



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
BABEȘ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITÄT
BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY
TRADITIO ET EXCELLENTIA



Universitatea Babeș-Bolyai
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Rezumatul în extenso al Tezei de Doctorat

Perspective asupra reactivității fierului heminic și non-heminic în contexte relevante biochimic

Doctorand: Cezara-Maria Zăgrean-Tuza

Conducător de Doctorat: Prof. Dr. Radu-Lucian Silaghi-Dumitrescu

Cluj-Napoca
2025

Cuvinte-cheie: fier, reactivitatea fierului, hem, mioglobină, fitoglobină non-simbiotică, prooxidant, antioxidant, acid galic, lipozomi, oxigen, fitoglobină, *Arabidopsis thaliana*, azotit, monoxid de azot, cianamidă, UV-viz, spectroscopie RES, DFT.

Cuprinsul tezei de doctorat

Abstract	3
Considerații generale.....	4
1. Introducere: element Fe-nomenal	5
2. Reacțiile fierului: când polifenolii generează radicali hidroxil și cum să îi folosim în scopuri analitice	11
3. Lipide în pericol: furia oxidativă a mioglobinei contra ”scuturilor” antioxidante. Ce inhibă peroxidarea lipozomilor indusă de mioglobină?	23
4. Frumusețea este în ochiul rezonatorului: testare cu molecule mici a unui situs atipic al unei hemoglobine utilizând spectroscopia de rezonanță de spin combinată cu simulări DFT	37
5. Un ghid de jonglerie cu azotit/monoxid de azot pentru fitoglobine. Reactivitatea hemoglobinelor vegetale față de azotit	47
6. O afacere cu monoxid de azot în hipoxie cu metionin aminopeptidaze și fitoglobina non-simbiotică 1	62
7. pKa și criza de identitate a globinei ferryl: care este natura evenimentului de protonare la pH<5?	72
8. Globi-Wan Kenobi al treilea și amenințarea cianamidei: activitatea asemănătoare catalazei a unei fitoglobine trunchate față de cianamidă	78
9. Concluzii generale.....	90
10. Activitate științifică: articole publicate și participări la conferințe.....	92
11. Mulțumiri	96
12. Bibliografie	97
13. Informații suplimentare	118

Cuprinsul rezumatului in extenso al tezei de doctorat

Considerații generale	3
1. Introducere: element Fe-nomenal.....	4
2. Reacțiile fierului: când polifenolii generează radicali hidroxil și cum să îi folosim în scopuri analitice	6
3. Lipide în pericol: furia oxidativă a mioglobinei contra ”scuturilor” antioxidante. Ce inhibă peroxidarea lipozomilor indusă de mioglobină? ^{19,56}	8
4. Frumusețea este în ochiul rezonatorului: testare cu molecule mici a unui situs atipic al unei hemoglobine utilizând spectroscopia de rezonanță de spin combinată cu simulări DFT	10
5. Un ghid de jonglerie cu azotit/monoxid de azot pentru fitoglobine. Reactivitatea hemoglobinelor vegetale față de azotit ¹⁴⁴	11
6. O afacere cu monoxid de azot în hipoxie cu metionin aminopeptidaze și fitoglobina non-simbiotică 1	13
7. pKa și criza de identitate a feril globinei: care este natura evenimentului de protonare la pH< 5? ..	14
8. Globi-Wan Kenobi al treilea și amenințarea cianamidei: activitatea asemănătoare catalazei a unei fitoglobine trunchate față de cianamidă ²⁶⁸	15
9. Concluzii generale	17
10. Bibliografie.....	18

Considerații generale

Toate capitolele acestei teze fie au fost deja publicate ca lucrări științifice, fie au fost trimise pentru publicare, fie sunt în curs de pregătire, după cum urmează:

Capitolul 2: manuscris trimis la revista Talanta, 2025;

Capitolul 3: publicat ca Zăgrean-Tuza, C., Matei, A., Silaghi-Dumitrescu, R. 2024. A biomimetic assay for antioxidant reactivity, based on liposomes and myoglobin. Journal of Inorganic Biochemistry, 258, 112613;

Atât capitolul 2, cât și capitolul 3 se bazează în parte pe articolul Zăgrean-Tuza, C., Igescu, I., Lupan, A., Silaghi-Dumitrescu, R. 2024. A study of the molecular interactions of hemoglobin with diverse classes of therapeutic agents. Inorganica Chimica Acta, 567, 122053;

Capitolul 4: manuscris trimis la revista Physical Chemistry Chemical Physics, 2025;

Capitolul 5: publicat sub titlul Zăgrean-Tuza, C., Pato, G., Damian, G., Silaghi-Dumitrescu, R., Mot, A. C. 2024. Redox Reactivity of Nonsymbiotic Phytoglobins towards Nitrite. Molecules, 29(6), 1200;

Capitolul 6: manuscris trimis la revista Nature Communications, 2024;

Capitolul 7: publicat ca Zăgrean-Tuza, C., Padurean, L., Lehen, M., Branzanic, A. M., Silaghi-Dumitrescu, R. 2024. Globin feril species: what is the nature of the protonation event at pH< 5? Journal of Biological Inorganic Chemistry, 30, 61–70.

Capitolul 8: manuscris trimis la Inorganic Chemistry, 2025.

1. Introducere: element Fe-nomenal

Marele Eveniment de Oxigenare (MEO) a schimbat în mod semnificativ chimia de la suprafața Pământului, având un impact foarte mare asupra biosferei. În timp ce cationul Fe^{2+} solubil a fost oxidat la Fe^{3+} insolubil, oxidarea cationului Cu^+ la Cu^{2+} a dus la creșterea solubilității acestuia și, prin urmare, la creșterea biodisponibilității. Forma ferică putea fi utilizată în continuare de forme de viață de viață primordiale, cu condiția de a fi "captat" într-o sferă de coordonare. Acest aspect explică într-o măsură de ce organismele acvatice folosesc un spectru mult mai divers de cationi (de exemplu vanadiu, nichel, cadmiu) în scop biocatalitice. MEO a făcut posibile o multitudine de reacții care, în mod normal, ar fi avut loc într-o măsură mai mică în condiții reductive: procese bazate pe radicali - și în special cele care implică specii reactive de oxigen. Oxidarea oxigenului molecular cu un electron produce superoxid, care prin pierderea a încă unui electron se transformă în H_2O_2 ; Fe^{3+} poate fi redus la Fe^{2+} de superoxid sau alte molecule. Fe^{2+} și H_2O_2 pot reacționa în două moduri, fie prin generarea radicalului hidroxil, fie prin generarea unui intermediar de fier cu valență ridicată. Ambele specii se pot angaja într-o varietate de procese chimice; astfel de procese au avut o contribuție semnificativă la apariția lumii vii așa cum o cunoaștem în prezent. Probabil cel mai mare efect al MEO asupra vieții pe Pământ a fost începutul metabolismului aerob. Atunci când oxigenul este utilizat ca acceptor final de electroni, se produce mult mai multă energie în comparație cu metabolismul anaerob. De exemplu, glicoliza produce aproximativ 5 echivalenți ATP, în timp ce ciclul Krebs produce 20 de echivalenți ATP. Această creștere a energiei a permis organismelor preistorice să evolueze și să se diversifice, nu doar să supraviețuiască pur și simplu. Deși eucariotele sunt dependente de oxigen pentru a produce energie, oxigenul în sine este un potențial pericol la adresa supraviețuirii lor; această paradigmă este cunoscută sub numele de "paradoxul oxigenului". Două procese care au la bază generarea radicalilor liberi în prezența fierului (heminic și non-heminic) sunt discutate în capitolele 2 și 3 ale acestei teze.

Pentru a se adapta și a utiliza întregul potențial chimic în condițiile aerobe emergente, organismele au fost nevoite să își extindă biochimiei, în special în ceea ce privește biocatalizatorii. Este important de remarcat faptul că (metalo)proteinele existau cu mult înainte de Marele Eveniment de Oxigenare. Ar fi fost păcat ca potențialul chimic al fierului să nu fie exploatat în biotransformări. Fierul există într-o gamă largă de stări de oxidare; perechea $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ funcționează în reacții acido-bazice sau de transfer de electroni. Potențialul lor redox poate fi ajustat în funcție de identitatea ligandului, diversificând astfel portofoliul chimic. În plus, fierul se poate lega atât la liganzi duri (pe bază de oxigen), cât și la liganzi moi (pe bază de azot și sulf); Fe^{3+} este un centru dur, în timp ce Fe^{2+} are un caracter intermediar.

Proteinele heminice sunt ex exemplu excelent pentru a ilustra versatilitatea chimiei fierului. Forma oxi conține un hem feros care leagă și, în globine, transportă oxigenul. Legarea oxigenului modifică structura electronică a hemului, stabilizând fierul într-o stare de spin jos și permițând eliberarea reversibilă de oxigen în țesuturile care au nevoie de acesta. Forma deoxi, în schimb, nu conține oxigen legat, lăsând Fe^{2+} într-o stare pentacoordinată, cu spin înalt (în unele globine). În capitolele 5 și 6 este analizată reactivitatea oxi- și deoxi fitoglobinelor.

Forma met, cunoscută și sub numele de hem feric (Fe^{3+}), rezultă în urma oxidării Fe^{2+} din oxi sau deoxi. În această stare, fierul heminic nu poate lega oxigenul; cu toate acestea, hemul

feric este capabil să lege o gamă largă de liganzi mici, alții decât oxigenul, deși cu afinități mai mici. În capitolul 4 este discutată și analizată această proprietate a formei met folosind spectroscopia RES și metodologie de modelare moleculară DFT. În plus, forma ferică este esențială în ciclul catalitic al catalazei, care este discutată în capitolul 8.

Interacțiunea dintre formele feroasă și ferică ale hemului este importantă în procesele celulare. Ciclul redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ din citocromul *c* permite transferul de electroni între complexul III (complexul citocromului bc_1) și complexul IV (citocromul *c* oxidază, una dintre cele mai vechi enzime). Ulterior, trio-ul $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$ contribuie, împreună cu un centru de Cu și o tirozină cheie, la producerea de protoni și apă în citocromul *c* oxidază. Ambii citocromi fac parte din lanțul de transfer al electronilor, care este ultima etapă a respirației celulare în organismele aerobe. În plus, această interacțiune feros/feric este esențială pentru ciclul catalitic al citocromului P450: forma ferică în repaus este redusă la cea feroasă, care leagă oxigenul pentru a genera Compusul 0, care la rândul său suferă homoliză la Compusul I care hidroxilează substraturile.

Compusul I este una dintre speciile fier-oxo de înaltă valență întâlnite în biochimie. Fe^{4+} este o stare redox rară, dar implicarea sa în transformarea legăturilor chimice puternice este importantă din punct de vedere fiziologic și inspiră catalizatori alternativi. Compusul I (Fe(IV)=O cuplat cu un radical liber pe bază de porfirină) este una dintre cele mai reactive specii heminice captate și caracterizate până în prezent. Acesta face parte integrantă din ciclul catalitic al citocromilor P450 și al peroxidazelor care permit hidroxilarea legăturilor C-H sau descompunerea peroxidului de hidrogen. În capitolul 8 este discutată ipoteza implicării unui compus I al globinei în hidroxilarea cianamidei.

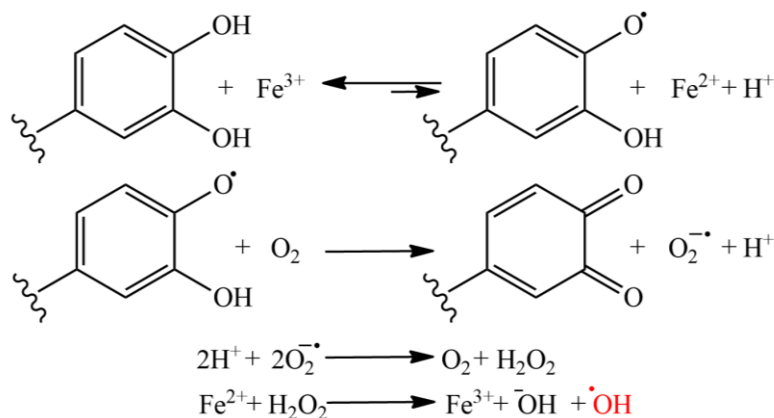
Factorii care ajustează reactivitatea Compusului I sunt încă în dezbatere, dar unele teorii câștigă teren, cum ar fi cele bazate pe conceptul de *Two State Reactivity* sau pe tăria legăturii O-H D(OH) formată în timpul etapei de abstracție a atomului de H, înrădăcinată în principiul Bell-Evans-Polanyi^{1,2}. Compusul I generează, la rândul său, Compusul II, un intermediar heme Fe(IV)=O curat. În capitolul 7 este discutată starea de protonare a formei feril din globine. În mod normal, potențialul Compusului II este prea scăzut pentru a permite hidroxilarea sau halogenarea substraturilor, dar poate totuși să participe la reacții de transfer de electroni sau să genereze radicali liberi, după cum este descris în capitolul 3.

În capitolele următoare, dorim să înțelegem comportamentul și reactivitatea hemului în proteine, în special în fitoglobine. Este utilizată o gamă complexă de metodologii care include spectroscopia (în special UV-viz și rezonanța electronică de spin, RES - deși în lucrările legate de teză candidatul explorează și utilizarea fluorescenței, rezonanța magnetică nucleară RMN și Mössbauer), biologie moleculară cu proteine recombinante, purificarea și caracterizarea acestora, cinetică (*steady-state*, *stopped-flow* și, în lucrările legate de teză, *freeze-quench rapid*), precum și calcule [DFT și docking].

2. Reacțiile fierului: când polifenolii generează radicali hidroxil și cum să îi folosim în scopuri analitice ³

În acest capitol, este discutată dezvoltarea și optimizarea unei noi metode analitice pentru determinarea activității prooxidante. Acest test prooxidant are la bază procese relevante din punct de vedere fiziologic și presupune evaluarea capacității polifenolilor de a genera radicali liberi. Pentru a servi scopului acestei teze de doctorat, mecanismul care stă la baza efectului prooxidant este studiat în detaliu, în timp ce parametri care performanța analitică a metodei sunt neglijăți; acest aspect este tratat în detaliu în articolul științific trimis la revista *Talanta* pentru publicare. O atenție deosebită este acordată reactivității fierului față de polifenoli, precum și reactivității de tip Fenton care rezultă din aceasta.

Principiul metodei prooxidante se bazează pe capacitatea Fe^{3+} de a oxida polifenolii la semichinone, după cum se arată în schema 1⁴. Compusul feric este transformat în forma sa feroasă și rămâne (ideal) în această stare de oxidare, deoarece Fe^{3+} nu este capabil să genereze radicalul hidroxil. Odată format, radicalul semichinonă poate transfera în continuare un electron oxigenului molecular, dând naștere radicalului anionic superoxid. Acesta din urmă suferă o reacție de disproporționare. Peroxidul de hidrogen astfel format reacționează cu Fe^{2+} într-o reacție de tip Fenton. Radicalul hidroxil rezultă în urma secvenței de reacții.



Schema 1.

Radicalul hidroxil este foarte reactiv și doar câteva abordări experimentale permit detectarea și determinarea acestuia. O modalitate foarte simplă de detectare a radicalilor liberi reactivi mici este prin captarea spinului. În astfel de experimente, o moleculă de tip nitronă (denumit *capcană de spin*) captează radicalul liber.

Metodele de detecție mai accesibile utilizează substraturi care suferă modificări semnificative ale absorbției UV-vis sau ale profilului de fluorescență atunci când este prezent radicalul hidroxil. Un astfel de substrat este 2-metil-4(5)-nitroimidazolul, care este atacat de radicalul hidroxil pentru a produce azotit. Deși această reacție în sine nu are o deplasare spectrală semnificativă, azotiții pot fi detectați cu reactivul Griess, un test analitic foarte specific și sensibil.

Au fost efectuate experimente de control pentru a demonstra principiul de funcționare cu Fe^{3+} -EDTA și acid galic la pH 7. Producția de radical HO a fost testată cu

2-metil-4(5)-nitroimidazol și reactivul Griess. Nu este detectată producerea de radicali hidroxil atunci când unul sau mai mulți reactanți (Fe^{3+} -EDTA, acid galic și/sau 2-metil-4(5)-nitroimidazol) sunt eliminați (1-6 în Figura 1). Pentru a investiga rolul oxigenului în acest sistem de tip Fenton, testul a fost efectuat în condiții normoxice, anaerobe și îmbogățite cu oxigen (7-9 în Figura 1). Rezultatele indică faptul că prezența oxigenului este esențială reacției Fenton, deoarece absența oxigenului molecular duce la diminuarea formării radicalilor hidroxil (8 în Figura 1). Îmbogățirea cu oxigen decu la un randament de trei ori mai mare de radical hidroxil (9 în Figura 1). Pe baza acestor considerente, oxigenul este într-adevăr esențial în această secvență de reacție de tip Fenton.

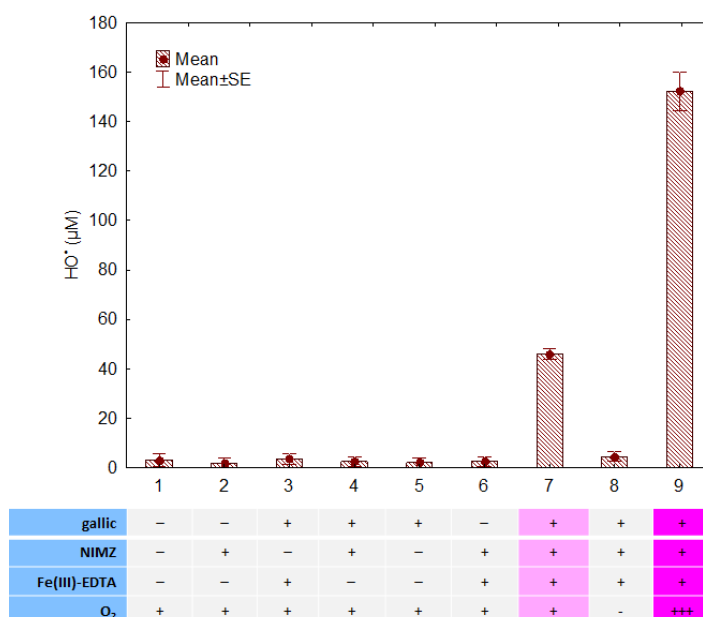


Figura 1. Experimente control cu acid galic și Fe(III)-EDTA. NIMZ reprezintă 2-metil-4(5)-nitroimidazol.

În acest capitol este studiată capacitatea acidului galic de a produce radicali hidroxil în prezența unui număr de complecși Fe^{3+} , într-un interval de pH și în prezența solvenților organici. În plus, discutăm observațiile noastre din perspectivă structurală și mecanică. Au fost utilizate tehnica de captare a spinului și spectroscopia RES în banda X în undă continuă pentru a verifica detecția UV-viz bazată pe Griess. Polifenolii în prezența Fe^{3+} -EDTA la pH 10 produc cei mai mulți radicali hidroxil și sistemul poate fi utilizat ca o metodă de determinare a caracterului prooxidant.

3. Lipide în pericol: furia oxidativă a mioglobinei contra ”scuturilor” antioxidante. Ce inhibă peroxidarea lipozomilor indusă de mioglobină? ^{19,56}

O metodologie bazată pe inhibarea peroxidării lipozomilor a fost dezvoltată de grupul nostru (ILA-proteină: inhibarea autooxidării lipozomilor de către proteine)⁵⁻⁸. O astfel de metodologie poate fi utilizată pentru a evalua capacitatea antioxidantă a unei game largi de compuși, indiferent de polaritatea acestora. Peroxidarea lipozomală poate fi accelerată de o serie de proteine heminice și chiar de hemul liber^{5,9-17}. Așa cum este ilustrat în Figura 2 A, proteinele heminice pot acționa ca inițiatori ai reacțiilor radicalice datorită chimiei fierului heminic prin descompunerea catalitică de tip pseudoperoxidază (sau Fenton) a urmelor de peroxizi și hidroperoxizi deja prezenți în probele de lecitină. Atunci când citocromul *c* este înlocuit cu mioglobina drept catalizator, autooxidarea lipozomală necesită perioade mult mai scurte pentru a se finaliza, cu o dependență clară de concentrația de mioglobină (Figura 2 B).

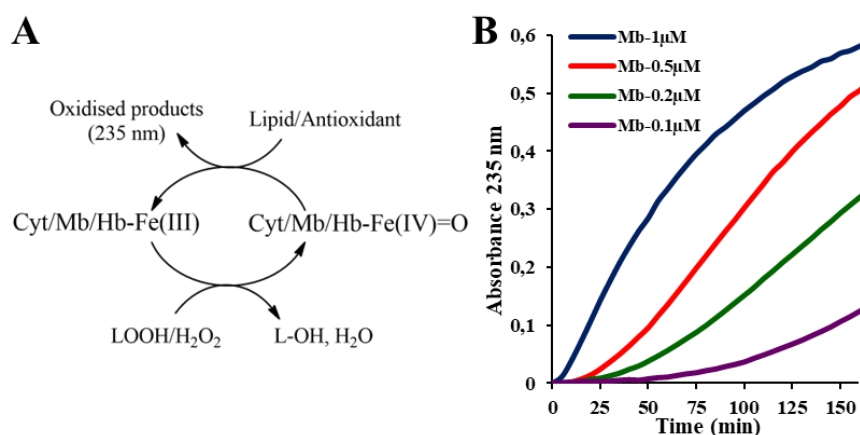


Figura 2. A. Schema de reacție propusă care evidențiază rolul hemului în peroxidare. B. Peroxidarea lipozomilor (0,5 mg/mL) în absența H₂O₂ ca dependentă de mioglobină.

După cum s-a constatat anterior în analizele IC₅₀ sau K_M utilizând alte teste antioxidante, potențialele redox ale antioxidantilor nu se corelează cu IC₅₀ILA-Mb¹⁸. Prin urmare, se poate presupune că mecanismul antioxidant evaluat în testul ILA-Mb nu depinde exclusiv de transferul de electroni sau de atomi de hidrogen între moleculele mici (de exemplu, antioxidanții și radicalii pe bază de lipide). Legarea specifică, interacțiunea și recunoașterea moleculară a antioxidantului de către lipozomi sau mioglobină sunt cel mai probabil implicate.

Pentru a explora legarea moleculelor mici la mioglobină la nivel teoretic, am efectuat calcule de docking folosind cei cinci antioxidanți selectați (ascorbat, catechin, galat, ferulat și rutin) ca liganzi. Situsul de legare al catechinului (cele mai mari afinități) este prezentat în Figura 3; catechinul formează o legătură de hidrogen cu gruparea propionat. Propionatul poate facilita un mecanism de tip PCET mai eficient atât prin legături de hidrogen, cât și prin interacțiuni electrostatice cu substraturile (în acest caz, cu antioxidanții mici). Această observație poate ajuta la explicarea comportamentului ascorbatului și catechinului: ambele formează cel puțin o legătură de hidrogen cu propionatul (antioxidanții sunt donatorii de H).

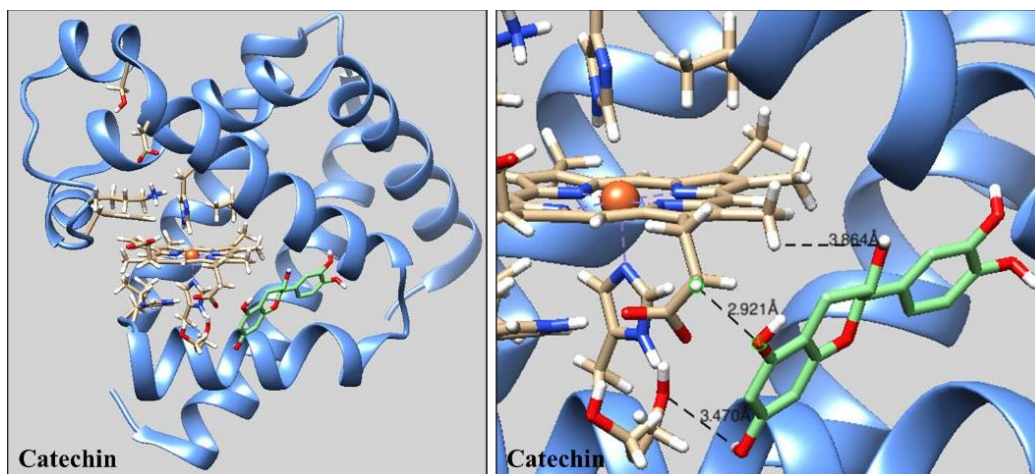


Figura 3. Situsul de legare cel mai favorabil prezis al catechinului la mioglobină.

În ceea ce privește interacțiunile cu lipidele, toți cei cinci antioxidanți și proba hidrofobă, α -tocoferolul, au indus modificări ale semnalului EPR al 16-MeDSAE ca urmare a interacțiunii lor cu lipozomii (Figura 4). Tratatamentul cu ascorbat, catechin, ferulat și galat produce profiluri spectrale identice: o singură componentă, cu o lărgire pronunțată a liniei spectrale, cu un timp de corelație de aproximativ $1,5 \times 10^{-9}$ s pentru toate cele patru spectre, ceea ce indică un regim de dinamică lentă. Pe de altă parte, tratamentul cu α -tocoferol și, surprinzător, rutin, a schimbat drastic forma spectrului 16-MeDSAE, prin îngustarea liniei spectrale. Componenta spectrală mai accentuată în cazul ambilor antioxidanți este caracterizată de un timp de corelație de 1×10^{-10} s, indicând un regim de dinamică rapidă, care poate fi corelat cu o creștere a fluidității membranei.

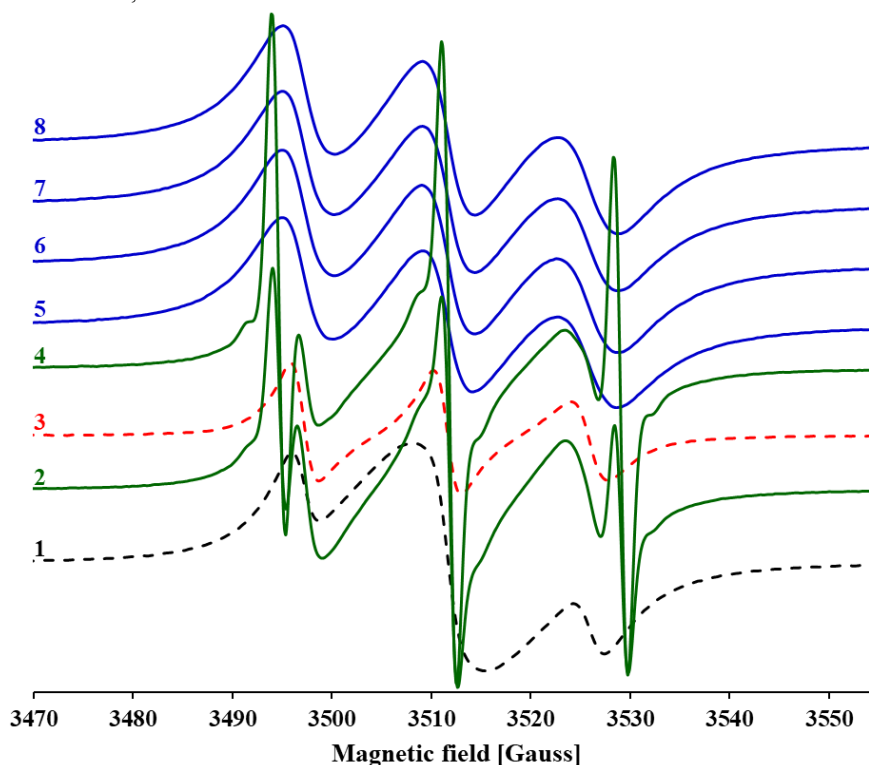


Figura 4. Spectre RES după cum urmează: 1- 16-MeDSAE în soluție tampon; 3- Lipozomi etichetați cu 16-MeDSAE în soluție tampon (control) tratați cu rutin(2), α -tocoferol(4), ascorbat(5), catechin(6), ferulat(7) și galat(8).

4. Frumusețea este în ochiul rezonatorului: testare cu molecule mici a unui situs atipic al unei hemoglobine utilizând spectroscopia de rezonanță de spin combinată cu simulări DFT¹⁹

Sistemele heminice în stare ferică sunt candidați optimi pentru spectroscopia RES. Fe^{3+} are cinci electroni d care pot fi dispuși fie într-o configurație cu spin înalt ($S=5/2$), fie într-o configurație cu spin jos ($S=1/2$), în funcție de liganzi. Semnalele RES ale hemului feric tind să aibă fie o geometrie axială (în configurație de spin înalt), fie rombică (în configurație de spin jos). Datorită valorilor ridicate ale cuplajului spin-orbită, astfel de semnale EPR pot fi observate de obicei la temperaturi foarte scăzute²⁰.

AtHb3 (hemoglobina 3 trunchată din *Arabidopsis thaliana*) este o fitogloblină non-simbiotică foarte interesantă. Îi lipsește histidina distală sau orice alt aminoacid distal²¹. Cavitățile de deasupra hemului este mai mare decât cea din globinele uzuale și are un caracter mai hidrofîl, cu aminoacizi care s-ar angaja cu ușurință în legături de hidrogen pentru stabilizarea liganzilor: Tyr44, Gln71 și Trp111.

În acest capitol explorăm mai mulți aducți ferici ai AtHb3 de spin jos prin spectroscopie RES utilizând o gamă de liganzi sondă mici care se leagă de fier și prezintă o diversitate de structuri electronice, preferințe de stare de spin, precum și izomerie de legare (Figura 5). Unul dintre acești complecși AtHb3 ne-a atras atenția în special datorită timpului său de relaxare ridicat. În consecință, explorăm mai multe proprietăți determinate din spectrul RES în undă continuă sau calculate utilizând DFT. Speculăm și evaluăm influența unor proprietăți precum tetragonalitatea, rombicitatea, densitatea de spin și componentele hiperfine.

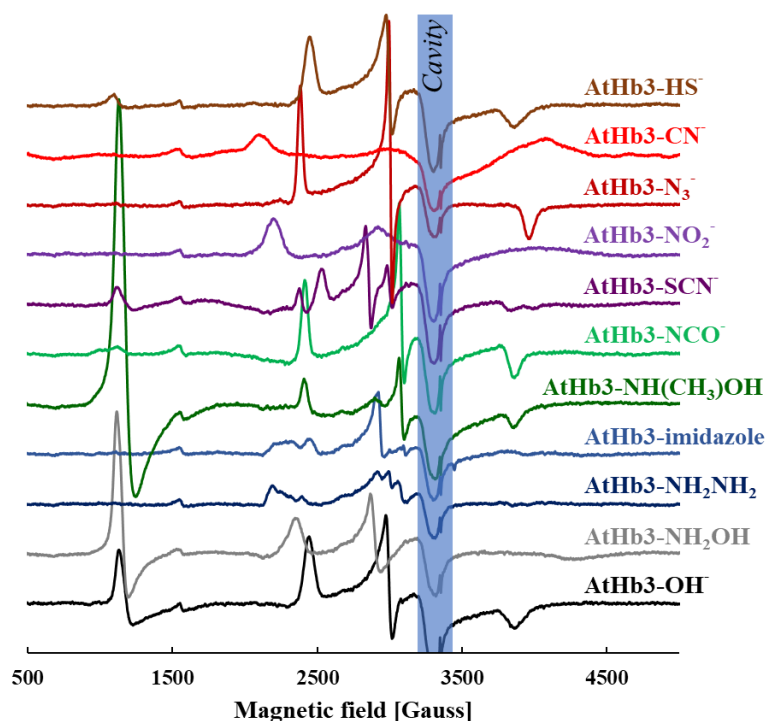


Figura 5. Spectrele RES în bandă X și undă continuă brute ale aducților AtHb3 selectați (300 μM în tampon Tris 200 mM pH 7) măsurate la 100 K. Semnalul cavității este marcat. Spectrele sunt prezentate fără nicio prelucrare matematică.

fitoglobine și mioglobină (Figura 8 este ilustrativă pentru AtHb1). Reacția oxiAtHb1 cu azotitul prezintă un timp de întârziere mult mai lung în comparație cu AtHb2. OxiAtHb3 a prezentat un comportament cinetic diferit, cu prezența doar a fazei de propagare, în oricare dintre condițiile investigate. Deoarece a fost detectată o globină de valență înaltă (feril) ca intermediar în experimente anterioare^{14,33,34}, este rezonabil să presupunem că oxiAtHb3 prezintă un comportament total diferit în prezența azotitului datorită implicării acestui intermediar.

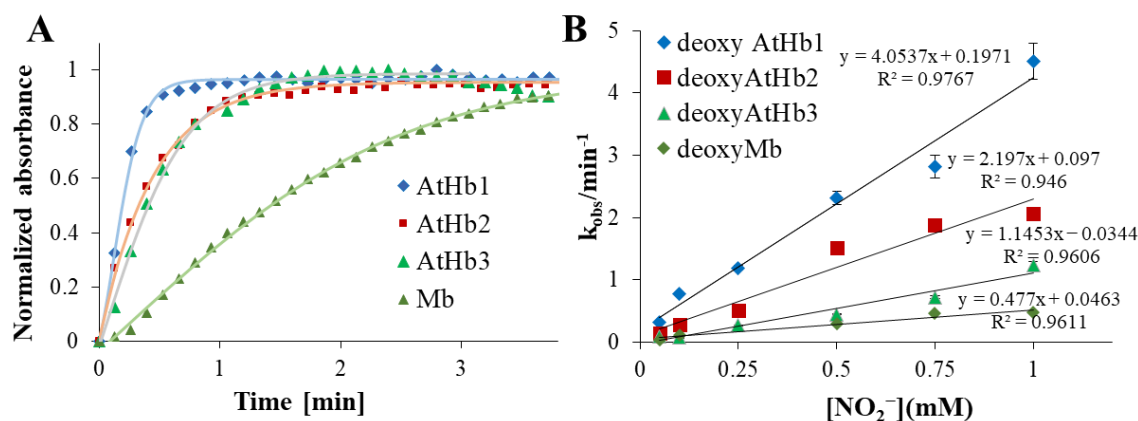


Figura 7. Cinetica reacției azotitului cu deoxihemoglobinele non-simbiotice din *A. thaliana* și deoxihemoglobina din inimă de cal. **A.** Profilul cinetic al fiecărei Hb și Mb în prezența a 1 mM azotit la 413 nm pentru AtHb1, 412 nm pentru AtHb2, 419 nm pentru AtHb3 și 422 nm pentru Mb. **B.** Diagrama constantelor de viteză observate în funcție de concentrația de azotit (pH 7, 25°C).

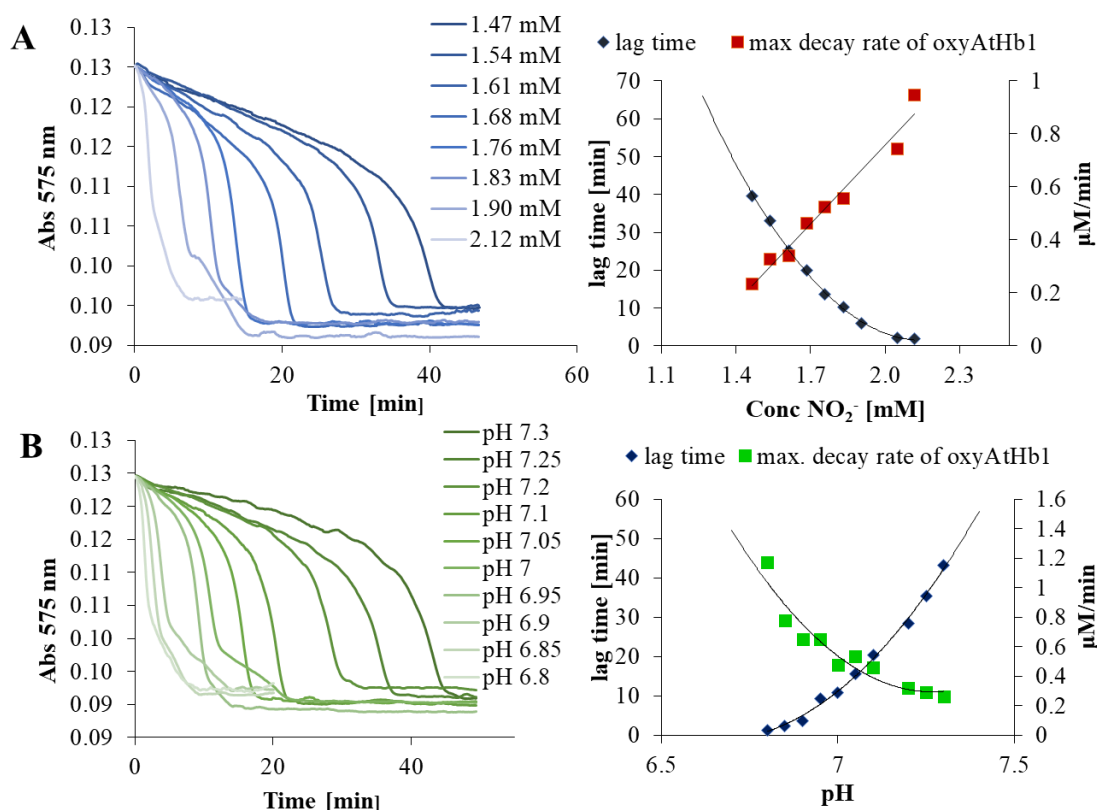


Figura 8. Profile cinetice și timpii de întârziere corespunzători, precum și vitezele pentru reacția dintre 8 μ M oxiAtHb1 și azotit **A.** la diferite concentrații de azotit (1,47-2,12 mM) în 50 mM tampon fosfat pH 7 și **B.** la diferite valori ale pH-ului (6,8-7,3) cu 1,83 mM NaNO₂.

Această reactivitate cu două fețe față de azotit este cel mai probabil mai mult decât un simplu răspuns la hipoxie. Reactivitatea oxifitoglobinelor față de azotat a fost explorată anterior *in vivo* și poate constitui o cale respiratorie alternativă în timpul hipoxiei, deoarece azotatul joacă rolul de acceptor intermediar de electroni.³⁵⁻³⁸ Azotitul ar fi produsul reducerii azotatului, dar nu s-ar acumula în plante, deoarece ar fi ulterior redus la monoxid de azot în hipoxie. Reducerea azotitului poate fi cuplată cu translocarea protonilor pentru a menține biosinteza ATP.³⁹ Ceea ce este și mai interesant este că, pentru a asigura o formă de respirație anaerobă, alte enzime, probabil oxifitoglobinele, pe baza mecanismului discutat în acest capitol, pot oxida NO înapoi la azotat, astfel încât ciclul să poată continua.⁴⁰

6. O afacere cu monoxid de azot în hipoxie cu metionin aminopeptidaze și fitoglobina non-simbiotică 1⁴¹

Îndepărtarea metioninei N-terminale este o modificare post-translațională esențială în aproximativ 60-70% din proteine și este efectuată de metionin aminopeptidazele (MAP). Datorită funcției lor fundamentale, activitatea unor astfel de enzime trebuie controlată strict, în principal prin modificări posttranslaționale⁴². În acest capitol, discutăm modul în care reactivitatea metionin aminopeptidazelor din *A. thaliana* poate fi reglată prin nitrozilarea metalului și a cisteinelor. Pornind de la disucția din capitolul anterior, explorăm un posibil transfer de monoxid de azot de la o metionin aminopeptidază nitrozilată la hemoglobina 1 non-simbiotică din *A. thaliana*.

La adăugarea GS¹⁴NO sau GS¹⁵NO la MAP-uri, apare un semnal RES bine definit de intensitate ridicată la valoarea g 2,004. Aceasta este o indicație clară a unui complex cu metal nitrozilat, foarte probabil cu un centru de fier non-heminic, cu o contribuție importantă din partea unei cisteine din vecinătatea^{43,44}. Formarea unui MAPx nitrozilat a dus la inhibarea parțială a activității în ambele MAP-uri testate.

Dovezile experimentale ale colaboratorilor noștri de la Universidad de Salamanca arată că metionin aminopeptidazele din *Arabidopsis* sunt implicate în răspunsurile la hipoxie și activitatea lor este reglată prin nitrozilare.⁴¹ Arătăm cum metionin aminopeptidazele transferă NO la AtHb1 prin spectroscopie RES, o interacțiune cu posibilă relevanță *in vivo*.

7. pKa și criza de identitate a feril globinei: care este natura evenimentului de protonare la pH < 5? ⁴⁵

În acest capitol sunt prezentate măsurătorile UV-viz (inclusiv *stopped-flow*) asupra mioglobinei feril (Mb) într-un interval larg de pH (2-10), arătând pentru prima dată banda Soret a acestei specii la pH < 5. Sunt discutate comparații între comportamentul formei feril și cel al Mb met și oxy în aceleași condiții. De asemenea, pentru a separa posibilele contribuții ale denaturării proteinelor sub pH 5, sunt efectuate experimente de control cu un agent alternativ de denaturare - guanidina (Gu). Descriem eforturile detaliate de a raționaliza diferențele de spectre dintre feril Mb la pH acid vs. neutru/bazic.

Figura 9 reiterează datele UV-viz raportate anterior privind feril Mb obținute din experimentele de salt de pH și le îmbunătățește acum cu date nou colectate în regiunea Soret. Valoarea pKa calculată pe baza regiunii Soret este 4,6 (prin aplicarea ecuației Henderson-Hasselbach asupra raportului dintre absorbțiile de 418 nm și 422 nm), care este în acord rezonabil cu pKa determinat din regiunea α și β (4,2 în Figura 9 sau 4,6 într-o altă lucrare⁴⁶). În general, experimentele control suplimentare sugerează că un eveniment de protonare semnificativ are loc la acidificarea intermediarului feril, dar nu și la acidificarea speciilor met sau oxi ale Mb, și nici la denaturarea proteinei. Prin urmare, credeam că acest eveniment de protonare (și schimbarea spectrală ulterioară) sunt intrinseci intermediarului feril mai degrabă decât proteinei în general.

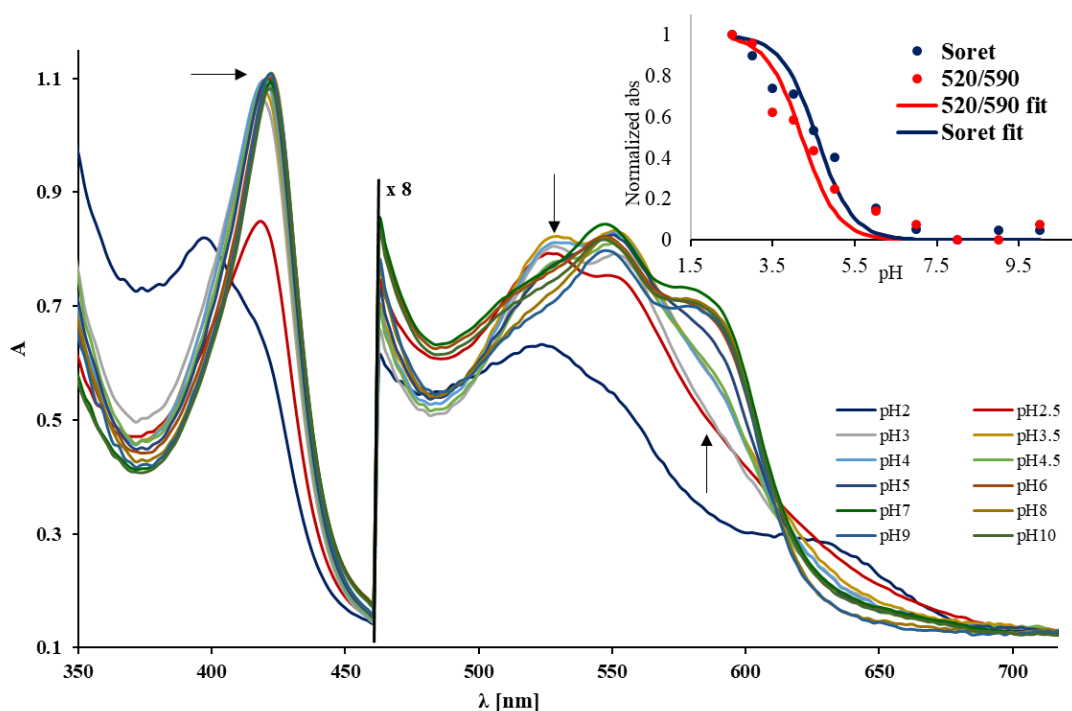


Figura 9. Spectre UV-viz colectate într-un experiment *stopped-flow* de titrare a 6,7 μ M feril Mb cu 120 mM tampon universal de diverse valori ale pH-ului la temperatura camerei. Inserția prezintă curbele de titrare ale feril Mb determinate din experimentul pH-jump. pKa calculat folosind curba derivată din Soret este 4,6 (4,58), în timp ce pKa determinat pe baza modificărilor α și β este 4,2.

8. Globi-Wan Kenobi al treilea și amenințarea cianamidei: activitatea asemănătoare catalazei a unei fitoglobine trunchate față de cianamidă⁴⁷

S-a observat că cianamida poate interacționa cu proteinele heminice ferice cu efecte de otrăvire asupra organismelor^{48,49}, efect amplificat de consumul de alcool. La rândul său, cianamida a fost utilizată ca tratament împotriva consumului de alcool excesiv⁵⁰, deoarece unul dintre metaboliții săi inhibă aldehyd dehidrogenază.^{51–54} Dovezile experimentale sugerează că cianamida este hidroxilată de Compusul I al catalazei la N-hidroxicianamidă, care la rândul său se descompune în cianură și HNO .^{55–57} Cavitatea de legare relativ spațioasă a AtHb3⁵⁸ și reactivitatea sa față de H_2O_2 pot fi considerate premise pentru o activitate de tip peroxidază/catalază. Pentru a explora posibilitatea acestei activități, cianamida a fost utilizată ca substrat.

Adăugarea de apă oxigenată la complexul cianamidă-AtHb3 declanșează modificări spectrale interesante, după cum se arată în Figura 10. Benzile α și β se deplasează într-un mod hipocromic la 534 și 562 nm, prezentând caracteristicile unei specii cu spin jos.

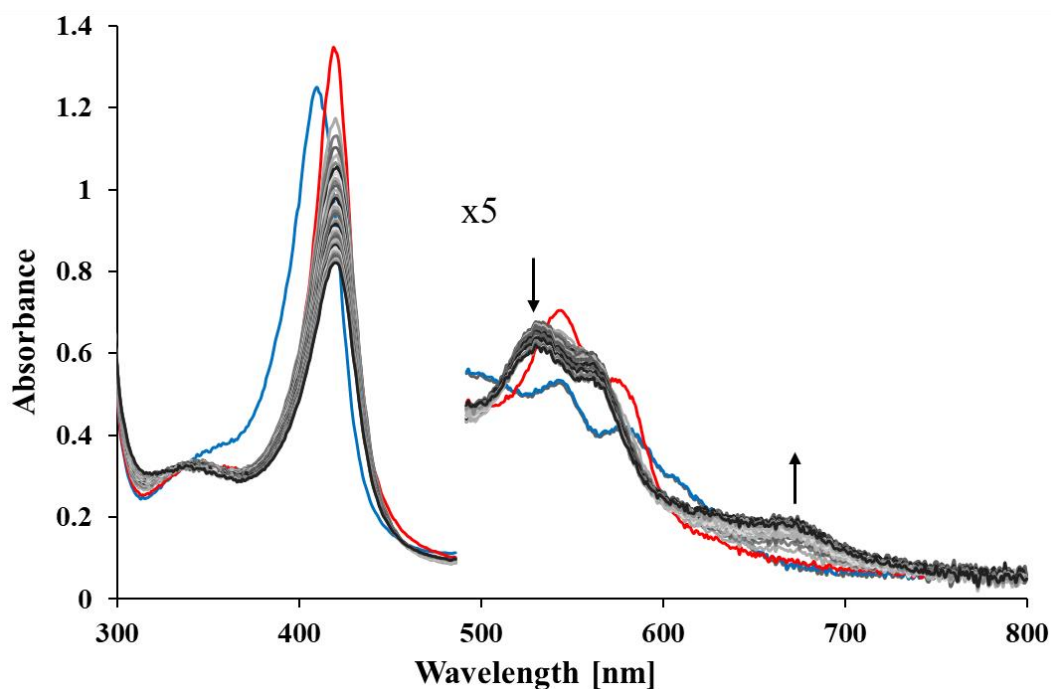


Figura 10. Cinetica UV-viz a reacției dintre aductul metAtHb3- NH_2CN și peroxidul de hidrogen. MetAtHb3 (spectru albastru) este transformat în metAtHb3- NH_2CN (spectru roșu), care la rândul său reacționează cu peroxidul de hidrogen pentru a genera o nouă specie (spectre gri/negru).

Capacitatea globinelor de a transforma ABTS în forma sa de radical liber este utilizată pentru a măsura activitatea lor de pseudoperoxidază.⁵⁹ Adăugarea de cianamidă inhibă peroxidarea ABTS într-un mod dependent de concentrație, cu o constantă de inhibiție egală cu 1,6 mM (Figura 11). Luate împreună, toate observațiile experimentale par să indice hidroxilarea cianamidei într-un mod similar cu cel catalizat de catalază.

Mecanismul care descrie reacția dintre aductul metAtHb3-cianamidă și peroxidul de hidrogen pare să cuprindă următoarele etape:

1. Cianamida disociază de metAtHb3 în prezența peroxidului de hidrogen; metAtHb3 este transformat în compusul I AtHb3.

2. O mică parte din Compusul I AtHb3 hidroxilează legătura N-H din grupa amino a cianamidei pentru a genera N-hidroxicianamidă, care se descompune în cianură și posibil N_2O .
3. În același timp, Compusul I AtHb3 este transformat rapid în Compusul II AtHb3 (ferilAtHb3); lipsa histidinei distale și a situsului de legare hidrofil, împreună cu lipsa unui agent reducător eficient duc cel mai probabil la degradarea proteinei.

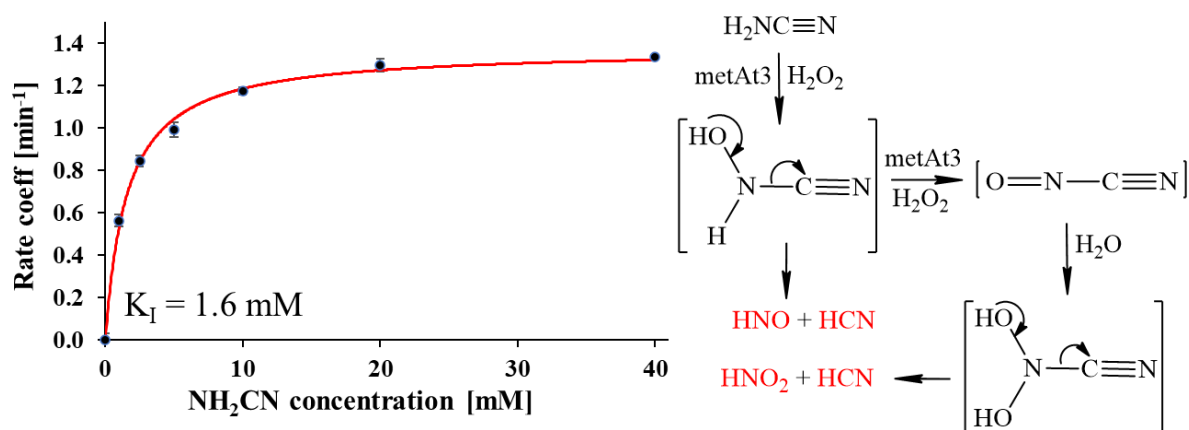


Figura 11. Stânga: Graficul Michaelis-Menten cu concentrație variabilă de cianamidă în prezența a 20 nM metAt3, 0,5 mM ABTS și 2 mM H_2O_2 la pH 7,4. Dreapta: Un mecanism propus pentru descompunerea cianamidei în prezența catalazei⁵⁷ adaptat pentru metAtHb3.

Nu există dovezi clare în sprijinul reactivității AtHb3 față de cianamidă *in vivo*, dar trebuie remarcat faptul că nicio altă enzimă (cu excepția catalazei) nu prezintă o astfel de reactivitate (asemănătoare catalazei) față de acest substrat. AtHb3 ar putea fi prima globină (fără modificări genetice) care efectuează reacții de hidroxilare utilizând Compusul I și nu o cale bazată pe radicalii liberi. Capturarea și caracterizarea experimentală a Compusului I AtHb3 ar putea aprofunda înțelegerea noastră actuală legată de intermediarii hemului de valență înaltă, în special a modului în care hemurile legate de histidină ar putea stabiliza intermediarii de valență înaltă pentru a efectua reacții de hidroxilare.

9. Concluzii generale

În capitolul 2 a fost discutat echilibrul complex dintre comportamentul antioxidant și prooxidant al polifenolilor, cu accent pe potențialul acestora de a genera radicali hidroxil în prezența compușilor de fier. Prin optimizarea unei metode colorimetrice de evaluare a activității prooxidante am dezvoltat un instrument analitic nou pentru a investiga chimia de tip Fenton a polifenolilor de proveniență vegetală. Rezultatele noastre demonstrează că structura polifenolilor, pH-ul și sfera de coordinare a fierului influențează semnificativ generarea radicalilor liberi.

Mecanismul peroxidării lipozomale în prezența mioglobinei și inhibarea acesteia de către polifenoli au fost analizate în capitolul 3. Activitatea inhibitoare a fost analizată din punctul de vedere al mecanismului, subliniindu-se importanța interacțiunilor moleculelor mici atât cu lipozomii, cât și cu globina.

În capitolul 4, am investigat aducții AtHb3 ferici de spin jos utilizând spectroscopia RES. Investigațiile noastre au evidențiat variații semnificative în anizotropia și comportamentul de relaxare al acestora. Anumiți complecși în special prezintă comportamente de relaxare care deviază de la așteptările convenționale, indicând efecte electronice complexe dincolo de simplul efect al cuplajului spin-orbită. Combinarea datelor experimentale RES cu calculele DFT a oferit informații valoroase cu privire la factorii fundamentali care guvernează proprietățile de spin ale sistemelor heminice, cum ar fi densitatea de spin și componentele hiperfine.

În ciuda diferențelor structurale și a posibilelor diferențe funcționale, toate cele trei hemoglobine vegetale non-simbiotice din *A. thaliana* prezintă o activitate asemănătoare celei a azotit reductazei în condiții anaerobe. După cum s-a discutat în capitolul 5, toate cele trei fitoglobine prezintă constante de viteză mai mari decât ale mioglobinei mamifere. Toate globinele studiate au reacționat cu azotitul și în condiții aerobe; dintre acestea, AtHb3 este de departe cea mai reactivă. Implicarea intermediarului feril este, de asemenea, discutată pe baza observațiilor spectroscopice și cinetice.

Capitolul 6 oferă dovezi convingătoare că monoxidul de azot ar putea modula activitatea metionin aminopeptidazelor (MAP) din *Arabidopsis thaliana* atât prin nitrozilare metalului, cât și prin S- nitrozilare. Experimentele noastre demonstrează că MAP-urile s-ar putea angaja în reacții de trans-nitrozilare cu fitoglobina non-simbiotică AtHb1, transferând NO și contribuind la semnalizare în timpul hipoxiei în plante.

În capitolul 7 arătăm cum feril Mb suferă un eveniment de protonare sub pH 5, după cum arată datele *pH jump* obținute prin *stopped-flow* (în UV-viz). Acest eveniment este caracterizat prin deplasări hipsocromice în banda Soret (~ 5 nm), precum și în benzile α și β (~ 20-40 nm) și o reducere de ~ 10 nm a diferenței de energie dintre benzile α și β . Experimentele de control sugerează că evenimentul de protonare este localizat pe atomul de oxigen legat de fier, parte integrantă a intermediarului Fe(IV)=O.

Capitolul 8 propune o reactivitate asemănătoare catalazei a fitoglobinei 3 trunchate din *A. thaliana* față de cianamidă. Modificările spectrale observate sunt în concordanță cu implicarea intermediarilor heminici de valență ridicată, asemănători cu cei găsiți în catalază. Datele cinetice relevă o activitate pseudoperoxidazică a AtHb3, care este semnificativ inhibată de cianamidă, ceea ce sugerează un mecanism de reacție cu de tip *inner sphere*. Investigațiile ulterioare sunt în concordanță cu implicarea Compusului I AtHb3 ca intermediar. Această activitate asemănătoare catalazei a AtHb3 față de cianamidă pare a fi unică printre enzimele care conțin hem până în prezent, cel puțin.

10. Bibliografie

- (1) Shaik, S.; Danovich, D.; Fiedler, A.; Schröder, D.; Schwarz, H. Two-State Reactivity in Organometallic Gas-Phase Ion Chemistry. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78* (6), 1393–1407. <https://doi.org/10.1002/HLCA.19950780602>.
- (2) Mayer, J. M. Hydrogen Atom Abstraction by Metal-Oxo Complexes: Understanding the Analogy with Organic Radical Reactions. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (8), 441–450. <https://doi.org/10.1021/AR970171H/ASSET/IMAGES/LARGE/AR970171HFA01E.JPEG>.
- (3) Zagrean-Tuza, C.; Mot, A. C. Prooxidant Assay Based on the Fenton-like Reactivity of Polyphenols. *Talanta* **2025**, *submitted*.
- (4) Mot, A. C.; Damian, G.; Sarbu, C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Redox Reactivity in Propolis: Direct Detection of Free Radicals in Basic Medium and Interaction with Hemoglobin. *Redox Rep.* **2009**, *14* (6), 267–274. <https://doi.org/10.1179/135100009X12525712409814>.
- (5) Mot, A. C.; Bischin, C.; Muresan, B.; Parvu, M.; Damian, G.; Vlase, L.; Silaghi-Dumitrescu, R. Antioxidant Activity Evaluation by Physiologically Relevant Assays Based on Haemoglobin Peroxidase Activity and Cytochrome C-Induced Oxidation of Liposomes. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30* (11), 1315–1319. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1054824>.
- (6) Bischin, C.; Deac, F.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Worrall, J. A. R. A. R.; Rajagopal, B. S. S.; Damian, G.; Cooper, C. E. E. Ascorbate Peroxidase Activity of Cytochrome C. *Free Radic. Res.* **2011**, *45* (4), 439–444.
- (7) Dezsi, S.; Badarau, A. S.; Bischin, C.; Vodnar, D. C. C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Gheldiu, A.-M. M.; Mocan, A.; Vlase, L. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Phenolic Profile of Eucalyptus Globulus Labill. and Corymbia Ficifolia (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson Leaves. *Molecules* **2015**, *20* (3), 4720–4734. <https://doi.org/10.3390/molecules20034720>.
- (8) Benedec, D.; Hanganu, D.; Oniga, I.; Filip, L.; Bischin, C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Tiperciuc, B.; Vlase, L. Achillea Schurii Flowers: Chemical, Antioxidant, and Antimicrobial Investigations. *Molecules* **2016**, *21* (8), 1050. <https://doi.org/10.3390/molecules21081050>.
- (9) Gorbunov, N. V.; Osipov, A. N.; Day, B. W.; Zayasrivera, B.; Kagan, V. E.; Elsayed, N. M. Reduction of Ferilmyoglobin and Ferilhemoglobin by Nitric-Oxide - a Protective Mechanism against Feril Hemoprotein-Induced Oxidations. *Biochemistry* **1995**, *34* (20), 6689–6699.
- (10) Yoshida, Y.; Kashiba, K.; Niki, E. Free Radical-Mediated Oxidation of Lipids Induced by Hemoglobin in Aqueous Dispersions. *Biochim. Biophys. Acta-General Subj.* **1994**, *1201* (2), 165–172.
- (11) Rogers, M. S.; Patel, R. P.; Reeder, B. J.; Sarti, P.; Wilson, M. T.; Alayash, A. I. Prooxidant Effects of Cross-Linked Hemoglobins Explored Using Liposome and Cytochrome-C-Oxidase Vesicle Model Membranes. *Biochem. J.* **1995**, *310*, 827–833.
- (12) Holt, S.; Reeder, B. J.; Wilson, M. T.; Harvey, S.; Morrow, J. D.; Roberts 2nd, L. J.; Moore, K.; Roberts, L. J.; Moore, K.; Roberts 2nd, L. J.; Moore, K.; Roberts, L. J.; Moore, K. Increased Lipid Peroxidation in Patients with Rhabdomyolysis. *Lancet* **1999**, *353* (9160), 1241.
- (13) Reeder, B. J.; Sharpe, M. A.; Kay, A. D.; Kerr, M.; Moore, K.; Wilson, M. T. Toxicity of Myoglobin and Haemoglobin: Oxidative Stress in Patients with Rhabdomyolysis and Subarachnoid Haemorrhage. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30* (4), 745–748.
- (14) Hathazi, D.; Scurtu, F.; Bischin, C.; Mot, A.; Attia, A.; Kongsted, J.; Silaghi-Dumitrescu, R. The Reaction of Oxy Hemoglobin with Nitrite: Mechanism, Antioxidant-Modulated Effect, and Implications for Blood Substitute Evaluation. *Molecules* **2018**, *23* (2), E350. <https://doi.org/10.3390/molecules23020350>.
- (15) Reeder, B. J.; Svistunenko, D. A.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. The Radical and Redox Chemistry of Myoglobin and Hemoglobin: From in Vitro Studies to Human Pathology. *Antioxidants Redox Signal.* **2004**, *6* (6), 954–966.
- (16) Reeder, B. J.; Wilson, M. T. The Effects of PH on the Mechanism of Hydrogen Peroxide and Lipid

- Hydroperoxide Consumption by Myoglobin: A Role for the Protonated Feril Species. *Free. Radic. Biol. Med.* **2001**, *30* (11), 1311–1318.
- (17) Reeder, B. J.; Wilson, M. T. Mechanism of Reaction of Myoglobin with the Lipid Hydroperoxide Hydroperoxyoctadecadienoic Acid. *Biochem J* **1998**, *330* (3), 1317–1323.
 - (18) Moț, A. C.; Coman, C.; Miron, C.; Damian, G.; Sarbu, C.; Silaghi-Dumitrescu, R. An Assay for Pro-Oxidant Reactivity Based on Phenoxyl Radicals Generated by Laccase. *Food Chem.* **2014**, *143*, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.128>.
 - (19) Zagrean-Tuza, C.; Branzanic, A. M. V.; Damian, G.; Klare, J. P.; Mot, A. C.; Silaghi-Dumitrescu, R. Beauty Is in the Eye of the Resonator: Small-Molecule Probing of an Atypical Hemoglobin Site Using Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Combined with DFT Simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2025**, *submitted*.
 - (20) Van Doorslaer, S. Understanding Heme Proteins with Hyperfine Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2017**, *280*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/J.JMR.2017.01.008>.
 - (21) Reeder, B. J.; Hough, M. A. The Structure of a Class 3 Nonsymbiotic Plant Haemoglobin from Arabidopsis Thaliana Reveals a Novel N-Terminal Helical Extension. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (5), 1411–1418. <https://doi.org/10.1107/S1399004714004878/QH5004SUP1.PDF>.
 - (22) Zagrean-Tuza, C.; Pato, G.; Damian, G.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Mot, A. C. Redox Reactivity of Nonsymbiotic Phytoglobins towards Nitrite. *Molecules* **2024**, *29* (6), 1200. <https://doi.org/10.3390/molecules29061200>.
 - (23) Tejero, J.; Gladwin, M. T. The Globin Superfamily: Functions in Nitric Oxide Formation and Decay. *Biol. Chem.* **2014**, *395* (6), 631. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2013-0289>.
 - (24) Moț, A. C. Nonsymbiotic Plant Hemoglobins: Synopsis and Perspectives of Their Structure and Enzymatic Activities. *Acta Met.* **2014**, *Tome XI* (2–4), 163–169.
 - (25) Becana, M.; Yruela, I.; Sarath, G.; Catalán, P.; Hargrove, M. S. Plant Hemoglobins: A Journey from Unicellular Green Algae to Vascular Plants. *New Phytol.* **2020**, *227* (6), 1618–1635. <https://doi.org/10.1111/nph.16444>.
 - (26) Mot, A. C.; Puscas, C.; Miclea, P.; Naumova-Letia, G.; Dorneanu, S.; Podar, D.; Dissmeyer, N.; Silaghi-Dumitrescu, R. Redox Control and Autoxidation of Class 1, 2 and 3 Phytoglobins from Arabidopsis Thaliana. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 13714. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31922-4>.
 - (27) Mukhi, N.; Dhindwal, S.; Uppal, S.; Kumar, P.; Kaur, J.; Kundu, S. X-Ray Crystallographic Structural Characteristics of Arabidopsis Hemoglobin I and Their Functional Implications. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, *1834* (9), 1944–1956. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2013.02.024>.
 - (28) Salhany, J. M. Kinetics of Reaction of Nitrite with Deoxy Hemoglobin after Rapid Deoxygenation or Predeoxygenation by Dithionite Measured in Solution and Bound to the Cytoplasmic Domain of Band 3 (SLC4A1). *Biochemistry* **2008**, *47* (22), 6059–6072.
 - (29) Naumova-Letia, G.; Moț, A. C. Probing Reducing Power for Feril Phytoglobins of Several Phenolic Compounds Using Their Kinetic Profiles Assisted by Chemometric Methods. *Stud. Univ. Babes-Bolyai Chem.* **2017**, *62* (2Tom1), 49–66. <https://doi.org/10.24193/subbchem.2017.2.04>.
 - (30) Mot, A. C.; Bischin, C.; Damian, G.; Attia, A. A. A.; Gal, E.; Dina, N.; Leopold, N.; Silaghi-Dumitrescu, R. Fe(III) – Sulfide Interaction in Globins: Characterization and Quest for a Putative Fe(IV)-Sulfide Species. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *179* (Iii), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.015>.
 - (31) Mot, A. C.; Puscas, C.; Dorneanu, S. A.; Silaghi-Dumitrescu, R. EPR Detection of Sulfanyl Radical during Sulfhemoglobin Formation – Influence of Catalase. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *137* (April), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.034>.
 - (32) Puscas, C.; Radu, L.; Carrascoza, F.; Mot, A. C.; Amariei, D.; Lungu, O.; Scurtu, F.; Podea, P.; Septelea, R.; Matei, A.; Mic, M.; Attia, A. A.; Silaghi-Dumitrescu, R. The High Affinity of Small-Molecule Antioxidants for Hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *124*, 260–274. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.019>.
 - (33) Kosaka, H.; Tyuma, I. Mechanism of Autocatalytic Oxidation of Oxyhemoglobin by Nitrite. *Environ.*

Health Perspect. **1987**, 73, 147. <https://doi.org/10.1289/EHP.8773147>.

- (34) Keszler, A.; Piknova, B.; Schechter, A. N.; Hogg, N. The Reaction between Nitrite and Oxyhemoglobin: A Mechanistic Study. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (15), 9615–9622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705630200>.
- (35) Morard, P.; Silvestre, J.; Lacoste, L.; Caumes, E.; Lamaze, T. Nitrate Uptake and Nitrite Release by Tomato Roots in Response to Anoxia. *J. Plant Physiol.* **2004**, 161 (7), 855–865. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2003.11.003>.
- (36) Horchani, F.; Aschi-Smiti, S.; Brouquisse, R. Involvement of Nitrate Reduction in the Tolerance of Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) Plants to Prolonged Root Hypoxia. *Acta Physiol. Plant.* **2010**, 32 (6), 1113–1123. <https://doi.org/10.1007/S11738-010-0503-0/TABLES/7>.
- (37) Oliveira, H. C.; Freschi, L.; Sodek, L. Nitrogen Metabolism and Translocation in Soybean Plants Subjected to Root Oxygen Deficiency. *Plant Physiol. Biochem. PPB* **2013**, 66, 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2013.02.015>.
- (38) Limami, A. M.; Diab, H.; Lothier, J. Nitrogen Metabolism in Plants under Low Oxygen Stress. *Planta* **2014**, 239 (3), 531–541. <https://doi.org/10.1007/S00425-013-2015-9/FIGURES/2>.
- (39) Gupta, K. J.; Mur, L. A. J.; Wany, A.; Kumari, A.; Fernie, A. R.; Ratcliffe, R. G. The Role of Nitrite and Nitric Oxide under Low Oxygen Conditions in Plants. *New Phytol.* **2020**, 225 (3), 1143–1151. <https://doi.org/10.1111/nph.15969>.
- (40) Igamberdiev, A. U.; Hill, R. D. Nitrate, NO and Haemoglobin in Plant Adaptation to Hypoxia: An Alternative to Classic Fermentation Pathways. *J. Exp. Bot.* **2004**, 55 (408), 2473–2482. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERH272>.
- (41) Manrique-Gil*, I.; Sánchez-Vicente*, I.; Zagrean-Tuza*, C.; Mot, A.; Damian, G.; Chamizo-Ampudia, A.; Vázquez, A.; Brunello, L.; Loreti, E.; Perata, P.; Lorenzo, O. *Methionine Aminopeptidases and Phytoglobin I Interaction Orchestrates Nitric Oxide Sensing during Hypoxia*; 2025.
- (42) López-Otín, C.; Bond, J. S. Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (45), 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>.
- (43) Woolum, J. C.; Tiezzi, E.; Commoner, B. Electron Spin Resonance of Iron-Nitric Oxide Complexes with Amino Acids, Peptides and Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **1968**, 160 (3), 311–320. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(68\)90204-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(68)90204-3).
- (44) Lee, M.; Chasteen, N. D.; Arosio, P.; Cozzi, A. Identification of the EPR-Active Iron-Nitrosyl Complexes in Mammalian Ferritins. *Biochemistry* **1994**, 33 (12), 3679–3687. <https://doi.org/10.1021/bi00178a026>.
- (45) Zagrean-Tuza, C.; Padurean, L.; Lehene, M.; Branzanic, A. M. V.; Silaghi-Dumitrescu, R. Globin Feril Species: What Is the Nature of the Protonation Event at PH < 5? *J. Biol. Inorg. Chem.* **2024**, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00775-024-02089-3>.
- (46) Silaghi-Dumitrescu, R.; Reeder, B. J.; Nicholls, P.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. Feril Haem Protonation Gates Peroxidatic Reactivity in Globins. *Biochem. J.* **2007**, 403 (3), 391–395. <https://doi.org/10.1042/BJ20061421>.
- (47) Zagrean-Tuza, C.; Mot, A. C.; Damian, G.; Silaghi-Dumitrescu, R. Truncated Phytoglobin Displays a Catalase-like Activity towards Cyanamide. *Inorg. Chem.* **2025**, submitted.
- (48) Barnard, R. D. A Specific Color Reaction of Cyanamide and Ferriheme with Notes on the Mechanism of Action of Certain Tissue Poisons. *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* **1944**, 33 (1), 24–28. <https://doi.org/10.1002/JPS.3030330106>.
- (49) Keilin, J. Reactions of Cyanamide with Methaemoglobin and Some Other Haematin Compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 71 (C), 621–631. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(63\)91135-1](https://doi.org/10.1016/0006-3002(63)91135-1).
- (50) Vasiliou, V.; Petersen, D. R. Aldehyde Dehydrogenases. *Compr. Toxicol. Second Ed.* **2010**, 4, 131–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00407-3>.
- (51) Nagasawa, H. T.; DeMaster, E. G.; Redfern, B.; Shirota, F. N.; Goon, D. J. W. Evidence for Nitroxyl in the Catalase-Mediated Bioactivation of the Alcohol Deterrent Agent Cyanamide. *J. Med. Chem.* **1990**, 33

- (12), 3120–3122. https://doi.org/10.1021/JM00174A001/ASSET/JM00174A001.FP.PNG_V03.
- (52) Nagasawa, H. T.; Lee, M. J. C.; Kwon, C. H.; Shiota, F. N.; DeMaster, E. G. An N-Hydroxylated Derivative of Cyanamide That Inhibits Yeast Aldehyde Dehydrogenase. *Alcohol* **1992**, 9 (5), 349–353. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(92\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0741-8329(92)90031-5).
 - (53) Shoeman, D. W.; Shiota, F. N.; DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. Reaction of Nitroxyl, an Aldehyde Dehydrogenase Inhibitor, with N-Acetyl-L-Cysteine. *Alcohol* **2000**, 20 (1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00056-7).
 - (54) Reisz, J. A.; Bechtold, E.; King, S. B. Oxidative Heme Protein-Mediated Nitroxyl (HNO) Generation. *Dalt. Trans.* **2010**, 39 (22), 5203–5212. <https://doi.org/10.1039/C000980F>.
 - (55) Demaster, E. G.; Shiota, F. N.; Nagasawa, H. T.; Demaster, E. G.; Shiota, F. N. Catalase Mediated Conversion of Cyanamide to an Inhibitor of Aldehyde Dehydrogenase. *Alcohol* **1985**, 2, 117–121.
 - (56) Shiota, F. N.; Demaster, E. G.; Nagasawa, H. T. Cyanide Is a Product of the Catalase-Mediated Oxidation of the Alcohol Deterrent Agent, Cyanamide. *Toxicol. Lett.* **1987**, 37, 7–12.
 - (57) Shiota, F. N.; Goon, D. J. W.; DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. Nitrosyl Cyanide, a Putative Metabolic Oxidation Product of the Alcohol-Deterrent Agent Cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52 (1), 141–147. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00174-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00174-8).
 - (58) Mukhi, N.; Dhindwal, S.; Uppal, S.; Kumar, P.; Kaur, J.; Kundu, S. X-Ray Crystallographic Structural Characteristics of Arabidopsis Hemoglobin I and Their Functional Implications. *Biochim.Biophys.Acta* **2013**, 1834, 1944. <https://doi.org/10.2210/PDB3ZHW/PDB>.
 - (59) Carlsen, C. U.; Skovgaard, I. M.; Skibsted, L. H. Pseudoperoxidase Activity of Myoglobin: Kinetics and Mechanism of the Peroxidase Cycle of Myoglobin with H₂O₂ and 2,2-Azino-Bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) as Substrates. *J Agric Food Chem* **2003**, 51 (19), 5815–5823.