

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΕΣΜΟΥ O–O ΣΤΗΝ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ C ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ
DENSITY FUNCTIONAL THEORY ΚΑΙ ΣΚΕΔΑΣΗ
RESONANCE RAMAN**

ΔΑΣΚΑΛΑΚΗΣ ΒΑΓΓΕΛΗΣ

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2003**

Περίληψη

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει, αρχικά, μια βιβλιογραφική αναφορά - αναδρομή στις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες της κυτοχρωμικής c οξειδάσης καθώς και άλλων ένζυμων – αντιπροσώπων της οικογένειας των τελικών οξειδασών. Οι τελικές οξειδάσες ή αίμο/χάλκο τελικές οξειδάσες (κυτοχρωμικές και κινολικές) ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε H₂O κατά τέσσερα ηλεκτρόνια, απομακρύνοντας με αυτόν τον τρόπο ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων και τη μετατροπή ελεύθερης ενέργειας. Οι τελικές οξειδάσες λειτουργούν, επιπλέον, ως οξειδοαναγωγικές αντλίες πρωτονίων, συνεισφέροντας σημαντικά και άμεσα στην διαμεμβρανική διαβάθμιση ελεύθερης ενέργειας, απαραίτητης για την παραγωγή ATP.

Μετά τη θεωρητική ανάπτυξη μεθόδων υπολογισμών που εφαρμόζονται στα βιολογικά μόρια και μια παρουσίαση των απλοποιημένων μοντέλων – ανάλογων του ενεργού κέντρου ένζυμων που χρησιμοποιούνται, συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα θεωρητικών υπολογισμών για τμήματα του ενεργού κέντρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης και συγκεκριμένα του μεταλλικού κέντρου Cu_B με τους υποκαταστάτες και το *cross-link* σύστημα ιστιδίνης-τυροσίνης. Μεταβάλλοντας τη δομή της τυροσίνης, μελετάμε την επίδραση στην ηλεκτρονιακή κατάσταση του χαλκού Cu_B και αναζητούμε τη σύνδεση δομής-ηλεκτρονιακής κατάστασης του Cu_B και αναγωγής του μοριακού οξυγόνου κατά το τρίτο ηλεκτρόνιο.

Τέλος, προτείνουμε περαιτέρω θεωρητικούς υπολογισμούς και πειράματα *Resonance Raman* για την διασαφήνιση του μηχανισμού της σχάσης του δεσμού O–O του μοριακού οξυγόνου.

Abstract

The present work includes, at first, a bibliographic report - retrospection on the structural and functional properties of cytochrome c oxidase as well as other enzymes – representatives of the family of terminal oxidases. Terminal oxidases or heme/copper terminal oxidases (cytochromic and cynolic) reduce molecular oxygen to H₂O by four electrons, removing by this way low energy electrons from the respiratory chain, and as a result facilitate the continuous transport of electrons and the transformation of free energy. Final oxidases function, moreover, as redox pumps of pro-

tons, contributing considerably and directly in the transmembrane gradation of free energy, essential for the production of ATP.

After a brief presentation of theoretical methods for calculations that apply to biological molecules and of a group of simplified models of the enzyme's active site used, the results of such theoretical calculations are discussed. Our goal is to study parts of the active site of cytochrome c oxidase and especially the Cu_B metal site with its ligands and the cross-link system histidine-tyrosine. Changing the tyrosine structure, we study the effect on the electronic state of copper CuB and seek the connection between the electronic/ structural state of Cu and the reduction of molecular oxygen at the third electron level.

Finally, we propose more theoretical calculations and experiments based on Resonance Raman for the clarification of the mechanism of O–O bond cleavage in the molecular oxygen.

Keywords:

Cytochrome C Oxidase, CcO, DFT, Density Functional Theory, Resonance Raman, theoretical study, cross-link system

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΑΝΑΠΝΟΗ ΚΑΙ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΕΣ C ΟΞΕΙΔΑΣΕΣ	3
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1.1 Από τους αναερόβιους οργανισμούς στην αερόβια αναπνοή	3
1.1.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση	4
1.2 ΑΑ ₃ ΚΑΙ CBB ₃ ΤΥΠΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΕΣ C ΟΞΕΙΔΑΣΕΣ: ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	6
1.2.1 Οι κυτοχρωμικές c οξειδάσες aa ₃	6
1.2.2 Κυτοχρωμική c οξειδάση τύπου cbb ₃ : χαρακτηριστικά και διαφοροποιήσεις από τις aa ₃	8
1.3 ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ C ΟΞΕΙΔΑΣΗ: ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΣΤΟΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟ ΚΥΚΛΟ	10
<i>Το ενδιάμεσο 607-nm και ο ρόλος της Tyr-244/Tyr-280 στον καταλυτικό κύκλο</i>	12
<i>Τοξικά, ισχυρά οξειδωτικά ενδιάμεσα στον καταλυτικό κύκλο</i>	14
<i>Σύζευξη ηλεκτρονιακής και πρωτονιακής μεταφοράς στην κυτοχρωμική c οξειδάση</i>	14
1.3.1 Φασματοσκοπικές ιδιότητες, χαρακτηριστικά και χρονική εξάρτηση ενδιαμέσων της αναγωγής του μοριακού O ₂ σε H ₂ O	15
<i>Το Ενδιάμεσο όζυ Cu_B¹⁺ Fe_{a3}³⁺-O₂⁻</i>	15
<i>Τα Ενδιάμεσα φερρόλ ή 580-nm και P ή 607-nm Cu²⁺-OH- Fe_{a3}⁴⁺=O</i>	15
<i>Το υδρόξυ ενδιάμεσο Cu_B²⁺-OH Fe_{a3}³⁺-OH</i>	17
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΧΑΛΚΟΥ-ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΤΗΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ C ΟΞΕΙΔΑΣΗ	21
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	21
2.2 Η ΜΕΘΟΔΟΣ DFT (DENSITY FUNCTIONAL THEORY) ΚΑΙ Η ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	22
2.2.1 Η κβαντική προσέγγιση της θεωρίας του συναρτησιακού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας	23
2.2.2 Η μέθοδος DFT/B3LYP	25
2.2.3 Η ακρίβεια στους υπολογισμούς των χρησιμοποιούμενων μεθόδων, εφαρμογές στα βιολογικά συστήματα	26
2.3 ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ: Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΗΝ ΚΒΑΝΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	27
<i>Τα ενδιάμεσα προϊόντα και οι μεταβατικές καταστάσεις</i>	27
<i>Οι σχετικές ενέργειες και οι ενέργειες ενεργοποίησης</i>	28
<i>Το πρωτεϊνικό περιβάλλον των μεταλλικών κέντρων στα ένζυμα</i>	29
2.4 ΜΟΝΤΕΛΑ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΚΕΝΤΡΩΝ ΣΤΟΥΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ C ΟΞΕΙΔΑΣΗ	31
<i>Το διπυρηνικό κέντρο Cu_B-Fe_{a3} στην κυτοχρωμική c οξειδάση</i>	32
2.5 ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΗΧΑΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ ΧΑΛΚΟΥ-ΣΙΔΗΡΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ C ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	33
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ – ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΟΝΗΤΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ FTIR ΚΑΙ RAMAN	39
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
3.2 Η ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ FT-IR	40
3.2.1 Το συμβολόμετρο του MICHELSON	40
3.2.2 Δονητική φασματοσκοπία, μηχανική και κβαντική προσέγγιση	41
3.3 Η ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ RAMAN	43
3.3.1 Περιγραφή του φαινομένου Raman με την κλασική μηχανική	43
3.3.2 Η Κβαντική θεώρηση του φαινομένου Raman	46
<i>Το φαινόμενο του συντονισμού Raman</i>	47
3.4 ΔΟΝΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV – ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΧΑΛΚΟΥ-ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	49
4.2 Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ	50
4.3 ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΙΚΟΥ ΚΕΝΤΡΟΥ Cu_B ΣΤΟΥΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ C ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ	51
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	52
<i>Ta ligands του Cu_B στα μοντέλα των θεωρητικών υπολογισμών</i>	<i>52</i>
<i>Το τρίτο ηλεκτρόνιο του καταλυτικού κύκλου και η κατάσταση Cu^{3+}</i>	<i>53</i>
<i>Δονήσεις της ομάδας C-O της ομοιοπολικά δεσμευμένης τυροσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου</i>	<i>55</i>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V – ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ/ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	58
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	58
5.2 RESONANCE RAMAN ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΟΞΟ- ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ BA_3 ΚΑΙ CBV_3 ΜΕ ΤΟ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2).....	59
5.3 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΧΑΛΚΟΥ-ΣΙΔΗΡΟΥ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ C ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – Αναπνοή και κυτοχρωμικές c οξειδάσες

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Από τους αναερόβιους οργανισμούς στην αερόβια αναπνοή

Η μορφή και η εξέλιξη της ζωής στον πλανήτη μας πιστεύεται ότι είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τις αλλαγές στη σύσταση της ατμόσφαιρας στα πρώτα στάδια ανάπτυξής της. Το Άζωτο (N_2), το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2), οι υδρατμοί (H_2O), όπως επίσης το μεθάνιο (CH_4) και η αμμωνία (NH_3) αποτελούσαν τα κυρίαρχα αέρια στην προ-βιολογική ατμόσφαιρα, καθιστώντας την *αναγωγική*. Η εμφάνιση της πρώ-

της μορφής ζωής χρονολογείται πριν 3.5 δισεκατομμύρια χρόνια, όπου αναερόβια ετερότροφα κύτταρα ικανοποιούσαν τις απαιτήσεις τους σε ενέργεια με οργανικά μόρια που προέρχονταν από φυσικές διαδικασίες. Η ελάττωση των πόρων αυτών οδήγησε την εξέλιξη στην αναζήτηση νέων μεθόδων παραγωγής ενέργειας, όπως την εκμετάλλευση της ηλιακής ενέργειας και του άφθονου H_2O ως δότη ηλεκτρονίων. Δύο δισεκατομμύρια χρόνια πριν, τα αυτότροφα αρχέγονα κυανοβακτήρια ανέπτυξαν πολύπλοκα συστήματα φωτοσύνθεσης με αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Καθώς τα ατμοσφαιρικά επίπεδα του O_2 (και του O_3 κατ' αναλογία), από τη φωτοξείδωση του H_2O , άρχιζαν να ανεβαίνουν, τα κυανοβακτήρια οδηγήθηκαν στην ανάπτυξη μηχανισμών/ ενζύμων αυτο-προστασίας ενάντια στο O_2 και τα παράγωγά του, σε μια κατ' επέκταση περισσότερο οξειδωτική ατμόσφαιρα. Όταν εξασφαλίστηκε η προστασία, ορισμένα από αυτά εξέλιξαν την ενζυμική άμυνά τους ακόμα περισσότερο, ώστε να χρησιμοποιούν το O_2 ως πηγή ενέργειας με τη διαδικασία που είναι γνωστή ως αναπνοή. Η εκμετάλλευση των οξειδωτικών όπως O_2 , H_2O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} ως πηγή ενέργειας έπρεπε να πραγματοποιηθεί εκτός του κυτταροπλάσματος, υποχρεώνοντας τους αρχέγονους οργανισμούς να οργανώσουν τα κύτταρά τους σε διαμερίσματα και οδηγώντας την εξέλιξη από τους προκαρυωτικούς στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Η χημεία του οξυγόνου στους ζωντανούς οργανισμούς περιλαμβάνει ενζυματικές διαδικασίες όπως τη σύνθεση πεπτιδίων, νουκλεϊκών και λιπαρών οξέων, μετατροπή σήματος, αποτοξίνωση και κυτταρική προστασία. Ωστόσο, η μεγαλύτερη ποσότητα του βιολογικού O_2 καταναλώνεται στην αναπνοή.

1.1.2 Μεταφορά ηλεκτρονίων και οξειδωτική φωσφορυλίωση

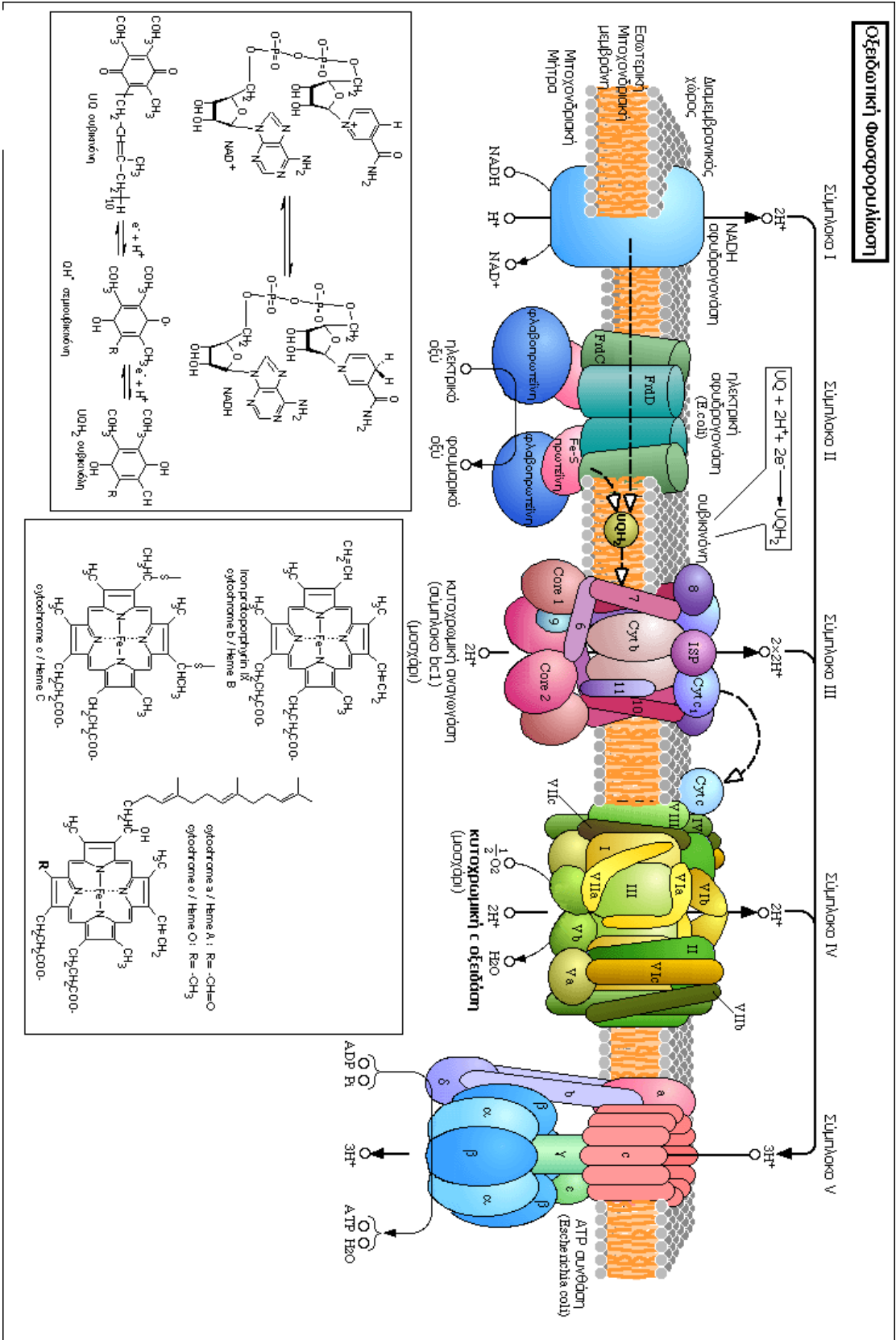
Το μόριο του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) συγκαταλέγεται μεταξύ των βιομορίων υψηλής ενέργειας παρουσιάζοντας μεγάλες αρνητικές τιμές ΔG^0 κατά την υδρόλυσή του και αποτελεί ένα βραχυπρόθεσμο μέσο αποθήκευσης – μεταφοράς της ενέργειας από το ένα ενζυμικό σύστημα στο άλλο. Το ενεργειακό νόμισμα, το ATP, είναι αυτό που παρέχει την “κινητήρια δύναμη” των δραστηριοτήτων στα κύτταρα, όπως της σύνθεσης πολύπλοκων βιομορίων, της ενεργητικής μεταφοράς ουσιών, της κυτταρικής κινητικότητας καθώς επίσης και της σύσπασης των μυών.

Το μεγαλύτερο μέρος της μεταβολικής ενέργειας από ουσίες που εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και της γλυκόλυσης αποθηκεύεται με τη μορφή του NADH και ανηγμένων φλαβονοπρωτεϊνών FADH₂. Τα αποθηκευμένα σε αυτά τα συστήματα υψηλού αρνητικού αναγωγικού δυναμικού ηλεκτρόνια διασχίζουν μια καλά οργανωμένη αλυσίδα πρωτεϊνών και συνενζύμων στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων με τελικό αποδέκτη το μόριο του O₂. Τα ένζυμα στις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι διαμεμβρανικά, καθώς έτσι η κίνηση αυτή των ηλεκτρονίων μπορεί να συζευχθεί με τη δημιουργία μιας χημειοσμωτικής πρωτονιακής διαβάθμισης Δ(pH) και μιας διαβάθμισης ηλεκτροστατικού δυναμικού ΔΨ στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων απαραίτητης για τη σύνθεση του ATP. Τα ηλεκτρόνια “κατεβαίνουν” την ενεργειακή κλίμακα μεταξύ των αναγωγικών δυναμικών των ζευγών NAD⁺/NADH (-0.33V) και O₂/H₂O (+0.82V) προς περισσότερο θετικά, δηλαδή, αναγωγικά δυναμικά.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια που φαίνεται στο **σχήμα 1** αποτελείται από τέσσερα διακριτά πρωτεϊνικά σύμπλοκα: (i) την *NADH αφυδρογονάση* που μεταφέρει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων από το NADH στο ευκίνητο υδρόφοβο συνένζυμο Q (σύνθεση περίπου 2,5 ATP ανά NADH), (ii) την *ηλεκτρική αφυδρογονάση* που οδηγεί τη ροή ηλεκτρονίων από το ηλεκτρικό οξύ στην ουβικινόνη (UQ ή συνένζυμο Q) μέσω του οξειδοαναγωγικού ζεύγους FADH₂ – FAD (σύνθεση περίπου 1,5 ATP ανά FADH₂), (iii) την *κυτοχρωμική αναγωγή* (cytochrome bc₁ complex) που μεταφέρει ηλεκτρόνια από την ουβικινόλη (UQH₂) στο ευκίνητο υδατοδιαλυτό κυτόχρωμα c και τον τελευταίο ενζυμικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων την (iv) *κυτοχρωμική c οξειδάση* της οικογένειας των τελικών οξειδάσων μέσω της οποίας μετακινούνται τα ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c στο μοριακό O₂. Συνολικά, 1.15V ανά ηλεκτρόνιο είναι διαθέσιμα για τη διεκπεραίωση των κυτταρικών διαδικασιών και υπολογίζεται ότι το κύτταρο είναι ικανό να αποθηκεύσει το 80% περίπου αυτής της ενέργειας σε μόρια ATP.

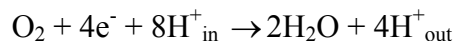
Οι τελικές οξειδάσες ή αιμο/χαλκο τελικές οξειδάσες (κυτοχρωμικές και κινολικές) ανάγουν το μοριακό O₂ σε H₂O. Απομακρύνονται με αυτόν τον τρόπο ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα την συνεχή μεταφορά ηλεκτρονίων και τη μετατροπή ελεύθερης ενέργειας. Με το μοριακό O₂, ως τελικό δέκτη των ηλεκτρονίων, η παραγωγή ελεύθερης ενέργειας είναι σημαντική, λόγω του υψηλού αναγωγικού δυναμικού του (0.815V σε pH 7). Οι τελικές οξειδάσες λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικές αντλίες πρωτονίων, συνεισφέροντας σημαντικά

Οξείδωτική Φωσφορύκωση



σχήμα 1

και άμεσα στην διαμεμβρανική διαβάθμιση ελεύθερης ενέργειας. Η στοιχειομετρία της πρωτονιακής μετατόπισης πλησιάζει το ένα πρωτόνιο ανά ηλεκτρόνιο που ανάγει το μοριακό O₂, δηλαδή τα 4H⁺ ανά μόριο O₂. Η ολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές οξειδάσες μπορεί να δοθεί ως:



Τα H⁺_{in} και H⁺_{out} συμβολίζουν τα πρωτόνια που διακινούνται κάθετα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων από τη μήτρα δια μέσου των τελικών οξειδασών. Από αυτά, τα 4H⁺ καταναλώνονται για το σχηματισμό του H₂O και 4H⁺ μεταφέρονται στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων.

Η κυτοχρωμική c οξειδάση είναι το τελικό ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας σε μιτοχόνδρια και αρκετά αερόβια βακτήρια, ενώ οι κινολικές τελικές οξειδάσες απαντώνται σε ορισμένους αρχέγονους οργανισμούς.

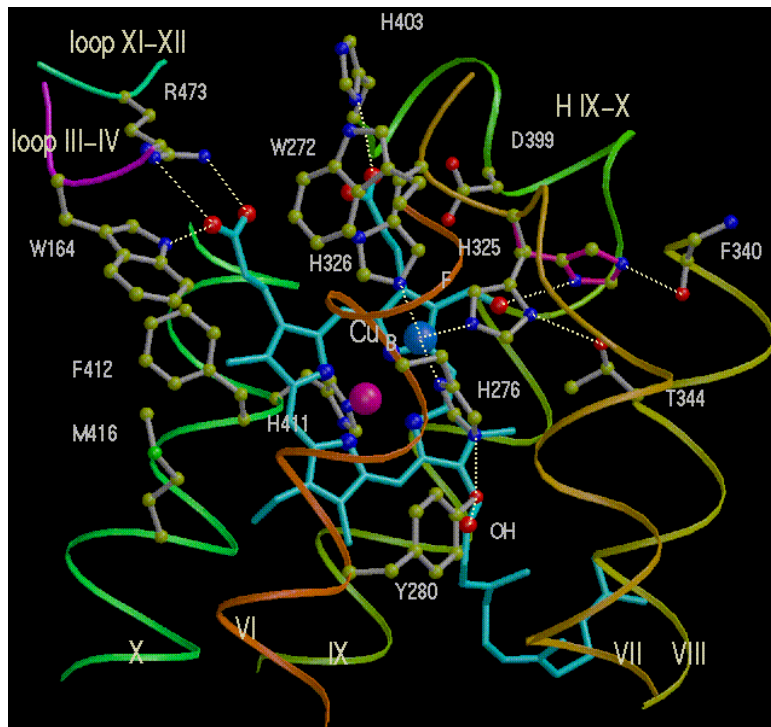
1.2 aa₃ και cbb₃ τύπου κυτοχρωμικές c οξειδάσες: Δομικά χαρακτηριστικά

1.2.1 Οι κυτοχρωμικές c οξειδάσες aa₃

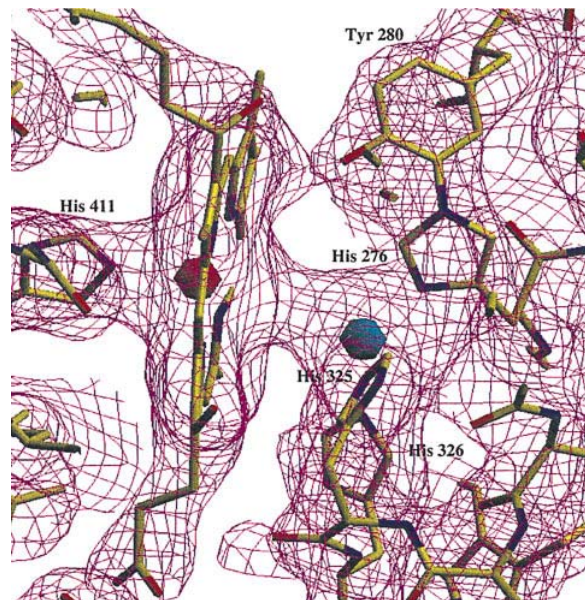
Οι κρυσταλλικές δομές της κυτοχρωμικής c οξειδάσης τύπου aa₃ από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans*^{7,8} και από μοσχαρίσια καρδιά^{9,10,11} είναι διαθέσιμες. Ο αριθμός των υπομονάδων στις κυτοχρωμικές c οξειδάσες κυμαίνεται μεταξύ 3 με 5 στα βακτήρια έως και 13 στα μιτοχόνδρια των θηλαστικών. Ωστόσο, οι υπομονάδες I και II ορισμένων τελικών οξειδασών εμφανίζουν ομοιότητα στην αμινοξεδική τους αλληλουχία και διατηρούν, ως σύμπλοκο, τη δραστηριότητα του ενζύμου (αναγωγή μοριακού O₂ και άντληση πρωτονίων)¹⁴. Έχει προταθεί ότι οι υπόλοιπες υπομονάδες συνεισφέρουν στην δομική διαμόρφωση, σταθερότητα και απομόνωση του πυρήνα των I και II¹², την προστασία από καταστροφικές ρίζες-ενδιάμεσα, τη ρύθμιση της δράσης της οξειδάσης με αλληλεπίδραση με το ATP²² και τη διαμόρφωση καναλιών μεταφοράς H⁺/e⁻. Η υπομονάδα II των τελικών οξειδασών περιέχει συνήθως τη θέση δέσμευσης – αλληλεπίδρασης με το κυτόχρωμα c¹⁵. Επιπλέον, η υπομονάδα III περιέχει ένα *cluster* φωσφολιπιδίου που βρίσκεται στην αρχή ενός πιθανού καναλιού μεταφοράς O₂ προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου¹².

Η κυτοχρωμική c οξειδάση (CcO) από το *P. denitrificans* αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες και εμφανίζεται μονομερές, ενώ 13 υπομονάδες συνιστούν την CcO από τη μοσχαρίσια καρδιά (διμερές). Εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, με την υπομονάδα II να περιέχει το διμερές κέντρο Cu_A, όπου τα δύο άτομα Cu_A είναι γεφυρωμένα με δύο άτομα θείου από κυστεΐνες (Cys) και σχηματίζουν ένα επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο. Στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ή στη μορφή μικτού σθένους του ενζύμου, το διμερές αυτό κέντρο, περιέχει ένα μη εντοπισμένο ηλεκτρόνιο στα δύο άτομα Cu_A (Cu_A[1.5] – Cu_A[1.5] φορτίο), καθιστώντας το οξειδοαναγωγικό κέντρο μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου. Στην υπομονάδα I βρίσκονται δύο αίμες, η αίμη a χαμηλού *spin*, με το Fe να έχει αριθμό συναρμογής 6 με δύο ιστιδίνες (His) ως αξονικούς υποκαταστάτες και η αίμη a₃ υψηλού *spin* που μαζί με το χαλκό Cu_B συνιστούν το διπυρηνικό καταλυτικό κέντρο στο οποίο λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού O₂. Ο Fe_{a3} έχει αριθμό συναρμογής 5, με πέμπτο υποκαταστάτη μια His, ενώ τρεις ιστιδίνες συνιστούν τους υποκαταστάτες του Cu_B. Ο υποκαταστάτης His276 (His240 στην αλληλουχία από τη μοσχαρίσια καρδιά) του Cu_B είναι συνδεδεμένος ομοιοπολικά με το κατάλοιπο Tyr-280 (Tyr-244) μέσω των αρωματικών τους δακτυλίων (δεσμός N–C). Η απόσταση μεταξύ των Fe_{a3} και Cu_B κυμαίνεται μεταξύ 4.5–5.2 Å. Το επίπεδο των δύο αιμών a και a₃ είναι κάθετο στο επίπεδο της μεμβράνης. Οι αίμες τύπου a περιέχουν τη φαρνεσυλική πλευρική αλυσίδα, βινυλικές και προπιονικές αλυσίδες. Έχει προταθεί, από την κρυσταλλική δομή, ότι το υδροξύλιο της υδροξυ-αιθυλ-φαρνεσυλικής αλυσίδας της αίμης a₃ σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Tyr244 (ή την Tyr280 για το *P. denitrificans*) και αποτελεί τμήμα ενός πιθανού καναλιού μεταφοράς πρωτονίων στο διπυρηνικό κέντρο⁷, **σχήμα 2** ή μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των μεταλλικών κέντρων Fe-a₃ και Cu_B⁹. Επίσης, σε *mutants* που έχει αντικατασταθεί η Tyr-244 από φαινυλαλανίνη παρατηρείται αδυναμία δέσμευσης του Cu_B, καθιστώντας και δομικό ίσως το ρόλο αυτού του καταλοίπου της τυροσίνης¹⁶. Στο **σχήμα 3** φαίνεται η συνεχής ηλεκτρονιακή πυκνότητα μεταξύ Fe_{a3}–Cu_B για το διπυρηνικό αυτό κέντρο.

Κινητική μελέτη αποδεικνύει ότι ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα c μεταφέρονται, αρχικά, στο διμερές κέντρο Cu_A–Cu_A και στη συνέχεια, μέσω της αίμης χαμηλού *spin* a, στο διπυρηνικό κέντρο Fe_{a3}–Cu_B¹⁷. Το διπυρηνικό κέντρο Fe_{αίμη-υψηλού spin}–Cu_B είναι κοινό χαρακτηριστικό ανάμεσα στις αιμο/χαλκο τελικές οξειδάσες (κινολικές και κυτοχρωμικές) στην υπομονάδα I και η αλληλουχία των καταλοίπων – υπο-



σχήμα 2: Το διπυρηνικό κέντρο αίμης a_3 / Cu_B της κυτοχρωμικής c οξειδάσης από το βακτήριο *P. denitrificans*. Διακεκομμένες γραμμές παριστάνουν το δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης a_3 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το $-OH$ της τυροσίνης Y280⁷.



σχήμα 3: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του διπυρηνικού κέντρου αίμη a_3 (σίδηρος κόκκινος) / Cu_B (μπλε)⁸.

καταστατών των μετάλλων στην υπομονάδα Ι διατηρείται αναλλοίωτη στην οικογένεια αυτή.

1.2.2 Κυτοχρωμική c οξειδάση τύπου cbb_3 : χαρακτηριστικά και διαφοροποιήσεις από τις aa_3

Βακτήρια όπως το *Rhodobacter sphaeroides*, το *Bradyrhizobium japonicum*¹⁸, το *Pseudomonas stutzeri* και το *Rhodobacter capsulatus*¹⁹ εκφράζουν την cbb_3 τύπου κυτοχρωμική c οξειδάση που διαφοροποιείται σημαντικά από τις συνήθεις τύπου aa_3 . Συγκεκριμένα, το *Rb. sphaeroides* εκφράζει τουλάχιστο δύο είδη κυτοχρωμικής c οξειδάσης. Οι μεμβράνες του είναι πλουσιότερες σε μια aa_3 τύπου *CcO* όταν καλλιεργείται σε υψηλές συγκεντρώσεις O_2 και σε μια τύπου cbb_3 όταν καλλιεργείται υπό μικροαερόβιες ή φωτοσυνθετικές συνθήκες^{20a}. Επίσης, παρατηρείται υψηλή συγκέντρωση της cbb_3 *CcO* σε *mutants* του *Rb. sphaeroides* που διαθέτουν μια μη λειτουργική ή ατελή aa_3 κυτοχρωμική c οξειδάση^{20b}.

Η cbb_3 αυτή κυτοχρωμική c οξειδάση από το *Rb. sphaeroides* αποτελείται από τρεις υπομονάδες (45 kDa, 35 kDa, 29 kDa) και εμφανίζει υψηλό αριθμό μετατροπής (turnover number, οξειδωμένο κυτόχρωμα ανά δευτερόλεπτο) γύρω στα $963\ s^{-1}$ με υπόστρωμα κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου¹². Το φάσμα διαφοράς ανηγμένου μείον οξειδωμένου cbb_3 παρουσιάζει μια κορυφή στο ορατό στα 551 και ένα διακριτό ώμο στα 562 nm που αντιστοιχούν σε αίμη C χαμηλού spin και αίμη B χαμηλού spin και αριθμού συναρμογής 6 αντίστοιχα, σε μια αναλογία 3 προς 2. Όπως προτείνουν οι *Garcia-Horsman et al.*¹², οι δύο μικρότερες υπομονάδες περιέχουν αίμη τύπου C χαμηλού spin, ομοιοπολικά δεσμευμένη στις πεπτιδικές αλυσίδες. Ωστόσο, η cbb_3 κυτοχρωμική οξειδάση περιέχει μια μόνο υψηλού spin αίμη B, όπως φαίνεται από τη δεσμευσή της με εξωγενή *ligands* CO και CN^- σε φάσματα διαφοράς του ενζύμου. Οι μοριακοί συντελεστές απορρόφησης έχουν υπολογιστεί για τα παρακάτω ζεύγη μήκους κύματος: 415.1/ 436 nm (δέσμευση CO), $190\ mM^{-1}cm^{-1}$ και 404/ 420 nm (δέσμευση CN^-), $52\ mM^{-1}cm^{-1}$.

Το σύμπλοκο του ανηγμένου (με *dithionite*) ενζύμου με CO δίνει κορυφές $1950\ cm^{-1}$ (δόνηση τάσης $Fe-C\equiv O$) και $2065\ cm^{-1}$ (δόνηση τάσης $Cu-C\equiv O$) σε FTIR φάσματα διαφοράς, καθώς το CO αποδεσμεύεται φωτολυτικά από το Fe και δεσμεύεται στο Cu. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κυτοχρωμική c

οξειδάση τύπου cbb_3 περιέχει το διπυρηνικό κέντρο Cu_B -αίμη των αιμο/χαλκο τελικών οξειδάσων.

Η οξειδάση τύπου cbb_3 δεν παρουσιάζει ταινία απορρόφησης στα 820 nm (ηλεκτρονιακή μετάπτωση λόγω μεταφοράς φορτίου σχετιζόμενη με το Cu) ή σήμα για $g=2$ περίπου σε EPR φάσματα, που είναι χαρακτηριστικά του Cu_A στις aa_3 κυτοχρωμικές οξειδάσες. Επιπλέον, η απουσία μεγάλου EPR σήματος για $g=6$ στο ένζυμο αποδίδεται σε ύπαρξη αίμης υψηλού spin συζευγμένης με το Cu_B του διπυρηνικού κέντρου που δε δίνει σήμα στις αιμο/χαλκο οξειδάσες. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τη μικρή αναλογία Cu (0.5 ισοδύναμα) ανά mol που βρέθηκε από τους *Garcia-Horsman et al.* για το ένζυμο.

Συνοψίζοντας, μπορούμε να συγκεντρώσουμε τις διαφορές μεταξύ των δύο τύπων κυτοχρωμικής c οξειδάσης aa_3 και cbb_3 ως εξής:

(α) Η οξειδάση τύπου cbb_3 περιέχει μόνο αίμες τύπου C (ομοιοπολικά δεσμευμένες στην πρωτεΐνη) και B (μη ομοιοπολική δέσμευση). Αίμη τύπου B βρίσκεται στο διπυρηνικό κέντρο Fe_{b3} - Cu_B , σε αντίθεση με άλλες αιμο/χαλκο τελικές οξειδάσες που περιέχουν αίμη τύπου A ή O^{21} , με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμη η φαρνεσυλική αλυσίδα σε αυτό το κέντρο (βλ. παράγραφο 1.2.1 για τη φαρνεσυλική αλυσίδα).

(β) Ο μόνος χαλκός που είναι παρόν στην οξειδάση τύπου cbb_3 είναι ο Cu_B του διπυρηνικού κέντρου, σε αντίθεση με τις aa_3 κυτοχρωμικές c οξειδάσες που περιέχουν Cu_A στην υπομονάδα II.

Η αναλογία που προτείνεται για αυτό το ένζυμο είναι 1 χαλκός, 2 αίμες B και 3 αίμες C ανά mol, με πιθανή παρουσία ενός διμερούς κυτοχρώματος c.

(γ) Η cbb_3 CcO δεν περιέχει τις κλασσικές υπομονάδες II και III που απαντώνται στις περισσότερες αιμο/χαλκο τελικές οξειδάσες, όπως τις συναντήσαμε στην παράγραφο 1.2.1, ακόμα και σε γονιδιακό επίπεδο.

(δ) Επιπλέον, δεν είναι διαθέσιμο το κατάλοιπο της τυροσίνης (βλ. Tyr-280 ή Tyr-244) κοντά στο διπυρηνικό κέντρο Fe_{b3} - Cu_B της cbb_3 CcO, γεγονός που καθιστά το ένζυμο αυτό ιδιαίτερο ανάμεσα στις τελικές κυτοχρωμικές οξειδάσες. Ο προτεινόμενος ρόλος του καταλοίπου αυτού της τυροσίνης αναφέρεται σε επόμενη παράγραφο στον καταλυτικό κύκλο.

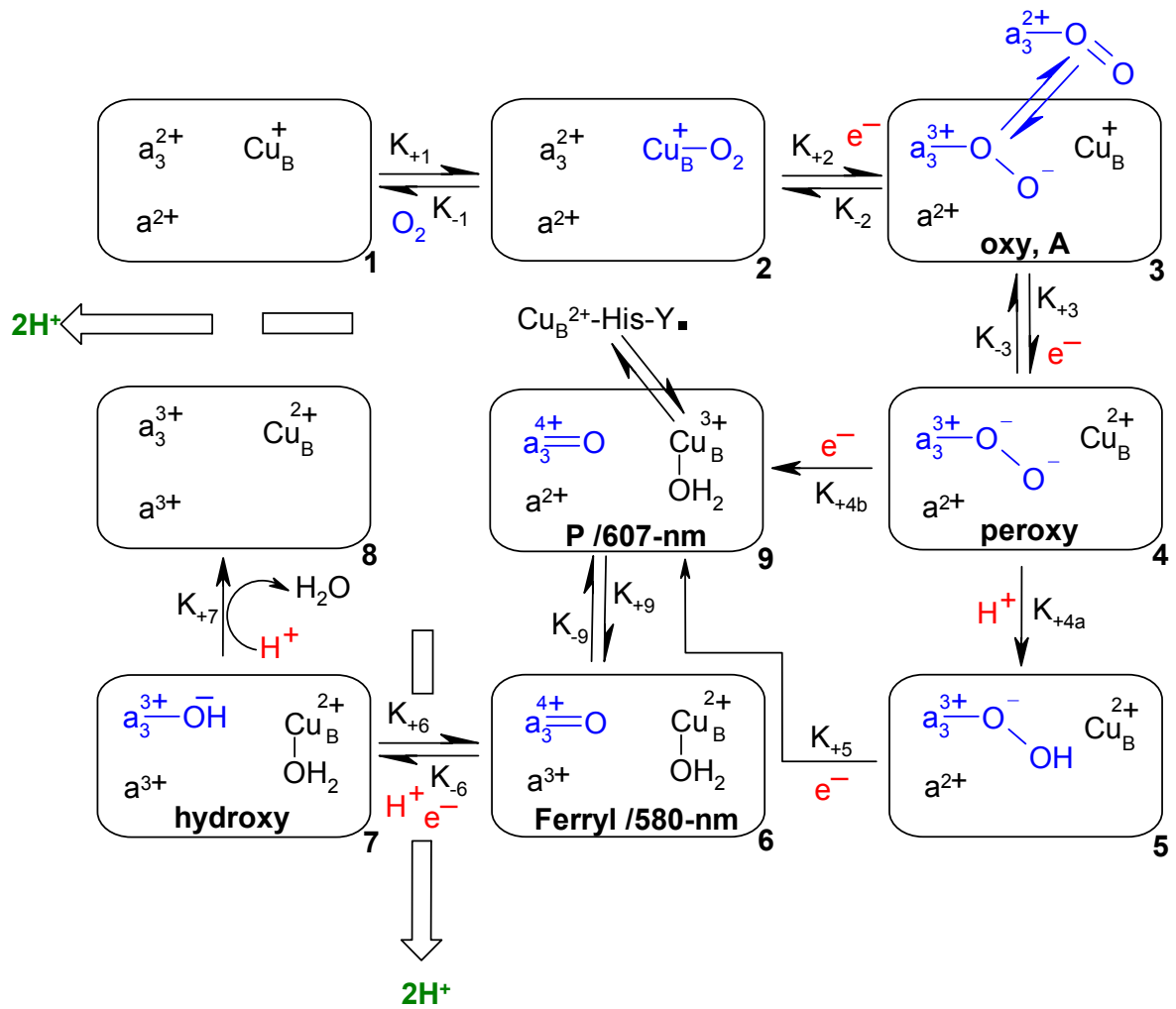
Από τη μία πλευρά, οι σημαντικές διαφορές που παρουσιάζουν οι δύο τύποι των ενζύμων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και από την άλλη, ο κοινός τους στόχος, η αναγωγή του μοριακού O_2 σε νερό, μας υποχρεώνει να αναθεωρήσουμε μηχανισμούς

κατάλυσης που έχουν προταθεί και διαθέσιμα πρωτόνια ή ηλεκτρόνια στο ενεργό διπυρηνικό κέντρο που αναφέρονται στην ερμηνεία της αναγωγής αυτής από τις aa_3 κυτοχρωμικές c οξειδάσες.

1.3 Κυτοχρωμική c οξειδάση: ενεργοποίηση μοριακού οξυγόνου και ενδιάμεσα στον καταλυτικό κύκλο

Σε αυτή την ενότητα θα περάσουμε από τη δομική στη μηχανιστική θεώρηση της κυτοχρωμικής c οξειδάσης και θα αναφερθούμε σε ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του μοριακού O_2 σε νερό. Οι μελέτες του μηχανισμού αυτού στηρίζονται στη μέθοδο *flow-flash-probe* που ανέπτυξαν αρχικά οι Greenwood και Gibson^{23a}. Στη συγκεκριμένη μέθοδο προκαλείται ελεγχόμενη έναρξη του καταλυτικού κύκλου με τη δέσμευση του μοριακού O_2 στο ένζυμο αμέσως μετά τη φωτόλυση συμπλόκου του με το CO (αναστολέας). Τα ενδιάμεσα προϊόντα ανιχνεύονται φασματοσκοπικά με τεχνικές *continues-flow*^{23b} και *stopped-flow*. Φασματοσκοπίες απορρόφησης και *Resonance Raman* σκέδαση χρησιμοποιούνται για την κινητική μελέτη και τον χαρακτηρισμό ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου. Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων ($1000-1800\text{ cm}^{-1}$) του φάσματος συντονισμού *Raman* περιέχει δονήσεις με πληροφορίες για την υποκατάσταση, την κατάσταση *spin* και την οξειδωτική κατάσταση των αιμών στο ένζυμο, ενώ στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων ($100-1000\text{ cm}^{-1}$), οι δονήσεις αφορούν κυρίως τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναγωγής του μοριακού O_2 από την CcO (δονήσεις ευαίσθητες στην ισοτοπική αντικατάσταση $^{16}O/^{18}O$). Ωστόσο, ο μηχανισμός της αναγωγής του O_2 *in vitro* στην κυτοχρωμική c οξειδάση και τα ενδιάμεσα που ανιχνεύονται ίσως να διαφοροποιούνται εν μέρει από τη φυσιολογική δράση του ενζύμου στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων²⁴.

Ο καταλυτικός κύκλος που μελετάμε αναμένουμε να περιλαμβάνει: προσθήκη ηλεκτρονίων, πρωτονίωση και διάσπαση του δεσμού $O=O$ του μοριακού οξυγόνου. Στο **σχήμα 4** φαίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου. Οι *Varotsis et al.*^{26,28} και *Rousseau et al.*^{24,25} διακρίνουν δύο φάσεις-διαδικασίες της αναγωγής με σταθερές $40,000\text{ s}^{-1}$ και $1,000\text{ s}^{-1}$, γεγονός που υποστηρίζεται και από την οξείδωση της αίμης a σε δύο διακριτές διαδικασίες²⁵.



Babcock et al. ^{4,27,28}		Rousseau et al. ²⁵	
K_{+1}	$3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		
K_{-1}	$5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$		
K_{+2}	$9 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$		
K_{-2}	$2.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$		
K_{+3}	$5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$		
K_{+4a}	$1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$	K_{+4b}	$5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
K_{+9}	$5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$		
K_{+6}	$1.2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$		
K_{+7}	$5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$		

σχήμα 4: προτεινόμενος μηχανισμός της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από την κυτοχρωμική c οξειδάση. Στο ενδιαμέσο 9 (P /607-nm) το τρίτο ηλεκτρόνιο προέρχεται από τον Cu_B του διπυρηνικού κέντρου και εμφανίζεται οξειδωμένος στην +3 κατάσταση. Στον προτεινόμενο μηχανισμό αναγράφονται και τα σημεία σύζευξης μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονιακής μεταφοράς (2 x 2H⁺).

Μετά τη φωτόλυση του χαμηλού *spin* συμπλόκου του ενζύμου με το CO (**His-Fe²⁺-CO**), το μοριακό οξυγόνο δεσμεύεται αρχικά στο Cu_B **2**. Η φωτόλυση του συμπλόκου είναι πολύ γρήγορη και πλήρης ($k_p = 1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$). Ο προτεινόμενος μηχανισμός ολοκληρώνεται σε δύο διακριτές φάσεις: μια αρχική γρήγορη φάση που περιλαμβάνει τη δέσμευση του O₂ οδηγώντας στο σύμπλοκο χαμηλού *spin* **Cu_B¹⁺ Fe_{a3}²⁺-O=O 3** και μερική οξειδωση του διπυρηνικού κέντρου μέχρι το **περόξυ** ενδιάμεσο **Cu_B⁺² Fe_{a3}⁺³-O₂²⁻(H) 4, 5** και μια δεύτερη που περιλαμβάνει την αναγωγή κατά το 3^ο και 4^ο ηλεκτρόνιο. Προτείνεται ότι στη μετάβαση από την πρώτη στη δεύτερη φάση υπάρχει κάποια ισορροπία και μεταξύ της αίμης a και του Cu_A, με το τρίτο διαθέσιμο ηλεκτρόνιο να βρίσκεται απεντοπισμένο.

Το O₂ δεσμεύεται στο σίδηρο της αίμης a₃, και σχηματίζεται το πρώτο ενδιάμεσο χαμηλού *spin* **όξυ**, **A** της χημείας οξυγόνου στην κυτοχρωμική c οξειδάση: **Cu_B⁺¹ Fe_{a3}⁺³-O-O⁻**. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται δύο πιθανά ενδεχόμενα αναγωγής του **A** προς τα **περόξυ** ενδιάμεσα και στη συνέχεια στο **φερρύλ (F)** ενδιάμεσο. Όταν δεν είναι διαθέσιμα ηλεκτρόνια στα κέντρα χαμηλού δυναμικού (Cu_A/ αίμη a), όπως στην περίπτωση του μικτού σθένους (*mixed valence*) ενζύμου^a, η μεταφορά ηλεκτρονίου στο ενδιάμεσο **A** πραγματοποιείται από τον **Cu_B** του διπυρηνικού κέντρου (στην περίπτωση που η μεταφορά ηλεκτρονίων από την αίμη a είναι εφικτή, το ένζυμο σχηματίζει γρήγορα το φερρύλ ή “580-nm” ενδιάμεσο με μεταφορά του δεύτερου ηλεκτρονίου από το κέντρο **a-Cu_A** και του τρίτου από τον **Cu_B**). Φασματοσκοπικές μελέτες αποδεικνύουν την ύπαρξη ενός ενδιάμεσου **P** οξο-φερρύλ δομής **Cu_B²⁺-OH₂ Fe_{a3}⁴⁺-O²⁻ 9** με μέγιστο απορρόφησης στα **607 nm** που προκύπτει από το μονοπάτι μεταφοράς ενός e⁻ από τον **Cu_B** (**σχήμα 4**). Εμφανίστηκε αρχικά σε πειράματα με δευτεριωμένο *buffer*. Το ενδιαφέρον διαφόρων ερευνητικών ομάδων στρέφεται στην προέλευση του τρίτου ηλεκτρονίου. Έχει προταθεί ότι το τρίτο ηλεκτρόνιο προέρχεται από οξειδοαναγωγική χημεία στην πρωτεΐνη σχηματίζοντας μια ρίζα R[•]. Προτείνεται ότι το ρόλο αυτό αναλαμβάνει το κατάλοιπο Tyr-244 που συνδέεται ομοιοπολικά με τον υποκαταστάτη His-240 του Cu_B (βλ. παρακάτω, παράγραφος 1.3.1) οδηγώντας σε ένα ενδιάμεσο **Cu_B²⁺-His₂₄₀-Tyr₂₄₄O[•] 27**. Μια εναλλακτική πηγή του ηλεκτρονίου αυτού θα μπορούσε να αποτελεί το οξειδοαναγωγικό κέντρο **Cu_B** με το σχηματισμό του εν-

^a Σε αυτή τη μορφή το ένζυμο είναι ανηγμένο κατά δύο ηλεκτρόνια, με τα κέντρα χαμηλού δυναμικού (κυτοχρωμα a και Cu_A) να είναι οξειδωμένα, ενώ το κυτοχρωμα a₃ και ο Cu_B (το διπυρηνικό κέντρο δηλαδή) ανηγμένα. Επίσης, τα αρχικά ενδιάμεσα της χημείας οξυγόνου έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής στη μορφή αυτή του ενζύμου^{23b}.

διαμέσου $\text{Cu}_B^{3+}\text{-His}_{240}\text{-Tyr}_{244}\text{OH}$ (σχήμα 4, ενδιάμεσο 9). Το τρίτο ηλεκτρόνιο στον καταλυτικό κύκλο οδηγεί στη σχάση του δεσμού O–O και τελικά στο σχηματισμό του φερρύλ ενδιάμεσου $\text{Cu}_B^{2+}\text{-OH}_2 \text{Fe}_{a3}^{4+}\text{-O}^{2-}$ 6 με μέγιστο απορρόφησης στα 580 nm από το περόξυ ενδιάμεσο 4. Το 4^ο ηλεκτρόνιο στον καταλυτικό κύκλο μεταφέρεται στο 580 -nm ενδιάμεσο που οδηγεί στην υδρόξυ μορφή $\text{Cu}_B^{2+}\text{-OH}^- \text{Fe}_{a3}^{3+}\text{-OH}^-$ (H) 7 χαμηλού ή υψηλού *spin*. Το τέταρτο ηλεκτρόνιο προκύπτει από μεταφορά ηλεκτρονίου από το a-Cu_A στο a₃-Cu_B κέντρο. Επιπλέον πρωτόνια μετατρέπουν αυτό το ενδιάμεσο στην πλήρως ανηγμένη μορφή του ενζύμου 8, 1. Ο προτεινόμενος μηχανισμός του σχήματος 4 διαθέτει μια διακλάδωση στο 4 περόξυ ενδιάμεσο, με το ένα μονοπάτι να οδηγεί στο σχηματισμό του P /607-nm είδους, ενώ το άλλο στο περόξυ είδος 5 από το οποίο όμοια με ένα επιπλέον e⁻ οδηγούμαστε στη σχάση του δεσμού O–O και το Ferryl ενδιάμεσο 6. Υπάρχει μια γρήγορη ισορροπία που μετατρέπει το P στο F ενδιάμεσο, μη οξειδοαναγωγική.

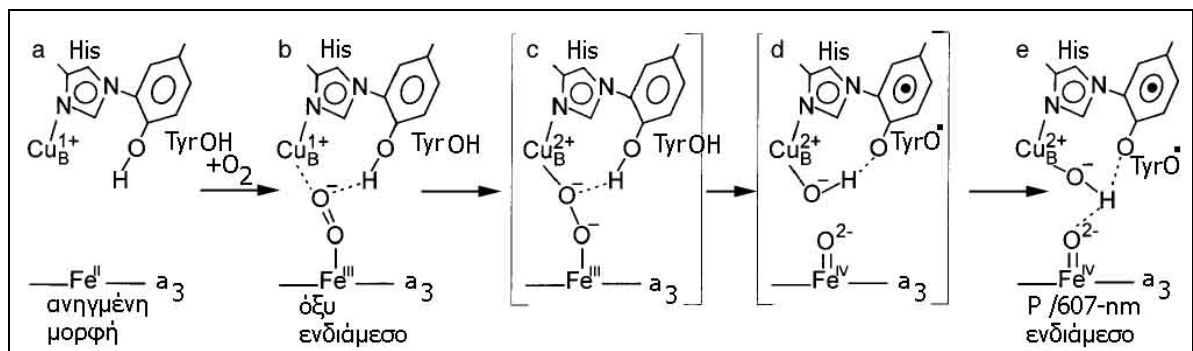
Το ενδιάμεσο 607-nm και ο ρόλος της Tyr-244/Tyr-280 στον καταλυτικό κύκλο

Το ενδιαφέρον και η διαμάχη μεταξύ διαφόρων ερευνητικών ομάδων στρέφεται στο στάδιο της σχάσης του δεσμού O–O, στην ουσία δηλαδή, στην προέλευση του τρίτου ηλεκτρονίου. Πιθανές πηγές προέλευσης συνιστούν τα παρακάτω: α) η αίμη a₃, χωρίς όμως να έχουν ανιχνευτεί πορφυρινικές π-κατιονικές ρίζες που να υποστηρίζουν το ενδεχόμενο αυτό, β) ο $\text{Fe}_{a3}^{\text{IV}}$ με την οξείδωσή του σε $\text{Fe}_{a3}^{\text{V}}$, όπως εμφανίζεται σε θεωρητικούς υπολογισμούς από την ερευνητική ομάδα του *Que*³⁶, γ) ο χαλκός Cu_B του κέντρου $\text{Cu}_B^{2+}\text{-OH}^-$, με την οξείδωσή του σε Cu_B^{3+} και δ) το ενδιάμεσο 607-nm, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, έχει προταθεί ότι σχηματίζεται μέσω της δημιουργίας μιας ρίζας τυροσίνης $\text{Tyr}_{244}\text{O}^{\bullet}$ ^{27,31}.

Η ερευνητική ομάδα του *Babcock*²⁷ θεωρεί την Tyr-244/Tyr-280 (στην CcO από μοσχαρίσια καρδιά και από το *P. denitrificans* αντίστοιχα) ως τον πιο πιθανή πηγή του τρίτου ηλεκτρονίου. Λόγω της θέσης της στο ενεργό κέντρο (βλ. κρυσταλλική δομή, παράγραφος 1.2.1) σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το οξυγόνο του $\text{Fe}_{a3}\text{-O}_2$ καθίσταται επιπλέον και ως πιθανός πρωτονιακός δότης στο βήμα της σχάσης του δεσμού O–O.

Στη μορφή μικτού σθένους (MV-CcO) το ήδη κατά δύο ηλεκτρόνια οξειδωμένο ένζυμο οδηγεί την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου μόνο μέχρι το ενδιάμεσο 607-nm. Βάσει πειραμάτων *time-resolved resonance Raman* της αντίδρασης MV-CcO/O₂²⁷, έχει προταθεί ο μηχανισμός που φαίνεται στο **σχήμα 5**, για την αναγωγή του μοριακού O₂ και τον τρόπο σχάσης του δεσμού O–O στον οποίο βασικό ρόλο κρατάει η τυροσίνη στο ενεργό κέντρο. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, το μοριακό O₂ δεσμεύεται μεταβατικά στον Cu_B⁺¹ (**5a**) και στη συνέχεια, η δέσμευσή του στον Fe_{a3} οδηγεί στο πρώτο ενδιάμεσο *όξυ*, **A Fe_{a3}³⁺-O₂⁻** (**5b**). Ακόλουθη μεταφορά ηλεκτρονίου, από τον Cu_B⁺¹, που μετατρέπεται σε Cu_B²⁺ οδηγεί στα *περόξυ* ενδιάμεσα (**5c**). Το *distal* οξυγόνο στο **Fe_{a3}³⁺-O⁻-O⁻** δεσμεύεται στον Cu_B²⁺ για τη διατήρηση του φορτίου και της τάξης δεσμού. Το *περόξυ* ενδιάμεσο αποσπά ένα πρωτόνιο (H⁺) από την κοντινή Tyr244 (**5d**). Σε αυτό το σημείο σχάζεται ο δεσμός O–O, με το *distal* οξυγόνο να σχηματίζει το υδροξύλιο στο **Cu_B²⁺-OH⁻** ενδιάμεσο, ενώ το *proximal* οξειδώνει το Fe_{a3} σε **Fe_{a3}^{IV}=O**. Η σχάση δύο δεσμών (**O–O, H–OTyr**) είναι ταυτόχρονη με το σχηματισμό δύο άλλων (**Fe=O, H–O⁻-Cu_B**). Σχηματίζεται έτσι και το σταθερό *όξο-φερρύλ* ενδιάμεσο (**5e**). Το **Cu_B²⁺-OH⁻** διατηρεί δεσμό υδρογόνου με το φαινολικό οξυγόνο της ουδέτερης ρίζας τυροσίνης. Ένας δεύτερος δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ του **O²⁻ όξο** οξυγόνου στο **Fe_{a3}^{IV}=O** και του πρωτονίου στο **Cu_B²⁺-OH⁻**³⁰. Η δομή του ενδιάμεσου στο **5e** θεωρείται ότι αντιστοιχεί στο **607-nm** είδος. Το πρωτόνιο που παρέχει η τυροσίνη κατά τη σχάση του δεσμού O–O εμφανίζεται στο *υδρόξυ* ενδιάμεσο **Fe_{a3}³⁺-OH⁻**. Ο δεσμός στο μοριακό οξυγόνο σχάζεται και δημιουργεί δύο ισχυρά οξειδωτικά μέσα: **Cu_B²⁺-His₂₄₀-Tyr₂₄₄O[•]** και **Fe_{a3}^{IV}=O**.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός του **σχήματος 5** παρουσιάζει ομοιότητες με τη *δημιουργία* του δεσμού O–O στον καταλυτικό κύκλο του φωτοσυστήματος Π³⁷. Μέσω της ομοιοπολικής δέσμευσης της Tyr-280/Tyr-244 στον υποκαταστάτη His-276/His-240 του Cu_B είναι δυνατή η ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού καθώς και του pKa της τυροσίνης. Ελέγχεται με αυτόν τον τρόπο η “ταχύτητα” της σχάσης, ευνοώντας και τη μετακίνηση-άντληση πρωτονίων. Ωστόσο, πρέπει να αναφέρουμε σε αυτό το σημείο ότι ο Cu_B²⁺ (S= ½) και η τυροσίνη ως ελεύθερη ρίζα (S=½) στο τελικό προϊόν δεν έχουν ανιχνευτεί στο EPR για την αντίδραση MV-CcO/O₂³⁸. Σύζευξη *spin* μεταξύ της TyrO[•] και του Cu_B είναι δυνατή μέσω του His-καταλοίπου υποκαταστάτη του χαλκού. Η σύζευξη αυτή μπορεί να οδηγήσει και σε



σχήμα 5: Προτεινόμενος ρόλος του καταλοίπου της τυροσίνης (Tyr-244/ Tyr-280) στην ενεργοποίηση και αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από την κυτοχρωμική c οξειδάση (ένζυμο μικτού σθένους)²⁷.

απεντοπισμό του ηλεκτρονίου μεταξύ των $Cu_B/His/TyrO^{\cdot}$ καθιστώντας τον Cu_B μερικώς τρισθενή Cu_B^{3+} . Υπάρχουν, δηλαδή, διάφορες δομές συντονισμού στο τελικό προϊόν, με μία να φαίνεται στο σχήμα **5e**, πράγμα που εν μέρει ερμηνεύει την απουσία σήματος στο EPR. Ποσοστό περίπου 7%³⁹ και 20%^{31c} τυροσινικής ρίζας έχει ανιχνευτεί σε αντιδράσεις οξειδωμένου ενζύμου με το H_2O_2 .

Τοξικά, ισχυρά οξειδωτικά ενδιάμεσα στον καταλυτικό κύκλο

Τα ενδιάμεσα της αναγωγής του μοριακού O_2 (υπεροξειδικές, περοξειδικές και υδρόδου ρίζες) αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά και ενδεχόμενα τοξικά μέσα για τα βιολογικά συστήματα (π.χ. μεμβράνες, γενετικό υλικό). Αποτέλεσμα αυτού είναι η ανάπτυξη μηχανισμών προστασίας, με έλεγχο-μεταβολισμό των τοξικών ειδών. Ταχύτατη, πιθανώς, πρωτονίωση των ενδιάμεσων αυτών να οδηγεί στην ικανοποιητική ελάττωση του χρόνου παραμονής των ενδιάμεσων αυτών στα ευαίσθητα βιολογικά συστήματα⁴.

Σύζευξη ηλεκτρονιακής και πρωτονιακής μεταφοράς στην κυτοχρωμική c οξειδάση

Στην κυτοχρωμική c οξειδάση παρατηρείται στενή σύζευξη μεταξύ της άντλησης πρωτονίων και της μεταφοράς ηλεκτρονίων που την ωθεί, όπως αναφέρθηκε. *Περόξυ* και *φερρύλ* ενδιάμεσα οξειδώνονται με τρόπο ικανό σε κάποιο στάδιο να υποστηρίξουν μια μεταφορά πρωτονίων (κατάλληλα δυναμικά οξειδοαναγωγής), όπως έχει προταθεί από τους *Wilkstrom et al.*^{33a}, όπως φαίνεται και στον καταλυτικό κύκλο (**σχήμα 4**). Η άντληση πρωτονίων από τη μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων από τη CcO πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Η ελεύθερη ενέργεια από την μεταφορά των ηλεκτρονίων, με σύζευξη, μεταφέρεται στην ενεργή μεταφορά των πρωτονίων. Κατά τη φάση που το ένζυμο οξειδώνεται, την “οξειδωτική φάση”, μεταφέροντας τέσσερα ηλεκτρόνια στο μοριακό O_2 , μεταφέρεται μέρος του πρωτονιακού φορτίου, ενώ όταν το ένζυμο περνά στη λεγόμενη “αναγωγική φάση”, στο τελευταίο ενδιάμεσο *υδρόξυ*, μετακινείται το υπόλοιπο πρωτονιακό φορτίο^{33b,c}.

Έχουν προταθεί δύο κανάλια μεταφοράς πρωτονίων στην CeO. Τα κανάλια αυτά ονομάζονται K- και D- (σχήμα 6). Θεωρείται ότι τα κανάλια αυτά εμπλέκονται στη μετακίνηση των πρωτονίων που χρησιμοποιούνται στο ενεργό κέντρο για την αναγωγή του O₂, αλλά και για τα πρωτόνια που οδηγούνται στο διαμεμβρανικό χώρο. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε σε αυτό το σημείο ότι στο K-κανάλι περιλαμβάνεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ της Tyr₂₈₀ (Tyr₂₄₄) και της φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης a₃⁷.

1.3.1 Φασματοσκοπικές ιδιότητες, χαρακτηριστικά και χρονική εξάρτηση ενδιάμεσων της αναγωγής του μοριακού O₂ σε H₂O

Το Ενδιάμεσο όζυ Cu_B¹⁺ Fe_{a3}³⁺-O₂⁻

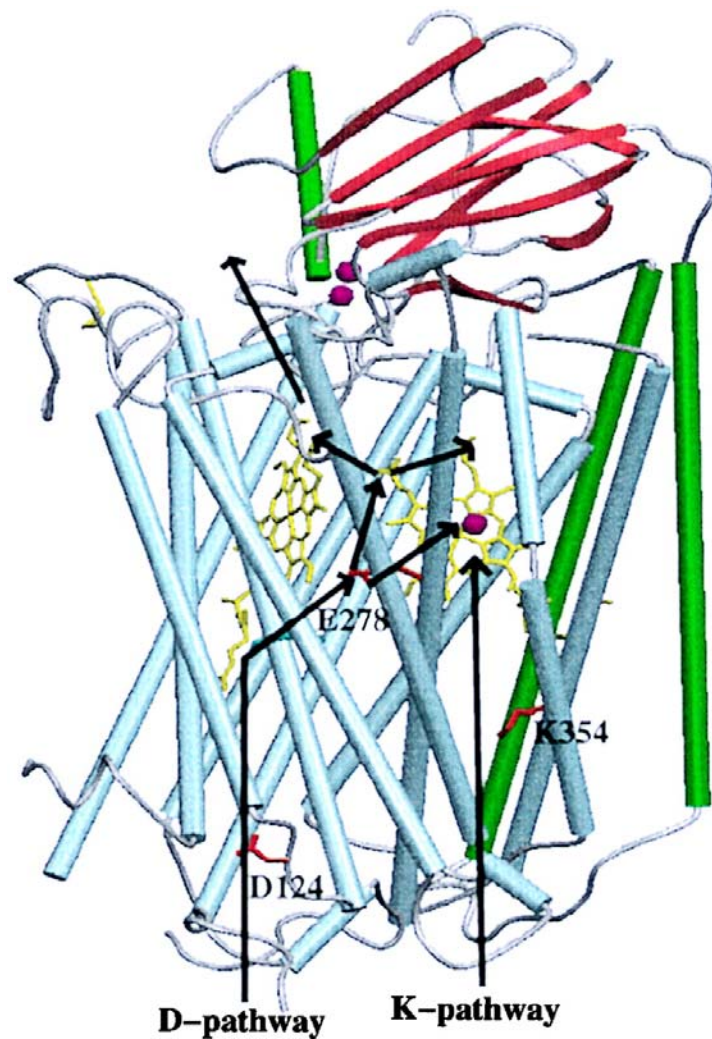
Το πρώτο ενδιάμεσο στον καταλυτικό κύκλο εμφανίζεται σε χρόνο μικρότερο των 10 μs και η συγκέντρωσή του ελαττώνεται σε χρόνο περίπου 35-40 μs από την έναρξη της αντίδρασης αναγωγής^{24,25,26,28}. Εμφανίζεται στους 568 cm⁻¹, ενώ μετατοπίζεται στους 547 cm⁻¹ (δονήσεις τάσης) με ¹⁸O₂ ισοτοπική αντικατάσταση σε φάσματα διαφοράς συντονισμού *Raman*. Η δομή του αναφέρεται ως *ferric*(Fe³⁺)-υπεροξειδική.

Είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι και οι δύο ομάδες των αιμών έχουν μετατραπεί σε Fe³⁺ μορφές κατά μεγάλο ποσοστό μέσα στα πρώτα περίπου 40 μs²⁵.

Τα Ενδιάμεσα φερρύλ ή 580-nm και P ή 607-nm Cu²⁺-OH- | Fe_{a3}⁴⁺=O

Τα δύο αυτά ενδιάμεσα όμοιας δομής σχηματίζονται με την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου κατά τρία ηλεκτρόνια, αλλά σε διαφορετικές χρονικές κλίμακες, με πρώτο να εμφανίζεται το 607-nm ενδιάμεσο²⁹.

Το **580-nm φερρύλ** προϊόν της αναγωγής εμφανίζεται σε χρονική κλίμακα περίπου 10 μs, παρατηρείται μέγιστο ποσοστό στα 65-100 μs και η συγκέντρωσή του αρχίζει να φθίνει στα 400 με 500 μs^{24,25,26,28}. Σε φάσματα διαφοράς συντονισμού *Ra-*



σχήμα 6: Προτεινόμενα μονοπάτια-κανάλια μεταφοράς πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στην υπομονάδα I της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (από το *P. denitrificans*). Στο σχήμα φαίνονται τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε κάθε κανάλι.

man, του έχει αποδοθεί συνεισφορά στις κορυφές στους 786 cm^{-1} , με ισοτοπική μετατόπιση στους 750 cm^{-1} για $^{18}\text{O}_2$ και στους 355 cm^{-1} .²⁵

Οι *Ogura et al.*²⁹ αναφέρουν την ύπαρξη μιας επιπλέον κορυφής στην περιοχή $800\text{-}805\text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα διαφοράς συντονισμού *Raman* που την αποδίδουν σε ένα διαφορετικό από το φερρύλ ενδιάμεσο, το ενδιάμεσο P. Οι *Proshlyakov et al.*³⁰ σε πειράματα με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) στο οξειδωμένο ένζυμο, που πραγματοποίησαν, διαπίστωσαν ότι το ενδιάμεσο αυτό είναι όξο-φερρύλ δομής, όμοιας με του φερρύλ, με μέγιστο απορρόφησης στα **607 nm** σε φάσματα διαφοράς ορατού. Το **607-nm** ενδιάμεσο εμφανίζεται αμέσως μετά την εξαφάνιση του όξυ, Α παραγώγου καθώς τα **περόξυ** ενδιάμεσα δομής $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{2-}(\text{H})$ στο ένζυμο μικτού σθένους ($+\text{O}_2$) έχουν πολύ μικρούς χρόνους ζωής για να ανιχνευτούν³⁰. Ο σχηματισμός του ενδιαμέσου **P** εισάγει τη σχάση του δεσμού **O-O** καθιστώντας μη αντιστρέψιμο το βήμα αυτό του καταλυτικού κύκλου της οξειδάσης. Το **607-nm** είδος μετατρέπεται στο **580-nm** ενδιάμεσο σε μια γρήγορη ισορροπία. Οι αναλογίες στις εντάσεις των κορυφών $580\text{nm}/607\text{nm}$ και $786\text{cm}^{-1}/801\text{cm}^{-1}$ εξαρτώνται από το pH κατά τρόπο όμοιο.

Η ερμηνεία των παραπάνω διαφορών στις απορροφήσεις στο ορατό των **580-nm** και **607-nm** ειδών και στις δονήσεις τάσης Fe-O των δύο ενδιαμέσων οφείλεται πιθανότατα σε διαφορετικές διαμορφώσεις της όξο-φερρύλ δομής στην αίμη a_3 και σε ηλεκτρονιακούς παράγοντες, οδηγώντας σε διαφορετική ισχύ του δεσμού Fe-O. Συγκεκριμένα^{25,27}:

A) Τα *distal* και *proximal* κατάλοιπα στο περιβάλλον της αίμης a_3 παίζουν σημαντικό ρόλο στις δονήσεις τάσης Fe-O στις αιμο-πρωτεΐνες. Οι οπτικές ιδιότητες της $\text{Fe}_{a_3}^{\text{IV}}=\text{O}$ οντότητας επηρεάζονται σημαντικά από τη διαμόρφωση της αίμης a_3 , της βασικότητας του ενδογενούς *axial* υποκαταστάτη (His) και του δεσμού υδρογόνου στον οποίο συμμετέχει το οξυγόνο της ομάδας αυτής.

B) Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης για το ενδιάμεσο **607-nm** εμφανίζεται μεγαλύτερος ($\approx 15\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)³⁴, σε συμφωνία με συνήθεις όξο-φερρύλ δομές χρωμοφόρων αίμης, και σε αντίθεση με τον αντίστοιχο συντελεστή για το **580-nm** ενδιάμεσο που εμφανίζεται μικρότερος. Ετερογενείς δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις με την *proximal* βάση οδηγούν ενδεχομένως σε διαφορετικές διαμορφώσεις του **580-nm**, στην ευρεία κορυφή στο φάσμα και το μικρότερο μοριακό συντελεστή απορρόφησης.

Γ) Η ρίζα της τυροσίνης ($\text{Cu}_B\text{-His}_{240}\text{-Tyr}_{244}$) με τον Cu_B του χρωμοφόρου που εμφανίζεται κατά το σχηματισμό του **607-nm (P)** ενδιάμεσου προϋποθέτει μια πιθανή ηλεκτρονιακή αλληλεπίδραση με το Fe^{IV} της αίμης a_3 , μετατοπίζοντας την απορρόφηση στο ορατό σε σχέση με αυτή για το **F** είδος.

Δ) Η διαφορά στις παρατηρούμενες δονήσεις $\nu_{\text{Fe=O}}$ στο Raman **804/ 786cm⁻¹** για τα **P/F** αντίστοιχα αποδίδεται σε διαφορετικές επιδράσεις από τους *proximal* και *distal* υποκαταστάτες της αίμης a_3 σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση που περιγράφεται στο Γ. Η δομή του **P** ενδιάμεσου με παρουσία ενός ασθενούς δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στο **όξο** οξυγόνο και το υδροξύλιο στο $\text{Cu}_B^{2+}\text{-OH}^-$ της *distal* θέσης³⁰ (σχήμα 6) διαφοροποιείται από αυτή του **F** είδους στο οποίο σχηματίζεται επιπλέον δεύτερος δεσμός υδρογόνου με τη μετάβαση **P**→**F**, καθώς πρωτονιώνεται η ρίζα του καταλοίπου της τυροσίνης Tyr₂₄₄. Η ύπαρξη επιπλέον δεσμού υδρογόνου στο **F** υποστηρίζεται και από φάσματα διαφοράς Raman H₂O/D₂O, όπου η Raman μετατόπιση είναι σημαντικότερη στο **F** από αυτή στο **P**^{28,35}. Οι διαφορές αυτές συνιστούν και στην αλλαγή των οπτικών ιδιοτήτων του χρωμοφόρου της αίμης a_3 .

Ε) Η ισχύς του δεσμού $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ και κατ' επέκταση η δονητική συχνότητα στο Raman μειώνεται καθώς αυξάνεται η βασικότητα του *proximal* υποκαταστάτη, καθώς δηλαδή αυξάνεται η τάση της His να προσφέρει ηλεκτρόνια στο κέντρο αυτό. Συνεπώς, διαφορές στη βασικότητα της His συνεισφέρουν στις φασματοσκοπικές διαφορές των **P** και **F** όξο-φερρύλ ειδών.

ΣΤ) Κατά τον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης μεταβάλλεται η απόσταση μεταξύ των μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{a_3}$ από τα 5.2 Å στο ανηγμένο ένζυμο, στα 4.9 Å στην οξειδωμένη μορφή. Έχει προταθεί από την ερευνητική ομάδα του Rousseau²⁵ ότι η μετάβαση 5.2 Å → 4.9 Å συμβαίνει κατά τη μετατροπή **P** → **F** ενδιάμεσου, με την απόσταση να είναι 5.2 Å στο **P** και να μειώνεται σε 4.9 Å στο **F**. Η μεταβολή στην απόσταση $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{a_3}$ οδηγεί σε διαφοροποίηση στο περιβάλλον της αίμης a_3 (διαφορές στο ορατό φάσμα), ενώ η μικρότερη απόσταση που παρατηρείται επηρεάζει τη δόνηση τάσης $\text{His-Fe}_{a_3}^{\text{IV}}=\text{O}$, καθώς διαφοροποιούνται οι ιδιότητες της *distal* θέσης πλησιάζοντας το Fe_{a_3} .

Το υδρόξυ ενδιάμεσο $\text{Cu}_B^{2+}\text{-OH Fe}_{a_3}^{3+}\text{-OH}$

Το προϊόν της αναγωγής κατά τέσσερα ηλεκτρόνια του μοριακού οξυγόνου εμφανίζεται σε λιγότερο από 100 μs και φθίνει σε ποσοστό στα πρώτα ms του καταλυτικού κύκλου^{24,25,26,28}. Η δόνηση τάσης Fe-OH σε αυτό το είδος εμφανίζεται σχετικά χαμηλά στους 450 cm^{-1} (χαμηλού *spin*) σε σύγκριση με τις υψηλού *spin* σφαιρίνες (490 cm^{-1}) σε φάσματα διαφοράς συντονισμού *Raman*. Έχει προταθεί η ύπαρξη ισχυρού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του H^+ στο υδροξείδιο και πιθανότατα του $\text{Cu}_B\text{-OH}$ ή της $\text{Tyr}_{244}\text{-OH}$. Η δυνατότητα δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του υδρόξυ ενδιάμεσου υποστηρίζεται από μια διαφορετική δόνηση τάσης Fe-OH που εμφανίζεται στους 475 cm^{-1} ³². Η τελευταία γραμμή αντιπροσωπεύει το υψηλού *spin* Fe-OH, ενώ η 450 cm^{-1} το είδος χαμηλού *spin*. Υποστηρίζεται ότι το 450 cm^{-1} είδος σχηματίζει ισχυρότερο δεσμό υδρογόνου, καθώς η απόσταση $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{a3}$ είναι μικρότερη (4.9 \AA) στο οξειδωμένο ένζυμο, ενώ στο 475 cm^{-1} είδος ο δεσμός υδρογόνου εξασθενεί λόγω της μεγαλύτερης απόστασης $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{a3}$ (5.2 \AA) στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου²⁵.

Βιβλιογραφία

- [1] Feelisch, M.; Martin, J. F. *TREE* **1995**, *10*, 496-499.
- [2] Pross, A. *J. theor. Biol.* **2003**, *220*, 393-406.
- [3] Williams, R. J. P.; Frausto dal Silva, *J. theor. Biol.* **2003**, *220*, 323-343.
- [4] Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2889-2907.
- [5] Morton B. E.; Lardy H. A. *Biochemistry* **1967**, *6*, 50-56.
- [6] Morton B. E.; Lardy H. A. *Biochemistry* **1967**, *6*, 43-49.
- [7] Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. *NATURE* **1995**, *376*, 660-669.
- [8] Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biochemistry* **1997**, *94*, 10547-10553.
- [9] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *SCIENCE* **1995**, *269*, 1069-1074.
- [10] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *SCIENCE* **1996**, *272*, 1136-1144.
- [11] Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Tsukihara, T. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, *30*, 7-14.

- [12] Garcia-Horsman, J. A.; Berry, E.; Shapleigh, J. P.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3113-3119.
- [13] Wikstrom, M. *Current Opinion in Struct. Biol.* **1998**, *8*, 480-488.
- [14] Hendler, R. W.; Pardhasaradhi, K.; Reynafarje, B.; Ludwig, B. *Biophys.* **1991**, *60*, 415-466.
- [15] Saraste, M. *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 331-366.
- [16] Tawa, G. J.; Pratt, L. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1625-1628
- [17] Hill, B. C. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2419-2425.
- [18] Preisig, O.; Anthamatten, D.; Hennecke, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3309-3313.
- [19] Gray, K. A.; Grooms, M.; Myllykallio, H.; Moomaw, C.; Slaughter, C.; Daldal, F. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3120-3127.
- [20] a. Shapleigh, J. P.; Gennis, R. B. *Mol. Microbiol.* **1992**, *6*, 635-642.
b. Shapleigh J. P.; Hill, J. J.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 2338-2343.
- [21] Wu, W.; Chang, C. K.; Varotsis, C.; Babcock, G. T.; Puustinen, A.; Wikstrom, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 1182-1187.
- [22] Frank, V.; Kadenbach, B. *FEBS Lett.* **1996**, *382*, 121-124.
- [23] a. Greenwood, C.; Gibson, Q. H. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1782-1787.
b. Han, S.; Ching, Y.-c.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9445-9451
- [24] Rousseau, D. L.; Han, S.; Song, S.; Ching, Y.-c. *J. Raman. Spec.* **1992**, *23*, 551-556.
- [25] Han, S.; Takahashi, S.; Rousseau, D. L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1910-1919.
- [26] Varotsis, C. A.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11260-11269.
- [27] Proshlyakov, D. A.; Pressler, M. A.; Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8020-8025.
- [28] Varotsis, C.; Zhang, Y.; Appelman, E. H.; Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 237-241.
- [29] Ogura, T.; Hirota, S.; Proshlyakov, D. A.; Sninzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5443-5449.
- [30] Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appelman, E. H.; Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29385-29388.
- [31] a. Suchera, A.; Szundi, I.; Einarsdottir, O. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17905-17914.

b. Das, T. K.; Pecoraro, C.; Tomson, F. L.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14471-14476.

c. MacMillan, F.; Kannt, A.; Behr, J.; Prisner, T.; Michel, H. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179-9184.

[32] Han, S. W.; Ching, Y. C.; Rousseau, D. L. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6604-6607.

[33] a. Wikstrom, M. *NATURE* **1989**, *338*, 776-778.

b. Verkhovsky, M. L.; Jasaitis, A.; Verkhovskaya, M. L.; Morgan, J. E.; Wikstrom, M. *NATURE* **1999**, *400*, 480-483.

c. Wikstrom, M. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **1998**, *8*, 480-488.

[34] Wikstrom, M.; Morgan, J. E. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10266-10273.

[35] Han, S.; Ching, Y.-c.; Rousseau, D. L. *NATURE* **1990**, *348*, 89-90.

[36] Bassan, A.; Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Que, L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11056-11063.

[37] Blair, D. F.; Witt, S. N.; Chan, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7389-7399.

[38] Clore, G. M.; Andreasson, L. -E.; Karlsson, B.; Aasa, R.; Malmstrom, B. G. *Biochem. J.* **1980**, *185*, 91-113.

[39] Fabian, M.; Palmer, G. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13802-13810.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II – θεωρητικές μελέτες του διπυρηνικού κέντρου χαλκού-σιδήρου στην κυτοχρωμική c οξειδάση

2.1 Εισαγωγή

Τα οξειδοαναγωγικά μεταλλικά κέντρα ενζύμων στις ζωτικές βιολογικές διαδικασίες (όπως το φωτοσύστημα II και η κυτοχρωμική c οξειδάση) καθώς επίσης και η διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης τους αποτελούν αντικείμενο πειραματικής μελέτης για δεκαετίες. Ωστόσο, οι θεωρητικοί υπολογισμοί με ακριβείς μεθόδους κβαντικής χημείας άρχισαν να εφαρμόζονται σε αυτά τα συστήματα μόλις λίγα χρόνια πριν. Μελέτες αυτού του είδους προϋποθέτουν τον προσδιορισμό όλων των ενδιαμέσων στον καταλυτικό κύκλο, μεταβατικών καταστάσεων και ενεργειών ενεργοποίη-

σης. Πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα, όπως αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω, αναπτύχθηκαν από τους οργανισμούς για την αποδοτικότερη παραγωγή ενέργειας κατά το μεταβολισμό. Η πολυπλοκότητα των μεταλλικών / ενεργών κέντρων των ενζύμων αυτών καθυστέρησε αρκετά και την εφαρμογή των μεθόδων της κβαντικής χημείας στην αναζήτηση του τρόπου δράσης τους. Ενεργά κέντρα, λοιπόν, που περιλαμβάνουν περισσότερα από 30 άτομα καθώς επίσης και μεταβατικά στοιχεία όπως ο Fe, αποτελούν σημαντική πρόκληση για την κβαντική χημεία με τους υπολογισμούς να περιορίζονται και από την υπάρχουσα υπολογιστική ισχύ. Ακόμα και με τον περιορισμό του αριθμού των ατόμων που χρησιμοποιούνται για το μοντέλο μελέτης του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου (λαμβάνοντας υπόψη – για παράδειγμα – μόνο την πρώτη σφαίρα υποκατάστασης στο μεταλλικό κέντρο), η ύπαρξη μεταβατικών στοιχείων οδήγησε στην ανεύρεση νέων αποδοτικότερων μεθόδων, σχετικά πρόσφατα. Ο περιορισμός που τίθεται στις διάφορες υπολογιστικές μεθόδους, καθώς επίσης και το κριτήριο ακρίβειάς τους είναι η συμφωνία με τις πειραματικές μελέτες.

Αξίζει να αναφέρουμε σε αυτό το σημείο ότι η εφαρμογή κβαντικών υπολογιστικών μεθόδων ακόμα και σε πολύ απλά συστήματα, όπως για παράδειγμα στην αντίδραση μεμονωμένων μεταβατικών στοιχείων με αλκένια, παρέχει σημαντικές πληροφορίες που βρίσκουν ισχύ και σε ευρύτερα συστήματα όπως την ομογενή κατάλυση ενεργοποίησης του δεσμού C-H του μεθανίου από $\text{RhCr}(\text{CO})^1$. Έτσι, παρουσιάζεται η δυνατότητα χρήσης απλούστερων μοντέλων του ενεργού κέντρου ενός ενζύμου (κυρίως των υποκαταστατών στο κεντρικό μέταλλο), παρέχοντας παράλληλα σημαντικές πληροφορίες διαλεύκανσης του μηχανισμού δράσης τους.

2.2 Η μέθοδος DFT (Density Functional Theory) και η εφαρμογή της στα βιολογικά συστήματα

Ένα σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση μελέτης πολύπλοκων συστημάτων έγινε με την ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων μεγάλης ακρίβειας βάσει της *Density Functional Theory* ή θεωρίας του Συναρτησιακού της Ηλεκτρονιακής πυκνότητας². Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών αποδίδει πολύ ικανοποιητικά για τα μεγάλα συστήματα μορίων. Έτσι, τα σύμπλοκα μεταβατικών στοιχείων που απαντώνται στα ενεργά κέντρα των υπό μελέτη βιολογικών συστημάτων περιγράφονται με την κβαντική χη-

μεία χρησιμοποιώντας τη *DFT* στους υπολογισμούς. Όπως θα γίνει περισσότερο κατανοητό παρακάτω, η *θεωρία του συναρτησιακού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας* αυξάνει την ακρίβεια στους υπολογισμούς με το να εισάγει στις συναρτήσεις όρους που εξαρτώνται από τη διαβάθμιση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, περιγράφοντας ικανοποιητικότερα ενέργειες ανταλλαγής (*exchange energies*). Οι *DFT* μέθοδοι περιλαμβάνουν τις επιδράσεις της ηλεκτρονιακής συσχέτισης (*electron correlation*) – το γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια σε ένα μοριακό σύστημα αντιδρούν το ένα στην κίνηση του άλλου και προσπαθούν να κρατούνται εκτός της πορείας το ένα του άλλου. Οι Hartree-Fock (HF) υπολογισμοί λαμβάνουν υπόψη αυτό το χαρακτηριστικό σε μικρό βαθμό, καθώς κάθε ηλεκτρόνιο “αισθάνεται” και αντιδρά σε μια μέση ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Επιπλέον, η εισαγωγή μερικών ημιεμπειρικών και σωστών παραμέτρων δυναμικού ανταλλαγής (*exchange potential/ energy*) έδωσε ώθηση στην ακρίβεια της μεθόδου οδηγώντας σε μια *υβριδική DFT*.

2.2.1 Η κβαντική προσέγγιση της *θεωρίας του συναρτησιακού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας*

Οι μέθοδοι *DFT* υπολογίζουν την ηλεκτρονιακή συσχέτιση μέσω γενικών συναρτησιακών^b της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Τα συναρτησιακά στη *DFT* διαιρούν την ηλεκτρονιακή ενέργεια σε διακεκριμένες συνιστώσες που υπολογίζονται χωριστά: την κινητική ενέργεια, την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίου-πυρήνα, την άπωση Coulomb και μια παράμετρο ανταλλαγής-συσχέτισης που αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο από την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου (η οποία χωρίζεται και αυτή σε διακεκριμένες συνιστώσες ανταλλαγής και συσχέτισης). Το δυναμικό αυτό αποτελεί μια συνεισφορά στο δυναμικό εξωτερικού πεδίου $V_{\text{eff}}(\mathbf{r})$, το οποίο δρα ως εξωτερικό δυναμικό μη αλληλεπιδρόντων ηλεκτρονίων. Αναφέρονται δύο θεμελιώδεις προσεγγίσεις της μεθόδου *DFT*: η προσέγγιση της *τοπικής σπινο-ηλεκτρονιακής πυκνότητας (TSHH)*, με τα συναρτησιακά ανταλλαγής και συσχέτισης (*local exchange and correlation functionals*) να περιλαμβάνουν μόνο τις τιμές των πυκνοτήτων των ηλεκτρονιακών *spin*, και τη γενικευμένη προσέγγιση της απόκλισης της πυκνότητας (*gradient*

^b Συναρτησιακό, στα μαθηματικά, ορίζεται ως η συνάρτηση μιας συνάρτησης. Στην *DFT* τα συναρτησιακά είναι συναρτήσεις της ηλεκτρονιακής πυκνότητας $n(\mathbf{r})$, που είναι με τη σειρά τους συνάρτηση των συντεταγμένων στο χώρο.

corrected functionals), με τα συναρτησιακά να περιλαμβάνουν τις τιμές της πυκνότητας των ηλεκτρονιακών *spin*, αλλά και τις αποκλίσεις τους.

Η θεωρία του συναρτησιακού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας βασίζεται κυρίως στην παρατήρηση – θεώρημα των Hohenberg-Kohn ότι η ολική ενέργεια $E[\mathbf{n}]$, της βασικής κατάστασης οποιουδήποτε πολυηλεκτρονιακού συστήματος, είναι ένα μοναδικό συναρτησιακό της πυκνότητας, $\mathbf{n}(\mathbf{r})$, των ηλεκτρονίων. Τα προσεγγιστικά συναρτησιακά που χρησιμοποιούν οι σημερινές *DFT* μέθοδοι, χωρίζουν την ηλεκτρονιακή ενέργεια ως εξής:

$$E[n] = T[n] + E_H[n] + E_{ext}[n] + E_{xc}[n] \quad (1)$$

Το $T[\mathbf{n}]$ είναι το συναρτησιακό της κινητικής ενέργειας από την μετακίνηση των ηλεκτρονίων, το $E_H[\mathbf{n}]$ είναι ο ηλεκτροστατικός όρος του συναρτησιακού αλληλεπίδρασης ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου ($U^{e-e}(\mathbf{r})$) που οφείλεται στο δυναμικό Hartree $V_H^{e-e}(\mathbf{r})$, το $E_{ext}[\mathbf{n}]$ αντιπροσωπεύει την ενέργεια του εξωτερικού πεδίου, και το $E_{xc}[\mathbf{n}]$ είναι η παράμετρος ανταλλαγής-συσχέτισης που περιλαμβάνει το υπόλοιπο μέρος από τις αλληλεπιδράσεις ηλεκτρονίου-ηλεκτρονίου: $U^{e-e}[n] = E_H[n] + E_{xc}[n]$.

Το δεύτερο θεμελιώδες θεώρημα της *DFT* αναφέρει ότι το συναρτησιακό της ολικής ενέργειας $E[n]$, έχει ένα ελάχιστο στην ενέργεια της βασικής κατάστασης και στη σωστή φυσική ηλεκτρονιακή πυκνότητα της βασικής κατάστασης. Τα δύο θεωρήματα μας επιτρέπουν την εύρεση της εξίσωσης καθορισμού του συναρτησιακού από την απαίτηση να έχουμε ελάχιστο της ενέργειας, το οποίο, σύμφωνα με την αρχή των μεταβολών, καθορίζεται από τη σχέση: $\delta(E[n] - \lambda \int n(r) dr) = 0$ (2), όπου λ ένας πολλαπλασιαστής *LaGrange*. Η εξίσωση (2), λαμβάνοντας υπόψη τις επιμέρους συνεισφορές από τα συναρτησιακά της εξίσωσης (1), μετασχηματίζεται στην:

$$\int \delta n(r) \left(\frac{\delta T}{\delta n(r)} + V_{eff}(r) - \lambda \right) dr = 0, \text{ με } V_{eff}(r) = \frac{\delta E_{xc}}{\delta n(r)} + \int \frac{n(r')}{|r-r'|} dr' + v_{ext}(r)$$

Η ολική ενέργεια του συστήματος παίρνει τη μορφή:

$$E[n] = \sum_{N=1}^N \varepsilon_N - \frac{1}{2} \int \frac{n(r)n(r')}{|r-r'|} dr dr' + E_{xc}[n] - \int \frac{\delta E_{xc}}{\delta n(r)} n(r) dr, \text{ με}$$

$$n(r) = \sum_{i=1}^N |\Psi_i(r)|^2 \text{ και } \left(-\frac{1}{2} \nabla^2 + V_{eff}(r) - \varepsilon_i \right) \Psi_i(r) = 0.$$

Όταν το δυναμικό $V_{eff}(r)$ είναι γνωστό, μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε τη λύση $n(r)$ που αντιπροσωπεύει το υπό μελέτη σύστημα. Ωστόσο, πρέπει να καθορι-

στεί το άγνωστο συναρτησιακό $E_{XC}[n]$ της ενέργειας ανταλλαγής και συσχέτισης, που συνήθως υπολογίζεται με προσεγγιστικές μεθόδους:

A) $E_{XC}[n] = \int \varepsilon_{XC}(n(r))n(r)dr$, με $\varepsilon_{XC}(n(r))$ η ενέργεια ανταλλαγής και συσχέτισης ανά ηλεκτρόνιο σ' ένα ομογενές ηλεκτρονιακό αέριο πυκνότητας $n(r)=n$. Η ενέργεια αυτή υπολογίζεται από τη θεωρία του ομογενούς ηλεκτρονιακού αερίου. Η παραπάνω εξίσωση για την $E_{XC}[n]$ αναφέρεται στην προσέγγιση της τοπικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

B) $E_{XC}[n_{\uparrow}, n_{\downarrow}] = \int \varepsilon_{XC}[n_{\uparrow}(r) \cdot n_{\downarrow}(r)]n(r)dr$, όπου $n_{\uparrow}(r), n_{\downarrow}(r)$ οι πυκνότητες των ηλεκτρονίων με προβολή *spin* $+1/2$ και $-1/2$ αντίστοιχα και $n(r) = n_{\uparrow}(r) + n_{\downarrow}(r)$. Η παραπάνω εξίσωση αφορά την προσέγγιση της τοπικής σπινο-ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

2.2.2 Η μέθοδος *DFT/B3LYP*

Η μέθοδος *DFT* που χρησιμοποιείται ευρύτατα στα βιολογικά συστήματα είναι η υβριδική *B3LYP*¹⁷. Στις υβριδικές μεθόδους, το συναρτησιακό ανταλλαγής ορίζεται ως ένας γραμμικός συνδυασμός *Hartree-Fock*, *local* και *gradient-corrected* παραμέτρων ανταλλαγής. Αυτό το συναρτησιακό ανταλλαγής στη συνέχεια συνδυάζεται με ένα *local* και / ή *gradient-corrected* συναρτησιακό.

Ο *Becke*¹⁷ όρισε συναρτησιακά που περιλαμβάνουν ένα μίγμα από *Hartree-Fock* και *DFT* παραμέτρους ανταλλαγής (E_X), μαζί με *DFT* παραμέτρους συσχέτισης (E_C), όπως: $E_{XC}^{hybrid} = c_{HF}E_X^{HF} + c_{DFT}E_{XC}^{DFT}$, όπου τα c είναι σταθερές. Η *B3LYP* Μέθοδος του *Becke* ορίζεται ως εξής:

$$E_{B3LYP}^{XC} = E_X^{LDA} + c_0(E_X^{HF} - E_X^{LDA}) + c_X \Delta E_X^{B88} + E_C^{VWN3} + c_C(E_C^{LYP} - E_C^{VWN3}),$$

όπου οι παράμετροι είναι: E_X^{LYP} / E_C^{LYP} ανταλλαγής/ συσχέτισης των *Lee, Yang* και *Parr*, E_C^{VWN3} συσχέτισης των *Vosko, Wilk*, και *Nusair*, E_X^{LDA} ανταλλαγής από το συναρτησιακό τοπικής ανταλλαγής (*local exchange functional*) και τελευταία η E_X^{B88} *gradient-corrected* ανταλλαγής που όρισε ο *Becke*, βασιζόμενος στην E_X^{LDA} . Στο συναρτησιακό *B3LYP*, οι παράμετροι c προσδιορίστηκαν από τον *Becke* προσαρμόζοντάς τις σε ενέργειες ατομοποίησης, δυναμικά ιονισμού, πρωτονιακές συγγένειες και ατομικές

ενέργειες: $c_0=0.20$, $c_X=0.72$ και $c_C=0.81$, χρησιμοποιώντας το συναρτησιακό συσχέτιση των *Perdew-Wang* και όχι των *VWN3, LYP*.

Σημαντικό είναι ότι οι ίδιες σταθερές c βρίσκουν ισχύ με διαφορετικά συναρτησιακά, εμπιριέχοντας προφανώς τη φυσική ερμηνεία ενός τέτοιου μίγματος παραμέτρων που πρότεινε ο *Becke*.

2.2.3 Η ακρίβεια στους υπολογισμούς των χρησιμοποιούμενων μεθόδων, εφαρμογές στα βιολογικά συστήματα

Με τις υβριδικές συναρτήσεις που εισάγονται στην *DFT* μπορούμε και λαμβάνουμε αποτελέσματα που συγκρίνονται σε ακρίβεια με τις πιο ακριβείς *ab initio* (από βασικές αρχές, με αποκλειστικά μεθόδους της κβαντικής χημείας) μεθόδους με πολύ λιγότερο υπολογιστικό κόστος, όμοιο με αυτό ενός υπολογισμού *HF*. Με φυσιολογικές διαφορές που κυμαίνονται μόλις λίγα kcal/mol από τα πειραματικά δεδομένα, οι υβριδικές συναρτήσεις υπολογίζουν ενέργειες με υψηλή ακρίβεια. Ωστόσο, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι το σφάλμα στην υπολογιζόμενη ενέργεια ενεργοποίησης (ενεργειακό φράγμα) για μια ενζυμική κατάλυση δεν είναι μικρότερο από 3–5 kcal/mol. Το όριο αυτό των 3–5 kcal/mol θέτει περιορισμό στο είδος των μηχανισμών που συγκρίνονται και στα ερωτηματικά που απαντώνται, για την εύρεση του πιθανότερου μηχανισμού *in vivo*. Μηχανισμοί με διαφορές στις ενέργειες μικρότερες ή ίσες των 3–5 kcal/mol δεν μπορούν να συγκριθούν και με ασφάλεια να καθοριστεί ο πιθανότερος. Στα βιολογικά συστήματα, κατά συνέπεια, μόνο ορισμένες μηχανιστικές λεπτομέρειες μπορούν να εξακριβωθούν από την κβαντική χημεία, με τις μεθόδους *DFT*. Στην κυτοχρωμική c οξειδάση, στο στάδιο της σχάσης του δεσμού στο μοριακό οξυγόνο, οι διάφοροι προτεινόμενοι μηχανισμοί διαφέρουν περισσότερο από 15 kcal/mol^{4,5}. Το αποτέλεσμα είναι να μπορεί να διασαφηνιστεί με ασφάλεια ο πιθανότερος μηχανισμός βάσει της κβαντικής χημείας στα μοντέλα που χρησιμοποιούνται για το ενεργό κέντρο της CcO.

Οι *Curtiss et al.*¹⁸ έδειξαν ότι η *B3LYP* μέθοδος είναι ανώτερη σε σχέση με τις άλλες *DFT* μεθόδους που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, με μέση ενεργειακή διαφορά από τα πειραματικά 3.11 kcal/mol. Πρόσφατη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας¹⁹, σε ενθαλπίες σχηματισμού, δυναμικά ιονισμού, ηλεκτροσυγγένειες και πρωτονιακές συγγένειες μεγαλύτερου αριθμού και μεγέθους μορίων έδωσε μέσο όρο δια-

φοράς ενέργειας 4.27 (ή 3.29 kcal/mol όταν χρησιμοποιηθούν μόνο μόρια με μικρό αριθμό δεσμών που σχηματίζονται, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από τη CcO). Στην ίδια μελέτη το μέσο σφάλμα στον υπολογισμό αποστάσεων δεσμών ανέρχεται στα 0.008 Å, ενώ για τις γωνίες στις 0.61⁰ στην *B3LYP* μέθοδο.

Η εφαρμογή της *B3LYP* μεθόδου, όμως, στα βιολογικά συστήματα, όπως την κυτοχρωμική c οξειδάση, περιλαμβάνει υπολογισμούς με μεταβατικά στοιχεία (Fe και Cu της πρώτης σειράς). Σε μια μελέτη των ενεργειών δεσμών **M-R** (όπου M μεταβατικό στοιχείο της πρώτης σειράς και R: H, CH₃, CH₂, OH) το μέσο απόλυτο σφάλμα κυμαίνεται μεταξύ 3-5 kcal/mol²⁰, ενώ για **M-CO** ενέργειες δεσμών το σφάλμα μειώνεται σε 3 kcal/mol περίπου.

Σε αντιδράσεις όπως αυτές της ενεργοποίησης και αναγωγής του μοριακού οξυγόνου, με διαμορφώσεις των μεταβατικών καταστάσεων (*TS[‡]*) παρόμοιας σχετικά ενέργειας, είναι δύσκολο με μία μόνο μέθοδο (*B3LYP*) να περιγραφούν ικανοποιητικά αυτές οι *TS[‡]* και οδηγούμαστε σε ελάχιστα υψηλότερα ενεργειακά φράγματα. Συνήθως η *B3LYP* μέθοδος χρησιμοποιείται για βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με μέτρια σερ βάσεων, ενώ οι ενέργειες υπολογίζονται με μεγαλύτερα σερ βάσεων.

2.3 Ακολουθία υπολογισμών: η μεθοδολογία στην κβαντική προσέγγιση

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μεθοδολογίες αντιμετώπισης των ενζυμικών συστημάτων και της εύρεσης ενδιάμεσων προϊόντων και μεταβατικών καταστάσεων στον καταλυτικό τους κύκλο. Η ερευνητική ομάδα της *Blomberg*, *M^{3,4,5}* έχει εφαρμόσει ένα πρωτόκολλο υπολογισμών στην κυτοχρωμική c οξειδάση⁴ με αποτελέσματα που ερμηνεύουν εν μέρει τις πειραματικές παρατηρήσεις.

Τα ενδιάμεσα προϊόντα και οι μεταβατικές καταστάσεις

Αρχικά, η υβριδική *DFT* μέθοδος *B3LYP* χρησιμοποιείται στην βελτιστοποίηση της γεωμετρίας των επιλεγμένων μοντέλων για τα μεταλλικά κέντρα. Επιπλέον ακρίβεια στους υπολογισμούς αυτούς εισάγεται με το πάγωμα ορισμένων παραμέτρων –

για παράδειγμα ατομικών αποστάσεων και γωνιών – στις αντίστοιχες που έχουν βρεθεί από την κρυσταλλική δομή των ενζύμων, οδηγώντας σε μια *constrained* (περιοριστική) βελτιστοποίηση μοριακής δομής. Σε αυτό το στάδιο των υπολογισμών, χρησιμοποιείται το σετ βάσεων^c *LANL2DZ*⁶. Το σετ αυτό βάσεων περιλαμβάνει τυπικά *double-ζ*^d σετ βάσεων για όλα τα ελαφριά στοιχεία, ενώ για τα μεταβατικά μέταλλα (όπως ο σίδηρος και ο χαλκός στο διπυρηνικό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης) χρησιμοποιείται ένα μη σχετικιστικό αποτελεσματικό πυρηνικό δυναμικό (*effective core potential, ECP*). Στις περισσότερες των περιπτώσεων προσδιορίζονται αρχικά προσεγγιστικές μεταβατικές καταστάσεις. Ο προσδιορισμός βασίζεται στο πάγωμα μίας ή δύο παραμέτρων σε διαφορετικές τιμές στο μοντέλο, στη βελτιστοποίηση των υπολοίπων βαθμών ελευθερίας και στην εύρεση του μεγίστου σε ένα ενεργειακό διάγραμμα των δομών που προκύπτουν. Οι παράμετροι που παγώνουν σε διάφορες τιμές είναι κυρίως διαφορετικά μήκη δεσμών που δημιουργούνται ή σχάζονται κατά την κατάλυση. Χρησιμοποιώντας την προσεγγιστική μεταβατική κατάσταση, που προσδιορίστηκε στο προηγούμενο βήμα, ως δομή εκκίνησης, πραγματοποιείται ο υπολογισμός της *Hessian*, ώστε να έχουμε μια πλήρη βελτιστοποίηση της μεταβατικής κατάστασης. Για τους υπολογισμούς των *Hessians*, δηλαδή των δευτέρων παραγώγων της ενέργειας συναρτήσεως των πυρηνικών συντεταγμένων, το χρησιμοποιούμενο σετ βάσεων είναι επίσης το *LANL2DZ*.

Οι σχετικές ενέργειες και οι ενέργειες ενεργοποίησης

Στους θεωρητικούς υπολογισμούς στρέφουμε κυρίως το ενδιαφέρον μας στις *σχετικές ενέργειες* μεταξύ των βελτιστοποιημένων δομών των ενδιάμεσων προϊόντων καθώς επίσης και στις ενέργειες ενεργοποίησης. Οι ενέργειες ενεργοποίησης υπολογίζονται ως η ενεργειακή διαφορά μεταξύ του αντιδρώντος και μιας μεταβατικής κατάστασης. Η επιλογή του ευνοϊκότερου μεταξύ διαφορετικών ενδεχόμενων μηχανι-

^c **Σετ βάσεων** (σύνολο συναρτήσεων) είναι μια μαθηματική περιγραφή (αναπαράσταση) των μοριακών τροχιακών σε ένα μόριο. Το σετ βάσεων ορίζει μια ομάδα βασικών συναρτήσεων σε κάθε άτομο στο μόριο για την προσέγγιση των τροχιακών του. Αυτές οι βασικές συναρτήσεις προέρχονται από γραμμικό συνδυασμό συναρτήσεων *Gaussian* (*G*). Το σετ βάσεων μπορεί να ερμηνευτεί ως ο περιορισμός κάθε ηλεκτρονίου σε μια συγκεκριμένη περιοχή του χώρου. Μεγαλύτερα σετ βάσεων επιβάλουν λιγότερους περιορισμούς στα ηλεκτρόνια στο χώρο και προσεγγίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τα μοριακά τροχιακά. Ωστόσο, τέτοια σετ βάσεων απαιτούν μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ.

^d Το *double-ζ* σετ βάσεων σχηματίζει όλα τα μοριακά τροχιακά με γραμμικούς συνδυασμούς δύο μεγεθών συναρτήσεων για κάθε ατομικό τροχιακό.

σμών βασίζεται στη σύγκριση των ενεργειών ενεργοποίησης σε κάθε περίπτωση. Υψηλές ενέργειες ενεργοποίησης προϋποθέτουν αργές αντιδράσεις, γεγονός που δε χαρακτηρίζει τα ενζυμικά συστήματα που μελετώνται. Οι διαφορές μεταξύ των ενεργειών ενεργοποίησης βάσει των προσεγγιστικών μεταβατικών καταστάσεων και αυτών που υπολογίζονται από τις πλήρως βελτιστοποιημένες μεταβατικές καταστάσεις είναι μόλις λίγα kcal/mol, όπως παρατηρείται⁴. Για τους παραπάνω ενεργειακούς υπολογισμούς πραγματοποιούνται περαιτέρω βελτιστοποιήσεις των δομών των μεταβατικών καταστάσεων και των ενδιάμεσων χρησιμοποιώντας τη B3LYP μέθοδο με μεγαλύτερα σετ βάσεων που περιλαμβάνουν συναρτήσεις διάχυσης^e και ένα μοναδικό σετ συναρτήσεων πόλωσης^f σε κάθε άτομο.

Το πρωτεϊνικό περιβάλλον των μεταλλικών κέντρων στα ένζυμα

Στην εφαρμογή των θεωρητικών υπολογισμών για τα βιολογικά συστήματα που μελετώνται δε πρέπει να παραβλέπουμε το γεγονός ότι τα μεταλλικά κέντρα στα ένζυμα περιβάλλονται κυρίως από αμινοξικά κατάλοιπα και πιθανώς μόρια νερού. Αν και έχει βρεθεί γενικά ότι η επίδραση του περιβάλλοντος του μεταλλικού κέντρου, που μελετάται με την κβαντική μηχανική, στις διάφορες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις δεν είναι σημαντική ($\leq \pm 3$ kcal/mol), ωστόσο χρησιμοποιούνται μέθοδοι προσομοίωσης αυτού του περιβάλλοντος. Σε περίπτωση που διαπιστώνεται μεγάλη επίδραση του διηλεκτρικού δυναμικού στους υπολογισμούς, πιθανότατα το χημικό μοντέλο που επιλέχτηκε να μην είναι το κατάλληλο ανά περίπτωση. Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, απλές μεθόδους (μοντέλα διαλυτών) που περιλαμβάνουν κοιλότητες στο σχήμα των μορίων που μελετώνται⁹, είναι εφικτή η σχετικά ρεαλιστική αναπαράσταση της φυσιολογικής δράσης του ενζύμου. Η διηλεκτρική σταθερά (E) της πρωτεΐνης αποτελεί τη μόνη εμπειρική παράμετρο που εισάγεται στις παραπάνω μεθόδους, περιλαμβάνοντας και την επίδραση από τα μόρια του νερού. Η τιμή του E που χρησιμοποιεί-

^e Οι συναρτήσεις διάχυσης είναι μεγαλύτερες εκδόσεις των s- και p- τύπου συναρτήσεων (στις τυπικές συναρτήσεις σθένους-μεγέθους). Επιτρέπουν στα τροχιακά να καταλαμβάνουν μεγαλύτερη περιοχή του χώρου. Χρησιμοποιούνται σε συστήματα με τα ηλεκτρόνια να βρίσκονται σχετικά μακριά από τον πυρήνα. Τέτοιες βάσεις είναι οι 6-31+G(d) και 6-31++G(d) με συναρτήσεις διάχυσης στα βαριά άτομα η πρώτη και επιπλέον στα άτομα υδρογόνου η δεύτερη.

^f Πολωμένα σετ βάσεων προσθέτουν d συναρτήσεις στα άτομα άνθρακα, f συναρτήσεις στα μεταβατικά στοιχεία και μερικές από αυτές προσθέτουν και p συναρτήσεις στα άτομα υδρογόνου. Έτσι, περιγράφεται μαζί με το μέγεθος, επιπλέον και το σχήμα των τροχιακών ακριβέστερα. Παραδείγματα: 6-31G(d), 6-31G(d,p).

ται για τις διάφορες πρωτεΐνες, όπως και στην περίπτωση της κυτοχρωμικής c οξειδάσης είναι 4^{4,5}. Στο τελευταίο βήμα, λοιπόν, περιλαμβάνονται υπολογισμοί για τις επιδράσεις του διηλεκτρικού δυναμικού E στις ήδη βελτιστοποιημένες δομές που προσδιορίστηκαν στα προηγούμενα στάδια. Το διηλεκτρικό δυναμικό εισάγεται στους υπολογισμούς στο επίπεδο B3LYP, ωστόσο με το μικρότερο σετ βάσεων.

Τα μοντέλα διαλύτη που χρησιμοποιούνται για συστήματα σε μη υδατικά διαλύματα αναφέρονται ως *Self-Consistent Reaction Field (SCRF)* ή μέθοδοι αυτοσυνεπούς πεδίου αντίδρασης. Όλες οι μέθοδοι αυτές προσομοιώνουν το διαλύτη (ή πρωτεϊνικό περιβάλλον) ως ένα συνεχές και ομογενές μέσο διηλεκτρικής σταθεράς ϵ (το πεδίο αντίδρασης). Το σύστημα τοποθετείται σε μια κοιλότητα μέσα στο διαλυτικό μέσο. Οι διαφορές που παρουσιάζονται στα διάφορα μοντέλα *SCRF* εντοπίζονται, στη ουσία, στον τρόπο ορισμού της κοιλότητας αυτής και του πεδίου αντίδρασης. Στο **σχήμα 7** παρουσιάζονται τα διαφορετικά μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για τις μεθόδους *SCRF*. Στο πιο απλό *SCRF* μοντέλο (A) το σύστημα καταλαμβάνει μια σταθερή σφαιρική κοιλότητα ακτίνας a_0 στο μέσο-διαλύτη. Κάποιο δίπολο στο μόριο δημιουργεί επαγόμενο δίπολο στο μέσο, και το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται από το μέσο-δίπολο με τη σειρά του θα αλληλεπιδράσει με το μοριακό δίπολο, οδηγώντας στη συνολική σταθεροποίηση του συστήματος. Το δεύτερο μοντέλο (B) ορίζει την κοιλότητα ως την ένωση μιας σειράς εμπλεκόμενων σφαιρών. Η επίδραση της πολωσιμότητας του διαλύτη-μέσου αναπαρίσταται αριθμητικά, καθώς υπολογίζεται από αριθμητική ολοκλήρωση, όπως συμβαίνει και στα δύο επόμενα μοντέλα (C, D). Το μοντέλο *IPCM* (C) ορίζει την κοιλότητα ως μια επιφάνεια ίδιας πυκνότητας του μορίου. Αυτή η επιφάνεια προσδιορίζεται από μια επαναληπτική διαδικασία στην οποία πραγματοποιείται ένας αυτοσυνεπής κύκλος. Η σύγκλιση στον κύκλο γίνεται χρησιμοποιώντας την τρέχουσα κοιλότητα ισοπυκνότητας (*isodensity*). Η προκύπτουσα κυματοσυνάρτηση χρησιμοποιείται στον υπολογισμό μιας καινούριας κοιλότητας ισοπυκνότητας και στη συνέχεια ο κύκλος επαναλαμβάνεται μέχρι το σχήμα της κοιλότητας να μη μεταβάλλεται κατά τον *SCF* κύκλο. Με την παραπάνω διαδικασία, η επιφάνεια ισοπυκνότητας (*isodensity*) αντιστοιχεί στο ενεργό σχήμα του μορίου όσο δυνατό περισσότερο. Το τελευταίο μοντέλο (*SCIPCM*, D) περιλαμβάνει την επίδραση της διαλυτοποίησης ενσωματώνοντάς την στον κύκλο *SCF* του μοντέλου *IPCM*, παρά σε ένα επόμενο βήμα. Έτσι, το μοντέλο *SCIPCM* λαμβάνει υπόψη του τη σύζευξη μεταξύ της κοιλότητας και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας και περιλαμβάνει όρους σύζευξης που δεν υπάρχουν στην *IPCM* μέθοδο.



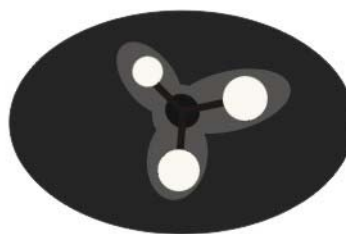
SCRF=Dipole



SCRF=PCM



SCRF=IPCM



SCRF=SCIPCM

σχήμα 7: Διάφορα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για να προσομοιώσουν το διαλύτη (ή πρωτεϊνικό περιβάλλον) στους θεωρητικούς υπολογισμούς

Το υπολογιστικό πακέτο που χρησιμοποιείται είναι το *GAUSSIAN*⁷ ή το *JAGUAR*⁸.

2.4 Μοντέλα μεταλλικών κέντρων στους θεωρητικούς υπολογισμούς για την κυτοχρωμική c οξειδάση

Εισαγωγικά, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι η επιλογή του μοντέλου που θα προσομοιώνει το ενεργό κέντρο ενός ενζύμου επηρεάζει και τα αποτελέσματα των θεωρητικών υπολογισμών. Σημαντική είναι, ωστόσο, η παρατήρηση ότι η επιλογή διαφορετικών υποκαταστατών για το μέταλλο στο μεταλλικό κέντρο δεν διαφοροποιεί ιδιαίτερα τα αποτελέσματα, σε αντίθεση με την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου που κατέχει καθοριστικό ρόλο στην έκβαση των υπολογισμών³. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η σύγκλιση στους υπολογισμούς επιτυγχάνεται ευκολότερα για μια σιδηρομαγνητική, παρά για την κατάλληλη αντισιδηρομαγνητική σύζευξη στα μεταλλικά κέντρα¹¹.

Το διπυρηνικό κέντρο στην κυτοχρωμική c οξειδάση, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποτελείται από δύο μέταλλα – ένα Cu_B υποκατεστημένο με τρεις ιστιδίνες (His) και ένα Fe_{a3} στην αίμη a₃ με πέμπτο υποκαταστάτη μια ιστιδίνη. Απλοποιώντας τους υπολογισμούς σε μια προσπάθειά μας να μειώσουμε τον αριθμό των ατόμων στα χρησιμοποιούμενα μοντέλα, οι ιστιδίνες μπορούν να αντικατασταθούν από ιμιδαζόλια (Im) και τα ιμιδαζόλια από αμμωνίες (NH₃⁺) σε ένα ακόμα απλούστερο υπό μελέτη σύστημα. Αν και στην αμμωνία δεν υπάρχει η ηλεκτρονιακή σύζευξη που εμφανίζεται στο ιμιδαζόλιο, ωστόσο, οι επιδράσεις στην ηλεκτρονιακή δομή εμφανίζονται παρόμοιες και στα δύο είδη υποκαταστατών (με μόλις 0.2 kcal/mol διαφορά στην ενέργεια ενεργοποίησης που υπολογίζεται³). Οι παραπάνω προσεγγίσεις στους υποκαταστάτες των μετάλλων πρέπει να λαμβάνουν υπόψη και την πιθανή αλλαγή που επιφέρουν στο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου του κέντρου. Η NH₃⁺, για παράδειγμα, ευνοεί τη δημιουργία περισσότερων δεσμών υδρογόνου από το ιμιδαζόλιο. Πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη επίδραση της διηλεκτρικής σταθεράς (μοντέλο διαλύτη) στους υπολογισμούς μπορεί να περιοριστεί χρησιμοποιώντας ένα περισσότερο ρεαλιστικό μοντέλο. Μια τέτοια επίδραση μπορεί να εμφανιστεί και σε περιπτώσεις όπου

στο σύστημα έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίου, χωρίς να έχουμε τη δυνατότητα χρήσης ρεαλιστικότερου μοντέλου, περιορίζοντας σχετικά την ακρίβεια των υπολογισμών¹⁰.

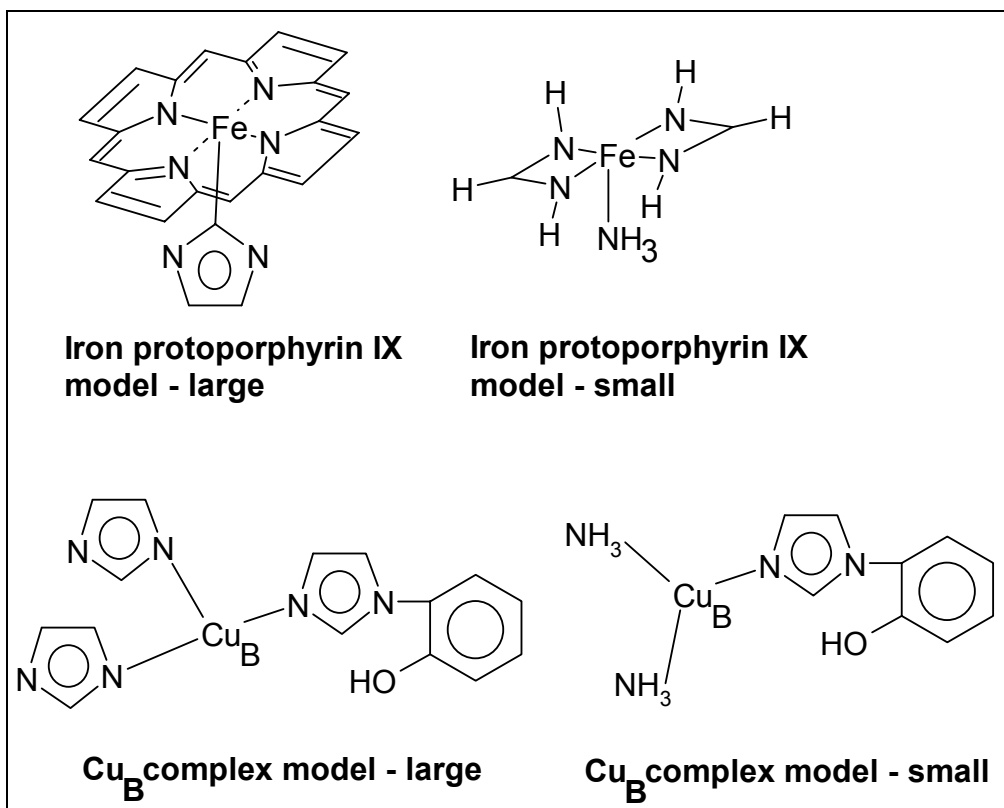
Το διπυρηνικό κέντρο Cu_B-Fe_{a3} στην κυτοχρωμική c οξειδάση

Οι *M.R.A. Blomberg et al.*^{3,4,5} έχουν προτείνει ορισμένα μοντέλα που προσομοιώνουν το διπυρηνικό κέντρο στη CcO, με τις ατομικές αποστάσεις σε αυτά να διατηρούνται σε όσο το δυνατό πλησιέστερες τιμές των αντιστοίχων από την κρυσταλλική δομή, κατά τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Χρησιμοποιούν σύνθετα ή απλούστερα μοντέλα, ανάλογα την περίπτωση και την απαιτούμενη ακρίβεια, χωρίς όμως ο αριθμός των ατόμων να ξεπερνάει τα 50, καθιστώντας τους υπολογισμούς μεταβατικών καταστάσεων εφικτούς.

Στο μεγαλύτερο μοντέλο του **Cu_B**, τα κατάλοιπα ιστιδίνων που συναρμολογούν τον **Cu_B** αντικαθίστανται από ιμιδαζόλια (**Im**) και το σύστημα ιστιδίνης-τυροσίνης στο ενεργό κέντρο αντικαθίσταται από φαινόλη ομοιοπολικά δεσμευμένη σε ιμιδαζόλιο (**N-C** ομοιοπολικός δεσμός). Ωστόσο, στο μοντέλο για το διπυρηνικό κέντρο, τα ιμιδαζόλια αντικαθίστανται από αμμωνίες, εκτός από το **Im** στο σύστημα ιμιδαζόλιου-φαινόλης. Στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου, ο **Cu_B** έχει αριθμό οξειδωσης +1, που μπορεί να εισαχθεί στους υπολογισμούς με δύο τρόπους: χρησιμοποιώντας θετικό φορτίο (+1) στο σύμπλοκο του **Cu_B** ή αποπρωτονιώνοντας ένα υποκαταστάτη ιμιδαζόλιο (ή αμμωνία) σχηματίζοντας ένα ουδέτερο σύμπλοκο. Το εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου στην κυτοχρωμική c οξειδάση που περιλαμβάνει και την **His290** (υποκαταστάτη του **Cu_B** στη CcO από τη μοσχαρίσια καρδιά) δίνει τη δυνατότητα στο σύμπλοκο να εναλλάσσεται – πιθανότατα – μεταξύ θετικά φορτισμένου και ουδέτερου ανάλογα με την κατάσταση πρωτονίωσης της **His290**¹². Στους υπολογισμούς χρησιμοποιείται το θετικό φορτίο (+1) στο σύμπλοκο **Cu_B**.

Για το σύμπλοκο **Fe-αίμη a₃** χρησιμοποιείται μια μη υποκατεστημένη πορφυρίνη, ενώ ο **5⁹⁵** υποκαταστάτης – ένα κατάλοιπο ιστιδίνης αντικαθίσταται από ιμιδαζόλιο (**Im**). Σε ένα απλούστερο μοντέλο, το οποίο και χρησιμοποιείται στους υπολογισμούς με το διπυρηνικό κέντρο, η πορφυρίνη αντικαθίσταται από δύο χηλικούς υποκαταστάτες **NH=CH-NH**, όπως και σε άλλες μελέτες με πορφυρίνη¹³, ενώ η αξονική ιστιδίνη από αμμωνία (**NH₃**).

Στο **σχήμα 8** παριστάνονται τα μοντέλα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω.



σχήμα 8: Μοντέλα για το ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης στους θεωρητικούς υπολογισμούς

Τα μεγαλύτερα μοντέλα χρησιμοποιούνται στην αποτίμηση της ακρίβειας των μικρότερων που χρησιμοποιούνται στο διπυρηνικό κέντρο και σε ορισμένες περιπτώσεις στις διορθωτικές επεμβάσεις στα αποτελέσματα από τα απλούστερα μοντέλα. Ωστόσο, όπως βρέθηκε, τα μικρότερα μοντέλα αναπαράγουν τα αποτελέσματα από τα μεγαλύτερα και πιο ρεαλιστικά σχετικά καλά⁵. Οι διορθώσεις που εισάγονται στους υπολογισμούς, με τα μεγαλύτερα μοντέλα, αφορούν κυρίως: α) την ισχύ του δεσμού **O–H** του νερού που είναι χαλαρά συναρμοσμένο στο χαλκό Cu_B (σύμπλοκο $\text{Cu}_B\text{-OH}_2$) που διαφέρει κατά +4.3 kcal/mol από το μεγαλύτερο στο μικρότερο μοντέλο, β) η ισχύς του δεσμού **O–H** στο σύμπλοκο $(\text{a}_3)\text{Fe(III)-O-O-H}$ (περόξυ ενδιάμεσο) που διαφέρει κατά +5.7 kcal/mol από το μικρότερο στο μεγαλύτερο μοντέλο^{4,5}. Η συγκεκριμένη σχετικά μεγάλη διαφορά στις ενέργειες δεσμού οφείλεται κυρίως στη μεγάλη ισχύ του δεσμού **Fe–O** στο $(\text{a}_3)\text{Fe(II)-O}_2$ είδος, όπως υπολογίζεται στα μοντέλα.

Ένα σημαντικό πρόβλημα που δεν έχει αντιμετωπιστεί ακόμα σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου που δεν ανταποκρίνονται στα δεδομένα της κρυσταλλικής δομής (πλασματικών) κατά τα βήματα μιας αντίδρασης ή η αδυναμία εισαγωγής δεσμών υδρογόνου στις θέσεις που απαιτούνται. Συνέπεια αυτής της δυσκολίας είναι ο συνυπολογισμός του σχηματισμού ή της διάσπασης δεσμών υδρογόνου στους υπολογισμούς σχετικών ενεργειών. Επειδή έχει παρατηρηθεί ότι η μεταβολή στους δεσμούς υδρογόνου είναι μικρότερη μεταβαίνοντας από το ενδιάμεσο στην αμέσως επόμενη μεταβατική κατάσταση (TS^\ddagger) οι ενέργειες ενεργοποίησης είναι σχετικά αξιόπιστες, σε αντίθεση με τις σχετικές ενέργειες μεταξύ ενδιάμεσων προϊόντων όπου απαιτείται μεγαλύτερη προσοχή στα εξαγόμενα συμπεράσματα.

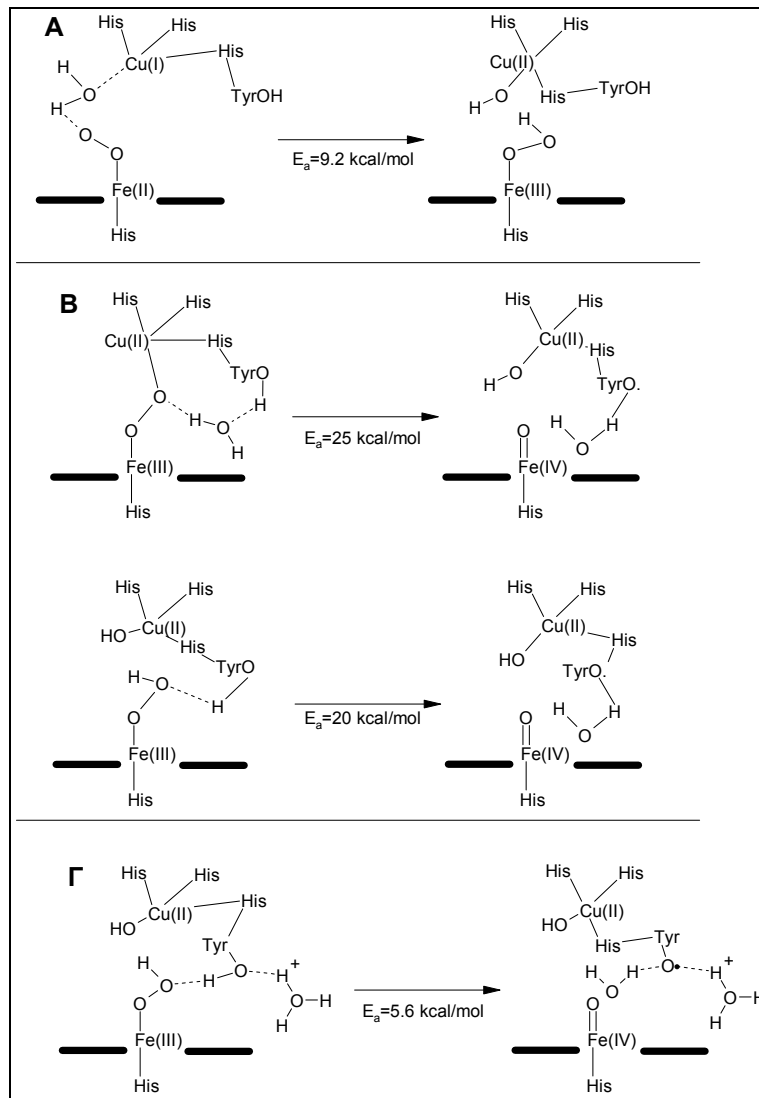
2.5 Θεωρητικές μηχανιστικές μελέτες του διπυρηνικού κέντρου χαλκού-σιδήρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης

Οι θεωρητικές μελέτες στην κυτοχρωμική c οξειδάση αφορούν το διπυρηνικό κέντρο $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{\text{a}_3}$ και συγκεκριμένα το στάδιο της σχάσης του δεσμού **O–O**, με τη σύγκριση των ενεργειών ενεργοποίησης και των σχετικών ενεργειών από διαφορετικούς πιθανούς μηχανισμούς. Όπως είναι γνωστό, η κυτοχρωμική c οξειδάση έχει υψηλό αριθμό μετατροπής (*turnover number* $\sim 1000 \text{ s}^{-1}$). Επιπλέον, μετατρέπει σχεδόν

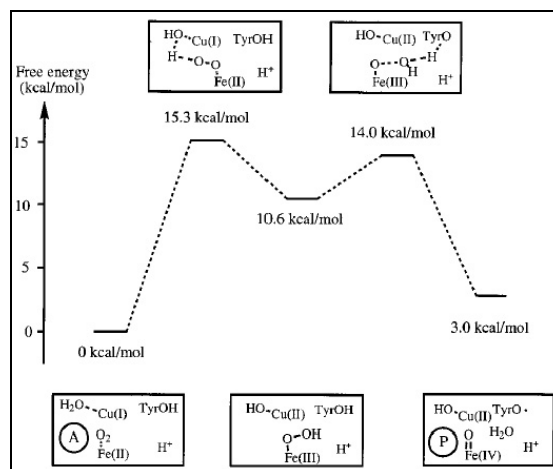
όλη την ελεύθερη ενέργεια αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε ATP. Έτσι, δε θα πρέπει να υπάρχουν υψηλές ενέργειες ενεργοποίησης σε οποιοδήποτε βήμα, διαφορετικά η όλη διαδικασία της αναγωγής θα ήταν πολύ αργή. Επίσης, κάθε επιμέρους αντίδραση (βήμα) θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από θερμοουδετερότητα, διαφορετικά η ενέργεια θα ελευθερωνόταν ως θερμότητα. Οι *Karpefors et al.*¹⁴ υπολόγισαν την ενέργεια ενεργοποίησης για τη σχάση του δεσμού στο μοριακό O₂ σε 6.4 kcal/mol από την κλίση της καμπύλης $\ln(k)$ ως προς $1/T$ (*Arrhenius plot*). Συμπερασματικά, μηχανισμοί που μελετώνται θεωρητικά, για να έχουν ισχύ *in vivo*, θα πρέπει να δίνουν ενέργειες ενεργοποίησης που κυμαίνονται όσο το δυνατό γύρω από αυτή την τιμή.

Αρχικές θεωρητικές μελέτες έδειξαν ότι ο δεσμός O–O μπορεί και σχάζεται στο επίπεδο αναγωγής κατά τρία ηλεκτρόνια, με σχεδόν θερμοουδέτερη αντίδραση, σχηματίζοντας ένα **όξο-φερρύλ** είδος και μια ρίζα τυροσίνης, ξεκινώντας από δύο διαφορετικές αρχικές δομές: μια γεφυρωμένη **Fe-O-O-Cu_B**, είτε μια **Fe-O-O-H** δομή, με το πρωτόνιο (H⁺) να προέρχεται από ένα μόριο H₂O κοντά στον **Cu_B**⁵. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις το ενεργειακό φράγμα της σχάσης του O₂ είναι απαγορευτικό (~ 30 kcal/mol), καθώς υπάρχει μια ασθενής ηλεκτρονιακή σύζευξη μεταξύ της τυροσίνης και του οξειδοαναγωγικά ενεργού κέντρου **Fe_{a3}**. Το ενδεχόμενο ύπαρξης είτε ρίζας τυροσίνης (παρέχοντας ηλεκτρόνιο και πρωτόνιο), ή πορφυρινικής ρίζας σε αυτό το στάδιο δε διασαφηνίζεται κατά τους υπολογισμούς, ωστόσο βρέθηκε ότι η ρίζα τυροσίνης δεν επηρεάζει τόσο ενεργειακά, όσο εμπλέκεται στην άντληση πρωτονίων που συζευγνύεται με την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου⁵. Στην περίπτωση της αρχικής δομής **Fe-O-O-H**, λαμβάνοντας υπόψη ότι η τυροσίνη (**His₂₇₆-Tyr₂₈₀OH/His₂₄₀-Tyr₂₄₄OH**) παρέχει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο κατά το στάδιο σχάσης του O₂, είναι αναγκαία η διαθεσιμότητα ενός επιπλέον πρωτονίου στο διπυρηνικό κέντρο, ώστε να μειωθεί η ενέργεια ενεργοποίησης της σχάσης^{4,5}. Μια πιθανή πηγή προέλευσης αυτού του επιπλέον πρωτονίου προτείνεται ότι είναι η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης *a*₃ που σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την τυροσίνη στο ενεργό κέντρο και βρίσκεται στο τέλος του K-καναλιού μεταφοράς πρωτονίων. Το υδροξύλιο –OH της φαρνεσυλική αλυσίδας σε συντονισμό με το σύστημα των πτροχιακών της αίμης *a*₃ έχει υψηλή πρωτονιακή συγγένεια.

Στο **σχήμα 9** παρουσιάζονται ορισμένοι μηχανισμοί που έχουν μελετηθεί^{4,5} στο διπυρηνικό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης, καθώς επίσης και οι ενέργειες ενεργοποίησης που αντιστοιχούν στον καθένα⁴:



Σχήμα 9: Στάδια – μηχανισμοί της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από την CcO που έχουν μελετηθεί με θεωρητικούς υπολογισμούς. E_a οι ενέργειες ενεργοποίησης σε κάθε βήμα.



Σχήμα 10: Ενέργειες ενεργοποίησης κατά την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου στην CcO (προτεινόμενος μηχανισμός).

(Α) Ένα μόριο H_2O κοντά στο κέντρο Cu_B παρέχει ένα πρωτόνιο H^+ στο *όξυ* Fe-O_2 ενδιάμεσο και ο χαλκός παρέχει ένα ηλεκτρόνιο μεταβαίνοντας σε +2 οξειδωτική κατάσταση, σχηματίζοντας τα ενδιάμεσα Fe(III)-O-O-H και $\text{Cu}_B(\text{II})-\text{OH}$. Το Fe(III)-O-O-H σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την TyrOH . Η πολλαπλότητα για το διπυρηνικό κέντρο $\text{Fe(III)-Cu}_B(\text{II})$ είναι **3** (*triplet*), με σιδηρομαγνητική σύζευξη.

(Β) Ένα μόριο H_2O σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του *distal* οξυγόνου στο Fe-O-O-Cu_B ενδιάμεσο και της τυροσίνης. Η τυροσίνη προσφέρει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο κατά τη σχάση του δεσμού στο μοριακό οξυγόνο.

(Γ) Εναλλακτικά του (Β), το τρίτο ηλεκτρόνιο προέρχεται από την αίμη $\text{a}_3\text{-Fe}$ και η τυροσίνη δε παρέχει το πρωτόνιο για τη σχάση του O-O δεσμού, αλλά αυτό προέρχεται από – πιθανότατα – τη φαρνεσυλική αλυσίδα (H_3O^+ στο σχήμα). Σε αυτή την περίπτωση υποστηρίζεται ότι η σχηματιζόμενη ρίζα μεταφέρεται από την πορφυρίνη στην τυροσίνη σε ένα εξώθερμο βήμα αμέσως μετά τη σχάση του δεσμού O-O , καθώς δεν ανιχνεύονται πορφυρινικές ρίζες. Ο σχηματισμός της ρίζας TyrO^\bullet από την τυροσίνη ευνοείται μόνο στην περίπτωση που η τυροσίνη δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με μια σχετικά ισχυρή βάση¹⁰. Η φαρνεσυλική αλυσίδα, ως βάση, μειώνει το δυναμικό ιονισμού της τυροσίνης σε τιμές μικρότερες αυτών του πορφυρινικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα τον απεντοπισμό της ρίζας στο προϊόν μεταξύ τυροσίνης και πορφυρινικού δακτυλίου. Έχει προταθεί, επίσης, ότι το επιπλέον πρωτόνιο H^+ στο τέλος της αντίδρασης σχάσης του δεσμού O-O πηγαίνει στην υδρόξυ ομάδα του Cu_B , ευνοώντας τη ρίζα τυροσίνης, καθώς το $\text{Cu}_B\text{-OH}_2$ είναι ισχυρότερη βάση από το υδροξύλιο της φαρνεσυλικής αλυσίδας⁴.

Οι υπολογισμοί δείχνουν ότι ένα ενδιάμεσο $\text{Cu}_B(\text{III})$ είναι λιγότερο σταθερό κατά 7 kcal/mol σε σύγκριση με το σχηματισμό της ρίζας του καταλοίπου της τυροσίνης⁴.

Συγκρίνοντας τις διάφορες ενέργειες ενεργοποίησης, οι *Blomberg et al.*⁴ πρότειναν το μηχανισμό του **σχήματος 10**, για την ενεργοποίηση και αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, όπου το καθοριστικό για την ταχύτητα της αναγωγής βήμα είναι η σχάση του μορίου του H_2O και ο σχηματισμός του Fe-O-O-H ενδιαμέσου. Αυτό το βήμα χαρακτηρίζεται από μεγάλο εντροπικό περιεχόμενο, πράγμα που δικαιολογεί και τη χαμηλή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης αναγωγής του O_2 από τη θερμοκρασία. Όπως διαπιστώνεται από τον προτεινόμενο μηχανισμό, το $\text{Fe(III)-O}_2\text{H}$

περόξυ ενδιάμεσο δεν είναι αρκετά σταθερό, με αποτέλεσμα ο δεσμός O–O να σχάζεται με χαμηλό ενεργειακό φράγμα.

Ωστόσο, οι *Bassan et al.*¹⁵, σε θεωρητικές μελέτες για την στερεοειδική οξείδωση υδρογονανθράκων, παρουσία H₂O₂, από σύμπλοκα **Fe(TPA)[§]**, προτείνουν ότι η ετερολυτική σχάση του δεσμού O–O είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ενός υψηλού σθένους Fe-όξο είδους **Fe^V=O** που οδηγεί στη στερεοειδική υδροξυλίωση των αλκενίων. Ενώ, η ομολυτική σχάση του δεσμού οδηγεί στο σχηματισμό ενός **Fe^{IV}=O** είδους και μιας ρίζας **•OH**. Έτσι, στην παραπάνω αντίδραση και τα δύο ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την ετερολυτική σχάση του δεσμού **O–O** παρέχονται από το σίδηρο, οξειδώνοντάς τον στην +5 κατάσταση. Το **Fe^V=O** ενδιάμεσο μπορεί να συγκριθεί με το ενδιάμεσο είδος **[(porf)Fe^{IV}=O]⁺** στο κυτόχρωμα **P450**, όπου ο πορφυρινικός δακτύλιος παρέχει το ένα ηλεκτρόνιο, σχηματίζοντας την πορφυρινική ρίζα, ενώ ο σίδηρος οξειδώνεται μέχρι την +4 (**φερρύλ**) κατάσταση. Από τα παραπάνω, γίνεται κατανοητό ότι μια κατάσταση **Fe^V** για το σίδηρο της αίμης *a₃* θα μπορούσε να είναι εφικτή, αν και δεν έχουν ανιχνευτεί τα αντίστοιχα ενδιάμεσα, καθιστώντας τον Fe_{a₃} ως την πηγή του τρίτου ηλεκτρονίου που απαιτείται για τη σχάση του δεσμού στο μοριακό οξυγόνο.

Βιβλιογραφία

- [1] Wasserman, E. P.; Morse, C. B.; Bergman, R. G. *SCIENCE* **1992**, *255*, 315.
- [2] Becke, A. D. *Phys. Rev.* **1988**, *A38*, 3098-3100.
- [3] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9375-9386.
- [4] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12848-12858.
- [5] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 261-269.
- [6] Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299-310.
- [7] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millan, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.;

[§] TPA= tris (2-pyridylmethyl) amine

Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A.; *Gaussian 98*; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, **1998**.

[8] Jaguar 4.0; Schrödinger Inc., Portland, OR, **2000**.

[9] a. Tomasi, J.; Persico, M. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027-2094.

b. Wiberg, K. B.; Keith, T. A.; Frisch, M. J.; Murcko, M. J. *Phys. Chem.* **1995**, *99*, 9072-9079.

[10] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8812-8824.

[11] Dismukes, G. C. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2909-2926.

[12] Tsukahara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *SCIENCE* **1995**, *269*, 1069-1074.

[13] a. Sigfridsson, E.; Ryde, U. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 99-110.

b. Newton, J. E.; Hall, M. B. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4627-4632.

[14] Karpefors, M.; Adlroth, P.; Namslaur, A.; Zhen, Y.; Brzezinski, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14664-14669.

[15] Bassan, A.; Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Que, L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11056-11063.

[16] a. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 2155-2160.

b. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 9173-9177.

c. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.

[17] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Trucks, G. W.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 7221-7230.

[18] Curtiss, L. A.; Raghavachari, K.; Redfern, R. C.; Rassolov, V.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 7764-7776.

[19] Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 421-437.

[20] Ανδριώτη, Α. Ν. *Υπολογιστική Φυσική* **1999**, τόμος II, Αθήνα.

[21] Gaussian 98, User's Reference, Second Edition (v. 6.1) **1999**. *Gaussian Inc.*

[22] Fores, J. B.; Frisch, A. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian*. Second Edition **1996**. Paperback, Gaussian Inc.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III – ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΔΟΝΗΤΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ FTIR ΚΑΙ RAMAN

3.1 Εισαγωγή

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες x, κλπ.) με την ύλη. Τα μόρια, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει. Ένα μόριο δεν αλληλεπιδρά με κάθε είδος ακτινοβολίας που θα συναντήσει, αλλά μόνο με αυτή που φέρει τη σωστή ποσότητα ενέργειας, ώστε να το προάγει από ένα ξεχωριστό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Με ακτινοβολία (φως) υπέρυθρων συχνοτήτων ($100\text{-}5000\text{ cm}^{-1}$) το μόριο μπορεί να μεταβεί από ένα δονητικό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Η ενέργεια μιας τέτοιας ακτινοβολίας ($1.2\text{-}60\text{ KJ/mol}$) είναι αρκετή, ώστε να προκαλέσει δονήσεις στα μόρια που την απορροφούν. Ωστόσο, οι περιστροφικές ενέργειες των μορίων είναι ακόμα μικρότερες

από τις δονητικές, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ακτινοβολία να είναι ικανή να προκαλέσει παράλληλα και περιστροφικές μεταπτώσεις. Στην περίπτωση αυτή, η φασματοσκοπία ονομάζεται *δονητική (vibrational spectroscopy)*. Τα δονητικά φάσματα συνήθως μετρούνται με δύο διαφορετικές τεχνικές. Στην υπέρυθη (IR) φασματοσκοπία, φως όλων των διαφορετικών συχνοτήτων περνάει μέσα από ένα δείγμα και μετράται η ένταση του φωτός που διαπερνά σε κάθε συχνότητα. Στη φασματοσκοπία *Raman* μελετάμε το φως που σκεδάζεται από το δείγμα και όχι αυτό που διαπερνά. Στην περίπτωση αυτή, χρησιμοποιείται φως μιας συχνότητας (*μονοχρωματική ακτινοβολία*) και μάλιστα μεγαλύτερης συχνότητας από τις υπέρυθρες, καθώς μετρώνται οι διαφορές $|ν_0 - ν_i|^h$ της *Raman* σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, με το $\Delta E = h |ν_0 - ν_i|$ να αντιστοιχεί σε ενέργειες που απορροφώνται από το δείγμα.

3.2 Η φασματοσκοπία υπέρυθρου *FT-IR*

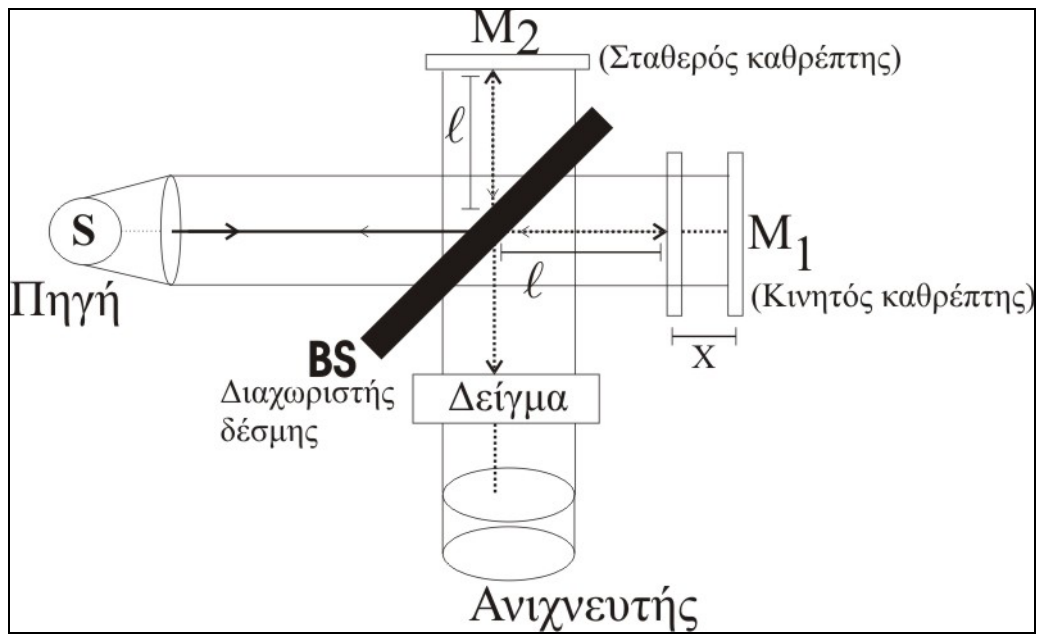
3.2.1 Το συμβολόμετρο του MICHELSON

Τα περισσότερα συμβολόμετρα (*interferometers*) που χρησιμοποιούνται σήμερα στην υπέρυθη φασματοσκοπία έχουν τη θεωρητική τους βάση στο συμβολόμετρο δύο δεσμών που σχεδίασε ο Michelson το 1821 (**σχήμα 11**). Παρακάτω θα γίνει μια αναφορά στον τρόπο λειτουργίας του συμβολόμετρου αυτού και στη μέτρηση του υπέρυθρου φάσματος.

Η βασική αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου του Michelson είναι ο διαχωρισμός μιας δέσμης ακτινοβολίας σε δύο πορείες και στη συνέχεια ο ανασυνδυασμός των δύο δεσμών μετά την εισαγωγή μιας διαφοράς φάσης διαδρομής. Δέσμη ακτινοβολίας από μια εξωτερική πηγή προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης που βρίσκεται μεταξύ δύο κάθετων μεταξύ τους καθρεπτών. Ο ένας μπορεί και κινείται με σταθερή ταχύτητα ή να καταλαμβάνει διακριτές θέσεις ανά σταθερά τμήματα κατά μήκος ενός άξονα κάθετου στο επίπεδό του και για σταθερά μικρά χρονικά διαστήματα (κινούμενος καθρέπτης). Ο δεύτερος καθρέπτης είναι σταθερός.

Η δέσμη, περνώντας από το διαχωριστή δέσμης, ανακλάται μερικώς στο σταθερό καθρέπτη στο σημείο M_2 και αναμεταδίδεται μερικώς στον κινούμενο καθρέπτη

^h Οι διαφορές $|ν_0 - ν_i|$ βρίσκονται στην υπέρυθη περιοχή συχνοτήτων.



Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση του συμβολόμετρου του MICHELSON. Τα μικρότερα βέλη δείχνουν την ακτινοβολία που ανακλάται από τους καθρέπτες M_1 και M_2 , καθώς και την ακτινοβολία που επιστρέφει στην πηγή.

στο σημείο M_1 . Οι δύο δέσμες ανακλώνται πίσω στο διαχωριστή δέσμης όπου και αλληλεπιδρούν. Η δέσμη που ανακλάται από το σημείο M_2 έχει διανύσει συνολικά απόσταση $2l$, μέχρι το διαχωριστή δέσμης, ενώ αυτή από το σημείο M_1 , απόσταση συνολικά $2(l+x)$, καθώς το σημείο M_1 μπορεί και κινείται. Οι αλληλεπιδρούμενες δέσμες ανακλώνται και αναμεταδίδονται μερικώς και πάλι. Κατά την αλληλεπίδραση, η ένταση κάθε δέσμης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη διαφορά $\delta=2x$. Στο φασματοφωτόμετρο, μετράμε την ένταση της ακτινοβολίας συναρτήσει της μετατόπισης x και προκύπτει το συμβολογράφημα. Με μετασχηματισμό Fourier στο συμβολογράφημα παίρνουμε το φάσμα απλής δέσμης (*single-beam spectrum*). Παρά το γεγονός ότι οι δύο δέσμες περιέχουν τις ίδιες πληροφορίες, συνήθως ανιχνευτής υπάρχει για την κάθετη της δέσμης από την πηγή. Η δέσμη αυτή διέρχεται από το δείγμα και τελικά φτάνει στον ανιχνευτή.

Για μια μονοχρωματική πηγή $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$, όταν $\delta=0$, όλη η ακτινοβολία από την πηγή φτάνει στον ανιχνευτή (σε ένα ιδανικό διαχωριστή δέσμης), ενώ για $\delta=\lambda/2$, στον ανιχνευτή δε φτάνει δέσμη. Γενικά, η ένταση $I(\delta)$ της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή είναι: $I(\delta) = 0.5I(\bar{\nu})[1 + \cos(2\pi\bar{\nu}\delta)]$, ενώ όταν $\delta=n\lambda$, με n ακέραιο, είναι $I(\delta) = I(\bar{\nu})$. Το συμβολογράφημα, στην περίπτωση αυτή, δίνεται από τη σχέση: $I(\delta) = 0.5I(\bar{\nu})\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)$. Εισάγοντας την παράμετρο $B(\bar{\nu}) = 0.5H(\bar{\nu})I(\bar{\nu})$ που αντιστοιχεί στην ένταση της ακτινοβολίας της πηγής σε μήκος κύματος $\bar{\nu}$ τροποποιημένα από τα χαρακτηριστικά του συμβολόμετρου (μη ιδανικό), παίρνουμε το συμβολογράφημα: $I(\delta) = B(\bar{\nu})\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)$. Το φάσμα υπολογίζεται από το συμβολογράφημα ως το συνημίτονωειδές της *Fourier μετατροπής* του $I(\delta)$.

Στην περίπτωση πολυχρωματικής συνεχούς πηγής, το συμβολογράφημα δίνεται από τη σχέση: $I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\bar{\nu})\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\bar{\nu}$, με $B(\bar{\nu}) = \int_0^{+\infty} I(\delta)\cos(2\pi\bar{\nu}\delta)d\delta$. Το $B(\bar{\nu})$ είναι το φάσμα απλής δέσμης (*single-beam spectra*) που αναφέρθηκε παραπάνω.

3.2.2 Δονητική φασματοσκοπία, μηχανική και κβαντική προσέγγιση

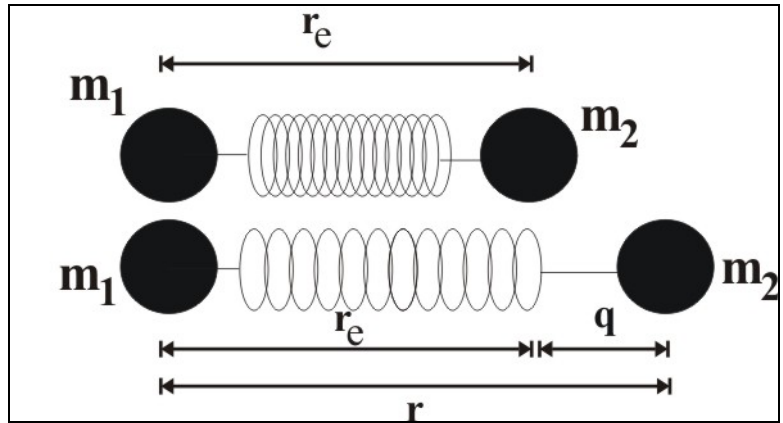
Στη φασματοσκοπία **υπερύθρου** μελετάμε την απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I_0) σε κάθε δονητική μετάβαση. Σύμφωνα με το νόμο των *Lambert-Beer*, η ένταση της IR ακτινοβολίας που δεν απορροφάται από το δείγμα θα είναι: $I = I_0 e^{-\epsilon Cd}$, όπου ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, d (cm) είναι το μήκος της κυψελίδας όπου βρίσκεται το δείγμα και C (M) είναι η συγκέντρωση του δείγματος. Η % διαπερατότητα T ορίζεται ως $T(\%) = \frac{I}{I_0} \times 100$, ενώ η απορρόφηση A ως: $A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon Cd$. Στα φάσματα IR συνήθως αναφέρεται η απορρόφηση συναρτήσει του κυματάριθμου $\bar{\nu} = 1/\lambda$. Στη φασματοσκοπία υπέρυθρου, το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο του φωτός αλληλεπιδρά με το μόριο στην περίπτωση που έχει διπολική ροπή μ . Χωρίς διπολική ροπή, δεν έχουμε δυνάμεις που μεταβάλουν το μόριο (όχι περιστροφικές και δονητικές μεταβάσεις). Για τις δονητικές μεταβάσεις, η διπολική ροπή μ πρέπει να μεταβάλλεται: ως κανόνας επιλογής $\left(\frac{\partial \mu}{\partial q} \right) \neq 0$, με q μια κανονική συντεταγμένη του μορίου.

Στην περίπτωση ενός διατομικού μορίου, θεωρούμε ότι η συμπεριφορά των πυρήνων κατά τη δόνηση είναι αντίστοιχη των δύο σφαιρών στον αρμονικό ταλαντωτή (**σχήμα 12**). Με την εφαρμογή του νόμου του *Hooke*, η δύναμη επαναφοράς F , δίνεται από τη σχέση: $F = -kq$, με το k να είναι η σταθερά επαναφοράς (N/m) και το q να παίρνει τιμές $q = r - r_0$. Το δυναμικό για τον αρμονικό ταλαντωτή, σε αυτή την περίπτωση, είναι: $dV = -Fdq = +kq dq \Rightarrow V = (1/2)kq^2$. Σύμφωνα με την κβαντική προσέγγιση για τον αρμονικό ταλαντωτή, ένα μόριο ανηγμένης μάζας μ μπορεί να έχει μόνο διακριτά ενεργειακά δονητικά επίπεδα που αντιστοιχούν στον κβαντικό αριθμό ν :

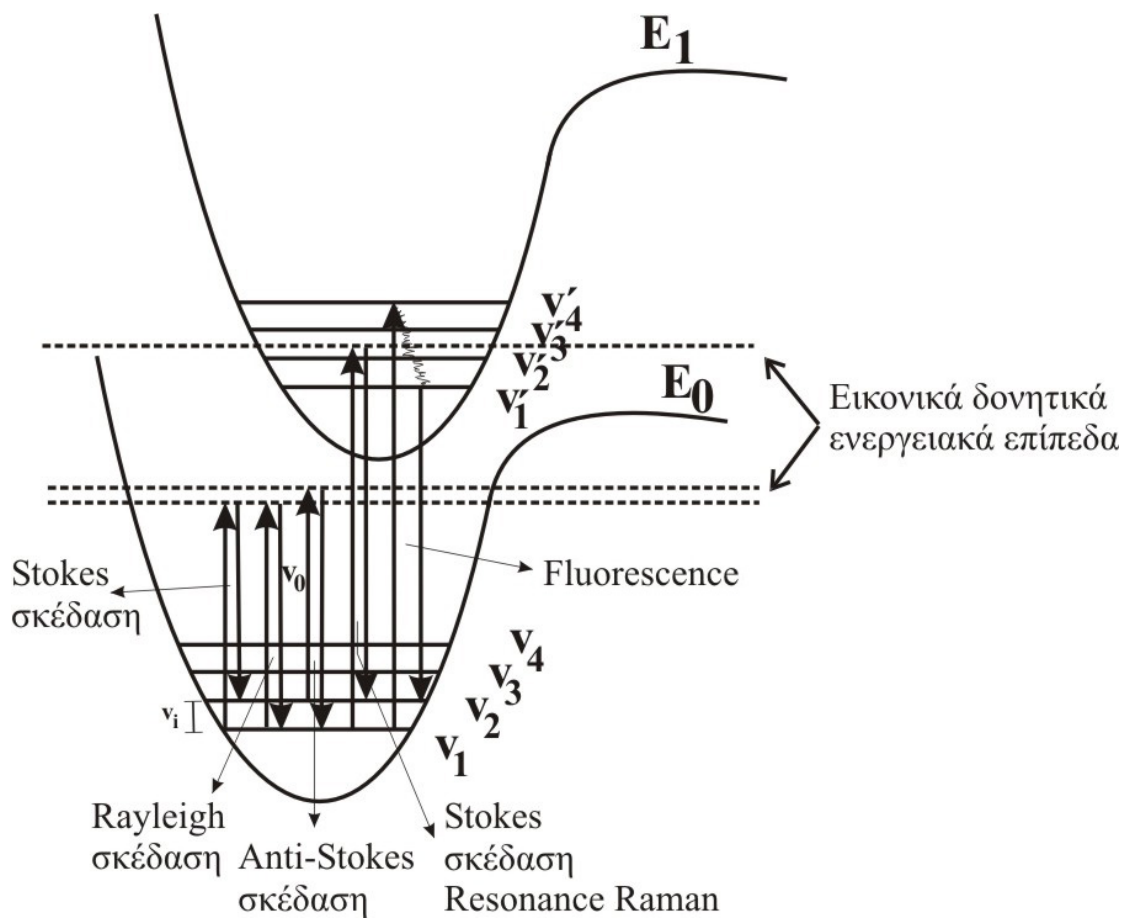
$$E_\nu = (\nu + 1/2) \frac{h}{2\pi} \sqrt{k/\mu} \equiv (\nu + 1/2)h\omega, \text{ με } \omega = \frac{1}{2\pi} \sqrt{k/\mu}, \nu = 0, 1, 2, 3, \dots$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Στην προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή, το μόριο έχει ισάπεχοντα δονητικά ενεργειακά επίπεδα ($\Delta E = +h\omega$) και ενέργεια μηδενικού σημείου $(1/2)h\omega$. Από τα δονητικά φάσματα διατομικών μορίων μπορούμε να υπολογίσουμε την σταθερά επαναφοράς (ισχύ) του χημικού δεσμού.



Σχήμα 12: Ο αρμονικός ταλαντωτής



Σχήμα 13: Το φαινόμενο Raman σχηματικά. E_0 και E_1 αφορούν ηλεκτρονιακές ενεργειακές καταστάσεις και v_1, v_2, v_3 και v_4 τα δονητικά ενεργειακά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης (E_0).

Ωστόσο, στη φύση, τα μόρια δε μπορούν να περιγραφούν ικανοποιητικά από το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή, καθώς με την αύξηση του δονητικού κβαντικού αριθμού, η ενέργεια μετάβασης μειώνεται έως ότου το μόριο σε κάποιο σημείο να διασπαστεί. Το δυναμικό “πηγάδι” ενός μορίου περιγράφεται σχετικά καλά από το δυναμικό του *Morse*: $V = D_e(1 - e^{-\beta q})^2$, όπου D_e είναι το βάθος του “πηγαδιού” δυναμικού και το β είναι μια παράμετρος της καμπυλότητας στον πάτο του “πηγαδιού”. Στην περίπτωση αυτή, τα ενεργειακά επίπεδα από το δυναμικό του *Morse*, έχουν ως εξής: $\bar{E} = \bar{\omega}_e(v + 1/2) - \bar{\omega}_e x_e(v + 1/2)^2$, όπου το $\bar{\omega}_e$ είναι κατ’αντιστοιχία με τον αρμονικό ταλαντωτή και το $\bar{\omega}_e x_e$ αντιπροσωπεύει την αναρμονική διόρθωση. Με το δυναμικό *Morse*, η διαφορά ενέργειας σε μια δονητική διέγερση (από το κατώτερο ενεργειακά επίπεδο) στο διατομικό μόριο είναι: $\Delta\bar{E} = \bar{E}_v - \bar{E}_0$, δηλαδή: $\Delta\bar{E} = \bar{\omega}_e v - \bar{\omega}_e x_e v(v + 1)$.

Στην περίπτωση των πολυατομικών μορίων, οι δονήσεις είναι περισσότερο πολύπλοκες και περιγράφονται από ένα σύστημα συζευγμένων μη αρμονικών ταλαντωτών. Γενικά, ένα μόριο με N άτομα θα έχει $3N - 6$ ανεξάρτητες βασικές δονήσεις (*modes of vibration*)ⁱ. Ένα γραμμικό μόριο θα έχει $3N - 5$ ανεξάρτητες βασικές δονήσεις (ή εσωτερικούς βαθμούς ελευθερίας). Το δονητικό φάσμα ενός πολυατομικού μορίου σχηματίζεται από τις εσωτερικές κινήσεις του. Οι εσωτερικές κινήσεις του μορίου είναι οι συνισταμένες των βασικών του δονήσεων (συζευγμένο σύστημα ανεξάρτητων αρμονικών ταλαντωτών).

Γίνεται κατανοητό από τα παραπάνω ότι το δονητικό του φάσμα χαρακτηρίζει απόλυτα ένα μόριο.

3.3 Η Φασματοσκοπία *Raman*

3.3.1 Περιγραφή του φαινομένου *Raman* με την κλασσική μηχανική

Στη φασματοσκοπία *Raman*, το δείγμα αλληλεπιδρά με ακτινοβολία (ν_0) στη *UV-Visible* περιοχή του φάσματος και το σκεδαζόμενο φως παρατηρείται συνήθως σε

ⁱ Στον κανονικό τρόπο δόνησης, όλα τα άτομα του μορίου δονούνται με την ίδια συχνότητα και περνούν ταυτόχρονα από τις θέσεις ισορροπίας τους.

κατεύθυνση κάθετη αυτής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 13**, το σκεδαζόμενο φως είναι δύο ειδών: το σκεδαζόμενο Rayleigh, που είναι μεγαλύτερης έντασης και έχει την ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία (ν_0) και το σκεδαζόμενο Raman, που είναι αρκετά ασθενέστερο ($\sim 10^{-5}$ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας), και έχει συχνότητες $\nu_0 \pm \nu_i$, όπου ν_i είναι μια δονητική συχνότητα του μορίου. Οι γραμμές $\nu_0 + \nu_i$ και $\nu_0 - \nu_i$, που προκύπτουν από ανελαστική σκέδαση του φωτός, ονομάζονται **anti-Stokes** και **Stokes** αντίστοιχα. Για τις Stokes γραμμές, το μόριο από το βασικό δονητικό επίπεδο ν_1 διεγείρεται, απορροφώντας ενέργεια $h\nu_0$, σε ένα ενεργειακό εικονικό επίπεδο από το οποίο αποδιεγείρεται στο διεγερμένο δονητικό επίπεδο ν_2 της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης, εκπέμποντας ακτινοβολία $\nu_0 - \nu_i$, με $h\nu_i = E(\nu_2) - E(\nu_1)$. Στην περίπτωση που το μόριο βρίσκεται ήδη σε διεγερμένο δονητικό επίπεδο ν_2 , διεγείρεται σε εικονικό δονητικό επίπεδο από το οποίο μεταβαίνει στο δονητικό επίπεδο ν_1 , κατά την αποδιέγερση, εκπέμποντας ακτινοβολία συχνότητας $\nu + \nu_i$. Στη φασματοσκοπία *Raman* μετράμε τη δονητική συχνότητα ν_i ως μετατόπιση από την προσπίπτουσα ακτινοβολία ν_0 και το φάσμα *Raman* παριστάνει την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός συναρτήσει της μετατόπισης της συχνότητας $\Delta\nu = \nu_0 - \nu_i$ μεταξύ της προσπίπτουσας ν_0 και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ν_i . Κορυφές σε ένα τέτοιο φάσμα αντιστοιχούν σε μεταβάσεις μεταξύ δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης, αποκαλύπτοντας τη δυναμική της. Η συχνότητα, η ένταση και η πόλωση του σκεδαζόμενου *Raman* φωτός εξαρτώνται από τη φύση των μορίων (δείκτης της μοριακής δομής).

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, E , της προσπίπτουσας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, δίνεται από τη σχέση: $E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$, με t τον χρόνο, E_0 το πλάτος και ν_0 τη συχνότητα του *laser*. Η ηλεκτρική διπολική ροπή P που επάγεται σε διατομικό μόριο που δέχεται την παραπάνω ακτινοβολία δίνεται από την εξίσωση:

$$P = \alpha E \Rightarrow P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$$

Το α είναι ο παράγοντας *πλωσιμότητα* του μορίου. Καθώς το μόριο δονείται με συχνότητα ν_i , η μετατόπιση του πυρήνα του q , θα περιγράφεται από τη σχέση:

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_i t)$$

Το α είναι γραμμική συνάρτηση του q για μικρές τιμές του q_0 (πλάτος της δόνησης):

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 + \dots$$

Το α_0 είναι η πολωσιμότητα του μορίου στην κατάσταση ισορροπίας, και $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0$ είναι ο ρυθμός μεταβολής του α σε σχέση με τη μεταβολή του q στην κατάσταση ισορροπίας.

Από τα παραπάνω, η επαγόμενη διπολική ροπή P θα δίνεται από την εξίσωση:

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \Rightarrow$$

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \Rightarrow$$

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_i t) \Rightarrow$$

$$P = \underbrace{\alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)}_{P_1} + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_i)t]}_{P_2} + \underbrace{\frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 q_0 E_0 \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_i)t]}_{P_3}$$

Από την παραπάνω εξίσωση, ο πρώτος όρος (P_1) αντιστοιχεί σε ένα δίπολο που ταλαντώνεται και εκπέμπει ακτινοβολία συχνότητας ν_0 (σκέδαση *Rayleigh*), ο δεύτερος (P_2) αντιστοιχεί στη σκέδαση *Raman*, συχνότητας $\nu_0 + \nu_i$ (γραμμή *anti-Stokes*), ενώ ο τρίτος (P_3) αντιστοιχεί στη σκέδαση *Raman*, συχνότητας $\nu_0 - \nu_i$ (γραμμή *Stokes*). Στην περίπτωση, όπου $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q} \right)_0 \neq 0$ έχουμε ενεργή δόνηση στο *Raman*, δηλαδή ο ρυθμός αλλαγής της πολωσιμότητας (α) με την δόνηση πρέπει να είναι διάφορος του μηδενός.

Όπως φαίνεται στο **σχήμα 13**, η ακτινοβολία συχνότητας ν_0 επιλέγεται, έτσι ώστε η ενέργειά της να είναι πολύ χαμηλότερη από την πρώτη ηλεκτρονιακή διεγερμένη κατάσταση. Ο πληθυσμός των μορίων στο δονητικό επίπεδο $v=0$ είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν για το $v=1$ δονητικό επίπεδο στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση (από κατανομή *Maxwell-Boltzman*). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, επομένως, οι γραμμές *Stokes* έχουν μεγαλύτερη ένταση από τις *anti-Stokes* και καθώς δίνουν τις ίδιες πληροφορίες, στο φάσμα *Raman* μελετάμε τη *Stoke* περιοχή.

Στη σκέδαση *Raman*, επιλέγουμε την προσπίπτουσα ακτινοβολία με συχνότητα ν_0 μακριά από συχνότητα συντονισμού (ηλεκτρονιακής μετάβασης). Σκέδαση συντο-

νισμού *Raman* (**Resonance Raman Scattering**) συμβαίνει όταν σε ένα μόριο η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει συχνότητα στην περιοχή μιας ηλεκτρονιακής του μετάβασης. Με το φαινόμενο αυτό, η σκέδαση *Raman* ενισχύεται σε σημαντικό βαθμό. Το φαινόμενο συντονισμού *Raman* έχει εφαρμογές στη βιολογία για τη μελέτη χρωμοφώρων μεταλλοπρωτεϊνών ή μακρομορίων. Το φάσμα συντονισμού *Raman* εμφανίζεται ισχυρά ενισχυμένο στις μπάντες απορρόφησης της περιοχής της ηλεκτρονιακής μετάβασης. Η **Resonance Fluorescence** διαδικασία λαμβάνει χώρα όταν το μόριο διεγείρεται σε ένα διακριτό ενεργειακό επίπεδο της διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης E_1 (σχήμα 13). Φάσματα **Fluorescence** παρατηρούνται όταν το διεγερμένο μόριο μεταβαίνει στο κατώτερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο μέσω μεταβάσεων χωρίς εκπομπές ακτινοβολίας. Ακτινοβολία εκπέμπεται στο τέλος της μετάβασης.

3.3.2 Η Κβαντική θεώρηση του φαινομένου *Raman*

Η ολική ένταση της ακτινοβολίας που σκεδάζεται σε γωνία 4π κατά τη διαδικασία *Raman*, δίνεται από τη σχέση:

$$I_S^{total} = \left(\frac{2^7 \pi^5}{9} \right) I_L \nu_S^4 \sum_{\rho, \sigma} |(\vec{a}_{\rho, \sigma})_{G \rightarrow F}|^2$$

Από την παραπάνω εξίσωση φαίνεται ότι η ένταση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της έντασης του *Laser*: $I_S^{total} \propto I_L$, ανάλογη της τέταρτης δύναμης της συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας: $I_S^{total} \propto \nu_S^4$ και ανάλογη του τετραγώνου του ταυστη πολωσιμότητας για τη μετάβαση $G \rightarrow F$: $I_S^{total} \propto |(\vec{a}_{\rho, \sigma})_{G \rightarrow F}|^2$.

Ο ταυστής πολωσιμότητας (το στοιχείο $\rho\sigma$ του πίνακα) δίνεται από τη θεωρία διαταραχών δεύτερης τάξης (*Kramers-Heisenberg* τύπος διασποράς):

$$(\vec{a}_{\rho\sigma})_{G \rightarrow F} = \frac{1}{hc} \sum_E \left[\frac{\langle F | \hat{\mu}_\rho | E \rangle \langle E | \hat{\mu}_\sigma | G \rangle}{\nu_{GE} - \nu_L + i\Gamma_E} + \frac{\langle F | \hat{\mu}_\sigma | E \rangle \langle E | \hat{\mu}_\rho | G \rangle}{\nu_{GE} + \nu_L + i\Gamma_E} \right]$$

Η παραπάνω σχέση εκφράζει την μεταβατική πολωσιμότητα, συναρτήσει της συχνότητας ν_L της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ως στοιχείο ενός πίνακα του τελεστή της πολωσιμότητας, συνδέοντας αρχικές και τελικές καταστάσεις. Η μεταβατική πολωσιμότητα γράφεται ως καρτεσιανός ταυστής, όπου ρ και σ είναι διευθύνσεις x , y , z στο μοριακό σκελετό. Στον παρονομαστή εμφανίζεται η ποσότητα $i\Gamma_E$, ένας πα-

ράγοντας απόσβεσης που εξαρτάται από το ενεργειακό επίπεδο και σχετίζεται με το χρόνο ζωής της ενδιάμεσης κατάστασης (ρυθμός ελάττωσης του πληθυσμού μέσω μηχανισμών με ακτινοβολία και χωρίς).

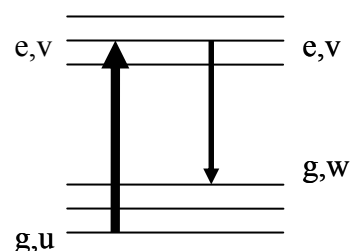
Το φαινόμενο του συντονισμού Raman

Στην περίπτωση του *Resonance Raman* φαινομένου, μόνο ο πρώτος όρος του τανυστή της πολωσιμότητας λαμβάνεται υπόψη:

$$(\vec{a}_{\rho\sigma})_{G \rightarrow F}^{res} \approx \frac{1}{hc} \sum_E \frac{\langle F | \hat{\mu}_\rho | E \rangle \langle E | \hat{\mu}_\sigma | G \rangle}{\nu_{GE} - \nu_L + i\Gamma_E}$$

Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση *Born-Oppenheimer*, το τμήμα του τανυστή της πολωσιμότητας για το συντονισμό, γράφεται ως εξής:

$$\begin{aligned} (\vec{a}_{\rho\sigma})_{u \rightarrow w}^{res} &\approx \frac{1}{hc} \sum_e \sum_v \frac{\langle gw | \hat{\mu}_\rho | ev \rangle \langle ev | \hat{\mu}_\sigma | gu \rangle}{\Delta\nu + i\Gamma}, (\Delta\nu = \nu_{GE} - \nu_L) \\ &\approx \frac{1}{hc} \sum_e \sum_v \frac{\langle g | \hat{\mu}_\rho | e \rangle \langle w_g | v_e \rangle \langle e | \hat{\mu}_\sigma | g \rangle \langle v_e | u_g \rangle}{\Delta\nu + i\Gamma} \\ &\approx \frac{1}{hc} M_{eg}^2 \sum_v \frac{\langle w_g | v_e \rangle \langle v_e | u_g \rangle}{\Delta\nu + i\Gamma}, (M_{eg} = |\langle g | \hat{\mu}_\rho | e \rangle| = |\langle e | \hat{\mu}_\sigma | g \rangle|) \end{aligned}$$



Η ενίσχυση λόγω του φαινομένου συντονισμού *Raman* περιγράφεται παρακάτω:

$$(\vec{a}_{\rho\sigma})_{G \rightarrow F}^{res} \propto M_{eg}^2 \propto \varepsilon(\nu) \text{ (συντελεστής μοριακής απορρόφησης)}$$

$$(\vec{a}_{\rho\sigma})_{G \rightarrow F}^{res} \propto (\nu_{GE} - \nu_L + i\Gamma_{GE})^{-1} \text{ (συχνότητα της ακτινοβολίας του Laser)}$$

3.4 Δονήσεις του πορφυρινικού σκελετού

Οι πληροφορίες που μπορούμε να συλλέξουμε από ένα φάσμα συντονισμού *Raman* για τις σιδηροπορφυρίνες είναι:

$\nu_{10}: C_a C_m$	$1600-1645 \text{ cm}^{-1}$	Ενίσχυση πληροφορίας για συναρμογή και κατάσταση
---------------------	-----------------------------	--

		<i>spin</i>
$\nu_2: C_b C_b$	1560-1600 cm^{-1}	Κατάσταση <i>spin</i>
$\nu_3: C_a C_m$	1470-1510 cm^{-1}	Αριθμός συναρμογής
$\nu_4: C_a N$	1345-1380 cm^{-1}	Οξειδωτική κατάσταση

Βιβλιογραφία

- [1] Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; Wiley & Sons: New York, **1986**.
- [2] Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. *Symmetry and Spectroscopy – An Introduction to vibrational and electronic spectroscopy*; Oxford University Press: New York, **1978**.
- [3] Ferraro, J. R.; Nakamoto, N. *Introductory Raman Spectroscopy*; Harcourt Brace & Company Publishers, Academic Press, Inc.: New York, **1994**.
- [4] McHale, J. L. *Molecular Spectroscopy, First Edition*; Prentice Hall.
- [5] Hollas, J. M. *Modern Spectroscopy*; Wiley & Sons: New York, **1996**.
- [6] Varotsis, C.; Babcock, G. *Methods in Enzymology* **1993**, 223, 409-431.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV – ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥΣ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΧΑΛΚΟΥ-ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Εισαγωγή

Στο Κεφάλαιο I αναφέρθηκε εκτεταμένα ο προτεινόμενος ρόλος της τυροσίνης στο διπυρηνικό κέντρο $\text{Cu}_B\text{-Fe}_{a3}$ κατά την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου και τη σχάση του δεσμού O–O.

Οι *Pinakoulaki et al.*¹ παρατήρησαν το σχηματισμό των “607” και “580” ενδιάμεσων στην αντίδραση $\text{CcO aa}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, χωρίς την εμπλοκή της Tyr280. Το ενδιάμεσο 607-nm ανιχνεύεται σε μια αντίδραση της κυτοχρωμικής c οξειδάσης (μικτού σθένους) με το μοριακό O_2 χωρίς τη συμμετοχή της Tyr280 (σε *mutant* Y280H).

Επιπλέον, οι *Koutsoupakis et al.*² υπολόγισαν το pK_a (7.8) της *crossed-linked* Tyr237 από το ba_3 στο *T. thermophilus*³ και προτείνουν ότι σε όξινες συνθήκες, όπου και η συγκεκριμένη τυροσίνη είναι πρωτονιωμένη (TyrOH), σχηματίζονται τα οξειδωτικά ενδιάμεσα $\text{Cu}_B^{2+}\text{-His-Tyr237}^\bullet$ και $\text{Fe}_{a3}^{\text{IV}}=\text{O}$, με δυνατότητα όμως ύπαρξης μιας ισορροπίας: $\text{Y}^\bullet\text{-Cu(II)}_B \leftrightarrow \text{Y-Cu(III)}_B$. Σε βασικές συνθήκες, ωστόσο, η Tyr237

είναι αποπρωτονιωμένη και κατά συνέπεια η σχάση του δεσμού O–O συμβαίνει πιθανότατα με οξειδωση ενός αμινοξικού καταλοίπου εκτός διπυρηνικού κέντρου ή μεταφορά ηλεκτρονίου από τον Cu^{2+} ($\rightarrow\text{Cu}^{3+}$), σχηματίζοντας μόνο το ένα είδος *ferryl* ενδιάμεσου (607-nm). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μικτού σθένους μορφή του ενζύμου και αποδεικνύεται ότι η σχάση του δεσμού στο μοριακό οξυγόνο δεν εξαρτάται από την κατάσταση πρωτονίωσης της Tyr237.

Η διερεύνηση των ιδιοτήτων και της δομής του συστήματος $\text{Cu}_B\text{-His-TyrOH}$ που εμφανίζεται στις αιμο/ χαλκο-οξειδάσες κρίνεται απαραίτητη, ώστε να κατανοήσουμε την ενεργοποίηση του μοριακού οξυγόνου και τη σχάση του δεσμού O–O. Το “πεπτίδιο” His-Tyr, όπως εμφανίζεται στις αιμο/ χαλκο-πρωτεΐνες, είναι μοναδικό στο είδος του. Αν και η ύπαρξης της οξειδωτικής κατάστασης Cu^{3+} έχει διαπιστωθεί σε αντιδράσεις με μοντέλα, δεν έχει ανιχνευτεί σε ένζυμα που περιέχουν Cu^{3+} . Ωστόσο, καθώς έχουν ανιχνευτεί μόνο μικρά ποσοστά Tyr[•] (βλ. παρακάτω³) κατά το σχηματισμό του 607-nm ενδιάμεσου, οι *Pinakoulaki et al.*¹ προτείνουν επίσης την ύπαρξη μιας ρίζας στην πρωτεΐνη εκτός του διπυρηνικού κέντρου ή την πιθανότητα ο Cu_B να συμμετέχει στην ισορροπία $\text{Y}^{\bullet}\text{-Cu(II)}_B \leftrightarrow \text{Y-Cu(III)}_B$, η οποία και να καθορίζει το μηχανισμό της ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου από το ένζυμο. Οι *McMillan et al.*³ σε μελέτες με *EPR* της αντίδρασης του πλήρως οξειδωμένου ενζύμου με το υπεροξείδιο H_2O_2 σε pH 6.0, ανίχνευσαν την ύπαρξη μιας οργανικής ρίζας σε ποσοστό ~20% που την αποδίδουν σε ρίζα τυροσίνης και προτείνουν ότι πιθανότατα να συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου.

Πραγματοποιείται, λοιπόν, θεωρητική μελέτη του παραπάνω συστήματος $\text{Cu}_B\text{-His-TyrOH}$, ώστε να βγουν ορισμένα συμπεράσματα για την δυνατότητα ύπαρξης της οξειδωτικής κατάστασης 3+ του χαλκού ή της ρίζας της τυροσίνης κατά τον καταλυτικό κύκλο. Επιπρόσθετα αναλύεται το ενδεχόμενο της ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ της ρίζας της τυροσίνης και του $\text{Cu}_B(\text{III})$.

4.2 Η μέθοδος των υπολογισμών

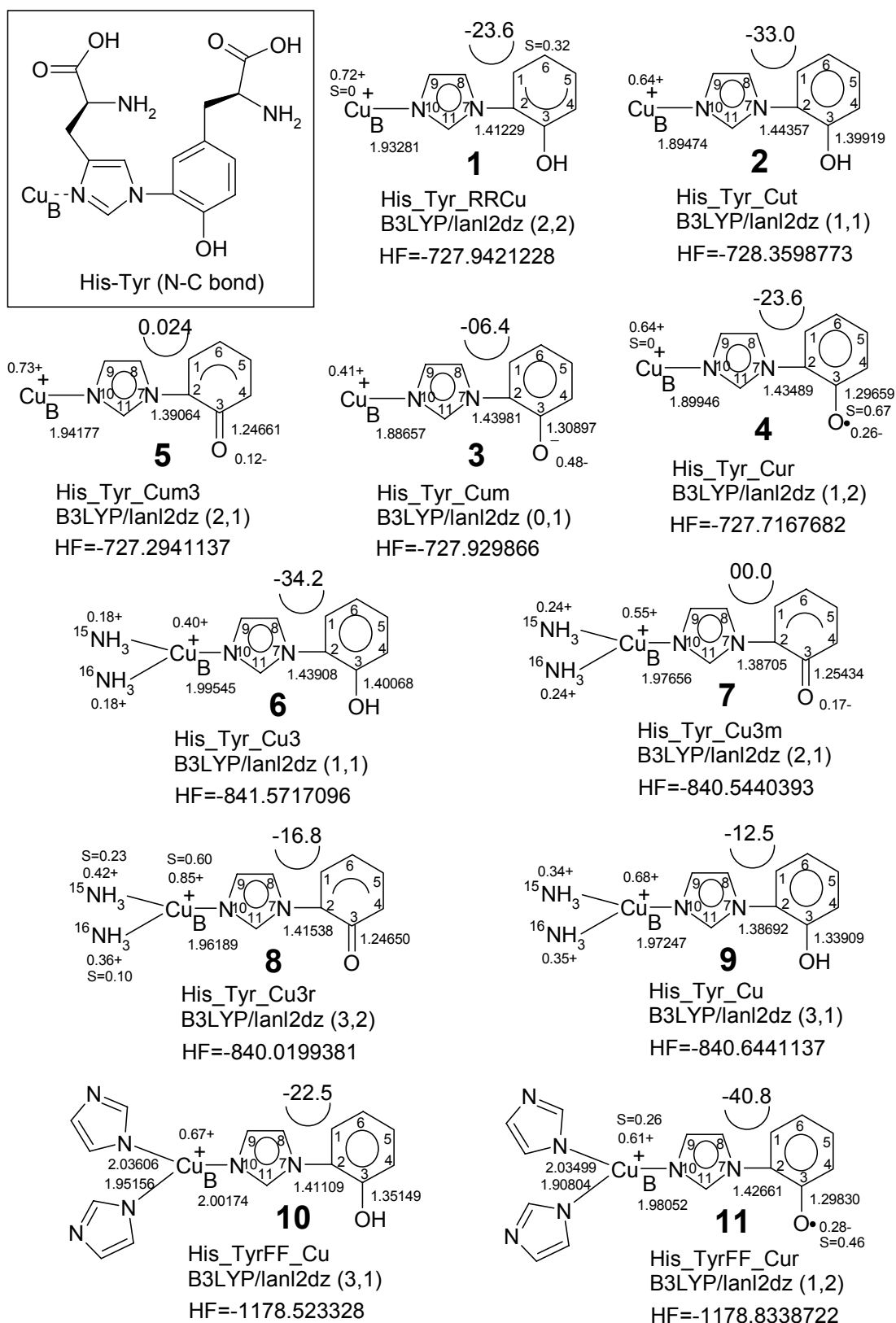
Σε αυτή τη μελέτη, όλες οι δομές βελτιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *DFT*, που όπως αναφέρθηκε σε άλλο κεφάλαιο δίνει και τα περισσότερα αξιόπι-

στα αποτελέσματα. Το σετ βάσεων που χρησιμοποιήθηκε είναι το LANL2DZ. Το σετ αυτό βάσεων, όπως αναφέρθηκε, περιλαμβάνει τυπικά *double-ζ* σετ βάσεων για όλα τα ελαφριά στοιχεία, ενώ για τα μεταβατικά μέταλλα (όπως ο χαλκός στο διπυρηνικό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης) χρησιμοποιείται ένα μη σχετικιστικό αποτελεσματικό πυρηνικό δυναμικό (*effective core potential, ECP*). Στην κάθε περίπτωση δομής που βελτιστοποιείται ερευνώνται οι πυκνότητες spin και τα φορτία στο κάθε άτομο με τη μέθοδο *Mulliken* και αναγράφονται οι αντίστοιχες τιμές για τα σημαντικότερα από αυτά (**σχήμα 14**). Πρέπει να σημειωθεί ότι το cross-linked σύστημα ιμιδαζολίου-φαινόλης είχε αρχικά βελτιστοποιηθεί στα επίπεδα HF/6-31G(d) και B3LYP/6-31G(d). Σε όλους τους παραπάνω υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πακέτο *Gaussian 98*.

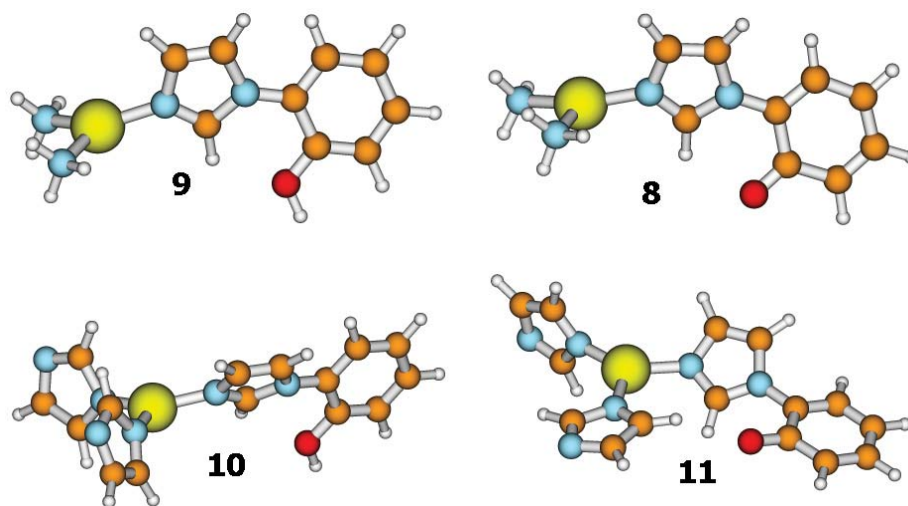
4.3 Μοντέλα του μεταλλικού κέντρου Cu_B στους θεωρητικούς υπολογισμούς για την κυτοχρωμική *c* οξειδάση στη μελέτη

Στα **σχήματα 14, 15** φαίνονται τα διάφορα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση του μεταλλικού κέντρου Cu_B. Οι δομές στο σχήμα έχουν βελτιστοποιηθεί στο επίπεδο B3LYP/Lan12dz. Σε μια αρχική προσέγγιση, ο Cu_B συναρμόζεται μόνο με το *cross-linked* σύστημα ιμιδαζολίου-φαινόλης, στην προσπάθειά μας να σχεδιάσουμε το σύστημα ιστιδίνης-τυροσίνης που απαντάται στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση. Στη συνέχεια, προσθέτουμε επιπλέον διαφορετικά *ligands* στο μεταλλικό κέντρο Cu_B και ερευνούμε τις επιδράσεις τους στην οξειδωτική κατάσταση του χαλκού και τη ρίζα της τυροσίνης. Επιπλέον, μελετάται η επίδραση της κατάστασης spin/φορτίου του οξυγόνου της φαινόλης (τυροσίνης) στην οξειδωτική κατάσταση του Cu_B. Σκοπός μας είναι η διερεύνηση της πιθανότητας του τρίτου ηλεκτρονίου στον καταλυτικό κύκλο της CcO να προέρχεται από τον Cu_B και όχι από την τυροσίνη (Tyr280 από το *P. denitrificans*, Tyr244 από τη μοσχαρίσια καρδιά και Tyr237 από το βακτήριο *T. thermophilus*) οδηγώντας στη σχάση του δεσμού O–O του μοριακού οξυγόνου.

Όπως γνωρίζουμε, ο Cu_B συναρμόζεται με τρεις ιστιδίνες, μία από τις οποίες συνδέεται ομοιοπολικά (δεσμός N-C) με μία τυροσίνη. Ο ομοιοπολικός αυτός δεσμός αναμένεται να μειώσει την τιμή pK_a του υδροξυλίου της τυροσίνης και κατά συνέ-



Σχήμα 14: Βελτιστοποιημένες δομές των μορίων – μοντέλων του συστήματος Cu_B-His-Tyr. Αναγράφονται αποστάσεις και διέδρες γωνίες.



Σχήμα 15: Τρισδιάστατες βελτιστοποιημένες δομές των μοντέλων 8, 9, 10 και 11. Οι δομές είναι τυπικές για σύμπλοκα Cu και ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στην κρυσταλλική δομή (11).

πεια, ένα μεγάλο ποσοστό της τυροσίνης ίσως να βρίσκεται στην αποπρωτονιωμένη μορφή της σε ουδέτερο pH. Από τις κρυσταλλικές δομές (βλ. Κεφάλαιο I) έχει προταθεί ότι οι ιστιδίνες (τα ιμιδαζόλια) μπορεί να είναι ουδέτερες ή αρνητικά φορτισμένες. Μία από τις ιστιδίνες-ligands του Cu_B (His290, μοσχαρίσια καρδιά) ανήκει σε ένα δίκτυο αμινοξικών καταλοίπων που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Αποπρωτονίωση/ πρωτονίωση της His290 στον ιμιδαζολικό δακτύλιο οδηγεί σε ένα αρνητικά φορτισμένο/ ουδέτερο αντίστοιχα *ligand*. Οι υπόλοιπες ιστιδίνες (ιμιδαζόλια) είναι ουδέτερα *ligands*. Όπως θα διαπιστώσουμε και από τους υπολογισμούς, ένα μοντέλο του κέντρου Cu_B με θετικά φορτισμένα *ligands* αμμωνίες -NH₃⁺, όπως προτείνουν οι *Blomberg et al.* (βλ. Κεφάλαιο II) δεν αναπαριστά ικανοποιητικά την πραγματικότητα αν και δεν έχει σημαντική επίδραση στο φορτίο/ οξειδωτική κατάσταση του Cu_B ή στις ατομικές αποστάσεις που υπολογίζονται στο μοντέλο. Επίσης, όπως προτείνει η ίδια ερευνητική ομάδα, το φορτίο +1 στον Cu_B εισάγεται στους υπολογισμούς με ένα θετικό συνολικό φορτίο +1 στο σύμπλοκο, πράγμα που, όπως φαίνεται από τις βελτιστοποιημένες δομές των μοντέλων που παρουσιάζονται παρακάτω, δεν εξασφαλίζει την οξειδωτική κατάσταση +1 στον Cu_B σε όλες τις περιπτώσεις.

Στην περίπτωση που το οξυγόνο της τυροσίνης βρίσκεται στις μορφές -OH /-O⁻ η πολλαπλότητα που δίνεται στους υπολογισμούς είναι 2S+1=1, ενώ στην περίπτωση της ρίζας -O[•] η πολλαπλότητα του συστήματος είναι 2. Χρησιμοποιώντας διαφορετική πολλαπλότητα στις παραπάνω περιπτώσεις, οδηγούμαστε σε δομές, όπως η **1**, όπου δε διατηρείται η αρωματικότητα στο δακτύλιο της τυροσίνης, με σχετικά εντοπισμένο spin (S=0.32) στον άνθρακα 6 του δακτυλίου. Σε αντίθεση, οι *Blomberg et al.* (βλ. Κεφάλαιο II) χρησιμοποιούν συνολικό spin 1 στο σύμπλοκο του Cu_B (2S+1=2) και φορτίο 2+ σε κάποια από τα προτεινόμενα μοντέλα τους.

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα ligands του Cu_B στα μοντέλα των θεωρητικών υπολογισμών

Συγκρίνοντας τις δομές **9** και **10** (συνολικό φορτίο 3 και πολλαπλότητα 1), παρατηρούμε ότι η επιλογή των *ligands* δεν επηρεάζει σημαντικά το φορτίο του Cu_B ούτε και τις διάφορες ατομικές αποστάσεις. Τα θετικά, ωστόσο, φορτισμένα αυτά *ligands* -NH₃⁺ δεν αντιπροσωπεύουν ικανοποιητικά τις ιστιδίνες, καθώς έρχονται σε αντίθεση με μια ουδέτερη ή αρνητικά φορτισμένη κατάσταση των ιμιδαζολίων στις ιστιδίνες του διπυρηνικού κέντρου (όπως έχει προταθεί). Κατά συνέπεια, δεν κρίνονται κατάλληλα για τους θεωρητικούς υπολογισμούς, εκτός την περίπτωση που εξετάζουμε πρωτονιωμένα *ligands*. Στη δομή **8**, ωστόσο παρατηρούμε ότι το είδος των *ligands* στον Cu_B και η κατάσταση πρωτονίωσής τους, επηρεάζει την ηλεκτρονιακή του κατάσταση.

Το τρίτο ηλεκτρόνιο του καταλυτικού κύκλου και η κατάσταση Cu³⁺

Συγκρίνοντας τις δομές **2** και **3** του σχήματος **14**, με συνολικό φορτίο +1, 0 αντίστοιχα και πολλαπλότητα 1, διαπιστώνουμε ότι το φορτίο στον Cu_B μειώνεται όταν υπάρχει εντοπισμένο φορτίο (-) στο οξυγόνο της τυροσίνης (δομή **3**). Δηλαδή, το μεταλλικό κέντρο Cu_B “τραβάει” φορτίο (ηλεκτρόνια) από το οξυγόνο της τυροσίνης, μέσω των αρωματικών δακτυλίων, προς μια σταθερότερη κατάσταση. Η μείωση του φορτίου στον Cu_B, όπως παρατηρείται από τους υπολογισμούς είναι περίπου 36%. Στην περίπτωση που στο οξυγόνο της τυροσίνης υπάρχει εντοπισμένο ηλεκτρόνιο (ρίζα, S=0.67), δε παρατηρείται μεταβολή στην οξειδωτική κατάσταση του Cu_B (σύγκριση δομών **2** και **4**), δηλαδή δεν έχουμε μεταφορά φορτίου από το οξυγόνο στον Cu_B σε αυτή την περίπτωση. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, πιθανότατα η τυροσίνη να είναι στη μορφή TyrO⁻ σε κάποιο στάδιο του καταλυτικού κύκλου της CcO (pK_a=7.8). Είναι γνωστό ότι η κατάσταση του χαλκού Cu³⁺ δεν είναι σταθερή, με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η προσφορά του τρίτου e⁻ από τον Cu_B. Ωστόσο, μια κατάσταση Cu³⁺ στον καταλυτικό κύκλο σε μια μεταβατική κατάσταση είναι πιθανή, εφόσον με την σημαντική παράλληλη μεταφορά φορτίου από το οξυγόνο της τυροσίνης (TyrO⁻) ο Cu_B σταθεροποιείται σε μια κατάσταση μικρότερου οξειδωτικού αριθμού.

Στις δομές **1** και **5** ο συνδυασμός φορτίου και πολλαπλότητας διαταράσσει την αρωματικότητα στους δακτυλίους και το φορτίο του Cu_B παραμένει στα ~0.72+, χωρίς να παρατηρείται μεταφορά φορτίου στην περίπτωση αυτή (δομή **5**).

Στη δομή **4** όπου βρίσκουμε τη ρίζα της τυροσίνης, υπάρχει ένα σχετικά σημαντικό ποσοστό αρνητικού φορτίου στο οξυγόνο (0.26-) παράλληλα με το ισχυρά εντοπισμένο spin (S=0.67).

Η πυκνότητα spin στο δεσμό N–C μεταξύ της ιστιδίνης και της τυροσίνης δε μεταβάλλεται αισθητά κατά τις διαφορετικές καταστάσεις του οξυγόνου της τυροσίνης, όπως διαπιστώνεται και από τα διάφορα μήκη N–C στα μοντέλα **2**, **3** και **4**. Το φορτίο μεταφέρεται μέχρι τον Cu_B, σε κάθε περίπτωση, διατηρώντας την αρωματικότητα, εκτός της **5** όπου παρατηρείται μικρή αύξηση της πυκνότητας spin στο δεσμό N–C, καθώς μειώνεται το μήκος του.

Η σημαντικότερη δομική αλλαγή που διαπιστώνεται από τους υπολογισμούς είναι στη διεδρη γωνία $\overline{C8-N7-C2-C1}$ που μειώνεται κατά 81% στο **3**. Ίσως σε μια τέτοια κατάσταση ευνοείται περισσότερο η μεταφορά φορτίου (απεντοπισμός) μεταξύ των δύο δακτυλίων λόγω κατάλληλης γεωμετρίας.

Σημαντικό είναι επίσης να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι το N10 είναι δεσμευμένο με τον Cu_B και τους C11, C9 (σχήμα **14**, ένθετο). Το ιμιδαζόλιο πρέπει να διατηρήσει την αρωματικότητά του, έτσι έχουμε να κάνουμε με ένα απεντοπισμένο σύστημα “4” δεσμών στο N10 που δυσκολεύει εν μέρει την ακριβή απεικόνιση του σε μοντέλα υπολογισμών. Οι δεσμοί Cu–N έχουν ηλεκτροστατικό και ομοιοπολικό χαρακτήρα⁴. Επίσης, τα ιμιδαζόλια για τα μοντέλα είναι αποπρωτονιωμένα οδηγώντας σε αποπρωτονιωμένες ιστιδίνες. Το σύστημα, ωστόσο, που χρησιμοποιούμε προσεγγίζει ικανοποιητικά το αντίστοιχο πραγματικό.

Ενδιαφέρον, ωστόσο, παρουσιάζει η σύγκριση των βελτιστοποιημένων δομών **4** και **11**. Στην πρώτη δομή, ανιχνεύεται εντοπισμένο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο της τυροσίνης (χωρίς δηλαδή να παρατηρείται απεντοπισμός του στο σύστημα). Σε αντίθεση με αυτό, στη δομή **11** όπου στον Cu_B έχουν προστεθεί επιπλέον δύο ligands ιμιδαζολίου, το ηλεκτρόνιο απεντοπίζεται σημαντικά μεταξύ του οξυγόνου της τυροσίνης (S=0.46) και του Cu_B (S=0.26), χωρίς να εμφανίζεται μεταβολή στο φορτίο του Cu_B. Ωστόσο, διαπιστώνουμε ότι το φορτίο (οξειδωτική κατάσταση) του Cu_B αυξάνεται (0.85+), καθώς και το spin του (S=0.60), όταν στο οξυγόνο της τυροσίνης δεν ε-

ντοπίζεται spin/ ή αρνητικό φορτίο (δομή **8**) σε σύστημα με πολλαπλότητα 2 και φορτίο +3. Στην περίπτωση της δομής **8** μπορούμε να δεχτούμε ότι οι φορτισμένοι θετικά υποκαταστάτες -NH_3^+ του Cu_B αντιπροσωπεύουν, στην ουσία, πρωτονιωμένα *ligands* του Cu_B , αφού όπως αναφέρεται και σε προηγούμενη παράγραφο, μια τέτοια υπόθεση είναι λογική. Στη δομή **8** το ηλεκτρόνιο που σε άλλες δομές εντοπιζόταν στο οξυγόνο της τυροσίνης, εμφανίζεται τώρα πλήρως εντοπισμένο στον Cu_B και διαθέσιμο (ως πιθανά το «τρίτο ηλεκτρόνιο» στον καταλυτικό κύκλο). Σύμφωνα με τα παραπάνω, λοιπόν, εξάγουμε το συμπέρασμα ότι το είδος των *ligands* στον Cu_B – και συγκεκριμένα η πρωτονίωσή τους – επηρεάζει τον απεντοπισμό του ηλεκτρονίου της ρίζας της τυροσίνης. Πιθανότατα η πρωτονίωση των ιμιδαζολίων – *ligands* του χαλκού να επηρεάζει ακόμα περισσότερο την «τύχη» αυτού του ηλεκτρονίου και να αποτελεί και το σημείο αναφοράς όσον αφορά στην προέλευση του τρίτου ηλεκτρονίου για τη σχάση του δεσμού **O–O**. Περαιτέρω θεωρητικοί υπολογισμοί με πρωτονιωμένα ιμιδαζόλια ως *ligands* στον Cu_B είναι υπό μελέτη. Η παραπάνω υπόθεση πιθανότατα να βρίσκει εφαρμογή σε κυτοχρωμικές c οξειδάσες όπως η *ccb₃*, η οποία δεν περιέχει την ομοιοπολικά δεσμευμένη TyrOH και τη φαρνεσυλική αλυσίδα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Όπως έχουμε αναφέρει, η φαρνεσυλική αλυσίδα έχει προταθεί ότι σταθεροποιεί τη ρίζα στο οξυγόνο της τυροσίνης.

Δονήσεις της ομάδας C-O της ομοιοπολικά δεσμευμένης τυροσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τους θεωρητικούς υπολογισμούς στο επίπεδο B3LYP/LANL2DZ όσον αφορά στις δονήσεις της ομάδας C-O στην τυροσίνη. Όπως παρατηρούμε, στο δονητικό φάσμα του μόριου-μοντέλου **3**, περισσότερες από μία δονήσεις εμφανίζουν χαρακτήρα C-O, καθώς πιθανότατα υπάρχει σύζευξη με τον αρωματικό δακτύλιο, ενώ στην περίπτωση των μορφών -OH και -O^\bullet εμφανίζεται μια δόνηση ανά περίπτωση. Στο δονητικό φάσμα του μοντέλου-μορίου **8** εμφανίζονται δύο δονήσεις C-O χαρακτήρα, αρκετά υψηλότερα, λόγω του καρβονυλίου.

2	1276 cm⁻¹	4	1363 cm⁻¹ 1339 cm ⁻¹
3	1366 cm⁻¹ 1378 cm ⁻¹ 1490 cm ⁻¹ 1513 cm ⁻¹	8	1663 cm⁻¹
11	1337 cm ⁻¹ 1350 cm⁻¹ 1363 cm ⁻¹		

(οι δονήσεις με τον περισσότερο C-O χαρακτήρα εμφανίζονται με **bold** γραμματοσειρά)

Πρόσφατες FTIR μελέτες σε ένα μόριο-μοντέλο His-Tyr-OH, το *2-imidazole-1-yl-4-methylphenol*, έχουν δείξει ότι οι δονήσεις $\nu_{7a}(\text{CO})$ και $\delta(\text{COH})$ στο αποπρωτονιωμένο είδος μετατοπίζονται από τους 1268 cm⁻¹ (πρωτονιωμένο) στους 1301 cm⁻¹⁵. Επίσης, οι *Koutsourakis et al*² έδειξαν ότι οι δονήσεις $\nu_{7a}(\text{CO})$ και $\delta(\text{COH})$ στο πρωτονιωμένο είδος (Cu_B-His-Tyr₂₃₇OH) από το *ba₃* του *T. thermophilus* εμφανίζονται στους 1247 cm⁻¹ και στους 1301 cm⁻¹ στην αποπρωτονιωμένη μορφή (Cu_B-His-Tyr₂₃₇O). Όπως παρατηρούμε, οι θεωρητικοί υπολογισμοί αναπαριστούν ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα, με την προϋπόθεση ότι εμφανίζουν σφάλμα μέχρι και 60 cm⁻¹.

Περαιτέρω υπολογισμοί πραγματοποιούνται για τη διερεύνηση της επίδρασης της κατάστασης της πρωτονίωσης των ιστιδίων στη δόνηση της ομάδας C-O της τυροσίνης.

Είναι απαραίτητο να αναφέρουμε ότι οι αποστάσεις Cu-N που υπολογίζονται στις βελτιστοποιημένες δομές **10** και **11** (γύρω στα 2.0 Å) συμφωνούν με τις κρυσταλλικές δομές (βλ. Κεφάλαιο I) και άλλες μελέτες⁴.

Βιβλιογραφία

[1] Pinakoulaki, E.; Pfitzner, U.; Ludwig, B.; Varotsis C. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13563-13568.

[2] Time-Resolved Step-Scan FTIR and Uv/ Vis Studies Reveal the Effects of the Covalently Ring Linked His-Tyr-OH to the Reduction of Dioxygen by Heme-Copper Oxidases, Constantinos Koutsoupakis, Tewfik Soulimane and Constantinos Varotsis, submitted.

[3] McMillan, F.; Kannt, A.; Behr, J.; Prisner, T.; Michel, H. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179-9184.

[4] Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239-2314.

[5] Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pasavento, R. P., v. Donk, W., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., Mäntele, W. (2002) *Biochemistry* **41**, 9116-9125.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V – ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ/ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

5.1 Εισαγωγή

Σκοπός αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι από τη μία πλευρά η θεωρητική μελέτη του ενεργού κέντρου $\text{Cu}_B/\text{Fe}_{a3}$ κατά τον καταλυτικό κύκλο της CcO και η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις ενέργειες ενεργοποίησης της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου χωρίς τη διαδικασία απόσπασης του πρωτονίου από την TyrOH (εφαρμογή στο cbb_3), και από την άλλη ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των ενδιάμεσων προϊόντων στον καταλυτικό κύκλο σε αντιδράσεις των κυτοχρωμικών c

οξειδασών ba_3 και cbb_3 με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το ενδιαφέρον, στους θεωρητικούς υπολογισμούς, θα εστιαστεί στο σύστημα **(His)₂Cu_B-His-TyrOH/ Fe_{a3}** σε σχέση με την απουσία της ομοιοπολικά δεσμευμένης **TyrOH**. Η παραπάνω μελέτες θα δώσουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από την κυτοχρωμική c οξειδάση, το σημαντικότερο ένζυμο στην αναπνευστική αλυσίδα.

Συνδυασμός γνώσεων από θεωρητικούς υπολογισμούς και πειραματικά δεδομένα, οδηγεί στην καλύτερη κατανόηση μηχανισμών αντιδράσεων/ καταλυτικών κύκλων, καθώς οι παρατηρήσεις αποκτούν θεωρητικό υπόβαθρο και συμπληρώνονται.

5.2 Resonance Raman μελέτες των όξο- ενδιαμέσων στην αντίδραση των οξειδασών ba_3 και cbb_3 με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το κυριότερο υπόστρωμα για τις κυτοχρωμικές c οξειδάσες αποτελεί το μοριακό O_2 , ωστόσο μια διαφορετική προσέγγιση στη μελέτη των ενδιάμεσων της αντίδρασης αυτής με το O_2 , είναι η αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου^j με το υπεροξείδιο H_2O_2 . Του ήδη, κατά δύο ηλεκτρόνια, δηλαδή, ανηγμένου υποστρώματος σε σχέση με το μοριακό οξυγόνο. Οι δομές της αίμης a_3 στα P (607-nm) και F (580-nm) ενδιάμεσα της αντίδρασης της ανηγμένης CcO/O_2 ταυτίζονται με αυτά της αντίδρασης της οξειδωμένης CcO με το H_2O_2 ¹. Ο πληθυσμός των F και P ενδιάμεσων εξαρτάται ισχυρά από το pH, τη συγκέντρωση του H_2O_2 και του ενζύμου. Σκοπός της μελέτης είναι η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός του **περόξυ** κυρίως ενδιάμεσου με φασματοσκοπία *Raman*, που δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα αν και έχει προταθεί σε καταλυτικούς κύκλους της CcO , όπως και ο ρόλος της ομοιοπολικά δεσμευμένης τυροσίνης σε ένα από τα 3 *ligands* ιστιδίνης του Cu_B. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, η οξειδάση cbb_3 δεν περιέχει τη συγκεκριμένη τυροσίνη και η αντίδραση με το H_2O_2 αναμένεται να δώσει σημαντικές πληροφορίες για κάποιο πιθανά εναλλακτικό μηχανισμό αναγωγής σε σχέση με αυτό της aa_3 , bo^2 όπου όπως θα αναφέρουμε, η συγκεκριμένη τυροσίνη παίζει σημαντικό ρόλο.

^j Η αίμη a_3 στη μορφή Fe^{3+} (κατ' αντιστοιχία η αίμη b_3 στο cbb_3)

Με την αντίδραση των οξειδωμένων ενζύμων (*ba*₃/*cbb*₃) με το H₂O₂ αναμένεται να συλλέξουμε:

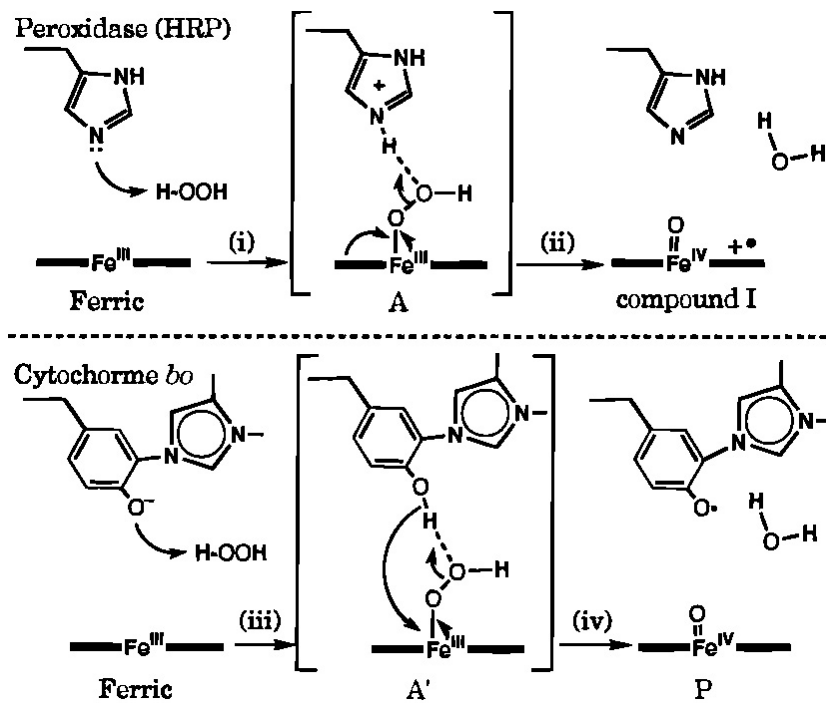
α) πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον του διπυρηνικού κέντρου Cu_B-Fe και συγκεκριμένα για την ύπαρξη η μη δεσμών υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου στο όξο ενδιάμεσο και απομακρυσμένων καταλοίπων που μπορούν να βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση της δομής του 607-nm ενδιάμεσου (εξάρτηση από το pH/ pD) και τα χαρακτηριστικά που το διαφοροποιούν από το άλλο Fe^{IV} είδος.

β) πληροφορίες για τους χρόνους ζωής των *περόξυ*, 607-nm και 580-nm ενδιάμεσων και την εξάρτησή τους από τις πειραματικές συνθήκες.

γ) πληροφορίες για το περιβάλλον της αίμης του διπυρηνικού κέντρου, που εκφράζονται στη μετατόπιση της δόνησης $\nu_{\text{Fe=O}}$.

Τέλος, να επιτύχουμε την ανίχνευση του *περόξυ* ενδιάμεσου του καταλυτικού κύκλου, γνωρίζοντας ήδη το αρχικό μας σύστημα (το *pK_a* της Tyr₂₃₇OH στο *ba*₃ από το *T. thermophilus* έχει υπολογιστεί σε 7.8³).

Οι *Uchida et al*² σε πειράματα *steady-state Resonance Raman* που πραγματοποίησαν στην αναγωγή του H₂O₂ από το κυτόχρωμα *bo*, προτείνουν το μηχανισμό που φαίνεται στο **σχήμα 16**. Σε υψηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ και υψηλά pH, ο χρόνος ζωής των *ferryl* ειδών P και F αυξάνεται καθιστώντας τα ανιχνεύσιμα⁴. Όπως φαίνεται στο **σχήμα 16**, στις περοξειδάσες (HRP), η αντίδραση εκκινεί με κάποιο αμινοξικό κατάλοιπο στην περιοχή του διπυρηνικού κέντρου (πιθανότατα τη μακρινή ιστιδίνη) να αποσπά πρωτόνιο από το H₂O₂. Στη συνέχεια ακολουθεί η ετερολυτική σχάση του O–O δεσμού λόγω της αστάθειας του Fe–O–O–H ενδιάμεσου, με τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου και τελικό προϊόν μια Fe^{IV}=O πορφυρηνική π-κατιονική ρίζα. Παρουσία της Tyr288 (στο *bo*)² η αποπρωτονιωμένη τυροσίνη του οξειδωμένου ενζύμου αποσπά ένα πρωτόνιο από το H₂O₂. Η Tyr288 αναλαμβάνει, στη συνέχεια, το ρόλο του δότη πρωτονίου στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το μακρινό οξυγόνο του Fe(III)-O–O–H (*περόξυ προς ανίχνευση*) είδους, οδηγώντας στην ετερολυτική σχάση του δεσμού O–O και τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου P. Η αναγωγή και η μετέπειτα πρωτονίωση της ρίζας της Tyr288 οδηγεί στο F ενδιάμεσο που έχει χαρακτηριστεί ικανοποιητικά. Έχει δειχτεί ότι η αύξηση στην τιμή του pH οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού παραγωγής του P ενδιάμεσου (αύξηση του πληθυσμού της Tyr288-O[•]) και ότι η παρουσία D₂O μειώνει το ρυθμό σχηματισμού του P είδους στην περίπτωση και του *bo*².



Σχήμα 16: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 με περοξειδάσες και το *bo* από τους *Uchida et al*²

Οι μελέτες της αντίδρασης του οξειδωμένου ba_3 με H_2O_2 θα γίνουν στην αποπρωτονιωμένη και πρωτονιωμένη μορφή του ενζύμου (TyrO⁻).

Με το H_2O_2 επιτυγχάνουμε με μικρή ποσότητα ενζύμου, σε *steady-state* πειράματα το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων, σε αντίθεση με την αντίδραση με το O_2 .

5.3 θεωρητικοί υπολογισμοί στο ενεργό κέντρο χαλκού-σιδήρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ενδελεχώς στο κεφάλαιο II, έχουν πραγματοποιηθεί θεωρητικοί υπολογισμοί όσον αφορά στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής c οξειδάσης από τους *M.R.A. Blomberg et al*^{5,6,7}. Κάθε μηχανισμός που προτείνεται και μελετάται προϋποθέτει την ύπαρξη της ομοιοπολικά δεσμευμένης σε ένα από τα *ligands* του Cu_B πρωτονιωμένης τυροσίνης TyrOH ή της φαρνεσυλικής αλυσίδας στην αίμη a_3 .

Η τυροσίνη χρησιμοποιείται ως δότης πρωτονίου σε δεσμούς υδρογόνου με το περόξυ ενδιάμεσο, ως δότης πρωτονίου και ηλεκτρονίου κατά τη σχάση του δεσμού O–O ή σε ένα τρίτο εναλλακτικό προτεινόμενο μηχανισμό, στους θεωρητικούς υπολογισμούς, η σχηματιζόμενη ρίζα μεταφέρεται από την πορφυρίνη στην τυροσίνη (εξώθερμο βήμα μετά τη σχάση του δεσμού στο μοριακό οξυγόνο). Η ύπαρξη της ρίζας τυροσίνης έχει ανιχνευτεί πειραματικά σε ένα ποσοστό περίπου 20%⁸, πράγμα που δεν ενισχύει σημαντικά την άποψη ότι στον καταλυτικό κύκλο το τρίτο ηλεκτρόνιο προέρχεται αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη τυροσίνη, σχηματίζοντας μια ρίζα. Εναλλακτικές πηγές του τρίτου ηλεκτρονίου και ισορροπίες, ανάλογα με τις συνθήκες και την κατάσταση πρωτονίωσης της συγκεκριμένης τυροσίνης, είναι δυνατόν να υφίστανται.

Σκοπός των θεωρητικών υπολογισμών, που θα πραγματοποιηθούν, είναι να μελετηθούν οι προτεινόμενοι μηχανισμοί της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου από την κυτοχρωμική c οξειδάση, και συγκεκριμένα το στάδιο της σχάσης του δεσμού O–O, απουσία της ομοιοπολικά δεσμευμένης τυροσίνης και της φαρνεσυλικής αλυσίδας (οξειδάση *ccb₃*), δηλαδή απουσία των “*διαθέσιμων*”, *ευνοϊκών* πρωτονίων της τυροσίνης ή της φαρνεσυλικής αλυσίδας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, και η θεωρη-

τική μελέτη των προτεινόμενων μηχανισμών (βλ. παραγράφους 1.3 & 2.5) παρουσία της αποπρωτονιωμένης μορφής της ομοιοπολικά δεσμευμένης τυροσίνης (TyrO⁻) στο ενεργό κέντρο της CcO, που πιθανότατα αναπαριστά ικανοποιητικότερα την *in vivo* κατάσταση του ενεργού κέντρου.

Η καθοδήγηση των θεωρητικών υπολογισμών βάσει των πειραματικών δεδομένων αποτελεί μια καλή τεχνική στην κατανόηση των πειραματικών παρατηρήσεων.

Βιβλιογραφία

[1] Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8580-8586.

[2] Uchida, T.; Mogi, T.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6669-6678.

[3] Time-Resolved Step-Scan FTIR and Uv/ Vis Studies Reveal the Effects of the Covalently Ring Linked His-Tyr-OH to the Reduction of Dioxygen by Heme-Copper Oxidases, Constantinos Koutsoupakis, Tewfik Soulimane and Constantinos Varotsis, submitted.

[4] a. Morgan, J. E.; Verkhovsky, M. I.; Wikstrom, M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12235-12240.

b. Brittain, T.; Little, R. H.; Greenwood, C.; Watmough, N. *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 21-25.

[5] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 261-269.

[6] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12848-12858.

[7] Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 9375-9386.

[8] McMillan, F.; Kannt, A.; Behr, J.; Prisner, T.; Michel, H. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9179-9184.