

Funzioni biologiche del molibdeno e di altri *early transition metals*

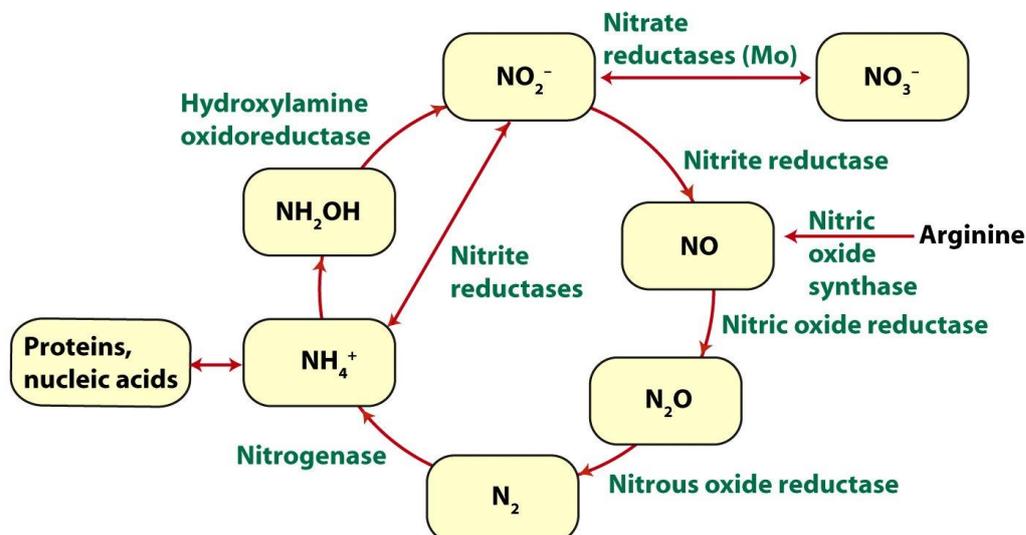
I metalli cosiddetti ‘di inizio serie’, che stanno cioè nella parte sinistra della tavola periodica, preferiscono stati di ossidazione elevati, alti numeri di coordinazione e leganti *hard*, in particolare leganti con atomi donatori di ossigeno carichi negativamente. Quindi i risultanti complessi osso e idrosso sono spesso carichi negativamente. Scandio e titanio non hanno ruoli biologici; vanadio, cromo e gli omologhi più pesanti, molibdeno e tungsteno hanno funzioni fisiologiche molto differenti. Il **molibdeno** (Gruppo 6) è quello biologicamente più importante della serie.

Il molibdeno è l’unico elemento del secondo periodo di transizione (4d) ad avere una funzione biologica. Una spiegazione può essere trovata nella sua bio-disponibilità; infatti, sebbene piuttosto raro nella crosta terrestre, è molto solubile in acqua di mare (pH = 7) nella sua forma più stabile, cioè come **molibdato(VI)**, MoO_4^{2-} , che strutturalmente è molto simile allo ione solfato SO_4^{2-} . Invece gli ossometallati MO_n^{m-} del tungsteno e soprattutto di niobio, tantalio, zirconio e afnio sono praticamente insolubili a pH = 7 a causa di aggregazione (poliossometallati). D’altra parte gli elementi 4d e 5d a destra di Mo e W, cioè tecnezio e renio, sono troppo poco abbondanti per avere importanza biologica. Il tungsteno viene utilizzato da alcuni batteri, soprattutto archeobatteri termofili (che vivono a circa 65 °C) e ipertermofili (che vivono a circa 100 °C).

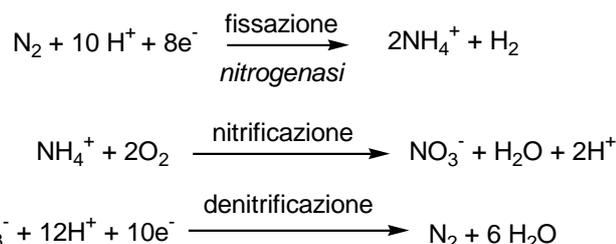
Lo ione cromato(VI), CrO_4^{2-} , che è analogo al MoO_4^{2-} ed è anche piuttosto solubile a pH 7, è un forte ossidante e quindi è instabile in condizioni fisiologiche; infatti CrO_4^{2-} è mutagenico e cancerogeno. La biodisponibilità del vanadio è simile a quella del molibdeno. Vedremo ora che un cofattore Fe-Mo riveste un ruolo essenziale nell’enzima per la fissazione dell’azoto, la nitrogenasi. In alcune nitrogenasi c’è il vanadio al posto del molibdeno.

Fissazione di N_2 : nitrogenasi

La maggior parte dei sistemi biologici che partecipano al ciclo globale dell’azoto (figura) contengono enzimi dipendenti da metalli.



Si possono distinguere 3 processi fondamentali: la **fissazione** dell’azoto (cioè la riduzione di N_2 ad ammoniaca), la **nitrificazione** (ossidazione di ammoniaca a nitrato) e la **denitrificazione** (riduzione del nitrato ad azoto molecolare).



Il processo ossidativo di nitrificazione produce nitrato, cioè l'altro stato di ossidazione – oltre all'ammonio – in cui l'azoto può venire assimilato dalla maggior parte delle piante. Il processo di fissazione dell'azoto, paragonabile in importanza biologica solo alla fotosintesi, è compiuto esclusivamente da **batteri procarioti diazotropici** che vivono in simbiosi con le radici (nei rizomi) delle piante leguminose. Si stima che i batteri riducano circa 10^8 tonnellate di N_2 all'anno! Accanto alla riduzione biologica dell'azoto si pone il processo industriale Haber-Bosch sviluppato poco più di un secolo fa (1911, ma entrato in grossa produzione negli anni 1950): esso usa un catalizzatore eterogeneo a base di ferro con vari additivi e contribuisce attualmente per almeno il 50% della fissazione globale di azoto. Più dell'80% dell'azoto fissato industrialmente viene utilizzato per produrre fertilizzanti artificiali e quindi cibo. Questo lo rende il singolo fattore più importante che ha consentito l'esplosione della popolazione mondiale, che è passata nel corso di un secolo da 1.7 a più di 7 miliardi.

A causa della stabilità termodinamica (entalpia di legame = $-945 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) e della bassa reattività (stabilità cinetica) della molecola non polare di N_2 , la sua riduzione richiede una grossa quantità di energia, sotto forma di numerosi equivalenti di ATP (idrolisi catalizzata da Mg^{2+}) e almeno 6 elettroni per molecola di N_2 , al potenziale parecchio negativo di -300 mV . A causa delle difficoltà sia termodinamiche che cinetiche, la velocità di *turnover* delle nitrogenasi è piuttosto bassa, circa **1 ciclo al secondo**. Le nitrogenasi più importanti dipendono dal Mo; sono enzimi composti da due parti, una ferro-proteina che funziona come elettrone-donatore ATP-dipendente ed una proteina Fe-Mo, che contiene il cofattore sito della coordinazione e riduzione del substrato N_2 , il cosiddetto FeMo-co. Ci sono poi anche V-Fe e Fe-Fe nitrogenasi, che cioè al posto del Mo hanno V o ancora Fe.

La stechiometria della reazione catalizzata dalla nitrogenasi è la seguente:

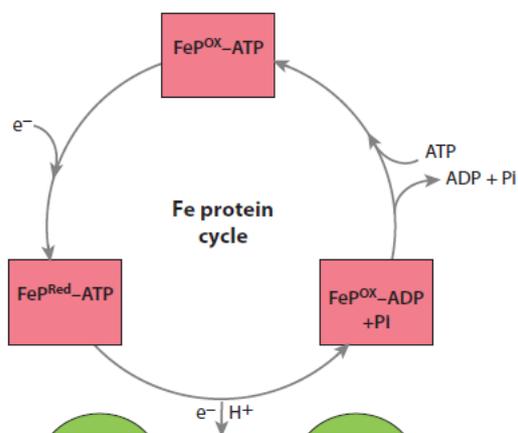


Il ruolo, cioè la necessità dell'idrolisi di tutto quell'ATP non è ancora chiaro. Infatti la reazione non è eccessivamente sfavorevole dal punto di vista termodinamico; si ritiene che gran parte dell'energia ottenuta dall'idrolisi di ATP serva per superare la elevata energia di attivazione, cioè per vincere la barriera cinetica. Oltre a catalizzare la riduzione di N_2 a NH_3 , le Mo-nitrogenasi possiedono una intrinseca attività di idrogenasi che porta alla produzione di H_2 durante la fissazione di N_2 (vedi dopo il meccanismo); H_2 si forma anche operando sotto pressione di N_2 , quindi un semplice equilibrio di spostamento non può spiegare la formazione di H_2 (comunque di solito questo H_2 viene subito riossidato da opportune idrogenasi per dare protoni ed energia).

A causa della loro reattività necessariamente elevata, gli enzimi di nitrogenasi richiedono l'assenza di molecole che possano competere, tipo O_2 . Quindi i micro-organismi (tipicamente *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Clostridium pasteurianum*) che fissano l'azoto sono o anaerobici, o possiedono dei complessi meccanismi di protezione per l'esclusione di O_2 dal sito attivo (ad esempio Fe-proteine che servono come sensori di O_2).

La Mo-nitrogenasi più studiata è formata, come già detto, da due proteine che, nel ciclo catalitico, agiscono in concerto, ed ha una struttura schematica del tipo $(\alpha_2\beta_2)(\gamma_2)$. Le due proteine sono dette rispettivamente FeMo-proteina e Fe-proteina, per via dei metalli che contengono. La parte γ_2 è una **ferro-proteina**, un omo-dimero di circa 60 kDa. Tra le due sub-unità γ si trova un singolo cluster

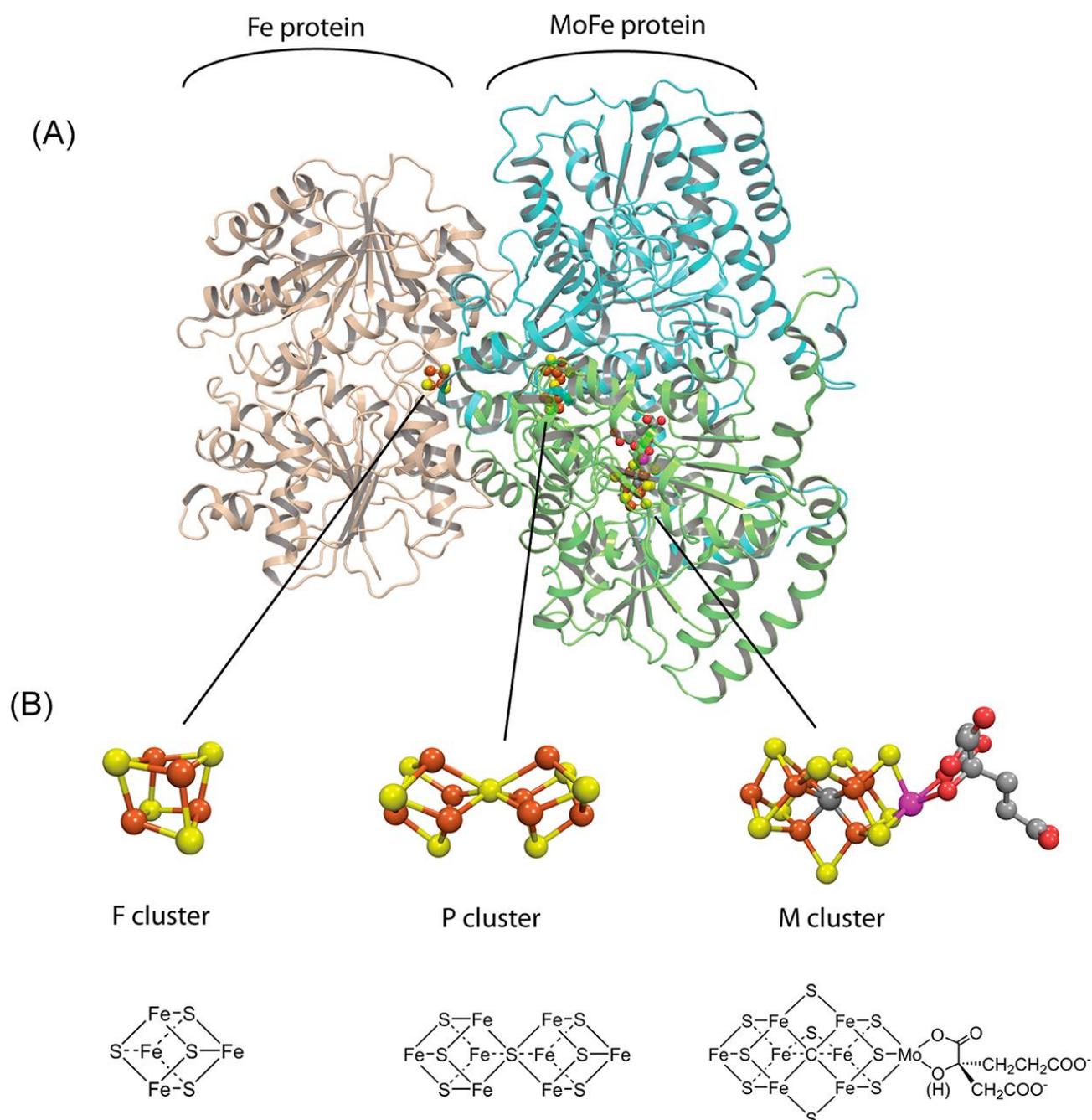
[4Fe-4S] a ponte, ancorato da due Cys da ogni sub-unità. Questo cluster funge da donatore di un elettrone (alla volta) alla FeMo-proteina, ed opera a un potenziale di circa -300 mV, che diventa -420 mV quando si coordina il Mg-ATP (vedi sotto). Il cluster può assumere tre diversi stati di ossidazione, molto probabilmente per adattarsi alla sorgente di elettroni disponibile, una ferridossina ridotta o una flavodossina (i.e. NADH).



Normalmente il cluster opera fra i due stati $[4Fe-4S]^+$ e $[4Fe-4S]^{2+}$ e la Fe-proteina compie un ciclo a tre stadi, chiamato *Fe protein cycle* (Figura). Questa ferro-proteina ha anche due siti recettoriali per Mg-ATP perché devono essere idrolizzate due molecole di ATP per ogni elettrone trasferito. La coordinazione di Mg-ATP induce delle variazioni conformazionali che favoriscono/permangono la formazione del complesso transiente con la FeMo-proteina che porta al trasferimento elettronico

intermolecolare. L'idrolisi dell'ATP, oltre a essere la *driving force* del trasferimento elettronico, causa anche la dissociazione del complesso fra la Fe-proteina e la FeMo-proteina, consentendo al ciclo di ripartire per far accumulare il numero di elettroni necessari per la riduzione del diazoto. Il cluster $[4Fe-4S]$ è molto esposto al solvente, più che nelle ferridossine, e per questo è probabilmente molto sensibile all' O_2 . I siti di *binding* dell'ATP sono piuttosto lontani (ca. 20 \AA) dal cluster Fe-S e la coordinazione del Mg-ATP provoca un abbassamento del potenziale del cluster di circa 100 mV (da -300 mV a -420 mV), presumibilmente tramite variazioni conformazionali della proteina. Il rilascio della Fe-proteina dopo il trasferimento dell'elettrone alla FeMo-proteina è il *rate determining step* del processo (costante cinetica ca. 6 s^{-1}). Da notare infine che la Fe-proteina è l'unico riducente della FeMo-proteina in grado di indurre anche la riduzione di N_2 . Altre piccole molecole donatrici di elettroni sono in grado di ridurre la FeMo-proteina ma non inducono la riduzione del substrato N_2 : questo significa che nella FeMo-proteina, sito della catalisi, devono avvenire delle variazioni conformazionali indotte dalla Fe-proteina, e quindi accoppiate all'idrolisi del Mg-ATP, che sono indispensabili per la coordinazione/riduzione del substrato.

Il secondo componente proteico, connesso reversibilmente (vedi sopra) al primo tramite ponti salini, è la **FeMo-proteina** che è la vera nitrogenasi. Essa è un etero-tetramero $\alpha_2\beta_2$ di circa 220 kDa e contiene due cluster ferro-zolfo molto speciali, i cosiddetti **P-cluster**, aventi proprietà spettroscopiche del tutto diverse da quelle di altri centri Fe-S, e due **cofattori FeMo-co**, ognuno di composizione $MoFe_7S_8C$. La struttura ai raggi X complessiva, con i principali cofattori è mostrata in figura (il FeMo-co è chiamato in figura M cluster).



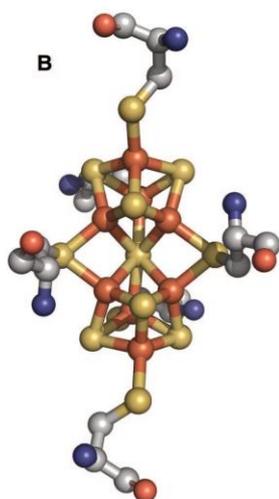
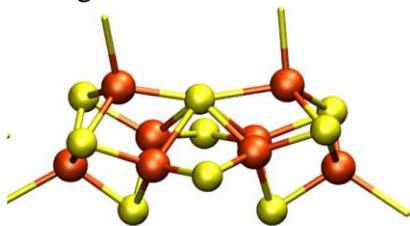
La prima struttura ai raggi X di una FeMo-proteina venne pubblicata nel 1992, a una risoluzione di 2.7 Å, e rivelò per la prima volta la disposizione e la composizione dei due centri metallici dell'enzima. Fin da quella prima struttura fu chiaro che la struttura del FeMo cluster **non** era stata dedotta correttamente dagli studi spettroscopici, in particolare EXAFS, su sistemi modello (vedi dopo). Negli anni seguenti, numerose caratterizzazioni ai raggi X, a risoluzione via via migliore, hanno permesso di capire in maggior dettaglio la struttura dei siti più rilevanti.

Innanzitutto in ognuna delle due parti $\alpha\beta$, il P-cluster e il FeMo-co sono distanziati di circa 19 Å e i due cofattori, nelle due unità $\alpha\beta$, distano circa 70 Å (cioè 7 nm). Questo ha intanto permesso di escludere la possibilità che l' N_2 si coordinasse a ponte fra due Mo durante la riduzione. Quindi si pensa che ogni dimerico $\alpha\beta$, che contiene un P-cluster ed un cofattore MoFe, agisca in maniera indipendente.

P-clusters

I P cluster sono dei **cluster [8Fe-7S]** collocati all'interfaccia tra le sub-unità α e β , e possono essere pensati come formati da due sotto-cluster cubanoidi [4Fe-4S] fusi tramite un atomo di S in comune, con inusuale coordinazione μ_6 . Ogni P-cluster è legato alla proteina tramite 6 cisteine, 3 dell'unità α

e 3 di quella β ; due di queste sono a ponte fra due atomi di ferro. La figura mostra due diverse immagini del P-cluster.



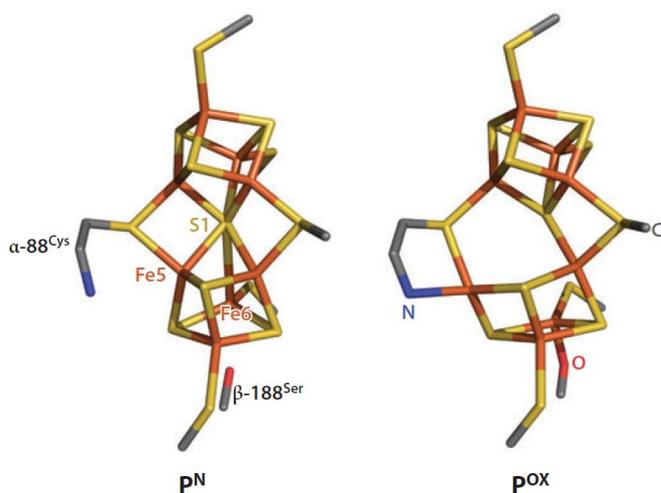
Il ruolo di questi P-cluster è quello di accettare gli elettroni provenienti dalla Fe-proteina, venendo così ridotto alla forma tutta-Fe(II), e regolare il trasferimento di elettroni a basso potenziale verso il FeMo-co. Cioè i P-cluster fungono da **intermediari** nel processo di trasferimento di elettroni dalla Fe-proteina al FeMo-co, dove avviene la riduzione di N_2 . Sono state individuate e caratterizzate, anche tramite struttura ai raggi X, due diverse forme di P-cluster che differiscono tra loro per lo stato di ossidazione degli ioni Fe. Nella forma più ridotta, P^N (*resting state* ottenuto artificialmente per riduzione con ditionito) tutti gli ioni ferro sono Fe(II). La forma definita P^{OX} contiene 2 elettroni in meno di P^N e può essere da questo generata reversibilmente. I P-cluster subiscono delle notevoli variazioni conformazionali nell'ossidazione da P^N a P^{OX} .

La figura sotto mostra le strutture di P^{OX} e P^N a confronto. Nello stato ossidato il P-cluster può essere descritto come composto da un cluster $4Fe-4S$ e da un cubano parziale $4Fe-3S$, che sono prevalentemente legati rispettivamente alle sub-unità proteiche α e β . In questa forma l'atomo di zolfo centrale (S1) è tetracoordinato a 4 atomi di Fe (3 verso la sub-unità α ed 1 verso la sub-unità β), cioè μ_4 . In seguito a riduzione a P^N un ulteriore atomo di Fe (Fe5) dal cubano parziale della sub-unità β , si porta a distanza di legame da S1 (e Fe6 si porta a circa 3 Å da S1). Come conseguenza di

questi cambiamenti, in P^N l'atomo di zolfo S1 è circondato da 6 atomi di Fe, cioè μ_6 , con un arrangiamento di ottaedro distorto. Quindi nei P-cluster le **variazioni strutturali causate dai processi redox** sono dominate dal movimento di due dei quattro Fe del cubano parziale dell'unità β . Rispetto alla loro posizione in P^{OX} gli atomi Fe5 e Fe6 si spostano rispettivamente di 1.4 e 0.9 Å verso l'atomo di zolfo centrale in P^N . Infine, nella riduzione da P^{OX} a P^N il movimento di Fe5 e Fe6 nel P-cluster è anche accompagnato da uno scambio di leganti. Nello stato ossidato ci sono due leganti aggiuntivi dalla proteina oltre alle 6 cisteine: Cys- α 88 si lega a Fe5 con l'azoto amidico, mentre O γ di Ser- β 188 coordina Fe6. Nello stato ridotto P^N questi due leganti non-cisteinici

addizionali sono rimpiazzati da interazioni con l'atomo di zolfo centrale S1 (figura).

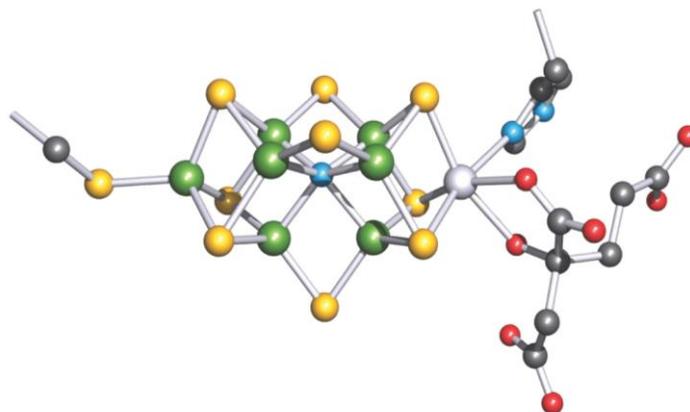
Quindi, sia in P^{OX} che in P^N tutti i Fe nel P-cluster rimangono tetra-coordinati. Dal momento che sia Cys- α 88 che Ser- β 188 sono protonati quando sono amminoacidi liberi, mentre potrebbero essere deprotonati quando si coordinano al ferro, esiste la possibilità che l'ossidazione bi-elettronica del P-cluster sia accompagnata dal rilascio simultaneo anche di 2 protoni. Cioè in definitiva il P-cluster potrebbe essere responsabile del trasferimento sincronizzato sia di elettroni che di protoni al FeMo-co. Assumendo che i P-cluster utilizzino i tre stati di ossidazione P^N , P^{+1} e



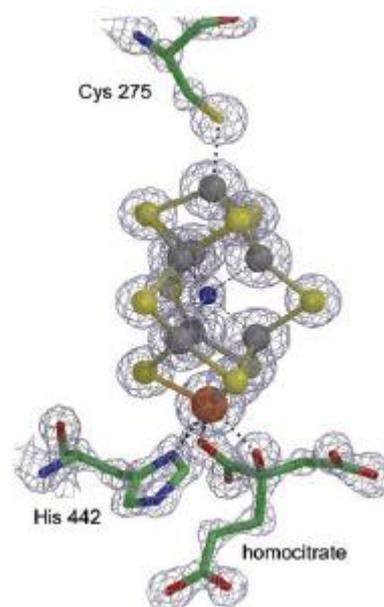
P^{+2} (o P^{OX}), essi sono in grado di fornire 1 o 2 elettroni alla volta al FeMo-co durante la catalisi.

Cofattore FeMo

Il FeMo-co ha una **struttura assolutamente eccezionale** fra tutti i cluster Fe-S (figura), diversa da tutti gli altri. Esso è formato da due frammenti cubanoidi parziali 4Fe-3S e Mo-3Fe-3S connessi da tre zolfuri a ponte. Esso è completamente contenuto all'interno della sub-unità proteica α , a circa 10 Å dalla superficie della proteina. E' sospeso in una tasca largamente idrofila tra due leganti proteici soltanto: è infatti legato tramite una cisteina a un atomo di Fe (Fe1) e tramite una istidina al Mo. Il Mo è ulteriormente coordinato ai gruppi idrossilici e carbonilici di una molecola di **omocitrato** (legante *hard*) per raggiungere la coordinazione ottaedrica. I 6 atomi di Fe centrali (Fe2 – Fe7) definiscono complessivamente un prisma trigonale e le due facce triangolari sono cappate da una parte da Fe1 e dall'altra dal Mo. Ogni atomo metallico è coordinato a tre zolfuri, di modo che ci sono complessivamente 9 atomi di zolfo nel centro del cluster, che ha quindi composizione [Fe₇MoS₉]. A parte Fe1 che è tetracoordinato, tutti gli altri sei atomi di Fe sono *apparentemente* circondati solo da tre donatori ciascuno e quindi hanno una geometria che è circa trigonale planare e stanno tutti con buona approssimazione sulla superficie di una sfera di raggio 2 Å e centrata al centro del FeMo-co. Bisogna sottolineare che la struttura della proteina, e quindi del FeMo-co, è quella del *resting state*, cioè senza N₂ coordinato e non in condizioni catalitiche.

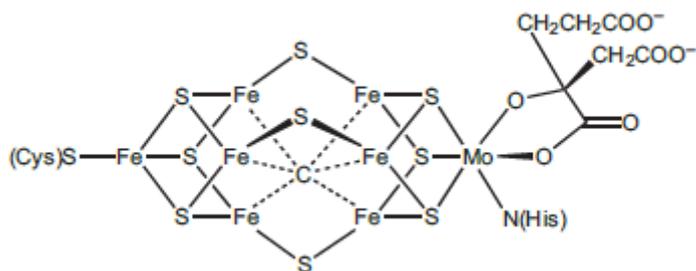


Fino a pochi anni fa si riteneva che la struttura del FeMo-co fosse quella sopra descritta, con la cavità centrale vuota, ma una determinazione strutturale ai raggi X del 2002 (*Science*) a risoluzione atomica (1.16 Å, la figura mostra la mappa di densità elettronica) ha permesso di individuare con sicurezza la presenza di un atomo leggero X al centro dei 6 atomi di Fe centrali (in grigio). La natura dell'atomo centrale X è stata oggetto di intenso dibattito per anni. In base alla densità elettronica della struttura si escludeva che potesse essere un altro S. Poteva essere C, N o O. Gli autori della struttura ipotizzarono che, dal momento che quello potrebbe essere il sito di riduzione di N₂, l'atomo centrale fosse un azoto. Altri autori, in base a complessi studi spettroscopici di tipo ENDOR (*Electron-Nuclear DOuble Resonance*) e ESEEM (*Electron Spin-Echo Envelope Modulation*), che riescono a individuare accoppiamenti caratteristici tra gli spin elettronici dei centri metallici e lo spin nucleare dell'atomo centrale sconosciuto, sostenevano viceversa che X non potesse essere un atomo di azoto. Sostanzialmente, i dati non permettevano di discriminare tra X = C o N; la possibilità che fosse O veniva esclusa a causa del fatto che il FeMo-co è sensibile all'ossigeno. Qualunque fosse la natura di X, i 6 atomi di Fe centrali sono tutti a distanza di legame e quindi non sono più tri- ma tetra-coordinati!



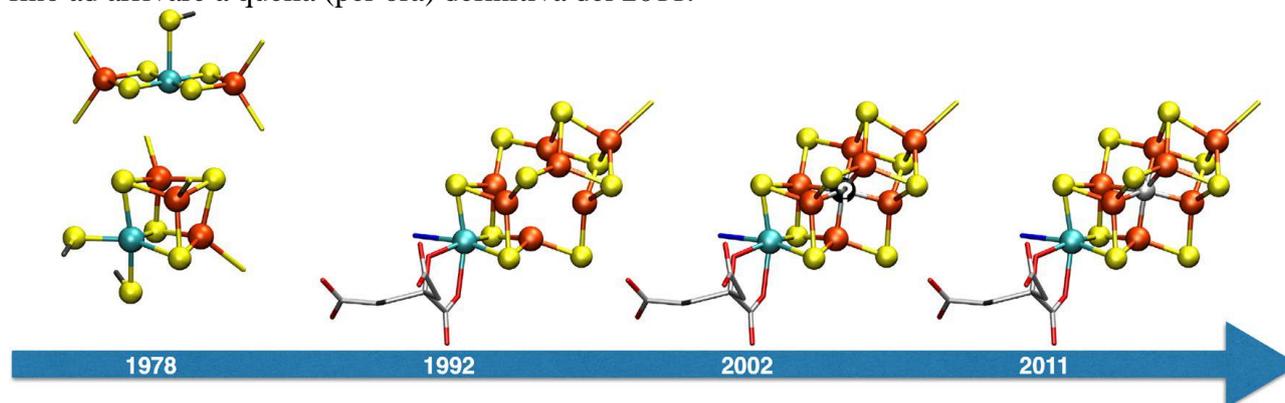
Soltanto nel 2011, cioè quasi 20 anni dopo la prima determinazione strutturale, tre distinte pubblicazioni (di cui due nello stesso numero di *Science*) hanno finalmente dimostrato, tramite metodi indipendenti, che l'atomo centrale del FeMo-co è un atomo di **carbonio** (ipervalente). L'evidenza sperimentale deriva da una nuova struttura ai raggi X a risoluzione 1.0 Å, nonché da misure spettroscopiche (in particolare di emissione di raggi X dal ferro, il cui segnale dipende fortemente dalla natura degli atomi a cui il ferro è legato, ed ESEEM condotte su FeMo-proteine arricchite al 100% con ¹⁵N o ¹³C). Quindi la

corretta stechiometria del FeMo-co è $[\text{Fe}_7\text{MoS}_9\text{C}]$. Quindi, al momento, la struttura accettata del cofattore è quella riportata in figura. E' piuttosto sorprendente constatare che il FeMo-co è un **cluster organometallico** e che un carburo (formalmente C^{4-}) sia presente in un sistema biologico, seppure naturalmente nella chimica dello stato solido siano ben noti – e molto stabili – i composti ferro-carbonio



(ghisa, acciaio!). E' stato anche dimostrato che il carburo rimane al suo posto nel cluster durante il suo funzionamento, cioè durante la catalisi. Anche la biosintesi del FeMo-co è un processo molto complesso, che impiega numerose proteine ed avviene in maniera indipendente dalla FeMo-proteina, ed è quindi definito un processo “*ex situ*”. In base ad esperimenti con isotopi radioattivi, si ritiene che la sorgente dell'atomo di carbonio al centro del cluster sia la S-adenosil-L-metionina, che trasferisce inizialmente un metile al cofattore in formazione. Il metile viene poi gradualmente deidrogenato fino a carburo.

La figura successiva riassume l'evoluzione della conoscenza della struttura del FeMo-co negli anni, fino ad arrivare a quella (per ora) definitiva del 2011.



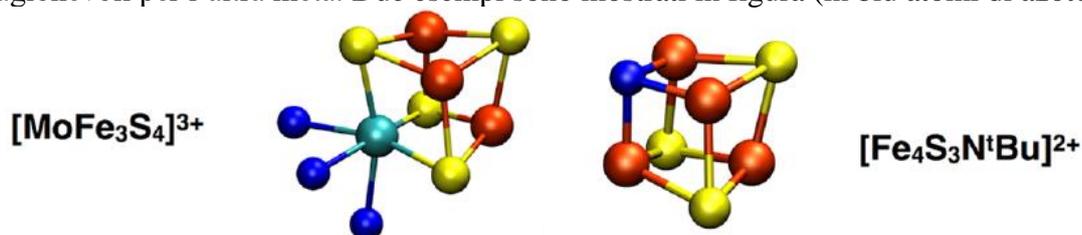
First structural models from EXAFS First crystal structure (2.7Å) Discovery of interstitial atom Interstitial atom identified as carbon

Contrariamente a quanto si potrebbe pensare, la determinazione della struttura del FeMo-co è soltanto il primo passo verso la comprensione del funzionamento dell'enzima. Numerosi sono gli interrogativi ancora aperti, soprattutto dal punto di vista meccanicistico. Innanzitutto bisogna identificare il **sito di legame del substrato** N_2 , il suo **modo di coordinazione** (*end-on*, *end-on* a ponte fra due atomi metallici, *side-on*,...), e bisogna caratterizzare i vari stati elettronici attraverso i quali passa il sito attivo durante la catalisi. La necessità di gestire ben otto elettroni nel corso di un ciclo catalitico richiede che gli stati elettronici in tutti i centri metallici coinvolti siano accuratamente controllati, specialmente nel FeMo-co. È anche noto che il FeMo-co non coordina N_2 nel suo *resting state*, ma lo coordina solo dopo essere stato ridotto con 4 elettroni. La coordinazione e riduzione del substrato potrebbe avvenire sia esternamente, su uno o più atomi di ferro, oppure sul molibdeno. Uno degli aspetti ancora molto controversi riguarda proprio il **ruolo del molibdeno** nel meccanismo di riduzione del diazoto. Inizialmente si pensava che la coordinazione avvenisse sul Mo, per giustificare la presenza di questo metallo inusuale. È importante sottolineare che, seppure a tutt'oggi non ci sia nessuna evidenza diretta su quale sia il sito di legame di N_2 , dati biochimici (mutagenesi) suggeriscono che potrebbe essere uno degli atomi di ferro, Fe_6 (vedi dopo). Inoltre, se il sito di *binding* fosse il Mo, la coordinazione dovrebbe essere preceduta dalla dissociazione reversibile dell'omocitrato, mentre studi spettroscopici condotti durante il funzionamento dell'enzima indicano che la sfera di coordinazione del Mo e così pure il suo stato di ossidazione non cambiano in modo sostanziale nel ciclo (la stessa cosa avviene per il vanadio nelle V-nitrogenasi). Se il molibdeno non è il sito di legame del diazoto (cosa però che non si può ancora escludere in

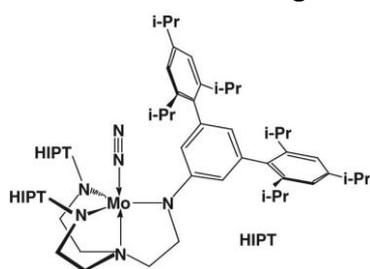
modo certo), allora esso potrebbe svolgere un ruolo nel modulare il potenziale redox complessivo del cofattore (o magari anche solo di un singolo atomo di ferro). In alternativa, il ruolo del Mo potrebbe essere quello di modificare la struttura elettronica del cofattore in modo da facilitare la coordinazione o la protonazione del substrato. Il fatto che nel ciclo catalitico il Mo apparentemente non cambia stato di ossidazione potrebbe rivelarsi una proprietà importante che giustifica la presenza di questo eterometallo nel cluster. La presenza di un atomo di carbonio nel sito attivo, oltre ad avere la funzione di “tenerlo assieme”, sembra possa servire per effettuare un *fine tuning* delle proprietà elettroniche e potrebbe consentire piccole variazioni strutturali del cluster centrale di atomi di ferro, in accordo con vari dati sperimentali che suggeriscono che durante la catalisi si abbiano solo minime variazioni delle lunghezze di legame nel FeMo-co. Questo comportamento però sarebbe in netto contrasto con i cicli per la riduzione di N₂ descritti da Schrock e altri su complessi di Mo (vedi sotto), dove le variazioni di stato di ossidazione del Mo sono fondamentali per l'attività.

Modelli

Sono stati fatti moltissimi tentativi di sintetizzare dei modelli del FeMo-co. Al momento non si è ancora riusciti a incorporare un carburo μ_6 in un cluster sintetico. Tuttavia, sono stati preparati numerosi cubani Mo-Fe-S, che sono dei buoni modelli strutturali per la **metà** del FeMo-co che contiene il molibdeno (con un solfuro al posto del carburo a occupare un vertice del cubo), mentre i ben noti cubani Fe-S sintetici ([4Fe-4S] o [4Fe-(4-n)S-nX]) sono a loro volta dei modelli ragionevoli per l'altra metà. Due esempi sono mostrati in figura (in blu atomi di azoto).

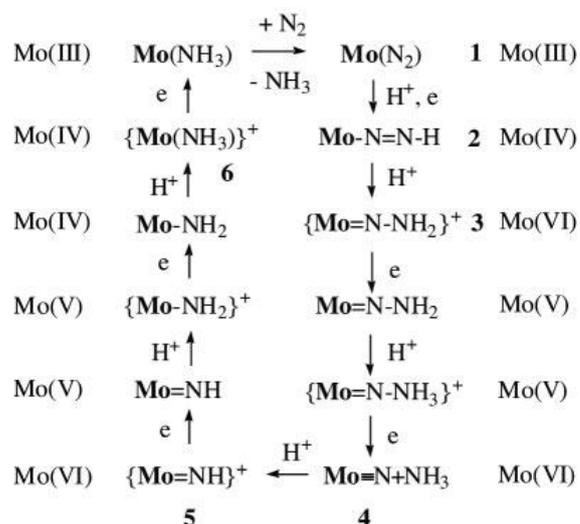


Sono stati fatti anche dei modelli “funzionali”, cioè in grado di coordinare e ridurre N₂, sia a base di Mo che di Fe. A sostegno dell'ipotesi che il sito di coordinazione e riduzione del diazoto sia il Mo,

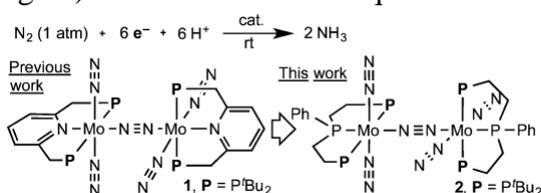


sono stati preparati molti complessi di questo metallo, a partire addirittura dagli anni 1970, in grado di coordinare N₂. In alcuni casi è stato anche dimostrato che il diazoto coordinato poteva venire ridotto stechiometricamente a NH₃. Solo in tempi abbastanza recenti però sono stati sviluppati complessi con (modesta!) attività catalitica. Il primo esempio è stato descritto dal premio Nobel per la chimica Richard Schrock (Science, 2003): un complesso mono-nucleare di molibdeno (figura) in grado di effettuare la riduzione catalitica di N₂

a NH₃ (8 eq di ammoniaca per Mo!) a temperatura ambiente (con riducenti e donatori di idrogeno diversi da H₂!). Sono anche stati isolati e caratterizzati numerosi intermedi. Il complesso meccanismo di reazione proposto è riportato in figura; le specie contrassegnate da un numero sono state isolate e caratterizzate, spesso anche tramite struttura ai raggi X. Il molibdeno durante il ciclo varia il suo stato di ossidazione da Mo(III) a Mo(VI). La coordinazione di N₂ avviene sul Mo(III) e la riduzione procede secondo il meccanismo cosiddetto *distale* (vedi dopo). Altri due esempi di complessi di Mo, con chelanti tridentati meridionali PNP o PPP in grado di ridurre cataliticamente N₂ a NH₃ (fino a 26 eq di NH₃

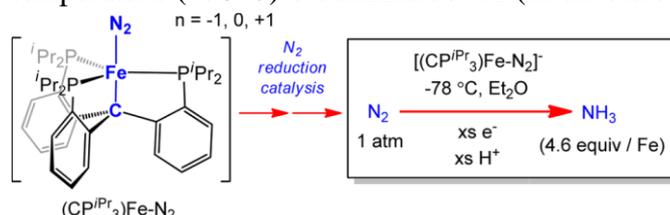


per mole di Mo) sono stati più recentemente descritti (2011 e 2015) dal giapponese Nishibayashi (figura). Il riducente usato in questo caso è stato CoCp^*_2 (composto organometallico a 19 elettroni).



Gli esempi con complessi di ferro sono molto pochi e sono stati ottenuti più recentemente. Nel 2011 due distinti lavori hanno dimostrato che anche complessi mono- e di-nucleari di ferro sono in grado di promuovere la rottura stechiometrica del legame N–N in N_2 , formando bis-nitruri, uno stadio ovviamente

essenziale nel processo di riduzione di N_2 a NH_3 . Solo nel 2014 Peters ha descritto un complesso di Fe con un legante tripodale in grado di coordinare N_2 in *trans* a un atomo di carbonio (come nel FeMo-co ?). Questo complesso (figura) a bassa temperatura (-78°C) e utilizzando K (in un eterocorona) come riducente ha generato NH_3 con una modestissima attività catalitica (4.6 eq di NH_3 per mole di Fe). Questi esempi di riduzione catalitica di N_2 a NH_3 , seppure con attività modestissima e utilizzando riducenti e fonti di protoni ben lontane da quelle fisiologiche, hanno tuttavia dimostrato che il processo può avvenire sia sul Fe che sul Mo, anche su complessi mononucleari.



Struttura elettronica del FeMo-co

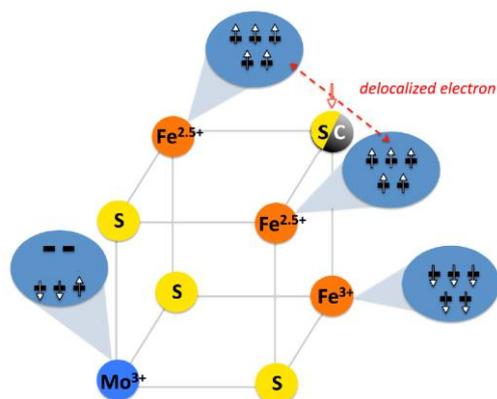
Il *resting state* del FeMo-co ha uno **spin totale** $S = 3/2$. Tuttavia, la carica totale del cofattore, lo stato di ossidazione degli atomi di metallo e la loro struttura elettronica rimangono delle questioni aperte, ovviamente fondamentali per comprendere il processo di riduzione di N_2 a livello molecolare. In letteratura sono stati proposte tre diverse combinazioni, con tre cariche totali diverse (calcolate considerando S^{2-} e C^{4-}):

- 1) $[\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{C}]^{3-}$ 6Fe(II)1Fe(III)Mo(IV)
- 2) $[\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{C}]^{1-}$ 4Fe(II)3Fe(III)Mo(IV)
- 3) $[\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{C}]^{1+}$ 2Fe(II)5Fe(III)Mo(IV)

Sono tutte congruenti con un stato di spin $S = 3/2$ e tutte assumono – a partire dagli anni 1980 – che il molibdeno si trovi come Mo(IV), con guscio elettronico chiuso d^2 e $S = 0$. Tuttavia, dati spettroscopici molto sofisticati del 2014 (*high-energy resolution fluorescence detected (HERFD) Mo X-ray absorption spectroscopy*), condotti sia sul FeMo-co che su numerosi modelli, suggeriscono fortemente che il molibdeno sia Mo(III), d^3 in un inusuale stato di basso spin ($\uparrow\uparrow\downarrow$ che viola la regola di Hund, forse una configurazione di stato eccitato causata dalle interazioni con i Fe) e non Mo(IV). Da notare che in biologia non vi sono altri esempi di Mo(III) in cofattori di enzimi, ma sempre Mo(IV), Mo(V) o Mo(VI). Tuttavia, nel sistema mononucleare di Shrock (vedi sopra) la coordinazione di N_2 avviene su Mo(III). Se questo stato di ossidazione del Mo verrà confermato, sarà necessario ridiscutere gli stati di ossidazione degli atomi di ferro per mantenere la carica complessiva. Le strutture elettroniche del FeMo-co nel *resting state* dovrebbero essere riassegnate come segue:

- $$6\text{Fe(II)}1\text{Fe(III)}\text{Mo(IV)} \rightarrow 5\text{Fe(II)}2\text{Fe(III)}\text{Mo(III)}$$
- $$4\text{Fe(II)}3\text{Fe(III)}\text{Mo(IV)} \rightarrow 3\text{Fe(II)}4\text{Fe(III)}\text{Mo(III)}$$
- $$2\text{Fe(II)}5\text{Fe(III)}\text{Mo(IV)} \rightarrow 1\text{Fe(II)}6\text{Fe(III)}\text{Mo(III)}$$

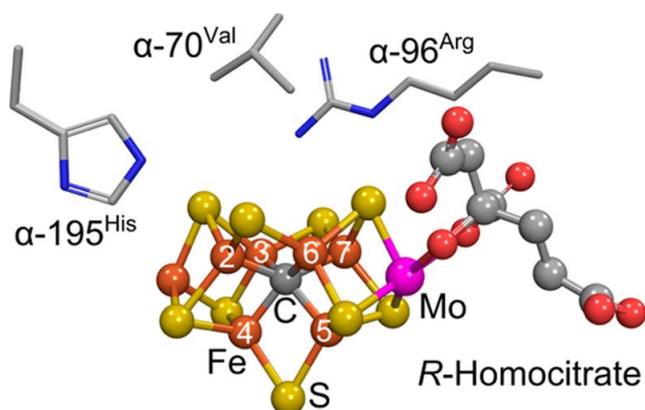
Inoltre, anche gli accoppiamenti di spin fra gli atomi di ferro e fra essi e il molibdeno, per arrivare a $S = 3/2$ dovranno essere riesaminati, tenendo conto che l'effetto dell'atomo di carbonio interstiziale sulla struttura elettronica del cluster rimane una questione aperta. La figura mostra un esempio di struttura elettronica per un modello di mezzo FeMo-co, un cubano Mo–Fe–S avente o un solfuro o un carburo in un vertice, cioè



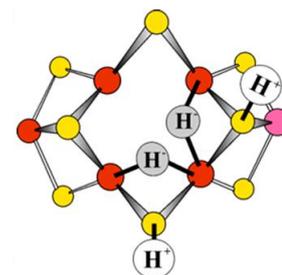
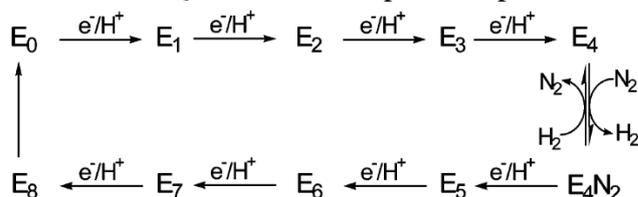
$[\text{MoFe}_3\text{S}_3\text{C}]^{1+}$ o $[\text{MoFe}_3\text{S}_4]^{3+}$. I due cubani condividono le seguenti caratteristiche: l'inusuale configurazione non-Hund al Mo(III), un paio di Fe a valenza mista Fe(2.5)–Fe(2.5), e un Fe(III) accoppiato anti-ferromagneticamente. In conclusione, la struttura elettronica del FeMoco è ancora un problema aperto.

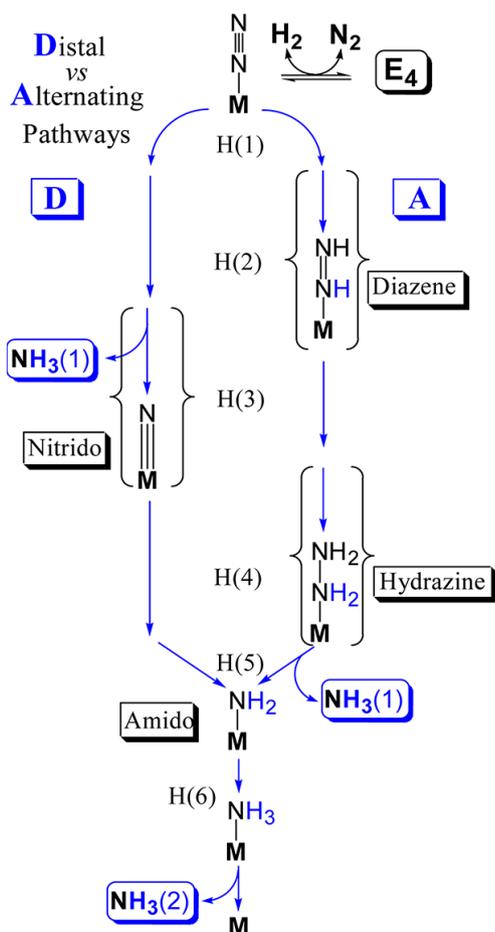
Ciclo catalitico

Durante il ciclo catalitico il FeMo-co deve accettare otto elettroni, e la Fe-proteina trasferisce un solo elettrone per volta quando si lega in modo transiente alla FeMo-proteina. Nel ciclo catalitico generico (figura), il numero complessivo di elettroni (e protoni) trasferiti alla FeMo-proteina (indicata con E) è il pedice numerico di ogni stato intermedio. Quindi la FeMo-proteina passa da E_0 a E_8 durante la fissazione di N_2 , prima di tornare di nuovo al *resting state* E_0 . Sono state fatte delle importanti osservazioni su questo ciclo catalitico: innanzitutto, si sa che si devono accumulare almeno 3 (ma preferibilmente 4) elettroni (stati E_3 o E_4) prima che il FeMo-co coordini N_2 . Inoltre, quando si lega N_2 viene rilasciata una molecola di H_2 dal FeMo-co. In assenza di N_2 , il FeMo-co passa solo attraverso stati E_n bassi, producendo H_2 , e la riduzione di protoni da parte della nitrogenasi è proprio una delle maggiori complicazioni quando si cerca di generare degli stati E_n alti per poterli studiare. È inoltre chiaro che l'ambiente proteico intorno al FeMo-co è fondamentale per determinarne l'attività catalitica (il FeMo-co isolato è inattivo) e probabilmente anche per determinare il sito di *binding* del substrato. Sebbene la fascia centrale del FeMo-co abbia tre facce rettangolari 4Fe–4S equivalenti per simmetria (e.g. una di queste è Fe2, Fe6, Fe5 e Fe4), l'intorno proteico non è simmetrico. Quindi sono stati mutati



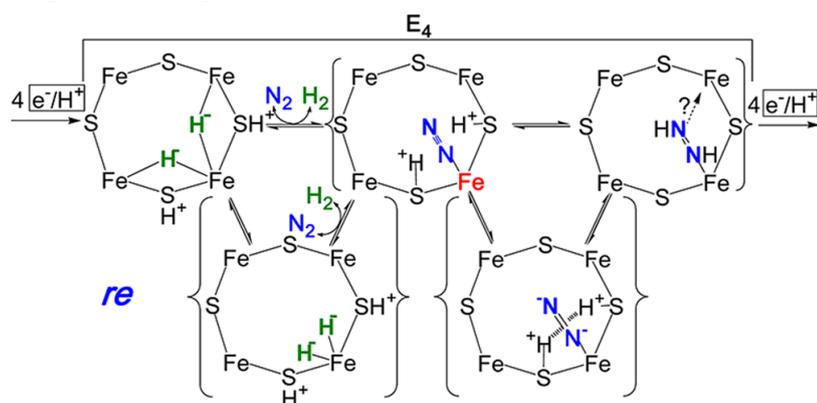
selettivamente i vari amminoacidi intorno al FeMo-co per avere indicazioni su quello che potrebbe essere il sito di *binding*, misurando l'affinità e la velocità di riduzione non solo di N_2 ma anche di altri substrati non-naturali, soprattutto alchini, che la nitrogenasi *wild type* riesce a ridurre. Si è visto in particolare che mutazioni a una glicina in seconda sfera rispetto al FeMo-co, $\alpha\text{Gly}69$, sono importanti e si trasmettono al FeMo-co tramite l'adiacente valina, $\alpha\text{Val}70$, in prima sfera (figura) considerata il *gatekeeper* del sito, che controlla stericamente l'accesso del substrato al sito attivo del FeMo-co. In base a questi dati si ritiene oggi che la coordinazione del substrato avvenga sulla faccia 4Fe–4S definita dagli atomi di ferro Fe2, Fe3, Fe6 e Fe7. Si ritiene anche che l'istidina adiacente, $\alpha\text{His}195$, sia coinvolta nel trasferimento di protoni al substrato in fase di riduzione. Studi spettroscopici e teorici condotti con alchini suggeriscono che per loro il sito di legame più probabile sia Fe6. Da sottolineare che, quand'anche Fe6 fosse il sito di *binding* di N_2 , gli studi fatti finora non escludono affatto la possibilità che gli intermedi durante la riduzione di N_2 possano migrare su altri siti. È stato recentemente intrappolato e caratterizzato spettroscopicamente (EPR/ENDOR) l'**intermedio** E_4 , quello in cui si coordina N_2 e che ha accumulato 4 elettroni e 4 protoni: si ritiene che contenga due idruri a ponte fra atomi di Fe (e questo richiede una faccia 4Fe). Un **modello** di E_4 è mostrato in figura, con due protoni aggiuntivi su solfuri a ponte per bilanciare la carica. Quindi, in questa ipotesi, i primi quattro equivalenti riduttivi (elettroni+protoni) sono accumulati sugli idruri e non sugli ioni metallici. Questa ipotesi è in accordo anche col fatto che il trasferimento di elettroni successivi dalla Fe-proteina avviene sempre allo stesso potenziale (se si accumulassero sul ferro dovrebbe essere via via più difficile trasferire elettroni al FeMo-co).





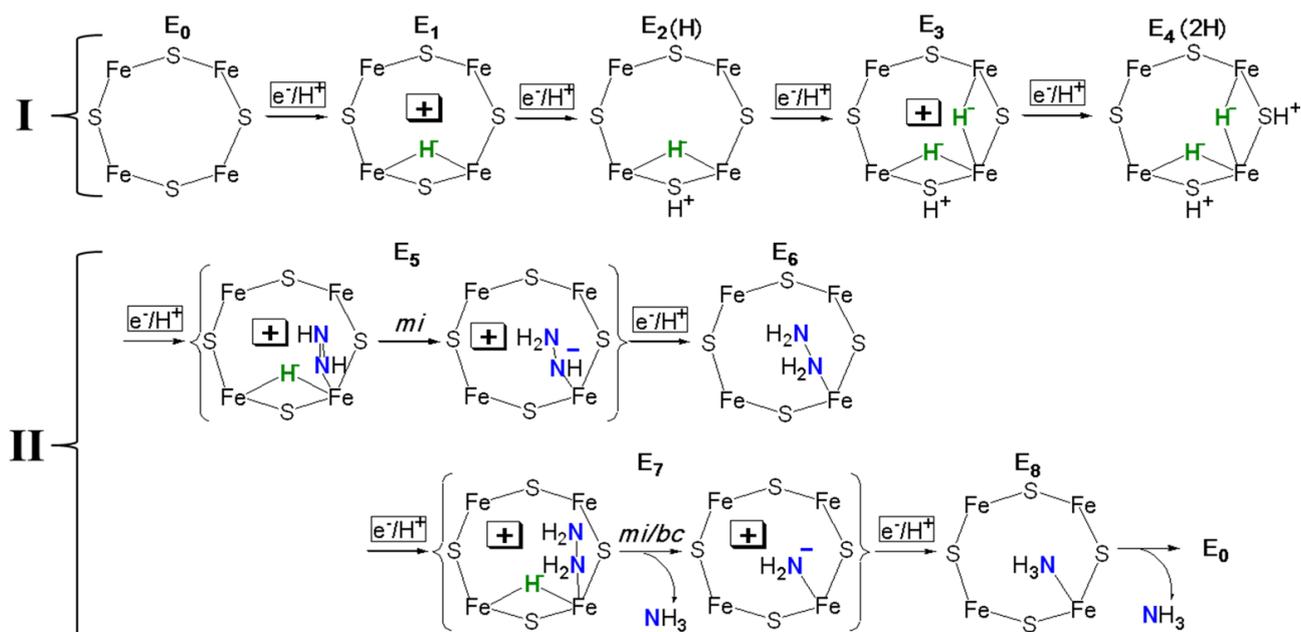
In linea di principio sono possibili due cammini di reazione per la riduzione di N_2 , con intermedi nettamente distinti: il cammino cosiddetto “*distale*”, **D**, (che corrisponde al modello di Schrock visto prima) e quello cosiddetto “*alternato*”, **A**, (figura). Nel cammino distale un solo N di N_2 , quello più lontano dal metallo, viene prima idrogenato in tre stadi successivi, (tre aggiunte di $e^- + H^+$) con rottura del legame N–N e liberazione della prima NH_3 , e poi il restante N (nitruro) viene ridotto e idrogenato altre tre volte generando la seconda molecola di ammoniaca. Nel meccanismo alternato, le prime due idrogenazioni generano un intermedio “diazene” e le successive due un’idrazina e la prima NH_3 viene liberata solo dalla quinta idrogenazione. A parte i possibili intermedi, la grossa differenza tra i meccanismi **A** e **D** è che in **D** il rilascio della prima NH_3 avviene dopo 3 idrogenazioni, mentre in **A** avviene dopo 5 idrogenazioni successive. Al momento, per una serie di considerazioni, **viene favorito il cammino A**, soprattutto perché la nitrogenasi riduce anche N_2H_2 e N_2H_4 e potrebbe farlo utilizzando un unico ciclo catalitico (cioè N_2H_2 e N_2H_4 entrerebbero nel ciclo nel loro stadio specifico). Si ritiene quindi che quando N_2 si lega (presumibilmente *end-on*) allo stadio E_4 , si abbia l’eliminazione di H_2 (con perdita di due dei quattro equivalenti di riduzione accumulati) e immediata riduzione di N_2 a diazene N_2H_2 , lo stadio

termodinamicamente più difficile, con i due equivalenti di riduzione e due protoni rimasti. Si ritiene anche che H_2 venga generato per eliminazione riduttiva dei due idruri (il cosiddetto *re mechanism*, figura), che quindi trasferirebbero al $FeMo-co$ 2 dei 4 elettroni che hanno accumulato, magari



generando un $Fe(0)$ altamente riduttivo (in rosso in figura) che coordinerebbe e ridurrebbe subito N_2 (attivato anche elettrostaticamente dai due protoni sui solfuri) generando N_2H_2 . Questo meccanismo giustificerebbe perché la nitrogenasi sprechi il 25% di ATP: la generazione di H_2 è necessaria per la creazione del $FeMo-co$ attivato per la doppia idrogenazione di N_2 . Questo

meccanismo complessivo, basato sugli idruri, prevede che **il cluster $FeMo-co$ cambi di una sola unità il suo stato di ossidazione complessivo**, quando riceve coppie elettrone/protoni per arrivare a stati E_n dispari. Se si presume che l’aggiunta di ogni coppia e^-/H^+ per dare un E_n dispari generi un idruro a ponte, questo implica che il cluster (o in particolare un atomo di Fe) si ossidi per 1 elettrone. In E_1 ed E_3 l’idruro viene “immagazzinato” dal cluster, mentre in E_5 ed E_7 verrebbe rapidamente trasferito al substrato. In seguito all’aggiunta di una coppia e^-/H^+ ad un E_n dispari per formare il successivo E_n pari, l’elettrone va formalmente a ridurre il cluster, riportandolo al livello del *resting state*. Il corrispondente protone va su un solfuro nella prima parte del ciclo, o a neutralizzare l’intermedio in fase di riduzione nella seconda. Il tutto è riassunto nella figura successiva, che è attualmente (2014) il modello più avanzato per il funzionamento della nitrogenasi.



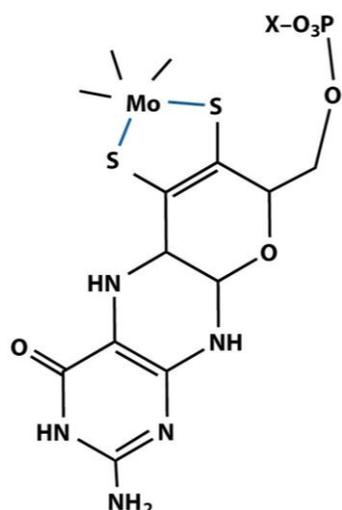
Al termine di questa aggiornata panoramica sulla nitrogenasi, si possono aggiungere alcune considerazioni di carattere generale. Buona parte del recente lavoro fatto dai chimici inorganici sulla riduzione di N_2 si è concentrato sulla produzione di ammoniaca. Sebbene si dica spesso che un processo catalitico in fase omogenea per la sintesi dell'ammoniaca sarebbe preferibile rispetto a quello eterogeneo Haber-Bosch che notoriamente richiede elevate temperature e pressioni (350 – 550 °C e 250 – 350 atm), e che si stima consumi tra l'1.4 e il 2% della produzione globale di energia, non bisogna trascurare il fatto che la presenza di un solvente creerebbe notevoli problemi di separazione e che attualmente la tecnologia Haber-Bosch può vantare un'eccellente efficienza energetica del 70% (molto prossima al limite termodinamico). Intuitivamente la riduzione biocatalitica di N_2 basata sulla nitrogenasi sembra attraente per via della bassa temperatura e pressione, ma risulta invece poco conveniente su larga scala perché la nitrogenasi non è affatto efficiente dal punto di vista energetico, dal momento che idrolizza almeno 16 molecole di ATP per ogni molecola di N_2 ridotta. Quindi, la prospettiva di impiegare catalizzatori omogenei o enzimatici per la produzione di ammoniaca su larga scala è piuttosto limitata. Il principale impatto che possono avere i piccoli complessi in grado di ridurre N_2 ad ammoniaca è a livello conoscitivo: essi possono fornire strutture ben definite e studi sistematici in grado di elucidare i meccanismi fondamentali della riduzione di N_2 e le analogie fra l'enzima e le superfici catalitiche dove i meccanismi a livello atomico sono ancora sconosciuti. Inoltre, i chimici dovrebbero cercare di espandere la gamma di prodotti che si possono ottenere dalla riduzione dell' N_2 coordinato, in particolare c'è molto interesse a sviluppare reazioni che portino alla formazione di legami N-C. Poiché questo tipo di reazioni può portare a prodotti chimici con elevato valore aggiunto, c'è in prospettiva molto più interesse economico per lo sviluppo di prodotti della chimica fine piuttosto che per la sintesi dell'ammoniaca. Vi sono già esempi di reazioni stechiometriche di questo tipo con complessi di Mo e Fe e la sfida è attualmente quella di farle diventare catalitiche.

Altri enzimi contenenti molibdeno o tungsteno

Oltre alla nitrogenasi, come già detto all'inizio di questo capitolo, il molibdeno svolge ruoli biologici in molte specie viventi, probabilmente anche grazie alla sua buona biodisponibilità. Invece finora il tungsteno è stato trovato soltanto in alcuni batteri, cioè in procarioti. Al momento sono stati purificati e caratterizzati dal punto di vista biochimico più di 50 enzimi contenenti molibdeno. A parte la nitrogenasi (nella quale il Mo è incorporato nel cluster $[MoFe_7S_9]$ del sito attivo), i siti attivi degli enzimi al Mo sono mononucleari.

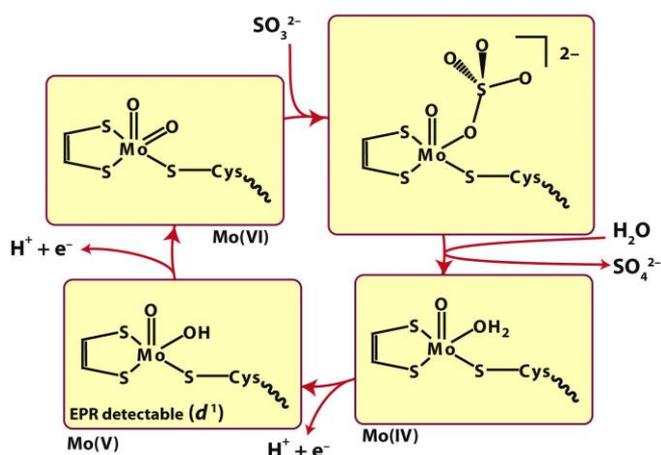
Il molibdeno è un *trace element* essenziale per numerosi enzimi importanti per il metabolismo sia di animali che piante. Il molibdeno è essenziale anche per l'uomo (ca. 10 mg su 75 kg di peso corporeo), essendo necessario per almeno tre enzimi: l'enzima **solfito ossidasi**, che catalizza l'ossidazione del solfito a solfato, è necessario per il metabolismo degli aminoacidi contenenti zolfo; la sua deficienza o assenza porta a sintomi neurologici e morte precoce. L'enzima **xantina ossidasi** catalizza l'idrossilazione ossidativa di purine e piridine, inclusa la conversione di ipoxantina a xantina e di quest'ultima ad acido urico. L'enzima **aldeide ossidasi** catalizza l'ossidazione di gruppi aldeidici ad acidi carbossilici e anche l'ossidazione di eterocicli. La carenza di molibdeno nella dieta comporta livelli bassi di acido urico nel siero e nell'urina ed eccessiva escrezione della xantina.

Enzimi al molibdeno catalizzano la ossidazione o la riduzione di piccole molecole, soprattutto inorganiche, cioè in genere la funzione catalitica consiste nel trasferire un atomo di ossigeno a/da una molecola di accettore/donatore fisiologico. Per questo motivo questi enzimi vengono a volte complessivamente definiti **osso-trasferasi**. Esempi di reazioni catalitiche sono l'ossidazione di solfito, arsenito, xantina, aldeidi e monossido di carbonio, e la **riduzione del nitrato** e del dimetilsolfossido. Tutti gli enzimi contenenti molibdeno rientrano in tre famiglie, vaste e mutuamente esclusive, esemplificate dagli enzimi **xantina-ossidasi**, **solfito-ossidasi** e **DMSO-riduttasi**. Noi tratteremo solo la solfito ossidasi.

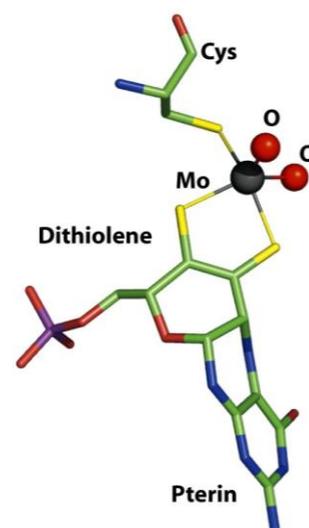


Sia Mo che W sono trovati in combinazione con una classe inusuale di cofattori, cioè di leganti: infatti, in quasi tutti gli enzimi al Mo o W il metallo è coordinato da un legante (o **cofattore**) speciale chiamato **molibdopterina** (figura), nel quale i due atomi di zolfo di un **gruppo ditiolene** fungono da donatori al molibdeno e il gruppo è poi legato covalentemente ad una idro-pterina. Il gruppo fosfato è poi spesso legato ad una base nucleosidica (X in figura), come la guanosina 5'-difosfato. La molibdopterina ha una biosintesi complessa, che parte dalla guanosina trifosfato e prevede come ultimo stadio l'incorporazione del molibdeno stesso, come Mo(VI). Il molibdeno, al contrario dei bio-metalli della prima serie di transizione che sono tipicamente presenti nella cellula come cationi, deriva dall'anione molibdato (altamente solubile in acqua). Dopo l'inserimento del molibdeno il cofattore è molto sensibile all'ossidazione e numerosi dati

sperimentali suggeriscono che, almeno negli eucarioti, esso non è libero nella cellula ma fortemente legato a proteine di *storage* che lo proteggono dall'ossidazione. Il motivo per cui Mo e W siano coordinati da questo legante inusuale non è noto, ma si ritiene che il gruppo pterinico possa fornire un buon percorso per il trasferimento di elettroni (pur non comportandosi esso stesso come legante redox-attivo) e facilitare quindi reazioni redox *long-range*. Un'altra funzione attribuita al



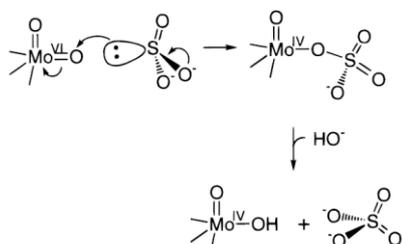
cofattore pterinico è quella di modulare il potenziale redox del molibdeno. Negli organismi superiori, mammiferi inclusi, il molibdeno è coordinato, oltre che dal ditiolene di una pterina, anche da altri leganti che spesso includono cisteinati, come nel sito attivo della **solfito-ossidasi**. Nella struttura ai raggi X di



questo sito (figura) si vede anche come è distorto il legante pterinico. In effetti, mentre nelle famiglie delle xantina-ossidasi e della DMSO-riduttasi la configurazione della molibdopterina sembra essere quella di tetraidro-pterina, in quella delle solfito-ossidasi è quella di diidro-pterina. Nei procarioti il Mo è coordinato addirittura a due cofattori pterinici. La coordinazione del Mo è poi solitamente completata da leganti donatori *hard*, tipicamente H_2O , OH^- e O^{2-} .

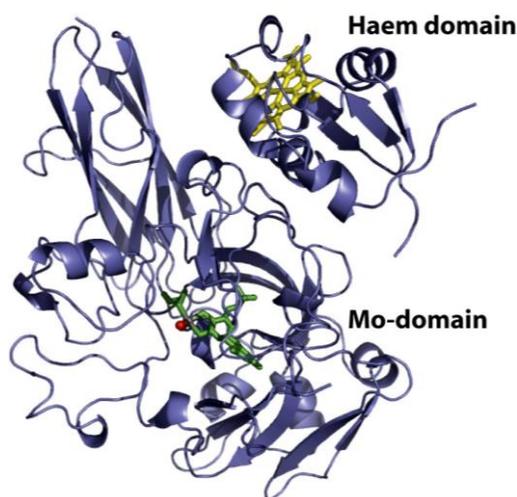
Il molibdeno è adatto a partecipare a reazioni redox in quanto possiede **tre stati di ossidazione stabili**, Mo(IV), Mo(V) e Mo(VI), separati dal trasferimento di un elettrone (che deve essere accoppiato al trasferimento di un protone). Tipicamente Mo(IV) e Mo(VI) differiscono nel numero di gruppi osso che contengono, e gli enzimi al molibdeno solitamente accoppiano reazioni di trasferimento di un elettrone al trasferimento di O.

Un tipico meccanismo, che prevede appunto il **trasferimento diretto di un atomo di ossigeno**, è illustrato in figura per l'enzima solfito-ossidasi, presente anche nell'uomo e localizzato nei mitocondri, che catalizza l'ossidazione del solfito (tossico) a solfato.



L'atomo di zolfo del solfito attacca un atomo di ossigeno coordinato al Mo(VI), e quindi elettrone-deficiente. L'attacco è seguito da rottura del legame Mo–O con formazione di Mo(IV) e di SO_4^{2-} . La riossidazione a Mo(VI) con contemporaneo recupero di un atomo di ossigeno “trasferibile” avviene tramite due trasferimenti di un elettrone alla volta a una Fe-porfirina di un

citocromo c che appartiene al dominio cosiddetto “mobile” dell'enzima (figura). L'intermedio contenente Mo(V) (d^1) è stato individuato tramite spettroscopia EPR.



Le reazioni di ossigenazione catalizzate da Mo-enzimi possono essere distinte da quella catalizzate da enzimi al Fe e Cu descritti precedentemente perché **negli enzimi al molibdeno il gruppo osso che viene trasferito non deriva da O_2 ma dall'acqua**. Il gruppo Mo(VI)=O può trasferire un atomo di ossigeno o direttamente (sfera interna) oppure indirettamente, a un substrato ossofilico come SO_3^{2-} o AsO_3^{2-} , ma **non è in grado di ossigenare legami C–H**. L'ultima figura mostra la scala per l'entalpia delle reazioni di

trasferimento di atomi di ossigeno: si vede che le specie osso-ferrile di Fe(IV) ottenute per reazione con O_2 o H_2O_2 sono altamente ossidanti e in grado di ossigenare qualsiasi substrato, mentre le specie di Mo(VI) sono limitate a substrati più riducenti (quelli che gli stanno sotto nella scala) e il Mo(IV) e W(IV) sono buoni accettori di atomi di ossigeno, ad esempio Mo(IV) è in grado di estrarre un atomo O dal nitrato e dal dimetilsolfossido (che gli stanno sopra nella scala).

In accordo con la sua posizione nel Gruppo 6 al di sotto del Mo, gli stati di ossidazione più bassi di W sono meno stabili di quelli di Mo, cosicché le specie di W(IV) sono spesso dei potenti agenti riducenti (cioè si ossidano facilmente a W(VI)). Un esempio è l'enzima al W formato-deidrogenasi, presente in certi organismi primitivi, che catalizza la riduzione di CO_2 a formato, HCOO^- , che è il primo stadio nell'assimilazione del carbonio per via non-fotosintetica. La reazione non prevede la inserzione di un atomo di O in un legame C–H, ma piuttosto la formazione di un legame C–H su CO_2 .

