

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Το O₂ και το NO στην Αναπνοή:
Time-Resolved FTIR και Resonance Raman Μελέτη της
Κυτοχρωμικής c Οξειδάσης και της Αναγωγάσης του
Μονοξειδίου του Αζώτου**

Ευτυχία Πινακουλάκη

Σεπτέμβριος 2002

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Η διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο
Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης*

*Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Βαρώτσος
Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας*

Βιογραφικό Σημείωμα

ΕΥΤΥΧΙΑ ΠΙΝΑΚΟΥΛΑΚΗ

Ημερομηνία γέννησης: 26 Οκτωβρίου 1976
Διεύθυνση αλληλογραφίας: Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
 71 409 Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα
 Τηλέφωνο: 30-810393603
 Fax: 30-810393601
 E-mail: effie@edu.uoc.gr

Εκπαίδευση

Πτυχίο Χημείας (Βαθμός 7.84), Πανεπιστήμιο Κρήτης	1998
Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στον τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης	1998-2002

Ξένες Γλώσσες

Άριστη γνώση Αγγλικής (Πτυχίο Proficiency)
 Μέτρια γνώση Γερμανικής

Διδακτική Εμπειρία

Επικουρική διδασκαλία μαθημάτων ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Τμήματος Χημείας (Πανεπιστήμιο Κρήτης).

Βιοχημεία II (Καθηγητής Γ. Τσιώτης)	1998-1999
Γενική Χημεία I (Καθηγητής Α. Ρίζος)	2000-2001 (Α εξάμηνο)

Συμμετοχή στην οργάνωση των ασκήσεων και του εργαστηριακού χώρου για το μάθημα Εργαστήρια Βιοχημείας (Καθηγητής Δ. Γανωτάκης) 2000-2001 (Β εξάμηνο).

Υποτροφίες

Υποτροφία Ι.Κ.Υ για την επίδοση του ακαδημαϊκού έτους 1999-2000

Short Term EMBO Fellowship (2000)

Υποτροφία Τμήματος Χημείας για το ακαδημαϊκό έτος 2001-2002

Γνώσεις Η/Υ

Άρτιος χειρισμός σε λειτουργικό περιβάλλον Windows. Προγράμματα : Microcal Origin, Chemdraw, Isis Draw, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint.

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

1. “The Role of the Cross-Link His-Tyr in the Functional Properties of the Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 13563-13568.
2. “Nitric Oxide Reductase: Structure and Properties of the Catalytic Site from Resonance Raman Scattering”
Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 23407-23413.
3. “Decay of the Transient Cu_B-CO Complex Is Accompanied by Formation of the Heme Fe-CO Complex of Cytochrome *cbb*₃-CO at Ambient Temperatures: Evidence from Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy”
Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 3814-3815.

4. “Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex in Cytochrome cbb_3 oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., Stavrakis, S., Urbani, A., and Varotsis, C.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 9378-9379.
5. “FTIR and Step-scan Time-resolved FTIR Spectroscopies Reveal a Unique Active Site in Cytochrome caa_3 Oxidase”
Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 32867-32874.
6. “Direct Observation of the Equilibrium Cu_B -CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme a_3 Propionates in Cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*: FTIR and Time-Resolved Step-Scan FTIR Studies”
Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 32860-32866.
7. “Fourier Transform Infrared Evidence for a Six Coordinate Ferric Nitrosylheme b_3 Complex of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri* at Ambient Temperature”
Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Urbani, A., and Varotsis, C.
Submitted to J. Phys. Chem. B
8. “Ferryl-Oxo Intermediates in the Cytochrome oxidase/ H_2O_2 Reaction: Absence of Evidence for Tyr-280 Involvement in the Catalytic Intermediates”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
To be submitted
9. “The Active NO and O_2 Site Structures of Nitric Oxide Reductase from *Paracoccus denitrificans* and of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., and Varotsis, C.
To be submitted

Συμμετοχή σε συνέδρια

1. **5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 13-17 April 1999, Corfu, Greece**
“Time-resolved Resonance Raman Scattering from Cytochromes aa_3 and ba_3 in the Fully Oxidized Cytochrome Oxidase/H₂O₂ Reaction”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Book of Abstracts pg 306.
2. **8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 29 August-2 September 1999, Enschede, The Netherlands**
“Cytochrome a_3 Hemepocket Relaxation Subsequent to Carbon Monoxide Photolysis from Fully Reduced Cytochrome ba_3 Oxidase of *Paracoccus denitrificans*”
Pinakoulaki, E., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Spectroscopy of Biological Molecules: New directions (Greve, J., Puppels, G.J., and Otto, C. Eds) pg 197-198, Kluwer Academic Publishers
3. **8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 29 August-2 September 1999, Enschede, The Netherlands**
“Resonance Raman Scattering from Cytochromes aa_3 and ba_3 in the Fully Oxidized Cytochrome Oxidase/H₂O₂ Reaction”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Spectroscopy of Biological Molecules: New directions (Greve, J., Puppels, G.J., and Otto, C. Eds) pg 195-196, Kluwer Academic Publishers
4. **International Conference on the Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes, 13-17 March 2001, Monte Verita, Ascona, Switzerland**
“Two Conformations of the Catalytic Site in Nitric Oxide Reductase”
Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis, C.
Abstract Book pg 92.

Curriculum Vitae

EFTYCHIA PINAKOULAKI

Date of birth: 26 October 1976
Correspondence Address: University of Crete
Department of Chemistry
71 409 Heraklion, Crete
Tel: 30-810393603
Fax: 30-810393601
E-mail: effie@edu.uoc.gr

Education

B.S. in Chemistry, University of Crete	1998
Ph.D in Biochemistry, Department of Chemistry, University of Crete	1998-2002

Foreign languages

English (Proficiency)
German

Teaching experience

Teaching Assistant	
Biochemistry II	1998-1999
General Chemistry I	2000-2001
Biochemistry Laboratory	2001-2002

Fellowships

I.K.Y 1999-2000

Short Term EMBO Fellowship (2000)

Department of Chemistry, University of Crete 2001-2002

Experience in PCs

Operating system: Windows. Programms: Microcal Origin, Chemdraw, Isis Draw, Microsoft Word, Microsoft PowerPoint.

Publications

1. "The Role of the Cross-Link His-Tyr in the Functional Properties of the Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase"
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 13563-13568.
2. "Nitric Oxide Reductase: Structure and Properties of the Catalytic Site from Resonance Raman Scattering"
Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 23407-23413.
3. "Decay of the Transient Cu_B-CO Complex Is Accompanied by Formation of the Heme Fe-CO Complex of Cytochrome *cbb*₃-CO at Ambient Temperatures: Evidence from Time-Resolved Fourier Transform Infrared Spectroscopy"
Stavrakis, S., Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 3814-3815.

4. “Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme b_3 Complex in Cytochrome cbb_3 oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., Stavrakis, S., Urbani, A., and Varotsis, C.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 9378-9379.
5. “FTIR and Step-scan Time-resolved FTIR Spectroscopies Reveal a Unique Active Site in Cytochrome caa_3 Oxidase”
Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 32867-32874.
6. “Direct Observation of the Equilibrium Cu_B -CO Complex and Functional Implications of the Transient Heme a_3 Propionates in Cytochrome ba_3 -CO from *Thermus thermophilus*: FTIR and Time-Resolved Step-Scan FTIR Studies”
Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 32860-32866.
7. “Fourier Transform Infrared Evidence for a Six Coordinate Ferric Nitrosylheme b_3 Complex of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri* at Ambient Temperature”
Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Urbani, A., and Varotsis, C.
Submitted to J. Phys. Chem. B
8. “Ferryl-Oxo Intermediates in the Cytochrome oxidase/ H_2O_2 Reaction: Absence of Evidence for Tyr-280 Involvement in the Catalytic Intermediates”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
To be submitted
9. “The Active NO and O_2 Site Structures of Nitric Oxide Reductase from *Paracoccus denitrificans* and of Cytochrome cbb_3 Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., and Varotsis, C.
To be submitted

Abstracts

1. **5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 13-17 April 1999, Corfu, Greece**
“Time-resolved Resonance Raman Scattering from Cytochromes $\alpha\alpha_3$ and $b\alpha_3$ in the Fully Oxidized Cytochrome Oxidase/H₂O₂ Reaction”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Book of Abstracts pg 306.
 2. **8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 29 August-2 September 1999, Enschede, The Netherlands**
“Cytochrome α_3 Hemepocket Relaxation Subsequent to Carbon Monoxide Photolysis from Fully Reduced Cytochrome $b\alpha_3$ Oxidase of *Paracoccus denitrificans*”
Pinakoulaki, E., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Spectroscopy of Biological Molecules: New directions (Greve, J., Puppels, G.J., and Otto, C. Eds) pg 197-198, Kluwer Academic Publishers
 3. **8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, 29 August-2 September 1999, Enschede, The Netherlands**
“Resonance Raman Scattering from Cytochromes $\alpha\alpha_3$ and $b\alpha_3$ in the Fully Oxidized Cytochrome Oxidase/H₂O₂ Reaction”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Osterman, T., Ludwig, B., and Varotsis, C.
Spectroscopy of Biological Molecules: New directions (Greve, J., Puppels, G.J., and Otto, C. Eds) pg 195-196, Kluwer Academic Publishers
 4. **International Conference on the Structure, Dynamics and Function of Proteins in Biological Membranes, 13-17 March 2001, Monte Verita, Ascona, Switzerland**
“Two Conformations of the Catalytic Site in Nitric Oxide Reductase”
Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis, C.
Abstract Book pg 92.
-

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης κατά το χρονικό διάστημα 1998-2002, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας Κωνσταντίνου Βαρώτση. Ευχαριστώ το Τμήμα Χημείας για την συμμετοχή μου στο μεταπτυχιακό του πρόγραμμα και για την χορήγηση υποτροφίας κατά το τελευταίο έτος των σπουδών μου.

Οι πιο θερμές μου ευχαριστίες απευθύνονται στον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας Κωνσταντίνο Βαρώτση για την πολύτιμη καθοδήγηση, συνεισφορά, και στήριξη του σε όλη την διάρκεια της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία τους και ιδιαίτερα τους κ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη και Σταύρο Σταυράκη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται στον Καθηγητή Bernd Ludwig για την ευκαιρία που μου προσέφερε, να εργαστώ στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής στο Johann Wolfgang Goethe-Universität, Biozentrum, Institut für Biochemie (Frankfurt, Germany) για την απομόνωση των κυτοχρωμάτων *aa₃*, μεταλλαγμένου Y280H *aa₃*, και *ba₃* από το βακτήριο *P. denitrificans*. Ευχαριστώ επίσης τους Ute Pfitzner και Thomas Ostermeier για την συνεργασία τους κατά την διάρκεια της παραμονής μου εκεί.

Επίσης, ευχαριστώ την Sabine Gemeinhardt για την τεχνική υποστήριξη στην απομόνωση της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *P. denitrificans* που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας στο European Molecular Biology Laboratory (Heidelberg, Germany) του Matti Saraste, του οποίου η πρόωρη απουσία από τη ζωή γέμισε βαθιά λύπη όλους όσους είχαν την ευκαιρία να τον γνωρίσουν.

Ευχαριστώ τους Dr. Andrea Urbani και Dr. Tewfik Soulimane για την απομόνωση των κυτοχρωμάτων *cbb₃* από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* και *caa₃* από το *Thermus thermophilus*, αντίστοιχα.

Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Καθηγητές Δ. Γανωτάκη, Χ. Κατερινόπουλο, Φ. Νταή, Μ. Ορφανόπουλο, Σ. Φαράντο, και τον Επίκουρο Καθηγητή Γ. Τσιώτη για την συμμετοχή τους σε αυτή.

Η εργασία αυτή υποστηρίχθηκε οικονομικά από υποτροφίες της Γ.Γ.Ε.Τ. (ΥΠΕΡ97), του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης, του Ι.Κ.Υ. και του European Molecular Biology Organization.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	14
Abstract	16
Συντομογραφίες	18
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	19
Στόχοι της ερευνητικής εργασίας	51
Κεφάλαιο 2: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Φασματοσκοπία FTIR, Time-Resolved Step-Scan FTIR, και Συντονισμού Raman	52
Κεφάλαιο 3: ΥΛΙΚΑ: Απομόνωση Κυτοχρωμικής Οξειδάσης και Αναγωγάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου	74
Κεφάλαιο 4: Ο Ρόλος του Δεσμού His-Tyr στις Λειτουργικές Ιδιότητες του Διπυρηνικού Κέντρου στην Κυτοχρωμική <i>c</i> Οξειδάση	87
Κεφάλαιο 5: Ενδιάμεσα της Αντίδρασης Οξειδωμένης Κυτοχρωμικής <i>c</i> Οξειδάσης /H ₂ O ₂ : Απουσία Εμπλοκής της Tyr- 280 στα Καταλυτικά Ενδιάμεσα.	95
Κεφάλαιο 6: Η <i>caa</i> ₃ -τύπου Κυτοχρωμική <i>c</i> Οξειδάση από το <i>Thermus thermophilus</i> Περιέχει Μια Ιδιαίτερη Ενεργή Θέση: FTIR και Step-Scan FTIR Μελέτη.	132
Κεφάλαιο 7: Time-Resolved Step-Scan FTIR Μελέτη των Κυτοχρωματών <i>ba</i> ₃ και <i>aa</i> ₃ του <i>P. denitrificans</i> .	155
Κεφάλαιο 8: Μελέτη του Διπυρηνικού Κέντρου Αιμικού/ Μη-Αιμικού Σιδήρου της Αναγωγάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου.	174

Κεφάλαιο 9: Η Αντίδραση της Οξειδωμένης Αναγωγής του Μονοξειδίου του Αζώτου με το NO.	192
Κεφάλαιο 10: Ανίχνευση του Συμπλόκου της Αίμης b_3^{2+} -NO στο Κυτόχρωμα cbb_3 από το <i>Pseudomonas stutzeri</i> .	209
Κεφάλαιο 11: Μελέτη της Αντίδρασης της Ανηγμένης Αναγωγής του Μονοξειδίου του Αζώτου με το NO και Σύγκριση των Αντιδράσεων NOR και cbb_3 με το O ₂ .	219
Δημοσιεύσεις	245

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε με στόχο την μελέτη 1) της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (CcO), η οποία είναι το ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου στην αερόβια αναπνοή θηλαστικών και βακτηρίων, και 2) της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOR) που καταλύει την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου στην αναερόβια αναπνοή των βακτηρίων. Η ενεργή θέση της CcO είναι ένα διπυρηνικό κέντρο αποτελούμενο από μία αίμη υψηλής διαμόρφωσης σπιν και ένα άτομο χαλκού, τον Cu_B. Στην NOR, η ενεργή θέση του ενζύμου αποτελείται από μία αίμη υψηλής διαμόρφωσης σπιν και ένα άτομο μη-αιμικού Fe_B.

Ένας από τους στόχους στην μελέτη της CcO ήταν ο χαρακτηρισμός του δομικού και λειτουργικού ρόλου της Tyr280, η οποία διατηρεί ομοιοπολικό δεσμό με έναν από τους υποκαταστάτες του Cu_B, την His276. Αρχικά, χαρακτηρίσαμε με φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR το κυτόχρωμα *aa*₃ του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans* στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη της Tyr280 σε ιστιδίνη στην οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή καθώς επίσης και το CO-σύμπλοκο του ενζύμου. Η αίμη *a*₃ διατηρεί την ίδια διαμόρφωση σπιν, αριθμό συναρμογής, εγγύ και μακρινό περιβάλλον στην οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή τόσο του φυσικού όσο και του Y280H μεταλλαγμένου ενζύμου. Η ενεργή θέση διατηρεί την ικανότητα δέσμευσης και αναγωγής του οξυγόνου στο μεταλλαγμένο ένζυμο, και άρα η σταθερότητα του διπυρηνικού κέντρου δεν επηρεάζεται από την απουσία του ομοιοπολικού δεσμού Tyr280-His276.

Μελετήθηκαν τα 607 και 580 nm ενδιάμεσα της χημείας οξυγόνου της CcO σε θερμοκρασία δωματίου με φασματοσκοπία UV/Vis και συντονισμού Raman, μέσω της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος *aa*₃ από το βακτήριο *P. denitrificans* με το H₂O₂. Διερευνήθηκε, επίσης ο ρόλος της τυροσίνης 280 στον σχηματισμό των 607 και 580 nm μορφών μέσω της σύγκρισης των αντιδράσεων της οξειδωμένης μορφής του φυσικού και μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος *aa*₃ με το H₂O₂, αλλά και της μικτού σθένους μορφής των ενζύμων με το O₂. Διαπιστώθηκε ότι οι ίδιες μορφές σχηματίζονται κατά τις αντίστοιχες αντιδράσεις φυσικού και μεταλλαγμένου ενζύμου, και κατά συνέπεια προτείνουμε ότι η Y280 δεν μετέχει στον σχηματισμό αυτών των ενδιάμεσων.

Η δομή και η δυναμική του διπυρηνικού κέντρου του κυτοχρώματος *caa*₃ από το βακτήριο *T. thermophilus*, που παρουσιάζει και ενεργότητα αναγωγής του NO, μελετήθηκε με φασματοσκοπία FTIR και time-resolved step scan FTIR. Το κυτόχρωμα *caa*₃ είναι το μόνο μέλος της οικογένειας των *aa*₃-τύπου οξειδασών που το διπυρηνικό του κέντρο αποτελείται

από μία αίμη β-διαμόρφωσης και Cu_B α-διαμόρφωσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου που έχουν ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της α-διαμόρφωσης δεν είναι απαραίτητες για την ενζυματική δραστηριότητα. Προτάθηκε επίσης μοντέλο για την περιγραφή της δυναμικής δέσμευσης/αποδέσμευσης υποκαταστατών στο ενεργό κέντρο. Με την ίδια μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε επίσης συγκριτική μελέτη των κυτοχρωμάτων aa_3 και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans*.

Χαρακτηρίστηκε η δομή του διπυρηνικού κέντρου αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *P. denitrificans*, κατά την μετάβαση από την οξειδωμένη στην ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου με φασματοσκοπία συντονισμού Raman, καθώς επίσης και του CO συμπλόκου του ενζύμου. Ο διαχωρισμός της δόνησης $\nu_{as}(Fe-O-Fe)$ δηλώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων (*ανοικτή* και *κλειστή*) στο καταλυτικό κέντρο του οξειδωμένου ενζύμου, ενώ η εγγύς ιστιδίνη δεν δεσμεύεται από τον αιμικό σίδηρο σε καμία από τις διαμορφώσεις αυτές. Η μετάβαση στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου προκαλεί την δέσμευση της εγγύς ιστιδίνης στον σίδηρο της αίμης. Ο δεσμός αυτός διατηρείται και στο CO-σύμπλοκο του ανηγμένου ενζύμου, το οποίο είναι αριθμού συναρμογής έξι και χαμηλής διαμόρφωσης σπιν.

Μελέτηκε επίσης η αντίδραση της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής της NOR με το NO με φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR, για τον χαρακτηρισμό ενδιάμεσων της καταλυτικής πορείας. Η αλληλεπίδραση του NO με την οξειδωμένη NOR έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου του NO με την αίμη b_3 χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι, το οποίο προτείνουμε ότι αποτελεί ενδιάμεσο του καταλυτικού της αναγωγής του NO. Τα προϊόντα της αντίδρασης της ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του αζώτου, δείχνουν ότι ο σχηματισμός του δεσμού N-N κατά την αναγωγή του NO σε N_2O στην διαδικασία της απονιτροποίησης πραγματοποιείται με ακέραιο τον δεσμό His-αίμης b_3 .

Η αντίδραση της αναγωγής του O_2 από την NOR, ως μακρινό μέλος της οικογένειας των τελικών οξειδασών, συγκρίθηκε με την αντίστοιχη αντίδραση του κυτοχρώματος cbb_3 από το *P. stutzeri*, που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομολογία με την NOR. Μελετήθηκε επίσης η αντίδραση του ανηγμένου κυτοχρώματος με το NO. Το cbb_3 παρουσιάζει την μέγιστη ενεργότητα αναγωγής του NO σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των τελικών οξειδασών. Η προσθήκη NO στο ένζυμο προκαλεί την διάσπαση του δεσμού της αίμης b_3 -His, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου b_3^{2+} -NO αριθμού συναρμογής πέντε. Προτάθηκε μοντέλο για την περιγραφή των καταστάσεων δέσμευσης του υποκαταστάτη και της οξείδωσης του ανηγμένου cbb_3 μετά την προσθήκη του NO.

ABSTRACT

The aim of this PhD thesis was to study 1) cytochrome *c* oxidase (CcO), which is the enzyme that catalyses the reduction of dioxygen to H₂O in the aerobic respiration of mammals and bacteria, and 2) nitric oxide reductase (NOR) that catalyses the reduction of nitric oxide in the anaerobic respiration of bacteria. The active center of CcO is a binuclear site consisting of a high spin heme and a copper atom, Cu_B. The catalytic site of NOR consists of a high spin heme and a non-heme iron, Fe_B.

A major aim of the study of CcO was to determine the structural and functional role of Tyr280, which is covalently bound to one of Cu_B ligands, namely His276. We have used resonance Raman and FTIR spectroscopy to characterize cytochrome *aa*₃ and the Y280H mutant from *P. denitrificans* in the oxidized and fully reduced state, as well as the CO-complexes of the enzymes. Heme *a*₃ retains the same proximal environment, spin, and coordination state in the wild type and Y280H mutant enzyme. The catalytic site retains its active configuration that allows dioxygen binding to heme *a*₃, thus the stability of the site is not compromised by absence of the covalent link between Tyr280-His276.

We have studied the formation of the 607 and 580 nm species of the catalytic cycle of CcO by investigating the reaction of the fully oxidized cytochrome *aa*₃ from *P. denitrificans* with hydrogen peroxide, at room temperature, using optical and resonance Raman spectroscopy. The role of Y280 in the formation of the 607 and 580 nm species was also examined by comparing the reactions of the oxidized wild type enzyme/H₂O₂ and the mixed-valence enzyme/O₂, to the respective reactions of the Y280H mutant. We have observed the formation of the same species in the reactions of the wild type and the Y280H mutant enzyme, and thus, suggested that Y280 is not involved in the generation of these intermediates.

FTIR and time-resolved step scan FTIR have been applied for the investigation of the structure and dynamics of the binuclear site of cytochrome *caa*₃ from *Thermus thermophilus*, which displays significant activity in the reduction of nitric oxide. Cytochrome *caa*₃ is the only member of the heme-copper oxidase family, whose binuclear center consists of an *a*₃-type heme of the β-form and a Cu_B atom of the α-form. These results illustrate that the properties of the binuclear center in other oxidases resulting in the α-form are not required for enzymatic activity. A model describing the photodissociation/association of ligands in the active site of the enzyme has been proposed. We have also used the same experimental

approach for the comparative study of the alternative oxidases of *P. denitrificans*, cytochromes aa_3 and ba_3 .

We have studied the structure of the dinuclear heme/non-heme iron center of nitric oxide reductase from *P. denitrificans* in both the oxidized and reduced states of the enzyme, as well as in the CO-complex of NOR. The two distinct $\nu_{as}(\text{Fe-O-Fe})$ modes we have observed suggest the presence of two different conformations (*open* and *closed*) of the catalytic site of the oxidized enzyme. The proximal histidine is not ligated to the heme b_3 in the oxidized state of NOR. The transition to the reduced state of the enzyme results in the formation of the heme b_3 -His bond. Heme b_3 becomes low spin and six-coordinate in the CO-complex.

Resonance Raman and FTIR spectroscopy have been applied for the investigation of the reaction of both oxidized and reduced NOR with nitric oxide. The interaction of oxidized NOR with NO results in the formation of a heme b_3 ferric-six-coordinate low-spin NO-complex, which we propose that is an intermediate of the catalytic cycle. The product of reaction of fully reduced NOR/NO indicates that the formation of the N-N bond in the denitrification process occurs with an intact His-heme b_3 bond.

The reduction of dioxygen by NOR has been investigated, as NOR is considered to be a distant member of the heme-copper oxidase superfamily, and compared to the respective reaction of cytochrome cbb_3 from *P. stutzeri*, which is the heme-copper oxidase that displays the higher homology with NOR. We have also studied the reaction of the fully reduced cytochrome cbb_3 with NO. Cytochrome cbb_3 displays the highest activity in nitric oxide reduction among the members of the heme-copper oxidase family. Addition of NO to the reduced state of cytochrome cbb_3 causes the disruption of the heme b_3 -His bond, resulting in the formation of a five coordinate b_3^{2+} -NO complex. A model describing the oxidation of the enzyme after the addition of NO has been proposed.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	adenosine diphosphate
ATP	adenosine triphosphate
CcO	cytochrome <i>c</i> oxidase
cNOR	cytochrome <i>c</i> -oxidizing bacterial nitric oxide reductase
DM	<i>n</i> -dodecyl β-D-maltoside
EDTA	ethylene diamine tetra-acetic acid
EPR	electron paramagnetic resonance
FTIR	Fourier transform infrared
Hb	hemoglobin
IMAC	immobilized metal-ion affinity chromatography
IPTG	isopropylthiogalactoside
kD	kilodaltons
Mb	myoglobin
MV	mixed valence
NAD	nicotinamide adenosine dinucleotide, oxidized form
NADH	nicotinamide adenosine dinucleotide, reduced form
NOR	bacterial nitric oxide reductase
qNOR	quinol-oxidizing bacterial nitric oxide reductase
QSHP	Q-sepharose high performance
RR	resonance Raman
TR-FTIR	time-resolved Fourier transform infrared
SDS-PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

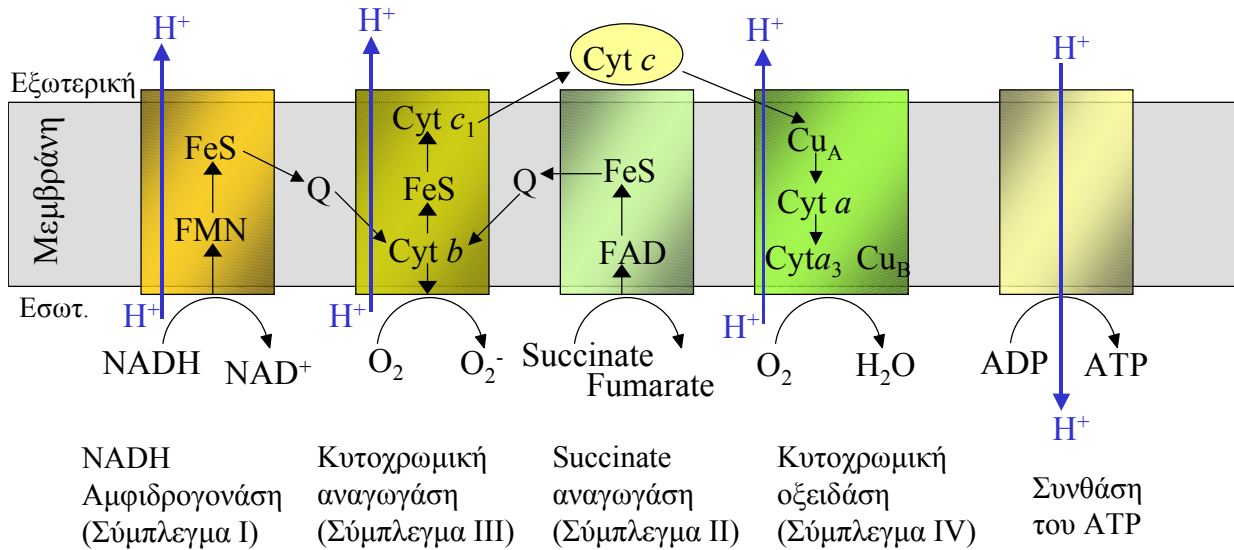
Εισαγωγή

1. ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΑΠΝΟΗ

1.1 Διατήρηση της ελεύθερης ενέργειας στην αναπνευστική αλυσίδα

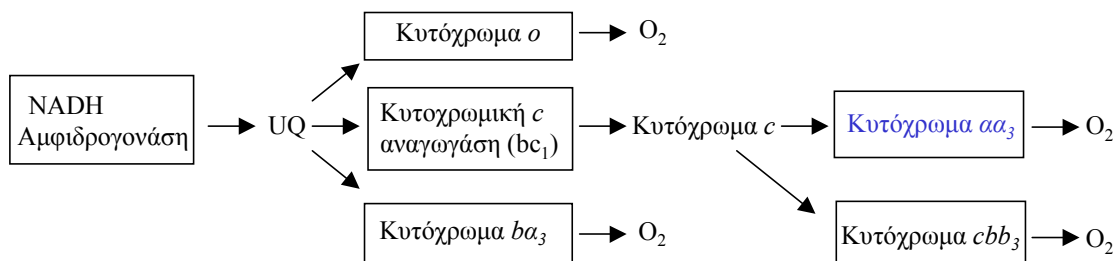
Το μοριακό οξυγόνο εμφανίστηκε στην γη πριν περίπου 2.5 δισεκατομύρια χρόνια και έφτασε τα σημερινά του επίπεδα (~20% της ατμόσφαιρας) μετά από 2 δισεκατομύρια χρόνια. Η ακριβής ιστορία της αύξησης του ποσοστού οξυγόνου δεν είναι γνωστή, αλλά η γενική θεωρία που επικρατεί υποστηρίζει την παρουσία οργανισμών ικανών να πραγματοποιούν την φωτοσυνθετική διαδικασία (πρόγονοι των σημερινών κυανοβακτηρίων) (1). Σήμερα το οξυγόνο είναι απαραίτητο στον μεταβολισμό πολλών βακτηρίων αλλά και όλων των φυτών και ζώων, αποτελώντας τον τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και συνεισφέροντας παράλληλα στην διατήρηση της ελεύθερης ενέργειας. Το γεγονός ότι το 90% του οξυγόνου της βιόσφαιρας ανάγεται από μία οικογένεια ενζύμων, τις τελικές αιμοχαλκοξειδάσες, στοιχειοθετεί την εξέχουσα σημασία της διαδικασίας αυτής (2-6).

Η παρουσία των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (ή βακτηρίων), είναι θεμελιώδες στοιχείο που καθορίζει την λειτουργία τους, εφόσον η ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις συζεύγνεται με την δημιουργία ηλεκτροχημικού δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης, που τελικά χρησιμοποιείται για την σύνθεση του ATP (7). Στο σχήμα 1 παρουσιάζονται τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων και με τα βέλη καθορίζονται τα μονοπάτια μεταφοράς ηλεκτρονίων, αρχικά από την NADH αμιδρογονάση (Σύμπλεγμα I) ως τον τελικό αποδέκτη, την κυτοχρωμική *c* οξειδάση (Σύμπλεγμα IV), που καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Με εξαίρεση το Σύμπλεγμα II, τα τρία άλλα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελούν αντλίες πρωτονίων, συζεύγνουν δηλαδή την μεταφορά ηλεκτρονίων από υψηλό σε χαμηλό δυναμικό, με την μετατόπιση πρωτονίων από την εσωτερική (μιτοχονδριακή μήτρα) προς την εξωτερική πλευρά (διαμεμβρανικός χώρος) της μεμβράνης. Η διαβάθμιση πρωτονίων που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό, χρησιμοποιείται την από την συνθάση του ATP, ολοκληρώνοντας την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



Σχήμα 1. Αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Με τα μαύρα βέλη απεικονίζεται το μονοπάτι μεταφοράς ηλεκτρονίων, και με τα κυανά η μεταφορά πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης.

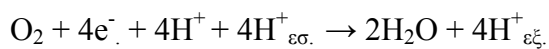
Τα βακτηριακά κύτταρα σε αντίθεση με τα μιτοχόνδρια διαθέτουν εναλλακτικές πορείες στην αναπνευστική τους αλυσίδα λόγω της ικανότητας τους να προσαρμόζονται στις συνθήκες του περιβάλλοντος που αναπτύσσονται. Σε αυτές τις εναλλακτικές πορείες είναι πιθανή η απουσία της κυτοχρωμικής αναγωγής (Σύμπλεγμα III), που έχει ως αποτέλεσμα την απευθείας μεταφορά των ηλεκτρονίων από μία κίνηση (Q) ή ουβικίνη (UQ) στην τελική οξειδάση που χαρακτηρίζεται αντίστοιχα ως κινολική οξειδάση. Εκτός λοιπόν των κυτοχρωμικών *c* οξειδασών των ευκαρυωτικών κυττάρων, που δέχονται ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα *c* (δότης ενός ηλεκτρονίου), στα προκαρυωτικά κύτταρα είναι δυνατή η παρουσία τελικών οξειδασών που οξειδώνουν δότες δύο ηλεκτρονίων, τις κινόνες. Το βακτήριο του εδάφους *Paracoccus denitrificans* είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα βακτηρίου με εναλλακτικές αναπνευστικές πορείες, οι οποίες περιλαμβάνουν διαφορετικές κινολικές και κυτοχρωμικές οξειδάσες και παρουσιάζονται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2. Εναλλακτικές πορείες στην αερόβια αναπνοή του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans*. Τα ένζυμα που δρουν ως αντλίες πρωτονίων περικλείονται σε τετράγωνα.

1.2 Η οικογένεια των τελικών οξειδασών

Η οικογένεια των τελικών οξειδασών (αιμοχαλκοξειδάσες), που αποτελεί όπως προαναφέρθηκε τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας, καταλύει την αντίδραση της αναγωγής του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η ελεύθερη ενέργεια που παράγεται κατά την αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για την μεταφορά πρωτονίων από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης (μιτοχονδριακή μήτρα ή κυτταρόπλασμα) προς την εξωτερική (2-6). Η συνολική αντίδραση μπορεί λοιπόν να περιγραφεί από την ακόλουθη χημική εξίσωση:

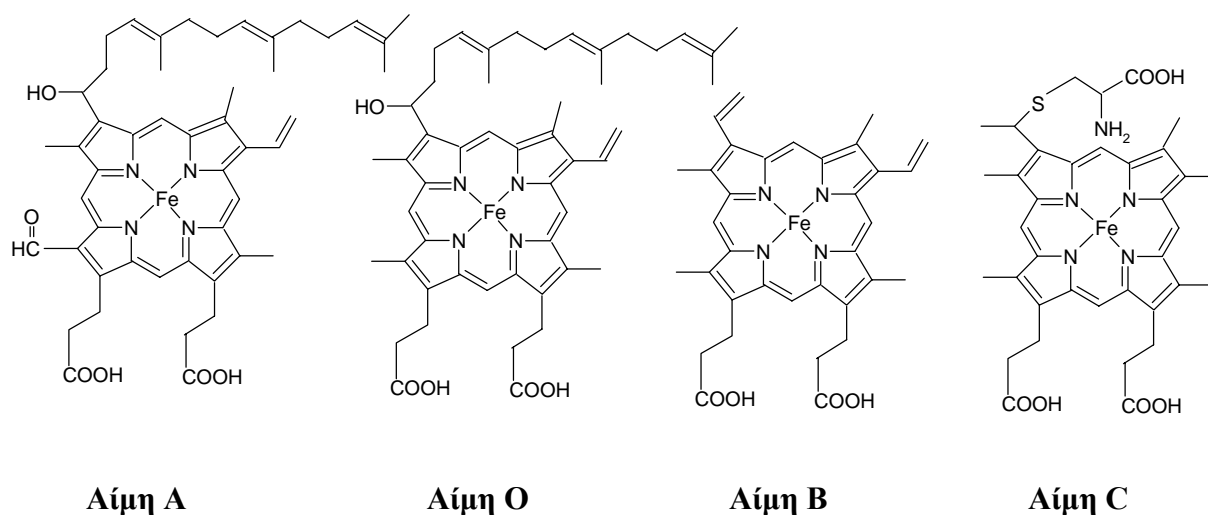


Όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 1 τα τέσσερα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του οξυγόνου μεταφέρονται από το κυτόχρωμα *c*, που βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο (εξωτερική πλευρά), ενώ τα τέσσερα πρωτόνια που είναι απαραίτητα για την δημιουργία του νερού αντλούνται από την μιτοχονδριακή μήτρα (εσωτερική πλευρά) και χαρακτηρίζονται ως «χημικά πρωτόνια». Η δημιουργούμενη από την χημεία του οξυγόνου διαβάθμιση φορτίου ενισχύεται επιπλέον, εφόσον η ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται από την αντίδραση χρησιμοποιείται από την οξειδάση για από την μεταφορά τεσσάρων πρωτονίων από την εσωτερική ($4\text{H}^+_{\text{εσ.}}$) στην εξωτερική πλευρά ($4\text{H}^+_{\text{εξ.}}$) της μεμβράνης. Τα πρωτόνια αυτά χαρακτηρίζονται ως «πρωτόνια διαβάθμισης» (scalar). Όμοια είναι η λειτουργία και των κινολικών οξειδασών με την διαφορά ότι δότη των ηλεκτρονίων αποτελεί μία κινόνη (ή ουβικινόνη) που βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης. Κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες προσφέρουν συνεπώς κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην διατήρηση της ενέργειας στο κύτταρο και άρα στην διατήρηση της ζωής στους αερόβιους οργανισμούς.

Η οικογένεια των τελικών οξειδασών περιλαμβάνει αρκετά μέλη που μπορεί να παρουσιάζουν διαφορές ως προς του δότες ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα *c* ή κινόνη), στον τύπο αιμών που περιέχουν (A, B, C, O), όπως επίσης και στον αριθμό των υπομονάδων τους. Τα μέλη της οικογένειας όμως καθορίζονται από την παρουσία στην υπομονάδα I, μιας αίμης χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι όπως επίσης και ένα μοναδικό διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από μία αίμη υψηλού σπιν και ένα άτομο χαλκού, τον Cu_B . Με βάση την ακολουθία των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε ένας αρχικός διαχωρισμός των αιμοχαλκοξειδασών σε δύο ομάδες α) του τύπου Cox που παρουσιάζουν ομοιότητα με την μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση και β) του τύπου *cbb*₃ (ή FixN) (8,9). Οι Cox-τύπου

οξειδάσες διαθέτουν μία δεύτερη υπομονάδα (υπομονάδα II) που περιέχει στην περίπτωση των κυτοχρωμικών οξειδασών ένα μικτού σθένους διμεταλλικό κέντρο χαλκού (Cu_A), ενώ στις κινολικές οξειδάσες το κέντρο αυτό απουσιάζει. Οι τύπου cbh_3 οξειδάσες περιέχουν δύο διαφορετικές υπομονάδες με μία και δύο αίμες c , αντίστοιχα.

Η υπομονάδα I που είναι διατηρημένη σε όλες τις τελικές οξειδάσες περιέχει την ενεργή θέση, το οποίο είναι το διπυρηνικό κέντρο της υψηλού σπιν αίμης- Cu_B , όπως επίσης και τον άμεσο δότη ηλεκτρονίων προς το καταλυτικό κέντρο, την χαμηλού σπιν αίμη. Τα αμινοξέα που δεσμεύονται σε αυτές τις ομάδες (έξι ιστιδίνες) είναι αυστηρά διατηρημένα σε ολόκληρη την οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών και είναι οι: His I-94 και His I-413 (υποκαταστάτες της αίμης χαμηλού σπιν), His I-276, His I-325, His I-326 (υποκαταστάτες του Cu_B), και His I-411 (εγγύς υποκαταστάτης της αίμης υψηλού σπιν). Η αναφορά των αμινοξέων γίνεται με βάση την αρίθμηση του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* (10,11). Ο τύπος αίμης στις οξειδάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι αποκλειστικά a και a_3 (όπου ο συμβολισμός « $_3$ » διαχωρίζει την αίμη υψηλού του διπυρηνικού κέντρου). Στην περίπτωση των προκαρυωτικών οξειδασών συναντάμε ποικιλία αιμών a , b , c , o τόσο στην θέση της χαμηλού σπιν όσο και της χαμηλού σπιν αίμης. Οι διαφορετικοί τύποι αίμης απεικονίζονται στο σχήμα 3.

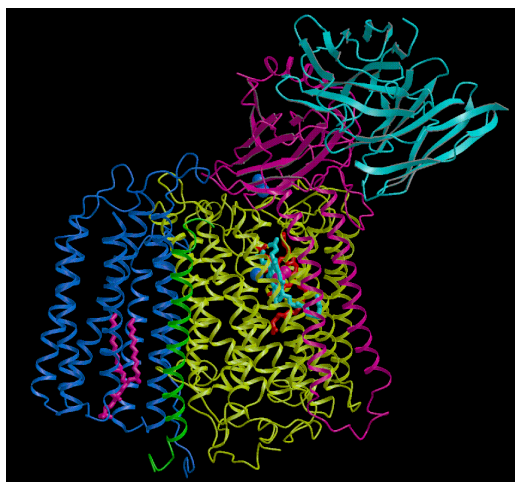


Σχήμα 3. Απεικόνιση των διαφορετικών ομάδων αίμης που εμφανίζονται στις τελικές οξειδάσες.

1.2.1 Δομή οξειδασών

Η δομή της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοδιού (12-14), όπως επίσης και των κυτοχρωμάτων aa_3 από το βακτήριο εδάφους *Paracoccus denitrificans* (11,15), ba_3 από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus* (16), και bo_3 από το βακτήριο *E. coli* (17), προσδιορίστηκαν τα τελευταία χρόνια με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, προσφέροντας μοναδικές πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων της οικογένειας των τελικών οξειδασών. Ο αριθμός των υπομονάδων παρουσιάζει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στην μιτοχονδριακή οξειδάση (13 υπομονάδες) και τα βακτηριακά ένζυμα (3-4 υπομονάδες). Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται κυρίως στην υπομονάδα I, που όπως προαναφέρθηκε είναι διατηρημένη σε όλη την οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών, και στην υπομονάδα II που παρουσιάζει υψηλή ομολογία στις Cox-τύπου οξειδάσες. Συνεπώς οι υπομονάδες που περιέχουν τα οξειδοαναγωγικά κέντρα του ενζύμου είναι αυτές που παρουσιάζουν παρόμοια δομή.

Η συνολική τρισδιάστατη δομή του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans* αποτελείται από 22 διαμεμβρανικά, κυρίως ελικοειδή, τμήματα και παρουσιάζεται στο σχήμα 4 (Iwata *et al. Nature*), στο οποίο συμπεριλαμβάνεται και το F_v θραύσμα αντισώματος με το οποίο κρυσταλλώθηκε. Στην παρούσα εργασία η αναφορά στην δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης θα γίνεται κυρίως με βάση το *P. denitrificans*.



Σχήμα 4: Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση από το βακτήριο *P. denitrificans* με το F_v θραύσμα αντισώματος που κρυσταλλώθηκε, όπως βρίσκεται παράλληλα προς την μεμβράνη. Ο κορμός της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των υπομονάδων I, II, III, IV και το F_v παρουσιάζονται με κίτρινο, μωβ, μπλε, πράσινο και γαλάζιο αντίστοιχα. Η υπομονάδα I περιέχει τις αίμες a (κόκκινο) και a_3 (γαλάζιο), όπως επίσης και το Cu_B (μπλε). Η υπομονάδα II περιέχει τον Cu_A (μπλε). Στην υπομονάδα III εμφανίζεται ένα μόριο φωσφολιπιδίου (μωβ). Η κυτταροπλασματική πλευρά (κάτω) είναι περίπου 90 \AA , η περιπλασματική 75 \AA και το ύψος $\sim 55 \text{ \AA}$. Θεωρώντας ότι βλέπουμε κάθετα προς την μεμβράνη η οξειδάση έχει ελλειψοειδές σχήμα με διαστάσεις των αξόνων 90 και 60 \AA .

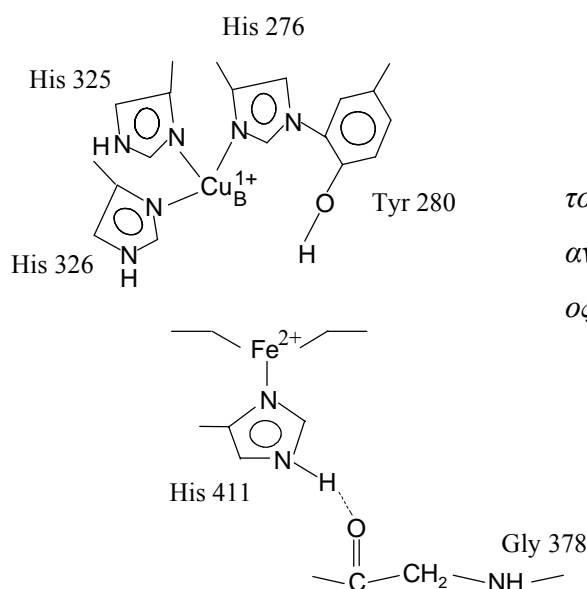
Υπομονάδα II

Στις κυτοχρωμικές οξειδάσες Cox-τύπου (μιτοχονδριακό κυτόχρωμα aa_3 , κυτόχρωμα aa_3 από το *Paracoccus denitrificans* και ba_3 από το βακτήριο *Thermus thermophilus*) ο αρχικός δέκτης ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c , ο Cu_A , βρίσκεται στην υπομονάδα II. Η υπομονάδα II αποτελείται από τρία τμήματα: ένα N-τελικό βρόγχο, δύο διαμεμβρανικές έλικες και ένα C-τελικό εξωμεμβρανικό σφαιρικό τμήμα το οποίο περιέχει και τον Cu_A . Όπως είχε προβλεφθεί από προηγούμενες μελέτες (18,19,20) και επιβεβαιώθηκε από την κρυσταλλική δομή ο Cu_A είναι ένα διμερές μικτού σθένους $Cu_A^{+1.5} - Cu_A^{+1.5}$. Το ένα άτομο χαλκού συνδέεται με την πρωτεΐνη μέσω των αμινοξέων Cys II-216, Cys II-220, His II-181, Met II-227 και το δεύτερο άτομο μέσω των Cys II-216, Cys II-220, His II-224 και το καρβονυλικό οξυγόνο του Glu II-218, δηλαδή τα δύο άτομα χαλκού συνδέονται μέσω των ατόμων θείου δύο κυστεϊνών και η απόστασή τους είναι 2.6 Å. Η απόσταση του Cu_A , που βρίσκεται πλησιέστερα στις δύο αίμες της υπομονάδας I, είναι 19.5 και 22.1 Å αντίστοιχα για την αίμη a και a_3 . Η μικρότερη απόσταση του Cu_A από την αίμη a συγκριτικά με την a_3 , βρίσκεται σε συμφωνία με την οριοθέτηση της μεταφοράς ηλεκτρονίων από τον αρχικό δεκτη Cu_A στην αίμη a και από εκεί τελικά στο διπυρηνικό κέντρο (6,19,21).

Υπομονάδα I

Η δομή της υπομονάδας I παρουσιάζει ίσως το σημαντικότερο ενδιαφέρον, εφόσον δεν εμφανίζει μόνο την υψηλότερη δομική ομοιότητα στην οικογένεια των τελικών οξειδασών, αλλά επίσης περιέχει την καταλυτική θέση όπου πραγματοποιείται η αναγωγή του οξυγόνου και η σύζευξή της με την άντληση πρωτονίων (2-6). Η υπομονάδα I αποτελείται από 12 διαμεμβρανικά τμήματα, με δευτεροταγή δομή στην οποία κυριαρχεί η α -έλικα, και περιέχει τα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα του ενζύμου. Τα 12 διαμεμβρανικά τμήματα είναι διευθετημένα ώστε να σχηματίζουν τρεις κύκλους συμμετρικά τοποθετημένους. Η διευθέτηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα των σχηματισμό τριών πόρων A, B και C. Ο πόρος A διαπερνάται από διατηρημένα αρωματικά αμινοξέα. Η υπομονάδα I περιέχει τις δύο ομάδες, με την αίμη a να είναι διευθετημένη στον πόρο C, ενώ η a_3 στον πόρο B. Οι δύο αίμες απέχουν από την περιπλαστική επιφάνεια της μεμβράνης περίπου 15 Å, με τα επίπεδά τους κάθετα προς αυτή και με τα μεταξύ τους επίπεδα να σχηματίζουν γωνία 108°. Η απόσταση ανάμεσα στις δύο αίμες είναι 13.2 Å (κέντρο-κέντρο), ενώ η πλησιέστερη απόσταση τους είναι 4.7 Å. Η αίμη a είναι χαμηλού σπιν με αξονικούς υποκαταστάτες δύο διατηρημένες ιστιδίνες, (βλ. Παράγραφο 1.2) τις His I-94 και His I-413. Η υδροξυαιθυλ-φαρνεσυλική πλευρική ομάδα της αίμης a περικλείεται στον πόρο C και σε συνδιασμό με την παρουσία υδρόφοβων καταλοίπων αποκλείει την πρόσβαση της αίμης από την κυτταροπλα-

σματική πλευρά της μεμβράνης. Η υψηλού σπιν αίμη α_3 και ο Cu_B , που σχηματίζουν το διπυρηνικό κέντρο στο οποίο πραγματοποιείται η αναγωγή του οξυγόνου, βρίσκονται στον πόρο B. Η αίμη α_3 παρουσιάζει αριθμό συναρμογής πέντε με αξονικό υποκαταστάτη την διατηρημένη ιστιδίνη His I-411, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο του καταλοίπου Gly I-378 (Σχήμα 5). Η υδροξυαιθυλ-φαρνεσυλική πλευρική ομάδα της α_3 , σε αντίθεση με την αίμη α , απομακρύνεται από τον πόρο B και διαπερνάει την λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης με αποτέλεσμα το διπυρηνικό κέντρο να είναι προσβάσιμο σε πρωτόνια από την περιπλαστική πλευρά. Οι υποκαταστάτες του Cu_B είναι τρία διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης, οι His I-276, His I-325 και His I-326. Η απόσταση α_3/Cu_B είναι 4.5 Å στο κυτόχρωμα $\alpha\alpha_3$ από το *P. denitrificans* που αποτελείται και από τις τέσσερις υπομονάδες, ενώ εμφανίζεται 5.2 Å στο ένζυμο που διαθέτει μόνο τις υπομονάδες I και II (11,15). Η απόσταση των δύο μετάλλων παρουσιάζει εξάρτηση από την οξειδωτική τους κατάσταση και από την δέσμευση υποκαταστατών, όπως φαίνεται από την διακύμανση από 4.9 Å στο οξειδωμένο μιτοχονδριακό κυτόχρωμα $\alpha\alpha_3$, σε 5.2 Å στην ανηγμένη μορφή του και σε 5.3 Å στα σύμπλοκα οξειδωμένου ενζύμου/αζιδίου και ανηγμένου ενζύμου/μονοξειδίου του άνθρακα (12-14). Η ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη που παρουσιάζει το διπυρηνικό κέντρο στην οξειδωμένη κατάσταση του ενζύμου αποτέλεσε την βάση για την πρόταση της ύπαρξης ενός υποκαταστάτη γέφυρας ανάμεσα στα δύο μεταλλικά κέντρα (22). Ο υποκαταστάτης αυτός δεν διελευκάνθηκε από την λύση της κρυσταλλοδομής, εφόσον η ηλεκτρονική πυκνότητα ανάμεσα στα δύο κέντρα αποδόθηκε από τον Yoshikawa σε υπεροξείδιο ($\alpha_3\text{-O-O-Cu}_B$), από την ομάδα του Michel σε δύο υδροξύλια ή μόρια H_2O που συνδέονται το καθένα με ένα μέταλλο και μεταξύ τους μέσω δεσμού υδρογόνου, ενώ ο Soulimane *et al.* αναφέρει την παρουσία ενός μόνο ατόμου O ως υποκαταστάτη γέφυρας.



Σχήμα 5: Σχηματική απεικόνιση του διπυρηνικού κέντρου στην ανηγμένη μορφή της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

Από τις κρυσταλλικές δομή των οξειδασών αναγνωρίστηκαν επίσης πιθανά μονοπάτια μεταφοράς πρωτονίων. Στο βακτήριο *P. denitrificans* (11,15) το πρώτο μονοπάτι οδηγεί στο διπυρηνικό κέντρο, ονομάστηκε K και περιλαμβάνει τα υψηλά διατηρημένα αμινοξέα Lys I-354, Thr I-351, Tyr I-280 και την υδρόξυ ομάδα της υδροξυαιθυλ-φαρνεσυλική πλευρική ομάδα της αίμης α_3 . Το δεύτερο χαρακτηρίστηκε ως D μονοπάτι και περιλαμβάνει την Asp I-124 και αρκετά διατηρημένα πολικά αμινοξέα όπως Asn I-199, Asn I-113, Asn I-131, Tyr I-35, Ser I-193, τα οποία βρίσκονται γύρω από τον πόρο C. Εξω από τον πόρο C πιθανά συμμετέχουν τα Glu I-278 και Pro I-277 ή οι προπιονικές ομάδες της αίμης α_3 . Παρόμοια μονοπάτια έχουν αναφερθεί και στις υπολοιπες οξειδάσες που έχουν κρυσταλλωθεί.

Μία από τις σημαντικότερες αποκαλύψεις της κρυσταλλικής δομής θεωρείται ο ομοιοπολικός δεσμός της Tyr I-280 με ένα από τους τρεις υποκαταστάτες του Cu_B , συγκεκριμένα την His I-276. Η ύπαρξη του δεσμού αυτού επιβεβαιώνεται σε όλες τις κρυσταλλικές δομές που έχουν αναφερθεί ως σήμερα όπως και από χημικές μελέτες της πρωτεΐνης (23). Η Tyr I-280 αποτελεί ένα καθολικά διατηρημένο αμινοξύ στην οικογένεια των Cox-τύπου οξειδασών, ενώ απουσιάζει στις *cbh3*-τύπου τελικές οξειδάσες. Η αποκάλυψη του ομοιοπολικού δεσμού του αμινοξέος με ένα από τους υποκαταστάτες του Cu_B αποτέλεσε τη βάση για μία σειρά μελετών που την προσδιορίζουν ως ενεργό μέτοχο στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου. (Παράγραφος 1.2.2)

1.2.2 Η αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο και το ανάλογό του, το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Πολλές φασματοσκοπικές αλλά και βιοχημικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου από την κυτοχρωμική οξειδάση. Στην προσπάθεια χαρακτηρισμού των ενδιάμεσων έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές συνθήκες, που περιλαμβάνουν την αντίδραση του πλήρως ανηγμένου (Cu_A^{1+} , a^{2+} , a_3^{2+} , Cu_B^{1+}), καθώς επίσης και του μικτού σθένους ενζύμου (Cu_A^{2+} , a^{3+} , a_3^{2+} , Cu_B^{1+}), με το οξυγόνο. Μελέτες για τον χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων της αντίδρασης και της οξειδωμένης αλλά και της ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το μερικώς ανηγμένο ενδιάμεσο οξυγόνου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, έχουν δείξει ότι κάποια από τα σχηματιζόμενα ενδιάμεσα είναι κοινά στις προαναφερόμενες αντιδράσεις.

Συνοπτικά, τα ενδιάμεσα της αντίδρασης που έχουν χαρακτηριστεί είναι τα: οξύ ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, A), φερύλ ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$, P ή 607 nm-μορφή), φερύλ ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$, F ή 580 nm-μορφή) και το υδρόξυ ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) ενώ διαφωνίες εξακολουθούν να ιφίστανται ως προς την εμφάνιση του περόξυ ενδιάμεσου ($\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^-$) και τον δομή των δύο ενδιάμεσων που παρουσιάζουν χαρακτήρα φερυλ, όπως επίσης και για την συμμετοχή της Tyr I-280 στην καταλυτική πορεία.

Αρχική δέσμευση του οξυγόνου και σχηματισμός του όξυ ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) ενδιάμεσου

Η πρώτη ουσιαστική μελέτη της αντίδρασης της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο αναφέρθηκε από τους Gibson και Greenwood (24,25) οι οποίοι ανέπτυξαν την μέθοδο φωτόλυσης του μονοξειδίου του άνθρακα για την μελέτη της αντίδρασης. Η ανάπτυξη της μεθόδου της φωτόλυσης του CO από το CO-σύμπλοκο της ανηγμένης οξειδάσης για την έναρξη της αντίδρασης με το οξυγόνο αποτέλεσε θεμέλιο λίθο για τις μετέπειτα μελέτες. Η θερμική αποδέσμευση του CO από την αίμη του διπυρηνικού κέντρου του ενζύμου πραγματοποιείται σε κλίμακα δευτερολέπτων, επιτρέποντας στο χρόνο αυτό την ανάμιξη της πλήρους ανηγμένης ή μικτού σθένους οξειδάσης με το οξυγόνο χωρίς την έναρξη της αντίδρασης. Η τελευταία πραγματοποιείται με την φωτοδιάσπαση του CO και η αντίδραση μπορεί συνεπώς να μελετηθεί με χρονοεξαρτημένες μεθόδους, χωρίς να ιφίσταται το πρόβλημα του νεκρού χρόνου μίξης που θα περιόριζε τη μελέτη σε ms κλίμακα. Με την εφαρμογή της μεθόδου οι Gibson και Greenwood έδειξαν ότι η αντίδραση με το οξυγόνο πραγματοποιείται σε κλίμακα μικροδευτερολέπτων (μs) όταν χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα κορεσμένο με οξυγόνο. Σημαντική επίσης ήταν η παρατήρηση ότι η αντίδραση δέσμευσης του οξυγόνου παρουσίαζε κινητική κορεσμού, ένδειξη ότι το οξυγόνο δεσμεύεται σε άλλη θέση στο ένζυμο πριν από την αίμη (25,26). Η παρατήρηση αυτή σε συνδιασμό με τις FTIR μελέτες του Alben και συνεργατών του, που έδειξαν ότι όταν φωτολυθεί το δεσμευμένο στην αίμη CO, αυτό σχηματίζει ένα μεταβατικό σύμπλοκο με τον Cu_B (27,28) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι αρχική θέση δέσμευσης εξωγενών υποκαταστατών και συνεπώς και του οξυγόνου, αποτελεί ο Cu_B . Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίχθηκε από έρευνες της ομάδας του Woodruff (29-31), ενώ επίσης και οι Oliveberg και Malmstrom (32) απέδωσαν την μετάβαση που ανίχνευαν στα 830 nm στο σχηματισμό του συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-O}_2$.

Ο σχηματισμός του αρχικού όξυ ενδιάμεσου ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ Cu_B^{1+} , A) στην αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο προτάθηκε αρχικά από τον Chance και τους

συνεργάτες του με πειράματα παγίδευσης EPR σε χαμηλές θερμοκρασίες (33). Η δημιουργία του όξυ ενδιάμεσου στηρίχθηκε με χρονοεξαρτώμενα πειράματα υπεριώδους/ορατού που έδειξαν τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου του οποίου οι μεταβάσεις παρουσιάζονται στα 430 και 595 nm (34,35) και η εφαρμογή χρονοεξαρτημένων πειραμάτων συντονισμού Raman έδωσε την δυνατότητα χαρακτηρισμού του ενδιάμεσου μέσω της απευθείας καταγραφής της δόνησης τάσης $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$, η οποία εμφανίζεται στους 572 cm^{-1} και παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου με $^{18}\text{O}_2$ (36-41). Η παρατηρούμενη $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2)$ βρίσκεται σε συμφωνία με την δόνηση που παρατηρείται στην όξυ μορφή της μυοσφαιρίνης και της αιμοσφαιρίνης όπως και με αντίστοιχα μοντέλα (42), γεγονός που δηλώνει ότι το δεσμευμένο στην αίμη οξυγόνο δεν αλληλεπιδρά με τον Cu_B στο όξυ ενδιάμεσο.

Το όξυ ενδιάμεσο παρατηρείται τόσο στην αντίδραση του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (36,38,40,41) όσο και του μικτού σθένους (37,39) όχι όμως στην αντίδραση της οξειδωμένης οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως άλλοστε είναι αναμενόμενο. Ο σχηματισμός του όξυ ενδιάμεσου στις δύο προαναφερόμενες αντιδράσεις πραγματοποιείται σε 5 μs , η ταχύτητα αποσχηματισμού του όμως παρουσιάζει σημαντική διαφορά. Στην αντίδραση του μικτού σθένους ενζύμου με το οξυγόνο η ταχύτητα αποσχηματισμού του όξυ ενδιάμεσου είναι $\sim 5 \times 10^3\text{ s}^{-1}$ (34,37), ενώ στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης με το οξυγόνο η αντίστοιχη ταχύτητα είναι $\sim 2 \times 10^4\text{ s}^{-1}$ (41,43,44) και ταυτόχρονα παρατηρείται οξείδωση της αίμης α (42,43).

Σχηματισμός του περόξυ ($\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^-$) ενδιάμεσου

Ο σχηματισμός και ανίχνευση του ενδιάμεσου με δομή ($\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^- \text{Cu}_B^{1+}$ ή $\text{Fe}^{2+}\text{-O}^-\text{-O}^- \text{Cu}_B^{2+}$) είναι ένα από τα θέματα που έχουν προκαλέσει σημαντικές διαφωνίες στην μελέτη της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου από την κυτοχρωμική οξειδάση. Αρχικά ο Blair *et al.* (45) πρότεινε τον σχηματισμό του περόξυ ενδιάμεσου ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}^-\text{-O}^- \text{Cu}_B^{2+}$) με πειράματα EPR σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η ανίχνευση μιας δόνησης που παρουσίαζε ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου σε πειράματα συντονισμού Raman στους $356/342\text{ cm}^{-1}$ για $^{16}\text{O}_2$ και $^{18}\text{O}_2$ αντίστοιχα αποδόθηκε, από τους Ogura *et al.* (46) και Varotsis *et al.* (41,47), στην δόνηση τάσης Fe-O του περόξυ ενδιάμεσου. Μεταγενέστερη μελέτη της αντίδρασης της ανηγμένης οξειδάσης με το οξυγόνο από τον Ogura *et al.* (48) (ομάδα Kitagawa), αμφισβήτησε την απόδοση της δόνησης αυτής και υποστήριξε την προέλευσή της από την δόνηση κάμψης $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$, ενός ενδιάμεσου στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η διάσπαση του δεσμού O-O. Η απόδοση της δόνησης στους 356 cm^{-1} στο

φερύλ ενδιάμεσο υποστηρίχθηκε επίσης με πειράματα μελέτης της αντίδρασης της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου από την ίδια ομάδα (49,50). Με την άποψη της ομάδας Kitagawa συμφωνεί και ο Rousseau σε πρόσφατη μελέτη της αντίδρασης οξειδάσης/οξυγόνου, ο οποίος υποστηρίζει ότι το περόξυ ενδιάμεσο δεν σχηματίζεται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις (51).

Σχηματισμός των P (607 nm) και F (580 nm) φερύλ ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$) ενδιαμέσων

Η αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους/ορατού, και μετά τον αποσχηματισμό του όξυ ενδιαμέσου παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός ενδιαμέσου το οποίο παρουσιάζει απορρόφηση στα 438 και 607 nm και χαρακτηρίζεται ως P (ή C ή 607 nm) ενδιάμεσο (35). Το P ενδιάμεσο σχηματίζεται στις αντιδράσεις ανηγμένης (35) και μικτού σθένους οξειδάσης με το οξυγόνο (52). Δεδομένου ότι στο μικτού σθένους ένζυμο μόνο δύο ηλεκτρόνια είναι διαθέσιμα για την αναγωγή του οξυγόνου, αρχικά θεωρήθηκε ότι το ενδιάμεσο αυτό αντιστοιχεί στο περόξυ ενδιάμεσο (53). Η ομάδα του Kitagawa κατόρθωσε να δείξει τον σχηματισμό του 607 nm ενδιαμέσου στην αντίδραση της οξειδωμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Εφαρμόζοντας την φασματοσκοπία συντονισμού Raman με διέγερση στα 607 nm και πραγματοποίηση της αντίδρασης με $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$, $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ και $\text{H}_2^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ απέδειξε ότι το P ενδιάμεσο έχει δομή φερύλ ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-} \text{Cu}_B^{2+}$) με $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ στους $804/769 \text{ cm}^{-1}$ για $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$ και $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ αντίστοιχα (54). Η ύπαρξη του ζεύγους $804/764 \text{ cm}^{-1}$ έχει αναφερθεί από την ίδια ομάδα και στην αντίδραση της ανηγμένης μορφής της κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο (48,55), αποδεικνύοντας την δημιουργία του P ενδιαμέσου ως κοινό ενδιάμεσο και στις δύο προαναφερόμενες αντιδράσεις. Στην προαναφερόμενη περίπτωση η δόνηση στους 804 cm^{-1} συνοδεύεται από μία δεύτερη στους 356 cm^{-1} , η οποία αρχικά θεωρήθηκε ως η $\delta(\text{His-Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ του ενδιαμέσου. Σε αντίθεση, σε μεταγενέστερες μελέτες της αντίδρασης οξειδάσης/υπεροξειδίου, προτάθηκε ότι η εμφάνιση της 804 cm^{-1} δόνησης δεν συνοδεύεται από την 356 cm^{-1} , αλλά η τελευταία αντιστοιχεί στην δόνηση $\delta(\text{His-Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ ενός άλλου φερύλ ενδιαμέσου του οποίου δεν προσδιορίζεται η αντίστοιχη δόνηση τάσης του. Σε πρόσφατη μελέτη της ομάδας που αναφέρει το ζεύγος δονήσεων $804/768 \text{ cm}^{-1}$ για $^{16}\text{O}_2$ και $^{18}\text{O}_2$ αντίστοιχα κατά τον σχηματισμό του P ενδιαμέσου από την δημιουργία του μικτού σθένους CO-συμπλόκου του ενζύμου παρουσία οξυγόνου, χωρίς ταυτόχρονη καταγραφή της 356 cm^{-1} δόνησης (56). Ο Proshlyakov *et al.* (57) σε χρονοεξαρτημένη μελέτη συντονισμού Raman της αντίδρασης του μικτού σθένους ενζύμου με το οξυγόνο παρουσιάζει

και τις δύο δονήσεις στους 804 και 356 cm^{-1} , αποδίδοντας την πρώτη στην $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ του φερύλ ενδιάμεσου, ενώ δεν αναφέρεται στην δεύτερη, γεγονός που αφήνει το ζήτημα της εμφάνισης του περόξυ ενδιάμεσου αδιευκρίνιστο.

Σε πρόσφατη μελέτη με φασματοσκοπία μάζας της αντίδρασης της μικτού σθένους οξειδάσης με το οξυγόνο, ο Palmer υποστηρίζει τον απόδοση του P ενδιάμεσου σε φερύλ, εφόσον αποδεικνύει ότι έχει ήδη πραγματοποιηθεί σχάση του δεσμού O-O (58). Το επόμενο ερώτημα που ανακύπτει είναι πως σχηματίζεται το P ενδιάμεσο στην αντίδραση του μικτού σθένους ενζύμου (2 διαθέσιμα ηλεκτρόνια) με το οξυγόνο, ενώ για την δημιουργία του φερύλ απαιτούνται τρία ηλεκτρόνια. Για την απάντηση του τελευταίου ερωτήματος έχουν γίνει διάφορες προτάσεις που περιλαμβάνουν ως πιθανές δομές ενδιάμεσων $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-} \text{Cu}_B^{3+}$ (59) και $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-} \text{Cu}_B^{2+} + \text{αμινοξική ρίζα}$ (βλ. Ρόλο της τυροσίνης 280).

Το ενδιάμεσο που ακολουθεί μετά το P είναι το φερύλ F (ή 580-nm μορφή), τόσο στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης με το οξυγόνο (41,60-62) όσο και στην αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (49,50). Ο αρχικός χαρακτηρισμός του F ενδιάμεσου πιστοποιήθηκε με την εφαρμογή της χρονοεξαρτημένης φασματοσκοπίας συντονισμού Raman από τους Varotsis *et al.* (60) και Ogura *et al.* (61) που ανέφεραν το ζεύγος δονήσεων 790/755 cm^{-1} για $^{16}\text{O}_2$ και $^{18}\text{O}_2$ αντίστοιχα. Ο Rousseau και συνεργάτες του έδειξαν ότι η δόνηση $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ στους 790 cm^{-1} παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση H με D και μετατοπίζεται κατά $\sim 12 \text{ cm}^{-1}$ στους 800-804 cm^{-1} , οπότε συμπεράνε ότι το οξυγόνο στο φερύλ ενδιάμεσο διατηρεί δεσμό υδρογόνου (62), όπως υποστηρίζεται και σε μεταγενέστερες μελέτες (41,55). Υπάρχει συμφωνία λοιπόν, από τις μελέτες συντονισμού Raman όλων των ομάδων, ότι το φερύλ με $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ στους 790 cm^{-1} παρατηρείται στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης με το οξυγόνο και στην αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η δομή του είναι $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-} \text{Cu}_B^{2+}$.

Σχηματισμός του υδρόξυ ($\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$) ενδιάμεσου

Το τελικό υδρόξυ ενδιάμεσο $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ της αντίδρασης ανηγμένης οξειδάσης/οξυγόνου χαρακτηρίστηκε με χρονοεξαρτημένη φασματοσκοπία συντονισμού Raman (41,48,62,63). Η δόνηση τάσης $\text{Fe}^{3+}\text{-OH}$ παρουσιάζεται $\sim 450 \text{ cm}^{-1}$ και παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση H με D, ενώ διαφορά παρουσιάζει και ο χρόνος εμφάνισής του εφόσον είναι $\sim 500 \mu\text{s}$ όταν το πείραμα πραγματοποιείται σε H_2O και $\sim 1 \text{ ms}$ σε D_2O (41,62).

Το υδρόξυ ενδιάμεσο αποτελεί επίσης το τελικό ενδιάμεσο της αντίδρασης οξειδάσης/υπεροξειδίου του υδρογόνου (49,50).

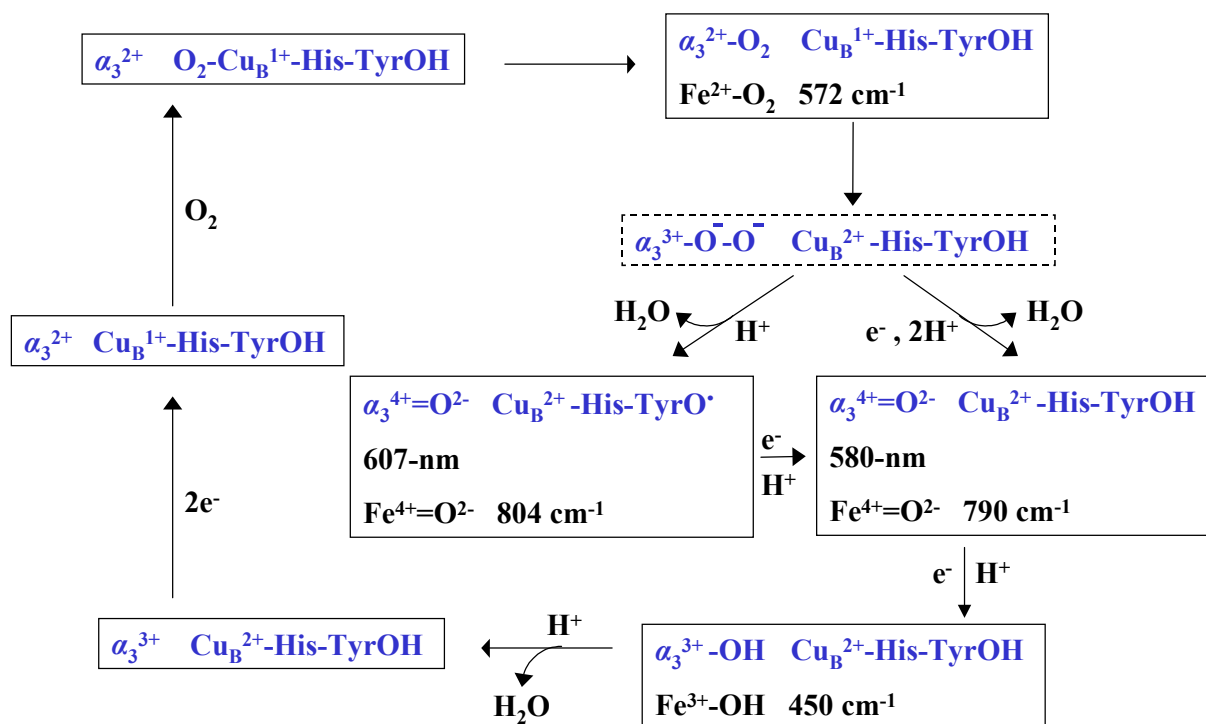
Ο ρόλος της τυροσίνης 280

Η αποκάλυψη του ομοιοπολικού δεσμού της Tyr I-280 με την His I-276 (που είναι ένας από τους υποκαταστάτες του Cu_B) από την κρυσταλλική δομή είχε ως αποτέλεσμα πολλές μελέτες να επικεντρωθούν στην προσπάθεια διελεύκανσης του πιθανού λειτουργικού του ρόλου. Σε μελέτη συντονισμού Raman η ομάδα του Rousseau, με βάση τις ιδιότητες του κυτοχρώματος aa_3 από το βακτήριο *Rhodobacter sphaeroides* στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη της συγκεκριμένης τυροσίνης σε φαινυλαλανίνη, πρότεινε ότι ο ομοιοπολικός δεσμός Tyr-His είναι απαραίτητος για την σταθερότητα του διπυρηνικού κέντρου. Η απουσία του δεσμού αυτού, όπως υποστήριξε, έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση ενός υποκαταστάτη του Cu_B και την συναρμογή του στην αίμη a_3 , με συνέπεια την απενεργοποίηση του ενζύμου (64). Ο Yoshikawa και οι συνεργάτες του στην λύση της κρυσταλλικής δομής του μιτοχονδριακού ενζύμου (14), υποστήριξαν ότι η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού Tyr-His προκαλεί σημαντική μείωση του pK_a της υδρόξυ ομάδας της τυροσίνης και κατά συνέπεια ένα σημαντικό ποσοστό της $-OH$ ομάδας μπορεί να είναι αποπρωτονιομένο σε φυσιολογικό pH. Πρότειναν, λοιπόν, ένα μηχανισμό στον οποίο η τυροσίνη 280 αποτελεί δότη πρωτονίου στο περόξυ ενδιάμεσο, και η ακόλουθη μεταφορά ηλεκτρονίου από τον Cu_B μέσω του ομοιοπολικού δεσμού, προκαλεί την σχάση του δεσμού O-O. Μοντέλο του διπυρηνικού κέντρου αίμης/χαλκού που περιλαμβάνει τον ομοιοπολικό δεσμό τυροσίνης-ιστιδίνης βρίσκεται σε συμφωνία με την πρόταση του Yoshikawa, παρέχοντας πειραματικά δεδομένα για την μείωση του pK_a της υδρόξυ ομάδας της τυροσίνης στο μοντέλο (65). Ο Proshlyakov *et al.* (57) σε χρονοεξαρτημένη μελέτη συντονισμού Raman της αντίδρασης του μικτού σθένους ενζύμου με το οξυγόνο αναφέρει την 804 cm^{-1} δόνηση που αποδίδει στο φερύλ ενδιάμεσο και ως τον πιθανότερο υποψήφιο δότη του τρίτου ηλεκτρονίου προς το διπυρηνικό κέντρο αναφέρει την Tyr I-280, η οποία μετατρέπεται σε ρίζα. Σε πιο πρόσφατη μελέτη η ίδια ομάδα απέδειξε την δημιουργία ρίζας του συγκεκριμένου αμινοξέος, αλλά σε συγκέντρωση της τάξης του μόλις 3% με την επισήμανση της ρίζας με ραδιενεργό ιώδιο (66). Η ανίχνευση ρίζας τυροσίνης από τον MacMillan *et al.* (67), κατά την αντίδραση της οξειδάσης με το υπεροξειδίου του υδρογόνου σε EPR πειράματα, αποδόθηκε επίσης στην συγκεκριμένη Tyr I-280. Στην αντίδραση του κυτοχρώματος bo_3 με το υπεροξειδίου του υδρογόνου με φασματοσκοπία συντονισμού Raman η ομάδα του

Kitagawa ανέφερε την ανίχνευση σήματος στους 1489 cm^{-1} , το οποίο απέδωσε σε ουδέτερη ρίζα τυροσίνης αν και δεν επιβεβαιώθηκε με ισοτοπική επισήμανση (68).

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται συνοπτικά η πορεία της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου από την οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών, όπως προκύπτει από τις μελέτες που προαναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.2.2. Είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις που υποστηρίζονται από διαφορετικές ομάδες (βλ. παράγραφο 1.2.2 και εκάστοτε παραπομπή), και η παρούσα συνοπτική σχηματική παρουσίαση δεν τις περιλαμβάνει.

Η εναλλακτική πορεία που περιλαμβάνει τον σχηματισμό της ρίζας τυροσίνης διαφοροποιείται στην περίπτωση των *ccb*₃-τύπου οξειδασών, στις οποίες απουσιάζει η τυροσίνη που σχηματίζει τον ομοιοπολικό δεσμό με τον υποκαταστάτη του Cu_B (His 276 – Tyr 280).



Σχήμα 6: Συνοπτική παρουσίαση των προτεινόμενων ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου της αναγωγής του οξυγόνου από τις τελικές οξειδάσες.

1.2.3 Αντιστρεπτή αναστολή της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης από το NO. Βακτηριακές τελικές οξειδάσες που ανάγουν το NO.

Το μονοξείδιο του αζώτου χαρακτηριζόταν πριν μερικά χρόνια ως ένας κοινός μολυσματικός παράγοντας του αέρα και παρόλο που ήταν γνωστή η παραγωγή του σε βακτήρια δεν αναμενόταν να παρουσιάζει ενδιαφέρουσα δράση σε μεταγενέστερα εξελικτικά ζώα, όπως τα θηλαστικά, πέρα της τοξικής δράσης του. Η άποψη αυτή ανατράπηκε στα μέσα της δεκαετίας του 80, όποτε και αποκαλύφθηκε η δράση του ως μεταφορέας μηνυμάτων στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα (βραβείο Nobel Ιατρικής 1998), ανακάλυψη που έθεσε νέες αρχές πάνω στην μεταφορά μηνυμάτων σε βιολογικά συστήματα. Μετέπειτα μελέτες ανέδειξαν τον πολύπλευρο ρόλο του NO, ως ρυθμιστικού παράγοντα της πίεσης του αίματος και της κατανομής αίματος στα διάφορα όργανα, αλλά και ως όπλο εναντίον παρασιτικών και βακτηριακών μολύνσεων.

Πρόσφατες μελέτες της δράσης του NO στην διαδικασία της αναπνοής υποστηρίζουν ότι μία από τις φυσιολογικές λειτουργίες του μονοξειδίου του αζώτου αποτελεί η ρύθμιση της αναπνοής στα μιτοχόνδρια (69). Το σημαντικότερο σημείο δράσης του NO στην αναπνευστική αλυσίδα θεωρείται η κυτοχρωμική οξειδάση. Οι πρώτες μελέτες που αποδεικνύουν την δράση του NO ως αντιστρεπτού αναστολέα της κυτοχρωμικής οξειδάσης πραγματοποιήκαν στα μέσα της δεκαετίας του 90 (70-72), παρόλο που προγενέστερες έρευνες είχαν δείξει την δέσμευση του NO στην αίμη a_3 , την καταλυτική θέση του ενζύμου (73-75), ενώ και ο Cu_B έχει επίσης θεωρηθεί ως θέση δέσμευσης του NO (76). Το NO αποτελεί επίσης αναστολέα των τελικών οξειδασών των βακτηρίων *P. denitrificans* (77) και *E. coli* (78) όπως και ανώτερων φυτικών μιτοχονδριακών οξειδασών (79).

Σε αντίθεση με τις προαναφερόμενες βακτηριακές οξειδάσες όπως και με τις μιτοχονδριακές, οι κυτοχρωμικές οξειδάσες του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermus thermophilus* (κυτοχρώματα caa_3 και ba_3) παρουσιάζουν την ικανότητα να καταλύουν την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σε N_2O , με ενεργότητες 0.1 ηλεκτρόνια/sec για το κυτόχρωμα ba_3 ενώ το κυτόχρωμα caa_3 φτάνει το 1 ηλεκτρόνιο/sec (80a). Το κυτόχρωμα cbb_3 του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* αποτελεί επίσης μια οξειδάση με σημαντική ενεργότητα αναγωγής του NO (3 ηλεκτρόνια/sec) (80β). Οι ενεργότητες αυτές είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί για βακτηριακές αναγωγές του μονοξειδίου του αζώτου, οι οποίες καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του NO σε N_2O με ρυθμό ~ 40-80 ηλεκτρόνια/sec (81-83). Επίσης οι βακτηριακές NORs παρουσιάζουν την

δυνατότητα να καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό, με ρυθμό ~ 30-120 ηλεκτρόνια/sec (81-83), σε σχέση με ~ 1000 ηλεκτρόνια/sec από τις οξειδάσες.

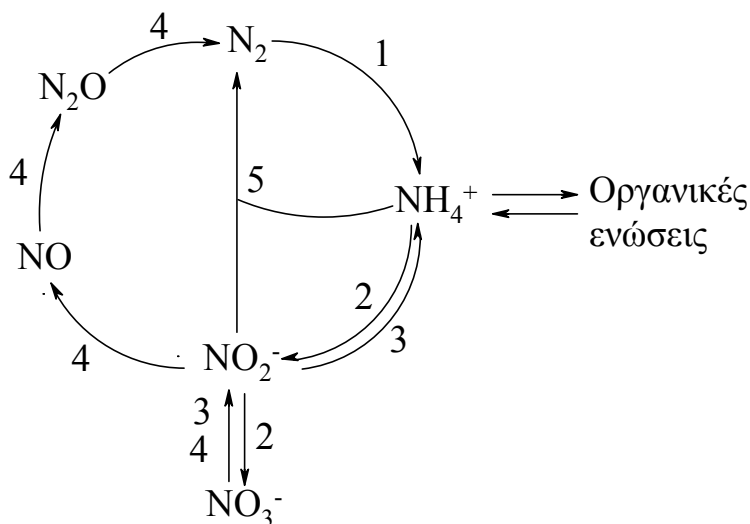
Παρά την διαφορετική ενεργότητα που παρουσιάζουν τα δύο ένζυμα, το γεγονός ότι έχουν την ικανότητα να καταλύουν τόσο την αναγωγή του οξυγόνου όσο και του μονοξειδίου του αζώτου, στηρίζει την άποψη ότι NORs και οξειδάσες κατάγονται από κοινό πρόγονο και διαφοροποιήθηκαν κατά την εξελικτική διαδικασία. Η πρόταση αυτή είχε αρχικά διατυπωθεί με βάση την υψηλή ομολογία της αμινοξικής ακολουθίας NORs/οξειδασών και δομικές τους ομοιότητες (9,84,85). Σύμφωνα με τα παραπάνω τα κυτοχρώματα *ba₃* και *caa₃* του θερμοφίλου βακτηρίου *Thermus thermophilus* αποτελούν χαρακτηριστικά δείγματα οξειδασών με τα πλησιέστερα χαρακτηριστικά ως προς τις NORs, και συνεπώς η μελέτη της δομής και δυναμικής του ενεργού τους κέντρου μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τα ιδιαίτερες ιδιότητες που καθορίζουν την λειτουργική διαφοροποίηση οξειδασών/NORs, παρά τις σημαντικές δομικές τους ομοιότητες. Σημαντικές πληροφορίες για την δομή και δυναμική του διπυρηνικού κέντρου των οξειδασών έχουν αντληθεί από την δέσμευση εξωγενών υποκαταστατών, και κυρίως του διατομικού μορίου CO. FTIR μελέτες του Alben και συνεργατών του έδειξαν ότι όταν φωτολυθεί το δεσμευμένο στην αίμη της μιτοχονδριακής οξειδάσης CO, αυτό σχηματίζει ένα μεταβατικό σύμπλοκο με το Cu_B (27,28). Το γεγονός αυτό οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι αρχική θέση δέσμευσης εξωγενών υποκαταστατών, και πιθανώς και του οξυγόνου, αποτελεί ο Cu_B. Έρευνες της ομάδας του Woodruff απέδειξαν ότι το σύμπλοκο του Cu_B με το CO έχει χρόνο ζωής της τάξης των μικροδευτερολέπτων (μs) ενώ η επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη πραγματοποιείται σε ms (29,31). Στην παρούσα εργασία θα πραγματοποιηθεί συγκριτική μελέτη της κυτοχρωμικής οξειδάσης *caa₃* και των τελικών εναλλακτικών οξειδασών (κυτοχρωμική οξειδάση *aa₃* και κινολική οξειδάση *ba₃*) του βακτηρίου *P. denitrificans*.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η μελέτη του μηχανισμού αναγωγής του NO από το κυτόχρωμα *cbb₃* του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri*, που είναι η οξειδάση που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ενεργότητα ως προς την αναγωγή του NO. Η σύγκριση του μηχανισμού της καταλυτικής αναγωγής του NO από τις αιμοχαλκοξειδάσες και του μακρινού μέλους της οικογενείας τους, της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου, αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την κατανόηση της εξελικτικής διαφοροποίησης των δύο ενζύμων (βλέπε ενότητα 2 του Κεφ. 1).

2. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΑΠΝΟΗ

2.1 Ο κύκλος του αζώτου

Το μοριακό άζωτο αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της γήινης ατμόσφαιρας (~ 75%) και είναι απαραίτητο για την διατήρηση της ζωής στον πλανήτη εφόσον αποτελεί στοιχείο των νουκλεϊκών οξέων και των αμινοξέων. Συμμετέχει σε μία σειρά διαφορετικών βιολογικών διαδικασιών που χαρακτηρίζονται συνολικά ως κύκλος του αζώτου (σχήμα 7) (86,87). Η αρχική διαδικασία με την οποία το αδρανές μοριακό άζωτο μετατρέπεται σταδιακά σε κατάλληλο βιολογικό υπόστρωμα για τα περισσότερα βιολογικά συστήματα χαρακτηρίζεται ως καθήλωση του αζώτου (nitrogen fixation), και περιλαμβάνει την μετατροπή του αέριου μοριακού αζώτου σε υδατοδιαλυτά αμμωνιακά άλατα, τα οποία μπορούν να μετέχουν σε αντιδράσεις που καταλύουν η γλουταμική διυδρογονάση και η γλουταμική συνθάση. Τα αμμωνιακά άλατα αποτελούν επίσης το υπόστρωμα για την διαδικασία της νιτροποίησης (nitrification), στην οποία η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη και νιτρικά άλατα. Στην αντίστροφη πορεία τα νιτρικά άλατα μπορούν να απορροφηθούν από ανώτερα φυτά, φύκη και μύκητες για την επανασύνθεση αμμωνίας, διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως αναγωγική απορρόφηση νιτρικών (assimilatory nitrate reduction). Η εναλλακτική πορεία που μπορούν να ακολουθήσουν τα νιτρικά χαρακτηρίζεται ως απονιτροποίηση (denitrification) και αποτελεί την διαδικασία μέσω της οποίας επιστρέφουν μεγάλα ποσοστά του αζώτου πίσω στην ατμόσφαιρα, αντισταθμίζοντας την διαδικασία της καθήλωσης του αζώτου. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε επίσης η απευθείας αντίδραση της αμμωνίας με τα νιτρώδη, που παράγει μοριακό άζωτο, διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως ANAMOX (anaerobic ammonium oxidation).



Σχήμα 7: Ο κύκλος του αζώτου. Τα νούμερα πάνω στα βέλη αντιστοιχούν στις διαδικασίες : (1) καθήλωση του αζώτου, (2) νιτροποίηση, (3) αναγωγική απορρόφηση νιτρικών (4) απονιτροποίηση και (5) ANAMOX.

Η απονιτροποίηση αποτελεί την βασική φυσιολογική διαδικασία για σημαντικό ποσοστό βακτηρίων, που απουσία του οξυγόνου ως τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων, παράγουν την απαραίτητη ενέργεια από την σύζευξη της φωσφοριλίωσης του ADP με την αναγωγή των οξειδίων του αζώτου (86,87). Ένα από τα σημεία στα οποία παρουσιάζονταν έντονη διαφωνία τα τελευταία χρόνια ήταν η παρουσία του NO ως απαραίτητο ενδιάμεσο στην πορεία της απονιτροποίησης. Σειρά δεδομένων που έχουν προκύψει από διαφορετικές μελέτες τα τελευταία χρόνια, απέδειξαν ότι το μονοξείδιο του αζώτου παράγεται και καταναλώνεται στην διαδικασία της απονιτροποίησης. Ανάμεσα στα δεδομένα αυτά περιλαμβάνονται η παγίδευση του NO σε βακτηριακές καλλιέργειες από την αιμοσφαιρίνη (88), η ανίχνευση επισημασμένου N_2O σε καλλιέργειες εμπλουτισμένες με $^{15}NO_2^-$ (89), όπως και η διατήρηση της δυνατότητας αναγωγής του NO παρά την εξάλειψη της δραστηριότητας αναγωγής του NO_2^- (90). Το σημαντικότερο δεδομένο στον χαρακτηρισμό της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου σε N_2O ως ένα από τα υποχρεωτικά ενδιάμεσα βήματα στην πορεία της απονιτροποίησης, αποτέλεσε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του ενζύμου της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (81,82,91-93).

Διαδικασία που παρουσιάζει ομοιότητες με την βακτηριακή απονιτροποίηση πραγματοποιείται επίσης από μία ομάδα μυκήτων (94). Η πορεία της απονιτροποίησης των μυκήτων περιλαμβάνει την αναγωγή των NO_3^- , NO_2^- , και NO με τελικό προϊόν το N_2O , εφόσον στις περισσότερες περιπτώσεις απουσιάζει η δράση της αναγωγής του οξειδίου του αζώτου.

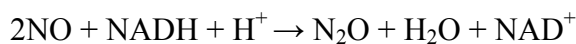
2.2 Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NOR)

Δύο κατηγορίες αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου έχουν χαρακτηριστεί ως σήμερα. Η μία κατηγορία αφορά την μεμβρανική αναγωγή του NO που παρουσιάζεται σε βακτήρια που πραγματοποιούν την απονιτροποίηση, ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει το υδατοδιαλυτό ένζυμο που ανάγει το μονοξείδιο του αζώτου σε μύκητες και χαρακτηρίζεται ως P-450nor .

2.2.1 P-450nor

Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου στους μύκητες (P-450nor) είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη που αποτελείται από μία υπομονάδα και ανήκει στην οικογένεια των P-450 ενζύμων (94,95). Περιέχει μία ομάδα αίμης *b*, ο εγγύς υποκαταστάτης της οποίας είναι

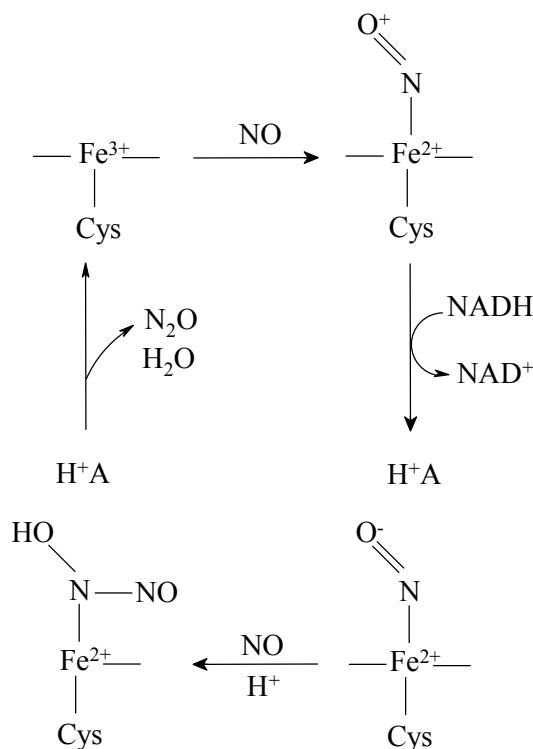
κυστεΐνη, όπως σε ολη την οικογένεια των P-450 ενζύμων. Σε αντίθεση όμως με τα υπόλοιπα ευκαρυωτικά κυτοχρώματα P-450s, απουσιάζει το N-τελικό άκρο που προσδένει την πρωτεΐνη στην μεμβράνη. Επίσης, αναφορικά με τον λειτουργικό ρόλο της οικογένειας των P-450s που καταλύουν την μονοξυγόνωση ή υδροξυλίωση διαφορετικών υποστρωμάτων, η P-450_{nor} δεν επιδεικνύει δραστηριότητα μονοξυγονάσης. Η αντίδραση που καταλύει η P-450_{nor} είναι η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σε N₂O με απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH, σύμφωνα με την ακόλουθη χημική εξίσωση :



Η δομή της P-450_{nor} από το βακτήριο *F. oxysporum* έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X στην οξειδωμένη μορφή, όπως επίσης έχει αναλυθεί και η δομή των συμπλόκων του ανηγμένου ενζύμου με το μονοξείδιο του άνθρακα και του οξειδωμένου με το μονοξείδιο του αζώτου (96,97). Συνολικά η δομή της P-450_{nor} (με εξαίρεση όπως προαναφέρθηκε το N-τελικό άκρο) είναι όμοια με τις αντίστοιχες δομές άλλων P-450 ενζύμων, αποτελούμενη από τρεις κεντρικές περιοχές, μία β-πτυχωτή επιφάνεια, μια α-έλικα και ένα σπείραμα.

Η πορεία της αντίδρασης που καταλύει η P-450_{nor} έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους (98), FTIR και Raman (99), και χρονοεξαρτημένη φασματοσκοπία συντονισμού Raman (100). Ο μηχανισμός που έχει προταθεί με βάση τις προαναφερόμενες μελέτες περιγράφεται συνοπτικά στο σχήμα 8. Στον μηχανισμό αυτό η δέσμευση του NO πραγματοποιείται στην οξειδωμένη μορφή της P-450_{nor}, εφόσον η δέσμευση του υποστρώματος αυξάνει το κανονικό δυναμικό οξειδοαναγωγής της αίμης (-307 mV), με αποτέλεσμα την μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH (98). Αντίθετα όταν το ένζυμο βρίσκεται στην οξειδωμένη κατάσταση δεν υπάρχει σημαντικό ποσοστό αναγωγής της P-450_{nor} από το NADH (95). Η δέσμευση του μονοξειδίου του αζώτου στο οξειδωμένο ένζυμο αρχικά χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία FTIR και Raman (99), ενώ πρόσφατα προσδιορίστηκε και η δομή του με κρυσταλλογραφία ακτίνων X (97). Η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων από το NADH στο NO-σύμπλοκο της P-450_{nor}, έχει ως αποτέλεσμα των σχηματισμό του ενδιάμεσου I, το οποίο παρουσιάζει δύο μεταβάσεις στα 444 και 554 nm (98). Σύμφωνα με τον χαρακτηρισμό του ενδιάμεσου I με χρονοεξαρτημένη φασματοσκοπία συντονισμού Raman η δομή που έχει είναι Fe²⁺-NO⁻ (100). Η αντίδραση του ενδιάμεσου I με ένα δεύτερο μόριο NO έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό N₂O και H₂O, ενώ το ένζυμο επανέρχεται στην οξειδωμένη κατάσταση. Σύμφωνα με το αυτό το μοντέλο αναγωγής του

NO από την P-450nor είναι απαραίτητη η μεταφορά δύο πρωτονίων στο ενεργό κέντρο. Στην δομή των συμπλόκων του ανηγμένου ενζύμου με το CO (96) και του οξειδωμένου με το NO (97) έχει αναγνωρισθεί ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στον εκάστοτε δεσμευμένο στην αίμη υποκαταστάτη και τον διαλύτη, που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα S286 και D393, γεγονός που στηρίζει τον προτεινόμενο μηχανισμό.



Σχήμα 8: Μοντέλο του μηχανισμού αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου από την P-450nor (100).

Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι η υδατοδιαλυτή φύση της P-450nor είναι ασύμβατη με την σύζευξη της αναγωγής του NO με την σύνθεση του ATP, σε αντίθεση με τις άλλες δύο αντιδράσεις των μυκητιακών μιτοχονδρίων, την αναγωγή των NO_3^- και NO_2^- , για τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι απελευθερώνουν ενέργεια που χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP.

2.2.2 Βακτηριακή NOR

cNOR και qNOR

Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σε N_2O στα βακτήρια, είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη. Οι δύο κατηγορίες των βακτηριακών NORs σύμφωνα με τον δότη ηλεκτρονίων τους, χαρακτηρίζονται ως cNOR (ή κυτοχρωμική NOR)

και qNOR (κινολική NOR) (101). Η κατηγοριοποίηση αυτή φαίνεται να ισχύει για την περίπτωση των gram-αρνητικών βακτηρίων, αν και η πρόσφατη απομόνωση της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου από το gram-θετικό βακτήριο *Bacillus azotoformans* (102) πιθανόν να προκαλέσει την αναθεώρηση του παραπάνω διαχωρισμού. Στην παρούσα εργασία η NOR του *Bacillus azotoformans* θα θεωρηθεί ως μέλος της κατηγορίας των qNORs.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα ένζυμα που καταλύουν την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια που δέχονται από υδατοδιαλυτούς δότες ηλεκτρονίων, όπως κυτοχρώματα *c*-τύπου και πιθανόν και ψευδοαζουρίνες (85,87). Οι αναγωγάσες του NO που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία ονομάζονται cNORs, σύμφωνα με τον δότη ηλεκτρονίων τους. Οι cNORs που έχουν απομονωθεί ως σήμερα, αποτελούν σύμπλοκα δύο υπομονάδων, NorC και NorB, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *norC* και *norB* αντίστοιχα, και διαθέτουν μοριακά βάρη περίπου 18 και 53 kDa (81,82,91-93). (Η μειωμένη τιμή του μοριακού βάρους της μεγαλύτερης υπομονάδας σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση (40 kDa), σε σχέση με το προβλεπόμενο από το γονίδιο *norB* μοριακό βάρος των 53 kDa, έχει αποδοθεί σε υπέρμετρη SDS-δέσμευση λόγω της μεγάλης της υδροφοβικότητας). Η υπομονάδα NorC περιλαμβάνει ένα κυτόχρωμα *c*-τύπου το οποίο βρίσκεται αγκιστρωμένο στην μεμβράνη μέσω μίας διαμεμβρανικής α -έλικας, ενώ η NorB αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο κυτοχρωμάτων *b*-τύπου και ενός ατόμου μη-αιμικού σιδήρου.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις αναγωγάσες του NO, των οποίων δότες ηλεκτρονίων αποτελούν κινόλες, και χαρακτηρίζονται ως qNORs. Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου του βακτηρίου *Rastolnia eutropha* αποτελεί μέλος της κατηγορίας αυτής, εφόσον παρουσιάζει δραστηριότητα μόνο παρουσία κινόλης (103). Στο βακτήριο αυτό δεν υπάρχει το γονίδιο *norC* και το γονίδιο *norB* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη όμοια με την υπομονάδα NorB του συμπλόκου NorBC, που διαθέτει όμως επιπλέον δύο διαμεμβρανικά τμήματα και ένα N-τελικό άκρο (104). Σύμφωνα με την άποψη της ομάδας του Saraste η ομοιότητα cNOR και qNOR δεν περιορίζεται μόνο στο τμήμα NorB, αλλά ισχύει και για το N-τελικό άκρο της qNOR που θεωρεί ομόλογο της υπομονάδας NorC της cNOR (101).

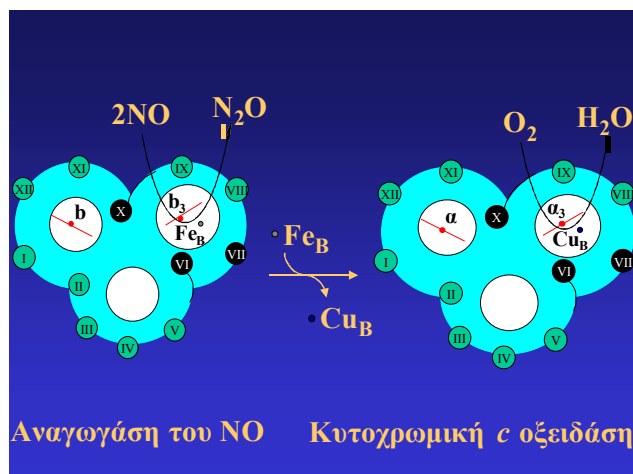
Μέλος της κατηγορίας των qNORs αποτελεί επίσης η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου από το gram-θετικό βακτήριο *Bacillus azotoformans* (102), εφόσον χρησιμοποιεί ως πηγή ηλεκτρονίων μία κινόλη. Το ένζυμο απομονώνεται ως σύμπλοκο δύο υπομονάδων με μοριακά βάρη 16 και 57 kDa. Η αμινοξική ακολουθία της υπομονάδας των 16 kDa δεν παρουσιάζει ομολογία με άλλες NOR, παρατηρήθηκε όμως 65% ομοιότητα με την υπομονάδα II του κυτοχρώματος *bo*₃, που αποτελεί την κυτοχρωμική οξειδάση του gram-

θετικού βακτηρίου *Bacillus stearothermophilus*. Το γεγονός της υψηλής ομολογίας ανάμεσα στις υπομονάδες των δύο ενζύμων σε συνδιασμό με την ανίχνευση δύο ατόμων χαλκού στην αναγωγή του NO, οδήγησε στην πρόταση ότι ο Cu βρίσκεται στην υπομονάδα των 16 kDa της NOR, ομοίως με τον Cu_A των οξειδάσων. Παρά το γεγονός ότι δεν αναγνωρίστηκε η αμινοξική ακολουθία της υπομονάδας των 57 kDa, η παρουσία δύο αίμων b-τύπου καθώς και μη-αιμικού σιδήρου δηλώνει την ομοιότητα με την υπομονάδα NorB του NorBC συμπλόκου.

NOR και Τελικές Οξειδάσες

Η αναγνώριση της αλληλουχίας των γονιδίων, *norB* και *norC*, που κωδικοποιούν την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* (105), έδωσε το πρώτο έναυσμα για την παρατήρηση της παρουσίας στην μεγαλύτερη υπομονάδα (NorB) της αναγωγής, ιδιαίτερων χαρακτηριστικών όμοιων με αυτά της υπομονάδας I των αιμοχαλκοξειδάσων (9,84). Συγκεκριμένα, τόσο οι 12 διαμεμβρανικές έλικες της υπομονάδας I των οξειδάσων, όσο και οι έξι ιστιδίνες που αποτελούν τους υποκαταστάτες της χαμηλού σπιν αίμης και των δύο μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου αίμης/Cu_B, είναι παρούσες και στην NorB υπομονάδα της NOR σε τοπολογικά σωστές θέσεις. Η διαφοροποίηση του διμεταλλικού κέντρου της NOR έγκειται στην παρουσία μη-αιμικού σιδήρου σε σχέση με το άτομο χαλκού στις οξειδάσες (βλ. οξειδοαναγωγικά κέντρα και ενεργή θέση της NOR). Η παρουσία Cu_A στην μικρή υπομονάδα της qNOR του gram-θετικού βακτηρίου *Bacillus azotoformans* και η υψηλή ομολογία της υπομονάδας με την υπομονάδα II του κυτοχρώματος bo₃ από το *Bacillus stearothermophilus*, αποτελεί έναν ακόμη κρίκο που συνδέει την NOR με τις οξειδάσες (102).

Η βακτηριακή αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, σύμφωνα με τα παραπάνω, θεωρείται ως μέλος της ευρύτερης οικογένειας των τελικών οξειδάσων (σχήμα 9).



Σχήμα 9: Μοντέλο για την δομική, λειτουργική και εξελικτική σχέση NOR και οξειδάσης.

Παρουσιάζεται η άνω όψη της υπομονάδας I από την NOR (μοντέλο) και το κυτόχρωμα aa₃ από το *P. denitrificans* (Iwata et al. 1995).

Τα οξειδοαναγωγικά κέντρα και η ενεργή θέση της NOR

Συνολικά στην cNOR (σύμπλοκο NorBC) έχει προσδιοριστεί η παρουσία συνολικά τεσσάρων μεταλλικών κέντρων. Τα φάσματα οπτικής απορρόφησης του απομονωμένου συμπλόκου δείχνουν την παρουσία *c*-τύπου και *b*-τύπου αίμης με αναλογία 1:2 (87,93,106). Η αναλογία αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα της ακολουθίας των δύο υπομονάδων που δίνουν ενδείξεις για την παρουσία μιας θέσης δέσμησης *c*-τύπου αίμης στην υπομονάδα NorC, και δύο θέσεις δέσμησης *b*-τύπου αίμης στην υπομονάδα NorB. Στα αντίστοιχα EPR φάσματα του συμπλόκου NorBC εμφανίζονται δύο διαφορετικά σήματα που αποδίδονται σε χαμηλού σπιν αίμη *c* και *b*, αντίστοιχα (82,93,106), ενώ MCD μετρήσεις επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μιας αίμης με δύο αξονικούς υποκαταστάτες ιστιδίνης και μία με υποκατάσταση ιστιδίνης/μεθειονίνης (106).

Η παρουσία μίας ακόμα *b*-τύπου αίμης με υψηλό σπιν αναφέρθηκε σύμφωνα με τις αλλαγές του οπτικού φάματος της ανηγμένης NOR κατά την δέσμηση του CO (80,92). Τα αποτελέσματα μετρήσεων MCD και φασματοσκοπίας οπτικής απορρόφησης παρείχαν ενδείξεις αξονικής υποκατάστασης της αίμης υψηλού σπιν από μία ιστιδίνη και ένα ισχυρό ανιόν στην οξειδωμένη της κατάσταση (106). Σε αντίθεση, δεδομένα πειραμάτων φασματοσκοπίας συντονισμού Raman έδειξαν ότι η υψηλού σπιν αίμη b_3 διατηρεί αριθμό συναρμογής πέντε, τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην ανηγμένη της μορφή και μάλιστα στην ανηγμένη κατάσταση πέμπτος υποκαταστάτης θεωρείται μία ιστιδίνη (107). Η ανάλυση μετάλλων στο απομονωμένο NorBC σύμπλοκο αποδεικνύει την παρουσία ενός ακόμα μεταλλικού κέντρου, εφόσον η αναλογία ατόμων σιδήρου ανά μόριο ενζύμου είναι 4:1. Δεδομένου λοιπόν ότι σε κάθε μόριο NOR αντιστοιχούν τρεις αίμες, το τέταρτο άτομο σιδήρου είναι ένας μη-αιμικός σίδηρος, ο οποίος συμβολίζεται ως Fe_B (82,87,93). Όπως έχει προαναφερθεί, οι έξι ιστιδίνες που αποτελούν τους υποκαταστάτες της χαμηλού σπιν αίμης και των δύο μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου αίμης/Cu_B, είναι παρούσες και στην NorB υπομονάδα της NOR. Η τοπολογία τους στην NOR επιτρέπει να θεωρείται ότι δύο από τις ιστιδίνες αυτές αποτελούν τους υποκαταστάτες της χαμηλού σπιν αίμης *b*, μία της υψηλού σπιν αίμης b_3 , και οι υπόλοιπες είναι τρεις από τους υποκαταστάτες του μη-αιμικού σιδήρου, σε πλήρη αντιστοιχία με τις τελικές οξειδάσες. Η απουσία EPR σήματος του μη-αιμικού σιδήρου και της υψηλού σπιν αίμης στην οξειδωμένη κατάσταση του ενζύμου αποδόθηκε σε αντισιδηρομαγνητική σύζευξη των δύο μετάλλων (106), ερμηνεία που επαληθεύτηκε σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη συντονισμού Raman στην οποία ένα άτομο οξυγόνου εμφανίζεται ως ο υποκαταστάτης που συνδέει τον μη-αιμικό σίδηρο με τον σίδηρο της

υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 , η οποία δεν δεσμεύει την εγγύ ιστιδίνη στην οξειδωμένη NOR (108). Το δεδομένο αυτό αποτέλεσε και την πρώτη πειραματική απόδειξη ότι η καταλυτική θέση της NOR είναι ένα διμεταλλικό κέντρο αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου σε αντιστοιχία με το διπυρηνικό κέντρο αίμης/ Cu_B των τελικών οξειδασών. Η παρατήρηση ότι η παρουσία του μη-αιμικού σιδήρου στην NOR ευνοεί ένα οκταεδρικό περιβάλλον σε σχέση με το τετραεδρικό περιβάλλον του Cu_B στις οξειδάσες σε συνδιασμό με την παρουσία τριών πλήρως διατηρημένων γλουταμικών στην NOR διαφορετικών βακτηρίων που δεν εμφανίζονται στις οξειδάσες (στις θέσεις 198, 202 και 267 σύμφωνα την αρίθμηση του *P. denitrificans*), οδήγησε στην υπόθεση ότι ένα από αυτά μπορεί να είναι ένας επιπλέον υποκαταστάτης του Fe_B (87).

Τα δεδομένα που υπάρχουν για τα οξειδοαναγωγικά κέντρα στις qNORs μίας υπομονάδας, δείχνουν ότι η μόνη διαφορά σε σχέση με τις cNORs είναι η απουσία της χαμηλού σπιν αίμης c (βρίσκεται στην υπομονάδα NorC που δεν κωδικοποιείται στην qNOR μιας υπομονάδας) (103). Αναφορικά με την qNOR των δύο υπομονάδων (*Bacillus azotoformans*) και πάλι απουσιάζει η χαμηλού σπιν αίμης c , διαθέτει όμως το ένζυμο μεταλλικό κέντρο Cu_A , ενώ δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα οξειδοαναγωγικά κέντρα της υπομονάδας με την ενεργή θέση (102).

Η υπομονάδα NorC των cNORs, και συγκεκριμένα η χαμηλού σπιν αίμη c η οποία βρίσκεται προσδεσμένη στην υπομονάδα αυτή, αποτελεί τον αρχικό δέκτη ηλεκτρονίων από το υδατοδιαλυτό κυτόχρωμα c , με κανονικό δυναμικό οξειδοαναγωγής 310 mV (109). Τα κανονικά δυναμικά της χαμηλού σπιν αίμη b όπως και του μη-αιμικού σιδήρου βρίσκονται πολύ κοντά σε αυτό της αίμης c , με αποτέλεσμα τα τρία αυτά οξειδοαναγωγικά κέντρα να κυμαίνονται σε επίπεδα $E_m = 300-350$ mV. Ευνοείται συνεπώς η μεταφορά ηλεκτρονίων από του φυσιολογικούς δότες, το κυτόχρωμα c με $E_m = 256$ mV ή την ψευδοαζουρίνη με $E_m = 230$ mV, στην καταλυτική θέση και συγκεκριμένα στον Fe_B . Όμως το κανονικό δυναμικό οξειδοαναγωγής των 60 mV της υψηλού σπιν αίμης b_3 , καθιστά την αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου με δύο ηλεκτρόνια θερμοδυναμικά μη ευνοούμενη.

Η αντίδραση της NOR με το NO

Ουσιαστική μελέτη της αντίδρασης της NOR με το μονοξείδιο του αζώτου δεν έχει πραγματοποιηθεί. Έχουν όμως προταθεί δύο τύποι μηχανισμών για την αναγωγή του NO. Στο ένα μοντέλο η ομάδα του deVries, βασιζόμενη σε μελέτες κινητικής σταθερής κατάστασης (93), πρότειναν ότι η αντίδραση ξεκινά όταν το διπυρηνικό κέντρο είναι πλήρως ανηγμένο

και ένα μόριο NO δεσμεύεται στο κάθε μέταλλο του κέντρου. Στην περίπτωση αυτή, η εγγύς ιστιδίνη της αίμης b_3 δεν είναι δεσμευμένη στο σίδηρο, και μετά τον διμερισμό των δύο μορίων NO, αυτά ανάγονται προς N_2O χρησιμοποιώντας τα ηλεκτρόνια των μεταλλικών κέντρων στα οποία ήταν δεσμευμένα. Ένας δεύτερος εναλλακτικός μηχανισμός έχει προταθεί από τον Watmough (109), σύμφωνα με τον οποίο επειδή η αναγωγή της αίμης b_3 είναι θερμοδυναμικά μη ευνοούμενη, το διπυρηνικό κέντρο υπάρχει σε μία μικτού σθένους κατάσταση ($b_3^{3+} Fe^{2+}$) πριν την δέσμευση του NO. Στην συνέχεια δύο μόρια NO δεσμεύονται διαδοχικά στον μη-αιμικό σίδηρο, ενώ η αίμη b_3 δεν μετέχει στον μηχανισμό. Τα μόνα πειραματικά δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με την αντίδραση NOR/NO είναι ο χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου κατά την προσθήκη NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο με φασματοσκοπία EPR, τα οποία δείχνουν τον σχηματισμό συμπλόκων b_3/NO αριθμού συναρμογής πέντε και έξι, όπως και σχηματισμό συμπλόκου μη-αιμικού σιδήρου/NO, χωρίς όμως να υπάρχει βεβαιότητα ότι τα σύμπλοκα αυτά είναι ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου (82).

Ένα σημαντικό θέμα που προκύπτει στην μελέτη της αναγωγής του NO και την δομική και λειτουργική συγγένεια NOR/αιμοχαλκοξειδασών, είναι αν η ελεύθερη ενέργεια που παράγεται από την οξειδοαναγωγική διαδικασία της μετατροπής του NO σε N_2O μεταφέρεται μέσω της NOR σε διεργασίες που απαιτούν ενέργεια, όπως είναι η σύνθεση του ATP. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διαφορά δυναμικού της αναγωγής του NO είναι 1.12 V και άρα μεγαλύτερη από τα 0.82 V της αναγωγής του οξυγόνου που χρησιμοποιούν οι τελικές οξειδάσες για την δημιουργία της πρωτονιακής διαβάθμισης που τελικά διοχετεύεται στην σύνθεση του ATP. Οι τελευταίες μελέτες όμως συγκλίνουν στην άποψη ότι η ελεύθερη ενέργεια της αναγωγής του NO δεν χρησιμοποιείται από την NOR. Επίσης τα πρωτόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του NO αντλούνται από την περιπλασμική πλευρά της μεμβράνης καθιστώντας την NOR ηλεκτρικά ουδέτερη εφόσον και τα ηλεκτρόνια αντλούνται από την ίδια πλευρά της μεμβράνης (83,110).

Βιβλιογραφία

1. Kasting, J. F. (1993) *Science* **259**, 920-926.
2. Wikstrom, M. (1977) *Nature* **266**, 271-273.
3. Wikstrom, M. (1989) *Nature* **338**, 776-778.
4. Babcock, G.T., Wikstrom, M. (1992) *Nature* **356**, 301-309.
5. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G.T., (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
6. Michel, H., Behr, J. Harrenga, A., Kannt, A. (1998) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.
7. Nicholls, D. G., Ferguson, S. T. (1992) *Bioenergetics 2*, Academic Press Inc.
8. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R. B. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5587-5600.
9. van der Oost, J., de Boer, A. P. N., de Gier, J. W. L., Zumft, W. G., Stouthamer, A.H., van Spanning, R. J. M. (1994) *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 1-10.
10. PDB code 1AR1.
11. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
12. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
13. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
14. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
15. Ostermeier, C., Harrenga, A., Elmer, U., and Michel, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10547-10553.
16. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776.
17. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L. Puustinen, A., Iwata, S., and Wikstrom, M. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 910-917.
18. Steffens, G. C. M., Soulimane, T., Wolff, G., Buse, G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 1149-1157.
19. Kelly, M., Lappalainen, P., Talbo, G., Haltia T., van der Oost, J., Saraste, M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16781-16787.

20. Blackburn, N. J., Barr, M. E., Woodruff W. H., van der Oost, J., deVries, S. (1994) *Biochemistry* **33**, 10401-10407.
21. Hill, B. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **266**, 2419-2425.
22. Palmer, G., Babcock, G. T., Vickery, L. E. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2206-2210.
23. Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., Bluggel, M. (1999) *Protein Sci.* **8**, 985-990.
24. Gibson, Q., Greenwood, C. (1963) *Biochem J.* **86**, 541-554.
25. Greenwood, C., Gibson, Q. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 1782-1787.
26. Blackmore, R. S., Greenwood, C., Gibson, Q. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19245-19249.
27. Alben, J. O., Moh, P. P., Fiamingo, F. G., Altschuld, R. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 234-237.
28. Fiamingo, F. G., Altschuld, R. A., Moh, P. P., Alben, J. O. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1639-1650.
29. Dyer, R. B., Einarsdottir, O., Killough, P. M., Lopez-Garriga, J. J., Woodruff, W. H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7657-7659.
30. Woodruff, W. H., Einarsdottir, O., Dyer, R. B., Bagley, K. A., Palmer, G., Atherton, S. J., Goldberg, R. A., Dawes, T. D., Kliger, D. S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2588-2592.
31. Lemon, D. D., Calhoun, M. W., Gennis, R. B., Woodruff, W. H. (1993) *Biochemistry* **32**, 11953-11956.
32. Oliveberg, M., Malmstrom B. G., (1992) *Biochemistry* **31**, 3560-3563.
33. Chance, B., Saronio, Leigh, J. S. Jr., (1975) *J. Biol. Chem.* **150**, 9226-9237.
34. Hill, B. C., Greenwood, C. (1983) *Biochem. J.* **215**, 659-657.
35. Hill, B. C., Greenwood, C. (1984) *Biochem. J.* **218**, 913-921.
36. Varotsis, C., Woodruff, W. H., Babcock, G. T. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6439-6440 **112**, 1297.
37. Varotsis, C., Woodruff, W. H., Babcock, G. T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11131-11136.
38. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 1380-1384.
39. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2491-2495.
40. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5630-5631.

41. Varotsis, C., Appleman, E. H., Babcock, G. T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 237-241.
42. Oertling, W. A., Kean, R. T., Wever, R., Babcock, G.T. (1990) *Inorg. Chem.* **29**, 2633-2645.
43. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8408-8412.
44. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Wikstrom, M. (1994) *Biochemistry* **33**, 3079-3086.
45. Blair, D., Witt, S. N., Chan, S. I. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7389-7399.
46. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 2901-2907.
47. Varotsis, C., Babcock, G.T., Lauraeus, M., Wikstrom, M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 111-116.
48. Ogura, T., Hirota, S., Proshlyakov, D. A., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5443-5449.
49. Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *Biochemistry* **35**, 76-82.
50. Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *Biochemistry* **35**, 8580-8586.
51. Han, S., Takahashi, S., Rousseau, D L. (1999) *J. Biol. Chem.* **275**, 1910-1919.
52. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9445-9451.
53. Wikstrom, M., Morgan, J. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10266-10273.
54. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appleman, E. H., Kitagawa, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29385-29388.
55. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appleman, E. H., Kitagawa, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8527-8536.
56. Kim, Y., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 757-758.
57. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Babcock, G. T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8020-8025.
58. Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B., Palmer, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13114-13117.
59. Fabian, M., Palmer, G. (1995) *Biochemistry* **34**, 10245-10255.
60. Varotsis, C., Babcock, G.T. (1990) *Biochemistry* **32**, 7357-7362.

61. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14721-14723.
62. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Nature* **348**, 89-90.
63. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6604-6607.
64. Kanti Das, T., Pecoraro, C., Tomson, F. L., Gennis, R. B., and Rousseau D. L. (1998) *Biochemistry* **37**, 14471-14476.
65. McCauley, K. M., Vrtis, J. M., Dupont, J., van der Donk, W. A. (2000) *J. Am. Chem. Soc* **122**, 2403-2404.
66. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Demaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D.L., Babcock, G. T. (2000) *Science* **290**, 1588-1591.
67. MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T., and Michel, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 9179-91884.
68. Uchida, T., Mogi, T., Kitagawa, T. (2000) *Biochemistry* **39**, 6669-6678.
69. Shiva S., Brookes, P S., Patel. R. P., Anderson, P. G., and Darley-Usmar, V. M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7212-7217.
70. Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., Schapira A. H. V. (1994) *FEBS Lett.* **345**, 50-54.
71. Brown, G. C., Cooper, M. J. (1994) *FEBS Lett.* **356**, 295-298.
72. Schweizer, M., Richter, C. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 169-175.
73. Wainio, W. W. (1955) *J. Biol. Chem.* **212**, 723-733.
74. Stevens, T. H., Brudwig, G. W., Bocian, D. F., Chan, S. I. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3320-3324.
75. Brudwig, G. W., Stevens, T. H., Chan, S. I. (1980) *Biochemistry* **19**, 5275-5285.
76. Torres, J., Darley-Usmar, V. M., Wilson, M. T. (1996) *Biochem. J.* **312**, 169-173.
77. Carr, G. J., Ferguson, S. J. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* **1017**, 57-62.
78. Yu, H., Sato E. F. , Nagata, K., Nishikawa, M., Kashiba, T., Arakawa, T., Koyahashi, K., Tamura, T., Inoue, M. (1997) *FEBS Lett.* **409**, 161-165.
79. Millar, A. H., Day, D. A. (1996) *FEBS Lett.* **341**, 155-158.
80. α) Giuffre, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G., Soulimane, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14718-14723.
β) Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffre, A. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 1-6.
81. Fujiwara, T & Fukumori, Y. (1996) *J. Biocteriol.* **178**, 1866-1871.

82. Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lubben, M., Saraste, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.
83. Hendriks, J. (2000) PhD Thesis, Vrije Universiteit, The Netherlands.
84. Saraste, M., & Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.* **341**, 1-4.
85. Hendriks, J., Gohlke, U., Saraste, M. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 15-24.
86. Averill B. A. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2951-2954.
87. Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B., Richardson, D. J. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1232**, 97-173.
88. Goretski, J., & Hollocher, T. C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2316-2323.
89. Goretski, J., & Hollocher, T. C. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 889-895.
90. Zumft, W. G., Döhler, K., Körner, H., Löchtelt, S., Viebrock, A., Frunzke, K. (1988) *Arch. Biochem.* **149**, 492-498.
91. Heiss, B., Frunzke, K., Zumft, W. G. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 3288-3297.
92. Dermastia, M., Turk, T., Hollocher, T. C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10899-10905.
93. Girsch, P., & de Vries, S. (1997) *Biochem. Biophys. Acta* **1318**, 202-216.
94. Shoun, H., Kim, D.-H., Uchiyama, H., Sugiyama, J. (1992) *FEMS Microbiol. Lett.* **94**, 277-282.
95. Nakahara, K., Tanimoto, K., Hatano, K., Usuda, K., Shoun, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8350-8355.
96. Park, S.-Y., Shimizu, H., Adashi, S., Nakagawa, A., Takanaka, I., Nakahara, K., Shoun, H., Nakamura, H., Iizuka, T., and Shiro, Y. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**, 827-832.
97. Shimizu, H., Obayashi, E., Gomi, Y., Arakawa, H., Park, S.-Y., Nakamura, H., Adashi, S., Shoun, H. and Shiro, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4816-4826.
98. Shiro, Y. Fujii, M., Iizuka, T., Adashi, S., Tsukamoto, K., Nakahara, K., Shoun, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1617-1623.
99. Obayashi, E., Tsukamoto, K., Adashi, S., Takahashi, S., Nomura, M., Iizuka, T., Shoun, H. and Shiro, Y. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7807-7816.
100. Obayashi, E., Takahashi, S., Shiro, Y. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12964-12965.
101. Hendriks, J., Ourbie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S., Saraste, M. (2000) *Biochem. Biophys. Acta* **1459**, 266-273.
102. Suharti, Strampraad, M. J. F., Shröder, I., de Vries, S. (2001) *Biochemistry* **40**, 2632-2639.
103. Cramm, R., Pohlmann, A., Friedrich, B. (1999) *FEBS Lett.* **460**, 6-10.
104. Cramm, R., Siddiqui, R. A., Friedrich, B. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 6769-6777.

105. Zumft, W. G., Braun, C., Cuypers, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 481-490.
106. Cheesman, M. R., Zumft, W. G., Thomson, A. J. (1998) *Biochemistry* **37**, 3994-4000.
107. Moënné-Loccoz, P., & de Vries, S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5147-5152.
108. Moënné-Loccoz, P., Richter, O.-M. H., Huang, H., Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D., de Vries, S. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9344-9345.
109. Grönberg, K. L. C., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J., Watmough, N. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 13780-13786.
110. Hendriks, J., Jasaitis, A., Saraste, M., Verkovsky, M. (2002) *Biochemistry* **41**, 2331-2340.

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

- Χαρακτηρισμός του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη της τυροσίνης-280 σε ιστιδίνη με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους, FTIR και συντονισμού Raman, για την διερεύνηση του ρόλου της τυροσίνης και του ομοιοπολικού δεσμού His-Tyr στην δομή και λειτουργία του διπυρηνικού κέντρου. Μελέτη της αντίδρασης του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος με το οξυγόνο. (βλ. κεφάλαιο 4)
- Μελέτη των ενδιάμεσων της χημείας οξυγόνου της κυτοχρωμικής οξειδάσης σε θερμοκρασία δωματίου μέσω της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το βακτήριο *P. denitrificans* με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Μελέτη της επίδρασης του pH στην πορεία της αντίδρασης αρχικά με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες παγίδευσης των ενδιάμεσων και στην συνέχεια ο χαρακτηρισμός των δομών των περόξυ, και φερόλ P και F ενδιάμεσων με δονητική φασματοσκοπία συντονισμού Raman. Διερεύνηση του ρόλου της τυροσίνης 280 στον σχηματισμό των P και F ενδιάμεσων (βλ. κεφάλαιο 5)
- Μελέτη της δομής και δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου του κυτοχρώματος caa_3 από το βακτήριο *T. thermophilus* με φασματοσκοπία time-resolved step scan FTIR, για τον προσδιορισμό ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που επιτρέπουν την κατάλυση της αντίδρασης αναγωγής του NO. Συγκριτική μελέτη με την ίδια μεθοδολογία των εναλλακτικών οξειδασών (κυτόχρωμα aa_3 και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans*) (βλ. κεφάλαιο 6 και 7)
- Χαρακτηρισμός της δομής του διπυρηνικού κέντρου αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *P. denitrificans*, κατά την μετάβαση από την οξειδωμένη στην ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου με φασματοσκοπία συντονισμού Raman, καθώς επίσης και του CO συμπλόκου του ενζύμου. (βλ. κεφάλαιο 8)
- Μελέτη της αντίδρασης της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής της NOR με το μονοξείδιο του αζώτου με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους και συντονισμού Raman, για τον χαρακτηρισμό ενδιάμεσων της καταλυτικής πορείας. Μελέτη της αναγωγής του οξυγόνου από την NOR, ως μακρινό μέλος της οικογένειας των τελικών οξειδασών και σύγκριση με την αντίστοιχη αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομολογία με την NOR, το κυτόχρωμα cbb_3 (βλ. κεφάλαιο 9 και 11). Μελέτη της αντίδρασης του ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 με το μονοξείδιο του αζώτου (βλ. κεφάλαιο 10).

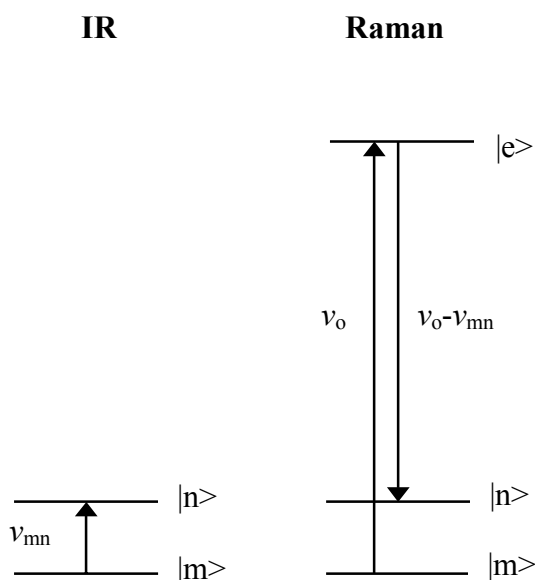
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: Φασματοσκοπία FTIR, Time-Resolved Step-Scan FTIR και Συντονισμού Raman

Εισαγωγή

Η δονητική φασματοσκοπία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία μελέτης για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών και της γεωμετρίας των μορίων. Η φασματοσκοπίες υπερύθρου (IR) και Raman ανήκουν στην κατηγορία της δονητικής φασματοσκοπίας, και βάση των διαφορετικών κανόνων που τις διέπουν μπορούν να συνεισφέρουν στον πλήρη δονητικό χαρακτηρισμό ενός συστήματος με τον συνδυασμό των πληροφοριών που καθεμία προσφέρει.

Η ενέργεια των δονητικών μεταβάσεων αντιστοιχεί περίπου στο ένα δέκατο της ενέργειας των ηλεκτρονιακών μεταβάσεων. Αν υποθέσουμε (όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1) ότι $|m\rangle$ και $|n\rangle$ είναι δύο κβαντισμένες καταστάσεις μιας κανονικής δόνησης στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση και $|e\rangle$ μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση που μπορεί να είναι και μη-πραγματική (virtual), η IR απορρόφηση προέρχεται από την απευθείας μετάβαση από το $|m\rangle$ στο $|n\rangle$, ενώ η σκέδαση Raman περιλαμβάνει δύο συνεχείς μεταβάσεις, από το $|m\rangle$ στο $|e\rangle$ και από το $|e\rangle$ στο $|n\rangle$. Ενώ λοιπόν και οι δύο τεχνικές, απορρόφηση IR και σκέδαση Raman, αποκαλύπτουν την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα κβαντισμένα δονητικά επίπεδα $|m\rangle$ και $|n\rangle$, ισχύουν διαφορετικοί κανόνες επιλογής. Αν η μετάβαση ανάμεσα στα $|m\rangle$ και $|n\rangle$ συνοδεύεται από μεταβολή της διπολικής ροπής η δόνηση είναι IR ενεργή, ενώ αν συνοδεύεται από μεταβολή της πολωσιμότητας είναι Raman ενεργή. Σε μόρια που διαθέτουν κέντρο συμμετρίας αντισυμμετρικές δονήσεις είναι IR ενεργές και συμμετρικές δονήσεις είναι Raman ενεργές.



Σχήμα 1 : Απορρόφηση υπερύθρου και σκέδαση Raman, όπου $|m\rangle$ και $|n\rangle$ είναι δύο κβαντισμένες καταστάσεις μιας κανονικής δόνησης στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση και $|e\rangle$ μια διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση.

1. Φασματοσκοπία Υπερύθρου. FTIR και Time-Resolved Step-Scan FTIR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου βασίζεται στην μετάβαση μεταξύ δύο κβαντισμένων δονητικών επιπέδων στην βασική ηλεκτρονική κατάσταση μορίου. Είναι μία διαδικασία ευθείας απορρόφησης η συνάρτηση της οποίας ως προς τον χρόνο (συχνότητα) αποτελεί το παρατηρούμενο φάσμα, και πραγματοποιείται όταν λαμβάνει χώρα μεταβολή της διπολικής ροπής που χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο τρόπο δόνησης.

Η μόνιμη διπολική ροπή μ_0 ενός μορίου δίνεται από την εξίσωση 1:

$$\mu_0 = e \times r \quad (1)$$

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

Όταν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισορροπίας της, καθώς τα δύο άτομα με το θετικό και αρνητικό φορτίο πραγματοποιούν μια επαναλαμβανόμενη κίνηση. Το ταλαντούμενο δίπολο απορροφάει ενέργεια από ένα ηλεκτρικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του διπόλου.

Για δονητικές κινήσεις η μεταβατική διπολική ροπή μ μπορεί να γραφεί σαν ένα άθροισμα όρων :

$$\mu = \mu_0 + (\partial\mu / \partial q) q + \dots \quad (2)$$

όπου μ_0 η μόνιμη διπολική ροπή και q συντεταγμένη της δόνησης η οποία ορίζεται ως :

$$q = r - r_e \quad (3)$$

όπου r η διαπυρηνική απόσταση και r_e η ίδια απόσταση κατά την ισορροπία.

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (3) στην (2) προκύπτει η μεταβατική διπολική ροπή μ_{mn} για μία μετάβαση μεταξύ των κβαντισμένων δονητικών επιπέδων m και n . Η δόνηση που αντιστοιχεί σε αυτή την μετάβαση είναι IR ενεργή αν $\langle n | \mu | m \rangle \neq 0$. Σε μόρια που διαθέτουν κέντρο συμμετρίας αντισυμμετρικές δονήσεις είναι IR ενεργές.

Η ένταση των παρατηρούμενων δονήσεων καθορίζεται από την μεταβατική διπολική ροπή και είναι ανάλογη του παράγοντα $(\partial\mu / \partial q)^2$, δηλαδή

$$I_{IR} \propto (\partial\mu / \partial q)^2 \quad (4)$$

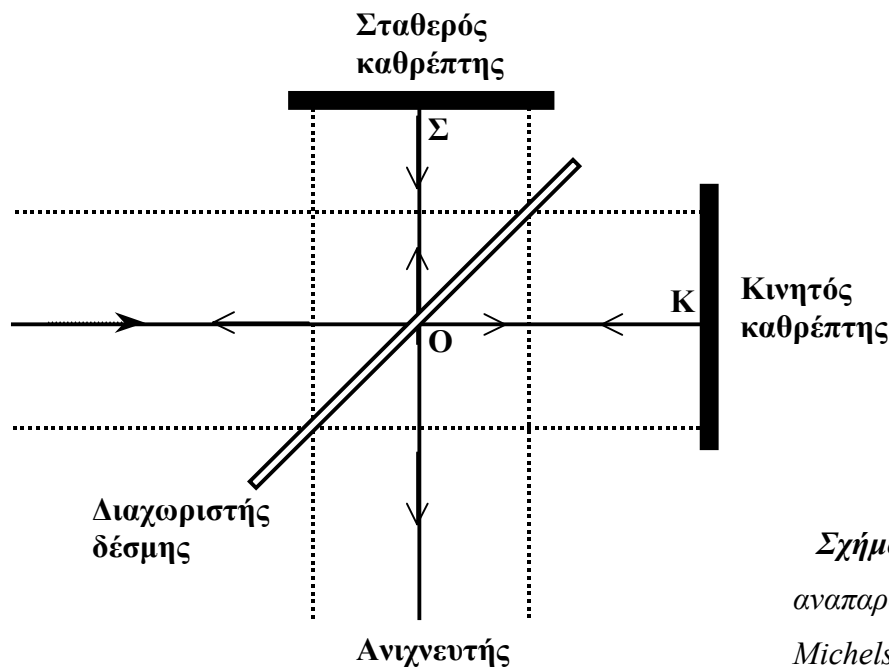
Επίσης ισχύει ο νόμος Beer – Lambert, δηλαδή

$$I_v = I_0 10^{-\epsilon cb} \quad (5)$$

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

Συμβολόμετρο Michelson

Ο σχεδιασμός των περισσότερων συμβολομέτρων (interferometers) που χρησιμοποιούνται σήμερα στην φασματοσκοπία υπερύθρου βασίζονται στο συμβολόμετρο δύο δεσμών που σχεδιάστηκε από τον Michelson το 1891. Το συμβολόμετρο Michelson είναι μία συσκευή που μπορεί να διαχωρίσει μία δέσμη ακτινοβολίας σε δύο πορείες και στη συνέχεια να επανασυνδιάσει τις δύο δέσμες αφού έχουν διανύσει διαφορετική απόσταση. Δημιουργείται δηλαδή μια διαδικασία *συμβολής* των δεσμών. Η διαφοροποίηση της έντασης της δέσμης της ακτινοβολίας από το συμβολόμετρο μπορεί να μετρηθεί από έναν ανιχνευτή ως συνάρτηση της απόστασης.



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση συμβολόμετρου Michelson. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τα άκρα της δέσμης και η συμπαγής το μέσο της.

Η πιο απλή μορφή ενός συμβολόμετρου Michelson (Σχήμα 2) αποτελείται από δύο επίπεδους καθρέπτες κάθετους μεταξύ τους, ένας από τους οποίους διαθέτει την ικανότητα κίνησης κατά άξονα κάθετο στο επίπεδό του. Ο κινητός καθρέπτης, όπως χαρακτηρίζεται ο τελευταίος, κινείται με σταθερή ταχύτητα ή κρατείται σταθερός σε σημεία που ισαπέχουν μεταξύ τους για καθορισμένο χρονικό διάστημα στο καθένα, μετακινούμενος γρήγορα ανάμεσά τους. Ανάμεσα στον σταθερό και κινητό καθρέπτη παρεμβάλεται ένας διαχωριστής δέσμης (beamsplitter), όπου η δέσμη της ακτινοβολίας από μια εξωτερική πηγή ανακλάται

μερικώς στον σταθερό καθρέπτη (σημείο Σ) και μερικώς διαπερνά προς τον κινητό καθρέπτη (σημείο Μ). Οι δέσμες επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης, όπου πραγματοποιείται η συμβολή τους και επαναλαμβάνεται η μερική ανάκλαση προς τον σταθερό και η μερική διαπέραση προς τον κινητό καθρέπτη. Λόγω του φαινομένου της συμβολής η ένταση της κάθε δέσμης της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή και ξαναγυρνάει στην πηγή εξαρτάται από την διαφορά στην πορεία των δεσμών στα δύο σκέλη του συμβολόμετρου. Η μεταβολή της εντάσεως των δεσμών στον ανιχνευτή ως συνάρτηση της απόστασης που διανύουν παράγει τις φασματικές πληροφορίες που τελικώς λαμβάνουμε από ένα φασματοφωτόμετρο Fourier transform υπερύθρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δέσμη που φτάνει στον ανιχνευτή και αυτή που επιστρέφει στην πηγή περιέχουν τις ίδιες πληροφορίες αν και για πρακτικούς λόγους η τελευταία δεν μετράτε.

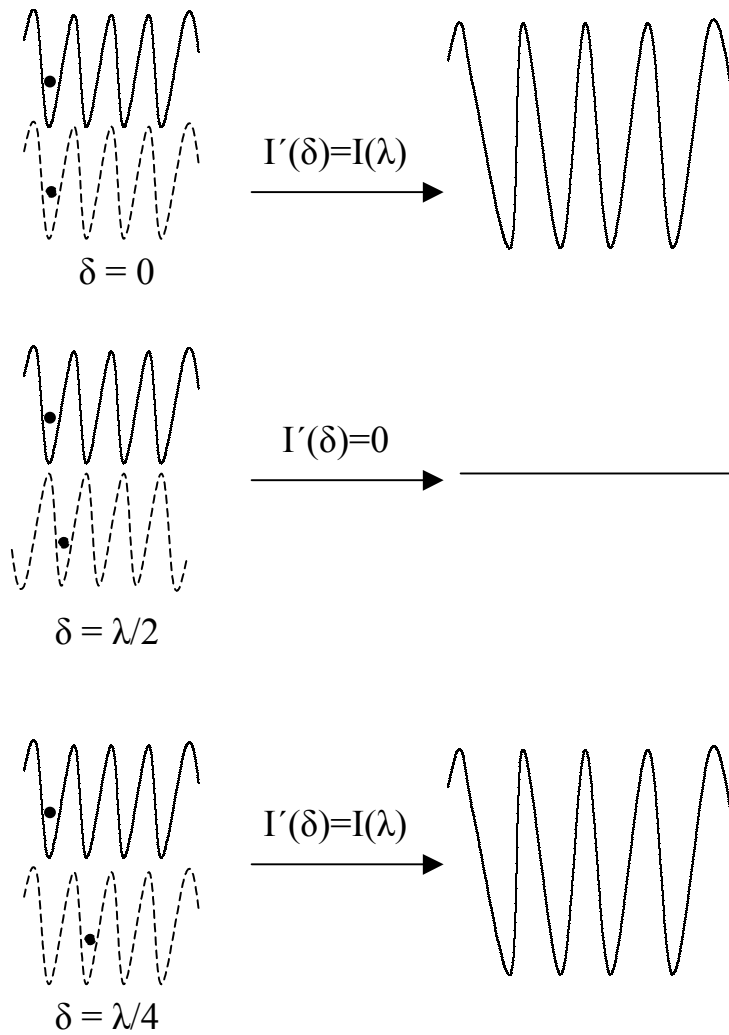
Αν θεωρήσουμε την απλή περίπτωση που η πηγή εκπέμπει μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος λ , ο διαχωριστής δέσμης έχει 50% διαπερατότητα και 50% ανακλαστικότητα και ο κινητός καθρέπτης κινείται σταθερός σε σημεία που ισαπέχουν μεταξύ τους για καθορισμένο χρονικό διάστημα στο καθένα, μετακινούμενος γρήγορα ανάμεσα τους. Η διαφορά στην απόσταση ανάμεσα στις δύο δέσμες που κινούνται προς τον κινητό και σταθερό καθρέπτη είναι $2(\text{OK}-\text{O}\Sigma)$, ορίζεται ως καθυστέρηση (retardation) και συμβολίζεται ως δ . Όταν κινητός και σταθερός καθρέπτης εισαπέχουν οι δέσμες βρίσκονται σε φάση στην διαδικασία της συμβολής με αποτέλεσμα να καταλήγει στον ανιχνευτή το άθροισμα των δεσμών ενώ στην πηγή επιστρέφει μηδενική ένταση. Στην περίπτωση αυτή οι δέσμες συμβάλουν δημιουργικά (constructively). Αντίθετα όταν ο κινητός καθρέπτης μετατοπιστεί κατά $\frac{1}{4} \lambda$, $\delta = \frac{1}{2} \lambda$ και συνεπώς κατά την συμβολή τους οι δύο δέσμες βρίσκονται εκτός φάσης με αποτέλεσμα την καοστροφική (destructive) συμβολή τους, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3. Όταν ο καθρέπτης κινείται με σταθερή ταχύτητα η ένταση που φτάνει στον ανιχνευτή $I'(\delta)$ ως συνάρτηση της δ είναι $I'(\delta)$

$$I'(\delta) = 0.5 I(\lambda) [1 + \cos(2\pi\delta/\lambda)] \quad (6)$$

όπου $I(\lambda)$ η ένταση της πηγής.

Η παραπάνω σχέση αποτελείται από δύο παράγοντες εκ των οποίων ο πρώτος είναι σταθερός και ο δεύτερος είναι μεταβαλλόμενος, αποτελεί το σημαντικό μέρος για την μέτρηση και αναφέρεται σαν συμβολογράφημα $I(\delta)$:

$$I(\delta) = 0.5 I(\lambda) \cos(2\pi\delta/\lambda) \quad (7)$$



Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση της φάσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων από τον σταθερό καθρέπτη (συμπαγής γραμμή) και τον κινητό καθρέπτη (διακεκομένη γραμμή) σε διαφορετικές τιμές δ .

Στην πράξη το συμβολογράφημα επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες όπως τα χαρακτηριστικά του διαχωριστή δέσμης (beamsplitter) και η απόκριση του ανιχνευτή, με αποτέλεσμα η εξίσωση (7) να μετατρέπεται στην:

$$I(\delta) = B(\lambda) \cos(2\pi\delta/\lambda) \quad (8)$$

όπου $B(\lambda)$ είναι η παράμετρος που δίνει την ένταση της πηγής όπως αυτή τροποποιείται από τα διάφορα χαρακτηριστικά των οργάνων. Η ένταση $I(\delta)$ είναι ο συνημιτονοειδής μετασχηματισμός Fourier του όρου $B(\lambda)$, από όπου και προκύπτει η ονομασία Fourier transform Infrared φασματοσκοπία.

Στα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα συμβολόμετρα Michelson ο κινητός καθρέπτης κινείται με σταθερή ταχύτητα v και συνεπώς το συμβολογράφημα μεταβάλλεται ως συνάρτηση του χρόνου $I(t)$, παρά ως συνάρτηση του δ . Η τιμή της δ μετά από χρόνο t μετά την μηδενική τιμή της, δίδεται από την σχέση:

$$\delta = 2vt \quad (9)$$

και κατά συνέπεια η εξίσωση (8) μετατρέπεται στην:

$$I(t) = B(\lambda) \cos[(2\pi/\lambda)(2vt)] \quad (10)$$

Στην περίπτωση πολυχρωματικής πηγής που δεν αποτελείται από ένα μήκος κύματος, τότε το συμβολογράφημα μπορεί να αναπαρασταθεί με το ολοκλήρωμα :

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\lambda) \cos(2\pi\delta/\lambda) d\lambda \quad (11)$$

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

$$B(\lambda) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\delta/\lambda) d\delta \quad (12)$$

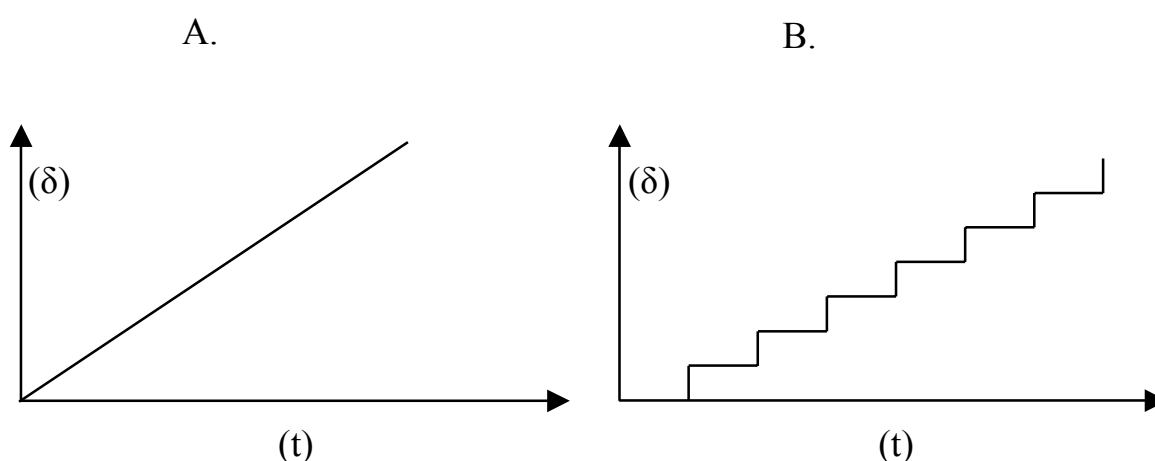
Από την μέγιστη τιμή της δ εξαρτάται η ανάλυση του φάσματος που παίρνουμε, ένα στοιχείο αρκετά σημαντικό για την φασματοσκοπία. Έτσι, αν η μέγιστη διαφορά διαδρομής ενός συμβολομέτρου είναι Δ_{\max} η υψηλότερη ανάλυση $\Delta\lambda$ που μπορεί να αποκτηθεί είναι :

$$\Delta\lambda = (\Delta_{\max})^{-1} \quad (13)$$

Time-Resolved Step-Scan FTIR

Η τεχνική του Time-Resolved Step-Scan FTIR δημιουργήθηκε για την μελέτη φαινομένων που πραγματοποιούνται σε πολύ μικρού χρόνους της τάξης ακόμα και των nanoseconds, εφόσον το κατώτερο όριο που φτάνει ένα συμβολόμετρο ταχείας σάρωσης δεν ξεπερνά τα microseconds. Στην τεχνική Step-Scan η διαδρομή του κινητού καθρέπτη χωρίζεται σε πολλά μικρά βήματα και αντί ο καθρέπτης να κινείται με σταθερή ταχύτητα, σταθεροποιείται διαδοχικά στα σημεία αυτά. Το συμβολογράφημα παράγεται με την ολοκλήρωση του σήματος του ανιχνευτή κατά την διάρκεια του χρόνου στον οποίο ο καθρέπτης παραμένει ακίνητος. Ο καθρέπτης μετακινείται στο επόμενο σημείο όπου ξανακαταγράφεται το σήμα. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η διαδικασία ή

αντίδραση που μελετάται πρέπει να παρουσιάζει επαναληψιμότητα, εφόσον σε κάθε βήμα του καθρέπτη πρέπει να επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για την καταγραφή του σήματος, ώστε να είναι δυνατή η καταγραφή του πλήρους χρονοεξαρτώμενου συμβολογραφήματος. Ο χρόνος που ο καθρέπτης μετακινείται ανάμεσα στα σημεία που σταθεροποιείται είναι ουσιαστικά νεκρός χρόνος, δεν συνεισφέρει στην καταγραφή του φάσματος, και κατά συνέπεια πρέπει να είναι σύντομος. Η επιτυχία της τεχνικής βασίζεται στην ομοιόμορφη αύξηση της δ μετά από κάθε βήμα. Ο κινητός καθρέπτης είναι πολύ περισσότερο ασταθής στην κατά βήμα κίνησή του σε σχέση με την κίνηση του με σταθερή ταχύτητα. Για την καταγραφή ενός συμβολογράματος με καλή διακριτικότητα η απόσταση των διαδοχικών βημάτων είναι της τάξης του ενός micrometer και ο καθρέπτης πρέπει να παρουσιάζει σταθεροποίηση με απόκλιση nanometers. Οι θέσεις στις οποίες ο κινητός καθρέπτης καθορίζονται από ένα laser He-Ne, από το σήμα του οποίου μπορεί να παρακολουθηθεί η κίνηση του καθρέπτη και η σταθερότητα του σε κάθε θέση. Το γεγονός της αστάθειας του συμβολομέτρου καθιστά την step-scan τεχνική ιδιαίτερος ευαίσθητη σε δονήσεις και είναι απαραίτητη η τοποθέτηση του συμβολομέτρου σε όσο το δυνατόν απομονωμένο από δονήσεις περιβάλλον. Η χρονική διακριτικότητα στην time-resolved Step-Scan FTIR φασματοσκοπία περιορίζεται μόνο από τον χρόνο απόκρισης του ανιχνευτή και του καταγραφέα σήματος. Στο Σχήμα 4 περιγράφεται σχηματικά η συνάρτηση της δ με τον χρόνο στην περίπτωση ενός συμβολομέτρου συνεχούς σάρωσης και ενός step-scan συμβολομέτρου.



Σχήμα 4 : Μεταβολή της δ συναρτήσει του χρόνου σε (A) συμβολόμετρο συνεχούς σάρωσης και (B) step-scan συμβολόμετρο.

Η εφαρμογή της time-resolved step-scan FTIR φασματοσκοπίας στις αιμοπρωτεΐνες

Η time-resolved step-scan FTIR φασματοσκοπία σε βιολογικά συστήματα εφαρμόστηκε την δεκαετία του 1990 και έδωσε πολύτιμες πληροφορίες για την δυναμική του ενεργού κέντρου σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως η μυοσφαιρίνη, αλλά και της καταλυτικής πορείας ενζύμων, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την βακτηριοδοψίνη.

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χρονική διακριτικότητα που φτάνει τα nanoseconds. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζεται με την μέθοδο time-resolved step-scan FTIR είναι το πρόβλημα της ισχυρής απορρόφησης του νερού που υπερκαλύπτει την ασθενή απορρόφηση που παρουσιάζουν δονήσεις βιολογικών συστημάτων. Η μέθοδος step-scan αποτελεί ιδανική περίπτωση για την εφαρμογή της τεχνικής της φασματοσκοπίας διαφοράς, με αποτέλεσμα να απομονώνονται οι μεταβατικές δονητικές ιδιότητες του συστήματος χωρίς την παρεμβολή του διαλύτη. Η καινούργια αυτή τεχνική και η εφαρμογή της σε βιολογικά συστήματα της τάξης μεγέθους της κυτοχρωμικής οξειδάσης με MB 100-200 KDa αποτελεί ένα νέο τεχνολογικό επίτευγμα με μεγάλη σημασία. Όπως θα παρουσιαστεί στο κεφάλαιο 7 της παρούσας εργασίας είναι δυνατή η παρατήρηση των μεταβολών στην διαμόρφωση ή την κατάσταση δεσμών υδρογόνου σε επίπεδο ξεχωριστών αμινοξικών καταλοίπων. Τέτοιες μεταβολές είναι συχνά κρίσιμες για την ενζυματική λειτουργία των πρωτεϊνών και ακόμα και υψηλής διακριτικότητας κρυσταλλική δομή δεν είναι σε θέση να παρέχει αυτές τις πληροφορίες. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα φαινόμενα αυτά μπορούν να παρατηρηθούν σε κλίμακα με μεγάλης χρονικής διακριτικής ικανότητας (ns) καθιστά την τεχνική step-scan FTIR μια μέθοδο που θα εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα στην μελέτη βιολογικών συστημάτων και έχει την δυναμική να δώσει απαντήσεις σε πολλά κρίσιμα ερωτήματα.

Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι εφαρμόζεται μόνο σε συστήματα που είναι δυνατός μεγάλος αριθμός επαναλήψεων. Ιδιαίτερα σε βιολογικά συστήματα MB 100-200 KDa με μικρές απορροφήσεις των ομάδων προς μελέτη απαιτείται σημαντικά μεγάλος αριθμός επαναλήψεων (μέτρηση ~10000-60000 επαναλήψεις). Επίσης, απαιτούνται ποσότητες δείγματος της τάξης 2-6 mg, οι οποίες είναι σημαντικές ποσοτητες για πρωτεΐνες, όπως αυτές που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Η πειραματική διαδικασία που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει την φωτοδιάσπαση ενός συμπλόκου (πρωτεΐνης-υποκαταστάτη), της παρατήρησης των σχηματιζομένων ενδιάμεσων και της επαναδημιουργίας του συμπλόκου σε χρονικό διάστημα 5 μs έως αρκετά ms. Οι πληροφορίες που αντλούνται από την εφαρμογή της time-resolved

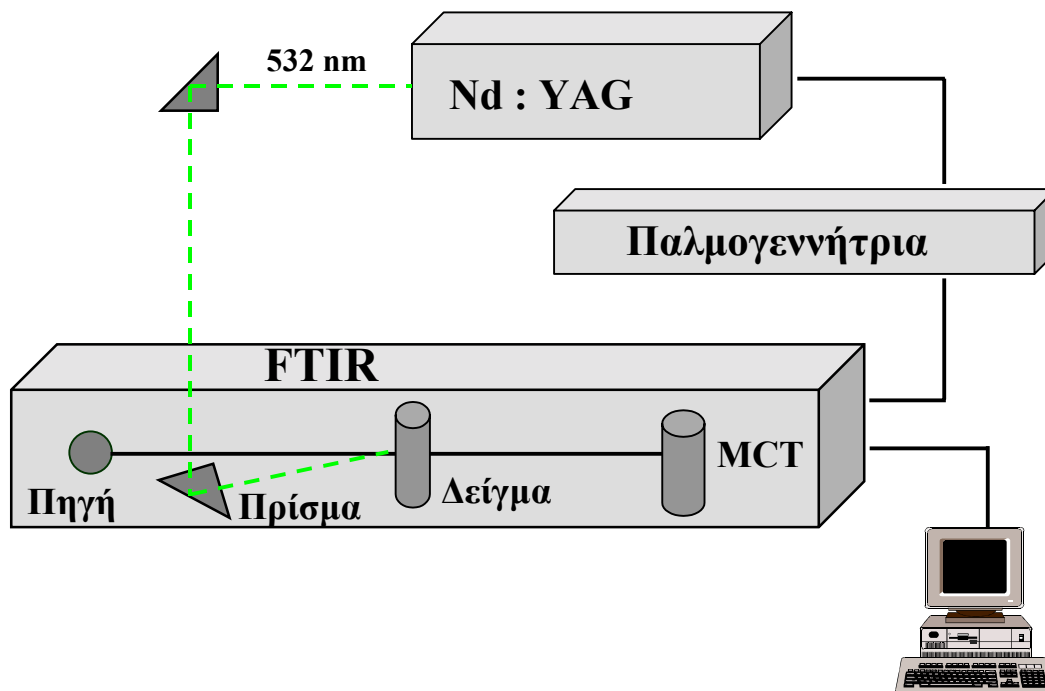
FTIR φασματοσκοπίας στις αιμοχαλκοξειδάσες, αφορούν την δυναμική του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης κατά την αλληλεπίδραση της με τον υποκαταστάτη άλλα και τις μεταβολές που προκαλούνται στο πρωτεϊνικό περιβάλλον κατά την διαδικασία δέσμευσης, αποδέσμευσης και επαναδέσμευσης του υποκαταστάτη.

Πειραματική διάταξη και διαδικασία για τις time-resolved step-scan FTIR μετρήσεις

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τις time-resolved Step-Scan FTIR μετρήσεις απεικονίζεται στο σχήμα 5. Η διάταξη περιλαμβάνει ένα FTIR φασματοφωτόμετρο Equinox 55 Bruker, ένα παλμικό laser στερεής κατάστασης Nd : YAG (Continuum) και μια παλμογεννήτρια (Quantum Composers, 9314T). Το φασματοφωτόμετρο FTIR είναι εξοπλισμένο με globar πηγή, laser He-Ne, φωτοβολταϊκό ανιχνευτή Mercury Cadmium Telluride (MCT) και μετασχηματιστή αναλογικού σήματος σε δεκαδικό 200-kHz, 16-bit. Το φασματοφωτόμετρο διαθέτει την επιλογή λειτουργίας του συμβολομέτρου με την τεχνική step-scan και η χρονική διακριτικότητα της διάταξης καθορίζεται από τον χρόνο απόκρισης του dc-coupled MCT που είναι 5 μ s. Το φασματοφωτόμετρο FTIR βρίσκεται τοποθετημένο σε τραπέζι Newport 4000 που στηρίζεται σε πεπιεσμένο αέρα για την απομόνωση των δονήσεων του περιβάλλοντος. Το παλμικό Nd : YAG laser παράγει παλμούς με μήκος κύματος 532 nm (δεύτερη αρμονική), με πλάτος 3-5 ns και ταχύτητα επανάληψης 1-15 Hz. Η παλμογεννήτρια συνδιάζει χρονικά την λήψη φασμάτων από το FTIR με τους παλμούς του Nd : YAG laser μέσω της διαδοχικής πυροδότησης flashlamps, Q-switch, και FTIR φασματοφωτόμετρου με TTL παλμό (Transistor Transistor Logic).

Η δεύτερη αρμονική 532 nm του παλμικού Nd : YAG laser χρησιμοποιείται για την φωτόλυση του συμπλόκου και η ταχύτητα επανάληψης των παλμών εξαρτάται από την χρονικό διάστημα που χρειάζεται το σύμπλοκο ώστε να επανέλθει στην αρχική του ισοροπία και να επαναληφθεί η διαδικασία της φωτοδιάσπασης. Η δέσμη των 532 nm εισέρχεται στο FTIR φασματοφωτόμετρο υπό τετοια γωνία που μετά την ανακλάσή της σε πρίσμα 90° να διέρχεται από το δείγμα αλλά όχι από τον MCT ανιχνευτή (Σχήμα 5), εφόσον θα προκαλούσε σημαντική αύξηση του θορύβου. Ο συνολικός χρόνος διεξαγωγής του πειράματος εξαρτάται από το επιθυμητό φασματικό εύρος (χρησιμοποιείται οπτικό φίλτρο (Optical Coating Laboratory, Santa Rosa, CA) με όριο τα 2.67 μ m για την μείωση του φασματικού εύρους από από 2.67 ως 8 μ m) την φασματική διακριτικότητα και τον αριθμό

επαναλήψεων σε κάθε σταθερό σημείο. Μια μέτρηση με εύρος $0-3900\text{ cm}^{-1}$ και διακριτικότητα 8 cm^{-1} , περιλαμβάνει 1110 σημεία στα οποία ο καθρέπτης σταθεροποιείται και καταγράφεται το σήμα, ενώ τουλάχιστον 10 επαναλήψεις σε κάθε σημείο είναι απαραίτητες για ικανοποιητικό σήμα/θόρυβο. Για την περαιτέρω βελτίωση του λόγου σήμα/θόρυβο 2-6 διαφορετικές μετρήσεις λαμβάνονται και προστίθενται ώστε να προκύψει ο μέσος όρος τους. Επιπλέον στοιχεία και λεπτομέρειες για κάθε την πειραματική διαδικασία και επεξεργασία των δεδομένων περιλαμβάνονται σε κάθε κεφάλαιο με time-resolved Step-Scan FTIR.



Σχήμα 5: Πειραματική διάταξη για τις time-resolved Step-Scan FTIR μετρήσεις.

2. Φασματοσκοπία συντονισμού Raman

Το φαινόμενο Raman προκαλείται κατά την ανελαστική σκέδαση ενός μορίου με μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος στην περιοχή του υπεριώδους ή ορατού. Η σκέδαση Raman σχετίζεται με κανονικές δονήσεις που προκαλούν μεταβολή της πολωσιμότητας του μορίου.

Όταν ένα μόριο τοποθετηθεί σε ηλεκτρικό πεδίο E , επάγεται σε αυτό διπολική ροπή P , λόγω της έλξης των ηλεκτρονίων του μορίου προς τον θετικό πόλο του πεδίου και των πυρήνων προς τον αρνητικό. Η διπολική ροπή δίνεται από την εξίσωση:

$$P = \alpha \times E \quad (14)$$

όπου α η πολωσιμότητα του μορίου.

Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι γνωστό ότι δίνεται από την σχέση:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (15)$$

όπου E_0 το πλάτος της έντασης, ν_0 η συχνότητα διέγερσης και t ο χρόνος.

Η πολωσιμότητα μπορεί να επίσης να γραφεί σαν μία σειρά :

$$\alpha = \alpha_0 + (\partial\alpha / \partial q)_0 q \cos 2\pi\nu_{mn} t + \dots \quad (16)$$

όπου q είναι η εκάστοτε δονητική συντεταγμένη και ν_{mn} η δονητική συχνότητα.

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις 15 και 16 στην 14 προκύπτει:

$$P = [\alpha_0 + (\partial\alpha / \partial q)_0 q \cos 2\pi\nu_{mn} t] (E_0 \cos 2\pi\nu_0 t) \quad (17)$$

$$\Rightarrow P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + 1/2 (\partial\alpha / \partial q)_0 E_0 [\cos 2\pi(\nu_0 - \nu_{mn})t + \cos 2\pi(\nu_0 + \nu_{mn})t] \quad (18)$$

Στην εξίσωση 18 διακρίνονται τρεις όροι οι οποίοι στις αντιστοιχούν ο πρώτος στις γραμμές Rayleigh, ο δεύτερος στις Stokes και ο τρίτος στις anti-Stokes γραμμές.

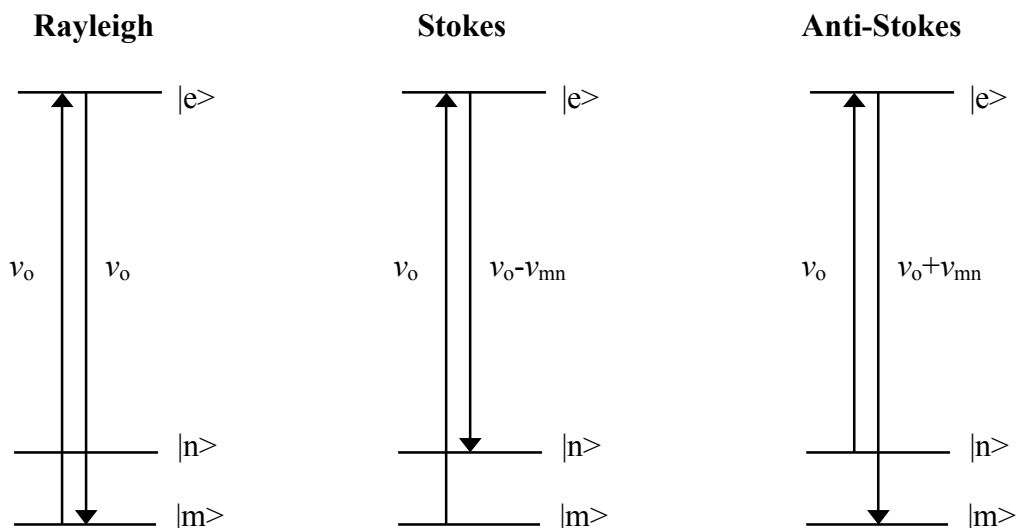
Το μεγαλύτερο ποσοστό από το σκεδαζόμενο φως αποτελείται από ακτινοβολία της ίδιας συχνότητας με το προσπίπτων φως, χαρακτηρίζεται ως γραμμή Rayleigh, και στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχει αλληλεπίδραση με το μόριο. Από την εξίσωση 18 προκύπτει και ο κανόνας επιλογής για μια ενεργή Raman δόνηση. Εάν ο παράγοντας $\partial\alpha / \partial q$ είναι μηδέν τότε ο μόνος όρος που είναι μη-μηδενικός αντιστοιχεί στην γραμμή Rayleigh. Συνεπώς, το φαινόμενο της σκέδασης Raman παρατηρείται μόνο όταν μεταβάλεται η πολωσιμότητα του μορίου κατά την δόνησή του, δηλαδή $\partial\alpha / \partial q \neq 0$.

Ένα μικρό ποσοστό του σκεδαζόμενου φωτός αλληλεπιδρά μέσω ανελαστικής σκέδασης με το μόριο και αποκτάει νέες τροποποιημένες συχνότητες $\nu_0 \pm \nu_{mn}$ όπου οι

διαφορές ν_{mn} σε σχέση με την αρχική συχνότητα ν_0 ισούνται με τις συχνότητες που σχετίζονται με τις μεταβάσεις μεταξύ δονητικών και λιγότερο συχνά, περιστροφικών επιπέδων του συστήματος. Δηλαδή το μόριο με την επίδραση της ακτινοβολίας $h\nu_0$ απορροφάει ενέργεια και μεταβαίνει από ένα δονητικό επίπεδο m ή n της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης σε ένα διεγερμένο ηλεκτρονιακό επίπεδο $|e\rangle$ που μπορεί να είναι και μη-πραγματικό (virtual), από το οποίο αποδιεγείρεται στο δονητικό επίπεδο n ή m της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης, αντίστοιχα, εκπέμποντας φωτόνια συχνότητας $\nu_0 \pm \nu_{mn}$. Στο παρατηρούμενο φάσμα οι δονητικές συχνότητες εμφανίζονται σαν μετατοπίσεις από την προσπίπτουσα συχνότητα ν_0 . Οι γραμμές Stokes εμφανίζουν συχνότητα μικρότερη από αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή $\nu_0 - \nu_{mn}$, και άρα το φωτόνιο που εκπέμπεται από το μόριο έχει χάσει ενέργεια που αντιστοιχεί στην δονητική μετάβαση από το $|m\rangle$ στο $|n\rangle$, ενώ οι γραμμές anti-Stokes εμφανίζουν μεγαλύτερη συχνότητα $\nu_0 + \nu_{mn}$ και το φωτόνιο έχει κερδίσει την ενέργεια που αντιστοιχεί στην δονητική μετάβαση. Επειδή στην πράξη ο πληθυσμός που καταλαμβάνει διεγερμένα δονητικά επίπεδα σε ένα μόριο μειώνεται εκθετικά με την αύξηση της ενέργειας, οι εντάσεις των γραμμών anti-Stokes είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες γραμμές Stokes και ισχύει η εξίσωση:

$$\frac{I_{aST}}{I_{ST}} = \frac{(\nu_0 + \nu_{mn})^4}{(\nu_0 - \nu_{mn})^4} \exp\left(-\frac{h\nu_{mn}}{kT}\right) \quad (19)$$

RAMAN



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση της γραμμής Rayleigh, και των Stokes και anti-Stokes γραμμών.

Η ένταση της σκέδασης I για μία μετάβαση μεταξύ δύο καταστάσεων $|m\rangle$ και $|n\rangle$ και σε γωνία 90 μοίρες ως προς την διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δίνεται από την σχέση :

$$I_{mn}(\pi/2) = 10^8 \frac{\pi^2}{\epsilon_0^2 c^4} (\nu_0 \pm \nu_{mn})^4 I_0 \sum_{\rho\sigma} [\alpha_{\rho\sigma}]_{mn}^2 \quad (20)$$

όπου I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ν_0 η συχνότητα της, ν_{mn} η συχνότητα της μετάβασης μεταξύ των καταστάσεων m και n , ϵ_0 η διαπερατότητα του κενού και $[\alpha_{\rho\sigma}]_{mn}$ το διάνυσμα που μας δίνει την μεταβατική πολωσιμότητα και δίνεται από την εξίσωση:

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{mn} = \frac{1}{h} \sum_e \frac{\langle n | \mu_\rho | e \rangle \langle e | \mu_\sigma | m \rangle}{\nu_{em} - \nu_0 + i\Gamma_e} + \frac{\langle n | \mu_\sigma | e \rangle \langle e | \mu_\rho | m \rangle}{\nu_{en} + \nu_0 + i\Gamma_e} \quad (21)$$

όπου $|m\rangle$ και $|n\rangle$ η αρχική και τελική κατάσταση του μορίου και το άθροισμα περιλαμβάνει όλες τις ενδιάμεσες καταστάσεις $|e\rangle$. Το $\langle n | \mu_\rho | e \rangle$ είναι η μεταβατική διπολική ροπή της μετάβασης en , μ_ρ ο τελεστής της διπολικής ροπής στην κατεύθυνση ρ και αντίστοιχα ορίζονται τα $\langle e | \mu_\sigma | m \rangle$, $\langle n | \mu_\sigma | e \rangle$ και $\langle e | \mu_\rho | m \rangle$. Ο παράγοντας Γ_e αντιστοιχεί στο πλάτος της μετάβασης από την βασική κατάσταση στην $|e\rangle$, αντιπροσωπεύει δηλαδή το χρόνο ημιζωής της ενδιάμεσης κατάστασης. Οι σ και ρ αναφέρονται στα σταθερά καρτεσιανά διανύσματα του μορίου x , y και z , και αντιπροσωπεύουν την πόλωση της προσπίπτουσας (σ) και σκεδαζόμενης (ρ) ακτινοβολίας.

Στην περίπτωση της **κανονικής σκέδασης Raman**, όπου η συχνότητα ν_0 της ενέργειας διέγερσης είναι πολύ μικρότερη από την ν_{em} , ο παρονομαστής του κλάσματος της εξίσωσης (21) δεν παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από την ν_0 και οι μοριακές δονητικές μεταβάσεις συνεισφέρουν ανάλογα με την διπολική τους ροπή. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού καταστάσεων που συνεισφέρουν στην $[\alpha_{\rho\sigma}]$ καθίσταται αδύνατος ο καθορισμός των σχετικών μεγεθών της κάθε συνεισφοράς. Επίσης οι μεταβολές στην ένταση Raman ως προς την συχνότητα διέγερσης εξαρτώνται μόνο από τον όρο ν_0^4 , και άρα δεν ιφίσταται επιλεκτικότητα.

Η κατάσταση είναι διαφορετική στην περίπτωση της **σκέδασης συντονισμού Raman**, όπου η συχνότητα ν_0 της ενέργειας διέγερσης είναι πολύ κοντά με μία ηλεκτρονιακή μετάβαση. Ο παρονομαστής του πρώτου όρου της εξίσωσης (21) αποκτά ελάχιστη τιμή και

είναι ο όρος που κυριαρχεί, δηλαδή στο άθροισμα κυριαρχεί η ηλεκτρονιακή κατάσταση με την οποία βρισκόμαστε σε συντονισμό.

Οι επιδράσεις του ηλεκτρονικού και δονητικού Raman μπορούν να διαχωριστούν αν οι ιδιοκαταστάσεις $|m\rangle$, $|n\rangle$, $|e\rangle$ παραγοντοποιηθούν σε ηλεκτρονικά και δονητικά μέρη και αντικατασταθούν στην εξίσωση (21), και σαν αποτέλεσμα μπορούμε να διαχωρίσουμε τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς σκέδασης. Έτσι η (21) γράφεται ως συνάρτηση τριών όρων :

$$[\alpha_{\rho\sigma}]_{mn} = A + B + C \quad (22)$$

$$\text{όπου: } A = \sum_{ev} \frac{\langle g | \mu_p | e \rangle \langle e | \mu_\sigma | g \rangle}{\nu_{ev} - \nu_o + i\Gamma_{ev}} (f | \nu) (\nu | j) \quad (23)$$

$$B = \sum_{ev} \left(\left[\frac{\partial \langle g | \mu_p | e \rangle}{\partial Q_\omega} \right] \cdot \frac{\langle e | \mu_\sigma | g \rangle}{\nu_{ev} - \nu_o + i\Gamma_{ev}} \right) (f | Q_\omega | \nu) (\nu | j) + \quad (24)$$

$$\left(\frac{\langle g | \mu_p | e \rangle}{\nu_{ev} - \nu_o + i\Gamma_{ev}} \cdot \left[\frac{\partial \langle e | \mu_\sigma | g \rangle}{\partial Q_\omega} \right]_0 \right) (f | \nu) (\nu | Q_\omega | j)$$

$$C = \sum_{ev} \sum_{\omega} \sum_{\omega'} \left(\left[\frac{\partial \langle g | \mu_p | e \rangle}{\partial Q_\omega} \right]_0 \left[\frac{\partial \langle e | \mu_p | g \rangle}{\partial Q_{\omega'}} \right]_0 \right) (f | Q_\omega | \nu) (\nu | Q_{\omega'} | j) \quad (25)$$

όπου τα τριγωνικά brackets χρησιμοποιούνται για το συμβολισμό των ολοκληρωμάτων που αντιπροσωπεύουν μεταβάσεις ανάμεσα σε στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση $|g\rangle$ και στις διεγερμένες ηλεκτρονιακές καταστάσεις $|e\rangle$, ενώ τα στρογγυλεμένα brackets χρησιμοποιούνται για το συμβολισμό των ολοκληρωμάτων που αντιπροσωπεύουν μεταβάσεις ανάμεσα σε δονητικά επίπεδα με $|j\rangle$ το αρχικό δονητικό επίπεδο στην βασική ηλεκτρονιακή κατάσταση $|g\rangle$ μιας κανονικής δόνησης ω , $|\nu\rangle$ το δονητικό επίπεδο της κανονικής δόνησης στην διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση, και $|f\rangle$ το τελικό δονητικό επίπεδο της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης.

Ο όρος A κυριαρχεί στην περίπτωση των ισχυρά επιτρεπτών μεταβάσεων. Εξαρτάται από τους παράγοντες Frank-Condon $(f|\nu)$ $(\nu|j)$ οι όποιοι θα είναι διαφορετικοί του μηδενός

μόνο όταν η γεωμετρία ισορροπίας της διεγερμένης κατάστασης είναι μετατοπισμένη κατά μήκος της συντεταγμένης μιας συμμετρικής κανονικής δόνησης σε σχέση με την βασική κατάσταση, υποθέτοντας ίδιες ορθοκανονικές κυματοσυναρτήσεις για την δόνηση στην βασική και διεγερμένη κατάσταση. Ενίσχυση του όρου A μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω ισχυρής Frank-Condon αλληλεπικάλυψης όταν οι δονητικές καταστάσεις της διεγερμένης κατάστασης αποτελούν λύσεις διαφορετικών χαμιλτονιανών σε σχέση με τις αντίστοιχες της βασικής κατάστασης. Στην περισσότερο κοινώς συναντούμενη περίπτωση που υπάρχει ομοιότητα (ίδιες ορθοκανονικές συναρτήσεις) στις δονήσεις της βασικής και διεγερμένης κατάστασης, και η γεωμετρία της διεγερμένης κατάστασης είτε διαστέλεται είτε συστέλεται σε σχέση με την βασική κατάσταση, η ενίσχυση των συμμετρικών δονήσεων είναι σχεδόν ανάλογη του $\Delta^2/2$, όπου Δ είναι η μετατόπιση του ελαχίστου της δυναμικής επιφάνειας της διεγερμένης κατάστασης κατά μήκος της Raman κανονικής συντεταγμένης. Για μικρές μετατοπίσεις μόνο οι θεμελιώδης δονήσεις παρουσιάζουν σημαντική ενίσχυση.

Η συμμετοχή του όρου B στο διάνυσμα της πολωσιμότητας α ενισχύεται μέσω της μη-Condon εξάρτησης ηλεκτρονιακών μεταβάσεων με δονητικές συντεταγμένες. Ένα από τα σημαντικότερα παραδείγματα μηχανισμών μέσω μη-Condon διαδικασιών, είναι η Herzberg-Teller δονητική σύζευξη διαφορετικών ηλεκτρονιακών μεταβάσεων. Με τον μηχανισμό αυτό ενισχύονται τόσο συμμετρικοί όσο και μη-σύμμετρικοί τρόποι δόνησης θεμελιωδών δονήσεων. Στην περίπτωση όμως ισχυρά επιτρεπτών μεταβάσεων, η συνεισφορά του όρου B για συμμετρικές δονήσεις είναι σημαντικά χαμηλότερη από την συνεισφορά του A όρου. Η συνεισφορά του B όρου κυριαρχεί μόνο για τις μη-συμμετρικές δονήσεις και σε μεταβάσεις με μεγάλη σταθερά δόνησης, που προκύπτει από Herzberg-Teller σύζευξη με γειτονικές επιτρεπτές μεταβάσεις.

Αν μία μετάβαση απαγορεύεται αυστηρά στην γεωμετρία ισορροπίας, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ενίσχυση θεμελιωδών δονήσεων ούτε μέσω του όρου A αλλά ούτε και του όρου B. Ο όρος C μπορεί όμως να προκαλέσει ενίσχυση αρμονικών και συνδιαστικών τρόπων δόνησης, που θα περιλαμβάνουν συνεισφορά δύο κβάντα της δόνησης ω ή ένα κβάντουμ της δόνησης ω και ένα της ω' . Ο όρος C μπορεί να κυριαρχήσει μόνο στην περίπτωση διέγερσης σε συντονισμό με απαγορευμένη ηλεκτρονιακή μετάβαση.

Συνοψίζοντας, οι τρόποι δόνησης που προκαλούν αλλαγή στην γεωμετρία κατά την μετάβαση από την βασική στην διεγερμένη κατάσταση (Franck-Condon) ή είναι ικανοί για δονητική σύζευξη της διεγερμένης με κάποια άλλη ηλεκτρονική κατάσταση διαφορετικής διπολικής ροπής (Herzberg-Teller), ενισχύονται ισχυρά στην περίπτωση της χρησιμοποίησης ενέργειας διέγερσης σε συντονισμό με κάποια ηλεκτρονιακή μετάβαση. Αυτή η επιλεκτική

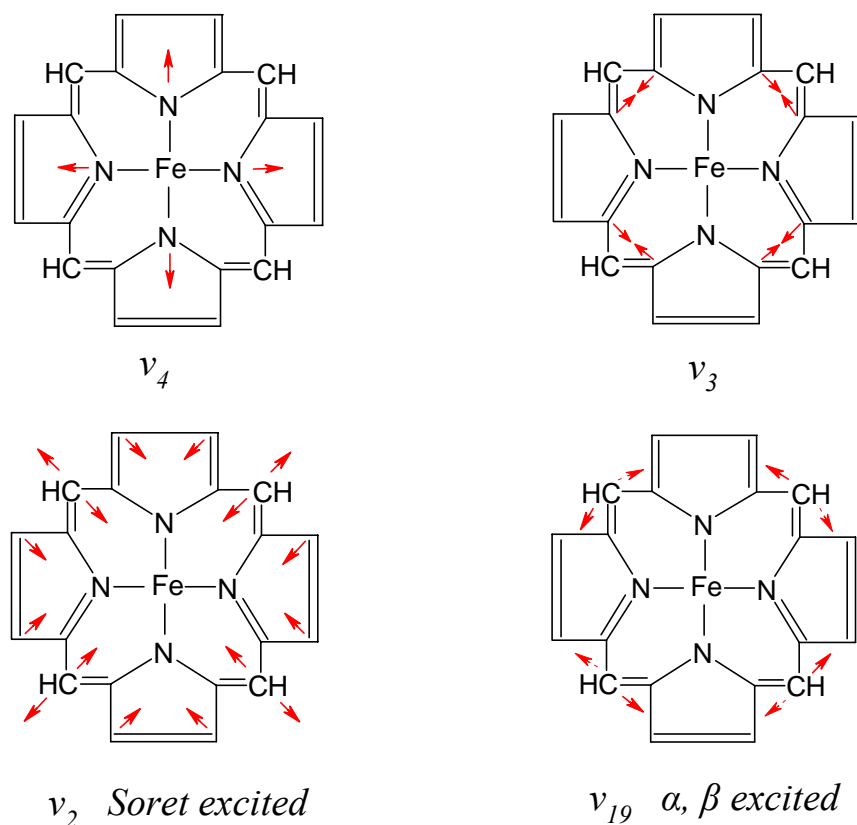
ενίσχυση είναι ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman καθώς το παρατηρούμενο φάσμα αποτελείται από συμμετρικούς ή όχι τελείως συμμετρικούς τρόπους δόνησης, ανάλογα με την φύση της συντονισμένης ηλεκτρονιακής μετάβασης.

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman στις αιμοπρωτεΐνες

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη των δομικών ιδιοτήτων βιολογικών συστημάτων. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα είναι ότι δεν υπάρχει επίδραση του νερού, σε αντίθεση με την φασματοσκοπία υπερύθρου. Με την χρήση των τελευταίας τεχνολογίας και μεγάλης ευαισθησίας ανιχνευτές μπορούν να ληφθούν μετρήσεις σε αρκετά αραιά δείγματα πρωτεϊνών 10 –100 μM . Επίσης με την χρησιμοποίηση διέγερσης μήκους κύματος σε συντόνισμο με τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις συγκεκριμένων ομάδων των πρωτεϊνών, μπορούν να μελετηθούν οι ομάδες αυτές χωρίς παρεμβολή από τα άλλα μέρη του μορίου. Για παράδειγμα με την χρήση διέγερσης 220-230 nm, στο όποιο μήκος κύματος απορροφούν αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους όπως τυροσίνη και τρυπτοφάνη, λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον που βρίσκονται αυτά τα αμινοξέα στην πρωτεΐνη. Στην περίπτωση των αιμοπρωτεϊνών όταν η διέγερση πλησιάζει τις $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις του πορφυρινικού δακτυλίου ενισχύονται οι εντός επιπέδου δονήσεις του δακτυλίου, καθώς και περιφερειακών υποκαταστατών του.

Η περιοχή των 1300-1700 cm^{-1} του φάσματος συντονισμού Raman των αιμοπρωτεϊνών περιέχει τις ενός επιπέδου δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου. Οι δονήσεις αυτές παρουσιάζουν ευαισθησία την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δακτυλίου, καθώς επίσης και την διαμόρφωση σπιν και αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου σιδήρου. Η ισχυρότερη γραμμή που παρουσιάζεται στο φάσμα, όταν η διέγερση πραγματοποιείται στην περιοχή της Soret μετάβασης είναι η πλήρως συμμετρική δόνηση breathing της αίμης και η οποία εμφανίζει ιδιαίτερη ευαισθησία στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δακτυλίου και για το λόγω αυτό αναφέρεται ως γραμμή της οξειδωτικής κατάστασης ή ν_4 . Μεταβολές της οξειδωτικής κατάστασης του κεντρικού ατόμου σιδήρου του δακτυλίου προκαλούν σημαντική μετατόπιση της συχνότητας που εμφανίζεται η ν_4 εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης των τροχιακών της πορφυρίνης και του σιδήρου. Επίσης δονήσεις όπως η ν_2 , ν_3 , και ν_{10} έχει αποδειχθεί με σειρά μελετών σε μοντέλα

πορφυρινών αλλά και αιμοπρωτεϊνών ότι είναι ευαίσθητες τόσο στον αριθμό συναρμογής του σιδήρου όσο και στη διαμόρφωση της κατάστασης σπιν. Στο Σχήμα 7 απεικονίζονται μερικές από τις χαρακτηριστικότερες δονήσεις που εμφανίζονται στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman των αιμοπρωτεϊνών.



Σχήμα 7 : Δονήσεις που εμφανίζονται στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman των αιμοπρωτεϊνών και χαρακτηρίζουν την οξειδωτική κατάσταση, την διαμόρφωση σπιν, και τον αριθμό συναρμογής του κεντρικού ατόμου σιδήρου.

Εκτός βέβαια από τις δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου στην υψηλή περιοχή των συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman αιμοπρωτεϊνών μπορούν να παρατηρηθούν δονήσεις περιφερειακών υποκαταστατών του πορφυρινικού δακτυλίου, όταν αυτοί οι υποκαταστάτες είναι συζυγιακά συστήματα όπως οι βνυλομάδες και φορμυλομάδες. Γενικά, δεν αναμένεται να ενισχύονται δονήσεις των περιφερειακών υποκαταστατών της πορφυρίνης με διέγερση στις $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις της αίμης, εφόσον δεν συνεισφέρουν στις μεταβάσεις αυτές. Κερδίζουν όμως σημαντική ένταση είτε μέσω της ηλεκτρονιακής σύζευξης τους με το συζυγιακό σύστημα της πορφυρίνης είτε μέσω κινητικής σύζευξης με τις δονήσεις του

δακτυλίου. Η καταγραφή τέτοιων δονήσεων προσφέρει πληροφορίες για τον τύπο της αίμης (α , β , δ), αλλά και για την αλληλεπίδραση των περιφερειακών υποκαταστάτων με γειτονικά αμινοξέα.

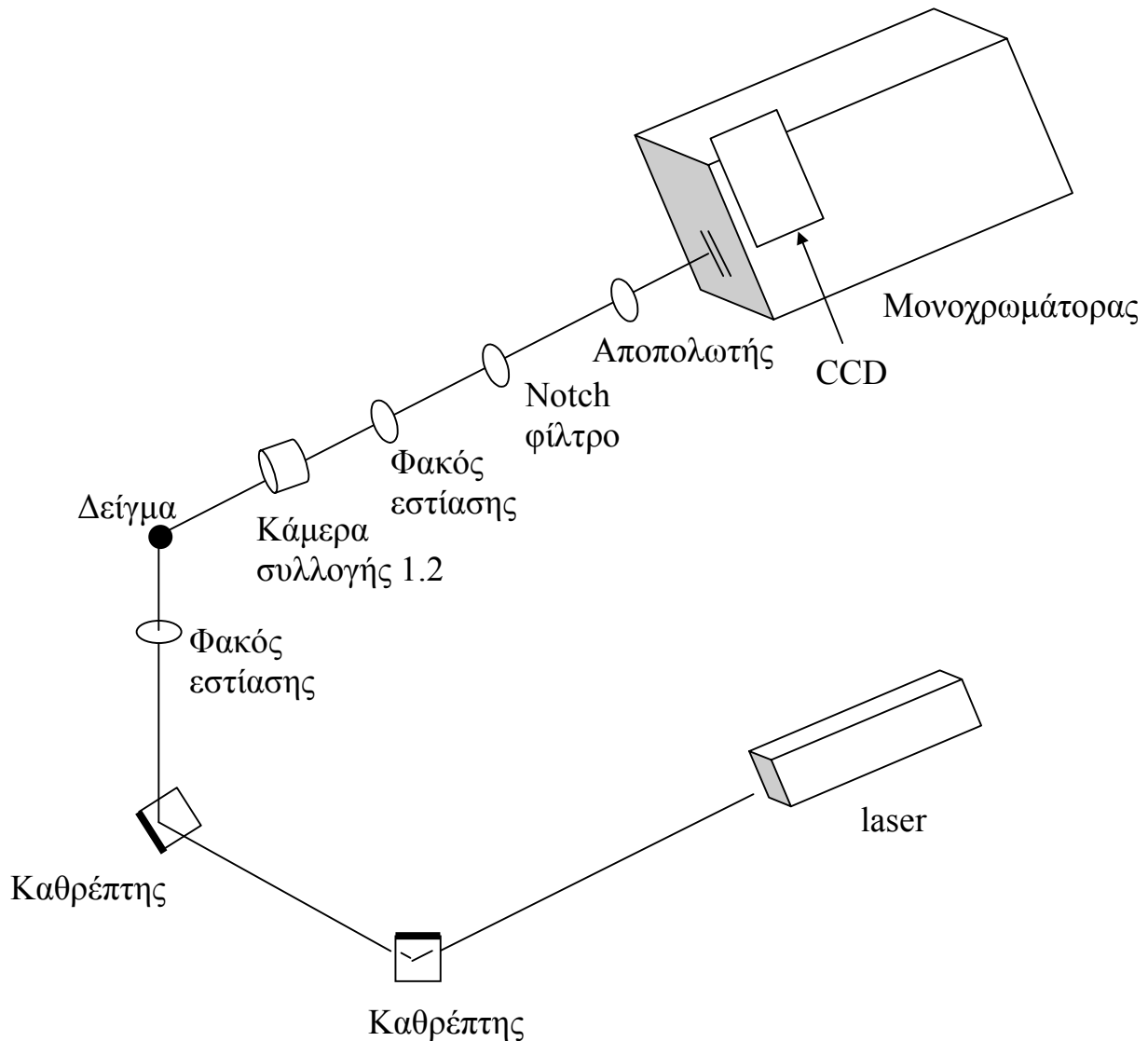
Ο πορφυρινικός δακτύλιος προσδένεται στις πρωτεΐνες συνήθως μέσω του δεσμού του αιμικού σιδήρου με ένα αμινοξύ ως αξονικό υποκαταστάτη (εγγύς υποκαταστάτης), και ο δεσμός αυτός αποτελεί σημαντικό στοιχείο για την λειτουργία της πρωτεΐνης. Ο δεσμός αυτός σχηματίζεται με συνεισφορά ασύζευκτων ηλεκτρονίων στα d_z^2 του σιδήρου από άτομα: θείου κυστεΐνης (P-450, χλωροπεροξειδάση, NO συνθάση), αζώτου ιμιδαζολίου ιστιδίνης (μυοσφαιρίνη, αιμοσφαιρίνη, κυτοχρωμική οξειδάση) ή οξυγόνου τυροσίνης (καταλάση), μέσω των οποίων ο εγγύς υποκαταστάτης συζεύγνεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο. Η ανίχνευση $\nu(\text{Fe-His})$ ή $\nu(\text{Fe-Cys})$ συντελεί στην αναγνώριση της ταυτότητας του εγγύς υποκαταστάτη αλλά και των αλληλεπιδράσεών του με το πρωτεϊνικό περιβάλλον εφόσον οι συχνότητες αυτές είναι ευαίσθητες στην γεωμετρία και τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

Σε αρκετές περιπτώσεις στην έκτη θέση δέσμευσης (μακρινή θέση δέσμευσης) του σιδήρου μπορούν να δεσμευτούν εξωγενείς υποκαταστάτες (φυσιολογικά υποστρώματα ή αναστολείς) όπως O_2 , NO , CO , CN^- , N_3 κ.α. Η ανίχνευση των δονήσεων Fe-υποκαταστάτη όσο και των εσωτερικών δονήσεων του υποκαταστάτη παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την δομή του μακρινού περιβάλλοντος της αίμης.

Πειραματική διάταξη μερτήσεων συντονισμού Raman

Η πειραματική διάταξη για τις μετρήσεις συντονισμού απεικονίζεται στο Σχήμα 8, και περιλαμβάνει laser (συνεχούς κύματος ή παλμικό) για την παροχή της μονοχρωματικής ενέργειας διέγερσης, οπτικά φίλτρα για την βελτίωση του ποσοστού των ανιχνευόμενων φωτονίων και του σήματος που καταγράφεται από τον ανιχνευτή, ένα απλό μονοχρωμάτορα Jobin Yvon-SPEX HR460 εξοπλισμένο με gratings 1200 mm/groove και 1800 mm/groove για την ανάλυση των σκεδαζόμενων φωτονίων και ανιχνευτή Charged Coupled Detector (CCD) Jobin Yvon- SPEX Spectrum ONE 3000 που ψύχεται με υγρό άζωτο.

Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε ως ενέργεια διέγερσης βρίσκεται σε συντονισμό για κάθε μέτρηση που πραγματοποιήθηκε, με την ηλεκτρονική μετάβαση στην περιοχή της Soret μετάβασης, όπου και τα συστήματα των αιμοπρωτεϊνών που μελετήθηκαν παρουσιάζουν τον μεγαλύτερο συντελεστή απορρόφησης. Η δέσμη της ορατής ακτινοβολίας κατευθύνεται μέσω πρισμάτων στο δείγμα αφού πρώτα εστιαστεί με το



Σχήμα 8: Πειραματική διάταξη για τις μετρήσεις συντονισμού Raman.

κατάλληλο φακό εστίασης . Η ακτινοβολία αλληλεπιδρά με το δείγμα και συλλέγονται τα φωτόνια που σκεδάζονται σε γωνία 90° . Τα φωτόνια συλλέγονται με φακό κάμερας 1.2, 50 mm. Εστιάζονται με φακό εστίασης, του οποίου η ικανότητα συλλογής και εστίασης φωτονίων καθορίζεται από το λόγο $F = f/D$ (όπου f το μήκος εστίασης και D η διάμετρος του) και όσο μικρότερη είναι η τιμή του λόγου τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα του φακού. Η τιμή F πρέπει να είναι το δυνατόν πλησιέστερα με την τιμή F του μονοχρωμάτορα (HR460 έχει $F = 5.3$). Στην συνέχεια τα φωτόνια διέρχονται από ένα notch φίλτρο που εμποδίζει τα φωτόνια του μήκους κύματος της διέγερσης (Reyleigh σκέδαση) να εισέλθουν στον μονοχρωμάτορα έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση δονήσεων που βρίσκονται σε

πολύ χαμηλές συχνότητες, δηλαδή πολύ κοντά στην γραμμή διέγερσης. Το τελευταίο οπτικό φίλτρο από το οποίο διέρχονται τα φωτόνια είναι ένας αποπολωτής. Στην συνέχεια τα σκεδαζόμενα φωτόνια διέρχονται από την σχισμή εισόδου του μονοχρωμάτορα η οποία ρυθμίζεται ώστε να επιτευχθεί και ένταση (μεγάλο μήκος σχισμής) αλλά και υψηλή φασματική διακριτικότητα (μικρό μήκος σχισμής). Στον μονοχρωμάτορα τα φωτόνια αναλύονται στα gratings και ανιχνεύονται από τον μεγάλης ευαισθησίας CCD ανιχνευτή.

Βιβλιογραφία

1. Nakamoto, K. (1986) *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. Part I*, Wiley, New York.
2. Griffith P. R.; de Haseth J. A. (1986) *Fourier Transform Infrared Spectrometry* Wiley, New York.
3. Mantele, W. (1996) in *Biological Techniques in Photosynthesis*, Chapter 9, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
4. Kitagawa, T., Ozaki, Y. (1987) *Structure and Bond* **64**, 71-114.
5. Hollas J. M. (1996) *Modern Spectroscopy*, Wiley, New York.
6. Ferraro, J. R., Nakamoto, K. (1994) *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, San Diego.
7. Clark R. J.; Dines T. J. (1982) *Raman Spectroscopy*, Wiley, New York.
8. Wang, J., Caughey, W. S., Rousseau, D. L. (1996) in *Methods in Nitric Oxide Research* Chapter 30, Wiley, New York.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ: Απομόνωση Κυτοχρωμικής Οξειδάσης και Αναγωγάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου

1. Απομόνωση της Κυτοχρωμικής Οξειδάσης

A. Απομόνωση του κυτοχρώματος aa_3 από το *Paracoccus denitrificans*

Καλλιέργεια των βακτηρίων και προετοιμασία των μεμβρανών

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το strain ATCC 13543, και η απομόνωση βασίστηκε στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής και μοριακού αποκλεισμού (1,2). Η παρακολούθηση της έκλυσης της πρωτεΐνης παρακολούθηθηκε με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους στα 280 nm και με βάση το φάσμα διαφοράς οξειδωμένης-ανηγμένης πρωτεΐνης.

Η προκαλλιέργεια 0.2 lt αναπτύχθηκε σε succinate μέσο pH 7 (50 mM succinate, 50 mM K_2HPO_4 , 10 mM NH_4Cl , 1 mM $MgSO_4$, 1 mM citrate, ιχνοστοιχεία) για 20- 22 ώρες και στη συνέχεια αυτή προστέθηκε σε δεύτερη καλλιέργεια 2 lt και μετά την επώασή της μεταφέρθηκε σε fermentor 100 lt στους 32 °C με το ίδιο μέσο και παρουσία οξυγόνου. Μετά την πάροδο 20 –22 ωρών η οπτική απορρόφηση στα 600 nm ξεπέρασε το 1 και η επώαση των βακτηρίων σταμάτησε. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με υπερφυγοκέντρηση στους 4 °C. Η μέση απόδοση της καλλιέργειας των 100 lt είναι 400-600 gr υγρών κυττάρων. Τα κύτταρα πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8 και φυλάχθηκαν στους –80 °C.

Η διάσπαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με υψηλές πιέσεις (200 bar), αφού διαλυτοποιήθηκαν ως τελικού όγκου περίπου 1 lt με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 , pH = 8, 1 mM EDTA για την συμπλοκοποίηση των ελεύθερων μετάλλων, και μερικούς κόκκους refabloc για την παρεμπόδιση της πρωτεόλυσης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του υλικού στις 40000 στροφές/λεπτό, στους 4 °C για δύο ώρες για να συλλεχθούν οι μεμβράνες που αποτελούν το μαλακό μέρος του ιζήματος, ενώ οι διασπασμένες κυτταρικές μεμβράνες που αποτελούν το σκληρό μέρος του ιζήματος απορρίφθηκαν. Οι μεμβράνες που συλλέχθηκαν διαλυτοποιήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Οι μεμβράνες χωρίστηκαν ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης να κυμαίνεται σε 3000-4000 mg σε κάθε κλάσμα (~10 mg/ml).

Διαλυτοποίηση μεμβρανών και απομόνωση της πρωτεΐνης

Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C, με στήλες πακεταριζόμενες πριν την χρήση τους με πληρωτικό υλικό της Pharmacia. Η έκλυση της

πρωτεΐνης παρακολουθήθηκε με το φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους ρυθμισμένο στα 280 nm.

Οι μεμβράνες του ομογενοποιημένου διαλύματος 300 ml σε 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, με συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/ml (συνολικά 3000-4000 mg πρωτεΐνης), διαλυτοποιήθηκαν με την χρήση του απορρυπαντικού n-dodecyl β -D-maltoside (DM) σε αναλογία 1.5 : 1 ως προς την πρωτεΐνη μέσω συνεχούς αναδεύσης για 30 min στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 40000 στροφές/λεπτό για 2 ώρες και μετέπειτα συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος.

Το διάλυμα αυτό φορτώθηκε σε ανιοανταλλακτική στήλη DEAE-Cellulose, η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 100 mM NaCl και 0.5% DM. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με συνολικό όγκο 5 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο της στήλης με γραμμική διαβάθμιση 100-600 mM NaCl .

Αφού συλλέχθηκαν τα κλάσματα με το κυτόχρωμα aa_3 από την πρώτη στήλη πραγματοποιήθηκε αραίωση 1:3 με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8 και 0.5% DM, για να μειωθεί η συγκέντρωση του NaCl, εφόσον και η δεύτερη στήλη είναι επίσης ανιοανταλλακτική στήλη. Το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη στήλη ήταν DEAE-Sepharose, και είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 100 mM NaCl και 0.5% DM. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με συνολικό όγκο 5 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο της στήλης με γραμμική διαβάθμιση 100-400 mM NaCl, με το κυτόχρωμα aa_3 να εκλύεται σε συγκέντρωση NaCl 300-350 mM.

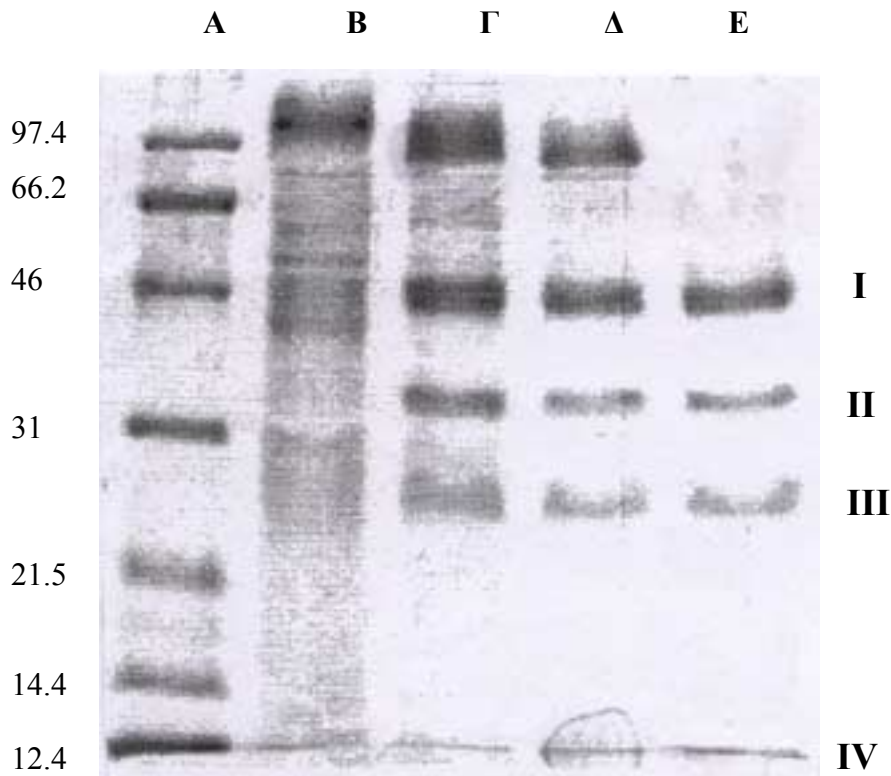
Η τρίτη στήλη, στην οποία εφαρμόζεται η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού απαιτεί την συγκέντρωση των κλασμάτων του κυτοχρώματος aa_3 από την προηγούμενη στήλη σε ελάχιστο όγκο, μικρότερο των 3-4 ml. Η στήλη αυτή είναι πληρωμένη με Ultrage1 AcA34 και εξισορροπημένη με το ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 100 mM NaCl και 0.5% DM, με το οποίο πραγματοποιήθηκε και η έκλουση. Κατά την έκλουση διακρίνονται δύο κλάσματα το πρώτο από τα οποία είναι χρώματος πράσινου και περιέχει το κυτόχρωμα aa_3 ενώ το δεύτερο είναι κόκκινο και είναι το κυτόχρωμα bc_1 .

Στην τελευταία στήλη επαναλήφθηκε η διαδικασία της δεύτερης στήλης, με την πρωτεΐνη να εκλύεται με καθαρότητα 99%. Το κυτόχρωμα aa_3 συγκεντρώθηκε με φίλτρα 100 kDa σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο.

Ηλεκτροφόρηση gel πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση gel πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε σε 12 % gel πολυακρυλαμιδίου στους 6 °C (Laemmli). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση προετοιμάστηκαν με την πρόσθεση σταθερής ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM TRIS-HCl pH=7, 9 % glycerol, 0.05 % bromophenol blue) που περιείχε 16 % SDS χωρίς αναγωγικό.

Στην στήλη Α εμφανίζονται οι μπάντες πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος, και στις ακόλουθες το το πρωτεϊνικό διαλύμα μετά την πρώτη DEAE-Cellulose (B), μετά την DEAE-Sepharose (Γ), μετά την Ultrigel (Δ), και μετά την δεύτερη DEAE-Sepharose (E). Στην στήλη (E) διακρίνονται ξεκάθαρα οι τέσσερις υπομονάδες I, II, III και IV της πρωτεΐνης.



Σχήμα 1: Gel πολυακρυλαμιδίου. Στην στήλη (A) εμφανίζονται οι μπάντες πρωτεϊνών με γνωστό μοριακό βάρος, το οποίο αναφέρεται σε kilodaltons αριστερά της στήλης. Το πρωτεϊνικό διαλύμα μετά την πρώτη DEAE-Cellulose (B), μετά την DEAE-Sepharose (Γ), μετά την Ultrigel (Δ), και μετά την δεύτερη DEAE-Sepharose. Στην στήλη (E) διακρίνονται οι τέσσερις υπομονάδες I, II, III και IV της πρωτεΐνης.

B. Απομόνωση του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος Y280H aa_3 από το *Paracoccus denitrificans*

Η καλλιέργεια των βακτηρίων και η προετοιμασία των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε ομοίως με το φυσικό κυτόχρωμα aa_3 , ενώ η μετάλλαξη της τυροσίνης 280 σε ιστιδίνη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παραπομπή 3.

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε η ενός βήματος διαδικασία που περιλαμβάνει συμπλοκοποίηση του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος aa_3 με θράυσμα αντισώματος F_v και την χρωματογραφία συγγένειας του συμπλόκου σε στήλη streptavidine sepharose (3).

Απομόνωση θραύσματος F_v αντισώματος

Για την απομόνωση του θραύσματος F_v αντισώματος χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια *E. Coli* σε 400 ml Luria-Bertani μέσο (10 g/l tryptone, 5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract) με 50 $\mu\text{g/ml}$ αμπικυλλίνη και επώαση για 12-14 ώρες στους 30 °C. Η κύρια καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 50 ml της προκαλλιέργειας σε 6 φλάσκες με 2 lt LB μέσου και 100 $\mu\text{g/ml}$ αμπικυλλίνη. Η επώαση συνεχίστηκε μέχρι η απορρόφηση στα 550 nm να φτάσει το 0.4 –0.5, ακολούθησε η προσθήκη 0.5 mM IPTG και μετά από περίπου τρεις ώρες η απορρόφηση στα 550 nm ξεπέρασε το 1.5 οπότε και διακόπηκε η επώαση. Τα κύτταρα συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση στους 4 °C (5000 στροφές/λεπτό για 15 min). Στην συνέχεια τα κύτταρα αναμίχθηκαν σε διάλυμα 120 ml το οποίο περιείχε 100 mM K_2HPO_4 pH=8, 500 mM sucrose, 1 mM EDTA, και 250 $\mu\text{M}/100$ ml refabloc συγκέντρωσης 10 mg/ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό στους 4 °C για 30 λεπτά, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, “περιπλασματικό διάλυμα”, στο οποίο προστέθηκαν 250 $\mu\text{M}/100$ ml refabloc συγκέντρωσης 10 mg/ml και 5 mM EDTA. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό στους 4 °C για 30 λεπτά και το υπερκείμενο διάλυμα συνολικού όγκου ~120 ml που περιέχει τα θραύσματα του F_v αντισώματος ψύχθηκε στους –80 °C, ως την χρήση του.

Διαλυτοποίηση μεμβρανών και απομόνωση της πρωτεΐνης

Οι μεμβράνες ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, με συγκέντρωση πρωτεΐνης 30 mg/ml (συνολικά ~1000 mg πρωτεΐνης). Στο

διάλυμα αυτό προστέθηκαν 60 ml διαλύματος των $F_v/1000$ mg πρωτεΐνης, 2.7 mg avidin /1000 mg πρωτεΐνης και ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι συγκέντρωση πρωτεΐνης να φτάσει τα 10 mg/ml. Στην συνέχεια οι μεμβράνες διαλυτοποιήθηκαν με την χρήση του απορρυπαντικού n-dodecyl β -D-maltoside (DM) σε αναλογία 1.5 : 1 ως προς την πρωτεΐνη μέσω συνεχούς αναδεύσης για 30 min στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 40000 στροφές/λεπτό για 2 ώρες και μετέπειτα συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος.

Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη *Streptavidine Sepharose*. Η στήλη είχε εξισσοροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% DM πριν φορτωθεί σε αυτή το διάλυμα πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη στήλη (σε αυτή προσδέεται μόνο το σύμπλοκο κυτοχρωμικής οξειδάσης/ F_v) εκλούστηκαν με τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε και για την εξισσορόπηση της στήλης όγκου ίσου με αυτόν της στήλης ~30 ml. Η έκλυση του συμπλόκου κυτοχρώματος aa_3/F_v πραγματοποιήθηκε με διάλυμα 50 mM K_2HPO_4 pH = 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% DM και 2 mM diaminobiotin. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε με καθαρότητα 99%, συγκεντρώθηκε με φίλτρα 100 kDa σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο.

Γ. Απομόνωση του κυτοχρώματος ba_3 (κινολική οξειδάση) από το *Paracoccus denitrificans*

Καλλιέργεια των βακτηρίων και προετοιμασία των μεμβρανών

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το strain G440 (*Δbc*) στο οποίο δεν εκφράζεται το κυτόχρωμα bc_1 και η απομόνωση βασίστηκε στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής, συγγένειας μετάλλου-ιόντος και μοριακού αποκλεισμού (4,5). Η παρακολούθηση της έκλυσης της πρωτεΐνης παρακολουθήθηκε με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους στα 280 nm και με βάση το φάσμα διαφοράς οξειδωμένης-ανηγμένης πρωτεΐνης.

Η προκαλλιέργεια 0.2 lt αναπτύχθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε succinate μέσω pH=6.8 με επιπλέον 25 μ g/ml στρεπτομυκίνη για 20 ώρες στους 32 °C, στην συνέχεια προστέθηκαν 50 ml από αυτή σε 1 lt μέσου με 25 μ g/ml στρεπτομυκίνη και ακολούθησε επώαση για άλλες 20-22 ώρες, ενώ στο τελευταίο στάδιο προστέθηκαν 50 ml από την

καλλιέργεια του 1 lt σε φλάσκες που περιείχαν 2.5 lt succinate μέσου, με 25 μg/ml στρεπτομυκίνη και 40 mM KNO₃ και επώστηκαν για 20- 22 ώρες. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με υπερφυγοκέντρηση στους 4 °C. Η μέση απόδοση της καλλιέργειας των 50 lt είναι 200-300 gr υγρών κυττάρων. Τα κύτταρα πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K₂HPO₄ pH = 8 και φυλάχθηκαν στους -80 °C.

Η διάσπαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με υψηλές πιέσεις (200 bar), αφού διαλυτοποιήθηκαν ως τελικού όγκου περίπου 1 lt με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K₂HPO₄ pH = 8, 1 mM EDTA για την συμπλοκοποίηση των ελεύθερων μετάλλων, και μερικούς κόκκους refabloc για την παρεμπόδιση της πρωτεόλυσης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του υλικού στις 40000 στροφές/λεπτό, στους 4 °C για δύο ώρες για να συλλεχθούν οι μεμβράνες που αποτελούν το μαλακό μέρος του ιζήματος, ενώ οι διασπασμένες κυταρρικές μεμβράνες που αποτελούν το σκληρό μέρος του ιζήματος απορρίφθηκαν. Οι μεμβράνες που συλλέχθηκαν διαλυτοποιήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K₂HPO₄ pH = 7, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl. Οι μεμβράνες χωρίστηκαν ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης να κυμαίνεται σε 1000-1500 mg σε κάθε κλάσμα (~10mg/ml).

Διαλυτοποίηση μεμβρανών και απομόνωση της πρωτεΐνης

Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας της Biogad τοποθετημένο σε δωμάτιο με θερμοκρασία 4 °C, σε συνδιασμό με κλώνες πακεταριζόμενες πριν την χρήση τους με πληρωτικό υλικό της Pharmacia. Η έκλυση της πρωτεΐνης παρακολούθηθηκε με το φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους του συστήματος ρυθμισμένο στα 280 nm.

Οι μεμβράνες του ομογενοποιημένου διαλύματος 100 ml σε 50 mM K₂HPO₄ pH = 7, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, με συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/ml (συνολικά 1000 mg πρωτεΐνης), διαλυτοποιήθηκαν με την χρήση του απορρυπαντικού n-dodecyl β-D-maltoside (DM) σε αναλογία 1.5 : 1 ως προς την πρωτεΐνη μεσω συνεχούς αναδύσης για 30 min στους 4 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 40000 στροφές/λεπτό για 2 ώρες και μετέπειτα συγκέντρωση του υπερκείμενου διαλύματος.

Το διάλυμα αυτό φορτώθηκε σε ανιοανταλλακτική στήλη Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) η οποία είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K₂HPO₄ pH = 7, 100 mM NaCl και 0.5% DM. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με συνολικό όγκο 5 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο της στήλης με γραμμική διαβάθμιση 100-500 mM

NaCl και ταχύτητα 1 ml/min. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την έκλουση δεν περιείχαν EDTA που θα δημιουργούσε παρεμβολή στην δεύτερη στήλη συγγένειας μετάλλου-ιόντος (IMAC: Immobilized Metal Affinity Chromatography) μέσω της συμπλοκοποίησης του μετάλλου της στήλης. Η έκλουση του κυτοχρώματος *ba₃* έχει ολοκληρωθεί σε συγκέντρωση NaCl 400 mM.

Τα κλάσματα που διέθεταν ενεργότητα κινολικής οξειδάσης (κυτόχρωμα *ba₃*) φορτώθηκαν στην δεύτερη χρωματογραφική στήλη (IMAC, Fast Flow Sepharose, Pharmacia) που είχε προηγουμένως δέσμευση Cu²⁺ και είχε εξισορροπηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα K₂HPO₄ pH = 7, 100 mM NaCl και 0.5% DM. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με γραμμική διαβάθμιση 0-50 mM ιμιδαζολίου σε συνολικό όγκο 5 φορές τον όγκο της κολώνας με ταχύτητα 0.6 ml/min. Η πρωτεΐνη εκλύεται με υψηλή καθαρότητα >95%.

Η τρίτη στήλη αφορά την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού και πραγματοποιείται τόσο για την αύξηση της καθαρότητας της πρωτεΐνης αλλά και την απομάκρυνση της πλεονάζουσας ποσότητας ιμιδαζολίου που συμπλοκοποιείται με την αίμη αν παραμείνει στο διάλυμα. Τα κλάσματα του κυτοχρώματος *ba₃* από την δεύτερη στήλη συγκεντρώθηκαν σε τελικό όγκο 2-3 ml, φορτώθηκαν σε στήλη μοριακού αποκλεισμού (Ultrogel AcA 34, Serva) εξισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM K₂HPO₄ pH = 7, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA και 0.2% DM, με το οποίο πραγματοποιήθηκε και η έκλουση.

Δ. Απομόνωση του κυτοχρώματος *caa₃* από το *Thermus thermophilus*

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραπομπής 6.

Ε. Απομόνωση του κυτοχρώματος *cb_b₃* από το *Pseudomonas stutzeri*

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραπομπής 7.

2. Απομόνωση της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOR)

Καλλιέργεια των βακτηρίων και προετοιμασία των μεμβρανών

Για την καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το strain Pd27.21 (*Δcb_b₃*) (8), στο οποίο απουσιάζει η κυτοχρωμική οξειδάση *cb_b₃* λόγω της αντικατάστασης με γονίδιο ανθεκτικό στην καναμυκίνη. Το stain Pd21.27 (*Δcb_b₃*) επιλέχθηκε ως αρχικό υλικό διότι

μειώνει τις πιθανότητες η απομονωμένη πρωτεΐνη να περιέχει την κυτοχρωμική οξειδάση *cbh₃*, που είναι επίσης ένα bc σύμπλοκο και δύσκολο να διαχωριστεί από την NOR. Η απομόνωση βασίστηκε στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας ανιοανταλλαγής και συγγένειας μετάλλου-ιόντος (9). Η παρακολούθηση της έκλυσης της πρωτεΐνης παρακολούθηθηκε με φασματοσκοπία ορατού/υπεριώδους στα 280 nm και με βάση την ενεργότητα της NOR.

Η προκαλλιέργεια 0.5 lt αναπτύχθηκε κάτω από αναερόβιες συνθήκες στους 30 °C σε Luria-Bertani μέσο το οποίο περιείχε 25μg/ml καναμυκίνη, μέχρι να φτάσει η οπτική απορρόφηση στα 600 nm το 0.5. Η καλλιέργεια των βακτηρίων συνεχίστηκε με την προσθήκη της προκαλλιέργειας σε κλειστή (χωρίς την παρουσία αέρα) fermentor 120 lt στους 35 °C. Τα 120 lt μέσου περιείχαν 50 mM sodium succinate και 100 mM KNO₃ σε pH 7. Μετά την πάροδο 20 ωρών παρατηρήθηκε η έκλυση αερίου, η επώαση των βακτηρίων σταμάτησε και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με υπερφυγοκέντρωση. Πριν την φύλαξη τους στους -80 °C, πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM TRIS-HCl pH 7.5. Η μέση απόδοση είναι 250 gr υγρών κυττάρων, τα οποία μοιράζονται δια 4 ώστε η περαιτέρω διάσπαση των κυττάρων και επεξεργασία των μεμβρανών να πραγματοποιείται με περίπου 60 gr υγρών κυττάρων κάθε φορά. Η αποθήκευση των κυττάρων πραγματοποιείται στους -80 °C.

Για την διαδικασία διάσπασης των κυττάρων τα 60 gr υγρών κυττάρων αρχικά διαλυτοποιήθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM TRIS-HCl pH=7.5 μέχρι τελικού όγκου 300 ml και προστέθηκαν μερικοί κόκκοι refabloc ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή πρωτεόλυση, 0.5 mM MgCl₂ και κόκκοι DNAase I. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διάρρηξη των κυταρικών μεμβρανών με την βοήθεια υψηλών πιέσεων σε French Press. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διάσπασης των κυττάρων προστέθηκε στο διάλυμα, που περιέχει πλέον τις μεμβράνες, EDTA τελικής συγκέντρωσης 1 mM για την συμπλοκοποίηση ελεύθερων μετάλλων. Ακολούθησε φυγοκέντρωση του υλικού στις 40000 στροφές/λεπτό, στους 4 °C για δύο ώρες για να συλλεχθούν οι μεμβράνες που αποτελούν το μαλακό μέρος του ιζήματος, ενώ οι διασπασμένες κυταρικές μεμβράνες που αποτελούν το σκληρό μέρος του ιζήματος απορρίφθηκαν. Οι μεμβράνες που συλλέχθηκαν διαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM TRIS-HCl pH=7.5 που περιείχε 0.5 M NaCl και 0.5 mM EDTA σε τελικό όγκο 300 ml. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0.2% Deoxycholate και μετά την πάροδο 5 λεπτών ομογενοποίηση του διαλύματος. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε και πάλι στις 40000 στροφές/λεπτό, στους 4 °C για δύο ώρες και συλλέχθηκαν οι μεμβράνες ως ίζημα. Η διαλυτοποίηση των μεμβρανών

πραγματοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA σε τελικό όγκο 100 ml με ακόλουθη ομογενοποίηση. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στις μεμβράνες μετά την προετοιμασία τους κυμάνθηκε σε 500-700 mg.

Διαλυτοποίηση μεμβρανών και απομόνωση της πρωτεΐνης

Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση του συστήματος P-50 Gradifac της Pharmacia τοποθετημένο σε δωμάτιο με θερμοκρασία 4 °C, σε συνδιασμό με κολώνες πακεταριζόμενες πριν την χρήση τους με πληρωτικό υλικό της Pharmacia. Η εισαγωγή του δείγματος πραγματοποιήθηκε με την αντλία του συστήματος P-50 Gradifac, και η έκλυση της πρωτεΐνης με την υγρή χρωματογραφία παρακολουθήθηκε με το φασματοφωτόμετρο ορατου/υπεριώδους του συστήματος ρυθμισμένο στα 280 nm.

Για την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες με περιεκτικότητα 500-700 mg πρωτεΐνης. Αρχικά το διάλυμα των μεμβρανών (100 ml σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA) διαλυτοποιήθηκε με 20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl ώστε η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης να κυμανθεί περίπου σε 3 mg/ml. Στο διάλυμα προστέθηκαν κόκκοι Pefabloc ως αναστολέας πρωτεόλυσης ενώ για την διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης προστέθηκε το απορριπαντικό n-dodecyl β-D-maltoside (DM) σε αναλογία 2:1 ως προς την συγκέντρωση πρωτεΐνης. Μετά από ανάδευση για 5 λεπτά το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 40000 στροφές/λεπτό, στους 4 °C για μία ώρα.

Το υπερκείμενο διάλυμα από την φυγοκέντρηση φορτώθηκε σε ανιοανταλλακτική στήλη 150 ml (διαμέτρου 5 cm) Q-Sepharose υψηλής απόδοσης (QSHP) η οποία είχε ήδη εξισορροπηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα (A). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανιοανταλλακτική στήλη ήταν : (A) 20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 0.1 mM EDTA, 0.02% DM και (B) 20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 1 M NaCl, 0.02% DM. Σε αυτό το χρωματογραφικό στάδιο το EDTA προστέθηκε μόνο στο ρυθμιστικό διάλυμα (A) για την αποφυγή παρεμβολής του στο δεύτερο στάδιο, που περιλαμβάνει χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου-ιόντος (IMAC: Immobilized Metal Affinity Chromatography). Η έκλυση από την στήλη QSHP πραγματοποιήθηκε αρχικά με την εφαρμογή διαβάθμισης 0-5% του διαλύματος (B) για 150 ml και στην συνέχεια 5-60% (B) για 800 ml με ροή 10 ml/min. Τα κλάσματα που περιείχαν την αναγωγάση του μονοξειδίου του αζώτου εκλούστηκαν σε συγκέντρωση

NaCl 450 mM, μετά την έκλουση της κυτοχρωμικής οξειδάσης aa_3 . Η καθαρότητα της NOR μετά την πρώτη στήλη είναι ~60%.

Ακολούθησε η συγκέντρωση των κλασμάτων και η εισαγωγή τους στην δεύτερη χρωματογραφική στήλη (Chelating Sepharose Fast Flow) 40 ml (διαμέτρου 2.6 cm), στην οποία είχε πραγματοποιηθεί δέσμευση Cu^{2+} και είχε εξισορροπηθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα (Γ), (20 mM TRIS-HCl pH=7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 mM imidazole, 0.02% DM). Το δεύτερο διάλυμα για την στήλη IMAC (Δ) ήταν το ίδιο με το (Γ) αλλά με συγκέντρωση imidazole 50 mM. Η αρχική διαβάθμιση που εφαρμόστηκε στην στήλη ήταν 0-5% (Δ) για 80 ml, στην συνέχεια κρατήθηκε σταθερό το ποσοστό του (Δ) στο 5% για 400 ml και τέλος εφαρμόστηκε διαβάθμιση 5-50% (Δ) για 200 ml ώστε να εκλουσθεί η NOR. Η ροή της στήλης είχε ρυθμιστεί στα 4 ml/min. Οι περισσότερες πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με την αρχική συγκέντρωση 2.5 mM ιμιδαζολίου, ενώ η NOR εκλούσθηκε με την διαβάθμιση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου ως τα 50 mM. Η καθαρότητα της NOR στο στάδιο αυτό φτάνει το 80% με κύρια πρόσμιξη την οξειδάση aa_3 . Τα κλάσματα που περιείχαν την NOR συγκεντρώθηκαν και αραιώθηκαν 1:1 με το διάλυμα (Α) για την άμεση μείωση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου μεταφέρεται στην τρίτη στήλη.

Η τρίτη χρωματογραφική στήλη με την οποία συνεχίστηκε η απομόνωση της πρωτεΐνης ήταν μία QSHP 20 ml (διαμέτρου 1.6 cm) και τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ίδια με τα (Α) και (Β) με την διαφορά ότι και τα δύο περιείχαν 0.5 mM EDTA. Αφού το δείγμα φορτώθηκε στην στήλη εφαρμόστηκε διαβάθμιση 0-25% (Β) για 20 ml και ακολούθησε διαβάθμιση 25-60% (Β) για 200 ml με ροή 4 ml/min. Η NOR εκλούσθηκε καθαρή σε συγκέντρωση NaCl 400-450 mM. Από την τελευταία ανιοανταλλακτική στήλη Q-Sepharose, η NOR εκλούεται σε καθαρότητα 99% . Η τυπική απόδοση καθαρής NOR είναι περίπου 15 mg από 1 g μεμβρανικής πρωτεΐνης.

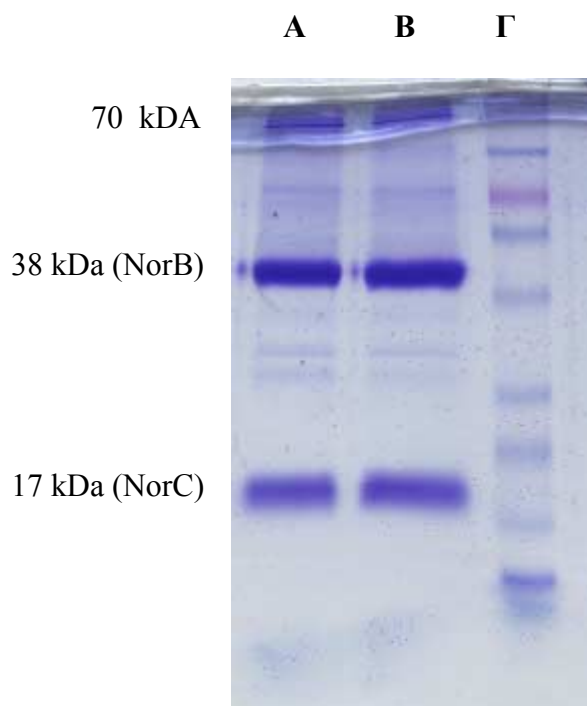
Η NOR συγκεντρώθηκε με φίλτρα 50 kDa σε τελική συγκέντρωση 20 mg/ml και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο.

Ηλεκτροφόρηση gel πολυακριλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση gel πολυακριλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε σε 13.5 % gel πολυακριλαμιδίου στους 6 °C (Laemmli). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προετοιμάστηκαν με την πρόσθεση σταθερής ποσότητας ρυθμιστικού

διαλύματος (50 mM TRIS-HCl pH=6.8, 9 % glycerol, 0.05 % bromophenol blue) που περιείχε 16 % SDS χωρίς αναγωγικό.

Η απομονωμένη NOR αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακά βάρη 38 (NorC) και 17kDa (NorB), όπως φαίνεται στο gel ακρυλαμιδίου όπου στη στήλη A και B αντιστοιχούν σε απομονωμένη NOR και η Γ σε πρωτεΐνες με γνωστό μοριακό βάρος. Δεν εμφανίζονται άλλες μπάντες εκτός μίας ασθενώς ορατής στα περίπου 70 kDa, η οποία πιθανώς οφείλεται σε διμερές της υπομονάδας NorB και γίνεται εντονότερη όταν τα δείγματα θερμανθούν πριν την ηλεκτροφόρηση.



Σχήμα 2: Gel πολυακρυλαμιδίου. Στις στήλες (A) και (B) εμφανίζονται δύο υπομονάδες με μοριακά βάρη 38 (NorC) και 17kDa (NorB) της απομονωμένη NOR, ενώ η ασθενώς ορατή μπάντα στα περίπου 70 kDa, πιθανώς οφείλεται σε διμερές της υπομονάδας NorB. Στην στήλη (Γ) εμφανίζονται πρωτεΐνες με γνωστό μοριακό βάρος.

Βιβλιογραφία

1. Berry, E. A., Trumpower, B.L. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2458-2467.
2. Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B. & Ludwig, B. (1991) *Biophys. J.* **60**, 415-423.
3. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B, & Richter, O.-M. H. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
4. Richter, O.-M. H., Tao, J.-s., Turba, A., Ludwig, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23079-23086.
5. Zichermann, I., Anemuller, S., Richter, O.-M. H., Tautu, O. S., Link, T. A., Ludwig, B. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 93-102.
6. Gerscher, S, Hildebreand, P., Soulimane, T. and Buse, G. (1998) *Biospectroscopy*, **4**, 365-377.
7. Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M. (2001) *FEBS Lett.* **508**, 29-35.
8. de Gier, J.-W. L., Schepper, M., Reijnders, W. N. M., van Dyck, S. J., Slotboom, D. J., Warne, A., Saraste, M., Krab, K., Finel, F., Stouthammer, A. H., van Spanning, R. J. M., and van der Oost, J. (1996) *Mol. Microbiol.* **20**, 1247-1260.
9. Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lubben, M., Saraste, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ο Ρόλος του Δεσμού His-Tyr στις Λειτουργικές Ιδιότητες του Διπυρηνικού Κέντρου στην Κυτοχρωμική c Οξειδάση

Περίληψη

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι συντονισμού Raman και Fourier Transform Infrared χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της απομονωμένης α_3 -τύπου κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης και του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος Y280H από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* σε θερμοκρασία δωματίου. Η Y280 συνδέεται ομοιοπολικά με την His276, που είναι δεσμευμένη στον Cu_B . Η τροποποίηση που ιφίσταται ο Cu_B από την πραγματοποίηση της μετάλλαξης της Y280 σε ιστιδίνη, έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη διατάραξη της φορμυλικής ομάδας της αίμης α_3 . Η σταθερότητα του διπυρηνικού κέντρου από την απουσία του ομοιοπολικής σύνδεσης των δύο αμινοξέων δεν επηρεάζεται, εφόσον η αίμη α_3 διατηρεί το ίδιο εγγύ (proximal) περιβάλλον, αριθμό υποκαταστατών και κατάσταση σπιν όπως το φυσικό κυτόχρωμα τόσο στην οξειδωμένη όσο και την ανηγμένη κατάσταση. Παρατηρούνται δύο δονήσεις τάσης C-O στο CO-σύμπλοκο του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος σε θερμοκρασία δωματίου, μία στους 1966 cm^{-1} και μία στους 1975 cm^{-1} . Η δόνηση στους 1975 cm^{-1} , που εμφανίζεται και στο φάσμα του φυσικού κυτοχρώματος, αποδίδεται στην γ -διαμόρφωση του ενζύμου και αντιπροσωπεύει την δομή του ενεργού κέντρου στην οποία ο Cu_B ασκεί ισχυρή στερική επίδραση στο δεσμευμένο στην αίμη α_3 CO, με αποτέλεσμα την παραμόρφωση της μονάδας Fe-CO. Συνεπώς, ο ρόλος της ομοιοπολικής σύνδεσης έγκειται στην διατήρηση του Cu_B σε συγκεκριμένη διαμόρφωση και απόσταση από την αίμη α_3 . Προτείνουμε ότι στο μεταλλαγμένο κυτόχρωμα Y280H η σύνδεση με την H276 δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, αλλά η κοιλότητα της αίμης διατηρεί την ενεργή της διαμόρφωση, που επιτρέπει την δέσμευση του οξυγόνου στην αίμη α_3 . Οξυγονομένες μορφές του ενζύμου σχηματίζονται από την μίξη του οξυγόνου με το CO-σύμπλοκο του μικτού σθένους φυσικού και μεταλλαγμένου Y280H α_3 κυτοχρώματος, εμφανίζοντας όμοιες Soret μετάβασεις στα 438 nm, και στην συνέχεια τα ένζυμα επανέρχονται στην αρχική οξειδωμένη τους κατάσταση.

Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση (CcO) πραγματοποιεί την σύζευξη της ενός ηλεκτρονίου οξείδωσης του κυτοχρώματος *c* με την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και συνδέει την μεταφορά ηλεκτρονίων με την μετατόπιση πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, ή της βακτηριακής κυτορροπλασματικής μεμβράνης, αντίστοιχα (1-6). Το ένζυμο περιέχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα, δύο αίμες *α* και δύο ομάδες ατόμων χαλκού. Η εισαγωγή ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* στο ομοδιπυρηνικό κέντρο χαλκού, το Cu_A, ακολουθείται από την ενδομοριακή μεταφορά των ηλεκτρονίων, μέσω της χαμηλού σπιν αίμης *α*, στο διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από την υψηλού σπιν αίμη *α*₃ και ένα άτομο Cu_B. Τα δύο τελευταία μεταλλικά κέντρα αποτελούν το ενεργό κέντρο στο οποίο καταλύεται η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Η ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται από τις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων διατηρείται ως ηλεκτροχημική διαβάθμιση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης και τελικά διοχετεύεται στην σύνθεση του ATP.

Η κρυσταλλική δομή της CcO των θηλαστικών (7-9) και του βακτηρίου του εδάφους *Paracoccus denitrificans* (10-11) προσδιορίστηκαν, προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου. Τα δομικά χαρακτηριστικά του διπυρηνικού κέντρου είναι ιδιαίτερης σπουδαιότητας, εφόσον το κέντρο *α*₃/Cu_B αποτελεί την θέση αναγωγής του οξυγόνου, ενώ επίσης θεωρείται και ως το πιθανότερο σημείο στο οποίο δημιουργείται η σύζευξη μεταφοράς ηλεκτρονίων και άντλησης πρωτονίων (2). Μία από τις μοναδικές ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου που καθορίστηκαν από την κρυσταλλική δομή είναι ο ομοιοπολικός δεσμός της τυροσίνης 280 με ένα από τους τρεις υποκαταστάτες του Cu_B, και συγκεκριμένα την H276. (Αν δεν αναφέρεται κάτι διαφορετικό, η αρίθμηση που ακολουθείται είναι αυτή του *P. denitrificans*.) Η συγκεκριμένη τυροσίνη, που βρίσκεται στο τέλος του K-καναλιού, παρουσιάζει υψηλό ποσοστό διατήρησης στις αιμοχαλκοξειδάσες και μετά την αποκάλυψη της ομοιοπολικής της σύνδεσης με την H276 έχει προταθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό δομικό και λειτουργικό ρόλο. Με βάση τις ιδιότητες του μεταλλαγμένου Y→F κυτοχρώματος από το βακτήριο *Rh. sphaeroides*, που αναλύθηκαν με φασματοσκοπία συντονισμού Raman (RR), ο Rousseau και οι συνεργάτες του (12) υποστήριξαν ότι η ομοιοπολική σύνδεση τυροσίνης-ιστιδίνης σταθεροποιεί το διπυρηνικό κέντρο. Πρότειναν ότι απουσία της σύνδεσης His-Tyr, μία από τις ιστιδίνες που αποτελούν τους υποκαταστάτες του Cu_B συναρμόζεται στην αίμη *α*₃, προκαλώντας ισχυρή διατάραξη της δομής του διπυρηνικού κέντρου και καθιστώντας τελικά το ένζυμο ανενεργό. Η ανάλυση

της κρυσταλλικής δομής της CcO από καρδιά βοδιού από τον Yoshikawa και συνεργάτες του (9) αποτέλεσε την βάση για την πρόταση ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την μεταφορά ενός πρωτονίου από την συγκεκριμένη τυροσίνη στο $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^-$ για τον σχηματισμό υδροπεροξυ παραγώγου και στην συνέχεια την μεταφορά ηλεκτρονίου από τον Cu_B^{1+} μέσω της σύνδεσης των αμινοξέων για την σχάση του δεσμού O-O. Επιπλέον, άλλες ομάδες έχουν προτείνει ότι η τυροσίνη αποτελεί δότη ενός ατόμου υδρογόνου κατά την αντίδραση κυτοχρωμικής οξειδάσης/ O_2 (3,6,11,13). Σε πρόσφατη μελέτη ο Babcock και συνεργάτες του (14) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Y280 είναι πηγή του πρωτονίου αλλά και του ηλεκτρονίου που απαιτούνται για την διάσπαση του δεσμού O-O, και ο Michel και συναργάτες του (15) υποστήριξαν ότι το EPR σήμα που κατέγραψαν κατά την αντίδραση $\text{aa}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (*P. denitrificans*) είχε ως προέλευση την ομοιοπολικά συνδεμένη τυροσίνη.

Σημαντικές πληροφορίες για το κέντρο αίμης/ Cu_B έχουν αντληθεί από μελέτες των CO-συμπλόκων (16-28). Οι πληροφορίες αυτές δεν περιορίζονται στην αποκάλυψη της ηλεκτρονιακής και στερικής φύση της κοιλότητας της αίμης, αλλά μελέτες τις φωτοδιάσπασης του CO αποτελούν ισχυρά εργαλεία για την μελέτη της δυναμικής και της χημείας συναρμογής του κέντρου αίμης/ Cu_B , που ακολουθεί μετά την φωτόλυση του μονοξειδίου του άνθρακα (29-34). Η φασματοσκοπία RR έχει εφαρμοστεί με ιδιαίτερη επιτυχία στην μελέτη των τελικών οξειδασών, εφόσον δίνει την δυνατότητα μελέτης των δονήσεων των αιμών χωρίς την παρεμβολή της πρωτεϊνικής μήτρας, καθιστώντας έτσι δυνατή την αναγνώριση της οξειδωτικής κατάστασης, της συναρμογή και της κατάσταση σπιν τους μέσω καθιερωμένων δονήσεων (35-41). Τόσο η RR όσο και η FTIR φασματοσκοπίες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό των CO-συμπλόκων τελικών οξειδασών. Οι συχνότητες δόνησης της μονάδας FeCO που προκύπτουν από τις δύο προαναφερθείσες φασματοσκοπικές μεθόδους έχουν καταγραφεί για διαφορετικού τύπου αιμοχαλκοξειδάσες, αποκαλύπτοντας διαφορετικές διαμορφώσεις του ενεργού κέντρου (16-23). Οι δύο κυριότερες διαμορφώσεις χαρακτηρίζονται ως α και β μορφές και παρά το γεγονός ότι η προέλευση όπως και η λειτουργική τους σημασία δεν έχουν διευκρινιστεί, έχει δειχθεί ότι στην α μορφή οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ δεν ανήκουν στην ευθεία που καθορίζει η αντίστροφη σχέση των δύο δονήσεων σε πρωτεΐνες με αξονική υποκατάσταση ιστιδίνης. Σε αντίθεση στην β μορφή οι συχνότητες συμπίπτουν στην ευθεία (17,22-28). Πρόσφατη μελέτη αλλαγών της διαμόρφωσης του διπυρηνικού κέντρου συναρτήσε του pH, οδήγησε στην πρόταση ότι οι διαφορετικές διαμορφώσεις είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της θέσης του Cu_B σε σχέση με το CO εξαιτίας της παρουσίας μίας ή περισσοτέρων ιονιζόμενων ομάδων (23). Επιπλέον, οι ομάδες που υποστηρίχθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι είναι η διατηρημένη

τυροσίνη που σχηματίζει τον ομοιοπολικό δεσμό με τον ένα υποκαταστάτη του Cu_B και βρίσκεται κοντά στην θέση δέσμευσης του οξυγόνου, όπως επίσης και ένας από τους υποκαταστάτες του χαλκού.

Σε μία προσπάθεια να αντλήσουμε επιπλέον πληροφορίες για τον ρόλο της Y280 στην καταλυτική λειτουργία της CcO, πραγματοποιήσαμε τον χαρακτηρισμό της φυσικής και μεταλλαγμένης Y280H CcO από το *P. denitrificans* στην οξειδωμένη και ανηγμένη κατάσταση όπως και το CO-σύμπλοκο με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού, RR και FTIR. Η μελέτη αυτή αποδεικνύει ότι η τροποποίηση που υφίσταται ο Cu_B από την πραγματοποίηση της μετάλλαξης της Y280 σε ιστιδίνη, έχει ως αποτέλεσμα την περιορισμένη διατάραξη της φορμυλικής ομάδας της αίμης α₃. Συνεπώς ο ρόλος του ομοιοπολικού δεσμού δεν είναι η αποτροπή της δέσμευσης της H276 (His240 από καρδιά βοδιού και His288 από το *R. sphaeroides*) στον Cu_B παρά στην αίμη, όπως είχε προηγούμενα υποστηριχθεί (12), αλλά να σταθεροποιεί τον Cu_B σε συγκεκριμένη διαμόρφωση και απόσταση ως προς την αίμη α₃. Απουσία της ομοιοπολικής σύνδεσης Y280 και H276, η κοιλότητα της αίμης διατηρεί την ενεργή της διαμόρφωση που επιτρέπει την δέσμευση του O₂ στην αίμη α₃. Η απευθείας ανάμιξη του O₂ με το CO-σύμπλοκο του μικτού σθένους φυσικού και μεταλλαγμένου ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό οξυγονομένων μορφών του ενζύμου που εμφανίζουν όμοιες Soret μετάβασεις στα 438 nm, και στην συνέχεια τα ένζυμα επανέρχονται στην αρχική οξειδωμένη τους κατάσταση.

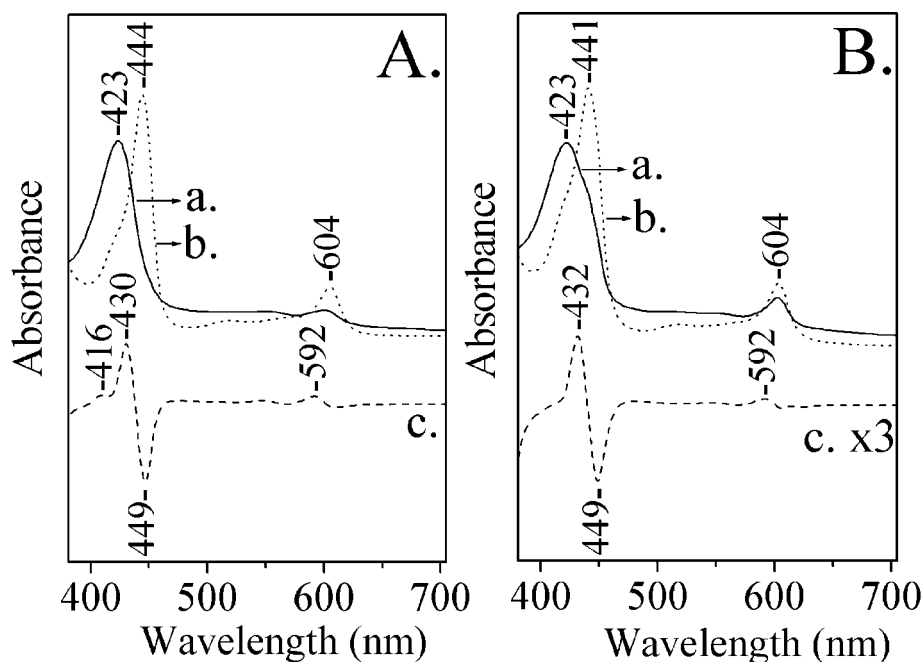
Πειραματικές Διαδικασίες

Η φυσική και μεταλλαγμένη CcO απομονώθηκαν από το βακτήριο *P. denitrificans* όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 και σύμφωνα με δημοσιευμένες διαδικασίες (42,43). Η CcO των θηλαστικών απομονώθηκε από βοδινές καρδιές (44). Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν σε 100-150 μM σε 50 mM HEPES pH 7.4 που περιείχε 0.1 % dodecyl β-D-maltoside και διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο ως την χρήση τους. Το σύμπλοκο της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης με το CO προετοιμάστηκε με την αναερόβια έκθεση του ανηγμένου με dithionite ενζύμου σε αέριο CO. Το μικτού σθένους σύμπλοκο του ενζύμου με το CO σχηματίστηκε μετά την έκθεση της οξειδωμένης μορφής της οξειδάσης σε αέριο CO για διάστημα 10 ωρών. Για την λήψη των RR φασμάτων χρησιμοποιήθηκε τριπλός μονοχρωμάτορας SPEX 1877 και EG&G (model 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτής. Το μήκος κύματος διέγερσης στα 413.1 nm αντλήθηκε από ένα Coherent Innova K-90 laser κρυπού, και η 431 nm διέγερση από ένα

Coherent 590 dye laser συνδεδεμένο με το Coherent Innova 200 laser αργού. Η ενέργεια πάνω στο δείγμα ήταν 4-6 mW. Τα FTIR φάσματα ελήφθησαν από δείγματα συγκέντρωσης 200-300 μM με φασματοφωτόμετρο FTIR Bruker Equinox 55 εξοπλισμένο με ανιχνευτή MCT που ψύχεται με υγρό άζωτο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αναερόβια σε κυψελίδα με παράθυρα CaF_2 και 0.025 mm πάχος δείγματος. Τα φάσματα είναι μέσος όρος 1000 σαρώσεων και ως φάσμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα. Η διακριτικότητα για τις FTIR μετρήσεις είναι 2 cm^{-1} και 4 cm^{-1} για το CO-φάσμα του φυσικού και μεταλλαγμένου ενζύμου, αντίστοιχα. Φάσματα απορρόφησης ορατού των δειγμάτων καταγράφηκαν πριν και μετά τις FTIR και Raman μετρήσεις για την πιστοποίηση της σταθερότητας των δειγμάτων με ένα φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους Perkin-Elmer Lambda 20.

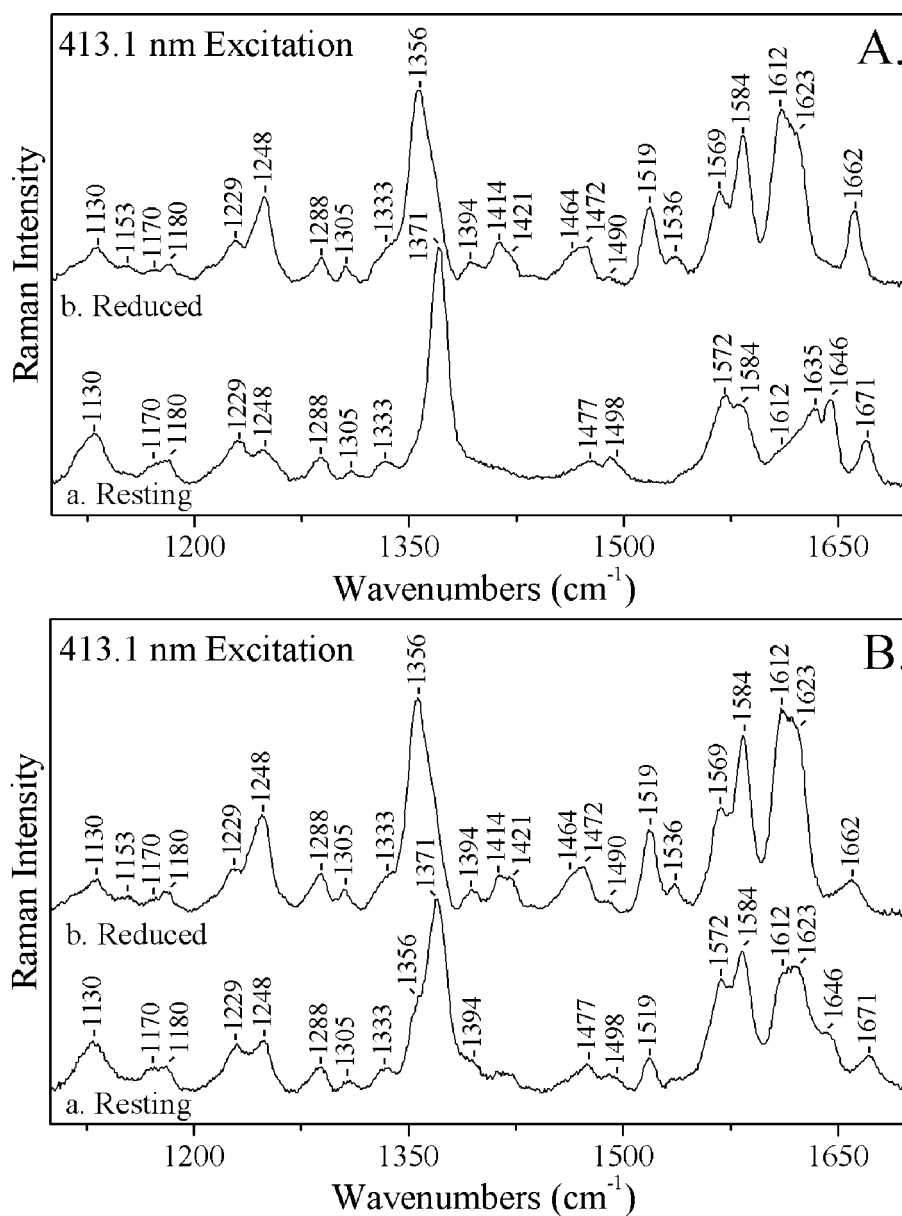
Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα φάσματα απορρόφησης ορατού του κυτοχρώματος a_3 από το *P. denitrificans* παρουσιάζουν μέγιστα στα 423 και 598 nm στην μορφή στην οποία απομονώνεται (Σχήμα 1A, φάσμα a) και στα 444 και 605 nm στην πλήρως ανηγμένη του κατάσταση (Σχήμα 1A, φάσμα b). Το φάσμα διαφοράς του CO-συμπλόκου μείον το ανηγμένο ένζυμο εμφανίζει μία θετική μετάβαση στα 430 nm με ώμο στα 416 nm και αρνητική κορυφή στα 449 nm (Σχήμα 1A, φάσμα c). Το φάσμα ορατού του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος Y280H, στην κατάσταση που απομονώνεται, απεικονίζεται στο σχήμα 1B (φάσμα a) και παρουσιάζει στην περιοχή της Soret μετάβασης επιπλέον του 423 nm μεγίστου και ένα ώμο στα 441 nm, όπως επίσης και αυξημένη ένταση στα 604 nm. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό της αίμης α (~ 30%) βρίσκεται στην ανηγμένη κατάσταση στην μεταλλαγμένη οξειδάση. Μετά την προσθήκη dithionite στο κυτόχρωμα Y280H (Σχήμα 1B, φάσμα b) οι μεταβάσεις του εμφανίζονται στα 441 και 604 nm, σε συμφωνία με το φυσικό ένζυμο. Το φάσμα διαφοράς του CO-συμπλόκου μείον το ανηγμένο Y280H είναι χαρακτηριστικό της δέσμευσης του CO στην αίμη α_3 , όπως αποδεικνύεται από τις μεταβάσεις στα 432 και 592 nm (Σχήμα 1B, φάσμα c).



Σχήμα 1. Φάσματα απορρόφησης ορατού του φυσικού κυτοχρώματος α_3 από το *P. denitrificans* (πίνακας A) και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου (πίνακας B) στην μορφή που απομονώνονται (φάσμα a, συνεχόμενη γραμμή) και στην ανηγμένη με dithionite μορφή (φάσμα b, γραμμή με κουκίδες). Στους δύο πίνακες συμπεριλαμβάνονται τα φάσματα διαφοράς (φάσματα c) του ανηγμένου CO-συμπλόκου μείον το πλήρως ανηγμένο ένζυμο, που δηλώνουν την δέσμευση του CO στην αίμη α_3 . Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν 10 μM και το μήκος της κυψελίδας 0.5 cm.

Τα φάσματα συντονισμού Raman στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων, του φυσικού κυτοχρώματος α_3 στην μορφή που απομονώνεται, καθώς επίσης και την πλήρως ανηγμένη του μορφή απεικονίζονται στο σχήμα 2A (φάσμα a και b αντίστοιχα) και βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που έχουν αναφερθεί για τις αιμοχαλκοξειδάσες (35-37,39-40). Στο φάσμα του ενζύμου στην μορφή που απομονώνεται, η δόνηση που αποτελεί χαρακτηριστικό της οξειδωτικής κατάστασης των αιμών, ν_4 , παρουσιάζεται στους 1371 cm^{-1} πιστοποιώντας ότι και οι δύο αίμες βρίσκονται στην πλήρως οξειδωμένη τους κατάσταση. Οι κορυφές στους 1477 και 1498 cm^{-1} προέρχονται από την ν_3 της υψηλού σπιν αίμης α_3 και της χαμηλού σπιν αίμης α , αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο αίμες διατηρούν αριθμό συναρμογής έξι. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα στοιχεία της κρυσταλλοδομής που δείχνουν ότι στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου η αίμη α



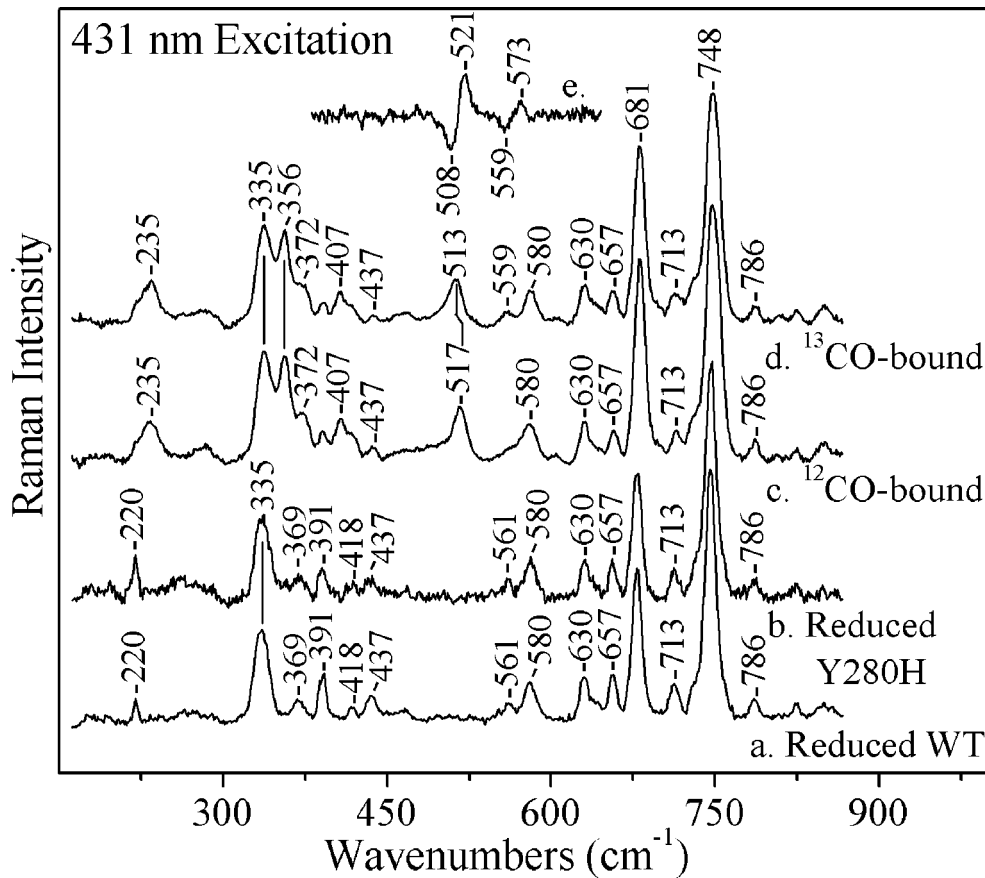
Σχήμα 2. Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του φυσικού κυτοχρώματος αα₃ από το *P. denitrificans* (πίνακας Α) και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου (πίνακας Β) στην μορφή που απομονώνονται (φάσμα α) και στην ανηγμένη με dithionite μορφή (φάσμα β). Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm, και ο συνολικός χρόνος λήψης του κάθε φάσματος 15 min.

συναρμόζεται από δύο ιστιδίνες ενώ υπάρχει και ένας υποκαταστάτης γέφυρας ανάμεσα στην αίμη α₃ και τον Cu_B (10-11). Η περιοχή στην οποία εμφανίζονται δονήσεις σχετικές με το μέγεθος του πυρήνα της αίμης παρουσιάζει δύο κορυφές στους 1572 cm⁻¹ (υψηλού σπιν αίμη α₃³⁺) και 1584 cm⁻¹ (χαμηλού σπιν αίμη α³⁺). Οι 1612 και 1635 cm⁻¹ δονήσεις

προέρχονται από τις ν_{10} των αιμών α_3^{3+} και α^{3+} , αντίστοιχα. Οι κορυφές στους 1646 και 1671 cm^{-1} έχουν αποδοθεί στην δόνηση τάσης C=O των φορμυλικών ομάδων (-CHO) των α^{3+} και α_3^{3+} (39-40). Το φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (Σχήμα 1A, φάσμα b) εμφανίζει την χαρακτηριστική για την οξειδωτική κατάσταση δόνηση, ν_4 , στους 1359 cm^{-1} πιστοποιώντας ότι οι δύο αίμες έχουν αναχθεί. Οι δονήσεις στους 1464 και 1490 cm^{-1} δημιουργούνται από την ανηγμένη αίμη αριθμού συναρμογής πέντε και υψηλού σπιν (5chs) α_3^{2+} και από την ανηγμένη αίμη αριθμού συναρμογής έξι και χαμηλού σπιν α^{2+} (6cls), αντίστοιχα. Η κορυφή στους 1519 cm^{-1} προέρχεται από την ν_{19} της αίμης α^{2+} και οι δονήσεις στους 1569 και 1584 cm^{-1} από τις ν_2 των αιμών α_3^{3+} και α^{3+} , αντίστοιχα. Οι δονήσεις στους 1612 και 1662 cm^{-1} έχουν αποδοθεί στην δόνηση τάσης C=O των φορμυλικών ομάδων (-CHO) των α^{2+} και α_3^{2+} (35,40). Η κορυφή στους 1623 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης C=C της αίμης α^{2+} και α_3^{2+} . Οι διαταραχές που προκαλούνται στο φάσμα του ενζύμου από την μετάλλαξη Y280H, στην μορφή που απομονώνεται το ένζυμο, είναι πολύ περιορισμένες εκτός από την μείωση των εντάσεων των δονήσεων που προέρχονται από την αίμη α^{3+} και την εμφάνιση δονήσεων που οφείλονται σε ποσοστό της αίμης α που βρίσκεται στην ανηγμένη κατάσταση (Σχήμα 2B, φάσμα a). Η ύπαρξη της ανηγμένης α^{2+} είναι προφανής από την αύξηση της έντασης των ν_4 στους 1356, ν_{11} στους 1519, ν_2 στους 1585, ν_{10} στους 1612 cm^{-1} , όπως επίσης και από την μείωση της έντασης της δόνησης φορμυλικής ομάδας στους 1646 cm^{-1} . Όλες οι δονήσεις που σχετίζονται με την υψηλού σπιν αίμη α_3^{3+} είναι όμοιες με αυτές του φυσικού ενζύμου. Η μόνη εξαίρεση είναι η μείωση της έντασης της δόνησης τάσης της φορμυλικής ομάδας στους 1671 cm^{-1} . Το RR φάσμα του του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος Y280H (Σχήμα 2B, φάσμα b) είναι όμοιο με αυτό του ανηγμένου φυσικού ενζύμου και πάλι με εξαίρεση την δόνηση της φορμυλικής ομάδας της αίμης α_3^{2+} στους 1662 cm^{-1} , που παρουσιάζει μειωμένη ένταση.

Ασυνήθιστες στερεοχημικές επιδράσεις στην αίμη α_3 που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μεταβολές στην θέση δέσμευσης υποκαταστατών στην αίμη δεν υπάρχουν, και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της αίμης α_3 δεν έχει μειωθεί κάτω από το αντίστοιχο του κυτοχρώματος *c* (12). Επιπλέον, δεν εμφανίζονται στοιχεία που να οδηγούν στο συμπέρασμα της αποδέσμευσης κάποιας ιστιδίνης από τον Cu_B και της ακόλουθης δέσμευσης της στην αίμη α_3 . Συνεπώς τα δεδομένα μας δεν στηρίζουν τα συμπεράσματα του Das *et al.* (12), ότι η απουσία του ομοιοπολικού δεσμού Y288 και H284 (αρίθμηση σύμφωνα με το *R. Sphaeroides*) προκαλεί σοβαρή διαταραχή στην κοιλότητα της αίμης α_3 , και μία από τις ιστιδίνες του Cu_B δεσμεύεται στην αίμη μειώνοντας το οξειδοαναγωγικό δυναμικό της. Η διαφοροποίηση των πειραματικών δεδομένων της ομάδας μας και αυτών του Das *et al.* (12)

πιθανώς να προέρχεται από τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζει η μετάλλαξη της ιστιδίνης 280 σε φαινυλαλανίνη τις ιδιότητες συναρμογής του διπυρηνικού κέντρου.



Σχήμα 3. Τα φάσματα συντονισμού Raman της πλήρως ανηγμένης μορφής του φυσικού κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* (φάσμα a) και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου (φάσμα b) στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Απεικονίζονται επίσης τα ^{12}CO και ^{13}CO σύμπλοκα του φυσικού ενζύμου στα φάσματα c και d, αντίστοιχα. Το φάσμα διαφοράς $^{12}\text{CO} - ^{13}\text{CO}$ εμφανίζεται στο φάσμα e. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm, και ο συνολικός χρόνος λήψης του κάθε φάσματος 20 min.

Το σχήμα 3 απεικονίζει την περιοχή χαμηλών συχνοτήτων του RR φάσματος του πλήρως ανηγμένου φυσικού και μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου, όπως επίσης και του CO-συμπλόκου του φυσικού κυτοχρώματος aa_3 . Το RR φάσμα του πλήρως ανηγμένου φυσικού ενζύμου (φάσμα a) χαρακτηρίζεται από την παρουσία της δόνησης τάσης Fe-His στους 220 cm^{-1} και δονήσεων του πορφυρινικού δακτυλίου τόσο της αίμης α όσο και της αίμης α_3 . Όμοιο είναι το φάσμα του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος aa_3 (φάσμα b). Η δόνηση

τάσης Fe-His παρουσιάζεται 6 cm^{-1} υψηλότερα σε σχέση με την αντίστοιχη της CeO των θηλαστικών (36). Η δέσμευση του CO στην αίμη α_3^{2+} συνοδεύεται από την εξαφάνιση της δόνηση τάσης Fe-His στους 220 cm^{-1} και της πορφυρινικής δόνησης στους 369 cm^{-1} (φάσμα c). Στην περιοχή 400-600 cm^{-1} του RR φάσματος του CO-συμπλόκου εμφανίζεται μόνο μία κορυφή στους 517 cm^{-1} για την $\nu(\text{Fe-CO})$. Η απόδοση της δόνησης αυτής επιβεβαιώνεται με την επανάληψη του πειράματος με ισοτοπικά εμπλουτισμένο υποκαταστάτη (^{13}CO , φάσμα d), όπου η αντίστοιχη κορυφή παρουσιάζεται στους 513 cm^{-1} , τιμή που είναι σύμφωνη με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή για διατομικό σύστημα σιδήρου και CO. Το φάσμα διαφοράς (φάσμα e) επίσης συνηγορεί με την απόδοση της δόνησης. Στο φάσμα του ^{13}CO -συμπλόκου ανιχνεύεται μία ακόμα κορυφή στους 559 cm^{-1} . Παρά το γεγονός ότι η παρουσία μιας δόνησης του πορφυρινικού δακτυλίου στους $\sim 580 \text{ cm}^{-1}$ παρεμποδίζει την απόδοση δονήσεων με το ^{12}CO στην περιοχή αυτή, το φάσμα διαφοράς δείχνει ότι η δόνηση στους 559 cm^{-1} του ^{13}CO φάσματος μετατοπίζεται στους 573 cm^{-1} όταν το πείραμα πραγματοποιείται με ^{12}CO . Με βάση τα παραπάνω, αποδίδουμε την κορυφή στους 573 cm^{-1} στην δόνηση κάμψης Fe-C-O. Οι συχνότητες των 517 και 573 cm^{-1} βρίσκονται κοντά στις αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί για την aa_3 -τύπου οξειδάση από βοδινή καρδιά (16), το *R. sphaeroides* (17) και το aa_3 -600 από το *B. subtilis* (21).

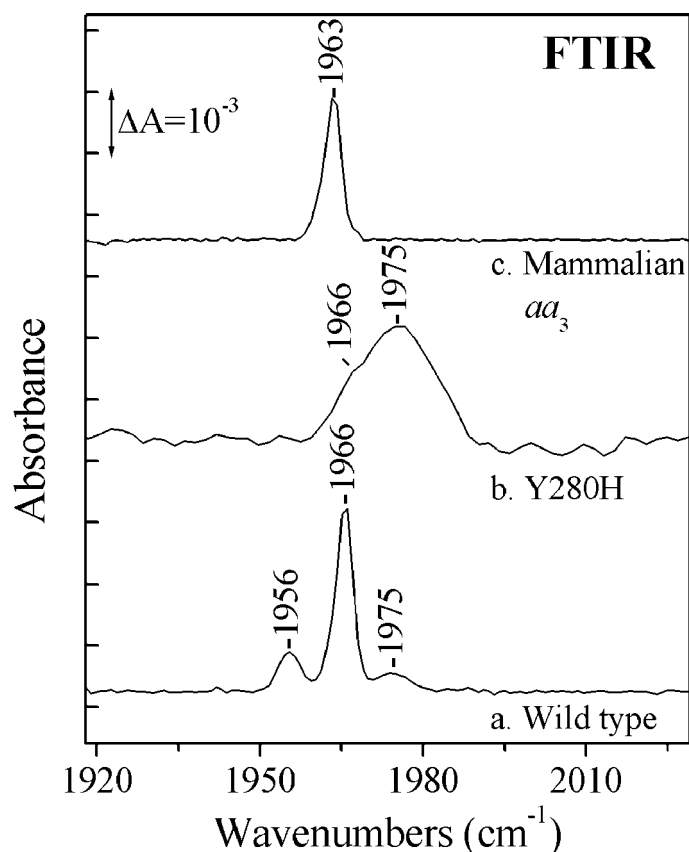
Η αυξημένη συχνότητα της δόνησης τάσης Fe-His που παρατηρήσαμε στο κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans* μπορεί να αποδοθεί στην ισχύ του δεσμού υδρογόνου του εγγούς υποκαταστάτη His411 με την Gly387 (41). Μελέτες ενώσεων-μοντέλων, έχουν αποδείξει ότι το σύμπλοκο με τον ασθενέστερο (ή απών) δεσμό υδρογόνου με την εγγύ ιστιδίνη αναμένεται να παρουσιάζει και τον ασθενέστερο δεσμό Fe-His και κατά συνέπεια και την χαμηλότερη συχνότητα δόνησης του δεσμού (36). Η ανίχνευση της δόνησης Fe-His στους 220 cm^{-1} σε συνδιασμό με τα δεδομένα της υψηλής περιοχής συχνοτήτων του RR φάσματος υποστηρίζουν το συμπέρασμά μας ότι η αίμη α_3^{2+} στο μεταλλαγμένο Y280H κυτόχρωμα διαθέτει αριθμό συναρμογής πέντε και είναι υψηλού σπιν, αλλά και το εγγύ περιβάλλον της αίμης α_3^{2+} δεν παρουσιάζει διαφοροποιήσεις σε σχέση με το φυσικό ένζυμο. Εφόσον λοιπόν, ο δεσμός Fe-His αποτελεί την μόνη σύνδεση ανάμεσα στην αριθμού συναρμογής πέντε αίμης α_3^{2+} και στην πρωτεΐνη, πιθανές δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης θα πρέπει να εμφανίζονται μέσω αυτού του δεσμού. Η απουσία τέτοιων μεταβολών στο εγγύ περιβάλλον της αίμης α_3^{2+} δηλώνει, ότι οι μεταβολές στην δομή της πρωτεΐνης λόγω της μετάλλαξης δεν είναι καθολικές, αλλά περιορίζονται στο περιβάλλον του Cu_B .

Δομικές πληροφορίες, σχετικές με την γεωμετρία του δεσμευμένου στην αίμη CO και την αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη με τον Cu_B , έχουν προσδιοριστεί από τις δονήσεις του

CO. Παρά το γεγονός ότι οι $\nu(\text{Fe-CO})$ and $\delta(\text{Fe-C-O})$ που προσδιορίσαμε είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί για τις aa_3 -τύπου οξειδάσες, ο λόγος $I_\delta/I_\nu \sim 0.25$ που παρατηρούμε, είναι μικρότερος σε σχέση με το aa_3 από το *R. sphaeroides* ($I_\delta/I_\nu \sim 0.43$) και μεγαλύτερος από αυτόν του κυτοχρώματος bo_3 ($I_\delta/I_\nu \sim 0.1$) (20). Έχει υποστηριχθεί ότι ένας υψηλός λόγος I_δ/I_ν αποτελεί ένδειξη για την ύπαρξη ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ του CO και του Cu_B . Συνεπώς, τα δεδομένα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η απόσταση $\text{Fe} \dots \text{Cu}_B$ είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* σε σύγκριση με την CcO του *R. sphaeroides*. Παρά την αυξημένη απόσταση όμως, δεν παρατηρήσαμε ένα χαμηλής ενέργειας δεσμό Fe-CO ($\sim 490 \text{ cm}^{-1}$), αντίστοιχο του υψηλής ενέργειας δεσμού C-O ($\sim 1950 \text{ cm}^{-1}$) της β-διαμόρφωσης. Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι οι δύο διαφορετικές δονήσεις Fe-CO που εμφανίζονται στα RR φάσματα του *R. sphaeroides* είναι αποτέλεσμα της αλλαγής της θέσης του Cu_B σχετικά με το CO, εξαιτίας της παρουσίας μίας ή περισσοτέρων ιονιζόμενων ομάδων κοντά στο διπυρηνικό κέντρο (23). Πειράματα για την διερεύνηση της ισχύς της υπόθεσης αυτής στο κυτόχρωμα aa_3 του *P. denitrificans* βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας.

Το σχήμα 4 απεικονίζει τα FTIR φάσματα του CO-συμπλόκου του φυσικού και Y280H μεταλλαγμένου κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* σε θερμοκρασία δωματίου. Το CO-σύμπλοκο του πλήρως ανηγμένου ενζύμου των θηλαστικών περιλαμβάνεται στο σχήμα για σύγκριση (φάσμα c). Το φάσμα a δείχνει ότι η δόνηση τάσης του δεσμευμένου CO στο *P. denitrificans* aa_3 διαχωρίζεται σε τρεις κορυφές, όπως έχει αναφερθεί και σε πειράματα σε χαμηλές θερμοκρασίες (27). Η κύρια κορυφή παρουσιάζεται στους 1966 cm^{-1} (α-διαμόρφωση) και οι δύο μικρότερες στους 1956 cm^{-1} (β-διαμόρφωση) και 1975 cm^{-1} . Η συχνότητα της κύριας δόνησης που ανιχνεύσαμε στο *P. denitrificans* είναι μεγαλύτερη κατά 3 cm^{-1} από την αντίστοιχη του δεσμευμένου στην αίμη a_3 CO της CcO των θηλαστικών (φάσμα c). Το φάσμα b απεικονίζει τις δύο διαμορφώσεις που παρουσιάζονται στο μεταλλαγμένο Y280H κυτόχρωμα με την $\nu(\text{CO})$ στους 1966 και 1975 cm^{-1} . Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί και σε πειράματα σε χαμηλές θερμοκρασίες (P. Hellwig, manuscript submitted).

Η βάση πάνω στην οποία θα μπορούσε να ερμηνευθεί ο διαχωρισμός του ενζύμου σε α- και β-μορφή δεν έχει καθοριστεί, ενώ επίσης δεν έχει αναφερθεί η προέλευση της 1975 cm^{-1} . Το εύρος (στη μέση του μεγίστου της δόνησης, FWHM) των δονήσεων των κύριων διαμορφώσεων του CO στα δύο ένζυμα, *P. denitrificans* και CcO θηλαστικών, είναι $\sim 5 \text{ cm}^{-1}$



Σχήμα 4. Τα FTIR φάσματα του πλήρως ανηγγμένου CO-συμπλόκου του του φυσικού κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* (φάσμα a) και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου (φάσμα b).

Περιλαμβάνεται επίσης το CO-σύμπλοκο του κυτοχρώματος aa_3 των θηλαστικών (φάσμα c).

δείχνοντας ότι δεν παρατηρείται ευρεία κατανομή των επιτρεπτόν στο CO διαμορφώσεων. Κατά συνέπεια, τα παρών δεδομένα επιβεβαιώνουν την ομοιότητα στις ιδιότητες της ενεργής θέσης των δύο τελικών οξειδασών. Η παρουσία, όμως, των δονήσεων στους 1956 και 1975 cm^{-1} στο *P. denitrificans* δηλώνει ότι αν και το διπυρηνικό κέντρο του βακτηριακού ενζύμου είναι όμοιο με αυτό των θηλαστικών, ωστόσο δεν είναι το ίδιο. Η αλληλομετατροπή των α- και β-μορφών εξαρτάται από το pH και έχει αποδοθεί σε αλλαγές της απόστασης σιδήρου-χαλκού. Έχει επίσης δειχθεί από δεδομένα FTIR πειραμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες, ότι το εύρος των δονήσεων που αντιστοιχούν στις α- και β-διαμορφώσεις εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και το pH (27). Συνεπώς, η α-μορφή αντιπροσωπεύει μία περιορισμένη κολότητα που δεν επιτρέπει στο CO να δεσμευτεί στον αιμικό σίδηρο χωρίς να δέχεται ισχυρές πολικές ή στερικές επιδράσεις από το άτομο του χαλκού, ενώ στη β-μορφή ο Cu_B έχει απομακρυνθεί από τον δεσμευμένο CO-υποκαταστάτη. Με βάση την παραπάνω ερμηνεία σχετικά με την προέλευση των α- και β-διαμορφώσεων, αποδίδουμε την δόνηση στους 1975 cm^{-1} στην γ-διαμόρφωση. Στην διαμόρφωση αυτή ο Cu_B βρίσκεται ακόμα πλησιέστερα προς το δεσμευμένο στην αίμη aa_3 CO, διαστρεβλώνοντας την ομάδα του Fe-C-O από την ευνοούμενη συμμετρία της α-μορφής. Σε αντίθεση με το φυσικό ένζυμο, που

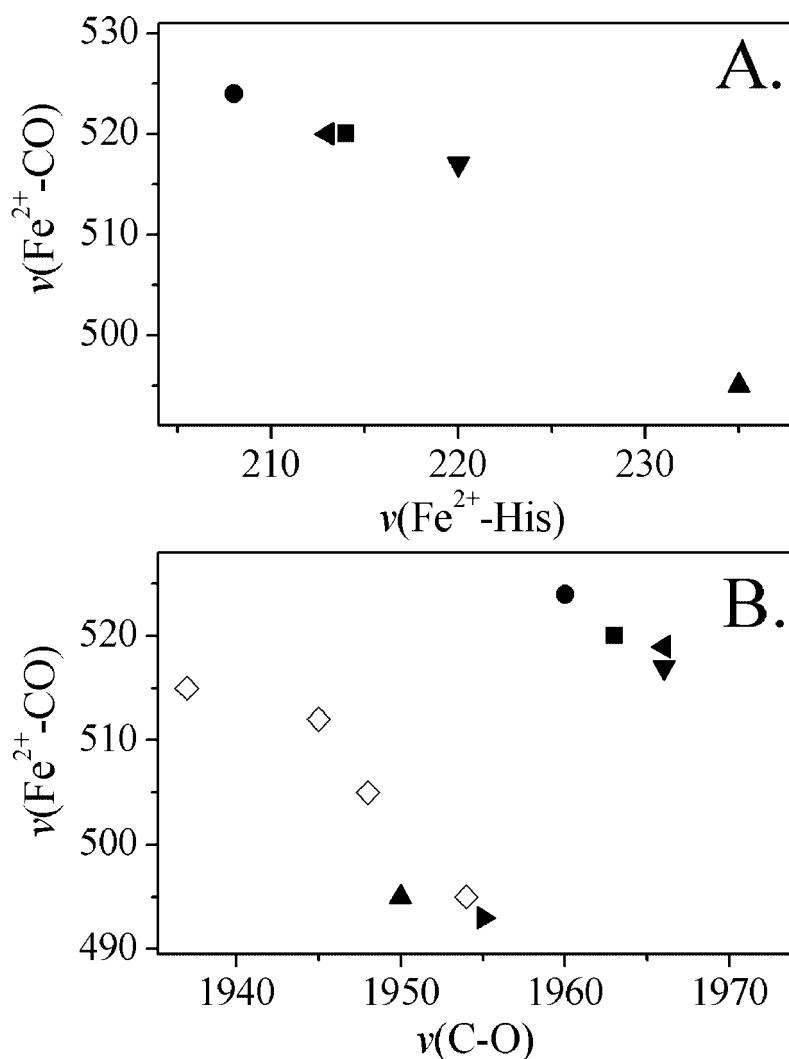
κυρίαρχη είναι η α-διαμόρφωση, το μεταλλαγμένο Y280H κυτόχρωμα aa_3 παρουσιάζει λόγο 1975 cm^{-1} (γ-μορφή)/ 1966 cm^{-1} (α-μορφή) 1.8 και άρα κυρίαρχη είναι η γ-διαμόρφωση. Κατά συνέπεια η απουσία του ομοιοπολικού δεσμού Tyr-His έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση του ατόμου του Cu_B πλησιέστερα προς το δεσμευμένο στην αίμη CO. Το συμπέρασμα αυτό στηρίζεται επίσης από την απουσία της β-διαμόρφωσης (1956 cm^{-1}) στο μεταλλαγμένο ένζυμο, μορφή στην οποία το CO δεν δέχεται πολικές ή στερικές επιδράσεις. Το ερώτημα που είναι αναγκαίο να τεθεί αφορά την αιτία της αλλαγής του λόγου των τριών διαμορφώσεων και το αποτέλεσμα που μπορεί να επιφέρει στην καταλυτική δράση του ενζύμου.

Μελέτες του Rousseau *et al.* (12,16-18,20) έχουν αποδείξει ότι οι συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{CO})$ των αιμοπρωτεϊνών και η συσχέτιση τους αντικατοπτρίζουν α) την ταυτότητα και ιδιότητες του εγγούς υποκαταστάτη εξαιτίας του ανταγωνισμού του δεσμευμένου CO με τον εγγύ υποκαταστάτη για τα ίδια d_z^2 τροχιακά και β) την πολικότητα της κοιλότητας της αίμης. Ένα ισχυρά πολικό περιβάλλον ευνοεί τον π-δεσμό επαναφοράς με αποτέλεσμα την αύξηση της $\nu(\text{Fe-CO})$ και την μείωση της $\nu(\text{C-O})$ λόγω της αυξημένης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα αντιδεσμικά τροχιακά του CO. Επιπλέον, πληροφορίες για τις ιδιότητες του εγγούς περιβάλλοντος των αιμοχαλκοξειδασών και του τρόπου με τον οποίο επηρεάζουν την δέσμευση υποκαταστατών στη μακρινή (distal) θέση δέσμευσης, έχουν αντληθεί από την αντίστροφη ευθεία συσχέτιση ανάμεσα στις συχνότητες των δονήσεων τάσης Fe-His και Fe-CO. Πρόσφατη μελέτη απέδειξε ότι η ισχύς του δεσμού υδρογόνου της εγγύς ιστιδίνης επηρεάζει την ισχύ των δεσμών Fe-C και C-O, που επιπλέον επηρεάζονται και από το μακρινό περιβάλλον του Cu_B (21). Θεωρούμε κατά συνέπεια ότι επιδράσεις τόσο στο μακρινό όσο και στο εγγύ περιβάλλον καθορίζουν τις $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ που καταγράψαμε.

Η κατά $\sim 4\text{ cm}^{-1}$ μείωση της $\nu(\text{Fe-CO})$ στο *P.denitrificans* σε σύγκριση με την αντίστοιχη δόνηση της CcO των θηλαστικών, προκαλείται από τον ισχυρό δεσμό υδρογόνου της εγγύς ιστιδίνης αλλά και από τις μακρινές αλληλεπιδράσεις στο δεσμευμένο στην αίμη a_3 CO από τον Cu_B . Το επιχείρημα αυτό στηρίζεται από την παρατηρούμενη υψηλή συχνότητα της δόνησης τάσης Fe-His στους 220 cm^{-1} , σε σχέση με τις άλλες aa_3 - και ba_3 -τύπου οξειδάσες. Παρόμοιο συμπέρασμα σχετικά με την επίδραση του εγγούς υποκαταστάτη στις ιδιότητες του δεσμευμένου στην μακρινή θέση CO έχει εξαχθεί πρόσφατα σε μελέτη της προσταγλαδινικής Η συνθάσης από τον Wang *et al.* (45). Σε αντίθεση, ο Das *et al.* (23) υποστηρίζει ότι η εξάρτηση που παρουσιάζουν οι δονήσεις της Fe-C-O μονάδας *Rb*.

sphaeroides από το pH, δεν μπορούν να αποδωθούν στις ιδιότητες της εγγύς θέσης εφόσον απουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στην δόνηση τάσης Fe-His σε μεταβολές του pH. Η εγγύς θέση της αίμης α_3 παρουσιάζει υδροφοβικό χαρακτήρα και είναι αποκομμένη από τον διαλύτη, όπως φαίνεται από μελέτες Raman σε D₂O (41). Συνεπώς, η σταθερότητα της δόνησης τάσης Fe-His σε αλλαγές του pH, δεν μπορεί να αποκλείσει τις αλληλεπιδράσεις που προκαλούνται από τον δεσμό υδρογόνου της εγγύς ιστιδίνης της αίμης α_3^{2+} . Επιπλέον, τα δεδομένα της κρυσταλλικής δομής του ενζύμου από το *P. denitrificans* δείχνουν την ύπαρξη δεσμού υδρογόνου της εγγύς ιστιδίνης με την Gly387. Οι συχνότητες των δονήσεων τάσης Fe-His και Fe-CO του *P. denitrificans* τοποθετούν το ένζυμο στην ευθεία που παρουσιάζεται στο σχήμα 5A και δείχνουν ότι η δομή του είναι όμοια με την α -μορφή των κυτοχρωμάτων aa_3 των θηλαστικών και του *Rb. Sphaeroides*. Η απουσία μεταβολής στο εγγύ περιβάλλον της αίμης α_3 , όπως φαίνεται από την ισχύ του δεσμού Fe²⁺-His στους 220 cm⁻¹, στο μεταλλαγμένο ένζυμο δηλώνει ότι η ανώμαλα υψηλή συχνότητα της δόνησης τάσης C-O του δεσμευμένου CO οφείλεται αποκλειστικά σε αλληλεπιδράσεις στην μακρινή θέση. Αλληλεπιδράσεις στην εγγύ θέση δεν υπάρχουν εφόσον η $\nu(\text{Fe-His})$ μένει ανεπηρέαστη από την μετάλλαξη, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν λαμβάνουν χώρα καθολικές μεταβολές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

Οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου $a_3\text{-Cu}_B$ έχουν προσδιοριστεί μέσω της σχέσης των $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ συχνοτήτων. Η κύρια α -διαμόρφωση του φυσικού κυτοχρώματος aa_3 , που απεικονίζεται στο σχήμα 5B, διαφοροποιείται από την αντίστροφη γραμμική σχέση που υπάρχει ανάμεσα στις συχνότητες στις συχνότητες $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ ανάμεσα στις πρωτεΐνες με υποκαταστάτη ιστιδίνη, αλλά ανήκει στην καμπύλη των υπολοίπων τελικών οξειδασών. Παρά το γεγονός ότι δεν ανιχνεύσαμε την $\nu(\text{Fe-CO})$ της β -διαμόρφωσης, η συχνότητα της $\nu(\text{C-O})$ αυτής της διαμόρφωσης είναι όμοια με την αντίστοιχη που έχει αναφερθεί για το κυτόχρωμα aa_3 από το *Rh. sphaeroides*, δηλώνοντας ότι οι συχνότητες της β -μορφής του *P. denitrificans* ανήκουν στην ευθεία των πρωτεϊνών με υποκατάσταση ιστιδίνης, στις οποίες το CO δεσμεύεται στον αιμικό σίδηρο χωρίς ανώμαλες πολικές και στερικές επιδράσεις. Η παρατήρησή μας, ότι το μεταλλαγμένο Y280H ένζυμο διατηρεί την ικανότητα να ανάγει το O₂ και να αντιδρά με το H₂O₂ προς παραγωγή ενδιάμεσων οξυγόνου (κεφ. 5), δηλώνει ότι η απουσία της β -διαμόρφωσης και η ταυτόχρονη παρουσία της γ -διαμόρφωσης στους 1975 cm⁻¹ δεν είναι καθοριστικής σημασίας για την λειτουργικότητα του ενεργού κέντρου του ενζύμου.



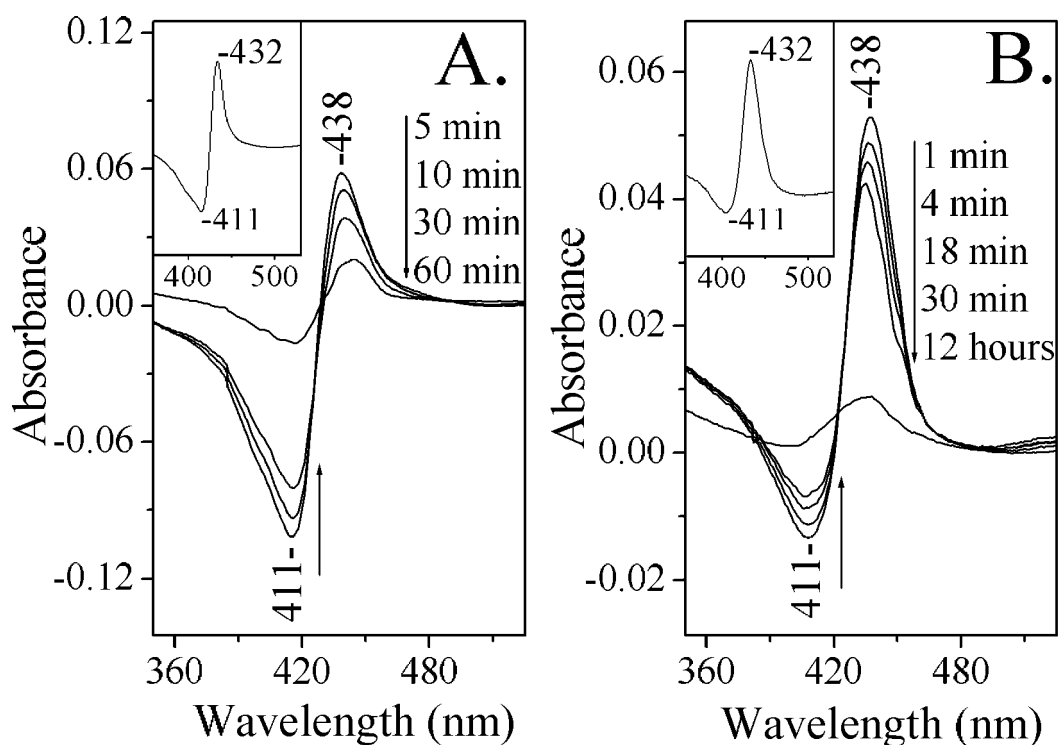
Σχήμα 5. Πίνακας A : Συσχέτιση των συχνοτήτων της δόνησης τάσης της Fe-His ως προς την C-O. (●) κυτόχρωμα bc_3 από το *E. coli*, (◄) η α-μορφή του κυτοχρώματος aa_3 από το *R. sphaeroides*, (■) κυτοχρωμική c οξειδάση των θηλαστικών και κυτόχρωμα aa_3 από το *B. subtilis*, (▼) κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans*, (▲) κυτόχρωμα cbb_3 από το *R. capsulatus*. Πίνακας B: Συσχέτιση των συχνοτήτων της δόνησης τάσης της Fe-CO ως προς την C-O. Ομοίως με τον πίνακα A και (►) η β-μορφή του κυτοχρώματος aa_3 από το *R. sphaeroides*, (◇) μυοσφαιρίνες και αιμοσφαιρίνες.

Η ομοιότητα ανάμεσα στις συχνότητες και την σχετική ενίσχυση των δονήσεων της οξειδωμένης αίμης a_3 στο φυσικό και μεταλλαγμένο ένζυμο αποτελεί ένδειξη ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον που περικλείει την αίμη a_3 παραμένει αμετάβλητο στις δύο περιπτώσεις. Η σύγκριση των RR φασμάτων στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του μεταλλαγμένου και φυσικού κυτοχρώματος, μετά την αναγωγή τους, δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Οι μεταβολές όμως στην ένταση και το εύρος της δόνησης της

φορμυλικής ομάδας της αίμης α_3 δηλώνουν ότι πιθανόν λαμβάνει χώρα αλλαγή στην διαμόρφωση του διπυρηνικού κέντρου στο μεταλλαγμένο Y280H σε σχέση με το φυσικό ένζυμο. Η αλλαγή αυτή δεν είναι αποτέλεσμα μετατροπής της οξειδωτικής ή σπιν κατάστασης, ή του αριθμού συναρμογής της αίμης α_3 , εφόσον έχουμε αποδείξει ότι τέτοιες μεταβολές δεν πραγματοποιούνται ως συνέπεια της μετάλλαξης της ιστιδίνης σε τυροσίνη. Κατά συνέπεια διαφορετικές πιθανότητες είναι απαραίτητο να σχολιαστούν.

Η απουσία μεταβολών στην διαμόρφωση της αίμης α_3 αφήνει ως μόνη πιθανότητα για την αιτιολόγηση της μείωσης της έντασης της φορμυλικής ομάδας της αίμης α_3 την εμπλοκή των ιστιδινών που αποτελούν τους υποκασταστάτες του Cu_B . Η H276 είναι η ιστιδίνη που σχηματίζει τον ομοιοπολικό δεσμό με την Y280 στο φυσικό ένζυμο και βρίσκεται αρκετά απομακρυσμένη από την φορμυλική ομάδα. Οι H325 και H326 ανήκουν στην ίδια έλικα και βρίσκονται κοντά στην φορμυλομάδα. Το πλησιέστερο αμινοξύ στο οξυγόνο της φορμυλικής ομάδας είναι η H325 (H290 σύμφωνα με την αρίθμηση του ενζύμου από καρδιά βοδιού). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η απουσία της Y280 από την κοιλότητα της αίμης καταλήγει στην απώλεια του δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στην υδρόξυ ομάδα της φαρνεσυλικής αλυσίδας της αίμης α_3 και της υδρόξυ ομάδας της τυροσίνης. Εάν οι παρατηρούμενες μεταβολές οφείλονταν σε αλλαγή του δεσμού υδρογόνου της φορμυλομάδας θα αναμέναμε μετατόπιση της συχνότητας της δόνησης της συγκεκριμένης ομάδας (46). Προτείνουμε ότι μεταβολές στην απόσταση Fe-Cu_B μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή της θέσης της H325 σε σχέση με την φορμυλική ομάδα της αίμης α_3 . Εφόσον λοιπόν δεν παρατηρείται μετατόπιση της συχνότητας δόνησης της φορμυλομάδας, αποδίδουμε την μεταβολή της έντασης της δόνησης της, στην αλλαγή της γεωμετρίας της ομάδας που δεν επιτρέπει στην ηλεκτρονιακή σύζευξη με τον πορφυρινικό πυρήνα να είναι τόσο αποτελεσματική όσο στην αίμη α_3 του φυσικού ενζύμου. Η απουσία της δόνησης τάσης C=O της φορμυλικής ομάδας στην ανηγμένη μορφή του μεταλλαγμένου Y280F κυτοχρώματος από το *R. sphaeroides* αποδόθηκε σε αλλαγή της διαμόρφωσης της αίμης α_3 . Η ερώτηση που ανακύπτει είναι σε πιο βαθμό μπορεί η μεταβολή του προσανατολισμού της φορμυλικής ομάδας, που είναι εμφανέστερη στο μεταλλαγμένο Y280F κυτόχρωμα $\alpha\alpha_3$ του *R. sphaeroides* συγκριτικά με το Y280H $\alpha\alpha_3$ του *P. denitrificans*, να επηρεάσει την καταλυτική δράση του ενζύμου. Πρόσφατα, ο Das *et al.* (46) ανέφερε ένα γεγονός αποπρωτονίωσης, συζευγμένο με οξειδοαναγωγικές διαδικασίες, στο διπυρηνικό κέντρο της κινολικής οξειδάσης από το βακτήριο *Acidianus ambivalens*. Οι μεταβολές στην δόνηση τάσης C-O της φορμυλικής ομάδας κατά την αναγωγή της αίμης α_3 αποδόθηκαν στην αλλαγή του δεσμού υδρογόνου της ομάδας. Οι συγγραφείς πρότειναν ως πιθανότερο

υποψήφιο για τις pH-εξαρτώμενες αλλαγές που παρατήρησαν την H290 (αρίθμηση του ενζύμου από καρδιά βοδιού) και ανέπτυξαν τις επιπτώσεις στην διαδικασία άντλησης πρωτονίων. Ανάλογες παρατηρήσεις δεν έχουν πραγματοποιηθεί για καμία άλλη α_3 -τύπου οξειδάση και κατά συνέπεια δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι είναι πιθανόν η μικρή αλλαγή της διαμόρφωσης της φορμλικής ομάδας της αίμης α_3 στο μεταλλαγμένο Y280H ένζυμο να επηρεάσει τις λειτουργικές ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου.



Σχήμα 5. Φάσματα διαφοράς της απορρόφησης ορατού, που απεικονίζουν τα προϊόντα της αντίδρασης με το οξυγόνο μείον την μορφή του φυσικού ενζύμου (πίνακας A) και μεταλλαγμένου Y280H (πίνακας B) όπως απομονώνονται. Τα αντίστοιχα ένθετα περιλαμβάνουν τα φάσματα των μικτού σθένους CO-συμπλόκων του φυσικού και Y280H ενζύμου μείον την μορφή που απομονώνονται. Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν 10 μM και το μήκος της κυψελίδας 0.5 cm.

Τα ενδιάμεσα οξυγόνο που δημιουργούνται μετά τον αποσχηματισμό του όξυ-ενδιαμέσου (I_m) στην αντίδραση της μικτού σθένους οξειδάσης με το οξυγόνο μπορούν να σχηματιστούν με την απευθείας ανάμιξη του οξυγόνου με το μικτού σθένους (MV) CO-σύμπλοκο της οξειδάσης (47). Τα ενδιάμεσα αυτά έχει αναφερθεί ότι έχουν αρκετά μεγάλους χρόνους ζωής και συνεπώς μπορούν να μελετηθούν με την χρήση ενός συμβατικού φασματοφωτομέτρου απορρόφησης. Η περιοχή της Soret μετάβασης των ενδιαμέσων

οξυγόνου που σχηματίζονται με την παραπάνω διαδικασία απεικονίζονται στο σχήμα 6. Το φάσμα διαφοράς του MV-CO μείον την οξειδωμένη μορφή του φυσικού ενζύμου (σχήμα 6A, ένθετο) με μέγιστο και ελάχιστο στα 432 και 411 nm, αντίστοιχα, βρίσκεται σε συμφωνία με το ανάλογο φάσμα του μικτού σθένους CO-συμπλόκου του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος (σχήμα 6B, ένθετο). Η ανάμιξη των MV-CO συμπλόκων τόσο του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το οξυγόνο μετατοπίζει την Soret μετάβαση στα 438 nm (1-18 min). Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι και στο φυσικό αλλά και το μεταλλαγμένο ένζυμο το O₂ αντικαθιστά αυθόρμητα το CO. Οι διαδοχικές μεταβολές της Soret μετάβασης δείχνουν τον αποσχηματισμό του 438 nm ενδιάμεσου και την επακόλουθη μετατροπή του ενζύμου στην μετακαταλυτική μορφή (pulsed) και στη συνέχεια στην μορφή όπως απομονώνεται (resting), μετατροπές που πραγματοποιούνται συνολικά σε κλίμακα δεκάδων δευτερολέπτων. Παρόμοιες παρατηρήσεις για την μετατροπή του Π_m ενδιάμεσου στην μορφή που απομονώνεται το ένζυμο, έχουν αναφερθεί από τον Rousseau και συνεργάτες του για την αντίδραση MV CcO/O₂ (47). Αποδείχθηκε επίσης από τους ίδιους συγγραφείς ότι τα ενδιάμεσα, που σχηματίζονται με την αυθόρμητη αντικατάσταση του CO από το O₂ μετά την ανάμιξη του οξυγόνου με το CO-σύμπλοκο της MV CcO, είναι όμοια με το Π_m των πειραμάτων ροής-παλμού (flow-flash) (47).

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ αποδεικνύουν ότι ο ομοιοπολικός δεσμός His-Tyr δημιουργεί ένα μοναδικό περιβάλλον γύρω από τον Cu_B, κρατώντας τον σε σταθερή απόσταση από την αίμη α₃. Η απουσία του δεσμού αυτού έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του Cu_B πλησιέστερα ως προς την αίμη α₃ στο CO σύμπλοκο του ενζύμου, επηρεάζοντας τις ιδιότητες των υποκαταστατών που δεσμεύονται στην αίμη α₃. Το μεταλλαγμένο Y280 κυτόχρωμα αα₃ διατηρεί ως εγγύ υποκαταστάτη στην αίμη α₃ την ιστιδίνη όπως και την ικανότητα να οξειδώνεται από το οξυγόνο. Η οξείδωση της αίμης α₃ στο Y280H μεταλλαγμένο ένζυμο πραγματοποιείται μέσω των ίδιων ενδιάμεσων με το φυσικό κυτόχρωμα αα₃ με μέγιστο στην περιοχή της Soret μετάβασης στα 438 nm. Οι ιδιότητες των ενδιάμεσων οξυγόνου παραμένουν προς καθορισμό. Ο χαρακτηρισμός της επίδρασης στις λειτουργικές/δομικές ιδιότητες του κέντρου α₃-Cu_B μετά την πραγματοποίηση της μετάλλαξης Y280H που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, καθώς επίσης ο προσδιορισμός των αρχικών σταδίων μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αντίδραση Y280H/O₂ θα οδηγήσουν σε βαθύτερη κατανόηση της οξείδωσης της κυτοχρωμικής c οξειδάσης.

Βιβλιογραφία

1. Wikström, M. (1989) *Nature* **338**, 776-778.
2. Babcock, G. T. & Wikström, M. (1992) *Nature*, **356**, 301-309.
3. Michel, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12819-12824.
4. Michel, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 15129-15140.
5. Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
6. Gennis, R. B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 241-248.
7. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
8. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S., (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
9. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T., (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
10. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
11. Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. & Michel, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10547-10553.
12. Das, T. K., Pecoraro, C., Tomson, F. L., Gennis, R. B. & Rousseau D. L. (1998) *Biochemistry* **37**, 14471-14476.
13. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. & Babcock G. T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8020-8025
14. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L. & Babcock G. T. (2000) *Science*, **290**, 1588-1591.
15. MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T. & Michel, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 9179-91884.
16. Argade, P.V, Ching, Y. C & Rousseau, D. (1984) *Science*, **225**, 329-331.
17. Wang, J., Takahashi, S., Hosler, P. H., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis R. B. & Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825.
18. Wang, J., Gray, K. A., Daldal, F. & Rousseau, D. L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9363-9364.
19. Wang, J., Takahashi, S. & Rousseau, D. L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9402-9406.

20. Wang, J., Ching, Y-C., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Hill, J. J. Rumbley, J. & Gennis R. B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3390-3391.
21. Varotsis, C. & Vamvouka, M. (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**, 7670-7673.
22. Hosler, P. H., Kim, Shapleigh, J. P., Gennis R. B., Alben, J. O., Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5515-5516.
23. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M. & Rousseau, D. L. (2001) *Biophysical J.* **80**, 2039-2045.
24. Park, S., Pan, L-P., Chan, S. I. & Alben, J. (1996) *Biophysical J.* **71**, 1036-1047.
25. Iwase, T., Varotsis, C., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S. & Kitawaga, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1415-1416.
26. Mitchell, D. M., Shapleigh, J. P., Archer A. M., Alben, J. O. & Gennis R. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 9446-9450.
27. Rost, B., Behr, J., Hellwig, P., Richter O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H. & Mäntele, W. (1998) *Biochemistry* **38**, 7565-7571.
28. Puustinen, A, Bailey, J. A, Dyer, R. B., Mecklenberg, S. L, Wikström, M. & Woodruff, W. H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13195-13200.
29. Dyer, R. B., Einarsdóttir, O., Killough, P. M., Lopez-Garriga, J. J. & Woodruff, W. H (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7657-7659.
30. Woodruff, W. H. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 177-188.
31. Dyer, R. B., Peterson, K. A., Stoutland, P. O. & Woodruff, W. H. (1994) *Biochemistry* **33**, 500-507.
32. Lemon, D. D, Calhoun, M. W., Gennis, R. B. & Woodruff, W.W. (1993) *Biochemistry* **32**, 11953-11956.
33. Varotsis, C., Kreszowski, D. H. & Babcock, G. T. (1996) *Biospectroscopy* **2**, 331-338.
34. Schelvis, H., Varotsis, C., Deinum, G., Ferguson-Miller S. & Babcock, G. T. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8409-8416.
35. Babcock, G. T. (1988) In *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (Spiro, T. G., Eds). Vol 3, pp 293-346, Wiley, New York.
36. Kitagawa, T. (1988) In *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (Spiro, T. G., Ed). Vol 3, pp 97, Wiley, New York.
37. Ching Y-C., Argade, P. V. & Rousseau, D. L. (1985) *Biochemistry* **24**, 4938-4946.
38. Varotsis, C., Babcock, G.T., Garcia-Horsmann, A. & Gennis, R.B. (1995) *J. Phys. Chem.* **99**, 16817-16820.

39. Vamvouka, M., Müller, W., Ludwig, B. & Varotsis, C. (1999) *J. Phys. Chem.* **103**, 3030-3034.
40. Heibel, G. E., Hildebrand, P., Ludwig, B., Steinrücke, P. Soulimane, T. & Buse, G. (1993) *Biochemistry* **32**, 10866-10877.
41. Lauraeus, M., Wikström, M., Varotsis, C., Tecklenburg, M. J. & Babcock, G. T. (1992) *Biochemistry* **31**, 10054-10060.
42. Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B. & Ludwig, B. (1991) *Biophys. J.* **60**, 415-423.
43. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B, & Richter, O.-M. H. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
44. Varotsis, C. & Babcock, G. T. (1990) *Biochemistry* **29**, 7357-7362.
45. Lou, B-S, Snyder, J. K., Marshall, P., Wang, J-S., Wu, G., Kulmacz, R., Tsai, A-L. & Wang, J. *Biochemistry*, **36**, 12424-12434.
46. Das, T. K., Gomes, C. M., Teixeira, M. & Rousseau, D. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9591-9596.
47. Han, S., Ching, Y-C. & Rousseau, D. L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9445-9451.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**Ενδιάμεσα της Αντίδρασης Οξειδωμένης Κυτοχρωμικής c
Οξειδάσης/ H₂O₂ : Απουσία Εμπλοκής της Tyr- 280 στα
Καταλυτικά Ενδιάμεσα.**

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία αναφέρουμε τον σχηματισμό των 580 και 607 nm μορφών και τις Raman δονήσεις που σχετίζονται με τα ενδιάμεσα αυτά στους 804, 790, και 358 cm⁻¹ κατά την αντίδραση του οξειδωμένου κυτοχρώματος aa₃ από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* με το H₂O₂. Σε εύρος pH 6.6-7.4 δημιουργείται η 580 nm μορφή με χαρακτηριστική Raman δόνηση που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 790 cm⁻¹. Σε pH μεγαλύτερο του 7.8 λαμβάνουμε μείγμα των 607 και 580 nm μορφών με εμφάνιση δύο Raman δονήσεων ευαίσθητων στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 804 και 358 cm⁻¹. Επιπλέον αναφέρουμε τον σχηματισμό των δύο προαναφερόμενων μορφών και στην αντίδραση του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος Y280H aa₃ με το H₂O₂ και προτείνουμε ότι η Y280 δεν μετέχει στον σχηματισμό αυτών των ενδιάμεσων. Η αντίδραση του μικτού σθένους μεταλλαγμένου ενζύμου Y280H/O₂ εμφανίζει όμοια χαρακτηριστικά με την αντίστοιχη αντίδραση του φυσικού ενζύμου, που επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό της 607 nm μορφής χωρίς την παρουσία του καταλοίπου της τυροσίνης 280. Τα φάσματα συντονισμού Raman των 580 και 607 nm ενδιάμεσων από την αντίδραση τόσο του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου με την χρήση διέγερσης στα 427 nm είναι όμοια μεταξύ τους, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο μορφές είναι σύμπλοκα της αίμης α₃ αριθμού συναρμογής έξι και χαμηλής διαμόρφωσης σπιν, αποκλείοντας παράλληλα τον σχηματισμό ρίζας κατιόντος πορφυρίνης.

Εισαγωγή

Ο καθορισμός των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του διπυρηνικού κέντρου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (CcO) (1-6) αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της συσχέτισης των δομικών χαρακτηριστικών με την χρονική συμπεριφορά των μεταβατικών ενδιάμεσων της αντίδρασης αναγωγής του μοριακού οξυγόνου. Η διελεύκανση του μηχανισμού της καταλυτικής αντίδρασης αποτελεί την θεμελιώδη βάση για την κατανόηση της λειτουργίας του ενζύμου ως αντλία πρωτονίων. Η κυτοχρωμική *c* οξειδάση από το βακτήριο του εδάφους *Paracoccus denitrificans* περιέχει ένα ομοπυρηνικό κέντρο χαλκού, Cu_A, μία χαμηλής διαμόρφωσης σπιν αίμη α , και ένα διπυρηνικό κέντρο αποτελούμενο από μία υψηλής διαμόρφωσης αίμη, την αίμη α_3 και ένα άτομο χαλκού, τον Cu_B. Το διπυρηνικό κέντρο α_3 /Cu_B αποτελεί την ενεργή θέση του ενζύμου όπου πραγματοποιείται η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε H₂O.

Μια από τις μοναδικές δομικές ιδιότητες του ενεργού κέντρου α_3 /Cu_B που αποκαλύφθηκε από τις κρυσταλλοδομές των κυτοχρωμάτων aa_3 του *P. denitrificans* αλλά και των θηλαστικών είναι ο ομοιοπολικός δεσμός που συνδέει έναν από του υποκαταστάτες του Cu_B, και συγκεκριμένα την H276 με γειτονικό αμινοξύ, την Y280 (7-11). Η τυροσίνη 280 αποτελεί το τελευταίο αμινοξύ του K καναλιού και είναι υψηλά διατηρημένη στην οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών. Η τοποθέτηση της στο διπυρηνικό κέντρο αποτέλεσε την βάση για την πρόταση ότι το συγκεκριμένο αμινοξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο σε σχέση με τα δομικά χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου όσο και με την λειτουργία του (9, 12-15). Το συμπέρασμα ότι η σχάση του δεσμού O-O πραγματοποιείται με την μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου από την Y280 προς τον σχηματισμό ενός συστήματος Fe⁴⁺=O²⁻/Cu_B²⁺-His-Y• (13), αναδεικνύει ένα βασικό ερώτημα, δηλαδή το μηχανισμό ελέγχου της μεταφοράς ηλεκτρονίου στο παραπάνω σύστημα, ώστε να λαμβάνουν χώρα οι δομικές μεταβολές που απαιτούνται για την άντληση πρωτονίων. Η πολυπλοκότητα των διαδικασιών αυτών καθιστά απαραίτητη την κατανόηση της δομής και κινητικής των ενδιάμεσων για την διελεύκανση των διαδικασιών πρωτονίωσης και σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ορισμένων ενδιάμεσων οξυγόνου, που δεν έχουν ακόμα καθοριστεί.

Η αντίδραση της οξειδωμένης CcO/H₂O₂ αποτελεί ένα πολύπλοκο ζήτημα πάνω στο οποίο έχουν ανακύψει σημαντικές διαφωνίες τα τελευταία χρόνια (16-26). Η αντίδραση αποτελεί ένα εναλλακτικό τρόπο μελέτης της οξειδωτικής κατάστασης του περόξυ ενδιάμεσου (2e⁻). Η αντίδραση της πλήρως οξειδωμένης μορφής της CcO με το H₂O₂, όπως

έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού, δείχνει την δημιουργία δύο μορφών του ενζύμου που χαρακτηρίζονται ως 607 και 580 nm μορφές και ο σχηματισμός τους παρουσιάζει εξάρτηση τόσο από την συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και από το pH. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι σε αλκαλικό pH η προσθήκη στοιχειομετρικής ποσότητας H₂O₂ οδηγεί στον σχηματισμό της 607 nm μορφής με δομή Fe⁴⁺=O²⁻...HO-Cu_B²⁺-His-Y•, ενώ η 580 nm μορφή με δομή Fe⁴⁺=O²⁻ Cu_B²⁺-His-Y• σχηματίζεται με την πρωτονίωση της 607 nm μορφής (4). Σε χαμηλό pH η 580 nm μορφή δημιουργείται με την προσθήκη στοιχειομετρικής ποσότητας H₂O₂ στο ένζυμο. Σε υψηλές τιμές pH η 607 nm μορφή μετατρέπεται μέσω μη-αντιστρεπτής διαδικασίας και σε χρονικό διάστημα της τάξης των λεπτών στην μορφή των χαμηλών pH, δηλαδή στην 580 nm μορφή. Η προσθήκη ενός δεύτερου ισοδύναμου H₂O₂ μετατρέπει τις προαναφερόμενες μορφές σε Fe⁴⁺=O²⁻ Cu_B²⁺-His-Y. Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι μόνο η 607 nm μορφή και όχι η 580 nm μορφή συνοδεύεται από την ανίχνευση σήματος ρίζας EPR σήματος (24). Η απουσία της ρίζας τυροσίνης ως δότη ηλεκτρονίου, οδήγησε στην πρόταση ότι πηγή του ηλεκτρονίου είναι ο Cu_B, ο οποίος μεταβαίνει στην οξειδωτική κατάσταση Cu_B³⁺ για να πραγματοποιηθεί η σχάση του δεσμού O-O (17). Πρόσφατη μελέτη της CcO από καρδιά βοδιού εμφανίζει το ευρύ σήμα του EPR του ενζύμου στο οποίο έχει πραγματοποιηθεί προσθήκη H₂O₂ να αποδίδεται σε ρίζα κατιόντος τρυπτοφάνης συζευγμένο με την όξο-φερύλ Fe⁴⁺=O²⁻ κατάσταση της αίμης α₃, ενώ ένα δεύτερο σήμα αποδόθηκε σε ρίζα κατιόντος πορφυρίνης (25). Ως συμπέρασμα υποστηρίχθηκε ότι τα EPR σήματα δεν σχετίζονταν, όπως στην προηγούμενη μελέτη με ρίζα τυροσίνης, αλλά με κατάλοιπο τρυπτοφάνης που βρίσκεται σε απόσταση ~ 9 Å από την αίμη α₃. Ο σχηματισμός ρίζας τρυπτοφάνης κατά την επεξεργασία της CcO με H₂O₂, έχει επίσης αναφερθεί και από μετρήσεις απορρόφησης ορατού (17).

Η 607 nm μορφή μπορεί επίσης να σχηματιστεί από την αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το μονοξείδιο του άνθρακα παρουσία μοριακού οξυγόνου. Μέσω της προσέγγισης αυτής οι Fabian και Palmer (18) παρακολούθησαν την μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή. Το συμπέρασμά τους ήταν ότι η αργή μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς ενός πρωτονίου σε αποπρωτονιομένη ομάδα που δημιουργείται στο διπυρηνικό κέντρο κατά τον σχηματισμό της 607 nm μορφής. Προτάθηκε ότι η ομάδα αυτή δεν είναι προσβάσιμη σε πρωτόνια από το μέσο και το pK_a της θεωρήθηκε μεγαλύτερο από 9.0. Η μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή αναφέρθηκε ότι πραγματοποιείται με σταθερά ταχύτητας 1.1x10⁻² s⁻¹ και η τελευταία με τη σειρά της μετατρέπεται στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου με σταθερά ταχύτητας 1.1x10⁻³ s⁻¹. Ο

Rousseau και οι συνεργάτες του (27) σε μελέτη της αντίδρασης του μικτού σθένους ενζύμου (MV), δηλαδή ανηγμένο μόνο το διπυρηνικό κέντρο, με το οξυγόνο παρακολούθησαν την μετατροπή της 607 nm μορφής στην μετακαταλυτική μορφή του ενζύμου και την ακόλουθη μετάβαση του στην οξειδωμένη μορφή, όπως απομονώνεται και ανέφεραν για τις δύο αυτές φάσεις σταθερές ταχύτητας $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ και $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, αντίστοιχα.

Ο ταυτόχρονος χαρακτηρισμός των φερύλ ενδιάμεσων της αντίδρασης της οξειδωμένης CcO/H₂O₂ με φασματοσκοπία ορατού και συντονισμού Raman έχει αναφερθεί σε μελέτη, που περιλαμβάνει και την εξάρτηση που παρουσιάζει η προαναφερόμενη αντίδραση από το pH και την συγκέντρωση υποστρώματος (22). Με την μεθοδολογία αυτή πραγματοποιήθηκε η άμεση συσχέτιση των μορφών που χαρακτηρίζονται από την απορρόφηση ορατού τους και συγκεκριμένες Raman δονήσεις. Αναφέρθηκε στην μελέτη αυτή ότι η αντίδραση κυτοχρωμικής οξειδάσης/υπεροξειδίου του υδρογόνου οδηγεί στον σχηματισμό των 607 και 580 nm ενδιάμεσων, που χαρακτηρίζονται από τις ίδιες δονήσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου, με τις αντίστοιχες δονήσεις ενδιάμεσων που εμφανίζονται στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης CcO/O₂. Σε εύρος pH 7.4-10 ο πληθυσμός του 607 nm ενδιάμεσου με χαρακτηριστική δόνηση $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-})$ στους 804 cm^{-1} μειώνεται με την αύξηση του pH και της συγκέντρωσης του H₂O₂. Ο σχηματισμός της 580 nm μορφής με συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μη-κορεσμένο επίπεδο συνοδεύεται από την εμφάνιση δύο δονήσεων Raman, που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου του H₂O₂. Η πρώτη δόνηση εμφανίζεται στους 785 cm^{-1} και εξαφανίζεται σε τιμές pH μεγαλύτερες του 8.5 και αποδίδεται σε ένα δεύτερο φερύλ ενδιάμεσο $\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$, ενώ η δεύτερη στους 355 cm^{-1} δεν εμφανίζεται σε pH μεγαλύτερο του 9 και χωρίς η απουσία της να συνοδεύεται από σημαντικές μεταβολές του φάσματος απορρόφησης ορατού. Ως συμπέρασμα αναφέρθηκε ότι η δόνηση στους 355 cm^{-1} προέρχεται από ένα τρίτο όξο-φερύλ ενδιάμεσο και δεν συσχετίζεται με τα φερύλ 804 και 785 cm^{-1} .

Πρόσφατα, αποδείξαμε ότι η σταθερότητα του διπυρηνικού κέντρου δεν επηρεάζεται από την απουσία του ομοιοπολικού δεσμού μέσω της μετάλλαξης της τυροσίνης 280 σε ιστιδίνη, εφόσον η αίμη a_3 διατηρεί το ίδιο εγγύ περιβάλλον, διαμόρφωση σπιν και αριθμό συναρμογής όπως το φυσικό ένζυμο τόσο στην οξειδωμένη όσο και την ανηγμένη κατάσταση (κεφάλαιο 4, παραπομπή 28). Τα παραπάνω αποτελέσματα παρέχουν ισχυρά στοιχεία ότι στο μεταλλαγμένο Y280H κυτόχρωμα aa_3 , το διπυρηνικό κέντρο διατηρεί την ενεργή του διαμόρφωση, που επιτρέπει την δέσμευση του O₂ στην αίμη a_3 . Τα οξυγονομένα ενδιάμεσα που σχηματίζονται από την απευθείας ανάμιξη των CO-συμπλόκων του μικτού

σθένους φυσικού και μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου παρουσιάζουν όμοιες Soret μεταβάσεις στα 438 nm. Οι διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις στην αντίδραση της οξειδωμένης CcO/H₂O₂ έχει επιφέρει ως αποτέλεσμα την διαφωνία πάνω στην δομή των 607 και 580 nm μορφών, αν και υπάρχει μερική συμφωνία ως προς την δομή της 580 nm μορφής και της μετατροπής της στο οξειδωμένο ένζυμο. Επιπλέον, η σύγκριση μεταξύ των 607 nm μορφών που προκύπτουν από τις αντιδράσεις μικτού σθένους ενζύμου/O₂ και οξειδωμένου ενζύμου/H₂O₂ απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση. Η σχέση ανάμεσα στις 804 και 785 cm⁻¹ δονήσεις με την 355 cm⁻¹ αποτελεί επίσης ένα σημείο προς διευκρίνιση ώστε να καταστεί δυνατή η αποσαφήνιση της δομής του κάθε ενδιάμεσου.

Στην παρούσα εργασία αναφέρουμε τον σχηματισμό των 580 και 607 nm μορφών και τις Raman δονήσεις που σχετίζονται με τα ενδιάμεσα αυτά στους 804, 790, και 358 cm⁻¹ κατά την αντίδραση του οξειδωμένου κυτοχρώματος aa₃ από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* με το H₂O₂. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι σε εύρος pH 6.6-7.4 δημιουργείται η 580 nm μορφή με χαρακτηριστική Raman δόνηση που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 790 cm⁻¹. Σε pH μεγαλύτερο του 7.8 λαμβάνουμε μείγμα των 607 και 580 nm μορφών με εμφάνιση δύο Raman δονήσεων ευαίσθητων στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 804 και 358 cm⁻¹. Επιπλέον, αναφέρουμε τον σχηματισμό των δύο προαναφερόμενων μορφών και στην αντίδραση του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος Y280H aa₃ με το H₂O₂ και προτείνουμε ότι η Y280 δεν μετέχει στον σχηματισμό αυτών των ενδιάμεσων. Η αντίδραση του μικτού σθένους μεταλλαγμένου ενζύμου Y280H/O₂ εμφανίζει όμοια χαρακτηριστικά με την αντίστοιχη αντίδραση του φυσικού ενζύμου, που επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό της 607 nm μορφής χωρίς την παρουσία του καταλοίπου της τυροσίνης 280. Τα φάσματα συντονισμού Raman των 580 και 607 nm ενδιάμεσων από την αντίδραση τόσο του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου με την χρήση διέγερσης στα 427 nm είναι όμοια μεταξύ τους, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο μορφές είναι σύμπλοκα της αίμης α₃ αριθμού συναρμογής έξι και χαμηλής διαμόρφωσης σπιν, αποκλείοντας τον σχηματισμό ρίζας κατιόντος πορφυρίνης, όπως είχε αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (25).

Πειραματικές Διαδικασίες

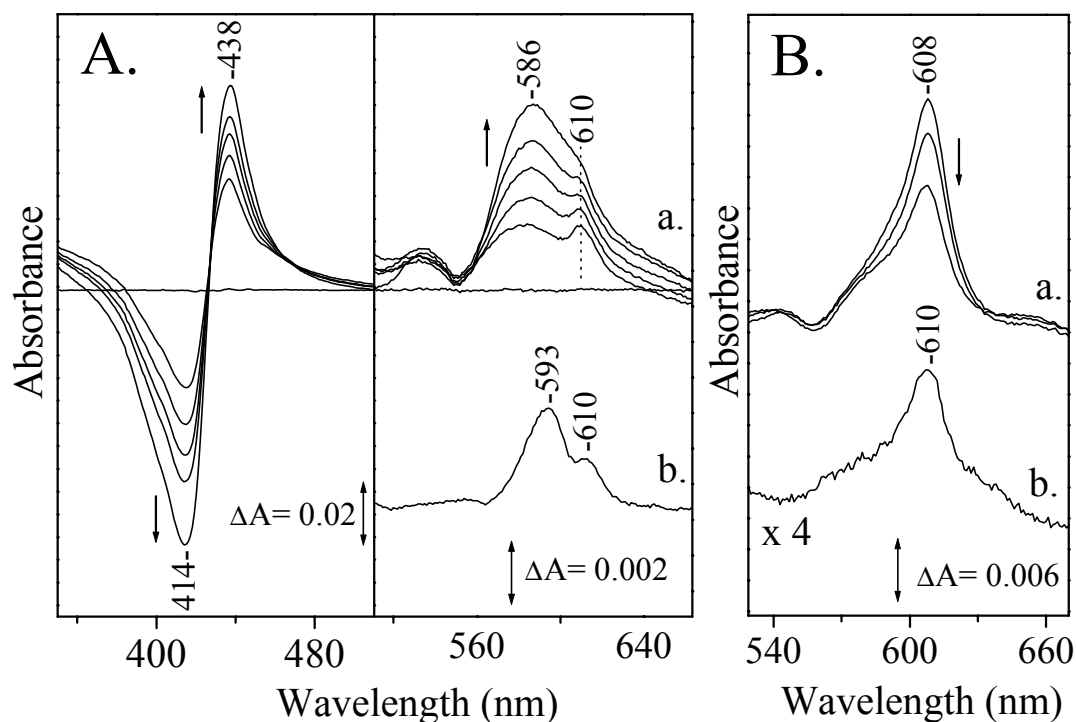
Το φυσικό και μεταλλαγμένο κυτόχρωμα Y280H aa₃ από το βακτήριο *P. denitrificans* απομονώθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 με τα

πρωτόκολλα των παραπομπών (29, 30). Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν σε 100-150 μM στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM (pH 6.5, MES; pH 7.5-8, HEPES; pH 8.5-9.5 CHES) που περιείχε 0.1 % dodecyl β-D-maltoside και ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο ως την χρήση τους. Τα διαλύματα δείγματος και H₂O₂ τοποθετήθηκαν σε διαφορετικές σύριγγες κινούμενες με αντλία ώστε να πραγματοποιείται η ανάμιξη των δύο διαλυμάτων σε μίξερ τύπου Gibson οκτώ θέσεων σε σειρά. Η έξοδος του μίξερ σχεδιάστηκε για επιτρέπει στο διάλυμα της οξειδάσης (τελικής συγκέντρωσης 40 μM) να ρέει μέσω κυψελίδας ύψους 2 cm και εσωτερικής διαμέτρου 0.2x0.1-mm. Η χρονική διακριτικότητα καθορίζεται από την ταχύτητα ροής, το εσωτερικό εμβαδόν της κυψελίδας και την χωρική απόσταση ανάμεσα στο σημείο μίξης των διαλυμάτων και της ακτινοβολίας διέγερσης των 427 nm. Το H₂O₂ αγοράστηκε από την Aldrich Chemical Co. Inc. και το H₂O₂¹⁸ από την Icon. Τα φάσματα συντονισμού Raman καταγράφηκαν όπως έχει περιγραφεί (κεφ. 4) Η ενέργεια της ακτινοβολίας διέγερσης πάνω στο δείγμα ήταν 4-6 mW. Τα φάσματα απορρόφησης ορατού των δειγμάτων καταγράφησαν με φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible.

Αποτελέσματα

Το Σχήμα 1A απεικονίζει τα φάσματα διαφοράς απορρόφησης ορατού της αντίδρασης της οξειδωμένης CcO του *P. denitrificans* (6 μM) με 3 mM H₂O₂ μείον το οξειδωμένο ένζυμο σε pH 7.6 στις αναφερόμενες χρονικές στιγμές μετά την ανάμιξη των αντιδρώντων. Τα φάσματα χαρακτηρίζονται από ελάχιστο στα 414 nm και μέγιστο στα 438 nm, καθώς επίσης και από δύο μεταβάσεις στα 586 και 610 nm. Οι μεταβολές που πραγματοποιούνται στην περιοχή της Soret μετάβασης αλλά και στην περιοχή των μεταβάσεων ορατού δείχνουν ότι η μεγιστοποίηση του πληθυσμού των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα 10 min. Τα προαναφερόμενα φάσματα διαφοράς είναι όμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί στην αντίδραση της οξειδωμένης οξειδάσης των θηλαστικών και του βακτηρίου *Rb. sphaeroides aa₃*-τύπου με το H₂O₂. Στην πραγματοποίηση του ίδιου πειράματος με το μεταλλαγμένο κυτόχρωμα Y280H το φάσμα διαφοράς (φάσμα b) παρουσιάζει μικρές μεταβολές με τα μέγιστα να εμφανίζονται στα 593 και 610 nm. Ο σχηματισμός της 607 nm μορφής* τόσο στην περίπτωση του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου δείχνει ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση αυτής της μορφής με την παρουσία της δομής Y280-His276.

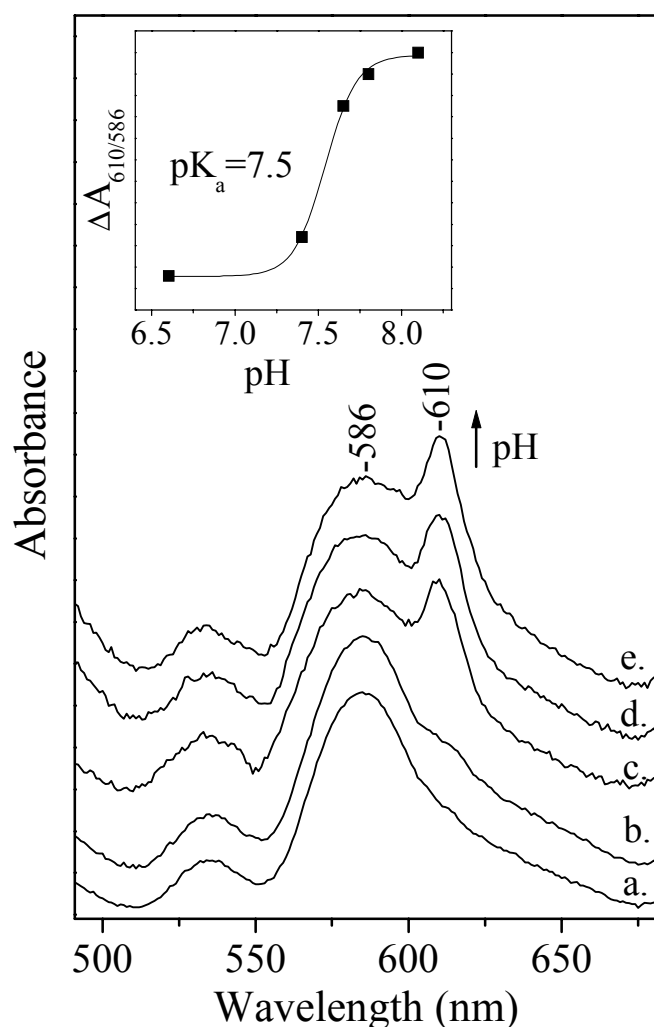
* Οι μεταβάσεις στα 586 και 610 nm θα αναφέρονται ως 580 και 607 nm μορφές σύμφωνα με την ορολογία που έχει επικρατήσει στην βιβλιογραφία στην μελέτη του μιτοχονδριακού ενζύμου.



Σχήμα 1: *A.* Φάσματα διαφοράς απορρόφησης ορατού της αντίδρασης του φυσικού κυτοχρώματος *aa₃* του *P. denitrificans* (φάσματα *a*) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε pH 7.6 και σε χρόνους 1, 2, 4, 5 και 10 min μετά την ανάμιξη 6 μM ενζύμου με 3 mM H₂O₂. Το φάσμα *b* είναι το αντίστοιχο φάσμα διαφοράς της αντίδρασης του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου σε pH 8. *B.* Το φάσμα *a* αντιστοιχεί στην αντίδραση του μικτού σθένους -CO συμπλόκου του φυσικού ενζύμου με το οξυγόνο μέσω απευθείας ανάμιξης, μείον το φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου σε χρόνους 1, 5, και 10 min. Το φάσμα *b* αντιστοιχεί στην ανάλογη αντίδραση του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου μείον το φάσμα του MV-CO συμπλόκου σε χρόνο 1 min.

Η απευθείας ανάμιξη οξυγόνου με το CO-σύμπλοκο της μικτού σθένους οξειδάσης παράγει ενδιάμεσα οξυγόνου μετά το αρχικό όξυ ενδιάμεσο με σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής. Η περιοχή των μεταβάσεων ορατού των φασμάτων του φυσικού και μεταλλαγμένου κυτοχρώματος *aa₃* που προκύπτουν σύμφωνα με την προαναφερόμενη διαδικασία απεικονίζονται στο Σχήμα 1B. Η χρονική εξέλιξη του αποσχηματισμού της 608 nm μετάβασης της αντίδρασης φυσικού MV/O₂ (φάσματα *a*, τα οποία είναι τα φάσματα διαφοράς της αντίδρασης MV/O₂ μείον το φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου) είναι όμοια με αυτή που έχει αναφερθεί για την αντίστοιχη αντίδραση του κυτοχρώματος *aa₃* των θηλαστικών (27). Επιπλέον το φάσμα διαφοράς της αντίδρασης MV/O₂ του μεταλλαγμένου

Y280H ενζύμου, που απεικονίζεται στο Σχήμα 1B (φάσμα b, τα οποίο αντιστοιχεί στο φάσμα διαφοράς της αντίδρασης MV/O₂ μείον το φάσμα του MV ενζύμου) παρουσιάζει ομοίως μέγιστο στα 610 nm, αν και η απορρόφηση της μετάβασης αυτής είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το φυσικό ένζυμο. Εφόσον η 607 nm μορφή που ανιχνεύσαμε στην περίπτωση στην αντίδραση Y280H MV/O₂ έχει την ίδια δομή με το ενδιάμεσο που παράγεται από την αντίδραση της οξειδωμένης φυσικής αλλά και μεταλλαγμένης οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι δεν ιφίσταται άμεση εμπλοκή της τυροσίνης 280 στον σχηματισμό του ενδιαμέσου αυτού.

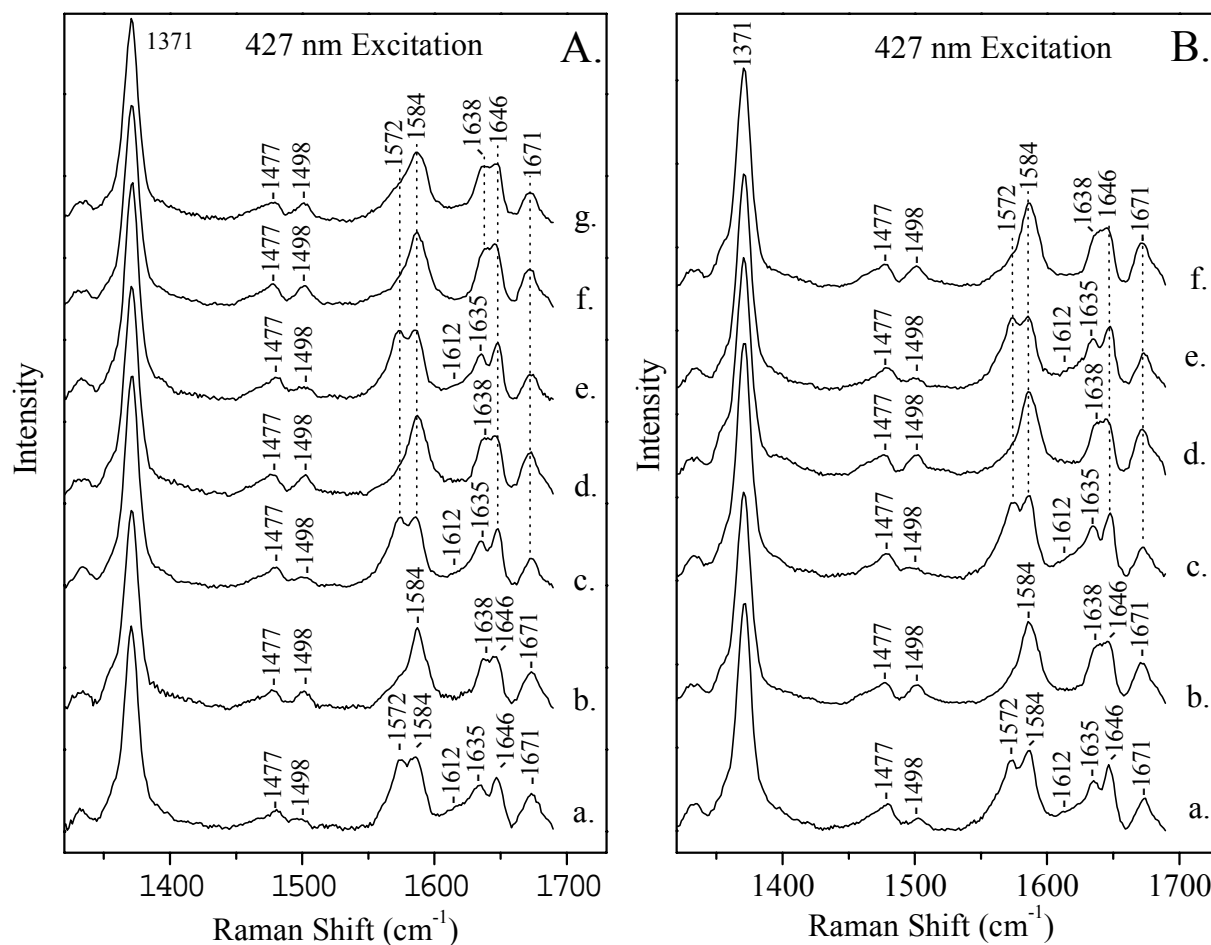


Σχήμα 2: Φάσματα διαφοράς απορρόφησης ορατού της αντίδρασης του κυτοχρώματος aa₃ του φυσικού *P. denitrificans* (φάσματα a) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε pH 6.6, 7.4, 7.6, 7.8, 8.1 (φάσμα a, b, c, d, e αντίστοιχα) και σε χρόνο 1 min μετά την ανάμιξη 6 μ M ενζύμου με 3 mM H₂O₂. Στο ένθετο απεικονίζεται η μεταβολή του λόγου των εντάσεων 610/586 nm ως συνάρτηση του pH, καμπύλη από την οποία υπολογίζεται pK_a της μετάβασης ανάμεσα στις δύο μορφές 7.5.

Το Σχήμα 2 απεικονίζει την εξάρτηση που παρουσιάζουν οι 607 και 580 nm μορφές από το pH. Η πρώτη μορφή παρουσιάζει σχετικά αυξημένο πληθυσμό σε τιμές pH μεγαλύτερες από 7.6 (φάσματα c, d, e), αλλά σταδιακά αντικαθιστάται από την 580 nm μορφή όσο το pH

μειώνεται (φάσματα a και b). Η επίδραση που παρουσιάζει η μεταβολή του pH στον σχηματισμό και αποσχηματισμό της 607 nm μορφής προς την 580 nm μορφή απεικονίζεται στο ένθετο του Σχήματος 2, δείχνοντας ότι η μετάβαση 607 προς 580 ελέγχεται από μία ομάδα με pK_a της τάξης του 7.5. Εφόσον το H₂O₂ είναι πλήρως πρωτονιωμένο στο εύρος των τιμών pH 5-8.5, προτείνουμε ότι η κατάσταση πρωτονίωσης μιας ομάδας στο διπυρηνικό κέντρο ελέγχει τα ενδιάμεσα της αντίδρασης. Όταν η ομάδα αυτή είναι πρωτονιομένη, η αντίδραση ευνοεί τον σχηματισμό της 580 nm μορφής, ενώ όταν είναι αποπρωτονιομένη σταθεροποιείται η 607 nm μορφή. Οι Fabian και Palmer (18) υποστήριξαν την εμπλοκή μιας πρωτονιομένης ομάδας στην μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή κατά την προετοιμασία του μικτού σθένους ενζύμου παρουσία μοριακού οξυγόνου. Σε τιμές pH 6.6 ως 7.4 η 607 nm μορφή παρουσιάζει ασθενή απορρόφηση και μόνο η 580 nm μορφή είναι εμφανής και αυξάνει σε 10 λεπτά στην μέγιστη συγκέντρωσή της. Σε εύρος pH 7.6 ως 8.1 είναι παρούσες και οι δύο μορφές 607 και 580 nm. Η ταχεία, στις χαμηλές τιμές pH, μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή δεν μπορεί να αντιστραφεί ούτε με μεταβολή του pH.

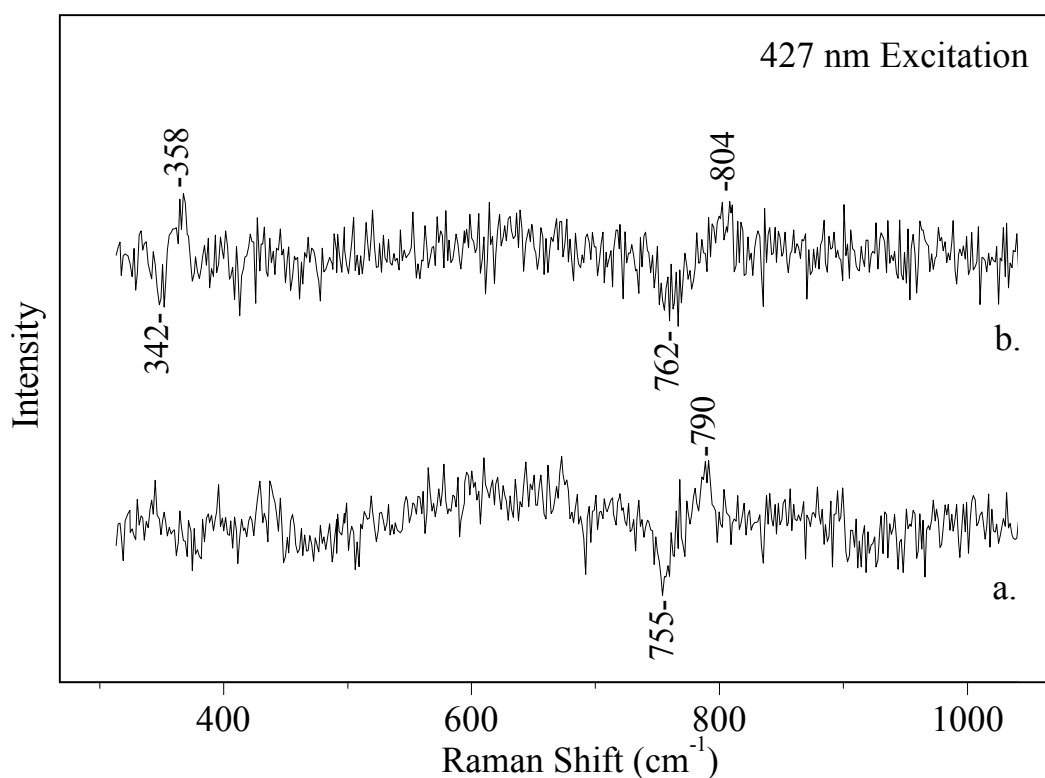
Με την χρησιμοποίηση του μήκους κύματος διέγερσης στα 427 nm η συνεισφορά της αίμης α στα φάσματα συντονισμού Raman του οξειδωμένου ενζύμου ενισχύεται σε σχέση με την αίμη α_3 εφόσον η πρώτη παρουσιάζει το μέγιστο της Soret μετάβασης στα 427 nm, ενώ η δεύτερη στα 416 nm. Το Σχήμα 3A και 3B απεικονίζει την περιοχή των υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του οξειδωμένου κυτοχρώματος $\alpha\alpha_3$ του *P. denitrificans* και των ενδιάμεσων της αντίδρασής του με το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε pH και pD 6.5-9.5, αντίστοιχα (φάσματα a-f). Το φάσμα g αντιστοιχεί στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman της αντίδρασης του οξειδωμένου μεταλλαγμένου ενζύμου Y280H με το H₂O₂. Τα φάσματα συντονισμού Raman του οξειδωμένου φυσικού ενζύμου σε pH 6.5 (φάσμα a), 7.8 (φάσμα c), και 9.5 (φάσμα e) είναι όμοια μεταξύ τους δείχνοντας ότι στο εύρος των παραπάνω τιμών pH δεν πραγματοποιείται κάποια μεταβολή είτε στην οξειδωτική κατάσταση της αίμης α και α_3 είτε στην υποκατάσταση της αίμης της ενεργού θέσης. Η δόνηση που χαρακτηρίζει την οξειδωτική κατάσταση των αιμών, ν_4 στους 1371 cm⁻¹ πιστοποιεί ότι και οι δύο αίμες βρίσκονται στην Fe³⁺ κατάσταση. Οι δονήσεις στους 1477 και 1498 cm⁻¹ προέρχονται από την ν_3 της υψηλής διαμόρφωσης σπιν αίμης α_3 και της χαμηλής διαμόρφωσης σπιν αίμης α , αντίστοιχα, αποδεικνύοντας ότι και οι δύο αίμες διατηρούν αριθμό συναρμογής έξι. Η περιοχή του φάσματος που χαρακτηρίζει το μέγεθος του πυρήνα του πορφυρινικού δακτυλίου παρουσιάζει δύο ν_2 δονήσεις στους 1572 cm⁻¹ (αίμη υψηλού σπιν α_3^{3+}) και 1584 cm⁻¹ (αίμη



Σχήμα 3: **A.** Φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων της οξειδωμένης μορφής του φυσικού κυτοχρώματος a_3 του *P. denitrificans* σε pH 6.5 (φάσμα α), 7.8 (φάσμα c) και 9.5 (φάσμα e). Τα φάσματα της αντίδρασης του ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου στα αντίστοιχα pH είναι τα b, d και f, ενώ το φάσμα g αντιστοιχεί στην αντίδραση του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το H₂O₂. **B.** Τα αντίστοιχα με το A φάσματα του οξειδωμένου κυτοχρώματος a_3 , καθώς και της αντίδρασης του με το D₂O₂ στις ανάλογες τιμές pH. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 427 nm.

χαμηλού σπιν a^{3+}). Οι κορυφές στους 1612 και 1635 cm^{-1} αποδίδονται στην ν_{10} της αίμης a_3^{3+} και a^{3+} , αντίστοιχα. Η εξαφάνιση των δονήσεων ν_2 και ν_{10} της υψηλής διαμόρφωσης σπιν της αίμης a_3 κατά την αντίδραση του ενζύμου με το υπεροξείδιο του υδρογόνου

αποτελεί ένδειξη ότι σχηματίζονται οξυγονομένα ενδιάμεσα όμοια με αυτά που έχουν αναφερθεί στην αντίδραση του κυτοχρώματος *aa*₃ των θηλαστικών με το H₂O₂. Η απουσία ν_2 και ν_{10} σε χαμηλότερες συχνότητες αποκλείει την πιθανότητα σχηματισμού κατιονικής πορφυρινικής ρίζας. Επιπλέον, η αύξηση της έντασης της ν_{10} της αίμης *a*₃ στους 1638 cm⁻¹ σε όλο το εύρος των τιμών pH που μελετήθηκαν δείχνει ότι τόσο η 580 nm όσο και η 607 nm μορφή είναι παράγωγα της αίμης *a*₃ με χαμηλή διαμόρφωση σπιν. Οι δονήσεις που εμφανίζονται στο φάσμα της αντίδρασης του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το H₂O₂ (φάσμα g) και αφορούν την αίμη του ενεργού κέντρου *a*₃ είναι όμοιες με τις αντίστοιχες του φυσικού κυτοχρώματος *aa*₃. Το Σχήμα 3B δείχνει ότι παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται κατά την αντίδραση *aa*₃/D₂O₂ σε εύρος pD 6.5-9.6.



Σχήμα 4: Φάσματα διαφοράς συντονισμού Raman στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων της αντίδρασης του ενζύμου με H₂¹⁶O₂/H₂¹⁸O₂ 2-5 λεπτά μετά την έναρξη της αντίδρασης της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το φάσμα a αντιστοιχεί σε pH 6.5 και το b σε pH 7.8. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 427 nm.

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται τα φάσματα διαφοράς H₂¹⁶O₂/H₂¹⁸O₂ συντονισμού Raman στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων 2-5 λεπτά μετά την έναρξη της αντίδρασης της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το φάσμα a εμφανίζει ένα ζεύγος δονήσεων στους 790/755 cm⁻¹ για H₂¹⁶O₂/H₂¹⁸O₂ σε pH 6.5 και είναι η μόνη δόνηση που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στο φάσμα. Η συχνότητα, το εύρος και η ισοτοπική μετατόπιση της προαναφερόμενης δόνησης παρουσιάζουν ομοιότητα με τα αντίστοιχα μεγέθη της δόνησης του όξο-φερύλ ενδιάμεσου που παρατηρείται κατά την αντίδραση του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος aa₃ των θηλαστικών με το μοριακό οξυγόνο και του οξειδωμένου ενζύμου με το H₂O₂ και έχει αποδοθεί σε σύμπλοκο Fe⁴⁺=O²⁻ της αίμης α₃. Το φάσμα b απεικονίζει το αντίστοιχο φάσμα διαφοράς της αντίδρασης σε pH 7.8. Στο φάσμα αυτό εμφανίζονται δύο άλλες δονήσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου. Το πρώτο ζεύγος δονήσεων βρίσκεται στους 804/762 cm⁻¹, και το δεύτερο στους 358/342 cm⁻¹. Οι δονήσεις στους 804 cm⁻¹ και 355 cm⁻¹ παρουσιάζουν τις ίδιες συχνότητες που έχουν παρατηρηθεί κατά την αντίδραση του πλήρως ανηγμένου και μικτού σθένους κυτοχρώματος aa₃ των θηλαστικών με το μοριακό οξυγόνο και του οξειδωμένου ενζύμου με το H₂O₂. Η 804 cm⁻¹ δόνηση έχει αποδοθεί σε ένα δεύτερο όξο-φερύλ ενδιάμεσο, ενώ δεν υπάρχει συμφωνία για την απόδοση της δεύτερης δόνησης.

Συζήτηση

Προέλευση των 607 και 580 nm μορφών.

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως σήμερα για τον σχηματισμό των 607 και 580 nm μορφών συγκλίνουν στην άποψη ότι η κυτοχρωμική οξειδάση καταλύει διαφορετικές αντιδράσεις με το O₂ και το H₂O₂, οι οποίες εμφανίζουν μερικά όμοια ενδιάμεσα (20-23, 27, 31-50). Οι 580 και 607 nm μορφές μπορούν να σχηματιστούν με την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε οξειδωμένο ένζυμο σε όξινες συνθήκες ή την προσθήκη περίσσειας H₂O₂ σε βασικό pH, αντίστοιχα. Τα δεδομένα της αντίδρασης του μεταλλαγμένου ενζύμου Y280H/ H₂O₂ αποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός της 607 nm μορφής δεν συνδέεται με τις οξειδο-αναγωγικές ιδιότητες της Y280, και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς την παρουσία του συγκεκριμένου αμινοξέος, και κατά συνέπεια της δομής Fe⁴⁺=O²⁻ Cu_B²⁺-His- Y•, όπως είχε πρόσφατα προταθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Fabian και Palmer (17) ανέφεραν το

σχηματισμό μιας ρίζας σε ποσοστό 7% στην αντίδραση της οξειδωμένης CcO/H₂O₂ και ο MacMillan *et al.* (24) στην ίδια αντίδραση κατέγραψε την δημιουργία 20% ρίζας τυροσίνης. Υπολογισμοί DFT έχουν δείξει ότι η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στο N_ε άτομο της His276 και το C_ε άτομο της Tyr280 ευνοεί την μεταφορά φορτίου στο N_δ άτομο της ιστιδίνης και κατά συνέπεια είναι πιθανή η σύζευξη ανάμεσα στον χαλκό και την οργανική ρίζα, Y•-Cu(II)_B ↔ Y-Cu_B(III) (51). Η πιθανότητα του σχηματισμού της 607 nm μορφής ως αποτέλεσμα της παρουσίας Cu_B(III), ρίζας τρυπτοφάνης ή τυροσίνης παραμένει ερώτημα προς διευκρίνυση (17, 24, 25). Όπως παρουσιάζεται στα Σχήματα 1 και 2 ο σχηματισμός της 607 nm μορφής στην αντίδραση της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου αυξάνει στο εύρος pH 6.6-8.1. Η εξάρτηση που παρουσιάζει η 607 nm μορφή από το pH μεταβάλλεται από τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Στο πειραματικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη αλλά και σε αυτό των Fabian και Palmer (16-18) η αύξηση του pH προκαλεί την αύξηση του πληθυσμού της 607 nm μορφής, ενώ στην περίπτωση της πειραματικής διαδικασίας που αναφέρθηκε από τον Proshlyakov *et al.* (22) στο εύρος 7.4-10 ο πληθυσμός της 607 nm μορφής μειώνεται με την αύξηση του pH και της συγκέντρωσης του H₂O₂. Σε ουδέτερο pH και μεγάλες συγκεντρώσεις H₂O₂, η 607 nm μορφή εμφανίζεται μεταβατικά και στην συνέχεια μετατρέπεται στην 580 nm μορφή. Από την τελευταία προαναφερόμενη ομάδα επισημάνθηκε ακόμα ότι ο σχετικός πληθυσμός των δύο μορφών σε δεδομένη τιμή pH παρουσίαζε εξάρτηση από την απομόνωση του ενζύμου, ενώ τέτοια εξάρτηση δεν παρουσιαζόταν στις προκαλούμενες μεταβολές από την διακύμανση του pH.

Ένα σημείο που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αντίδραση του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος με το O₂ και το H₂O₂ είναι η καταγραφή της 607 nm μορφής και στις δύο αντιδράσεις, και της 580 nm μορφής στην δεύτερη αντίδραση. Τόσο ηλεκτρονιακοί όσο και δομικοί παράγοντες αναμένεται να επηρεάζουν την διαφορά ανάμεσα στα μέγιστα των μεταβάσεων των 607 και 580 nm μορφών. Ο συντελεστής απορρόφησης της πρώτης μορφής κυμαίνεται ~12 mM⁻¹ cm⁻¹ και της δεύτερης ~5 mM⁻¹ cm⁻¹. Η μειωμένη τιμή που παρουσιάζει ο συντελεστής της 580 nm μορφής οφείλεται σε ένα βαθμό στο γεγονός ότι το μέγιστο της μετάβασης παρουσιάζει διακύμανση από τα 575 ως τα 593 nm, στοιχείο που αποτελεί ένδειξη ότι στην συγκεκριμένη μετάβαση αντιστοιχούν περισσότερες από μία μορφές. Δεδομένου της εγγύτητας της τυροσίνης 280 στην αίμη α₃, αναμένεται μεταβολή του οπτικού φάσματος της αίμης α₃ στην περίπτωση που πραγματοποιείται σημαντική αύξηση του πληθυσμού της Y• κατά τον σχηματισμό της 607 nm μορφής. Μια τέτοια μεταβολή δεν

εμφανίζεται στα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας στην περίπτωση των αντιδράσεων μικτού σθένους ενζύμου/O₂ και οξειδωμένου ενζύμου/H₂O₂, τόσο για την περίπτωση του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου κυτοχρώματος *aa*₃. Υπάρχει γενική ομοφωνία ότι η 607 nm μορφή μετατρέπεται σε μια άλλη μορφή με μέγιστο που κυμαίνεται ανάμεσα στα 575 με 593 nm, και σε συμφωνία με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα ετερογενών δεσμών υδρογόνου στην μακρινή θέση της κοιλότητας της αίμης *a*₃. Παρά το γεγονός ότι καταγράψαμε τον σχηματισμό της 607 nm μορφής τόσο στην αντίδραση του φυσικού όσο και του μεταλλαγμένου Y280H κυτοχρώματος *aa*₃ με το H₂O₂, παρατηρήσαμε την μετατόπιση σε μεγαλύτερο μήκος κύματος του μεγίστου της 580 nm μορφής κατά 6 nm στην περίπτωση της αντίδρασης του μεταλλαγμένου ενζύμου. Ο ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στην Y280 και την H276 ελέγχει σε ένα βαθμό την διευθέτηση του Cu_B στο διπυρηνικό κέντρο, ενώ και η υδρόξυ ομάδα της τυροσίνης βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου με την υδρόξυ ομάδα της πλευρικής υδρόξυαιθυλ-φαρνεσυλικής αλυσίδας της αίμης *a*₃. Παρόλο που δεν υπάρχει άμεση απόδειξη, ο ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στην μεταλλαγμένη σε ιστιδίνη Y280 και την H276 στο μεταλλαγμένο ένζυμο δεν είναι πιθανόν να υπάρχει. Σε πρόσφατη μελέτη μας υποστηρίξαμε ότι η πιθανολογούμενη απουσία του προαναφερόμενου ομοιοπολικού δεσμού έχει ως αποτέλεσμα την μετακίνηση του Cu_B προς την αίμη *a*₃, με συνέπεια την στερική αλληλεπίδραση του με τους δεσμευμένους στην αίμη *a*₃ υποκαταστάτες. Το διπυρηνικό κέντρο, όμως δεν ιφίσταται καταστροφική μεταβολή. Προτείνουμε ότι στην αντίδραση του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου με το H₂O₂, το μέγιστο της μετάβασης στα 593 nm οφείλεται σε οξο-φερύλ ενδιάμεσο από το οποίο απουσιάζουν οι ετερογενείς δεσμοί υδρογόνου, που παρατηρούνται στην περίπτωση του φυσικού ενζύμου.

Η τιμή p*K*_a 7.5 που προσδιορίσαμε για την μετάβαση της 607 στην 580 nm μορφή βρίσκεται σε συμφωνία με αναφορά των Fabian και Palmer (18). Οι συγγραφείς της προαναφερόμενης μελέτης ανέφεραν ότι η 607 nm μορφή μπορεί να σχηματιστεί με την έκθεση του οξειδωμένου ενζύμου σε CO σε ανοικτό στην ατμόσφαιρα περιβάλλον και η ενδογενής μετετροπή της στην 580 nm μορφή και στην συνέχεια στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου εμφανίζει εξάρτηση από το pH στο εύρος τιμών 3.0 με 7.6. Από την άλλη πλευρά, ο Kitagawa και οι συνεργάτες του (49) ακολούθησαν την ίδια διαδικασία για τον σχηματισμό της 607 nm μορφής σε pH 6.8, 7.4 και 8.0, χωρίς να αναφέρουν την μετατροπή της 607 στην 580 nm μορφή. Οι Fabian και Palmer (18), απέκλεισαν την πιθανότητα αμινοξύ με p*K*_a ~7 να ευθύνεται για την μετάβαση από την 607 στην 580 nm μορφή, διότι το ένζυμο πάνω από το

ουδέτερο pH αυτοανάγεται με όμοια ταχύτητα με αυτή του αποσχηματισμού της 607 nm μορφής, διαδικασία η οποία επιταχύνεται με την αύξηση του pH. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* δεν παρατηρήθηκε αυτοαναγωγή του ενζύμου στο εύρος pH 6.5-9.5 ούτε στα φάσματα απορρόφησης ορατού όπως επίσης ούτε στα φάσματα συντονισμού Raman, και κατά συνέπεια προτείνουμε ότι το pK_a της μετάβασης 607 στην 580 nm μορφή είναι 7.5.

Ανίχνευση και απόδοση των Raman δονήσεων των ενδιαμέσων.

Η απόδοση των δονήσεων του κυτοχρώματος aa_3 του βακτηρίου *P. denitrificans* έχει πραγματοποιηθεί (28, 52). Το μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε ως διέγερση ενισχύονται δονήσεις τόσο της αίμης χαμηλού σπιν α (S=O), όσο και της υψηλού σπιν αίμης α_3 (S=2), όπως επίσης και των οξυγονομένων ενδιαμέσων της αίμης α_3 . Η σημαντική διαφοροποίηση της συχνότητας στην οποία εμφανίζονται οι δονήσεις που χαρακτηρίζουν τον αριθμό συναρμογής και την διαμόρφωση σπιν των δύο αιμών επιτρέπουν την αναγνώριση των μεταβολών που πιθανόν να ιφίσταται κάθε αίμη κατά την δέσμευση νέων υποκατασταστών ή λόγω της διακύμανσης του pH. Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου σε εύρος τιμών pH και pD 6.5-9.5 αποδεικνύει ότι δεν πραγματοποιείται αυτοαναγωγή ούτε της αίμης α αλλά ούτε και της αίμης α_3 ως αποτέλεσμα της μεταβολής του pH, όπως είχε αναφερθεί προηγούμενα. Στα φάσματα συντονισμού Raman που αντιστοιχούν στην αντίδραση CcO/H₂O₂ οι δονήσεις που χαρακτηρίζουν την διαμόρφωση σπιν, ν_2 και ν_{10} , αποδεικνύουν ότι σχηματίζεται χαμηλού σπιν σύμπλοκο της αίμης α_3 , ενώ ταυτόχρονα αποκλείουν την δημιουργία π-κατιονικής πορφυρινικής ρίζας. Ο δομικός χαρακτηρισμός των 607 και 580 nm μορφών έχει και εξακολουθεί να αποτελεί ένα ζήτημα πάνω στο οποίο εμφανίζονται σημαντικές διαφωνίες. Οι δύο προαναφερόμενες μορφές αρχικά παρατηρήθηκαν σε μιτοχόνδρια κατά την αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο κυτόχρωμα c (53). Ο σχηματισμός του οξο-φερύλ ενδιάμεσου στην αντίδραση της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4, απευθύνεται στο παραπάνω ζήτημα και αποδεικνύει ότι η 607 nm μορφή συνδέεται με φερύλ ενδιάμεσο Fe(IV)=O το οποίο χαρακτηρίζεται από την δόνηση τάσης στους 804 cm⁻¹, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες του Kitagawa και των συνεργατών του (20-22). Η 607 nm μορφή συνδέεται επίσης με μια δεύτερη δόνηση που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 358 cm⁻¹ (βλ. παρακάτω). Η 580 nm μορφή αντιστοιχεί σε ένα δεύτερο οξο-

φερύλ ενδιάμεσο με δόνηση τάσης στους 790 cm⁻¹, το οποίο επίσης βρίσκεται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα και την απόδοση που υιοθετεί η ομάδα Kitagawa.

Οι ιδιότητες των ενδιάμεσων που χαρακτηρίζονται από δονήσεις στην περιοχή συχνοτήτων 785-805 cm⁻¹ παρουσιάζουν πολυπλοκότητα και έχουν δωθεί διαφορετικές ερμηνείες. Επιπλέον, η απόδοση της δόνησης στους 358 cm⁻¹ αποτελεί ένα ζήτημα που δεν έχει διευκρινιστεί. Τόσο ο Kitagawa (20-22, 47, 50) όσο και ο Rousseau (48) και οι συνεργάτες τους έχουν αποδώσει την τελευταία δόνηση σε δόνηση κάμψης His-Fe⁴⁺=O²⁻ ενός παραμορφωμένου φερύλ. Οι τελευταίοι συγγραφείς θεώρησαν ότι η 358 cm⁻¹ δόνηση συνυποδηλώνει την 790 cm⁻¹ δόνηση του φερύλ ενδιάμεσου και έχει ένα αναγωγικό ισοδύναμο διαφορά σε σχέση με την 800 cm⁻¹ δόνηση που ανέφερε η ομάδα Kitagawa (47). Η εναλλακτική πρόταση από τον Varotsis *et al.* (43, 45) για την 358 cm⁻¹ δόνηση είναι ότι προέρχεται από το υδροπερόξυ ενδιάμεσο, Fe³⁺-O⁻-O(H), που σχηματίζεται κατά την αντίδραση της πλήρως ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το O₂.

Πρόσφατα, ο Proshlyakov *et al.* (13) παρακολούθησε την αντίδραση του μικτού σθένους ενζύμου με το οξυγόνο κατά την οποία σχηματίζεται η 607 nm μορφή, και με την χρήση 416 nm διέγερσης ανέφερε την δημιουργία οξοφερύλ ενδιάμεσου με δόνηση στους 804 cm⁻¹ και την ταυτόχρονη παρατήρηση της 358 cm⁻¹ δόνησης. Επιπλέον, ο Kim *et al.* (49) ανέφερε τον σχηματισμό της 607 nm μορφής σε πείραμα απευθείας μίξης MV-CO ενζύμου/O₂ και απέδωσε την δόνηση που κατέγραψε στους 804 cm⁻¹ στο ίδιο οξοφερύλ ενδιάμεσο που δημιουργείται στις αντιδράσεις πλήρως ανηγμένου και μικτού σθένους ενζύμου με το O₂ και οξειδωμένου ενζύμου/H₂O₂. Δεν ανιχνεύθηκαν όμως οι 790 και 358 cm⁻¹ δονήσεις. Η ανίχνευση της 804 cm⁻¹ δόνηση πραγματοποιήθηκε με την χρήση ενέργειας διέγερσης μήκους κύματος στα 441 και 607 nm αλλά όχι με 413.1 και 421.3 nm. Αδιευκρίνιστο παραμένει το ερώτημα γιατί η 804 cm⁻¹ δόνηση ανιχνεύθηκε μόνο με διέγερση 441 nm, εφόσον θεωρήθηκε ότι προέρχεται από το ίδιο οξοφερύλ ενδιάμεσο με το αντίστοιχο που σχηματίζεται κατά τις αντιδράσεις πλήρως ανηγμένου και μικτού σθένους ενζύμου με το οξυγόνο και οξειδωμένης οξειδάσης/ H₂O₂. Η 804 cm⁻¹ δόνηση σε προηγούμενες μελέτες έχει ανιχνευθεί με διέγερση 416 nm στην αντίδραση MV/O₂ και με 423 nm στην αντίδραση πλήρως ανηγμένης CcO/O₂ από την ίδια ομάδα, όπως και με 427 nm στην αντίδραση οξειδωμένης CcO/H₂O₂ (13, 20-22, 47). Επιπλέον, η 358 cm⁻¹ δόνηση που εμφανίζεται τόσο στην αντίδραση MV/O₂, όσο και πλήρως ανηγμένης CcO/O₂, καθώς επίσης και οξειδωμένης CcO/H₂O₂, δεν παρατηρήθηκε από τον Kim *et al.* (49). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι παρόλο που η 607 nm μορφή δημιουργήθηκε στα πειράματα των Proshlyakov *et al.* (13) και Kim *et*

al. (49), ωστόσο οι 804 και 358 cm⁻¹ δονήσεις προέρχονται από διαφορετικά σύμπλοκα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στα δύο προαναφερόμενα πειράματα η 804 cm⁻¹ αποδόθηκε στην δόνηση τάσης Fe(IV)=O, διότι η συχνότητα η ισοτοπική της μετατόπιση παρουσίασαν ομοιότητα με την αντίστοιχη δόνηση των 804 cm⁻¹ που είχε ανιχνευθεί στις αντιδράσεις ανηγμένου ενζύμου/O₂ και οξειδωμένου ενζύμου/H₂O₂. Και στις δύο παραπάνω αντιδράσεις, και μάλιστα στην τελευταία με 607 nm διέγερση, η ομάδα Kitagawa απέδειξε με την χρήση ¹⁶O¹⁸O ότι η 804 cm⁻¹ δόνηση προέρχεται από φερύλ Fe(IV)=O ενδιάμεσο (20). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, όμως το γεγονός ότι σε μοντέλα αίμης-O-O-Cu η ν(O-O) εμφανίζεται στους 804 cm⁻¹ (54). Με βάση την παραπάνω ανάλυση, η 607 nm μορφή περιέχει δύο διαφορετικά ενδιάμεσα με όμοιες δονήσεις συντονισμού Raman στους 804 cm⁻¹. Στην περίπτωση που ένα μόνο ενδιάμεσο εμφάνιζε δόνηση στους 804 cm⁻¹, τότε ο Kim *et al.* (49) θα μπορούσε να ανιχνεύσει την δόνηση αυτή και με 421.3 nm διέγερση, κάτι όμως που όπως αναφέρεται από τον συγγραφέα δεν ήταν δυνατό.

Έχει προταθεί ότι η καταγραφή της δόνησης 358 cm⁻¹ που θεωρείται ως δόνηση κάμψης, οφείλεται σε δυνάμεις που εξασκούνται από την πρωτεΐνη και έχουν ως αποτέλεσμα την παραμόρφωση του δεσμού Fe=O από την αναμενόμενη ευθεία διαμόρφωση της ομάδας His-Fe=O (47, 50). Το φερύλ ενδιάμεσο με την παραμορφωμένη γεωμετρία, θεωρήθηκε ότι εμφανίζει την αντίστοιχη δόνηση τάσης του περίπου στους 800 cm⁻¹, δόνηση η οποία αλληλεπικαλύπτεται με την γειτονική δόνηση των 804 cm⁻¹. Όμως, η ταυτόχρονη καταγραφή των 358 και 790 cm⁻¹ δονήσεων στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης CcO/O₂ από την ομάδα του Rousseau (48) αποδεικνύει ότι είναι σχεδόν απίθανο να σχηματίζεται παραμορφωμένης διαμόρφωσης φερύλ ενδιάμεσα με δονήσεις στους 358/804 cm⁻¹ αλλά και στους 358/790 cm⁻¹. Το παραπάνω επιχείρημα ενισχύεται αν αναλογιστεί κάποιος ότι τα προαναφερόμενα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στην ίδια αντίδραση, την αντίδραση της πλήρως ανηγμένης CcO/O₂. Επίσης, στην περίπτωση της αντίδρασης του οξειδωμένου κυτοχρώματος *bo*₃/H₂O₂ ανιχνεύθηκαν οι δονήσεις τάσης τόσο της παραμορφωμένης όσο και της μη-παραμορφωμένης διαμόρφωσης φερύλ ενδιάμεσου χωρίς όμως την ταυτόχρονη καταγραφή της 358 cm⁻¹ δόνησης (23).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η 358 cm⁻¹ σχετίζεται με την 804 cm⁻¹ δόνηση δίνοντας την εντύπωση ότι οι δύο αυτές δονήσεις προέρχονται από το ίδιο ενδιάμεσο. Όπως προαναφέρθηκε, το συμπέρασμα αυτό είχε εξαχθεί στην περίπτωση της αντίδρασης της ανηγμένης CcO/O₂ από τον Ogura *et al.* (47), ενώ ο Rousseau και οι συνεργάτες του (48) στην ίδια αντίδραση προτείνουν ότι συχετίζονται οι 358/790 cm⁻¹.

Βασιζόμενοι στο συμπέρασμα που εξάγαμε προηγουμένως, ότι δηλαδή οι 358 και 804 cm⁻¹ δεν προέρχονται από το ίδιο ενδιάμεσο αλλά η 607 nm μορφή περιέχει δύο διαφορετικές μορφές του ενζύμου, απορρίπτουμε την απόδοση της 358 cm⁻¹ ως δόνησης κάμψης φερύλ ενδιάμεσου με αντίστοιχη δόνηση τάσης στους 804 ή 790 cm⁻¹. Έχει επίσης αναφερθεί η πιθανότητα η 358 cm⁻¹ δόνηση να προέρχεται από Cu_B-OH σύμπλοκο. Όμως, η μόνη μεταβολή που παρατηρείται κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης σε διαλύτη D₂O είναι η αύξηση του εύρους της δόνησης και όχι η μετατόπισή της και κατά συνέπεια η ερμηνεία που περιλαμβάνει το σύμπλοκο Cu_B-OH καθίσταται μάλλον απίθανη, συμπέρασμα με το οποίο συμφωνεί η ομάδα Kitagawa. Ο Varotsis *et al.*(43) ανέφερε την καταγραφή της 358 cm⁻¹ δόνησης μόνο στα αρχικά χρονικά στάδια της αντίδρασης της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης με το οξυγόνο, μετά τον αποσχηματισμό του αρχικού όξυ Fe-O₂ ενδιάμεσου και πριν τον σχηματισμό του οξοφερύλ Fe⁴⁺=O²⁻ στους 790 cm⁻¹, δόνηση την οποία απέδωσε σε υδροπερόξυ Fe-OOH ενδιάμεσο. Το επιχείρημα που προτάθηκε για την απόρριψη της απόδοσης σε περόξυ μορφή ήταν ότι το ζεύγος 358/342 cm⁻¹ θα έπρεπε να εμφανίζει διαφορετικές συχνότητες δόνησης ανάμεσα σε Fe-¹⁶O¹⁸OH και Fe-¹⁶O¹⁶OH και ανάμεσα σε Fe-¹⁸O¹⁶OH και Fe-¹⁸O¹⁸OH. Το ανώτατο όριο, όμως, μετατόπισης για την ομάδα Fe-O-O γωνίας 120° είναι 2 cm⁻¹, που αποτελούν πολύ μικρή διαφοροποίηση για την διακριτικότητα των μετρήσεων συντονισμού Raman. Με δεδομένο τις αντιφάσεις που έχουν αναφερθεί στην ανάλυση μας, και την προηγούμενη καταγραφή της δόνησης αυτής στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το οξυγόνο χωρίς την παράλληλη εμφάνιση δονήσεων στην περιοχή 780-804 cm⁻¹, δεν μπορούμε με βεβαιότητα να αποδώσουμε την 358 cm⁻¹ δόνηση της αντίδρασης της οξειδωμένης οξειδάσης με το H₂O₂ σε κάποιο ενδιάμεσο.

Τα ενδιάμεσα που έχουν παρατηρηθεί στις αντιδράσεις της κυτοχρωμικής οξειδάσης με O₂ και H₂O₂ παρουσιάζονται κοινά σε ορισμένα βήματα. Ο Varotsis *et al* (43) και μετέπειτα ο Rousseau και οι συνεργάτες του (48) έδειξαν ότι η καταλυτική αντίδραση της κυτοχρωμικής οξειδάσης αποτελείται από διακλαδούμενο μηχανισμό μετά το αρχικό όξυ ενδιάμεσο. Στους μηχανισμούς που προτάθηκαν από τους δύο συγγραφείς περιλαμβάνεται ο σχηματισμός ενός περόξυ Fe³⁺-O⁻-O⁻ και ενός υδροπερόξυ Fe³⁺-O-OH ενδιάμεσου, αν και ο Rousseau υιοθετεί την ερμηνεία του Ogura *et al.* (47) ότι η 358 cm⁻¹ δόνηση προέρχεται από την δόνηση κάμψης της ομάδας His-Fe-O. Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι και στην περίπτωση της αντίδρασης της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης με το υπεροξείδιο του υδρογόνου υπάρχει διακλάδωση της αντίδρασης, που πραγματοποιείται με

τον σχηματισμό οξοφερύλ (804 cm⁻¹) ενδιάμεσου που μετατρέπεται στην 580 nm μορφή με χαρακτηριστική δόνηση ν(Fe⁴⁺=O²⁻) στους 790 cm⁻¹.

Με βάση τους προτεινόμενους μηχανισμούς για την καταλυτική πορεία, παρατηρούνται ομοιότητες ανάμεσα στην κυτοχρωμική οξειδάση και τις περοξειδάσες όπως επίσης και τις καταλάσες ως προς την χημεία διάσπασης του δεσμού O-O και των προϊόντων που προκύπτουν από τις αντίστοιχες αντιδράσεις. Στην περίπτωση των περοξειδασών και των καταλασών, το ένζυμο χρησιμοποιεί ένα ηλεκτρόνιο από το μέταλλο της αίμης και ένα δεύτερο από οργανική ομάδα για την αναγωγή του H₂O₂ με διαδικασία ενός βήματος σε O⁻ και OH⁻ (ενδιάμεσο I). Σε ακόλουθο βήμα το ενδιάμεσο I ανάγεται και σχηματίζει το ενδιάμεσο II, το οποίο χαρακτηρίζεται από Fe(IV)=O δομή. Η οξείδωση της αίμης α₃ στην κυτοχρωμική οξειδάση, όπως πραγματοποιείται στο ενδιάμεσο I των περοξειδασών, μπορεί να αποκλειστεί με βάση τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης ορατού και συντονισμού Raman. Επίσης το συμπέρασμα σχετικά με την εμπλοκή της τυροσίνης 280 σε ρόλο καταλύτη οξέος-βάσης, όπως η μακρινή ιστιδίνη στην περίπτωση της HRP, θεωρούμε ότι είναι απίθανο με βάση τα δεδομένα των φασμάτων απορρόφησης ορατού του μεταλλαγμένου Y280H ενζύμου. Η πρόταση που έχει διατυπωθεί είναι ότι η αποπρωτονιωμένη Y280 λαμβάνει ένα πρωτόνιο από το H₂O₂ και στην συνέχεια δρα ως δότης πρωτονίου για την ετερολυτική διάσπαση του δεσμού O-O και την δημιουργία του οξοφερύλ ενδιάμεσου και H₂O. Απουσία της Y280 ένα γλουταμικό αμινοξύ, με πιθανό υποψήφιο το Glu278, ή μια ιστιδίνη μπορεί να διαδραματίσει το ρόλο καταλύτη οξέος-βάσης. Στην περίπτωση των χλωροπεροξειδασών έχειδειχθεί ότι ένα γλουταμικό οξύ δρα ως καταλύτης οξέος-βάσης, και συγκεκριμένα το Glu186 το οποίο βρίσκεται στην θέση που αντιστοιχεί στην μακρινή ιστιδίνη στην περίπτωση της HRP.

Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι η 607 nm μορφή σχηματίζεται τόσο στην αντίδραση MV CcO/O₂ όσο και την αντίδραση CcO/H₂O₂, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία της Y280. Τα προϊόντα της τελευταίας αντίδρασης τόσο του φυσικού όσο και του Y280H μεταλλαγμένου ενζύμου είναι σύμπλοκα χαμηλού σπιν της αίμης α₃. Στην αντίδραση του φυσικού κυτοχρώματος αα₃ με το υπεροξείδιο του υδρογόνου εμφανίζονται τρεις Raman δονήσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου στους 804, 790, και 358 cm⁻¹. Οι δύο πρώτες αποδίδονται στην δόνηση τάσης Fe=O των φερύλ ενδιάμεσων που αντιστοιχούν στην 607 και 580 nm μορφές, ενώ για πρώτη φορά παρουσιάζεται η 358 cm⁻¹ δόνηση να συνοδεύεται από την 804 cm⁻¹ στην αντίδραση κυτοχρωμικής οξειδάσης/H₂O₂.

Βιβλιογραφία

1. Wikström, M. (1989) *Nature* **338**, 776-778.
2. Babcock, G. T., and Wikström, M. (1992) *Nature*, **356**, 301-309.
3. Michel, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12819-12824.
4. Michel, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 15129-15140.
5. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
6. Gennis, R. B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 241-248.
7. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
8. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S., (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
9. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J, Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T., (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
10. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
11. Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., and Michel, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10547-10553.
12. Kanti Das, T., Pecoraro, C., Tomson, F. L., Gennis, R. B., and Rousseau D. L. (1998) *Biochemistry* **37**, 14471-14476.
13. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Babcock, G. T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8020-8025.
14. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., Demaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D.L., Babcock, G. T. (2000) *Science* **290**, 1588-1591.
15. Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B., Palmer, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13114-13117.
16. Fabian, M., Palmer, G. (1995) *Biochemistry* **34**, 1534-1540.
17. Fabian, M., Palmer, G. (1995) *Biochemistry* **34**, 13802-13810.
18. Fabian, M., Palmer, G. (2001) *Biochemistry* **40**, 1867-1874.
19. Pecoraro, C., Gennis, R. B., Vygodina, T. V., Konstantinov, A.A. (2001) *Biochemistry* **40**, 9695-9708.
20. Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appelman, E. H., Kitagawa, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **47**, 29385-29388.

21. Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *Biochemistry* **35**, 76-82.
22. Proshlyakov, D. A., Ogura, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *Biochemistry* **35**, 8580-8586.
23. Uchida, T., Mogi, T., Kitagawa, T. (2000) *Biochemistry* **39**, 6669-6678.
24. MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T., and Michel, H. (1999) *Biochemistry* **38**, 9179-91884.
25. Rigby, S. E. J., Jünemann, S., Rich, P. R., Heathcote, P. (2000) *Biochemistry* **39**, 5921-5928.
26. Zaslansky, D., Smirnova, I., Brzezinski, P., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Gennis, R. B. (1999) *Biochemistry* **38**, 16016-16023.
27. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9445-9451.
28. Pinakoulaki, E.; Pfitzner, U.; Ludwig, B.; Varotsis C. *J. Biol. Chem.* (2002), **277**, 13563-13568.
29. Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B. & Ludwig, B. (1991) *Biophys. J.* **60**, 415-423.
30. Pfitzner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B, & Richter, O.-M. H. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
31. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6604-6607.
32. Varotsis, C., Woodruff, W. H., Babcock, G. T. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6439-6440
112, 1297.
33. Varotsis, C., Woodruff, W. H., Babcock, G. T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11131-11136.
34. Varotsis, C., Babcock, G.T. (1990) *Biochemistry* **32**, 7357-7362.
35. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 1380-1384.
36. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2491-2495.
37. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8408-8412.
38. Han, S., Ching, Y.-C., Rousseau, D. L. (1990) *Nature* **348**, 89-90.
39. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5630-5631.
40. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 14721-14723.
41. Ogura, T., Takahashi, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1991) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 2901-2907.

42. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appleman, E. H., Kitagawa, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8527-8536.
43. Varotsis, C., Appleman, E. H., Babcock, G. T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 237-241.
44. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appleman, E. H., Kitagawa, T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29385-29388.
45. Varotsis, C., Babcock, G.T., Lauraeus, M., Wikstrom, M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1231**, 111-116.
46. Varotsis, C., Babcock, G.T. (1995) *J. Am. Chem. Soc* **117**, 11260-11269.
47. Ogura, T., Hirota, S., Proshlyakov, D. A., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 5443-5449.
48. Han, S., Takahashi, S., Rousseau, D L. (1999) *J. Biol. Chem.* **275**, 1910-1919.
49. Kim, Y., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Kitagawa, T. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 757-758.
50. Kitagawa, T. (2000) *J. Inorg. Biochem.* **82**, 9-18.
51. Kannt, A., Lancaster, R. D., Michel, H. (1998) *Bioophys. J.* **74**, 708-721.
52. Heibel, G. E., Hildebrand, P., Ludwig, B., Steinrücke, P. Soulimane, T. & Buse, G. (1993) *Biochemistry* **32**, 10866-10877.
53. Wikstrom, M., Morgan, J. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10266-10273.
54. Sasaki, T., Nakamura, N., Naruta, Y. (1998) *Chemistry Letters* 351-352.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

**Η *caa*₃-τύπου Κυτοχρωμική *c* Οξειδάση από το *Thermus thermophilus* Περιέχει Μια Ιδιαίτερη Ενεργή Θέση:
FTIR και Step-Scan FTIR Μελέτη.**

Περίληψη

Η φασματοσκοπία Fourier-transform υπερύθρου και η step-scan time-resolved FTIR χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου του κυτοχρώματος *caa*₃ με το μονοξείδιο του άνθρακα. Ανιχνεύθηκαν συνολικά τρεις δονήσεις του δεσμευμένου στην αίμη α_3 CO, με την κύρια δόνηση να εμφανίζεται στους 1958 cm⁻¹ και τις δύο μικρότερες στους 1967 και 1975 cm⁻¹ με αναλογία 7:1:1, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι δονήσεις παρέμειναν αμετάβλητες κατά την ανταλλαγή H₂O/D₂O, και οι συχνότητες τους βρίσκονται 10 cm⁻¹ υψηλότερα από τις αντίστοιχες που είχαν αναφερθεί για το ίδιο σύμπλοκο στους 21 K (Einarsdóttir, O., Killough, P. M., Fee, J. A., and Woodruff, W. H. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2405-2408). Τα time-resolved FTIR πειραματικά δεδομένα δείχνουν τον σχηματισμό σε θερμοκρασία δωματίου ενός ασταθούς συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO σύμφωνα με την εμφάνιση της δόνησης στους 2062 cm⁻¹ μετά την φωτοδιάσπαση του CO από την αίμη α_3 . Συνεπώς, το κυτόχρωμα *caa*₃ είναι το μόνο μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοπρωτεϊνών που το διπυρηνικό του κέντρο αποτελείται από μία αίμη α_3 -τύπου της β-διαμόρφωσης και ένα άτομο Cu_B α-διαμόρφωσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου άλλων μελών της οικογένειας των τελικών οξειδασών που έχουν ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της α-διαμόρφωσης δεν είναι απαραίτητες για την ενζυματική δραστηριότητα. Ο αποσχηματισμός του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO είναι διφασικός και πραγματοποιείται σταθερά 2.3x10⁴ s⁻¹ (ταχεία φάση, 35%) και 36.3 s⁻¹ (αργή φάση, 65%). Η επαναδεύμευση του CO στην αίμη α_3 πραγματοποιείται με παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας 34.1 s⁻¹.

Εισαγωγή

Το θερμόφιλο gram-αρνητικό βακτήριο *Thermus thermophilus* HB8 (ATCC27634) εκφράζει τα κυτοχρώματα *caa*₃ και *ba*₃, ως τελικές οξειδάσες που ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε νερό (1). Το πρώτο κυτόχρωμα δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ενώ η κρυσταλλική δομή του δεύτερου αναφέρθηκε πρόσφατα (2). Τα δύο κυτοχρώματα καταλύουν επίσης την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σε N₂O κάτω από αναερόβιες συνθήκες, σε αντίθεση με την ευκαρυωτική μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση *aa*₃ (CcO) (3). Η αποκάλυψη αυτή στηρίζει την υπόθεση της κοινής εξέλιξης της βακτηριακής απονιτροποίησης και της αερόβιας αναπνοής. Το κυτόχρωμα *caa*₃ από το *Thermus thermophilus* περιέχει ένα μικτού σθένους ομοπυρηνικό κέντρο χαλκού [Cu_A^{1.5+}-Cu_A^{1.5+}], δύο χαμηλού σπιν αίμες (*α* και *ε* τύπου), και ένα διπυρηνικό κέντρο Cu_B και αίμης *a*₃ (1-2, 4). Η *α*-τύπου αίμη του κυτοχρώματος *caa*₃ περιέχει μια υδρόφοβη ομάδα υδροξυαιθυλ-τζερανύλτζερανύλ αντί της υδροξυαιθυλ-φαρνεσύλ αλυσίδας των περισσότερων βακτηριακών καθώς και των ευκαρυωτικών *aa*₃ οξειδασών (1). Η αίμη *ε*-τύπου (δότης ηλεκτρονίων των κυτοχρωμικών οξειδασών) του κυτοχρώματος *caa*₃ είναι ομοιοπολικά δεσμευμένη στην πρωτεΐνη, όπως έχει βρεθεί σε ελάχιστα άλλα βακτήρια. Εφόσον το κυτόχρωμα *caa*₃ είναι μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών, η μελέτη της δομής και λειτουργίας του είναι απαραίτητη για την κατανόηση δυνατότητας του να καταλύει τόσο την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου όσο και του μονοξειδίου του αζώτου.

Τα FTIR φάσματα CO-συμπλόκων αιμοχαλκοξειδασών έχουν αποκαλύψει αρκετά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του διπυρηνικού κέντρου των μελών της οικογένειας, όπως η ταυτότητα του μετάλλου που προσδένει το CO, αλλά και αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους αξονικούς υποκαταστάτες και την αίμη καθώς επίσης με το περιβάλλον του Cu_B (5-14). Κρυογονικές τεχνικές έχουν συνδιαστεί επιτυχώς με την φασματοσκοπία FTIR για την παγίδευση ασταθών ενδιάμεσων μέσω του παγώματος του CO-συμπλόκου της πρωτεΐνης σε κρυογονικές θερμοκρασίες και στην συνέχεια την φωτοδιάσπαση του δεσμευμένου στην αίμη CO (6-10). Πρόσφατα, αναφέρθηκε η σύγκριση ανάμεσα στα ενδιάμεσα που παράγονται κατά την φωτοδιάσπαση των CO-συμπλόκων του κυτοχρώματος *aa*₃ των θηλαστικών και του κυτοχρώματος *ba*₃ από το βακτήριο *E.coli*, σε κρυογονικές θερμοκρασίες και τα αντίστοιχα που δημιουργούνται σε θερμοκρασία δωματίου, με αρκετά ενδιαφέροντα αποτελέσματα (13). Παρά το γεγονός ότι οι συχνότητες των δονήσεων αίμης-CO και Cu_B¹⁺-CO είναι όμοιες ανάμεσα στα φάσματα σε κρυογονικές θερμοκρασίες και σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο

διαφορές παρατηρούνται στις συχνότητες σημάτων που οφείλονται στην δόνηση τάσης C=O καρβοξυλικών ομάδων πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων όπως γλουταμικών ή ασπαρτικών. Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν στο γεγονός ότι στα φάσματα σε κρυογονικές θερμοκρασίες το σύμπλοκο Cu_B¹⁺-CO δεν έχει μεταβατικό χαρακτήρα αλλά είναι η τελική κατάσταση. Αντίθετα σε θερμοκρασία δωματίου το CO απόδεσμεύεται από τον χαλκό σε κλίμακα μικρο-δευτερολέπτων.

Σε FTIR μελέτη με φάσματα «φως» μείον «σκοτάδι» (δηλαδή καταγραφή φασμάτων κατά την διάρκεια φωτόλυσης μείον τα φάσματα χωρίς την πραγματοποίηση φωτόλυσης) του κυτοχρώματος *caa*₃ στους 21 K αναγνωρίστηκαν δύο δονήσεις τάσης δεσμευμένου CO στους 1953 cm⁻¹ και 1947 cm⁻¹ (6). Επίσης στο φάσμα καταγράφησαν άλλες τρεις δονήσεις μικρής έντασης στους 1965 cm⁻¹, 2036 cm⁻¹, και 2060 cm⁻¹, με σημαντικά χαμηλό σήμα/θόρυβο, ενώ δεν επιβεβαιώθηκαν και με την χρήση ισοτοπικά επισημασμένου μονοξειδίου του άνθρακα. Η παραπάνω μελέτη πραγματοποιήθηκε στους 21 K και δεν ανέλυσε την προέλευση των χαμηλών συχνοτήτων που καταγράφηκαν για το CO σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών. Η μετατόπιση των δύο κυρίων δονήσεων στους 1953 cm⁻¹ και 1947 cm⁻¹ στο κυτόχρωμα *caa*₃ του βακτηρίου *T. thermophilus* (6), σε σχέση με τους 1963 cm⁻¹ του κυτοχρώματος *aa*₃ των θηλαστικών (5, 8), τους 1966 cm⁻¹ της οξειδάσης *aa*₃ του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans* (10), και τους 1982/1973 cm⁻¹ του κυτοχρώματος *ba*₃ του βακτηρίου *T. thermophilus* (6), θα μπορούσε να χαρακτηρίζει μια σημαντική διαφορά της ενεργής θέσης του κυτοχρώματος *caa*₃. Αναφέρθηκε επίσης ότι σε θερμοκρασία δωματίου στο *caa*₃ η εξισορρόπηση του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO με το CO στο διάλυμα πραγματοποιείται με σταθερά ταχύτητας $k_{-1} = 2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ και η επαναδεύμεση του CO στην αίμη α_3 με $k_2 = 50 \text{ s}^{-1}$ (5). Οι σταθερές αυτές είναι 35- και 20-φορές μικρότερες από τις αντίστοιχες που μετρήθηκαν για το κυτόχρωμα *aa*₃ των θηλαστικών ($k_{-1} = 7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1030 \text{ s}^{-1}$) και σημαντικά μεγαλύτερες από την εναλλακτική οξειδάση του βακτηρίου *T. thermophilus*, το κυτόχρωμα *ba*₃ (5, 6).

Στα πειράματα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία FTIR (14,15) για την μελέτη του συμπλόκου του κυτοχρώματος *caa*₃ με το μονοξείδιο του άνθρακα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική time-resolved step-scan για την διερεύνηση της δυναμικής του ενεργού κέντρου μετά την φωτόλυση του CO σε θερμοκρασία δωματίου, που αποτελεί σημαντικό βήμα για την κατανόηση των μοναδικών χημικών μηχανισμών των οξειδοαναγωγικών διαδικασιών του ενζύμου. Η διελεύκανση των ιδιοτήτων του διπυρηνικού κέντρου του κυτοχρώματος *caa*₃ συμβάλει στην κατανόηση της

φύσης του καταλυτικού κέντρου της οικογένειας των τελικών οξειδασών, αλλά και χρησιμεύει ως βάση σε περαιτέρω μελέτες προσθήκης NO στο ένζυμο. Τέλος, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την παρούσα μελέτη επιτρέπουν την σύγκριση των δομών που παρουσιάζουν μεγάλους πληθυσμούς σε θερμοκρασία δωματίου σε σχέση με τους αντίστοιχους των κρυογονικών θερμοκρασιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, πληθυσμό σε θερμοκρασία δωματίου συγκεντρώνουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις του δεσμευμένου στην αίμη *a*₃ υποκαταστάτη, με δονήσεις στους 1958, 1967 και 1975 cm⁻¹ και αναλογία 7:1:1. Οι συχνότητες των τριών προαναφερόμενων δονήσεων είναι μετατοπισμένες κατά 10 cm⁻¹ σε σχέση με της διαμορφώσης στους 21 K (6), και παρέμειναν αμετάβλητες κατά την ισοτοπική αντικατάσταση H₂O/D₂O. Η κυρίαρχη δόνηση του CO της αίμης εμφανίζεται στους 1958 cm⁻¹, ενώ του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO στους 2062 cm⁻¹, αποδεικνύοντας ότι η β- και η α- διαμόρφωση σταθεροποιούνται για την αίμη *a*₃ και τον Cu_B, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, το κυτόχρωμα *caa*₃ είναι το μόνο μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών που το διπυρηνικό του κέντρο αποτελείται από μία αίμη *a*₃-τύπου της β-διαμόρφωσης και ένα άτομο Cu_B α-διαμόρφωσης. Η παρακολούθηση της έντασης της απορρόφησης των δονήσεων του CO προσδιορίστηκαν οι χρόνοι του αποσχηματισμού του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO και της επαναδημιουργίας του συμπλόκου αίμης *a*₃²⁺-CO. Για την ερμηνεία των δεδομένων μας, προτείνουμε ένα μοντέλο για την δυναμική του διπυρηνικού κέντρου *a*₃²⁺/Cu_B¹⁺ μετά την φωτόλυση του CO.

Πειραματικές Διαδικασίες

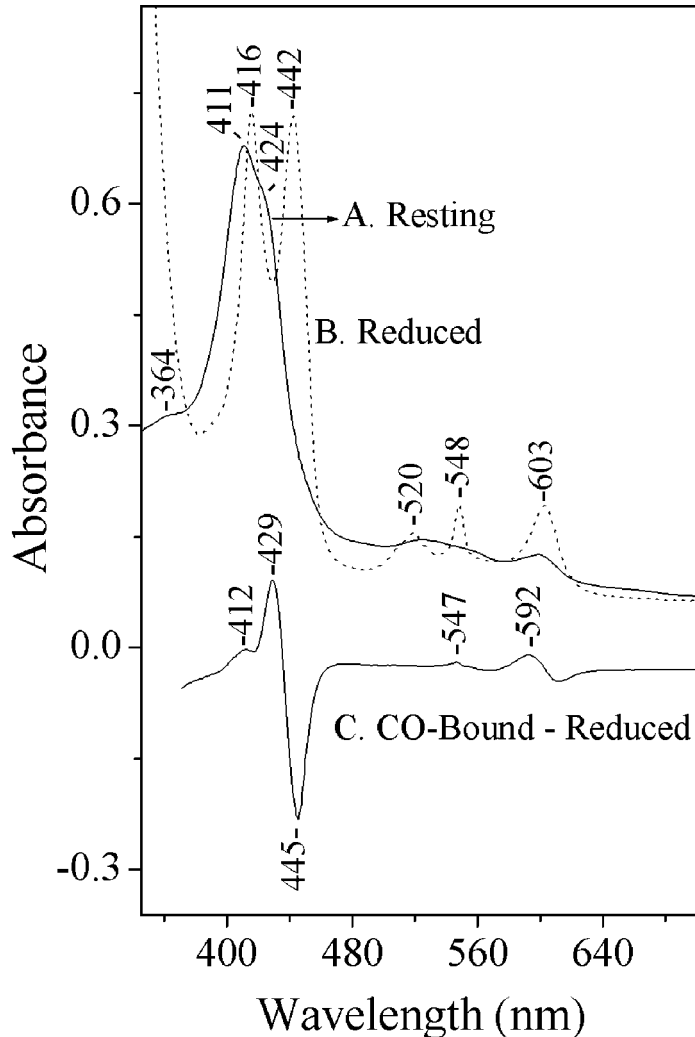
Η απομόνωση του κυτοχρώματος *caa*₃ από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus thermophilus* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παραπομπή (4). Η *aa*₃ οξειδάση από το *P. denitrificans* απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραπομπής (15) και το κυτόχρωμα *aa*₃ των θηλαστικών σύμφωνα με την παραπομπή (16) από καρδιά βοδιού. Η συγκέντρωση του *caa*₃ προσδιορίστηκε από το φάσμα οπτικής απορρόφησης του ανηγμένου μείον το οξειδωμένο ένζυμο και χρησιμοποιώντας συντελεστή απορρόφησης $\epsilon_{605}=11.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Το pD των δευτεριομένων διαλυμάτων μετρήθηκε με την χρήση pHμέτρου και υποθέτοντας pD=pH (ένδειξη) + 0.4. Τα δείγματα του ενζύμου ανάχθηκαν με dithionite και εκτέθηκαν σε 1 atm CO (συγκέντρωση στο διάλυμα 1 mM) υπό αναερόβιες συνθήκες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αναερόβια IR κυψελίδα με

παράθυρα CaCl₂ και ένα 0.025 mm spacer. Το αέριο CO αγοράστηκε από την Messer (Germany) και το ισοτοπικά επισημασμένο αέριο (¹³CO) από την Isotec. Για την λήψη των φασμάτων FTIR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα συγκέντρωσης 400-500 μM φασματοφωτόμετρο Bruker Equinox 55 FTIR εξοπλισμένο με mercury cadmium telluride ανιχνευτή, ψυχόμενο με υγρό άζωτο. Τα φάσματα παρουσιάζονται έχοντας αφαιρέσει το ρυθμιστικό διάλυμα και είναι ο μέσος όρος 1000 σαρώσεων. Η διακριτικότητα των στατικών FTIR μετρήσεων ήταν 2 cm⁻¹. Η φωτόλυση του συμπλόκου *caa*₃-CO επιτεύχθηκε με την χρήση παλμού 532 nm (πλάτους 7-ns και ενέργειας ~10 mJ/παλμό) από ένα Continuum Nd-YAG laser με ρυθμό επανάληψης 3 Hz. Τα time-resolved FTIR φάσματα καταγράφησαν με διακριτικότητα 8 cm⁻¹ και ανά 5 μs για τις μετρήσεις 5μs-8ms ή 100 μs για τις μετρήσεις 100 μs-80ms. Ο συνολικός αριθμός φασμάτων ήταν 800, με τα 40 να αντιστοιχούν σε φάσματα πριν και 760 μετά τον παλμό. Σε κάθε σημείο πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλήψεις. Οι μεταβολές της έντασης των δονήσεων καταγράφηκαν με MCT ανιχνευτή (dc-coupled) και μετατράπηκαν από αναλογικό σε δεκαδικό σήμα με 200- kHz, 16-bit, ADC μετασχηματιστή. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή είναι Blackman-Harris three-term με διακριτικότητα φάσης 32 cm⁻¹ και διόρθωση φάσης με τον αλγόριθμο Mertz. Τα φάσματα διαφοράς υπολογίστηκαν ως $\Delta A = -\log(I_S/I_R)$. Οι σταθερές ταχύτητας για κάθε φάση του αποσχηματισμού του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO και της επαναδεδύμευσης του CO στην αίμη *a*₃ υπολογίστηκαν με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε εκθετική συνάρτηση τριών παραμέτρων. Πριν και μετά το τέλος των μετρήσεων time-resolved step-scan FTIR λήφθησαν τα φάσματα οπτικής απορρόφησης του δείγματος για να εκτιμηθεί η σταθερότητα του, με φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible.

Αποτελέσματα

Το φάσμα απορρόφησης ορατού του κυτοχρώματος *caa*₃ από το *T. thermophilus* στην μορφή που απομονώνεται (οξειδωμένο) παρουσιάζει μέγιστα στην περιοχή της Soret μετάβασης στα 411 (αίμη *c*³⁺) και 424 nm (αίμες *a*³⁺ και *a*₃³⁺), και στην περιοχή των α και β ταινιών στα 600 nm (Σχήμα 1, φάσμα A). Το ανηγμένο ένζυμο παρουσιάζει Soret μέγιστο στα 416 (αίμη *c*²⁺) και 442 nm (αίμες *a*²⁺ και *a*₃²⁺), καθώς και μέγιστα στα 520, 548 (αίμη *c*²⁺) και 603 nm (*a*²⁺ και *a*₃²⁺) (Σχήμα 1, φάσμα B). Το φάσμα διαφοράς του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου του ενζύμου με το μονοξείδιο του άνθρακα μείον το ανηγμένο ένζυμο είναι

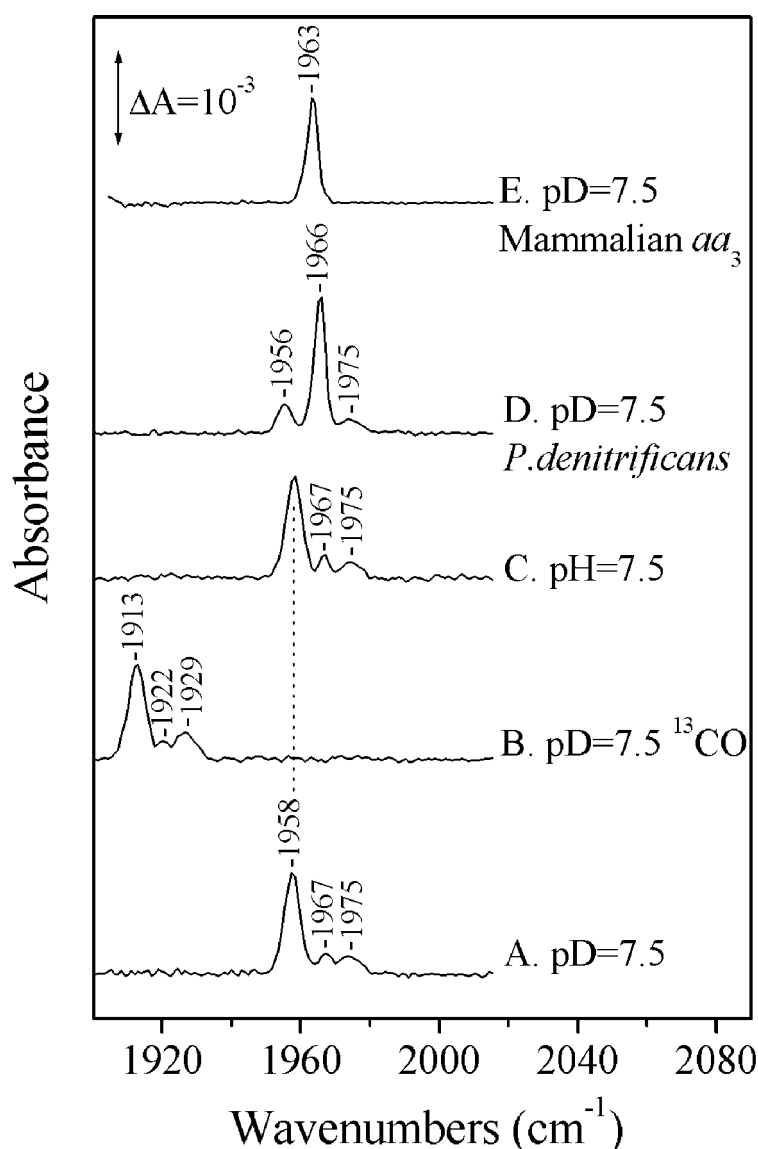
χαρακτηριστικό της δέσμευσης του CO στην αίμη α₃, όπως φαίνεται από τα μέγιστα στα 429 και 592 nm (Σχήμα 1, φάσμα C).



Σχήμα 1: Φάσματα απορρόφησης ορατού του κυτοχρώματος *caa*₃ από το *T. thermophilus*. Τα φάσματα A (συμπαγής γραμμή) και B (διακεκομμένη γραμμή) αντιστοιχούν στην οξειδωμένη και ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου. Το φάσμα διαφοράς C του συμπλόκου του πλήρους ανηγμένου κυτοχρώματος *caa*₃ με το CO μείον το ανηγμένο ένζυμο δείχνουν την δέσμευση του CO στην αίμη α₃.

Στο Σχήμα 2 (φάσματα A-C) παρουσιάζονται τα FTIR φάσματα των συμπλόκων του κυτοχρώματος *caa*₃ με το CO σε ουδέτερο pH και pD, και σε θερμοκρασία δωματίου. Για σύγκριση, παρατίθενται επίσης τα CO-σύμπλοκα των κυτοχρωμάτων *aa*₃ από το *Paracoccus denitrificans* (Σχήμα 2, φάσμα D) και των θηλαστικών (Σχήμα 2, φάσμα D). Τα φάσματα των CO-συμπλόκων του κυτοχρώματος *caa*₃ εμφανίζουν μία κύρια δόνηση στους 1958 cm⁻¹ και δύο μικρότερης έντασης στους 1967 και 1975 cm⁻¹, οι οποίες και παραμένουν ανεπηρέαστες από την ανταλλαγή ανάμεσα σε H₂O (φάσμα C) και D₂O (φάσμα A). Στο φάσμα του σύμπλοκο του ενζύμου με το ισοτοπικά επισημασμένο ¹³C¹⁶O οι τρεις δονήσεις μετατοπίζονται στους 1913, 1922 και 1929 cm⁻¹. Η απόδοση των δονήσεων στο δεσμευμένο

στην αίμη α_3 CO είναι προφανής, εφόσον η ισοτοπική μετατόπιση που εμφανίζουν ακολουθεί τους καθιερωμένους κανόνες. Το φάσμα του κυτοχρώματος aa_3 από το βακτήριο *P. denitrificans* παρουσιάζει την κύρια δόνηση στους 1967 cm^{-1} (α -διαμόρφωση) και δύο μικρότερες στους 1956 cm^{-1} (β -διαμόρφωση) και 1975 cm^{-1} (γ -διαμόρφωση), ενώ το φάσμα του ενζύμου των θηλαστικών εμφανίζει μία μοναδική $\nu(\text{CO})$ στους 1963 cm^{-1} (α -διαμόρφωση). Το μικρό εύρος της κύριας $\nu(\text{CO})$ του κυτοχρώματος caa_3 στους 1958 cm^{-1} (FWHM= 5 cm^{-1}) αποτελεί ένδειξη περιορισμένων επιτρεπτών διαμορφώσεων CO.

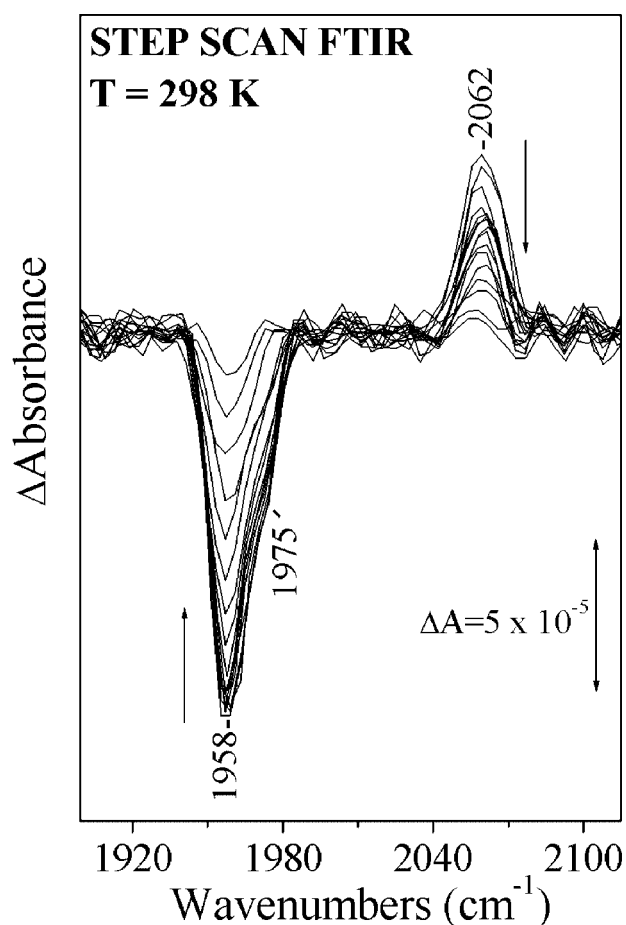


Σχήμα 2: FTIR φάσματα του CO συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος caa_3 σε H_2O και D_2O στους 298 K. (A) pD 7.5, (B) pD 7.5, ^{13}CO , (C) pH 7.5. Το CO συμπλόκο του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* (D), και των θηλαστικών (E,) σε pD=7.5 περιλαμβάνονται για σύγκριση. Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν 0.5 mM , το πάχος της κυψελίδας $25\ \mu\text{m}$, και η φασματική διακριτικότητα 2 cm^{-1} .

Η συχνότητα της κύριας δόνησης CO του κυτοχρώματος *caa*₃ παρουσιάζεται 8 και 5 cm⁻¹ χαμηλότερα από τις αντίστοιχες συχνότητες των CO-συμπλόκων των κυτοχρωμάτων *aa*₃ από το *P. denitrificans* και τα θηλαστικά, αντίστοιχα (8, 10, 15). Είναι, όμως παρόμοια με αυτή του κυτοχρώματος *cb*b₃, που η αίμη του διπυρηνικού του κέντρου δεν είναι τύπου *a*₃ ή *o*₃ (14). Το γεγονός ότι οι CO δονήσεις του κυτοχρώματος *caa*₃ δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην ανταλλαγή H/D δηλώνει την απουσία δεσμού υδρογόνου του δεσμευμένου CO με αμινοξέα της ενεργής θέσης. Αρκετοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ισχύ του δεσμού C-O. Για παράδειγμα αλληλεπιδράσεις στην μακρινή θέση της αίμης με τον Cu_B μπορούν να μεταβάλουν την διαμόρφωση της ομάδας Fe-C-O από την ευνοϊκή της συμμετρία προς μία κεκαμμένη διαμόρφωση αυξάνοντας την συχνότητα του C-O δεσμού. Επίσης, η ισχύς πιθανών δεσμών υδρογόνου της εγγύς ιστιδίνης είναι δυνατόν να επηρεάσει την ισχύ των δεσμών Fe-C και C-O που καθορίζεται και από τις αλληλεπιδράσεις με τον Cu_B (15, 17). Η δόνηση Fe-His της αίμης *a*₃ του κυτοχρώματος *caa*₃ εμφανίζεται στους 211 cm⁻¹ (4), συχνότητα που είναι παρόμοια με άλλες *aa*₃ τύπου οξειδάσες καθώς επίσης και με την διαμόρφωση της υψηλής συχνότητας του κυτοχρώματος *ba*₃ (193 και 208 cm⁻¹) (18). Συνδιάζοντας τις παραπάνω πληροφορίες με τα FTIR δεδομένα της παρούσας εργασίας και τα προηγούμενα RR δεδομένα (4), μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι το μακρινό περιβάλλον της αίμης *a*₃ είναι αυτό που επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τις δονητικές ιδιότητες του συμπλόκου *a*₃²⁺-CO.

Οι α-, β-, και γ-διαμορφώσεις έχουν αποδοθεί σε προηγούμενες μελέτες σε μεταβολές στην απόσταση ανάμεσα στο άτομο σιδήρου της αίμης *a*₃ και του Cu_B (15, 19). Η α-διαμόρφωση αντιπροσωπεύει μια περιορισμένη κοιλότητα της αίμης που δεν επιτρέπει την συναρμογή του CO στην αίμη χωρίς αυτό να δέχεται αλληλεπιδράσεις από τον Cu_B, ενώ στην περίπτωση της β-δομής ο Cu_B μετακινείται μακριά από τον δεσμευμένο υποκαταστάτη (21). Πρόσφατα δείξαμε ότι στην γ-διαμόρφωση ο Cu_B τοποθετείται πλησιέστερα στο σύμπλοκο *a*₃-CO, προκαλώντας την παραμόρφωση της ομάδας Fe-C-O από την ευνοϊκή συμμετρία της α-διαμόρφωσης (15). Κατά συνέπεια, αποδίδουμε την δόνηση στους 1958 cm⁻¹ στην β-διαμόρφωση και τις δονήσεις στους 1967 και 1975 cm⁻¹ στην α- και γ-δομή, αντίστοιχα. Όλες οι τελικές οξειδάσες με α-τύπου αίμη που έχουν μελετηθεί ως σήμερα διαθέτουν ως σταθερή διαμόρφωση σε ουδέτερο pH και θερμοκρασία δωματίου την α-διαμόρφωση (10, 17, 19-21). Το κυτόχρωμα *caa*₃ αποτελεί την μόνη οξειδάση τύπου α της οποίας το διπυρηνικό κέντρο διαθέτει ως σταθερή διαμόρφωση την β-δομή.

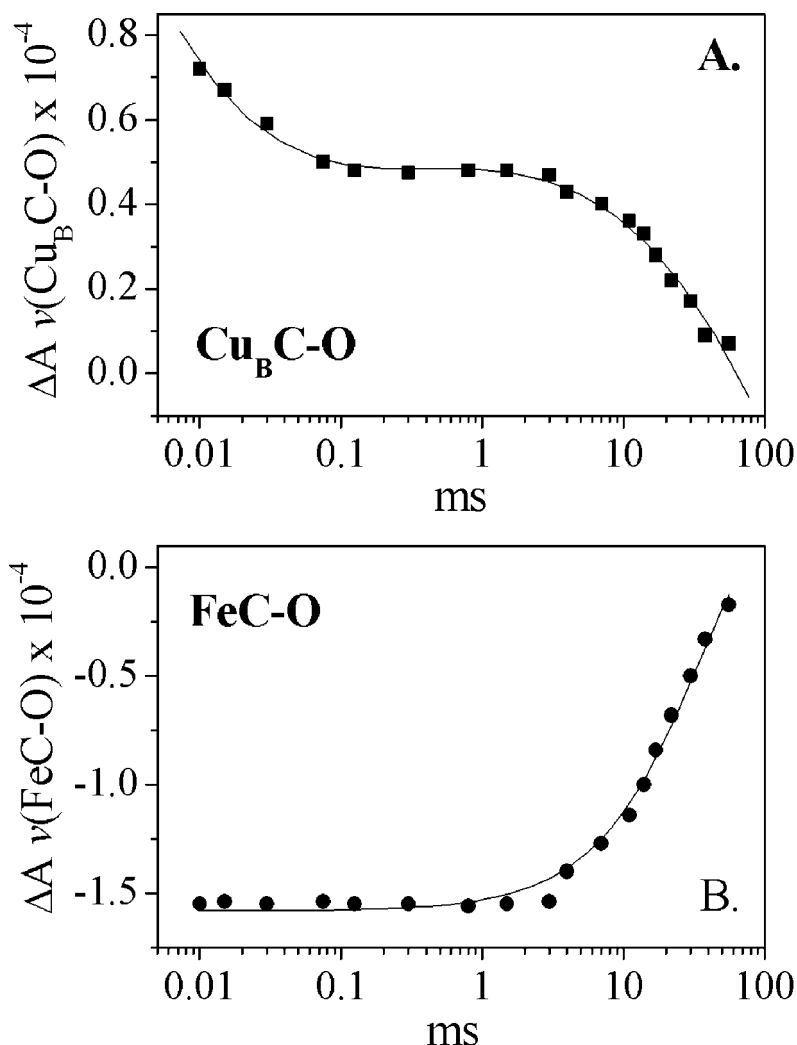
Το Σχήμα 3 απεικονίζει τα step-scan time-resolved FTIR φάσματα ($t_d = 10 \mu\text{s}$ -56 ms, 8 cm^{-1} διακριτικότητα) του πλήρως ανηγμένου συμπλόκου *caa*₃-CO μετά την φωτόλυση του CO από nanosecond παλμό laser (532 nm). Μετά την φωτόλυση του CO από την αίμη a_3 , ο υποκαταστάτης μεταφέρεται στον Cu_B . Οι αρνητικές δονήσεις στους $1958/1975 \text{ cm}^{-1}$ προέρχονται από το φωτολυμένο σύμπλοκο a_3^{2+} -CO και η θετική κορυφή στους 2062 cm^{-1} ($t_d = 10 \mu\text{s}$) αποδίδεται στην δόνηση τάσης C-O του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO, και η συχνότητα αλλά όχι και η έντασή του είναι όμοια με αυτή που αναφέρθηκε στους 21 K (6). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ένταση της δόνησης $\nu(\text{CO})$ του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO στους 21 K είναι σχεδόν στο σήμα/θόρυβο. Στις *aa*₃ τύπου οξειδάσες οι συχνότητες που έχουν καταγραφεί για το σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO στους 2064 και 2042 cm^{-1} συνδέονται με τις α - και β -διαμορφώσεις, αντίστοιχα (10, 20). Στο κυτόχρωμα *ccb*₃, όπου το διπυρηνικό κέντρο δεν διαθέτει την υδροξυαίθυλ-φαρνεσυλ πλευρική αλυσίδα καθώς επίσης και την υψηλά διατηρημένη στην οικογένεια των τελικών οξειδασών τυροσίνη 280 (*P. denitrificans* αριθμηση), η διαμόρφωση του Cu_B^{1+} -CO είναι η α -δομή με συχνότητα στους 2065 cm^{-1} (14).



Σχήμα 3: Step-scan FTIR φάσματα διαφοράς του CO συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος *caa*₃ (pD 7.5), σε 0.010, 0.015, 0.030, 0.075, 0.125, 0.300, 0.800, 1.5, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 22, 30, 38, and 56 ms μετά την φωτόλυση του CO. Η φασματική διακριτικότητα ήταν 8 cm^{-1} και η χρονική διακριτικότητα 5 και 100 μs για τις μετρήσεις 5 μs -4 ms και 100 μs -80 ms. Για την φωτόλυση του CO χρησιμοποιήθηκε παλμός 532 nm, 10 mJ/pulse.

Κατά συνέπεια, το σύμπλοκο $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CO}$ στο κυτόχρωμα *caa3* ανήκει στην α -διαμόρφωση και η πλευρική αλυσίδα της αίμης α_3 υδρόξυαιθυλ-τζεραυλτζερανύλ δεν έχει επίδραση στις δονητικές ιδιότητες του δεσμευμένου CO στην αίμη α_3 ή τον Cu_B . Στους αρχικούς χρόνους της μέτρησης (10-100 μs), η μείωση της έντασης της δόνησης στους 2062 cm^{-1} δείχνει την αποδέσμευση του υποκαταστάτη από το μεταβατικό σύμπλοκο $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CO}$, ενώ η ένταση της δόνησης $1958/1975\text{ cm}^{-1}$ παραμένει αμετάβλητη, δηλώνοντας ότι η αρχική φάση αποσχηματισμού του συμπλόκου $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CO}$ δεν συνοδεύεται από τον επανασχηματισμό του συμπλόκου $\alpha_3\text{ Fe}^{2+}\text{-CO}$. Ακολουθεί μια φάση (150 μs -3 ms) στην οποία δεν πραγματοποιούνται μεταβολές στην ένταση ούτε της αρνητικής ούτε της θετικής δόνησης. Τέλος, στους χρόνους μετά τα 4 ms συνεχίζεται η μείωση της έντασης στους 2062 cm^{-1} , που συνοδεύεται από την μείωση της αρνητικής δόνησης στους $1958/1975\text{ cm}^{-1}$. Σε 56 ms μετά την φωτόλυση οι εντάσεις όλων των δονήσεων έχουν μειωθεί σημαντικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι λόγω της διακριτικότητας των time-resolved φασμάτων (8 cm^{-1}) δεν μπορέσαμε να διαχωρίσουμε τις 1967 και 1975 cm^{-1} κορυφές, ωστόσο φαίνεται ότι η επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 πραγματοποιείται με την διατήρηση των α - (1967 cm^{-1}), β - (1958 cm^{-1}), και γ -διαμορφώσεων (1975 cm^{-1}) της ισορροπίας. Συνεπώς, κατά την διάρκεια της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη δεν παρατηρούνται μεταβατικές κινήσεις της πρωτεΐνης που θα επηρέαζαν την απόσταση $\text{Fe-CO}\dots\text{Cu}_B$, και άρα τις διαμορφώσεις που ιφίστανται στην ισορροπία (19).

Το σήμα/θόρυβο στα time-resolved FTIR φάσματα επιτρέπει την παρακολούθηση της έντασης των δονήσεων στους 2062 και $1958/1975\text{ cm}^{-1}$. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται ο χρόνος αποσχηματισμού του συμπλόκου $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CO}$ (γράφημα Α), όπως προσδιορίζεται από την μεταβολή της έντασης στους 2062 cm^{-1} των φασμάτων που περιλαμβάνονται στο Σχήμα 3, καθώς επίσης και ο σχηματισμός του συμπλόκου $\alpha_3^{2+}\text{-CO}$ (γράφημα Β) σύμφωνα με την μεταβολή της έντασης της δόνησης στους $1958/1975\text{ cm}^{-1}$. Το CO απομακρίνεται από τον Cu_B με ταχύτητα $2.3 \times 10^4\text{ s}^{-1}$ (ταχεία φάση, 35%) και 36.3 s^{-1} (αργή φάση, 65%) και επαναδεσμεύεται στην αίμη α_3 με παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας 34.1 s^{-1} σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 4: Συσχέτιση των 2062 cm^{-1} (A) και $1958/1975 \text{ cm}^{-1}$ (B) δονήσεων ως προς τον χρόνο μετά την φωτόλυση του CO. Το ΔA αντιστοιχεί στα φάσματα του σχήματος 3.

Συζήτηση

Προέλευση των Πολλαπλών Διαμορφώσεων Δεύσμευσης του CO

Η Einarsdóttir *et al.* (6) ανέφερε ως συχνότητες δόνησης των κύριων διαμορφώσεων του δεσμευμένου στο κυτόχρωμα *caa3* CO τις 1953 και 1947 cm^{-1} στους 21 K . Στα φάσματα του πλήρως ανηγμένου CO-συμπλόκου που καταγράψαμε σε θερμοκρασία δωματίου δεν ανιχνεύεται κορυφή στους 1947 cm^{-1} . Μια από τις πιθανές εκδοχές για την προαναφερόμενη διαφοροποίηση είναι ότι διαφορετικές διαμορφώσεις συγκεντρώνουν ανιχνεύσιμο πληθυσμό

σε χαμηλές θερμοκρασίες και θερμοκρασία δωματίου. Μεταβολές της διαμόρφωσης συναρτήσει της θερμοκρασίας έχουν μελετηθεί κυρίως στο κυτόχρωμα *aa*₃ των θηλαστικών και του *P. denitrificans* (7, 10). Στην περίπτωση της οξειδάσης των θηλαστικών αναφέρθηκε ότι μόνο συχνότητα της β-διαμόρφωσης μετατοπίζεται από τους 1948 cm⁻¹ στους 21 K στους 1959 cm⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου (7). Παρόμοια συμπεράσματα αναφέρθηκαν και από τον Rost *et al.* (10) που κατέγραψε μικρότερες μετατοπίσεις (~ 4 cm⁻¹) συναρτήσει της θερμοκρασίας για την β-διαμόρφωση του κυτοχρώματος *aa*₃ από το βακτήριο *P. denitrificans*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η συχνότητα της α-διαμόρφωσης των παραπάνω ενζύμων δεν μετατοπίζεται με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Στην μελέτη του *P. denitrificans* καταγράφηκε επίσης μεταβολή των πληθυσμών των α-και β-διαμορφώσεων συναρτήσει της θερμοκρασίας, με τον πληθυσμό της δεύτερης να ευνοείται στις χαμηλές θερμοκρασίες (10). Επιπλέον, λόγω της εμφάνισης της α-διαμόρφωσης σε σταθερή συχνότητα ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, προτάθηκε ότι η διαμόρφωση αυτή προέρχεται από άκαμπτο περιβάλλον, ενώ αντίθετα η εξάρτηση της β-διαμόρφωσης από την θερμοκρασία δηλώνει ένα εύκαμπτο πρωτεϊνικό περιβάλλον. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος *caa*₃ τόσο οι συχνότητες όσο και οι εντάσεις των CO-δονήσεων παρουσιάζουν εξάρτηση από την θερμοκρασία, και συνεπώς προτείνουμε ότι κατά την μετάβαση από τις χαμηλές θερμοκρασίες στην θερμοκρασία δωματίου πραγματοποιούνται δομικές μεταβολές που επηρεάζουν τον σχετικό πληθυσμό των α- και β-διαμορφώσεων.

Ο μοριακός μηχανισμός που προκαλεί την διαφοροποίηση των συχνοτήτων δόνησης της ομάδας Fe-C-O στο διπυρηνικό κέντρο αίμης/χαλκού είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρων. Σε μελέτη του CO-συμπλόκου του κυτοχρώματος *cbh*₃ του βακτηρίου *R. capsulatus* από τον Rousseau και τους συνεργάτες του προτάθηκε ότι η ανοικτή δομή της κοιλότητας της ενεργής θέσης είναι αποτέλεσμα της παρουσίας της β-διαμόρφωσης στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου, στην οποία δεν ιφίστανται οι αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται στην α-διαμόρφωση, και συνεπώς το CO μπορεί να συναρμολογείται στην αίμη *b*₃ κάθετα ως προς το επίπεδο της αίμης (22). Επιπλέον, υποστηρίχθηκε από τους ίδιους συγγραφείς ότι η α-διαμόρφωση εξαρτάται από την σύνδεση της τυροσίνης 280 (*P. denitrificans* αριθμηση), που βρίσκεται στην έλικα των υποκαταστατών του Cu_B, με την υδρόξυ ομάδα της υδροξυαίθυλ-φαρνεσουλ πλευρικής αλυσίδας της αίμης *a*₃ (23-24). Εφόσον η υδροξυαίθυλ-φαρνεσουλ αλυσίδα απουσιάζει από το την αίμη *b*₃, το ενεργό κέντρο του κυτοχρώματος *cbh*₃ υιοθετεί μόνο την β-διαμόρφωση. Η αίμη *a*₃ του κυτοχρώματος *caa*₃ περιέχει μια υδροξυτζερανυλτζερανυλ ομάδα και την Y280 και άρα την σύνδεση της υδροξυομάδας με το αμινοξύ (1). Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η

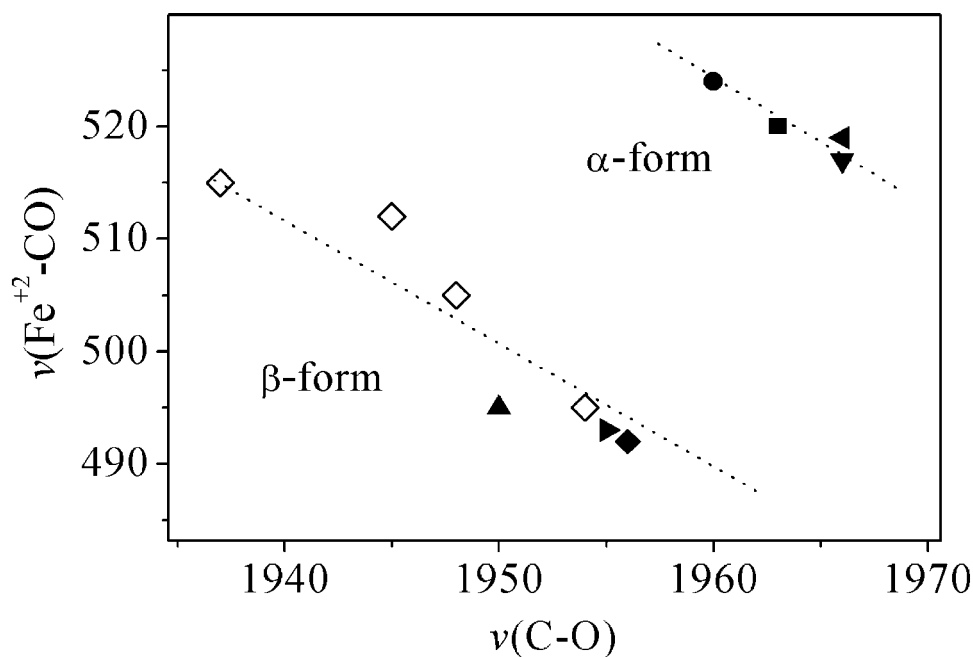
απουσία δεσμού φαρνεσύλ αλυσίδας και τυροσίνης δεν επηρεάζει την ν(CO) και κατά συνέπεια των τύπο της σταθερής διαμόρφωσης (α ή β) του ενεργού κέντρου των αιμοχαλοκοξειδασών.

Στο παρελθόν, υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η εμφάνιση διαφορετικών διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου και η ύπαρξη ισορροπίας ανάμεσα σε αυτές διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενζυματική δραστηριότητα των μελών της οικογένειας των τελικών οξειδασών (21). Μάλιστα, ορισμένες μεταλλαγμένες οξειδάσες, στις οποίες ανιχνεύονταν χαμηλές συχνότητες δόνησης τάσης του CO, δεν εμφάνιζαν ικανότητα αναγωγής του οξυγόνου (25). Στις περιπτώσεις που καταγράφηκε η παρουσία της β-διαμόρφωσης, η ταυτόχρονη ανίχνευση και της α-διαμόρφωσης δεν κατέστησε δυνατή την εκτίμηση της δραστηριότητας της β-δομής. Οι συχνότητες δόνησης του δεσμευμένου CO στα σύμπλοκα με τις τελικές οξειδάσες με αίμες *a*₃-, *o*₃-, και *b*₃- τύπου καθώς και οι απόδοσή τους στις διαμορφώσεις (α, β και γ) παρατίθενται στον Πίνακα I. Η σύγκριση των CO δονήσεων του Πίνακα I, όταν ο υποκαταστάτης βρίσκεται δεσμευμένος στην αίμη ή τον Cu_B διαφορετικών οξειδασών με πλήρη ενεργότητα δείχνει ότι ο τύπος της σταθερής διαμόρφωσης (α, β ή γ) του ενεργού κέντρου δεν ελέγχει την ενζυματική δραστηριότητα.

Πίνακας I

Συχνότητες των δονήσεων τάσης C-O (cm ⁻¹) των α-, β- και γ-διαμορφώσεων στο CO σύμπλοκο των αιμοχαλοκοξειδασών.						
Fe			Cu _B			
α	β	γ	α	β	Παραπομπή	
<i>aa</i> ₃						
(bovine)	1965 (300 K)	1952 (80 K)		2065 (300 K)	2043 (10 K)	(5-8)
(<i>Rb.sph.</i>)	1966 (300 K)	1955 (300 K)		2064 (10 K)	2039 (10 K)	(20,21)
(<i>B.subt.</i>)	1963 (300 K)					(17)
(<i>P.den</i>)	1966 (300 K)	1956 (300 K)	1975 (300 K)			(10,15)
	1966 (84 K)	1952 (84 K)	1971 (84 K)	2061 (84 K)	2038 (84 K)	(10)
<i>bo</i> ₃	1960 (300K)			2065 (15K)		(13)
<i>cbb</i> ₃		1956 (300 K)		2065 (300 K)		(14)
<i>ba</i> ₃	1967 (300K)	1973/1982 (300 K)		2053 (300 K)		(34)
<i>caa</i> ₃	1967 (300K)	1958 (300K)	1975 (300 K)	2062 (300 K)		παρούσα εργασία

Συνοτομογραφίες Πίνακα I: *Rb.sph* = *Rhodobacter sphaeroides*, *B. subt.* = *Bacillus subtilis*, *P.den* = *Paraccocus denitrificans*, *bo*₃ = cytochrome *bo*₃ from *E. coli*, *cbb*₃ = cytochrome *cbb*₃ from *Pseudomonas stutzeri*, *ba*₃ = cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*, *caa*₃ = cytochrome *caa*₃ from *Thermus thermophilus*.



Σχήμα 5. Συσχέτιση των συχνοτήτων της δόνησης τάσης της Fe-CO ως προς την C-O. (●) κυτόχρωμα *bo*₃ από το *E. coli*, (◄) η α-μορφή του κυτοχρώματος *aa*₃ από το *R. sphaeroides*, (◼) κυτοχρωμική c οξειδάση των θηλαστικών και κυτόχρωμα *aa*₃ από το *B. subtilis*, (◄) κυτόχρωμα *aa*₃ από το *P. denitrificans*, (▲) κυτόχρωμα *cbb*₃ από το *R. capsulatus*, (◆) κυτόχρωμα *cbb*₃ από το *Pseudomonas stutzeri*, (◄) η β-μορφή του κυτοχρώματος *aa*₃ από το *R. sphaeroides*, (◊) μωσφαιρίνες και αιμοσφαιρίνες.

Οι ιδιότητες της ομάδας ιστιδίνης-αίμης *a*₃-CO...Cu_B έχουν καθοριστεί από τις συχνότητες και τις εντάσεις των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$, $\nu(\text{C-O})$, and $\delta(\text{Fe-C-O})$, καθώς επίσης και από την συσχέτιση των δονήσεων $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ (21). Παρόλο λοιπόν, που οι συχνότητες των δονήσεων τάσης Fe²⁺-CO και κάμψης Fe-C-O δεν έχουν αναφερθεί ακόμα για το κυτόχρωμα *caa*₃, χρησιμοποιώντας την αντίστροφη σχέση που υπάρχει ανάμεσα στις συχνότητες των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ για τις αιμοπρωτεΐνες με υποκατάσταση ιστιδίνης στην εγγύ θέση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5, εκτιμούμε ότι η συχνότητα της $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ του κυτοχρώματος *caa*₃ κυμαίνεται κοντά στους 495 cm⁻¹.

Η διαμόρφωση που σταθεροποιείται στο διπυρηνικό κέντρο μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την μακρινή θέση δέσμευσης της αίμης. Για παράδειγμα, η αύξηση ή μείωση της απόστασης Fe-Cu_B είναι δυνατόν να επηρεάσει τις ιδιότητες των ενδιάμεσων οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την καταλυτική πορεία, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι οι συχνότητες και κατά συνέπεια η ισχύς των δεσμών σιδήρου-υποκαταστατών στις αιμοπρωτεΐνες εξαρτάται από τις ιδιότητες των αμινοξέων που πλαισιώνουν την θέση

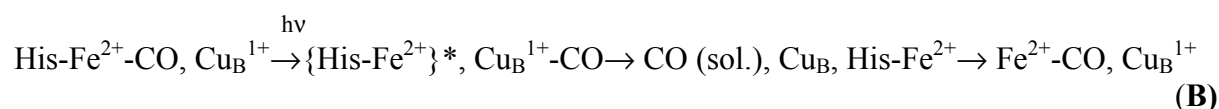
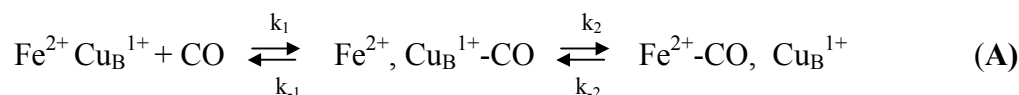
δέσμευσης των υποκαταστατών. Σύμφωνα με το παραπάνω σκεπτικό, έχει προταθεί ότι τα P και F φερύλ ενδιάμεσα αντιπροσωπεύουν διαφορές στην διαμόρφωση του διπυρηνικού κέντρου λόγω μεταβολής της απόστασης ανάμεσα στον αιμικό σίδηρο και τον Cu_B (26). Επιπλέον στοιχείο για την ύπαρξη διαφορετικών διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου αποτελεί η ανίχνευση δύο διαφορετικών υδρόξυ ενδιάμεσων της αίμης a_3 . Μελέτες RR αποκάλυψαν ότι το υδρόξυ ενδιάμεσο με συχνότητα της δόνησης τάσης Fe^{3+} -OH στους 450 cm^{-1} προέρχεται από την ύπαρξη ισχυρού δεσμού υδρογόνου του οξυγόνου που έχει ως αποτέλεσμα την χαμηλή συχνότητα δόνησης (27-28). Το ενδιάμεσο με $\nu(Fe^{3+}$ -OH) στους 477 cm^{-1} , αντίθετα, σχηματίζει ασθενέστερο δεσμό υδρογόνου λόγω μιας περισσότερο ανοικτής διαμόρφωσης της κοιλότητας του ενεργού κέντρου (28). Συνεπώς, η συσχέτιση που εμφανίζουν οι δονήσεις του CO στις α - και β -διαμορφώσεις μπορούν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη τόσο των στερικών παραγόντων στο διπυρηνικό κέντρο, που επηρεάζουν το καταλυτικό μηχανισμό των αιμοχαλκοξειδασών, αλλά και της απόστασης αιμικού σιδήρου και Cu_B .

Η συχνότητα των 2062 cm^{-1} που καταγράψαμε για το μεταβατικό σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO (α -διαμόρφωση) είναι όμοια με αυτή που αναφέρθηκε για το σύμπλοκο αυτό στους 21 K, γεγονός που δηλώνει ότι σε αντίθεση με το σύμπλοκο αίμης a_3^{2+} -CO το μεταβατικό σύμπλοκο του χαλκού με το CO δεν παρουσιάζει εξάρτηση από την θερμοκρασία. Η διαφορά που υπάρχει ανάμεσα στην κρυογονική και την θερμοκρασία δωματίου είναι ότι στην τελευταία δεν εμφανίζεται η δόνηση στους 2036 cm^{-1} . Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Alben και των συνεργατών του (8), που έδειξαν ότι η διαμόρφωση του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO που εμφανίζει την χαμηλότερη συχνότητα δόνησης στο σύμπλοκο του κυτοχρώματος aa_3 των θηλαστικών παρουσιάζεται μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο Rost *et al.* (10) αναφέρει παρόμοιο συμπέρασμα για το κυτόχρωμα aa_3 του *P.denitrificans*. Η ομοιότητα ανάμεσα στην συχνότητα των 2062 cm^{-1} τόσο σε θερμοκρασία δωματίου όσο και σε κρυογονικές θερμοκρασίες αποτελεί ένδειξη ότι η ψύξη δεν επηρεάζει τον βαθμό ελευθερίας του δεσμευμένου στον χαλκό CO. Συνεπώς, οι διαφορές που παρατηρούνται στις CO δονήσεις της αίμης a_3 συναρτήσει της θερμοκρασίας δεν οφείλονται σε διαφορετική διαμόρφωση του χαλκού, αλλά σε μεταβολή της διαμόρφωσης της αίμης a_3 . Σύμφωνα με τον παραπάνω συλλογισμό το σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO με την εναλλακτική οξειδάση του βακτηρίου *T. thermophilus*, το κυτόχρωμα ba_3 , στο οποίο το σύμπλοκο Cu_B^{1+} -CO έχει την ίδια συμπεριφορά σε κρυογονικές θερμοκρασίες και σε θερμοκρασία δωματίου (6, 34).

Δυναμική των CO-Διαμορφώσεων

Η δέσμευση και απομάκρυνση μικρών μορίων-υποκαταστατών από το διπυρηνικό κέντρο αίμης-Cu_B των αιμοχαλκοξειδασών αφορά μία πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την κίνηση του υποκαταστάτη μέσα στην πρωτεΐνη και εκτεταμένες μεταβολές στην ηλεκτρονική δομή της αίμης καθώς και της διαμόρφωσής της. Μελέτες των CO-συμπλόκων της κυτοχρωμικής οξειδάσης παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για την ενεργή θέση, και η φωτοδιάσπαση και επαναδεσμεύση του υποκαταστάτη αποκάλυψε τις δυναμικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο διπυρηνικό κέντρο (5, 29). Ο καθορισμός της μοριακής βάσης για την λειτουργία των αιμοχαλκοξειδασών προαπαιτεί την γνώση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους υποκαταστάτες που δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο και στα αμινοξέα που το πλαισιώνουν, έτσι ώστε τελικά να οδηγηθούμε στην κατανόηση της κινητικής της δέσμευσης των υποκαταστατών και των ιδιοτήτων της καταλυτικής θέσης. Η δέσμευση του CO στις αιμοχαλκοξειδάσες και η φωτοδιάσπαση του CO περιγράφονται στο Διάγραμμα 1A και 1B, αντίστοιχα.

Διάγραμμα 1



όπου k_1 και k_{-1} αντιπροσωπεύουν τις σταθερές ταχύτητας της αντιστρεπτής δέσμευσης του CO στον Cu_B και η k_2 την πρώτης τάξης διαδικασία της μεταφοράς του CO από τον Cu_B στον αιμικό σίδηρο (5, 29). Το σύμπλοκο Cu_B¹⁺-CO σχηματίζεται πλήρως σε 1 ps μετά την φωτόλυση του CO από την αίμη α_3 , χρόνος που δηλώνει την απουσία παραγόντων που αυξάνουν την ενέργεια ενεργοποίησης για την διαδικασία της μεταφοράς του CO από την αίμη α_3 στον Cu_B (29). Η κατάσταση που δηλώνεται με τον αστερίσκο αντιπροσωπεύει μία κατάσταση μη-ισορροπίας της αίμης α_3 , η οποία χαρακτηρίζεται από την μετατόπιση της δόνηση τάσης Fe-His σε μεγαλύτερες συχνότητες, και στην περίπτωση του κυτοχρώματος $\alpha\alpha_3$ των θηλαστικών μεταβαίνει στην κατάσταση ισορροπίας της ανηγμένης μορφής σε χρόνο

> 10 μs (30-32). Πρόσφατα, δείχθηκε ότι η ασυνήθιστα ταχεία αποδέσμευση του CO από την αίμη α_3 , με ισχυρή εξάρτηση από την θερμοκρασία, και η ανίχνευση του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO στο κυτόχρωμα ba_3 του βακτηρίου *T. thermophilus* στην κατάσταση ισορροπίας είναι το αποτέλεσμα της μικρής συγγένειας που παρουσιάζει η αίμη α_3 για το CO ($K_{\text{eq}}=1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) σε θερμοκρασία 20 °C (33). Παρά το γεγονός ότι η ανάλογη συγγένεια του κυτοχρώματος *caa3* για το CO δεν έχει μετρηθεί ακόμα, ωστόσο από την απουσία του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO στην ισορροπία συμπεραίνουμε ότι η αίμη α_3 χαρακτηρίζεται από μικρότερη σταθερά αποδέσμευσης του CO και άρα μεγαλύτερη συγγένεια για το CO σε σχέση με το κυτόχρωμα ba_3 .

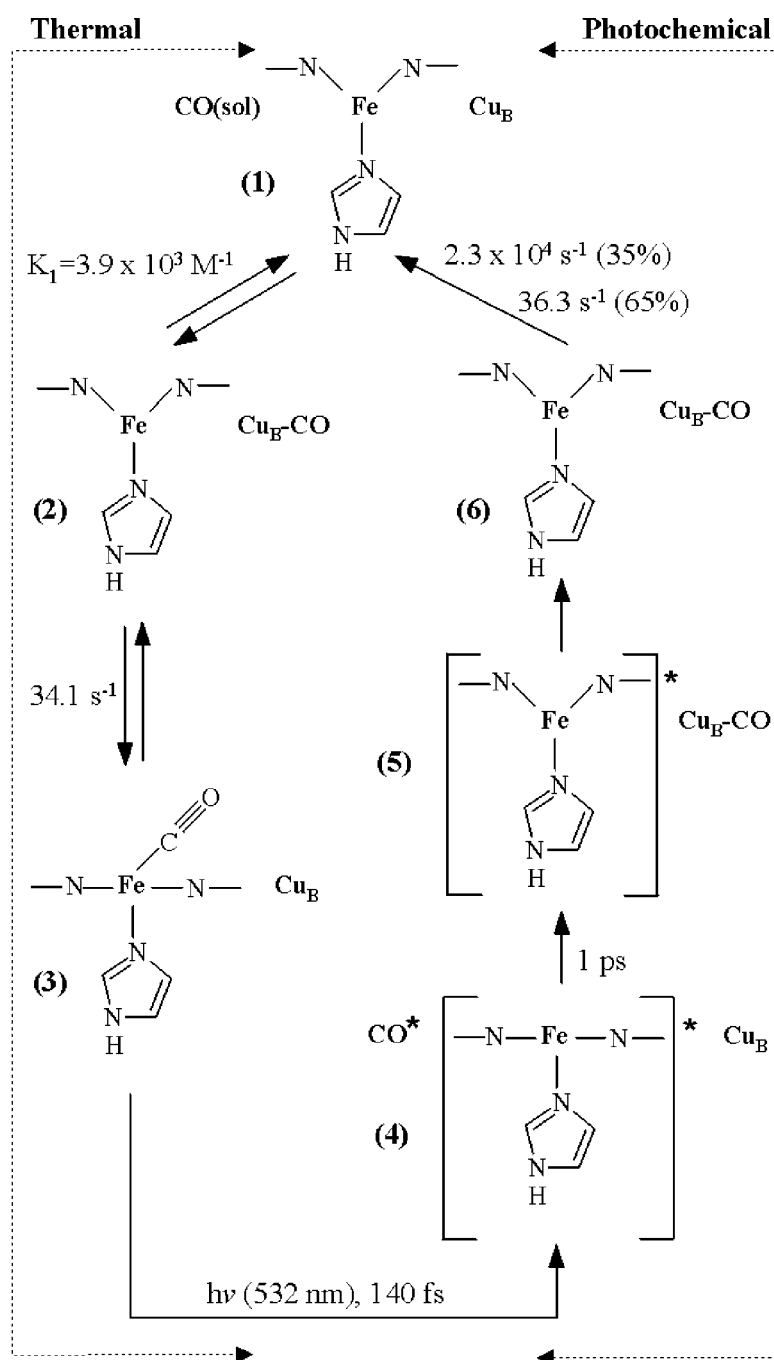
Η σταθερά ταχύτητας της ταχείας φάσης (35%) αποσχηματισμού της δόνησης 2062 cm^{-1} του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO που παρατηρήσαμε είναι όμοια με την ταχύτητα που είχε αναφερθεί προηγούμενα για τον πλήρη αποσχηματισμό του συμπλόκου (5). Παρά το γεγονός της απομάκρυνσης 35% του CO από το σύμπλοκο του με τον χαλκό δεν παρατηρείται η επαναδέσμευσή του στην αίμη α_3 . Η ταχεία φάση ακολουθείται από μια φάση στην οποία δεν πραγματοποιείται περαιτέρω αποσχηματισμός του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO και τελικά από την αργή φάση στην οποία ολοκληρώνεται η αποδέσμευση του CO (36.3 s^{-1} , 65%). Η ταχύτητα που παρατηρήθηκε για την επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 (34.1 s^{-1}), βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη ($k_{\text{obs}}=40 \text{ s}^{-1}$) (5).

Πρόσφατα, προτάθηκε ότι στο κυτόχρωμα aa_3 των θηλαστικών η ταχεία επαναδέσμευση του CO στην αίμη μπορεί να ευνοηθεί από την παρεμπόδιση της κίνησης του υποκαταστάτη μακριά από τον Cu_B και μειώνοντας τις στερικές επιδράσεις πάνω στην αίμη α_3 (14). Επιπλέον, η πρόσβαση του υποκαταστάτη στην αίμη α_3 , καθώς επίσης η αποδέσμευση του από τον χαλκό και η μετανάστευση του προς το εγγύ περιβάλλον απαιτούν μεταβατικές κινήσεις της πρωτεΐνης. Προτάθηκε ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον του Cu_B στο κυτόχρωμα aa_3 ωθεί το CO, που αποδεσμεύεται θερμικά από τον Cu_B , να διαχυθεί μακριά από το διπυρηνικό κέντρο. Κατά τον τρόπο αυτό παρεμποδίζει την επαναδέσμευση του CO στην αίμη α_3 αμέσως μετά την αποδέσμευσή του από τον Cu_B . Οι τιμές των σταθερών ταχύτητας $k_{-1}=2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ και $k_2=50 \text{ s}^{-1}$ που είχαν αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (5) για το κυτόχρωμα *caa3*, δείχνουν ότι παρόμοιος μηχανισμός με αυτόν που παρεμποδίζει την απευθείας επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στο κυτόχρωμα aa_3 των θηλαστικών είναι ενεργός και στην περίπτωση του *caa3* ενζύμου. Τα δεδομένα της παρούσας εργασίας δηλώνουν ότι το βήμα που καθορίζει την επαναδέσμευση του CO στην αίμη είναι ο αποσχηματισμός του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα

αποδέσμευσης του CO από το σύμπλοκο Cu_B¹⁺-CO στην πρώτη φάση (35%) είναι μεγάλη και άρα το περιβάλλον του Cu_B παρεμποδίζει την άμεση δέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη *a*₃. Ο συνολικός χρόνος ζωής του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO είναι αρκετά μεγάλος ώστε να επηρεάζει τα flow-flash πειράματα με το οξυγόνο. Στα πειράματα αυτά πραγματοποιείται φωτόλυση του συμπλόκου αίμης-CO για την έναρξη της αντίδρασης με το οξυγόνο, η δέσμευση όμως στον Cu_B για χρόνο στην κλίμακα των ms παρεμποδίζει την αντίδραση με το οξυγόνο. Βέβαια εφόσον στο κυτόχρωματος *caa*₃ υπάρχουν δύο πληθυσμοί Cu_B¹⁺-CO με διαφορετικό χρόνο ζωής και δεν μπορεί να εκτιμηθεί αν το 35% της ταχείας αποδέσμευσης είναι ικανό ποσοστό για την επιτυχία των flow-flash πειραμάτων.

Μοντέλο για την δέσμευση/φωτοδιάσπαση

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται ένα μοντέλο για την κινητική του CO, την αποδιέγερση της κοιλότητας της αίμης, και της χημείας συναρμογής του διπυρηνικού κέντρου αίμης *a*₃-Cu_B του κυτοχρώματος *caa*₃. Το μοντέλο αποτελείται από δύο κλάδους, την θερμική και φωτοχημική πορεία της δυναμικής του υποκαταστάτη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αντίστοιχα. Το μοντέλο αυτό είναι όμοιο με αυτό που αναφέρθηκε πρόσφατα για το κυτόχρωμα *ba*₃ (34) με την διαφορά ότι δεν συμπεριλαμβάνεται το σύμπλοκο Cu_B¹⁺-CO στην ισορροπία, που παρατηρείται μόνο στην περίπτωση του *ba*₃. Η χρονική κλίμακα των αρχικών βημάτων στην φωτοχημική πορεία του *caa*₃ αναμένεται να είναι η ίδια με αυτή που αναφέρθηκε από τον Woodruff και συνεργάτες του για το κυτόχρωμα *aa*₃ των θηλαστικών (5). Συνεπώς στο φωτοχημικό σκέλος η His-αίμη *a*₃ που βρίσκεται σε μια διεγερμένη κατάσταση, αποδιεγείρεται στην διαμόρφωση ισορροπίας και το CO αποδεσμεύεται από τον Cu_B και εξισορροπεί με τον διαλύτη. Η άμεση επαναδέσμευση του CO στην αίμη δεν παρατηρείται μετά την φωτοδιάσπαση του CO, κατά συνέπεια ούτε το στάδιο 5 ούτε το 6 δεν αντιστοιχούν σε τέτοιες καταστάσεις. Στα στάδια 5 και 6 το φωτολυμένο CO και η κοιλότητα της αίμης περιέχουν περίσσεια ενέργειας λόγω της φωτόλυσης. Η παραγόμενη θερμότητα από τα 532 nm φωτόνια εμφανίζεται ως περιστροφική ενέργεια του μη διεγερμένου CO και ως περίσσεια ενέργειας στο διπυρηνικό κέντρο. Το CO δεσμεύεται στον Cu_B χωρίς την θέρμανση του ενεργού κέντρου. Η μεγάλη συγγένεια του Cu_B ($K_1 = k_{-1}/k_1 = 3.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) για το CO παρεμποδίζει την άμεση επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη και αυτή πραγματοποιείται στον θερμικό κλάδο στο στάδιο 3 σε 20.3 ms.



Διάγραμμα 2.
Μηχανιστικό μοντέλο για την φωτοχημική και θερμική πορεία της δυναμικής δέσμευσης/φωτοδιάσπασης του στο κτόχρομα *caa*₃.

Συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός των διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου κατά την δέσμευση του CO και κατά την διαδικασία φωτοδιάσπασης/επαναδέσμευσης αποτελεί βασικό στοιχείο στην διερεύνηση της δυναμικής του ενεργού κέντρου των αιμοχαλκοξειδασών. Τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας παρέχουν την βάση για την ανάλυση των δομικών ιδιοτήτων που ευθύνονται για τις ιδιαίτερες διαμορφώσεις που υιοθετούνται στο ενεργό

κέντρο των τελικών οξειδασών. Οι διαμορφώσεις του κυτοχρώματος *caa*₃ αντιστοιχούν στην β-δομή της αίμης *a*₃ και την α-δομή του Cu_B. Οι διαμορφώσεις που είχαν ανιχνευθεί για την αίμη *a*₃ στην μελέτη του ενζύμου σε κρυογονικές θερμοκρασίες δεν εμφανίζονται στην θερμοκρασία δωματίου. Δομικές αλλαγές που συντελούνται από την μεταβολή θερμοκρασίας είναι πιθανό να ευθύνονται για την σημαντική διαφοροποίηση της ισχύς του δεσμού C-O όταν αυτό βρίσκεται δεσμευμένο στην αίμη *a*₃, όχι όμως και στην περίπτωση που βρίσκεται δεσμευμένο στον Cu_B. Προτείνουμε ότι οι διαφορετικές διαμορφώσεις προέρχονται από μεταβολές στην απόσταση της αίμης *a*₃ και του Cu_B και επηρεάζουν τον υποκαταστάτη όταν αυτός δεσμεύεται στην αίμη. Από τα δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου που προέρχονται από την α-διαμόρφωση της αίμης *a*₃ δεν αποτελούν προϋπόθεση για την ενζυμική δραστηριότητα. Η δημιουργία και ο αποσχηματισμός του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO καθώς επίσης και η επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη για τον σχηματισμό του συμπλόκου *a*₃²⁺-CO περιγράφονται με το μοντέλο που παρουσιάστηκε.

Βιβλιογραφία

1. Than, M. E. and Soulimane, T. (2001) in *Handbook of Metalloproteins* (Messerschmidt, A., Huber, R., Poulos, T., and Wieghardt, K., eds) pp 363-378, Wiley, Chichester.
2. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776.
3. Giuffre, A., Stubauer, G., Sart, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G., Soulimane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1999) **96**, 14718-14723.
4. Gerscher, S, Hildebreand, P., Soulimane, T., Buse, G. (1998) *Biospectroscopy*, **4**, 365-377.
5. Woodruff, W. H. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**,177-188.
6. Einarsdóttir, O., Killough, P. M., Fee, J. A., and Woodruff, W. H. (1989) *J. Biol.Chem.* **264**, 2405-2408.
7. Einarsdóttir, O., Dyer, R. B., Lemon, D. D., Killough, P.M., Hubig, S. M., Atherton, S. J., Lopez-Garriga, J. J., Palmer, G., and Woodruff, W. H. (1993) *Biochemistry* **32**, 12013-12024.
8. Park, S., Pan, L-P., Chan, S. I., and Alben, J. (1996) *Biophysical J.* **71**, 1036-1047.
9. Heitbrink, D., Sigurdson, H., Bowlwien, C., Brzezinski, P., and Heberle, J. (2002) *Biophysical J.* **82**, 1-10.
10. Rost, B., Behr, J., Hellwig, P., Richter O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H., and Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* **38**, 7565-7571.
11. Iwase, T., Varotsis, C., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1415-1416.
12. Rich, P.R., and Breton, J. (2001) *Biochemistry* **40**, 6441-6449.
13. Bailey, J. A., Tomson, F. L., Mecklenburg, S. L., MacDonald, G. M., Katsonouri, A., Puustinen, A., Gennis, R. B., Woodruff, W. H, and Dyer, R. B. (2002) *Biochemistry* **41**, 2675-2683.
14. Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3814-3815.
15. Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. (2002) *J. Biol.Chem.*, **277**, 13563-13568.
16. Varotsis, C., and Babcock, G. T. (1990) *Biochemistry* **29**, 7357-7362.
17. Varotsis, C., and Vamvouka, M. (1998) *J. Phys. Chem.* **102**, 7670-7673.
18. Oertling, W. A., Surerus, K. K., Einarsdóttir, O. Fee, J. A., Dyer, R. B., and Woodruff, W. H. (1994) *Biochemistry* **33**, 3128-3141.

19. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M., and Rousseau, D. L. (2001) *Biophysical J.* **80**, 2039-2045.
20. Mitchell, D. M., Shapleigh, J. P., Archer A. M., Alben, J. O., and Gennis R. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 9446-9450.
21. Wang, J., Takahashi, S., Hosler, P. H., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis R. B., and Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825.
22. Wang, J., Gray, K. A., Daldal, F., and Rousseau, D. L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9363-9364.
23. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T., (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
24. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
25. Hosler, J. P., Kim, Y., Shapleigh, J. Gennis, R. B., Alben, J. O. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5515-5516.
26. Han, S., Takahashi, S., and Rousseau, D. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1910-1919.
27. Varotsis, C., Zhang, Y., Appelman, E. H., and G. T. Babcock (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 237-241.
28. Han, S., Ching, Y-C., and Rousseau, D. L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6604-6607.
29. Dyer, R. B., Peterson, K. A., Stoutland, P. O., and Woodruff, W. H. (1994) *Biochemistry*, **33**, 500-507.
30. Findsen, E. W.; Centeno, J., Babcock, G. T., and Ondrias, M. R. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5367-5372.
31. Varotsis, C., and Babcock, G. T. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11260-11269.
32. Schelvis, J. P. M., Deinum, G., Varotsis, C. A., Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8409-8416.
33. Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., and Buse, G. (1999) *Biochemistry* **38**, 1057-1065.
34. Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32860-32866.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Time-Resolved Step-Scan FTIR Μελέτη των Κυτοχρωματων ba_3 και aa_3 του *P. denitrificans*

Περίληψη

Η φασματοσκοπία Fourier-transform υπερύθρου και η time-resolved step-scan time-resolved FTIR χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων των κυτοχρωμάτων ba_3 και aa_3 του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans* με το μονοξείδιο του άνθρακα. Το κυτόχρωμα ba_3 εμφανίζει δύο δονήσεις του δεσμευμένου στην αίμη α_3 CO, με την κύρια δόνηση να εμφανίζεται στους 1966 cm^{-1} (α -διαμόρφωση), ομοίως με το κυτόχρωμα aa_3 (Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 13563-13568), και την μικρότερη στους 1971 cm^{-1} (γ -διαμόρφωση), σε θερμοκρασία δωματίου. Τα time-resolved FTIR πειραματικά δεδομένα δείχνουν τον σχηματισμό σε θερμοκρασία δωματίου ενός μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO σύμφωνα με την εμφάνιση της δόνησης στους 2062 cm^{-1} (α -διαμόρφωση), μετά την φωτοδιάσπαση του CO από την αίμη α_3 στο κυτόχρωμα ba_3 . Μελετήθηκαν επίσης οι μεταβολές που προκαλούνται σε ομάδες της πρωτεΐνης κατά την φωτοδιάσπαση των CO-συμπλόκων των κυτοχρωμάτων aa_3 και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans*. Οι μεταβολές αυτές πραγματοποιούνται τόσο στο περιβάλλον αμινοξέων, γλουταμινικών ή/και ασπαρτικών, των προπιονικών ομάδων της αίμης α_3 , αλλά και τυροσίνης που προτείνουμε ότι είναι η Tyr 280 του K-καναλιού. Στην διαδικασία ελέγχου της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3^{2+} ενεργοποιούνται δύο διαφορετικοί μηχανισμοί στα δύο κυτοχρώματα. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 ο χρόνος ημιζωής του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO είναι της τάξης των μs , όμως το πρωτεϊνικό περιβάλλον του Cu_B απομακρύνει το CO από την ενεργή θέση, ώστε η επαναδέσμευση του στην αίμη α_3^{2+} να πραγματοποιείται τελικά σε χρόνο ms. Σε αντίθεση στο κυτόχρωμα ba_3 ο χρόνος ημιζωής του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO, που είναι της τάξης των ms, καθορίζει την επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη α_3^{2+} .

Εισαγωγή

Το gram-αρνητικό βακτήριο *Paracoccus denitrificans* εκφράζει τρεις διαφορετικές τελικές οξειδάσες, από τις οποίες οι δύο είναι οι κυτοχρωμικές οξειδάσες aa_3 και cbb_3 και η τρίτη είναι η κινολική οξειδάση ba_3 (1). Το κυτόχρωμα ba_3 δέχεται τα ηλεκτρόνια απευθείας από την ουβικινόνη και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως κινολική οξειδάση. Στο κυτόχρωμα ba_3 υπάρχουν μόνο τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα, που περιλαμβάνουν την χαμηλού σπιν αίμη b -τύπου και το διπυρηνικό κέντρο που αποτελείται από την υψηλού σπιν αίμη a_3 και τον Cu_B , και είναι η θέση που πραγματοποιείται η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό, ενώ απουσιάζει ο Cu_A που είναι ο αρχικός δέκτης ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 (2,3). Όπως όλα τα μέλη της οικογένειας των τελικών οξειδασών, τα κυτοχρώματα aa_3 και ba_3 συξεύγνουν την χημεία οξυγόνου με την άντληση πρωτονίων και την δημιουργία ηλεκτροχημικού δυναμικού που χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP.

Η κρυστάλλωση των κυτοχρωμικών οξειδασών aa_3 -τύπου του *P. denitrificans* (4,5) και των θηλαστικών (6-8), ba_3 -τύπου του *Thermus thermophilus* (9), και της κινολικής οξειδάσης bo_3 -τύπου από το *Escherichia coli* (10) πρόσφεραν σημαντικές γνώσεις για την δομή της οικογένειας των τελικών οξειδασών σε ατομική λεπτομέρεια. Με βάση τον συνδιασμό των δεδομένων από τις κρυσταλλοδομές και μεταλλάξεων συγκεκριμένων αμινοξέων προτάθηκαν κανάλια μεταφοράς πρωτονίων για την σύνθεση του νερού αλλά και για την άντληση των πρωτονίων. Στην περίπτωση του *P. denitrificans* χαρακτηρίζονται ως K- και D-κανάλια και κάποια από τα αμινοξέα «κλειδιά» που περιλαμβάνουν είναι η Lys354, Thr351, και Tyr280 για το πρώτο, και Glu278 και Asp124 για το δεύτερο. (Η αρίθμηση των αμινοξέων πραγματοποιείται σύμφωνα με το *P. denitrificans*, εκτός στις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά).

Πειραματικά δεδομένα για τη συμμετοχή ορισμένων από τα αμινοξέα αυτά, αλλά και άλλων ομάδων της πρωτεΐνης στην δέσμευση υποκαταστατών ή στην πραγματοποίηση οξειδοαναγωγικών διαδικασιών συλλέχθηκαν από FTIR μελέτες. Οι πρώτες μελέτες πραγματοποιήθηκαν από τον Alben και τους συνεργάτες του (11,12) πάνω στο σύμπλοκο της ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης των θηλαστικών με το CO. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι κατά την φωτόλυση του δεσμευμένου στην αίμη CO, αυτό σχηματίζει σύμπλοκο με το άλλο μέταλλο του διπυρηνικού κέντρου, τον Cu_B . Το σύμπλοκο αυτό είναι σταθερό σε κρυογονικές θερμοκρασίες και είναι δυνατή η αναγνώριση ομάδων της πρωτεΐνης που ιφίστανται μεταβολές κατά την παραπάνω διαδικασία μέσω της καταγραφής στατικών

φασμάτων διαφοράς, πριν την φωτόλυση μείον τα φάσματα μετά την φωτόλυση, «σκοτάδι-φως». Σε θερμοκρασία δωματίου ο χρόνος ημιζωής του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO είναι της τάξης των μικροδευτερολέπτων (13).

Η πρώτη μελέτη στην οποία υποστηρίχθηκε ότι υπάρχει λειτουργική σύνδεση ανάμεσα στην δέσμευση υποκαταστατών στα μέταλλα του διπυρηνικού κέντρου και ένα συγκεκριμένο αμινοξύ μέλος του D-μονοπατιού, το Glu287, πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Woodruff μέσω της φωτόλυσης του CO συμπλόκου του κυτοχρώματος bo_3 από το *E. coli*, σε κρυογονικές θερμοκρασίες (14). Στην εργασία αυτή καταγράφηκε μετατόπιση ενός σήματος από τους 1724 στους 1731 cm^{-1} κατά την φωτόλυση, και εφόσον το σήμα αυτό εξαφανίστηκε με την μετάλλαξη του Glu278, αποδόθηκε στο συγκεκριμένο αμινοξύ. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από την ομάδα του Mäntele για το κυτόχρωμα aa_3 του *P. denitrificans* σε χαμηλές θερμοκρασίες (15), και από τους Iwase et al. (16) και Rich et al. (17) για το κυτόχρωμα aa_3 των θηλαστικών με στατικά φάσματα συνεχούς φωτόλυσης. Μετατόπιση από υψηλότερες (1745 cm^{-1}) σε χαμηλότερες συχνότητες (1737-1732 cm^{-1}), παρατηρήθηκε και σε στατικά FTIR φάσματα διαφοράς της ανηγμένης μείον την οξειδωμένη κατάσταση αιμοχαλκοξειδασών διαφορετικών οργανισμών και αποδόθηκαν στο ίδιο αμινοξύ (18-21). Η παρατηρούμενη μετατόπιση ερμηνεύθηκε ότι προέρχεται από την μεταφορά πρωτονίου ανάμεσα σε δύο αμινοξέα ή σε επαναδιευθέτηση του αμινοξέος σε περισσότερο υδρόφιλο περιβάλλον (15,18). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει πρόσφατη μελέτη της φωτοδιάσπασης των CO-συμπλόκων των κυτοχρωμάτων aa_3 των θηλαστικών και bo_3 από το *E. coli* από τον Bailey et al. (22), που έδειξε ότι διαφορετικά σήματα καταγράφονται σε κρυογονικές θερμοκρασίες σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες (θερμοκρασία δωματίου) στην περιοχή που εμφανίζονται οι C=O δονήσεις αμινοξέων. Σημαντικά είναι επίσης τα αποτελέσματα της φωτοδιάσπασης των CO-συμπλόκων των κυτοχρωμάτων caa_3 , Pinakoulaki et al. (23, κεφάλαιο 6) και ba_3 , Koutsoupakis et al. (24) του βακτηρίου *Thermus thermophilus* που δείχνουν τον σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO με μεγάλο χρόνο ημιζωής σε σχέση με τις υπόλοιπες αιμοχαλκοξειδάσες (13,25). Στην μελέτη του κυτοχρώματος ba_3 του *T. thermophilus* για πρώτη φορά παρουσιάστηκαν πειραματικά δεδομένα για την σύζευξη ανάμεσα στο σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO και σε μεταβολές των προπιονικών ομάδων (COOH) της αίμης a_3 , και συγκεκριμένα μετατόπιση του σήματος των προπιονικών από τους 1706 στους 1694 cm^{-1} κατά την φωτόλυση. Προτάθηκε ότι υπάρχει σύζευξη μεταξύ της δέσμευσης υποκαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο και του περιβάλλοντος των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 που ιφίστανται μεταβολή στην ισχύ του δεσμού με ένα πρωτόνιο που αλληλεπιδρά με ένα μόριο

νερού ή με ένα αμινοξύ, που σύμφωνα με τα δεδομένα της κρυσταλλοδομής προσδιορίστηκε ως πιθανότερος υποψήφιος το Asp372 (αρίθμηση *T. thermophilus*).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε αρχικά την φασματοσκοπία FTIR και time-resolved step-scan FTIR (23,24,26) για τον χαρακτηρισμό της δομής του διπυρηνικού κέντρου του κυτοχρώματος ba_3 του *P. denitrificans*, μέσω των διαμορφώσεων που υιοθετεί το CO σύμπλοκο του ενζύμου, όταν το CO βρίσκεται δεσμευμένο στην αίμη a_3^{2+} και τον Cu_B^{1+} , αντίστοιχα. Στην συνέχεια η φασματοσκοπία time-resolved step-scan FTIR χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη των μεταβολών που προκαλούνται σε ομάδες της πρωτεΐνης κατά την φωτοδιάσπαση των CO-σμπλόκων των κυτοχρωμάτων aa_3 και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans*. Οι μεταβολές αυτές πραγματοποιούνται τόσο στο περιβάλλον αμινοξέων, γλουταμινικών ή/και ασπαρτικών, των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 , αλλά και τυροσίνης που προτείνουμε ότι είναι η Tyr 280 του K-καναλιού. Το συμπέρασμα που μπορεί κατά συνέπεια να συναχθεί είναι ότι η δέσμευση υποκαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου είναι συζευγμένη με μεταβολές της πρωτεΐνης. Η σύζευξη αυτή μπορεί να πραγματοποιείται είτε με απευθείας δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις προπιονικές ομάδες της αίμης του διπυρηνικού κέντρου και σειρά αμινοξέων, είτε μέσω αλλαγών διαμόρφωσης εξαιτίας μεταβολών της ηλεκτροστατικής σταθεράς του περιβάλλοντος των προαναφερόμενων ομάδων. Επίσης, προσδιορίστηκαν οι παρατηρούμενες σταθερές αποσχηματισμού του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO και επαναδέσμευσης στην αίμη a_3^{2+} στην περίπτωση του κυτοχρώματος ba_3 , ενώ για το κυτόχρωμα aa_3 υπολογίστηκε η παρατηρούμενη σταθερά επαναδέσμευσης του υποκαταστάτη στην αίμη.

Πειραματικές Διαδικασίες

Η απομόνωση των κυτοχρωμάτων ba_3 και aa_3 από το βακτήριο *P. denitrificans* πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 και σύμφωνα με τις παραπομπές (3,27). Το pD των δευτεριομένων διαλυμάτων μετρήθηκε με την χρήση pHμετρου και υποθέτωντας $pD=pH$ (ένδειξη) + 0.4. Τα δείγματα του ενζύμου ανάχθηκαν με dithionite και εκτέθηκαν σε 1 atm CO (συγκέντρωση στο διάλυμα 1 mM) υπό αναερόβιες συνθήκες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αναερόβια IR κυψελίδα με παράθυρα $CaCl_2$ και ένα 0.025 mm spacer. Το αέριο CO αγοράστηκε από την Messer (Germany) και το ισοτοπικά επισημασμένο αέριο (^{13}CO) από την Isotec. Για την λήψη των φασμάτων FTIR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα συγκέντρωσης 500-600 μM φασματοφωτόμετρο Bruker Equinox 55 FTIR εξοπλισμένο με

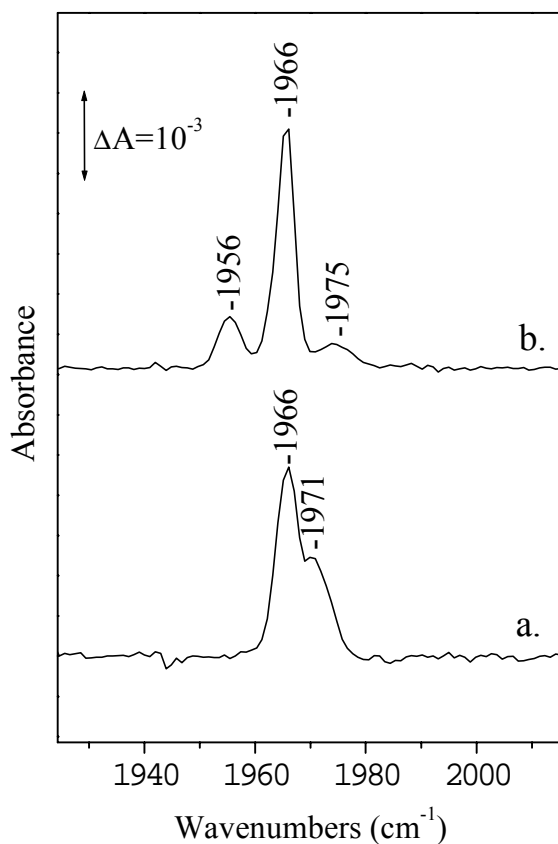
mercury cadmium telluride ανιχνευτή, ψυχόμενο με υγρό άζωτο. Τα φάσματα παρουσιάζονται έχοντας αφαιρέσει το ρυθμιστικό διάλυμα και είναι ο μέσος όρος 1000 σαρώσεων. Η διακριτικότητα των στατικών FTIR μετρήσεων ήταν 2 cm^{-1} .

Για τα time-resolved step-scan FTIR πειράματα, η φωτόλυση των συμπλόκων ba_3 και aa_3 -CO επιτεύχθηκε με την χρήση παλμού 532 nm (πλάτους 7-ns και ενέργειας $\sim 10\text{ mJ/παλμός}$) από ένα Continuum Nd-YAG laser με ρυθμό επανάληψης 3 Hz. Το φασματοφωτόμετρο FTIR βρίσκεται τοποθετημένο σε τραπέζι Newport που στηρίζεται σε πεπιεσμένο αέρα για την απομόνωση των δονήσεων του περιβάλλοντος. Το τραπέζι είναι απαραίτητο για την αποσύζευξη του κινητού καθρέπτη του FTIR από τις δονήσεις του χώρου ώστε να είναι παρουσιάζει την μικρότερη κατά το δυνατό αστάθεια κατά την σταθεροποίησή του σε κάθε βήμα στην time-resolved step-scan μέτρηση, διότι αυτή η αστάθεια έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του θορύβου στα φάσματα. Η σταθερότητα του καθρέπτη ελέγχεται μέσω του συμβολογραφήματος του laser He-Ne, που παρουσιάζει διακύμανση 0.7-0.9 V όταν ο καθρέπτης βρίσκεται σε σταθερή θέση, ενώ το συνολικό πλάτος του του συμβολογραφήματος είναι 5 V. TTL παλμός (Transistor Transistor Logic) από ψηφιακή παλμογεννήτρια (Quantum Composers, 9314T) πυροδοτεί με την σειρά τα flashlamps, το Q-switch, και το FTIR φασματοφωτόμετρο. Η πυροδότηση του FTIR πριν το laser επιτρέπει την καταγραφή φασμάτων πριν την φωτόλυση, που χρησιμοποιούνται ως φάσματα αναφοράς. Οπτικό φίλτρο (Optical Coating Laboratory, Santa Rosa, CA) με όριο τα 2.67 μm χρησιμοποιήθηκε για την μείωση του φασματικού εύρους από 2.67 ως 8 μm . Τα time-resolved FTIR φάσματα καταγράφησαν με διακριτικότητα 8 cm^{-1} και ανά 5 μs για τις μετρήσεις 5 μs -4ms ή 50 μs για τις μετρήσεις 50 μs -40ms και 70 μs για 70 μs -56ms . Ο συνολικός αριθμός φασμάτων ήταν 800, με τα 20 να αντιστοιχούν σε φάσματα πριν και 780 μετά τον παλμό. Σε κάθε σημείο πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλήψεις, και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν 4-8 φορές για να επιτευχθεί βελτίωση του σήματος/θόρυβο ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση ελάχιστης έντασης μεταβολών. Οι μεταβολές της έντασης των δονήσεων καταγράφηκαν με MCT ανιχνευτή (dc-coupled) και μετατράπηκαν από αναλογικό σε δεκαδικό σήμα με 200- kHz, 16-bit, ADC μετασηματιστή. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την μετατροπή είναι Blackman-Harris three-term με διακριτικότητα φάσης 32 cm^{-1} και διόρθωση φάσης με τον αλγόριθμο Mertz. Τα φάσματα διαφοράς υπολογίστηκαν ως $\Delta A = -\log(I_S/I_R)$. Οι σταθερές ταχύτητας για κάθε φάση του αποσηματισμού του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO και της επαναδεύσεως του CO στην αίμη a_3 υπολογίστηκαν με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε εκθετική συνάρτηση τριών παραμέτρων. Πριν και μετά το τέλος των

μετρήσεων time-resolved step-scan FTIR λήφθηκαν τα φάσματα οπτικής απορρόφησης του δείγματος για να εκτιμηθεί η σταθερότητα του, με φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Το σχήμα 1 απεικονίζει το FTIR φάσμα του συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος ba_3 από το βακτήριο *P. denitrificans* με το μονοξείδιο του άνθρακα (φάσμα a) και για σύγκριση το αντίστοιχο φάσμα του κυτοχρώματος aa_3 (φάσμα b). Το φάσμα a παρουσιάζει δύο κορυφές που αντιστοιχούν σε δόνηση τάσης του δεσμευμένου στην αίμη α_3 CO, στους 1966 και 1971 cm^{-1} . Το CO δεσμεύεται αποκλειστικά στην αίμη α_3^{2+} σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις. Στο φάσμα του κυτοχρώματος aa_3 -CO καταγράφονται τρεις δονήσεις στους 1956, 1966 και 1975 cm^{-1} , δηλαδή υπάρχουν τρεις διαμορφώσεις του δεσμευμένου στην αίμη α_3 CO.



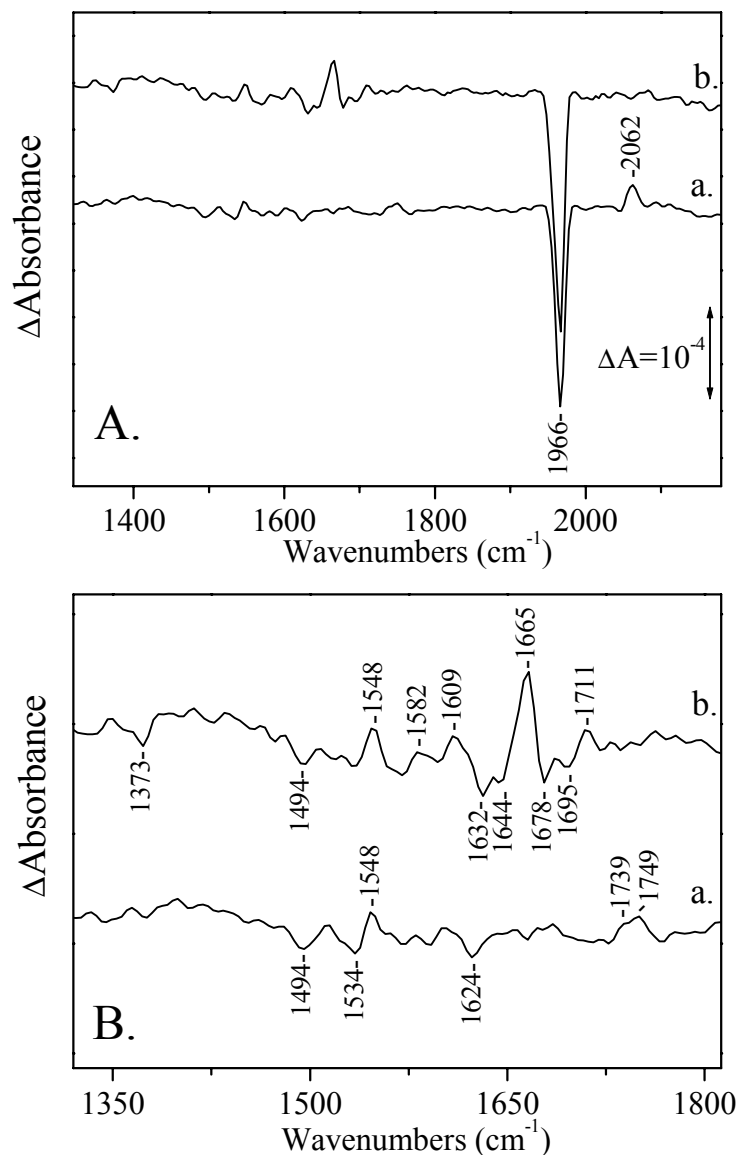
Σχήμα 1: FTIR φάσματα των CO συμπλόκων των κυτοχρωμάτων ba_3 (φάσμα a) και aa_3 (φάσμα b) του βακτηρίου *P. denitrificans* σε $pD=7.5$ και $T = 298K$.

Οι διαφορετικές διαμορφώσεις του CO-συμπλόκου της οξειδάσης αποτέλεσαν αντικείμενο έρευνας από τον Rousseau και τους συνεργάτες του (28,29), που απέδειξαν ότι στην β-διαμόρφωση οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ του συμπλόκου οξειδάσης-CO ανήκουν στην ευθεία που καθορίζει η αντίστροφη σχέση των δύο δονήσεων σε πρωτεΐνες με αξονική υποκατάσταση ιστιδίνης. Σε αντίθεση, στην α-διαμόρφωση οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ αποκλίνουν από την προηγούμενως αναφερόμενη ευθεία. Μελέτη του CO-συμπλόκου του κυτοχρώματος aa_3 από το *Rhodobacter sphaeroides* απέδειξε ότι η αλληλομετατροπή των α- και β-μορφών εξαρτάται από το pH, και αποδόθηκε σε αλλαγές της απόστασης σιδήρου-χαλκού (30). Σύμφωνα με την ερμηνεία αυτή, η α-μορφή αντιπροσωπεύει μία περιορισμένη κοιλότητα που δεν επιτρέπει στο CO να δεσμευτεί στον αιμικό σίδηρο χωρίς να δέχεται ισχυρές πολικές ή στερικές επιδράσεις από το άτομο του χαλκού, ενώ στη β-μορφή η κοιλότητα είναι ανοικτή και ο Cu_B έχει απομακρυνθεί από τον δεσμευμένο CO-υποκαταστάτη. Πρόσφατη μελέτη μας (31) πάνω στο CO σύμπλοκο του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* με φασματοσκοπία FTIR και συντονισμού Raman έδειξε την ύπαρξη της α- (1966 cm^{-1}) και β-διαμόρφωσης (1956 cm^{-1}), άλλα και επιπλέον μιας τρίτης που χαρακτηρίσαμε ως γ-δομή (1975 cm^{-1}). Στην διαμόρφωση αυτή ο Cu_B βρίσκεται ακόμα πλησιέστερα προς το δεσμευμένο στην αίμη a_3 CO, διαστρεβλώνοντας την ομάδα του Fe-C-O από την ευνοούμενη συμμετρία της α-μορφής.

Σε αναλογία με τον χαρακτηρισμό των δονήσεων του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* αποδίδουμε την δόνηση στους 1966 cm^{-1} του κυτοχρώματος ba_3 στην α-διαμόρφωση και στους 1971 cm^{-1} στην γ-διαμόρφωση. Η κύρια δόνηση και στις δύο περιπτώσεις (aa_3 και ba_3) είναι η 1966 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στην α-διαμόρφωση και είναι η διαμόρφωση που κυριαρχεί έναντι των άλλων σε όλες τις οξειδάσες με a_3 -τύπου αίμη στο διπυρηνικό κέντρο σε ουδέτερο pH και θερμοκρασία δωματίου, με μοναδική εξαίρεση τις κυτοχρωμικές οξειδάσες του θερμοφιλου βακτηρίου *Thermus thermophilus* (23,24). Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις που ανιχνεύθηκε η γ-διαμόρφωση, δηλαδή στο κυτόχρωμα aa_3 του *P. denitrificans* και caa_3 του *T. thermophilus*, αυτή υπήρχε σε μικρό πληθυσμό σε σχέση με τις α- και β-δομές, όπως φαίνεται στο φάσμα b του σχήματος 1, και στο caa_3 η αναλογία των εντάσεων $\alpha:\beta:\gamma = 1:7:1$. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος ba_3 η αναλογία $\alpha:\gamma = 2:1$, ενώ απουσιάζει εντελώς η β-διαμόρφωση. Κατά συνέπεια, το ενεργό κέντρο του κυτοχρώματος ba_3 αποτελεί μία κλειστή κοιλότητα στην οποία ο αιμικός σίδηρος και ο Cu_B βρίσκονται σε ασυνήθιστα κοντινή απόσταση. Η απόσταση αυτή μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των ενδιάμεσων οξυγόνου της καταλυτικής πορείας του ενζύμου. Ήδη μελέτες της αντίδρασης αναγωγής του οξυγόνου από την κυτοχρωμική οξειδάση έδειξαν τον σχηματισμό

δύο διαφορετικής δομής φερύλ ενδιάμεσων (P και F) που πιθανολογήθηκε ότι είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής απόστασης ανάμεσα στον αιμικό σίδηρο και το άτομο του Cu_B (32). Κατά συνέπεια η ιδιαιτερότητα της κλειστής κοιλότητας που φαίνεται να παρουσιάζει το κυτόχρωμα ba_3 στο CO σύμπλοκό του μπορεί να αποτελέσει βάση για την μελέτη των στερικών παραγόντων, που πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον μηχανισμό κατάλυσης του ενζύμου, και μάλιστα σε αντιδιαστολή με κυτοχρώματα όπως το caa_3 του *Thermus thermophilus* που παρουσιάζει αντιδιαμετρικά αντίθετη συμπεριφορά με την ανοικτή β-διαμόρφωση να είναι αυτή που κυριαρχεί (23).

Ο πίνακας A του σχήματος 2 απεικονίζει τα time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς της φωτοδιάσπαση των συμπλόκων a_3^{2+} -CO του κυτοχρώματος ba_3 του *P. denitrificans* σε χρόνο 5-100 μs (φάσμα a) και του κυτοχρώματος aa_3 σε χρόνο 5-50 μs (φάσμα b) με nanosecond παλμό 532 nm. Στο φάσμα a εμφανίζεται μία αρνητική δόνηση στους 1966 cm^{-1} και μία θετική στους 2062 cm^{-1} , ενώ μικρότερης έντασης δονήσεις εμφανίζονται και στην περιοχή $1300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$. Η αρνητική δόνηση στους 1966 cm^{-1} οφείλεται στην φωτοδιάσπαση του συμπλόκου a_3^{2+} -CO και δεν εμφανίζει τον ώμο στους 1971 cm^{-1} λόγω της φασματικής διακριτικότητας των 8 cm^{-1} που χρησιμοποιήθηκε για τα time-resolved step-scan φάσματα. Η θετική κορυφή στους 2062 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης του CO του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO. Πραγματοποιείται δηλαδή μεταφορά του φωτολυμένου υποκαταστάτη από την αίμη a_3 στον Cu_B , όπως έχει αναφερθεί και στην περίπτωση άλλων μελών της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών (11-17, 22-26). Ανάλογες διαμορφώσεις με τις α- και β-δομές του συμπλόκου αίμης a_3^{2+} -CO έχουν αναφερθεί και για τα μεταβατικά σύμπλοκα του Cu_B^{1+} -CO με την α-διαμόρφωση να κυμαίνεται σε συχνότητες $2060\text{-}2070\text{ cm}^{-1}$ και την β-διαμόρφωση σε εύρος $2038\text{-}2048\text{ cm}^{-1}$ (15,23). Η συχνότητα της δόνησης $\nu(\text{CO})$ των 2062 cm^{-1} του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO στο κυτόχρωμα ba_3 του *P. denitrificans* δείχνει ότι η διαμόρφωση που υιοθετεί το σύμπλοκο είναι η α-δομή. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 (φάσμα b) στην περιοχή που εμφανίζονται οι $\nu(\text{CO})$ όταν ο υποκαταστάτης είναι δεσμευμένος στην αίμη a_3^{2+} ή τον Cu_B^{1+} παρουσιάζει μία μόνο αρνητική κορυφή στους 1966 cm^{-1} , που οφείλεται στην φωτοδιάσπαση του συμπλόκου αίμης a_3^{2+} -CO. Η απουσία θετικής κορυφής που να μπορεί να αποδοθεί στον σχηματισμό μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO δικαιολογείται σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη της φωτοδυναμικής του CO-συμπλόκου του κυτοχρώματος aa_3 από την ομάδα του Woodruff, που προσδιόρισε το χρόνο ημιζωής του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO στο 1 μs (25). Εφόσον λοιπόν η χρονική διακριτικότητα της παρούσας μελέτης είναι 5 μs είναι αδύνατη η ανίχνευση του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO.



Σχήμα 2: Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς της φωτοδιάσπασης «φως-σκοτάδι» των συμπλόκων α_3^{2+} -CO του κυτοχρώματος ba_3 του *P. denitrificans* σε χρόνο 5-100 μs (φάσμα a) και του κυτοχρώματος aa_3 σε χρόνο 5-50 μs (φάσμα b) με nanosecond παλμό 532 nm σε θερμοκρασία 298 K. Στον πίνακα B παρουσιάζεται σε μεγένθυση η περιοχή 1300-1800 cm^{-1} των αντίστοιχων φασμάτων.

Στον πίνακα B του σχήματος 2 εμφανίζεται σε μεγένθυση η περιοχή 1300-1800 cm^{-1} , όπου αναμένεται η εμφάνιση δονήσεων συγκεκριμένων αμινοξέων ή ομάδων αίμης, που ιφίστανται μεταβολές κατά την διάρκεια της φωτοδιάσπασης του συμπλόκου α_3^{2+} -CO ή/και την δημιουργία και αποσχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO. Η περιοχή 1700-1750 cm^{-1} εμφανίζει δονήσεις πρωτονιομένων ασπαρτικών ή γλουταμινικών οξέων. Στην

περιοχή αυτή στο φάσμα α του κυτοχρώματος ba_3 παρουσιάζονται δύο δονήσεις στους 1739 και 1749 cm^{-1} που αποδίδονται στην δόνηση τάσης C=O δύο τουλάχιστον αμινοξέων ασπαρτικού και/ή γλουταμινικού, των οποίων μεταβάλλεται η διαμόρφωση ή το ποσοστό πρωτονίωσης τους. Αντίστοιχες αρνητικές δονήσεις δεν είναι τόσο εμφανής, ομοίως με τα αντίστοιχα φάσματα του κυτοχρώματος bo_3 σε θερμοκρασία δωματίου όπου στα ζεύγη 1726(-)/1732(+) cm^{-1} και 1740(+)/1749(-) cm^{-1} εμφανής είναι κυρίως οι θετικές δονήσεις (22). Το γεγονός ότι οι μετατοπίσεις είναι μικρότερες από το εύρος της δόνησης του αμινοξέος έχει ως συνέπεια στα φάσματα διαφοράς να παρατηρούνται απλά αρνητικές ή θετικές κορυφές ή ζεύγοι θετικών και αρνητικών κορυφών. Στις κορυφές που παρουσιάζονται σε συχνότητες 1620-1680 cm^{-1} κυριαρχούν δονήσεις C=O του πολυπεπτιδικού κορμού (amide I), και στην περιοχή αυτή εμφανίζεται μόνο μία αρνητική κορυφή στους 1624 cm^{-1} που αποδίδεται στην amide I β-πτυχωτής (21). Στην δόνηση αυτή πιθανόν να συνεισφέρει και η βυνυλική ομάδα της αίμης a_3 . Οι δονήσεις τάσης C-N και κάμψης N-H του κορμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (amide II) παρουσιάζονται στο εύρος 1520-1560 cm^{-1} . Στην περιοχή αυτή το φάσμα α εμφανίζει μία θετική κορυφή στους 1548 cm^{-1} και μία αρνητική στους 1534 cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές εμφανίζουν συνεισφορά από τις δονήσεις amide II, αλλά και μέρος της έντασης τους οφείλεται στην δόνηση τάσης COO⁻ προπιονικής ή προπιονικών ομάδων αίμης, σύμφωνα με τον χαρακτηρισμό των δονήσεων των προπιονικών ομάδων του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* μέσω επιλεκτικής ισοτοπικής αντικατάστασης των ομάδων αυτών με ¹³C από την Behr *et al.* (33). Η αρνητική δόνηση στους 1494 cm^{-1} αποδίδεται στην ν_{19} (CC) του δακτυλίου της αποπρωτονιομένης μορφής τυροσίνης (21,34).

Στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* παρατηρείται (πίνακα Β του σχήματος 2, φάσμα b) παρατηρείται σημαντικότερη διατάραξη της δομής του πολυπεπτιδικού κορμού σε σχέση με το ba_3 , εφόσον οι δονήσεις στους 1644 και 1632 cm^{-1} αποδίδονται σε amide I β-πτυχωτής και η 1665 cm^{-1} που αποτελεί την ισχυρότερης έντασης δόνηση στην περιοχή 1300-1800 cm^{-1} σε amide I α-έλικας, ενώ συνεισφέρει στην ένταση της και η φορμυλική ομάδα της αίμης a_3 . Ομοίως με το φάσμα α η 1548 cm^{-1} αποδίδεται σε amide II. Πιθανή είναι η συμμετοχή των προπιονικών ομάδων στις μεταβολές που πραγματοποιούνται στην περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου μετά την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου a_3^{2+} -CO, εφόσον η αρνητική δόνηση στους 1678 cm^{-1} χαρακτηρίζει την $\nu(\text{C=O})$ της πρωτονιομένης κατάστασης προπιονικής ομάδας, ενώ το αρνητικό σήμα στους 1373 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στην συμμετρική δόνηση τάσης COO⁻ προπιονικής ομάδας, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί και συνεισφορά της ν_{41} (CaN) της αίμης (22,33). Το ζεύγος θετικής/αρνητικής κορυφής στους 1711/1696 cm^{-1} , σύμφωνα με την απόδοση των δονήσεων

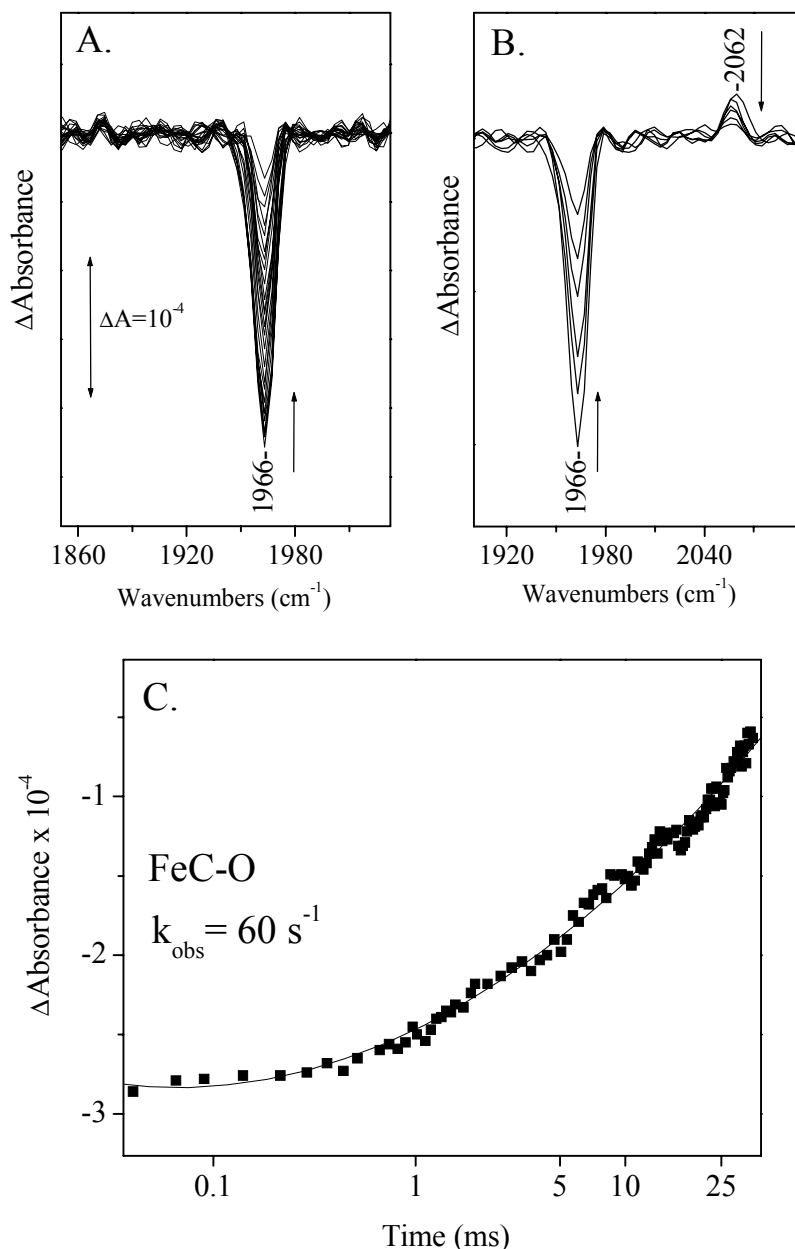
του κυτοχρώματος aa_3 στα φάσματα διαφοράς του ανηγμένου μείον του οξειδωμένου ενζύμου από τον Mäntele και τους συνεργάτες του, οφείλεται στην δόνηση τάσης C=O ενός ή περισσοτέρων πρωτονιομένων γλουταμικών ή ασπαρτικών (21). Σε μελέτη όμως της οξειδοαναγωγής του κυτοχρώματος ba_3 του *T. thermophilus* από την ίδια ομάδα, το αντίστοιχο ζεύγος δονήσεων ($1706(+)/1692(-)$ cm^{-1}) αποδόθηκε στις προπιονικές ομάδες της αίμης με την ερμηνεία ότι το ποσοστό πρωτονίωσης τους είναι μεγαλύτερο σε σχέση με το κυτόχρωμα aa_3 (20). Η καταγραφή και απόδοση του ζεύγους των προαναφερόμενων δονήσεων στις προπιονικές ομάδες της αίμης a_3 πραγματοποιήθηκε και στην μελέτη φωτοδιάσπασης του CO-συμπλόκου του κυτοχρώματος ba_3 του *T. thermophilus* από τον Koutsoupakis *et al.* (24). Στην περίπτωση μας υιοθετούμε την ερμηνεία της ομάδας Mäntele (21), δηλαδή αποδίδουμε το ζεύγος $1711/1696$ cm^{-1} σε γλουταμικό ή/και ασπαρτικό, χωρίς όμως να αποκλείουμε και πιθανή συνεισφορά των προπιονικών ομάδων. Η αρνητική δόνηση στους 1494 cm^{-1} αποδίδεται στην ν_{19} (CC) του δακτυλίου της αποπρωτονιομένης μορφής τυροσίνης, όπως και στο φάσμα a.

Στην μελέτη της φωτόλυσης του συμπλόκου CO-κυτοχρώματος bo_3 του βακτηρίου *E. coli* τα δύο ζεύγη δονήσεων στους $1726(-)/1732(+)$ cm^{-1} και $1740(+)/1749(-)$ cm^{-1} αποδόθηκαν το πρώτο στο Glu 286 (D-κανάλι), σύμφωνα και με την προγενέστερη μελέτη σε κρυογονικές θερμοκρασίες, ενώ για το δεύτερο προτάθηκε ως πιθανός υποψήφιος το Glu 89 (αρίθμηση του κυτοχρώματος bo_3) που βρίσκεται κοντά στην είσοδο του K καναλίου (22). Στην περίπτωση του κυτοχρώματος ba_3 του *T. thermophilus* το κυρίαρχο στοιχείο είναι η μεταβολή των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 (24). Στην παρούσα μελέτη των κυτοχρωμάτων aa_3 και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans* φαίνεται ότι η φωτοδιάσπαση του CO-συμπλόκου των ενζύμων προκαλεί μεταβολές τόσο στο περιβάλλον αμινοξέων, γλουταμικών ή/και ασπαρτικών, αλλά και των προπιονικών ομάδων της αίμης a_3 . Το συμπέρασμα που μπορεί κατά συνέπεια να συναχθεί είναι ότι η δέσμευση υποκαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου είναι συζευγμένη με μεταβολές σε ομάδες COOH και -OH της πρωτεΐνης. Η σύζευξη αυτή μπορεί να πραγματοποιείται είτε με απευθείας δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις προπιονικές ομάδες της αίμης του διπυρηνικού κέντρου και σειρά αμινοξέων, είτε μέσω αλλαγών διαμόρφωσης εξαιτίας μεταβολών της ηλεκτροστατικής σταθεράς του περιβάλλοντος των προαναφερόμενων ομάδων.

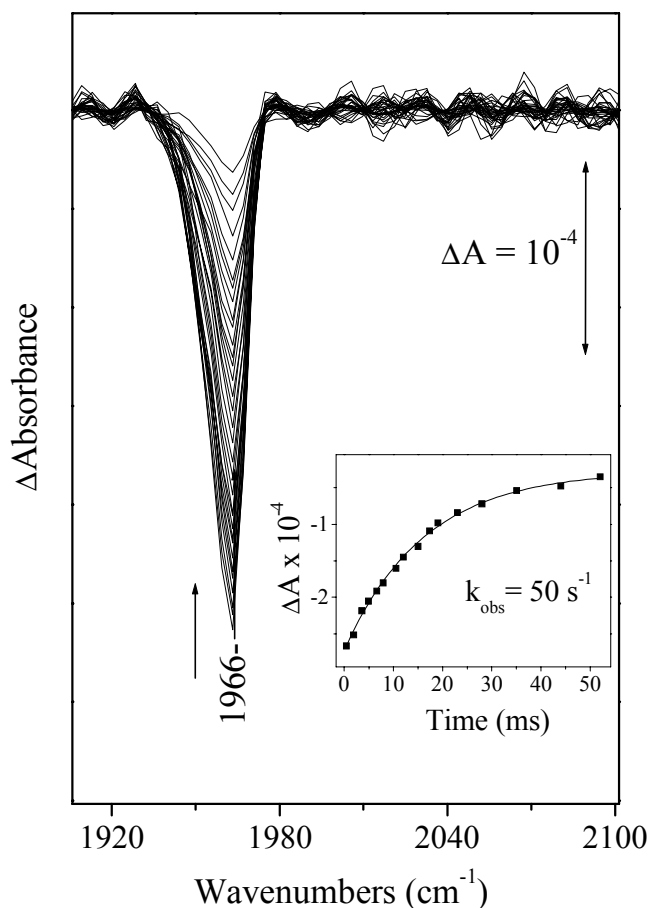
Μία σημαντική παρατήρηση στην μελέτη τόσο του κυτοχρώματος aa_3 όσο και ba_3 του βακτηρίου *P. denitrificans* είναι το αρνητικό σήμα στους 1494 cm^{-1} που αποδόθηκε στην ν_{19} (CC) του δακτυλίου της αποπρωτονιομένης μορφής τυροσίνης. Ένας από τους πιθανότερους υποψηφίους για το σήμα αυτό θεωρούμε ότι είναι η Tyr 280, που είναι η πλησιέστερη στο

διπυρηνικό κέντρο και αποτελεί το τελικό αμινοξύ του K-καναλιού (4). Παρουσιάζει υψηλό ποσοστό διατήρησης στις αιμοχαλκοξειδάσες και είναι ομοιοπολικά σύνδεμένη με έναν από τους υποκαταστάτες του Cu_B , την His 276. Ο Yoshikawa και οι συνεργάτες του στην λύση της κρυσταλλικής δομής του μιτοχονδριακού ενζύμου (8), υποστήριξαν ότι η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού Tyr-His προκαλεί σημαντική μείωση του pK_a της υδρόξυ ομάδας της τυροσίνης και κατά συνέπεια ένα σημαντικό ποσοστό της $-OH$ ομάδας μπορεί να είναι αποπρωτονιομένο σε φυσιολογικό pH. Πρότειναν, λοιπόν, ένα μηχανισμό στον οποίο η τυροσίνη 280 αποτελεί δότη πρωτονίου στο περόξυ ενδιάμεσο, και η ακόλουθη μεταφορά ηλεκτρονίου από τον Cu_B μέσω του ομοιοπολικού δεσμού, προκαλεί την σχάση του δεσμού O-O. Μοντέλο του διπυρηνικού κέντρου αίμης/χαλκού που περιλαμβάνει τον ομοιοπολικό δεσμό τυροσίνης-ιστιδίνης βρίσκεται σε συμφωνία με την πρόταση του Yoshikawa, παρέχοντας πειραματικά δεδομένα για την μείωση του pK_a της υδρόξυ ομάδας της τυροσίνης στο μοντέλο (35). Κατά συνέπεια προτείνουμε ότι το σήμα που καταγράψαμε οφείλεται στην αποπρωτονιομένη μορφή της τυροσίνης 280. Η μεταβολή του σήματος της Tyr 280 κατά την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου α_3^{2+} -CO δεν οφείλεται στον σχηματισμό του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO, όπως θα μπορούσε να υποθεθεί λόγω του ομοιοπολικού δεσμού Tyr 280-His 276, εφόσον τουλάχιστον στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 το σύμπλοκο του CO με τον Cu_B έχει αποσχηματιστεί ενώ το σήμα της τυροσίνης παραμένει. Προτείνουμε ότι η μεταβολή της τυροσίνης αποτελεί μέρος της ευρύτερης σύξευξης ομάδων πρωτεΐνης με την δέσμευση υποκαταστατών στο διπυρηνικό κέντρο, όπως σχολιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Η φασματοσκοπία time-resolved step-scan FTIR μας δίνει επίσης την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την χρονική εξέλιξη της πορείας της φωτοδιάσπασης του CO-συμπλόκου της οξειδάσης. Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται τα φάσματα διαφοράς «φως-σκοτάδι» του κυτοχρώματος ba_3 μετά την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου α_3^{2+} -CO σε χρόνους από 5 μs ως 40 ms. Στον πίνακα A παρουσιάζεται μόνο η περιοχή που εμφανίζεται η δόνηση α_3^{2+} -CO, ενώ στον πίνακα B παρουσιάζονται τόσο η δόνηση α_3^{2+} -CO (1966 cm^{-1}) όσο και η δόνηση Cu_B^{1+} -CO (2062 cm^{-1}) και περιλαμβάνεται μικρότερος αριθμός φασμάτων για μεγαλύτερη ευκρίνεια. Οι παρατηρούμενες σταθερές ταχύτητας αποσχηματισμού του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO και επαναδέσμευσης του υποκαταστάτη στην αίμη α_3 είναι όμοιες όπως φαίνεται από τα φάσματα του πίνακα B. Η μεταβολή της απορρόφησης της δόνησης στους 1966 cm^{-1} συναρτήσει του χρόνου παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα C, και με την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων προσδιορίστηκε η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3 $k_{obs} = 60\text{ s}^{-1}$.



Σχήμα 3: Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς της φωτοδιάσπασης «φωσ-σκοτάδι» του συμπλόκου α_3^{2+} -CO του κυτοχρώματος ba_3 του *P. denitrificans* με nanosecond παλμό 532 nm στους 298 K από 10 μs ως 40 ms (Πίνακας A). Στον Πίνακα B παρουσιάζεται και η περιοχή εμφάνισης και του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO, ενώ περιλαμβάνεται μικρότερος αριθμός φασμάτων για μεγαλύτερη ευκρίνεια. Η μεταβολή της απορρόφησης της δόνησης στους 1966 cm^{-1} συναρτήσεως του χρόνου παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα C, και με την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων προσδιορίστηκε η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3 .



Σχήμα 4: Time-resolved step-scan FTIR φάσματα διαφοράς της φωτοδιάσπασης «φως-σκοτάδι» του συμπλόκου α_3^{2+} -CO του κυτοχρώματος aa_3 του *P. denitrificans* με nanosecond παλμό 532 nm στους 298 K από 70 μ s ως 56 ms. Η μεταβολή της απορρόφησης της δόνησης στους 1966 cm^{-1} συναρτήσκει του χρόνου παρουσιάζεται αναλυτικά στο ένθετο, και με την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων υπολογίστηκε η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3 .

Στο Σχήμα 4 απεικονίζονται τα φάσματα διαφοράς «φως-σκοτάδι» του κυτοχρώματος aa_3 μετά την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου α_3^{2+} -CO σε χρόνους από 5 μ s ως 56 ms. Η μεταβολή της απορρόφησης της δόνησης στους 1966 cm^{-1} συναρτήσκει του χρόνου παρουσιάζεται αναλυτικά στο ένθετο του σχήματος, και με την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων προσδιορίστηκε η παρατηρούμενη σταθερά ταχύτητας της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3 $k_{\text{obs}} = 50 \text{ s}^{-1}$, τιμή η οποία βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη (25), αλλά και είναι όμοια με την αντίστοιχη τιμή που υπολογίστηκε για το κυτόχρωμα ba_3 .

Παρά το γεγονός ότι οι τιμές των παρατηρούμενων σταθερών επαναδέσμευσης του CO στην αίμη α_3 μετά την φωτοδιάσπαση του αρχικού συμπλόκου CO-ενζύμου παρουσιάζουν πολύ κοντινές τιμές στην περίπτωση των κυτοχρωμάτων ba_3 και aa_3 του βακτηρίου *P. denitrificans*, η κινητική συμπεριφορά του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO παρουσιάζει σημαντική διαφορά. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος aa_3 το σύμπλοκο αυτό έχει αποσχηματιστεί σε 5 μ s, που αποτελεί την χρονική διακριτικότητα των μετρήσεων της εργασίας αυτής, ενώ στα φάσματα του κυτοχρώματος ba_3 η ένταση του συμπλόκου εμφανίζεται ως τα 40 ms. Το κυτόχρωμα aa_3 παρουσιάζει συμπεριφορά όμοια με το

κυτόχρωμα aa_3 των θηλαστικών, που ο χρόνος ημιζωής του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO είναι 1.5 μ s (13), και η αίμη a_3 που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση με αυξημένη ισχύ του δεσμού Fe-His επανέρχεται σε ισορροπία σε χρονική κλίμακα επίσης μ s (36). Όμως η διαδικασία της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη a_3 πραγματοποιείται σε χρόνους πολύ μεγαλύτερους, της τάξης των ms (25). Η άμεση επαναδέσμευση του CO στην αίμη είναι της τάξης των ns, συνεπώς κάποιος άλλος παράγοντας είναι αυτός που ελέγχει την παραπάνω διαδικασία. Για την ερμηνεία του φαινομένου προτάθηκε αρχικά από την ομάδα του Woodruff (25) ένα μοντέλο που περιελάμβανε την δέσμευση ενός ενδογενούς υποκαταστάτη στην έκτη θέση δέσμευσης της αίμη a_3 , οπότε και η επαναδέσμευση του CO πραγματοποιούνταν μετά την απομάκρυνση αυτού του ενδογενούς υποκαταστάτη. Μεταγενέστερα time-resolved ps πειράματα συντονισμού Raman απέδειξαν ότι η αίμη a_3^{2+} είναι υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε μετά την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου a_3^{2+} -CO, και κατά συνέπεια δεν δεσμεύεται σε αυτήν κάποιος ενδογενής υποκαταστάτης (37). Σε πρόσφατη συγκριτική μελέτη των κυτοχρωμάτων aa_3 των θηλαστικών και cbb_3 του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri*, προτάθηκε ότι ο μηχανισμός ελέγχου της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη a_3 στην περίπτωση του πρώτου ενζύμου καθορίζεται από το πρωτεϊνικό περιβάλλον του Cu_B , το οποίο κατευθύνει τον υποκαταστάτη μακριά από το διπυρηνικό κέντρο αμέσως μετά την αποδέσμευση του από το άτομο του χαλκού. Σε αντίθεση, στο κυτόχρωμα cbb_3 η διαδικασία που ελέγχει την επαναδέσμευση του CO στην αίμη b_3^{2+} είναι ο αποσχηματισμός του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO (26). Ο τελευταίος μηχανισμός είναι αυτός που ισχύει στην περίπτωση του κυτοχρώματος ba_3 βακτηρίου *P. denitrificans*, αλλά και των κυτοχρωμάτων caa_3 και ba_3 του *T. thermophilus* σύμφωνα με προηγούμενες εργασίες (23,24). Κατά συνέπεια, ιφίστανται δύο διαφορετικοί μηχανισμοί ελέγχου της κινητικής συμπεριφοράς του ενεργού κέντρου στην δέσμευση του CO σε διαφορετικές οξειδάσες, παρά την δομική ομοιότητα του διπυρηνικού κέντρου στην οικογένεια αυτών των ενζύμων. Ωστόσο, και στους δύο αυτούς μηχανισμούς κοινό στοιχείο αποτελεί η αργή επαναδέσμευση του υποκαταστάτη στην αίμη της ενεργού θέσης (σε χρόνο ms, ενώ η άμεση επαναδέσμευση πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε σε χρονική κλίμακα ns) είτε μέσω του μεγάλου χρόνου ζωής του συμπλόκου Cu_B^{1+} -CO, είτε μέσω της απομάκρυνσης του υποκαταστάτη από το ενεργό κέντρο. Αυτή η ιδιότητα της οικογένειας των τελικών οξειδασών αναμένεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της καταλυτικής αναγωγής του μοριακού οξυγόνου.

Βιβλιογραφία

1. Ludwig, B. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1101**, 195-197.
2. Richter, O.-M. H., Tao, J.-s., Turba, A., Ludwig, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 23079-23086.
3. Zichermann, I., Anemuller, S., Richter, O.-M. H., Tautu, O. S., Link, T. A., Ludwig, B. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 93-102.
4. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
5. Ostermeier, C., Harrenga, A., Elmer, U., and Michel, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10547-10553.
6. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science* **269**, 1069-1074.
7. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) *Science* **272**, 1136-1144.
8. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
9. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) *EMBO J.* **19**, 1766-1776.
10. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikstrom, M. (2002) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 910-917.
11. Alben, J. O., Moh, P. P., Fiamingo, F. G., Altschuld, R. A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 234-237.
12. Park, S., Pan, L-P., Chan, S. I., and Alben, J. (1996) *Biophysical J.* **71**, 1036-1047.
13. Dyer, R. B.; Einarsdóttir, O.; Killough, P. M.; Lopez-Garriga, J. J.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7657-7659.
14. Puustinen, A., Baily, J. A., Dyer, R. B., Mecklenburg, S. L., Wikström, M., and Woodruff, W. H. (1997) *Biochemistry* **36**, 13195-13200.
15. Rost, B., Behr, J., Hellwig, P., Richter O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H., and Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* **38**, 7565-7571.
16. Iwase, T., Varotsis, C., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitagawa, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1415-1416.
17. Rich, P.R., and Breton, J. (2001) *Biochemistry* **40**, 6441-6449.

18. Lübben, M., Gerwert, K. (1996) *FEBS Lett.* **385**, 53-57.
19. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mäntele, W. (1999) *FEBS Lett.* **458**, 83-86.
20. Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G., and Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* **38**, 9648-9658.
21. Hellwig, P., Grzybek, S., Behr, J., Ludwig, B., Michel, H., and Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* **38**, 1685-1694.
22. Bailey, J. A., Tomson, F. L., Mecklenburg, S. L., MacDonald, G. M., Katsonouri, A., Puustinen, A., Gennis, R. B., Woodruff, W. H, and Dyer, R. B. (2002) *Biochemistry* **41**, 2675-2683.
23. Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32867-32874.
24. Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32860-32866.
25. Woodruff, W. H. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**,177-188.
26. Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3814-3815.
27. Hendler, R. W., Pardhasaradhi, K., Reynafarje, B. & Ludwig, B. (1991) *Biophys. J.* **60**, 415-423.
28. Wang, J., Takahashi, S., Hosler, P. H., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis R. B. & Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825.
29. Wang, J., Gray, K. A., Daldal, F. & Rousseau, D. L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9363-9364.
30. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M. & Rousseau, D. L. (2001) *Biophysical J.* **80**, 2039-2045.
31. Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 13563-13568.
32. Han, S., Takahashi, S., and Rousseau, D. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1910-1919.
33. Behr, J., Hellwig, P., Mäntele, W., Michel, H. (1998) *Biochemistry* **37**, 7400-7406.
34. Hellwig, P., Pfitzner, U., Behr, J., Rost, B., Pesavento, R. P., Donk, W. v., Gennis, R. B., Michel, H., Ludwig, B., and Mäntele, W. (2002) *Biochemistry* ASAP
35. McCauley, K. M., Vrtis, J. M., Dupont, J., van der Donk, W. A. (2000) *J. Am. Chem. Soc* **122**, 2403-2404.
36. Findsen, E. W.; Centeno, J.; Babcock, G. T.; Ondrias, M. R. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5367-5372.

37. Schelvis, J. P. M.; Deinum, G.; Varotsis, C.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. (1997)
J. Am. Chem. Soc. **119**, 8409-8416.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

**Μελέτη του Διπυρηνικού Κέντρου Αιμικού/Μη-Αιμικού
Σιδήρου της Αναγωγής του Μονοξειδίου του Αζώτου**

Περίληψη

Το φάσμα συντονισμού Raman της οξειδωμένης μορφής της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NO) από το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* παρουσιάζει δύο ξεχωριστές δονήσεις $\nu_{as}(\text{Fe-O-Fe})$ του κέντρου αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου στους 815 και 833 cm^{-1} . Ο διαχωρισμός της δόνησης Fe-O-Fe δηλώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων (*ανοικτή* και *κλειστή*) στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Πειράματα ανταλλαγής με δευτέριο παρέχουν στοιχεία από που μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε ότι στην κύρια διαμόρφωση (833 cm^{-1} , *κλειστή*) η Fe-O-Fe ομάδα διατηρεί δεσμό υδρογόνου με γειτονικά αμινοξέα. Προτείνουμε ότι στην *κλειστή* διαμόρφωση, τα δεσμευμένα στον μη-αιμικό σίδηρο αμινοξικά κατάλοιπα εξασκούν ισχυρές στερικές ή πολικές αλληλεπιδράσεις στο οξυγόνο της γέφυρας, με αποτέλεσμα την συμπίεση ή παραμόρφωση της Fe-O-Fe ομάδας. Αντίθετα, η *ανοικτή* (815 cm^{-1}) διαμόρφωση επιτρέπει μόνο ασθενείς αλληλεπιδράσεις με τα γειτονικά αμινοξέα. Οι παραπάνω διαφορές που εμφανίζονται στα φάσματα Raman μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αίμη έχει εύκολη πρόσβαση σε πρωτόνια και επίσης τα ευκίνητα αμινοξέα του αιμικού σιδήρου αλληλεπιδρούν με αυτήν. Τα δεδομένα αυτά δηλώνουν την πιθανότητα της άμεσης εμπλοκής των υποκαταστατών του μη-αιμικού σιδήρου στην πρωτονίωση του NO κατά την καταλυτική αναγωγή του. Τα φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων προσφέρουν πληροφορίες για την κατάσταση σπιν και την συναρμογή υποκαταστατών μέσω συγκεκριμένων δονήσεων του πορφυρινικού δακτυλίου, και ιδιαίτερα για την φυσική και δεόξυ μορφή της αίμη b_3 , πληροφορίες για το εγγύ (*proximal*) και μακρινό (*distal*) περιβάλλον της. Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου της ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του άνθρακα. Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης περιγράφονται με μεγαλύτερη βεβαιότητα οι δομές της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής του ενζύμου, καθώς επίσης και το σύμπλοκο της ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του άνθρακα.

Εισαγωγή

Η βακτηριακή αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου σχηματίζει τον δεσμό N-N κατά την διαδικασία της απονιτροποίησης (1-7). Είναι ένα bc μεμβρανικό σύμπλοκο που αποτελείται από δύο υπομονάδες, NorC και NorB, και καταλύει την αναγωγή του NO σε N₂O. Το σύμπλοκο περιέχει τέσσερα γνωστά οξειδοαναγωγικά κέντρα: τρεις αίμες και ένα άτομο μη-αιμικού σιδήρου. Η αίμη *c* (αριθμού συναρμογής έξι, χαμηλού σπιν) είναι προσδεμένη στην υπομονάδα NorC και αποτελεί το σημείο εισόδου των ηλεκτρονίων για το ένζυμο. Η υπομονάδα NorB περιέχει μια χαμηλού σπιν αίμη *b* αριθμού συναρμογής έξι και μία αίμη *b*₃ υψηλού σπιν με αριθμό συναρμογής πέντε, η οποία σχηματίζει με το άτομο του μη-αιμικού σιδήρου την διπυρηνική περιοχή αναγωγής του NO. Η αμινοξική ακολουθία της NorB περιέχει και τις έξι ιστιδίνες που είναι υποκαταστάτες των αιμών *a* και *a*₃ καθώς και του ατόμου Cu_B στην κυτοχρωμική οξειδάση (CcO).

Τα φάσματα συντονισμού Raman της οξειδωμένης, ανηγμένης όπως επίσης και του συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου ενζύμου με το CO έχουν αναφερθεί και παρείχαν ιδιαίτερα απρόσμενα αποτελέσματα. Τα φάσματα συντονισμού Raman (RR) της οξειδωμένης NOR έχουν αποκαλύψει την παρουσία της υψηλού σπιν αριθμού συναρμογής πέντε αίμης *b*₃, που δεν είναι συναρμοσμένη στην πρωτεΐνη με την εγγύ ιστιδίνη στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου. (6) Τα RR (6) και FTIR (5) φάσματα του ανηγμένου ενζύμου στο σύμπλοκο με το CO έχουν δείξει τις συχνότητες των δονήσεων τάσης Fe-CO στα 478 cm⁻¹, κάμψης Fe-C-O στους 570 cm⁻¹ και τάσης C-O στους 1970 cm⁻¹, αποτελέσματα που δηλώνουν ότι η αίμη *b*₃ είναι συναρμοσμένη με την πρωτεΐνη μέσω της εγγύς ιστιδίνης. Σε μια πρόσφατη αναφορά των φασμάτων Raman της οξειδωμένης μορφής του NOR, αναγνωρίστηκε μία δόνηση στους 811 cm⁻¹, που παρουσίαζε ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου, και αποδόθηκε στην ασύμμετρη δόνηση τάσης ν_{as}(Fe-O-Fe) του αιμικού/μη-αιμικού δισιδηρικού κέντρου (7).

Η σύγκριση των ιδιοτήτων του οξειδωμένου με το δεόξυ ένζυμο (αριθμού συναρμογής πέντε, που δημιουργείται μέσω αντιδράσεων) καθώς επίσης και με το CO σύμπλοκο, συνδέεται με τις δομικές αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την δέσμευση και αποδέσμευση υποκαταστατών από την πρωτεΐνη. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην αίμη και την πρωτεΐνη καθορίζουν τις βιολογικές ιδιότητες τις αιμοπρωτεΐνης. Επιπλέον, η διελεύκανση του μηχανισμού πρωτονίωσης του NO, προϋποθέτει τον καθορισμό περιοχών του ενζύμου που διαθέτουν ανταλλάξιμα πρωτόνια. Η πιθανή ύπαρξη τέτοιων περιοχών

κοντά στον αιμικό ή μη-αιμικό σίδηρο μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές των φασμάτων συντονισμού Raman με την πραγματοποίηση πειραμάτων ανταλλαγής πρωτονιωμένων με δευτεριομένα ρυθμιστικά διαλύματα, εφόσον οι δονητικές συχνότητες παρουσιάζουν ευαισθησία στην ανηγμένη μάζα.

Σε μια προσπάθεια να συγκεντρώσουμε πληροφορίες σχετικές με τις παραπάνω παρατηρήσεις, χρησιμοποιήσαμε 413.1 nm RR διέγερση για να μελετήσουμε τα RR φάσματα της μορφής της NOR, όπως αυτό απομονώνεται, μέσω της ανταλλαγής με $D_2^{16}O$ και $H_2^{18}O$ και να τα συγκρίνουμε με τα φάσματα του ανηγμένου ενζύμου. Με βάση τα αποτελέσματά μας, προτείνουμε ένα πιθανό μηχανισμό για την μετάβαση από την οξειδωμένη στην ανηγμένη κατάσταση, καθώς επίσης και την δυνατότητα των υποκαταστατών του μη-αιμικού σιδήρου να δρουν ως δότες πρωτονίων στην αναγωγή του NO σε N_2O .

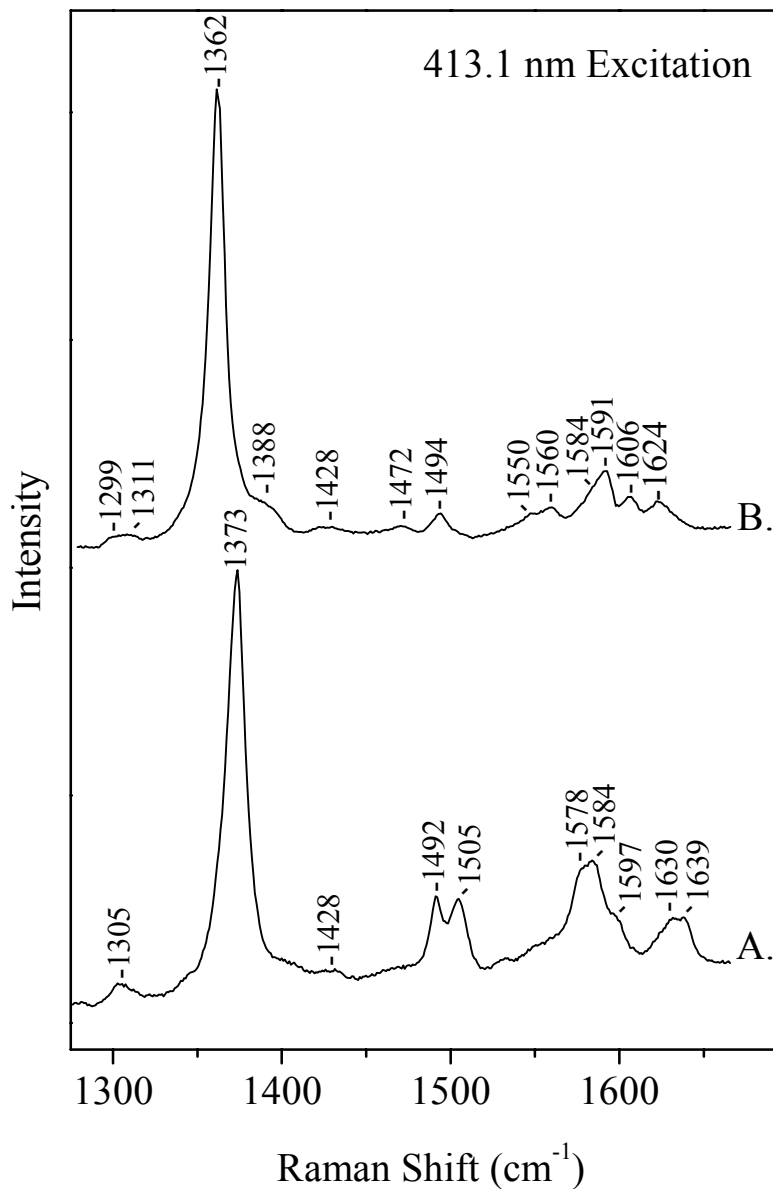
Πειραματική διαδικασία

Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κεφαλαίου 3. Για τις ισοτοπικές μελέτες υδρογόνου/δευτερίου και $H_2O/H_2^{18}O$, διαλύματα του οξειδωμένου ενζύμου ανταλλάχθηκαν τρεις φορές με 99.9% $D_2^{16}O$ (Aldrich Chemical Co. Inc.) και 97% $H_2^{18}O$ (Icon). Το σύμπλοκο της πλήρως ανηγμένης NOR με το CO προετοιμάστηκε με την αναερόβια έκθεση του ανηγμένου με dithionite ενζύμου σε αέριο CO. Τα πειράματα Raman πραγματοποιήθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης 413.1 nm από CW Kr ion Laser (Coherent). Περίπου 40μl ενζύμου συγκέντρωσης 50μM σε 20mM Tris, pH 7.4 τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενη κυψελίδα quartz Raman (4000-6000 rpm) για να ελαχιστοποιηθεί η θέρμανση του δείγματος. Οι κυψελίδες είναι σχεδιασμένες για αναερόβιες μετρήσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την καταγραφή Raman φασμάτων όσο και απορρόφησης ορατού. Τα Raman φάσματα ελήφθησαν με τριπλό πολυχρωμάτορα SPEX 1877 με ανιχνευτή EG&G (model 1530-CUV-1024S) CCD. Οι μετατοπίσεις συχνότητων διαβαθμίστηκαν με βάση το τουλούδιλο. Η ακρίβεια των μετρήσεων Raman είναι $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ για τις απόλυτες μετρήσεις και $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ για τις συσχετιζόμενες μετατοπίσεις. Η προσπίπτουσα στο δείγμα ενέργεια του laser κύμανθηκε σε 5-10 mW και ο συνολικός χρόνος καταγραφής για κάθε φάσμα 20-30 min. Τα FTIR φάσματα ελήφθησαν από δείγματα συγκέντρωσης 200-300 μM με φασματοφωτόμετρο FTIR Bruker Equinox 55 εξοπλισμένο με ανιχνευτή MCT που ψύχεται με υγρό άζωτο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν αναερόβια σε κυψελίδα με παράθυρα CaF_2 και 0.025 mm πάχος

δείγματος. Τα φάσματα είναι μέσος όρος 1000 σαρώσεων και ως background χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα. Η διακριτικότητα για τις FTIR μετρήσεις είναι 2 cm^{-1} .

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα φάσματα συντονισμού Raman αιμοπρωτεϊνών στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων περιέχουν δονήσεις που έχουν αποδοθεί στον πορφυρινικό δακτύλιο και χαρακτηρίζουν καταστάσεις του δακτυλίου, όπως η οξειδωτική του κατάσταση (ν_4), ο αριθμός υποκατάστασης και το σπιν του (ν_3 , ν_2 , ν_{10}).



Σχήμα 1. RR φάσματα της οξειδωμένης (φάσμα A) και ανηγμένης (φάσμα B) NOR στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων με διέγερση 413.1 nm.

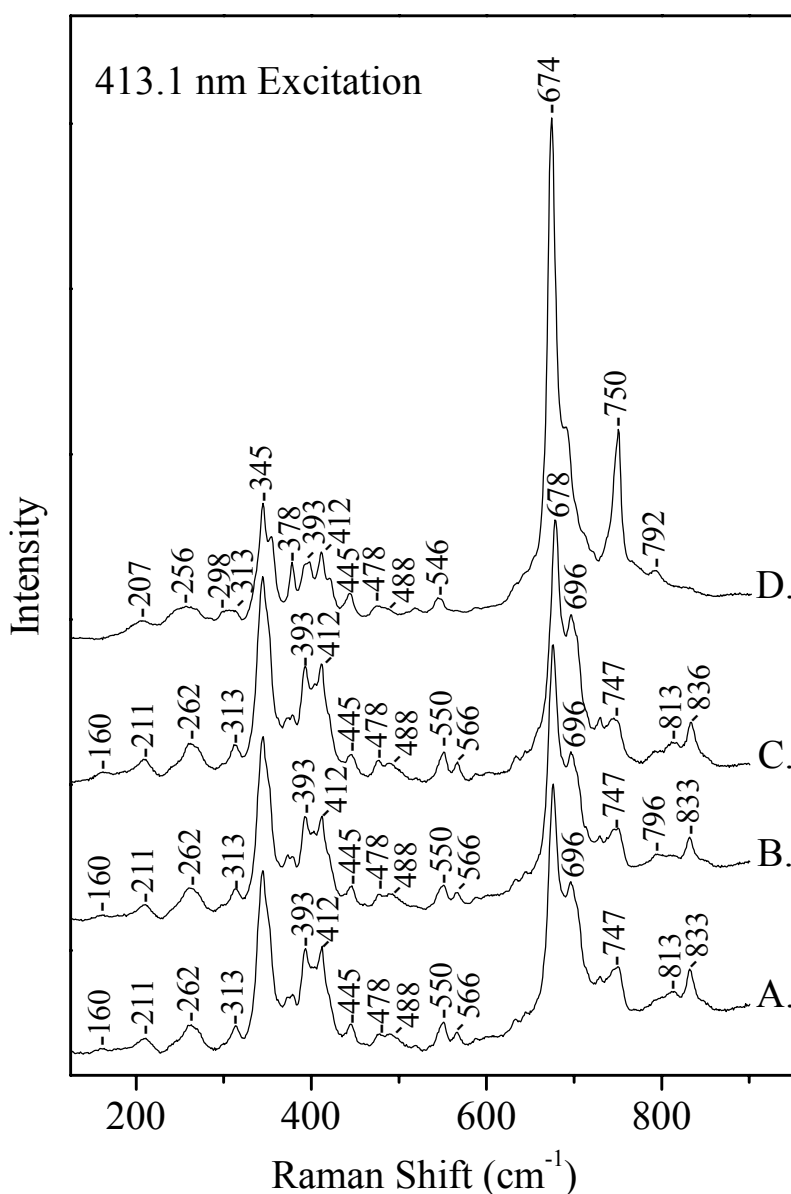
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Συχνότητες δονήσεων (cm^{-1}) συντονισμού Raman στην NOR

Δονήσεις	Οξειδωμένο		Ανηγμένο	
	5C/HS	6C/LS	5C/HS	6C/LS
ν_2	1578	1584	1560	1584/1591
ν_3	1492	1505	1472	1494
ν_4	1373	1373	1362	1362
ν_{10}	1630	1639	1606	
ν_{11}				1550
ν_{37}		1597		
$\nu_{C=C}$			1624	1624

Το σχήμα 1 απεικονίζει την περιοχή υψηλών συχνοτήτων του RR φάσματος της οξειδωμένης (φάσμα A) και της πλήρως ανηγμένης (φάσμα B) μορφής της NOR χρησιμοποιώντας ως μήκος κύματος διέγερσης τα 413.1 nm, το οποίο βρίσκεται σε συντονισμό με όλες οι αίμες. Τα αποτελέσματα και η απόδοση των δονήσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Οι δονήσεις του οξειδωμένου ενζύμου (φάσμα A) στους 1373 (ν_4) 1492 (ν_3), 1578 (ν_2) και 1630 (ν_{10}) cm^{-1} δηλώνουν την παρουσία της υψηλού σπιν αίμης b_3 , αριθμού συναρμογής πέντε, όπως έχει αναφερθεί από τους Moëhne-Loccoz και de Vries (6). Συνεπώς η αίμη b_3 είναι δεσμευμένη με ένα μόνο αξονικό υποκαταστάτη, είτε στην εγγύ ή την μακρινή θέση. Επίσης παρούσες στο φάσμα είναι δονήσεις στους 1505 (ν_3), 1584 (ν_2) και 1639 (ν_{10}) cm^{-1} , που είναι ενδεικτικές των χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι αιμών c και b . Η δόνηση στους 1597 cm^{-1} προέρχεται από την ν_{37} των χαμηλού σπιν c και b . Η ν_4 δόνηση παρουσιάζεται στην ίδια συχνότητα για τις τρεις οξειδωμένες αίμες παρόλο που υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα οξειδοαναγωγικά δυναμικά και τους υποκαταστάτες του πορφυρινικού δακτυλίου για την κάθε μία από αυτές. Το γεγονός αυτό είναι ασυνήθιστο εφόσον η ν_4 παρουσιάζει εξάρτηση από την ισχύ των δεσμών επαναφοράς μεταξύ μετάλλου→πορφυρίνης ($d\pi \rightarrow e_g(\pi)$). Στο φάσμα του ανηγμένου ενζύμου (φάσμα B) η ν_4 εμφανίζεται στους 1362 cm^{-1} πιστοποιώντας ότι όλες οι αίμες βρίσκονται στην ανηγμένη μορφή. Η ν_3 στους 1472 cm^{-1} , η ν_2 στους 1560 cm^{-1} , και η ν_{10} στους 1606 cm^{-1} δηλώνουν την παρουσία της ανηγμένης, αριθμού συναρμογής πέντε, υψηλού σπιν αίμης b_3 . Ενδεικτική των χαμηλού σπιν αιμών c και b είναι η ν_3 στους 1494 cm^{-1} . Οι δονήσεις στους 1584 και 1591 cm^{-1} αποδίδονται στην ν_2 των χαμηλού σπιν b και c , αντίστοιχα. Η ν_{10} των χαμηλού σπιν

αιμών αναμένεται στους 1620 cm^{-1} , αλλά η ανίχνευσή της παρεμποδίζεται λόγω αλληλεπικάλυψης με την δόνηση τάσης των βυνιλίων του πορφυρινικού δακτυλίου. Οι συχνότητες που παρουσιάζονται όλες οι δονήσεις βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες RR ενζύμων που περιέχουν *b* και *c* αίμες, καθώς επίσης και με τα μοντέλα Fe-πρωτοπορφυρινών (8-12).

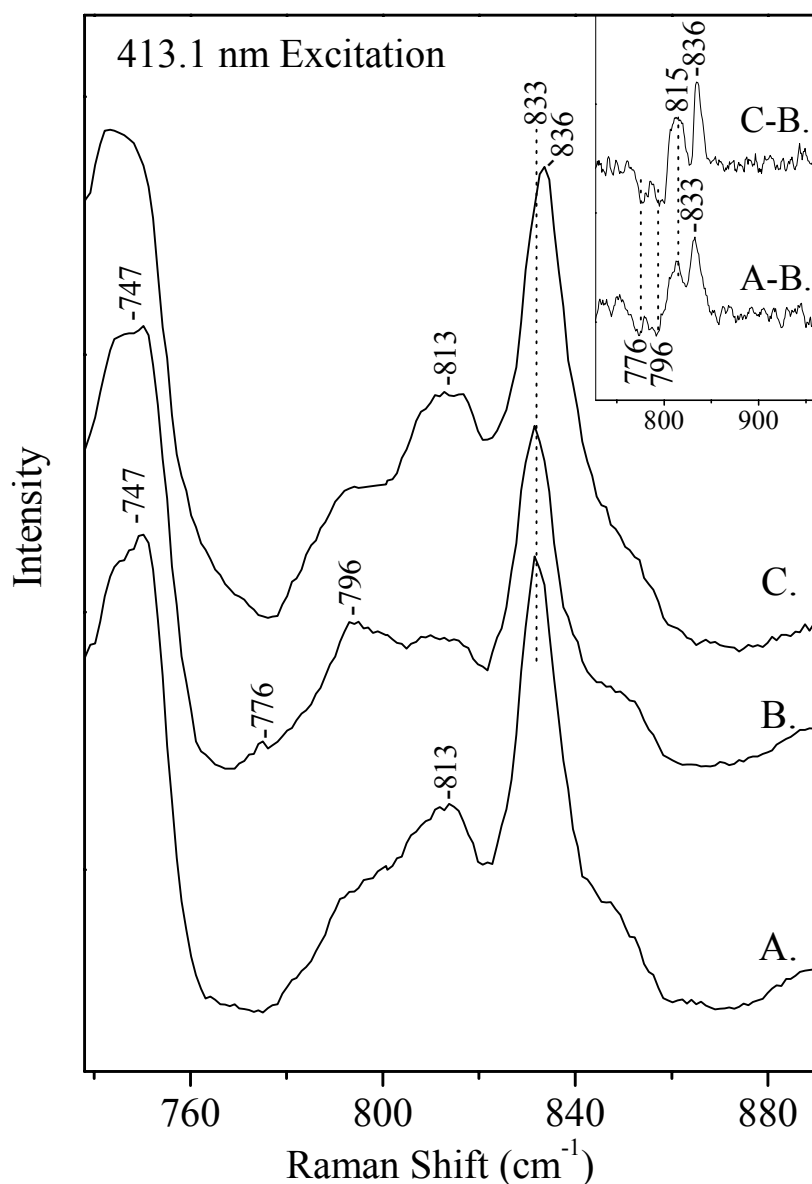
Το σχήμα 2 παρουσιάζει την περιοχή χαμηλών συχνοτήτων του RR φάσματος από τους 150 έως τους 900 cm^{-1} της οξειδωμένης μορφής της NOR σε H_2^{16}O (φάσμα A), H_2^{18}O (φάσμα B), D_2^{16}O (φάσμα C) καθώς και του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (φάσμα D) με 413.1 nm διέγερση. Οι γραμμές Raman στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων περιλαμβάνουν δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου και των περιφερειακών υποκαταστατών του, καθώς



Σχήμα 2. RR φάσματα στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων με διέγερση 413.1 nm της οξειδωμένης NOR σε H_2^{16}O (φάσμα A), σε H_2^{18}O (φάσμα B), και σε D_2^{16}O (φάσμα C). Το φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (φάσμα D) καταγράφηκε μετά την πρόσθεση dithionite στο οξειδωμένο ένζυμο.

επίσης και τις κινήσεις Fe-υποκαταστάτη που είναι κάθετες στο επίπεδο της αίμης και του μη αιμικού σιδήρου. Με την χρησιμοποίηση διέγερσης στην περιοχή της Soret μετάβασης, τα RR φάσματα αίμης τύπου *b* που διαθέτουν αριθμό συναρμογής πέντε στην Fe(II) κατάσταση, και αξονικό υποκαταστάτη ιστιδίνη, εμφανίζουν την δόνηση τάσης σιδήρου-ιστιδίνης στους 200-250 cm^{-1} . Η δόνηση που εμφανίζεται στους 211 cm^{-1} στο φάσμα A, δεν έχει αναφερθεί σε φάσματα αιμών χαμηλού σπιν *b* και *c* στην Fe(III) κατάσταση, και δεν αποτελεί αξονική δόνηση της υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 που σχηματίζει το σύμπλοκο της όξο-γέφυρας αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου. Επιπλέον, δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση με H_2^{18}O (φάσμα B) και D_2^{16}O (φάσμα C), και δεν εμφανίζεται στο φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (φάσμα D). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η γραμμή στους 211 cm^{-1} είναι υποψήφια RR δόνηση του μη-αιμικού σιδήρου/ιστιδίνης. Έχει αποδειχθεί ότι πρωτεΐνες και μοντέλα που περιέχουν όξο-γέφυρες δισιδηρικών κέντρων, παρουσιάζουν ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 320-420 nm. Οι μεταβάσεις αυτές έχουν αποδοθεί σε $\text{o}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ταινίες μεταφοράς φορτίου (CT) (13,14). Συνεπώς, με την χρησιμοποίηση διέγερσης στα 413.1 nm βρισκόμαστε σε συντονισμό με την CT ταινία και μας δίνεται η δυνατότητα παρατήρησης δονήσεων του συστήματος μη-αιμικού Fe(III). Η ανάλυση της ενίσχυσης της $\nu(\text{Fe-O-Fe})$ συναρτήσεως του μήκους κύματος διέγερσης μπορεί να προσφέρει πληροφορίες για την αναγνώριση της συνεισφοράς των $\text{o}_2\text{O} \rightarrow \text{μετάλλου CT}$ ταινιών. Η συχνότητα της δόνησης στους 207 cm^{-1} (φάσμα D) είναι όμοια με τις $\nu(\text{Fe}^{+2}\text{-His})$ που εμφανίζονται σε άλλα συστήματα υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής, Fe(II) αίμης *b* (11,12,15). Η περιοχή 250-750 cm^{-1} του RR φάσματος της NOR παρουσιάζει μεγάλο αριθμό δονήσεων, οι περισσότερες από τις οποίες οφείλονται στον πορφυρινικό δακτύλιο και τους περιφερειακούς υποκαταστάτες των χαμηλού σπιν αιμών *b* και *c*. Στην περιοχή 740-890 cm^{-1} καταγράφονται αλλαγές έντασης και μετατοπίσεις συχνοτήτων κατά την ανταλλαγή με H_2^{18}O και D_2^{16}O , περιοχή η οποία παρουσιάζεται σε μεγένθυση στο σχήμα 3.

Στο σχήμα 3, η δόνηση στους 833 cm^{-1} (φάσμα A) εμφανίζει μειωμένη ένταση στο φάσμα του H_2^{18}O (φάσμα B), και η δόνηση στους 813 cm^{-1} (φάσμα A) έχει εξαφανιστεί στο φάσμα του H_2^{18}O (φάσμα B). Η αφαίρεση του φάσματος του H_2^{18}O (φάσμα B) από αυτό του H_2^{16}O δίνει το φάσμα διαφοράς A-B, που απεικονίζεται στο ένθετο του σχήματος 3. Το φάσμα διαφοράς παρουσιάζει δύο δονήσεις που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου, με τα ζεύγη κορυφών να εμφανίζονται στους 815/776 cm^{-1} και 833/796 cm^{-1} για $\text{H}_2^{16}\text{O}/\text{H}_2^{18}\text{O}$. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η ευρεία αρνητική δόνηση



Σχήμα 3. Ομοίως με το σχήμα 2, αλλά στην περιοχή συχνοτήτων 740-890 cm^{-1} . Τα φάσματα στο ένθετο αντιπροσωπεύουν τα φάσματα διαφοράς $\text{H}_2^{16}\text{O}-\text{H}_2^{18}\text{O}$ (A-B) και $\text{D}_2\text{O}-\text{H}_2^{18}\text{O}$ (C-B).

στους 778 cm^{-1} που είχε αρχικά αναφερθεί για το φάσμα σε H_2^{18}O , δεν είναι αποτέλεσμα μίας μόνο δόνησης αλλά δύο κορυφών που αλληλεπικαλύπτονται. Για να καθορίσουμε κατά πόσο υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη δεσμών υδρογόνου στο οξυγόνο που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση, καταγράψαμε το RR φάσμα σε ρυθμιστικό διάλυμα εμπλουτισμένο σε D_2^{16}O (φάσμα C). Η σύγκριση του φάσματος C με το A δείχνει ότι η δόνηση στους 833 cm^{-1} έχει μετατοπιστεί στους 836 cm^{-1} στο D_2^{16}O . Επιπλέον στοιχείο που πιστοποιεί την μετατόπιση της δόνησης στους 836 cm^{-1} , αλλά και την ύπαρξη δύο ζευγών κορυφών $815/776$ και $833/796 \text{ cm}^{-1}$, που παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου είναι το φάσμα διαφοράς C-B. Η παρατηρούμενη μετατόπιση λόγω δευτερίωσης συνδέεται με αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου. Το φάσμα

διαφοράς C-B δείχνει επίσης ότι η 815 cm^{-1} δόνηση παρουσιάζει μεγαλύτερο εύρος στο D_2O σε σχέση με το H_2O . Οι συχνότητες που παρουσιάζονται στα φάσματα διαφοράς αντιπροσωπεύουν σωστά τις αντίστοιχες των απολύτων φασμάτων, και το μικρό εύρος της 815 cm^{-1} δόνησης στο H_2O σε σχέση με το D_2O δεν είναι αποτέλεσμα της μικρής διαφοράς στην συχνότητα των O^{16} και O^{18} κορυφών. Εάν λοιπόν, το εύρος εξαρτάται από την ανομοιογένεια της διαμόρφωσης, τότε η 815 cm^{-1} κορυφή δηλώνει κοντινή απόσταση αμινοξέων στο οξυγόνο της γέφυρας. Στην περιοχή $160\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος δεν παρατηρούνται άλλες δονήσεις που να παρουσιάζουν ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του οξυγόνου, γεγονός που δείχνει ότι τόσο η συμμετρική δόνηση τάσης αλλά και η δόνηση κάμψης του Fe-O-Fe δεν ενισχύονται με το μήκος κύματος διέγερσης των 413.1 nm . Επιπλέον, οι δονήσεις στους 815 και 833 cm^{-1} δεν ανιχνεύονται στο φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (σχήμα 2, φάσμα D), όπως άλλωστε αναμένεται από την μετάβαση της οξειδωμένης στην ανηγμένη μορφή. Τα πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι τόσο η 815 όσο και η 833 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στην ασύμμετρη δόνηση τάσης ν_{as} (Fe-O-Fe) της NOR, εφόσον και η μετατόπιση $38\text{-}39\text{ cm}^{-1}$ λόγω ισοτοπικού φαινομένου βρίσκεται σε συμφωνία με την θεωρητική προσέγγιση του αρμονικού ταλαντωτή για την ομάδα Fe-O-Fe.

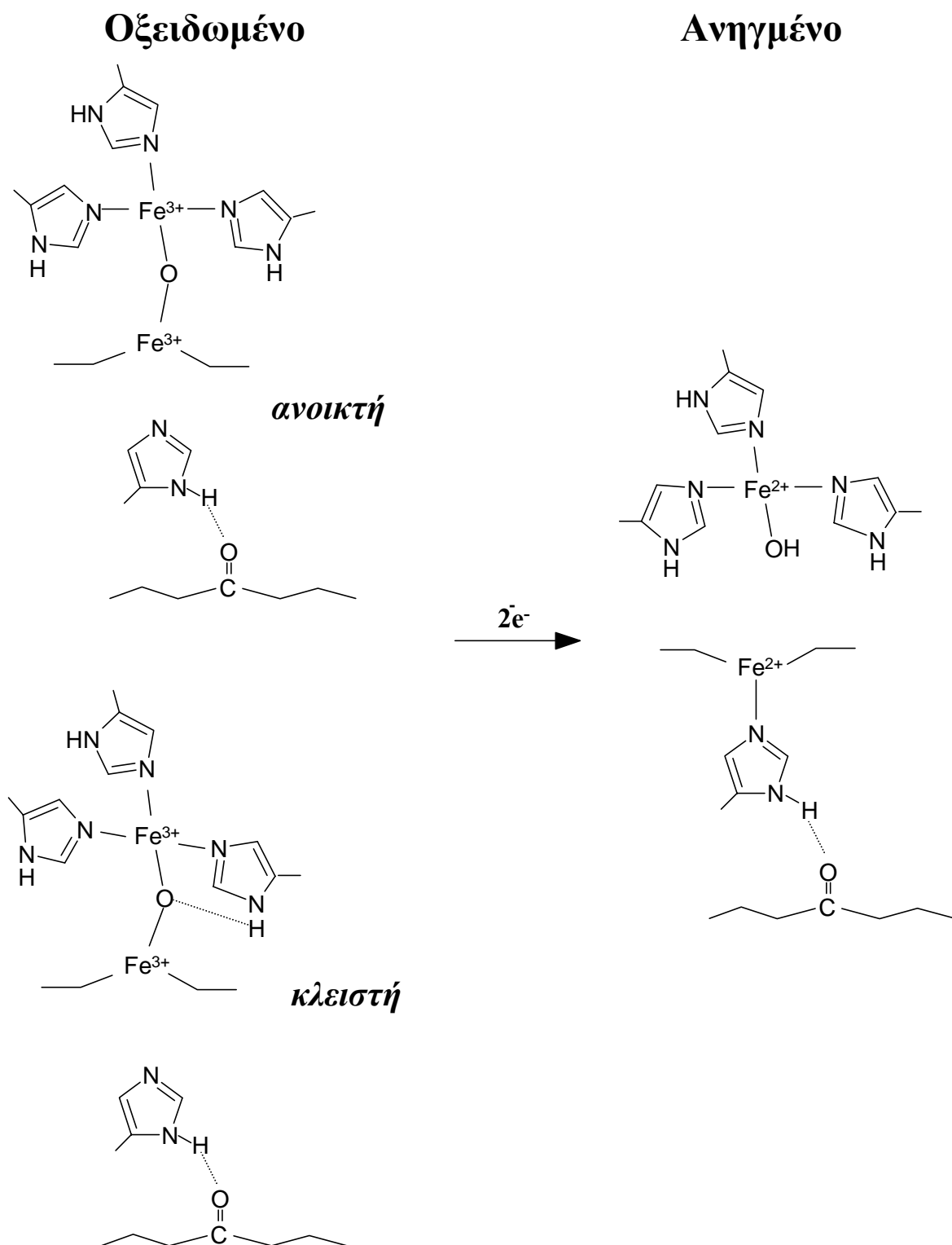
Το ζεύγος δονήσεων στους $815/776\text{ cm}^{-1}$ είχα πρόσφατα αναφερθεί από τους Moëhne-Locozz *et al.* (7), ως η μοναδική ν_{as} (Fe-O-Fe) της NOR. Παρόλο που οι συγγραφείς ανίχνευσαν αλλαγές στην ένταση της κορυφής στους 833 cm^{-1} , δεν ερμήνευσαν την δόνηση αυτή ως δεύτερη ν_{as} (Fe-O-Fe). Η πιο λογική εξήγηση είναι ότι οι δύο δονήσεις, 815 και 833 cm^{-1} , προκύπτουν από διαφορετικές διαμορφώσεις του συμπλόκου Fe(III)-O-Fe(III). Η διαμόρφωση με τον ασθενέστερο δεσμό υδρογόνου στο οξυγόνο της γέφυρας αναμένεται να έχει και τον ασθενέστερο δεσμό Fe-O-Fe και άρα την μικρότερη συχνότητα δόνησης, 815 cm^{-1} . Σύμφωνα με αυτή την ερμηνεία, η διαμόρφωση του NOR με τον ισχυρότερο δεσμό υδρογόνου συνεισφέρει στην δόνηση των 833 cm^{-1} και η ισχύς του δεσμού Fe-O-Fe είναι παρόμοια με αυτήν που παρουσιάζεται στο μοντέλο $[(^5\text{L})\text{Fe(III)-O-Fe(III)-Cl}]^+$ (ν_{as} (Fe-O-Fe) = 841 cm^{-1}) (7). Η δόνηση των 815 cm^{-1} όμως, παρουσιάζεται 26 cm^{-1} χαμηλότερα από την αντίστοιχη του συμπλόκου αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου $[(^5\text{L})\text{Fe(III)-O-Fe(III)-Cl}]^+$, παρά το γεγονός ότι το μοντέλο αναπαράγει με ακρίβεια την σφαίρα συναρμογής που υπάρχει γύρω από τα άτομα σιδήρου στην πρωτεΐνη (7). Η διαμόρφωση του NOR που εμείς ανιχνεύουμε είναι πολύ κοντά στους $818\text{-}829\text{ cm}^{-1}$, συχνότητες που έχουν καταγραφεί για φερύλ σύμπλοκα αριθμού συναρμογής έξι (8) και οξοφερύλ π-κατιονικές ρίζες πορφυρινικού

δακτυλίου με αριθμό συναρμογής πέντε (9). Παρά την ομοιότητα των συχνοτήτων, προτείνουμε την Fe-O-Fe δομή για την δόνηση που ανιχνεύουμε. Η βάση για αυτό βρίσκεται στο γεγονός ότι τόσο η 815 όσο και η 833 cm^{-1} , εμφανίζονται στο ένζυμο μετά από τον οξειδοαναγωγικό κύκλο του (7,15).

Αποδίδουμε την διαμόρφωση με την υψηλή συχνότητα δόνησης της ν_{as} (Fe-O-Fe) στους 833 cm^{-1} , ως αυτή στην οποία υπάρχει ισχυρή πολική αλληλεπίδραση ανάμεσα στο άτομο του οξυγόνου και γειτονικών αμινοξέων. Με τον αυτό τρόπο σχηματίζεται μια συμπαγής (*κλειστή*) δομή στην οποία το άτομο του οξυγόνου σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου. Η διαμόρφωση με την χαμηλή συχνότητα δόνησης της ν_{as} (Fe-O-Fe) στους 815 cm^{-1} ερμηνεύεται ως *ανοικτή* δομή. Ο λόγος $I_{833\text{cm}^{-1}}/I_{815\text{cm}^{-1}}$ φανερώνει ότι η διαμόρφωση με τους δεσμούς υδρογόνου είναι κυρίαρχη στην μορφή που απομονώνεται το ένζυμο. Εφόσον λοιπόν, μπορούμε να αποκλείσουμε την εμπλοκή της εγγύς ιστιδίνης για την ερμηνεία της ύπαρξης *ανοικτής* και *κλειστής* διαμόρφωσης, ένα ενδιαφέρον μοντέλο είναι αυτό στο οποίο η διαφοροποίηση προέρχεται από την δημιουργία δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στην όξο γέφυρα και γειτονικά αμινοξέα του μη-αιμικού σιδήρου ή/και ενός μορίου H_2O . Συνεπώς η ύπαρξη δεσμών υδρογόνου του οξυγόνου με γειτονικά αμινοξέα είναι πιθανό να αποτελεί το λόγο διαφοροποίησης των δομών στην NOR. Μια τέτοια δομή της ομάδας Fe-O-Fe είναι δυνατόν να αυξάνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο αιμικό άτομο σιδήρου και ως αποτέλεσμα να μετατοπίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό σε αρνητικότερες τιμές. Ενδιαφέρον θέμα αποτελεί η μελέτη του κατά πόσο υπάρχουν σχετικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στις δύο διαμορφώσεις στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου, ιδιαίτερα εφόσον η αλληλεπίδραση του μη-αιμικού σιδήρου με τα πιθανά ενδιάμεσα αίμης/NO μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική για τις δύο διαμορφώσεις. Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για να καθοριστεί εάν οι δύο μορφές του ενζύμου αντικατοπτρίζουν ρύθμιση της ενεργότητάς του.

Σε μία προσπάθεια να κατανοήσουμε την εμπλοκή δομικών ιδιοτήτων στην μετάβαση της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου στην ανηγμένη, παρουσιάζουμε ένα μοντέλο στο σχήμα 4. Στο πρώτο στάδιο οι δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του διπυρηνικού κέντρου, στις οποίες η Fe-O-Fe ομάδα πλαισιώνεται από διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, αντιπροσωπεύουν την *κλειστή* και *ανοικτή* δομή, αντιστίχια. Και στις δύο δομές η υψηλού σπιν αίμη b_3 έχει αριθμό συναρμογής πέντε και η εγγύς ιστιδίνη δεν είναι δεσμευμένη. Δύο ηλεκτρόνια εισέρχονται στην καταλυτική περιοχή στο δεύτερο στάδιο, προκαλώντας την διάσπαση του δεσμού Fe-O-Fe και ακόλουθα την αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου. Στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου η ιστιδίνη βρίσκεται στην πέμπτη θέση δέσμευσης της αίμης

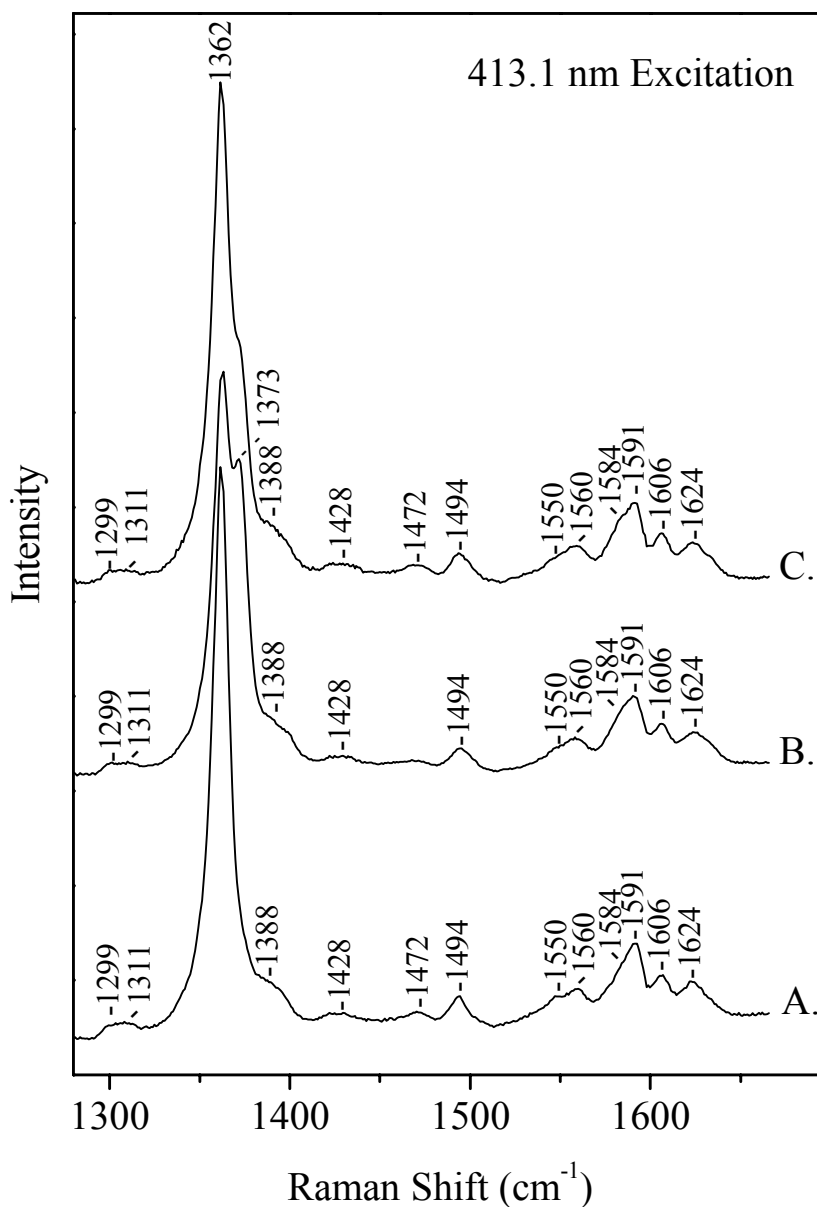
b_3 και το N_8 άτομο σχηματίζει δεσμό υδρογόνου, όπως σε όλες σχεδόν τις αιμοπρωτεΐνες (16).



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση της σύγκρισης ανάμεσα στην οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή της NOR..

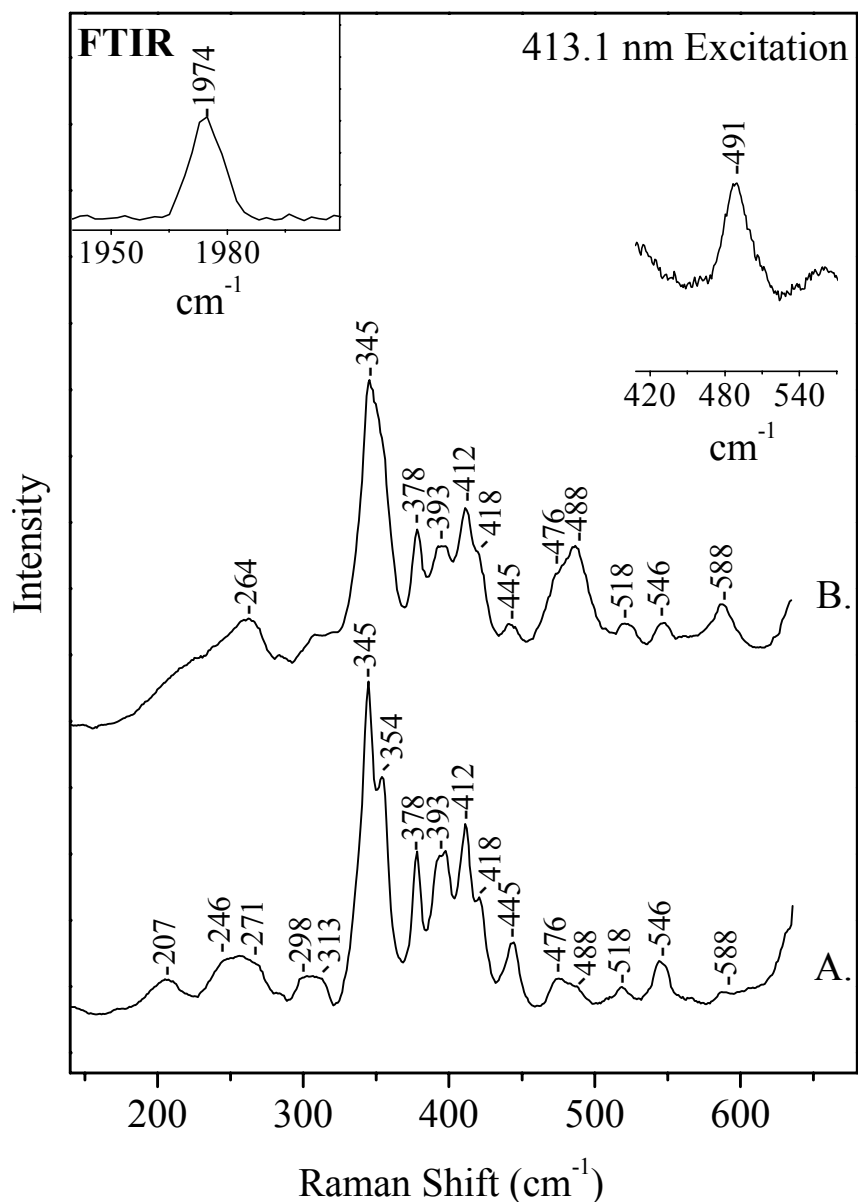
Τα δεδομένα από την οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του ενζύμου αποδεικνύουν ξεκάθαρα την μετάβαση από την υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμη, Fe(III)-O-Fe(III), στην υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμη με δομή His-Fe(II) της ανηγμένης μορφής. Η μικρή απόσταση των 3.5 Å ανάμεσα στο αιμικό και μη-αιμικό σίδηρο (4) αποτελεί ένδειξη ότι συγκεκριμένη διευθέτηση δύο αρωματικών δακτυλίων (ιμιδαζόλια του μη-αιμικού σιδήρου) μπορεί να προκαλέσει στερικές παρεμποδίσεις στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Συνεπώς, παρόλο που ανεξάρτητα αμινοξέα μπορεί να αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες για την ύπαρξη των δύο διαμορφώσεων, είναι επίσης πιθανή η δημιουργία πολλαπλών επαναδιευθετήσεων στην κοιλότητα. Προτείνουμε ότι η αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση γύρω από την αίμη, με αποτέλεσμα επαναδιευθέτηση της αίμης και κίνηση του σιδήρου προς την εγγύ ιστιδίνη, έτσι ώστε να επιτραπεί η δέσμευση της τελευταίας στο σίδηρο. Έτσι, η απόσταση αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου αναμένεται μεγαλύτερη στην ανηγμένη μορφή. Το γεγονός αυτό δεν είναι απίθανο, εφόσον η κοιλότητα της αίμης στην NOR πρέπει να διαθέτει αρκετή ελαστικότητα για να επιτρέψει στο σε δύο μόρια υποστρώματος, NO, να εισέλθουν στο ενεργό κέντρο για τον σχηματισμό του δεσμού N-N και την αποχώρησή του ως N₂O.

Στο σχήμα 5 απεικονίζεται το φάσμα συντονισμού Raman του συμπλόκου της ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του άνθρακα (φάσμα B), στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων, ενώ επίσης περιλαμβάνεται για σύγκριση το φάσμα της ανηγμένης κατάστασης του ενζύμου (φάσμα A) που αναλύθηκε στο σχήμα 1. Η εμφάνιση μιας ακόμα κορυφής στην περιοχή της ν_4 στους 1373 cm⁻¹, καθώς επίσης η εξαφάνιση της ν_3 (1472 cm⁻¹) της υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 , αποτελούν στοιχεία για την δέσμευση του CO στην ανηγμένη αίμη b_3 , προς σχηματισμό συμπλόκου χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι. Η εγγύ ιστιδίνη παραμένει δεσμευμένη στον πορφυρινικό δακτύλιο, του οποίου έκτος υποκαταστάτης είναι το CO. Η φωτοδιάσπαση συμπλόκων του μονοξειδίου του άνθρακα με αιμοπρωτεΐνες είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την χρήση σχετικά χαμηλών ενεργειών, λόγω της υψηλής κβαντικής απόδοσης του CO. Η διαφοροποίηση του φάσματος του συμπλόκου NOR/CO (φάσμα C), με την χρήση υψηλότερης ενέργειας διέγερσης σε σχέση με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για το φάσμα B, είναι σύμφωνη με την φωτοδιάσπαση σημαντικού ποσοστού του συμπλόκου, όπως αποδεικνύεται από την μείωση της ν_4 στους 1373 cm⁻¹ και την επανεμφάνιση της ν_3 στους 1472 cm⁻¹.



Σχήμα 5. RR φάσματα της ανηγμένης NOR (φάσμα A) και του συμπλόκου ανηγμένης NOR/CO με ενέργεια διέγερσης 3 mW (φάσμα B) και 10 mW (φάσμα C) στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων με διέγερση 413.1 nm.

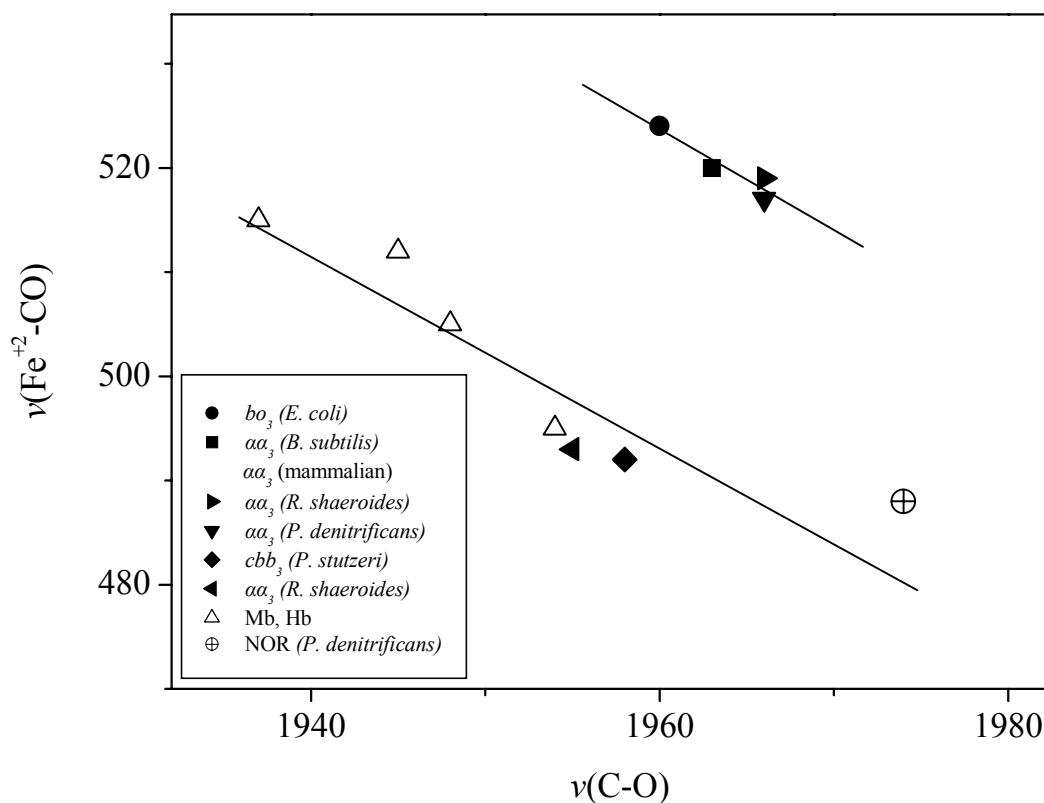
Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου NOR/CO πραγματοποιείται μέσω της ανίχνευσης των δονήσεων $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{CO})$. Η δόνηση τάσης Fe-CO αναμένεται στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman του συμπλόκου, το οποίο παρουσιάζεται στο σχήμα 6 (φάσμα B). Το φάσμα A αντιστοιχεί στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο και από την σύγκριση των A και B παρατηρούμε την εμφάνιση μιας κορυφής στο φάσμα του συμπλόκου στους 488 cm^{-1} που απουσιάζει από το φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου. Η δόνηση αυτή εξαφανίζεται κατά την καταγραφή του φάσματος του CO-συμπλόκου με την χρήση υψηλότερης ενέργειας διέγερσης, που προκαλεί την φωτοδιάπαση



Σχήμα 6: RR φάσματα της ανηγμένης NOR (φάσμα A) και του συμπλόκου ανηγμένης NOR/CO (φάσμα B) στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων με διέγερση 413.1 nm.

του συμπλόκου, όπως αποδείχθηκε προηγούμενα κατά την αναφορά στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman. Το φάσμα διαφοράς του CO-συμπλόκου μείον το φωτοδιασπόμενο σύμπλοκο παρουσιάζει στην περιοχή 300-600 cm⁻¹ μία δόνηση στους 491 cm⁻¹, την οποία και αποδίδουμε στην δόνηση τάσης Fe-CO. Στο ένθετο του σχήματος 6 απεικονίζεται το FTIR φάσμα του συμπλόκου NOR/CO, το οποίο παρουσιάζει μία δόνηση στους 1974 cm⁻¹ την οποία αποδίδουμε στην δόνηση τάσης C-O, του δεσμευμένου στην αίμη *b*₃ μονοξειδίου του άνθρακα. Η ανίχνευση μίας μοναδικής δόνησης ν(CO) αποκλείει την πιθανότητα ταυτόχρονης δέσμευσης δεύτερου μορίου CO στον μη-αιμικό σίδηρο. Το ενδεχόμενο αυτό είχε αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (6) για να

υποστηρίζει το προτεινόμενο μοντέλο αναγωγής του NO που περιλαμβάνει την ταυτόχρονη δέσμευση δύο μορίων NO στο δισιδηρικό κέντρο προς την δημιουργία του συμπλόκου αιμικού Fe-NO/μη αιμικού Fe-NO, πριν τον σχηματισμό του δεσμού N-N και την απελευθέρωση τους ως N₂O.



Σχήμα 7: Συσχέτιση των συχνοτήτων της δόνησης τάσης της Fe-CO ως προς την C-O. (●) κυτόχρωμα bo₃ από το *E. coli*, (◄) η α-μορφή του κυτοχρώματος aa₃ από το *R. sphaeroides*, (■) κυτοχρωμική c οξειδάση των θηλαστικών και κυτόχρωμα aa₃ από το *B. Subtilis*, (▼) κυτόχρωμα aa₃ από το *P. denitrificans*, (▲) κυτόχρωμα cbb₃ από το *R. capsulatus*, (►) η β-μορφή του κυτοχρώματος aa₃ από το *R. sphaeroides*, (◇) μωσοσφαιρίνες και αιμοσφαιρίνες, (⊕) NOR.

Μελέτες συμπλόκων αιμοπρωτεϊνών με μονοξείδιο του άνθρακα (17-20) έχουν αποδείξει ότι οι συχνότητες των δονήσεων ν(Fe-CO) και ν(CO) των και η συσχέτιση τους αντικατοπτρίζουν α) την ταυτότητα και ιδιότητες του εγγούς υποκαταστάτη εξαιτίας του ανταγωνισμού του δεσμευμένου CO με τον εγγύ υποκαταστάτη για τα ίδια d_z² τροχιακά και β) την πολικότητα της κοιλότητας της αίμης. Ένα ισχυρά πολικό περιβάλλον ευνοεί τον π-δεσμό επαναφοράς με αποτέλεσμα την αύξηση της ν(Fe-CO) και την μείωση της ν(C-O)

λόγω της αυξημένης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα αντιδεσμικά τροχιακά του CO. Σημαντικό μέρος από τις προαναφερόμενες μελέτες αναφέρονται στην οικογένεια των τελικών οξειδασών, στην οποία θεωρείται ότι ανήκει και η NOR, αποκαλύπτοντας διαφορετικές διαμορφώσεις του ενεργού κέντρου αίμης/χαλκού. Οι δύο κυριότερες διαμορφώσεις χαρακτηρίζονται ως α και β μορφές και έχει δειχθεί ότι στην α μορφή οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ δεν ανήκουν στην ευθεία που καθορίζει η αντίστροφη σχέση των δύο δονήσεων σε πρωτεΐνες με αξονική υποκατάσταση ιστιδίνης (σχήμα 7). Σε αντίθεση στην β μορφή οι συχνότητες συμπίπτουν στην ευθεία. Σύμφωνα με την ερμηνεία που έχει δωθεί σχετικά με την προέλευση της α-διαμόρφωσης, αυτή αντιπροσωπεύει μία περιορισμένη κοιλότητα του διπυρηνικού κέντρου αίμης/χαλκού που δεν επιτρέπει στο CO να δεσμευτεί στον αιμικό σίδηρο χωρίς να δέχεται ισχυρές πολικές ή στερικές επιδράσεις από το άτομο του χαλκού, ενώ στη β-μορφή ο Cu_B έχει απομακρυνθεί από τον δεσμευμένο CO-υποκαταστάτη.

Οι συχνότητες των $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{CO})$ που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη κατατάσσουν το CO-σύμπλοκο της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου στην β-διαμόρφωση, όπως φαίνεται στο σχήμα 7. Κατά συνέπεια, η παρουσία του μη-αιμικού σιδήρου στην κοιλότητα της αίμης δεν εξασκεί ιδιαίτερες πολικές ή στερικές αλληλεπιδράσεις στο δεσμευμένο στην αίμη CO, όπως ο Cu_B στις οξειδάσες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι το μόνο μέλος της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών που δεν εμφανίζει την α-μορφή είναι το κυτόχρωμα cbb_3 , που θεωρείται και ως ο πλησιέστερος κρίκος με την NOR. Πρόσφατη μελέτη αλλαγών της διαμόρφωσης του διπυρηνικού κέντρου της κυτοχρωμικής οξειδάσης του βακτηρίου *R. sphaeroides* συναρτήσεως του pH, οδήγησε στην πρόταση ότι οι διαφορετικές διαμορφώσεις είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της θέσης του Cu_B σε σχέση με το CO εξαιτίας της παρουσίας μίας ή περισσότερων ιονιζόμενων ομάδων (21). Επιπλέον, οι ομάδες που υποστηρίχθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι είναι η υψηλά διατηρημένη στην οικογένεια των οξειδασών, τυροσίνη 280 (αρίθμηση σύμφωνα με το *P. denitrificans*), που σχηματίζει τον ομοιοπολικό δεσμό με τον ένα υποκαταστάτη του Cu_B και βρίσκεται κοντά στην θέση δέσμευσης του οξυγόνου, όπως επίσης και ένας από τους υποκαταστάτες του χαλκού. Η αντικατάσταση της τυροσίνης 280 από μία γλυκίνη στο κυτόχρωμα cbb_3 και από ένα γλουταμικό στην NOR θα μπορούσε να θεωρηθεί ως η αιτία διαφοροποίησης των δύο ενζύμων από τις ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου της ευρύτερης οικογένειας των τελικών οξειδασών.

Βιβλιογραφία

1. Zumft, W.G. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 553-616.
2. Saraste, M., and Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.* **341**, 1-4.
3. Girsch, P. and de Vries, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 202-216.
4. Hendricks, J., Gohlke, U. and Saraste, M. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 15-24.
5. Hendricks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lübben, M. and Saraste, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.
6. Moënné-Loccoz, P. and de Vries S. (1998) *J. Am.Chem. Soc.* **120**, 5147-5152.
7. Moënné-Loccoz, P., Richter, O-M, H., Huang, H-w, Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. and de Vries S. (2000) *J. Am.Chem. Soc.* **122**, 9344-9345.
8. Kean, R. T., Oertling, W. A. and Babcock, G.T. (1987) *J. Am .Chem. Soc.* **109**, 2185-2187.
9. Proniewicz, L. M., Paeng, I. R. and Nakamoto, K. (1991) *J. Am .Chem. Soc* **113**, 3294-3303.
10. Varotsis, C., Babcock, G.T., Garcia-Horsman, J. A. and Gennis, R. B. (1995) *J. Phys. Chem.* **99**, 16817-16820.
11. Kitagawa, T. in *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. Ed., Wiley:New York, (1988), Vol. **3** 97-131.
12. Rousseau, D.L., Friedman, J. M. in *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. Ed., Wiley:New York, (1988), Vol. **3** 133-215.
13. Sanders-Loer, J., Wheeler, W. D., Shiemke, A. K., Averill, B. A., Loehr, T. M (1989) *J. Am. Chem. Soc* **111**, 8084-8093.
14. Reem, R.C., McCormick, J. M., Richardson, D. E., Devlin, F. J., Stephens, P.J., Musselman, R. L., Solomon, E. I. (1989) *J. Am .Chem. Soc* **111**, 4688-4696.
15. Varotsis *et. al.* unpublished results.
16. Rousseau, D.G. and Rousseau, D.L. (1992) *J. Struct. Biol.* **109**, 13-17.
17. Argade, P.V, Ching, Y. C & Rousseau, D. (1984) *Science*, **225**, 329-331.
18. Wang, J., Takahashi, S., Hosler, P. H., Mitchell, D. M., Ferguson-Miller, S., Gennis R. B. & Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 9819-9825.
19. Wang, J., Gray, K. A., Daldal, F. & Rousseau, D. L. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9363-9364.
20. Wang, J., Ching, Y-C., Takahashi, S., Rousseau, D. L., Hill, J. J. Rumbley, J. & Gennis R. B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3390-3391.
21. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M. & Rousseau, D. L. (2001) *Biophysical J.* **80**, 2039-2045.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Η Αντίδραση της Οξειδωμένης Αναγωγάσης του Μονοξειδίου του Αζώτου με το NO

Περίληψη

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της αντίδρασης της οξειδωμένης μορφής της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο εδάφους *Paracoccus denitrificans* με το NO. Η αλληλεπίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με την οξειδωμένη NOR έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου του NO με την αίμη b_3 χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι, το οποίο προτείνουμε ότι αποτελεί ενδιάμεσο του καταλυτικού της αναγωγής του NO. Με βάση την ισοτοπική μετατόπιση με την χρήση επισημασμένου ^{15}NO χαρακτηρίστηκε η δόνηση τάσης $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ στους 594 cm^{-1} . Το φάσμα υπερύθρου παρουσιάζει την δόνηση τάσης N-O του δεσμευμένου μονοξειδίου του αζώτου στους 1904 cm^{-1} . Ανιχνεύτηκε μία μόνο διαμόρφωση για το NO-σύμπλοκο της NOR, σε αντίθεση με την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου στην οποία χαρακτηρίστηκαν δύο διαμορφώσεις με διαφορετική ισχύ της όξο-γέφυρας αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου. Η διαμόρφωση His-Fe-NO που υιοθετεί το σύμπλοκο NOR/NO είναι όμοια με αυτή των NO-συμπλόκων της αιμογλοβίνης και μυογλοβίνης με την ιστιδίνη δεσμευμένη στην αίμη b_3 . Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι το NO-σύμπλοκο της NOR που χαρακτηρίσαμε, φωτολύεται προς τον σχηματισμό μιας νέας μορφής οξειδωμένου ενζύμου στην οποία η εγγύς ιστιδίνη είναι δεσμευμένη στην αίμη b_3 , σε αντίθεση με την κατάσταση στην οποία απομονώνεται το ένζυμο. Η φωτοδιάσπαση του NO οδηγεί στον σχηματισμό της υψηλού σπιν διαμόρφωσης της αίμης b_3 , με αριθμό συναρμογής πέντε.

Εισαγωγή

Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη που καταλύει την αναγωγή του NO σε N₂O στην διαδικασία της βακτηριακής απονιτροποίησης (1-5). Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου πραγματοποιείται σε ένα διπυρηνικό κέντρο αποτελούμενο από ένα άτομο μη-αιμικού σιδήρου και από την αίμη b₃ (5-7). Η μελέτη της NOR με φασματοσκοπία συντονισμού Raman έδειξε ότι στην μορφή που απομονώνεται το ένζυμο περιέχει μία όξο γέφυρα ανάμεσα στον μη-αιμικό και αιμικό σίδηρο της αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b₃, ενώ με την αναγωγή του ενζύμου η αίμη b₃ υιοθετεί υψηλού σπιν διαμόρφωση και αριθμό συναρμογής πέντε με την εγγύ ιστιδίνη να αποτελεί τον πέμπτο υποκαταστάτη (κεφάλαιο 8). Στην μεταφορά των ηλεκτρονίων ανάμεσα στον φυσιολογικό δότη, κυτόχρωμα c, και το διπυρηνικό κέντρο της NOR παρεμβάλλονται δύο επιπλέον οξειδοαναγωγικά κέντρα, δύο αίμες χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι από τις οποίες η μία είναι τύπου b και η άλλη τύπου c. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής των δύο αυτών αιμών είναι παραπλήσιο με αυτό του μη-αιμικού σιδήρου, ενώ της αίμης b₃ είναι σημαντικά χαμηλότερο και με βάση αυτό προτάθηκε ότι η πλήρης αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου είναι θερμοδυναμικά μη ευνοούμενη (8).

Ο καταλυτικός κύκλος της NOR δεν έχει μελετηθεί, έχουν όμως προταθεί δύο διαφορετικά μοντέλα. Στο ένα μοντέλο ο de Vries και οι συνεργάτες του (3) βασίστηκαν σε κινητικές μετρήσεις και πρότειναν ότι η διαδικασία της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου ξεκινάει όταν το διπυρηνικό κέντρο είναι πλήρως ανηγμένο και δύο μόρια NO δεσμεύονται ενεργής θέσης του ενζύμου, ένα στο κάθε μεταλλικό κέντρο της. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η εγγύς ιστιδίνη δεν είναι συναρμοσμένη στην αίμη b₃ μετά την δέσμευση του NO και ο σχηματισμός του N₂O πραγματοποιείται με την χρησιμοποίηση των ηλεκτρονίων των δύο μετάλλων, αιμικού και μη-αιμικού σιδήρου (3,6,7). Το δεύτερο μοντέλο που προτάθηκε από τον Watmough και τους συνεργάτες του (8) περιλαμβάνει την ύπαρξη μικτού σθένους διπυρηνικού κέντρου (b₃³⁺ Fe²⁺) πριν την δέσμευση δύο μορίων NO ταυτόχρονα στον μη-αιμικό σίδηρο, ενώ η αίμη b₃ παραμένει αμέτοχη στον καταλυτικό κύκλο. Οι ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου μετά την προσθήκη NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο χαρακτηρίστηκαν πρόσφατα με φασματοσκοπία ηλεκτρονιακού παραμαγνητισμού (5). Ανιχνεύθηκαν συνολικά τρία σήματα, δύο από τα οποία αποδόθηκαν σε NO-σύμπλοκα της αίμης b₃ αριθμού συναρμογής πέντε και έξι, ενώ το τρίτο στο σύμπλοκο μη-αιμικού Fe(II)-NO.

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman είναι μία δυναμική τεχνική για τον προσδιορισμό τόσο της συναρμογής υποκαταστατών στο ενεργό κέντρο αιμοπρωτεϊνών όσο και της διαμόρφωσης των σχηματιζόμενων συμπλόκων (9-11). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της RR φασματοσκοπίας για την διερεύνηση της μοριακής βάσης της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου, που απαιτεί την γνώση της δομής και των κινητικών ιδιοτήτων των ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου. Με την μέθοδο της ισοτοπικής αντικατάστασης, χαρακτηρίστηκε το σύμπλοκο της οξειδωμένης μορφής της NOR με το μονοξείδιο του αζώτου μέσω της δόνησης τάσης Fe^{3+} -NO και N-O, το οποίο προτείνεται ότι αποτελεί ενδιάμεσο του καταλυτικού της αναγωγής του NO. Επιπλέον, το NO σύμπλοκο της NOR που ανιχνεύσαμε μπορεί να φωτοδιασπαστεί και το φωτοπροϊόν έχει διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με την μορφή που απομονώνεται το ένζυμο.

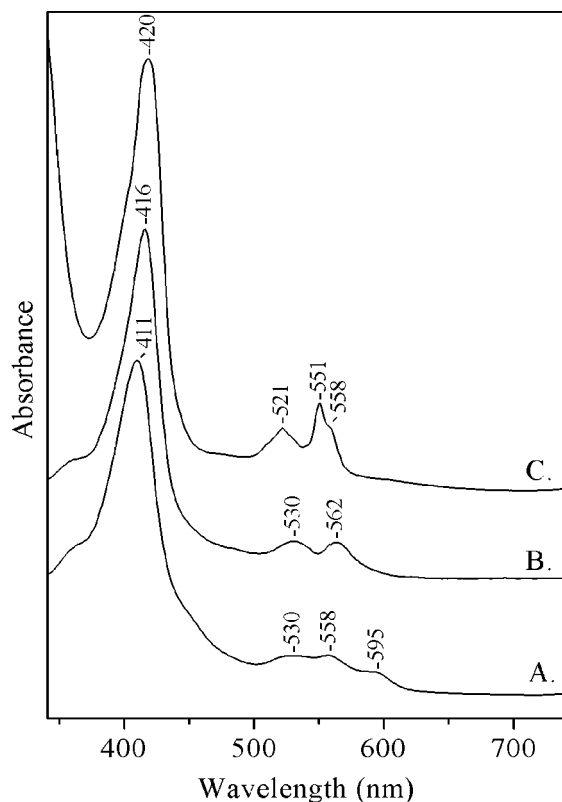
Πειραματικές Διαδικασίες

Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου απομονώθηκε όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 3. Η ενεργότητα του ενζύμου μετρήθηκε 40 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ($46e^-/\text{s}$), σύμφωνα με την μεθοδολογία της παραπομπής 5. Η πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε στα 150 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris pH 7.4 που περιείχε 0.05 % dodecyl β -D-maltoside και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο ως την χρησιμοποίησή της. Η συγκέντρωση της NOR προσδιορίστηκε με την λήψη φάσματος οπτικής απορρόφησης του οξειδωμένου ενζύμου και χρησιμοποιώντας $\epsilon_{411} = 3.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Οι Raman μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με διέγερση 413.1 nm από Kr^+ laser (Coherent K-90). Η συγκέντρωση του ενζύμου που τοποθετήθηκε στην περιστρεφόμενη με 4000-6000 rpm quartz Raman κυψελίδα για την μείωση της θέρμανσης του δείγματος, ήταν 40-50 μM . Οι κυψελίδες είναι σχεδιασμένες για αναερόβιες μετρήσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την λήψη φασμάτων συντονισμού Raman όσο και φασμάτων απορρόφησης ορατού (Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible spectrometer). Τα φάσματα Raman ελήφθησαν με την χρήση τριπλού πολυχρωμάτορα SPEX 1877 και EG&G (model 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Η ισχύς της ακτινοβολίας διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε πάνω στο δείγμα ήταν 5-7 mW και ο συνολικός χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 20-30 min. Για την καταγραφή των FTIR φασμάτων χρησιμοποιήθηκε δείγμα συγκέντρωσης 200-300 μM και ένα Bruker Equinox 55 FTIR φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με mercury cadmium telluride ανιχνευτή ψυχόμενο με υγρό άζωτο. Η δημιουργία του NO-συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με την έκθεση οξειδωμένου με 1

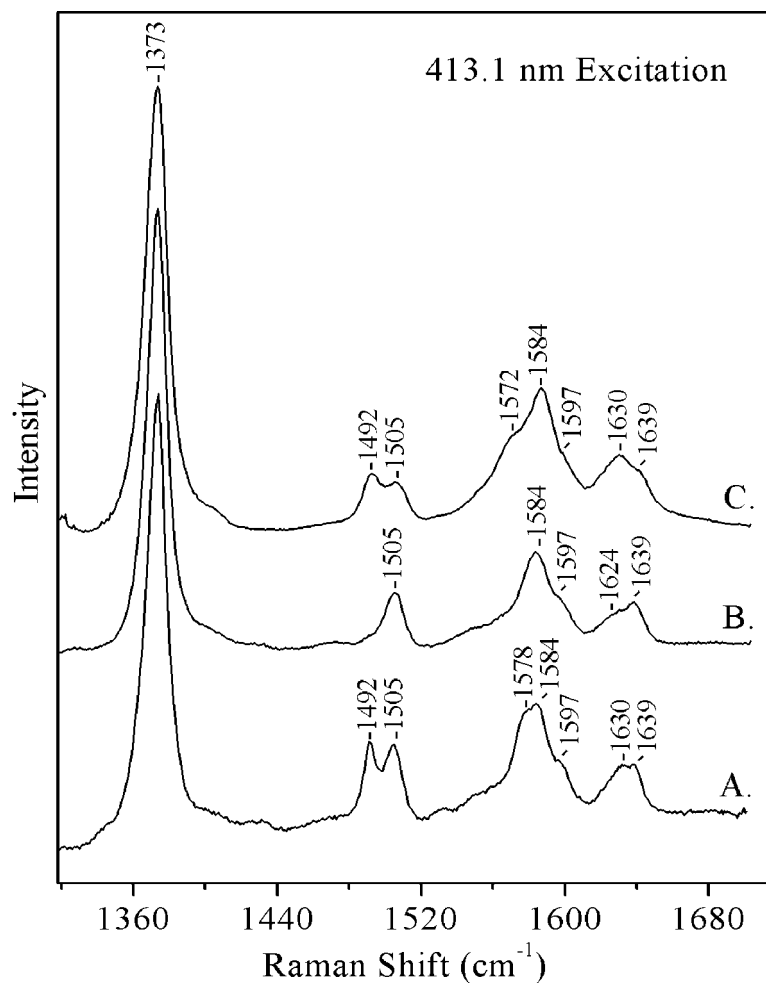
ατμόσφαιρα NO και αναερόβια μεταφορά του στην περιστρεφόμενη Raman κυψελίδα για την λήψη των φασμάτων συντονισμού Raman και σε FTIR κυψελίδα με παράθυρα CaCl₂ και spacer 0.025 mm για την καταγραφή του FTIR φάσματος, αντίστοιχα. Το FTIR φάσμα είναι φάσμα διαφοράς με το ρυθμιστικό διάλυμα ως φάσμα αναφοράς, με 2 cm⁻¹ διακριτικότητα και είναι ο μέσος όρος 1000 σαρώσεων. Το αέριο NO προέρχεται από την Messer (Germany) και το ισότοπο NO (¹⁵NO) από την Isotec.

Αποτελέσματα

Το φάσμα απορρόφησης ορατού της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου (Σχήμα 1, φάσμα A) παρουσιάζει μέγιστα στα 411, 530 και 558 nm, που είναι ενδεικτικά της ύπαρξης αιμών *b* και *c* χαμηλής διαμόρφωσης σπιν. Ο ώμος στα 595 nm αποδίδεται σε ταινία μεταφοράς φορτίου από την πορφυρίνη στο μέταλλο και είναι χαρακτηριστικός της αίμης υψηλής διαμόρφωσης σπιν *b*₃. Το φάσμα του συμπλόκου οξειδωμένου ενζύμου-NO (Σχήμα 1, φάσμα B) καταγράφηκε μετά την απευθείας εισαγωγή αερίου NO στο οξειδωμένο ένζυμο και παρουσιάζει μέγιστο στην περιοχή της Soret μετάβασης στα 416 nm και στην περιοχή των α και β ταινιών μέγιστα στα 562 και 530 nm, αντίστοιχα, ενώ εξαφανίζεται η ταινία της υψηλού σπιν αίμης *b*₃ στα 595 nm. Το πλήρως ανηγμένο ένζυμο (Σχήμα 1, φάσμα C) παρουσιάζει μέγιστα στα 420, 521, 551 και 558 nm.



Σχήμα 1. Φάσματα απορρόφησης ορατού της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου στην οξειδωμένη κατάσταση (φάσμα A), του οξειδωμένου NO-συμπλόκου (φάσμα B), και της ανηγμένης κατάστασης του ενζύμου (φάσμα C).



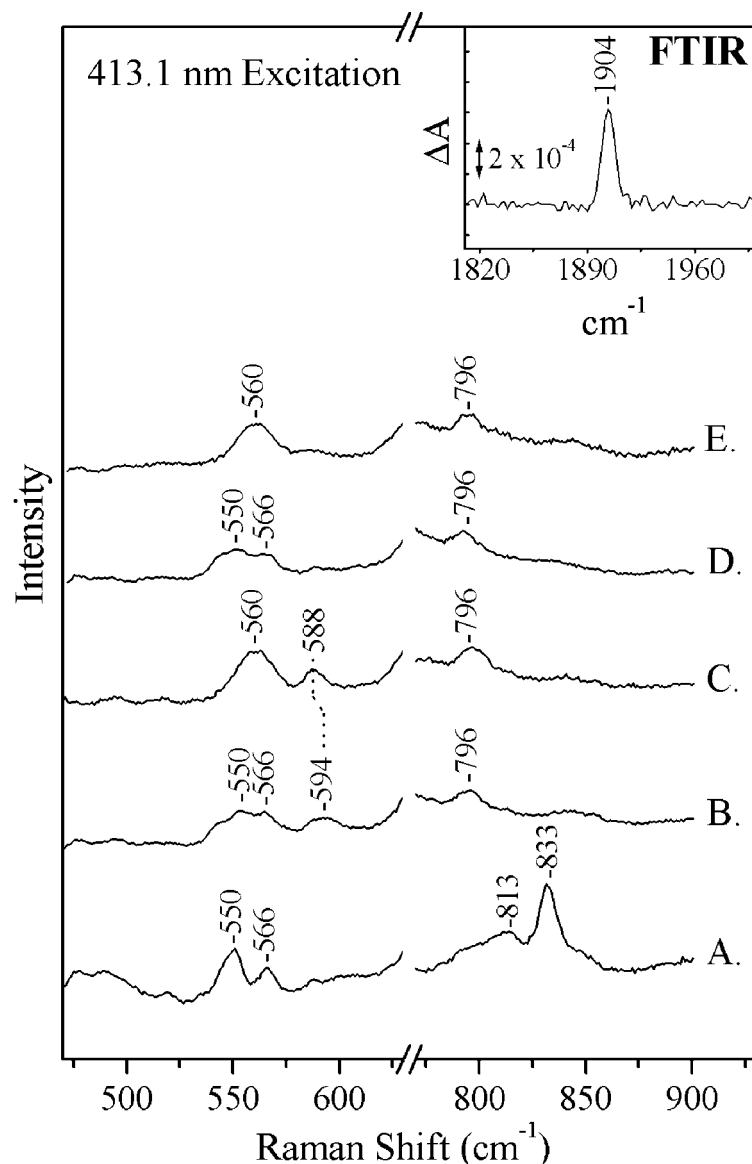
Σχήμα 2. Περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου στην οξειδωμένη κατάσταση (φάσμα A), του οξειδωμένου NO-συμπλόκου (φάσμα B), και του φωτοπροϊόντος του NO-συμπλόκου (φάσμα C).

Η περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman παρέχει πληροφορίες για τον αριθμό υποκατάστασης καθώς και την διαμόρφωση σπιν των αιμών του ενζύμου μέσω χαρακτηριστικών συχνοτήτων των δονήσεων του πορφυρινικού δακτυλίου. Παράλληλα μπορούν να εκτιμηθούν η κατάσταση του μακρινού (distal) και εγγούς (proximal) περιβάλλοντος της αίμης b_3 στην οξειδωμένη μορφή της, καθώς επίσης στο NO-σύμπλοκο και το φωτοπροϊόν του. Συγκεκριμένα, τα RR φάσματα των αιμοπρωτεϊνών στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων περιέχουν αρκετές πορφυρινικές δονήσεις που χαρακτηρίζουν την οξειδωτική κατάσταση (ν_4) ή τον αριθμό υποκατάστασης και την διαμόρφωση σπιν (ν_2, ν_3, ν_{10}). Το Σχήμα 2 απεικονίζει την περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του RR φάσματος του οξειδωμένου (φάσμα A), του NO-συμπλόκου (φάσμα B) και του φωτοπροϊόντος του (φάσμα C), με την χρησιμοποίηση διέγερσης στα 413.1 nm, συχνότητα με την οποία ενισχύονται οι δονήσεις από όλες τις αίμες. Η απόδοση των δονήσεων του οξειδωμένου ενζύμου (φάσμα A) έχει ήδη πραγματοποιηθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο και αναφέρεται στον Πίνακα I. Συνοπτικά, οι δονήσεις στους 1373 (ν_4), 1492 (ν_3), 1578 (ν_2) και 1630 (ν_{10}) cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές της υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης

b_3 . Οπως έχει αποδειχθεί στο Κεφ. 8 η αίμη b_3 στην οξειδωμένη μορφή της δεν είναι δεσμευμένη με την εγγύ ιστιδίνη αλλά μέσω μιας γέφυρας οξυγόνου με τον μη-αιμικό σίδηρο. Οι δονήσεις στο φάσμα A στους 1505 (ν_3), 1584 (ν_2), και 1639 (ν_{10}) cm^{-1} οφείλονται στις χαμηλού σπιν αίμες b και c , ενώ συνεισφέρουν και στην ν_4 στους 1373 cm^{-1} . Η μεταβολές που προκαλούνται στο φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου μετά την προσθήκη αερίου NO στο ένζυμο (φάσμα B) είναι περιορισμένες και αφορούν την εξαφάνιση των ν_3 , ν_2 και ν_{10} στους 1492, 1578 και 1630 cm^{-1} , αντίστοιχα, που είναι οι χαρακτηριστικές δονήσεις της υψηλού σπιν αίμης b_3 . Η συναρμογή του NO στο οξειδωμένο ένζυμο μετατοπίζει τις ν_3 , ν_2 και ν_{10} , ώστε αυτές να συμπίπτουν με τις αντίστοιχες δονήσεις των χαμηλού σπιν αιμών c και b στους 1505, 1584 και 1639 cm^{-1} . Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αίμη b_3 , υιοθετεί αριθμό συναρμογής έξι και διαμόρφωση χαμηλού σπιν στο NO-σύμπλοκο. Η διαφοροποίηση του φάσματος του NO-συμπλόκου με την αύξηση της ενέργειας διέγερσης (φάσμα C), χαρακτηρίζει την φωτοδιάσπαση του συμπλόκου. Η αναγνώριση των ν_3 και ν_2 στους 1492 και 1572 cm^{-1} (φάσμα C) αποτελεί απόδειξη ότι η απομάκρυνση του έκτου υποκαταστάτη (NO) από την αίμη b_3 μετατρέπει τον αριθμό υποκατάστασης της αίμης σε πέντε και την διαμόρφωση σπιν σε υψηλή. Η ν_2 που χαρακτηρίζει το μέγεθος του πυρήνα του πορφυρινικού δακτυλίου έχει μετατοπιστεί σε χαμηλότερες συχνότητα σε σχέση με το οξειδωμένο ένζυμο, γεγονός που δείχνει την αύξηση του πυρήνα του πορφυρινικού δακτυλίου στο φωτοπροϊόν. Η απόδοση των δονήσεων του οξειδωμένης NOR και του NO-συμπλόκου της συνοψίζονται στον Πίνακα I.

Πίνακας I

Δόνηση	Οξειδωμένο		Ανηγμένο		Fe(III)-NO
	5C/HS	6C/LS	5C/HS	6C/LS	6C/LS
ν_2	1578	1584	1560	1584/1591	1584
ν_3	1492	1505	1472	1494	1505
ν_4	1373	1373	1362	1362	1373
ν_{10}	1630	1639	1606		1639
ν_{11}				1550	
ν_{37}		1597			
$\nu_{C=C}$			1624	1624	1624



Σχήμα 3. Περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου στην οξειδωμένη κατάσταση (φάσμα A), του οξειδωμένου ^{14}NO -συμπλόκου (φάσμα B), του ^{15}NO -συμπλόκου (φάσμα C), του φωτοπροϊόντος του ^{14}NO -συμπλόκου (φάσμα D), και του φωτοπροϊόντος του ^{15}NO -συμπλόκου (φάσμα E). Στο ένθετο παρουσιάζεται το FTIR φάσμα του NOR/NO-συμπλόκου.

Η περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων του RR φάσματος του NO-συμπλόκου οξειδωμένης κατάστασης της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου απεικονίζεται στο Σχήμα 3. Το φάσμα A αντιστοιχεί στο οξειδωμένο ένζυμο, το φάσμα B προέρχεται από την έκθεση του οξειδωμένου ενζύμου σε αέριο $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ και το φάσμα C από την έκθεση σε $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$. Από τα φάσματα B και C συνάγεται το συμπέρασμα ότι η δόνηση στους 594 cm^{-1} (φάσμα B) αφορά κίνηση του NO εφόσον μετατοπίζεται στους 588 cm^{-1} (φάσμα C) με την ισοτοπική αντικατάσταση του $^{14}\text{N}^{16}\text{O}$ σε $^{15}\text{N}^{16}\text{O}$. Παρά το γεγονός ότι η δόνηση στους 594 cm^{-1} είναι παρόμοια με αυτές που έχουν καταγραφεί για σύμπλοκα μη-αιμικού Fe-NO (12), αποδίδουμε την δόνηση αυτή στο σύμπλοκο αίμης $b_3\text{-NO}$ με βάση όσα καταγράφησαν στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων των RR φασμάτων. Σε αναλογία λοιπόν, με άλλες πρωτεΐνες που διαθέτουν ως εγγύ υποκαταστάτη ιστιδίνη, στα φάσματα των οποίων η ισχυρότερη δόνηση

που παρουσιάζει ισοτοπική μετατόπιση χαρακτηρίζει την δόνηση τάσης Fe-NO, αποδίδουμε την δόνηση στους 594 cm^{-1} στην $\nu(\text{Fe}^{3+}\text{-NO})$. Η δόνηση τάσης Fe-NO της NOR είναι παρόμοια με την αντίστοιχη δόνηση του NO-συμπλόκου της μυογλοβίνης και της αιμογλοβίνης (13,14). Στα φάσματα των NO-συμπλόκων της NOR δεν καταγράφεται άλλη δόνηση που παρουσιάζει ευαισθησία στην ισοτοπική αντικατάσταση του μονοξειδίου του αζώτου και θα μπορούσε να αποδοθεί στην δόνηση κάμψης του συστήματος Fe-N-O. Τα φάσματα D και E καταγράφησαν με υψηλότερη ενέργεια διέγερσης και η απουσία των δονήσεων στους 594 και 588 cm^{-1} δείχνει την φωτοδιάσπαση του NO-συμπλόκου, σε συμφωνία με την περιοχή υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman, όπως περιγράφηκε στο Σχήμα 2. Το FTIR φάσμα που περιλαμβάνεται ως ένθετο στο Σχήμα 2, απεικονίζει μία μοναδική δόνηση στους 1904 cm^{-1} . Η συχνότητα της δόνησης αυτής είναι παρόμοια με την δόνηση τάσης N-O της όξινης μορφής της metMb-NO (15) και της HRP-NO (13,15) αλλά 18 cm^{-1} χαμηλότερα από την ουδέτερη metMb-NO (15,16). Στην περιοχή συχνοτήτων $1800\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ δεν ανιχνεύονται άλλες δονήσεις που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε σύμπλοκα μη-αιμικού σιδήρου/NO. Ο χαρακτηρισμός των δονήσεων τάσης $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ και NO κατά την αντίδραση της οξειδωμένης μορφής της NOR με το μονοξείδιο του αζώτου παρέχει ακριβή περιγραφή του συμπλόκου NOR/NO. Επιπλέον, η περιοχή $800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ των φασμάτων συντονισμού Raman που περιλαμβάνεται στο Σχήμα 3, δείχνει ότι η φωτοδιάσπαση του NO-συμπλόκου δεν συνοδεύεται από τον επανασηματισμό της γέφυρας της αίμης b_3 Fe-O-Fe (μη αιμικού σιδήρου), εφόσον δεν παρουσιάζονται οι δονήσεις στους 813 και 833 cm^{-1} που αποδίδονται στις δύο διαμορφώσεις της όξο-γέφυρας (κεφ. 8).

Συζήτηση

Ιδιότητες του συμπλόκου $\text{Fe}^{3+}\text{-NO}$ της NOR

Ο Πίνακας II περιλαμβάνει τις συχνότητες των δονήσεων $\nu(\text{Fe}^{3+}\text{-NO})$, $\delta(\text{Fe}^{3+}\text{-NO})$ και $\nu(\text{NO})$ για διάφορες αιμοπρωτεΐνες και μοντέλα τους. Στις πρωτεΐνες με εγγύ υποκατάσταση ιστιδίνης και με την χρήση ενέργειας διέγερσης για τα φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή της Soret μετάβασης έχουν ανιχνευθεί μόνο η δόνηση τάσης Fe-NO και κάμψης Fe-N-O (13, 19, 20). Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στο μικρό ποσοστό σύζευξης που ιφίσταται μεταξύ των τροχιακών του μονοξειδίου του αζώτου και της αίμης στα σύμπλοκα His-Fe-NO. Στο ένζυμο P450_{nor} που διαθέτει ως εγγύ υποκαταστάτη κυστεΐνη εκτός από την δόνηση τάσης Fe-NO ανιχνεύθηκε επίσης και η δόνηση τάσης N-O με την χρήση ενέργειας διέγερσης στην περιοχή της Soret μετάβασης (18).

Πίνακας II

Συχνότητες (cm^{-1}) των NO ισοτοπικά ευαίσθητων δονήσεων σε σύμπλοκα Fe^{3+} -NO πρωτεϊνών				
Πρωτεΐνες	$\nu(\text{Fe-NO})$	$\delta(\text{Fe-N-O})$	$\nu(\text{NO})$	Παραπομπές
Mb	595	573	1922	13-16
HbA	594	574	1925	13
HRP	604	574	1903	13,14
CPO	538	558		17
P450 _{nor}	530		1853	18
P450	528			19
NOS(-)	540			20
Nhase	592	570	1853	12
Nor	594		1904	παρ. εργασία

Πρόσφατα αναφέρθηκε η $\nu(\text{NO})$ του συστήματος His-Fe^{3+} -NO διαφορετικών αιμοπρωτεϊνών με την χρησιμοποίηση υπεριώδους ενέργειας διέγερσης για την καταγραφή των φασμάτων Raman (15). Στην περιοχή $1800\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ των RR του συμπλόκου NOR/NO με διέγερση στην περιοχή της ταινίας Soret δεν καταγράφηκε κάποια δόνηση, σε συμφωνία με τις προηγούμενες αναφορές για His-Fe-NO συστήματα. Η δόνηση τάσης Fe^{3+} -NO στο P-450, το οποίο έχει ως εγγύ υποκαταστάτη κυστεΐνη, είναι μετατοπισμένη χαμηλότερα κατά 70 cm^{-1} σε σχέση με την αντίστοιχη δόνηση αιμοπρωτεϊνών με εγγύ υποκαταστάτη ιστιδίνη (15, 16, 18). Μεταβολές στην βασικότητα του εγγούς υποκαταστάτη είναι πιθανόν να συνεισφέρουν στην διαφορά στην δόνηση τάσης του μονοξειδίου του αζώτου όταν αυτό δεσμεύεται σε πρωτεΐνες με υποκατάσταση ιστιδίνης ή κυστεΐνης. Δεδομένου, μάλιστα του γεγονότος ότι το άτομο θείου της κυστεΐνης είναι ισχυρός δότης ηλεκτρονίων, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο δεσμός του NO στο σύμπλοκο παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στην βασικότητα του εγγούς υποκαταστάτη, και η συχνότητα δόνησης του NO αυξάνει όσο ο εγγύς υποκαταστάτης γίνεται ισχυρότερος δότης ηλεκτρονίων προς το κέντρο Fe(III)-NO .

Η $\nu(\text{NO})$ του ελεύθερου μονοξειδίου του αζώτου είναι ευαίσθητη στην ηλεκτρονιακή του κατάσταση. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην ρίζα του NO, το οποίο διαθέτει ένα ηλεκτρόνιο στο αντιδεσμικό τροχιακό π^* , εξασθενεί τον δεσμό N-O και δίνει NO^- , ενώ η

απομάκρυνση του ηλεκτρονίου του τροχιακού π^* ενισχύει τον δεσμό N-O και δίνει NO^+ . Οι συχνότητες που εμφανίζεται η δόνηση τάσης στα NO^- , NO^\cdot και NO^+ είναι 1284, 1876 και 2345 cm^{-1} , αντίστοιχα (21-23). Οι συχνότητες της $\nu(\text{NO})$ στην Mb (όξινη μορφή), Mb (ουδέτερη μορφή) και HRP είναι 1910, 1922 και 1903 cm^{-1} , αντίστοιχα, δηλαδή η ηλεκτρονιακή κατάσταση του δεσμευμένου μονοξειδίου του αζώτου στις παραπάνω αιμοπρωτεΐνες βρίσκεται πλησιέστερα στην NO^\cdot και το σύστημα NO έχει έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Όπως είχε προταθεί από τον Tomita *et al.* (15) η $\nu(\text{NO})$ σε αρκετές αιμοπρωτεΐνες με υποκατάσταση ουδέτερης ιστιδίνης στην εγγύ θέση δέσμευσης, το NO έχει έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και η συνεισφορά π ηλεκτρονίων από την ιστιδίνη είναι μικρή. Συνεπώς, προτείνουμε ότι στην NOR το NO υιοθετεί την μορφή συντονισμού $\text{Fe}^+=\text{N}=\text{O}$, που είναι παρόμοια με αυτή της όξινης μορφής του συμπλόκου metMb-NO ($\nu(\text{NO}) = 1910 \text{ cm}^{-1}$) παρά την $\text{Fe}-\text{N}\equiv\text{O}^+$ της ουδέτερης μορφής ($\nu(\text{NO}) = 1922 \text{ cm}^{-1}$). Η τελευταία δομή σταθεροποιείται στην μυογλοβίνη μέσω του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων στο N_ϵ της ιστιδίνης που βρίσκεται στην μακρινή θέση ως προς την αίμη, και ο προσανατολισμός της επιτρέπει την αλληλεπίδραση με το δεσμευμένο NO αυξάνοντας έτσι την $\nu(\text{NO})$. Επίσης, μπορεί να εκτιμηθεί ότι ο βαθμός του δεσμού επαναφοράς στο σύστημα Fe^{3+} -NO στην NOR είναι ο ίδιος με τα NO-σύμπλοκα Hb και Mb, εφόσον έχει δειχθεί ότι η συχνότητα της δόνησης Fe^{3+} -NO είναι ευαίσθητη στον εγγύ υποκαταστάτη και η συχνότητα που καταγράφηκε για το σύμπλοκο της NOR είναι σύμφωνη με την συναρμογή ουδέτερης παρά αρνητικά φορτισμένης ιστιδίνης, όπως στις περοξειδάσες (15).

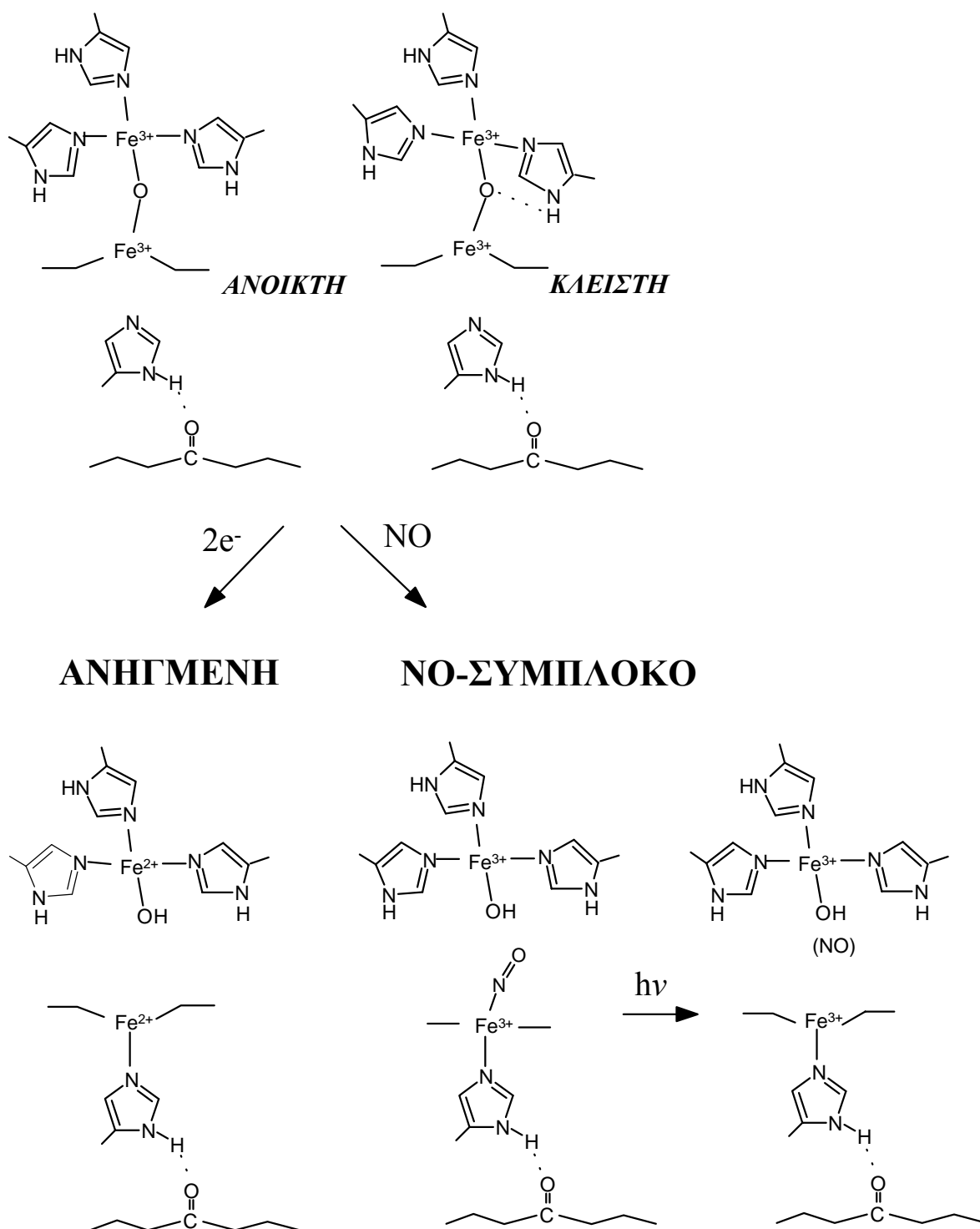
Η ασυνήθιστα χαμηλή συχνότητα της δόνησης τάσης Fe-CO που έχει καταγραφεί στην NOR αποδόθηκε στην ύπαρξη αρνητικού φορτίου στην κοιλότητα της αίμης (6). Η ύπαρξη αρνητικού φορτίου στο διπυρηνικό κέντρο της NOR θα σταθεροποιούσε την μορφή συντονισμού $\text{Fe}-\text{N}\equiv\text{O}^+$ με αποτέλεσμα μια σχετικά αυξημένη $\nu(\text{NO})$. Σύμφωνα όμως με τα πειραματικά δεδομένα μας η μορφή συντονισμού που σταθεροποιείται στην NOR είναι η $\text{Fe}^+=\text{N}=\text{O}$ και συνεπώς η πολικότητα του διπυρηνικού κέντρου δεν επηρεάζει απευθείας την ισχύ των δεσμών Fe-NO και N-O. Τα RR και FTIR αποτελέσματα μας παρέχουν ξεκάθαρα στοιχεία που δείχνουν ότι δεν παρουσιάζονται ασυνήθιστες στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις στο διπυρηνικό κέντρο της NOR που επηρεάζουν τον δεσμό Fe-NO, και παρά το γεγονός της ύπαρξης δύο διαμορφώσεων στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, το μονοξείδιο του αζώτου δεσμεύεται σε μία συγκεκριμένη διαμόρφωση στην αίμη b_3 . Εάν το NO δεσμευόταν σε διαφορετικές διαμορφώσεις, τότε ένα δεύτερο ζευγάρι $\nu(\text{Fe}-\text{NO})$ και $\nu(\text{NO})$ θα εμφανιζόταν στα RR και FTIR φάσματα. Καμία όμως τέτοια δόνηση δεν καταγράφηκε.

Δομή του καταλυτικού κέντρου στην NOR

Στην προσπάθεια να διευκρινιστούν οι δομικές αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά την μετάβαση από την οξειδωμένη μορφή της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου στο NO-σύμπλοκό της και το φωτοπροϊόν του, προτείνουμε το μοντέλο που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4 και περιλαμβάνει επίσης και την μετάβαση στην πλήρως ανηγμένη μορφή της NOR, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συνοπτικά, όπως έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, στην οξειδωμένη μορφή το ένζυμο διαθέτει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις την ανοικτή και κλειστή δομή. Και στις δύο αυτές δομές η αίμη b_3 διατηρεί αριθμό συναρμογής πέντε και υψηλού σπιν διαμόρφωση, με την εγγύ ιστιδίνη να μην βρίσκεται δεσμευμένη στον αιμικό σίδηρο. Η διαφοροποίηση των δύο διαμορφώσεων στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του οξυγόνου της γέφυρας Fe-O-Fe με τους υποκαταστάτες του μη-αιμικού σιδήρου μέσω δεσμού υδρογόνου ή/και στερικών παρεμποδίσεων στην κλειστή δομή, ενώ αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιορίζονται σε μικρότερο βαθμό στην ανοικτή διαμόρφωση. Η εισαγωγή δύο ηλεκτρονίων στο διπυρηνικό κέντρο έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση της γέφυρας που συνδέει τα δύο μέταλλα και την δέσμευση της εγγύς ιστιδίνης στην υψηλού σπιν αίμη b_3 , και την διατήρηση του αριθμού συναρμογής πέντε για την αίμη. Η εγγύς ιστιδίνη διατηρεί δεσμό υδρογόνου με γειτονικό αμινοξύ όπως στην πλειοψηφία των αιμοπρωτεϊνών (24). Ένα από τα σημαντικότερα δομικά χαρακτηριστικά του διπυρηνικού κέντρου της NOR είναι η σχετική διεύθετηση των μεταλλικών κέντρων του αιμικού και του μη-αιμικού σιδήρου. Τα κέντρα αυτά βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, και στο μηχανισμό που έχει προταθεί για την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου από τον deVries (6), απόσταση των δύο μετάλλων είναι αυτή που επιτρέπει την δημιουργία του δεσμού N-N μετά την δέσμευση ενός μορίου υποστρώματος σε κάθε κέντρο. Κατά συνέπεια, μεταβολές στην απόσταση των δύο κέντρων σιδήρου είναι ιδιαίτερης σημασίας εφόσον μπορεί να επηρεάσουν την κινητική της καταλυτικής αντίδρασης ή ακόμα και να καθορίσουν τον σχηματισμό πιθανών ενδιάμεσων.

Προσθήκη του NO στην οξειδωμένη μορφή της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου προκαλεί διάσπαση του δεσμού Fe-O-Fe και δέσμευση της εγγύς ιστιδίνης στον αιμικό σίδηρο, παράγοντας ένα σύμπλοκο His-Fe³⁺-NO. Τα δεδομένα στηρίζουν την άποψη ότι μπορεί να υπάρχει επικοινωνία εγγύς και μακρινής θέσης δέσμευσης, πιθανά μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου. Συνεπώς, μια δομική αλλαγή στην μακρινή θέση που προκαλείται από την δέσμευση του NO είναι πιθανόν να μεταφέρεται στην εγγύ θέση μέσω του κορμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να μετέχει ο μη-αιμικός σίδηρος στην διαδικασία δέσμευσης του μονοξειδίου του αζώτου ως

ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ



Σχήμα 4. Μοντέλο δομής-λειτουργίας του καταλυτικού κέντρου της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου.

αρχική θέση δέσμευσης, με αποτέλεσμα την διάσπαση της όξο-γέφυρας Fe-O-Fe και στην συνέχεια την μεταφορά του NO στον αιμικό σίδηρο με επακόλουθο την δέσμευση και της εγγύς ιστιδίνης στην αίμη b_3 . Με βάση όμως τα πειραματικά δεδομένα αποκλείεται η ταυτόχρονη δέσμευση δύο μορίων υποστρώματος στο οξειδωμένο διπυρηνικό κέντρο και κατά συνέπεια η αίμη b_3 είναι το μέταλλο που διαθέτει την υψηλότερη συγγένεια για το NO σε σχέση με τον μη-αιμικό σίδηρο. Η φωτοδιάσπαση συμπλόκων NO αποτελεί συχνά πρόβλημα εφόσον αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή. Τα πειραματικά δεδομένα της παρούσης εργασίας δείχνουν ότι τα NO-σύμπλοκα έχουν υψηλή κβαντική απόδοση και η επίτευξη πλήρους φωτοδιάσπασης είναι σχετικά εύκολη. Το προϊόν της φωτοδιάσπασης του NO-συμπλόκου έχει δομή στην οποία η εγγύς ιστιδίνη είναι δεσμευμένη στην αίμη b_3 , σε αντίθεση με το οξειδωμένο ένζυμο, όπως αυτό απομονώνεται.

Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι και στους δύο μηχανισμούς που έχουν προταθεί ως σήμερα για την καταλυτική πορεία της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου, δύο μόρια NO προσδένονται στο ενεργό κέντρο. Στο μοντέλο που προτείνεται από τον de Vries και τους συνεργάτες του (6), η αντίδραση ξεκινάει όταν το ένζυμο είναι πλήρως ανηγμένο και ένα μόριο υποστρώματος προσδένεται σε κάθε μέταλλο του ενεργού κέντρου. Η δέσμευση του μονοξειδίου του αζώτου στον αιμικό σίδηρο έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της εγγύς ιστιδίνης, ενώ ο δεσμός N-N σχηματίζεται ανάμεσα στα δύο δεσμευμένα μόρια NO, που ανάγονται σε N_2O χρησιμοποιώντας τα ηλεκτρόνια από τα μέταλλα στα οποία βρίσκονται δεσμευμένα. Η αναγωγή των δύο NO προς N_2O αφήνει την οξειδωμένη αίμη b_3 με αριθμό συναρμογής πέντε δεσμευμένη με τον επίσης οξειδωμένο μη-αιμικό σίδηρο μέσω όξο γέφυρας. Στον εναλλακτικό μηχανισμό που προτάθηκε από τον Watmough και τους συνεργάτες του (8) το διπυρηνικό κέντρο της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου υπάρχει σε μικτού σθένους κατάσταση κέντρου ($b_3^{3+} Fe^{2+}$) πριν την δέσμευση δύο μορίων NO ταυτόχρονα στον μη-αιμικό σίδηρο, ενώ η αίμη b_3 παραμένει αμέτοχη στον καταλυτικό κύκλο. Το μοντέλο αυτό βασίστηκε στο γεγονός ότι το κανονικό δυναμικό αναγωγής της αίμης b_3 είναι σημαντικά χαμηλότερο από τα δυναμικά αναγωγής των τριών υπολοίπων μεταλλικών κέντρων του ενζύμου γεγονός που καθιστά την αναγωγή της b_3 θερμοδυναμικά μη ευνοούμενη. Συγκεκριμένα, το δυναμικό της αίμης b_3 ($E_m=60$ mV) είναι πολύ χαμηλότερο από τα 310 mV της αίμης c , 345 mV της αίμης b , και τα 320 mV του μη-αιμικού σιδήρου. Δεν παρουσιάστηκαν ωστόσο πειραματικά δεδομένα που να στηρίζουν την δέσμευση ενός ή δύο μορίων υποστρώματος στον ανηγμένο μη-αιμικό σίδηρο.

Οι τιμές των δυναμικών των οξειδοαναγωγικών κέντρων της NOR που αναφέρθηκαν παραπάνω καθιστούν πιθανή την υπόθεση ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η

ενεργοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται όταν αυτό βρίσκεται σε κατάσταση μικτού σθένους, στην οποία οι χαμηλού σπιν αίμες b και c καθώς επίσης και ο μη-αιμικός σίδηρος βρίσκονται στην ανηγμένη τους μορφή ενώ η υψηλού σπιν αίμη b_3 είναι οξειδωμένη. Στην περίπτωση αυτή ένα μόριο NO προσδένεται στην αίμη b_3 και η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο b_3^{3+} -NO παράγει το ανηγμένο ενδιάμεσο NO Fe^{2+} -N=O⁻. Στην συνέχεια ένα δεύτερο μόριο NO προσβάλλει το δεσμευμένο άτομο N με αποτέλεσμα το σχηματισμό HONNO⁻, δηλαδή του δεσμού N-N. Η διάσπαση του δεσμού N-O τελικά παράγει N₂O και H₂O ενώ το ενεργό κέντρο έχει οξειδωθεί. Παρόμοια διαδικασία πραγματοποιείται από το P450Nor (25), το οποίο ανάγει το NO με απευθείας λήψη των ηλεκτρονίων από το NADH. ($2\text{NO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$). Το αρχικό βήμα στην καταλυτική πορεία του P450Nor είναι ο σχηματισμός του συμπλόκου Fe^{3+} -NO και η αναγωγή του από το NADH καταλήγει στον σχηματισμό ενός ασταθούς ενδιάμεσου το οποίο αποσχηματίζεται και αφήνει την αίμη στην Fe^{3+} κατάσταση. Σε άλλα ένζυμα, όπως η κυτοχρωμική οξειδάση όπου η αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου είναι ευνοούμενη, έχει δειχθεί ότι η δέσμευση δύο μορίων NO στην ενεργή θέση του πλήρως ανηγμένου ($4e^-$) ενζύμου, οδηγεί στην οξείδωση της αίμης και του γειτονικού ατόμου Cu_B (26). Η παραπάνω διαδικασία περιλαμβάνει την λήψη δύο πρωτονίων για τον σχηματισμό N₂O και H₂O. Ο μοριακός μηχανισμός αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου σε N₂O από την NOR εμφανίζεται περίπλοκος εφόσον τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι το NO δεσμεύεται στο οξειδωμένο ένζυμο αποκλειστικά στον αιμικό σίδηρο του ενεργού κέντρου προς τον σχηματισμό ενός φωτοδιασπόμενου συμπλόκου.

Συμπεράσματα

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman σε συνδιασμό με την φασματοσκοπία FTIR χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό της συναρμογής του NO στην οξειδωμένη μορφή της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου. Η καταγραφή των δονήσεων τάσης Fe^{3+} -NO και N-O του συμπλόκου της αίμης b_3 βάζει τα θεμέλια για την αναγνώριση και άλλων δονήσεων διαφορετικών NO ενδιάμεσων και κατά συνέπεια τον προσδιορισμό της καταλυτικής αντίδρασης αυτού του συναρπαστικού ενζύμου. Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες για την διαμόρφωση ενός ολοκληρωμένου μοντέλου για την λειτουργία της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου.

Βιβλιογραφία

1. Saraste, M., and Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.* **341**, 1-4.
2. Zumft, W.G. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 553-616.
3. Girsch, P. and de Vries, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 202-216.
4. Hendriks, J., Gohlke, U. and Saraste, M. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 15-24.
5. Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lübben, M. and Saraste, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.
6. Moënné-Loccoz, P. and de Vries S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5147-5152.
7. Moënné-Loccoz, P., Richter, O-M, H., Huang, H-w, Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. and de Vries S. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9344-9345.
8. Grönberg, K. L. C., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J., Watmough, N. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 13780-13786.
9. Kitagawa, T. (1988) in *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, (Spiro, T. Ed.) Vol. **3**, pp 97-131, Wiley, New York.
10. Rousseau, D. L., Friedman, J. M. (1988), in *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, (Spiro, T. Ed.) Vol. **3**, pp 133-215, Wiley, New York.
11. Nakamoto, K. (1990) *Coord. Chem Rev.* **100**, 363-402.
12. Noguchi, T., Hoshino, M., Tsujimura, M., Odaka, M., Inoue, Y., and Endo, I. (1996) *Biochemistry* **35**, 16777-16781.
13. Benko, B. and Yu, N.T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **80**, 7042-7046.
14. Mackin, H. C., Benko, B., Yu, N. T, and Gersonde, K. (1983) *FEBS Lett.* **158**, 199-203.
15. Tomita, T., Haruta, N., Aki, M., Kitagawa, T., and Ikeda-Saito, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2666-2667.
16. Miller, L. M., Pedraza, A. J., and Chance, M. R. (1997) *Biochemistry* **36**, 12199-12207.
17. Hu, S. and Kincaid, J. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 6189-6193.
18. Obayashi, E., Tsukamoto, K., Adachi, S-I, Takahashi, S., Nomura, M., Iizuka, T., Shoun, H., and Shiro, Y. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7807-7816.
19. Hu, S. and Kincaid, J. R. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2843-2850.
20. Wang, J., Rousseau, D. L., Abu-Soud, H., and Stuehr, D. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 10512-10516.
21. Kim, E. K. and Kochi, J. K. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4962-4974.
22. Laane, J. and Ohlsen, J. R. (1980) *Prog. Inorg. Chem.* **27**, 465-513.

23. Maricq, M. M, Tanguay, N. A., O'Brien, J. C., Rodday, S. M., and Rinden, E. (1989) *J. Chem. Phys.*, **90**, 3136-3144.
24. Rousseau, D. G. and Rousseau, D.L. (1992) *J. Struct. Biol.* **109**, 13-17.
25. Obayashi, E., Takahashi, S., and Shiro, Y. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12964-12965.
26. Rousseau, D. L., Singh, S., Ching, Y-c., and Sassaroli, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 5681-5685.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

**Ανίχνευση του Συμπλόκου της Αίμης
 b_3^{2+} -NO στο Κυτόχρωμα cbb_3 από το *Pseudomonas stutzeri***

Περίληψη

Η κατανόηση των χημικών ιδιοτήτων του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο σύμπλοκο του με τις αιμοχαλκοξειδάσες αποτελεί θεμέλιο για την διελεύκανση του μηχανισμού ενεργοποίησης του NO. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η ανίχνευση με φασματοσκοπία συντονισμού Raman των δονήσεων τάσης Fe^{2+} -NO και N-O, που χαρακτηρίζουν τις δονητικές ιδιότητες του δεσμευμένου NO στην αίμη b_3 του κυτοχρώματος cbb_3 από το *Pseudomonas stutzeri*. Η προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο προκαλεί την διάσπαση του δεσμού της αίμης b_3 με την εγγύ ιστιδίνη, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου b_3^{2+} -NO αριθμού συναρμογής πέντε, με τις δονήσεις $\nu(Fe^{2+}$ -NO) και $\nu(NO)$ στους 524 cm^{-1} και 1679 cm^{-1} , αντίστοιχα. Οι συχνότητες που ανιχνεύθηκαν για το σύμπλοκο b_3^{2+} -NO είναι όμοιες με αυτές που έχουν αναφερθεί για σύμπλοκα μοντέλων αιμών-NO και αιμοπρωτεϊνών-NO. Προτείνεται μοντέλο για την περιγραφή των καταστάσεων δέσμευσης του υποκαταστάτη και της οξειδωσης του πλήρως ανηγμένου κυτόχρωμα cbb_3 μετά την προσθήκη του NO.

Εισαγωγή

Η χημεία της αλληλεπίδρασης του μονοξειδίου του αζώτου με το διπυρηνικό κέντρο των αιμοχαλκοξειδασών παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω της συσχέτισής της με φυσιολογικές διαδικασίες (1,2). Για παράδειγμα, η αντιστρεπτή αναστολή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από το NO έχει προταθεί ότι αποτελεί σημείο ελέγχου της κατανάλωσης του O_2 στα μιτοχόνδρια, με πιθανό συσχετισμό με παθολογικές καταστάσεις του κυττάρου (3,4). Επίσης έχουν αναφερθεί στοιχεία που συνδέουν την αερόβια αναπνοή με την διαδικασία της απονιτροποίησης των βακτηρίων, με βάση τις δομικές ομοιότητες ανάμεσα στην αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου και την κυτοχρωμική οξειδάση cbb_3 του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* (2). Η cbb_3 οξειδάση του *Pseudomonas stutzeri* περιέχει τρεις αίμες τύπου *c* χαμηλής διαμόρφωσης σπιν, μία αίμη τύπου *b* με επίσης χαμηλή διαμόρφωση σπιν, και το διπυρηνικό κέντρο της υψηλού σπιν αίμης b_3 -Cu_B (5, 6). Μελέτες stopped-flow φασματοσκοπίας ορατού/υπεριώδους του κυτοχρώματος cbb_3 απέδειξαν ότι η δράση του ενζύμου ως αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου είναι όμοια με αυτή που έχει αναφερθεί για τα κυτοχρώματα ba_3 και caa_3 του θερμοφιλού βακτηρίου *Thermus thermophilus* (1, 5).

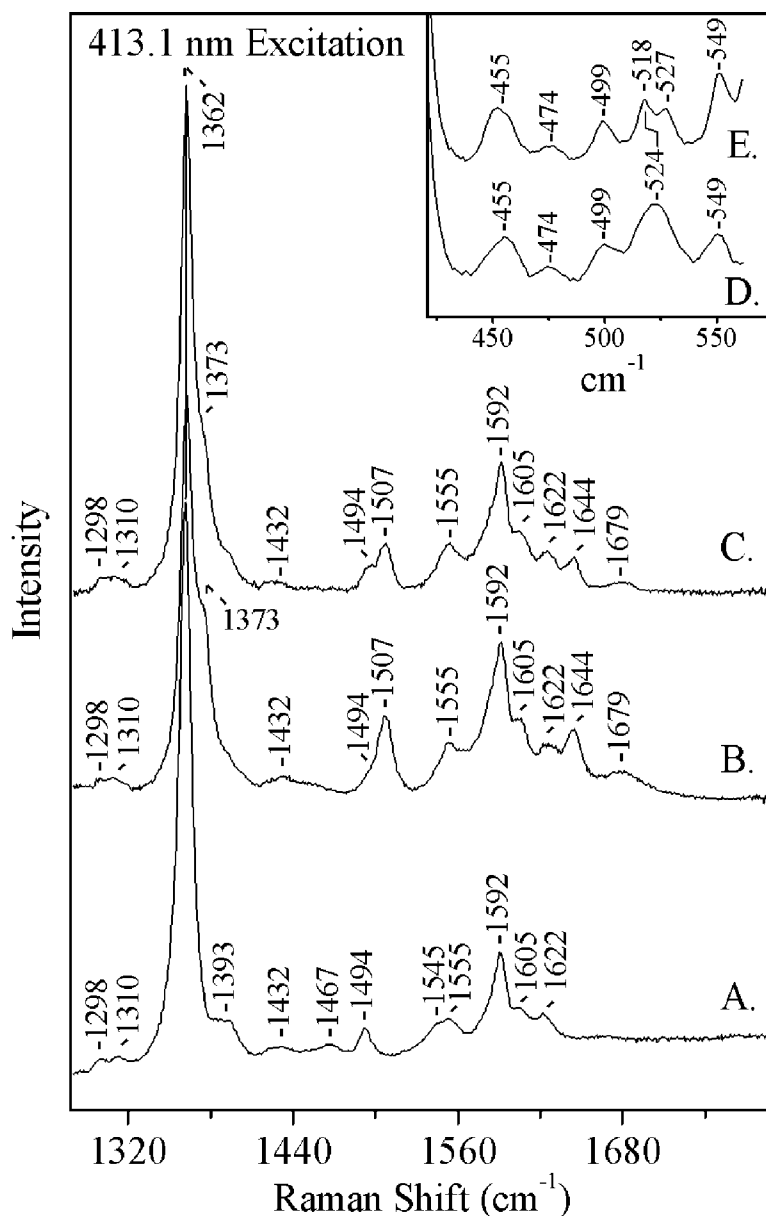
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman, μέθοδος που επιτρέπει την ανίχνευση δονήσεων αιμικού σιδήρου-υποκαταστατών, για τον χαρακτηρισμό του NO-συμπλόκου του ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 . Παρά το γεγονός ότι το σύμπλοκο b_3^{2+} -NO δεν θα έπρεπε να παρουσιάζει σημαντικό πληθυσμό στον καταλυτικό κύκλο, ο χαρακτηρισμός του σχηματισμού του συμπλόκου που ανιχνεύτηκε είναι σημαντικός για τον προσδιορισμό των συνθηκών κάτω από τις οποίες το ένζυμο παγιδεύεται σε μια κατάσταση λόγω της αργής αποδέσμευση του NO από την αίμη. Ανιχνεύθηκαν ταυτόχρονα οι δονήσεις τάσης του NO και του Fe^{2+} -NO στους 1679 και 524 cm^{-1} , αντίστοιχα. Από τις συχνότητες που παρουσιάζουν οι προαναφερόμενες δονήσεις, αποδεικνύεται ότι η προσθήκη του NO στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα cbb_3 του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του δεσμού His- Fe^{2+} της αίμης b_3 . Εφόσον λοιπόν πραγματοποιείται σχάση του δεσμού του αιμικού σιδήρου με τον εγγύ υποκαταστάτη το σύμπλοκο b_3^{2+} -NO παρουσιάζει αριθμό συναρμογής πέντε.

Πειραματικές Διαδικασίες

Το κυτόχρωμα cbb_3 απομονώθηκε όπως έχει περιγραφεί στο (5α). Η πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε στα 150 μM σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris pH 7.4 που περιείχε 0.05 % dodecyl β -D-maltoside και αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο ως την χρησιμοποίησή της. Για τις ιστοπικές μελέτες υδρογόνου/δευτερίου, διαλύματα του οξειδωμένου ενζύμου ανταλλάχθηκαν τρεις φορές με 99.9% D_2^{16}O (Aldrich Chemical Co. Inc.) Οι Raman μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με διέγερση 413.1 nm από Kr^+ laser (Coherent K-90). Η συγκέντρωση του ενζύμου που τοποθετήθηκε στην περιστρεφόμενη με 4000-6000 rpm quartz Raman κυψελίδα για την μείωση της θέρμανσης του δείγματος, ήταν 40-50 μM . Οι κυψελίδες είναι σχεδιασμένες για αναερόβιες μετρήσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την λήψη φασμάτων συντονισμού Raman όσο και φασμάτων οπτικής απορρόφησης (Perkin-Elmer Lambda 20 UV-visible spectrometer). Τα φάσματα Raman ελήφθησαν με την χρήση τριπλού πολυχρωμάτορα SPEX 1877 και EG&G (model 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Η διακριτικότητα των φασμάτων Raman είναι $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Η ισχύς της ακτινοβολίας διέγερσης που χρησιμοποιήθηκε πάνω στο δείγμα ήταν 3-5 mW και ο συνολικός χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 20-30 min. Η δημιουργία του NO-συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με την έκθεση ανηγμένου με dithionite ενζύμου σε 1 ατμόσφαιρα NO και αναερόβια μεταφορά του στην περιστρεφόμενη Raman κυψελίδα Το αέριο NO προέρχεται από την Messer (Germany) και το ισότοπο NO (^{15}NO) από την Isotec.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Το Σχήμα 1 απεικονίζει τα φάσματα συντονισμού Raman του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* καθώς επίσης και των NO-συμπλόκων του σε H_2O και D_2O . Η απόδοση των δονήσεων του ανηγμένου ενζύμου (Σχήμα 1 A) πραγματοποιείται σε αναλογία με τις αντίστοιχες δονήσεις του ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 από το βακτήριο *Rhodobacter sphaeroides* (7). Οι δονήσεις στους 1362 (ν_4), 1467 (ν_3), και 1605 (ν_{10}) cm^{-1} χαρακτηρίζουν την αίμη υψηλής διαμόρφωσης σπιν b_3 . Στο φάσμα εμφανίζονται επίσης οι κορυφές στους 1494 (ν_3) and 1592 (ν_2) cm^{-1} , δηλώνοντας την παρουσία των χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι αιμών b^{2+} και c^{2+} . Η δέσμευση του NO στην αίμη b_3^{2+} του πλήρως ανηγμένου ενζύμου δημιουργεί ένα σύμπλοκο b_3^{2+} -NO με χαμηλή διαμόρφωση σπιν (Σχήμα 1 B). Η κατάσταση σπιν και ο αριθμός συναρμογής του συμπλόκου προσδιορίζονται από τις δονήσεις στους 1373 (ν_4), 1507 (ν_3), και 1644 (ν_{10}) cm^{-1} .



Σχήμα 1: Περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman του ανηγμένου cbb_3 (A), του συμπλόκου του ανηγμένου cbb_3 -NO σε H_2O (B) και του συμπλόκου του ανηγμένου cbb_3 -NO σε D_2O (C) με διέγερση 413.1 nm. Ένθετο: Περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman του συμπλόκου του ανηγμένου cbb_3 -¹⁴NO (D) και του cbb_3 -¹⁵NO (E) σε H_2O .

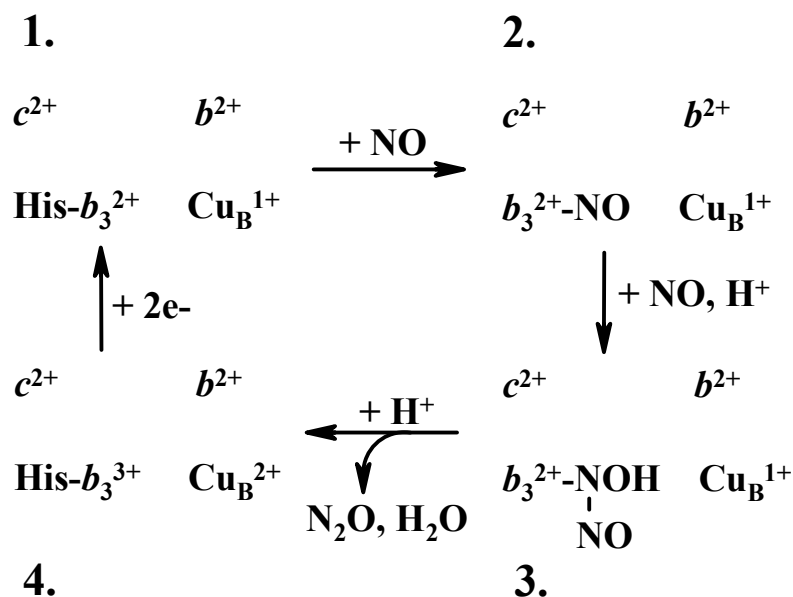
Επιπλέον εμφανίζεται μία νέα δόνηση στους 1679 cm^{-1} . Η προέλευση της δόνησης είναι από το δεσμευμένο NO στο σύμπλοκο b_3^{2+} -NO, και η ερμηνεία αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με τις συχνότητες $\nu(\text{NO})$ που έχουν αναφερθεί για άλλα σύμπλοκα αίμης Fe^{2+} -NO αριθμού συναρμογής πέντε (9-17). Το Σχήμα 1C παρουσιάζει το φάσμα του δεσμευμένου NO στο

κυτόχρωμα cbb_3 σε D_2O . Η σύγκριση του φάσματος B με το φάσμα C δείχνει ότι παρόμοιες δονήσεις λαμβάνονται σε ρυθμιστικά διαλύματα H_2O και D_2O . Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται με το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις του δεσμευμένου NO που να σχετίζονται με δεσμό υδρογόνου στο σύμπλοκο b_3^{2+} -NO σε pH 7.4. Η υψηλή περιοχή συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman του συμπλόκου b_3^{2+} - ^{15}NO δεν εμφανίζει την δόνηση στους 1679 cm^{-1} . Η αναμενόμενη συχνότητα της $\nu(^{15}NO)$ του συμπλόκου βρίσκεται στους 1636 cm^{-1} , σε μια περιοχή του φάσματος με δονήσεις μεγάλης έντασης, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η ανίχνευση της $\nu(^{15}NO)$. Στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman του συμπλόκου cbb_3 - ^{14}NO (Σχήμα 1 D) εμφανίζεται μία δόνηση στους 524 cm^{-1} που μετατοπίζεται στους 518 cm^{-1} στο σύμπλοκο του ενζύμου με το ισοτοπικά επισημασμένο ^{15}NO (Σχήμα 1 E). Η κορυφή αυτή αποδίδεται στην δόνηση τάσης Fe-NO του συμπλόκου b_3^{2+} -NO, εφόσον η ισοτοπική μετατόπιση των 6 cm^{-1} είναι σύμφωνη με την θεωρητική τιμή που προσδιορίζεται με βάση το μοντέλο του διατομικού αρμονικού ταλαντωτή και επίσης η συχνότητα της δόνησης $\nu(Fe^{2+}$ -NO) είναι όμοια με τις αντίστοιχες που έχουν αναφερθεί για σύμπλοκα μοντέλων αιμών-NO και αιμοπρωτεϊνών-NO (9-16). Σύμφωνα με το μοντέλο του διατομικού αρμονικού ταλαντωτή προβλέπεται μετατόπιση για την αντικατάσταση $^{14}N^{16}O$ με $^{15}N^{16}O$ της τάξης των 6 cm^{-1} για ευθεία διαμόρφωση και 16 cm^{-1} για κεκαμμένη δομή. Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα από τα φάσματα συντονισμού Raman του συμπλόκου b_3^{2+} -NO συντείνουν στον προσδιορισμό ευθείας διαμόρφωσης, τα δεδομένα X-ray μελετών μοντέλων Fe^{2+} -NO δείχνουν ότι η δομή που εννοείται είναι η κεκαμμένη.

Η ασυνήθιστα χαμηλή συχνότητα της δόνησης τάσης Fe^{2+} -CO στο κυτόχρωμα cbb_3 σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα άλλων μελών της οικογένειας των αιμοχαλκοξειδασών αποδόθηκε σε μια ανοικτή δομή της ενεργής θέσης, στην οποία δεν παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις με το γειτονικό άτομο του Cu_B και συνεπώς το δεσμευμένο στην αίμη b_3 CO μπορεί να υιοθετήσει ευθεία διαμόρφωση, κάθετα ως προς το επίπεδο της αίμης (18). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συνηγορούν στην ύπαρξη μιας παρόμοιας διαμόρφωσης της μακρινής θέσης της κοιλότητας της αίμης με αυτή του CO-συμπλόκου στο ένζυμο. Οι συχνότητες $\nu(Fe^{2+}$ -NO)= 524 cm^{-1} και $\nu(NO)$ = 1679 cm^{-1} βρίσκονται πολύ κοντά στις τιμές που έχουν αναφερθεί για σύμπλοκα αιμών-NO με αριθμό συναρμογής πέντε. Το εύρος που εμφανίζει η δόνηση $\nu(Fe^{2+}$ -NO) είναι μικρό και κυμαίνεται στους 523 - 526 cm^{-1} , ενώ για την δόνηση $\nu(NO)$ έχει καταγραφεί μεγαλύτερη διακύμανση που καλύπτει το εύρος τιμών από 1667 ως 1681 cm^{-1} . Αν και παραμένει προς διευκρίνιση το ποσοστό που επηρεάζει η πολικότητα της μακρινής θέσης της κοιλότητας της αίμης τις ιδιότητες της

$\nu(\text{NO})$, όπως επηρεάζει και την $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$, τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η πολικότητα της μακρινής θέσης της αίμης b_3 στο κυτόχρωμα cbb_3 είναι όμοια με αυτή της sGC ($\nu_{\text{NO}}=1681$) και της FixL ($\nu_{\text{NO}}=1677$) (8, 9, 16).

Για να περιγραφούν οι πιθανές καταστάσεις δέσμευσης του υποκαταστάτη και η οξειδωτική τους κατάσταση, κατά την προσθήκη NO στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα cbb_3 , προτείνεται το μοντέλο που απεικονίζεται συνοπτικά στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. Σχηματική απεικόνιση των δομών των οξειδοαναγωγικών κέντρων του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 κατά την προσθήκη μονοξειδίου του αζώτου.

Η προσθήκη του NO στο ανηγμένο κυτόχρωμα cbb_3 προκαλεί την διάσπαση του δεσμού της αίμης b_3 με την εγγύ ιστιδίνη, παράγοντας ένα σύμπλοκο αίμης b_3^{2+} -NO αριθμού συναρμογής πέντε **2**. Ένα δεύτερο μόριο NO προσβάλλει το άτομο N του συμπλόκου αίμης-NO και με συνακόλουθη πρωτονίωση σχηματίζεται ένα μεταβατικό σύμπλοκο (HONNO⁻), και άρα ο δεσμός N-N. Αυτή η μορφή του ενζύμου είναι ασταθής και με την προσθήκη ενός πρωτονίου σχηματίζεται μια κατάσταση μικτού σθένους **4** ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται το παραγόμενο N₂O και H₂O. Η παρουσία περίσσειας dithionite οδηγεί στον αναγωγή του ενζύμου και τον σχηματισμό και πάλι της μορφής **1**. Στα πειράματα της προσθήκης NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο, που περιγράφονται στην παρούσα εργασία, δεν συναντάμε στοιχεία που να συνηγορούν στην οξείδωση του ενζύμου, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη σημαντικής περίσσειας αναγωγικού που αποτρέπει την οξείδωση. Συνεπώς, ο

σηματισμός του ενδιαμέσου **3**, από το σύμπλοκο αίμης b_3^{2+} -NO **2**, που εξαρτάται από την περίσσεια NO, αναστέλεται κάτω από τις παραπάνω συνθήκες και άρα αυξάνεται ο πληθυσμός του συμπλόκου b_3^{2+} -NO. Ο μηχανισμός που περιγράφει την δημιουργία του NO-συμπλόκου κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο εργασίας για μελλοντικά πειράματα.

Η αίμη b_3 του κυτοχρώματος cbb_3 ανάγεται μερικώς από το ασκορβικό και οξειδώνεται από το NO (5). Η πλήρης αναγωγή του ενζύμου απαιτεί την χρησιμοποίηση dithionite, όπως απαιτείται και στην περίπτωση της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (NOR) του *Paracoccus denitrificans* και του κυτοχρώματος cbb_3 από το *Rhodothermus marinus* (19, 20). Η συμπεριφορά αυτή αποτελεί ένδειξη για ασυνήθιστα χαμηλή τιμή του κανονικού δυναμικού οξειδοαναγωγής της αίμης b_3 . Το κανονικό δυναμικό οξειδοαναγωγής της αίμης b_3 στην περίπτωση της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου είναι $E_m=60$ mV, και η πλήρης αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου στο ένζυμο αυτό είναι μη ευνοούμενη θερμοδυναμικά (21). Παρόμοιες παρατηρήσεις ισχύουν και για το κυτόχρωμα cbb_3 από το *Rhodothermus marinus* (20). Το NO-σύμπλοκο που ανιχνεύσαμε απαιτεί την χρήση dithionite και άρα πλήρως ανηγμένο ενεργό κέντρο. Πρόσφατα προτάθηκε ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης του NO από την NOR πραγματοποιείται με ένα πλήρως ανηγμένο διπυρηνικό κέντρο αίμης b_3 /μη-αιμικού σιδήρου, και η δέσμευση NO στην ανηγμένη αίμη b_3 προκαλεί την αποδέσμευση της εγγύς ιστιδίνης (22).

Τα πειραματικά δεδομένα και η ανάλυση που παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία αποδεικνύουν τον σχηματισμό ενός συμπλόκου Fe^{2+} -NO της αίμης b_3 με αριθμό συναρμογής πέντε. Η ανίχνευση αυτού του συμπλόκου δεν ήταν αναμενόμενη. Αν και έχει αναφερθεί σε διάφορα μηχανιστικά μοντέλα αναγωγής του NO (22), η επιβεβαίωση του σχηματισμού του και ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του δεν είχε καταστεί δυνατόν να πραγματοποιηθεί πιθανόν λόγω του μικρού χρόνου ζωής του κατά την καταλυτική πορεία. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για την εξέταση των ιδιοτήτων του συμπλόκου και τον πιθανό ρόλο του στην ενζυματική λειτουργία της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου και των κυτοχρωμάτων cbb_3 και ba_3 από το *T. thermophilus*, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Επίσης, η σύγκριση των συμπλόκων NO αριθμού συναρμογής πέντε και έξι, αντίστοιχα, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον προσδιορισμό των δομικών παραμέτρων που ευνοούν την διάσπαση του δεσμού Fe-His κατά την δέσμευση του NO.

Βιβλιογραφία

1. Giuffrè, A.; Stubauer, G.; Sart, P.; Brunori, M.; Zumft, W. G.; Buse, G.; Soulimane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* (1999), **96**, 14718-14723.
2. Zumft, W.G. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1997), **61**, 533-616.
3. Brown, G. C. *FEBS Lett.* (1995), **369**, 136-139.
4. Shiva, S.; Brookes, P. S.; Patel, R. P.; Anderson, P. G.; Darley-Usmar, V. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001), **98**, 7212-7217.
5. Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A. *Eur. J. Biochem.* (2001), **268**, 1-6.
6. Stavrakis, S.; Koutsoupakis, K.; Pinakoulaki, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Varotsis, C. *J. Am. Chem. Soc.* (2002), **124**, 3814-3815.
7. Varotsis, C.; Babcock, G. T.; Garcia-Horsman, A.; Gennis, R. B. *J. Phys. Chem.* (1995), **99**, 16817-16820.
8. Deinum, G.; Stone, J. R.; Babcock, G. T.; Marletta, M. A. *Biochemistry* (1996), **35**, 1540-1547.
9. Lukat-Rodgers, G. S.; Rodgers, K. R. *Biochemistry* (1997), **36**, 4178-4187.
10. Renolds, M. F.; Parks, R. B.; Burstyn, J. N.; Shelver, D.; Thorsteinsson, M. V.; Kerby, R. L.; Roberts, G. P.; Vogel, K. M.; Spiro, T. G. *Biochemistry* (2000), **39**, 388-396.
11. Choi, I. K.; Spiro, T. G.; Langry, K. C.; Smith, K. M. *Inorg. Chem.* (1991), **30**, 1832-1839.
12. Vogel, K. M.; Kozlowski, P. M.; Zgierski, M. Z.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* (1999), **121**, 9915-9921.
13. Tomita, T.; Hirota, S.; Ogura, T.; Olson, J. S.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem. B.* (1999), **103**, 7044-7054.
14. Schelvis, J. P. M.; Seibold, S. A.; Cerda, J. F.; Garavito, R. M.; Babcock, G. T. *J. Phys. Chem. B.* (2000), **104**, 10844-10850.
15. Schelvis, J. P. M.; Zhao, Y.; Marletta, M. A.; Babcock, G.T. *Biochemistry* (1998), **37**, 16289-16297
16. Tomita, T.; Ogura, T.; Tsuyama, S.; Imai, Y.; Kitagawa, T. *Biochemistry* (1997), **36**, 10155-10160.
17. Nagai, K.; Welborn, C.; Dolphin, D.; Kitagawa, T. *Biochemistry* (1980), **19**, 4755-4761.
18. Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* (1995), **117**, 9363-9364.

19. Pinakoulaki, E.; Gemeinhardt, S.; Saraste, M.;Varotsis C. *J. Biol.Chem.* (2002), **277**, 23407-23413.
20. Pereira, M. M.; Carita, J. N.; Anglin, R.; Saraste, M.; Texeira, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* (2000), **32**, 143-152.
21. Grönberg, K. L. C.; Roldan, M. D.; Prior, L., Butland, G.; Cheesman, M. R.; Richardson, D. J.; Spiro, S.; Thomson, A. J.; Watmough, N. J. *Biochemistry* (1999), **38**, 13780-13786.
22. Moënné-Loccoz, P.; de Vries S. *J. Am .Chem. Soc.* (1998), **120**, 5147-5152.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

**Μελέτη της Αντίδρασης της Ανηγμένης Αναγωγάσης του
Μονοξειδίου του Αζώτου με το NO και
Σύγκριση των Αντιδράσεων NOR και *cbb*₃ με το O₂**

Περίληψη

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του διπυρηνικού κέντρου αίμης b_3 -Cu_B του κυτοχρώματος *cbb₃* από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* και του κέντρου αίμης b_3 -Fe (μη-αιμικού σιδήρου) της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans* σε διαφορετικές μορφές των ενζύμων. Τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων *cbb₃*/O₂ και NOR/O₂ δείχνουν ότι και τα δύο ένζυμα καταλύουν την αναγωγή του O₂ σε H₂O. Με βάση τις διαφορές στην μορφή που απομονώνονται τα δύο ένζυμα προτείνουμε ότι ο επανασηματισμός του δεσμού b_3 -O-Fe στην NOR προκαλεί την διάσπαση του δεσμού His-αίμης b_3 προς την δημιουργία της ανοικτής και κλειστής διαμόρφωσης του οξειδωμένου ενεργού κέντρου b_3 -O(H)-Fe. Ο συνδιασμός φασματοσκοπίας ορατού και συντονισμού Raman για τα προϊόντα της αντίδρασης της ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του αζώτου, δείχνουν ότι ο σχηματισμός του δεσμού N-N κατά την αναγωγή του NO σε N₂O στην διαδικασία της απονιτροποίησης πραγματοποιείται με ακέραιο τον δεσμό His-αίμης b_3 . Η αναγωγή του O₂ και του NO από την κυτοχρωμική οξειδάση και την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου συγκρίνονται και σχολιάζονται.

Εισαγωγή

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση της λειτουργίας και της μοριακής δομής του αναπνευστικού συμπλόκου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (1-45). Η ικανότητα του ενζύμου να ανάγει το O₂ και να αντλεί πρωτόνια αποτέλεσε αντικείμενο μεγάλου αριθμού μελετών για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της τάξης αυτών των ενζύμων. Με βάση τις δομικές ομοιότητες ανάμεσα στην αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου και της τελικής οξειδάσης *cbb*₃ προτάθηκε πρόσφατα ότι υπάρχουν κοινά στοιχεία ανάμεσα στην αερόβια αναπνοή και την βακτηριακή απονιτροποίηση (29). Στο ίδιο πλαίσιο, θεωρήθηκε ότι η διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο τάξεις ενζύμων έγκειται στην οργάνωση της ενεργού τους θέσης. Στην διαδικασία της απονιτροποίησης, η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NOR) καταλύει την δύο ηλεκτρονίων αναγωγή του NO σε N₂O μέσω ενός διπυρηνικού κέντρου αιμικού *b*₃/μη-αιμικού σιδήρου, ενώ η αναγωγή του O₂ σε H₂O από το ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας λαμβάνει χώρα στο διπυρηνικό κέντρο *b*₃/Cu_B (1-5, 45-54).

Μελέτες πάνω στον βιολογικό έλεγχο της χημείας οξυγόνου και μονοξειδίου του αζώτου έχουν αναδείξει διαφορετικούς μηχανισμούς (1, 45, 55). Τα μέταλλα που συναντώνται συχνότερα στις παραπάνω διαδικασίες είναι ο σίδηρος και ο χαλκός σε μονοπυρηνικά, και ομο- ή ετερο- διπυρηνικά κέντρα. Μέσω της εξελικτικής διαδικασίας επιλέχθηκαν τα καταλληλότερα μέσα για την αξιοποίηση των ιδιοτήτων της χημείας του O₂ και του NO, και σημαντικός αριθμός ενζύμων εξελίχθηκε για τον έλεγχο της ενεργοποίησης τους (45, 54). Πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι τα κυτοχρώματα *ba*₃ και *caa*₃ του θερμοφίλου βακτηρίου *Thermus thermophilus* παρουσιάζουν ενεργότητα αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου (29). Επιπλέον, το κυτόχρωμα *cbb*₃ από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* εμφανίζει την μεγαλύτερη ενεργότητα αναγωγής του NO ανάμεσα από τις οξειδάσες που έχουν μελετηθεί, παρέχοντας ενδείξεις για κοινή καταγωγή του κυτοχρώματος και της NOR (43, 44). Από την άλλη πλευρά, και η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου εμφανίζει δραστηριότητα ως προς το οξυγόνο, με ενεργότητα που φτάνει τα 120 ηλεκτρόνια s⁻¹, τιμή που είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με την ενεργότητά της ως προς το NO (49).

Το κυτόχρωμα *cbb*₃ από το βακτήριο *Pseudomonas stutzeri* περιέχει τρεις *c*-τύπου χαμηλού σπιν αίμες, μία *b*-τύπου χαμηλού σπιν αίμη και το διπυρηνικό κέντρο της υψηλού σπιν αίμης *b*₃-Cu_B (44). Ορισμένα από τα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος *cbb*₃ είναι ξεχωριστά σε σχέση με τις *aa*₃-τύπου κυτοχρωμικές οξειδάσες, και συγκεκριμένα

απουσιάζουν η πλευρική ομάδα υδροξυαιθυλ-φαρνεσύλ της αίμης και η υψηλά διατηρημένη στην οικογένεια των τελικών οξειδασών τυροσίνη 244 (αρίθμηση *aa₃* θηλαστικών), που έχει προταθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου (8, 10, 11). Πρόσφατα, η μελέτη της φωτοδιάσπασης του CO συμπλόκου του κυτοχρώματος *cbb₃* με φασματοσκοπία time-resolved step-scan FTIR απέδειξε ότι ο αποσχηματισμός του μεταβατικού συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO είναι ταυτόχρονος με την επαναδέσμευση του CO στην αίμη *b₃*, σε αντίθεση με το κυτόχρωμα *aa₃* των θηλαστικών (26). Παράλληλα, η $\nu(\text{CO})$ του συμπλόκου Cu_B¹⁺-CO στους 2065 cm⁻¹ έδειξε ότι η διαμόρφωση του υποκαταστάτη είναι όμοια με το κυτόχρωμα *aa₃* των θηλαστικών, παρά την απουσία της ομοιοπολικά δεσμευμένης Y244 με τον ένα υποκαταστάτη του Cu_B, την H276. Επίσης έχουμε χαρακτηρίσει το σύμπλοκο Fe²⁺-NO του κυτοχρώματος *cbb₃* του *Pseudomonas stutzeri* (κεφ. 10, 38). Προσθήκη του NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο προκαλεί την διάσπαση του δεσμού His-Fe της αίμης *b₃*, παράγοντας ένα σύμπλοκο *b₃*²⁺-NO αριθμού συναρμογής πέντε.

Η NOR περιλαμβάνει μία *c*- και μια *b*-τύπου χαμηλού σπιν αίμη, και μία υψηλού σπιν αίμη *b₃*, η οποία μαζί με ένα άτομο μη-αιμικού σιδήρου σχηματίζουν ένα ομοδιπυρηνικό κέντρο, όπου και πραγματοποιείται η αναγωγή του NO (47-52). Μελέτη μας με φασματοσκοπία συντονισμού Raman αποκάλυψε τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου της οξειδωμένης και ανηγμένης κατάστασης της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου του βακτηρίου *Paracoccus denitrificans*, καθώς επίσης και του NO-συμπλόκου του ενζύμου (κεφ. 8 και 9, 53). Στην οξειδωμένη κατάσταση το φάσμα της NOR εμφανίζει δύο δονήσεις $\nu_{\text{as}}(\text{Fe-O-Fe})$ στους 815 και 833 cm⁻¹, οι οποίες αποδόθηκαν σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του καταλυτικού κέντρου, την ανοικτή και την κλειστή, αντίστοιχα. Επιπλέον χαρακτηρίστηκε το NOR/NO σύμπλοκο της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου, μέσω των $\nu(\text{Fe}^{3+}\text{-NO})$ και $\nu(\text{N-O})$ στους 594 και 1904 cm⁻¹, αντίστοιχα (κεφ. 9, 53).

Η σύγκριση της κυτοχρωμικής οξειδάσης τύπου *cbb₃* με την αναγωγάση του μονοξειδίου του αζώτου μπορεί να μας δώσει την δυνατότητα για την αναγνώριση των διατηρημένων δομικών χαρακτηριστικών στα δύο ένζυμα, που παρέχουν σε αυτά την δυνατότητα να επιτελούν τις κοινές βασικές λειτουργίες τους. Σε αντίθεση, οι διαφοροποιήσεις τους αφορούν την προσαρμογή των ενζύμων στις ιδιαίτερες ανάγκες του βιολογικού τους ρόλου.

Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε τις ομοιότητες στην δομή και τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου του κυτοχρώματος *cbb₃* και της NOR, μελετήσαμε τα φάσματα συντονισμού Raman των ενζύμων στην οξειδωμένη και ανηγμένη κατάσταση, καθώς και του συμπλόκου του ανηγμένου ενζύμου με το CO. Επιπλέον, καταγράψαμε τα φάσματα

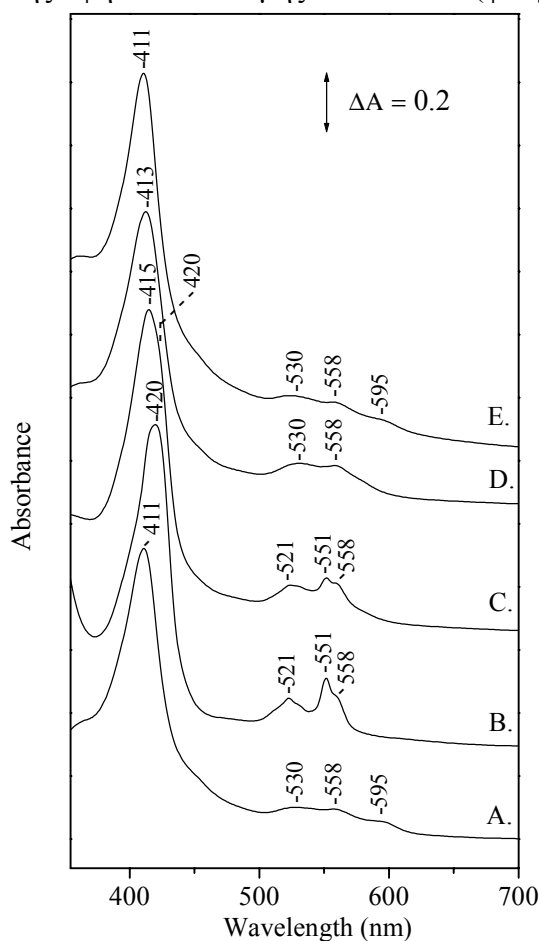
συντονισμού Raman κατά την αντίδραση των CO-συμπλόκων *cbb*₃ και NOR με το οξυγόνο, στα οποία πραγματοποιείται αυθόρμητη αντικατάσταση του CO από το O₂. Η σύγκριση ανάμεσα στα πειραματικά δεδομένα των αντιδράσεων *cbb*₃ και NOR με το οξυγόνο, δείχνει τον σχηματισμό ομοίων προϊόντων. Τα RR δεδομένα της αντίδρασης της πλήρους ανηγμένης NOR με το NO οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παράγεται ένα σύμπλοκο υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής έξι, με το νερό να θεωρείται ως ο πιθανότερος έκτος υποκαταστάτης. Προτείνουμε ότι το οξυγόνο του μορίου του δεσμευμένου νερού είναι αυτό που στην συνέχεια σχηματίζει την όξο-γέφυρα *b*₃-O-Fe, ο σχηματισμός της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του δεσμού His-αίμης *b*₃ και την αναγέννηση του ενζύμου στην μορφή στην οποία απομονώνεται, δηλαδή του διπυρηνικού κέντρου όξο-γέφυρας *b*₃-O(H)-Fe. Επιπλέον, τα δεδομένα μας στηρίζουν την άποψη ότι ο σχηματισμός του δεσμού N-N στην διαδικασία της απονιτροποίησης πραγματοποιείται με ακέραιο τον δεσμό His-αίμης *b*₃ και το διπυρηνικό κέντρο οξειδώνεται πλήρως μετά τον καταλυτικό κύκλο.

Πειραματικές Διαδικασίες

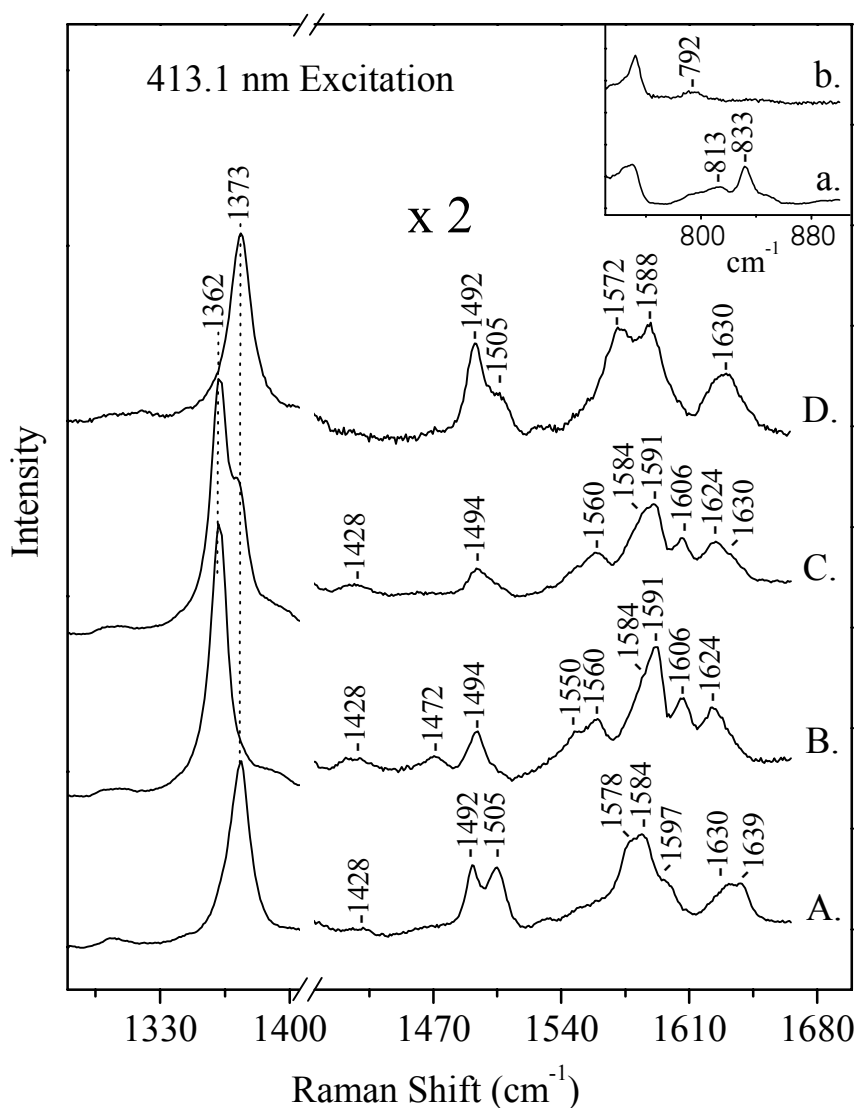
Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3 και σύμφωνα με την παραπομπή 50. Η κυτοχρωμική οξειδάση *cbb*₃-τύπου του *Pseudomonas stutzeri* απομονώθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παραπομπής 44. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν ως 150 μM σε 20 mM Tris pH 7.4 που περιείχε 0.05 % dodecyl β-D-maltoside και αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο ως την χρήση τους. Η συγκέντρωση της NOR υπολογίστηκε με $\epsilon_{411} = 3.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Τα φάσματα συντονισμού Raman συλλέχθηκαν σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί στις παραπομπές (20, 21, 27). Η ενέργεια διέγερσης στα 413.1 nm ήταν 5-7 mW και ο συνολικός χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 5-10 min. Οι κυψελίδες Raman είναι σχεδιασμένες για αναερόβιες μετρήσεις φασμάτων Raman αλλά και απορρόφησης ορατού (Perkin Elmer Lambda 20) για την εκτίμηση της σταθερότητας του εκάστοτε δείγματος. Τα CO-σύμπλοκα των δύο ενζύμων παρασκευάστηκαν με την έκθεση των ανηγμένων με dithionite δειγμάτων σε 1 atm CO, μετά την απομάκρυνση του οξυγόνου με κύκλους αργού/κενού. Η αντίδραση με το οξυγόνο πραγματοποιήθηκε με την έκθεση των δειγμάτων σε 1 atm O₂, ενώ για την αντίδραση της NOR με το NO το δείγμα αρχικά ανάχθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες με dithionite και στην συνέχεια εκτέθηκε σε 1 atm NO. Τα αέρια NO και CO αγοράστηκαν από την Messer (Frankfurt, Germany).

Αποτελέσματα

Το φάσμα απορρόφησης ορατού της οξειδωμένης μορφής της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου (φάσμα Α, Σχήμα 1) παρουσιάζει μέγιστα στα 411, 530, 558 nm, τα οποία είναι ενδεικτικά της παρουσίας των χαμηλού σπιν *b*- και *c*-τύπου αιμών και της υψηλού σπιν αίμης *b*₃. Η μετάβαση στα 595 nm είναι μια χαρακτηριστική ταινία μεταφοράς φορτίου από την πορφυρίνη στον υποκαταστάτη, που οφείλεται στην αίμη υψηλού σπιν *b*₃. Το ανηγμένο ένζυμο (φάσμα Β, Σχήμα 1) εμφανίζει την Soret μετάβαση στα 420 nm και τις άλλες μεταβάσεις ορατού στα 521, 551, και 558 nm. Το NO συναρμόζεται στις αιμοπρωτεΐνες τόσο στην ανηγμένη όσο και την οξειδωμένη τους κατάσταση, δίνοντας χαρακτηριστικά φάσματα (53). Η έκθεση της ανηγμένης NOR σε 1 atm αερίου NO (φάσμα C, Σχήμα 1) μετατοπίζει την Soret μετάβαση στα 415 nm και μειώνει την ένταση των μεταβάσεων ορατού στα 521, 551, και 558 nm. Κατά συνέπεια φαίνεται ότι το NO οξειδώνει το ένζυμο. Με την παροδο περίπου 10 min το ένζυμο σταδιακά οξειδώνεται (φάσμα D, Σχήμα 1) και μετά την απομάκρυνση της περίσσειας του αερίου NO αναγεννάται το φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου στην μορφή που απομονώνεται, με την χαρακτηριστική μετάβαση της υψηλού σπιν αίμης στα 595 nm (φάσμα E, Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Φάσματα απορρόφησης ορατού της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου από το βακτήριο *P. denitrificans* στην μορφή που απομονώνεται το ένζυμο (φάσμα Α), την πλήρως ανηγμένη με dithionite μορφή (φάσμα Β), της αντίδρασης ανηγμένης NOR/NO σε $t=3$ min (φάσμα C) και σε $t=10$ min (φάσμα D) και μετά την απομάκρυνση της περίσσειας NO με διοχέτευση αργού (φάσμα E). Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 10 μ M και το μήκος της κυψελίδας 0.5 cm.



Σχήμα 2: Φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων της NOR στην μορφή που απομονώνεται (φάσμα A), την ανηγμένη μορφή (φάσμα B), του CO-συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (φάσμα C), και της επανοξειδωμένης με O₂ μορφής (φάσμα D). Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm και ο χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 10-15 min.

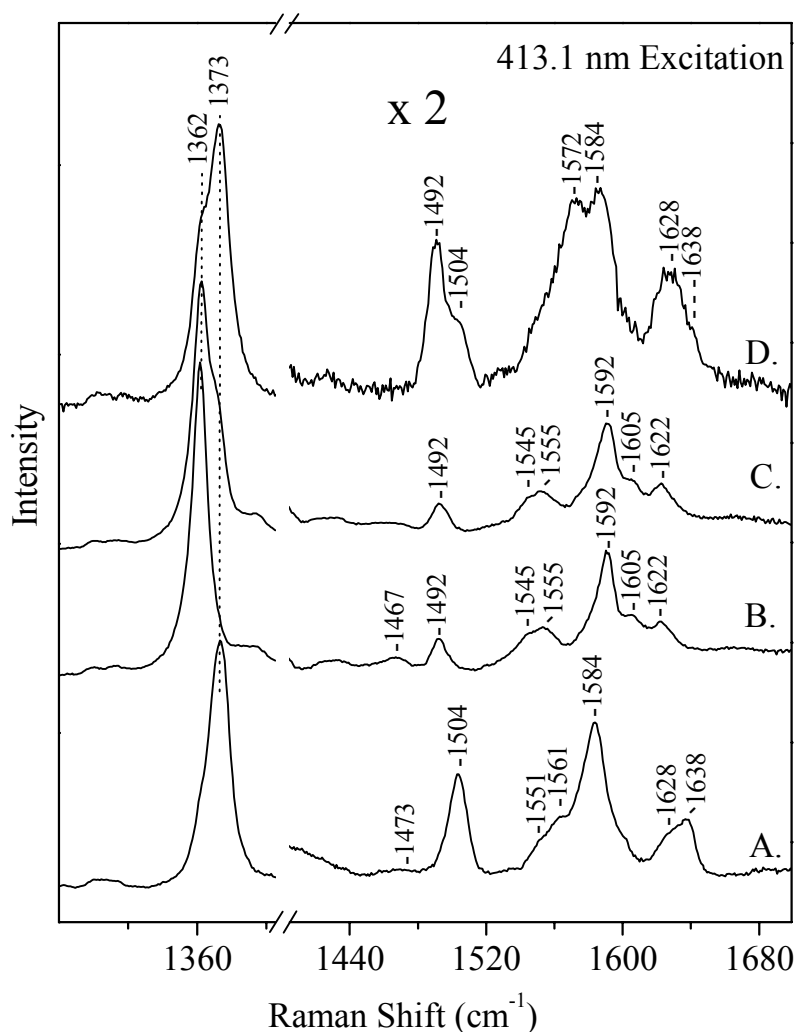
Τα φάσματα συντονισμού Raman της NOR στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων στην οξειδωμένη (φάσμα A) και την ανηγμένη της μορφή (φάσμα B), του πλήρως ανηγμένου CO-συμπλόκου (φάσμα C) και του επανοξειδωμένου με O₂ ενζύμου (φάσμα D) παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Το μήκος κύματος διέγερσης των 413.1 nm βρίσκεται σε συντονισμό με όλες τις αίμες, και συνεπώς όλες συνεισφέρουν στην ένταση του φάσματος. Η περιοχή των υψηλών συχνοτήτων (1200-1700 cm⁻¹) περιέχει δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου που

χαρακτηρίζουν την οξειδωτική κατάσταση (ν_4), τον αριθμό συναρμογής και την κατάσταση σπιν των αιμών (ν_3 , ν_2 , ν_{10}). Οι δονήσεις του οξειδωμένου ενζύμου στους 1373 (ν_4), 1492 (ν_3), 1578 (ν_2) και 1630 (ν_{10}) cm^{-1} είναι ενδεικτικές της υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 . Οι αίμες χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι b και c συνεισφέρουν στις δονήσεις στους 1505 (ν_3), 1584 (ν_2), 1639 (ν_{10}) και στους 1597 cm^{-1} (ν_{37}). Η αναγωγή όλων των αιμών του ενζύμου (φάσμα B) επιβεβαιώνεται από την μετατόπιση της ν_4 στους 1362 cm^{-1} . Οι δονήσεις της υψηλού σπιν αίμης και αριθμού συναρμογής πέντε ανηγμένης αίμης b_3 (αξονικός υποκαταστάτης η εγγύς ιστιδίνη) παρουσιάζονται στους 1472 (ν_3), 1560 (ν_2), και 1606 (ν_{10}). Η παρουσία των ανηγμένων αιμών χαμηλού σπιν b και c χαρακτηρίζεται από την δόνηση ν_3 στους 1494 cm^{-1} , ενώ η ν_2 εμφανίζεται στους 1584 και 1591 cm^{-1} , αντίστοιχα για την κάθε μία. Το φάσμα του CO-συμπλόκου της NOR (φάσμα C) κυριαρχείται από δονήσεις αιμών χαμηλής διαμόρφωσης και αριθμού συναρμογής έξι. Οι δονήσεις της b_3 μετατοπίζονται στους 1373, (ν_4), 1494 (ν_3), και στους 1630 cm^{-1} (ν_{10}), το CO δεσμεύεται στην αίμη b_3 σχηματίζοντας το σύμπλοκο χαμηλού σπιν His-Fe²⁺-CO. Η ν_2 συμπίπτει με άλλες δονήσεις όπως οι ν_{11} , ν_{37} και ν_{38} , συνεπώς η απόδοση της δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με τα παρόν δεδομένα (19), αλλά απαιτούνται πειράματα με διαφορετική πόλωση. Η προσθήκη O_2 στο CO-σύμπλοκο του ενζύμου (φάσμα D) προκαλεί την συνολική μετατόπιση της έντασης της ν_4 στους 1373 cm^{-1} δείχνοντας την οξείδωση του συνόλου των αιμών της NOR. Με εξαίρεση την μεγάλη ένταση των δονήσεων της υψηλού σπιν αίμης και αριθμού συναρμογής αίμης b_3 στους 1492 και 1572 cm^{-1} , το φάσμα είναι όμοιο με το φάσμα της μορφής που απομονώνεται το ένζυμο. Για να διαπιστωθεί αν ο δεσμός b_3 -O-Fe έχει επαναδημιουργηθεί καταγράψαμε το φάσμα συντονισμού στην περιοχή 700-900 cm^{-1} . Το ένθετο του σχήματος 2 απεικονίζει το φάσμα a, που αντιστοιχεί στο ένζυμο στην μορφή που απομονώνεται, ενώ το φάσμα b μετά την οξείδωση με το O_2 . Από την σύγκριση των δύο φασμάτων φαίνεται ότι οι 813 και 833 cm^{-1} δονήσεις που αντιστοιχούν στην όξο-γέφυρα δεν εμφανίζονται στα φάσμα b, γεγονός που προσδιορίζει την δομή της υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 σε His- b_3^{3+} . Ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η οξείδωση του ενζύμου δεν είναι γνωστός, ωστόσο πιθανή είναι η αντικατάσταση του CO από το οξυγόνο και η ακόλουθη, τεσσάρων ηλεκτρονίων, αναγωγή του προς H_2O με μεταφορά ηλεκτρονίων από τις αίμες b/c και τον μη-αιμικό σίδηρο. Οι δονήσεις των διαφορετικών καταστάσεων και συμπλόκων της NOR συνοψίζονται στον Πίνακα I και βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες φασμάτων συντονισμού ενζύμων με b και c αίμες, καθώς επίσης και μοντέλων πορφυρινών.

Πίνακας I

Συχνότητες (cm^{-1}) δονήσεων συντονισμού Raman στην NOR

Δόνηση	Οξειδωμένο		Ανηγμένο		αίμη b_3 -CO	Επανοξειδ. (O_2) αίμη b_3	Επανοξειδ. (NO) αίμη b_3
	5C/HS	6C/LS	5C/HS	6C/LS	6C/LS	5C/HS	6C/HS
ν_2	1578	1584	1560	1591	1584	1572	1565
ν_3	1492	1505	1472	1494	1494	1492	1484
ν_4	1373	1373	1362	1362	1373	1373	1373
ν_{10}	1630	1639	1606		1633	1630	
ν_{11}				1550			
ν_{37}		1597					
$\nu_{C=C}$			1624	1624	1624		

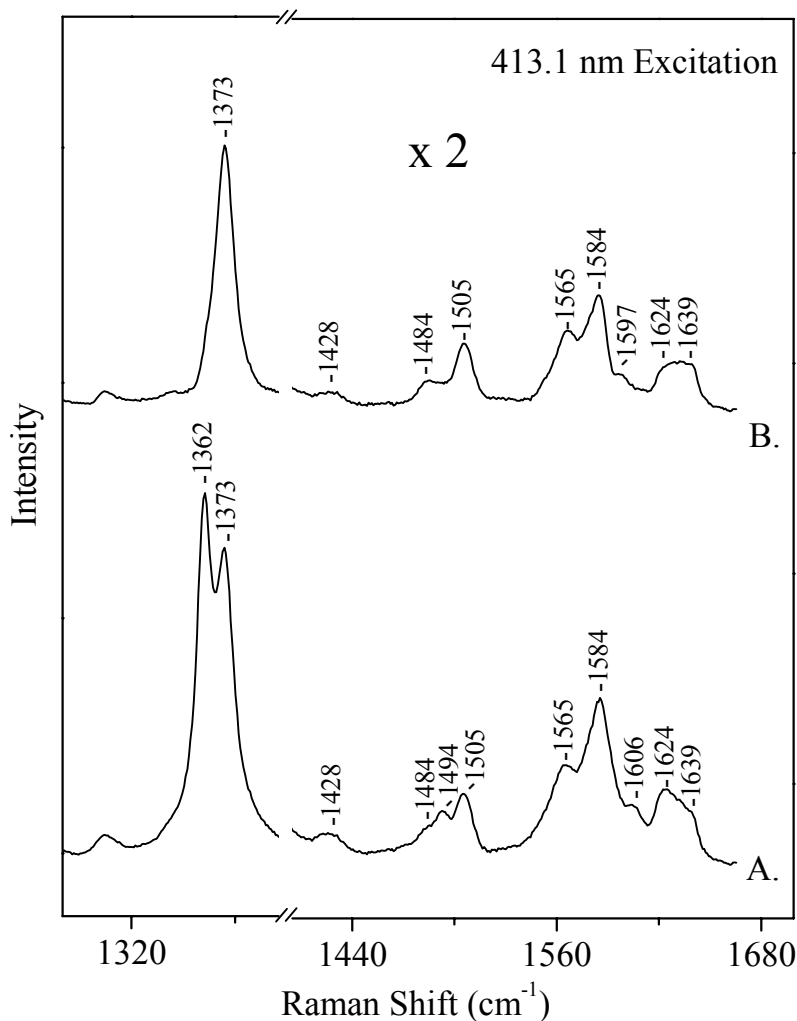


Σχήμα 3: Φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του κυτοχρώματος *cbb*₃ στην οξειδωμένη μορφή που απομονώνεται (φάσμα A), στην πλήρως ανηγμένη μορφή (φάσμα B), του CO-συμπλόκου του ανηγμένου ενζύμου (φάσμα C), και του προϊόντος της αντίδρασης μετά την μίξη του CO-συμπλόκου με οξυγόνο ώστε αυτό να αντικαταστήσει αυθόρμητα το CO. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm και ο χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 10-15 min.

Το Σχήμα 3 απεικονίζει την περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman της οξειδωμένης (φάσμα A) και της ανηγμένης μορφής (φάσμα B) του κυτοχρώματος *cbb*₃ του βακτηρίου *P. stutzeri*, καθώς επίσης του πλήρως ανηγμένου CO-συμπλόκου (φάσμα C), και του παραγόμενου προϊόντος από την αντίδραση του CO-συμπλόκου ενζύμου με το

O_2 (φάσμα D). Το μήκος κύματος διέγερσης 413.1 nm βρίσκεται και σε αυτή την περίπτωση σε συντονισμό με όλες τις αίμες. Το φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου εμφανίζει την ν_4 στους 1373 cm^{-1} , επιβεβαιώνοντας την Fe^{3+} οξειδωτική κατάσταση των αιμών, όπως και σε προηγούμενες μελέτες (20). Η ασθενής δόνηση στους 1437 cm^{-1} προέρχεται από την ν_3 και σε συνδιασμό με την ν_2 που παρουσιάζεται στους 1561 cm^{-1} και την ν_{10} στους 1628 cm^{-1} αποδεικνύει ότι η αίμη b_3 διαθέτει υψηλή διαμόρφωση σπιν και αριθμό συναρμογής έξι. Οι δονήσεις στους 1504 (ν_3), 1584 (ν_2), and 1638 (ν_{10}) cm^{-1} είναι χαρακτηριστικές των χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι αιμών τύπου b και c . Η δόνηση που παρουσιάζει την μεγαλύτερη ευαισθησία στην ηλεκτρονιακή κατάσταση του πορφυρινικού δακτυλίου (ν_4) στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα cbb_3 παρουσιάζεται στους 1362 cm^{-1} , πιστοποιώντας την αναγωγή του συνόλου των αιμών του ενζύμου. Η ν_3 στους 1467 cm^{-1} , η ν_2 στους 1555 cm^{-1} και η ν_{10} στους 1605 cm^{-1} χαρακτηρίζουν την παρουσία της ανηγμένης υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε αίμης b_3 . Οι ανηγμένες αίμες χαμηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι b και c συνεισφέρουν στην ένταση των ν_3 στους 1492 cm^{-1} , ν_2 στους 1592 cm^{-1} και ν_{10} στους 1622 cm^{-1} . Η δόνηση στους 1605 cm^{-1} αποδίδεται στην ν_{37} των χαμηλού σπιν αιμών b και c . Η ν_{11} παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στην φύση των αξονικών υποκαταστατών και στην γεωμετρία του δακτυλίου της αίμης (19). Οι δονήσεις που παρουσιάζονται στους 1545 και 1555 cm^{-1} οφείλονται στην ν_{11} των αιμών c και b , αντίστοιχα. Η ομοιότητα της συχνότητας της ν_{11} της αίμης χαμηλού σπιν b του κυτοχρώματος bo_3 με αυτή του κυτοχρώματος cbb_3 αποτελεί ένδειξη της ταυτόσημης αξονικής υποκατάσταση (His-Fe-His) καθώς και της γεωμετρίας της αίμης (15). Επιπλέον, η ν_{11} μπορεί να αξιοποιηθεί ως χαρακτηριστική δόνηση της ανηγμένης χαμηλού σπιν αίμης b , εφόσον σε αυτήν την περιοχή του φάσματος η αλληλεπικάλυψη δονήσεων μικρού εύρους δεν είναι τόσο έντονη. Η σύγκριση της ν_{11} της αίμης c με τις αντίστοιχες που έχουν καταγραφεί για κυτοχρώματα που περιέχουν αίμες c αποδεικνύει σημαντικά χαμηλότερη τιμή στην περίπτωση του cbb_3 . Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην διατάραξη της ρομβικής γεωμετρίας που συνήθως υιοθετείται από His-Fe-Met αίμες c ή στην ύπαρξη ενός τουλάχιστον διαφορετικού αξονικού υποκαταστάτη στο κυτόχρωμα cbb_3 . Η έκθεση του ανηγμένου κυτοχρώματος cbb_3 σε 1 atm CO (φάσμα C) προκαλεί την μετάβαση της αίμης b_3 από υψηλή σε χαμηλή διαμόρφωση σπιν. Ο σχηματισμός του συμπλόκου b_3^{2+} -CO είναι εμφανής από τις μετατοπίσεις των ν_4 από τους 1360 στους 1373 cm^{-1} και ν_3 από τους 1467 στους 1492 cm^{-1} . Η προσθήκη O_2 στο CO-σύμπλοκο του κυτοχρώματος cbb_3 (φάσμα D) προκαλεί σημαντικές μεταβολές στο φάσμα συντονισμού Raman του ενζύμου, που

πραγματοποιούνται σε χρόνο λίγων λεπτών. Η ν_3 στους 1492 και η ν_2 στους 1572 cm^{-1} αποδεικνύουν την συναρμογή του O₂ στην αίμη *b*₃ και την επακόλουθη οξείδωσή της. Η παρουσία των δονήσεων στους 1504 cm^{-1} (ν_3), 1584 cm^{-1} (ν_3) και 1638 cm^{-1} (ν_3) δηλώνουν οξείδωση των αιμών χαμηλού σπιν *b* και *c*, αν και αυτή δεν είναι πλήρης, όπως φαίνεται από την ένταση της ν_4 στους 1362 cm^{-1} . Οι συχνότητες των παραπάνω δονήσεων συνοψίζονται στον Πίνακα II.



Σχήμα 4: Φάσμα συντονισμού Raman στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων της αντίδρασης της πλήρως ανηγμένης NOR με το μονοξείδιο του αζώτου. Το φάσμα καταγράφηκε αμέσως μετά την προσθήκη αερίου NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο. Το φάσμα B αντιστοιχεί στην αφαίρεση ενός ποσοστού ανηγμένου ενζύμου (φάσμα B του Σχήματος 2) από το φάσμα A. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm και ο συνολικός χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 10 min.

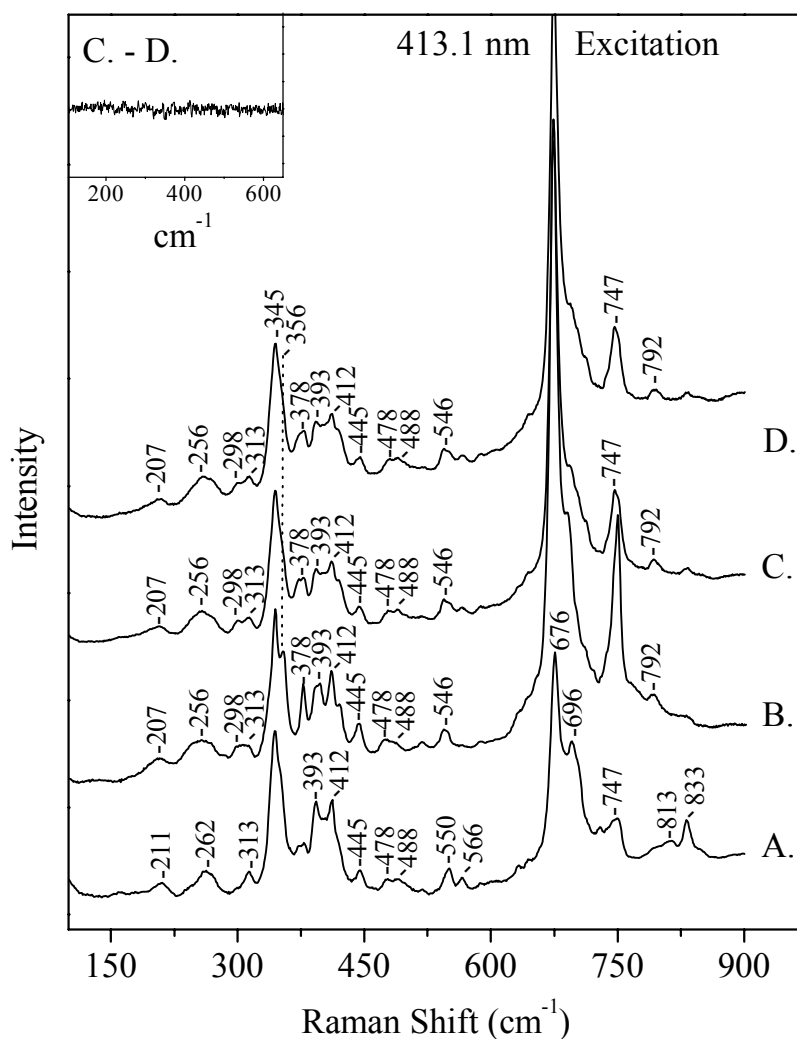
Πίνακας II

Συχνότητες (cm^{-1}) δονήσεων συντονισμού Raman στην κυτοχρωμική οξειδάση cbh_3

Δόνηση	Οξειδωμένο		Ανηγμένο		αίμη b_3 -CO	Επαναοξειδωμένη (O_2) αίμη b_3
	6C/HS	6C/LS	5C/HS	6C/LS	6C/LS	5C/HS
ν_2	1561	1584	1555	1592	1592	1572
ν_3	1473	1504	1467	1492	1492	1492
ν_4	1373	1373	1362	1362	1373	1373
ν_{10}	1628	1638	1606	1622	1622	1628
ν_{11}	1551		1545			
ν_{37}		1597				
$\nu_{C=C}$			1622			

Το Σχήμα 4 απεικονίζει το φάσμα συντονισμού Raman της αναγωγής του μονοξειδίου του αζώτου μετά την έκθεση του ανηγμένου ενζύμου σε αέριο NO. Η σύγκριση του παραπάνω φάσματος με το φάσμα του πλήρως ανηγμένου ενζύμου (φάσμα B, Σχήμα 2) αποκαλύπτει αρκετές διαφορές. Το φάσμα μετά την προσθήκη NO παρουσιάζει διπλή ν_4 στους 1362 και 1373 cm^{-1} , και την ν_3 στους 1484, 1494, και 1505 cm^{-1} , αλλά και δύο ν_{10} στους 1624 και 1639 cm^{-1} . Οι δονήσεις αυτές φανερώνουν την παρουσία μείγματος της αίμης b_3^{3+} και αιμών $b^{3+/2+}$ και $c^{3+/2+}$. Το φάσμα B προκύπτει από την αφαίρεση από το φάσμα A ενός ποσοστού του ανηγμένου ενζύμου, ώστε να αφαιρεθούν οι δονήσεις των ανηγμένων αιμών χωρίς ωστόσο να προκύψουν αρνητικές κορυφές (φάσμα B, Σχήμα 4). Στο φάσμα B είναι ξεκάθαρα τα στοιχεία που δείχνουν αριθμό συναρμογής έξι. Συγκεκριμένα, οι δονήσεις στους 1484 (ν_3), 1565 (ν_2), και 1624 cm^{-1} (ν_{10}) χαρακτηρίζουν την παρουσία ενός συμπλόκου Fe^{3+} υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής έξι. Οι δονήσεις στους 1505 (ν_3), 1584 (ν_2), και 1639 cm^{-1} (ν_{10}) οφείλονται σε αίμες χαμηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής έξι.

Οι κορυφές στο φάσμα συντονισμού Raman στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων, 200-800 cm^{-1} , προέρχονται από τις δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου, αλλά και από τις κινήσεις Fe-υποκαταστάτη ως προς τον άξονα της αίμης (17, 18, 23). Τα δεδομένα από την περιοχή των υψηλών συχνοτήτων του φάσματος συντονισμού Raman περιείχαν ενδείξεις για τον σχηματισμό ενός νέου συμπλόκου, το οποίο θα μπορούσε να είναι και NO-παράγωγο της αίμης b_3 , και για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων. Το Σχήμα 5 απεικονίζει το φάσμα του οξειδωμένου (φάσμα A), ανηγμένου (φάσμα B), και των προϊόντων της αντίδρασης του ανηγμένου ενζύμου με ^{14}NO (φάσμα C) και ^{15}NO (φάσμα D). Η έκθεση του ανηγμένου ενζύμου στο NO προκαλεί μικρές αλλά σημαντικές αλλαγές. Συγκεκριμένα τα φάσματα C και D παρουσιάζουν μεταβολές στις δονήσεις στους 356 και 393 cm^{-1} . Τα NO-συμπλοκα τόσο στην οξειδωμένη όσο και την ανηγμένη μορφή αιμοπρωτεϊνών παρουσιάζουν τις δονήσεις της ομάδας Fe-N-O στην περιοχή 400-600 cm^{-1} (56-62). Η απουσία θετικής/αρνητικής κορυφής στο φάσμα διαφοράς C-D, το οποίο απεικονίζεται στο ένθετο του σχήματος 5, αποδεικνύει ότι οι μεταβολές που παρουσιάζονται στο φάσμα του ενζύμου ως αποτέλεσμα της προσθήκης NO δεν οφείλονται σε σύμπλοκο της αίμης b_3 με το NO.



Σχήμα 5: Φάσματα συντονισμού Raman στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων της NOR στην μορφή που απομονώνεται (φάσμα A), την ανηγμένη μορφή (φάσμα B), και των προϊόντων της αντίδρασης του ανηγμένου ενζύμου με ¹⁴NO (φάσμα C) και ¹⁵NO (φάσμα D). Στο ένθετο απεικονίζεται η αφαίρεση των φασμάτων C-D. Το μήκος κύματος διέγερσης ήταν 413.1 nm και ο συνολικός χρόνος καταγραφής κάθε φάσματος 10 min.

Συζήτηση

Η αντίδραση του ανηγμένου κυτοχρώματος *cbh*₃/O₂

Διαφορετικές φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί στην μελέτη του αρχικού όξυ συμπλόκου στην αντίδραση της πλήρως ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης, το οποίο είναι όμοιο με τα όξυ σύμπλοκα της αιμογλοβίνης και μυογλοβίνης (1, 10, 25, 28). Τα

περισσότερα από τα ενδιάμεσα της αντίδρασης κυτοχρωμικής οξειδάσης/O₂ έχουν χαρακτηριστεί αναλυτικά (10, 25, 28, 31). Η διαφωνία εμφανίζεται σε ένα από τα κρίσιμα σημεία του κύκλου, στον μηχανισμό διάσπασης του δεσμού O-O στο κέντρο *a*₃/Cu_B και στον χρόνο που αυτή πραγματοποιείται (34). Ένας μηχανισμός που έχει προταθεί για την διάσπαση του δεσμού O-O περιλαμβάνει την ταυτόχρονη μεταφορά ηλεκτρονίου/πρωτονίου από την ομοιοπολικά δεσμευμένη τυροσίνη 280, Y280-H276, προς τον σχηματισμό του οξοφερύλ συμπλόκου της αίμης *a*₃, του Cu_B²⁺-OH και ρίζας τυροσίνης. Υπάρχει συμφωνία ως προς τον χαρακτηρισμό των επόμενων ενδιάμεσων στην πορεία του καταλυτικού κύκλου, και το υδρόξυ τελικό ενδιάμεσο μεταβαίνει στην μετακαταλυτική μορφή του ενζύμου (pulsed) και τελικά στην μορφή στην οποία απομονώνεται το ένζυμο (34). Το σύμπλοκο που ανιχνεύσαμε στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το τελικό προϊόν πολλαπλών καταλυτικών κύκλων και από τα δεδομένα των φασμάτων συντονισμού Raman μπορούμε να συμπεράνουμε ότι πρόκειται για μορφή υψηλής διαμόρφωσης σπιν της αίμης *b*₃. Είναι προφανές ότι το τελικό προϊόν που ανιχνεύσαμε είναι διαφορετικό από την οξειδωμένη μορφή στην οποία απομονώνεται το κυτόχρωμα *cbb*₃. Για παράδειγμα, η ν_2 εμφανίζεται σε συχνότητα υψηλότερη κατά $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$ σε σχέση με την οξειδωμένη μορφή που απομονώνεται το ένζυμο. Η παρατήρηση αυτή σε συνδιασμό με την αύξηση της έντασης της ν_3 στους 1492 cm^{-1} δείχνει ότι η μορφή του ενζύμου που ανιχνεύουμε δεν είναι ταυτόσημη με την μορφή που απομονώνεται το ένζυμο, αλλά μεταβαίνει σε αυτή σε μεταγενέστερο χρόνο. Η μετάβαση αυτή περιλαμβάνει αλλαγή της διαμόρφωσης της υψηλού σπιν αίμης *b*₃. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν αναφερθεί για την αντίστοιχη αντίδραση του κυτοχρώματος *aa*₃ με το O₂ (25). Στο πείραμα αυτό αποδείχθηκε ότι η υψηλής διαμόρφωσης αίμη *a*₃ αμέσως μετά τον καταλυτικό κύκλο είναι διαφορετική από την μορφή που απομονώνεται το ένζυμο, και ιφίσταται μετατροπή διαμόρφωσης για να επανέλθει στην μορφή αυτή. Η ανίχνευση ενός ποσοστού ανηγμένου κυτοχρώματος *c* στο προϊόν της αντίδρασης του κυτοχρώματος *cbb*₃ με το O₂ δεν δημιουργεί έκπληξη, εφόσον το ένζυμο στην πλήρως ανηγμένη μορφή του περιέχει έξι ηλεκτρόνια, όταν απαιτούνται τέσσερα για την μετατροπή του οξυγόνου σε νερό. Σαν αποτέλεσμα η αναγωγή του οξυγόνου από το κυτόχρωμα *cbb*₃ μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς το ένζυμο να χρησιμοποιήσει τα ηλεκτρόνια που είναι διαθέσιμα σε όλα τα μεταλλικά του κέντρα. Στην περίπτωση των κυτοχρωμάτων *aa*₃ των θηλαστικών και *bo*₃ του *E. coli* έχει προταθεί ότι υπάρχουν διαθέσιμα έξτρα αναγωγικά ισοδύναμα από πηγές διαφορετικές των τεσσάρων και τριών μεταλλικών κέντρων, αντίστοιχα (11,15).

Στον προτεινόμενο μηχανισμό για το κυτόχρωμα aa_3 των θηλαστικών, που περιλαμβάνει την ρίζα τυροσίνης, η μοριακή δομή δύο ενδιάμεσων είναι το κλειδί στην άντληση πρωτονίων (10). Στον μηχανισμό αυτό η φασματοσκοπική ανίχνευση του Fe-O₂ όξυ ενδιάμεσου ακολουθείται από την μεταφορά ηλεκτρονίου από τον Cu_B¹⁺ για τον σχηματισμό ενός περόξυ ενδιάμεσου, που όμως δεν φτάνει ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις διότι αποσπά άμεσα ένα άτομο υδρογόνου από την γειτονική τυροσίνη 280 και ο δεσμός O-O διασπάται. Η απουσία της προαναφερόμενης τυροσίνης από το κυτόχρωμα cbb_3 και κατά συνέπεια πιθανώς και του μηχανισμού της γρήγορης απόσπασης υδρογόνου, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι το περόξυ b^{3+} Fe-O-O ενδιάμεσο μπορεί να διαθέτει σημαντική συγκέντρωση στην αντίδραση cbb_3/O_2 . Συνεπώς η αντίδραση cbb_3/O_2 μπορεί να προσφέρει την μοναδική δυνατότητα για την πλήρη διελεύκανση του μηχανισμού διάσπασης του δεσμού O-O από τις τελικές οξειδάσεις. Επιπλέον, τα ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου είναι πιθανόν να ακολουθούν διαφορετική κινητική. Πειράματα για την προαναφερόμενη αντίδραση βρίσκονται σε εξέλιξη. Από τα δεμένα, όμως της παρούσας εργασίας είναι ξεκάθαρο ότι παρά την απουσία της υδροξυαιθυλ-φαρνεσυλ πλευρικής αλυσίδας της αίμης και της υψηλά διατηρημένης στην οικογένεια των αιμοχαλκοξειδασών τυροσίνης 280, το κυτόχρωμα cbb_3 καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Η κινητική των δονήσεων στο φάσμα Raman της αντίδρασης του κυτοχρώματος cbb_3 με το O_2 που σχετίζονται με τον σχηματισμό διαφορετικών ενδιάμεσων δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί, ωστόσο το ένζυμο ανάγει το O_2 σε H_2O , και εφόσον απουσιάζει η Y280, χωρίς την συμμετοχή της.

Η αντίδραση ανηγμένης NOR/ O_2

Η αρχική δέσμευση του οξυγόνου στο διπυρηνικό κέντρο αιμικού/μη-αιμικού σιδήρου στην NOR ακολουθείται από την αναγωγή του υποστρώματος για τον σχηματισμό του τελικού υδρόξυ συμπλόκου της αίμης b_3 (28, 31, 34). Στην συνέχεια πραγματοποιείται μεταβολή της διαμόρφωσης του ενεργού κέντρου, το υδρόξυ ενδιάμεσο εξισσοροπεί με νερό, όπως στην περίπτωση της αντίδρασης του cbb_3/O_2 , ενώ τελικά αποδεσμεύεται από την αίμη b_3 και πιθανώς προσδένεται στον μη-αιμικό σίδηρο, με αποτέλεσμα να ανιχνεύουμε το σύμπλοκο υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε της αίμης b_3 . Προτείνουμε ότι ο σχηματισμός του δεσμού b_3 -O-Fe πραγματοποιείται στο τελικό προϊόν που ανιχνεύσαμε και προκαλεί την διάσπαση του δεσμού Fe-His της αίμης b_3 , με αποτέλεσμα την αναγέννηση της ανοικτής και κλειστής διαμόρφωσης του ενζύμου, στην

οποία η αίμη b_3 είναι υψηλής διαμόρφωσης και αριθμού συναρμογής πέντε χωρίς την δέσμευση της εγγύς ιστιδίνης αλλά σχηματίζοντας το $b_3-O(H)-Fe$. Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες πολλαπλών οξειδοαναγωγικών κύκλων με O_2 , που κατέληξαν στον επανασχηματισμό του διπυρηνικού κέντρου του ενζύμου στην μορφή που απομονώνεται b_3-O-Fe_B (52, 53).

Τα τελικά προϊόντα των αντιδράσεων των cbb_3/O_2 και NOR/O_2 , όπως παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία, μέσω της αυθόρμητης αντικατάστασης του CO από το O_2 , δείχνουν την δομική ομοιότητα ανάμεσα στα δύο ένζυμα ως προς την αίμη b_3 . Κατά συνέπεια, η παρουσία του μη-αιμικού σιδήρου δεν επηρεάζει τα τελικά στάδια της αντίδρασης με το οξυγόνο, αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί διαφορετική κινητική συμπεριφορά στα αρχικά στάδια μετατροπής του όξυ $Fe-O_2$ ενδιαμέσου και την ακόλουθη οξείδωση των αιμών χαμηλού σπιν b και c , καθώς και του μη-αιμικού σιδήρου στην NOR. Λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές στην μορφή που απομονώνονται τα δύο ένζυμα μπορούμε να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι ιφίστανται δομικές διαφορές στα ενεργά κέντρα αίμης b_3-Cu_B (cbb_3) και αίμης b_3-Fe (NOR), των οποίων η διελεύκανση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της λεπτομερής καταγραφής των μεταβολών που πραγματοποιούνται από την μετάβαση από την μετακαταλυτική μορφή στην μορφή που απομονώνονται τα ένζυμα. Στον μηχανισμό που αναπτύξαμε για να περιγράψουμε την μετάβαση από την οξειδωμένη στην ανηγμένη κατάσταση της NOR (κεφ. 8) αλλά και από την οξειδωμένη μορφή στο NO-σύμπλοκο και το φωτοπροϊόν του (κεφ. 9) αναδείχθηκε ως βασικό στοιχείο η επικοινωνία ανάμεσα στην εγγύ και μακρινή θέση της αίμης μέσω της δικτύου δεσμών (53). Όμοιες μεταβολές διαμόρφωσης φαίνεται να εμπλέκονται και την μετάβαση από την μετακαταλυτική μορφή στην μορφή που απομονώνεται η NOR. Ο σχηματισμός του δεσμού b_3-O-Fe_B συνδέεται με την διάσπαση του δεσμού της εγγύς ιστιδίνης με την αίμη b_3 .

Στην πλειοψηφία των ενζύμων που μεταβολίζουν το μοριακό οξυγόνο η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, η πρωτονίωση είναι ταχεία και τοξικά ενδιάμεσα δεν παρουσιάζουν σημαντική συγκέντρωση (32). Στην περίπτωση των τελικών οξειδασών η πρωτονίωση παρουσιάζεται να ελέγχει την αντίδραση, η ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων μειώνεται σταδιακά κατά την πορεία της αντίδρασης, ενώ υπάρχει ισχυρή σύξευξη ανάμεσα στην οξειδοαναγωγική διαδικασία και την άντληση πρωτονίων από το ένζυμο κατά μήκος της μεμβράνης. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αύξηση της συγκέντρωσης μερικώς ανηγμένων ενδιαμέσων οξυγόνου σε σημαντικά επίπεδα που επιτρέπουν την ανίχνευση τους με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η αναγωγή

του μονοξειδίου του αζώτου δεν παρουσιάζει δράση αντλίας πρωτονίων (49, 50). Εμφανίζει όμως δραστικότητα στην αναγωγή του O₂ σε H₂O, με την διοχέτευση στο οξυγόνο των τεσσάρων ηλεκτρονίων από τα αντίστοιχα τέσσερα μεταλλικά της κέντρα (49). Παραμένει προς διευκρίνιση το κατά πόσο τα ενδιάμεσα που σχηματίζονται διαθέτουν ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση ανηγμένης NOR/NO

Η δονητική φασματοσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων Fe³⁺-NO και Fe²⁺-NO που σχηματίζονται κατά την αντίδραση του NO με αιμοπρωτεΐνες αλλά και πρωτεΐνες με μη-αιμικό σίδηρο (56-62). Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του NO με αιμοπρωτεΐνες είναι απαραίτητη για την διελεύκανση της *in vivo* χημείας του NO και σε πιο βαθμό η αντίδραση με αιμικό ή/και μη-αιμικό σίδηρο κυριαρχείται από χαρακτήρα ρίζας ή βάσεως Lewis.

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης ανηγμένης NOR/NO δεν μετατρέπεται άμεσα στην οξειδωμένη μορφή που απομονώνεται το ένζυμο, καθώς 20 min μετά την αντίδραση υπάρχει σημαντικό ποσοστό του υψηλού σπιν και αριθμού συναρμογής έξι συμπλόκου. Το τελικό προϊόν μετατρέπεται σε μια μορφή οξειδωμένου ενζύμου και στην συνέχεια στην μορφή στην οποία αυτό απομονώνεται. Τόσο στην αντίδραση NOR/NO όσο και NOR/O₂ απελευθερώνεται H₂O, και στην πρώτη περίπτωση το άτομο O του H₂O δεσμεύεται στον σίδηρο της αίμης *b*₃ προς τον σχηματισμό της μορφής στην οποία απομονώνεται το ένζυμο, ενώ στην δεύτερη περίπτωση το άτομο O δεσμεύεται στον μη-αιμικό σίδηρο και πάλι προς τον σχηματισμό της μορφής στην οποία απομονώνεται η NOR. Και στις δύο περιπτώσεις οι δομικές αλλαγές από την συναρμογή του μορίου H₂O στην μακρινή κοιλότητα της ενεργής θέσης επιφέρουν μέσω του κορμού της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, μεταβολές στην εγγύ θέση της αίμης *b*₃, με αποτέλεσμα την διάσπαση του δεσμού His-Fe της αίμης *b*₃.

Ο μοριακός μηχανισμός της αναγωγής του NO από την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου δεν έχει διελευκανθεί ακόμα λόγω της δυσκολίας να συλλεχθούν πληροφορίες για την κατάσταση του NO στα διάφορα ενδιάμεσα που σχηματίζονται κατά τον καταλυτικό κύκλο. Στο παρελθόν η μεγαλύτερη προσπάθεια συλλογής αυτών των πληροφοριών πραγματοποιήθηκε με την χρήση της φασματοσκοπίας ορατού και EPR (48, 50-52). Στο ένα μοντέλο που προτάθηκε από τον de Vries και τους συνεργάτες του με βάση κινητικές μελέτες ορατού, η αντίδραση αρχίζει όταν το διπυρηνικό κέντρο βρίσκεται στην πλήρως ανηγμένη

κατάσταση και ένα μόριο NO δεσμεύεται στο κάθε μεταλλικό κέντρο (48, 51, 52). Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η δέσμευση του NO προκαλεί την διάσπαση του δεσμού His-Fe της αίμης b_3 . Ο διμερισμός των δύο μορίων NO και η ακόλουθη αναγωγή τους σε N_2O πραγματοποιείται με την διοχέτευση των ηλεκτρονίων από τα δύο μέταλλα. Το παραγόμενο N_2O απομακρύνεται αφήνοντας την αίμη b_3 στην οξειδωμένη μορφή και συνδεδεμένη με τον μη-αιμικό σίδηρο μέσω της όξο γέφυρας και απουσία του δεσμού His-Fe. Το εναλλακτικό μοντέλο που προτάθηκε από τον Watmough και τους συνεργάτες του (54) περιλαμβάνει την ύπαρξη του διπυρηνικού κέντρου σε κατάσταση μικτού σθένους (αίμη b_3^{3+} /μη-αιμικός Fe^{2+}), και δύο μόρια NO δεσμεύονται διαδοχικά στον μη-αιμικό σίδηρο στον οποίο πραγματοποιείται η αναγωγή, αφήνοντας την αίμη b_3 ως απλό θεατή στον καταλυτικό κύκλο. Επίσης σύμφωνα με EPR μετρήσεις προτάθηκε από την ομάδα Saraste ότι το δεσμευμένο NO αποκτά χαρακτήρα ανιόντος NO^- , και ο διμερισμός δύο τέτοιων ανιόντων με επακόλουθη αντίδραση πρωτονίωσης απελευθερώνει N_2O και H_2O (50). Μόνο το NO^- μπορεί να απόδεσμευτεί από την αίμη, ώστε το NO να παγιδεύεται σε αυτή μετά την κατανάλωση των αναγωγικών ισοδύναμων. Το αποτέλεσμα είναι το διπυρηνικό κέντρο να μην οξειδώνεται πλήρως στον καταλυτικό κύκλο.

Η εξέταση του προϊόντος της αντίδρασης ανηγμένης NOR/NO οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αίμη b_3 είναι αριθμού συναρμογής έξι. Σημανικές μεταβολές θα καταγράφονταν στα φάσματα συντονισμού Raman στην περίπτωση που ο δεσμός της αίμης b_3 με την εγγύ ιστιδίνη θα είχε διασπαστεί. Ομοίως σημαντικές μεταβολές θα καταγράφονταν και στα φάσματα ορατού, εφόσον σε άλλες μελέτες αιμών b -τύπου στις οποίες διασπάται ο δεσμός His-Fe η Soret μετάβαση μετατοπίζεται από ~420 nm σε ~390 nm κατά την μετατροπή της αίμης αριθμού έξι συναρμογής σε αριθμού συναρμογής πέντε με την απομάκρυνση της ιστιδίνης. Το συμπέρασμα της παρούσας μελέτης είναι ότι ο σχηματισμός του δεσμού N-N πραγματοποιείται με συναρμοσμένη την ιστιδίνη στην αίμη b_3 . Επιπλέον, τόσο τα φάσματα ορατού της αντίδρασης της ανηγμένης αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου με το NO όσο και τα αντίστοιχα φάσματα συντονισμού Raman, αποδεικνύουν ότι η αίμη b_3 οξειδώνεται. Κατά συνέπεια οι προτάσεις ότι α) ο σχηματισμός του δεσμού N-N πραγματοποιείται με διασπασμένο τον δεσμό της αίμης b_3 με την εγγύ ιστιδίνη, β) το διπυρηνικό κέντρο δεν οξειδώνεται κατά τον καταλυτικό κύκλο και γ) δύο μόρια NO προσδένονται στον μη-αιμικό σίδηρο αφήνοντας ανεπηρέαστη την αίμη b_3 , δεν βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας.

Ένα από τα σημαντικότερα θέματα στην αναγωγή του NO σε N_2O είναι ο σχηματισμός του δεσμού N-N κατά τον οποίο είναι δυνατόν να δημιουργηθούν τοξικά ενδιάμεσα που να διαχυθούν και να προκαλέσουν αντίδρασης νίτρωσης. Δεν έχουν αναφερθεί ως σήμερα πειραματικά δεδομένα τα οποία να επιβεβαιώνουν την δέσμευση δύο μορίων NO στα μέταλλα του διπυρηνικού κέντρου, ώστε να πραγματοποιηθεί ο διμερισμός και η επακόλουθη απελευθέρωση N_2O . Αντίθετα, έχουμε αποδείξει ότι το NO δεσμεύεται στην οξειδωμένη μορφή της αίμης b_3 , δίνοντας Fe^{3+} -NO (κεφ. 9, 53). Πρόσφατα, προτείναμε ότι αν η φυσιολογική ενεργοποίηση του NO από την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου πραγματοποιείται από μικτού σθένους ενζύμου, τότε η προσθήκη δύο ηλεκτρονίων στο Fe^{3+} -NO οδηγεί στον σχηματισμό Fe^{2+} -N=O⁻, το οποίο με προσθήκη ενός δεύτερου μορίου NO παράγει το N_2O . Το χαμηλό δυναμικό της αίμης (E_m , pH 7.6 = +60 mV) αποτελεί ένα υψηλό θερμοδυναμικό φράγμα στην αναγωγή της από την μεταφορά ηλεκτρονίων από τις αίμες χαμηλού σπιν c και b (E_m , pH 7.6 = +310mV και E_m , pH 7.6 = +345mV, αντίστοιχα), ή από τον μη-αιμικό σίδηρο (E_m , pH 7.6 = +320mV), εμποδίζοντας τον σχηματισμό του συμπλόκου b_3^{2+} -NO σε σημαντικές συγκεντρώσεις. Τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν ότι το σύμπλοκο b_3^{2+} -NO δεν παρουσιάζει σημαντικό πληθυσμό και ακόμα και αν υποθέσουμε ότι η ενεργοποίηση του NO από την NOR πραγματοποιείται από το πλήρως ανηγμένο ένζυμο, η αναγωγή σε N_2O λαμβάνει χώρα με την εγγύ ιστιδίνη δεσμευμένη στο άτομο σιδήρου της αίμης b_3 .

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των δεδομένων της παρούσας εργασίας με τα αντίστοιχα του κυτοχρώματος cbb_3 (κεφ. 10, 38), το οποίο παρουσιάζει σημαντικό ποσοστό ομολογίας με την NOR. Το σύμπλοκο της αίμης b_3^{2+} -NO στο cbb_3 , εμφανίζει τις δονήσεις τάσης NO και Fe-NO στους 1679 και 524 cm^{-1} , αντίστοιχα. Οι συχνότητες αυτές δείχνουν ότι η προσθήκη του NO στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο προκαλεί την διάσπαση του δεσμού His-Fe της αίμης b_3 με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλόκου b_3^{2+} -NO με αριθμό συναρμογής πέντε. Ο χαρακτηρισμός του προαναφερόμενου NO συμπλόκου δηλώνει ότι το ένζυμο παγιδεύεται στο σύμπλοκο αυτό, λόγω της πολύ αργής αποδέσμευσης του NO από την αίμη. Οι ίδιες πειραματικές συνθήκες εφαρμόστηκαν και στην περίπτωση της αντίδρασης της πλήρως ανηγμένης NOR με το NO, χωρίς όμως να παράγεται το αντίστοιχο σύμπλοκο της αίμης b_3 με το NO, αριθμού συναρμογής πέντε ή οποιοδήποτε άλλο NO-σύμπλοκο σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις. Αντίθετα, το τελικό προϊόν της αντίδρασης NOR/NO είναι ένα σύμπλοκο υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής έξι, στο οποίο κανένας υποκαταστάτης δεν είναι το NO. Επιπλέον πειράματα πάνω στην δέσμευση του NO στην

μικτού σθένους NOR αλλά και στο κυτόχρωμα *cbb*₃ θα καθορίσουν την προέλευση των διαφορετικών προϊόντων στις αντιδράσεις των ενζύμων με το NO, ώστε τελικά να διαμορφωθεί ένας ολοκληρωμένος μηχανισμός για την αλληλεπίδραση του υποστρώματος με τα δύο ένζυμα υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Σημαντική πρόοδος σημειώθηκε τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση σε μοριακό επίπεδο των ομοιοτήτων ανάμεσα στις αιμοχαλκοξειδάσες και το μακρινό μέλος της ευρύτερης οικογενείας τους, την αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου. Ο καθορισμός της μοριακής βάσης των πολύπλοκων μηχανισμών των αντιδράσεων αναγωγής του μοριακού οξυγόνου και του μονοξειδίου του αζώτου, προαπαιτεί τον χαρακτηρισμό των δομικών και κινητικών ιδιοτήτων των ενδιάμεσων της καταλυτικής αντίδρασης των ενζύμων. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία συντονισμού Raman για τον χαρακτηρισμό των ενεργών κέντρων του κυτοχρώματος *cbb*₃ και της βακτηριακής NOR. Οι μετρήσεις μας αποδεικνύουν ότι η αναγωγή του οξυγόνου σε H₂O στην περίπτωση και των δύο ενζύμων καταλήγει στον σχηματισμό αίμης υψηλής διαμόρφωσης σπιν και αριθμού συναρμογής πέντε *b*₃. Ακολουθεί στην NOR η επαναδημιουργία του δεσμού *b*₃-O-Fe και η ταυτόχρονη διάσπαση του δεσμού His-Fe της αίμης *b*₃ προς των σχηματισμό της ανοικτής και κλειστής διαμόρφωσης που διαθέτει το ένζυμο στην μορφή που απομονώνεται. Στην αντίδραση της αναγωγής του NO από την NOR η χημεία πραγματοποιείται με την εγγύ ιστιδίνη δεσμευμένη στην αίμη *b*₃, η οποία στο τελικό προϊόν οξειδώνεται και σχηματίζει σύμπλοκο υψηλής διαμόρφωσης σπιν με αριθμό συναρμογής έξι, όπου ο έκτος υποκαταστάτης είναι πιθανόν ένα μόριο νερού. Η διαθεσιμότητα πρωτονίων στο ενεργό κέντρο αποτελεί επίσης ένα θέμα το οποίο μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην βιολογική λειτουργία του ενζύμου, όπως η πρωτονίωση ενδιάμεσων NO κατά την αναγωγή του. Παρά το γεγονός, ότι δεν έχουν χαρακτηριστεί τα ενδιάμεσα μεταβατικά σύμπλοκα της χημείας οξυγόνου και μονοξειδίου του αζώτου, όπως πραγματοποιείται στα ενζυμικά συστήματα, φαίνεται ότι η αιμοπρωτεΐνες με ενεργά κέντρα σιδήρου/χαλκού και αιμικού σιδήρου/μη-αιμικού σιδήρου θα παρουσιάσουν κοινά στοιχεία.

Βιβλιογραφία

1. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
2. Gennis, R. B. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 241-248.
3. Michel, H. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12819-12824.
4. Michel, H., Behr, J. Harrenga, A., Kannt, A. (1998) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.
5. Wikström, M. (1989) *Nature* **338**, 776-778.
6. Babcock, G. T., and Wikström, M. (1992) *Nature*, **356**, 301-309.
7. Michel, H. (1998) *Biochemistry* **38**, 15129-15140.
8. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T., (1998) *Science* **280**, 1723-1729.
9. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) *Nature* **376**, 660-669.
10. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock G. T. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 8020-8025
11. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A. DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock G. T. (2000) *Science*, **290**, 1588-1591.
12. Varotsis, C., and Vamvouka, M. (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**, 7670-7673.
13. Das, T. K., Tomson, F. K., Gennis, R. B., Gordon, M., and Rousseau, D. L. (2001) *Biophysical J.* **80**, 2039-2045.
14. Iwase, T., Varotsis, C., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Kitawaga, T. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1415-1416.
15. Wang, J. W., Rumbley, J., Ching, Y-C, Takahashi, S., Gennis, R. B., and Rousseau, D. L. (1995) *Biochemistry* **34**, 15504-15511.
16. Puustinen, A, Bailey, J. A, Dyer, R. B., Mecklenberg, S. L, Wikström, M., and Woodruff, W. H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 13195-13200.
17. Varotsis, C., Kreszowski, D. H., and Babcock, G. T. (1996) *Biospectroscopy* **2**, 331-338.
18. Schelvis, H., Varotsis, C., Deinum, G., Ferguson-Miller S., and Babcock, G. T. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8409-8416.
19. Babcock, G. T. (1988) In *Biological Applications of Raman Spectroscopy* (Spiro, T. G., Eds). Vol 3, pp 293-346, Wiley, New York.

20. Varotsis, C., Babcock, G.T., Garcia-Horsmann, A., and Gennis, R.B. (1995) *J. Phys. Chem.* **99**, 16817-16820.
21. Vamvouka, M., Müller, W., Ludwig, B., and Varotsis, C. (1999) *J. Phys. Chem.* **103**, 3030-3034.
22. Lauraeus, M., Wikström, M., Varotsis, C., Tecklenburg, M. J., and Babcock, G. T. (1992) *Biochemistry* **31**, 10054-10060.
23. Varotsis, C., and Babcock, G. T. (1990) *Biochemistry* **29**, 7357-7362.
24. Das, T. K., Gomes, C. M., Teixeira, M., and Rousseau, D. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9591-9596.
25. Han, S., Ching, Y-C., and Rousseau, D. L. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9445-9451.
26. Stavrakis, S. Koutsoupakis, K., Pinakoulaki, E., Urbani, A., Saraste, M., and Varotsis, C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3814-3815.
27. Pinakoulaki, E. Pfitzner, U. Ludwig, B., and Varotsis C. (2002) *J. Biol.Chem.*, **277**, 13563-13568.
28. Varotsis, C., Zhang, Y., Appelman, E. H., and G. T. Babcock (1993) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **90**, 237-241.
29. Giuffrè, A., Stubauer, G., Sart, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G., and Soulimane, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 14718-14723.
30. Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane, T., and Buse, G. (1999) *Biochemistry* **38**, 1057-1065.
31. Ogura, T., Takahashi, S., Hirota, S., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Appelman, E. H., and Kitagawa, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8527-8536.
32. Varotsis, C., and Babcock, G. T. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11260-11269.
33. Vamvouka, M., and Varotsis, C. (1999) *J. Phys. Chem.* **103**, 3942-3946.
34. Han, S., Takahashi, S., and Rousseau, D. L. (2000) *J. Biol.Chem.*, **275**, 1910-1919.
35. Koutsoupakis, K., Stavrakis, S., Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32860-32866.
36. Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C., (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32867-32874.
37. Ostermeier, C., Harrenga, A., Elmer, U., and Michel, H. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10547-10553.
38. Pinakoulaki, E., Stavrakis, S., Urbani, A. , and Varotsis C. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9378-9379.

39. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 910-917.
40. Rost, B., Behr, J., Hellwig, P., Richter O.-M. H., Ludwig, B., Michel, H., and Mäntele, W. (1999) *Biochemistry* **38**, 7565-7571.
41. Bailey, J. A., Tomson, F. L., Mecklenburg, S. L., MacDonald, G. M., Katsonouri, A., Puustinen, A., Gennis, R. B., Woodruff, W. H., and Dyer, R. B. (2002) *Biochemistry* **41**, 2675-2683.
42. Heitbrink, D., Sigurdson, H., Bowlwien, C., Brzezinski, P., and Heberle, J. (2002) *Biophysical J.* **82**, 1-10.
43. Forte, E.; Urbani, A.; Saraste, M.; Sarti, P.; Brunori, M.; Giuffrè, A. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1-6.
44. Urbani, A.; Gemeinhardt, S.; Warne, A.; Saraste, M. (2001) *FEBS Lett.*, **508**, 29-35.
45. Averill, B. A. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2951-2964.
46. Zumft, W.G. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 553-616.
47. Saraste, M., and Castresana, J. (1994) *FEBS Lett.* **341**, 1-4.
48. Girsch, P. and de Vries, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 202-216.
49. Hendriks, J., Gohlke, U. and Saraste, M. (1998) *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 15-24.
50. Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lübben, M. and Saraste, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13102-13109.
51. Moënne-Loccoz, P., Richter, O-M, H., Huang, H-w, Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. and de Vries S. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 9344-9345.
52. Moënne-Loccoz, P. and de Vries S. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5147-5152.
53. Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 23407-23413.
54. Grönberg, K. L. C., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J., Watmough, N. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 13780-13786.
55. Holm, R. H., Kennepohl, P., and Solomon, E. I. (1996) *Chem. Rev.* **96**, 2239-2314.
56. Benko, B. and Yu, N.T. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **80**, 7042-7046.
57. Mackin, H. C., Benko, B., Yu, N. T., and Gersonde, K. (1983) *FEBS Lett.* **158**, 199-203.
58. Tomita, T., Haruta, N., Aki, M., Kitagawa, T., and Ikeda-Saito, M. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2666-2667.
59. Miller, L. M., Pedraza, A. J., and Chance, M. R. (1997) *Biochemistry* **36**, 12199-12207.
60. Hu, S. and Kincaid, J. R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 6189-6193.

61. Obayashi, E., Tsukamoto, K., Adachi, S-I, Takahashi, S., Nomura, M., Iizuka, T., Shoun, H., and Shiro, Y. (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7807-7816.
62. Hu, S. and Kincaid, J. R. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 2843-2850.

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. “The Role of the Cross-Link His-Tyr in the Functional Properties of the Binuclear Center in Cytochrome *c* Oxidase”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 13563-13568.
2. “Nitric Oxide Reductase: Structure and Properties of the Catalytic Site from Resonance Raman Scattering”
Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. **2002**, *277*, 23407-23413.
3. “Resonance Raman Detection of a Ferrous Five-Coordinate Nitrosylheme *b*₃ Complex in Cytochrome *cbb*₃ oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., Stavrakis, S., Urbani, A., and Varotsis, C.
J. Am. Chem. Soc. **2002**, *124*, 9378-9379.
4. “FTIR and Step-scan Time-resolved FTIR Spectroscopies Reveal a Unique Active Site in Cytochrome *caa*₃ Oxidase”
Pinakoulaki, E., Soulimane, T., and Varotsis, C.
J. Biol. Chem. *in press*.
First Published on Web in JBC Papers in press, July 9, 2002, DOI 10.1074/jbc.M205568200
5. “Ferryl-Oxo Intermediates in the Cytochrome oxidase/H₂O₂ Reaction: Absence of Evidence for Tyr-280 Involvement in the Catalytic Intermediates”
Pinakoulaki, E., Pfitzner, U., Ludwig, B., and Varotsis, C.
To be submitted
6. “The Active NO and O₂ Site Structures of Nitric Oxide Reductase from *Paracoccus denitrificans* and of Cytochrome *cbb*₃ Oxidase from *Pseudomonas stutzeri*”
Pinakoulaki, E., and Varotsis, C.
To be submitted