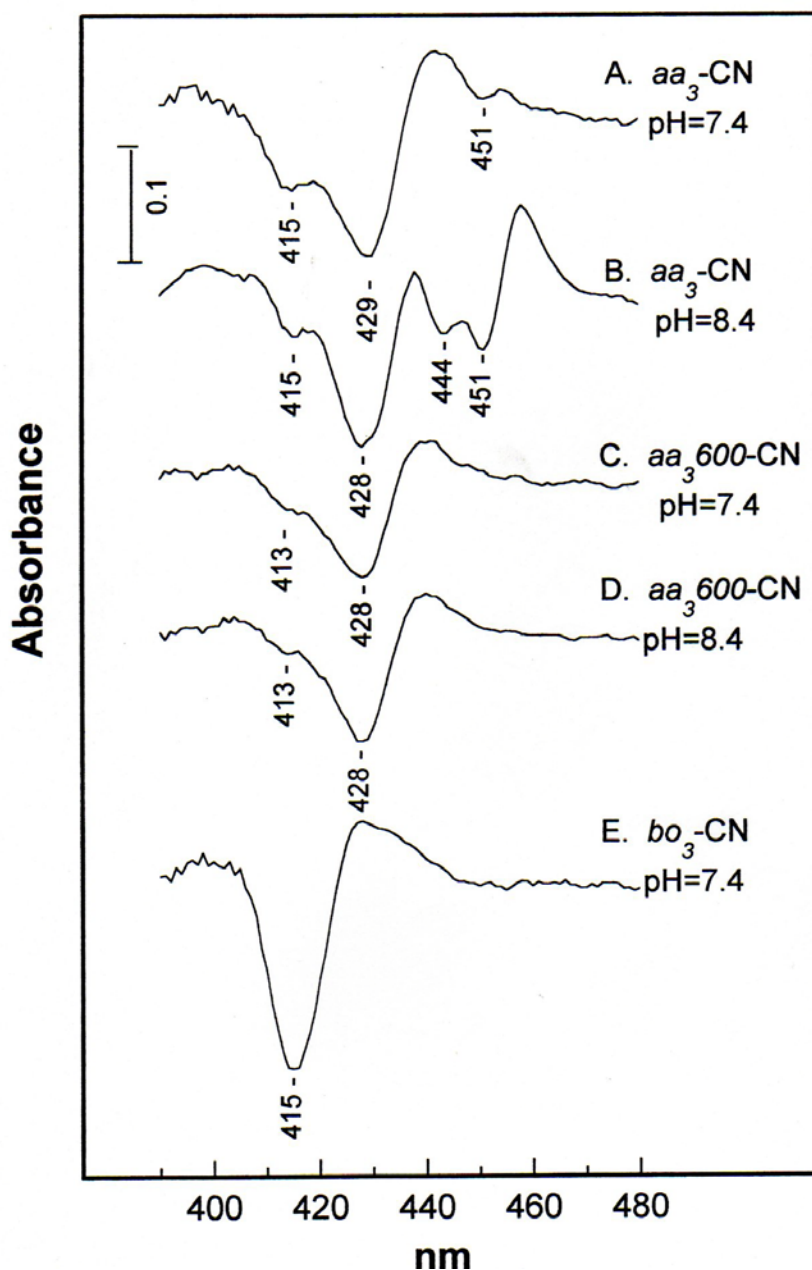
Η CcO, το κυτόχρωμα *aa*₃-600 και το κυτόχρωμα *bo*₃ απομονώθηκαν αωτίστοιχα από καρδιά βοός, το *B. subtilis* και το *E. coli* σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα καθαρισμού [1,25,26]. Ως μέσο διάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα: α) 50 mM Hepes, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4 και β) 50 mM Tris-HCl, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 8.4. Τα κυανιούχα σύμπλοκα των ενζύμων παρασκευάστηκαν με την προσθήκη μικρού όγκου συγκεντρωμένου διαλύματος KCN (ή ισοτοπικών αναλόγων) στο ένζυμο, έτσι ώστε η τελική αναλογία των συγκεντρώσεων [ένζυμο]:[KCN] να είναι 1:14 για την CcO, 1:21 για το *aa*₃-600 και 1:22.5 για το *bo*₃. Επίσης παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς με το ελεύθερο, μη υποκατεστημένο ένζυμο και το ελεύθερο KCN.

Τα FTIR φάσματα ελήφθησαν μέσα σε IR κυψελίδα με CaF₂ παράθυρα και spacer 52 μm. Τα φάσματα καταγράφηκαν ως προς τον αέρα, με διακριτική ικανότητα 2 cm⁻¹ σ' ένα BRUKER EQUINOX 55 FTIR φασματοφωτόμετρο. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Origin 4. Από το φάσμα του συμπλόκου ένζυμο-CN αφαιρέθηκε το φάσμα του ελεύθερου ενζύμου και μετά έγινε διόρθωση της baseline. Από το φάσμα του αναφορικού δείγματος του κυανίου αφαιρέθηκε το φάσμα του διαλύτη και κατόπιν έγινε διόρθωση της baseline. Επειδή το pKa του HCN είναι 9.31 στους 25 °C, ένα μεγάλο μέρος του κυανίου στο διάλυμα σε pH 7.4 και 8.4 βρίσκεται στη μορφή του οξέος, το οποίο δίνει ισχυρή δόνηση στους 2093 cm⁻¹ για το H¹²C¹⁴N. Η δόνηση αυτή μετατοπίζεται στους 2065 cm⁻¹ για το H¹³C¹⁴N και το H¹²C¹⁵N [2]. Αυτές οι δονήσεις απαλείφθηκαν με την αφαίρεση του φάσματος διαφοράς του ελεύθερου κυανίου από το φάσμα διαφοράς του συμπλόκου του ενζύμου. Στο τελικό φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline. Τα UV-Vis φάσματα των πρωτεϊνικών δειγμάτων ελήφθησαν μέσα στην IR κυψελίδα πριν και μετά τις FTIR μετρήσεις. Τα δεδομένα καταγράφηκαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο.

4.3 Αποτελέσματα

Το σχήμα 4.1 παρουσιάζει τη δεύτερη παράγωγο των UV-Vis φασμάτων των κυανιούχων συμπλόκων της CcO, και των κυτόχρωμάτων aa_3-600 και bo_3 σε pH 7.4 και 8.4, στην περιοχή της Soret ταινίας. Η δεύτερη παράγωγος αναλύει τη σύνθεση της Soret ταινίας και δίνει τα λ_{\max} αυτών. Και για τα τρία ένζυμα παρατηρούμε μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας σε μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω μετατόπισης προς αυτή την κατεύθυνση της Soret ταινίας της αίμης του διπυρηνικού κέντρου, η οποία συμβαίνει και στα δύο pH που εξετάστηκαν. Για το CcO-CN σύμπλοκο σε pH 7.4 παρατηρούμε ότι η δέσμευση του CN προκαλεί μείωση της έντασης στα 415 nm και αύξηση της έντασης στα 428 nm. Αυτό σημαίνει ότι το λ_{\max} της αίμης a_3 μετατοπίζεται από τα 415 στα 428 nm, κατά τη δέσμευση του κυανίου. Πέραν αυτών των αλλαγών στα απόλυτα φάσματα, παρατηρούμε στο φάσμα διαφοράς του CcO-CN συμπλόκου μείον το φάσμα της πλήρως οξειδωμένης CcO (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται), μία ευρεία και ασθενή αρνητική ταινία στην περιοχή από τα 620 έως τα 680 nm. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ταινία στα 655 nm της CcO «χάνεται» κατά τη δέσμευση. Η ταινία στα 655 nm, η οποία υπάρχει όταν το ένζυμο είναι στην οξειδωμένη, ελεύθερη μορφή, έχει προταθεί ότι οφείλεται στην υψηλού spin διαμόρφωση της αίμης a_3 και επομένως η απώλειά της σημαίνει τη μετάβαση της αίμης a_3 στην κατάσταση χαμηλού spin [27]. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες MCD μελέτες της δέσμευσης του κυανίου στην CcO [15]. Για το CcO-CN σύμπλοκο σε pH 8.4 η δεύτερη παράγωγος του οπτικού φάσματος εμφανίζει δύο επιπλέον λ_{\max} , στα 444 nm και τα 451 nm. Οι κορυφές στα 415 και 428 nm προκύπτουν από τις οξειδωμένες αίμες a_3^{3+} και a^{3+} , αντίστοιχα. Στην ανηγμένη μορφή και οι δύο αίμες παρουσιάζουν λ_{\max} στα 444 nm [28]. Όπως θα συζητηθεί παρακάτω, κατά την ερμηνεία του αντίστοιχου FTIR φασμάτος του CcO-CN, η αίμη a_3 δεν πρέπει να έχει αναχθεί. Η κορυφή στα 451 nm δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα. Έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει μία δεύτερη διαμόρφωση της ανηγμένης αίμης a [28]. Δέσμευση του κυανίου στο κυτόχρωμα aa_3-600 δεν προκαλεί μερική αναγωγή του ενζύμου σε pH 7.4 ή pH 8.4. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή παρατηρείται μετατόπιση της Soret ταινίας της αίμης a_3 από τα 413 nm στα 428 nm. Προσθήκη κυανίου στο πλήρως οξειδωμένο κυτόχρωμα bo_3 έχει ως

αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας της αίμης o_3 απ' τα 403 nm στα 415 nm.

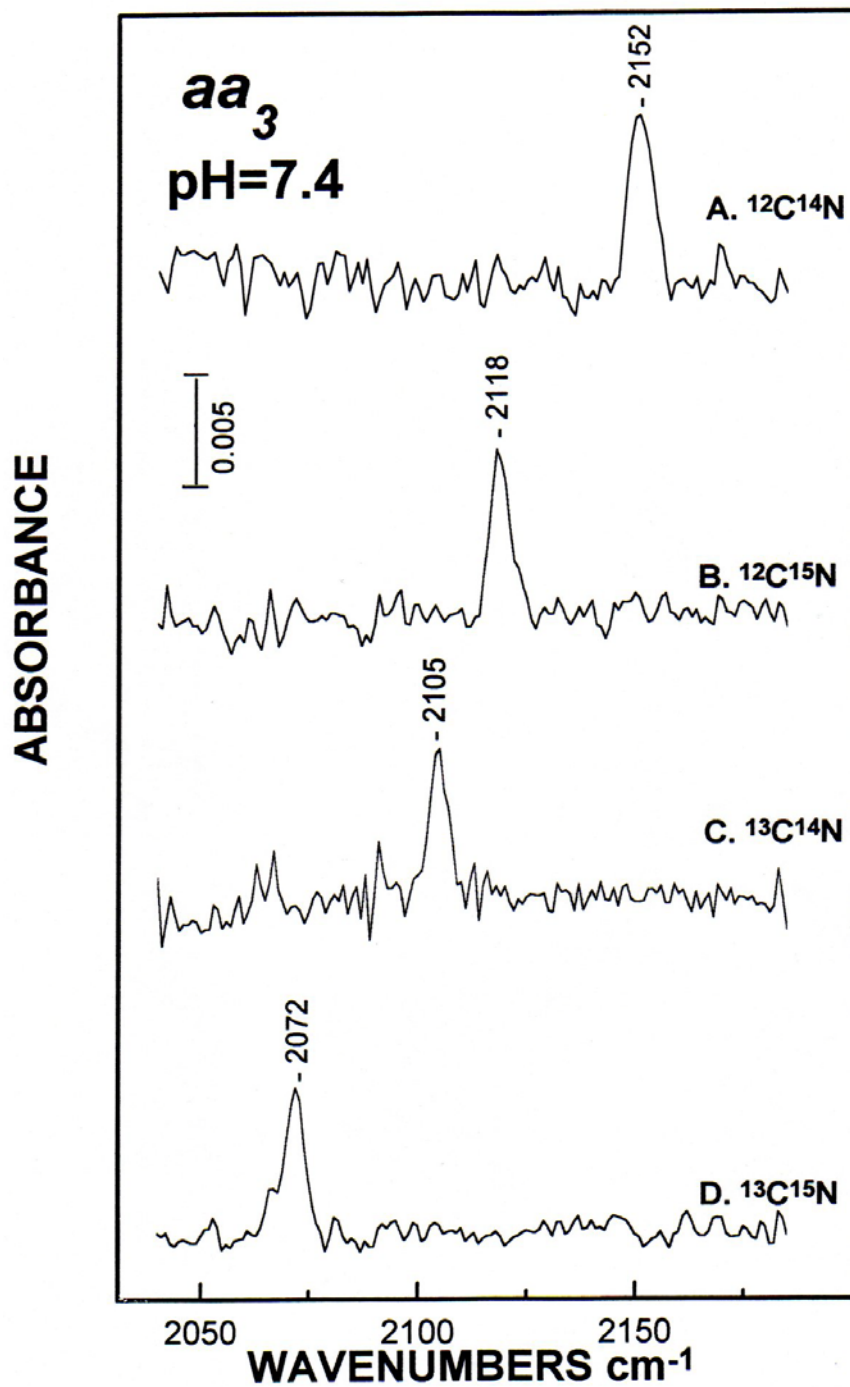


Σχήμα 4.1. Η δεύτερη παράγωγος στην περιοχή του Soret των UV-Vis φασμάτων A) CcO-CN pH 7.4 B) CcO-CN pH 8.4 C) aa_3 -600-CN pH 7.4 D) aa_3 -600-CN pH 8.4 E) bo_3 -CN pH 7.4

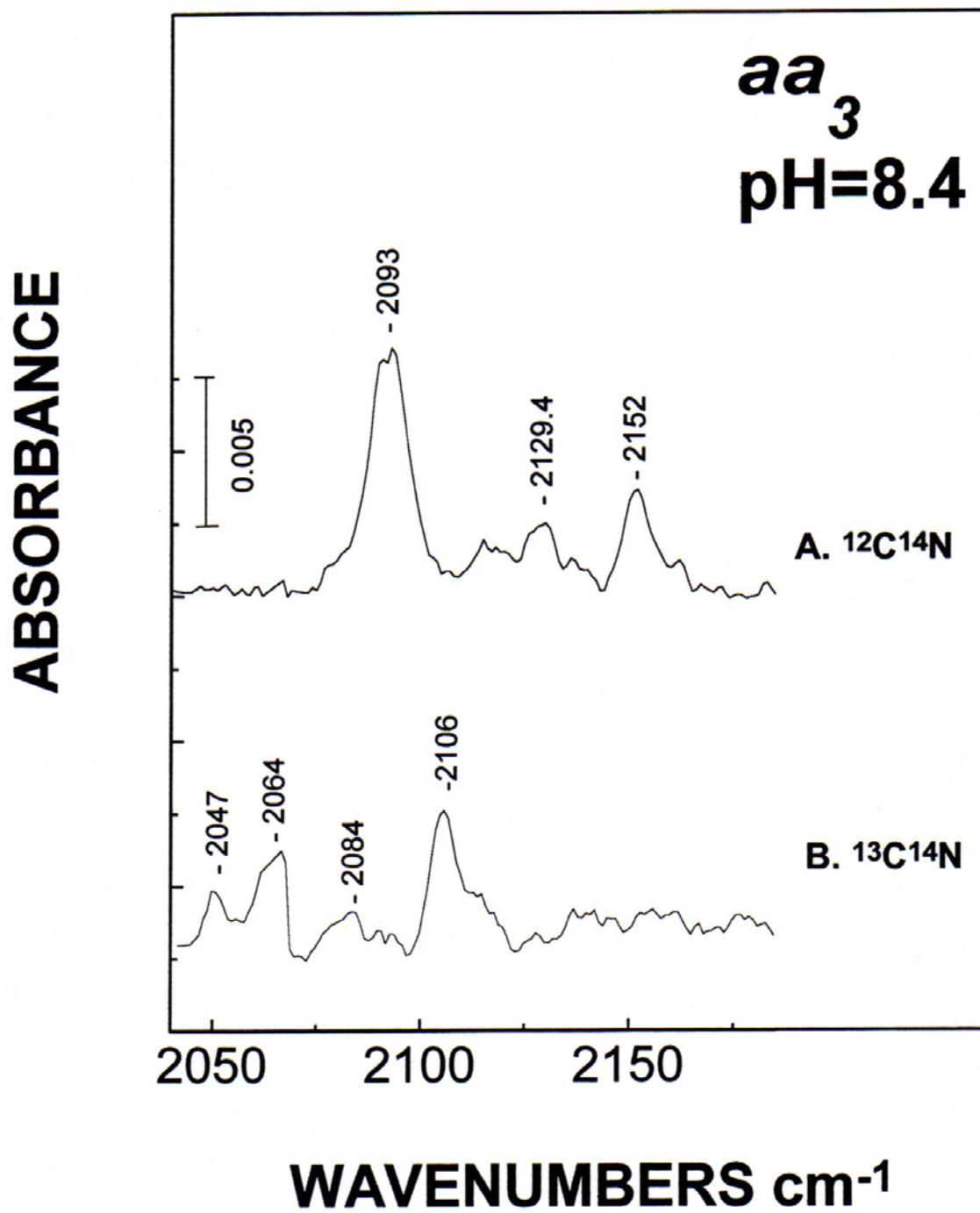
Στο σχ 4.2 φαίνονται τα FTIR φάσματα του κυανίου με την CcO σε pH 7.4. Το φάσμα του CcO- $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ συμπλόκου εμφανίζει μία δόνηση στους 2152 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζει ισοτοπική ευαισθησία και μετατοπίζεται αντίστοιχα στους 2118 cm^{-1} , 2105 Πίνακας I).

Επιπλέον δονήσεις παρατηρούνται στα FTIR φάσματα του CN με τη CcO σε pH 8.4 (σχ. 4.3). Το φάσμα του CcO- $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ συμπλόκου παρουσιάζει τρεις δονήσεις στους 2152 cm^{-1} , 2129 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} . Με την ισοτοπική αντικατάσταση $\text{K}^{12}\text{C}^{14}/\text{K}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$, η 2152 cm^{-1} δόνηση μετατοπίζεται στη 2106 cm^{-1} , η 2129 cm^{-1} στη 2084 cm^{-1} και η 2093 στις $2065\text{ cm}^{-1}/2050\text{ cm}^{-1}$. Οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις συμφωνούν με το μοντέλο του αρμονικού ταλατωντή. Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην παράγραφο «πειραματική διαδικασία» αυτού του κεφαλαίου, οι $2093\text{ cm}^{-1}/2065\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις οφείλονται στο υδροκυάνιο [2]. Σύμφωνα, όμως, με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή η επιπλέον δόνηση που παρατηρείται στους 2050 cm^{-1} προέρχεται από την 2093 cm^{-1} (Πίνακας I) και επομένως οι $2093\text{ cm}^{-1}/2050\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται σε δέσμευση του κυανίου στο ένζυμο.

Η 2152 cm^{-1} δόνηση παρατηρείται τόσο στο pH 7.4, όπου το ένζυμο είναι στην πλήρως οξειδωμένη μορφή, όσο και στο pH 8.4, όπου έχει συμβεί μερική αναγωγή του ενζύμου. Επομένως, η δόνηση αυτή δηλώνει την παρουσία ενός πλήρως οξειδωμένου συμπλόκου CcO-CN. Επιπλέον, οι παρατηρούμενες μεταβολές στα οπτικά φάσματα προτείνουν δέσμευση του κυανίου στην αίμη α_3^{3+} . Αν και με τα παρόντα πειραματικά αποτελέσματά μας, δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε χωρίς αμφιβολία τη φύση της 2152 cm^{-1} δόνησης, προτείνουμε ότι αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε ένα τελικό σύμπλοκο της μορφής α_3^{3+} -CN είτε σε ένα σύμπλοκο γέφυρας της μορφής αίμη α_3 -CN -Cu_B. Προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι το CN συναρμόζεται στο κεντρικό μέταλλο της αίμης κατά προτίμηση μέσω του άνθρακα, ενώ δρα ως σ-δότης μειώνοντας την ηλεκτρονική πυκνότητα στο σ^* υψηλότερα κατεληγμένο τροχιακό του. Επομένως, $\nu(\text{CN})$ των αντίστοιχων CN-συμπλόκων αναμένεται να είναι υψηλότερη



Σχήμα 4.2 Τα FTIR φάσματα των συμπλόκων (A) $\text{CcO-}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$, (B) $\text{CcO-}^{12}\text{C}^{15}\text{N}$, (C) $\text{CcO-}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$, και (D) $\text{CcO-}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$, σε pH 7.4



Σχήμα 4.3 Τα FTIR φάσματα των συμπλόκων (A) CcO-¹²C¹⁴N B) CcO-¹³C¹⁴N σε pH 8.4

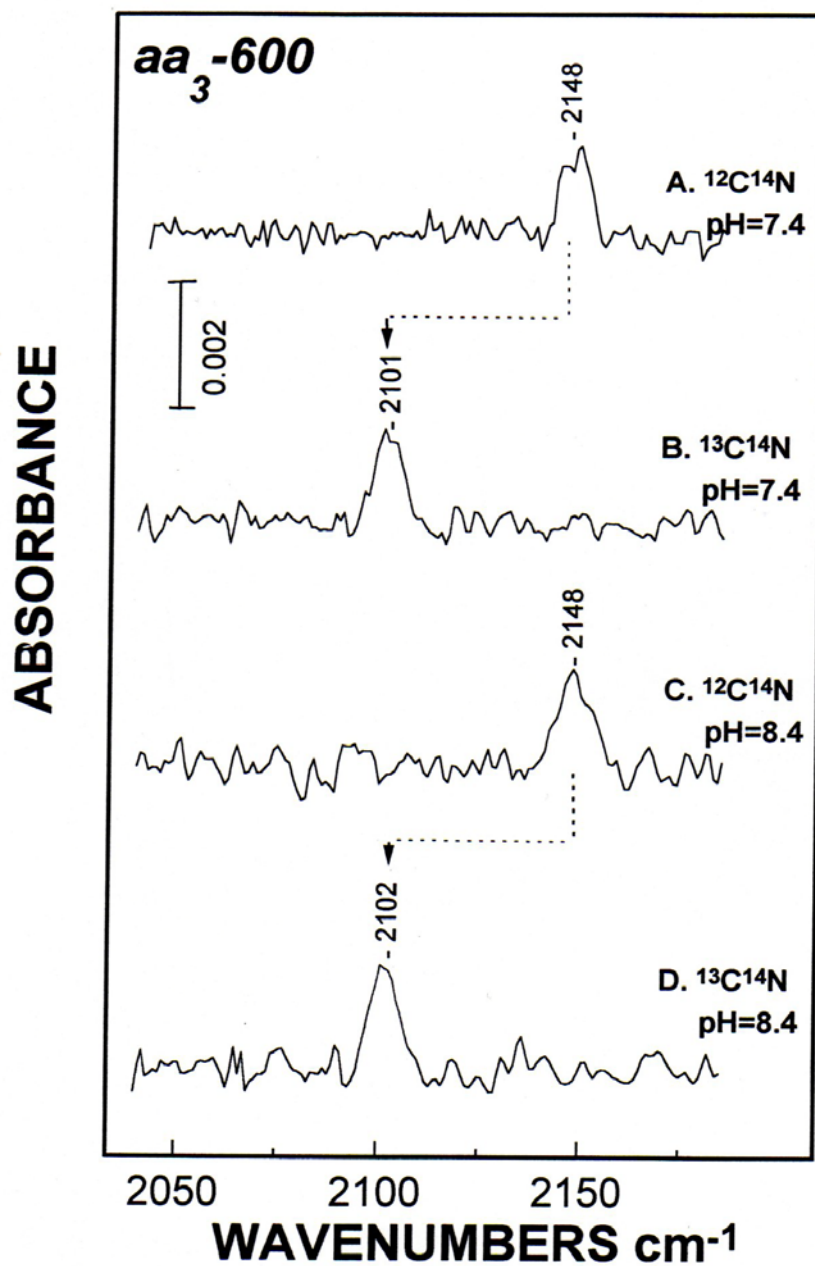
ΠΙΝΑΚΑΣ Ι : Οι συγγόμενες (cm^{-1}) και των εύρος των $\nu(\text{CN})$ δονήσεων $\text{C}\alpha\text{O}-\text{CN}$, $\alpha\alpha_3-600-\text{CN}$ και $\text{C}\alpha_3-\text{CN}$ συμπλόκων σε pH 7.4 και 8.4. Οι αναμενόμενες δονήσεις βάζει του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή αναφέρονται μέσα στις παρενθέσεις

	κυτοχρωμική οξειδάση (CcO)					
	pH 7.4	pH 8.4	pH 7.4	pH 8.4	pH 7.4	pH 8.4
$\nu(^{12}\text{C}^{14}\text{N})$	2152	2129	2148	2148	2146	2146
$\Delta\nu_{1/2}$	6.9	6.7	8.5	8.5	7.4	7.4
$\nu(^{12}\text{C}^{15}\text{N})$	2118 (2118.6)					
$\Delta\nu_{1/2}$	5.4					
$\nu(^{13}\text{C}^{14}\text{N})$	2105 (2107)	2106 (2107)	2101 (2103)	2101 (2103)	2101 (2103)	2101 (2101)
$\Delta\nu_{1/2}$	5.5	6.7	8	8	8	9.2
$\nu(^{13}\text{C}^{15}\text{N})$	2072 (2073)					
$\Delta\nu_{1/2}$	5.5					

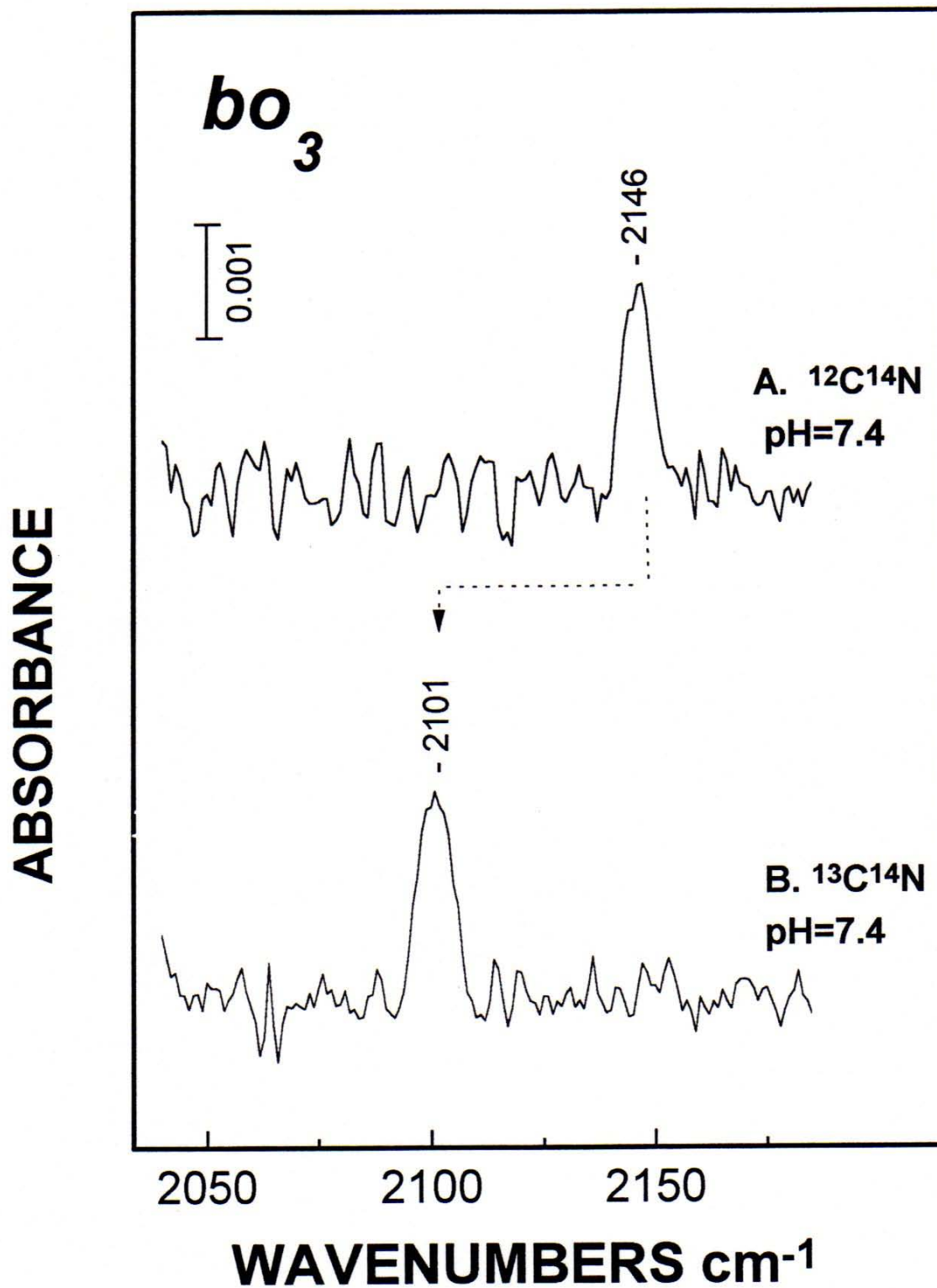
απ' τη $\nu(\text{CN})=2078\text{cm}^{-1}$ του ελεύθερου ιόντος κυανίου. Στην περίπτωση που το CN μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα γέφυρας, αναμένεται μία περαιτέρω αύξηση της συχνότητας της $\nu(\text{CN})$ δόνησης: η δημιουργία ενός επιπλέον σ -δοτικού δεσμού στο N άτομο του κυανίου θα έχει ως αποτέλεσμα την παραπέρα μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του σ^* τροχιακού. Η συχνότητα της 2152cm^{-1} δόνησης για το CcO-CN σύμπλοκο είναι $30\text{-}24\text{cm}^{-1}$ υψηλότερη απ' τις $\nu(\text{CN})$ συχνότητες των τελικής γεωμετρίας CN- συμπλόκων της Hb και Mb συμπλόκων [2] και βάσει των παραπάνω επιχειρημάτων θεωρούμε πιθανότερο να προέρχεται από ένα σύμπλοκο γέφυρας της μορφής $\text{Fe}_{\text{a}_3}^{3+}\text{-CN-Cu}_{\text{B}}^{2+}$.

Οι 2129cm^{-1} και 2093cm^{-1} δονήσεις παρατηρούνται μόνο στο pH 8.4, όπου μέρος της CcO έχει υποστεί μερική αναγωγή. Η δεύτερη παράγωγος του UV-Vis φάσματος του CcO-CN δείγματος (σχ. 4.1) δείχνει ότι μέρος της αίμης α έχει αναχθεί (444nm , 451nm). Επιπλέον, το αντίστοιχο UV-Vis φάσμα δεν εμφανίζει τη χαρακτηριστική ταινία στα 655nm , γεγονός που προτείνει ότι αίμη η α_3 είναι στην κατάσταση χαμηλού σπιν. Είναι γνωστό ότι η αίμη α_3 ανάγεται δυσκολότερα και πάντα τελευταία κατά την πλήρη αναγωγή του ενζύμου, ενώ μερική αναγωγή της CcO, έστω και με ένα ισοδύναμο αναγωγικού αντιδραστηρίου οδηγεί στην αναγωγή του Cu_{B} , η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της spin σύζευξης στο διπυρηνικό κέντρο. Οι παρατηρήσεις αυτές προτείνουν ότι: 1) η δέσμευση του CN στις 2129cm^{-1} και 2093cm^{-1} γεωμετρίες προϋποθέτει την αναγωγή του Cu_{B} και 2) σ' αυτές τις δομές η αίμη α_3 έχει χαμηλού σπιν διαμόρφωση και βρίσκεται στην $3+$ οξειδωτική κατάσταση. Επιπλέον, φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης του CN σε σιδηροπορφυρινικές (Fe^{3+}) ενώσεις δείχνουν ότι οι συχνότητες των $\nu(\text{CN})$ δονήσεων: 1) μειώνονται με αύξηση της βασικότητας του ligand στη θέση trans 2) εξαρτώνται από τις στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές παρεμποδίσεις στην εγγύς περιοχή και από τη γωνία του δεσμού Fe-C-N [5,6]. Έτσι, προτείνεται ότι οι 2129cm^{-1} και 2093cm^{-1} δονήσεις περιγράφουν δύο διαφορετικά σύμπλοκα της μορφής $\alpha_3^{3+}\text{-CN}$. Η διαφοροποίηση των δύο $\text{Fe}_{\text{a}_3}^{3+}\text{-CN-Cu}_{\text{B}}^{1+}$ δομών μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή της βασικότητας της proximal ιστιδίνης ή/και σε αλλαγή της διαμόρφωσης της εγγύς περιοχής.

Στο σχήμα 4.4 παρουσιάζονται τα FTIR αποτελέσματα για την α_{3-600} οξειδάση. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχουν διαφορές για τα δύο pH που εξετάστηκαν.



Σχήμα 4.4 Τα FTIR φάσματα των συμπλόκων A) $\alpha_3-600-^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ και B) $\alpha_3-600-^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ σε pH 7.4 και C) $\alpha_3-600-^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ και D) $\alpha_3-600-^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ σε pH 8.4.



Σχήμα 8.9 Τα FTIR φάσματα των A) bo_3 - $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ και B) bo_3 - $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ σε pH 7.4.

Τα φάσματα εμφανίζουν μία δόνηση στους 2148 cm^{-1} για το $^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ -σύμπλοκο, η οποία μετατοπίζεται στους 2101 cm^{-1} με την ισοτοπική αντικατάσταση $\text{K}^{12}\text{C}^{14}\text{N}/\text{K}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$.

Ανάλογα αποτελέσματα λαμβάνονται και για το κυτόχρωμα bo_3 (σχ 4.5). Προσθήκη κυανίου στο πλήρως οξειδωμένο ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας δόνησης στους 2146 cm^{-1} , η οποία μετατοπίζεται στους 2101 cm^{-1} , κατά την αντίδραση του ενζύμου με το $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$. Οι συχνότητες των $\nu(\text{CN})$ στους 2148 cm^{-1} και 2146 cm^{-1} για τα CN-σύμπλοκα των aa_3-600 και bo_3 , αντίστοιχα είναι παραπλήσιες της $\nu(\text{CN})=2152 \text{ cm}^{-1}$ για το CcO-CN σύμπλοκο και κατά αναλογία αποδίδονται στη δόνηση τάσης του κυανίου του συμπλόκου γέφυρας $\text{Fe}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$ στο διπυρηνικό κέντρο.

Συνοπτικά, η παρούσα εργασία προτείνει ότι το κυάνιο σχηματίζει σύμπλοκα γέφυρας στο πλήρως οξειδωμένο διπυρηνικό κέντρο της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων (CcO), του κυτοχρώματος bo_3 και του κυτοχρώματος aa_3-600 . Επίσης, φαίνεται ότι σε pH 8.4, προσθήκη του κυανίου στην CcO προκαλεί -άγνωστο πώς- την αναγωγή της αίμης a και του Cu_B , και προτείνεται ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες το κυάνιο δεσμεύεται ως τελικό ligand στο $\text{Fe}_{a_3}^{3+}$ σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις.

Αναφορές

1. Varotsis, C.; Zhang, Y.; Appelman, E. H.; Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 237-241.
2. Yoshikawa, S.; O' Keeffe, D. H.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3518-3528.
3. Lopez-Garriga, J. J.; Oertling, W. A.; Kean, R. T.; Hoogland, H.; Wever, R.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9387-9395.
4. Hirota, S.; Ogura T.; Shinzawa-Itoth, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15274-15279.
5. Tanaka, T.; Yu, N.-T.; Chang, C. K.; *Biophys. J.* **1987**, *52*, 801-805.
6. Uno, T.; Hatano, K.; Nishimura, Y.; Arata, Y. *Iron. Chem.* **1988**, *27*, 3215-3219.
7. Thomson, A. J.; Johnson, M. K.; Greenwood, C.; Gooding, P. E. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 687-697
8. Thomson, A. J.; Eglinton, D. G.; Hill, B. C.; Greenwood, C. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 167-170.
9. Johnson, M. K.; Eglinton, D. G.; Gooding, P. E.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 699-708.
10. Kent, T. A.; Munck, E.; Dunham, W. R.; Filter, W. F.; Findling, K. C.; Yoshida, J.; Fee, J. A. *J. Biol. Chem* **1982**, *257*, 12489-12492.
11. Tweedle, N. F.; Wilson, L. J.; Carcia-Iniguez, L.; Babcock, G. T.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8065-8071.

12. Cheesman, M. R.; Watmough, N. J.; Gennis, R. B.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 595-602.
13. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, S.; Sato-Watanabe, M.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4017-4022.
14. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Anraku, Y.; Hori, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6065-6072.
15. Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Gadsby, P. M. A.; Peterson, J.; Eglinton, D. F.; Hill, B. C.; Nicholls, P. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *23*, 187-197.
16. Lee, S. C.; Scott, M. J.; Kauffmann, K.; Munck, K.; Holm, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 401-402.
17. Scott, M. J.; Holm, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11357-11367.
18. Garder, M. T.; Deinum, G.; Kim, Y.; Babcock, G. T.; Scott, M. J.; Holm, R. D. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6878-6884.
19. Scott, M. J.; Lee, S. C.; Holm, R. H. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651-4662.
20. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7945-7958.
21. Yoshikawa, S.; Mochizuki, M.; Zhao, X.-J.; Caughey, S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4270-4279.
22. Caughey, W. S.; Dong, A.; Sampath. V.; Yoshikawa, S.; Zhao, X.- Z. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 81-91.
23. Li, W.; Paimer, G. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 1833-1843.
24. Tsubaki, M. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 164-173.
25. Lauraeus, M.; Haltia, T.; Saraste, M.; Wikstrom, M. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 699-705.
26. Puustinen, A.; Wikstrom, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 6122-6129.
27. Mitchell, R.; Mitchell, P.; Rich, P. R. *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 321-324.
28. Sherman, D.; Kotake, S.; Inhibe, N.; Copeland, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **1991**, *88*, 4265-4269.

Κεφάλαιο 5

Προτεινόμενα πειράματα

Τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η δέσμευση υπακαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο αίμης (Fe)-Cu_B επιφέρει αλλαγές τόσο στη σφαίρα συναρμογής αυτών των μεταλλικών κέντρων όσο και την οξειδωτική κατάσταση αυτών και πιθανόν οι αλλαγές αυτές να σχετίζονται με το μηχανισμό άντλησης των πρωτονίων. Παράλληλα υπάρχουν προηγούμενες μελέτες οι οποίες προτείνουν ότι οι μεταβολές στην οξειδωτική κατάσταση ή τη συναρμογή των μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου μπορεί να σχετίζονται με αλλαγές στη διαμόρφωση συγκεκριμένων περιοχών της πρωτεΐνης ή/και με φαινόμενα πρωτονίωση-αποπρωτονίωσης (βλ. παρακάτω).

Οι Lubben et al [1] και Hellwig et al [2] παρατήρησαν μετατόπιση σε μικρότερες συχνότητες της δόνησης του καρβοξυλικού >C=O κατά την αναγωγή των κυτοχρωμάτων *bo*₃ από το *E. coli*, και *aa*₃ από το *P. denitrificans* και *R. sphaeroides* και προτείνουν ότι η μεταβολή αυτή μπορεί να οφείλεται σε αλλαγή του προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας ενός πρωτονιομένου ασπαρτικού ή γλουταμινικού αμινοξέος ή σε φαινόμενα πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης καρβοξυλικών αμινοξέων.

Οι Ruustinen et. al [3] παρατήρησαν παρόμοιες μετατοπίσεις της >C=O δόνησης κατά τη φωτόλυση του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος *bo*₃-CO σε χαμηλή θερμοκρασία, ενώ διαφορετικές μετατοπίσεις παρατηρούνται κατά τη φωτόλυση του Glu286Asp μεταλλαγμένου κυτοχρώματος *bo*₃-CO. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προτάθηκε ότι η αλλαγή στη συχνότητα της >C=O δόνησης οφείλεται σε αλλαγή της διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας του Glu286 που πιθανόν να προκαλείται με την αλλαγή της συναρμολόγησης στο Cu_B [3].

Οι παραπάνω μελέτες δείχνουν ότι συγχρόνως υπάρχουν και αλλαγές στις συχνότητες δονήσεων του αμίδιου I και II, οι οποίες μάλλον προκύπτουν από τοπικές αλλαγές.

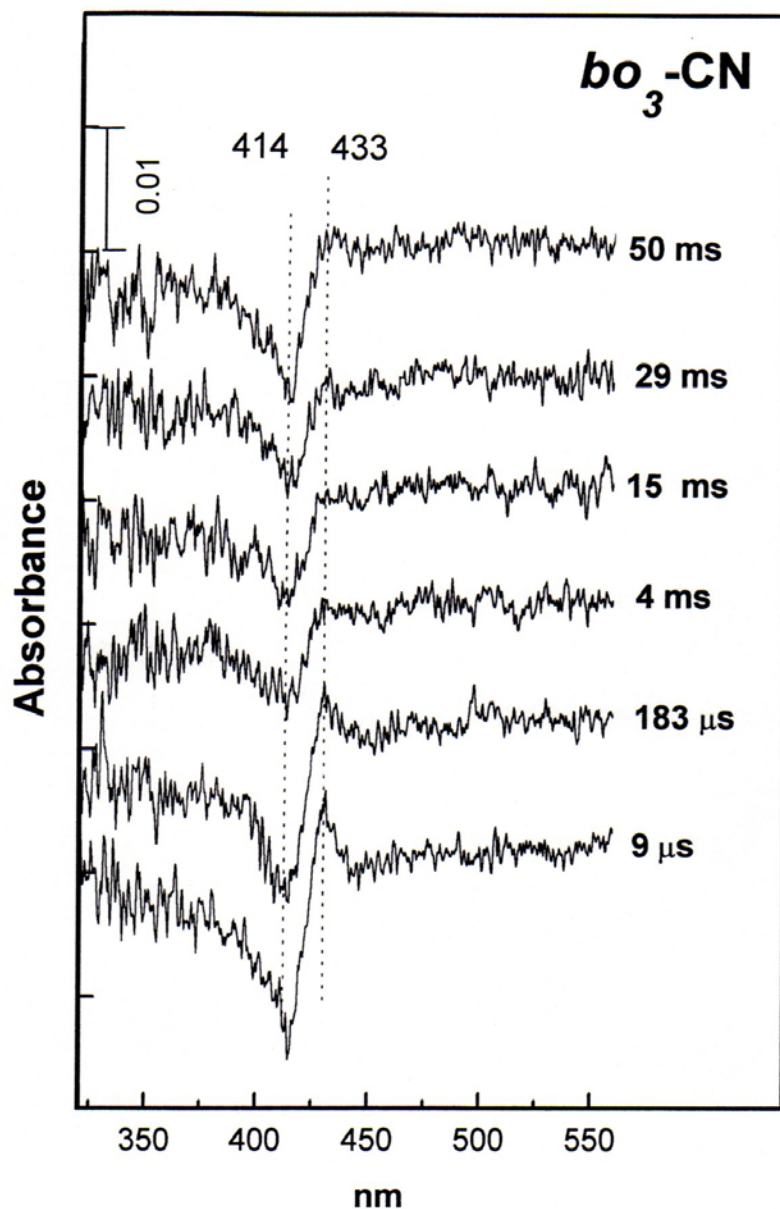
Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, προτείνεται η παραπέρα μελέτη της δομής και δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου των αναπνευστικών αιμαχολκο-οξειδασών μελετώντας την αλληλεπίδραση κυανίου και μονοξειδίου του άνθρακα με την κυτοχρωμική *c* οξειδάση από το *P. denitrificans* και την κινολική οξειδάση *bo*₃ από το *E. coli*. Τόσο το CO όσο και το CN έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την μελέτη των

κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών και πολλών άλλων αιμοπρωτεϊνών. Το CO έχει παρόμοια χημική δομή με το O₂ και γενικά δεσμεύεται στις ίδιες θέσεις που δεσμεύεται και O₂ στις μεταλλοπρωτεΐνες. Όσον αφορά τις κυτοχρωμικές και τις κινολικές οξειδάσεις, το CO δεσμεύεται στο Fe_{a3} ή Fe_{o3} μόνο όταν το διπυρηνικό κέντρο έχει αναχθεί. Επιπλέον, η συχνότητα και το εύρος της κορυφής της δόνησης του C-O εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τρόπο της δέσμευσης και το περιβάλλον γύρω από τη θέση της δέσμευσης. Έτσι, οι παράμετροι των κορυφών που χαρακτηρίζουν δέσμευση του CO μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή των θέσεων δέσμευσης. Το CN όπως και το CO είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αναπνοής. Το CN μπορεί να δεσμεύεται σε πολλά διαφορετικά μεταλλικά ιόντα και σε πολλές διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις. Τόσο το CO όσο και το CN μπορούν να αποδεσμευτούν από σύμπλοκά τους με φωτόλυση. Έχει αποδειχθεί ότι κατά τη φωτόλυση του συμπλόκου Fe_{a3}-CO Fe_{o3}-CO το CO δεσμεύεται στο Cu_B [3,4]. Αυτή η ιδιότητα τους τα κάνει ιδιαίτερα χρήσιμα για τη μελέτη της δομής της θέσης δέσμευσης.

Προτείνεται να πραγματοποιηθούν αρχικά πειράματα τιτλοδότησης κυανίου στην πλήρως οξειδωμένη, μικτού σθένους και πλήρως ανηγμένη κυτοχρωμική *c* οξειδάση και κινολική οξειδάση *bo3*, σε διαφορετικά pH. Οι αλλαγές στα οπτικά φάσματα λόγω της σταδιακής προσθήκης του κυανίου θα δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δέσμευση του κυανίου, όπως τον αριθμό των ενδιάμεσων φάσεων δέσμευσης, τη σταθερά τους διάστασής τους, και την εξάρτηση της δέσμευσης από το pH.

Τα παραπάνω πειράματα θα αποτελέσουν τη βάση για τα FTIR πειράματα για τον προσδιορισμό της γεωμετρίας δέσμευσης του CN και του CO στις διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις του ενζύμου και τα διαφορετικά pH και pD.

Παράλληλα πρέπει να μελετηθεί με φασματοσκοπία υπερύθρου η φωτόλυση σε χαμηλές θερμοκρασίες των παραπάνω συμπλόκων, με ιδιαίτερη έμφαση στις αλλαγές που προκύπτουν στη δευτεροταγή δομή. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μέτρηση των διαφορών της απορρόφησης μεταξύ του «σταθεροποιημένου» προϊόντος της φωτόλυσης και του αρχικού συμπλόκου του κυτοχρώματος *bo3* και του *cyt aa3* με το CN ή το CO. Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και τα φάσματα διαφοράς μπορούν να δώσουν ακριβείς πληροφορίες όσον αφορά τον προσανατολισμό στο χώρο των πλευρικών



Σχήμα 5.1 Οπτικά φάσματα διαφοράς μετά τη φωτόλυση του $bo_3\text{-CN}$.

Ο προσδιορισμός των δομικών επαναδιευθετήσεων κατά την πορεία της επανασύνδεσης των υποκαταστατών, μπορεί να γίνει με χρονοεξαρτώμενη FTIR φασματοσκοπία. Η μέθοδος αυτή δίνει τη δυνατότητα να παρατηρηθούν δομικές αλλαγές στη χρονική κλίμακα των ns. Από τα φάσματα διαφοράς του προϊόντος της φωτόλυσης μείον του αρχικού συμπλόκου σε χρόνους ns-ms μετά τη φωτόλυση μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες για τις μεταβολές στη διαμόρφωση συγκεκριμένων δεσμών και

ομάδων που συμβαίνουν κατά την επανσύνδεση του υποκαταστάτη στο διπυρηνικό κέντρο.

Αναφορές

1. Lubben, M., Gerwert, *FEBS Lett*, 1996, **397**, 303-307
2. Hewllig, P., Rost, B. Kaiser, U., Ostermeier, C., Michel, H., Mantele. *FEBS Lett*, 1996, **385**, 53-57
3. Pustinen, A., Baily, J., Dyer, R.B., Mecklenburg, S.L., Wikstrom, M., Woodruff, W.H. *Biochemistry* 1997, **36**, 13195-13200
4. Alben, J.O., Moh, P.P., Fiamingo, F., Altschuld, R.A., *Proc. Natl. Acad.Sci U.S.A.* 1991, **78**, 234-237