

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΕΞΩΓΕΝΩΝ LIGANDS ΣΤΗΝ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ

ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ ΒΑΜΒΟΥΚΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

*Στους γονείς μου
Μιχάλη και Μαρίνα*

Βιογραφικό Σημείωμα
Μαγδαληνή Βάμβουκα

Εργαστήριο Βιοφυσικής-Χημείας
Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης
714 09 Ηράκλειο

Τηλ: 003 081-393613
Fax: 003 081-393601

Email: mvamv@chemnt.chemistry.uoh.gr

Ημερομηνία γέννησης: 11 Σεπτεμβρίου, 1970
Τόπος γέννησης: Ηράκλειο, Κρήτη

Εκπαίδευση: Διδακτορική Διατριβή, 1994 – Δεκέμβριος 2000
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τίτλος Διατριβής: «Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της δέσμευσης
εξωγενών ligands στην κυτοχρωμική οξειδάση»

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Βαρώτσος, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Πτυχίο Χημείας, 1993
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Διπλωματική Εργασία, 1992 – 1993
Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
Τίτλος εργασίας: «Κρυσταλλογραφία Rop 139»

Επιβλέπων καθηγητής: Μιχαήλ Κοκκινίδης, Αν. Καθηγητής
Πανεπιστημίου Κρήτης

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά

Διδακτική εμπειρία:

- 1995-1996: Ασκήσεις Βιοχημείας I και Εργαστήριο Φυτικοχημείας I
- 1997-1998: Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II

Δημοσιεύσεις:

- Resonance Raman and FTIR Studies of Carbon Monoxide-Bound Cytochrome aa₃-600 of *Bacillus Subtilis*. Varotsis, C. & Vamvouka, M. *Journal of Physical Chemistry* **102**, 7670-7673, (1998)

- Fourier Transform Infrared and Resonance Raman Studies of the Interaction of Azide with Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. **Vamvouka, M.**, Müller, W., Ludwig, B. & Varotsis, C. *Journal of Physical Chemistry* **B103**, 3030-3034, (1999)
- Resonance Raman and FTIR Studies of the Interaction of Azide with cytochrome *bo3* from *Escherichia coli*. Varotsis, C. & **Vamvouka, M.** *Journal of Physical Chemistry* **B103**, 3942-3946, (1999)
- ***Spectroscopic Characterization of Azide Binding to Bovine Cytochrome c Oxidase: Evidence for a pH-dependent Polarity Change at the Binuclear Center.*** *Vamvouka, M. & Varotsis, C. in preparation*
- ***Probing the Binuclear Center of Heme-Copper oxidases by Cyanide: Observation of the Fe-CN-Cu_B modes.*** *Vamvouka, M. & Varotsis, C. in preparation*

Συμμετοχή σε Συνέδρια:

Περιλήψεις

- Detection of the Fe-C-N Modes in the Cyanide-bound Oxidized Cytochrome *c* Oxidase. Varotsis, C. & **Vamvouka, M.** 8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. 29 August - 2 September 1999, Enschede, The Netherlands
- Spectroscopic Characterization of Cyanide and Azide Binding to the Binuclear Center of Heme-Copper Oxidases. **Vamvouka, M.** & Varotsis, C. 5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. 13-17 April 1999, Corfu, Greece
- Φασματοσκοπικές μελέτες της αιμοχαλκοπρωτεΐνης *bo3*. **Βάμβουκα, Μ.**, & Βαρώτσης, Κ. 2^ο Συμπόσιο Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, Χημική Έρευνα και Βιομηχανία. 3-5 Δεκεμβρίου, Αθήνα.
- Δέσμευση υποκαταστατών στην χαλκοπρωτεΐνη nitrite reductase. Πινακουλάκη, Ε., **Βάμβουκα, Μ.**, Πετράτος, Κ. και Βαρώτσης, Κ. 2^ο Συμπόσιο Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, Χημική Έρευνα και Βιομηχανία. 3-5 Δεκεμβρίου, Αθήνα.
- Μελέτη του διπυρηνικού κέντρου του κυτοχρώματος *aa3* and *aa3-600*. Πετροπούλου, Σ., **Βάμβουκα, Μ.** και Βαρώτσης, Κ. 2^ο Συμπόσιο Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, Χημική Έρευνα και Βιομηχανία. 3-5 Δεκεμβρίου, Αθήνα.

Ομιλίες

- Observation of the Modes of Azide-Bound to Heme-Copper Oxidases: A probe for the Oxidized Binuclear Center.

Humbolt-Stiftung meeting. 19-20 June 1999, Heraklion, Crete.

Curriculum Vitae
Magdalini Vamvouka

Biophysical Chemistry Laboratory
Department of Chemistry
University of Crete
714 09 Heraklion
Crete, Greece

Tel: 003 081-393613

Fax: 003 081-393601

Email: mvamv@chemnt.chemistry.uoh.gr

Date of Birth: **September 11, 1970**

Place of Birth: **Heraklion, Crete**

Education: **Ph.D. 1994 – December 2000**

Chemistry Department, University of Crete.

Thesis: “Spectroscopic Characterization of ligand binding to cytochrome *c* oxidase”

Thesis advisor: Professor Constantinos Varotsis

B.Sc. Chemistry, 1993

University of Crete.

Undergraduate Dissertation, 1992 – 1993

Biology Department, University of Crete.

Thesis: “Crystallization and crystallographic study of Rop 139”

Advisor: Professor Michael Kokkinidis

Languages: **English**

Teaching Experience:

- 1995-1996 : Teaching assistant in Physical Chemistry undergraduate laboratory practical classes and Biochemistry Courses
- 1997-1998: Teaching assistant in Analytical Chemistry undergraduate laboratory practical classes

Publications:

- Resonance Raman and FTIR Studies of Carbon Monoxide-Bound Cytochrome *aa3-600* of *Bacillus Subtilis*. Varotsis, C. & **Vamvouka, M.** *Journal of Physical Chemistry* **102**, 7670-7673, (1998)

- Fourier Transform Infrared and Resonance Raman Studies of the Interaction of Azide with Cytochrome *c* Oxidase from *Paracoccus denitrificans*. **Vamvouka, M.**, Müller, W., Ludwig, B. & Varotsis, C. *Journal of Physical Chemistry* **B103**, 3030-3034, (1999)
- Resonance Raman and FTIR Studies of the Interaction of Azide with cytochrome *bo3* from *Escherichia coli*. Varotsis, C. & **Vamvouka, M.** *Journal of Physical Chemistry* **B103**, 3942-3946, (1999)
- ***Spectroscopic Characterization of Azide Binding to Bovine Cytochrome c Oxidase: Evidence for a pH-dependent Polarity Change at the Binuclear Center.*** Vamvouka, M. & Varotsis, C. **in preparation**
- ***Probing the Binuclear Center of Heme-Copper oxidases by Cyanide: Observation of the Fe-CN-Cu_B modes.*** Vamvouka, M. & Varotsis, C. **in preparation**

Participation in Symposium:

Abstracts

- Detection of the Fe-C-N Modes in the Cyanide-bound Oxidized Cytochrome *c* Oxidase. Varotsis, C. & **Vamvouka, M.** 8th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. 29 August - 2 September 1999, Enschede, The Netherlands
- Spectroscopic Characterization of Cyanide and Azide Binding to the Binuclear Center of Heme-Copper Oxidases. **Vamvouka, M.** & Varotsis, C. 5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. 13-17 April 1999, Corfu, Greece
- Spectroscopic Characterization of cytochrome *bo3*. **Vamvouka, M.** & Varotsis, C. 2nd Symposium of the Institute of Physical Chemistry, Chemical Research and Industry. 3-5 December 1997, Athens, Greece
- Ligand Binding to Nitrite Reductase from *Alcaligenes faecalis*. Pinakoulaki, E., **Vamvouka, M.**, Petratos, K. & Varotsis, C. 2nd Symposium of the Institute of Physical Chemistry, Chemical Research and Industry. 3-5 December 1997, Athens, Greece
- Spectroscopic characterization of binuclear center of cytochrome *aa3* and cytochrome *aa3-600*. Petropoulou, S., **Vamvouka, M.** & Varotsis, C. 2nd Symposium of the Institute of Physical Chemistry, Chemical Research and Industry. 3-5 December 1997, Athens, Greece

Oral presentations

- Observation of the Modes of Azide-Bound to Heme-Copper Oxidases: A probe for the Oxidized Binuclear Center.

Humbolt-Stiftung meeting. 19-20 June 1999, Heraklion, Greece.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες καταλύουν την αναγωγή του O_2 σε νερό κατά την αναπνοή του κυττάρου και χρησιμοποιούν την ελεύθερη ενέργεια που απελευθερώνεται κατά την αναγωγή για την άντληση πρωτονίων κατά μήκος της βιολογικής μεμβράνης στην οποία είναι βυθισμένες. Το ηλεκτροχημικό δυναμικό, το οποίο δημιουργείται λόγω της διαβάθμισης των πρωτονίων, αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη σύνθεση του ATP. Η ενεργή θέση αυτών των ενζύμων είναι ένα spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο αίμης Fe-Cu_B στο οποίο το O_2 δεσμεύεται και ανάγεται. Έχει προταθεί ότι το διπυρηνικό κέντρο συμμετέχει επίσης στη διαδικασία άντλησης των πρωτονίων μέσω δομικών επαναδιευθετήσεων στη σφαίρα συναρμογής του.

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο χαρακτηρισμός των δομικών και λειτουργικών ιδιοτήτων του διπυρηνικού κέντρου κατά τη δέσμευση εξωγενών ligands χρησιμοποιώντας μεθόδους φασματοσκοπίας UV-Vis, συντονισμού Raman και υπερύθρου (FTIR).

Σ' αυτή την εργασία χαρακτηρίζεται η δέσμευση του CO στην πλήρως ανηγμένη αα₃-600 κινολική οξειδάση από το *B. subtilis* βακτήριο. Παρά την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της πρωτεΐνης, οι οποίες επιδρούν στην ισχύ του δεσμού μεταξύ της αξονικής (proximal) His376 και του σιδήρου στην πλήρως ανηγμένη μη υποκατεστημένη μορφή, παρατηρείται μόνο μία διαμόρφωση για το CO-υποκατεστημένο ένζυμο, στην οποία η αίμη Fe²⁺-CO μονάδα έχει δομή παρόμοια με εκείνη της α μορφής της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, αποδεικνύεται ότι υπάρχει μία «αντίστροφη γραμμική» σχέση μεταξύ των συχνοτήτων των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His376})$ και $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ δονήσεων των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών. Προτείνεται ότι οι συχνότητες των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ και $\nu(\text{CO})$ δονήσεων που παρατηρούνται στις αίμη-Cu_B οξειδάσες καθορίζονται τόσο από τις ιδιότητες της proximal His376, η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Gly351 όσο και από το Cu_B. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της His376 και της Gly351 θα μπορούσε να ρυθμίζει τη βασικότητα της His376 με τέτοιο τρόπο ώστε να σταθεροποιεί την υψηλού βαθμού οξειδωτική κατάσταση αίμη-Fe⁴⁺=O²⁻, η οποία σχηματίζεται κατά την κατάλυση.

Επίσης μελετάται η δέσμευση του ιόντος του αζιδίου στην πλήρως οξειδωμένη οξειδάση από καρδιά βοός και το *P. denitrificans* βακτήριο και την bo₃ οξειδάση από το *E. coli* βακτήριο. Το ιόν του αζιδίου δεσμεύεται σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις,

σηματίζοντας και στις δύο σύμπλοκα γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο. Αυτή η μελέτη αναφέρει για πρώτη φορά μία εξαρτώμενη από το pH μεταβολή της διαμόρφωσης στην κυτοχρωμική οξειδάση από καρδιά βοός, όταν βρίσκεται στην πλήρως οξειδωμένη N₃-υποκατεστημένη μορφή. Προτείνεται ότι η μετατροπή μεταξύ των δύο διαμορφώσεων σχετίζεται με μία μεταβολή της πολικότητας στην εγγύς περιοχή, η οποία επιδρά στη θέση του Cu_B. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων συντονισμού Raman και FTIR μεταξύ των τριών ενζύμων που μελετούνται προτείνει ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου, οι οποίες αντανakλούν δομικές διαφορές στο διπυρηνικό κέντρο των τριών ενζύμων. Επιπλέον, αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου καθορίζεται περισσότερο από τις ιδιότητες της εγγύς περιοχής, παρά από ένα trans φαινόμενο από την His376.

Στην παρούσα διατριβή εξετάζεται επίσης η αλληλεπίδραση του ιόντος του κυανίου με την οξειδωμένη μορφή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοός και των aa₃-600 και h_{o3} κινολικών οξειδασών. Το κυάνιο δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο αίμη-Cu_B. Ωστόσο, παρατηρείται μόνο μία διαμόρφωση της μονάδας αίμη Fe³⁺-CN-Cu_B²⁺. Από τη σύγκριση των ν(CN) συχνοτήτων που παρατηρούνται για τα τρία ένζυμα και των ν(Fe-His) συχνοτήτων που έχουν αναφερθεί από προηγούμενες μελέτες, προκύπτει ότι η θέση και/ή η οξύτητα του Cu_B διαφέρει στα τρία ένζυμα. Αυτά τα γνωρίσματα είναι καθοριστικά για την ακριβή διαμόρφωση του δεσμευμένου κυανίου. Επίσης, τα FTIR αποτελέσματα για την κυτοχρωμική οξειδάση προτείνουν ότι στην μερικώς ανηγμένη μορφή του ενζύμου, στην οποία ο Cu_B έχει αναχθεί, το ιόν του κυανίου δεσμεύεται ως τελικό ligand στην αίμη Fe³⁺ σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις. Προτείνεται ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαμορφώσεων μπορεί να οφείλεται σε μία αλλαγή της βασικότητας της proximal His376 όπως επίσης και σε διαφορές στην εγγύς περιοχή.

Τα αποτελέσματα για τη δέσμευση του αζιδίου και του κυανίου προτείνουν ότι, στην οξειδωμένη μορφή, ο Cu_B συμμετέχει άμεσα στη δέσμευση εξωγενών ligands σχηματίζοντας σύμπλοκα γέφυρας με τη γειτονική αίμη. Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να αποτελούν ένα μοντέλο για το προτεινόμενο περόξυ ενδιάμεσο. Εάν σχηματίζεται είναι πολύ πιθανό να έχει δομή γέφυρας της μορφής Fe³⁺-O⁻-O⁻-Cu_B²⁺.

ABSTRACT

Cytochrome and quinol oxidases catalyze the reduction of O₂ to water, the final step in the cellular respiration. In addition, these enzymes use the free energy released in this reaction, in order to translocate protons across the membrane in which they are buried, producing a proton gradient that drives the synthesis of ATP. The active site is a spin coupled heme-Cu_B binuclear center, where O₂ binds and reduction occurs. It has been proposed that binuclear center is also involved in proton pumping process via ligand rearrangements.

The aim of the present dissertation is the characterization of the structural and dynamic properties of the binuclear center upon the binding of exogenous ligands, by using UV-Vis, resonance Raman and FTIR spectroscopy.

In this work, it has been characterized the CO binding to fully reduced *aa*₃-600 quinol oxidase. Despite the presence of two different heme-protein conformations that affect the proximal His376-iron bond stretch in the fully reduced ligand-free form of the enzyme, the CO-bound enzyme exists in a single conformation in which the His376-Fe²⁺-CO moiety has the same structure as the α form found in bovine cytochrome *c* oxidase. Moreover, it is demonstrated that an inverse linear correlation exists between the frequencies of the $\nu(\text{Fe-His})$ and $\nu(\text{Fe-CO})$ stretching modes of the terminal oxidases. It is proposed that the frequencies of both the $\nu(\text{Fe-CO})$ and $\nu(\text{C-O})$ modes found in heme-Cu_B oxidases are affected by the proximal His376, which is hydrogen bonded to Gly351, and by distal effects on the bound CO exerted by Cu_B. It is also hypothesised that the hydrogen bond between His376-Gly351 could regulate the anionic character of the proximal histidine, affecting the stabilization of higher oxidation states of heme Fe⁴⁺=O²⁻ which is formed during the catalysis.

It has been also studied the binding of azide ion to fully oxidized cytochrome *c* oxidase from bovine heart and the *P. denitrificans* bacterium and the *bo*₃ quinol oxidase from the *E. coli* bacterium. Azide ion binds in two different enzyme conformations, both forming bridging complexes with the oxidized heme Fe-Cu_B binuclear center. This study also reports for first time a pH-dependent conformational change in bovine cytochrome *c* oxidase, in the fully oxidized N₃-bound form of the enzyme. It is proposed that the transition between the two N₃-bound conformations is associated with a polarity change in the distal environment, which affect the position of Cu_B. Comparison of the resonance

Raman and FTIR data of the three enzymes suggests significant alternations in the configuration of the bound azide, resulting from specific structural differences within their respective heme-Cu_B binuclear pockets. Furthermore, these data suggest that differences in distal environment, adjacent bound azide rather than differences in a trans effect induced by proximal histidine affect the conformation of azide.

In this dissertation it has been also investigated the interaction of cyanide ion with the oxidized bovine cytochrome *c* oxidase and the *aa*₃-600 and *bo*₃ quinol oxidases. Cyanide binds as bridging ligand within the binuclear center. However, in contrast to the case of azide, it is observed a single conformation of the Fe³⁺-CN-Cu_B²⁺ moiety. The correlation of the frequencies of the $\nu(\text{CN})$ stretching vibrations observed for the three enzymes and the frequencies of the $\nu(\text{Fe-His})$ have been reported previously indicates that the position and/or the acidity of Cu_B differ between the three enzymes. These features are the key determinants of the frequencies of the $\nu(\text{CN})$ modes observed for the three enzymes. FTIR data on cytochrome *c* oxidase also suggest that, if Cu_B is reduced, cyanide binds to heme Fe³⁺ as terminal ligand in two distinct conformations. It is proposed that the two conformations reflect a change in the basicity of proximal His376 as well as differences in the distal environment.

The results of azide and cyanide binding indicate that, in the fully oxidized form, Cu_B has a direct interaction with the heme Fe-bound ligand, forming bridging complexes. These phenomena could present a model for the postulated peroxy intermediate. If it is formed, it is very likely to have a bridging structure (Fe³⁺-O⁻-O⁻-Cu_B²⁺).

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοφυσικής-Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κωνσταντίνου Βαρώτση, τον οποίο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη εργασία αλλά και για την επιστημονική καθοδήγηση και τη συνεργασία σ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ επίσης το Τμήμα Χημείας για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς και για τη χορήγηση υποτροφίας για ορισμένο χρονικό διάστημα των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω του καθηγητές κκ. Δημήτριο Γανωτάκη, Μιχαήλ Κοκκινίδη, Παναγιώτη Παπαγιαννακόπουλο, Ευριπίδη Στεφάνου, Γεώργιο Τσιώτη και Νικόλαο Χανιωτάκη, οι οποίοι δέχθηκαν να συμμετέχουν στην εξεταστική επιτροπή του διδακτορικού διπλώματος.

Επίσης ευχαριστώ:

*Τον καθηγητή Bernd Ludwig και τον τεχνικό Werner Muller στο Ινστιτούτο Βιοχημείας, στο Πανεπιστήμιο Johann Wolfgang Goethe για τη συνεργασία τους στη μελέτη της δέσμευσης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση από το *P. denitrificans* βακτήριο.*

Τον καθηγητή Gerald T. Babcock στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου του Michigan για τη δυνατότητα που μας έδωσε να πραγματοποιήσουμε τα Raman πειράματα στο εργαστήριό του.

Τον καθηγητή Marten Wikstrom και την Dr. Anne Puustinen στο Τμήμα Ιατρικής Χημείας στο Πανεπιστήμιο του Ελσίνκι για την απομόνωση των κυτοχρωμάτων aa_3-600 και bo_3 .

Τον ερευνητή Dr. Κυριάκο Πετράτο στο Εργαστήριο κρυσταλλογραφίας στο I.M.B.B στο I.T.E και την ερευνητική ομάδα του: τον Dr. Γιάννη Παπανικολάου και τους τεχνικούς Μαρία Παπαδοβασιλάκη και Γιώργο Ταβλά για τη φιλοξενία και την πολύ καλή συνεργασία κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριό τους για την απομόνωση της NIR II πρωτεΐνης. Επίσης, ευχαριστώ την Dr. Renate Gesman για τη φιλική της συμπεριφορά.

Όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και συναδέλφους του Τμήματος Χημείας, ιδιαίτερα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές της ερευνητικής ομάδας του καθηγητή Δ. Γανωτάκη για τη συναδελφικότητα όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ επίσης τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Βιοφυσικής-Χημείας για τη συνεργασία που είχαμε, ιδιαίτερα την Αγαθή Χαρίτου, τη Λίλα

Καραλή και την Ελίνα Χατζάρα που δούλεψαν μαζί μου για την απομόνωση της κυτοχρωμικής οξειδάσης στα πλαίσια της διπλωματικής τους εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τη Dr. Έλενα Κουϊμιτζόγλου, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σοφία-Μαρία Καπετανάκη, τον Dr. Gerry McDermott, τη Dr. Σταματία Χρόνη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελένη Παυλίδου για τη φιλία και τη συναδελφικότητά τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη φροντίδα τους και την ηθική και υλική υποστήριξή τους στη διάρκεια των σπουδών μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΑ-ΟΡΟΛΟΓΙΑ	1
--	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ	3
1.1.1	Η διατήρηση της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς	3
1.1.2	Η οικογένεια των τελικών οξειδασών	5
1.1.3	Η δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια και το <i>P. denitrificans</i> βακτήριο	8
1.1.4	Η διαδρομή των ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα c στο διπυρηνικό κέντρο	12
1.1.5	Τα ενδιάμεσα κατά την αναγωγή του O ₂ από την κυτοχρωμική οξειδάση	13
1.1.6	Δομή και δυναμική του διπυρηνικού κέντρου αίμη-Cu _B . Οι ενδείξεις που υπάρχουν από τις φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης εξωγενών ligands.	17
1.2	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	22
	Βιβλιογραφία	23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ UV-Vis, FTIR ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

2.1	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ	29
2.1.1	Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	29
2.1.2	Τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης των ομάδων αίμης	31
2.2	ΔΟΝΗΤΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ	32
2.2.1	Εισαγωγή	33
2.2.2	Οι βασικές αρχές της δονητικής φασματοσκοπίας	34
2.2.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR, FTIR)	36
2.2.4	Η αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson	37
2.2.5	Η κλασική θεωρία για το φαινόμενο Raman	41
2.2.6	Το φαινόμενο συντονισμού Raman	44
2.2.7	Εφαρμογές της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman στις αμοπρωτεΐνες	47
	Βιβλιογραφία	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1	Παρασκευή της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων	50
3.1.1	Υλικά	50
3.1.2	Απομόνωση των μιτοχονδρίων	51
3.1.3	Απομόνωση της κυτοχρωμικής οξειδάσης	51
3.2	Μετρήσεις UV-Vis, συντονισμού Raman και FTIR	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ $\alpha\alpha_3$ -600 ΑΠΟ ΤΟ *Bacillus subtilis* ΒΑΚΤΗΡΙΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR

4.1	Εισαγωγή	54
4.2	Υλικά και μέθοδοι	57
4.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	58
	Βιβλιογραφία	63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-VIS, ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΛΗΡΩΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ *P.denitrificans* ΒΑΚΤΗΡΙΟ

5.1	Εισαγωγή	66
5.2	Υλικά και μέθοδοι	68
5.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	69
	Βιβλιογραφία	79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-VIS, ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ $b\alpha_3$ ΑΠΟ ΤΟ *Escherichia coli* ΒΑΚΤΗΡΙΟ.

6.1	Εισαγωγή	81
6.2	Υλικά και μέθοδοι	83
6.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	83
	Βιβλιογραφία	91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΛΗΡΩΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

7.1	Εισαγωγή	94
7.2	Υλικά και μέθοδοι	95

7.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	97
	Βιβλιογραφία	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

FTIR ΚΑΙ UV-VIS ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΑΝΙΟΥ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ

8.1	Εισαγωγή	110
8.2	Υλικά και μέθοδοι	112
8.3	Αποτελέσματα και συζήτηση	114
	Βιβλιογραφία	130
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	132

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ-ΣΥΜΒΟΛΑ-ΟΡΟΛΟΓΙΑ

ATP	: τριφωσφορική αδενοσίνη
NADH	: νικοταμιδο-αδενο-δινουκλουοτιδίο (ανηγμένη μορφή)
FADH ₂	: φλαβινο- νικοταμιδο-αδενο-δινουκλουοτιδίο (ανηγμένη μορφή)
<i>P. denitrificans</i>	: <i>Paracoccus denitrificans</i> βακτήριο
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i> βακτήριο
<i>B. subtilis</i>	: <i>Bacillus subtilis</i> βακτήριο
<i>R. sphaeroides</i>	: <i>Rhodobacter sphaeroides</i> βακτήριο
<i>T. thermophilus</i>	: <i>Thermus thermophilus</i> βακτήριο
CcO ή <i>aa</i> ₃	: η κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια και τα <i>P. denitrificans</i> και <i>R. sphaeroides</i> βακτήρια
<i>aa</i> ₃ -600	: η κινολική οξειδάση <i>aa</i> ₃ -600 από το <i>B. subtilis</i> βακτήριο
<i>bo</i> ₃	: η κινολική οξειδάση <i>bo</i> ₃ από το <i>E. coli</i> βακτήριο
<i>ba</i> ₃	: η κυτοχρωμική c οξειδάση <i>ba</i> ₃ από το <i>T. thermophilus</i> βακτήριο
<i>cbb</i> ₃	: η κυτοχρωμική οξειδάση <i>cbb</i> ₃ από το <i>R. sphaeroides</i> βακτήριο
UV-Vis	: φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
FTIR	: φασματοσκοπία υπερώθρου με μετασχηματισμό Fourier
IR	: φασματοσκοπία υπερώθρου
EPR	: φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού
Å	: angstroem (10 ⁻¹⁰ m)
cm ⁻¹	: κυματάριθμοι
λ	: μήκος κύματος σε nm
λ _{max}	: το μήκος κύματος σε nm στο οποίο η απορρόφηση είναι μέγιστη
ν	: δόνηση τάσης
δ	: δόνηση κάμψης
His	: ιστιδίνη
Tyr	: τυροσίνη
Gly	: γλυκίνη

Glu	: γλουταμινικό
Bis-Tris	: δι[2-υδροξυαιθυλ]αμινο-2-[υδροξυμεθυλ]-1,3 προπανοδιόλη
Hepes	: N-[2-υδροξυαιθυλ]πιπεράζινο-N'-2αιθανοσουλφονικό οξύ
Tris	: τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο
Triton TX-114	: οκτυλ-φenoξυ-πολυαιθοξυαιθανόλη
EDTA	: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

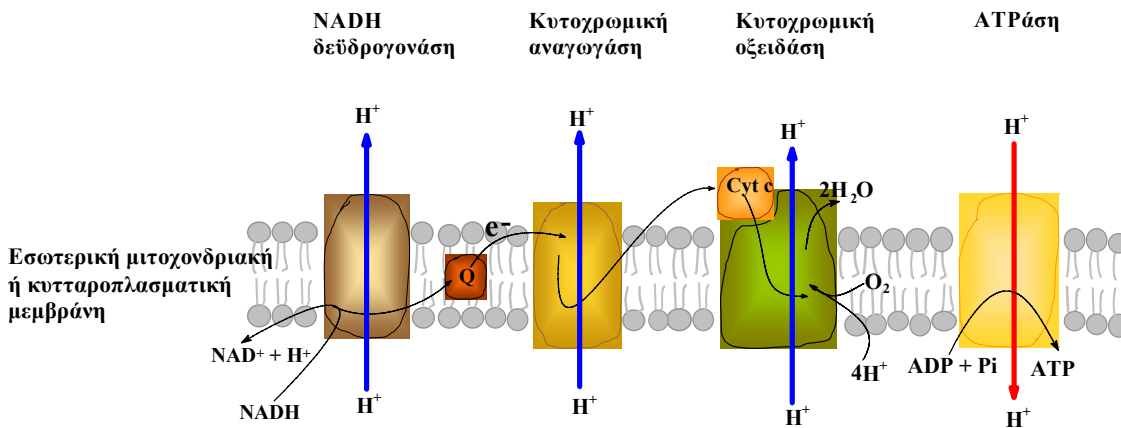
1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ

1.1.1 Η διατήρηση της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς

Η διατήρηση της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς βασίζεται στη σταδιακή αναγωγή του O_2 σε H_2O από την αναπνευστική αλυσίδα του κυττάρου, καθώς το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται σ' αυτή τη διαδικασία, χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP. Το ATP, η τριφωσφορική αδενοσίνη, αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για την κίνηση, τη βιοσύνθεση και την ενεργό μεταφορά των ιόντων και μορίων στα βιολογικά συστήματα.

Η αναπνευστική αλυσίδα του κυττάρου αποτελείται από μία σειρά μεμβρανικών ενζυμικών συμπλόκων τα οποία δρουν ως οξειδοαναγωγικές αντλίες H^+ (σχήμα 1.1). Τα ένζυμα αυτά είναι οργανωμένα σε ορισμένη διάταξη στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ή την εσωτερική κυτταρική μεμβράνη στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα συνένζυμα NADH και $FADH_2$, που σχηματίζονται κατά τη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, τη γλυκόλυση και τον κύκλο του κιτρικού οξέος στη γειτονική μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα, είναι οι δότες e^- για την αναγωγή του O_2 . Αυτά τα μόρια έχουν ένα ζεύγος e^- με μεγάλο δυναμικό μεταφοράς. Η σταδιακή μεταφορά e^- από το NADH ή το $FADH_2$ στο μοριακό O_2 , μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, οδηγεί σε μετατόπιση H^+ από την εσωτερική στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Έτσι, δημιουργείται ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό, το οποίο αποτελείται από τη διαβάθμιση του pH και το ηλεκτρικό δυναμικό κατά μήκος της μεμβράνης. Το ATP συντίθεται όταν τα H^+ εισρέουν πίσω στη μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα μέσω

Διαμεμβρανικός χώρος



Μιτοχονδριακή μήτρα ή κυτταρόπλασμα

Σχήμα 1.1 Η αναπνευστική αλυσίδα των ευκαρυωτικών και ορισμένων προκαρυωτικών οργανισμών

της ΑΤΡασης, η οποία βρίσκεται στην ίδια μεμβράνη με την αναπνευστική αλυσίδα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως οξειδωτική φωσφορλίωση και αποτελεί την κύρια πηγή ΑΤΡ στους αερόβιους οργανισμούς.

Η αναπνευστική αλυσίδα των ευκαρυωτικών και ορισμένων προκαρυωτικών οργανισμών περιέχει τρία μεγάλα ενζυμικά σύμπλοκα: τη ΝΑDΗ δεϋδρογονάση, την κυτοχρωμική αναγωγή και την κυτοχρωμική οξειδάση (σχήμα 1.1). Δύο επιπλέον μεταφορείς e⁻, μία κινίνη (Q) στο εσωτερικό της μεμβράνης και μία μικρή σφαιρική πρωτεΐνη, το κυτόχρωμα c, στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης συμπληρώνουν την αλυσίδα, διευκολύνοντας τη μεταφορά των e⁻ μεταξύ των τριών κυρίων παραγόντων. Τα e⁻ μεταφέρονται διαδοχικά από τον ένα παράγοντα στον άλλο, με τελικό αποδέκτη την κυτοχρωμική οξειδάση. Σε ορισμένα βακτήρια η αναπνευστική αλυσίδα υπολείπεται της κυτοχρωμικής αναγωγής και του κυτοχρώματος c, με αποτέλεσμα τα e⁻ να μεταφέρονται κατευθείαν από την κινίνη σε μία κινολική οξειδάση.

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες είναι τα τελικά ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας των αερόβιων οργανισμών, τα οποία δεσμεύουν και ανάγουν το O_2 σε H_2O . Ταυτόχρονα, χρησιμοποιούν την ενέργεια που απελευθερώνεται κατά στην αναγωγή για να μεταφέρουν τέσσερα H^+ απ' την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης έξω στο διαμεμβρανικό χώρο.¹⁻¹⁰ Έτσι, η συνολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές οξειδάσες έχει ως εξής:



Ο όρος $4H^+$ αναφέρεται στα H^+ που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του νερού, γνωστά και ως «χημικά» H^+ , ενώ οι όροι $4H^+_{in}$ και $4H^+_{out}$ συμβολίζουν τα H^+ που μετατοπίζονται κάθετα ως προς την μεμβράνη («αντλούμενα» πρωτόνια).

Επειδή τα H^+ που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του H_2O , προέρχονται από τη μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης, ενώ τα e^- μεταφέρονται από το κυτόχρωμα c , που βρίσκεται στην απέναντι πλευρά στο διαμεμβρανικό χώρο, ή την κινόνη που είναι στο μέσο της μεμβράνης, η χημεία O_2 δημιουργεί από μόνη της μία διαβάθμιση φορτίου κατά μήκος της μεμβράνης. Η ταυτόχρονη μετατόπιση $4H^+$ ανά μόριο O_2 που ανάγεται, αυξάνει ακόμη περισσότερο τη διαμεμβρανική διαβάθμιση των H^+ και του φορτίου και διπλασιάζει την ενεργειακή απόδοση της αντίδρασης.³ Με αυτό τον τρόπο, οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες συνεισφέρουν μέγιστα στο ηλεκτροχημικό δυναμικό της μεμβράνης και επομένως στη διατήρηση της ενέργειας στο κύτταρο.

1.1.2 Η οικογένεια των τελικών οξειδάσων

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες αποτελούν μια οικογένεια δομικά και λειτουργικά συγγενών ενζύμων, γνωστή ως η οικογένεια των τελικών οξειδάσων ή η οικογένεια των αιμοχαλκοοξειδάσων.^{4-7, 11-12}

Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελούνται από 7 έως 13 υπομονάδες (πολυπεπτιδικές αλυσίδες).¹¹⁻¹² Όλες περιέχουν 3 κύριες υπομονάδες, οι οποίες κωδικοποιούνται από το μιτοχόνδριο και χαρακτηρίζονται με τους λατινικούς αριθμούς I, II και III. Αυτές οι υπομονάδες παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό διατήρησης της αμινοξικής ακολουθίας τους μέσα στην οικογένεια των τελικών οξειδάσων. Οι βακτηριακές οξειδάσες αποτελούνται από 3 έως 5 υπομονάδες.⁴⁻⁸ Όλες περιέχουν μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, ομόλογη της υπομονάδας I των μιτοχονδρίων, ενώ οι περισσότερες περιέχουν

επίσης πολυπεπτιδικές αλυσίδες ομόλογες των υπομονάδων II και III. Ωστόσο, μόνο οι υπομονάδες I και II είναι απαραίτητες για την πλήρη λειτουργία των τελικών οξειδάσων, εφόσον ένα τέτοιο υποσύμπλοκο έχει απομονωθεί από το *P. denitrificans* βακτήριο και έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανάγει το O₂ και να μετατοπίζει H⁺.¹³

Το υποσύμπλοκο των υπομονάδων I και II περιέχει τα οξειδοαναγωγικά κέντρα των ενζύμων. Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες από τα μιτοχόνδρια έχουν τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: δύο κέντρα χαλκού, το Cu_A και το Cu_B και δύο ομάδες αίμης, την αίμη α (Fe_a) και την αίμη α₃ (Fe_{a3}). Στη μορφή που απομονώνονται οι πρωτεΐνες (πλήρως οξειδωμένες), η αίμη α είναι στην κατάσταση χαμηλού spin, ενώ η αίμη α₃ είναι στην κατάσταση υψηλού spin.¹⁴ Η αίμη α₃ και ο Cu_B απέχουν μεταξύ τους μόλις 4.9 Å και σχηματίζουν ένα spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο, πιθανότατα μέσω ενός ligand γέφυρας.¹⁴⁻²¹ Το διπυρηνικό κέντρο αίμη-Cu_B είναι η θέση δέσμευσης και αναγωγής του O₂.³ Ο Cu_A αποτελεί τον αρχικό δέκτη e⁻ από το κυτόχρωμα c. Τα e⁻ στη συνέχεια μεταφέρονται στην αίμη α και από εκεί στο διπυρηνικό κέντρο αίμη α₃-Cu_B.

Η παρουσία του διπυρηνικού κέντρου αίμης-Cu_B είναι ένα από τα κριτήρια συγγένειας μεταξύ των τελικών οξειδάσων.⁴ Παρά τη μεγάλη απόσταση που χωρίζει εξελικτικά τους ευκαρυωτικούς (θηλαστικά) από τους προκαρυωτικούς (βακτήρια) οργανισμούς, καθώς και την απλότητα που χαρακτηρίζει τις βακτηριακές τελικές οξειδάσες, η δομή του διπυρηνικού κέντρου διατηρείται πλήρως μέσα στην οικογένεια των τελικών οξειδάσων.

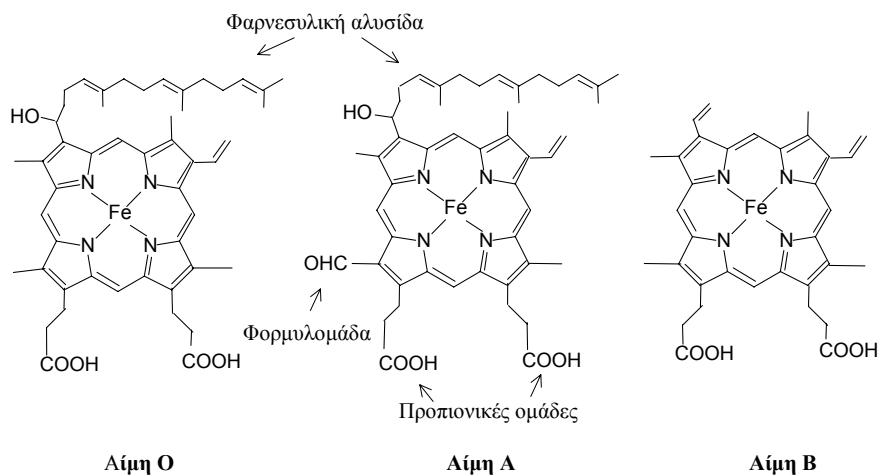
Οι τελικές οξειδάσες από τα βακτήρια παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τις τελικές (αποκλειστικά κυτοχρωμικές) οξειδάσες των ευκαρυωτικών οργανισμών.⁴⁻⁸ Πρώτον, σε αντίθεση με τις κυτοχρωμικές, οι κινολικές οξειδάσες, οι οποίες συναντώνται μόνο στα βακτήρια, δεν περιέχουν το Cu_A, επειδή ο δότης ηλεκτρονίων είναι μια κινόνη (ουβοκινόνη ή υδροκινόνη). Δεύτερον, οι δύο ομάδες αίμης σε μία βακτηριακή τελική οξειδάση μπορεί να είναι αίμη o₃, αίμη α (ή α₃), ή αίμη b (ή b₃) σε διάφορους συνδυασμούς. Από το σύνολο των τελικών οξειδάσων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια προκύπτει ότι στο διπυρηνικό κέντρο μπορεί να συμμετέχει μία αίμη α₃, o₃, ή b₃, ενώ στη θέση της αίμης χαμηλού spin μπορεί να υπάρχει αίμη α ή αίμη b. Οι αίμες α και α₃, όπως και οι αίμες b και b₃, έχουν τον ίδιο χημικό τύπο, αίμη A και αίμη B, αντίστοιχα.^a Ωστόσο, οι δύο ομάδες αίμης μίας τελικής οξειδάσης διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις

^a Οι χημικοί τύποι των ομάδων αίμης συμβολίζονται με κεφαλαία γράμματα π.χ. A, B, O, ενώ οι ομάδες αίμης που είναι δεσμευμένες μέσα στις πρωτεΐνες αναφέρονται με μικρά γράμματα π.χ. a, b, o.

χημικές και φασματοσκοπικές ιδιότητες, εξαιτίας της διαφορετικής θέσης και λειτουργίας τους μέσα στην πρωτεΐνη.

Οι χημικοί τύποι των ομάδων αίμης που περιέχονται στις τελικές οξειδάσες φαίνονται στο σχήμα 1.2. Η αίμη A χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας φαρνεσυλικής αλυσίδας στη θέση 2 του πορφυρινικού δακτυλίου και μίας φορμυλομάδας στη θέση 8. Στις αίμες B και O, η φορφυλομάδα αντικαθίσταται από ένα μεθύλιο, ενώ στη θέση 2 της αίμης B υπάρχει μία μεθυλομάδα.

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες ονομάζονται βάσει των ομάδων αίμης που περιέχουν, με την αίμη που συμμετέχει στο διπυρηνικό κέντρο να αναφέρεται τελευταία. Π.χ. η κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια αναφέρεται ως οξειδάση ή κυτόχρωμα aa_3 , ενώ συνηθίζεται να συμβολίζεται εν συντομία ως CcO ή COX.^β



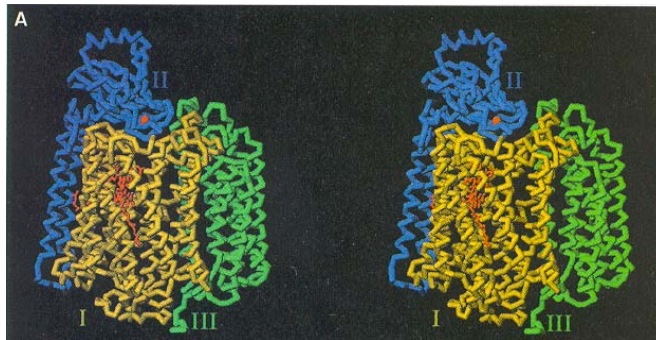
Σχήμα 1.2 Οι ομάδες αίμης που συναντώνται στις τελικές οξειδάσες

1.1.3 Η δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια και το *P. denitrificans* βακτήριο

^β Οι όροι κυτόχρωμα και αίμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά για την ονομασία των μεμονομένων προσθετικών ομάδων μέσα στην πρωτεΐνη π.χ. κυτόχρωμα α ή αίμη α, συνηθίζεται όμως ο όρος κυτόχρωμα να αναφέρεται σ' ολόκληρη την πρωτεΐνη, π.χ. κυτόχρωμα aa_3 .

Οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες είναι εσωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαπερνούν απ' άκρη σ' άκρη τη μεμβράνη, στην οποία είναι βυθισμένες και έρχονται σε επαφή με το διάλυμα μέσα και έξω από τη μεμβράνη.

Πρόσφατα προσδιορίστηκαν με ακτίνες-X οι κρυσταλλικές δομές της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοός,²²⁻²⁶ η οποία είναι ένα σύμπλοκο 13 υπομονάδων και της κυτοχρωμικής οξειδάσης από το *P. denitrificans* βακτήριο,^{25,26} η οποία αποτελείται από 4 υπομονάδες. Παρά τη διαφορετική προέλευση των δύο ενζύμων, οι δύο δομές είναι σύμφωνες και επιβεβαιώνουν τη δομή που είχε προβλεφθεί από τον επιτυχή συνδυασμό μεθόδων φασματοσκοπίας και μοριακής βιολογίας.^{4,7} Όταν η δομή παρατηρείται κάθετα στη μεμβράνη το σύνολο των υπομονάδων I, II και III φαίνεται να σχηματίζει ένα τραπέζιο, ύψους 55 Å και πλάτους περίπου 90 Å προς την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και περίπου 75 Å προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης. Η υπομονάδα I είναι κυλινδρική και καταλαμβάνει το κεντρικό μέρος του ενζύμου. Οι υπομονάδες II και III συνδέονται με την υπομονάδα I, αλλά δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3 Οι υπομονάδες I, II και III στην μιτοχονδριακή κυτοχρωμική οξειδάση από καρδιά βοός.¹⁷

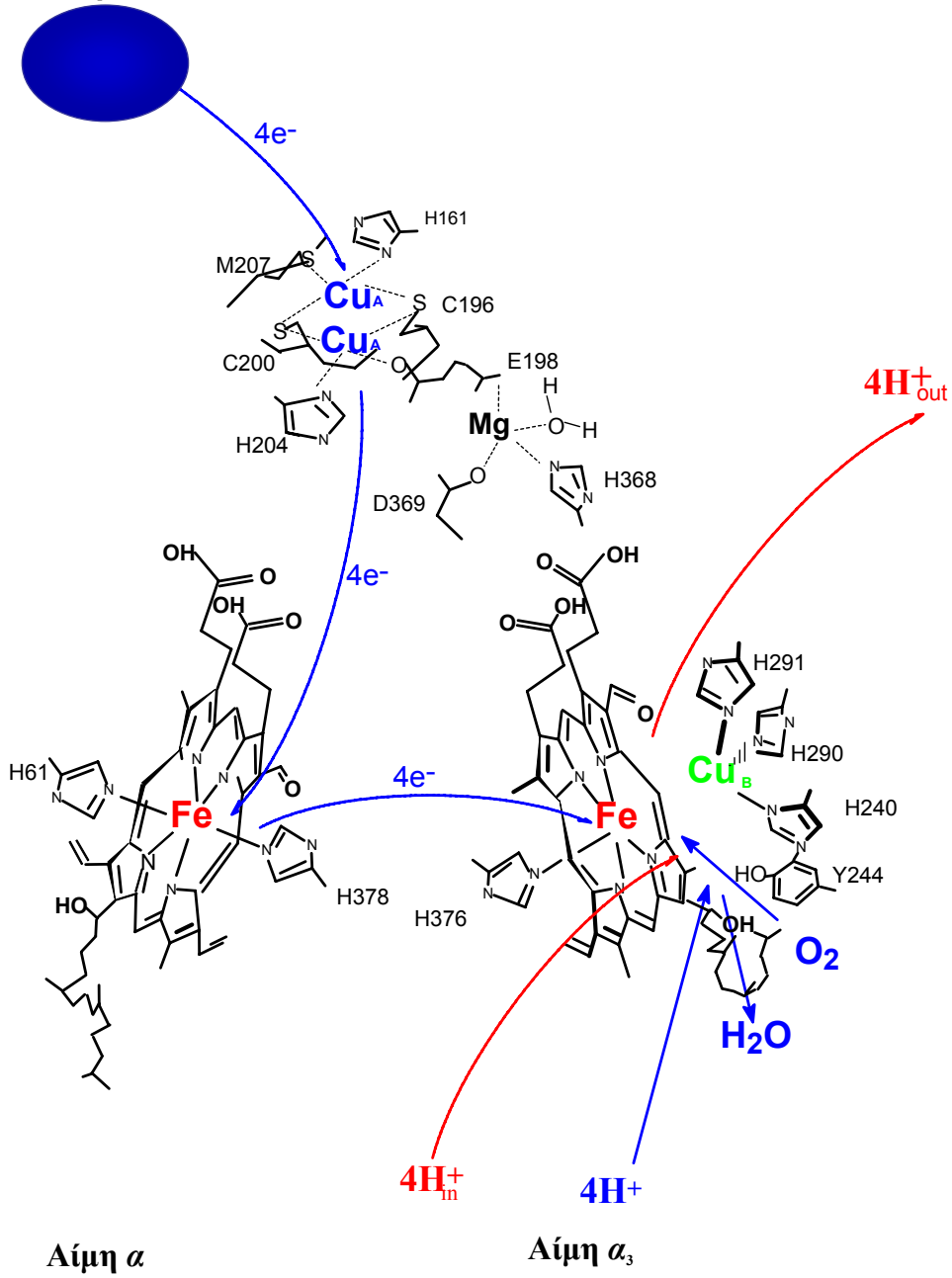
Η υπομονάδα III υπάρχει σ' όλες σχεδόν τις κυτοχρωμικές οξειδάσες, αλλά είναι άγνωστη η λειτουργία της. Από όσα γνωρίζουμε δε φαίνεται να σχετίζεται με τη δέσμευση των οξειδοαναγωγικών κέντρων ή το μηχανισμό της μετατόπισης των πρωτονίων, εφόσον το υποσύμπλοκο που αποτελείται αποκλειστικά από τις υπομονάδες I και II απομονώνεται και είναι πλήρως ενεργό. Έχει προταθεί ότι η υπομονάδα III σχηματίζει την είσοδο ενός καναλιού μεταφοράς του O₂ στο διπυρηνικό κέντρο.^{23,27} Επίσης είναι πιθανό να έχει και δομικό ρόλο συμβάλλοντας στη συγκρότηση της πρωτεΐνης.²⁸

Η υπομονάδα II αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες και ένα μεγάλο σφαιρικό υδατοδιαλυτό domain (περιοχή), το καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο βρίσκεται πάνω από την υπομονάδα I στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης.^{23, 26, 27} Αυτό το domain συγκρατεί το Cu_A, ο οποίος βρίσκεται μόλις 7 Å μακριά από το κοντινότερο σημείο της επιφάνειας του domain. Σε συμφωνία με προηγούμενες EPR μελέτες,^{29,30} οι δομές των δύο ενζύμων έδειξαν ότι ο Cu_A είναι ουσιαστικά ένα διπυρηνικό κέντρο χαλκού μικτού σθένους, της μορφής Cu_A^{1.5+}-Cu_A^{1.5+} (σχήμα 1.4). Τα δύο ιόντα του χαλκού απέχουν μεταξύ τους 2.5 Å και συνδέονται με δύο γέφυρες θείου δύο κυστεϊνών (Cys200, Cys196).⁷ Δύο επιπλέον ligands υπάρχουν σε κάθε χαλκό: ο Cu_{A1} συνδέεται με μία ιστοιδίνη (His161) και μία μεθειονίνη (Met207), ενώ ο Cu_{A2} ενώνεται μ' ένα γλουταμινικό οξύ (Glu198) και μία ιστοιδίνη (His204). Κάθε ιόν χαλκού σχηματίζει ένα παραμορφωμένο τετραεδρικό σύμπλοκο, έτσι ώστε τα δύο ιόντα χαλκού και τα δύο άτομα του θείου που τα συνδέουν να βρίσκονται όλα στο ίδιο επίπεδο.

Η υπομονάδα I είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα διατηρημένη πολυπεπτιδική αλυσίδα στις τελικές οξειδάσες. Αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες και περιέχει τα υπόλοιπα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα.^{23,26,27} Όταν παρατηρείται από την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, οι 12 έλικες φαίνεται να σχηματίζουν ανά 4 ένα ημικύκλιο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τρεις πόροι, οι A, B και C και η υπομονάδα I να εμφανίζει συμμετρία τρίτης τάξης. Ο πόρος A φράσσεται από τα υψηλά διατηρημένα αρωματικά αμινοξέα. Αντίθετα ο πόρος B περιέχει την αίμη α₃ και το Cu_B, ενώ ο πόρος C περικλείει την αίμη α. Τα τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα βρίσκονται περίπου 13 Å κάτω από την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης (σχήμα 1.4). Τα επίπεδα της αίμης α και της α₃ είναι σχεδόν κάθετα στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά οι δύο αίμες δεν είναι παράλληλες μεταξύ τους. Δεσμευμένες στην ίδια έλικα και με τις προπιονικές τους ομάδες να κατευθύνονται προς την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης, οι δύο αίμες σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 104°. Η απόσταση μεταξύ των δύο ιόντων σιδήρου είναι 14 Å, ενώ οι

⁷ Σ' αυτή την εργασία, οι θέσεις των αμινοξέων αναφέρονται σύμφωνα με την αρίθμηση της αμινοξικής ακολουθίας της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων από καρδιά βοός.

Κυτόχρωμα c



Σχήμα 1.4 Η διάταξη των τεσσάρων οξειδοαναγωγικών κέντρων στην κυτοχρωμική οξειδάση.

προπιονικές ομάδες πλησιάζουν μεταξύ τους μέχρι τα 4.5 \AA .

Η χαμηλού spin **αίμη α** έχει δύο αξονικά ligands ιστιδίνης, τις His61 και His378 της υπομονάδας I (σχήμα 1.4). Η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης κατευθύνεται προς τη μιτοχονδριακή μήτρα (ή το κυτταρόπλασμα) παραμένοντας στον πόρο C. Έτσι, μαζί με τα γειτονικά υδροφοβικά κατάλοιπα, η φαρνεσυλική αλυσίδα εμποδίζει την πρόσβαση της αίμης α στη μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα. Η αίμη α είναι πιθανό να συνδέεται με το Cu_A, μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου, το οποίο σχηματίζεται από την His204 του Cu_A, τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ των Arg438 και Arg439 της υπομονάδας I και μία από τις προπιονικές ομάδες.^{23,25,31-34}

Η υψηλού spin **αίμη α₃** έχει ένα μόνο αξονικό ligand ιστιδίνης, τη His376, η οποία βρίσκεται στην ίδια έλικα με τη His378 της αίμης α (σχήμα 1.4).²²⁻²⁶ Η His376 αναφέρεται ως proximal ιστιδίνη και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πεπτιδική καρβονυλική ομάδα της Gly351.²² Η ισχύς του δεσμού αυτού αναμένεται να επηρεάζει τις ιδιότητες της αίμης α₃, όσον αφορά τη δέσμευση εξωγενών ligands σε θέση trans ως προς την His376. Ο σίδηρος είναι περίπου 0.7 Å εκτός του επιπέδου της αίμης, προς το μέρος της His376. Αντίθετα από την αίμη α, η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης α₃ δεν κατευθύνεται προς την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά αφήνει τον πόρο B και τυλίγεται σχηματίζοντας ένα βραχίονα σχήματος U, με αποτέλεσμα ο πόρος B να απελευθερώνεται και η αίμη α₃ να μπορεί να επικοινωνεί με τη μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα.

Ο Cu_B βρίσκεται 4.9 Å μακριά από το Fe_{a3} και 1.0 Å πάνω από τον κύριο άξονα της αίμης α₃, προς το μέρος του αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου που φέρει τη φορμυλομάδα (σχήμα 1.4).²² Τρία κατάλοιπα ιστιδίνης συναρμολογούνται με το Cu_B, οι His 240, His290 και His291. Ο Cu_B δε δίνει σήμα EPR. Για την εξήγηση της απουσίας των αναμενόμενων EPR σημάτων και τη μείωση του παραμαγνητισμού στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, οι van Gelder et al.¹⁴ πρότειναν πρώτοι την ύπαρξη μίας αντισιδηρομαγνητικής spin-spin σύζευξης μεταξύ του Fe_{a3}³⁺ και του Cu_B²⁺, η οποία οδηγεί σ' ένα σύστημα ολικού spin S=2. Μετρήσεις μαγνητικής επιδεικτικότητας δείχνουν καθαρά την παρουσία ενός συστήματος με S=2 στην οξειδωμένη μορφή της CcO.¹⁵⁻¹⁷ Έχει προταθεί ότι αυτή η σύζευξη επιτυγχάνεται μέσω ενός ligand γέφυρας μεταξύ της αίμης α₃ και του Cu_B και έχουν προταθεί μία σειρά από πιθανές ομάδες, οι οποίες θα μπορούσαν να σχηματίζουν μία γέφυρα μεταξύ των δύο ιόντων, όπως H₂O, OH⁻, COO⁻, S, ή Cl.¹⁸⁻²⁰ Μελέτες με EXAFS και ENDOR προτείνουν την ύπαρξη ενός τέταρτου ligand στο Cu_B, πιθανόν ενός μορίου H₂O ή ενός ιόντος HO⁻.²¹ Οι δομές που προσδιορίστηκαν με ακτίνες X δείχνουν ηλεκτρονική

πυκνότητα μεταξύ των δύο οξειδοαναγωγικών κέντρων, ωστόσο η ταυτοποίηση δεν ήταν δυνατή λόγω της παρουσίας των βαριών ιόντων των $\text{Fe}_{\text{a}_3}^{3+}$ και $\text{Cu}_{\text{B}}^{2+}$. Οι Yoshikawa et al.²⁴ προτείνουν την ύπαρξη μίας υπεροξειδικής γέφυρας μεταξύ των δύο κέντρων, για το ένζυμο από τα μιτοχόνδρια, ενώ για την οξειδάση από το *P. denitrificans* οι Ostermeier et al.²⁶ υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ligand H_2O στην έκτη θέση της αίμης a_3 και ενός ligand HO^- στο Cu_{B} .

Τα έξι κατάλοιπα ιστιδίνης, με τα οποία συναρμολόζονται οι δύο ομάδες αίμης και ο Cu_{B} , διατηρούνται σε υψηλό βαθμό μεταξύ των αιμοχαλκοοξειδασών και αποτελούν το δεύτερο κριτήριο ορισμού αυτής της οικογένειας.

Η Tyr244 είναι επίσης ένα από τα πλέον διατηρημένα αμινοξέα στην οικογένεια των τελικών οξειδασών και βρίσκεται μόλις 3.2 Å μακριά από το σίδηρο της αίμης a_3 .²²⁻²⁶ Από τις κρυσταλλικές δομές, προκύπτει ότι η Tyr244 συνδέεται με την His240 του Cu_{B} μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των C_{e_2} και N_{e_2} ατόμων.^{24,26} Η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού μειώνει σημαντικά το pK_{a} της Tyr244, η οποία επίσης αλληλεπιδρά με τη φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης a_3 σχηματίζοντας ένα δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλική της ομάδα. Έχει προταθεί ότι η Tyr244 συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου παρέχοντας ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο για τη διάσπαση του δεσμού O-O (παράγραφος 1.5).³⁵

1.1.4 Η διαδρομή των ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* στο διπυρηνικό κέντρο

Η διευθέτηση των οξειδοαναγωγικών κέντρων, οι αποστάσεις μεταξύ τους και οι σχετικοί προσανατολισμοί τους, τα ligands και τα αμινοξέα που τα περιβάλλουν, αποτελούν τη βάση για την ταυτοποίηση της διαδρομής των ηλεκτρονίων μέσα στην πρωτεΐνη και την κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης της μεταφοράς τους.

Τεχνικές γρήγορης κινητικής έχουν αποδείξει ότι ο Cu_{A} είναι ο αρχικός δέκτης των e^- από το κυτόχρωμα *c*.³² Η ταχύτητα μεταφοράς των e^- από το κυτόχρωμα *c* στο Cu_{A} είναι περίπου 70000 s^{-1} .³³ Έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου του κυτοχρώματος *c* με την οξειδάση είναι το στάδιο που καθορίζει την πορεία της αντίδρασης, ανάμεσα στο ανηγμένο κυτόχρωμα *c* και την οξειδάση.³⁶

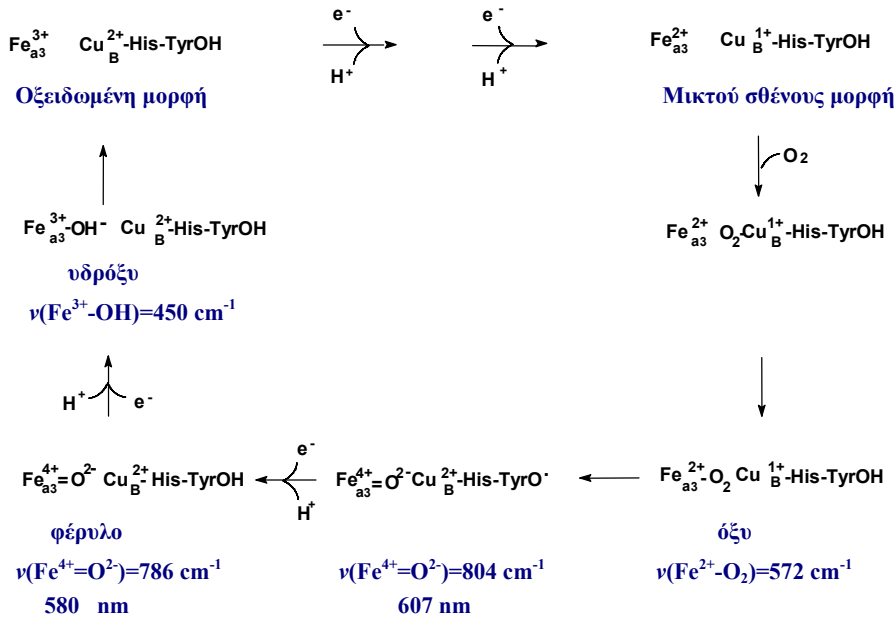
Από το Cu_A, τα e⁻ μεταφέρονται στην αίμη α. Σύμφωνα με τις κρυσταλλικές δομές και των δύο κυτοχρωμικών οξειδάσων, υπάρχει ένα πιθανό μονοπάτι μεταφοράς e⁻ από το Cu_A στην αίμη α, το οποίο σχηματίζεται από δεκατέσσερις ομοιοπολικούς και δύο υδρογονικούς δεσμούς στη σειρά. Σ' αυτό το μονοπάτι συμμετέχουν ο πεπτιδικός δεσμός μεταξύ των καλά διατηρημένων Arg438 και Arg439, μία από τις προπιονικές ομάδες της αίμης α και το πλήρως διατηρημένο ligand του Cu_A, η His204 (σχήμα 1.4). Η ταχύτητα μεταφοράς είναι 20000 s⁻¹, αρκετά υψηλή εάν ληφθεί υπόψιν η μεγάλη απόσταση μεταξύ των δύο κέντρων (19.5 Å) και η μικρή διαφορά δυναμικού (50 mV).³⁷ Η ενέργεια αναδιοργάνωσης γι' αυτή τη μεταφορά είναι ασυνήθιστα μικρή³¹ και αυτό αποδίδεται στην ικανότητα του διπυρηνικού κέντρου του Cu_A να απεντοπίζει τα e⁻ σε μία μεγάλη περιοχή,^{31,34,38} αλλά και την ύπαρξη ενός αποτελεσματικού μονοπατιού μεταφοράς των ηλεκτρονίων μεταξύ των δύο κέντρων.³¹ Ο διπυρηνικός χαρακτήρας του Cu_A φαίνεται ότι είναι απαραίτητος για τη γρήγορη μεταφορά των e⁻, καθώς μεταβολή της δομής αυτού του κέντρου έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της ταχύτητας του ολικού turnover του ενζύμου.^{39,40} Όμως ακόμα και αν δεν υφίσταται ο διπυρηνικός χαρακτήρας του Cu_A, η κυτοχρωμική οξειδάση διατηρεί την ικανότητά της να μετατοπίζει πρωτόνια, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη δομή του Cu_A δεν είναι απαραίτητη για αυτή τη λειτουργία του ενζύμου.^{9,41}

Από την αίμη α, τα e⁻ μεταφέρονται στην αίμη α₃. Η μεταφορά είναι πιθανό να συμβαίνει μέσω ενός δικτύου δεσμών, από το Fe_a στο Fe_{a3}, επειδή η αξονική His378 της αίμης α και η proximal His376 της αίμης α₃ ανήκουν στην ίδια έλικα.^{9,10}

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

Τα ενδιάμεσα της αναγωγής του O₂ από την κυτοχρωμική οξειδάση, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί είναι το όξυ (Fe²⁺-O₂), το ονομαζόμενο 607 nm ενδιάμεσο (Fe⁴⁺=O²⁻), το φέρυλο ή ένωση F (Fe⁴⁺=O²⁻) και το υδρόξυ (Fe³⁺-OH). Στο σχήμα 1.5 φαίνεται η σειρά με την οποία σχηματίζονται αυτά τα ενδιάμεσα. Ο κύκλος αρχίζει με το πλήρως οξειδωμένο

ένζυμο (Cu_A^{2+} , Fe_a^{3+} , Fe_{a3}^{3+} , Cu_B^{2+}). Με τη μεταφορά δύο e^- στο ένζυμο, ανάγεται το διπυρηνικό κέντρο και σχηματίζεται το μικτού σθένους ένζυμο (Cu_A^{2+} , Fe_a^{3+} , Fe_{a3}^{2+} , Cu_B^{1+}). Έχει προταθεί ότι η μεταφορά αυτών των e^- από την αίμη α στο διπυρηνικό κέντρο συνοδεύεται από τη μεταφορά H^+ ,^{43,44} ενώ η ταχύτητα μεταφοράς των e^- ρυθμίζεται από τη διαθεσιμότητα των H^+ .⁴⁴ Μετά την αναγωγή του διπυρηνικού κέντρου, το O_2 δεσμεύεται και σχηματίζεται το όξυ ενδιάμεσο $\text{Fe}_{a3}^{2+}\text{-O}_2$.



Σχήμα 1.5 Τα ενδιάμεσα της αναγωγής του O_2 από την κυτοχρωμική οξειδάση

Η ταχύτητα σχηματισμού του όξυ ενδιάμεσου ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) δεν είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος, αλλά φθάνει μία μέγιστη τιμή σε υψηλές συγκεντρώσεις O_2 . Αυτό προτείνει την ύπαρξη ενός παρεμβαλλόμενου σταδίου, στο οποίο το O_2 δεσμεύεται προσωρινά σε μία θέση διαφορετική της αίμης a_3 .⁴⁵ Έχει προταθεί ότι αυτή η θέση είναι ο Cu_B^{1+} .⁴⁵⁻⁵⁰ Η πρόταση αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι το CO δεσμεύεται προσωρινά στο Cu_B^{1+} , μετά τη φωτόλυση του δεσμού $\text{Fe}_{a3}^{2+}\text{-CO}$.^{51,52} Η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης σχηματισμού του $\text{Cu}_B^{1+}\text{-O}_2$ είναι $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.⁴⁵

Ο σχηματισμός του όξυ ενδιάμεσου παρατηρήθηκε αρχικά με EPR φασματοσκοπία σε χαμηλή θερμοκρασία.⁵³ Μετέπειτα μελέτες με χρήση χρονοεξαρτώμενης

φασματοσκοπίας UV-Vis και συντονισμού Raman επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του. Το UV-Vis φάσμα διαφοράς, ως προς πλήρως ανηγμένο μη υποκατεστημένο ένζυμο, εμφανίζει αύξηση της απορρόφησης στα 430 και 595 nm,^{54,55} ενώ το αντίστοιχο φάσμα συντονισμού Raman χαρακτηρίζεται από μία ισοτοπικά εξαρτώμενη δόνηση στους 572 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στη $\nu(\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{2+}\text{-O}_2)$.⁵⁶⁻⁵⁸ Η συχνότητα της $\nu(\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{2+}\text{-O}_2)$ είναι παρόμοια μ' εκείνη που έχει παρατηρηθεί για το όξυ προϊόν της Mb και της Hb,^{59,60} αλλά και μοντέλων της αίμης α ,⁶¹ γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο Cu_B δεν αλληλεπιδρά με το δεσμευμένο O₂. Η σταθερά ταχύτητας της δέσμησης του O₂ είναι 1x10⁵ s⁻¹.⁶²⁻⁶⁴

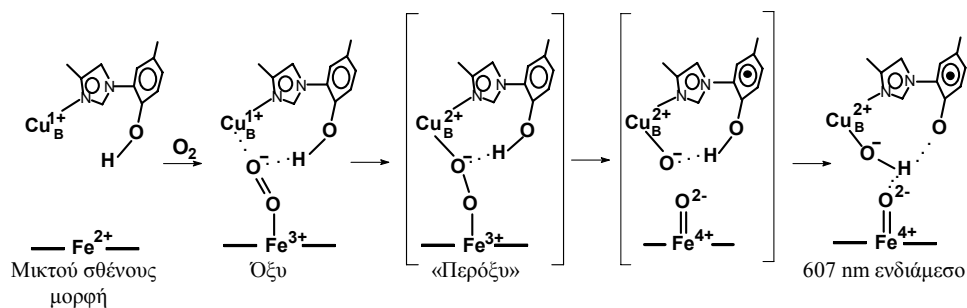
Το όξυ ενδιάμεσο μετατρέπεται στο γνωστό ως 607 nm ενδιάμεσο, μέσω επαναδιευθέτησης των ηλεκτρονίων μέσα στο διπυρηνικό κέντρο. Η σταθερά της ταχύτητας σχηματισμού αυτού του ενδιάμεσου είναι 5x10³ s⁻¹.^{65,66} Το οπτικό φάσμα διαφοράς, ως προς το οξειδωμένο ένζυμο, χαρακτηρίζεται από μία ταινία με μέγιστο απορρόφησης στα 607 nm και τη μετατόπιση της Soret ταινίας στα 428 nm.^{66,67} Η δομή αυτού του ενδιάμεσου υπήρξε αντικείμενο έντονων διαφωνιών. Επειδή μέχρι αυτό το σημείο του καταλυτικού κύκλου έχει γίνει προσθήκη μόνο δύο ηλεκτρονίων, αρχικά είχε θεωρηθεί ότι πρόκειται για μία περόξυ ένωση, της μορφής $\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^- \text{Cu}_{\text{B}}{}^{2+}$ ή $\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^- \text{H Cu}_{\text{B}}{}^{1+}$.⁶⁸⁻⁷² Ωστόσο μελέτες Raman υποστηρίζουν το σχηματισμό ενός φερυλίου με $\nu(\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{4+}=\text{O}^{2-})=804 \text{ cm}^{-1}$.^{35,73-75} Η σχάση του δεσμού O=O σ' αυτό το σημείο είχε υποστηριχθεί πρώτα από τους Weng et al.,⁷⁶ οι οποίοι θεώρησαν ότι οι αλλαγές που παρατηρούνται στα οπτικά φάσματα δηλώνουν το σχηματισμό μίας φέρυλο ένωσης.

Στη συνέχεια του κύκλου πραγματοποιείται η αναγωγή του 607 nm ενδιάμεσου, η οποία συνοδεύεται από την άντληση H⁺ και οδηγεί στο σχηματισμό του φέρυλο ενδιάμεσου (ένωση F). Το φέρυλο ενδιάμεσο χαρακτηρίζεται από το μέγιστο απορρόφησης στα 580 nm, στο φάσμα διαφοράς ως προς το οξειδωμένο ένζυμο και τη $\nu(\text{Fe}_{\text{a}_3}{}^{4+}=\text{O}^{2-})=786 \text{ cm}^{-1}$, στο φάσμα συντονισμού Raman.^{38,67,77,78} Έχει βρεθεί ότι η αντίδραση 607 nm ενδιάμεσο→F επιβραδύνεται με τη μείωση του pH (pKa 7.9) και με την αλλαγή του διαλύτη από H₂O σε D₂O. Το ισοτοπικό φαινόμενο που μετρήθηκε είναι k_H/k_D=1.4.⁷⁹ Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τα H⁺ που μπορούν να ληφθούν από το διάλυμα.⁷⁹

Το τελευταίο ενδιάμεσο που έχει παρατηρηθεί είναι η υδρόξυ ένωση της αίμης α_3 , η οποία χαρακτηρίζεται από τη $\nu(\text{Fe-OH})=450 \text{ cm}^{-1}$.^{67,80-83} Η αντίδραση αυτή συνοδεύεται από τη λήψη ενός H⁺ από το διάλυμα. Η τιμή της σταθεράς της ταχύτητας της αντίδρασης

εξαρτάται από το pH και έχει προσδιοριστεί ότι είναι από 800 ως 1000 s⁻¹.^{66,79,83} Γι' αυτό το στάδιο έχει επίσης βρεθεί σημαντικό ισοτοπικό κινητικό φαινόμενο και έχει προταθεί ότι η ταχύτητα καθορίζεται από τα διαθέσιμα πρωτόνια.⁷⁹

Το σημείο του καταλυτικού κύκλου στο οποίο πραγματοποιείται η σχάση του δεσμού O=O υπήρξε αντικείμενο πολλών συζητήσεων. Το γεγονός ότι το 607 nm/804 cm⁻¹ ενδιάμεσο έχει δομή φερυλίου, σημαίνει ότι ο δεσμός O=O διασπάται μετά την προσθήκη δύο μόνο e⁻ στο ένζυμο. Ο σχηματισμός όμως ενός φερυλίου Fe_{a3}⁴⁺=O²⁻ και μίας υδρόξυ ένωσης Cu_B²⁺-OH, από το Fe_{a3}²⁺-O₂ ενδιάμεσο, απαιτεί την ύπαρξη 4 e⁻ και ενός H⁺ διαθέσιμων μέσα στο ένζυμο. Τρία e⁻ είναι άμεσα διαθέσιμα στο διπυρηνικό κέντρο: δύο από την αίμη a₃, η οποία οξειδώνεται από τη +2 στη +4 κατάσταση και ένα από το Cu_B¹⁺ που επίσης οξειδώνεται. Η Tyr244, η οποία απέχει μόλις 3.2 Å από το Fe_{a3}, είναι ο πιθανός δότης του τέταρτου e⁻ και του ατόμου του υδρογόνου που απαιτούνται. Ο μηχανισμός, ο οποίος έχει προταθεί για τη μετάβαση από το όξυ στο ενδιάμεσο P φαίνεται στο σχήμα 1.6.³⁵ Μετά το σχηματισμό του Fe_{a3}²⁺-O₂, ακολουθεί ο σχηματισμός ενός περόξυ ενδιαμέσου με δομή γέφυρας Fe_{a3}³⁺-O⁻-O⁻-Cu_B²⁺, για τη διατήρηση της ηλεκτροουδετερότητας και της τάξης των δεσμών. Αυτό το περόξυ ενδιάμεσο είναι πολύ



Σχήμα 1.6 Προτεινόμενος μηχανισμός για τη σχάση του δεσμού O-O.³⁵

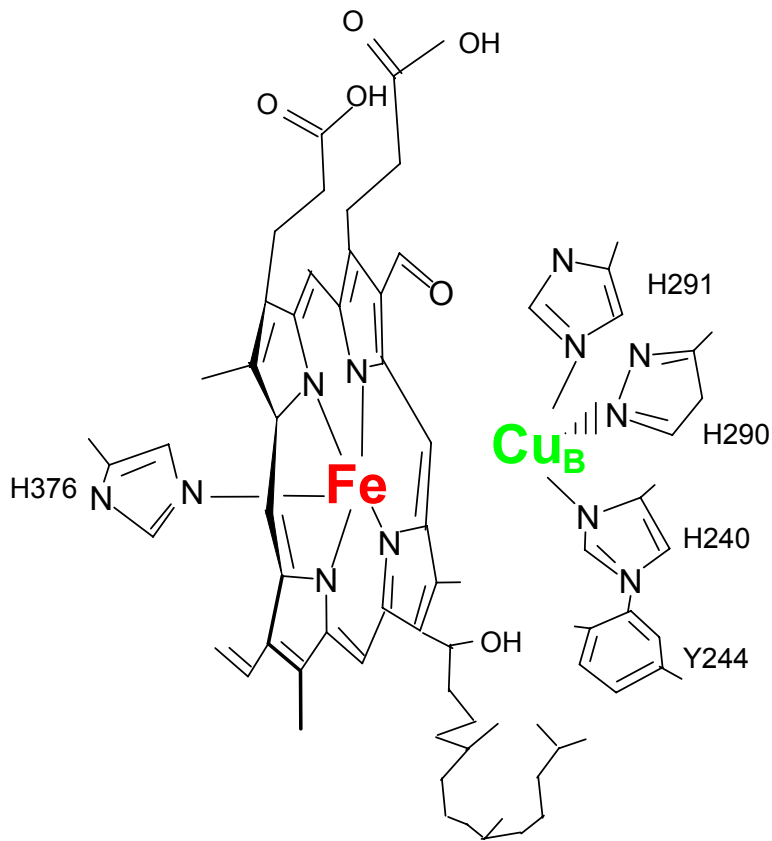
ασταθές και αποσπά πολύ γρήγορα ένα άτομο υδρογόνου από τη γειτονική Tyr244. Ταυτόχρονα, μ' ένα συντονισμένο τρόπο, ο δεσμός O-O σχάζεται και σχηματίζεται μία φέρυλο και μία υδρόξυ δομή, ενώ η Tyr244 οξειδώνεται και σχηματίζεται μία ουδέτερη ρίζα Tyr'. Έτσι, μία πιθανή δομή για το ενδιάμεσο P είναι: a₃⁴⁺=O²⁻---HO-Cu_B²⁺-His-Tyr'.

1.1.6 Δομή και δυναμική του διπυρηνικού κέντρου αίμη-Cu_B. Οι ενδείξεις που υπάρχουν από τις φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης εξωγενών ligands.

Τα ενδιάμεσα, τα οποία έχουν ανιχνευθεί κατά την αντίδραση του O₂ με την κυτοχρωμική οξειδάση, είναι ενώσεις ιδιαίτερα τοξικές για τον οργανισμό, εάν απελευθερωθούν στο κύτταρο. Το διπυρηνικό κέντρο αποδεικνύεται ιδανικό για την πραγματοποίηση αυτής της αντίδρασης, καθώς συγκρατεί και απομονώνει από την υπόλοιπη πρωτεΐνη τα ενδιάμεσα τοξικά προϊόντα, απελευθερώνοντας μόνο το τελικό προϊόν της αντίδρασης, το H₂O.

Παράλληλα, τα αποτελέσματα των μετρήσεων μεταφοράς φορτίου προτείνουν ότι η μετατόπιση των H⁺ πραγματοποιείται σε ορισμένα μόνο στάδια του καταλυτικού κύκλου.^{1,2,83} Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι οι δύο λειτουργίες του ενζύμου είναι συζευγμένες μεταξύ τους. Τα μοντέλα που έχουν αναπτυχθεί για το μηχανισμό της σύζευξης προτείνουν την άμεση ή έμμεση εμπλοκή του διπυρηνικού κέντρου, μέσω των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν σ' αυτό και το περιβάλλον γύρω απ' αυτό κατά την αναγωγή του οξυγόνου.⁸⁴⁻⁸⁶

Η παρουσία του Cu_B μόλις 4.9 Å μακριά από το σίδηρο της αίμης (σχήμα 1.5) δημιουργεί το ερώτημα ποιος είναι ο ρόλος του Cu_B στην κατάλυση και σε ποια έκταση μπορεί ο Cu_B να αλληλεπιδράσει με τις μερικώς ανηγμένες μορφές του οξυγόνου. Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα 607 nm/804 cm⁻¹ και 580 nm/786 cm⁻¹ ενδιάμεσα έχουν δομή φερυλίου.^{35,38,67,73-78,87} Όμως παραμένουν άγνωστα τα ιδιαίτερα γνωρίσματα που έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διαφορά στην α-ταινία απορρόφησης και τη ν(Fe⁴⁺=O²⁻) συχνότητα. Έχει προταθεί ότι οι διαφορετικές οπτικές ιδιότητες ίσως αντανακλούν μία μεταβολή της απόστασης Fe-Cu_B, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του περιβάλλοντος της



Σχήμα 1.7 Το διπυρηνικό κέντρο στην κυτοχρωμική οξειδάση.

αίμης.^{76,89} Επίσης, το γεγονός ότι στο επίπεδο του 607 nm ενδιαμέσου έχει ήδη πραγματοποιηθεί η σχάση O-O, θέτει το ζήτημα εάν ένα περόξυ ενδιαμέσο πράγματι σχηματίζεται και αν σχηματίζεται ποια είναι η δομή του. Μια σειρά από πιθανές

δομές έχουν προταθεί στις οποίες το υποτιθέμενο ενδιάμεσο αλληλεπιδρά άμεσα ή καθόλου με το Cu_B (π.χ. $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^-\text{-Cu}_B^{2+}$, $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-H}$).⁶⁸⁻⁷²

Από φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης εναλλακτικών ligands όπως το CO , το N_3^- και το CN^- υπάρχουν ενδείξεις ότι η δραστηριότητα του διπυρηνικού κέντρου σχετίζεται με τις περισσότερες λειτουργίες του ενζύμου απ' ότι είχε αρχικά υποθεθεί και αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το Cu_B .

Η θερμοδυναμικά επιθυμητή θέση δέσμευσης του CO , στα πλήρως ανηγμένα και μικτού σθένους ένζυμα είναι ο Fe^{2+} . Όμως FTIR μελέτες της φωτόλυσης του συμπλόκου $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ έχουν δείξει ότι το CO δεσμεύεται προσωρινά στο Cu_B^{1+} πριν την έξοδό του στο διαλύτη.^{51,52} Επίσης, κινητικές μελέτες της φωτοδιάσπασης/επαναδέσμευσης του CO στην CcO αποδεικνύουν ότι το CO δεσμεύεται αρχικά στο Cu_B^{1+} πριν τη δέσμευσή του στο Fe^{2+} .^{46,48,49,90,91} Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο Cu_B αποτελεί μία ενδιάμεση θέση δέσμευσης κατά την είσοδο και την έξοδο των ligands στο διπυρηνικό κέντρο.⁴⁶ Αυτή η υπόθεση είναι σε συμφωνία με τα κινητικά δεδομένα για το όξυ ενδιάμεσο, τα οποία προτείνουν δέσμευση του O_2 σε μία ενδιάμεση θέση πριν τη δέσμευσή του στο Fe^{2+} .⁴⁵

Οι κινητικές μελέτες της φωτοδιάσπασης/επαναδέσμευσης του CO στην CcO σε θερμοκρασία δωματίου δείχνουν ότι, μετά τη διάσπαση του δεσμού $\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO}$, του CO δεσμεύεται στο Cu_B^{1+} σε λιγότερο από 1ps,⁹¹ όπου παραμένει για 1.5 μs περίπου⁴⁸ και στη συνέχεια απελευθερώνεται στο διαλύτη. Η επαναδέσμευση του CO στο $\text{Fe}_{a_3}^{2+}$ συμβαίνει μέσω του Cu_B^{1+} με μία διαδικασία η οποία εξαρτάται απ' τη συγκέντρωση του CO στο διαλύτη και πραγματοποιείται σε χρονική κλίμακα των ms.⁴⁹ Επίσης, μελέτες με χρονοεξαρτώμενη φασματοσκοπία Raman δείχνουν ότι η $\nu(\text{Fe-His})$, η οποία παρατηρείται στους 214 cm^{-1} στο πλήρως ανηγμένο μη υποκατεστημένο ένζυμο, μετατοπίζεται στους $220\text{-}222\text{ cm}^{-1}$ κατά τη φωτόλυση του CO ^{46,94-97} και επανέρχεται στη συχνότητα ισορροπίας σε χρόνο περίπου 1μs.⁹⁵ Παρόμοια φαινόμενα έχουν παρατηρηθεί και για το κυτόχρωμα *bo3* απ' το *E. coli*, ωστόσο έχουν μετρηθεί διαφορετικοί χρόνοι επαναδέσμευσης του CO και επαναφοράς της $\nu(\text{Fe-His})$ στη συχνότητα ισορροπίας, γεγονός το οποίο προτείνει ότι υπάρχουν διαφορές στη δυναμική των $a_3\text{-Cu}_B$ και $o_3\text{-Cu}_B$ μονάδων, ως προς τη φωτόλυση του CO .⁹⁸

Για τη δικαιολόγηση των παραπάνω αποτελεσμάτων, κυρίως της χαμηλής ταχύτητας επαναδέσμευσης και της μετατόπισης της $\nu(\text{Fe-His})$ συχνότητας, ο Woodruff και

οι συνεργάτες του πρότειναν ότι, κατά τη δέσμευση του CO στο Cu_B^{1+} , ένα ενδογενές ligand του Cu_B αποσπάται και δεσμεύεται στην έκτη θέση συναρμογής της αίμης, προκαλώντας το σπάσιμο του δεσμού Fe-His376.^{46,49} Σύμφωνα μ' αυτή την ερμηνεία, το καθοριστικό στάδιο της επαναδέσμευσης του CO στο Fe^{2+} είναι η μεταφορά του ενδογενούς ligand απ' την αίμη πίσω στο Cu_B . Μία διαφορετική ερμηνεία δίνουν οι Schelvis et al.,⁹⁷ οι οποίοι δε θεωρούν πιθανή μια ανταλλαγή ligands στην εγγύς περιοχή. Αυτοί οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αύξηση της $\nu(\text{Fe-His})$ συχνότητας αντιπροσωπεύει μία ισχυροποίηση του δεσμού Fe-His376 και δικαιολογούν τη χαμηλή ταχύτητα επαναδέσμευσης του CO στο Fe^{2+} , ως συνέπεια του σχηματισμού του Cu^{1+} -CO συμπλόκου μέσω μιας θερμικά ελεγχόμενης πορείας.

Μερικές πολύ ενδιαφέρουσες ιδιότητες του διπυρηνικού κέντρου έχουν επίσης εξαχθεί απ' τις FTIR μελέτες των CO-συμπλόκων των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδάσων. Αυτές οι μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων, των α και β μορφών του διπυρηνικού κέντρου στις CO-υποκατεστημένες οξειδάσες.^{51,52,99-102} Αυτές οι καταστάσεις χαρακτηρίζονται από διαφορετικές $\nu(\text{C-O})$ και πρόσφατα αποδείχθηκε ότι είναι ευαίσθητες στη μεταβολή του pH.¹⁰² Η αιτία σε μοριακό επίπεδο της διαφοροποίησης των δύο καταστάσεων δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη.⁹⁹

Μια πρόσφατη FTIR μελέτη της φωτόλυσης του o_3 -CO συμπλόκου του κυτοχρώματος bo_3 απ' το *E. coli* έδειξε ότι η δέσμευση του CO στο Cu_B^{1+} , μετά τη φωτόλυση, προκαλεί μία αλλαγή στη διαμόρφωση του Glu278 (Glu242 στην CcO των μιτοχονδρίων), το οποίο βρίσκεται 11-12 Å μακριά απ' το διπυρηνικό κέντρο.¹⁰³ Προτάθηκε ότι αυτή η αλλαγή της διαμόρφωσης προκύπτει από μια αλλαγή της οξύτητας κατά Lewis του Cu_B^{1+} ή την αντικατάσταση ενός ligand του Cu_B .¹⁰³

Το N_3^- επιδεικνύει ένα σχετικά ισχυρό πεδίο υποκαταστατών για εκείνες τις αιμοπρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να είναι σε χαμηλού ή υψηλού spin διαμόρφωση. Για παράδειγμα, όταν το αζίδιο δεσμεύεται στη μυοσφαιρίνη λαμβάνεται ένα μίγμα δύο συμπλόκων αίμη Fe^{3+} - N_3 , ενός υψηλού spin ($S=5/2$) και χαμηλού spin ($S=1/2$) συμπλόκου.¹⁰⁴ Μελέτες μαγνητικής επιδεικτικότητας, MCD και EPR επιβεβαιώνουν ότι η βασική κατάσταση της Mb- N_3 είναι η $S=1/2$.¹⁰⁴

Αντίθετα, MCD μελέτες της δέσμευσης του N_3^- στην CcO των μιτοχονδρίων^{105,106} και το κυτόχρωμα bo_3 απ' το *E. coli*¹⁰⁷ δείχνουν καθαρά την ύπαρξη ενός υψηλού spin Fe^{3+} μετά τη δέσμευση του αζιδίου. Αυτό σημαίνει ότι το N_3^- δεν προκαλεί μεταβολή της spin

κατάστασης της αίμης στο διπυρηνικό κέντρο. Έχει προταθεί ότι η εξασθένιση του πεδίου της υποκατάστασης πραγματοποιείται με το σχηματισμό μιας γέφυρας αζιδίου μεταξύ της αίμης και του Cu_B^{2+} .¹⁰⁶ Αυτή η πρόταση είναι σε συμφωνία με EPR μελέτες, οι οποίες δείχνουν ότι η spin σύζευξη αίμη- Cu_B^{2+} διατηρείται μετά τη δέσμευση του αζιδίου.^{105,106,108} Όμως, βάσει πρόσφατων κινητικών, EPR, και MCD αποτελεσμάτων προτάθηκε ότι το αζίδιο δεσμεύεται ως τελικό ligand στο Cu_B στο κυτόχρωμα bo_3 , ενώ πρόσφατες FTIR μελέτες των CcO-N_3 ^{105,109,110} και $bo_3\text{-N}_3$ ^{108,111} αναφέρουν την ύπαρξη δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ για κάθε ένζυμο, ενδεικτικό της ύπαρξης δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του N_3^- στην πρωτεΐνη. Ο χαρακτηρισμός αυτών των δονήσεων παραμένει ένα αίνιγμα, καθώς ένας αριθμός διαφορετικών πιθανών δομών έχουν προταθεί για την ερμηνεία των παρατηρούμενων $\nu_{as}(\text{N}_3)$.

Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει με το αζίδιο, MCD και EPR μελέτες της δέσμευσης του CN^- στην CcO από τα μιτοχόνδρια και το κυτόχρωμα bo_3 απ' το *E. coli* επιβεβαιώνουν τη μετάβαση από μία κατάσταση υψηλού spin σε μία κατάσταση χαμηλού spin για την αίμη α_3 ¹¹²⁻¹¹⁶ και την αίμη o_3 ¹⁰⁸. Ταυτόχρονα όμως δεν παρατηρείται κάποιο EPR σήμα για το Cu_B^{2+} ή η δημιουργία μίας $\text{Fe}^{3+}\text{-CN}$ δομής χαμηλού spin. Αυτά τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το CN^- δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο, αντικαθιστώντας το υποτιθέμενο ligand γέφυρας, μέσω του οποίου πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται η spin σύζευξη Fe-Cu_B στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου.^{112-116,108}

Η παραδοχή ότι το CN^- σχηματίζει μία γέφυρα (Fe-CN-Cu_B) στο διπυρηνικό κέντρο αμφισβητήθηκε απ' τους Yoshikawa et al.,¹¹⁷ οι οποίοι ερμηνεύοντας τα FTIR αποτελέσματα τους, υποστήριξαν ότι το CN^- σχηματίζει ένα σύμπλοκο τελικής γεωμετρίας με το Cu_B^{2+} , το οποίο χαρακτηρίζεται από τη $\nu(\text{CN})=2152\text{ cm}^{-1}$. Μετέπειτα FTIR μελέτες επιβεβαιώνουν την ύπαρξη της $\nu(\text{CN})=2152\text{ cm}^{-1}$ δόνησης για το CcO-CN σύμπλοκο, έχουν όμως διατυπωθεί διαφορετικές υποθέσεις για την προέλευσή της.^{105,118,119} Έχει προταθεί ότι η 2152 cm^{-1} δόνηση οφείλεται στο σχηματισμό είτε ενός συμπλόκου γέφυρας, στο οποίο ο Cu_B^{2+} συμμετέχει άμεσα (Fe-CN-Cu_B)^{105,119} είτε ενός συμπλόκου $\text{Fe}^{3+}\text{-CN}$ τελικής γεωμετρίας, στο οποίο το άτομο του αζώτου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μ' ένα ligand του Cu_B ¹¹⁸.

Συνοψίζοντας, ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της δέσμευσης των CO , CN^- και N_3^- μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή και τη δυναμική του διπυρηνικού κέντρου και να οδηγήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για πιθανές διαμορφώσεις της

ενεργής θέσης και τον προσδιορισμό των λειτουργικών και δομικών ιδιοτήτων του Cu_B , καθώς και το ρόλο του Cu_B στα φαινόμενα συναρμογής στο διπυρηνικό κέντρο.

1.2 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας που παρουσιάζεται εδώ είναι ο χαρακτηρισμός της δομής και της δυναμικής του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών, κατά τη δέσμευση μικρών επιλεγμένων μορίων ή ιόντων (υποκαταστάτες/ligands) στην οξειδωμένη και πλήρως ανηγμένη μορφή και ο προσδιορισμός των γνωρισμάτων που καθορίζουν τη δέσμευση των εξωγενών ligands. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία UV-Vis, FTIR και συντονισμού Raman.

Η οπτική φασματοσκοπία δίνει πληροφορίες για την ηλεκτρονική διαμόρφωση των συμπλόκων που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα ligands. Επιπλέον, η μελέτη με UV-Vis φασματοσκοπία της τιτλοδότησης των ενζύμων με τα ligands επιτρέπει τον χαρακτηρισμό των ενδιάμεσων φάσεων της δέσμευσης και τον προσδιορισμό των σταθερών διάστασης αυτών. Οι σταθερές διάστασης ουσιαστικά περιγράφουν τη χημική συγγένεια μεταξύ των ligands και της θέσης δέσμευσης. Οι φασματοσκοπίες υπερόθρου (FTIR) και συντονισμού Raman παρέχουν ακριβείς πληροφορίες για τη δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων, επειδή οι δονήσεις που οφείλονται στη δέσμευση των ligands επηρεάζονται όχι μόνο από την ισχύ των δεσμών, αλλά και από τις στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με την εισαγωγή του υποκαταστάτη. Με τη φασματοσκοπία συντονισμού Raman μπορεί να προσδιοριστεί η spin και οξειδωτική κατάσταση, αλλά και ο αριθμός συναρμογής των προσθετικών ομάδων αίμης. Η φασματοσκοπία FTIR δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της διαμόρφωσης και της γεωμετρίας των ligands, τα οποία μπορούν να δεσμεύονται και σε άλλες, μεταλλικές ή μη θέσεις, πέραν των ομάδων αίμης.

Ο συνδυασμός των τριών τεχνικών επιτρέπει το χαρακτηρισμό της δέσμευσης των ligands καθώς οι πληροφορίες που αντλούνται χαρακτηρίζουν: 1) τη θέση και την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου, στο οποίο δεσμεύεται ο υποκαταστάτης 2) την επίδραση πάνω στη θέση της υποκατάστασης όλων των οξειδοαναγωγικών επιπέδων, αλλά και των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων θέσεων μέσα στο μόριο,

3) τη δομή και τη δυναμική γύρω από τη θέση δέσμευσης, καθώς και την επίδραση του pH και του μέσου στη δέσμευση του υποκαταστάτη.

Στην εργασία που παρουσιάζεται εδώ, μελετάται αρχικά η δέσμευση του CO στο πλήρως ανηγμένο κυτοχρώμα aa_3-600 από το *B. subtilis* (κεφάλαιο 4). Για το κυτοχρώμα aa_3-600 έχουν παρατηρηθεί δύο $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ δονήσεις, οι οποίες αποδίδονται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της proximal ιστιδίνης.¹²⁰ Επομένως το κυτοχρώμα aa_3-600 είναι ένα θαυμάσιο σύστημα για τη διερεύνηση της επίδρασης στη δέσμευση του CO των ιδιοτήτων της εγγύς περιοχής αλλά και των ιδιοτήτων της proximal ιστιδίνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση της $\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO}$ μονάδας καθορίζεται τόσο από τις ιδιότητες της εγγύς περιοχής όσο και από τις ιδιότητες της proximal ιστιδίνης.

Για το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του διπυρηνικού κέντρου στην οξειδωμένη μορφή, μελετάται η δέσμευση του N_3^- στο κυτοχρώμα aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (κεφάλαιο 5), το κυτοχρώμα bo_3 από το *E. coli* (κεφάλαιο 6) και την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια (κεφάλαιο 7). Επίσης σ' αυτή την ερευνητική εργασία χαρακτηρίζεται η αλληλεπίδραση του CN^- με την πλήρως οξειδωμένη μορφή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια, του κυτοχρώματος bo_3 από το *E. coli* και του κυτοχρώματος aa_3-600 από το *B. subtilis* (κεφάλαιο 8). Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι ο Cu_B διαδραματίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ενζύμου, καθώς μπορεί να μεταβάλλει τη θέση του προκειμένου να σχηματίσει σύμπλοκα γέφυρας με τη γειτονική αίμη.

Βιβλιογραφία

1. Wikstrom, M. *Nature* **1989**, *338*, 776-778.
2. Wikstrom, M. *Nature* **1977**, *266*, 271-273.
3. Babcock, G.T.; Wikstrom, M. *Nature* **1992**, *356*, 301-309.
4. Calhoun, M.W.; Thomas, J.W.; Gennis R.B. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 325-330.
5. Saraste, M.; Holm, L.; Lemieux, L.; Lubben, M.; Van der Oost, J. *Biochemical Society Transactions* **1991**, *19*, 608-612.
6. Anraku, Y.; Gennis, R.B. *TIBS* **1987**, *12*, 262-266.
7. Garcia-Horsman, J. A.; Barquera, B.; Rumbley, J.; Ma, J.; Gennis, R.B. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5587-5600.
8. Saraste, M. *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 331-336.
9. Ferguson-Miller, S.; Babcock, G.T. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2889-2907.

10. Michel, M.; Berh, J.; Harrenga, A.; Kannt, A. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 329-356.
11. Bisson, R. In *Bioelectrochemistry III: Separation across Biomembranes* (Milazzo, G & Blank, M., eds) Plenum Press, London and New York **1990**, 125-177.
12. Chance, S. I.; Li, P. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1,12.
13. Hendler, R. W.; Pardhasaradhi, K.; Reynafarje, B.; Ludwig, B. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 415-423.
14. Van Gelder, B. F.; Beinert, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *189*, 1-24.
15. Barnes, Z. K.; Babcock, G. T.; Dye, J. L. *Biochemistry* **1991**, *30*, 7597-7603.
16. Moss, T.H.; Shapiro, E.; King, T. E.; Beinert, H.; Hartzell, C. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8072-8073.
17. Tweedle, M. F.; Wilson, L. J.; Garcia-Iniguez, L.; Babcock, G. T.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8065-8071.
18. Brudvig, G. W.; Stevens, T. H.; Morse, R. H.; Chan, S. I. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3912-3921.
19. Li, P. M.; Gelles, J.; Chan, S. I.; Sullivan, R. J.; Scott, R. A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2091-2095.
20. Scott, R. A. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18*,137-158.
21. Fan, Y. C.; Ahmed, I.; Blachburm, N, J.; Boswell, J. S.; Verkhovskaya, M, L.; Hoffman, B. M.; Wikstrom, M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10245-10255.
22. Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, *269*, 1069-1074.
23. Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Tamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashina, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1996**, *272*, 1136-1144.
24. Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashina, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libeu, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
25. Iwata, S.; Ostermeier, C.;Ludwig, B.; Michel, H. *Nature* **1995**, *376*, 660-669.
26. Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**, *94*, 10547-10553.
27. Riistama, S.; Puustinen, A.; Garcia-Horseman, A.; Iwata, S.; Michel, H.; Wikstrom, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 1-4.
28. Haltia, T.; Ginel, M.; Harms, N.; Nakari, T.; Raitio, M.; Wikstrom, M.; Saraste, M. *EMBO. J.* **1989**, *8*, 3571-3579.
29. Blackburn, N. J.; Barr, M. E.; Woodruff, W, H.; van der Oost, J.; DeVries, S. *Biochemistry* **1994**, *33*, 10401-10407.
30. Kelly, M.; Lappalainen, P.; Talbo, G.; Hantia, T.; vzn der Oost J.; Saraste, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16781-16787
31. Ramirez, B. E.; Malmstrom, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Proc. Natl. Acad. USA* **1995**, *92*, 11949-11951.
32. Hill, B. C. *J.Biol. Chem.* **1991**, *266*, 2219-2226.
33. Hill, B. C. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2419-2425.

34. Brzezinski, P. *Biochemistry* **1996**, *35*, 5611-5615.
35. Proshlyakov, D. A.; Pressler, M. A.; Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8020-8025.
36. Antalıs, T. M.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 6194-6206.
37. Winkler, J. R.; Malmstrom, B. G.; Gray, H.B. *Biophys. Chem.* **1995**, *54*, 199-209.
38. Larsson, S.; Kallebring, B.; Wittung, P.; Malmstrom, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7167-7171.
39. Zickermann, V.; Verkhovsky, M.; Morgan, J.; Wikstrom, M.; Anemuller, S.; Bill, E.; Steffens, G.; Ludwig, B. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 686-693.
40. Zhen, Y.J.; Fetter, J.; Ferguson-Miller, S. *Biophys. J* **1996**, *70*, A353.
41. Gelles, J.; Blair, D. F.; Chan, S. I. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *853*, 205-236.
42. Moody, A. J.; Brandt, U.; Rich, P. R. *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 101-105.
43. Mitchell, R.; Rich, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1186*, 19-26.
44. Verkhovsky, M. I.; Morgan, J. E.; Wikstrom, M.; *Biochemistry* **1995**, *34*, 7483-7491.
45. Blackmore, R. S.; Greenwood, C.; Gibson, Q. H. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 19245-19249.
46. Woodruff, W. H.; Einarsdottir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2588-2592.
47. Einarsdottir, O. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1229*, 129-147.
48. Dyer, R. B.; Einarsdottir, O.; Killough, P. M.; Lopez-Garcia, J. J.; Woodruff, W.H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7657-7659.
49. Einarsdottir, O.; Dyer, R.B.; Lemon, D. D.; Killough, P. M.; Hubig, S. M.; Atherton, S. J.; Lopez-Garriga, J. J.; Palmer, G.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12013-12024.
50. Lemon, D. D.; Calhoun, M. W.; Gennis, R. B.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11953-11956.
51. Alben, J. O.; Moh, P. P.; Fiamingo, F. G., Atschul, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 234-237.
52. Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A.; Moh, P. P.; Alben, J. O.; *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1639-1650.
53. Chance, B.; Saronio, C.; Leigh, J. S., Jr. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 9226-9237.
54. Hill, B. C.; Greenwood, C. *Biochem. J.* **1984**, *215*, 659-667.
55. Verkhovsky, M. I.; Morgan, J. E.; Puustinen, A.; Wikstrom, M. *Biochemistry* **1996a**, *35*, 16241-16146.
56. Varotsis, C.; Woodruff, W. H.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6439-6440.
57. Han, S.; Ching, Y.; Rousseau, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2491-2495.
58. Ogura, T.; Takahashi, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S Kitagawa, T. *J. Am. Soc. Chem.* **1990**, *112*, 5630-5631.
59. Brunner, H. *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 129-130.
60. Van Wart, H. E.; Zimmer, J. *J. Biol. Chem.* **1985**, *265*, 8372-8377.

61. Oertling, W. A.; Keam, R. T.; Wever, R.; Babcock, G. T. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 2633-2645.
62. Oliveberg, M.; Malmstrom, B. G. *Biochemistry*. **1992**, *31*, 3560-3563.
63. Verkhovskiy, M. I.; Morgan, M.; Wikstrom, M. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3079-3086.
64. Bailey, J. A.; James, C. A.; Woodruff, W. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 1055-1060.
65. Hill, B. C.; Greenwood, C. *Biochem. J.* **1984**, *218*, 913-921.
66. Oliveberg, M.; Brzezinski, P.; Malmstrom, B. G. *Biochim. Biophys. Acta.* **1989**, *977*, 322-328.
67. Ogura, T.; Takahashi, S.; Hirota, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8527-8536.
68. Vygodina, T.; Konstantinov, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *973*, 390-398.
69. Wikstrom, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4051-4054.
70. Wikstrom, M.; Morgan, J. E. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10266-10273.
71. Orii, Y. *Ann. NY Acad. Sci.* **1988**, *550*, 105-117.
72. Vygodina, T.; Konstantinov, A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *550*, 124-138.
73. Proshlyakov, D. A.; Ogura, D.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appelman, E. H.; et al. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29385-29388.
74. Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *Biochemistry*. **1996**, *35*, 8580-8586.
75. Proshlyakov, D. A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *Biochemistry* **1996**, *35*, 76-82.
76. Weng, L.; Baker, G. M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5727-5733.
77. Han, S.; Ching, Y.; Rousseau, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8408-8412.
78. Varotsis, C.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7357-7362.
79. Hallen, S.; Nilson, T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11853-11859.
80. Han, S.; Ching, Y.; Rousseau, D. L. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6604-6607.
81. Han, S.; Ching, Y.; Rousseau, D. L. *Nature* **1990**, *348*, 89-90.
82. Ogura, T.; Hirota, S.; Proshlyakov, D. D.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5443-5449.
83. Verkhovskiy, M. I.; Jasaitis, A.; Verkhovskaya, M.; Morgan, J. E.; Wikstrom, M. *Nature* **1999**, *400*, 480-483.
84. Morgan, J. E.; Verkhovskiy, M. I.; Wikstrom, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994**, *26*, 599-608.
85. Wikstrom, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1458*, 188-198.
86. a) Michel, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12819-12824 b) Michel, H. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15129-15140.
87. Fabian, M.; Palmer, G. *Science*
88. Han, S.; Takahashi, S.; Rousseau, D. L. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1910-1919.
89. Fabian, M.; Palmer, G. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13802-13810.

90. Stoutland, P. O.; Lambry, J. C.; Martin, J. L.; Woodruff, W. H. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 6406-6408.
91. Dyer, R. B.; Peterson, K. A.; Stoutland, P. O.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6276-6277.
92. Van Steelandt-Frentrup, J.; Salmeen, I.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5981-5982.
93. Ogura, T.; Hon-Nami, K.; Oshima, T.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7781-7783.
94. Findsen, E. W.; Ondrias, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5736-5738.
95. Findsen, E. W.; Centeno, J.; Babcock, G. T.; Ondrias, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5367-5371.
96. Sassaroli, M.; Ching, Y. C.; Agrade, P. V.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2496-2502.
97. Schelvis, J. P. M.; Deinum, G.; Varotsis, C. A.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *109*, 8409-8416.
98. Varotsis, C.; Kreszowski, D.H.; Babcock, G. T. *Biospectroscopy* **1996**, *3*, 331-338.
99. Wang, J.; Takahashi, S.; Hosler, J. P.; Mitchell, D. M.; Ferguson-Miller, S.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9818-9825.
100. Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9363-9364.
101. Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
102. Mitchell, D. M.; Shapleigh, J. P.; Archer, A. M.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9446-9450.
103. Puustinen, A.; Baily, J. A.; Dyer, R. B.; Mecklenburg, S. L.; Wikström, M.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13195-13200.
104. a) Eglinton, D. G.; Gadsby, P. M. A.; Sievors, G.; Peterson, J.; Thomson, A. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1983**, *742*, 648-658. b) Hori, H.; Fujiii, M.; Shiro, Y.; Jizuka, T.; Adachi, S.; Morishima, J. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5715-5719. c) Iizuka, T.; Kotani, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *181*, 275-286. d) Iizuki, I.; Kotani, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *154*, 417-419.
105. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1833-1843.
106. Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Gadsby, P. M. A.; Peeterson, J.; Eglinton, O. G.; Hill, B. C.; Nicholls, P. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *23*, 187-197.
107. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13780-13787.
108. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Anraku, Y.; Hori, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6065-6072.
109. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
110. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
111. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H. *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 191-195.
112. Thomson, A. J.; Johnson, M. K.; Greenwood, C.; Cooding, P. E. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 687-697

113. Thomson, A. J.; Eglinton, D. G.; Hill, B. C.; Greenwood, C. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 167-170.
114. Johnson, M. K.; Eglinton, D. G.; Gooding, P. E.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 699-708.
115. Kent, T. A.; Munck, E.; Dunham, W. R.; Filter, W. F.; Findling, K. C.; Yoshida, J.; Fee, J. A. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 12489-12492.
116. Tweedle, N. F.; Wilson, L. J.; Carcia-Iniguez, L.; Babcock, G. T.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8065-8071.
117. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7945-7958.
118. Yoshikawa, S.; Mochizuki, M.; Zhao, X-Z.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4270-4279.
119. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 164-173.
120. Lauraeus, M.; Wikstrom, M.; Varotsis, C.; Tecklenberg, M. M. J.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10054-10060.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΙ ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ UV-Vis, FTIR ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN

2.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

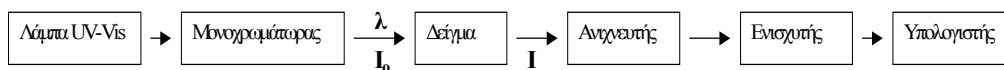
2.1.1 Οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)

Η ενέργεια που απαιτείται για να συμβεί μία ηλεκτρονική μετάβαση αντιστοιχεί σε ενέργεια φωτός κυρίως στην περιοχή του ορατού (400-750 nm) και του υπεριώδους (200-400 nm).¹⁻³ Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) οφείλονται σε μεταβάσεις του μορίου ή του ατόμου από τη βασική (θεμελιώδη) ηλεκτρονική κατάσταση στη διεγερμένη. Όταν σ' ένα άτομο ή μόριο προσπέσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, τότε τα e^- αρχίζουν να ταλαντώνονται λόγω της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας. Η έκταση αυτών των επαγόμενων ταλαντώσεων εξαρτάται από την πολωσιμότητα του μορίου ή του ατόμου, δηλαδή από το πόσο εύκολα μπορεί να διαταραχθεί το ηλεκτρονικό νέφος. Εάν η συχνότητα της ταλάντωσης των ηλεκτρονίων συμπίπτει με τη συχνότητα της ενεργειακής διαφοράς δύο ηλεκτρονικών καταστάσεων, τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συμβεί η μετάβαση.

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

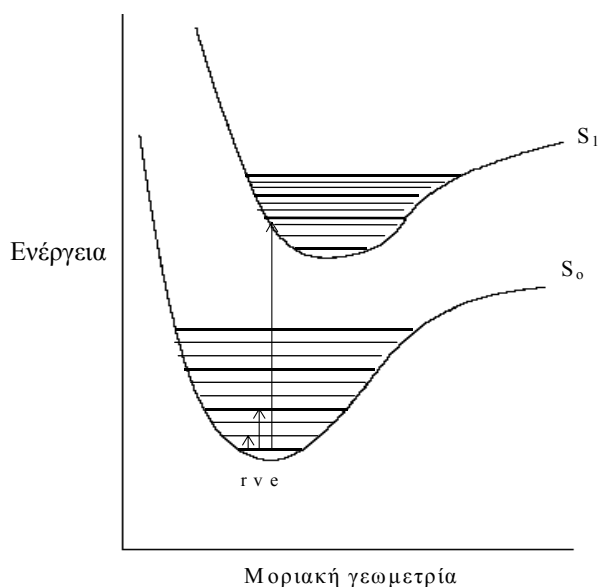
$$A = -\log(I/I_0) = \epsilon c l \quad [2.1]$$

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



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

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



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

Μία ηλεκτρονική μετάβαση είναι επιτρεπτή όταν α) δε μεταβάλλει το spin του e^- ενώ β) μεταβάλλει τη διπολική ροπή. Η ένταση της απορρόφησης εξαρτάται από τη διπολική ροπή P που επάγεται στη διάρκεια της διεγέρσης και αυξάνεται με αυτή. Εάν Ψ_m και Ψ_n

είναι οι κυματικές συναρτήσεις της βασικής και της διεγερμένης ηλεκτρονικής κατάστασης, αντίστοιχα, τότε το ολοκλήρωμα:

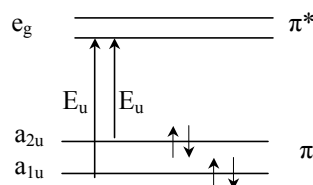
$$P_{mn} = \int \Psi_m P \Psi_n d\nu \quad [2.2]$$

παριστάνει κατά προσέγγιση τη μεταβολή της διπολικής ροπής κατά τη διεύρεση. Εάν $P_{mn}=0$, τότε η διεύρεση είναι απαγορευμένη.

Οι ηλεκτρονικές καταστάσεις περιγράφονται από τα μοριακά τροχιακά. Οι ηλεκτρονικές διεργασίες συχνά αντιστοιχούν σε ανύψωση ενός ηλεκτρονίου από ένα δεσμικό (σ , π) ή μη δεσμικό (n) τροχιακό σ' ένα αντιδεσμικό τροχιακό (σ^* , π^*).¹⁻³ Στα σύμπλοκα των μεταβατικών μετάλλων, όπου συμβαίνει άρση του εκφυλισμού των d τροχιακών των μετάλλων λόγω του πεδίου των υποκαταστατών (ligands), πραγματοποιούνται επίσης $d \rightarrow d$ διεργασίες. Σε μερικά σύμπλοκα είναι δυνατό να συμβαίνει μεταφορά φορτίου (e^-) από ένα κατειλημμένο σ ή π τροχιακό του υποκαταστάτη σ' ένα άδειο d τροχιακό του μετάλλου ή αντίστροφα, από ένα κατειλημμένο τροχιακό του μετάλλου σ' ένα άδειο τροχιακό του ligand.

2.1.2 Τα UV-Vis φάσματα απορρόφησης των ομάδων αίμης

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



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

Τα παραπάνω εξηγούνται σύμφωνα με το μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών του Gouterman.⁴ Σε μία πορφυρίνη υψηλής συμμετρίας (D_{4h}), τα χαμηλότερης ενέργειας μη κατειλημμένα π^* τροχιακά είναι εκφυλισμένα και έχουν συμμετρία e_g , ενώ τα υψηλότερης ενέργειας κατειλημμένα π τροχιακά είναι a_{1u} και a_{2u} συμμετρίας. Επειδή αυτά τα π τροχιακά έχουν σχεδόν την ίδια ενέργεια, υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των $a_{1u} \rightarrow e_g$ και $a_{2u} \rightarrow e_g$ μεταβάσεων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των α και γ ταινιών. Στην περίπτωση της α ταινίας οι διπολικές ροπές των μεταβάσεων σχεδόν αναιρούνται, ενώ στην περίπτωση της γ ταινίας οι διπολικές ροπές προστίθενται. Μέρος της έντασης (περίπου το 10%) επανακάτται για τη χαμηλής ενέργειας π - π^* μετάβαση, μέσω δονητικής σύζευξης με την υψηλής ενέργειας π - π^* μετάβαση, με αποτέλεσμα την εμφάνιση της β ταινίας, όπως ήδη έχει αναφερθεί.

2.1.3 Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων.

Οι δύο ομάδες αίμης μίας τελικής οξειδάσης έχουν διαφορετικές οπτικές ιδιότητες. Συνήθως όμως οι Soret και οι α ταινίες αυτών των ομάδων επικαλύπτονται με αποτέλεσμα το UV-Vis φάσμα του ενζύμου να εμφανίζει μία ευρεία ταινία στα 410-425 nm και μία δεύτερη στα 590-600 nm. Η δεύτερη παράγωγος του φάσματος μπορεί να αναλύσει αυτές τις ταινίες και να δείξει τα λ_{max} των δύο ομάδων αίμης.⁵

Το φάσμα της πλήρως οξειδωμένης, όπως απομονώνεται, κυτοχρωμικής οξειδάσης από καρδιά βοός χαρακτηρίζεται από δύο ευρείες ταινίες, μία γύρω στα 420 nm και μία γύρω στα 600 nm. Η ακριβής θέση του μεγίστου της Soret μετάβασης εξαρτάται από τη μέθοδο παρασκευής του ενζύμου. Άλλα ξεχωριστά χαρακτηριστικά του οξειδωμένου ενζύμου είναι μία ευρεία και ασθενής ταινία στα 830 nm, η οποία θεωρείται ότι οφείλεται

στο Cu_A^{2+} και ένας ώμος στα 655 nm, ο οποίος σχετίζεται με την υψηλού spin διαμόρφωση της αίμης α_3 . Η δεύτερη παράγωγος του φάσματος εμφανίζει δύο ελάχιστα στην περιοχή του Soret, ένα στα 416 nm από την αίμη α_3^{3+} και ένα στα 427 nm από την αίμη α^{3+} . Το φάσμα της αίμης α είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητο από την οξειδωτική κατάσταση και τη συναρμογή της αίμης α_3 . Ισχύει και το αντίθετο. Πλήρη αναγωγή του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του Soret στα 444 nm και της α ταινίας στα 605 nm. Έχει αποδειχθεί ότι, στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου, οι δύο αίμες συνεισφέρουν σχεδόν ισοδύναμα στην περιοχή του Soret, ενώ το 80% της απορρόφησης στα 605 nm οφείλεται στην αίμη α . Στον Πίνακα 2.1 αναφέρονται τα λ_{\max} των δύο ομάδων αίμης σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις του ενζύμου.

Πίνακας 2.1. Τα λ_{\max} στην περιοχή του Soret για την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων από καρδιά βοδιού.⁵

<i>πλήρως οξειδωμένη μορφή ($\lambda_{\max}=418-423$ nm)</i>	
α_3^{3+}	416
α^{3+}	429
<i>πλήρως ανηγμένη μορφή ($\lambda_{\max}=444$ nm)</i>	
α_3^{2+}	444
α^{2+}	444

2.2 ΔΟΝΗΤΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

2.2.1 Εισαγωγή

Οι φασματοσκοπίες υπερύθρου (IR) και Raman παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τις ενέργειες των δονήσεων των μορίων και επομένως για τις δομές των μορίων. Ωστόσο οι δύο τεχνικές οφείλονται σε δύο διαφορετικά φυσικά φαινόμενα. Η φασματοσκοπία υπερύθρου προκύπτει από την απορρόφηση IR ακτινοβολίας από τα δονούμενα μόρια, ενώ η φασματοσκοπία Raman είναι το αποτέλεσμα της ανελαστικής σκέδασης από τα δονούμενα μόρια μίας μονοχρωματικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος στην περιοχή του ορατού ή του υπεριώδους. Και οι δύο μέθοδοι αναφέρονται κατά κύριο λόγο στις θεμελιώδεις μεταβάσεις, δηλαδή εκείνες που

συμβαίνουν μεταξύ της βασικής δονητικής κατάστασης $\nu=0$ και της κατάστασης $\nu=1$. *Ο αυστηρός κανόνας επιλογής για το IR και το Raman εκφράζεται από τη μαθηματική σχέση $\Delta\nu=\pm 1$, όπου η τιμή $+1$ σημαίνει απορρόφηση, ενώ η τιμή -1 σημαίνει εκπομπή.*

Για τα βιολογικά μόρια η φασματοσκοπία Raman έχει το πλεονέκτημα ότι εφαρμόζεται ευκολότερα σε υδατικά διαλύματα, επειδή το νερό δε σκεδάζει σημαντικά ενώ απορροφά ισχυρά στην περιοχή του IR. Ωστόσο η ένταση μίας Raman δόνησης είναι αρκετά χαμηλή. Εάν όμως επιλεγεί η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι μέσα στην περιοχή μίας ταινίας απορρόφησης του μορίου ή κάποιου χρωμοφόρου του μορίου, τότε είναι δυνατό οι εντάσεις μερικών δονήσεων να αυξηθούν δραματικά λόγω του φαινομένου του συντονισμού Raman.

2.2.2 Οι βασικές αρχές της δονητικής φασματοσκοπίας

Τα διατομικά μόρια αποτελούν το καλύτερο σημείο εκκίνησης για την περιγραφή των δονήσεων των πολυατομικών μορίων. Ένα διατομικό μόριο A-B μπορεί να προσεγγιστεί με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή, στο οποίο δύο σημειακές μάζες m_1 και m_2 συνδέονται μέσω αβαρούς ελατηρίου σταθεράς k .^{6,7} Τότε η συχνότητα της δόνησης του δεσμού A-B περιγράφεται από τη εξίσωση που δίνει τη συχνότητα ταλάντωσης του αρμονικού ταλαντωτή:

$$\nu = (1/2\pi)(k/\mu)^{1/2} \quad [2.3]$$

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

$$1/\mu = 1/m_1 + 1/m_2 \quad [2.4]$$

Στην εξίσωση 2.3, η συχνότητα εκφράζεται σε s^{-1} . Για την έκφραση της συχνότητας σε κυματάρθρωμους ν' (cm^{-1}) γίνεται η αντικατάσταση $\nu = (1/\lambda)c = \nu'c$, όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός, οπότε λαμβάνεται η εξίσωση:

$$\nu' = (1/2\pi c)(k/\mu)^{1/2} \quad [2.5]$$

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

$$\nu = (1/2\pi c)(k/\mu)^{1/2} \quad [2.6]$$

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

Είναι γνωστό ότι η ενέργεια είναι κβαντισμένη και ότι τα μόρια έχουν διακριτά δονητικά επίπεδα ενέργειας, το καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε μία τιμή του δονητικού κβαντικού αριθμού $\nu=0,1,2,3,\dots$. Ο κανόνας επιλογής των μεταβάσεων μεταξύ των δονητικών επιπέδων επιτρέπει μεταβάσεις μόνο μεταξύ γειτονικών επιπέδων. Σε θερμοκρασία δωματίου τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη βασική δονητική κατάσταση, όπου $\nu=0$. Με απορρόφηση κατάλληλης ενέργειας το μόριο μεταβαίνει στην κατάσταση $\nu=1$. Η μετάβαση αυτή ονομάζεται θεμελιώδης. Η ενέργεια που απαιτείται για τη μετάβαση δίνεται από τη σχέση:

$$E=h\nu \quad [2.7]$$

Η θεώρηση του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή είναι προσεγγιστική. Η κβαντομηχανική θεώρηση δίνει την πιο σωστή σχέση, η οποία εκφράζεται από την εξίσωση :

$$E_\nu=(\nu+1/2)h/2\pi(k/\mu)^{1/2} \text{ με } \nu=0,1,2,3,\dots \quad [2.8]$$

Η κύρια διαφορά μεταξύ του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή και του κβαντομηχανικού μοντέλου είναι ότι για $\nu=0$ το μόριο έχει ενέργεια, την ενέργεια μηδενικού σημείου, E_0 :

$$E_0=1/2h\nu \quad [2.9]$$

Οι δονήσεις όλων των μορίων, συμπεριλαμβανομένων και των διατομικών, δεν είναι αυστηρά αρμονικές. Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στην περίπτωση του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή, στο κβαντομηχανικό μοντέλο αυτό συνεπάγεται ανυπαρξία της ισοτιμίας των διαστημάτων μεταξύ των δονητικών ενεργειακών επιπέδων ($\nu=0 \rightarrow \nu=1$, $\nu=1 \rightarrow \nu=2$), με αποτέλεσμα τα υψηλότερα επίπεδα να πλησιάζουν (σχήμα 2.2). Συνέπεια της μη αρμονικότητας των μοριακών δονήσεων είναι η ύπαρξη μεταβάσεων από τη βασική κατάσταση $\nu=0$ σε καταστάσεις με $\nu=2,3,\dots$ (υπερτονικές), καθώς και ο συνδυασμός των μεταβάσεων. Η ενέργεια ενός μη αρμονικού ταλαντωτή είναι:

$$E_{\nu i b}=h\nu[(\nu+1/2) - \chi_0(\nu+1/2)^2] \quad [2.10]$$

όπου χ_0 είναι η σταθερά μη αρμονικότητας και ν είναι η συχνότητα δόνησης της βασικής δονητικής κατάστασης.

Ένα περισσότερο σύνθετο μόριο με N άτομα θεωρείται ως ένα σύστημα συζευγμένων μη-αρμονικών ταλαντωτών και έχει $3N-5$ βασικές δονήσεις, εάν είναι γραμμικό και $3N-6$ στην περίπτωση που είναι μη γραμμικό. Σε κάθε βασική δόνηση όλα τα

άτομα του μορίου δονούνται με την ίδια συχνότητα και περνούν από τις θέσεις ισορροπίας τους ταυτόχρονα.

2.2.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR, FTIR)

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

Το ποσό της ακτινοβολίας IR που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της ταινίας στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης:^{6,7,9}

$$I_{IR} \sim (\partial P / \partial q)^2 \quad [2.11]$$

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

Τα φάσματα υπερύθρου συνήθως λαμβάνονται ως η μεταβολή της απορρόφησης A συναρτήσει του ν (cm^{-1}). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την απορρόφηση στο IR ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert (εξίσωση 2.1), ωστόσο ο συντελεστής απορρόφησης μίας δόνησης σπάνια χρησιμοποιείται, επειδή εξαρτάται ισχυρά από το περιβάλλον της δόνησης. Τα χαρακτηριστικά στοιχεία μίας ταινίας IR είναι η συχνότητα $\nu(\text{cm}^{-1})$, στην οποία η ταινία εμφανίζει μέγιστο και το πλάτος $\Delta(\nu)_{1/2}$ στο μισό του ύψους της.

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

$$\nu/\nu^* = (\mu^*/\mu) \quad [2.12]$$

Υπάρχουν δύο τύποι φασματοφωτόμετρων IR: τα φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating) και τα FTIR φασματοφωτόμετρα. Στα πρώτα χρησιμοποιείται ένα πλέγμα οπτικά διαβαθμισμένο για την επιλογή μίας μονοχρωματικής

IR ακτινοβολίας για την ανάλυση. Το βασικό τμήμα ενός σύγχρονου FTIR οργάνου είναι το συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών του Michelson, η αρχή λειτουργίας του οποίου περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

2.2.4 Η αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson

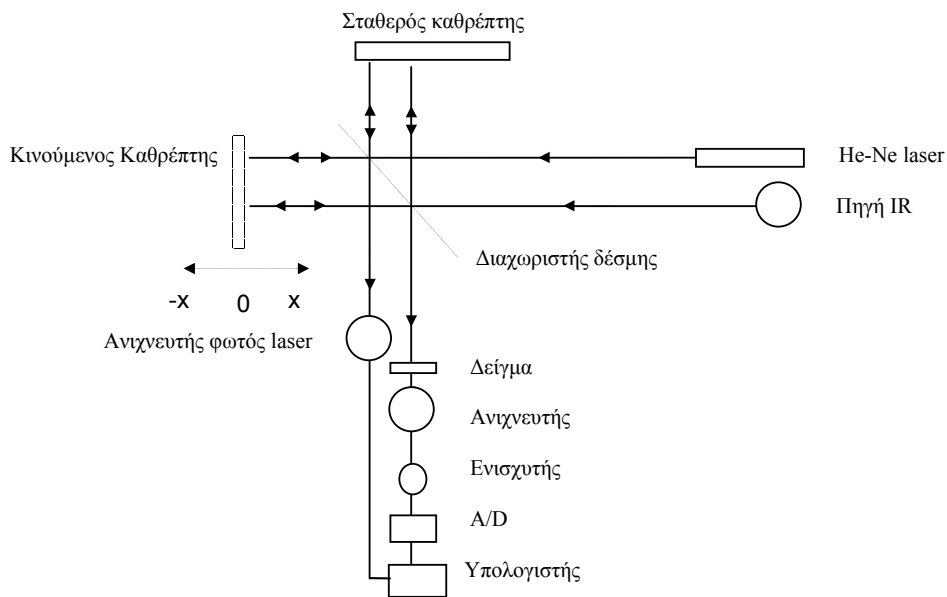
Η βάση της FTIR φασματοσκοπίας είναι ένα συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών, που αρχικά σχεδίασε ο Michelson το 1891. Πολλά άλλα συμβολόμετρα δύο δεσμών έχουν σχεδιαστεί μετά απ' αυτό, τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμα για μερικές ιδιαίτερες εφαρμογές. Ωστόσο, η αρχή λειτουργίας των συμβολόμετρων δύο δεσμών είναι παρόμοια.^{6,8-10}

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο και τις επανασυνδέει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Αυτή η διαφορά μήκους των οπτικών διαδρομών είναι η συνθήκη για το συνδυασμό των κυματικών συναρτήσεων των δύο δεσμών. Οι μεταβολές της έντασης της ανασυνδυασμένης ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή.

Ο απλούστερος τύπος ενός συμβολόμετρου Michelson φαίνεται στο σχήμα 2.4. Αποτελείται από 1) μια θερμική πηγή πολυχρωματικής IR ακτινοβολίας (globar, metal strips, Nernst glover), 2) ένα διαχωριστή δέσμης (beam splitter), ο οποίος έχει την ιδιότητα να ανακλά ένα μέρος της IR ακτινοβολίας που προσπίπτει σ' αυτόν, ενώ αφήνει το υπόλοιπο να περάσει μέσα απ' αυτόν, 3) δύο καθρέπτες, ο ένας εκ των οποίων είναι σταθερός σε μία θέση, ενώ ο δεύτερος μπορεί να μετακινείται ή κατά ορισμένα διαστήματα σε ορισμένα χρονικά διαστήματα ή με σταθερή ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από τον τύπο του ανιχνευτή, 4) ένα laser He-Ne για τον προσδιορισμό της θέσης του κινούμενου καθρέπτη και 5) έναν ανιχνευτή (DTGS, MCT κ.α.).

Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης. Στην ιδανική περίπτωση το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45°, ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά. Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR

ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση $(L+x)$, ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta=2x$, γνωστή ως retardation. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν



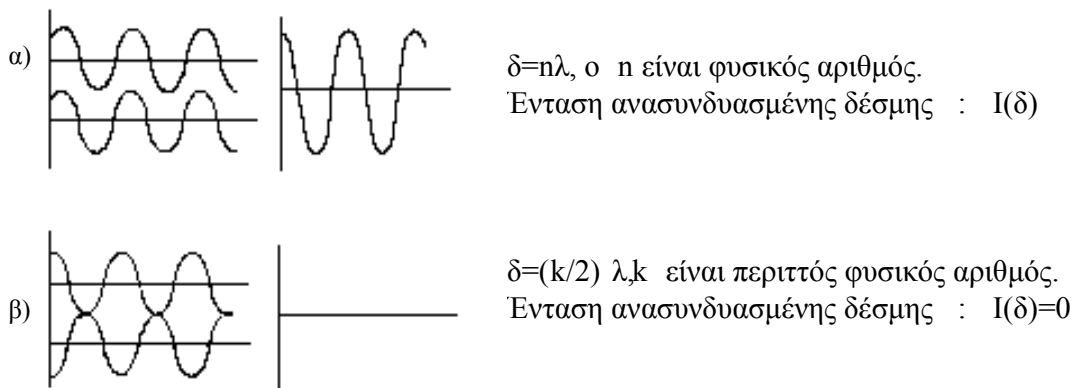
Σχήμα 2.4. Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου (interferometer) του Michelson.

φθάσουν στο διαχωριστή, συνδυάζονται και ένα μέρος της ακτινοβολίας που προκύπτει ανακλάται πίσω στην πηγή, ενώ το υπόλοιπο διαπερνά το διαχωριστή και αφού περάσει από το δείγμα (ή το αναφορικό δείγμα) φθάνει στον ανιχνευτή.^a Ο συνδυασμός των ανακλώμενων δεσμών γίνεται, είτε «προσθετικά» (constructive interference) είτε «αφαιρετικά» (deconstructive interference), ανάλογα με το αν οι δέσμες είναι σε φάση ή εκτός φάσης, κάτι που εξαρτάται από τη θέση του κινούμενου καθρέπτη τη στιγμή της ανάκλασης (σχήμα 2.5). Το αποτέλεσμα του συνδυασμού είναι η δημιουργία κροσσών συμβολής, δηλαδή ενός «συμβολογραφήματος» (interferogram) το οποίο καταγράφεται από τον ανιχνευτή ως η μεταβολή της έντασης της ακτινοβολίας συναρτήσει της μετατόπισης του καθρέπτη. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός μικροϋπολογιστή λαμβάνεται το FTIR φάσμα του δείγματος από τον λόγο ενός Fourier μετασχηματισμού του

^a Κάθε μέρος της ανασυνδυασμένης δέσμης περιέχει την ίδια φασματοσκοπική πληροφορία. Ωστόσο, το μέρος που επιστρέφει στην πηγή σπάνια μετράται, κυρίως επειδή είναι δύσκολο να διαχωριστεί από την ακτινοβολία που εκπέμπει η πηγή.

συμβολογραφήματος του δείγματος προς τον Fourier μετασχηματισμό του συμβολογραφήματος ενός αναφορικού δείγματος.

Για να κατανοηθεί η διαδικασία λειτουργίας ενός Michelson συμβολόμετρου, είναι καλύτερα να θεωρηθεί αρχικά η περίπτωση της εκπομπής μονοχρωματικής IR ακτινοβολίας



Σχήμα 2.5. Ένα ζεύγος φυσικών κυμάτων α) σε φάση και β) εκτός φάσης, από την πηγή. Έστω λοιπόν ότι το μήκος κύματος αυτής της ακτινοβολίας είναι λ , το οποίο αντιστοιχεί σε n κυματάρια. Εάν ο κινούμενος καθρέπτης μετακινείται κατά x , έτσι ώστε:

$$\delta = 2x = n\lambda, \text{ όπου } n=1,2,3 \quad [2.13]$$

οι δύο ανακλώμενες δέσμες είναι σε φάση, όταν φθάνουν στο διαχωριστή (σχήμα 2.5). Τότε, η ένταση της ανασυνδυασμένης δέσμης που κατευθύνεται στον ανιχνευτή είναι το άθροισμα των εντάσεων των επιμέρους δεσμών. Εάν όμως ισχύει:

$$\delta = 2x = (k/2)\lambda \quad [2.14]$$

όπου k είναι ένας περιττός φυσικός αριθμός, τότε οι ανακλώμενες δέσμες είναι εκτός φάσης, με αποτέλεσμα το σήμα που φθάνει στον ανιχνευτή να είναι μηδέν.

Στην πραγματικότητα, το σήμα που φθάνει στον ανιχνευτή εξαρτάται και από πολλούς παράγοντες, εκτός της έντασης, $I(\nu)$, της μονοχρωματικής ακτινοβολίας.⁶ Καταρχήν, είναι πρακτικά αδύνατο να βρεθεί ένας ιδανικός διαχωριστής δέσμης, ικανός να

ανακλά το 50% της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και να είναι διαπερατός στο υπόλοιπο 50%. Επιπλέον, οι περισσότεροι IR ανιχνευτές αλλά και οι ενισχυτές δεν αποκρίνονται το ίδιο σ' όλες τις συχνότητες. Η πλήρης εξάρτηση της έντασης $I(\delta)$ ενός συμβολογραφήματος από το δ δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$I(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) \quad [2.15]$$

όπου $B(\nu)$ είναι ένα γινόμενο της έντασης $I(\nu)$ της μονοχρωματικής ακτινοβολίας και ενός διορθωτικού παράγοντα για τις διακυμάνσεις του σήματος λόγω των παραπάνω τεχνικών παραγόντων.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται μία πηγή πολυχρωματικής ακτινοβολίας, η ένταση του συμβολογραφήματος δίνεται από την εξίσωση:⁸

$$I(\delta) = \int_{-\infty}^{\infty} B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) d\nu \quad [2.16]$$

Η διακριτική ικανότητα ενός FTIR οργάνου εξαρτάται κυρίως από δύο παράγοντες: α) τη μέγιστη διαφορά της οπτικής διαδρομής $\delta=2x$ και β) το μαθηματικό τύπο της αποξείδωση συνάρτησης, η οποία χρησιμοποιείται για το convolution του συμβολογραφήματος, επειδή η κίνηση του καθρέπτη είναι περιορισμένη. Σύμφωνα με το κριτήριο Rayleigh, δύο φασματικές γραμμές που απέχουν μεταξύ τους απόσταση d , διαχωρίζονται όταν η διαφορά της οπτικής διαδρομής είναι τουλάχιστον $1/d$.

Σε σύγκριση με τα συμβατικά IR φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα, τα FTIR φασματοφωτόμετρα υπερέχουν σημαντικά, καθώς ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι πολύ μεγαλύτερος, ενώ το φάσμα μπορεί να καταγραφεί με ακρίβεια μέχρι 0.001 cm^{-1} σε κλάσματα δευτερολέπτου. *Η υπεροχή των FTIR φασματοφωτόμετρων οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους, που έχουν ως αποτέλεσμα: 1) όλες οι συχνότητες που εκπέμπονται από την πηγή να φθάνουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή 2) ένα μεγάλο εμβαδόν της δέσμης να περνά μέσα από το δείγμα και 3) η θέση του κινούμενου καθρέπτη να προσδιορίζεται με ακρίβεια μεγαλύτερη από $0.0005 \mu\text{m}$.*

Δύο από τους πιο κοινά χρησιμοποιημένους IR ανιχνευτές στην περιοχή του υπερύθρου είναι ο DTGS (deuterated triglycine sulfate) και ο MCT (mercury cadmium telluride). Στη φασματοσκοπία βιολογικών μορίων χρησιμοποιείται κυρίως ο MCT ανιχνευτής, λόγω του μικρού χρόνου απόκρισης (μs).

2.2.5 Η κλασσική θεωρία για το φαινόμενο Raman.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φάσμα Raman ενός μορίου είναι το αποτέλεσμα της ανελαστικής σκέδασης, από το μόριο μίας μονοχρωματικής ακτινοβολίας με συχνότητα ν στην περιοχή του ορατού ή του υπεριώδους. Ουσιαστικά το φαινόμενο Raman συμβαίνει λόγω των μεταβολών της πολωσιμότητας του μορίου στη διάρκεια της ταλάντωσης.^{6,7,11} Η πολωσιμότητα α είναι ένα μέτρο της ευκολίας με την οποία διαταράσσεται το ηλεκτρονικό νέφος γύρω από τα άτομα του μορίου. Όταν μία ακτινοβολία συχνότητας ν προσπέσει στο μόριο, δημιουργείται ένας διαχωρισμός φορτίου (πυρήνα-ηλεκτρονίων), λόγω της επίδρασης του ηλεκτρικού πεδίου E της ακτινοβολίας. Έτσι επάγεται μία διπολική ροπή, P , η οποία δίνεται από την εξίσωση:

$$P = \alpha E \quad [2.17]$$

Λόγω της κυματικής φύσης του φωτός, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$E = E_0 \cos 2\pi \nu t \quad [2.18]$$

όπου E_0 είναι το μέγιστο πλάτος ταλάντωσης του πεδίου. Οπότε ισχύει:

$$P = \alpha E_0 \cos 2\pi \nu t \quad [2.19]$$

Εάν τώρα το μόριο δονείται με συχνότητα ν_1 , η παραμόρφωση, q , του πυρήνα είναι:

$$q = q_0 \cos 2\pi \nu_1 t \quad [2.20]$$

με q_0 να είναι το πλάτος (amplitude) της μετατόπισης. Για μικρές τιμές του q_0 , η πολωσιμότητα του μορίου είναι γραμμική ως προς τη μετατόπιση q . Οπότε ισχύει:

$$\alpha = \alpha_0 + (\partial \alpha / \partial q)_0 q \quad [2.21]$$

όπου α_0 είναι η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας, ενώ $(\partial \alpha / \partial q)_0$ είναι ο ρυθμός μεταβολής της πολωσιμότητας ως συνάρτηση της μετατόπισης q στη θέση ισορροπίας. Συνδυάζοντας τις εξισώσεις 2.19, 2.20 και 2.21 προκύπτει ότι:

$$\begin{aligned} P &= \alpha E_0 \cos 2\pi \nu t \quad [2.22] \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu t + (\partial \alpha / \partial q)_0 q_0 E_0 \cos 2\pi \nu t \cos 2\pi \nu_1 t \\ &= \alpha_0 E_0 \cos 2\pi \nu t + 1/2 (\partial \alpha / \partial q)_0 q_0 E_0 \{ \cos 2\pi(\nu + \nu_1)t + \cos 2\pi(\nu - \nu_1)t \} \end{aligned}$$

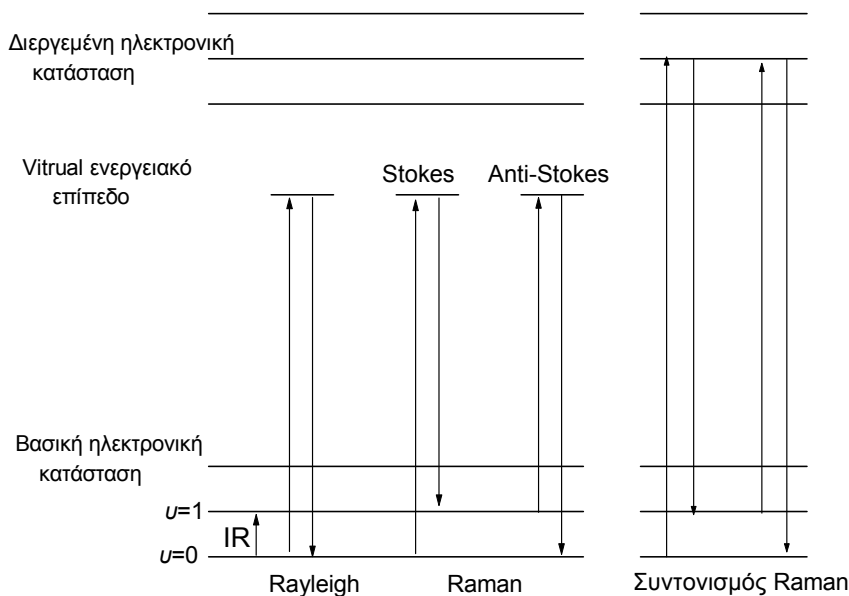
Η τελευταία εξίσωση περιγράφει το φαινόμενο της σκέδασης της ακτινοβολίας από το μόριο. Σύμφωνα με τον πρώτο όρο του δεύτερου μέλους της εξίσωσης, ένα μέρος της ακτινοβολίας σκεδάζεται ελαστικά, με τη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός να είναι ίδια

με τη συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (σκέδαση Reyleigh). Όμως ο δεύτερος όρος δηλώνει ότι ένα μικρότερο μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σκεδάζεται ανελαστικά. Η συχνότητα της σκεδασμένης ακτινοβολίας μπορεί να είναι μεγαλύτερη ($\nu+\nu_1$), ή μικρότερη ($\nu-\nu_1$) από τη συχνότητα διέγερσης του μορίου, λόγω μεταφοράς ενέργειας μεταξύ του μορίου και της ακτινοβολίας διέγερσης. Αυτές οι μετατοπίσεις στη συχνότητα της ακτινοβολίας που σκεδάζεται είναι γνωστές ως το φαινόμενο Raman.

Επειδή η ενέργεια είναι κβαντισμένη, το ποσό της ενέργειας που μεταφέρεται σε μία σκέδαση Raman πρέπει να αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας ΔE μεταξύ δύο δονητικών ενεργειακών επιπέδων του μορίου που σκεδάζει. Αυτό σημαίνει ότι η μεταβολή στη συχνότητα των φωτονίων που σκεδάζονται αντανακλά τη ΔE και είναι ανεξάρτητη της συχνότητας της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του μορίου.

Στην εξίσωση 2.22, εάν ο παράγοντας $(\partial a/\partial q)_0$ είναι μηδέν τότε ο δεύτερος όρος εξαλείφεται. Αυτό σημαίνει ότι η σκέδαση Raman παρατηρείται μόνο όταν συμβαίνει μεταβολή της πολωσιμότητας του μορίου κατά τη δόνησή του. Αυτός είναι ο κανόνας επιλογής για να είναι μία δόνηση ενεργή στο Raman.

Μία γραφική αναπαράσταση των φαινομένων που λαβαίνουν χώρα σ' ένα πείραμα σκέδασης Raman φαίνεται στο σχήμα 2.6. Στην περίπτωση της σκέδασης Raman χωρίς συντονισμό, η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι έξω από την περιοχή κάποιας ταινίας απορρόφησης του μορίου ή κάποιου χρωμοφόρου μέσα στο μόριο. Επειδή η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι αρκετά μικρότερη από την ενέργεια που απαιτείται για τη μετάβαση του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, το μόριο μεταβαίνει από τη βασική ηλεκτρονική κατάσταση σε μία «ενδιάμεση» ενεργειακή κατάσταση, η οποία συνηθίζεται να ονομάζεται virtual (εικονικό) ενεργειακό επίπεδο. Στη συνέχεια το μόριο μπορεί να χάσει ελαστικά την ενέργειά του και εκπέμποντας



Σχήμα 2.6. Ποιοτική περιγραφή της σκέδασης Rayleigh και Raman από ένα μόριο. Οι οριζόντιες γραμμές αναπαριστούν τα δονητικά επίπεδα σε δύο διαφορετικές ηλεκτρονικές καταστάσεις του μορίου.

ακτινοβολία με συχνότητα ίδια με εκείνη της προσπίπτουσας, επιστρέφει στο ενεργειακό επίπεδο στο οποίο ήταν αρχικά. Αυτή είναι η περίπτωση της σκέδασης Rayleigh. Στη σκέδαση Raman χωρίς συντονισμό όμως η συχνότητα της σκεδασμένης ακτινοβολίας μπορεί να είναι είτε μεγαλύτερη ($\nu+\nu_1$), είτε μικρότερη ($\nu-\nu_1$) από τη συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στην πρώτη περίπτωση, το μόριο βρίσκεται αρχικά στο επίπεδο $\nu=0$, διεγείρεται και μετά επιστρέφει στο επίπεδο $\nu=1$ χάνοντας ενέργεια ίση με τη διαφορά ΔE των δύο επιπέδων. Οι φασματικές γραμμές που παρατηρούνται λόγω αυτής της σκέδασης είναι γνωστές ως Stokes γραμμές. Στη δεύτερη περίπτωση, το μόριο ξεκινάει από το $\nu=1$ επίπεδο και κατά τη διέγερσή του κερδίζει ενέργεια ΔE και μεταβαίνει στο $\nu=0$ επίπεδο κατά την αποδιέγερσή του. Έτσι παρατηρούνται οι anti-Stokes γραμμές στο φάσμα Raman του μορίου. Επειδή περισσότερα μόρια βρίσκονται στο $\nu=0$ επίπεδο απ' ό,τι στο $\nu=1$ επίπεδο, οι Stokes γραμμές είναι εντονότερες από τις anti-Stokes σ' ένα φάσμα Raman.

Η ένταση μίας δόνησης Raman είναι περίπου 10^{-3} έως 10^{-4} φορές πιο ασθενής από την ένταση μίας δόνησης Rayleigh. Ωστόσο μία δόνηση Raman είναι δυνατό να

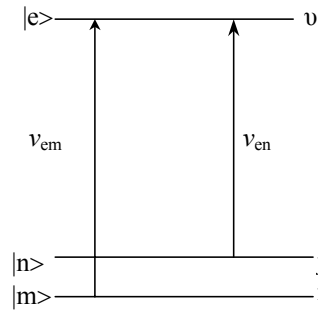
παρατηρηθεί εάν για τη διέγερση του μορίου χρησιμοποιηθεί μία ακτινοβολία ισχυρής έντασης, όπως είναι τα laser Kr⁺ (647.1 nm), He-Ne(632.8 nm), Ar⁺ (514.5 nm) και Ar⁺ (488 nm). Επίσης με την τεχνική συντονισμού Raman, που περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο, οι εντάσεις μερικών δονήσεων του μορίου μπορούν να αυξηθούν δραματικά.

2.2.6 Το φαινόμενο συντονισμού Raman

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, σ' ένα πείραμα Raman το μόριο διεγείρεται από τη βασική σε μία διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση, ε. Έαν m και n είναι η αρχική και η τελική δονητική κατάσταση του μορίου (σχήμα 2.7), τότε η ένταση, I_{mn}, της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι:¹²⁻¹⁷

$$I_{mn} = \frac{128\pi^5}{9c^4} (\nu_0 \pm \nu_{mn})^4 I_0 \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2 \quad [2.23]$$

όπου ν_0 , I_0 είναι η συχνότητα και η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα, c είναι η ταχύτητα του φωτός, ν_{mn} είναι η συχνότητα που αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά των m και n καταστάσεων και $(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}$ είναι ο τανυστής πολωσιμότητας της μετάβασης, ο οποίος δίνεται από την εξίσωση 2.24:



Σχήμα 2.7 Ενεργειακό διάγραμμα που περιγράφει το φαινόμενο συντονισμού Raman.

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{\hbar} \sum_{\epsilon} \left[\frac{\langle n | \mu_{\sigma} | e \rangle \langle e | \mu_{\rho} | m \rangle}{\nu_{em} - \nu_0 + i\Gamma_{\epsilon}} + \frac{\langle n | \mu_{\sigma} | e \rangle \langle e | \mu_{\rho} | i \rangle}{\nu_{en} + \nu_0 + i\Gamma_{\epsilon}} \right] \quad [2.24]$$

Τα ρ και σ είναι οι καρτεσιανές συντεταγμένες x, y και z της πόλωσης της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, αντίστοιχα. Τα μ_{ρ} και μ_{σ} είναι οι τελεστές της διπολικής

ροπής. Τα $|m\rangle$ και $|n\rangle$ είναι οι κυματοσυναρτήσεις των m και n καταστάσεων αντίστοιχα, ενώ το $|e\rangle$ είναι η κυματοσυνάρτηση της e διεγερμένης κατάστασης με πλάτος Γ_e . Οι ν_{em} και ν_{en} είναι οι συχνότητες που αντιστοιχούν στην ενεργειακή διαφορά των $e-m$ και $e-n$ καταστάσεων, αντίστοιχα.

Όταν η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι αρκετά μικρότερη από τη συχνότητα που αντιστοιχεί σε μία ηλεκτρονική μετάβαση του μορίου ($\nu_0 \ll \nu_{em}$), τότε οι δύο όροι της εξίσωσης 2.24 συνεισφέρουν εξίσου. Αν όμως η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας επιλεγεί ώστε να είναι κοντά στη συχνότητα μίας ηλεκτρονικής μετάβασης, τότε ο πρώτος όρος της εξίσωσης 2.24 και κατά συνέπεια και η ένταση I_{mn} αυξάνεται δραματικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται συντονισμός Raman.¹²⁻¹⁷ Δηλαδή, όταν το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για τη διέγερση του μορίου είναι μέσα στην περιοχή μίας ταινίας απορρόφησης του μορίου, τότε λαβάνει χώρα το φαινόμενο συντονισμού Raman.

Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι εντάσεις των δονήσεων αυξάνονται με το φαινόμενο συντονισμού Raman, γνωστοί ως A και B όροι σκέδασης για τους οποίους ισχύει:¹²⁻¹⁷

$$(\alpha_{rs})_{mn} = A + B \quad [2.25]$$

Ο A όρος σκέδασης δίνεται από την εξίσωση:¹²⁻¹⁷

$$A = \mu_e^2 \sum_{\nu} \frac{\langle j|\nu\rangle\langle\nu|i\rangle}{\Delta\nu_{\nu} + i\Gamma_{\nu}} \quad [2.26]$$

όπου μ_e είναι η ηλεκτρική διπολική ροπή για τη διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση e και ν είναι ένα δονητικό επίπεδο αυτής της κατάστασης με εύρος Γ_{ν} . Η $\nu_{\nu i}$ είναι η συχνότητα της μετάβασης από το i δονητικό επίπεδο της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης στο ν επίπεδο της διεγερμένης. Ο A όρος αυξάνεται καθώς ελαττώνεται ο παρανομαστής ($\nu_{\nu i} - \nu_0 \rightarrow 0$, συνθήκη συντονισμού) και αυξάνεται η μ_e (ισχυρή ηλεκτρονική απορρόφηση). Ο αριθμητής περιέχει το αποτέλεσμα της αλληλεπικάλυψης των ολοκληρωμάτων των δονητικών κυματοσυναρτήσεων (επικάλυψη Frank-Condon) των j , i και ν επιπέδων. Ο A όρος αποτελεί τον κύριο μηχανισμό σκέδασης Raman με συντονισμό για τις επιτρεπόμενες ηλεκτρονικές μεταβάσεις με υψηλές τιμές μ_e . Η σχετική αύξηση της έντασης διαφορετικών δονήσεων εξαρτάται από τις τιμές των Frank-Condon ολοκληρωμάτων. Λόγω της ορθογωνικότητας των κυματοσυναρτήσεων, τα ολοκληρώματα Frank-Condon είναι μηδέν εκτός και αν η θέση ισορροπίας των πυρήνων μετατοπίζεται κατά την ηλεκτρονική

διέγερση. Αυτό όμως συμβαίνει μόνο στις ολικά συμμετρικές δονήσεις. Επομένως, ο A όρος αυξάνει μόνο τις ολικά συμμετρικές δονήσεις.

Μέσω του B όρου αυξάνεται η ένταση τόσο των ολικά όσο και των μη ολικά συμμετρικών δονήσεων. Ο B όρος είναι σημαντικός όταν μία ασθενής ηλεκτρονική μετάβαση μπορεί να κερδίσει, μέσω δονητικής σύζευξης, ένταση από μία κοντινή, ισχυρά επιτρεπόμενη, ηλεκτρονική μετάβαση. Ο B όρος δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:¹²⁻¹⁷

$$B = \mu_e \mu_s h \sum_v \frac{\langle j|Q|v\rangle\langle v|i\rangle + \langle j|v\rangle\langle v|Q|i\rangle}{\Delta v_v + i\Gamma_v} \quad [2.27]$$

$$h = \frac{\langle s|\partial H/\partial Q|e\rangle}{v_s - v_e}$$

όπου v_s και μ_s είναι η συχνότητα και η διπολική ροπή της ισχυρά επιτρεπόμενης μετάβασης, ενώ Q είναι οι κανονικές συντεταγμένες μίας ορισμένης δόνησης. Το h είναι ένα ολοκλήρωμα, το οποίο επιτρέπει τη μίξη των e και s ηλεκτρονικών καταστάσεων κατά μήκος των Q συντεταγμένων. Η τιμή του h μειώνεται καθώς αυξάνεται η διαφορά των συχνοτήτων των δύο ηλεκτρονικών καταστάσεων. Ο αριθμητής στην εξίσωση του B όρου περιέχει ολοκληρώματα τα οποία εξαρτώνται από το Q, όπως και ολοκληρώματα Frank-Condon και επομένως μπορεί να είναι μη μηδενικός και στην περίπτωση των μη ολικά συμμετρικών δονήσεων. Ο πιο σημαντικός όμως όρος στην εξίσωση 2.27 είναι ο τελεστής της δονητικής σύζευξης, $\langle s|\partial H/\partial Q|e\rangle$. Αυτός ο όρος καθορίζει ποιες από τις δονήσεις ενισχύονται μέσω του B όρου και είναι μη μηδενικός μόνο αν η κανονική δόνηση έχει κατάλληλη συμμετρία.

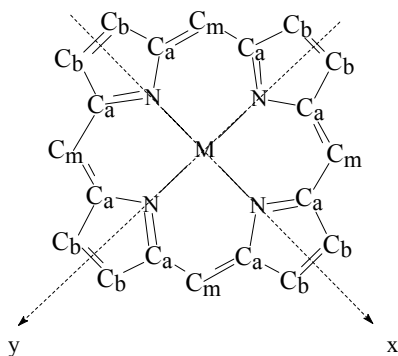
Στην περίπτωση των μεταλλοπορφυρινικών ενώσεων, εάν για τη διέγερση του μορίου χρησιμοποιείται ακτινοβολία με συχνότητα στην περιοχή του Soret, τότε ο συντονισμός Raman συμβαίνει μέσω του A όρου και επομένως το φάσμα της ένωσης κυριαρχείται από τις ολικά συμμετρικές δονήσεις (συμμετρίας A_{1g}).¹²⁻¹⁷ Εάν όμως η διέγερση γίνεται με ακτινοβολία με μήκος κύματος στην περιοχή των α και β ταινιών απορρόφησης, τότε ο συντονισμός Raman λαμβάνει χώρα μέσω του B όρου, λόγω της δονητικής σύζευξης που συμβαίνει μεταξύ της α και της Soret ταινίας. Σ' αυτήν περίπτωση ενισχύονται οι δονήσεις συμμετρίας A_{2g} , B_{1g} και B_{2g} .¹²⁻¹⁷ Σ' αυτήν την εργασία τα φάσματα συντονισμού Raman ελήφθησαν με διέγερση στην περιοχή του Soret.

Η αύξηση της έντασης μίας δόνησης Raman λόγω συντονισμού είναι συνήθως της τάξης του 10^2 έως 10^3 . Έτσι, τα φάσματα συντονισμού Raman μπορούν να ληφθούν από δείγματα συγκεντρώσεως 10^{-4} M ή λιγότερο. Σ' αυτές τις συγκεντρώσεις, είναι συνήθως αδύνατη η καταγραφή των φασμάτων χωρίς τη συνθήκη του συντονισμού.

2.2.7 Εφαρμογές της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman στις αιμοπροτεΐνες.

Η φασματοσκοπία συντονισμού Raman έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική για το χαρακτηρισμό της δομής και της δυναμικής των πορφυρινικών ενώσεων και των ομάδων αίμης. Μελέτες μοντέλων αίμης και πορφυρινικών ενώσεων έχουν οδηγήσει στον εμπειρικό συσχετισμό μεταξύ των συχνοτήτων ορισμένων δονήσεων αυτών των χρωμοφόρων και της οξειδωτικής και spin κατάστασης αλλά και του αριθμού συναρμογής των κεντρικών μεταλλικών ιόντων. Οι δονήσεις αυτές ονομάζονται δείκτες του αριθμού συναρμογής και της οξειδωτικής και spin καταστάσεως του κεντρικού μετάλλου.^{12-15,18}

Οι δονήσεις στην περιοχή $1000-1700\text{ cm}^{-1}$ (περιοχή υψηλών συχνοτήτων) οφείλονται κυρίως στις C-C και C-N δονήσεις τάσης του πορφυρινικού δακτυλίου. Όταν το φάσμα λαμβάνεται με μήκος κύματος διέγερσης στην περιοχή του Soret, η κύρια δόνηση στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων είναι η ν_4 .^{12-15,18} Πρόκειται για μία συμμετρική δόνηση, η οποία εμφανίζεται στους $1355-1375\text{ cm}^{-1}$. Αυτή η δόνηση οφείλεται στις $\nu(\text{C}_a\text{-N})$ και $\delta(\text{C}_a\text{-C}_m)$ δονήσεις (σχήμα 2.8) και η συχνότητά της είναι ευαίσθητη στην ηλεκτρονική



Σχήμα 2.8. Ο πορφυρινικός δακτύλιος.

πυκνότητα των π^* τροχιακών της πορφυρίνης. Πρακτικά, η συχνότητα της ν_4 επηρεάζεται από δύο παράγοντες: την οξειδωτική κατάσταση του κεντρικού ιόντος και την ύπαρξη ενός αζονικού ligand το οποίο είναι π-οξύ. Μεταβολή του σθένους του κεντρικού ιόντος έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της συχνότητας της ν_4 λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης του κεντρικού ιόντος και του πορφυρινικού δακτυλίου. Ένας αξιόπιστος δείκτης της spin κατάστασης του κεντρικού ιόντος είναι η ν_2 δόνηση, η οποία εμφανίζεται στους 1570-1590 cm^{-1} περίπου.^{12-15,18} Αυτή η δόνηση οφείλεται στη C_b-C_b δόνηση τάσης και σχετίζεται με το μέγεθος του πορφυρινικού δακτυλίου. Μείωση της συχνότητας της ν_2 δηλώνει διαστολή του πορφυρινικού δακτυλίου και άρα μετάβαση σε κατάσταση υψηλού spin. Η συχνότητα της ν_2 μεταβάλλεται επίσης με τη μεταβολή του αριθμού συναρμογής του κεντρικού ιόντος. Οι συχνότητες των ν_3 και ν_{10} δονήσεων είναι επίσης ενδεικτικές της spin κατάστασης και του αριθμού συναρμογής του κεντρικού ιόντος.^{12-15,18} Αυτές οι δονήσεις προκύπτουν από τις $\nu(C_aC_m)$ και $\nu(C_aC_b)$ δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου.

Βιβλιογραφία

1. Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. In *Biophysical Chemistry*; Freeman, W. H and Company: San Francisco 1980; Part II, pp 349-408.
2. Cambell, I. D.; Dwek, R. A. In *Biological Spectroscopy*; The Benjamin/Cummings Publing Company, Inc; Chapter 4, pp 61-90.
3. Κατάκης, Δ. και Πνευματικάκης, Γ. «Πανεπιστημιακή Ανόργανος Χημεία Α'». ΟΕΔΒ: Αθήνα 1988, κεφάλαιο 5, σελ. 186-190.
4. Gouterman, M. In *Porphyrins*; D. Dolphin, Ed.; Academic Press: New York, 1979; Part A, pp 1-156.
5. Sherman, D.; Kotake, S.; Inhibe, N.; Copeland, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **1991**, 88, 4265-4269.
6. Cremlich, H-U, In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; VCH Verlagsgesellschaft, 1994; Vol B5, pp 429-469.
7. Nakamoto, L.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; Wiley & Sons, Inc: 1986; Part I.
8. Griffiths, P.; de Haseth, J. A. In *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; Willey: New York 1986; Chapter 1, pp 1-55.
9. Mantele, W. In *Biological Techniques in Photosynthesis*; Amesz & Hoff, A. J. Ed; Kluwer Academic Publishers; Netherlands, 1996; Chapter 9, pp 137-160.
10. Nakamoto, K.; Czernuszewiz, R. S. *Methods in Enzymology* **1993**, 226, 259-285.
11. Braiman, M. S.; Rothshchild, K. J. *Annu. Rev. Biophys, Biophys. Chem* **1988**, 541-570.
12. Kitagawa, T.; Ozaki, Y. *Structure and Bond* **1987**, 64, 71-114.

13. Spiro, T. *Adv. Prot. Chem.* **1985**, *37*, 111-159.
14. Spiro, T. G.; Stein, P. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1977**, *28*, 501-521.
15. Spiro, T. G.; Czernuszewia, R. S.; Li, X-Y. *Coordination Chemistry Reviews.* **1990**, *100*, 541-571.
16. Spiro, T. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *416*, 169-189.
17. Ferraro, J. R.; Nakamoto, K. In *Introductory Raman Spectroscopy*; Academic Press, Inc: San Diego 1994; Chapter 1, pp 1-94.
18. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed; Wiley: New York 1988; Vol 3, pp 293-345.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Παρασκευή της κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων

3.1.1 Υλικά

Η κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων απομονώνεται από καρδιά βοός. Αρχικά απομονώνονται τα μιτοχόνδρια¹ και μετά γίνεται η εξαγωγή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τη μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C με τη χρήση θαλάμων χαμηλής θερμοκρασίας, παγόλουτρων και ψυχόμενης φυγοκέντρου. Τα δείγματα των μιτοχονδρίων αποθηκεύονται στους -40°C, ενώ τα πρωτεϊνικά δείγματα διατηρούνται σε υγρό άζωτο μέχρι τη χρήση τους.

Οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε φυγόκεντρο Sigma τύπου 4K 15 με κεφαλή 12165 H και φυγόκεντρο Herarus SEPATECH τύπου Suprafuge 22 με κεφαλή HFA 14290.

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υδατικά διαλύματα:

Διάλυμα 200 mM NaPi: παρασκευάζεται με την ανάμιξη διαλύματος Na₂HPO₄, 200 mM και διαλύματος NaH₂PO₄, 200 mM. Το pH του τελικού διαλύματος είναι 7.4.

Διάλυμα σουκρόζη-Tris: 250 mM σουκρόζη, 10 mM Tris, pH 7.4.

Διάλυμα HET: 1 mM L-ιστιδίνη, 10 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.4.

Διάλυμα ET: 10 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7.4.

Διάλυμα triton: διάλυμα Triton-TX 114 συγκέντρωσης 20% v/v.

Διάλυμα χολικού νατρίου: διάλυμα χολικού νατρίου συγκέντρωσης 20% w/v, pH 8.0.

Διάλυμα Hepes-maltoside: 50 mM Hepes, 0.3 % w/v lauryl maltoside, pH 7.4.

3.1.2 Απομόνωση των μιτοχονδρίων

Η απομόνωση των μιτοχονδρίων γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Yoshikawa, S.; Choc, G.; O'Toole, M. C.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252, 5498-5508. Χρησιμοποιούνται φρέσκιες βοδινές καρδιές, οι οποίες διατηρούνται συνεχώς στον πάγο.

Αφού αφαιρεθούν τα λίπη, οι μεμβράνες και τα διάφορα αγγεία, το κρέας πλένεται με άφθονο κρύο νερό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως ή να διατηρηθεί στους -20°C . Για τη συνέχιση της διαδικασίας, το κρέας αλέθεται σε μηχανή κρέατος. 800-900g αλεσμένου κρέατος αναμιγνύονται με 2 lt κρύου απιονισμένου H_2O και το μίγμα διηθείται από 12 φύλλα γάζας. Στη συνέχεια, 225g αλεσμένου κρέατος αναμιγνύονται με 1.15 lt κρύου απιονισμένου H_2O και 150 ml διαλύματος NaPi 200 mM. Το μίγμα αναδεύεται σε μπλέντερ για 10 min στους 4°C και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 860 g για 20 min. Το υπερκείμενο διηθείται από 20 φύλλα γάζας και διατηρείται στους 4°C . Το ίζημα επανααιωρείται με την προσθήκη 675ml κρύου απιονισμένου H_2O και 75 ml διαλύματος NaPi 200 mM και ανάδευση στο μπλέντερ για 10 min (4°C). Το μίγμα φυγοκεντρείται στα 860 g για 15-20 min και το υπερκείμενο διηθείται όπως πριν. Με την προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος CH_3COOH 30% v/v ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου στο 5.15 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 860 g για 15 min. Το ίζημα το οποίο καταβυθίζεται είναι τα μιτοχόνδρια. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται προσεκτικά με κρύο απιονισμένο H_2O και διαλυτοποιείται σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος σουκρόζης-Tris. Αφού το μίγμα ομογενοποιηθεί με μηχανικό ομογενοποιητή, προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του σε πρωτεΐνη και αποθηκεύεται στους -40°C .

3.1.3 Απομόνωση της κυτοχρωμικής οξειδάσης

Η απομόνωση της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια γίνεται σε δύο στάδια σύμφωνα με τη μέθοδο των Hartzell, C. R.; Beinert, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, 368, 318-338. Στο πρώτο στάδιο απομακρύνονται τα ανεπιθύμητα κυτοχρώματα (*b*, *c*, *c*₁) από τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων προσθέτοντας το απορρυπαντικό triton TX-114. Επειδή το triton αλληλεπιδρά με το χολικό νάτριο που χρησιμοποιείται στο δεύτερο στάδιο της απομόνωσης, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην απομάκρυνση του triton. Γι' αυτό το λόγο γίνονται εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα HET και επώαση με αιθανόλη. Τέλος το δείγμα ψύχεται σε υγρό άζωτο, επειδή αυτή η διαδικασία διευκολύνει το σπάσιμο των λιπιδίων και την εξαγωγή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τις μεμβράνες. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η εξαγωγή της κυτοχρωμικής οξειδάσης και άλλων πρωτεϊνών με τη χρήση του χολικού νατρίου. Στη συνέχεια μ' ένα συνδυασμό σταδίων εναλάτωσης-κατακρήμνισης με $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και φυγοκέντρήσεων λαμβάνεται η κυτοχρωμική οξειδάση ως ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 50 mM HEPES, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4.

1ο στάδιο απομόνωσης

Στο διάλυμα των μιτοχονδρίων προστίθεται, αργά και υπό συνεχή ανάδευση, διάλυμα triton (20% v/v) σε αναλογία 6.4 ml διαλύματος απορρυπαντικού ανά g πρωτεΐνης. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται στερεό KCl μέχρι τελική συγκέντρωση 0.2 M. Το μίγμα επωάζεται για μία ώρα, υπό συνεχή ανάδευση στον πάγο. Καθώς τα κυτοχρώματα *b*, *c*, *c*₁ διαλυτοποιούνται το χρώμα του μίγματος αλλάζει από καφέ σε κόκκινο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 48000 g για 90 min και λαμβάνεται το ίζημα. Αρχικά απομακρύνονται με χαρτί τα υπολείμματα του απορρυπαντικού από τα τοιχώματα των σωλήνων φυγοκέντρησης και στη συνέχεια το ίζημα εκπλένεται αρκετές φορές με ρυθμιστικό διάλυμα HET. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος HET και ομογενοποιείται με μηχανικό ομογενοποιητή. Ο συνολικός όγκος του μίγματος ρυθμίζεται στο 1/4 του αρχικού όγκου του διαλύματος των μιτοχονδρίων. Κατόπιν, προστίθεται, αργά και υπό συνεχή ανάδευση, CH₃COOH 95% v/v ώστε η τελική συγκέντρωσή της στο δείγμα να είναι 10 % v/v. Το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα, υπό συνεχή ανάδευση στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 48000 g για 90-120 min. Το ίζημα που προκύπτει εκπλένεται με διάλυμα HET πολλές φορές για την πλήρη απομάκρυνση του triton και κατόπιν επαναδιαλύεται με την προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος HET. Το μίγμα ομογενοποιείται και ρυθμίζεται ο όγκος του στο 1/7 του αρχικού όγκου του διαλύματος των μιτοχονδρίων. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη και το δείγμα ψύχεται σε υγρό άζωτο.

2ο στάδιο απομόνωσης

Όπως και τα προηγούμενα στάδια, έτσι και αυτό το στάδιο πραγματοποιείται στους 4 °C.

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα που λαμβάνεται από το 1^ο στάδιο προστίθεται υπό συνεχή ανάδευση στον πάγο διάλυμα χολικού νατρίου 20% w/v, μέχρι τελική συγκέντρωση 1.5 mg χολικού νατρίου ανά mg πρωτεΐνης. Στο διάλυμα που προκύπτει προστίθεται, υπό ανάδευση, στερεό (NH₄)₂SO₄ μέχρι κορεσμού 10% w/v και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.4. Το μίγμα επωάζεται για 90 min, υπό συνεχή ανάδευση στον πάγο και κατόπιν φυγοκεντρείται στα 48000 g για 20 min. Στο υπερκείμενο (διαυγές σκούρο πράσινο) προστίθεται στερεό (NH₄)₂SO₄ μέχρι ολικού κορεσμού 35% w/v, ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και το μίγμα επωάζεται υπό ανάδευση στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως πριν και λαμβάνεται το υπερκείμενο. Με νέα προσθήκη στερεού

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ μέχρι ολικού κορεσμού 43% w/v πραγματοποιείται η κατακρήμνιση της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Ρυθμίζεται το pH στο 7.4 και το μίγμα επωάζεται όπως πριν. Στη συνέχεια, με φυγοκέντρηση στα 48000 g για 30 min, λαμβάνεται η κυτοχρωμική οξειδάση στο ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται πλήρως με 10 ml διαλύματος ET. Με επιπλέον προσθήκη διαλύματος ET, το διάλυμα αραιώνεται μέχρι τελικού όγκου 25 ml. Στη συνέχεια προστίθενται, αργά και υπό συνεχή ανάδευση στον πάγο, V ml κορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ μέχρι το σημείο που το πρωτεϊνικό διάλυμα αρχίζει να θολώνει λόγω της κατακρήμνισης (ανεπιθύμητων) πρωτεϊνών. Αυτό συνήθως συμβαίνει σε κορεσμό 28-32% w/v. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το μίγμα επωάζεται όχι περισσότερο από 5 min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 48000 g για 20 min. Στο υπερκείμενο που προκύπτει προστίθενται (16-V) ml κορεσμένου διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ με αποτέλεσμα το πρωτεϊνικό διάλυμα να φθάνει σε κορεσμό 40% w/v ως προς το άλας, όπου πραγματοποιείται η κατακρήμνιση της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Το pH ρυθμίζεται στο 7.4 και το μίγμα επωάζεται για 5 min στον πάγο υπό ανάδευση. Τέλος με φυγοκέντρηση στα 48000 g για 30 min, λαμβάνεται η κυτοχρωμική οξειδάση ως ίζημα, επαναδιαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM HEPES, 0.3 % w/v lauryl maltoside, pH 7.4 και αποθηκεύεται σε υγρό άζωτο.

3.2 Μετρήσεις UV-Vis, συντονισμού Raman και FTIR

Οι ακριβείς συνθήκες με τις οποίες ελήφθησαν τα φάσματα UV-Vis, συντονισμού Raman και FTIR αναφέρονται αναλυτικά στα επιμέρους κεφάλαια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ *aa₃-600* ΑΠΟ ΤΟ *Bacillus subtilis* ΒΑΚΤΗΡΙΟ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR

4.1 Εισαγωγή

Το κυτόχρωμα *aa₃-600* από το Gram-θετικό βακτήριο *Bacillus subtilis* είναι μέλος της οικογένειας των δομικά συγγενών αιμοχαλκοοξειδασών και αποτελεί την τελική οξειδάση της αναπνευστικής αλυσίδας του βακτηρίου κάτω από ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, μεταφέροντας ηλεκτρόνια από την υδροκινόνη MQ-7 στο O₂.^{1,3} Πρόσφατες φασματοσκοπικές μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο αυτό μετατοπίζει πρωτόνια κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης και καταλύει την αναγωγή του O₂ σε H₂O μέσω ενδιάμεσων προϊόντων, παρόμοιων εκείνων που σχηματίζονται κατά την αναγωγή του O₂ απ' την κυτοχρωμική οξειδάση.^{4,5} Επίσης, μελέτη του οξειδωμένου κυτοχρώματος *aa₃-600* με φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων-X έδειξε ότι η δομή του διπυρηνικού κέντρου του ενζύμου είναι παρόμοια με εκείνη που έχει δημοσιευτεί για την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων.² Το κυτόχρωμα *aa₃-600* έχει ορισμένα μοναδικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις υπόλοιπες *aa₃* τύπου οξειδάσες. Ως κινολική οξειδάση έχει μόνο τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα: την αίμη *a*, την αίμη *a₃* και το Cu_B. Η αίμη *a* μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από την υδροκινόνη MQ-7 στο διπυρηνικό κέντρο *a₃-Cu_B*, όπου πραγματοποιείται η δέσμευση και η αναγωγή του O₂.^{1,3} Σε αντίθεση με την πλήρως ανηγμένη κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, η οποία εμφανίζει μόνο μία δόνηση τάσης Fe-His376, το πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα *aa₃-600* χαρακτηρίζεται από δύο ν(Fe-His).⁶ Επιπλέον, το πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα *aa₃-600* εμφανίζει την α-ταινία απορρόφησης στα 600 nm, ~7 nm χαμηλότερα σε σχέση με τις περισσότερες *aa₃* οξειδάσες.^{1,4}

Πολλές από τις πληροφορίες που έχουμε για τη δομή και τη δυναμική του διπυρηνικού κέντρου των κυτοχρωμικών και των κινολικών οξειδάσων προέρχονται από τις μελέτες των CO-συμπλόκων αυτών των ενζύμων. Το CO δεσμεύεται στα μικτού σθένους και πλήρως ανηγμένα ένζυμα, ως τελικό ligand στην αίμη του διπυρηνικού κέντρου. Οι δονήσεις $\nu(\text{Fe-CO})$, $\delta(\text{Fe-C-O})$ και $\nu(\text{C-O})$ της $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ μονάδας έχουν χαρακτηριστεί για αρκετές τελικές οξειδάσες (Πίνακας 4.1), χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία συντονισμού Raman και FTIR. Επιπλέον της γεωμετρίας δέσμευσης, οι μελέτες αυτές έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες της proximal ιστοιδίνης και της αλληλεπίδρασης του CO με το γειτονικό περιβάλλον. Επίσης, μελέτες της κινητικής της φωτοδιάσπασης του δεσμού $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ και της επαναδέσμευσης του CO έχουν δώσει επιπλέον πληροφορίες για τη δυναμική του διπυρηνικού κέντρου και τις κινητικές ιδιότητες των σχηματιζόμενων ενδιάμεσων.^{14a,b,15} Ο δεσμός $\text{Fe}^{2+}\text{-His}$ ισχυροποιείται σε χρόνο $\sim 1\mu\text{s}$ μετά τη φωτόλυση, ενώ η επαναδέσμευση του CO συμβαίνει σε χρόνο $\sim 1\text{ms}$.

Πίνακας 4.1: Οι συχνότητες (cm^{-1}) των $\nu(\text{Fe-His})$, $\nu(\text{Fe-CO})$, $\delta(\text{Fe-C-O})$ και $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων για μερικές κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες

ένζυμα	$\nu(\text{Fe-His})$	$\nu(\text{Fe-})$	$\delta(\text{Fe-C-})$	$\nu(\text{C-O})$
κυτόχρωμα $aa_3\text{-600}$ (<i>B. subtilis</i>)	194/214 ⁶	520 ^a	575 ^a	1963 ^a
κυτοχρωμική οξειδάση (aa_3) (μιτοχόνδρια)	214 ^{20,21}	520 ⁷	578 ⁷	1963 ¹⁸
κυτόχρωμα ba_3 (<i>T. thermophilus</i>)	193/209 ²³			

κυτόχρωμα <i>bo</i> ₃ (<i>E. coli</i>)	208 ²⁹	524 ⁹	577 ⁹	1960 ³⁷
κυτόχρωμα <i>cbb</i> ₃ (<i>R. capsalatus</i>)	235 ²⁸	495 ⁸	574 ⁸	1950 ³⁸

^a Η παρούσα μελέτη

FTIR μελέτες της δέσμευσης του CO στην *aa*₃ οξειδάση των μιτοχονδρίων σε χαμηλή θερμοκρασία (10 K) έδειξαν ότι υπάρχουν δύο διαμορφώσεις του διπυρηνικού κέντρου α_3 -Cu_B, η α και η β μορφή, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικές $\nu(\text{C-O})$ συχνότητες.¹⁷ Η α μορφή εμφανίζει τη $\nu(\text{C-O})$ δόνηση στους 1963 cm⁻¹, ενώ η β μορφή στους 1952 cm⁻¹. Πρόσφατα βρέθηκε ότι η κυτοχρωμική *aa*₃ οξειδάση από το *Rhodobacter sphaeroides* βακτήριο εμφανίζει και τις δύο μορφές σε θερμοκρασία δωματίου (1966 cm⁻¹, 1955),¹¹ ενώ η κυτοχρωμική οξειδάση *cbb*₃ από το *Rhodobacter capsalatus* βακτήριο εμφανίζει μόνο τη β μορφή (1950 cm⁻¹).³⁸ Τέλος για την κινολική οξειδάση *bo*₃ από το *E. coli* έχει παρατηρηθεί μόνο η α μορφή (1960 cm⁻¹),³⁷ ενώ η κυτοχρωμική οξειδάση *ba*₃ από το *T. thermophilus* εμφανίζει δύο $\nu(\text{C-O})$, μία στους 1974 cm⁻¹ και μία στους 1984 cm⁻¹.²² Δεν είναι ακόμη γνωστό ποια είναι τα δομικά χαρακτηριστικά που ευθύνονται γι' αυτή τη διαφοροποίηση και πώς αυτά σχετίζονται με τη δράση των τελικών οξειδασών.

Μελέτες συντονισμού Raman και FTIR καρβονυλικών συμπλόκων αιμοπρωτεϊνών που έχουν ένα αξονικό ligand ιστιδίνης, έδειξαν ότι υπάρχει μία γραμμική σχέση μεταξύ των $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ συχνοτήτων. Η σχέση αυτή περιγράφεται από μία ευθεία με αρνητική κλίση σ' ένα διάγραμμα των $\nu(\text{Fe-CO})$ συχνοτήτων συναρτήσει των $\nu(\text{C-O})$ συχνοτήτων. Αυτή η «αντίστροφη γραμμική» σχέση αποδίδεται στην ύπαρξη του π δεσμού επαναφοράς, απ' το σίδηρο της αίμης στο δεσμευμένο CO. Παρά την παρουσία της proximal ιστιδίνης, οι κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες αποκλίνουν σημαντικά απ' αυτή τη συμπεριφορά. Οι $\nu(\text{C-O})$ συχνότητες της α μορφής είναι ιδιαίτερα υψηλές, με αποτέλεσμα τα ζεύγη [$\nu(\text{Fe-CO})$, $\nu(\text{C-O})$] να βρίσκονται εκτός της $\nu(\text{Fe-CO})/\nu(\text{C-O})$

ευθείας των His-υποκατεστημένων αιμοπρωτεϊνών. Αντίθετα, οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ συχνότητες της β μορφής της οξειδάσης aa_3 από το *Rhodobacter sphaeroides* δίνουν ένα σημείο πάνω στην ευθεία. Η αιτία που ευθύνεται για την υψηλή συχνότητα της $\nu(\text{C-O})$ δόνησης της α μορφής παραμένει άγνωστη. Έχει προταθεί ότι η υψηλή τιμή της $\nu(\text{C-O})$ μπορεί να οφείλεται σε εξασθένηση του δεσμού Fe-His376,⁷ ή σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις απ' το γειτονικό Cu_B .¹³

Μελέτες συντονισμού Raman έχουν δείξει ότι υπάρχουν αρκετές ομοιότητες μεταξύ του κυτοχρώματος aa_3 -600 και της μιτοχονδριακής οξειδάσης, όσον αφορά την υποκατάσταση και το περιβάλλον των ομάδων αίμης.⁶ Όμως στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων, το πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα aa_3 -600 χαρακτηρίζεται από δύο $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ δονήσεις, μία στους 214 cm^{-1} και μία στους 194 cm^{-1} . Αντίθετα, η κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, στην οποία η proximal His376 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πεπτιδική C=O ομάδα της Gly351,¹⁹ εμφανίζει μόνο μία $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ δόνηση στους 214 cm^{-1} .^{20,21} Έχει προταθεί ότι οι δύο $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ που παρατηρούνται για το κυτόχρωμα aa_3 -600 οφείλονται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της αίμης a_3 μέσα στη πρωτεΐνη, οι οποίες επιδρούν στην ισχύ του δεσμού $\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His}$. Η ύπαρξη δύο $\nu(\text{Fe}_{a_3}\text{-His})$ συχνοτήτων, εκ των οποίων η μία είναι ασυνήθιστα χαμηλή, δηλώνει την παρουσία ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της αζονικής ιστιδίνης, τα οποία μπορεί να έχουν καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του ενζύμου. Επομένως, ο χαρακτηρισμός του ενζύμου αυτού μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των τελικών οξειδασών.

Στην εργασία που παρουσιάζεται εδώ, μελετάται με φασματοσκοπία FTIR και συντονισμού Raman η δέσμευση του CO στην πλήρως ανηγμένη aa_3 -600 οξειδάση από το *B. subtilis*. Σε αντίθεση με την ba_3 οξειδάση από το *T. thermophilus* βακτήριο, η οποία χαρακτηρίζεται από δύο $\nu(\text{Fe-His})$ και δύο $\nu(\text{C-O})$ δονήσεις,^{22,23} τα αποτελέσματα για το κυτόχρωμα aa_3 -600 δείχνουν ότι, παρά την ύπαρξη δύο $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ δονήσεων δεν πραγματοποιείται σχάση των $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO})$, $\delta(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-C-O})$ και $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων. Οι δονήσεις αυτές εμφανίζονται στους 520 cm^{-1} , 575 cm^{-1} και 1963 cm^{-1} , αντίστοιχα και δηλώνουν την παρουσία της α μορφής του ενζύμου. Η γραφική παράσταση των $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His})$ συχνοτήτων συναρτήσει των $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO})$ συχνοτήτων που παρατηρούνται για την aa_3 -600 και άλλες τελικές οξειδάσες είναι ευθεία με αρνητική κλίση. Αυτό δηλώνει την ύπαρξη άμεσης αλληλεπίδρασης μεταξύ των $\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-His}$ και $\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO}$ δεσμών. Προτείνεται ότι οι $\nu(\text{Fe}_{a_3}^{2+}\text{-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ καθορίζονται τόσο απ' τη θέση του Cu_B , όσο

και από την οξύτητα της proximal ιστοιδίνης (His376), η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Gly351.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

Το κυτόχρωμα *aa₃-600* από το *B. subtilis* βακτήριο απομονώθηκε σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο καθαρισμού.¹ Σ' όλα τα πειράματα που αναφέρονται εδώ ως μέσο διάλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα: 50 mM HEPES, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.5. Για την πλήρη αναγωγή του ενζύμου τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα διαλύματος οξειδωμένου ενζύμου σε μικρό γυάλινο σωλήνα, ο οποίος σφραγίστηκε με septum. Το δείγμα απαερώθηκε σε γραμμή κενού, πραγματοποιώντας συνεχόμενους κύκλους κενού-ατμόσφαιρας Ar. Υπό ατμόσφαιρα αργού προστέθηκε μικρός όγκος κορεσμένου διαλύματος Na₂S₂O₄, 15 mM ασκορβικό νάτριο και 1mM TMPD (*N,N,N',N'*-τετραφένυλ-*p*-φαινυλενοδιαμίνη) και παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος του ενζύμου, η οποία είναι ενδεικτική για την πραγματοποίηση της αναγωγής. Στη συνέχεια, προστέθηκαν υπό κενό 3-4 ml ¹²C¹⁶O ή ¹³C¹⁶O. Το δείγμα επώαστηκε για μερικές ώρες, ενώ ενδιάμεσα πραγματοποιήθηκε ανανέωση της ατμόσφαιρας του CO στο δείγμα.

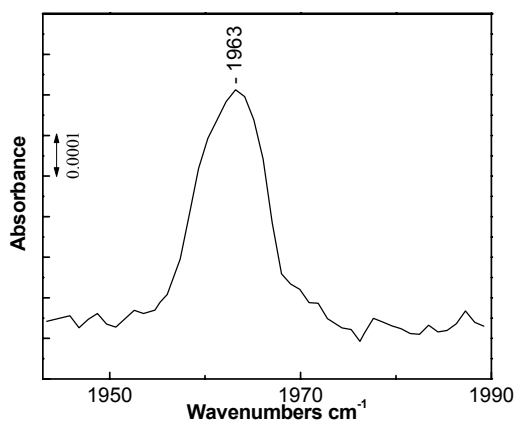
Για τα FTIR πειράματα ελήφθησαν τα φάσματα του *aa₃-600-CO* συμπλόκου και του μέσου διαλύσης. Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 250 μM ως προς την αίμη A. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία IR κυψελίδα με CaF₂ παράθυρα και 52 μm spacer. Τα φάσματα καταγράφηκαν ως προς τον αέρα με διακριτική ικανότητα 2 cm⁻¹ χρησιμοποιώντας ένα BRUKER EQUINOX 55 FTIR φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με ένα ανιχνευτή MCT. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν 2100 interferograms. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια του software επεξεργασίας δεδομένων Origin 4. Από το φάσμα του *aa₃-600-CO* συμπλόκου αφαιρέθηκε το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος. Στο φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline.

Για τα φάσματα συντονισμού Raman, η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 40 μM. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία περιστρεφόμενη κυλινδρική κυψελίδα από χαλαζία. Η θερμοκρασία των δειγμάτων διατηρήθηκε στους 3-5 °C με ένα ρεύμα κρύου αερίου αζώτου πάνω στο δείγμα σ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα φάσματα καταγράφηκαν με ένα SPEX 1877 triplemate εξοπλισμένο μ' έναν EG&gG (μοντέλο 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Ένα Coherent Innova K-90 krypton ion laser χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή του μήκους κύματος διέγερσης 413.1 nm. Η ισχύς της δέσμης ήταν 2-4 mV.

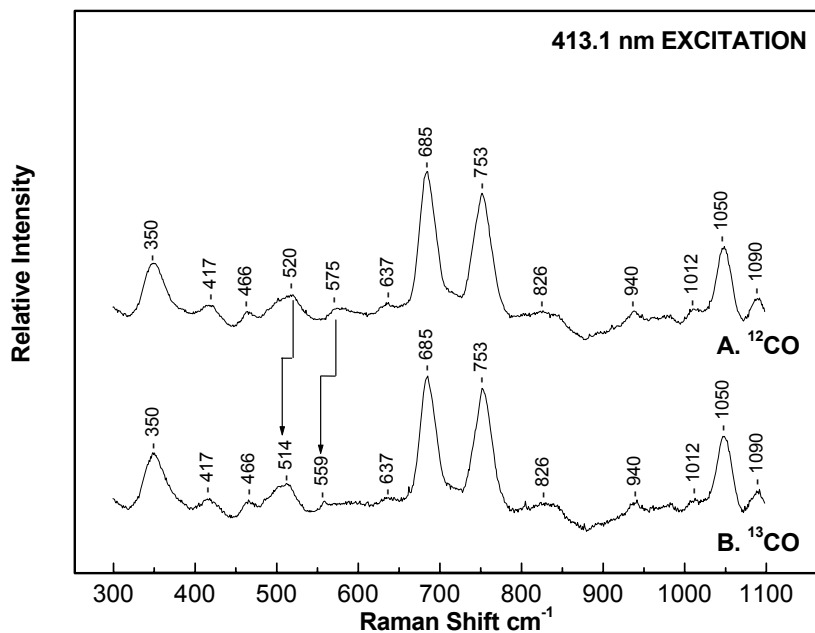
Προκειμένου να πιστοποιηθεί η σταθερότητα των δειγμάτων, ελήφθησαν επίσης τα UV-Vis φάσματα των δειγμάτων πριν και μετά τη λήψη των φασμάτων συντονισμού Raman και FTIR. Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφηκαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο.

4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζεται το FTIR φάσμα του CO-συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος aa_3 -600. Δέσμευση του CO προκαλεί την εμφάνιση μίας απλής δόνησης στους 1963 cm^{-1} με $\Delta\nu_{1/2}=8.1\text{ cm}^{-1}$, η οποία αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O. Τα αντίστοιχα φάσματα συντονισμού Raman των συμπλόκων του aa_3 -600 με το ^{12}CO και το ^{13}CO φαίνονται στο σχήμα 4.2. Το φάσμα ^{12}CO -υποκατεστημένου ενζύμου



Σχήμα 4.1 Το FTIR φάσμα του CO-συμπλόκου του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος aa_3 -600.



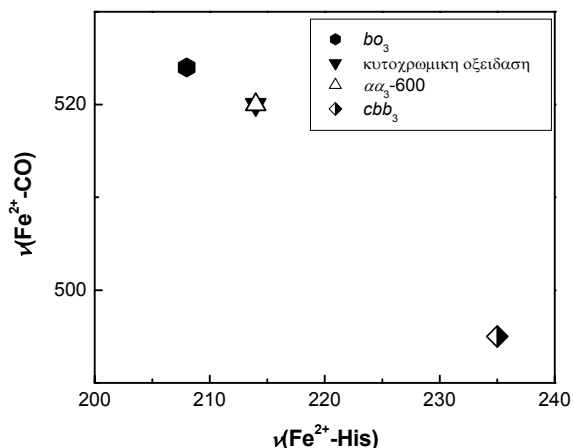
Σχήμα 4.2 Η περιοχή 300-1100 cm^{-1} των φασμάτων συντονισμού Raman των συμπλόκων του πλήρως ανηγμένου κυτοχρώματος α_3 -600 με τα Α) $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ και Β) $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$.

εμφανίζει δύο δονήσεις, μία στους 520 cm^{-1} και μία στους 575 cm^{-1} , οι οποίες μετατοπίζονται στους 514 cm^{-1} και 559 cm^{-1} αντίστοιχα, όταν δεσμεύεται το $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$. Η 520 cm^{-1} δόνηση αποδίδεται στη $\nu(\text{Fe-CO})$ δόνηση τάσης και η 575 cm^{-1} στη $\delta(\text{Fe-C-O})$ δόνηση κάμψης. Οι συχνότητες των παραπάνω δονήσεων είναι πολύ κοντά σ' εκείνες που έχουν παρατηρηθεί για την α_3 οξειδάση από τα μιτοχόνδρια^{7,12} και το *Rhodobacter sphaeroides* βακτήριο,^{11,13} καθώς και για τη bo_3 οξειδάση από το *E. coli*⁹ (Πίνακας 4.1). Από φασματοσκοπικές μελέτες μοντέλων αίμης, προκύπτει ότι η ένταση της δόνησης κάμψης είναι ανάλογη της κλίσης που αποκτά το CO λόγω των στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Στα φάσματα συντονισμού Raman που παρουσιάζονται εδώ, ο λόγος της έντασης της δόνησης $\delta(\text{Fe-C-O})$ προς την ένταση της δόνησης $\nu(\text{Fe-CO})$ του CO-υποκατεστημένου α_3 -600 κυτοχρώματος είναι παρόμοιος με εκείνον για το α_3 -CO σύμπλοκο από τα μιτοχόνδρια ($I_\delta/I_\nu=0.2-0.4$). Αυτό σημαίνει ότι η διαμόρφωση της Fe-C-O μονάδας είναι όμοια με εκείνη του α_3 -CO συμπλόκου, δηλαδή η Fe-C-O μονάδα σχηματίζει γωνία 21° με τον κύριο άξονα της αίμης (κεκλιμένη διαμόρφωση).²⁵

Τα φάσματα FTIR και συντονισμού Raman που παρουσιάζονται εδώ δείχνουν καθαρά ότι παρά την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του πλήρως ανηγμένου μη υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 -600, το CO δεσμεύεται σε μία μόνο διαμόρφωση στην αίμη a_3 . Στην περίπτωση που το CO δεσμευόταν σε δύο διαμορφώσεις, έπρεπε να υπάρχει ένα δεύτερο ζεύγος $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{CO})$ δονήσεων. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάτι τέτοιο. Οι συχνότητες $\nu(\text{Fe-CO})=520 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{Fe-C-O})=575 \text{ cm}^{-1}$ και $\nu(\text{C-O})=1963 \text{ cm}^{-1}$ που χαρακτηρίζουν το μοναδικό σύμπλοκο aa_3 -600-CO που σχηματίζεται, δηλώνουν την παρουσία της a μορφής του ενζύμου. Παρόμοιες δονήσεις έχουν παρατηρηθεί κατά τη δέσμευση του CO στην aa_3 οξειδάση των μιτοχονδρίων, για την οποία έχει βρεθεί ότι η proximal His376 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πεπτιδική καρβονυλική ομάδα της Gly351. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι στο κυτόχρωμα aa_3 -600 η δέσμευση του CO στην αίμη a_3 μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των διαμορφώσεων του ενζύμου, προς εκείνη την κατεύθυνση, στην οποία η His376 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Gly351. Ωστόσο, για το κυτόχρωμα ba_3 απ' το *T. thermophilus* βακτήριο έχει παρατηρηθεί σχάση τόσο της $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His})$ δόνησης του πλήρως ανηγμένου μη υποκατεστημένου ενζύμου, όσο και της $\nu(\text{C-O})$ δόνησης του CO-σμπλόκου, γεγονός που δηλώνει την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων του ενζύμου και στις δύο καταστάσεις^{22,23}. Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να είναι το αποτέλεσμα αλλαγών στην περιοχή της proximal ιστιδίνης, όπως συζητείται παρακάτω.

Από μελέτες συντονισμού Raman καρβοξυλικών συμπλόκων αιμοπρωτεϊνών, είναι γνωστό ότι οι ιδιότητες του ligand σε θέση trans ως προς το δεσμευμένο CO, μπορούν να επηρεάσουν το δεσμό Fe-CO, άρα και τη συχνότητα της $\nu(\text{C-O})$ δόνησης.²⁶ Το CO δεσμεύεται στο σίδηρο της αίμης μέσω ενός π δεσμού επαναφοράς από το d_{π} τροχιακό του σιδήρου στο π^* τροχιακό του CO και ενός σ δεσμού που σχηματίζεται από το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του CO και το d_z^2 του σιδήρου. Αύξηση της αλληλεπικάλυψης των d_{π} , π^* τροχιακών θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της τάξης του δεσμού του Fe-CO και τη σύγχρονη μείωση της τάξης του δεσμού C-O.²⁷ Ωστόσο, τα δύο αξονικά ligands της αίμης (His, CO) ανταγωνίζονται για το ίδιο d_z^2 τροχιακό του σιδήρου για το σχηματισμό του σ δεσμού με το σίδηρο. Έτσι, ισχυροποίηση του σ δεσμού Fe-His θα έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του δεσμού Fe-CO. Αυτό το συμπέρασμα είναι σύμφωνο με μελέτες συντονισμού Raman μοντέλων πορφυρινικών ενώσεων, οι οποίες δείχνουν ότι η αύξηση της ισχύος του δεσμού Fe-proximal ligand προκαλεί την εξασθένηση του δεσμού Fe-CO.^{26,27}

Στο σχήμα 4.3 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ συχνοτήτων συναρτήσει των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His})$ συχνοτήτων για μερικές τελικές οξειδάσες. Αυτή η γραφική παράσταση δίνει μία ευθεία με αρνητική κλίση. Η $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His})$ δόνηση είναι στους 214 cm^{-1} για την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια και το κυτόχρωμα $aa_3\text{-600}$, στους 208 cm^{-1} για την bo_3 οξειδάση και τους 235 cm^{-1} για την cbb_3 οξειδάση (Πίνακας 4.1).^{6,9,20,21,28}



Σχήμα 4.3 Γραφική παράσταση των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ συχνοτήτων συναρτήσει των $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His})$ συχνοτήτων που παρατηρούνται για τις κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες.

Οι παρατηρούμενες διαφορές στις συχνότητες μπορούν να αποδοθούν σε διαφορές της ισχύος του δεσμού υδρογόνου μεταξύ της proximal His376 και της Gly351. Ο σχηματισμός ενός ισχυρού δεσμού υδρογόνου θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ανιονικού χαρακτήρα του ιμιδαζολίου της His376, με συνέπεια την αύξηση της συχνότητας της $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-His})$. Η παρατηρούμενη μείωση της $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ συχνότητας κατά 25 cm^{-1} για το κυτόχρωμα cbb_3 ⁸ σε σύγκριση με την οξειδάση από τα μιτοχόνδρια,⁷ αποδίδεται σε αύξηση του ανιονικού χαρακτήρα του ιμιδαζολίου της proximal ιστιδίνης. Όμως, η αύξηση του ανιονικού χαρακτήρα της His376 συνεπάγεται αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του $\text{Fe}_{b_3}^{2+}$ του κυτοχρώματος cbb_3 και άρα ισχυροποίηση του π δεσμού επαναφοράς, απ' το $\text{Fe}_{b_3}^{2+}$ στο CO, με αποτέλεσμα τη μείωση της $\nu(\text{C-O})$, όπως πράγματι παρατηρείται (Πίνακας 4.1). Ωστόσο, η αναμενόμενη αύξηση της τάξης του δεσμού $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ αντισταθμίζεται απ' την ισχυρή αλληλεπίδραση του d_z^2 τροχιακού του Fe^{2+} με την His376 για το σχηματισμό του σ δεσμού, με επακόλουθο τη μείωση της $\nu(\text{Fe}^{2+}\text{-CO})$ συχνότητας.

Σύμφωνα με την παραπάνω ερμηνεία, η ισχύς του δεσμού υδρογόνου μεταξύ της His376 και της Gly351 καθορίζει την ισχύ των δεσμών Fe-CO και C-O στις αιμοχάλκο-οξειδάσες. Επιπλέον, ab initio υπολογισμοί έχουν δείξει ότι η proximal ιστιδίνη καθορίζει

σ' ένα μεγάλο ποσοστό την παραμόρφωση του CO στις σφαιρικές πρωτεΐνες.³⁰ Ωστόσο, μελέτες συντονισμού Raman της δέσμευσης του CO στο κυτόχρωμα aa_3 απ' το *R. sphaeroides* βακτήριο έδειξαν ότι η αντικατάσταση της His333, η οποία είναι ένα ligand του Cu_B , με μία Asn έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της $\nu(\text{Fe-CO})$ δόνησης 16 cm^{-1} χαμηλότερα από τη συχνότητα που παρατηρείται για το φυσικό ένζυμο.¹³ Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προτάθηκε ότι, η υψηλή συχνότητα της $\nu(\text{Fe-CO})$ δόνησης για το φυσικό κυτόχρωμα aa_3 απ' το *R. sphaeroides* και η απόκλιση των αιμοχαλκοξειδασών απ' την $\nu(\text{Fe-CO})/\nu(\text{C-O})$ ευθεία των His-υποκατεστημένων αιμοπρωτεϊνών μπορεί να οφείλονται στην ύπαρξη παρεμποδίσεων απ' το γειτονικό Cu_B . Αυτή η πρόταση έρχεται, κατά κάποιον τρόπο, σε αντίθεση με τα φασματοσκοπικά δεδομένα για το όξυ ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά την αναγωγή του O_2 απ' την κυτοχρωμική οξειδάση,³¹⁻³³ καθώς η $\nu(\text{Fe-O}_2)$ συχνότητα για το $a_3^{2+}\text{-O}_2$ ενδιάμεσο είναι παραπλήσια εκείνης που παρατηρείται για το όξυ σύμπλοκο των πρωτεϊνών μεταφοράς οξυγόνου.^{34,35} Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το περιβάλλον γύρω από την αίμη επιδρά πολύ λίγο στο δεσμευμένο ligand. Είναι αξιοσημείωτο ότι η αλλαγή του διαλύτη από H_2O σε D_2O δεν προκαλεί μετατόπιση των $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων.³⁶ Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών¹³ προτείνουν ότι, όσον αφορά τις αιμοχαλκοξειδάσες, η ισχύς του δεσμού υδρογόνου, που σχηματίζει η proximal ιστιδίνη, επηρεάζει την ισχύ τόσο του δεσμού Fe-CO, όσο και του δεσμού C-O δεσμού. Οι δεσμοί αυτοί μπορεί να επηρεάζονται επιπλέον απ' τον γειτονικό Cu_B .

Η αιτία σε μοριακό επίπεδο του σχηματισμού ενός μόνο aa_3 -600-CO συμπλόκου, είναι μοναδική. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για το κυτόχρωμα ba_3 έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη δύο διαμορφώσεων τόσο για την πλήρως ανηγμένη μη υποκατεστημένη μορφή του ενζύμου, όσο και για τη CO-υποκατεστημένη μορφή.^{22,23} Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι οι σχετικές εντάσεις των $\nu(\text{Fe-His})$ δονήσεων εξαρτώνται από τη θερμοκρασία με τον ίδιο τρόπο που εξαρτώνται και οι σχετικές εντάσεις των $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων. Επομένως, η σχάση των $\nu(\text{Fe-His})$ και $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων πρέπει να οφείλεται στους ίδιους παράγοντες διαμόρφωσης. Στο κυτόχρωμα aa_3 -600 όμως, η δέσμευση του CO αλλάζει τη διαμόρφωση της proximal His376, έτσι ώστε να είναι επιθυμητός ο σχηματισμός του δεσμού υδρογόνου. Αυτή η αλλαγή της διαμόρφωσης μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό ελέγχου για τη συναρμογή και τη χημεία της αίμης a_3 . Επιπλέον, ο δεσμός υδρογόνου μπορεί να ρυθμίζει τη βασικότητα της His376 με τέτοιο τρόπο, ώστε να σταθεροποιεί την υψηλού βαθμού

οξειδωτική κατάσταση $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$ της αίμης α_3 , η οποία σχηματίζεται κατά την αναγωγή του O_2 .

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας αποδεικνύουν ότι παρά την ύπαρξη δύο διαμορφωμένων του πλήρως ανηγμένου μη υποκατεστημένου κυτοχρώματος α_3 -600, το CO δεσμεύεται στην αίμη α_3 σε μία μόνο διαμόρφωση του ενζύμου, η οποία μοιάζει με την α μορφή της α_3 οξειδάσης των μιτοχονδρίων. Επίσης, τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με εκείνα προηγούμενων μελετών δείχνουν ότι οι $\nu(\text{Fe-CO})$ και $\nu(\text{C-O})$ συχνότητες των CO υποκατεστημένων τελικών αναπνευστικών οξειδασών επηρεάζονται τόσο από το εγγύς, όσο και από το trans περιβάλλον της αίμη Fe-CO μονάδας.

Βιβλιογραφία

1. Lauraeus, M.; Haltia, T.; Saraste, M.; Wikstrom, M. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 699-705.
2. Powers, L.; Lauraeus, M.; Reddy, K. S.; Chance, B., Wikstrom, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *113*, 504-512.
3. Lauraeus, M.; Wikstrom, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11470-11473.
4. Lauraeus, M.; Morgan, J. E.; Wikstrom, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2664-2670.
5. Varotsis, C.; Lauraeus, M.; Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1231*, 111-116.
6. Lauraeus, M.; Wikstrom, M.; Varotsis, C.; Tecklenberg, M. M. J.; Babcock, G. T. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10054-10060.
7. Argade, P. V.; Ching, Y.-c.; Rousseau, D. L. *Science* **1984**, *225*, 329-331.
8. Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9363-9364.
9. Wang, J.; Ching, Y.-c.; Rousseau, D. L.; Hill, J. J.; Rumbley, J.; Gennis, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *115*, 3390-3391.
10. Wang, J.; Takahashi, S.; Rousseau, D. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 9402-9406.
11. Wang, J.; Takahashi, S.; Hosler, J. P.; Mitchell, D. M.; Ferguson-Miller, S.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9818-9825.
12. Hirota, S.; Ogura, T.; Shinzawa-Itor, K.; Yoshikawa, S.; Nagai, M.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6652-6660.
13. Hosler, J. P.; Kim, Y.; Shapleigh, J.; Gennis, R.; Alben, J.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5515-5516.
14. (a) Findsen, E. W.; Centeno, J. A.; Babcock, G. T.; Ondrias, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5367-5372. (b) Schelvis, H.; Varotsis, C.; Deinum, G.; Ferguson-Miller, S.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8409-8416.
15. Varotsis, C.; Kreszowski, D. H.; Babcock, G. T. *Biospectroscopy* **1996**, *2*, 331-338.

16. Alben, J. O.; Caughey, W. S. *Biochemistry* **1968**, *7*, 175-183.
17. Alben, J. O.; Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 234-237.
18. Yoshikawa, S.; Choc, M. C.; O'Tool, M. C.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 5494-5508.
19. Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, *269*, 1069-1074.
20. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T.G., Ed.; Wiley: New York, 1998; Vol. 3, p 293.
21. Kitagawa, T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G.; Ed; Willey: New York, 1998; Vol. 3, p 97.
22. Einarsdottir, O.; Killough, P. M.; Fee, J. A.; Woodruff, W. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2405-2408.
23. Oertling, W. A.; Surerus, K. K.; Einarsdottir, O.; fee, J. A.; Dyer, R. B.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3128-3141.
24. Yu, N. T.; Kerr, E. A.; Ward, B.; Chang, C. K. *Biochemistry* **1983**, *22*, 4534-4540.
25. Dyer, R. B.; Lopez- Carriga, J. J.; Einarsdottir, O.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8962-8963.
26. Li, X.-Y.; Spiro, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *110*, 6024-6033.
27. Yu. N.-T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol. 3, p 39.
28. Varotsis, C.; Babcock, G. T.; Garcia- Horman, J, A.; Gennis, R. B. *J. Phys, Chem.* **1995**, *99*, 16817-16820.
29. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H.; Hirota, S.; Ogura, T.; Kitagawa, T.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *49*, 30861-30868.
30. Jewsbury, P.; Yamamoto, S.; Minato, T.; Saito, M.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem.* **1994**, *116*, 11586-11587.
31. Varotsis, C.; Zhang, Y.; Appelman, E. H.; Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* **1993**, *90*, 237-241.
32. Han, S.; Ching, Y.-c.; Rousseau, D. L. *Nature* **1990**, *348*, 89-90.
33. Ogura, T., Takahashi, S.; Hirota, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appelman, E.; Kitagawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *111*, 8527-8536.
34. Brunner, H. *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 129-130.
35. Van Wart, H. E.; Zimmer, J. *J. Biol. Chem.* **1985**, *265*, 8372-8377.
36. Varotsis et al. Unpublished results.
37. Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
38. Garcia-Horsman, J. A.; Berry, E.; Shapleigh, J. P.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 3113-3119.

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-VIS, ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΛΗΡΩΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ *P.denitrificans* ΒΑΚΤΗΡΙΟ

5.1 Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδάση (κυτόχρωμα aa_3) από το *P. denitrificans* βακτήριο είναι μία από τις τελικές οξειδάσες της αναπνευστικής αλυσίδας του βακτηρίου και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα c στο O_2 , ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης στην οποία είναι βυθισμένη.¹⁻⁷ Το κυτόχρωμα aa_3 έχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: το Cu_A , τη χαμηλού spin αίμη α , την υψηλού spin αίμη α_3 και το Cu_B με τα δύο τελευταία να σχηματίζουν ένα spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο, στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου. Το διπυρηνικό αυτό κέντρο είναι η θέση δέσμευσης και αναγωγής του οξυγόνου.⁸ Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου δείχνουν ότι παρουσία αζιδίου (NaN_3) ο Cu_B διατηρεί μόνο τα δύο από τα τρία ligands ιστιδίνης με τα οποία συναρμόζεται απουσία του αναστολέα.^{2a,b} Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η παρουσία του αζιδίου προκαλεί την απομάκρυνση της His325 (His290 στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων), χωρίς όμως να αποκαλύπτεται η θέση δέσμευσης του αζιδίου μέσα στο ένζυμο. Η αίμη α_3 διατηρεί την His411 (His376 στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων) στην πέμπτη θέση συναρμογής, η ερμηνεία όμως της ηλεκτρονικής πυκνότητας μεταξύ του Fe_{a_3} και του Cu_B δεν ήταν δυνατή. Τα παραπάνω αποτελέσματα δηλώνουν την ύπαρξη ιδιαίτερων γνωρισμάτων του ενζύμου, καθώς η κρυσταλλική δομή της κυτοχρωμικής οξειδάσης από τα μιτοχόνδρια δείχνει ότι ο Cu_B διατηρεί και τα τρία ligands ιστιδίνης παρουσία αζιδίου, ενώ προτείνει ότι το αζίδιο σχηματίζει μία $\mu-1,3$ γέφυρα με τα ιόντα του $Fe_{a_3}^{3+}$ και του Cu_B^{2+} .⁹

Αποτελέσματα μελετών με χρήση χρονοεξαρτώμενων τεχνικών φασματοσκοπίας συντονισμού Raman, UV-Vis και MCD προτείνουν ότι, κατά τη δέσμευση του CO στο Cu_B^{1+} , μετά τη φωτοδιάσπαση του συμπλόκου Fe^{2+} -CO, ένα ενδογενές ligand του Cu_B^{1+} απομακρύνεται και δεσμεύεται στην έκτη θέση της αίμης α_3^{2+} , ενώ ταυτόχρονα απομακρύνεται η proximal His376 από την αίμη α_3 .¹⁰ Παρόμοιες αλλαγές στη σφαίρα συναρμογής της αίμης α_3 και του Cu_B έχουν προταθεί ότι ευθύνονται για τη σύζευξη της μεταφοράς των e^-/H^+ , η οποία πραγματοποιείται κατά τον καταλυτικό κύκλο των τελικών οξειδωσών.¹¹ Ως ένα πρώτο βήμα για την κατανόηση των φαινομένων απομάκρυνσης και ανταλλαγής των ligands, τα οποία έχουν προταθεί ότι συμβαίνουν στο διπυρηνικό κέντρο, είναι απαραίτητο να διευκρινιστεί αρχικά η έκταση στην οποία η αίμη ή ο Cu_B μπορούν να μεταβάλλουν ή να επεκτείνουν τη σφαίρα συναρμογής τους. Μία προσέγγιση αυτού του ζητήματος είναι η φασματοσκοπική μελέτη της δέσμευσης εναλλακτικών ligands. Ο χαρακτηρισμός του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή το ένζυμο αυτό δρα ως οξειδοαναγωγική αντλία πρωτονίων, όπως και η κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων και επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα μετάλλαξης αμινοξέων, τα οποία θεωρούνται ότι σχετίζονται άμεσα με την καταλυτική δράση του ενζύμου.⁵ Σύγκριση αυτής της οξειδάσης με τις άλλες τελικές οξειδάσες μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τις δομικές και λειτουργικές ιδιότητες όλων των αιμοχάλκοοξειδωσών και να προσδιορίσουμε τα δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία διατηρούνται μέσα στην οικογένεια αυτών των ενζύμων και ευθύνονται για τη σημαντική λειτουργία τους.

Στην εργασία που παρουσιάζεται εδώ, χαρακτηρίζεται με χρήση φασματοσκοπίας UV-Vis, FTIR και συντονισμού Raman η αλληλεπίδραση του αζιδίου με το κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι το N_3^- δεσμεύεται στο κυτόχρωμα aa_3 σε δύο φάσεις: μία φάση υψηλής συγγένειας με $K_d=4.1 \mu\text{M}$, στην οποία δεσμεύεται σε μία μη μεταλλική θέση κοντά στο διπυρηνικό κέντρο και μία φάση χαμηλής συγγένειας με $K_d=11.4 \text{ mM}$, στην οποία το N_3^- δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο. Η φάση χαμηλής συγγένειας χαρακτηρίζεται από δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ στους 2038 cm^{-1} και 2056 cm^{-1} και μία $\nu(\text{Fe-N}_3\text{-Cu}_B)$ στους 417 cm^{-1} . Η παρατήρηση δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ προτείνει ότι το αζίδιο δεσμεύεται σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις σχηματίζοντας και στις δύο ένα σύμπλοκο γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

Η κυτοχρωμική οξειδάση απομονώθηκε από το *P. denitrificans* βακτήριο σύμφωνα με το δημοσιευμένο πρωτόκολλο καθαρισμού.⁷ Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο μέχρι τη χρήση τους. Ως μέσο διάλυσης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα: 50 mM HEPES, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4. Η επεξεργασία όλων των φασμάτων έγινε με το software επεξεργασίας δεδομένων Origin 4.

Για τα UV-Vis πειράματα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα από χαλαζία με μήκος διαδρομής 0.5 cm και τα φάσματα ελήφθησαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Η αρχική συγκέντρωση του πρωτεΐνης ήταν 5.5 μM και ο αρχικός όγκος του δείγματος ήταν 130 μl . Η τιτλοδότηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με τη σταδιακή προσθήκη 0.4 μl διαλυμάτων NaN_3 , η συγκέντρωση των οποίων αυξανόταν με την πρόοδο του πειράματος. Τα UV-Vis φάσματα διαφοράς λαμβάνονταν 10 min μετά την προσθήκη του αζιδίου. Ο τελικός όγκος του δείγματος ήταν 137.2 μl και οι τελικές συγκεντρώσεις του ενζύμου και του NaN_3 ήταν 5.2 μM και 16.7 mM, αντίστοιχα. Σ' όλα τα φάσματα έγινε διόρθωση της έντασης λόγω της αραιώσης του δείγματος. Η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από τη γραφική παράσταση του αντιστρόφου της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret ως προς το αντίστροφο της συγκέντρωσης του NaN_3 στο δείγμα (διάγραμμα Lineweaver-Burk). Για τη φάση υψηλής συγγένειας, όπου η συγκέντρωση του αζιδίου είναι μικρή, η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την κλίση της ευθείας που προκύπτει από το διάγραμμα Lineweaver-Burk. Στη φάση χαμηλής συγγένειας, η συγκέντρωση του αζιδίου είναι μεγάλη και η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την τετμημένη επί την αρχή στο αντίστοιχο διάγραμμα Lineweaver-Burk.

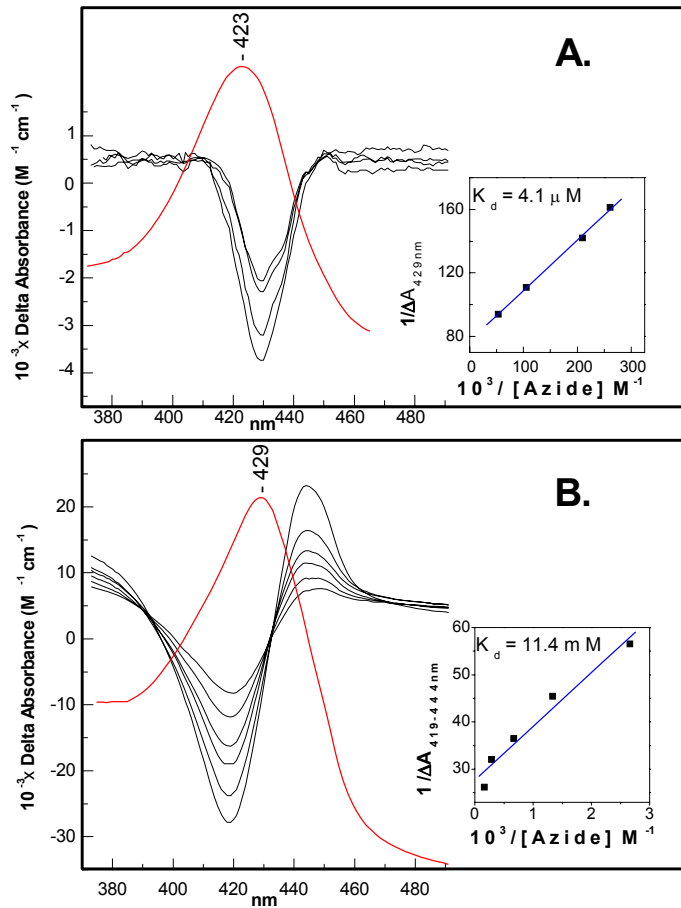
Για τα FTIR πειράματα παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα: α) $aa_3\text{-N}_3$: 30 μl διαλύματος κυτοχρώματος aa_3 συγκέντρωσης 120 μM αναμίχθηκαν με 2.1 μl διαλύματος Na^{14}N_3 ή $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ συγκέντρωσης 90 mM και η αναλογία [aa_3]: $[\text{NaN}_3]$ ήταν 1:53, β) aa_3 δείγμα αναφοράς: 30 μl διαλύματος κυτοχρώματος aa_3 συγκέντρωσης 120 μM αναμίχθηκαν με 2.1 μl ρυθμιστικού διαλύματος, η τελική συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 112 μM και γ) δείγμα αναφοράς ελεύθερου αζιδίου: 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος αναμίχθηκαν με 2.1 μl διαλύματος Na^{14}N_3 ή $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ συγκέντρωσης 90 mM, η τελική συγκέντρωση του αζιδίου ήταν 5.88 mM. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε IR κυψελίδα με CaF_2 παράθυρα και spacer 52 μm . Τα φάσματα των παραπάνω δειγμάτων και του

ρυθμιστικού διαλύματος καταγράφηκαν ως προς τον αέρα μ' ένα BRUKER EQUINOX 55 FTIR φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με ένα MCT ανιχνευτή. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν 2 cm^{-1} και για κάθε δείγμα ελήφθησαν 2100 interferograms. Λόγω της έντονης απορρόφησης του νερού στην περιοχή $2000\text{-}2100\text{ cm}^{-1}$ και της ισχυρής και ευρείας δόνησης του ελεύθερου N_3^- στους 2048 cm^{-1} πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία των φασμάτων. Από το φάσμα του ενζύμου-αζιδίου αφαιρέθηκε το αντίστοιχο φάσμα του ελεύθερου ενζύμου και από το αντίστοιχο φάσμα του ελεύθερου αζιδίου αφαιρέθηκε το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος. Στα φάσματα διαφοράς τα οποία ελήφθησαν από τις δύο αφαιρέσεις έγινε διόρθωση της baseline. Στη συνέχεια από το φάσμα διαφοράς του συμπλόκου ένζυμο-αζίδιο αφαιρέθηκε το φάσμα διαφοράς του ελεύθερου αζιδίου πολλαπλασιασμένο με ένα συντελεστή. Ο συντελεστής αυτός υπολογίστηκε βάσει του κλάσματος του αζιδίου που δεσμεύεται. Στο τελικό φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline.

Για τα φάσματα συντονισμού Raman, η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν $35\text{ }\mu\text{M}$. Η τελική συγκέντρωση του αζιδίου ήταν $100\text{ }\mu\text{M}$ για τα πειράματα στη φάση υψηλής συγγένειας και 20 mM για τα πειράματα στη φάση χαμηλής συγγένειας. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία περιστρεφόμενη κυλινδρική κυψελίδα από χαλαζία. Η θερμοκρασία των δειγμάτων διατηρήθηκε στους $3\text{-}5\text{ }^\circ\text{C}$, με ένα ρεύμα κρύου αερίου αζώτου πάνω στο δείγμα σ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα δεδομένα καταγράφηκαν με ένα SPEX 1877 triplamate εξοπλισμένο μ' έναν EG&G (μοντέλο 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Ένα Coherent Innova K-90 krypton ion laser χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του μήκους κύματος διέγερσης 413.1 nm . Για το μήκος κύματος διέγερσης 427 nm χρησιμοποιήθηκε ένα Coherent 590 dye laser συνδεδεμένο μ' ένα Coherent Innova 200 Argon laser. Η ισχύς της δέσμης ήταν $8\text{-}10\text{ mW}$.

5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 5.1 παρουσιάζονται τα απόλυτα φάσματα απορρόφησης του οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο (σχήμα 5.1A) και του N_3 -συμπλόκου του ενζύμου (σχήμα 5.1B), σε $\text{pH}=7.4$. Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζονται



Σχήμα 5.1 Τα απόλυτα οπτικά φάσματα απορρόφησης του οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (σχήμα 5.1A) και του N_3 -υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 (σχήμα 5.2B) και τα φάσματα διαφοράς του aa_3 - N_3 μείον το φάσμα του aa_3 κατά τη σταδιακή προσθήκη του αζιδίου. Στη φάση υψηλής συγγένειας (σχήμα 5.1A) η αναλογία των συγκεντρώσεων $[aa_3]:[NaN_3]$ είναι 1:0.8, 1:1.2, 1:2 και 1:4. Στη φάση χαμηλής συγγένειας (σχήμα 5.1B) η αναλογία των συγκεντρώσεων $[aa_3]:[NaN_3]$ είναι 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1200 και 1:2200. Στα ένθετα φαίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα Lineweaver-Burk, βάσει των οποίων υπολογίζονται οι σταθερές διάστασης των δύο φάσεων.

επίσης τα οπτικά φάσματα διαφοράς του aa_3 - N_3 συμπλόκου ως προς το φάσμα του οξειδωμένου ενζύμου, τα οποία λαμβάνονται κατά τη σταδιακή προσθήκη του NaN_3 στο

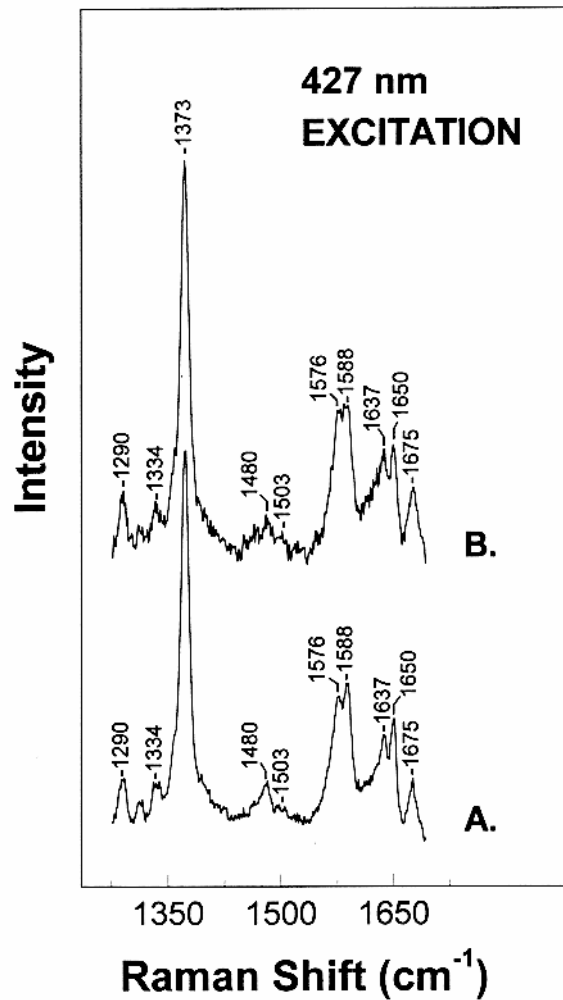
κυτόχρωμα aa_3 . Προσθήκη 5 mM NaN_3 σε 5.5 μM κυτοχρώματος aa_3 προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας κατά 6 nm, από τα 423 nm στα 429 nm, σε αντίθεση με την κινολική οξειδάση bo_3 από το *E. coli* βακτήριο και την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, στις οποίες προσθήκη περίσσειας αζιδίου προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας μόνο κατά 2-3 nm, σε pH 7.4 (κεφάλαια 6 και 7, αντίστοιχα). Τα φάσματα διαφοράς χαρακτηρίζονται από δύο σειρές αλλαγών στην απορρόφηση. Σε συγκεντρώσεις αζιδίου μικρότερες από 0.4 mM παρατηρείται μηδενική διασταύρωση στα 410 nm και ελάχιστο απορρόφησης στα 429 nm, το οποίο δηλώνει μείωση της έντασης της Soret ταινίας. Η γραφική παράσταση του αντιστρόφου της μεταβολής της απορρόφησης στα 429 nm ($1/\Delta A_{429\text{nm}}$) ως συνάρτηση του αντιστρόφου της συγκέντρωσης του αζιδίου ($1/[\text{NaN}_3]$) είναι ευθεία και αντιστοιχεί σε σταθερά διάστασης $K_d=4.1 \mu\text{M}$. Οι μικρές αλλαγές που παρατηρούνται στην απορρόφηση και η μικρή τιμή της σταθεράς διάστασης χαρακτηρίζουν δέσμευση του αζιδίου σε θέση υψηλής συγγένειας. Αυξάνοντας τη συγκέντρωση του αζιδίου παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα ηλεκτρονικά φάσματα διαφοράς, τα οποία εμφανίζουν ελάχιστο στα 419 nm και μέγιστο στα 444 nm. Η γραφική παράσταση του αντιστρόφου της μεταβολής της απορρόφησης στη Soret περιοχή ($1/\Delta A_{419-444\text{nm}}$) ως συνάρτηση του $1/[\text{NaN}_3]$ είναι ευθεία και αντιστοιχεί σε $K_d=11.4 \text{ mM}$. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν δέσμευση του αζιδίου σε θέση χαμηλής συγγένειας.

Η σταθερά διάστασης $K_d=4.1 \mu\text{M}$, η οποία βρέθηκε για τη φάση υψηλής συγγένειας είναι περίπου 40 φορές μικρότερη απ' τη $K_d=150 \mu\text{M}$, η οποία παρατηρείται για την αντίστοιχη φάση στην κυτοχρωμική οξειδάση απ' τα μιτοχόνδρια (κεφάλαιο 7) και είναι περίπου ίδια με εκείνη που αναφερθεί για το κυτόχρωμα bo_3 (17 μM) απ' το *E. coli*,¹² για το οποίο έχει παρατηρηθεί μόνο μία φάση δέσμευσης του αζιδίου.¹² Αντίθετα η $K_d=11.4 \text{ mM}$ (φάση υψηλής συγγένειας) είναι πιο κοντά στη σταθερά διάστασης 62.4 mM, η οποία έχει βρεθεί για το ένζυμο των μιτοχονδρίων (κεφάλαιο 7).

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο τρόπος δέσμευσης του N_3^- , ελήφθησαν επίσης τα φάσματα συντονισμού Raman και υπερύθρου των συμπλόκων που σχηματίζονται και στις δύο φάσεις. Η δέσμευση του αζιδίου στη φάση χαμηλής συγγένειας πιστοποιήθηκε απ' τη μετατόπιση του μεγίστου της ταινίας Soret απ' τα 423 nm στα 429 nm.

Το σχήμα 5.2 δείχνει τα φάσματα συντονισμού Raman του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 (φάσμα A) και του συμπλόκου $aa_3\text{-N}_3$ (φάσμα B) στην περιοχή των

υψηλών συχνοτήτων, η οποία χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου που είναι ευαίσθητες στη μεταβολή του αριθμού συναρμογής και της

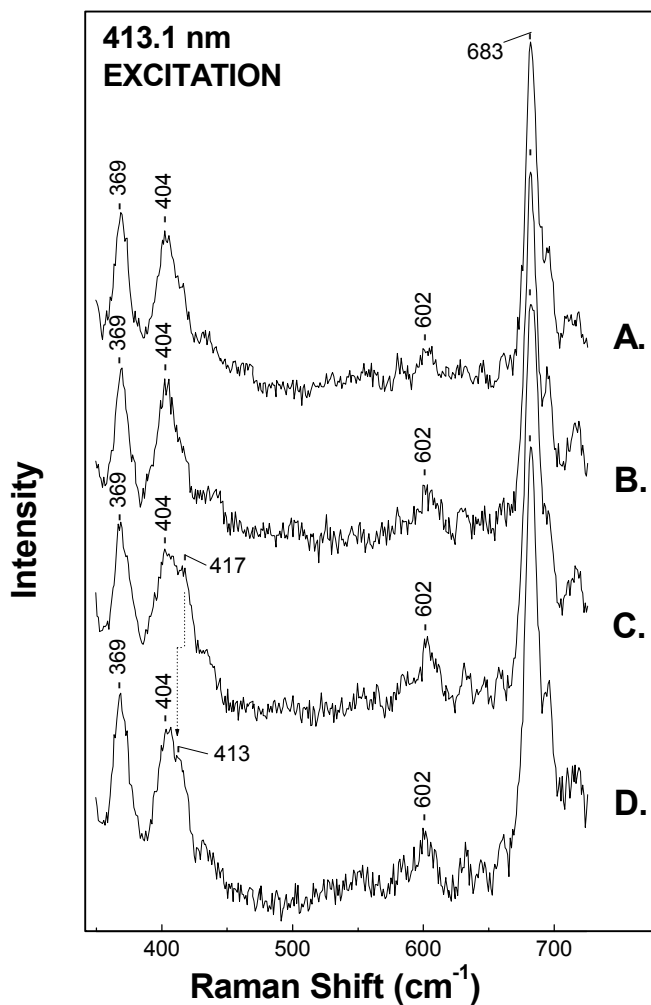


Σχήμα 5.2 Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman: (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* και (B) του κυτοχρώματος aa_3 μετά την προσθήκη 20 mM NaN_3 (φάση χαμηλής συγγένειας). Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm.

οξειδωτικής και spin κατάστασης του κεντρικού μεταλλικού ιόντος. Τα παραπάνω φάσματα ελήφθησαν με μήκος κύματος διέγερσης 427 nm. Αυτό το μήκος κύματος διέγερσης είναι σε συντονισμό με την $\pi-\pi^*$ διέγερση της αίμης α , η οποία παρουσιάζει το μέγιστο της Soret

κορυφής στα 427 nm. Η αίμη α_3 εμφανίζει το μέγιστο της Soret ταινίας στα 416 nm, στην πλήρως οξειδωμένη μη υποκατεστημένη κατάσταση του ενζύμου. Το φάσμα απορρόφησης όμως του $\alpha\alpha_3\text{-N}_3$ συμπλόκου στη φάση χαμηλής συγγένειας εμφανίζει μέγιστο στα 429 nm, γεγονός που δηλώνει τη μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας της αίμης α_3 από τα 416 nm στα 427 nm με τη δημιουργία του συμπλόκου. Επομένως, το μήκος διέγερσης στα 427 nm είναι επίσης σε συντονισμό με την $\pi\text{-}\pi^*$ διέγερση της αίμης α_3 του N_3 -συμπλόκου. Έτσι, με μήκος κύματος διέγερσης 427 nm, ενισχύονται οι δονήσεις της αίμης α στην περίπτωση του μη υποκατεστημένου ενζύμου (σχήμα 5.2A), ενώ στην περίπτωση του $\alpha\alpha_3\text{-N}_3$ συμπλόκου ενισχύονται οι δονήσεις τόσο της αίμης α όσο και της αίμης α_3 (σχήμα 5.2B). Στο φάσμα του μη υποκατεστημένου κυτοχρώματος $\alpha\alpha_3$, η ν_4 δόνηση στους 1374 cm^{-1} πιστοποιεί ότι και οι δύο ομάδες αίμης βρίσκονται στην οξειδωμένη κατάσταση (Fe^{3+}). Η ν_2 δόνηση της αίμης α_3^{3+} εμφανίζεται στους 1576 cm^{-1} και δηλώνει την υψηλού spin διαμόρφωση αυτού του κέντρου. Η ν_2 δόνηση της αίμης α^{3+} είναι στους 1588 cm^{-1} πιστοποιώντας τη χαμηλού spin διαμόρφωση του Fe_a^{3+} . Η γραμμή στους 1637 cm^{-1} προκύπτει από τη ν_{10} δόνηση της αίμης α_3^{3+} , ενώ οι δονήσεις στους 1650 cm^{-1} και 1675 cm^{-1} οφείλονται στη C=O δόνηση της φορμουλάδας της αίμης α^{3+} και της αίμης α_3^{3+} , αντίστοιχα. Οι συχνότητες των παραπάνω δονήσεων είναι παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται για την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια.¹³ Προσθήκη 20 mM NaN_3 σε 35 μM οξειδωμένου κυτοχρώματος $\alpha\alpha_3$ (σχήμα 5.2B, φάση χαμηλής συγγένειας) προκαλεί μικρή αύξηση της έντασης της ν_2 δόνησης της αίμης α_3^{3+} στους 1576 cm^{-1} , ενώ οι συχνότητες και οι εντάσεις των υπολοίπων δονήσεων δε μεταβάλλονται. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι δε συμβαίνουν αλλαγές στο περιβάλλον της αίμης α , η οποία παραμένει οξειδωμένη με αριθμό συναρμογής έξι και διαμόρφωση χαμηλού spin. Η αίμη α_3 επίσης διατηρεί την υψηλού spin διαμόρφωσή της και παραμένει οξειδωμένη με αριθμό συναρμογής έξι.

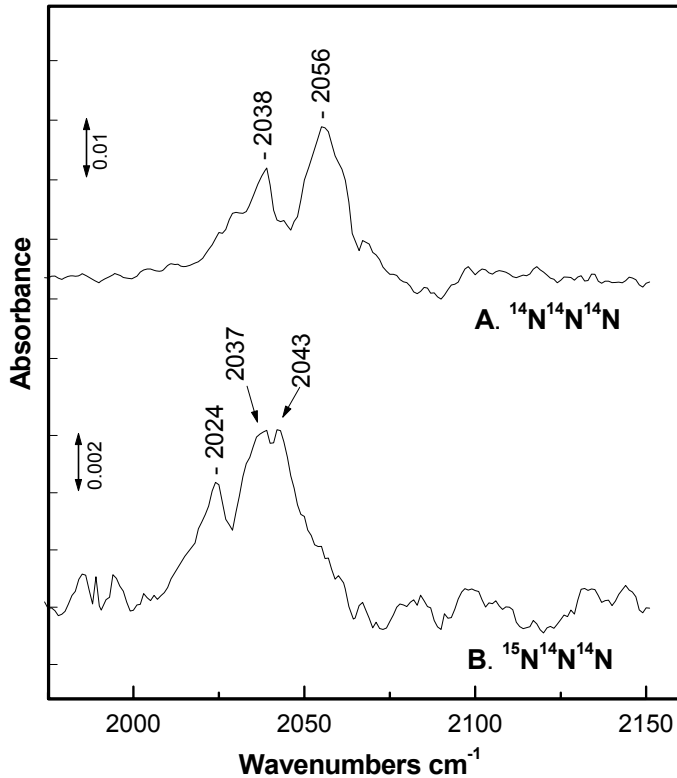
Στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων, τα φάσματα συντονισμού Raman των αιμοπρωτεϊνών χαρακτηρίζονται από δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου και των εκτός επιπέδου δονήσεων του κεντρικού μετάλλου με τα αζονικά ligands. Στο σχήμα 5.3 φαίνεται η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του οξειδωμένου



Σχήμα 5.3 Η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του πλήρως οξειδωμένου μη υποκατεστημένου κυτοχρώματος *aa*₃ από το *P. denitrificans* (φάσμα A) και του αζίδο-δεσμευμένου *aa*₃ μετά την προσθήκη 100 μM NaN_3 (φάσμα B, φάση υψηλής συγγένειας), 20 mM NaN_3 (φάσμα C, φάση χαμηλής συγγένειας) και 20 mM $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ (φάσμα D, φάση χαμηλής συγγένειας). Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 413.1 nm.

κυτοχρώματος aa_3 και των συμπλόκων που σχηματίζει με το αζίδιο με την προσθήκη 100 $\mu\text{M Na}^{14}\text{N}_3$ (φάσμα B, φάση υψηλής συγγένειας), 20 mM Na^{14}N_3 (φάσμα C, φάση χαμηλής συγγένειας) και 20 mM $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$ (φάσμα D, φάση χαμηλής συγγένειας). Τα παραπάνω φάσματα ελήφθησαν με μήκος κύματος διέγερσης 413.1 nm, το οποίο είναι σε συντονισμό και με τις δύο ομάδες αίμης. Οι κύριες δονήσεις στους 369 cm^{-1} , 404 cm^{-1} και 683 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου και των δύο ομάδων αίμης. Προσθήκη 100 $\mu\text{M Na}^{14}\text{N}_3$ (φάση υψηλής συγγένειας) δεν προκαλεί αλλαγές στο φάσμα. Αυτό σημαίνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στη φάση υψηλής συγγένειας δεν επιφέρει αλλαγές στο περιβάλλον των δύο ομάδων αίμης. Ωστόσο, τα οπτικά φάσματα διαφοράς στη φάση υψηλής συγγένειας δείχνουν ότι η δέσμευση του αζιδίου προκαλεί μείωση της απορρόφησης στη Soret περιοχή. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι σ' αυτή τη φάση το αζίδιο δεσμεύεται σε μη μεταλλική θέση κοντά στο διτυρηνικό κέντρο. Προσθήκη 20 mM Na^{14}N_3 (φάση χαμηλής συγγένειας) προκαλεί την εμφάνιση μίας νέας δόνησης στους 417 cm^{-1} στο φάσμα συντονισμού Raman του ενζύμου (σχήμα 5.3C). Η δόνηση αυτή μετατοπίζεται στους 413 cm^{-1} με την προσθήκη 20 mM $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$ στο οξειδωμένο κυτόχρωμα aa_3 (σχήμα 5.3D). Η συχνότητα αυτής της δόνησης (417 cm^{-1}) και η ισοτοπική ευαισθησία που παρουσιάζει επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της ως τη δόνηση τάσης του δεσμού αίμη $\alpha_3\text{-N}_3$. Παρόμοιες συχνότητες έχουν αναφερθεί και για τα σύμπλοκα Mb- N_3 και Hb- N_3 . Όμως, η ισοτοπική μετατόπιση των 4 cm^{-1} που παρατηρείται για το $aa_3\text{-N}_3$ σύμπλοκο είναι μικρή, σε σχέση με την ισοτοπική μετατόπιση των 7 cm^{-1} που έχει βρεθεί για τις N_3 -υποκατεστημένες πρωτεΐνες μεταφοράς οξυγόνου.^{14a-e} Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι ο Cu_B αλληλεπιδρά άμεσα με το δεσμευμένο ιόν του αζιδίου σχηματίζοντας το σύμπλοκο αίμη $\alpha_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$.

Το FTIR φάσμα του $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο στη φάση χαμηλής συγγένειας (σχήμα 4A) εμφανίζει δύο δονήσεις, μία στους 2038 cm^{-1} και μία στους 2056 cm^{-1} , οι οποίες μετατοπίζονται αντίστοιχα στους 2023 cm^{-1} και τους $2043\text{ cm}^{-1}/2037\text{ cm}^{-1}$, όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με την προσθήκη $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$ (σχήμα 5.4B). Όπως θα συζητηθεί στα κεφάλαια 6 και 7, η δέσμευση του αζιδίου στο κυτόχρωμα bo_3 από το *E. coli* και την CcO από τα μιτοχόνδρια χαρακτηρίζεται επίσης από δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$, ωστόσο υπάρχουν κάποιες διαφορές στις συχνότητες αυτών των δονήσεων. Οι συχνότητες των 2056 cm^{-1} και 2038 cm^{-1} δονήσεων που παρατηρούνται για το κυτόχρωμα aa_3 είναι 4 cm^{-1} υψηλότερα και



Σχήμα 5.4 Τα FTIR φάσματα των (A) $^{14}\text{N}_3^-$ - και (B) $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}^-$ - συμπλόκων του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans*. Η αναλογία των συγκεντρώσεων [aa_3]:[αζίδιο] είναι 1:53 (φάση χαμηλής συγγένειας).

3 cm^{-1} χαμηλότερα από τις αντίστοιχες $\nu_{as}(\text{N}_3)$ συχνότητες, οι οποίες παρατηρούνται για το ένζυμο από τα μιτοχόνδρια. Επίσης για το $bo_3\text{-N}_3$ οι $\nu_{as}(\text{N}_3)$ είναι στους 2041 cm^{-1} και τους 2061 cm^{-1} . Οι παρατηρούμενες διαφορές στις συχνότητες των $\nu_{as}(\text{N}_3)$ μεταξύ των τριών αυτών αιμοχαλκοξειδασών δείχνουν ότι το διπυρηνικό κέντρο του κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο είναι παρόμοιο, αλλά όχι απόλυτα ίδιο με το διπυρηνικό κέντρο της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης και του κυτοχρώματος bo_3 .

Παρόμοιες δονήσεις, μία στους 2039 cm^{-1} και μία στους 2051 cm^{-1} , έχουν δημοσιευτεί και από άλλους ερευνητές για την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων, ωστόσο υπάρχει διαφωνία ως προς τον χαρακτηρισμό τους. Οι Yoshikawa et al.¹⁵ θεωρούν

ότι η 2039 cm^{-1} δόνηση οφείλεται σε δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στο Cu_B , ενώ η 2051 cm^{-1} προέρχεται από τη δέσμευση του αζιδίου σε μη μεταλλική θέση κοντά στο διπυρηνικό κέντρο. Αυτή η ερμηνεία αμφισβητήθηκε απ' τον Tsubaki,¹⁶ ο οποίος πρότεινε ότι η 2051 cm^{-1} δόνηση προέρχεται από ένα σύμπλοκο αίμη $\alpha_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$, ενώ η 2039 cm^{-1} προκύπτει απ' τη δέσμευση του N_3 ως τελικό ligand στην αίμη α_3^{3+} , η οποία διατηρεί την υψηλού spin διαμόρφωσή της. Οι Li et al.¹⁷ διαφωνούν με το χαρακτηρισμό της 2039 cm^{-1} βάσει των FTIR, EPR και MCD αποτελεσμάτων τους και προτείνουν ότι αυτή η δόνηση οφείλεται σε δέσμευση του αζιδίου στην αίμη α , η οποία συμβαίνει σε μεγάλες συγκεντρώσεις αζιδίου (φάση χαμηλής συγγένειας). Όσον αφορά την 2051 cm^{-1} δόνηση, υποστηρίζουν ότι οφείλεται σε δέσμευση του N_3^- στο διπυρηνικό κέντρο ως ligand γέφυρας, επειδή δεν παρατηρούν καμία από τις δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ παρουσία μικρής συγκέντρωσης CN^- , το οποίο θεωρούν ότι δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο προκαλώντας την εμφάνιση της 2152 cm^{-1} δόνησης. Έτσι, το ιόν του αζιδίου θα πρέπει να δεσμεύεται στην ίδια θέση που δεσμεύεται και το ιόν του κυανίου ή σε κάποια θέση η οποία καλύπτεται απ' το δεσμευμένο CN^- .

Η κρυσταλλική δομή του κυτοχρώματος aa_3 απ' το *P. denitrificans* βακτήριο παρουσία 0.1% NaN_3 δείχνει ότι η αίμη α συναρμόζεται με δύο κατάλοιπα ιστιδίνης στις αζονικές θέσεις.^{2a} Επιπλέον, τα φάσματα συντονισμού Raman που παρουσιάζονται εδώ προτείνουν ότι το περιβάλλον της αίμης α δεν επηρεάζεται από την προσθήκη του NaN_3 στο κυτόχρωμα aa_3 . Επομένως, ούτε η 2056 cm^{-1} ούτε η 2038 cm^{-1} δόνηση σχετίζονται με δέσμευση του αζιδίου στην αίμη α . Ο πιο αιτιολογημένος χαρακτηρισμός της $\nu_{as}(\text{N}_3)=2056\text{ cm}^{-1}$ είναι ότι οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου της μορφής αίμη $\alpha_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$. Για μια τέτοια δομή γέφυρας είναι αναμενόμενο η 2056 cm^{-1} δόνηση να παρουσιάσει σχάση κατά την ισοτοπική αντικατάσταση $\text{Na}^{14}\text{N}_3/\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$, λόγω διαφορετικής ισχύος των Fe-N και $\text{Cu}_B\text{-N}$ δεσμών. Η σχάση που παρατηρείται για την 2056 cm^{-1} δόνηση υποστηρίζει τον χαρακτηρισμό της ως την ασύμμετρη δόνηση τάσης του αζιδίου ενός συμπλόκου γέφυρας ($\alpha_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$). Η $\nu_{as}(\text{N}_3)=2038\text{ cm}^{-1}$ όμως δεν παρουσιάζει σχάση κατά την ισοτοπική αντικατάσταση. Αυτό σημαίνει ότι η ισχύς των δύο $\text{N}=\text{N}$ δεσμών του αζιδίου είναι περίπου ίδια. Η συχνότητα αυτής της δόνησης είναι παρόμοια της $\nu_{as}(\text{N}_3)$ που παρατηρείται κατά τη δέσμευση του αζιδίου στη μυοσφαιρίνη.¹⁸⁻²¹ Παρά την ομοιότητα αυτή, προτείνεται ότι το αζίδιο δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο αίμη $\alpha_3\text{-Cu}_B$ σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις (αναλύεται παρακάτω). Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις $417\text{ cm}^{-1}/2056\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις, ενώ η δεύτερη απ' τις $417\text{ cm}^{-1}/2038\text{ cm}^{-1}$. Δύο

διαφορετικές $\nu_{as}(N_3)$ έχουν επίσης ταυτοποιηθεί στα FTIR φάσματα των N_3 -συμπλόκων της Mb από ελέφαντα και της Mb από καρδιά αλόγου.^{20,21} Οι $\nu_{as}(N_3)$ στους 2041 cm^{-1} και μία στους 2054 cm^{-1} που ανιχνεύθηκαν για τη Mb από ελέφαντα έχουν προταθεί ότι προκύπτουν από δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της μονάδας αίμη- N_3 .²⁰ Η 2041 cm^{-1} δόνηση θεωρείται ότι προκύπτει από ένα ομοιοπολικό σύμπλοκο αίμη- N_3 , ενώ η 2054 cm^{-1} αποδίδεται στο σχηματισμό ενός ιονικού συμπλόκου αίμη- N_3 . Έτσι η μεγάλη διαφορά στη συχνότητα των 2056 cm^{-1} και 2038 cm^{-1} δονήσεων, που παρατηρούνται για το κυτόχρωμα aa_3 , μπορεί να προκύπτει από μία αύξηση της τάξης του δεσμού μέταλλο-N σε συνδυασμό με μια μείωση της τάξης των δεσμών N=N στην περίπτωση της δόνησης στους 2038 cm^{-1} . Επίσης, η γωνία που σχηματίζουν η αίμη a_3 και/ή ο Cu_B με τα N άτομα του αζιδίου μπορεί να επηρεάσει τη συχνότητα της ασύμμετρης δόνησης του αζιδίου. Εάν το αζίδιο συναρμόζεται στην αίμη a_3 σε τελική γεωμετρία και όχι ως ligand γέφυρας μεταξύ αυτής και του Cu_B , αναμένεται μετάβαση της αίμης a_3 στην κατάσταση χαμηλού spin. Ωστόσο, τα φάσματα συντονισμού Raman δείχνουν ότι η αίμη a_3 διατηρεί την υψηλού spin διαμόρφωση κατά τη δέσμευση του αζιδίου. Επομένως, ούτε η 2056 cm^{-1} ούτε η 2038 cm^{-1} δόνηση οφείλονται σε δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στην αίμη a_3 .

Περιληπτικά, το αζίδιο δεσμεύεται στο κυτόχρωμα aa_3 σε δύο φάσεις, μία φάση υψηλής συγγένειας και μία φάση χαμηλής συγγένειας. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συντονισμού Raman και FTIR, που παρουσιάζονται εδώ, προτείνουν ότι στη φάση υψηλής συγγένειας το N_3^- δεσμεύεται σε μία μη μεταλλική θέση, κοντά στο διτυρηνικό κέντρο, ενώ στη φάση χαμηλής συγγένειας δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις σχηματίζοντας, και στις δύο, σύμπλοκα της μορφής αίμη a_3^{3+} - N_3 - Cu_B^{2+} . Επίσης, η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman δείχνει ότι το περιβάλλον της αίμης a δε μεταβάλλεται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αζιδίου, γεγονός το οποίο προτείνει ότι η φάση χαμηλής συγγένειας δε σχετίζεται με δέσμευση του αζιδίου στην αίμη a , όπως έχει προταθεί για την CcO από τα μιτοχόνδρια. Αυτή η ερμηνεία είναι σε συμφωνία με τις κρυσταλλικές δομές παρουσία αζιδίου των κυτοχρωμάτων aa_3 από τα μιτοχόνδρια και το *P. denitrificans* βακτήριο.^{2a,9} Η σύγκριση των σταθερών διάστασης και των $\nu_{as}(N_3)$ των N_3 -συμπλόκων των κυτοχρωμάτων aa_3 από το *P. denitrificans* και τα μιτοχόνδρια και του κυτοχρώματος ba_3 από το *E. coli* δείχνει ότι υπάρχουν διαφορές στην κινητική της δέσμευσης του N_3^- και τη δομή των a_3 - Cu_B και o_3 - Cu_B κέντρων. Η κρυσταλλική δομή της aa_3 οξειδάσης από το *P. denitrificans* παρουσία αζιδίου δε δείχνει ηλεκτρονική πυκνότητα για την His325, γεγονός το οποίο προτείνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στο κυτόχρωμα aa_3

προκαλεί την απομάκρυνση της His325 από το Cu_B.^{2a} Πρόσφατα, οι Puustinen et al.²² πρότειναν ότι η δέσμευση του CO στο Cu_B, μετά τη φωτόλυση του δεσμού αίμη α₃²⁺-CO προκαλεί την αντικατάσταση ενός ligand του Cu_B ή τη μεταβολή της οξύτητας κατά Lewis αυτού του ιόντος. Τα παραπάνω προτείνουν ότι τα φαινόμενα που παρατηρούνται κατά τη συναρμογή του αζιδίου είναι αντιπροσωπευτικά για τη δέσμευση και άλλων ligands όπως το CO και το O₂. Επομένως, οι ιδιότητες του Cu_B και οι δομικές επαναδιευθετήσεις που συμβαίνουν σ' αυτόν, λόγω της λειτουργίας του ως ενδιάμεσης θέσης δέσμευσης κατά την «είσοδο» και την «έξοδο» των ligands από τη θέση αναγωγής του O₂, έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη λειτουργία του ενζύμου.

Βιβλιογραφία

1. Babcock, G. T.; Wikström, M. *Nature* **1992**, *356*, 301-309.
2. a) Iwata, S.; Ostermeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H. *Nature*, **1995**, *376*, 660-669 b) Ostermeier, C.; Harrenga, A.; Ermler, U.; Michel, H. *PNAS* **1997**, *94*, 10547-10553
3. Ludwig, B. *FEMS Microbiol. Rev.* **1987**, *46*, 41-56.
4. Gennis, R. B.; Trumpower, B. L. *Ann. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 675-716.
5. Steiner, P.; Gerhus, E.; Ludwig, B. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7676-7681.
6. Capaldi, R. A. *Ann. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 569-596.
7. Hendler, R. W.; Pardhasaradhi, K.; Reynafatje, B.; Ludwig, B. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 415-423.
8. Einarsdottir, O. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1229*, 129-147.
9. Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashina, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libeu, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
10. Woodruff, W. H.; Einarsdottir, O.; Dyer, R. B.; Bagley, K. A.; Palmer, G.; Atherton, S. J.; Goldbeck, R. A.; Dawes, T. D.; Kliger, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1991**, *88*, 2588-2592.
11. Morgan, J. E.; Verkhovskiy, M. I.; Wikström, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994**, *26*, 599-608.
12. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13780-13787.
13. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol.3, p.293
14. (a) Asher, S. A.; Vickery, L.E.; Schuster, T.M.; Sauer, K. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5849-5855. (b) Asher, S. A.; Schuster, T. M. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5377-5382. (c) Desbois, A.; Lutz, M.; Banerjee, R. *Biochemistry* **1979**, *18*, 1510-1515. (d) Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T. *Biochemistry* **1979**, *18*, 946-952. (e) Czernuszewicz, R. S.; Wagner, W-D.; Ray, G. B.; Nakamoto, K. *J. Mol. Struct.* **1991**, *242*, 99-117.

15. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
16. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
17. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *322*, 1833-1843.
18. McCoy, S.; Caughey, W. S. *Biochemistry* **1970**, *9*, 2387-2392.
19. Alben, J. O.; Fager, L. Y. *Biochemistry* **1972**, *11*, 842-847.
20. Bormett, R. W.; Asher, S. A.; Larkin, P. J.; Gustafson, W. G.; Ragunathan, N.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A.; Balasubramanian, S.; Boxer, S. G.; Yu, N-T.; Gersonde, K.; Noble, R. W.; Springer, B. A.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6864-6867.
21. Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7600-7608.
22. Puustinen, A.; Baily, J. A.; Dyer, R. B.; Mecklenburg, S. L.; Wikström, M.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13195-13200.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-VIS, ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ RAMAN ΚΑΙ FTIR ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ bo_3 ΑΠΟ ΤΟ *Escherichia coli* ΒΑΚΤΗΡΙΟ.

6.1 Εισαγωγή

Το κυτόχρωμα bo_3 είναι η τελική οξειδάση στην αερόβια αναπνευστική αλυσίδα του *Escherichia coli* και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη-8 στο O_2 .¹⁻²¹ Το κυτόχρωμα bo_3 , όπως όλες οι τελικές κινολικές οξειδάσες, υπολείπεται του Cu_A ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για τις κυτοχρωμικές οξειδάσες.^{1,10,11} Συνεπώς, το ένζυμο αυτό έχει μόνο τρία οξειδοαναγωγικά κέντρα: τη χαμηλού spin αίμη b , την υψηλού spin αίμη o_3 και το Cu_B . Η αίμη b συμμετέχει στη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη-8 στο spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο που σχηματίζουν η αίμη o_3 και ο Cu_B . Παρά τις εμφανείς διαφορές που υπάρχουν μεταξύ της CcO και του κυτοχρώματος bo_3 , όπως είναι η απουσία του Cu_A και η φύση του δότη ηλεκτρονίων, το κυτόχρωμα bo_3 δρα ως οξειδοαναγωγική αντλία πρωτονίων και ανάγει το O_2 μέσω ενδιάμεσων προϊόντων παρόμοιων εκείνων που έχουν βρεθεί για την CcO των μιτοχονδρίων.²²

Συγκριτικές μελέτες συντονισμού Raman και FTIR της δέσμευσης του CO στην ανηγμένη μορφή των κυτοχρωμάτων aa_3 από τα μιτοχόνδρια²⁴ και bo_3 από το *E. coli*,^{23a} δίνουν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά τις δονήσεις που περιγράφουν τη δέσμευση του CO στις δύο οξειδάσες. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων προτάθηκε ότι τα δύο ένζυμα έχουν παρόμοια διπυρηνικά κέντρα.^{23b} Αρκετές φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης εναλλακτικών ligands έχουν επίσης πραγματοποιηθεί στην οξειδωμένη μορφή των δύο ενζύμων. Ωστόσο, είναι δύσκολο να εξαχθεί ένα γενικό συμπέρασμα σχετικά με τις ιδιότητες της δέσμευσης εξωγενών ligands στις δύο τελικές οξειδάσες λόγω της έλλειψης μίας ολοκληρωμένης μελέτης αυτών των γνωρισμάτων με την εφαρμογή τεχνικών δονητικής φασματοσκοπίας.²⁵⁻²⁷ Παρά την πραγματοποίηση αρκετών φασματοσκοπικών μελετών δεν έχει επιτευχθεί ακόμα ο χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης του αζιδίου με

την κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων και το κυτόχρωμα bo_3 , με αποτέλεσμα ένας αριθμός από ενδιαφέρουσες δομές να έχουν προταθεί για τα N_3 -σύμπλοκα των δύο ενζύμων. FTIR μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων αναφέρουν δύο $\nu_{as}(N_3)$, μία στους 2051 cm^{-1} και μία στους 2039 cm^{-1} . Για την 2051 cm^{-1} δόνηση έχει προταθεί ότι μπορεί να προκύπτει από τη δέσμευση του αζιδίου είτε σε μη μεταλλική θέση μέσα στην πρωτεΐνη²⁵ είτε ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο του ενζύμου.^{26, 30} Αντίθετα, για την 2039 cm^{-1} δόνηση έχει προταθεί ότι ίσως οφείλεται σε δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand είτε στο Cu_B ,²⁵ είτε σε μία από τις δύο ομάδες αίμης.^{26, 30} Για το κυτόχρωμα bo_3 , έχουν παρατηρηθεί δύο $\nu_{as}(N_3)$ στους 2040 και 2062.5 cm^{-1} , οι οποίες έχουν αποδοθεί στο σχηματισμό των αίμη $o_3-N_3-Cu_B$ και Cu_B-N_3 συμπλόκων, αντίστοιχα.^{27,31} Οι Little et al.²⁸ χρησιμοποιώντας UV-Vis, EPR, και MCD φασματοσκοπία βρήκαν ότι το αζίδιο δεσμεύεται στο κυτόχρωμα bo_3 με στοιχειομετρία 1:1 με τη σταθερά δέσμευσης, k_{on} , να εξαρτάται σημαντικά από το pH. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων τους οι Little et al.²⁸ πρότειναν ότι το κυτόχρωμα bo_3 αντιδρά με το HN_3 και όχι το N_3^- , σχηματίζοντας το σύμπλοκο αίμη $o_3\text{ Fe-OH}_2::Cu_B-N_3$.

Επειδή οι περισσότεροι προτεινόμενοι μηχανισμοί για την άντληση των H^+ απ' τις αιμοχάλκοξειδάσες προτείνουν τη συμμετοχή του διπυρηνικού κέντρου σ' αυτή τη διαδικασία³² και επειδή υπάρχουν διαφωνίες όσον αφορά τη θέση και τη γεωμετρία δέσμευσης του αζιδίου στο κυτόχρωμα bo_3 ,^{27,28,31} επανεξετάστηκε η αλληλεπίδραση του αζιδίου με την κινολική αυτή οξειδάση, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-Vis, συντονισμού Raman και FTIR. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται σ' αυτό το κεφάλαιο. Η δέσμευση του αζιδίου στο πλήρως οξειδωμένο κυτόχρωμα bo_3 προκαλεί μικρές αλλαγές στο φάσμα UV-Vis του ενζύμου και την εμφάνιση τριών νέων δονήσεων στους 419 cm^{-1} , 2040 cm^{-1} και 2061 cm^{-1} στο φάσμα συντονισμού Raman. Οι δύο τελευταίες δονήσεις εμφανίζονται επίσης στο FTIR φάσμα του bo_3-N_3 συμπλόκου, ενώ δεν παρατηρούνται νέες επιπλέον δονήσεις στο φάσμα αυτό. Η 419 cm^{-1} δόνηση αποδίδεται στη $\nu(Fe_{o_3}-N_3-Cu_B)$ και οι 2040 cm^{-1} και 2061 cm^{-1} στις $\nu_{as}(N_3)$ δονήσεις του συμπλόκου $Fe_{o_3}^{3+}-N_3-Cu_B^{2+}$. Αυτό σημαίνει ότι το αζίδιο δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις στις οποίες σχηματίζει σύμπλοκα γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο. Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις $419\text{ cm}^{-1}/2040\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις και η δεύτερη από τις $419\text{ cm}^{-1}/2061\text{ cm}^{-1}$. Σύγκριση των FTIR φασμάτων των N_3 -υποκατεστημένων κυτοχρωμάτων aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο και bo_3 δείχνει ότι η σχέση μεταξύ των $2056\text{ cm}^{-1}/2038\text{ cm}^{-1}$ διαμορφώσεων του aa_3 είναι αντίστροφη αυτής που υπάρχει μεταξύ των $2061\text{ cm}^{-1}/2040$

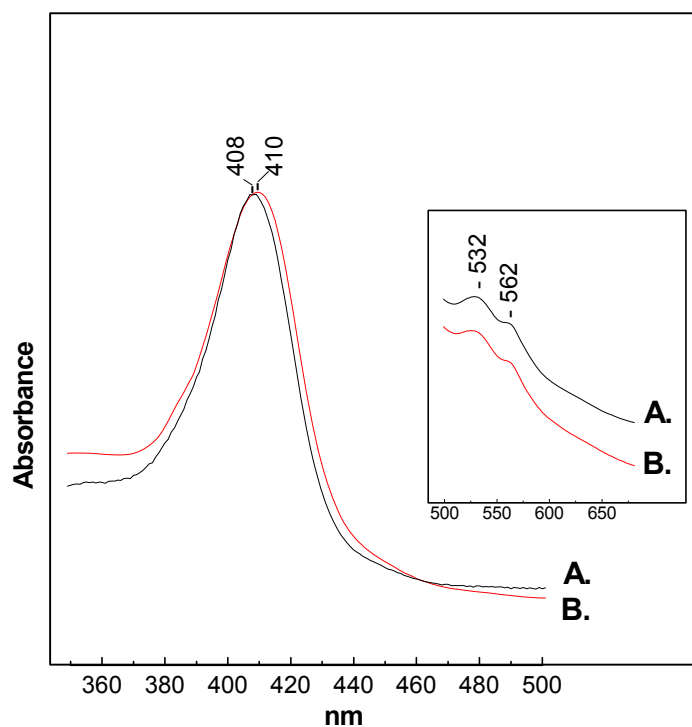
cm^{-1} διαμορφώσεων του bo_3 . Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι υπάρχουν διαφορές στη δομή των δύο οξειδωμένων διπυρηνικών κέντρων κατά τη δέσμευση του αζιδίου.

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

Το κυτόχρωμα bo_3 απομονώθηκε από το *E.coli* βακτήριο όπως περιγράφεται στο δημοσιευμένο πρωτόκολλο καθαρισμού.¹⁰ Σ' όλα τα πειράματα το μέσο διάλυσης ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα: 100 mM Tris-HCl, 0.2 % w/v lauryl maltoside, pH 7.4. Για τα UV-Vis πειράματα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής φωτός 0.5 cm και φάσματα καταγράφηκαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Η συγκέντρωση του ενζύμου στο δείγμα ήταν 5.5 μM και του NaN_3 120 μM . Οι συνθήκες λήψης και η διαδικασία επεξεργασίας των φασμάτων συντονισμού Raman και FTIR είναι όμοια με εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 5.2. Για τα FTIR πειράματα η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 240 μM και η τελική συγκέντρωση του αζιδίου (Na^{14}N_3 ή $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) ήταν 5.8 mM. Για τα πειράματα συντονισμού Raman η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 30 μM και η συγκέντρωση του αζιδίου (Na^{14}N_3 ή $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) ήταν 600 μM .

6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

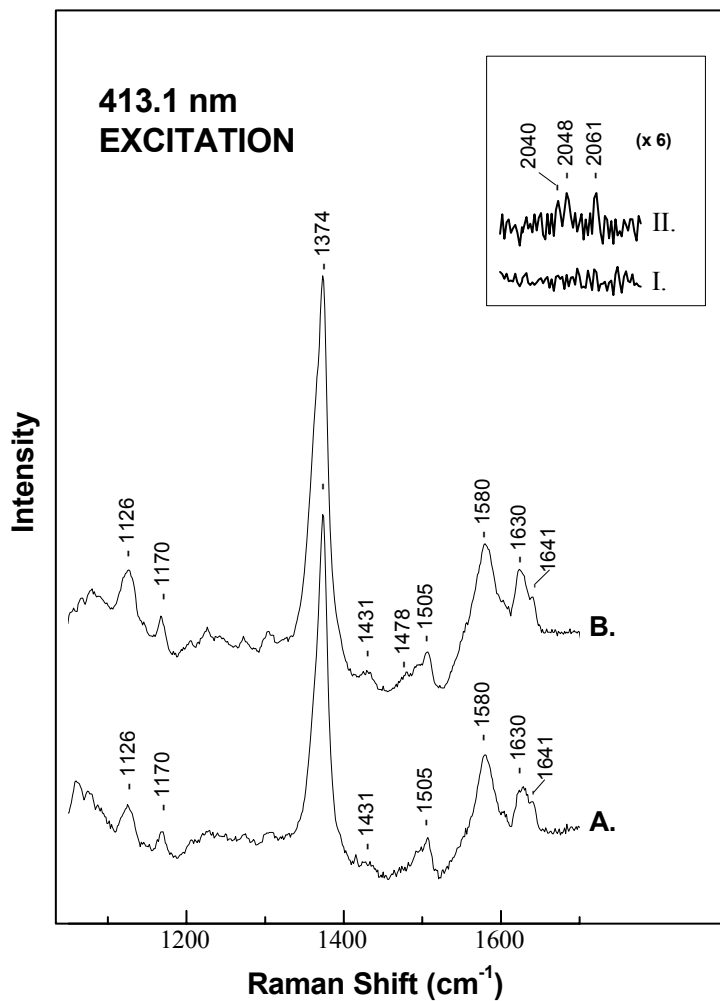
Η αλληλεπίδραση του αζιδίου με το κυτόχρωμα bo_3 εξετάστηκε αρχικά με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους. Στο σχήμα 6.1 φαίνονται τα οπτικά φάσματα του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 , πριν (φάσμα A) και μετά (φάσμα B) την αντίδραση με το αζίδιο. Προσθήκη 120 μM NaN_3 σε 5.5 μM πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 , pH 7.4, προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας κατά 2 nm, από τα 408 nm στα 410 nm και μικρή μείωση της έντασης των α και β ταινιών στα 562 nm και 532 nm, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η αίμη o_3 έχει αριθμό συναρμογής έξι και



Σχήμα 6.1 Τα οπτικά φάσματα απορρόφησης: (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 από το *E. coli* και (B) του N_3 -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bo_3 . Στο ένθετο φαίνεται η περιοχή 500-680 nm αυτών των φασμάτων.

διαμόρφωση υψηλού spin και μετά τη δέσμευση του αζιδίου, όπως έχουν δείξει προηγούμενες μελέτες με EPR και MCD φασματοσκοπία.²⁸

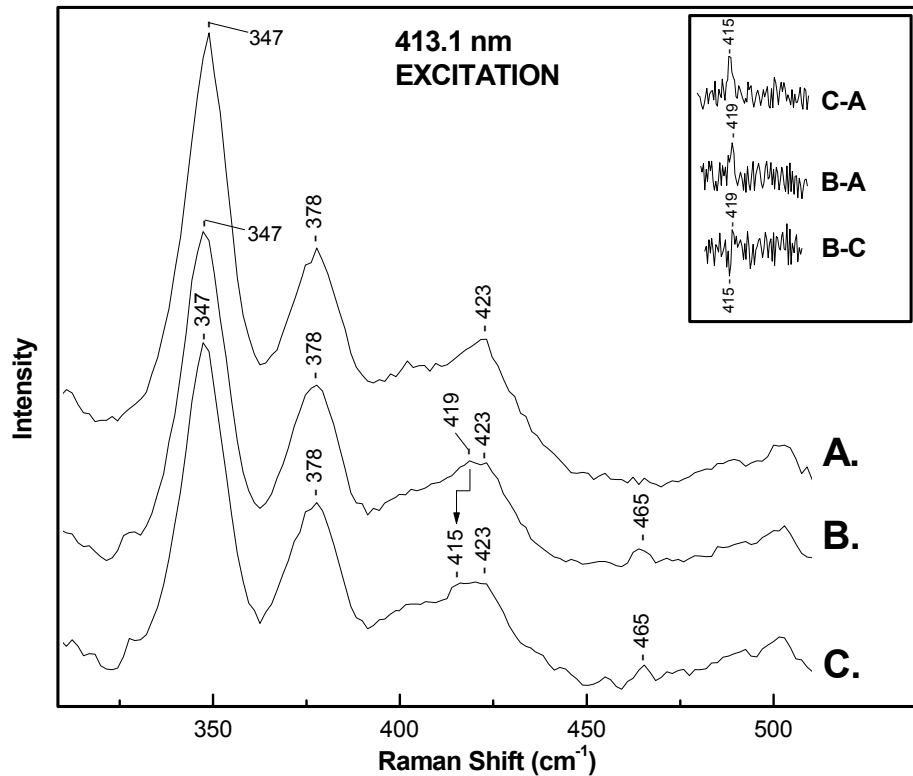
Το σχήμα 6.2 δείχνει την περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 (φάσμα A) και του N_3 -συμπλόκου του (φάσμα B). Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 413.1 nm και είναι σε συντονισμό με την αίμη b^{3+} . Στο φάσμα του μη υποκατεστημένου ενζύμου, οι κύριες δονήσεις στους 1374 cm^{-1} (ν_4), 1478 cm^{-1} (ν_3), 1580 cm^{-1} (ν_2) και 1630 cm^{-1} (ν_{10}) πιστοποιούν την παρουσία της υψηλού spin, με αριθμό συναρμογής έξι αίμης o_3^{3+} .^{23b} Επίσης, οι δονήσεις στους 1505 cm^{-1} (ν_3) και τους 1641 cm^{-1} (ν_{10}) βεβαιώνουν την παρουσία της χαμηλού spin, με αριθμό συναρμογής έξι αίμης b^{3+} .^{23b} Οι συχνότητες και οι εντάσεις των δονήσεων αυτών δεν μεταβάλλονται με την προσθήκη του αζιδίου. Αυτό προτείνει ότι κατά τη δέσμευση του



Σχήμα 6.2 Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων του φασμάτων συντονισμού Raman: (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bO_3 και (B) του N_3 -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bO_3 . Στο ένθετο παρουσιάζεται η περιοχή 2000-2080 cm^{-1} των φασμάτων φασμάτων συντονισμού Raman: (I) του οξειδωμένου και (II) του $^{14}N_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bO_3 . Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 413.1 nm.

αζιδίου δεν μεταβάλλεται ούτε ο αριθμός συναρμογής, ούτε η spin και οξειδωτική κατάσταση των ομάδων αίμης o_3 και b . Στο ένθετο του σχήματος 6.2 φαίνονται τα φάσματα του ελεύθερου κυτοχρώματος bo_3 (φάσμα I) και του bo_3 - $^{14}N_3$ συμπλόκου (φάσμα II), στην περιοχή από 2000 cm^{-1} έως 2080 cm^{-1} , όπου αναμένονται οι $\nu_{as}(N_3)$. Το φάσμα του bo_3 - N_3 συμπλόκου εμφανίζει τρεις νέες δονήσεις στους 2040 cm^{-1} , 2048 cm^{-1} και 2061 cm^{-1} . Η δόνηση στους 2048 cm^{-1} οφείλεται στη παρουσία του ελεύθερου ιόντος του αζιδίου. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα FTIR αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (σχήμα 6.4) προτείνουν ότι το αζίδιο δεσμεύεται στην αίμη o_3 . Επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης απαιτεί την παρατήρηση της δόνησης του δεσμού αίμη o_3 - N_3 .

Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται η περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman του οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 πριν (φάσμα A) και μετά την προσθήκη $Na^{14}N_3$ (φάσμα B) και $Na^{15}N^{14}N^{14}N$ (φάσμα C). Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 413.1 nm . Οι κύριες δονήσεις που παρατηρούνται στους 423 cm^{-1} , 378 cm^{-1} και 347 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου και των δύο ομάδων αίμης. Προσθήκη $Na^{14}N_3$ προκαλεί την εμφάνιση μίας νέας δόνησης στους 419 cm^{-1} , η οποία μετατοπίζεται στους 415 cm^{-1} με την προσθήκη $Na^{15}N^{14}N^{14}N$ στο κυτόχρωμα bo_3 . Η συχνότητα αυτής της δόνησης και η ισοτοπική μετατόπιση που παρουσιάζει επιτρέπουν τον χαρακτηρισμό της ως τη δόνηση τάσης του δεσμού αίμη Fe_{o_3} - N_3 . Η ύπαρξη της ισοτοπικά εξαρτώμενης δόνησης στους 419 cm^{-1} επιβεβαιώνεται και από τα φάσματα διαφοράς που φαίνονται στο ένθετο του σχήματος 6.3. Το φάσμα διαφοράς του $^{14}N_3$ -παραγώγου μείον το φάσμα του μη υποκατεστημένου ενζύμου (φάσμα B-A) εμφανίζει μία θετική κορυφή στους 419 cm^{-1} , ενώ το αντίστοιχο φάσμα διαφοράς του $^{15}N^{14}N_2$ -παραγώγου (φάσμα C-A) παρουσιάζει μία θετική κορυφή στους 415 cm^{-1} . Επιπλέον, το φάσμα διαφοράς των δύο συμπλόκων (φάσμα B-C) χαρακτηρίζεται από μία θετική κορυφή στους 419 cm^{-1} και μία αρνητική στους 415 cm^{-1} . Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, κατά την $Na^{14}N_3/Na^{15}N^{14}N_2$ ισοτοπική αντικατάσταση, θα έπρεπε να εμφανιστούν δύο δονήσεις της ίδιας εντάσεως λόγω της ασύμμετρης ισοτοπικής επισήμανσης του αζιδίου. Ωστόσο, παρατηρείται μία δόνηση στους 415 cm^{-1} με εύρος μεγαλύτερο απ' την 419 cm^{-1} . Είναι φανερό ότι η διακριτική ικανότητα του οργάνου δεν είναι αρκετά υψηλή για να διαχωρίσει τις δύο αναμενόμενες δονήσεις, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μίας ευρείας δόνησης στους 415 cm^{-1} .



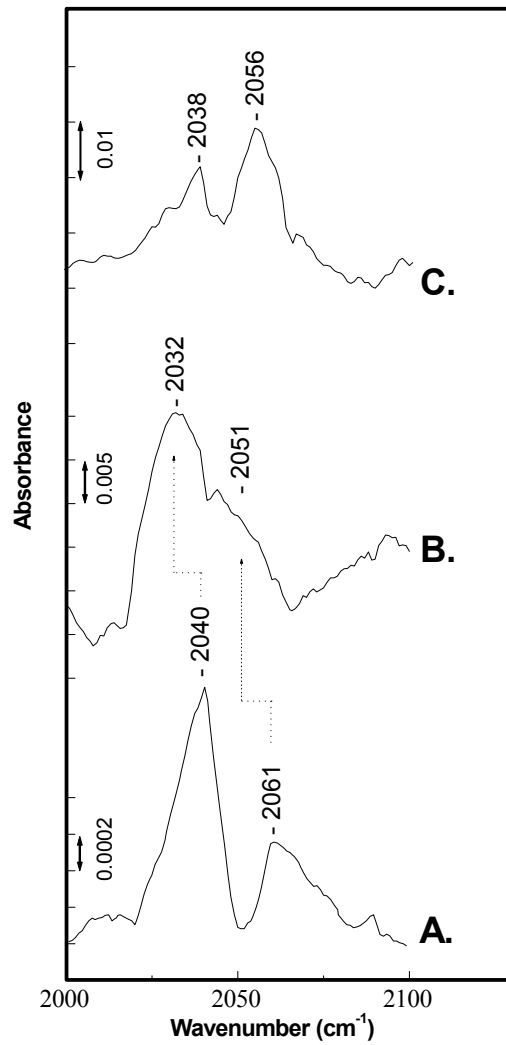
Σχήμα 6.3 Η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων του φασμάτων συντονισμού Raman: (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 , (B) του $^{14}N_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bo_3 και (C) του $^{15}N^{14}N^{14}N$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bo_3 . Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 413.1 nm.

Ο πιο αιτιολογημένος χαρακτηρισμός της 419 cm^{-1} δόνησης είναι ότι προκύπτει από ένα σύμπλοκο γέφυρας της μορφής αίμη $o_3-N=N=N-Cu_B$. Η μικρή ισοτοπική μετατόπιση που παρουσιάζει σε σχέση με τις $\nu(Fe-N_3)$ δονήσεις τάσης των $Mb-N_3$,^{34,35} $Hb-N_3$ ^{36,37} και N_3 -συμπλόκων σιδηροπορφυρινών,³⁸ αλλά και η ομοιότητά της με την 417 cm^{-1} δόνηση του $Fe_{a_3}-N_3-Cu_B$ συμπλόκου του κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (κεφάλαιο 5), προτείνουν ότι το N_3^- δε δεσμεύεται ως τελικό ligand στην αίμη o_3 , αλλά αντίθετα σχηματίζει γέφυρα μεταξύ των δύο μετάλλων του διπυρηνικού κέντρου ($Fe_{o_3}^{3+}-N_3-Cu_B^{2+}$).

Η αλληλεπίδραση του αζιδίου με το πλήρως οξειδωμένο κυτόχρωμα bo_3 μελετήθηκε επίσης με FTIR φασματοσκοπία, επειδή η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα παρατήρησης και χαρακτηρισμού της δέσμευσης και της δυναμικής όχι μόνο των ligands που δεσμεύονται στην αίμη αλλά και των ligands που δεσμεύονται στο Cu_B .³⁹ Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζονται τα FTIR φάσματα (A) του $^{14}N_3$ - και (B) $^{15}N^{14}N_2$ -συμπλόκου του ενζύμου. Η αναλογία των συγκεντρώσεων αζιδίου/πρωτεΐνης είναι ίδια με εκείνη των πειραμάτων συντονισμού Raman και UV-Vis. Το FTIR φάσμα του $^{14}N_3$ - παραγώγου εμφανίζει δύο δονήσεις, μία στους 2040 cm^{-1} και μία στους 2061 cm^{-1} , οι οποίες παρουσιάζουν ισοτοπική ευαισθησία και μετατοπίζονται αντίστοιχα στους 2032 cm^{-1} και 2051 cm^{-1} στο φάσμα του $^{15}N^{14}N_2$ -παραγώγου. Οι συχνότητες αυτών των $\nu_{as}(N_3)$ δονήσεων είναι ίδιες με εκείνες που ανιχνεύθηκαν στα φάσματα συντονισμού Raman, ενώ δεν παρατηρήθηκαν νέες, ισοτοπικά εξαρτώμενες, δονήσεις.

Η συχνότητα της κύριας δόνησης στους 2040 cm^{-1} είναι κοντά στη συχνότητα της $\nu_{as}(N_3)$ που παρατηρείται για την υψηλού spin Mb- N_3 ^{40,41} και τα N_3 -σύμπλοκα σιδηροπορφυρινών³⁸ και ίδια με εκείνη που έχει αναφερθεί παλαιότερα από τους Tsubaki et al.²⁷ για το bo_3 - N_3 σύμπλοκο. Αυτοί οι ερευνητές απέδωσαν τη δόνηση στους 2040 cm^{-1} στην ασύμμετρη δόνηση τάσης ενός o_3 - $N=N=N$ - Cu_B συμπλόκου γέφυρας, βάσει της παρατήρησης ότι η προσθήκη KCN στο ήδη σχηματισμένο σύμπλοκο bo_3 - N_3 έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της 2040 cm^{-1} δόνησης και την εμφάνιση μίας νέας δόνησης στους 2146 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στη $\nu(CN)$ ενός συμπλόκου γέφυρας της μορφής αίμη o_3 - CN - Cu_B . Όσον αφορά την 2061 cm^{-1} δόνηση, η συχνότητά της είναι ασυνήθιστα υψηλή σε σύγκριση με τις 2046 και 2023 cm^{-1} δονήσεις που παρατηρούνται για τη Mb- N_3 .^{40,41} Η συχνότητα αυτής της $\nu_{as}(N_3)$ δόνησης είναι κοντά στη $\nu_{as}(N_3)=2058\text{ cm}^{-1}$ η οποία παρατηρείται για τα N_3 -σύμπλοκα των χαλκοπρωτεϊνών SOD⁴² και NIR II (Varotsis et al. μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Οι Tsubaki et al.³¹ παρατηρούν μία παρόμοια δόνηση στους 2062.5 cm^{-1} για το bo_3 - N_3 , για την οποία παρατηρούν σχάση στους 2059 και 2043 cm^{-1} με την ισοτοπική αντικατάσταση $^{14}N_3 / ^{15}N^{14}N^{14}N$ και την οποία αποδίδουν σε δέσμευση του N_3^- ως τελικό ligand στο Cu_B .

Τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ δεν υποστηρίζουν δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στο Cu_B . Σύμφωνα με τα FTIR φάσματα δε συμβαίνει σχάση της 2040 ή της 2061 cm^{-1} δόνησης με την ασύμμετρη ισοτοπική



Σχήμα 6.4 Τα FTIR φάσματα: (A) του $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bo_3 , (B) του $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος bo_3 και (C) του $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένου κυτοχρώματος aa_3 από το *P. denitrificans*.

επισημάνση του αζιδίου. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου σ' αυτά τα πειράματα ήταν 2 cm^{-1} , οπότε μία σχάση μεγαλύτερη από 2 cm^{-1} ήταν δυνατό να ανιχνευθεί, όμως δεν

παρατηρήθηκε. Το γεγονός ότι αυτά τα φάσματα ελήφθησαν από διαφορετικά δείγματα $bo_3\text{-}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$, καθιστά αξιόπιστα αυτά τα αποτελέσματα. Απ' την άλλη, η ανίχνευση των δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ στα πειράματα συντονισμού Raman (σχήμα 6.2, ένθετο) προτείνει ότι αυτές οι δονήσεις οφείλονται σε δέσμευση του αζιδίου στην αίμη o_3 . Ωστόσο, η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman δείχνει καθαρά ότι δε μεταβάλλεται η spin κατάσταση της αίμης o_3 . Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι 2040 cm^{-1} και 2061 cm^{-1} δονήσεις χαρακτηρίζουν δέσμευση του N_3^- ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο αίμη $o_3\text{-Cu}_B$. Επομένως το αζίδιο δεσμεύεται στο κυτόχρωμα bo_3 σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, σχηματίζοντας σύμπλοκα της μορφής αίμη $o_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$. Η πρώτη διαμόρφωση περιγράφεται από τις $419\text{ cm}^{-1}/2040\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις και η δεύτερη απ' τις $419\text{ cm}^{-1}/2061\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις. Η ερμηνεία αυτή είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι η προσθήκη του KCN προκαλεί την εξαφάνιση των 2040 και 2061 cm^{-1} δονήσεων.²⁷

Οι συχνότητες και οι εντάσεις των ασύμμετρων δονήσεων τάσεως του αζιδίου, όπως και η μεταξύ τους σχέση εξαρτώνται άμεσα απ' το περιβάλλον γύρω απ' τη θέση δέσμευσης του αζιδίου και μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα για πιθανές δομές της θέσης αναγωγής του O_2 στις τελικές οξειδάσεις. Παρά το γεγονός ότι τα φασματοσκοπικά δεδομένα για την αλληλεπίδραση του αζιδίου με τα κυτοχρώματα aa_3 από το *P. denitrificans* και bo_3 από το *E. coli* προτείνουν δέσμευση του αζιδίου ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο σε δύο διαμορφώσεις, υπάρχουν διαφορές. Οι συχνότητες των $\nu_{as}(\text{N}_3)$ δονήσεων του $bo_3\text{-N}_3$ συμπλόκου είναι 2-5 cm^{-1} υψηλότερες από εκείνες που παρατηρούνται για το N_3 -υποκατεστημένο κυτόχρωμα aa_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (σχήμα 6.4). Επίσης, σε αντίθεση με τη $\nu_{as}(\text{N}_3)=2056\text{ cm}^{-1}$ του $aa_3\text{-N}_3$ συμπλόκου, η $\nu_{as}(\text{N}_3)=2061\text{ cm}^{-1}$ δόνηση του $bo_3\text{-N}_3$ συμπλόκου δεν παρουσιάζει σχάση κατά την ισοτοπική αντικατάσταση $\text{Na}^{14}\text{N}_3/\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}_2$. Αυτό σημαίνει ότι η ισχύς των δύο «εσωτερικών» δεσμών $\text{N}=\text{N}$ του δεσμευμένου αζιδίου είναι παρόμοια η μία με την άλλη στην 2061 cm^{-1} διαμόρφωση. Επίσης, η σύγκριση των FTIR φασμάτων των N_3 -υποκατεστημένων κυτοχρωμάτων aa_3 και bo_3 αποκαλύπτει διαφορές στις σχετικές εντάσεις των ασύμμετρων δονήσεων τάσεως του αζιδίου. Στο κυτόχρωμα aa_3 , η ένταση της υψηλής συχνότητας $\nu_{as}(\text{N}_3)$ δόνησης (2056 cm^{-1}) είναι μεγαλύτερη από την ένταση της χαμηλής συχνότητας $\nu_{as}(\text{N}_3)$ δόνησης (2038 cm^{-1}). Η σχέση αυτή αντιστρέφεται για το κυτόχρωμα bo_3 . Αντίστοιχες διαφορές δεν έχουν αναφερθεί μεταξύ άλλων καταστάσεων συναρμογής ή οξειδώσεως των δύο ενζύμων. Τέτοιες διαφορές μπορούν να αποδοθούν σε αλλαγές στην εγγύς περιοχή, όπως αλλαγή της θέσης του Cu_B . Επομένως, είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί

εάν υπάρχουν διαφορές και στην καταλυτική δράση των δύο ενζύμων, αφού η αλληλεπίδραση του Cu_B και των ligands του με τα ενδιάμεσα της αναγωγής του O₂, τα οποία είναι δεσμευμένα στη γειτονική αίμη, μπορεί να διαφέρει μεταξύ των δύο ενζύμων.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα αυτής της μελέτης δίνουν σαφείς ενδείξεις για το χαρακτηρισμό της δέσμευσης του ιόντος του αζιδίου στο διπυρηνικό κέντρο του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo₃, η οποία χαρακτηρίζεται απ' τις 419 cm⁻¹, 2040 cm⁻¹ και 2061 cm⁻¹ δονήσεις. Οι 2040 cm⁻¹ και 2061 cm⁻¹ δονήσεις αποδίδονται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης δύο διαμορφώσεων του αζιδίου, το οποίο δεσμεύεται ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο αίμη o₃-Cu_B, ενώ η 419 cm⁻¹ δόνηση αποδίδεται στη δόνηση τάσης Fe_{o3}-N των δύο Fe_{o3}-N₃-Cu_B διαμορφώσεων. Επίσης, η παρατηρούμενη διαφορά των σχετικών εντάσεων των ν_{as}(N₃) των κυτοχρωμάτων aa₃ από το *P. denitrificans* και bo₃ από το *E. coli* αποδίδεται σε διαφορές της δομής του διπυρηνικού κέντρου των δύο ενζύμων.

Βιβλιογραφία

1. Anraku, Y.; Gennis, R. B. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 262-266.
2. Chepuri, V.; Lemieux, L.; Au, C. C-T.; Gennis, R. B. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11185-11192.
3. Miller, M. J.; Gennis, R. B. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 9159-9165.
4. Bolgiano, B.; Salmon, I.; Ingledew, W. J.; Poole, R. K. *Biochem. J.* **1991**, *274*, 723-730.
5. Minagawa, J.; Mogi, T.; Gennis, R. B.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2096-2094.
6. Kita, K.; Kasahara, M.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7933-7935.
7. Puustinen, A.; Finel, M.; Virkki, M.; Wikström, M. *FEBS Lett.* **1989**, *249*, 163-167.
8. Puustinen, A.; Finel, M.; Haltia, T.; Gennis, R. B.; Wikström, M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 3936-3942.
9. Puustinen, A.; Morgan, J. E.; Verkhovskiy, M.; Thomas, J. W.; Gennis, R. B.; Wikström, M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10363-10369.
10. Puustinen, A.; Wikström, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 6122-6129.
11. Saraste, M.; Holm, L.; Lemieux, L.; Lübber, M.; van der Oost, J. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *19*, 608-612.
12. Wu, W.; Chang, C. K.; Varotsis, C.; Babcock, G. T.; Puustinen, A.; Wikström, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1182-1187.
13. Gohlke, U.; Warne, A.; Saraste, M. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1181-1188.
14. Calhoun, M. W.; Hill, J. J.; Lemieux, L. J.; Ingledew, W. J.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11524-11529.
15. Lemieux, L. J.; Calhoun, M. W.; Thomas, J. W.; Ingledew, W. J.; Gennis, R. B. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2105-2113.

16. Minagawa, J.; Mogi, T.; Gennis, R. B.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2096-2104.
17. Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
18. Thomas, J. W.; Calhoun, M. W.; Lemieux, L. J.; Puustinen, A.; Wikström, M.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1994**, *33*, 13013-13021.
19. Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
20. (a) Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H.; Hirota, S.; Ogura, T.; Kitagawa, T.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *49*, 30861-30868 (b) Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H. *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 191-195.
21. Lemon, D. D.; Calhoun, M. W.; Gennis, R. B.; Woodruff, W. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11953-11956.
22. Hirota, S.; Mogi, T.; Ogura, T.; Hirano, T.; Anraku, Y.; Kitagawa, T. *FEBS Lett.* **1994**, *352*, 67-70.
23. (a) Wang, J.; Ching, Y-c.; Rousseau, D. L.; Hill, J. J.; Rumbley, J.; Gennis, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *8*, 3390-3391. (b) Wang, J.; Ching, Y-c.; Takahasi, S.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 15504-15511.
24. Argade, P.V.; Ching, Y-c.; Rousseau, D. L. *Science* **1984**, *225*, 329-331.
25. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
26. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
27. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Anraku, Y.; Hori, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6065-6072, Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13780-13787.
28. Little, R. H.; Cheesman, M. R.; Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Watmough, N. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13780-13787.
29. Vygodina, T. V.; Konstantinov, A. A. *Biol. Membr.* **1985**, *2*, 861-869.
30. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *322*, 1833-1843.
31. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori, H. *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 191-195.
32. Morgan, J. E.; Verkhovskiy, M. I.; Wikström, M. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994**, *26*, 599-608.
33. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol.3, p.293
34. Asher, S. A.; Vickery, L.E.; Schuster, T.M.; Sauer, K. *Biochemistry* **1977**, *16*, 5849-5855.
35. Asher, S. A.; Schuster, T. M. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5377-5382.
36. Desbois, A.; Lutz, M.; Banerjee, R. *Biochemistry* **1979**, *18*, 1510-1515.
37. Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T. *Biochemistry* **1979**, *18*, 946-952.
38. Czernuszewicz, R. S.; Wagner, W-D.; Ray, G. B.; Nakamoto, K. *J. Mol. Struct.* **1991**, *242*, 99-117.
39. Hill, J. J.; Goswitz, V. C.; Calhoun, M.; Garcia-Horsman, J. A.; Lemieux, L.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11435-11440.

40. Bormett, R. W.; Asher, S. A.; Larkin, P. J.; Gustafson, W. G.; Ragunathan, N.; Freedman, T. B.; Nafie, L. A.; Balasubramanian, S.; Boxer, S. G.; Yu, N-T.; Gersonde, K.; Noble, R. W.; Springer, B. A.; Sligar, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6864-6867.
41. Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7600-7608.
42. Blackburn, N. J.; Reedy, B.; Zhou, E.; Carr, R.; Benkovic, S. J. *J. Inorg. Biochem.* **1992**, *47*, 8-16.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΛΗΡΩΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδάση (CcO) από καρδιά βοός είναι το μεγαλύτερο και καλύτερα χαρακτηρισμένο ένζυμο της οικογένειας των αιμοχαλκοοξειδασών. Βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας από το κυτόχρωμα *c* στο μοριακό O₂, ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει 4 H⁺ κατά μήκος της μεμβράνης για κάθε μόριο O₂ που ανάγει.¹⁻³ Περιέχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: το Cu_A, την αίμη *a* και το spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο αίμη *a*₃-Cu_B, το οποίο αποτελεί και την καταλυτική θέση του ενζύμου.

Οι κρυσταλλικές δομές διαφορετικών υποκατατεστημένων καταστάσεων της οξειδωμένης και πλήρως ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης, οι οποίες έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα, δείχνουν ορισμένα ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του διπυρηνικού κέντρου.⁴ Η δομή της οξειδωμένης μη υποκατεστημένης CcO παρουσιάζει ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δύο μετάλλων, η οποία ίσως είναι ενδεικτική της ύπαρξης ligands γέφυρας. Αντίθετα, στην περίπτωση της πλήρως ανηγμένης μη υποκατεστημένης μορφής δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονική πυκνότητα σ' αυτή την περιοχή. Επίσης, σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, η απόσταση Fe_{a3}-Cu_B μεταβάλλεται ανάλογα με την υποκατάσταση και την οξειδωτική κατάσταση του διπυρηνικού κέντρου. Στην οξειδωμένη μορφή είναι 4.9 Å, ενώ στην αζίδιο-δεσμευμένη και την πλήρως ανηγμένη κατάσταση βρέθηκε ότι είναι 5.3-5.2 Å.^{4b} Η αιτία σε μοριακό επίπεδο που ευθύνεται για αυτή τη μεταβολή της απόστασης δεν είναι γνωστή.

Φασματοσκοπικές μελέτες της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης δείχνουν ότι υπάρχουν διαφορετικές, εξαρτώμενες από το pH, διαμορφώσεις του ενζύμου, οι οποίες διαφέρουν ως προς την κινητική δέσμευσης εξωγενών ligands, όπως το CN⁻ και το H₂O₂.⁵⁻⁷

Ωστόσο, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών ή τη σημασία τους για τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου. Έχει προταθεί ότι αυτές οι διαμορφώσεις διαφέρουν στη συναρμογή του διπυρηνικού κέντρου.

Οι μελέτες δέσμησης του αζιδίου στα οξειδωμένα κυτοχρώματα aa_3 και bo_3 , οι οποίες παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια 5 και 6, δείχνουν ότι υπάρχουν δύο ξεχωριστές αίμη Fe^{3+} - $N=N=N$ - Cu_B^{2+} διαμορφώσεις. Αυτές οι μελέτες είναι κατά κάποιο τρόπο σε διαφωνία με προηγούμενες μελέτες της δέσμησης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων.

Στην εργασία που παρουσιάζεται εδώ, μελετάται η δέσμηση του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση και εξετάζεται η επίδραση του pH με φασματοσκοπία UV-Vis, FTIR και συντονισμού Raman. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών για τα βακτηριακά κυτοχρώματα aa_3 και bo_3 . Το αζίδιο δεσμεύεται ως ligand γέφυρας, σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, στο διπυρηνικό κέντρο. Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις $\nu_{as}(N_3)/\nu(Fe-N_3-Cu_B)$ δονήσεις στους $418\text{ cm}^{-1}/2041\text{ cm}^{-1}$, ενώ η δεύτερη παρουσιάζει τις ίδιες δονήσεις στους $418\text{ cm}^{-1}/2052\text{ cm}^{-1}$. Επιπλέον, τα FTIR αποτελέσματα προτείνουν ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων επηρεάζεται από το pH. Προτείνεται ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαμορφώσεων οφείλεται σε μία αλλαγή της πολικότητας της εγγύς περιοχής του διπυρηνικού κέντρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της θέσης του Cu_B .

7.2 Υλικά και μέθοδοι

Η κυτοχρωμική οξειδάση απομονώθηκε από καρδιά βοός σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3. Το ένζυμο διαλυτοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ανάλογα με το επιθυμητό pH κάθε φορά. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) 50 mM Bis-Tris, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 6.5 β) 50 mM Hepes, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4 και γ) 50 mM Tris-HCl, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 8.5.

Για τα UV-Vis πειράματα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 0.5 cm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 9.5 μM για κάθε pH που εξετάστηκε. Τα πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με τη σταδιακή προσθήκη 0.5 μl συγκεντρωμένων διαλυμάτων NaN_3 . Δέκα λεπτά μετά την προσθήκη του αζιδίου λαμβανόταν το φάσμα διαφοράς της απορρόφησης ως προς το αρχικό δείγμα του πλήρως

οξειδωμένου μη υποκατεστημένου ενζύμου. Τα δεδομένα καταγράφηκαν με ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Στα φάσματα που ελήφθησαν κατά την τιτλοδότηση έγινε διόρθωση της απορρόφησης λόγω της αραίωσης του δείγματος. Η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την κλίση της ευθείας του Scatchard διαγράμματος της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret λόγω της σταδιακής αύξησης της συγκέντρωσης του NaN_3 .

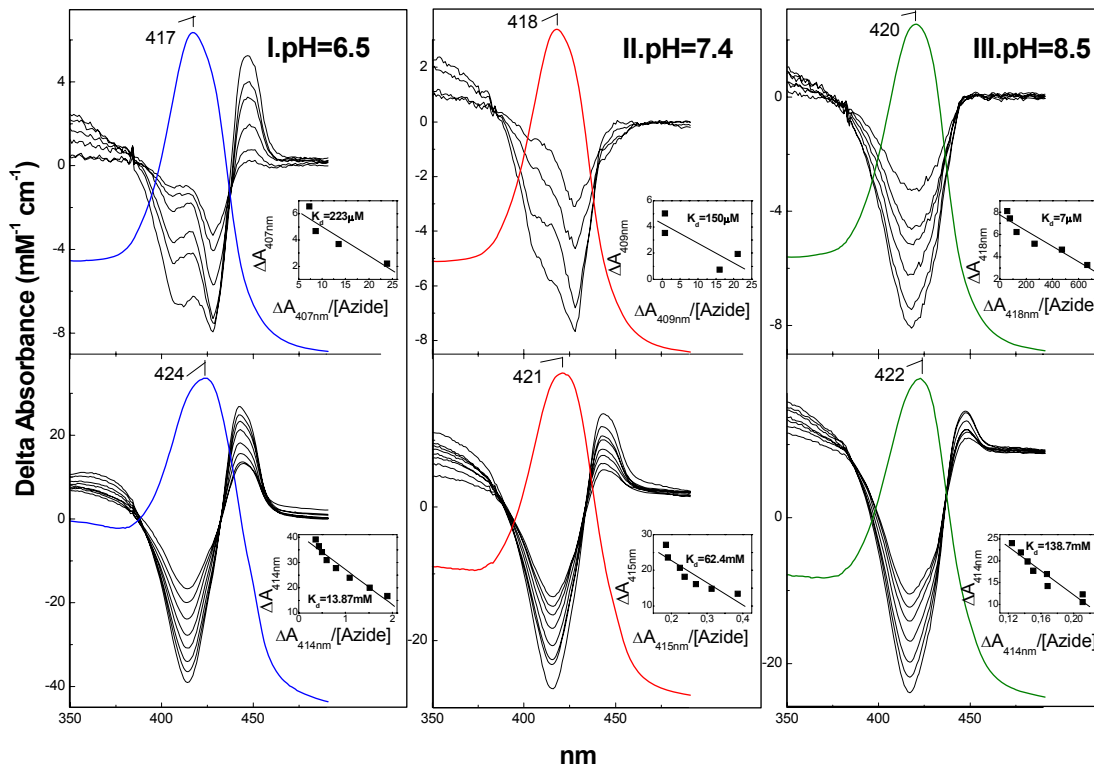
Για τα FTIR πειράματα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 350 μM , ενώ η συγκέντρωση του NaN_3 ήταν 350 μM , 1.75 mM και 14 mM, οπότε η στοιχειομετρία [πρωτεΐνη]:[NaN_3] ήταν 1:1 1:7 και 1:40, αντίστοιχα. Παρασκευάστηκαν επίσης, χωριστά για κάθε pH που εξετάστηκε, δείγματα αναφοράς του ελεύθερου ενζύμου συγκέντρωσης 350 μM και του ελεύθερου αζιδίου συγκέντρωσης ίδιας με εκείνης στα δείγματα πρωτεΐνης-αζιδίου. Τα φάσματα των παραπάνω δειγμάτων και των ρυθμιστικών διαλυμάτων ελήφθησαν μέσα σε IR κυψελίδα με CaF_2 παράθυρα και 52 μm spacer, σε ένα BRUKER 55 EQUINOX FTIR φασματοφωτόμετρο, εξοπλισμένο με MCT ανιχνευτή. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν 2000 interferograms. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν 2 cm^{-1} . Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.

Για τα πειράματα συντονισμού Raman παρασκευάστηκαν δείγματα με συγκέντρωση πρωτεΐνης 40 μM και αζιδίου 1.5 mM. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία περιστρεφόμενη κυλινδρική κυψελίδα από χαλαζία και η θερμοκρασία των δειγμάτων διατηρήθηκε στους 3-5 $^\circ\text{C}$ με ένα ρεύμα κρύου αερίου αζώτου πάνω στα δείγματα σ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα φάσματα καταγράφηκαν με ένα SPEX 1877 triplemate εξοπλισμένο με ένα EG&G (μοντέλο 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Το μήκος κύματος διέγερσης 427 nm παράχθηκε μ' ένα Coherent 590 dye laser συνδεδεμένο μ' ένα Coherent Innova 200 Argon laser. Η ισχύς της δέσμης ήταν 8-10 mW.

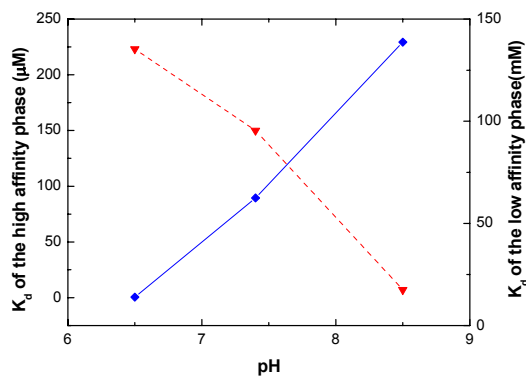
7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 7.1 φαίνονται τα αποτελέσματα των UV-Vis πειραμάτων τιτλοδότησης της CcO με το αζίδιο σε pH 6.5, 7.4 και 8.5. Τα φάσματα διαφοράς ως προς το οξειδωμένο ένζυμο, τα οποία λαμβάνονται κατά τη σταδιακή προσθήκη του NaN_3 , χαρακτηρίζονται από δύο σειρές αλλαγών στην απορρόφηση σε όλα τα pH που εξετάστηκαν. Αυτό προτείνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στην CcO πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στη Soret περιοχή. Οι τιμές των σταθερών διάστασης είναι 223 μM σε pH 6.5, 150 μM σε 7.4 και 7 μM σε 8.5 (σχήμα 7.1, ένθετα). Λόγω των μικρών αλλαγών που προκαλούνται στην απορρόφηση της Soret ταινίας και των χαμηλών σταθερών διάστασης, η φάση αυτή χαρακτηρίζεται ως φάση υψηλής συγγένειας. Η δεύτερη φάση παρατηρείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αζιδίου. Τα φάσματα διαφοράς εμφανίζουν μέγιστο γύρω στα 444 nm και ελάχιστο γύρω στα 414 nm. Αυτό σημαίνει ότι το μέγιστο της Soret ταινίας μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Στο pH 6.5 το λ_{max} μετατοπίζεται κατά 7 nm, ενώ στο pH 8.5 μετατοπίζεται μόνο κατά 2 nm. Η σταθερά διάστασης γι' αυτή την αντίδραση είναι 13.87 mM, 62.4 mM και 138.7 mM σε pH 6.5, 7.4 και 8.5, αντίστοιχα (σχήμα 7.1, ένθετα). Αυτή η αντίδραση αναφέρεται ως φάση χαμηλής συγγένειας.

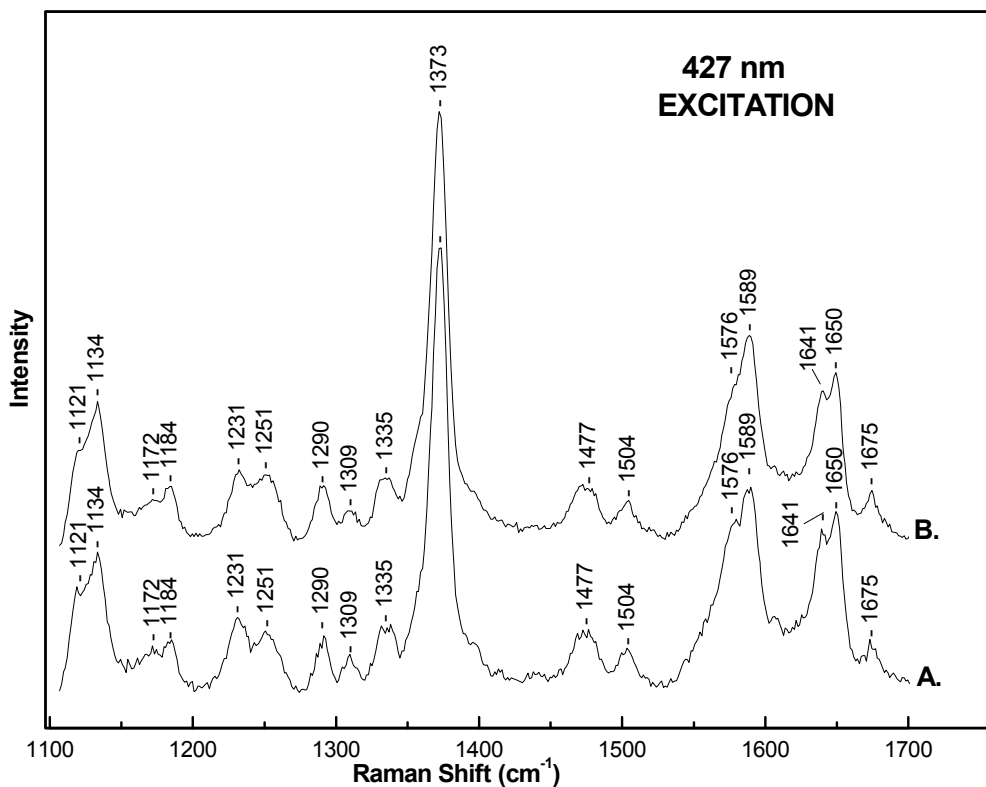
Η γραφική παράσταση των σταθερών διάστασης των δύο φάσεων ως προς το pH φαίνεται στο σχήμα 7.2. Στη φάση υψηλής συγγένειας, η σταθερά διάστασης μειώνεται γραμμικά με το pH. Αντίθετα, η σταθερά διάστασης για τη φάση χαμηλής συγγένειας αυξάνεται με το pH. Προηγούμενες UV-Vis μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στην CcO των μιτοχονδρίων επίσης δείχνουν εξάρτηση της K_d από το pH. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές αναφέρουν μόνο μία φάση δέσμευσης, η οποία αντιστοιχεί στη φάση υψηλής συγγένειας που παρατηρείται εδώ. Οι Wever et al.⁸ αναφέρουν ότι η σταθερά διάστασης αυξάνει με το pH και μετρούν μία σταθερά διάστασης 20 μM για το pH 7.2. Αντίθετα οι Vygodina et al.⁹ αναφέρουν μία μη γραμμική εξάρτηση της σταθεράς διάστασης απ' το pH, η οποία δίνει μέγιστη $K_d=50 \mu\text{M}$ στο pH 7.5. Η ύπαρξη των δύο φάσεων αναφέρεται μόνο από τους Li et



Σχήμα 7.1 Τα απόλυτα οπτικά φάσματα απορρόφησης της οξειδωμένης CcO και N₃-υποκατεστημένης CcO και τα φάσματα διαφοράς της CcO-N₃ μείον το φάσμα της CcO κατά τη σταδιακή προσθήκη του αζιδίου σε (I) pH 6.5, (II) pH 7.4 και (III) pH 8.5. Στα ένθετα φαίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα Scatchard της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret για τον υπολογισμό των K_d .



Σχήμα 7.2 Γραφική παράσταση της εξάρτησης της σταθεράς διάστασης από το pH (διακεκομένη γραμμή: φάση υψηλής συγγένειας, συνεχής γραμμή: φάση χαμηλής συγγένειας).



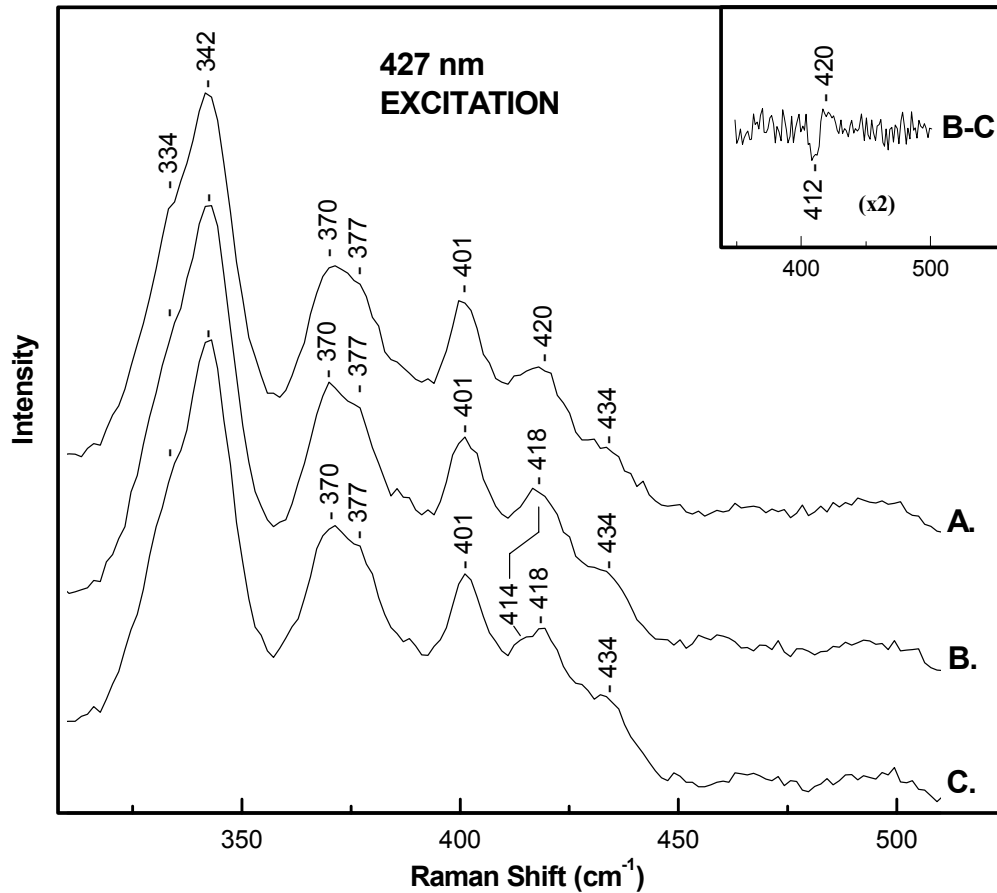
Σχήμα 7.3 Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman: (A) της πλήρως οξειδωμένης CcO και (B) N₃-υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm.

al.¹⁰ Αυτοί οι ερευνητές πραγματοποίησαν UV-Vis πειράματα τιτλοδότησης στο pH 8.0 και παρατήρησαν δύο φάσεις δέσμευσης του αζιδίου στην CcO με σταθερές διάστασης 64 μM για τη φάση υψηλής συγγένειας και 21 mM για τη φάση χαμηλής συγγένειας.

Στο σχήμα 7.3 φαίνεται η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman της πλήρως οξειδωμένης CcO πριν (φάσμα A) και μετά την δέσμευση του αζιδίου (Na¹⁴N₃) στη φάση υψηλής συγγένειας (φάσμα B), σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm και είναι σε συντονισμό με την π-π* διέγερση της αίμης α. Σύγκριση των δύο φασμάτων δείχνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στην CcO δε μεταβάλλει τη spin ή την οξειδωτική κατάσταση των ομάδων αίμης α και α₃. Η ν₄ δόνηση παρατηρείται στους 1373 cm⁻¹, συχνότητα η οποία είναι χαρακτηριστική για τη Fe³⁺ οξειδωτική κατάσταση και των δύο ομάδων αίμης.¹¹ Οι δονήσεις στους 1576 cm⁻¹(ν₂), 1477 cm⁻¹(ν₃) και 1641 cm⁻¹(ν₁₀)

δηλώνουν ότι η αίμη α_3 βρίσκεται στην υψηλού spin διαμόρφωση και συναρμόζεται με έξι υποκαταστάτες.¹¹ Οι δονήσεις στους $1504\text{ cm}^{-1}(\nu_3)$ και $1589\text{ cm}^{-1}(\nu_2)$ χαρακτηρίζουν την αίμη α .¹¹ Οι παρατηρούμενες συχνότητες δηλώνουν ότι η αίμη α έχει έξι υποκαταστάτες και βρίσκεται στην κατάσταση χαμηλού spin.

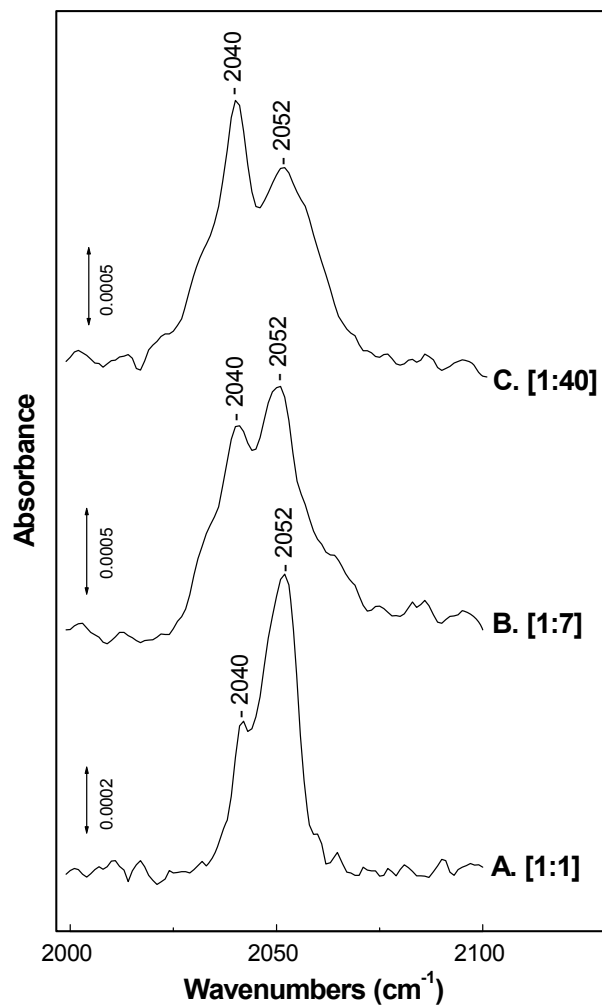
Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζεται η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman της πλήρως οξειδωμένης CcO (φάσμα A) και των συμπλόκων που σχηματίζει με το $^{14}\text{N}_3$ (φάσμα B) και το $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ (φάσμα C) στο pH 7.4. Οι συγκεντρώσεις της CcO και των Na^{14}N_3 , $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ είναι ίδιες με εκείνες των



Σχήμα 7.4 Η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman: (A) της πλήρως οξειδωμένης CcO, (B) $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένης CcO και της (C) $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ -υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm.

πειραμάτων στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων. Το φάσμα του $^{14}\text{N}_3$ -παραγώγου εμφανίζει μία δόνηση στους 418 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζει ισοτοπική ευαισθησία και μετατοπίζεται στους 414 cm^{-1} , όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με το $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$. Το φάσμα διαφοράς των δύο συμπλόκων (σχήμα 7.4, ένθετο) παρουσιάζει μία θετική κορυφή στους 420 cm^{-1} και μία αρνητική στους 412 cm^{-1} , επιβεβαιώνοντας την παρουσία της 418 cm^{-1} δόνησης (κατά την αφαίρεση των απολύτων φασμάτων είναι αναμενόμενη μία μετατόπιση $1\text{-}2\text{ cm}^{-1}$ στις συχνότητες των δονήσεων στα φάσματα διαφοράς). Η δόνηση στους 418 cm^{-1} είναι παρόμοια με τις $\nu(\text{Fe-N}_3\text{-Cu}_B)$ δονήσεις των N_3 -υποκατεστημένων κυτοχρωμάτων a_{a3} από το *P. denitrificans* (417 cm^{-1}) και b_{o3} απ' το *E. coli* (419 cm^{-1}) και αντιστοίχως αποδίδεται στη $\nu(\text{Fe}_{a3}\text{-N}_3\text{-Cu}_B)$ του CcO-N_3 συμπλόκου.

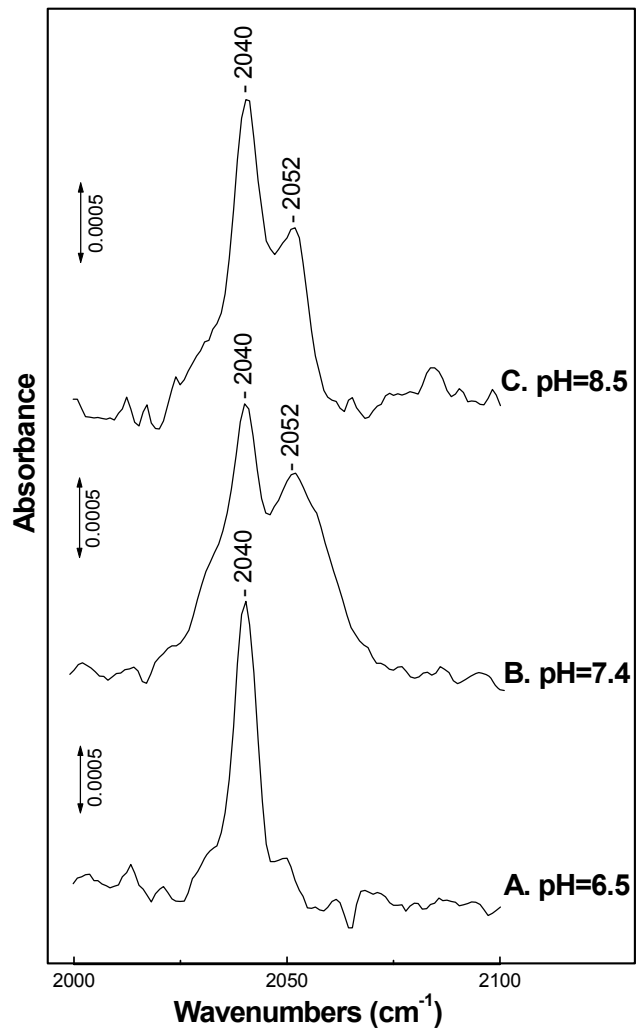
Στο σχήμα 7.5 παρουσιάζονται τα FTIR φάσματα της N_3 -υποκατεστημένης CcO τα οποία λαμβάνονται με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αζιδίου σε pH 7.4. Οι αναλογίες των συγκεντρώσεων $[\text{CcO}]:[\text{NaN}_3]$ αντιστοιχούν στη φάση υψηλής συγγένειας. Παρατηρούνται δύο δονήσεις, μία στους 2040 cm^{-1} και μία στους 2052 cm^{-1} , οι σχετικές εντάσεις των οποίων μεταβάλλονται με τη συγκέντρωση του αζιδίου. Σε αναλογία συγκεντρώσεων 1:1, η κύρια δόνηση είναι η 2052 cm^{-1} . Αύξηση της συγκέντρωσης του αζιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της 2040 cm^{-1} . Οι συχνότητες αυτών των δονήσεων είναι σε συμφωνία με προηγούμενες FTIR μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στην CcO , οι οποίες αναφέρουν δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ στους 2039 cm^{-1} και 2052 cm^{-1} .^{10,12,13} Ο χαρακτηρισμός αυτών των δονήσεων έχει γίνει αντικείμενο πολλών συζητήσεων και διαφωνιών. Οι Yoshikawa et al.¹² ερμηνεύοντας τα FTIR και UV-Vis αποτελέσματά τους αποδίδουν την 2052 cm^{-1} σε δέσμευση του αζιδίου σε μη μεταλλική θέση μέσα στην πρωτεΐνη και την 2039 cm^{-1} στο σχηματισμό ενός συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-N}_3$ τελικής διαμόρφωσης. Ο Tsubaki¹³ υποστηρίζει ότι οι δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του αζιδίου στο διπυρηνικό κέντρο, στη μία (2052 cm^{-1}) σχηματίζει μία γέφυρα μεταξύ των δύο μετάλλων, ενώ στην άλλη (2039 cm^{-1}) δεσμεύεται ως τελικό ligand στην αίμη a_3 . Τέλος οι Li et al.,¹⁰ οι οποίοι αναφέρουν δύο φάσεις δέσμευσης του αζιδίου, προτείνουν ότι η 2052 cm^{-1} προκύπτει από ένα σύμπλοκο γέφυρας αίμη $a_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$ και βάσει των EPR και MCD αποτελεσμάτων τους προτείνουν ότι στη φάση χαμηλής συγγένειας το αζίδιο αντικαθιστά ένα αζονικό ligand ιστιδίνης της αίμης a , σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο χαρακτηρίζεται από την 2039 cm^{-1} δόνηση.



Σχήμα 7.5 Τα FTIR φάσματα της ¹⁴N₃-υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4 και αναλογία συγκεντρώσεων [CcO]:[NaN₃]: (A) 1:1, (B) 1:7 και (C) 1:40.

Από τα φάσματα συντονισμού Raman δεν υπάρχουν ενδείξεις για αλλαγή της συναρμογής της αίμης α ή μεταβολή της spin κατάστασης της αίμης α_3 και επομένως δεν είναι πιθανή η δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στην αίμη α ή την α_3 . Το συμπέρασμα αυτό είναι σε συμφωνία και με την κρυσταλλική δομή της CcO-N₃,^{4b} η οποία δείχνει ότι η αίμη α διατηρεί τα δύο αξονικά ligands ιστιδίνης και μετά τη δέσμευση του αζιδίου. Η κρυσταλλική δομή του CcO-N₃ συμπλόκου δείχνει επίσης ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δύο ιόντων του διπυρηνικού κέντρου, η οποία έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει μία μ -1,3 γέφυρα αζιδίου μεταξύ του σιδήρου και του χαλκού. Οι συχνότητες των δύο $\nu_{as}(N_3)$, που παρατηρούνται στο FTIR φάσμα του CcO-N₃ συμπλόκου, είναι παρόμοιες με τις συχνότητες $\nu_{as}(N_3)$ των α_3 -N₃-Cu_B συμπλόκων του κυτοχρώματος α_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (Πίνακας 7.1) και κατά συνέπεια αποδίδονται στο σχηματισμό α_3 -N₃-Cu_B συμπλόκων της CcO των μιτοχονδρίων. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, όπως συμβαίνει στα κυτοχρώματα α_3 από το *P. denitrificans* και $\beta\alpha_3$ από το *E. coli*, το ιόν του αζιδίου δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις στο ένζυμο των μιτοχονδρίων σχηματίζοντας σε κάθε μία σύμπλοκο γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο. Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις 418 cm⁻¹ και 2040 cm⁻¹ δονήσεις, ενώ η δεύτερη από τις 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹.

Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού των χαρακτηριστικών που ευθύνονται για την ύπαρξη των δύο Fe-N₃-Cu_B διαμορφώσεων, εξετάστηκε επίσης με FTIR φασματοσκοπία η επίδραση του pH στη δέσμευση του αζιδίου στην CcO (σχήμα 7.6). Η αναλογία των συγκεντρώσεων της CcO του NaN₃ είναι 1:40 σε όλα τα φάσματα (φάση υψηλής συγγένειας). Σε pH 6.5 παρατηρείται μόνο η 2040 cm⁻¹ δόνηση, ενώ σε pH 7.4 και 8.5 παρατηρούνται και οι δύο δονήσεις. Αυτό σημαίνει ότι σε pH 6.5 το σύμπλοκο CcO-N₃ είναι αποκλειστικά στην 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ διαμόρφωση, αντίθετα στα υψηλότερα pH υπάρχει και στις δύο διαμορφώσεις. Φαίνεται, λοιπόν, ότι φαινόμενα πρωτονώσης/αποπρωτονώσης ομάδων με pKa κοντά σ' αυτές τις τιμές pH επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, τη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου. Προτείνεται ότι η μεγάλη διαφορά στη συχνότητα μεταξύ των δύο $\nu_{as}(N_3)$ αντανακλά μία αλλαγή στην πολικότητα του περιβάλλοντος γύρω απ' τη θέση δέσμευσης, χωρίς να αποκλείεται η περίπτωση η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαμορφώσεων να είναι το αποτέλεσμα μίας ευρύτερης αλλαγής στη διαμόρφωση του ενζύμου.



Σχήμα 7.6 Τα FTIR φάσματα της ¹⁴N₃-υποκατεστημένης CcO σε (A) pH 6.5, (B) pH 7.4 και (C) pH 8.4. Η αναλογία των συγκεντρώσεων [CcO]:[NaN₃] είναι 1:40 σ' όλα τα pH (φάση υψηλής συγγένειας).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των UV-Vis και FTIR πειραμάτων που αναφέρονται παραπάνω επιτρέπει τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των CcO-N₃ συμπλόκων και οδηγεί σε γενικότερα συμπεράσματα όσον αφορά τις ιδιότητες των δύο διαμορφώσεων, τις οποίες μπορεί να υιοθετήσει το διπυρηνικό κέντρο. Τα UV-Vis πειράματα δείχνουν ότι η σταθερά διάστασης για τη φάση υψηλής συγγένειας στο pH 6.5 είναι 223 μM. Από τα FTIR πειράματα προκύπτει ότι σ' αυτές τις συνθήκες σχηματίζεται αποκλειστικά το 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ σύμπλοκο και επομένως η σταθερά διάστασης αυτού του συμπλόκου είναι 223 μM. Σε υψηλότερα pH, όμως, στη φάση υψηλής συγγένειας σχηματίζονται και τα δύο CcO-N₃ σύμπλοκα και οι σταθερές διάστασης είναι χαμηλότερες. Συνεπώς, η σταθερά διάστασης του 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹ συμπλόκου είναι αρκετά μικρότερη απ' τη K_d=223 μM του 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ παραγώγου. Από τα παραπάνω προκύπτει, επίσης, ότι η τιμή της K_d για τη φάση υψηλής συγγένειας εξαρτάται από τη θέση ισορροπίας μεταξύ των δύο διαμορφώσεων. Έτσι, η πολύ μικρή σταθερά διάστασης για το pH 8.5 - συγκρινόμενη με τη σταθερά διάστασης στο pH 6.5 - προτείνει ότι στο pH 8.5 η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων μετατοπίζεται προς εκείνη την κατεύθυνση, στην οποία σχηματίζεται το 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹ σύμπλοκο.

Οι συχνότητες των δονήσεων που παρατηρούνται κατά τη δέσμευση του αζιδίου στις τελικές οξειδάσες, όπως επίσης η σχέση μεταξύ αυτών, μπορούν να οδηγήσουν στο χαρακτηρισμό των γνωρισμάτων που καθορίζουν τη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου και κατ' επέκταση να βοηθήσουν στον προσδιορισμό των κοινών και των ιδιαίτερων γνωρισμάτων, τα οποία μπορεί να είναι σημαντικά για τη λειτουργία του ενζύμου. Στον πίνακα 7.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μελετών της δέσμευσης του αζιδίου στα κυτόχρωμα aa₃ από το *P. denitrificans* και bo₃ από το *E. coli* και την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια. Σύγκριση των δονήσεων αυτών δείχνει ότι υπάρχουν πολύ μικρές διαφορές στη συχνότητα των ν(Fe-N₃-Cu_B) δονήσεων τάσης. Μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται στις συχνότητες των ν_{as}(N₃) δονήσεων, κυρίως εκείνων που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ενέργειες. Αυτές οι διαφορές αντανακλούν διαφοροποιήσεις στο μικροπεριβάλλον γύρω από το διπυρηνικό κέντρο. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου καθορίζεται από τις ιδιότητες της εγγύς περιοχής σε μεγαλύτερο βαθμό απ' τις ιδιότητες της proximal

ιστιδίνης. Ωστόσο, παρά τις φαινομενικές διαφορές μεταξύ των τριών οξειδασών, όπως η προέλευση, η σύνθεση των υπομονάδων/ομάδων αίμης, αυτά τα ένζυμα μπορούν να υπάρξουν σε δύο διαμορφώσεις στην πλήρως οξειδωμένη μορφή τους, οι οποίες προτιμούν να σχηματίζουν σύμπλοκα γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο με εξωγενή ligands, όπως το N_3^- .

Πίνακας 7.1. Οι συχνότητες (cm^{-1}) των $\nu(Fe-N_3-Cu_B)$ και $\nu_{as}(N_3)$ δονήσεων για μερικές κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες

Ένζυμα	$\nu(Fe-N_3-Cu_B)$	$\nu_{as}(N_3)$
κυτοχρωμική οξειδάση (μιτοχόνδρια)	418	2052/2041
κυτόχρωμα aa_3 (<i>P.denitrificans</i>)	417	2056/2037
κυτόχρωμα bo_3 (<i>E.coli</i>)	419	2061/2040

Η τιμή της $\nu_{as}(N_3)$ για τα N_3 -σύμπλοκα μετάλλων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η τάξη των δεσμών μέταλλο-N και N=N, η ισχύς των δύο δεσμών N=N και οι γωνίες που αυτοί σχηματίζουν με τα μέταλλα. Αύξηση της τάξης δεσμού μέταλλο-N και μείωση της τάξης των δεσμών N=N έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της $\nu_{as}(N_3)$.¹⁴ Επίσης, φασματοσκοπικές μελέτες N_3 -συμπλόκων προτείνουν ότι μία μεγάλη διαφορά στα μήκη των δύο δεσμών N=N, οδηγεί σε υψηλές συχνότητες της $\nu_{as}(N_3)$.¹⁵ Το ιόν του N_3 θεωρείται ευθύγραμμο και συμμετρικό με μήκος δεσμού N=N 1.15 Å κατά μέσο όρο.¹⁶ Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του CcO- N_3 ενζύμου τα μήκη των δεσμών Fe_{a_3} - N_3 και Cu_B - N_3 είναι 1.97 και 1.9 Å, αντίστοιχα.^{4b} Επομένως, μία ευθύγραμμη διευθέτηση της μονάδας $Fe_{a_3}^{3+}$ -N=N=N- Cu_B^{2+} απαιτεί απόσταση Fe_{a_3} - Cu_B περίπου 6.2 Å. Όμως οι κρυσταλλικές δομές της μη υποκατεστημένης CcO και του CcO- N_3 συμπλόκου δείχνουν ότι τα ιόντα του $Fe_{a_3}^{3+}$ και του Cu_B^{2+} απέχουν μεταξύ τους 4.9 και 5.3 Å, αντίστοιχα.⁴ Αυτό σημαίνει ότι η δέσμευση του N_3 στο διπυρηνικό κέντρο προκαλεί τη μετατόπιση του Cu_B , ενώ το σύμπλοκο $Fe_{a_3}^{3+}$ -N=N=N- Cu_B^{2+} αποκλίνει σημαντικά από την

ευθύγραμμη διευθέτηση, με αποτέλεσμα οι γωνίες των δεσμών $\text{Fe}_{a_3}\text{-N=N}$ και $\text{Cu}_B\text{-N=N}$ να είναι αρκετά μικρότερες από 180° . Για το χαμηλού spin σύμπλοκο αίμη Fe-N_3 της Mb, το οποίο χαρακτηρίζεται από τις $\nu(\text{Fe-N}_3)=411\text{cm}^{-1}$ και $\nu(\text{N}_3)=2023\text{cm}^{-1}$, έχει βρεθεί ότι η γωνία Fe-N=N είναι $111^\circ\text{-}112^\circ$.¹⁷ Τα παραπάνω προτείνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση της $\text{Fe}^{3+}\text{-N=N=N-Cu}_B^{2+}$ μονάδας εξαρτάται από τη θέση του Cu_B . Επομένως οι δύο διαμορφώσεις $\text{Fe}^{3+}\text{-N=N=N-Cu}_B^{2+}$ που παρατηρούνται είναι πιθανό να διαφέρουν στην απόσταση Fe-Cu_B . Η αιτία της αλλαγής της θέσης του Cu_B και της απόστασης Fe-Cu_B μπορεί να οφείλεται σε μία μεταβολή της πολικότητας στην εγγύς περιοχή, όπως προτείνουν τα FTIR πειράματα για την εξάρτηση απ' το pH (σχήμα 7.6).

Οι φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στα κυτοχρώματα aa_3 από το *P. denitrificans* και bo_3 από το *E. coli* και την CcO από τα μιτοχόνδρια δείχνουν την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου στις N_3 -υποκατεστημένες μορφές των τριών τελικών οξειδωσών που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τα UV-Vis και FTIR δεδομένα για την CcO δείχνουν ότι, η ισορροπία μεταξύ των δύο καταστάσεων των πλήρως οξειδωμένων ενζύμων επηρεάζεται από την αλλαγή του pH. FTIR και Raman μελέτες της δέσμευσης του CO στις κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες, πιστοποιούν την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου, της α και της β μορφής, για τα πλήρως ανηγμένα ένζυμα.¹⁸ Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη των α και β μορφών είναι αποτέλεσμα μεταβολών που συμβαίνουν στην εγγύς περιοχή, όπως η αλλαγή της θέσης του Cu_B . Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών εξαρτάται από το pH. Πιο συγκεκριμένα, οι Mitchel et al.¹⁹ πραγματοποιώντας FTIR πειράματα φωτόλυση/επανασύνδεσης του CO στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα aa_3 από το *R. sphaeroides* βακτήριο σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρατήρησαν ότι οι σχετικές εντάσεις των $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων για τα $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ και $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CO}$ σύμπλοκα των α/β μορφών, μεταβάλλονται κατά τον ίδιο τρόπο με την αλλαγή του pH. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταβολές που προκαλεί η αλλαγή του pH επηρεάζουν τη συναρμογή τόσο στο Fe_{a_3} όσο και το Cu_B . Σε υψηλά pH (pH 9.0), η οξειδάση βρίσκεται κυρίως στην α μορφή, ενώ σε χαμηλότερα pH (pH 6.0) η κύρια μορφή είναι η β . Απ' τα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε ότι το pK_a για την αλληλομετατροπή των α και β μορφών είναι 7.3. Είναι ενδιαφέρον ότι δύο διαφορετικές, εξαρτώμενες από το pH, διαμορφώσεις έχουν επίσης αναφερθεί για το φέρυλο ενδιάμεσο, το οποίο σχηματίζεται κατά την αντίδραση της CcO με το H_2O_2 και το O_2 .²⁰⁻²³ Οι καταστάσεις αυτές χαρακτηρίζονται από διαφορετικά οπτικά φάσματα και διαφορετικές $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$. Η πρώτη διαμόρφωση παρουσιάζει την α -ταινία απορρόφησης στα

607 nm και την $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$ στους 804 cm^{-1} . Η δεύτερη διαμόρφωση δίνει την α -ταινία απορρόφησης στα 580 nm και τη $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$ στους 786 cm^{-1} . Δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα οι διαφορές στη δομή μεταξύ των δύο καταστάσεων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διαφορά στη θέση της α -ταινίας απορρόφησης. Η ύπαρξη διαφορετικών σταθερών διαμορφώσεων σε άλλες υποκατεστημένες μορφές, προτείνει ότι οι δύο καταστάσεις του φέρυλο ενδιαμέσου είναι πιθανό να προκύπτουν από μία αλλαγή της διαμόρφωσης του διπυρηνικού κέντρου.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αναφέρει για πρώτη φορά μία εξαρτώμενη από το pH μεταβολή της διαμόρφωσης στην οξειδωμένη N_3 -υποκατεστημένη κυτοχρωμική οξειδάση. Τα FTIR αποτελέσματα προτείνουν ότι οι $2040 \text{ cm}^{-1} / 2052 \text{ cm}^{-1}$ διαμορφώσεις σχετίζονται με μία αλλαγή της πολικότητας στην εγγύς περιοχή. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων της δέσμησης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια και *P. denitrificans* και το κυτόχρωμα bo_3 από το *E. coli* δείχνει ότι το διπυρηνικό κέντρο στα τρία ένζυμα είναι παρόμοιο αλλά όχι απόλυτα ίδιο. Προτείνεται ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στις $\nu_{as}(\text{N}_3)$ αντανακλούν διαφορές στην απόσταση σιδήρου-χαλκού.

Βιβλιογραφία

1. Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *Nature* **1992**, *356*, 301-309.
2. Garia-Horsman, A. J.; Barquera, B.; Rumbley, J.; Ma, J.; Gennis, R. *J. Bacteriology* **1994**, *176*, 5587-5600.
3. Anraku, Y.; Gennis, R. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 262-266.
4. a) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, *269*, 1069-1074. b) Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libue, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
5. Baker, G. M.; Palmer, G. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3038-2044.
6. Moody, A. J.; Cooper, C. E.; Rich, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1059*, 189-207.
7. Baker, G. M.; Noguchi, M.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 595-604.
8. Wever, R.; Muijsers, A. O.; Van Gelder, B. F.; Bakker, E. P.; Van Buuren, K. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *325*, 1-7.
9. Vygodina, T. V.; Konstantinov, A. A. *Biol. Membr.* **1985**, *2*, 861-869.
10. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *322*, 1833-1843.
11. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol.3, p.293.

12. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
13. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
14. Alben, J. O.; Fager, L. Y. *Biochemistry* **1972**, *11*, 842-847.
15. Argell, J. *Acta Chem. Scand.* **1971**, 2964-2974.
16. Dori, Z.; Ziola, R. F. *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 247-254.
17. a) Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T. *Biochemistry* **1979**, *18*, 946-952. b) Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7600-7608. c) Stryer, L.; Kendrew, J. G.; Watson, H. C. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 96-104.
18. a) Alben, J. O.; Moh, P. P.; Fiamingo, F. G.; Atschul, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 234-237. b) Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A.; Moh, P. P.; Alben, J. O.; *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1639-1650. c) Wang, J.; Takahashi, S.; Hosler, J. P.; Mitchell, D. M.; Ferguson-Miller, S.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9818-9825. d) Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9363-9364. e) Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
19. Mitchell, D. M.; Spapleigh, J.P.; Archer, A. M.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9446-9450.
20. Weng, L. C.; Baker, G. M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5727-5733.
21. Proshlyakov, D.A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appleman, E. H.; Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29385-29388.
22. Han, S.; Takahashi, S.; Rousseau, D. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1910-1919.
23. Proshlyakov, D.A.; Pressler, M. A; Babcock, G.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1998**, *95*, 8020-8025.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΑΖΙΔΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΛΗΡΩΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Η κυτοχρωμική οξειδάση (CcO) από καρδιά βοός είναι το μεγαλύτερο και καλύτερα χαρακτηρισμένο ένζυμο της οικογένειας των αιμοχαλκοοξειδασών. Βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και καταλύει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων της αναπνευστικής αλυσίδας από το κυτόχρωμα *c* στο μοριακό O₂, ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζει 4 H⁺ κατά μήκος της μεμβράνης για κάθε μόριο O₂ που ανάγει.¹⁻³ Περιέχει τέσσερα οξειδοαναγωγικά κέντρα: το Cu_A, την αίμη *a* και το spin συζευγμένο διπυρηνικό κέντρο αίμη *a*₃-Cu_B, το οποίο αποτελεί και την καταλυτική θέση του ενζύμου.

Οι κρυσταλλικές δομές διαφορετικών υποκατατεστημένων καταστάσεων της οξειδωμένης και πλήρως ανηγμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης, οι οποίες έχουν δημοσιευτεί πρόσφατα, δείχνουν ορισμένα ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά του διπυρηνικού κέντρου.⁴ Η δομή της οξειδωμένης μη υποκατεστημένης CcO παρουσιάζει ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δύο μετάλλων, η οποία ίσως είναι ενδεικτική της ύπαρξης ligands γέφυρας. Αντίθετα, στην περίπτωση της πλήρως ανηγμένης μη υποκατεστημένης μορφής δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονική πυκνότητα σ' αυτή την περιοχή. Επίσης, σύμφωνα με αυτές τις μελέτες, η απόσταση Fe_{a3}-Cu_B μεταβάλλεται ανάλογα με την υποκατάσταση και την οξειδωτική κατάσταση του διπυρηνικού κέντρου. Στην οξειδωμένη μορφή είναι 4.9 Å, ενώ στην αζίδιο-δεσμευμένη και την πλήρως ανηγμένη κατάσταση βρέθηκε ότι είναι 5.3-5.2 Å.^{4b} Η αιτία σε μοριακό επίπεδο που ευθύνεται για αυτή τη μεταβολή της απόστασης δεν είναι γνωστή.

Φασματοσκοπικές μελέτες της οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης δείχνουν ότι υπάρχουν διαφορετικές, εξαρτώμενες από το pH, διαμορφώσεις του ενζύμου, οι οποίες διαφέρουν ως προς την κινητική δέσμευσης εξωγενών ligands, όπως το CN⁻ και το H₂O₂.⁵⁻⁷

Ωστόσο, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών ή τη σημασία τους για τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου. Έχει προταθεί ότι αυτές οι διαμορφώσεις διαφέρουν στη συναρμογή του διπυρηνικού κέντρου.

Οι μελέτες δέσμησης του αζιδίου στα οξειδωμένα κυτοχρώματα aa_3 και bo_3 , οι οποίες παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια 5 και 6, δείχνουν ότι υπάρχουν δύο ξεχωριστές αίμη Fe^{3+} - $N=N=N$ - Cu_B^{2+} διαμορφώσεις. Αυτές οι μελέτες είναι κατά κάποιο τρόπο σε διαφωνία με προηγούμενες μελέτες της δέσμησης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση των μιτοχονδρίων.

Στην εργασία που παρουσιάζεται εδώ, μελετάται η δέσμηση του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση και εξετάζεται η επίδραση του pH με φασματοσκοπία UV-Vis, FTIR και συντονισμού Raman. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών για τα βακτηριακά κυτοχρώματα aa_3 και bo_3 . Το αζίδιο δεσμεύεται ως ligand γέφυρας, σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, στο διπυρηνικό κέντρο. Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις $\nu_{as}(N_3)/\nu(Fe-N_3-Cu_B)$ δονήσεις στους $418\text{ cm}^{-1}/2041\text{ cm}^{-1}$, ενώ η δεύτερη παρουσιάζει τις ίδιες δονήσεις στους $418\text{ cm}^{-1}/2052\text{ cm}^{-1}$. Επιπλέον, τα FTIR αποτελέσματα προτείνουν ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων επηρεάζεται από το pH. Προτείνεται ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαμορφώσεων οφείλεται σε μία αλλαγή της πολικότητας της εγγύς περιοχής του διπυρηνικού κέντρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της θέσης του Cu_B .

7.2 Υλικά και μέθοδοι

Η κυτοχρωμική οξειδάση απομονώθηκε από καρδιά βοός σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3. Το ένζυμο διαλυτοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ανάλογα με το επιθυμητό pH κάθε φορά. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) 50 mM Bis-Tris, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 6.5 β) 50 mM Hepes, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4 και γ) 50 mM Tris-HCl, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 8.5.

Για τα UV-Vis πειράματα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 0.5 cm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 9.5 μM για κάθε pH που εξετάστηκε. Τα πειράματα τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν με τη σταδιακή προσθήκη 0.5 μl συγκεντρωμένων διαλυμάτων NaN_3 . Δέκα λεπτά μετά την προσθήκη του αζιδίου λαμβανόταν το φάσμα διαφοράς της απορρόφησης ως προς το αρχικό δείγμα του πλήρως

οξειδωμένου μη υποκατεστημένου ενζύμου. Τα δεδομένα καταγράφηκαν με ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο. Στα φάσματα που ελήφθησαν κατά την τιτλοδότηση έγινε διόρθωση της απορρόφησης λόγω της αραίωσης του δείγματος. Η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε από την κλίση της ευθείας του Scatchard διαγράμματος της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret λόγω της σταδιακής αύξησης της συγκέντρωσης του NaN_3 .

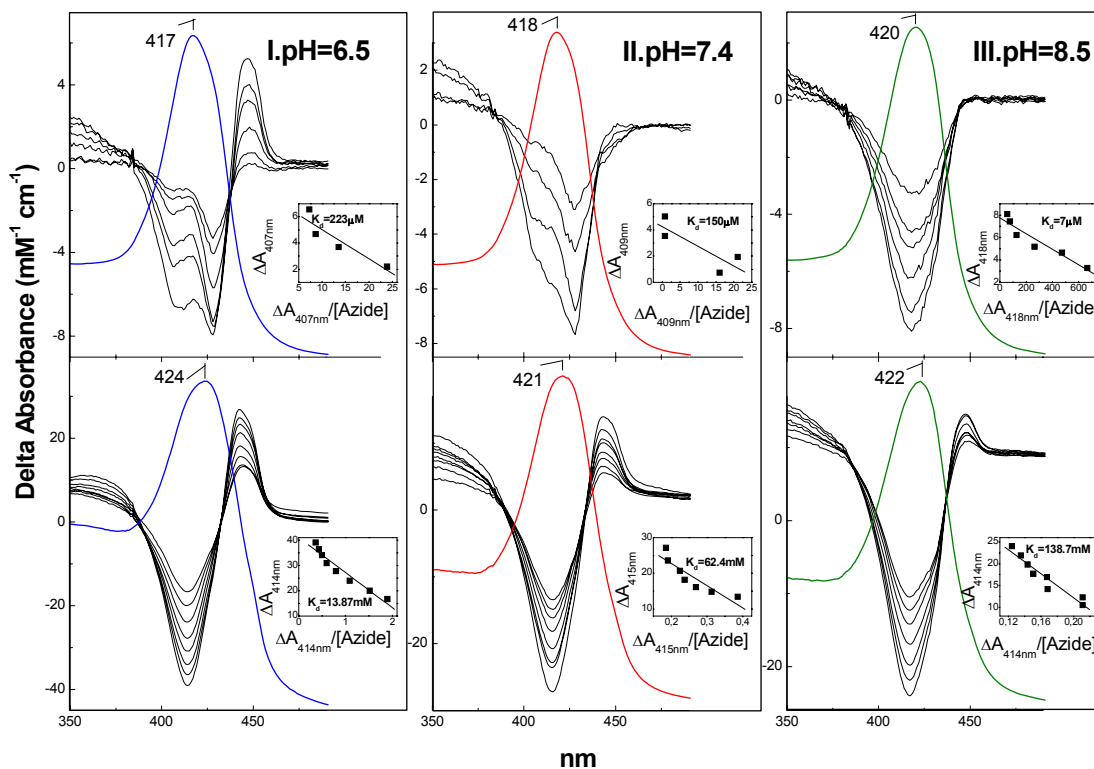
Για τα FTIR πειράματα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 350 μM , ενώ η συγκέντρωση του NaN_3 ήταν 350 μM , 1.75 mM και 14 mM, οπότε η στοιχειομετρία [πρωτεΐνη]:[NaN_3] ήταν 1:1 1:7 και 1:40, αντίστοιχα. Παρασκευάστηκαν επίσης, χωριστά για κάθε pH που εξετάστηκε, δείγματα αναφοράς του ελεύθερου ενζύμου συγκέντρωσης 350 μM και του ελεύθερου αζιδίου συγκέντρωσης ίδιας με εκείνης στα δείγματα πρωτεΐνης-αζιδίου. Τα φάσματα των παραπάνω δειγμάτων και των ρυθμιστικών διαλυμάτων ελήφθησαν μέσα σε IR κυψελίδα με CaF_2 παράθυρα και 52 μm spacer, σε ένα BRUKER 55 EQUINOX FTIR φασματοφωτόμετρο, εξοπλισμένο με MCT ανιχνευτή. Για κάθε δείγμα ελήφθησαν 2000 interferograms. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου ήταν 2 cm^{-1} . Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.2.

Για τα πειράματα συντονισμού Raman παρασκευάστηκαν δείγματα με συγκέντρωση πρωτεΐνης 40 μM και αζιδίου 1.5 mM. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία περιστρεφόμενη κυλινδρική κυψελίδα από χαλαζία και η θερμοκρασία των δειγμάτων διατηρήθηκε στους 3-5 $^\circ\text{C}$ με ένα ρεύμα κρύου αερίου αζώτου πάνω στα δείγματα σ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα φάσματα καταγράφηκαν με ένα SPEX 1877 triplemate εξοπλισμένο με ένα EG&G (μοντέλο 1530-CUV-1024S) CCD ανιχνευτή. Το μήκος κύματος διέγερσης 427 nm παράχθηκε μ' ένα Coherent 590 dye laser συνδεδεμένο μ' ένα Coherent Innova 200 Argon laser. Η ισχύς της δέσμης ήταν 8-10 mW.

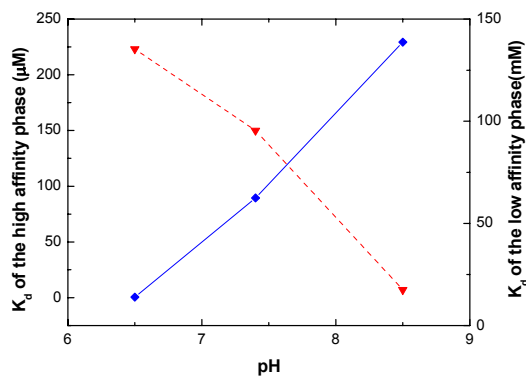
7.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 7.1 φαίνονται τα αποτελέσματα των UV-Vis πειραμάτων τιτλοδότησης της CcO με το αζίδιο σε pH 6.5, 7.4 και 8.5. Τα φάσματα διαφοράς ως προς το οξειδωμένο ένζυμο, τα οποία λαμβάνονται κατά τη σταδιακή προσθήκη του NaN₃, χαρακτηρίζονται από δύο σειρές αλλαγών στην απορρόφηση σε όλα τα pH που εξετάστηκαν. Αυτό προτείνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στην CcO πραγματοποιείται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στη Soret περιοχή. Οι τιμές των σταθερών διάστασης είναι 223 μM σε pH 6.5, 150 μM σε 7.4 και 7 μM σε 8.5 (σχήμα 7.1, ένθετα). Λόγω των μικρών αλλαγών που προκαλούνται στην απορρόφηση της Soret ταινίας και των χαμηλών σταθερών διάστασης, η φάση αυτή χαρακτηρίζεται ως φάση υψηλής συγγένειας. Η δεύτερη φάση παρατηρείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αζιδίου. Τα φάσματα διαφοράς εμφανίζουν μέγιστο γύρω στα 444 nm και ελάχιστο γύρω στα 414 nm. Αυτό σημαίνει ότι το μέγιστο της Soret ταινίας μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Στο pH 6.5 το λ_{max} μετατοπίζεται κατά 7 nm, ενώ στο pH 8.5 μετατοπίζεται μόνο κατά 2 nm. Η σταθερά διάστασης γι' αυτή την αντίδραση είναι 13.87 mM, 62.4 mM και 138.7 mM σε pH 6.5, 7.4 και 8.5, αντίστοιχα (σχήμα 7.1, ένθετα). Αυτή η αντίδραση αναφέρεται ως φάση χαμηλής συγγένειας.

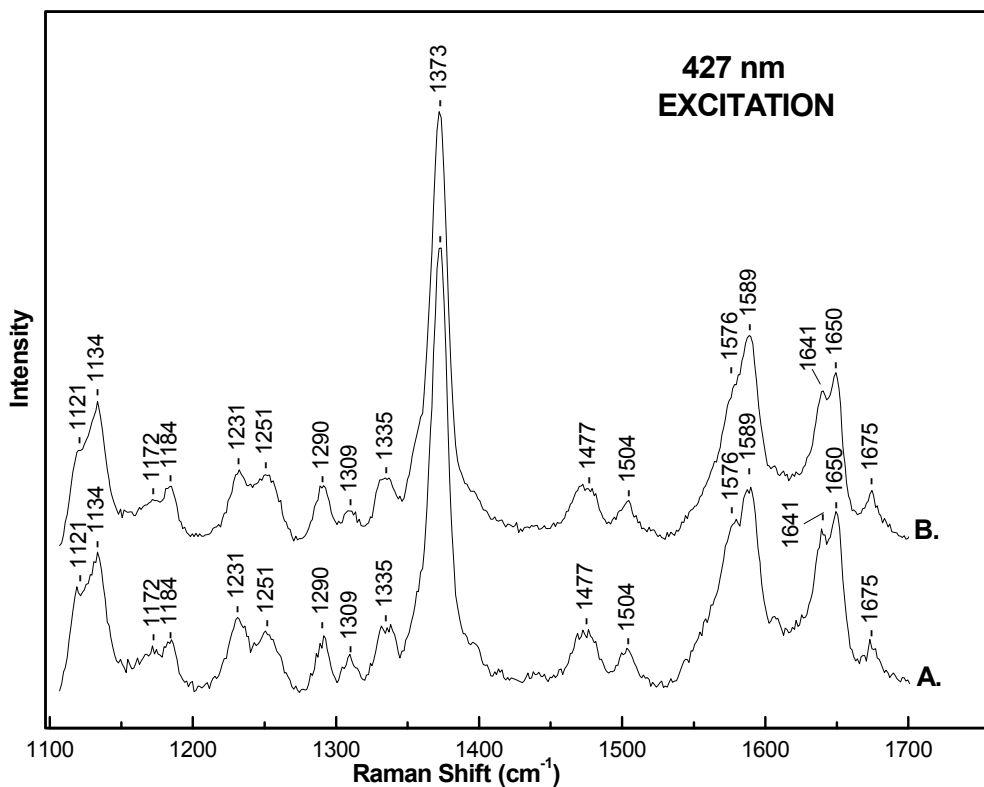
Η γραφική παράσταση των σταθερών διάστασης των δύο φάσεων ως προς το pH φαίνεται στο σχήμα 7.2. Στη φάση υψηλής συγγένειας, η σταθερά διάστασης μειώνεται γραμμικά με το pH. Αντίθετα, η σταθερά διάστασης για τη φάση χαμηλής συγγένειας αυξάνεται με το pH. Προηγούμενες UV-Vis μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στην CcO των μιτοχονδρίων επίσης δείχνουν εξάρτηση της K_d από το pH. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές αναφέρουν μόνο μία φάση δέσμευσης, η οποία αντιστοιχεί στη φάση υψηλής συγγένειας που παρατηρείται εδώ. Οι Wever et al.⁸ αναφέρουν ότι η σταθερά διάστασης αυξάνει με το pH και μετρούν μία σταθερά διάστασης 20 μM για το pH 7.2. Αντίθετα οι Vygodina et al.⁹ αναφέρουν μία μη γραμμική εξάρτηση της σταθεράς διάστασης απ' το pH, η οποία δίνει μέγιστη K_d=50 μM στο pH 7.5. Η ύπαρξη των δύο φάσεων αναφέρεται μόνο από τους Li et



Σχήμα 7.1 Τα απόλυτα οπτικά φάσματα απορρόφησης της οξειδωμένης CcO και N₃-υποκατεστημένης CcO και τα φάσματα διαφοράς της CcO-N₃ μείον το φάσμα της CcO κατά τη σταδιακή προσθήκη του αζιδίου σε (I) pH 6.5, (II) pH 7.4 και (III) pH 8.5. Στα ένθετα φαίνονται τα αντίστοιχα διαγράμματα Scatchard της μεταβολής της απορρόφησης στην περιοχή του Soret για τον υπολογισμό των K_d.



Σχήμα 7.2 Γραφική παράσταση της εξάρτησης της σταθεράς διάστασης από το pH (διακεκομένη γραμμή: φάση υψηλής συγγένειας, συνεχής γραμμή: φάση χαμηλής συγγένειας).



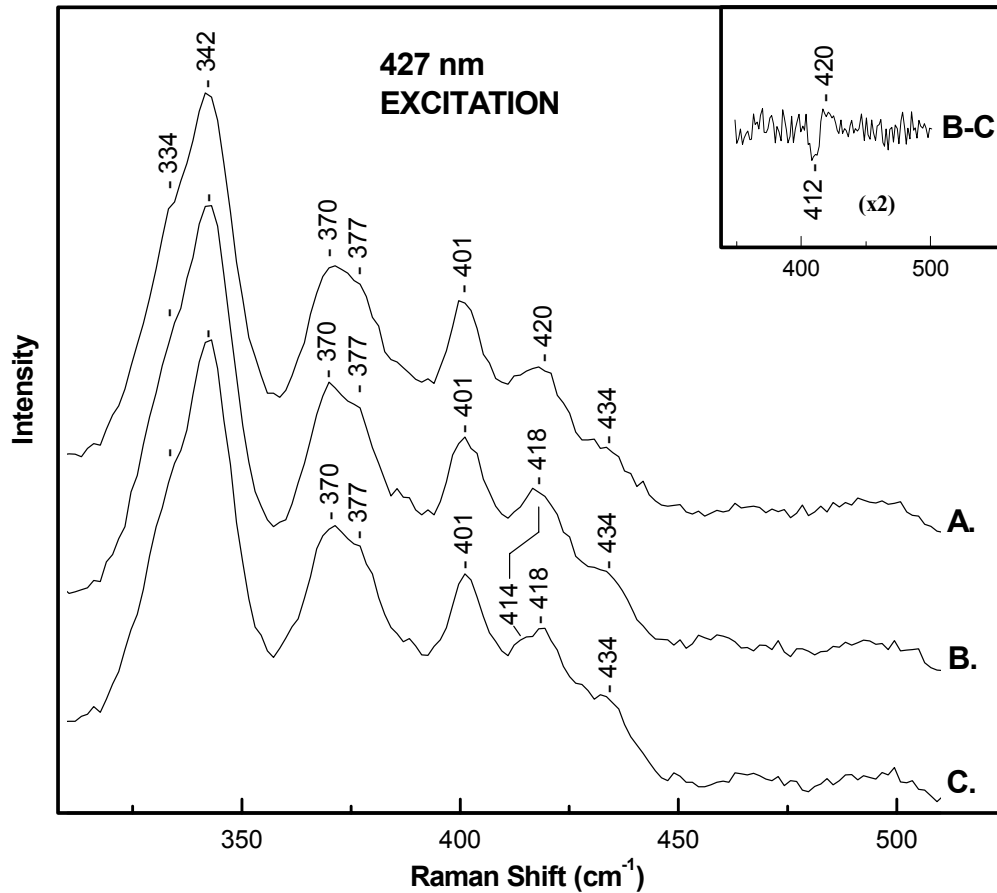
Σχήμα 7.3 Η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman: (A) της πλήρως οξειδωμένης CcO και (B) N₃-υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm.

al.¹⁰ Αυτοί οι ερευνητές πραγματοποίησαν UV-Vis πειράματα τιτλοδότησης στο pH 8.0 και παρατήρησαν δύο φάσεις δέσμευσης του αζιδίου στην CcO με σταθερές διάστασης 64 μM για τη φάση υψηλής συγγένειας και 21 mM για τη φάση χαμηλής συγγένειας.

Στο σχήμα 7.3 φαίνεται η περιοχή υψηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman της πλήρως οξειδωμένης CcO πριν (φάσμα A) και μετά την δέσμευση του αζιδίου (Na¹⁴N₃) στη φάση υψηλής συγγένειας (φάσμα B), σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm και είναι σε συντονισμό με την π-π* διέγερση της αίμης α. Σύγκριση των δύο φασμάτων δείχνει ότι η δέσμευση του αζιδίου στην CcO δε μεταβάλλει τη spin ή την οξειδωτική κατάσταση των ομάδων αίμης α και α₃. Η ν₄ δόνηση παρατηρείται στους 1373 cm⁻¹, συχνότητα η οποία είναι χαρακτηριστική για τη Fe³⁺ οξειδωτική κατάσταση και των δύο ομάδων αίμης.¹¹ Οι δονήσεις στους 1576 cm⁻¹(ν₂), 1477 cm⁻¹(ν₃) και 1641 cm⁻¹(ν₁₀)

δηλώνουν ότι η αίμη α_3 βρίσκεται στην υψηλού spin διαμόρφωση και συναρμόζεται με έξι υποκαταστάτες.¹¹ Οι δονήσεις στους $1504\text{ cm}^{-1}(\nu_3)$ και $1589\text{ cm}^{-1}(\nu_2)$ χαρακτηρίζουν την αίμη α .¹¹ Οι παρατηρούμενες συχνότητες δηλώνουν ότι η αίμη α έχει έξι υποκαταστάτες και βρίσκεται στην κατάσταση χαμηλού spin.

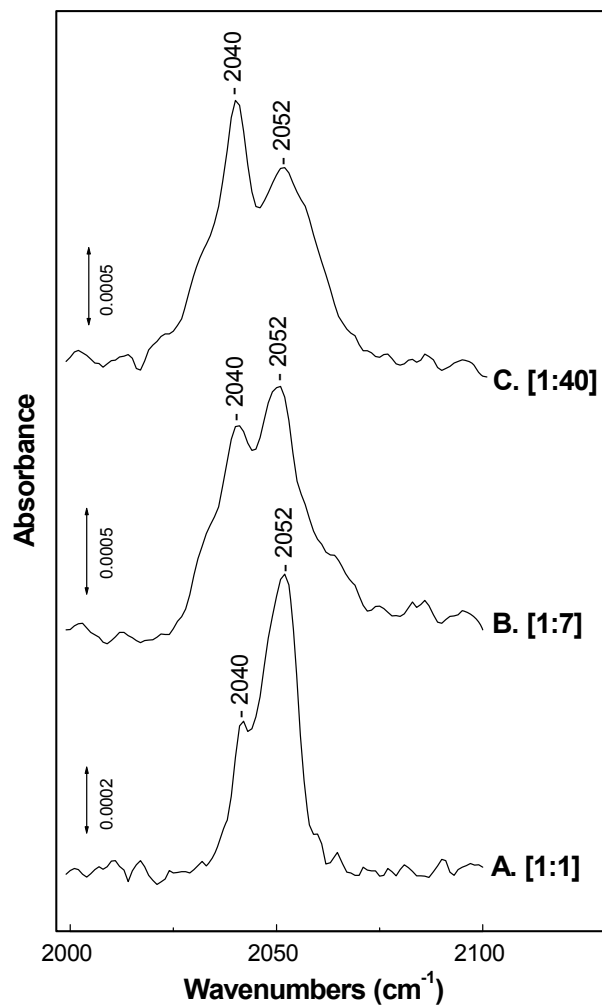
Στο σχήμα 7.4 παρουσιάζεται η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman της πλήρως οξειδωμένης CcO (φάσμα A) και των συμπλόκων που σχηματίζει με το $^{14}\text{N}_3$ (φάσμα B) και το $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ (φάσμα C) στο pH 7.4. Οι συγκεντρώσεις της CcO και των Na^{14}N_3 , $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ είναι ίδιες με εκείνες των



Σχήμα 7.4 Η περιοχή χαμηλών συχνοτήτων των φασμάτων συντονισμού Raman: (A) της πλήρως οξειδωμένης CcO, (B) $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένης CcO και της (C) $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ -υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4. Το μήκος κύματος διέγερσης είναι 427 nm.

πειραμάτων στην περιοχή των υψηλών συχνοτήτων. Το φάσμα του $^{14}\text{N}_3$ -παραγώγου εμφανίζει μία δόνηση στους 418 cm^{-1} , η οποία παρουσιάζει ισοτοπική ευαισθησία και μετατοπίζεται στους 414 cm^{-1} , όταν το πείραμα επαναλαμβάνεται με το $\text{Na}^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{14}\text{N}$. Το φάσμα διαφοράς των δύο συμπλόκων (σχήμα 7.4, ένθετο) παρουσιάζει μία θετική κορυφή στους 420 cm^{-1} και μία αρνητική στους 412 cm^{-1} , επιβεβαιώνοντας την παρουσία της 418 cm^{-1} δόνησης (κατά την αφαίρεση των απολύτων φασμάτων είναι αναμενόμενη μία μετατόπιση $1\text{-}2\text{ cm}^{-1}$ στις συχνότητες των δονήσεων στα φάσματα διαφοράς). Η δόνηση στους 418 cm^{-1} είναι παρόμοια με τις $\nu(\text{Fe-N}_3\text{-Cu}_B)$ δονήσεις των N_3 -υποκατεστημένων κυτοχρωμάτων a_3 από το *P. denitrificans* (417 cm^{-1}) και b_3 απ' το *E. coli* (419 cm^{-1}) και αντιστοίχως αποδίδεται στη $\nu(\text{Fe}_{a_3}\text{-N}_3\text{-Cu}_B)$ του CcO-N_3 συμπλόκου.

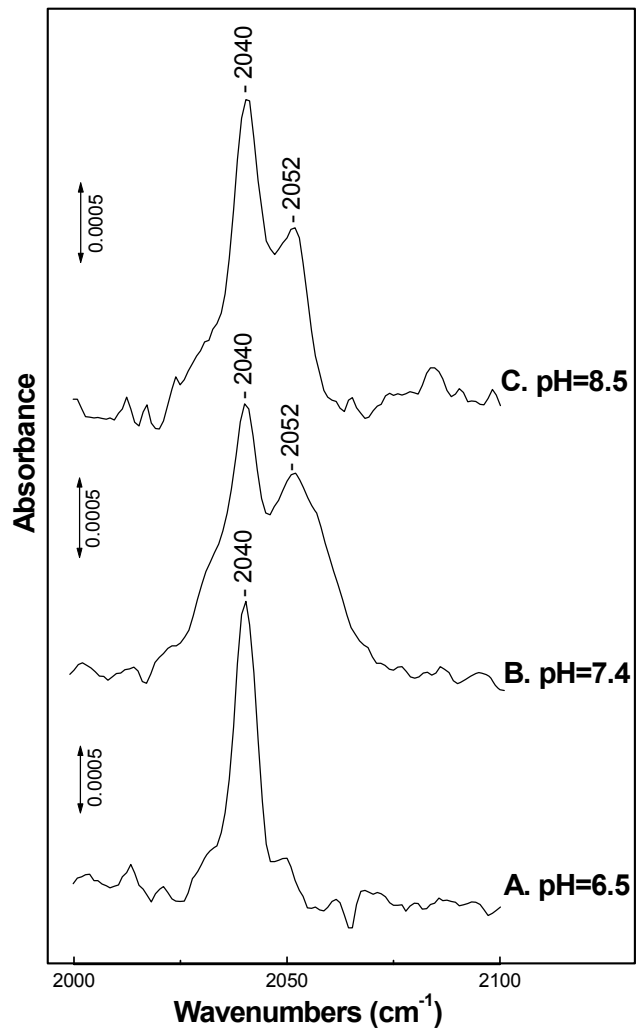
Στο σχήμα 7.5 παρουσιάζονται τα FTIR φάσματα της N_3 -υποκατεστημένης CcO τα οποία λαμβάνονται με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αζιδίου σε pH 7.4. Οι αναλογίες των συγκεντρώσεων $[\text{CcO}]:[\text{NaN}_3]$ αντιστοιχούν στη φάση υψηλής συγγένειας. Παρατηρούνται δύο δονήσεις, μία στους 2040 cm^{-1} και μία στους 2052 cm^{-1} , οι σχετικές εντάσεις των οποίων μεταβάλλονται με τη συγκέντρωση του αζιδίου. Σε αναλογία συγκεντρώσεων 1:1, η κύρια δόνηση είναι η 2052 cm^{-1} . Αύξηση της συγκέντρωσης του αζιδίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της 2040 cm^{-1} . Οι συχνότητες αυτών των δονήσεων είναι σε συμφωνία με προηγούμενες FTIR μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στην CcO , οι οποίες αναφέρουν δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ στους 2039 cm^{-1} και 2052 cm^{-1} .^{10,12,13} Ο χαρακτηρισμός αυτών των δονήσεων έχει γίνει αντικείμενο πολλών συζητήσεων και διαφωνιών. Οι Yoshikawa et al.¹² ερμηνεύοντας τα FTIR και UV-Vis αποτελέσματά τους αποδίδουν την 2052 cm^{-1} σε δέσμευση του αζιδίου σε μη μεταλλική θέση μέσα στην πρωτεΐνη και την 2039 cm^{-1} στο σχηματισμό ενός συμπλόκου $\text{Cu}_B\text{-N}_3$ τελικής διαμόρφωσης. Ο Tsubaki¹³ υποστηρίζει ότι οι δύο $\nu_{as}(\text{N}_3)$ αντιπροσωπεύουν δύο διαφορετικές διαμορφώσεις του αζιδίου στο διπυρηνικό κέντρο, στη μία (2052 cm^{-1}) σχηματίζει μία γέφυρα μεταξύ των δύο μετάλλων, ενώ στην άλλη (2039 cm^{-1}) δεσμεύεται ως τελικό ligand στην αίμη a_3 . Τέλος οι Li et al.,¹⁰ οι οποίοι αναφέρουν δύο φάσεις δέσμευσης του αζιδίου, προτείνουν ότι η 2052 cm^{-1} προκύπτει από ένα σύμπλοκο γέφυρας αίμη $a_3\text{-N}_3\text{-Cu}_B$ και βάσει των EPR και MCD αποτελεσμάτων τους προτείνουν ότι στη φάση χαμηλής συγγένειας το αζίδιο αντικαθιστά ένα αζονικό ligand ιστιδίνης της αίμης a , σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο το οποίο χαρακτηρίζεται από την 2039 cm^{-1} δόνηση.



Σχήμα 7.5 Τα FTIR φάσματα της $^{14}N_3$ -υποκατεστημένης CcO σε pH 7.4 και αναλογία συγκεντρώσεων $[CcO]:[NaN_3]$: (A) 1:1, (B) 1:7 και (C) 1:40.

Από τα φάσματα συντονισμού Raman δεν υπάρχουν ενδείξεις για αλλαγή της συναρμογής της αίμης α ή μεταβολή της spin κατάστασης της αίμης α_3 και επομένως δεν είναι πιθανή η δέσμευση του αζιδίου ως τελικό ligand στην αίμη α ή την α_3 . Το συμπέρασμα αυτό είναι σε συμφωνία και με την κρυσταλλική δομή της CcO-N₃,^{4b} η οποία δείχνει ότι η αίμη α διατηρεί τα δύο αξονικά ligands ιστιδίνης και μετά τη δέσμευση του αζιδίου. Η κρυσταλλική δομή του CcO-N₃ συμπλόκου δείχνει επίσης ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δύο ιόντων του διπυρηνικού κέντρου, η οποία έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει μία μ -1,3 γέφυρα αζιδίου μεταξύ του σιδήρου και του χαλκού. Οι συχνότητες των δύο $\nu_{as}(N_3)$, που παρατηρούνται στο FTIR φάσμα του CcO-N₃ συμπλόκου, είναι παρόμοιες με τις συχνότητες $\nu_{as}(N_3)$ των α_3 -N₃-Cu_B συμπλόκων του κυτοχρώματος α_3 από το *P. denitrificans* βακτήριο (Πίνακας 7.1) και κατά συνέπεια αποδίδονται στο σχηματισμό α_3 -N₃-Cu_B συμπλόκων της CcO των μιτοχονδρίων. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι, όπως συμβαίνει στα κυτοχρώματα α_3 από το *P. denitrificans* και $\beta\alpha_3$ από το *E. coli*, το ιόν του αζιδίου δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις στο ένζυμο των μιτοχονδρίων σχηματίζοντας σε κάθε μία σύμπλοκο γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο. Η πρώτη διαμόρφωση χαρακτηρίζεται από τις 418 cm⁻¹ και 2040 cm⁻¹ δονήσεις, ενώ η δεύτερη από τις 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹.

Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού των χαρακτηριστικών που ευθύνονται για την ύπαρξη των δύο Fe-N₃-Cu_B διαμορφώσεων, εξετάστηκε επίσης με FTIR φασματοσκοπία η επίδραση του pH στη δέσμευση του αζιδίου στην CcO (σχήμα 7.6). Η αναλογία των συγκεντρώσεων της CcO του NaN₃ είναι 1:40 σε όλα τα φάσματα (φάση υψηλής συγγένειας). Σε pH 6.5 παρατηρείται μόνο η 2040 cm⁻¹ δόνηση, ενώ σε pH 7.4 και 8.5 παρατηρούνται και οι δύο δονήσεις. Αυτό σημαίνει ότι σε pH 6.5 το σύμπλοκο CcO-N₃ είναι αποκλειστικά στην 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ διαμόρφωση, αντίθετα στα υψηλότερα pH υπάρχει και στις δύο διαμορφώσεις. Φαίνεται, λοιπόν, ότι φαινόμενα πρωτονώσης/αποπρωτονώσης ομάδων με pKa κοντά σ' αυτές τις τιμές pH επηρεάζουν, άμεσα ή έμμεσα, τη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου. Προτείνεται ότι η μεγάλη διαφορά στη συχνότητα μεταξύ των δύο $\nu_{as}(N_3)$ αντανακλά μία αλλαγή στην πολικότητα του περιβάλλοντος γύρω απ' τη θέση δέσμευσης, χωρίς να αποκλείεται η περίπτωση η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο διαμορφώσεων να είναι το αποτέλεσμα μίας ευρύτερης αλλαγής στη διαμόρφωση του ενζύμου.



Σχήμα 7.6 Τα FTIR φάσματα της $^{14}\text{N}_3$ -υποκατεστημένης CcO σε (A) pH 6.5, (B) pH 7.4 και (C) pH 8.4. Η αναλογία των συγκεντρώσεων $[\text{CcO}]:[\text{NaN}_3]$ είναι 1:40 σ' όλα τα pH (φάση υψηλής συγγένειας).

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των UV-Vis και FTIR πειραμάτων που αναφέρονται παραπάνω επιτρέπει τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των CcO-N₃ συμπλόκων και οδηγεί σε γενικότερα συμπεράσματα όσον αφορά τις ιδιότητες των δύο διαμορφώσεων, τις οποίες μπορεί να υιοθετήσει το διπυρηνικό κέντρο. Τα UV-Vis πειράματα δείχνουν ότι η σταθερά διάστασης για τη φάση υψηλής συγγένειας στο pH 6.5 είναι 223 μM. Από τα FTIR πειράματα προκύπτει ότι σ' αυτές τις συνθήκες σχηματίζεται αποκλειστικά το 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ σύμπλοκο και επομένως η σταθερά διάστασης αυτού του συμπλόκου είναι 223 μM. Σε υψηλότερα pH, όμως, στη φάση υψηλής συγγένειας σχηματίζονται και τα δύο CcO-N₃ σύμπλοκα και οι σταθερές διάστασης είναι χαμηλότερες. Συνεπώς, η σταθερά διάστασης του 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹ συμπλόκου είναι αρκετά μικρότερη απ' τη K_d=223 μM του 418 cm⁻¹/2040 cm⁻¹ παραγώγου. Από τα παραπάνω προκύπτει, επίσης, ότι η τιμή της K_d για τη φάση υψηλής συγγένειας εξαρτάται από τη θέση ισορροπίας μεταξύ των δύο διαμορφώσεων. Έτσι, η πολύ μικρή σταθερά διάστασης για το pH 8.5 - συγκρινόμενη με τη σταθερά διάστασης στο pH 6.5 - προτείνει ότι στο pH 8.5 η ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων μετατοπίζεται προς εκείνη την κατεύθυνση, στην οποία σχηματίζεται το 418 cm⁻¹/2052 cm⁻¹ σύμπλοκο.

Οι συχνότητες των δονήσεων που παρατηρούνται κατά τη δέσμευση του αζιδίου στις τελικές οξειδάσες, όπως επίσης η σχέση μεταξύ αυτών, μπορούν να οδηγήσουν στο χαρακτηρισμό των γνωρισμάτων που καθορίζουν τη διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου και κατ' επέκταση να βοηθήσουν στον προσδιορισμό των κοινών και των ιδιαίτερων γνωρισμάτων, τα οποία μπορεί να είναι σημαντικά για τη λειτουργία του ενζύμου. Στον πίνακα 7.1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των φασματοσκοπικών μελετών της δέσμευσης του αζιδίου στα κυτόχρωμα aa₃ από το *P. denitrificans* και bo₃ από το *E. coli* και την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια. Σύγκριση των δονήσεων αυτών δείχνει ότι υπάρχουν πολύ μικρές διαφορές στη συχνότητα των ν(Fe-N₃-Cu_B) δονήσεων τάσης. Μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται στις συχνότητες των ν_{as}(N₃) δονήσεων, κυρίως εκείνων που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες ενέργειες. Αυτές οι διαφορές αντανακλούν διαφοροποιήσεις στο μικροπεριβάλλον γύρω από το διπυρηνικό κέντρο. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση του δεσμευμένου αζιδίου καθορίζεται από τις ιδιότητες της εγγύς περιοχής σε μεγαλύτερο βαθμό απ' τις ιδιότητες της proximal

ιστιδίνης. Ωστόσο, παρά τις φαινομενικές διαφορές μεταξύ των τριών οξειδασών, όπως η προέλευση, η σύνθεση των υπομονάδων/ομάδων αίμης, αυτά τα ένζυμα μπορούν να υπάρξουν σε δύο διαμορφώσεις στην πλήρως οξειδωμένη μορφή τους, οι οποίες προτιμούν να σχηματίζουν σύμπλοκα γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο με εξωγενή ligands, όπως το N_3^- .

Πίνακας 7.1. Οι συχνότητες (cm^{-1}) των $\nu(Fe-N_3-Cu_B)$ και $\nu_{as}(N_3)$ δονήσεων για μερικές κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες

Ένζυμα	$\nu(Fe-N_3-Cu_B)$	$\nu_{as}(N_3)$
κυτοχρωμική οξειδάση (μιτοχόνδρια)	418	2052/2041
κυτόχρωμα aa_3 (<i>P.denitrificans</i>)	417	2056/2037
κυτόχρωμα bo_3 (<i>E.coli</i>)	419	2061/2040

Η τιμή της $\nu_{as}(N_3)$ για τα N_3 -σύμπλοκα μετάλλων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η τάξη των δεσμών μέταλλο-N και N=N, η ισχύς των δύο δεσμών N=N και οι γωνίες που αυτοί σχηματίζουν με τα μέταλλα. Αύξηση της τάξης δεσμού μέταλλο-N και μείωση της τάξης των δεσμών N=N έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της $\nu_{as}(N_3)$.¹⁴ Επίσης, φασματοσκοπικές μελέτες N_3 -συμπλόκων προτείνουν ότι μία μεγάλη διαφορά στα μήκη των δύο δεσμών N=N, οδηγεί σε υψηλές συχνότητες της $\nu_{as}(N_3)$.¹⁵ Το ιόν του N_3 θεωρείται ευθύγραμμο και συμμετρικό με μήκος δεσμού N=N 1.15 Å κατά μέσο όρο.¹⁶ Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή του CcO- N_3 ενζύμου τα μήκη των δεσμών Fe_{a_3} - N_3 και Cu_B - N_3 είναι 1.97 και 1.9 Å, αντίστοιχα.^{4b} Επομένως, μία ευθύγραμμη διευθέτηση της μονάδας $Fe_{a_3}^{3+}$ -N=N=N- Cu_B^{2+} απαιτεί απόσταση Fe_{a_3} - Cu_B περίπου 6.2 Å. Όμως οι κρυσταλλικές δομές της μη υποκατεστημένης CcO και του CcO- N_3 συμπλόκου δείχνουν ότι τα ιόντα του $Fe_{a_3}^{3+}$ και του Cu_B^{2+} απέχουν μεταξύ τους 4.9 και 5.3 Å, αντίστοιχα.⁴ Αυτό σημαίνει ότι η δέσμευση του N_3 στο διπυρηνικό κέντρο προκαλεί τη μετατόπιση του Cu_B , ενώ το σύμπλοκο $Fe_{a_3}^{3+}$ -N=N=N- Cu_B^{2+} αποκλίνει σημαντικά από την

ευθύγραμμη διευθέτηση, με αποτέλεσμα οι γωνίες των δεσμών $\text{Fe}_{\text{a}_3}\text{-N=N}$ και $\text{Cu}_{\text{B}}\text{-N=N}$ να είναι αρκετά μικρότερες από 180° . Για το χαμηλού spin σύμπλοκο αίμη Fe-N_3 της Mb, το οποίο χαρακτηρίζεται από τις $\nu(\text{Fe-N}_3)=411\text{cm}^{-1}$ και $\nu(\text{N}_3)=2023\text{cm}^{-1}$, έχει βρεθεί ότι η γωνία Fe-N=N είναι $111^\circ\text{-}112^\circ$.¹⁷ Τα παραπάνω προτείνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση της $\text{Fe}^{3+}\text{-N=N=N-Cu}_{\text{B}}^{2+}$ μονάδας εξαρτάται από τη θέση του Cu_{B} . Επομένως οι δύο διαμορφώσεις $\text{Fe}^{3+}\text{-N=N=N-Cu}_{\text{B}}^{2+}$ που παρατηρούνται είναι πιθανό να διαφέρουν στην απόσταση Fe-Cu_{B} . Η αιτία της αλλαγής της θέσης του Cu_{B} και της απόστασης Fe-Cu_{B} μπορεί να οφείλεται σε μία μεταβολή της πολικότητας στην εγγύς περιοχή, όπως προτείνουν τα FTIR πειράματα για την εξάρτηση απ' το pH (σχήμα 7.6).

Οι φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης του αζιδίου στα κυτοχρώματα aa_3 από το *P. denitrificans* και bo_3 από το *E. coli* και την CcO από τα μιτοχόνδρια δείχνουν την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου στις N_3 -υποκατεστημένες μορφές των τριών τελικών οξειδωσών που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τα UV-Vis και FTIR δεδομένα για την CcO δείχνουν ότι, η ισορροπία μεταξύ των δύο καταστάσεων των πλήρως οξειδωμένων ενζύμων επηρεάζεται από την αλλαγή του pH. FTIR και Raman μελέτες της δέσμευσης του CO στις κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες, πιστοποιούν την ύπαρξη δύο διαμορφώσεων του διπυρηνικού κέντρου, της α και της β μορφής, για τα πλήρως ανηγμένα ένζυμα.¹⁸ Έχει προταθεί ότι η ύπαρξη των α και β μορφών είναι αποτέλεσμα μεταβολών που συμβαίνουν στην εγγύς περιοχή, όπως η αλλαγή της θέσης του Cu_{B} . Πρόσφατα, διαπιστώθηκε ότι η ισορροπία μεταξύ των δύο μορφών εξαρτάται από το pH. Πιο συγκεκριμένα, οι Mitchel et al.¹⁹ πραγματοποιώντας FTIR πειράματα φωτόλυση/επανασύνδεσης του CO στο πλήρως ανηγμένο κυτόχρωμα aa_3 από το *R. sphaeroides* βακτήριο σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρατήρησαν ότι οι σχετικές εντάσεις των $\nu(\text{C-O})$ δονήσεων για τα $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ και $\text{Cu}_{\text{B}}^{1+}\text{-CO}$ σύμπλοκα των α/β μορφών, μεταβάλλονται κατά τον ίδιο τρόπο με την αλλαγή του pH. Αυτό σημαίνει ότι οι μεταβολές που προκαλεί η αλλαγή του pH επηρεάζουν τη συναρμογή τόσο στο Fe_{a_3} όσο και το Cu_{B} . Σε υψηλά pH (pH 9.0), η οξειδάση βρίσκεται κυρίως στην α μορφή, ενώ σε χαμηλότερα pH (pH 6.0) η κύρια μορφή είναι η β . Απ' τα πειράματα αυτά προσδιορίστηκε ότι το pK_a για την αλληλομετατροπή των α και β μορφών είναι 7.3. Είναι ενδιαφέρον ότι δύο διαφορετικές, εξαρτώμενες από το pH, διαμορφώσεις έχουν επίσης αναφερθεί για το φέρυλο ενδιάμεσο, το οποίο σχηματίζεται κατά την αντίδραση της CcO με το H_2O_2 και το O_2 .²⁰⁻²³ Οι καταστάσεις αυτές χαρακτηρίζονται από διαφορετικά οπτικά φάσματα και διαφορετικές $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$. Η πρώτη διαμόρφωση παρουσιάζει την α -ταινία απορρόφησης στα

607 nm και την $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$ στους 804 cm^{-1} . Η δεύτερη διαμόρφωση δίνει την α -ταινία απορρόφησης στα 580 nm και τη $\nu(\text{Fe}^{4+}=\text{O})$ στους 786 cm^{-1} . Δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα οι διαφορές στη δομή μεταξύ των δύο καταστάσεων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διαφορά στη θέση της α -ταινίας απορρόφησης. Η ύπαρξη διαφορετικών σταθερών διαμορφώσεων σε άλλες υποκατεστημένες μορφές, προτείνει ότι οι δύο καταστάσεις του φέρυλο ενδιαμέσου είναι πιθανό να προκύπτουν από μία αλλαγή της διαμόρφωσης του διπυρηνικού κέντρου.

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία αναφέρει για πρώτη φορά μία εξαρτώμενη από το pH μεταβολή της διαμόρφωσης στην οξειδωμένη N_3 -υποκατεστημένη κυτοχρωμική οξειδάση. Τα FTIR αποτελέσματα προτείνουν ότι οι 2040 cm^{-1} / 2052 cm^{-1} διαμορφώσεις σχετίζονται με μία αλλαγή της πολικότητας στην εγγύς περιοχή. Η σύγκριση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων της δέσμησης του αζιδίου στην κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια και *P. denitrificans* και το κυτόχρωμα bo_3 από το *E. coli* δείχνει ότι το διπυρηνικό κέντρο στα τρία ένζυμα είναι παρόμοιο αλλά όχι απόλυτα ίδιο. Προτείνεται ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στις $\nu_{as}(\text{N}_3)$ αντανακλούν διαφορές στην απόσταση σιδήρου-χαλκού.

Βιβλιογραφία

24. Babcock, G. T.; Wikstrom, M. *Nature* **1992**, *356*, 301-309.
25. Garia-Horsman, A. J.; Barquera, B.; Rumbley, J.; Ma, J.; Gennis, R. *J. Bacteriology* **1994**, *176*, 5587-5600.
26. Anraku, Y.; Gennis, R. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 262-266.
27. a) Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. *Science* **1995**, *269*, 1069-1074. b) Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libue, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.
28. Baker, G. M.; Palmer, G. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3038-2044.
29. Moody, A. J.; Cooper, C. E.; Rich, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1059*, 189-207.
30. Baker, G. M.; Noguchi, M.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 595-604.
31. Wever, R.; Muijsers, A. O.; Van Gelder, B. F.; Bakker, E. P.; Van Buuren, K. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *325*, 1-7.
32. Vygodina, T. V.; Konstantinov, A. A. *Biol. Membr.* **1985**, *2*, 861-869.
33. Li, W.; Palmer, G. *Biochemistry* **1993**, *322*, 1833-1843.
34. Babcock, G. T. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G., Ed.; Wiley: New York, 1988; Vol.3, p.293.

35. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9757-9766.
36. Tsubaki, M. *Biochemistry* **1993**, *32*, 174-182.
37. Alben, J. O.; Fager, L. Y. *Biochemistry* **1972**, *11*, 842-847.
38. Argell, J. *Acta Chem. Scand.* **1971**, 2964-2974.
39. Dori, Z.; Ziola, R. F. *Chem. Rev.* **1973**, *73*, 247-254.
40. a) Tsubaki, M.; Srivastava, R. B.; Yu, N.-T. *Biochemistry* **1979**, *18*, 946-952. b) Bogumil, R.; Hunter, C. L.; Maurus, R.; Tang, H-L.; Lee, H.; Lloyd, E.; Brayer, G. D.; Smith, M.; Mauk, A. G. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7600-7608. c) Stryer, L.; Kendrew, J. G.; Watson, H. C. *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 96-104.
41. a) Alben, J. O.; Moh, P. P.; Fiamingo, F. G.; Atschul, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 234-237. b) Fiamingo, F. G.; Altschuld, R. A.; Moh, P. P.; Alben, J. O.; *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1639-1650. c) Wang, J.; Takahashi, S.; Hosler, J. P.; Mitchell, D. M.; Ferguson-Miller, S.; Gennis, R. B.; Rousseau, D. L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9818-9825. d) Wang, J.; Gray, K. A.; Daldal, F.; Rousseau, D. L. *J. Am Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9363-9364. e) Uno, T.; Mogi, T.; Tsubaki, M.; Nishimura, Y.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 11912-11920.
42. Mitchell, D. M.; Spapleigh, J.P.; Archer, A. M.; Alben, J. O.; Gennis, R. B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 9446-9450.
43. Weng, L. C.; Baker, G. M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5727-5733.
44. Proshlyakov, D.A.; Ogura, T.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Appleman, E. H.; Kitagawa, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29385-29388.
45. Han, S.; Takahashi, S.; Rousseau, D. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1910-1919.
46. Proshlyakov, D.A.; Pressler, M. A; Babcock, G.T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1998**, *95*, 8020-8025.

FTIR ΚΑΙ UV-VIS ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΝΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΑΝΙΟΥ ΣΤΟ ΔΙΠΥΡΗΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΙΔΑΣΩΝ

8.1 Εισαγωγή

Το CN^- έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως ένα εναλλακτικό ligand για τη διερεύνηση των ιδιοτήτων της ενεργής θέσης πολλών αιμοπρωτεϊνών. Οι μελέτες αυτές έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για το μικροπεριβάλλον στην εγγύς περιοχή γύρω από τη θέση δέσμευσης αλλά και το χαρακτήρα και την επίδραση στη θέση δέσμευσης του ligand σε θέση trans ως προς το δεσμευμένο κυάνιο. Το CN^- , όπως και το CO, δεσμεύεται ευθύγραμμα και κάθετα στο επίπεδο της αίμης σε «μη παρεμποδισμένα» μοντέλα αίμης.¹ Ωστόσο, στις αιμοπρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα αποκλίνει σημαντικά απ' αυτή την επιθυμητή διαμόρφωση υιοθετώντας μία κεκλιμένη² ή/και κεκαμένη διαμόρφωση.³ Αυτή η απόκλιση από την ευθύγραμμη και κατακόρυφη διεύθυνση αποδίδεται στην ύπαρξη στεreoχημικών παρεμποδίσεων από κατάλοιπα αμινοξέων στο μικροπεριβάλλον γύρω από τη θέση δέσμευσης^{2,4} ή/και το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου του κυανίου και γειτονικών αμινοξέων.^{3,4} Επίσης, από μελέτες συντονισμού Raman και IR CN-συμπλόκων μοντέλων αίμης προκύπτει ότι η ισχύς των δεσμών Fe-C και $\text{C}\equiv\text{N}$ επηρεάζεται από τη βασικότητα του ligand σε θέση trans ως προς το CN.^{5,6} Έχει παρατηρηθεί ότι όσο πιο ασθενής βάση είναι αυτό το ligand, τόσο πιο ασθενείς είναι οι δεσμοί Fe-C και $\text{C}\equiv\text{N}$. Η ύπαρξη αυτής της σχέσης έχει αποδοθεί στο σχηματισμό των σ και π δεσμών των δύο αζονικών ligands με το σίδηρο.⁵

Η δέσμευση του κυανίου στις πλήρως οξειδωμένες αιμοχαλκοοξειδάσες έχει ως αποτέλεσμα τη μετάβαση της υψηλού spin αίμης του διπυρηνικού κέντρου στην κατάσταση χαμηλού spin και κατά συνέπεια τη μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας προς μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτή η μεταβολή των οπτικών και μαγνητικών ιδιοτήτων έδωσε το έναυσμα για την εκτενή μελέτη της δέσμευσης του κυανίου στις κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες. Έτσι, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση

φασματοσκοπίας UV-Vis, EPR και MCD.⁷⁻¹⁵ Υπάρχει, όμως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το χαρακτηρισμό της δέσμευσης με FTIR φασματοσκοπία, επειδή η $\nu(\text{CN})$ δόνηση είναι ορατή στο IR, στην περιοχή $2000\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$ και μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες για τη γεωμετρία του δεσμευμένου κυανίου και τις ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος της θέσης δέσμευσης. Παρά το γεγονός ότι φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες CN-συμπλόκων πρότυπων ενώσεων δείχνουν ότι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου γέφυρας Fe-CN-Cu είναι πιθανός,¹⁶⁻¹⁹ η ύπαρξη ενός τέτοιου συμπλόκου στις κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες δεν έχει αποδειχθεί. Η δέσμευση του CN⁻ στην πλήρως οξειδωμένη CcO των μιτοχονδρίων χαρακτηρίζεται από την $\nu(\text{CN})=2152\text{ cm}^{-1}$.²⁰⁻²⁴ Μερική αναγωγή του συμπλόκου αυτού οδηγεί στην εμφάνιση δύο νέων δονήσεων, μία στους 2132 cm^{-1} και μία στους 2093 cm^{-1} .^{20,21,24} Η δέσμευση του κυανίου στο πλήρως οξειδωμένο κινολικό κυτόχρωμα *bo₃* από το *E. coli* δίνει μία δόνηση στους 2146 cm^{-1} .^{13,14} Η πρώτη FTIR μελέτη της δέσμευσης του κυανίου στην κυτοχρωμική οξειδάση πραγματοποιήθηκε από τους Yoshikawa και Caughey,²⁰ οι οποίοι υποστήριζαν ότι οι 2152 cm^{-1} , 2132 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} δονήσεις οφείλονται στο σχηματισμό των $\text{Cu}_B^{2+}\text{-CN}$, $\text{Fe}_{a_3}^{3+}\text{-CN}$ και $\text{Cu}_B^{1+}\text{-CN}$ συμπλόκων, αντίστοιχα. Οι Li et al.²³ διαφώνησαν μ' αυτόν τον χαρακτηρισμό και πρότειναν ότι η 2152 cm^{-1} δόνηση οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου γέφυρας $\text{Fe}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$. Ο Tsubaki²⁴ επίσης υποστήριξε το σχηματισμό ενός συμπλόκου γέφυρας. Επιπλέον, θεωρώντας ότι περισσότερα από ένα ιόντα κυανίου μπορούν να δεσμεύονται ταυτόχρονα στη μερικώς ανηγμένη CcO, πρότεινε το σχηματισμό ενός συμπλόκου CcO-CN της μορφής $\text{Fe}_{a_3}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{1+}\text{-CN}$, αποδίδοντας τη δόνηση στους 2132 cm^{-1} σε δέσμευση του κυανίου στο σίδηρο και τη 2093 cm^{-1} δόνηση σε δέσμευση στο χαλκό.²⁴ Σε μία μεταγενέστερη μελέτη, οι Yoshikawa et al.²¹ υποστήριξαν ότι οι εντάσεις των τριών δονήσεων είναι αρκετά υψηλές για να οφείλονται στο σχηματισμό συμπλόκων γέφυρας. Οι ερευνητές αυτοί πρότειναν, και στις τρεις περιπτώσεις, δέσμευση του κυανίου στην οξειδωμένη αίμη *a₃* και το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου του κυανίου και ενός ligand του Cu_B , ο οποίος βρίσκεται στην +2 οξειδωτική κατάσταση στο 2152 cm^{-1} σύμπλοκο και στην +1 κατάσταση στα 2132 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} σύμπλοκα. Τέλος, οι Tsubaki et al.¹⁴ πρότειναν το σχηματισμό ενός συμπλόκου $\text{Fe}_{o_3}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$ [$\nu(\text{CN})=2146\text{ cm}^{-1}$] κατά την αντίδραση του κυανίου με το οξειδωμένο κυτόχρωμα *bo₃*.

Λόγω της υπάρχουσας διαφωνίας ως προς το χαρακτηρισμό της δέσμευσης του κυανίου στην CcO των μιτοχονδρίων αλλά και σε μία προσπάθεια προσδιορισμού των

ιδιοτήτων των τελικών οξειδασών που αφορούν τη δέσμευση εξωγενών ligands, επανεξετάστηκε με UV-Vis και FTIR φασματοσκοπία η αλληλεπίδραση του CN⁻ με την πλήρως οξειδωμένη CcO μιτοχονδρίων σε δύο διαφορετικά pH, 7.4 και 8.4. Για την ύπαρξη μίας ολοκληρωμένης συγκριτικής μελέτης των ιδιοτήτων των τελικών οξειδασών, μελετήθηκε επίσης η αλληλεπίδραση του κυανίου με τα κινολικά κυτόχρωματα *aa*₃-600 από *B. subtilis* βακτήριο και *bo*₃ από το *E. coli*. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μελετών της δέσμευσης του κυανίου σε πρότυπες ενώσεις υποστηρίζουν δέσμευση του κυανίου ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο των οξειδωμένων ενζύμων. Αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στην περίπτωση του N₃⁻, κατά τη δέσμευση του κυανίου σχηματίζεται ένα μόνο σύμπλοκο γέφυρας, το οποίο χαρακτηρίζεται από τη ν(CN) δόνηση στους 2152, 2148 και 2146 cm⁻¹ στην περίπτωση της CcO, του *aa*₃-600 και του *bo*₃, αντίστοιχα. Επίσης, κατά την αντίδραση με το κυάνιο στο pH 8.4, η CcO υφίσταται μερική αναγωγή. Στο FTIR φάσμα της αντίδρασης παρατηρούνται δύο επιπλέον δονήσεις, μία στους 2129 cm⁻¹ και μία στους 2093 cm⁻¹. Αιτιολογείται ότι δύο αυτές δονήσεις οφείλονται σε δέσμευση του κυανίου σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της μερικώς ανηγμένης CcO σχηματίζοντας, και στις δύο περιπτώσεις σύμπλοκα τελικής γεωμετρίας, της μορφής Fe_{a3}³⁺-CN Cu_B¹⁺.

8.2 Υλικά και μέθοδοι

Η CcO απομονώθηκε από καρδιά βοός σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3. Τα κυτοχρώματα *aa*₃-600 και *bo*₃ απομονώθηκαν αντίστοιχα από τα *B. subtilis* και *E.coli* βακτήρια σύμφωνα με τα δημοσιευμένα πρωτόκολλα καθαρισμού.^{25,26}

Ως μέσο διάλυσης χρησιμοποιήθηκαν τα ρυθμιστικά διαλύματα: α) 50 mM HEPES, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 7.4 και β) 50 mM Tris-HCl, 0.3% w/v lauryl maltoside, pH 8.4. Τα CN-σύμπλοκα των ενζύμων παρασκευάστηκαν ως εξής: α) CcO-CN: 30 μl διαλύματος CcO συγκέντρωσης 450 μM + 2.1 μl διαλύματος KCN συγκέντρωσης 90 mM (ή ισοτοπικών αναλόγων), β) *aa*₃-600-CN: 30 μl διαλύματος *aa*₃-600 συγκέντρωσης 300 μM + 2.1 μl διαλύματος KCN συγκέντρωσης 90 mM (ή ισοτοπικών αναλόγων) και γ) *bo*₃-CN: 30 μl διαλύματος *bo*₃ συγκέντρωσης 280 μM + 2.1 μl διαλύματος KCN συγκέντρωσης 90 mM (ή ισοτοπικών αναλόγων). Η αναλογία των συγκεντρώσεων [ένζυμο]:[KCN] είναι 1:14 για την CcO, 1:21 για το *aa*₃-600 και 1:22.5 για

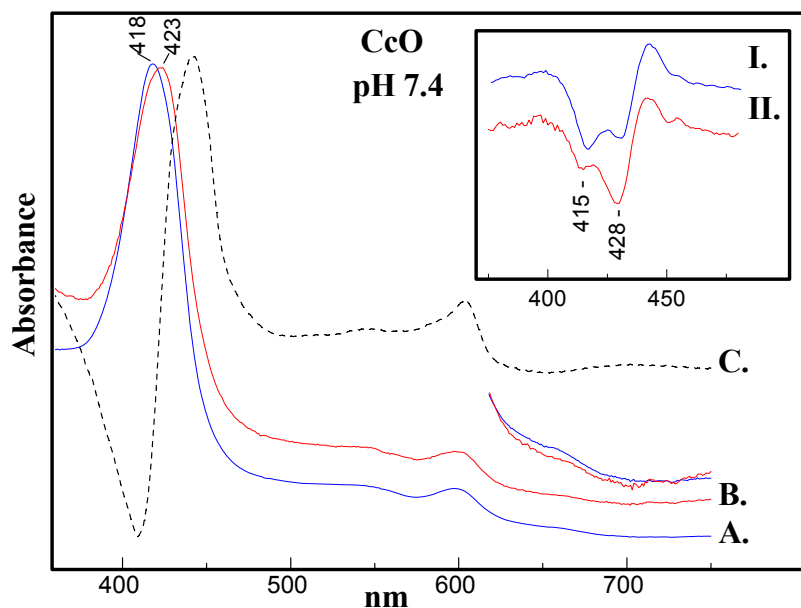
το $h\nu_3$. Επίσης παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δείγματα αναφοράς: α) 30 μl διαλύματος ενζύμου + 2.1 μl ρυθμιστικού διαλύματος και β) 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος + 2.1 μl διαλύματος KCN συγκέντρωσης 90 mM (ή ισοτοπικών αναλόγων).

Τα FTIR φάσματα των παραπάνω δειγμάτων ελήφθησαν μέσα σε IR κυψελίδα με CaF_2 παράθυρα και spacer 52 μm. Τα φάσματα καταγράφηκαν ως προς τον αέρα, με διακριτική ικανότητα 2 cm^{-1} σ' ένα BRUKER EQUINOX 55 FTIR φασματοφωτόμετρο. Για το κάθε δείγμα ελήφθησαν 2400 interferograms. Η περαιτέρω επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το software επεξεργασίας δεδομένων Origin 4. Από το φάσμα του συμπλόκου ένζυμο-CN αφαιρέθηκε το φάσμα του ελεύθερου ενζύμου. Στο φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline. Επίσης από το φάσμα του αναφορικού δείγματος του κυανίου αφαιρέθηκε το φάσμα του διαλύτη και κατόπιν έγινε διόρθωση της baseline. Επειδή το pK_a του HCN είναι 9.31 στους 25°C , ένα μεγάλο μέρος του κυανίου στο διάλυμα σε pH 7.4 και 8.4 βρίσκεται στη μορφή του οξέος, το οποίο δίνει ισχυρή δόνηση στους 2093 cm^{-1} για το $\text{H}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$. Η δόνηση αυτή μετατοπίζεται στους 2065 cm^{-1} για το $\text{H}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ και το $\text{H}^{12}\text{C}^{15}\text{N}$.² Αυτές οι δονήσεις απαλείφθηκαν με την αφαίρεση του φάσματος διαφοράς του ελεύθερου κυανίου από το φάσμα διαφοράς του συμπλόκου του ενζύμου. Στο τελικό φάσμα διαφοράς έγινε διόρθωση της baseline. Τα UV-vis φάσματα των πρωτεϊνικών δειγμάτων ελήφθησαν μέσα στην IR κυψελίδα πριν και μετά τις FTIR μετρήσεις. Τα δεδομένα καταγράφηκαν μ' ένα Perkin Elmer Lambda 20 UV-Vis φασματοφωτόμετρο.

8.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο σχήμα 8.1 φαίνονται τα οπτικά φάσματα της πλήρως οξειδωμένης κυτοχρωμικής οξειδάσης των μιτοχονδρίων πριν και μετά την αντίδραση με το κυάνιο. Προσθήκη 5.9 mM KCN σε 420 μM CcO, pH 7.4, προκαλεί τη μετατόπιση του μεγίστου της Soret κορυφής από τα 418 nm στα 423 nm. Η εξέταση της δευτέρας παραγώγου των παραπάνω φασμάτων (σχήμα 8.1, ένθετο) δίνει τα λ_{max} των ομάδων αίμης στα δύο δείγματα και αποδεικνύει ότι η μετατόπιση του μεγίστου της Soret μάλιστα οφείλεται στη μετατόπιση της γ-ταινίας της αίμης α_3 από τα 415 nm στα 428 nm. Στο πλήρως οξειδωμένο

μη υποκατεστημένο ένζυμο η αίμη α_3 εμφανίζει λ_{\max} στα 415 nm, ενώ η αίμη α στα 428 nm. Από τη σύγκριση της δεύτερης παραγώγου των φασμάτων των CcO και CcO-CN προκύπτει



Σχήμα 8.1. Τα UV-Vis φάσματα (A) της πλήρως οξειδωμένης CcO, (B) του CN-συμπλόκου αυτής και (C) του CN-συμπλόκου μείον το φάσμα της CcO σε pH 7.4. Παρουσιάζεται επίσης σε μεγένθυση η περιοχή από τα 620 έως τα 750 nm των φασμάτων της CcO (μπλε γραμμή) και του CcO-CN (κόκκινη γραμμή). Ένθετο: η δεύτερη παράγωγος στην περιοχή του Soret των UV-Vis φασμάτων (I) της CcO και (II) του CN-συμπλόκου αυτής.

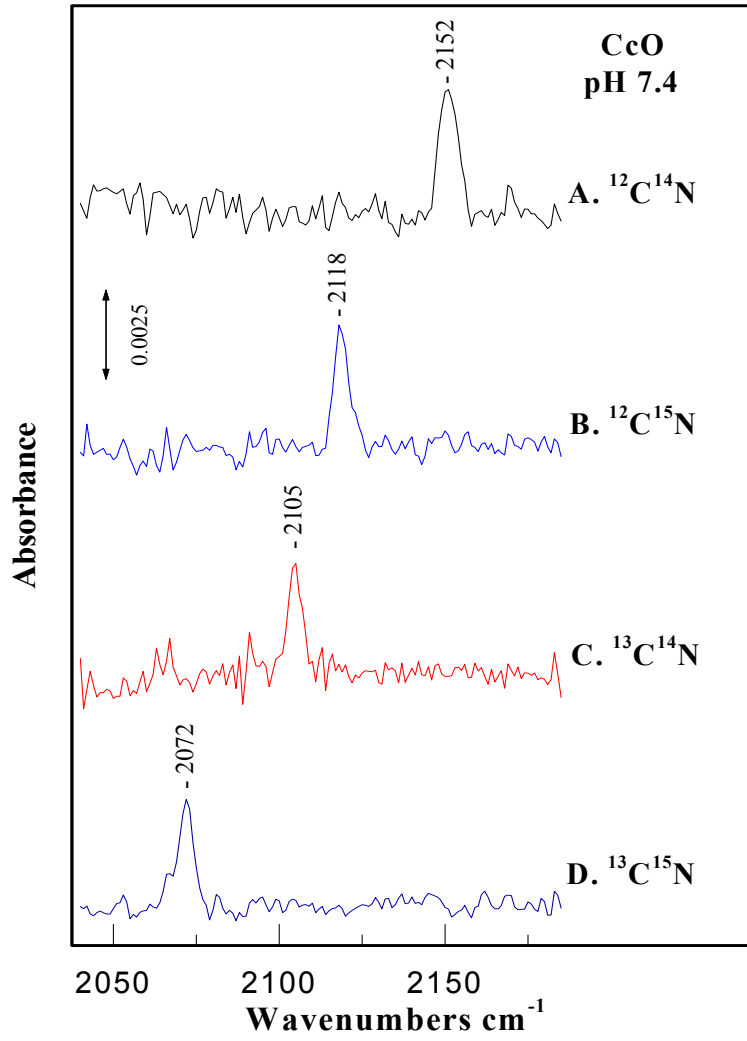
ότι η δέσμευση του CN προκαλεί μείωση της έντασης στα 415 nm και αύξηση της έντασης στα 428 nm. Αυτό σημαίνει ότι το λ_{\max} της αίμης α_3 μετατοπίζεται από τα 415 στα 428 nm, κατά τη δέσμευση του κυανίου. Στο ίδιο σχήμα φαίνεται επίσης το φάσμα διαφοράς της απορρόφησης του CcO-CN συμπλόκου μείον το φάσμα της πλήρως οξειδωμένης CcO, το οποίο παρουσιάζει μία ευρεία και ασθενή αρνητική ταινία στην περιοχή από τα 620 έως τα 680 nm. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ταινία στα 655 nm της CcO «χάνεται». Η ταινία στα 655 nm, η οποία υπάρχει όταν το ένζυμο είναι στην οξειδωμένη μορφή, έχει προταθεί οφείλεται στην υψηλού spin διαμόρφωση της αίμης α_3 και επομένως η απώλειά της σημαίνει τη μετάβαση της αίμης α_3 στην κατάσταση χαμηλού spin.²⁷ Αυτό το αποτέλεσμα

είναι σε συμφωνία με προηγούμενες MCD μελέτες της δέσμευσης του κυανίου στην CcO.¹⁵ Τα παραπάνω προτείνουν ότι το CN⁻ δεσμεύεται στην αίμη α₃, δε διευκρινίζουν όμως εάν το κυάνιο είναι ένα τελικό ligand ή ένας υποκαταστάτης γέφυρας.

Το σχήμα 8.2 δείχνει τα αποτελέσματα των FTIR πειραμάτων της μελέτης της δέσμευσης του κυανίου στην CcO σε pH 7.4. Το φάσμα του CcO-¹²C¹⁴N συμπλόκου εμφανίζει μία δόνηση στους 2152 cm⁻¹, η οποία παρουσιάζει ισοτοπική ευαισθησία και μετατοπίζεται αντίστοιχα στους 2118 cm⁻¹, 2105 cm⁻¹ και 2072 cm⁻¹, κατά την επανάληψη του πειράματος με K¹²C¹⁵N, K¹³C¹⁴N και K¹³C¹⁵N, αντίστοιχα. Οι μετατοπίσεις που παρατηρούνται συμφωνούν με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή (Πίνακας 8.1).

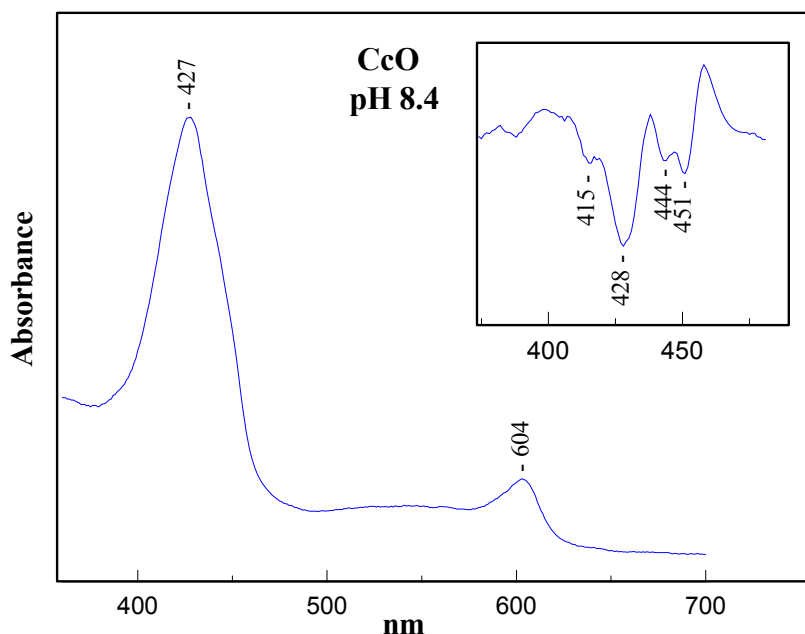
Πίνακας 8.1: Η επίδραση της ισοτοπικής αντικατάστασης του κυανίου στις ν(CN) συχνότητες (cm⁻¹) των CcO-CN, aa₃-600-CN και bo₃-CN συμπλόκων. Οι αναμενόμενες δονήσεις βάσει του μοντέλου του αρμονικού ταλαντωτή αναφέρονται μέσα στις παρενθέσεις.

CN-ενώσεις	ν(¹² C ¹⁴ N)	ν(¹² C ¹⁵ N)	ν(¹³ C ¹⁴ N)	ν(¹³ C ¹⁵ N)
CcO-CN	2152	2118 (2118.6)	2106 (2107)	2072 (2073)
CcO-CN	2129		2084 (2084)	
CcO-CN	2093		2050 (2049)	
aa ₃ -600-CN	2148		2101 (2103)	
bo ₃ -CN	2146		2101 (2101)	
HCN	2093		2065	
CN ⁻	2079		2037	



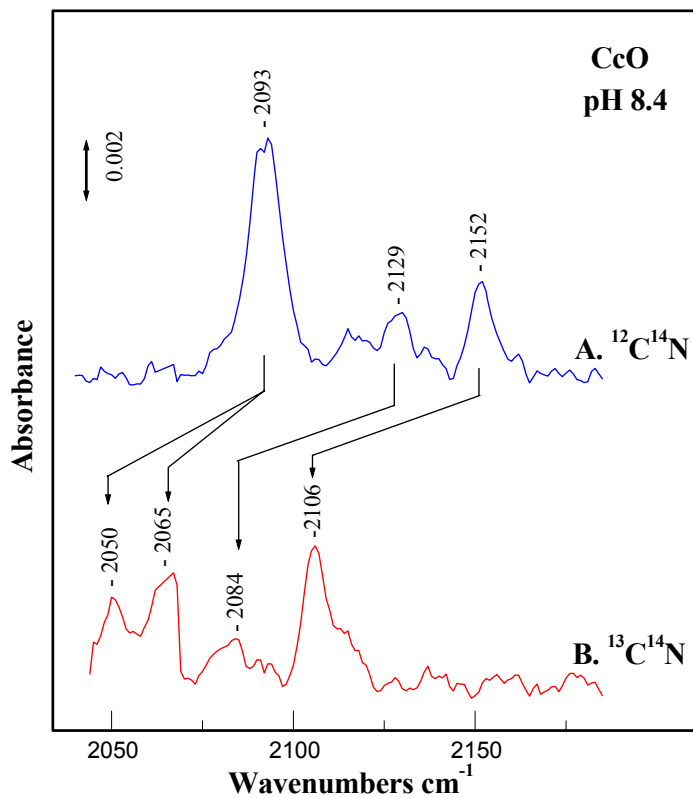
Σχήμα 8.2 Τα FTIR φάσματα των συμπλόκων (A) CcO-¹²C¹⁴N, (B) CcO-¹²C¹⁵N, (C) CcO-¹³C¹⁴N, και (D) CcO-¹³C¹⁵N, σε pH 7.4

Διαφορετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά την αντίδραση του κυανίου με την CcO σε pH 8.4. Προσθήκη 5.9 mM KCN σε 420 μM CcO, pH 8.4, προκαλεί μερική αναγωγή της CcO, όπως δείχνει το φάσμα απορρόφησης του CcO-CN συμπλόκου (σχήμα 8.3). Το μέγιστο της Soret ταινίας είναι στα 427 nm, ενώ παρατηρείται και ένας ώμος στην περιοχή 440-450 nm. Η δεύτερη παράγωγος του φάσματος (σχήμα 8.3, ένθετο) δίνει κορυφές στα 415 nm, 428 nm, 444 nm και 451 nm. Οι κορυφές στα 415 και 428 nm προκύπτουν από τις οξειδωμένες αίμες α_3^{3+} και α^{3+} , αντίστοιχα. Στην ανηγμένη μορφή και οι δύο αίμες παρουσιάζουν λ_{max} στα 444 nm.²⁸ Όπως θα συζητηθεί παρακάτω, κατά την ερμηνεία του αντίστοιχου FTIR φασμάτος του CcO-CN, η αίμη α_3 δεν πρέπει να έχει αναχθεί. Η κορυφή στα 451 nm δεν έχει χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα. Έχει προταθεί ότι αντιπροσωπεύει μία δεύτερη διαμόρφωση της ανηγμένης αίμης α .²⁸ Η ένταση της 428 nm κορυφής είναι αυξημένη, ενώ η απορρόφηση στα 415 nm έχει μειωθεί. Επομένως, και στο pH 8.4, η δέσμευση του κυανίου προκαλεί τη μετατόπιση της γ -ταινίας της αίμης α_3 απ' τα 415 nm στα 428 nm.



Σχήμα 8.3 Τα UV-Vis φάσμα της CcO μετά την αντίδραση με το κυάνιο σε pH 8.4. Στο ένθετο φαίνεται η δεύτερη παράγωγος του φάσματος στην περιοχή του Soret.

Τα αποτελέσματα των FTIR μετρήσεων στο pH 8.4 φαίνονται στο σχήμα 8.4. Το φάσμα του $\text{CcO-}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$ συμπλόκου παρουσιάζει τρεις δονήσεις στους 2152 cm^{-1} , 2129 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} . Με την ισοτοπική αντικατάσταση $\text{K}^{12}\text{C}^{14}/\text{K}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$, η 2152 cm^{-1} δόνηση μετατοπίζεται στη 2106 cm^{-1} , η 2129 cm^{-1} στη 2084 cm^{-1} και η 2093 cm^{-1} στις $2065\text{ cm}^{-1}/2050\text{ cm}^{-1}$. Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην παράγραφο «υλικά και μέθοδο» αυτού του κεφαλαίου, οι $2093\text{ cm}^{-1}/2065\text{ cm}^{-1}$ δονήσεις οφείλονται στο υδροκυάνιο.² Σύμφωνα, όμως, με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή η επιπλέον δόνηση που παρατηρείται στους 2050 cm^{-1} προέρχεται από την 2093 cm^{-1} (Πίνακας 8.1) και επομένως οι $2093\text{ cm}^{-1}/2050\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται σε δέσμευση του κυανίου στο ένζυμο.

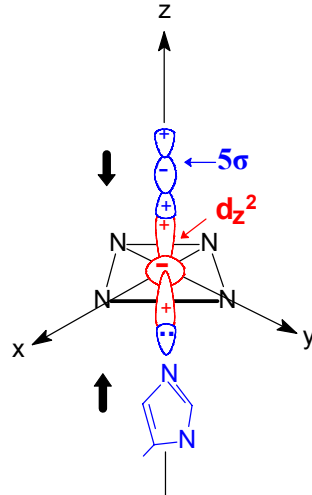


Σχήμα 8.4 Τα FTIR των συμπλόκων (A) $\text{CcO-}^{12}\text{C}^{14}\text{N}$, (B) $\text{CcO-}^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ σε pH 8.4

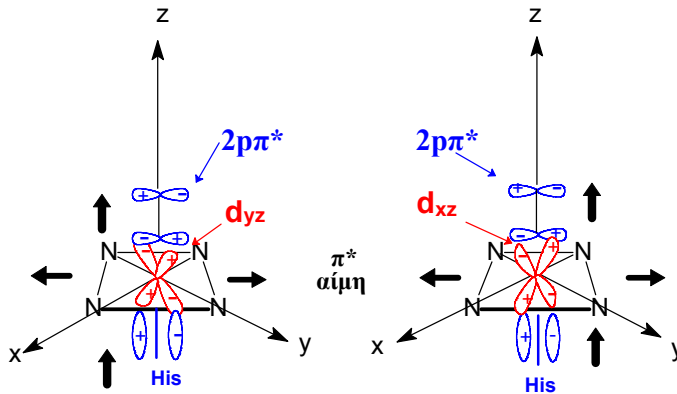
Η 2152 cm^{-1} δόνηση παρατηρείται τόσο στο pH 7.4, όπου το ένζυμο είναι στην πλήρως οξειδωμένη μορφή, όσο και στο pH 8.4, όπου έχει συμβεί μερική αναγωγή του ενζύμου.

Επομένως, η δόνηση αυτή δηλώνει την παρουσία ενός πλήρως οξειδωμένου συμπλόκου CcO-CN. Ο πιο αιτιολογημένος χαρακτηρισμός της 2152 cm^{-1} δόνησης είναι ότι οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου γέφυρας, $\text{Fe}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$, στο διπυρηνικό κέντρο. Η συχνότητα αυτής της δόνησης είναι αρκετά υψηλότερη από τις 2122 cm^{-1} , 2126 cm^{-1} και 2137 cm^{-1} $\nu(\text{CN})$ συχνότητες των CN-συμπλόκων της αιμοσφαιρίνης,² της μυοσφαιρίνης² και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου,²⁹ αντίστοιχα. Το CN^- γενικά προτιμά να δεσμεύεται σε ευθύγραμμη διάταξη μέσω του άνθρακα στο κεντρικό ιόν των πορφυρινικών και αιμικών ομάδων.¹ Στις ενώσεις αυτές το CN^- συναρμόζεται μέσω ενός ισχυρού σ-δοτικού δεσμού και ενός ασθενούς π-δεσμού επαναφοράς. Ο σ-δοτικός δεσμός προκύπτει από την αλληλεπίδραση του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων στο 5σ τροχιακό του CN^- , το οποίο είναι ασθενώς αντιδεσμικό τροχιακό, με το d_z^2 τροχιακό του κεντρικού ιόντος του πορφυρινικού συστήματος (σχήμα 8.5).¹ Ο π-δεσμός επαναφοράς προκύπτει από την αλληλεπίδραση των κατειλημμένων d_π (d_{xz} , d_{yz}) τροχιακών του κεντρικού ιόντος με το αντιδεσμικό $2p^*$ κενό τροχιακό του CN^- . Ενώ το CO είναι ισχυρός π-δέκτης και ασθενής σ-δότης ηλεκτρονίων, το CN^- δρα περισσότερο ως σ-δότης ηλεκτρονίων παρά σαν π-δέκτης ηλεκτρονίων.^{1,30} Επομένως, με το σχηματισμό των CN-συμπλόκων ο δεσμός $\text{C}\equiv\text{N}$ ισχυροποιείται, επειδή η δημιουργία του σ-δοτικού δεσμού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του ασθενώς αντιδεσμικού 5σ τροχιακού του CN^- . Έτσι, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει με τα CO-σύμπλοκα των πορφυρινών, η $\nu(\text{CN})$ των αντίστοιχων CN-συμπλόκων αναμένεται να είναι υψηλότερη απ' τη $\nu(\text{CN})=2078\text{ cm}^{-1}$ του ελεύθερου ιόντος κυανίου. Πράγματι, οι δονήσεις τάσης αυτών των συμπλόκων είναι γύρω στους 2130 cm^{-1} . Στην περίπτωση που το CN^- μπορεί να δράσει ως διδραστικό ligand και να δώσει σύμπλοκα γέφυρας, αναμένεται μία περαιτέρω αύξηση της συχνότητας της $\nu(\text{CN})$ δόνησης. Αυτό αιτιολογείται από το γεγονός ότι η δημιουργία ενός επιπλέον σ-δοτικού δεσμού στο N άτομο του κυανίου θα έχει ως αποτέλεσμα την παραπέρα μείωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του 5σ τροχιακού. Η συχνότητα της 2152 cm^{-1} δόνησης για το CcO-CN σύμπλοκο είναι $30\text{-}24\text{ cm}^{-1}$ υψηλότερη απ' τις $\nu(\text{CN})$ συχνότητες των τελικής γεωμετρίας CN- συμπλόκων της Hb^2 και Mb^2 συμπλόκων και βάσει των παραπάνω επιχειρημάτων αποδίδεται στη δόνηση τάσης του κυανίου ενός συμπλόκου $\text{Fe}_{a3}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$. Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή αυτού του κεφαλαίου, οι Yoshikawa et al.³¹

σ δοτικός δεσμός



π δεσμός επαναφοράς



Τροχιακά

Fe^{3+}	CN	CO
$d_{x^2-y^2}$ —	σ^* —	—
d_{z^2} —	π^* — —	— —
d_{xz} d_{yz} $\uparrow\downarrow$ \uparrow	σ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$
d_{xy} $\uparrow\downarrow$	π $\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$ $\uparrow\downarrow$

Σχήμα 8.5 Στο πάνω μέρος του σχήματος δίνεται μία σχηματική αναπαράσταση των σ και π δεσμών μεταξύ του σιδήρου μίας αίμης και των αξονικών ligands CN (CO) και His. Στο κάτω μέρος παρουσιάζεται σχηματικά η ηλεκτρονική διαμόρφωση των CN, CO και χαμηλού spin Fe^{3+} .

υποστηρίζουν ότι η ένταση της 2152 cm^{-1} δόνησης είναι ιδιαίτερα υψηλή για να προκύπτει από ένα σύμπλοκο γέφυρας. Ωστόσο, υπάρχουν φασματοσκοπικές μελέτες CN-σμπλόκων πρότυπων ενώσεων από τις οποίες προκύπτει ότι η ένταση της $\nu(\text{CN})$ δόνησης δεν μπορεί να είναι κριτήριο για τη γεωμετρία του δεσμευμένου κυανίου. Έχει βρεθεί ότι σε συστήματα Ru η ένταση της $\nu(\text{CN})$ στην περίπτωση συμπλόκων γέφυρας είναι μικρότερη απ' ό,τι σε σύμπλοκα τελικής διαμόρφωσης.³¹ Η αντίθετη τάση παρατηρείται για πορφυρινικές ενώσεις πρότυπα του διπυρηνικού κέντρου.¹⁸

Οι 2129 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} δονήσεις παρατηρούνται μόνο στο pH 8.5, στο οποίο ένα μέρος του ενζύμου έχει υποστεί μερική αναγωγή. Στο pH 7.4, όπου το ένζυμο βρίσκεται αποκλειστικά στην πλήρως οξειδωμένη μορφή, παρατηρείται μόνο η 2152 cm^{-1} δόνηση. Επομένως, οι δύο δονήσεις με τη χαμηλότερη συχνότητα προκύπτουν απ' τη δέσμευση του κυανίου στη μερικώς ανηγμένη CcO. Επίσης, τόσο η 2129 cm^{-1} όσο και η 2093 cm^{-1} δόνηση δεν πρέπει να οφείλονται στο σχηματισμό ενός επιπλέον συμπλόκου της μορφής $\alpha_3^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$. Εάν οι δονήσεις αυτές χαρακτηρίζαν δέσμευση του κυανίου ως ligand γέφυρας στο οξειδωμένο διπυρηνικό κέντρο, θα ήταν αναμενόμενη η ύπαρξή τους και στο pH 7.4 - σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μελετών δέσμευσης του αζιδίου οι δύο διαμορφώσεις της CcO μπορούν να υπάρξουν σε pH 7.4 και 8.4.

Το UV-Vis φάσμα του CcO-CN δείγματος σε pH 8.4 (σχήμα 8.3) δείχνει ότι ένα μέρος της αίμης α έχει αναχθεί (444 nm, 451 nm). Η αίμη α_3 ανάγεται δυσκολότερα και πάντα τελευταία κατά την πλήρη αναγωγή του ενζύμου. Εξάλλου, αναγωγή της αίμης α_3 θα οδηγούσε στο σχηματισμό του $\text{Fe}_{\alpha_3}^{2+}\text{-CN}$ συμπλόκου, το οποίο χαρακτηρίζεται από τις δονήσεις τάσης του δεσμού $\text{C}\equiv\text{N}$ στους 2058 και 2045 cm^{-1} .^{20,24} Δεν παρατηρήθηκαν όμως τέτοιες δονήσεις. Επομένως, η αίμη α_3 είναι στην +3 οξειδωτική κατάσταση. Μερική αναγωγή της CcO, έστω και με ένα ισοδύναμο αναγωγικού αντιδραστηρίου οδηγεί στην αναγωγή του Cu_B , η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της spin σύζευξης μεταξύ της αίμης α_3 και του Cu_B . Απ' τα παραπάνω προκύπτει ότι η απαίτηση για τη δέσμευση του CN^- στην 2129 cm^{-1} και 2093 cm^{-1} γεωμετρία είναι η αναγωγή του Cu_B . Η συχνότητα της $\nu(\text{CN})=2129\text{ cm}^{-1}$ είναι παραπλήσια της $\nu(\text{CN})$ συχνότητας των Hb-CN και Mb-CN συμπλόκων και βάσει αυτής της ομοιότητας αποδίδεται σε δέσμευση του κυανίου ως τελικό ligand στην αίμη α_3^{3+} με το Cu_B να είναι στη +1 οξειδωτική κατάσταση. Η συχνότητα της $\nu(\text{CN})=2093\text{ cm}^{-1}$ / $\nu(^{13}\text{C}^{14}\text{N})=2050\text{ cm}^{-1}$ είναι αρκετά μικρότερη και υπάρχουν δύο πιθανότητες για την προέλευσή της. Η πρώτη είναι ότι οφείλεται σε δέσμευση του CN^- ως τελικό ligand στο Cu_B^{1+} , ταυτόχρονα με τη δέσμευση του CN^-

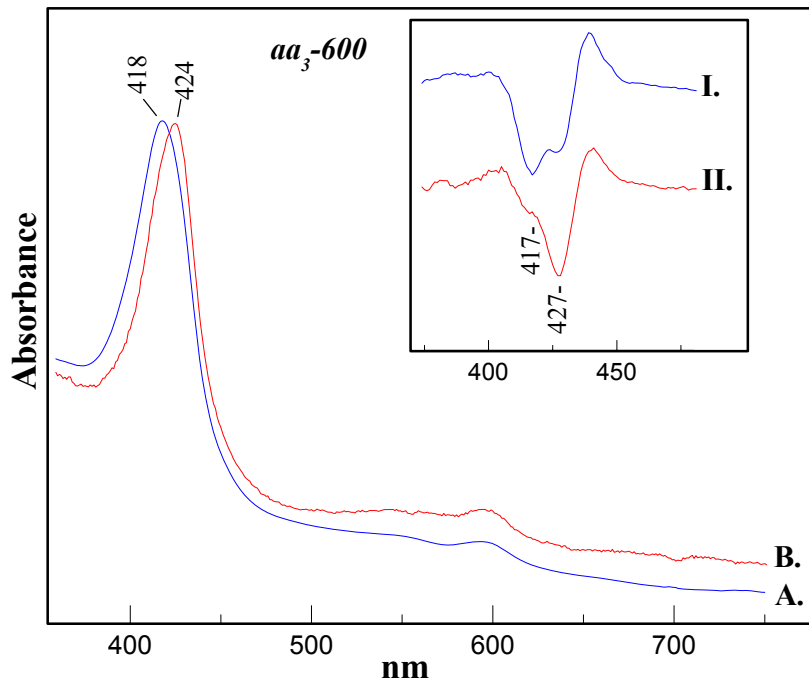
στην αίμη α_3^{3+} -CN (2129 cm^{-1}). Αυτή η παραδοχή έχει υποστηριχθεί από τον Tsubaki,²⁴ επειδή κατά την αλληλεπίδραση του CO με το πλήρως ανηγμένο σύμπλοκο CcO-CN παρατήρησε την ανάπτυξη των $\nu(\text{CN})=2093\text{ cm}^{-1}$ και $\nu(\text{CO})=1963\text{ cm}^{-1}$ ($\text{Fe}_{\alpha_3}^{2+}$ -CO) δονήσεων και την ταυτόχρονη εξαφάνιση των $\nu(\text{CN})$ στους 2058 cm^{-1} και 2047 cm^{-1} του $\text{Fe}_{\alpha_3}^{2+}$ -CN συμπλόκου. Όμως, FTIR μετρήσεις κατά την προοδευτική αναγωγή του πλήρως οξειδωμένου συμπλόκου CcO-CN δείχνουν ότι η 2093 cm^{-1} δόνηση εμφανίζεται μαζί με τη 2129 cm^{-1} στη μερικώς ανηγμένη μορφή του CcO-CN, ενώ και δύο δονήσεις εξαφανίζονται με την πλήρη αναγωγή του συμπλόκου, οπότε παρατηρούνται μόνο οι 2058 cm^{-1} και 2047 cm^{-1} δονήσεις.²⁴ Εάν το κυάνιο δεσμεύεται στο Cu_B^{1+} στη μερικώς ανηγμένη μορφή του ενζύμου, είναι αναμενόμενο το ίδιο να ισχύει και στην περίπτωση της πλήρως ανηγμένης οξειδάσης. Συνεπώς, η 2093 cm^{-1} δόνηση δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι οφείλεται στο σχηματισμό ενός συμπλόκου Cu_B^{1+} -CN.

Είναι πιθανότερο η 2093 cm^{-1} δόνηση να προκύπτει απ' το σχηματισμό ενός δεύτερου συμπλόκου της μορφής $\text{Fe}_{\alpha_3}^{3+}$ -CN Cu_B^{1+} . Αυτό σημαίνει ότι η Fe^{3+} -CN Cu_B^{1+} μονάδα μπορεί να υιοθετήσει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις, τη 2129 cm^{-1} και τη 2093 cm^{-1} .

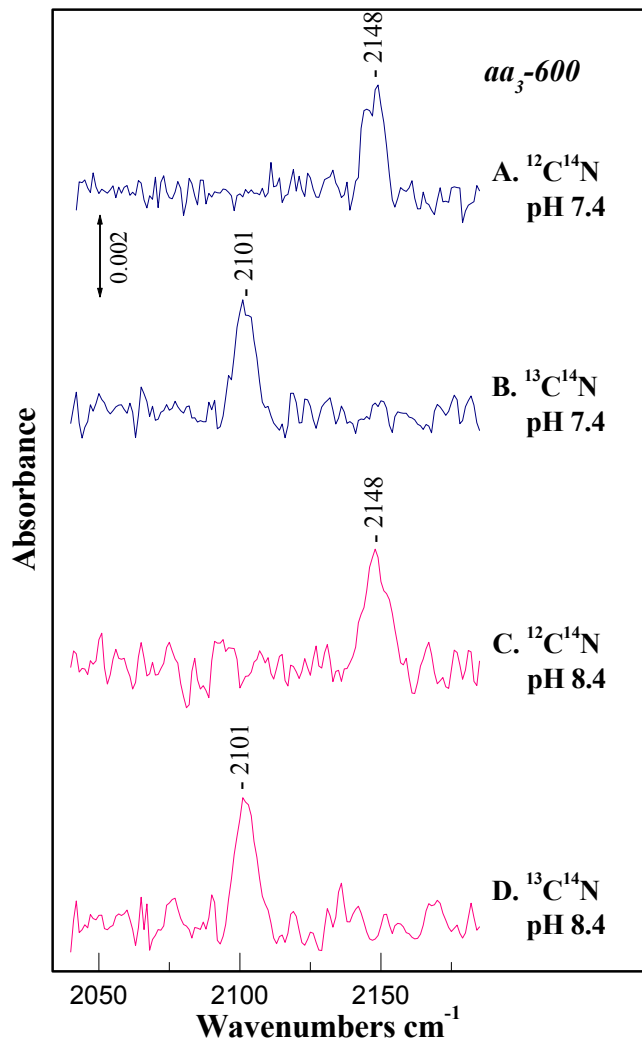
Φασματοσκοπικές μελέτες της δέσμευσης του CN^- σε σιδηροπορφυρινικές (Fe^{3+}) ενώσεις δείχνουν ότι συχνότητες των $\nu(\text{CN})$ και $\nu(\text{Fe-CN})$ δονήσεων εξαρτώνται τόσο από τις ιδιότητες του ligand σε θέση trans ως προς το CN^- , όσο και από τις στερεοχημικές και ηλεκτροστατικές παρεμποδίσεις στην εγγύς περιοχή.^{5,6} Αυτό εξηγείται βάσει των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τροχιακών. Αύξηση του βασικού χαρακτήρα του ligand σε θέση trans, δηλαδή της proximal His376 για την CcO των μιτοχονδρίων, θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του d_z^2 τροχιακού του $\text{Fe}_{\alpha_3}^{3+}$ και του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων της His376 (σχήμα 8.5). Επειδή η His376 και το CN^- συναγωνίζονται για το ίδιο d_z^2 για το σχηματισμό του σ -δοτικού δεσμού με το $\text{Fe}_{\alpha_3}^{3+}$, αναμένεται μείωση της αποτελεσματικότητας του σ -δοτικού δεσμού από το CN^- . Αυτό όμως συνεπάγεται αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας του 5σ τροχιακού του κυανίου και άρα μείωση της συχνότητας της $\nu(\text{CN})$ δόνησης, επειδή το 5σ τροχιακό έχει χαρακτήρα μερικώς αντιδεσμικού τροχιακού. Οποσδήποτε όμως ένα τέτοιο φαινόμενο αναμένεται να επηρεάσει τη $\nu(\text{CN})$ συχνότητα σε μικρότερο βαθμό απ' ότι δηλώνει η διαφορά των 36 cm^{-1} μεταξύ των 2093 cm^{-1} και 2129 cm^{-1} συχνοτήτων. Απ' την άλλη, η εισαγωγή ενός δεσμού υδρογόνου στο N άκρο του κυανίου θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας, $\nu(\text{CN})$. Από φασματοσκοπικές μελέτες σε πρότυπες ενώσεις προκύπτει ότι η $\nu(\text{CN})$ δόνηση

επιηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' τις στερεοχημικές ή/και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις γύρω από τη θέση δέσμευσης.⁵ Η $\nu(\text{CN})$ για μία ευθύγραμμη διαμόρφωση της Fe-CN μονάδας αιμικών συστημάτων είναι γύρω στους 2130 cm^{-1} . Όταν το κυάνιο υφίσταται δραστικές στερεοχημικές ή/και ηλεκτροστατικές παρεμποδίσεις και εξαναγκάζεται σε μία μη γραμμική διεύθυνση της Fe-C \equiv N μονάδας, η συχνότητα της $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ δόνησης μειώνεται σημαντικά. Έτσι, για μία κεμαμένη διαμόρφωση της Fe³⁺-C \equiv N μονάδας γωνίας 130° , η $\nu(\text{CN})$ είναι στους 2118 cm^{-1} .⁵ Τέτοιου είδους φαινόμενα είναι πιθανό να συμβαίνουν στην εγγύς περιοχή του διπυρηνικού κέντρου της CcO. Ο Cu_B μπορεί να μεταβάλλει τη θέση του ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του ενζύμου αλλά και την υποκατάσταση στο διπυρηνικό κέντρο.³² Αυτή η «ευκινησία» αναμένεται να μεταβάλλει τις στερεοχημικές και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στην εγγύς περιοχή. Επίσης, η εισαγωγή ενός ή περισσοτέρων αρνητικών φορτίων κοντά στο δεσμευμένο CN⁻ θα είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη απόκλιση της Fe-C \equiv N μονάδας από την ευθύγραμμη διαμόρφωση. Τα φορτία αυτά μπορούν να δημιουργηθούν εξαιτίας φαινομένων αποπρωτονίωσης συγκεκριμένων καταλοίπων στην εγγύς περιοχή. Τέτοια κατάλοιπα είναι π.χ η Tyr244 και τα ligands ιστιδίνης του Cu_B. Τα παραπάνω προτείνουν ότι η ακριβής διαμόρφωση του κυανίου στη μερικώς ανηγμένη CcO καθορίζεται τόσο από τις ιδιότητες της proximal His376, όσο και από τις ιδιότητες της εγγύς περιοχής. Έτσι, η μεγάλη διαφορά στις συχνότητες των 2093 cm^{-1} και 2129 cm^{-1} δονήσεων αντανάκλα σημαντικές διαφορές στο διπυρηνικό κέντρο μεταξύ των δύο διαμορφώσεων, με αποτέλεσμα τη σημαντική απόκλιση της Fe³⁺-C \equiv N μονάδας απ' την ευθύγραμμη διεύθυνση στην περίπτωση του 2093 cm^{-1} συμπλόκου.

Στα σχήματα 8.6 και 8.7 παρουσιάζονται τα UV-Vis και FTIR αποτελέσματα για την $\alpha\alpha_3$ -600 οξειδάση. Δέσμευση του κυανίου στο κυτόχρωμα $\alpha\alpha_3$ -600 δεν προκαλεί μερική αναγωγή του ενζύμου σε pH 7.4 ή pH 8.4. Κατά την αλληλεπίδραση αυτή, το λ_{max} της Soret ταινίας μετατοπίζεται από τα 418 nm στα 424 nm. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη μετατόπιση της γ -ταινίας της αίμης α_3 από τα 413 nm στα 428 nm. Τα αντίστοιχα FTIR φάσματα εμφανίζουν μία δόνηση στους 2148 cm^{-1} για το ¹²C¹⁴N- σύμπλοκο, η οποία μετατοπίζεται στους 2101 cm^{-1} με την ισοτοπική αντικατάσταση K¹²C¹⁴N/K¹³C¹⁴N.

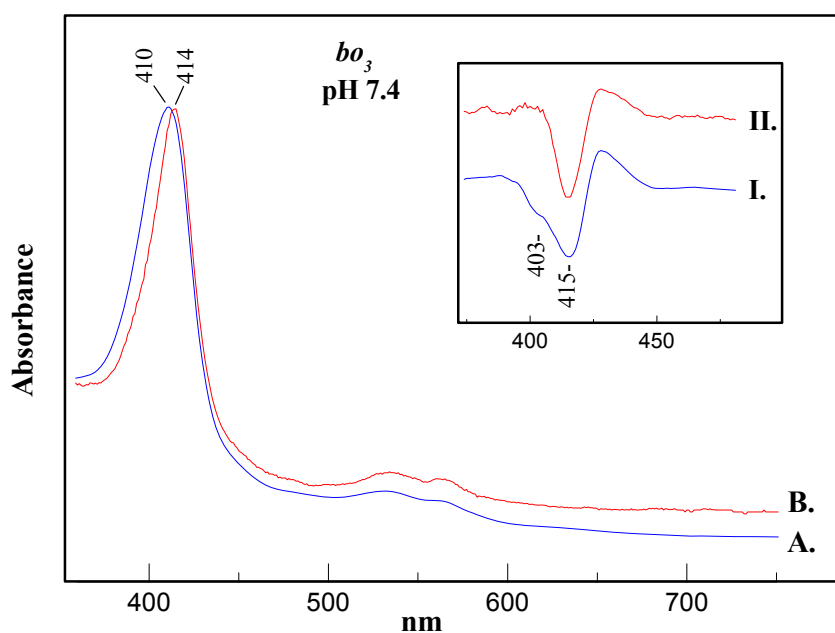


Σχήμα 8.6 Τα UV-Vis φάσματα (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος aa_3-600 και (B) του CN-συμπλόκου του. Ένθετο: η δεύτερη παράγωγος στην περιοχή του Soret των UV-Vis φασμάτων (I) του κυτοχρώματος aa_3-600 και (II) του CN-συμπλόκου του. Δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ του pH 7.4 και 8.4.

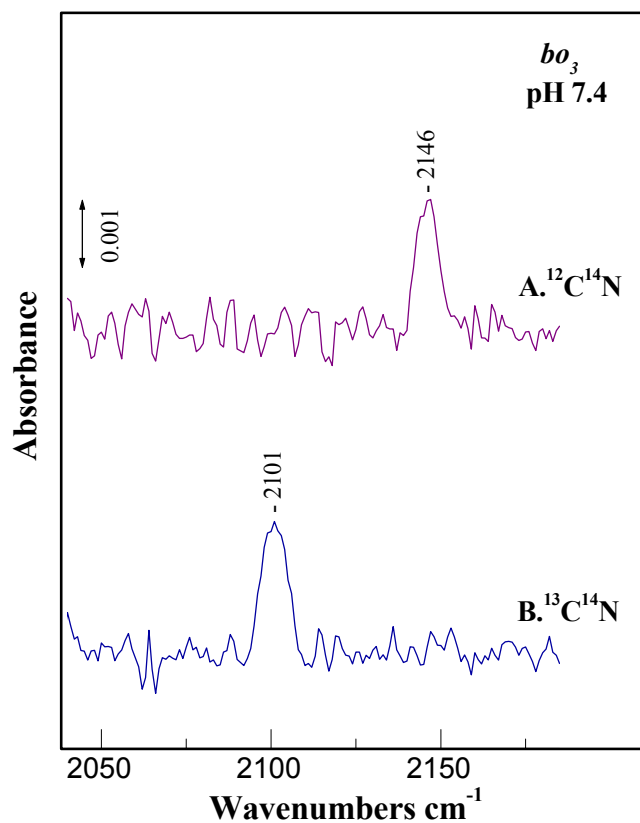


Σχήμα 8.7 Τα FTIR φάσματα των συμπλόκων (A) $aa_3-600-^{12}C^{14}N$ και (B) $aa_3-600-^{13}C^{14}N$ σε pH 7.4 και (C) $aa_3-600-^{12}C^{14}N$ και (D) $aa_3-600-^{13}C^{14}N$ σε pH 8.4.

Ανάλογα αποτελέσματα λαμβάνονται και για το κυτόχρωμα bo_3 . Προσθήκη κυανίου στο πλήρως οξειδωμένο ένζυμο έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μεγίστου της Soret ταινίας από τα 403 nm στα 415 nm, λόγω της μετατόπισης της Soret ταινίας της αίμης o_3 απ' τα 403 nm στα 415 nm (σχήμα 8.8). Επίσης, το σύμπλοκο που προκύπτει χαρακτηρίζεται απ' την $\nu(\text{CN})$ στους 2146 cm^{-1} , η οποία μετατοπίζεται στους 2101 cm^{-1} , κατά την αντίδραση του ενζύμου με το $^{13}\text{C}^{14}\text{N}$ (σχήμα 8.9). Οι συχνότητες των $\nu(\text{CN})$ στους 2148 cm^{-1} και 2146 cm^{-1} για τα CN-σύμπλοκα των aa_3-600 και bo_3 είναι παραπλήσιες της $\nu(\text{CN})=2152 \text{ cm}^{-1}$ για το CcO-CN σύμπλοκο και κατά αναλογία αποδίδονται στη δόνηση τάσης του κυανίου του συμπλόκου γέφυρας $\text{Fe}^{3+}\text{-CN-Cu}_B^{2+}$ στο διπυρηνικό κέντρο.



Σχήμα 8.8 Τα UV-Vis φάσματα (A) του πλήρως οξειδωμένου κυτοχρώματος bo_3 και (B) του CN-συμπλόκου του σε pH 7.4. Ένθετο: η δεύτερη παράγωγος στην περιοχή του Soret των UV-Vis φασμάτων (I) του κυτοχρώματος bo_3 και (II) του $bo_3\text{-CN}$.



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

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συνοψίζονται στον πίνακα 8.2. Το CN^- κατά την αλληλεπίδραση του με την πλήρως οξειδωμένη μορφή της CcO και των κυτοχρωμάτων aa_3 -600 και bo_3 σχηματίζει σύμπλοκα γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο των τριών ενζύμων. Παρά την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της πλήρους οξειδωμένης N_3 -υποκατεστημένης μορφής των τελικών οξειδασών, παρατηρείται μία μόνο $\nu(CN)$ δόνηση για τα πλήρως οξειδωμένα CN -σύμπλοκα των ενζύμων. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στην υπόθεση ή ότι οι δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο διπυρηνικό κέντρο δεν επηρεάζουν τη διαμόρφωση του συμπλόκου γέφυρας ή ότι ο σχηματισμός της γέφυρας κυανίου αναιρεί τέτοιου είδους διαφοροποιήσεις μετατοπίζοντας την ισορροπία μεταξύ των δύο καταστάσεων προς μία κατεύθυνση.

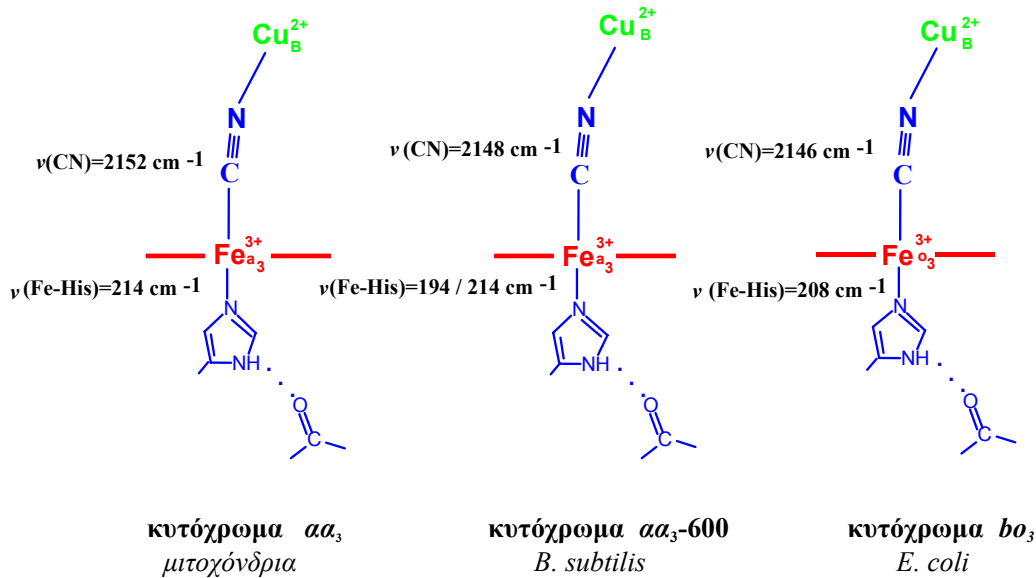
ΠΙΝΑΚΑΣ 8.2: Οι συχνότητες (cm^{-1}) και των εύρος των $\nu(\text{CN})$ δονήσεων για μερικές κυτοχρωμικές και κινολικές οξειδάσες

	κυτοχρωμική οξειδάση				κυτόχρωμα <i>aa</i> ₃ -		κυτόχρωμα
	pH 7.4		pH 8.4		pH 7.4	pH 8.4	pH 7.4
$\nu(^{12}\text{C}^{14}\text{N})$	2152	2152	2129	2093	2148	2148	2146
)	6.9	6.7	7		8.5	10	7.4
$\Delta\nu_{1/2}$							
$\nu(^{12}\text{C}^{15}\text{N})$	2118						
)	5.4						
$\Delta\nu_{1/2}$							
$\nu(^{13}\text{C}^{14}\text{N})$	2105	2106	2084	2050	2101	2101	2101
)	5.5	6.7	9.4		8	8	9.2
$\Delta\nu_{1/2}$							
$\nu(^{13}\text{C}^{15}\text{N})$	2072						
)	5.5						
$\Delta\nu_{1/2}$							

Το κυτόχρωμα *aa*₃-600, για το οποίο έχουν παρατηρηθεί δύο $\nu(\text{Fe-His376})$ στους 194 και τους 214 cm^{-1} , εμφανίζει μόνο μία $\nu(\text{CN})$ στους 2148 cm^{-1} . Η συχνότητα αυτής της δόνησης είναι πολύ κοντά στη $\nu(\text{CN})=2152 \text{ cm}^{-1}$ της CcO, για την οποία $\nu(\text{Fe-His376})$ είναι στους 214 cm^{-1} . Φαίνεται, λοιπόν, ότι η δέσμευση του κυανίου στο κυτόχρωμα *aa*₃-600 μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δύο Fe-His376 διαμορφώσεων προς εκείνη την κατεύθυνση, στην οποία σχηματίζεται η 214 cm^{-1} δομή.

Επειδή η proximal His376 σχηματίζει ένα σ δοτικό και ένα π δεσμό με τα d_z^2 και d_π τροχιακά του Fe, αντίστοιχα, η ισχυροποίηση του δεσμού Fe-His376 θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της $\nu(\text{CN})$. Η υψηλότερη τιμή της $\nu(\text{Fe-His376})$ για τη CcO (214 cm^{-1}) συγκριτικά με το *bo*₃ (208 cm^{-1}) φανερώνει ένα περισσότερο αποτελεσματικό δεσμό υδρογόνου μεταξύ της Gly351 και της His376 στην περίπτωση της CcO (σχήμα 8.10). Ένας ισχυρός δεσμός υδρογόνου His376-Gly351, όμως, οδηγεί σε ισχυροποίηση του π δεσμού Fe-His376, με συνέπεια την αύξηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας των d_π τροχιακών του σιδήρου. Αυτό σημαίνει ότι ο π δεσμός επαναφοράς από το Fe(d_π) στο CN($2p\pi^*$) είναι περισσότερο αποτελεσματικός στην CcO και επομένως αναμένεται μείωση της $\nu(\text{CN})$ σε σχέση με το *bo*₃. Παρατηρείται, όμως, το αντίθετο. Αυτή η μη αναμενόμενη αύξηση της $\nu(\text{CN})$ είναι πιθανό να οφείλεται στη συναρμογή του CN ως ligand γέφυρας στο διπυρηνικό κέντρο. Ένας ισχυρός σ δεσμός Cu_B-NC θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της

ηλεκτρονικής πυκνότητας του 5σ τροχιακού του κυανίου και συνεπώς την αύξηση της $\nu(\text{CN})$. Φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες CN-συμπλόκων γέφυρας μοντέλων διπυρηνικών συστημάτων, σιδηροπορφυρινών-Cu, δείχνουν ότι η $\nu(\text{CN})$ εξαρτάται από το μήκος, d , του δεσμού Cu-NC και τη γωνία, θ , της μονάδας Cu-N≡C. Για τα μοντέλα που μελετήθηκαν, βρέθηκε ότι η $\nu(\text{CN})$ μεταβάλλεται γραμμικά με τα d και θ .¹⁸ Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες αύξηση της θ και μείωση του d οδηγεί σε αύξηση της $\nu(\text{CN})$.



Σχήμα 8.10 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης δέσμευσης του CN στη κυτοχρωμική οξειδάση aa_3 , το κυτόχρωμα aa_3 -600 και το κυτόχρωμα bo_3 .

Ένα από τα βασικά ζητήματα στο πεδίο της κυτοχρωμικής οξειδάσης είναι η έκταση στην οποία οι μερικώς ανηγμένες μορφές οξυγόνου, οι οποίες σχηματίζονται κατά την καταλυτική πορεία, αλληλεπιδρούν με τα δύο μέταλλα του διπυρηνικού κέντρου. Έχει προταθεί ότι κατά τη μετάβαση από το οξύ ενδιάμεσο ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$) στο 607nm ενδιάμεσο ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$), σχηματίζεται μία περόξυ ένωση. Ο σχηματισμός ενός τέτοιου ενδιάμεσου δεν έχει παρατηρηθεί ακόμα φασματοσκοπικά και αρκετές πιθανές δομές, όπως $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-Cu}^{2+}$, $\text{Fe}^{3+}\text{-O-O-(H)}$ έχουν προταθεί γι' αυτό. Τα φασματοσκοπικά αποτελέσματα για τη δέσμευση των ιόντων αζιδίου και κυανίου συνιστούν ότι, στην

οξειδωμένη μορφή, ο Cu_B έχει άμεση αλληλεπίδραση με το δεσμευμένο στην αίμη ligand, σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα γέφυρας. Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να αποτελέσουν ένα μοντέλο για το προτεινόμενο περόξυ ενδιάμεσο. Εάν σχηματίζεται, είναι πολύ πιθανό να έχει δομή γέφυρας, της μορφής $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^-\text{-O}^-\text{-Cu}_B^{2+}$. Μία πιθανή εξήγηση για τη μη παρατήρησή του μέχρι τώρα είναι ο μικρός χρόνος ημιζωής του λόγω της γρήγορης μεταφοράς, άγνωστο πώς, ηλεκτρονίων με τελικό αποτέλεσμα τη σχάση του δεσμού O-O και το σχηματισμό ενός φερυλίου ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$, 607 nm/ 804 cm^{-1} ενδιάμεσο).

Συνοπτικά, οι $\nu(\text{CN})$ ιο οποίες χαρακτηρίζουν τη δέσμευση του ιόντος του κυανίου αποδεικνύουν μερικά πολύ ενδιαφέροντα γνωρίσματα των κυτοχρωμικών και κινολικών οξειδασών. Στη οξειδωμένη μορφή των τριών ενζύμων, που μελετήθηκαν εδώ, το κυάνιο δεσμεύεται σε μία διαμόρφωση σχηματίζοντας σύμπλοκο γέφυρας με το διπυρηνικό κέντρο. Η σύγκριση των $\nu(\text{CN})$ συχνοτήτων, που παρατηρούνται εδώ και των $\nu(\text{Fe-His})$ συχνοτήτων, που έχουν δημοσιευθεί για τα τρία ένζυμα, προτείνει ότι η διαμόρφωση του δεσμευμένου κυανίου εξαρτάται από τις ιδιότητες του Cu_B . Στη μερικώς ανηγμένη CcO, όπου έχει πραγματοποιηθεί αναγωγή του Cu_B , το κυάνιο δεσμεύεται ως τελικό ligand στο Fe_{a3}^{3+} σε δύο διαφορετικές διαμορφώσεις. Προτείνεται ότι η διαφοροποίηση των δύο $\text{Fe}_{a3}^{3+}\text{-CN Cu}_B^{1+}$ δομών οφείλεται τόσο σε αλλαγή της βασικότητας της proximal ιστοιδίνης, όσο και σε αλλαγή της διαμόρφωσης της εγγύς περιοχής.

Βιβλιογραφία

1. Yu, N.-T.; Kerr, E. A. In *Biological Applications of Raman Spectroscopy*; Spiro, T. G.; Ed.; Wiley: New York **1998**, Vol III, pp 39-95.
2. Yoshikawa, S.; O' Keeffe, D. H.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3518-3528.
3. Lopez-Garriga, J. J.; Oertling, W. A.; Kean, R. T.; Hoogland, H.; Wever, R.; Babcock, G, T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9387-9395.
4. Hirota, S.; Ogura T.; Shinzawa-Itoth, K.; Yoshikawa, S.; Kitagawa, T. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15274-15279.
5. Tanaka, T.; Yu, N.-T.; Chang, C. K.; *Biophys. J.* **1987**, *52*, 801-805.
6. Uno, T.; Hatano, K.; Nishimura, Y.; Arata, Y. *Iron. Chem.* **1988**, *27*, 3215-3219.
7. Thomson, A. J.; Johnson, M. K.; Greenwood, C.; Cooding, P. E. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 687-697
8. Thomson, A. J.; Eglinton, D. G.; Hill, B. C.; Greenwood, C. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 167-170.
9. Johnson, M. K.; Eglinton, D. G.; Gooding, P. E.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 699-708.

10. Kent, T. A.; Munck, E.; Dunham, W. R.; Filter, W. F.; Findling, K. C.; Yoshida, J.; Fee, J. A. *J. Biol. Chem* **1982**, *257*, 12489-12492.
11. Tweedle, N. F.; Wilson, L. J.; Carcia-Iniguez, L.; Babcock, G. T.; Palmer, G. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8065-8071.
12. Cheesman, M. R.; Watmough, N. J.; Gennis, R. B.; Greenwood, C.; Thomson, A. J. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 595-602.
13. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Hori.; Sato-Watanabe, M.; Anraku, Y. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4017-4022.
14. Tsubaki, M.; Mogi, T.; Anraku, Y.; Hori, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6065-6072.
15. Thomson, A. J.; Greenwood, C.; Gadsby, P. M. A.; Peterson, J.; Eglinton, D. F.; Hill, B. C.; Nicholls, P. *J. Inorg. Biochem.* **1985**, *23*, 187-197.
16. Lee, S. C.; Scott, M. J.; Kauffmann, K.; Munck, K.; Holm, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 401-402.
17. Scott, M. J.; Holm, R.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11357-11367.
18. Garder, M. T.; Deinum, G.; Kim, Y.; Babcock, G. T.; Scott, M. J.; Holm, R. D. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6878-6884.
19. Scott, M. J.; Lee, S. C.; Holm, R. H. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 4651-4662.
20. Yoshikawa, S.; Caughey, W. S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 7945-7958.
21. Yoshikawa, S.; Mochizuki, M.; Zhao, X.-J.; Caughey, S. *J. Bid. Chem.* **1995**, *270*, 4270-4279.
22. Caughey, W. S.; Dong, A.; Sampath. V.; Yoshikawa, S.; Zhao, X.- Z. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *25*, 81-91.
23. Li, W.; Paimer, G. *Biochemisty*, **1993**, *32*, 1833-1843.
24. Tsubaki, M. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 164-173.
25. Lauraeus, M.; Haltia, T.; Saraste, M.; Wikstrom, M. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 699-705.
26. Puustinen, A.; Wikstrom, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 6122-6129.
27. Mitchell, R.; Mitchell, P.; Rich, P. R. *FEBS Lett.* **1991**, *280*, 321-324.
28. Sherman, D.; Kotake, S.; Inhibe, N.; Copeland, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **1991**, *88*, 4265-4269.
29. Han, J.; Blackburn, N. J.; Loehr, T. M. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3223-3229.
30. Nakamoto, L.; *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; Wiley& Sons, Inc: 1986; Part III, p272.
31. Dorn, S. K.; Dyer, R. B.; Stoutland, P. O.; Woodruff, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6398.
32. Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashina, R.; Yaono, R.; Yamashita, E.; Inoue, N.; Yao, M.; Fei, M. J.; Libeu, C. P.; Mizushima, T.; Yamaguchi, H.; Tomizaki, T.; Tsukihara, T. *Science* **1998**, *280*, 1723-1729.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διαδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του διπυρηνικού κέντρου αίμη-Cu_B των αιμοχαλκοοξειδασών μελετώντας με φασματοσκοπία UV-Vis, FTIR και συντονισμού Raman τη δέσμευση του CO και των ιόντων N₃⁻ και CN⁻. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Παρά την ύπαρξη δύο διαφορετικών διαμορφώσεων της proximal His376 στο κυτόχρωμα aa₃-600 από *B. subtilis* βακτήριο, το CO δεσμεύεται σε μία μόνο διαμόρφωση, στην οποία η proximal His σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Gly351. Αυτός ο δεσμός υδρογόνου θα μπορούσε να ρυθμίζει τη βασικότητα της His376 έτσι ώστε να σταθεροποιεί το Fe⁴⁺=O²⁻ ενδιάμεσο.
- Το N₃⁻ δεσμεύεται σε δύο ξεχωριστές διαμορφώσεις στο διπυρηνικό κέντρο αίμη-Cu_B σχηματίζοντας σύμπλοκα γέφυρας, της μορφής αίμη Fe³⁺-N=N=N-Cu_B²⁺.
- Παρά το μικρότερο μέγεθος του CN⁻ σε σχέση με το N₃⁻, το CN⁻ επίσης σχηματίζει μία γέφυρα στο διπυρηνικό κέντρο, μεταξύ της αίμης και του Cu_B.
- Τα αποτελέσματα για τη δέσμευση του αζιδίου και του κυανίου προτείνουν ότι, στην οξειδωμένη μορφή, ο Cu_B συμμετέχει άμεσα στη δέσμευση εξωγενών ligands σχηματίζοντας σύμπλοκα γέφυρας με τη γειτονική αίμη. Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να αποτελέσουν ένα μοντέλο για το προτεινόμενο περόξυ ενδιάμεσο. Εάν σχηματίζεται είναι πολύ πιθανό να έχει δομή γέφυρας της μορφής Fe³⁺-O⁻-O⁻-Cu_B²⁺.