

Ferro-eme

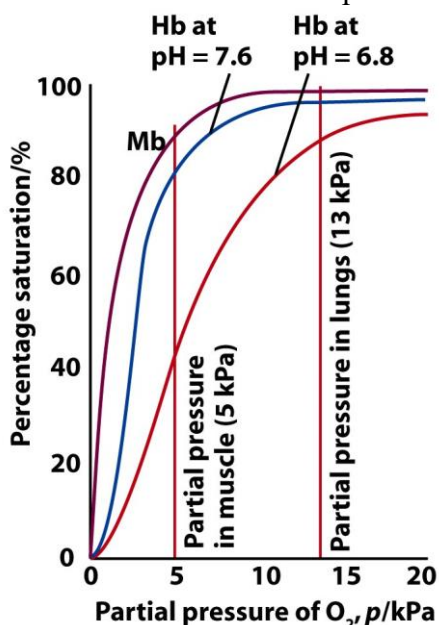
Trasporto ed immagazzinamento di O₂: Emoglobina e Mioglobina

L'utilizzo controllato di O₂ da parte di un organismo richiede innanzitutto il suo *uptake* reversibile dall'atmosfera e il suo trasporto in siti dove deve essere immagazzinato prima di venire utilizzato.

Per questo scopo alcuni invertebrati utilizzano centri metallici dinucleari coordinati da amminoacidi, sia rame (**Emocianina**) che ferro (**Emeritina**) (vedi dopo). Ma gli altri organismi superiori usano il sistema **eme**, cioè il complesso mononucleare di ferro in un macrociclo tetrapirrolico di tipo porfirinico. Le proteine corrispondenti sono la **Emoglobina (Hb)**, un tetramero, per l'*uptake* nei polmoni e il trasporto nel sangue, e la **Mioglobina (Mb)**, monomero (vedi in figura la struttura ai raggi X), per l'immagazzinamento e il trasporto dell'ossigeno nel tessuto muscolare. La presenza di proteine di trasporto aumenta fino a 100 volte la concentrazione di O₂ nel sangue rispetto all'acqua, dove normalmente sarebbe millimolare.

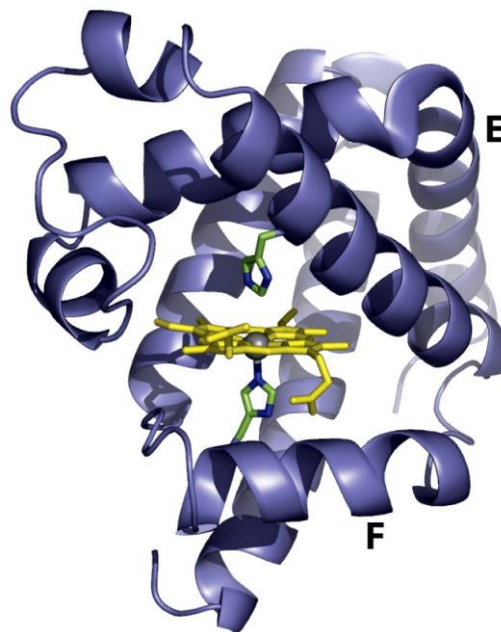
Dal momento che il trasporto dell'O₂ è stechiometrico, circa il 65% del ferro contenuto nel corpo umano è impiegato nell'Hb; il contenuto di ferro nella proteina di *storage* Mb è di circa il 6% (serve da *buffer* per mantenere elevato il livello di O₂ nei tessuti anche in condizioni sfavorevoli, ad esempio bassa pressione di O₂). Il resto del ferro è quasi tutto immagazzinato nella ferritina (vedi dopo). Gli enzimi catalitici al ferro sono presenti solo in quantità molto piccole.

L'Hb deve catturare e trasportare l'O₂ con efficienza (ed evitando che reagisca!), ma poi cederlo



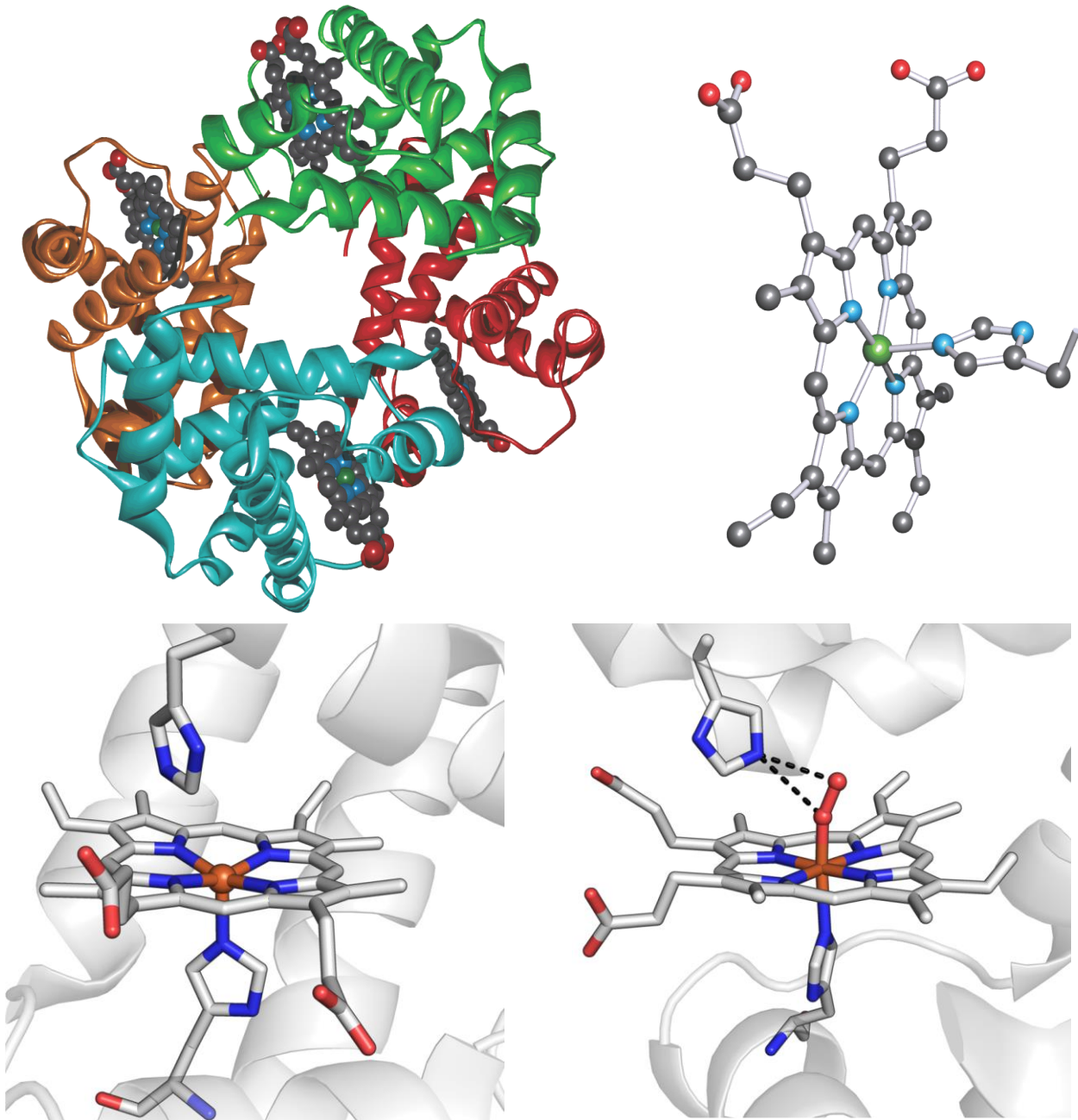
completamente alla proteina di *storage* Mb, la quale quindi deve avere una più elevata affinità per O₂ rispetto alla Hb. Questa efficienza nella Hb è garantita da un **effetto cooperativo** dei 4 gruppi eme, cioè l'affinità per l'ossigeno in funzione della sua pressione parziale aumenta con una curva di saturazione sigmoideale, non iperbolica come quella della mioglobina (figura). Cioè quando il gruppo eme in una delle 4 subunità dell'emoglobina si lega all'ossigeno, i rimanenti gruppi eme aumentano la loro affinità per O₂. L'effetto cooperativo garantisce il trasferimento efficiente ai siti di *storage*: meno ossigeno è presente nel sistema di trasporto e più completamente è rilasciato allo *storage*. Inoltre, come si vede in figura, la curva di saturazione dipende dal pH: questo effetto nasce dal fatto che l'emoglobina funge anche da trasportatore del diossido di carbonio, il quale occupa però un diverso sito di legame (rispetto all'ossigeno). Tramite l'enzima *anidrasi carbonica* (vedi dopo) il diossido di carbonio reagisce con l'acqua per dare acido carbonico, che si

decompone in idrogenocarbonato e protoni:



Quindi il sangue con elevati livelli di CO_2 ha anche un pH più basso. L'Hb può legare protoni e CO_2 : i protoni si legano in vari siti lungo la proteina mentre **il diossido di carbonio si lega al gruppo amminico terminale (α) formando un carbammato** (vedi anche Rubisco). Questi legami inducono variazioni conformazionali nella proteina che facilitano il rilascio dell'ossigeno. Al contrario, quando il livello di CO_2 nel sangue diminuisce (ad esempio nei capillari dei polmoni), CO_2 e protoni vengono rilasciati dall'emoglobina, aumentandone di conseguenza l'affinità per l'ossigeno. Questo controllo dell'affinità dell'Hb per l'ossigeno attraverso la coordinazione ed il rilascio di CO_2 e protoni è un caso di effetto allosterico (vedi dopo) noto come **effetto Bohr**.

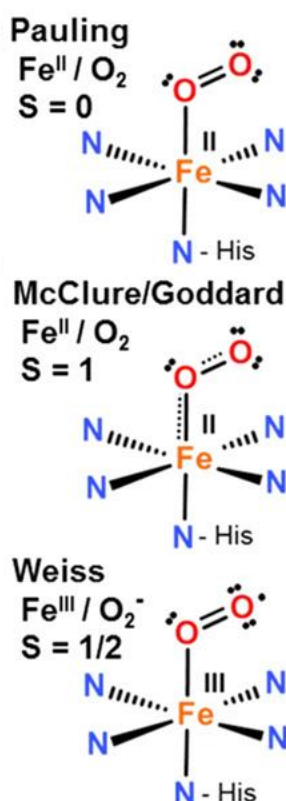
L'emoglobina è una proteina globulare, un tetramero $\alpha_2\beta_2$ composto da due coppie uguali (α e β) di catene peptidiche non legate covalentemente fra loro, formate rispettivamente da 141 e 146 amminoacidi, e molto simili a quella della mioglobina. La mioglobina (le prima proteina ad essere cristallizzata nel 1849) ha peso molecolare 17.8 kDa, mentre la Hb ha peso molecolare 64.5 kDa (figura).



Dei due siti assiali del ferro nell'eme, uno è occupato dall'imidazolo di un'**istidina prossimale**, unico sito di ancoraggio, mentre l'altro è essenzialmente libero per la coordinazione dell' O_2 . Però

nelle vicinanze del sito c'è anche una istidina distale (e una valina, che contiene il gruppo isopropile).

Vediamo innanzitutto il problema degli stati di ossidazione e di spin del ferro prima e dopo la coordinazione di O_2 . Nelle desossi-Hb e Mb il ferro è sicuramente **Fe(II), d^6 , ad alto spin**, con quattro elettroni spaiati. La presenza di un numero pari di elettroni spaiati è favorevole al legame rapido, non spin-proibito, dell' O_2 che è in stato di tripletto ($S = 1$). La forma ossi è diamagnetica ($S = 0$), con l' O_2 coordinato in **modo end-on**, con un angolo Fe–O–O di circa 120° . In questo caso la definizione dello stato di ossidazione è meno facile, a causa della natura 'non-innocente' dell' O_2 coordinato. Sono state proposte due alternative "estreme", una avanzata da Pauling e l'altra da Weiss. Secondo Pauling il diamagnetismo della forma ossi è dovuto alla combinazione di Fe(II) basso spin e ossigeno di singoletto, 1O_2 , entrambi diamagnetici. Secondo Weiss, invece, si ha prima il trasferimento di un elettrone dal metallo all' O_2 , generando Fe(III) basso spin con $S = 1/2$ e un radical-anione superossido O_2^- , anch'esso con spin $S = 1/2$. Il diamagnetismo complessivo sarebbe dovuto ad un forte **accoppiamento anti-ferromagnetico** tra i due frammenti. Alcuni dati sperimentali, come la frequenza di stretching O–O a circa 1100 cm^{-1} – caratteristica del superossido O_2^- – sembrano favorire l'ipotesi di Weiss. Un argomento a favore di Pauling è che CO ed NO, che di solito coordinano i metalli in basso stato di ossidazione, riescono a rimpiazzare l' O_2 coordinato. In genere, i calcoli teorici e le misure sperimentali (oltre all'IR anche misure di XPS, X-ray photoelectron spectroscopy) **favoriscono il modello di Weiss**. Tuttavia, dal momento che lo stato di ossidazione è sostanzialmente un formalismo, non è escluso che la realtà presenti diversi



contributi di entrambi i modelli, con una situazione intermedia come quella proposta nel **modello di McClure/Goddard** (figura), che prevede 3O_2 e Fe(II) in uno stato di spin intermedio con 2 elettroni spaiati e quindi $S = 1$ (dovuto a inversione della popolazione elettronica dei livelli d), con accoppiamento antiferromagnetico tra i due. In effetti i dati più recenti sono in accordo con tale modello, che prevede poco trasferimento di carica su O_2 , che avrebbe poco carattere di superossido, e una delocalizzazione del legame sui tre centri simile a quella nella molecola di ozono, con una buona percentuale di doppio legame Fe–O (figura). Gli interessati possono leggere gli articoli su calcoli teorici (J. Inorg. Biochem. 2005) e recenti misure sperimentali (PNAS 2017) che si trovano nella sezione bibliografia di Moodle.

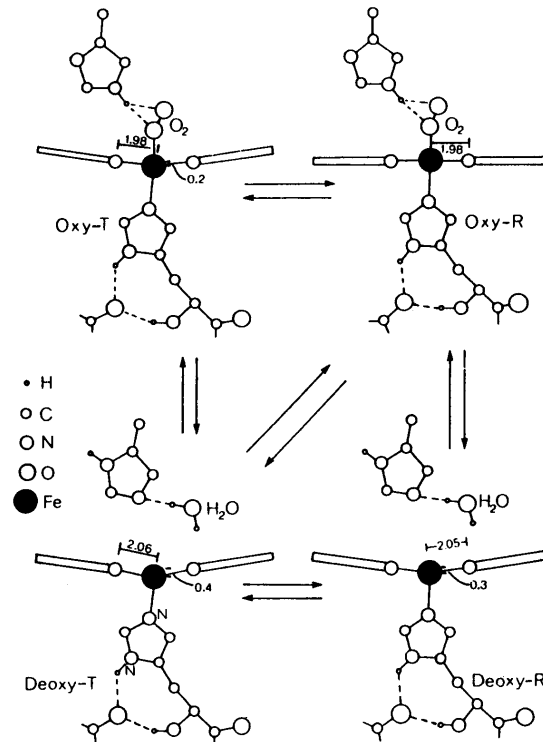
La figura precedente mostrava le strutture ai raggi X del sito di legame dell' O_2 nella desossi-Hb umana (A) e nella Hb ossigenata. Si noti il movimento dell'atomo di ferro verso il piano dell'eme nella forma ossigenata. L'istidina (basica) in posizione distale è posizionata in modo da facilitare la formazione di legami a idrogeno fra il gruppo $N_\epsilon-H$ e gli atomi di ossigeno dell' O_2 coordinato. Inoltre serve a tenere i protoni lontani dall' O_2 coordinato. I protoni infatti sono competitori elettrofili rispetto al ferro e indeboliscono il legame con O_2 .

La situazione alto-spin del Fe(II) nelle forme desossi di Hb e Mb è **inusuale** per complessi tetrapirrolici, che generano un campo forte. Il Fe(II) alto-spin però è relativamente grande (raggio ionico 0.92 \AA) e non

si adatta bene come dimensione nella cavità dell'eme, ed è quindi spostato di circa 0.42 \AA verso l'istidina vicina; inoltre l'eme è un pò piegato verso il basso. La coordinazione dell' O_2 al ferro comporta comunque, secondo tutti i modelli, un parziale trasferimento di carica dal Fe all' O_2 ed induce lo spin-crossover del Fe. Il ferro a basso-spin è più piccolo, sia come Fe(III) che Fe(II)

(raggio di 0.75 \AA per Fe(II) basso-spin, 0.55 \AA per Fe(III) basso-spin) e si avvicina di circa 0.2 \AA verso il piano della porfirina, che lo coordina meglio, così come anche l'istidina prossimale.

L'effetto cooperativo è attribuito alle interazioni fra le 4 unità eme della Hb, indotte dalla successiva coordinazione di O₂ ai singoli siti eme. Le 4 catene proteiche sono "legate" fra loro da interazioni elettrostatiche (*salt bridges*); ognuna mostra variazioni conformazionali in seguito alla coordinazione di O₂ e queste vengono trasmesse alle altre unità da un processo che comporta un cambiamento conformazionale della struttura quaternaria. E' stato proposto per ogni gruppo eme un semplice modello detto "a molla in tensione" a due stati, uno Teso (T), con minore affinità per O₂, ed uno Rilassato (R), con elevata affinità per O₂.



Secondo questo schema (figura) ci sono **quattro stati per il singolo sistema eme**: ossi o desossi, T o R. Le caratteristiche geometriche di ognuno di questi stati sono riportate nello schema. In particolare la forma T presenta un'interazione sterica con l'istidina prossimale che favorisce il piegamento della porfirina osservato nella forma desossi, che è non-planare.

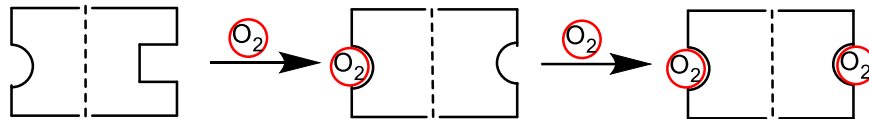
La prima molecola di O₂ si coordina alla desossi-T, 'fortemente' piegata, e quindi ha una affinità minore rispetto alla coordinazione a una Mb. Le interazioni fra le quattro catene impediscono alla forma ossi-T, ancora non completamente planare, di rilassarsi alla forma planare ossi-R, con legami Fe-N più forti. Così anche la seconda molecola di O₂ si coordina sostanzialmente a un eme nella forma T, cioè con affinità inferiore a quella massima. Si ritiene che dopo l'ingresso della seconda molecola di ossigeno si abbia il rilassamento di tutti i quattro gruppi eme, anche quelli ancora desossi, alla forma R, in cui il legame della istidina prossimale è più corto di 0.5 – 0.6 Å rispetto alla forma T. E' stata infatti determinata la struttura ai raggi X della Hb nello stato bis-ossigenato ed essa mostra solo un piccolo movimento dell'atomo di Fe e dell'istidina rispetto alla mono-ossigenata, cioè è ancora nello stato T. E' l'arrivo della seconda molecola di O₂ che induce la conversione allo stato R; questo rimuove la tensione della specie intermedia e permette all'atomo di Fe di entrare meglio al centro delle porfirine ossigenate, che si appiattiscono. Questo rilassamento viene trasmesso ai due Fe-eme ancora disponibili, non ossigenati, e quindi la coordinazione delle ultime due molecole di O₂ avviene con affinità crescente, spiegando l'andamento sigmoide della curva di saturazione. In pratica l'affinità della forma R per O₂ è circa la stessa delle catene α e β isolate, cioè della Mb, mentre quella della forma T è circa 12 – 14 kJ/mole inferiore.

Nel processo inverso, il rilascio di O₂ dalla forma ossi-R comporta di nuovo il piegamento della porfirina, forma desossi-R. I residui degli amminoacidi distali sono influenzati da queste variazioni

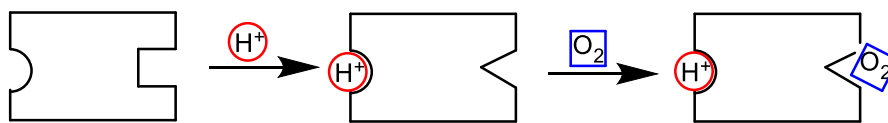
geometriche e, tramite variazioni nei ponti salini fra le catene, sono in grado di fornire interazioni *allosteriche omotropiche* con gli altri siti attivi nel tetramero di Hb, cioè modularne l'affinità per l'ossigeno.

In generale allosterismo significa il cambio di attività e conformazione di un enzima in seguito al legame di un composto (*effettore*) ad un sito dell'enzima diverso da quello attivo. La distinzione fra allosterismo omotropico ed eterotropico può venire schematizzata come segue:

L'effetto Bohr prima citato, in cui la coordinazione di CO₂ all'emoglobina e la protonazione della catena proteica influiscono sull'affinità dell'eme per l'ossigeno, è un esempio di allosterismo eterotropico.



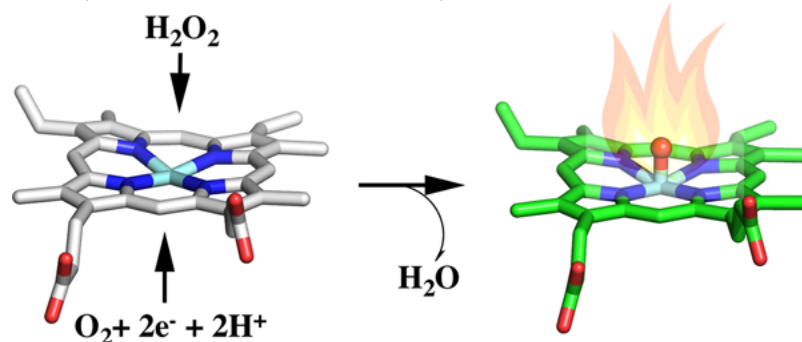
Allosterismo Omotropico



Allosterismo Eterotropico

Catalisi con eme-proteine

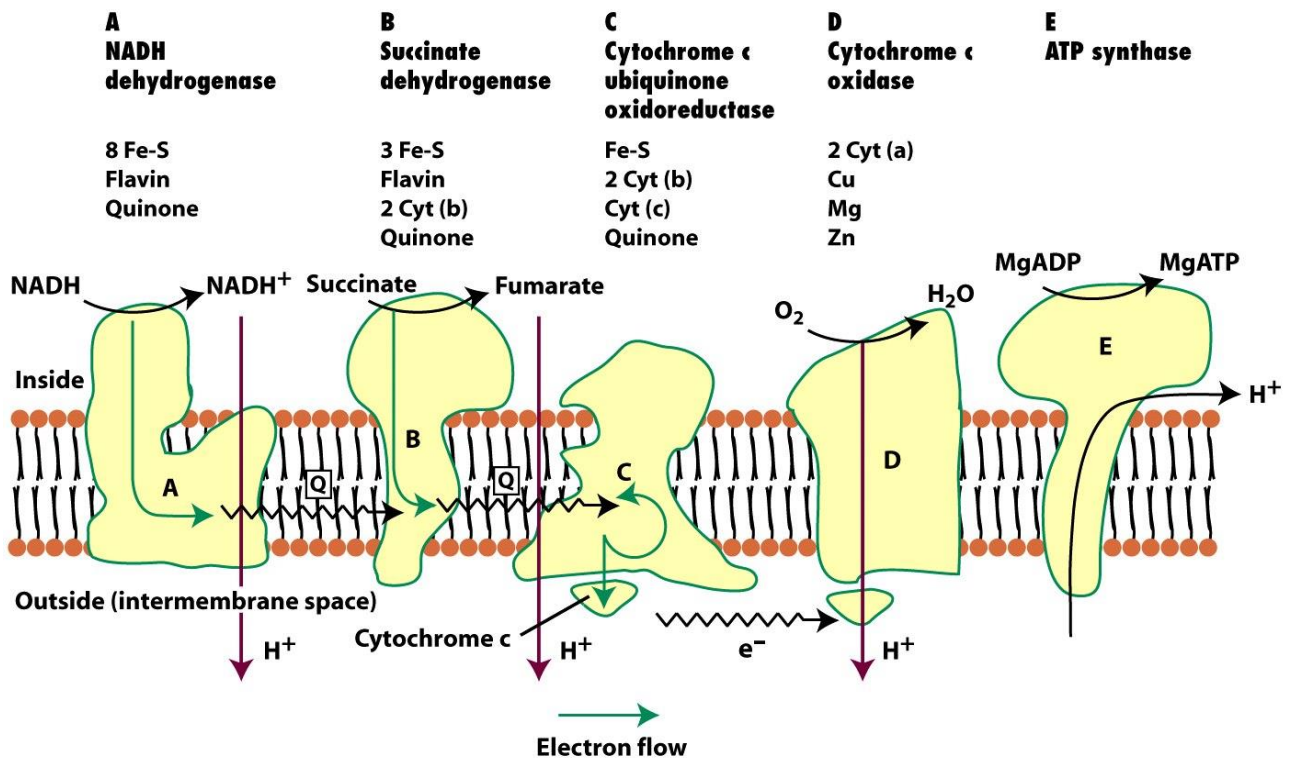
I complessi Fe-porfirina non sono coinvolti soltanto nel trasporto stechiometrico di O₂ ma anche in una serie di processi catalitici biochimici. Proteine contenenti gruppi eme partecipano a reazioni di trasferimento elettronico, e a reazioni di ossidazione, utilizzando O₂ o H₂O₂ come ossidanti.



Enzimi contenenti Fe-eme partecipano a complessi processi redox, come la respirazione cellulare. Il caso specifico della Citocromo c Ossidasi (CcO) verrà trattato più avanti con il rame.

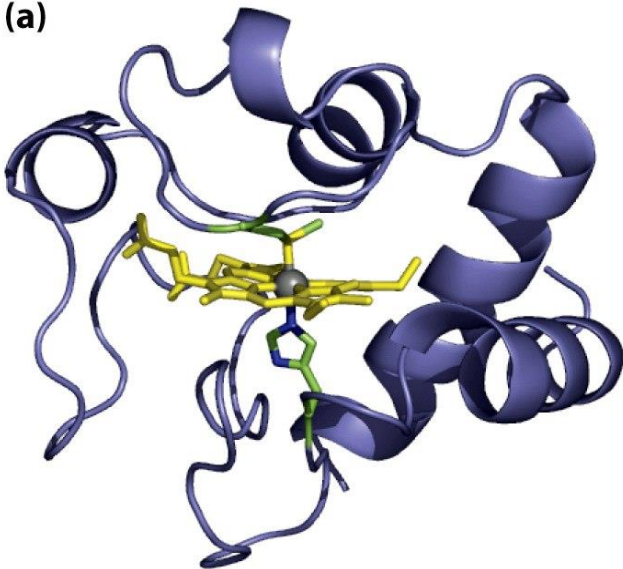
Citocromi

I citocromi sono eme-proteine che svolgono la loro **funzione di trasferimento elettronico** non solo nella catena respiratoria (figura), ma anche nella fotosintesi e in altri complessi processi biologici. Sono noti più di 50 citocromi, che vengono divisi in gruppi a seconda della loro struttura e delle proprietà fisiche. I citocromi possono contenere più di un gruppo eme.

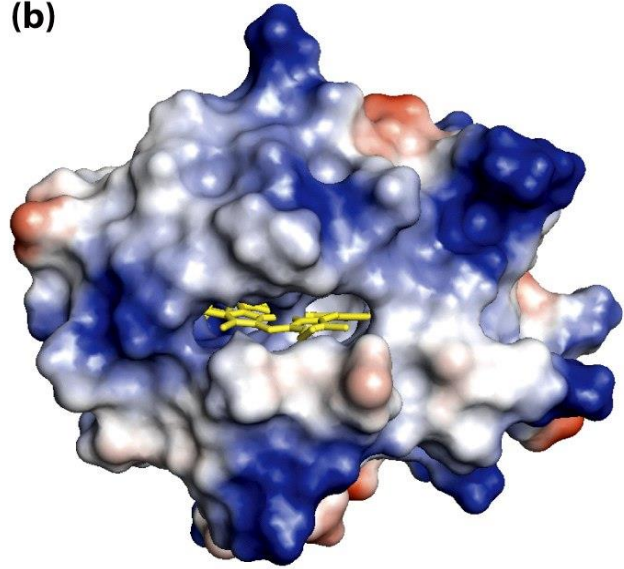


Il citocromo più studiato è il **Citocromo c**, una piccola proteina mobile che si ottiene tipicamente dal muscolo del cuore di cavallo. E' una proteina relativamente piccola, con poco più di 100 amminoacidi (12 kDa di peso molecolare), ed è mobile; contiene un solo gruppo eme che ha come leganti assiali del ferro una **istidina** e una **metionina** ($R = -CH_2CH_2SCH_3$); da notare che il Fe è coordinativamente saturo, in quanto deve solo trasferire elettroni. In figura è mostrata la struttura ai raggi X del Citocromo c (a destra è evidenziata la mappa del potenziale elettrostatico, in blu le zone a potenziale più positivo – cioè elettrone-povere – e in rosso quelle a potenziale più negativo, cioè più elettrone-ricche). Poiché la metionina è un legante a campo forte, il ferro del citocromo c nella sua forma nativa è basso-spin in entrambi gli stati di ossidazione (in accordo con la bassa energia di riorganizzazione del processo redox).

(a)

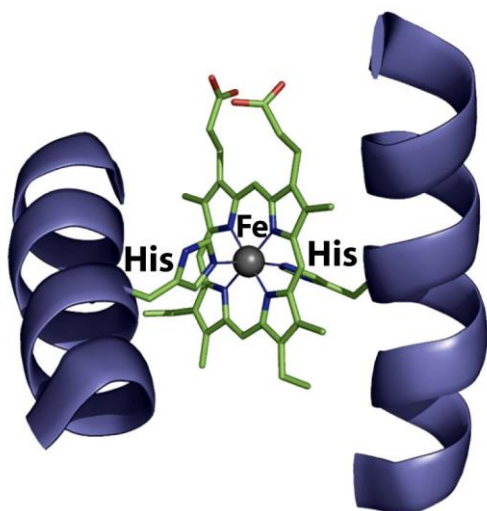


(b)



In generale il potenziale redox $Fe(III)/Fe(II)$ nei centri eme coordinativamente saturi dipende molto dai leganti assiali, per esempio è +260 mV per il Citocromo c e +20 mV nel Citocromo b, i cui leganti assiali sono due istidine (figura). Il potenziale redox dipende poi anche da altri fattori dell'intorno coordinativo, quali legami a idrogeno, distribuzione delle cariche elettrostatiche, distorsioni geometriche.

Il citocromo c deve essere una proteina molto antica in termini evolutivi, in quanto la sequenza amminoacidica e la struttura terziaria sono molto ben conservate in proteine isolate da organismi molto diversi.



Sebbene il trasferimento di elettroni sia una delle più semplici reazioni chimiche, bisogna considerare almeno tre variabili:

- 1) energia, cioè il potenziale redox a cui avviene;
- 2) lo spazio, cioè la direzionalità del trasferimento;
- 3) il tempo, cioè la velocità del trasferimento elettronico.

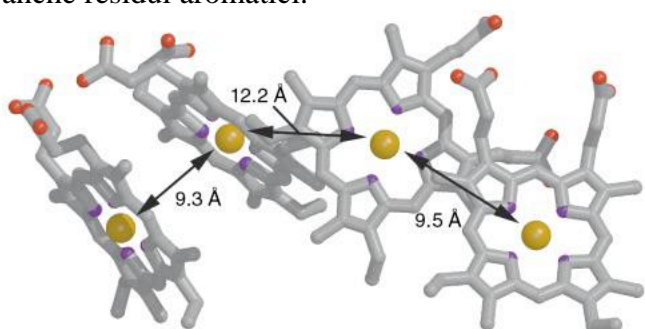
Vi sono aspetti non ancora del tutto chiariti a proposito delle proteine che compiono trasferimenti elettronici, e soprattutto: quali sono i requisiti, a livello molecolare, per un trasferimento elettronico, sia intra- che intermolecolare, che sia veloce ma comunque controllato dal potenziale redox? Come è possibile trasferire elettroni fra centri redox che possono distare fra loro più di 2 nm in un

ambiente proteico apparentemente inerte?

Il più grosso ostacolo a un rapido trasferimento elettronico sono le differenze geometriche tra la specie ossidata e ridotta della coppia redox (ricordare l'energia di riarrangiamento λ nell'equazione di Marcus). Studi su modelli di ferro-porfirina con tioeteri come leganti assiali hanno mostrato che la lunghezza del legame Fe-S cambia poco durante la transizione Fe(III)/Fe(II), perché l'atomo di S è sia σ -donatore che π -accettore e quindi fa raggiungere facilmente al sistema un bilancio elettronico.

In accordo con la teoria dello stato entatico, il *ground-state* enzimatico, sia per il Citocromo c che per altre proteine di trasferimento elettronico, è intermedio fra tipiche strutture di ognuno dei due stati di ossidazione del metallo, cioè è già vicino allo stato di transizione, per cui nel processo non si hanno grosse variazioni geometriche. Questo garantisce una bassa energia di attivazione.

La direzionalità del trasferimento elettronico *long-range* è ancora oggetto di molti studi; si parla di effetto "tunnelling", ma sembra anche che il trasferimento elettronico "through bond" possa essere importante, soprattutto quando la sezione proteica interessata al cammino dell'elettrone contiene anche residui aromatici.



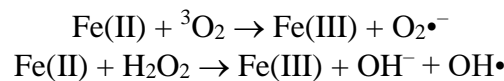
Per quanto riguarda il meccanismo di *tunnelling* degli elettroni nei citocromi, si ritiene che esso avvenga attraverso il bordo esposto di un gruppo eme (la porfirina è un sistema aromatico coniugato che può facilmente subire ossidazione o riduzione). A questo proposito, è istruttivo osservare la disposizione dei gruppi eme nel **Citocromo c554**, che ne contiene quattro ed è coinvolto

nella catena di nitrificazione catalizzata da batteri, cioè la conversione di NH_3 a NO_3^- . Il ruolo del Citocromo c554 è (presumibilmente) quello di accettare coppie di elettroni e poi trasferirle, tramite un altro citocromo, alla ossidasi finale. La struttura ai raggi X del Citocromo c554 (figura sopra) mostra che i quattro gruppi eme sono disposti in due coppie, nelle quali gli anelli porfirinici sono approssimativamente paralleli ed hanno un bordo sovrapposto. Le due coppie adiacenti sono circa perpendicolari fra loro. Questo tipo di disposizione spaziale è stata osservata anche in altri citocromi multi-eme, ed è presumibilmente fatta per consentire dei cammini di trasferimento elettronico efficiente fra i bordi dei gruppi eme. Nel c554 tre gruppi eme hanno il Fe coordinato da due istidine assiali, ma in uno di essi l'istidina è coordinata tramite l'inusuale $\text{N}\delta$; il quarto eme,

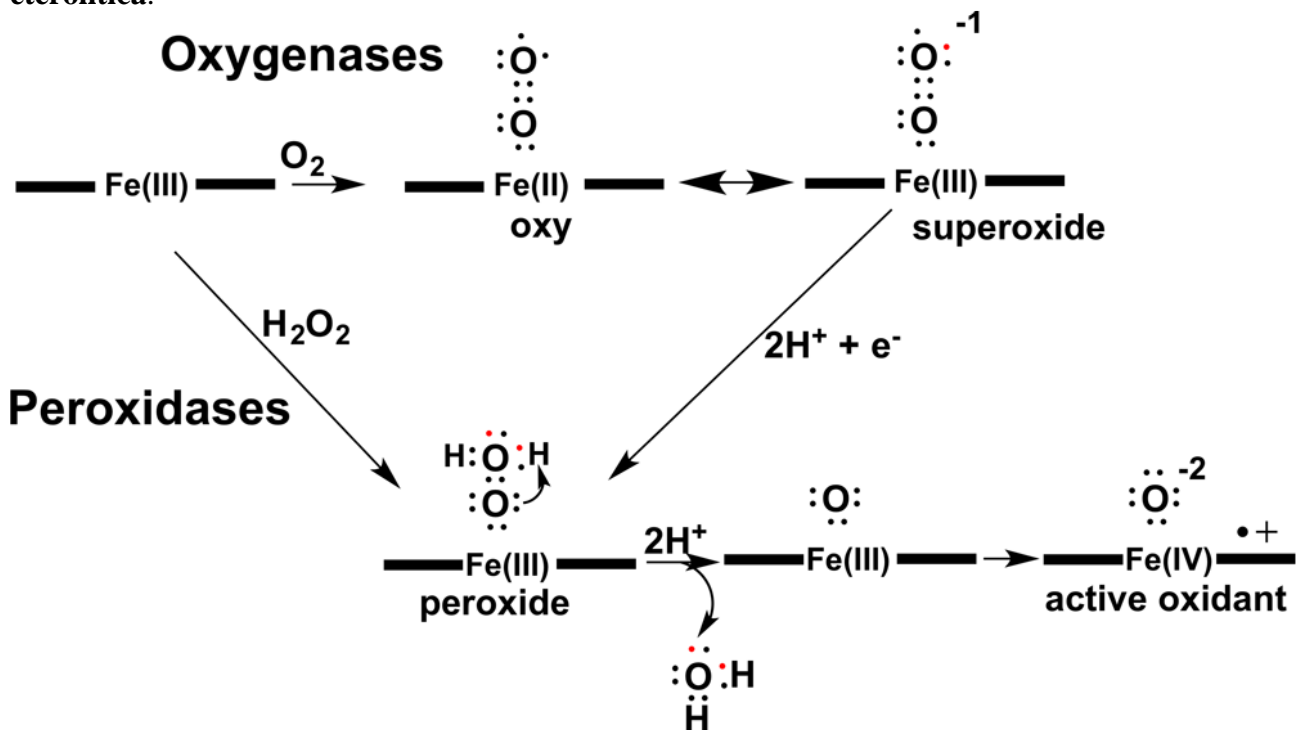
infine, è coordinato a una sola istidina assiale (ma non si ha evidenza che il sito assiale libero venga usato per coordinare piccole molecole).

Eme-enzimi ossidanti

Ci sono due ampie classi di eme-enzimi con funzioni ossidanti: le **ossigenasi**, che usano O_2 per ossidare, e solitamente ossigenare i substrati (cioè inserirvi atomi di O), e le **perossidasi**, che usano H_2O_2 per ossidare, ma normalmente non ossigenare, i substrati. Dei due ossidanti molecolari, il diossigeno è il più “difficile” perché, sebbene l’ossidazione di praticamente tutte le molecole biologiche da parte di O_2 sia un processo termodinamicamente favorito, O_2 non è una molecola reattiva. Il motivo sta nel fatto che queste reazioni hanno una grande barriera cinetica perché O_2 è una molecola paramagnetica e quindi la sua reazione con la stragrande maggioranza di molecole biologiche che sono diamagnetiche è un processo spin-proibito. La necessità della Natura di utilizzare centri metallici e l’eme nei siti attivi degli enzimi è proprio per superare questa barriera cinetica. Anche se H_2O_2 non presenta la barriera di spin di O_2 , essendo diamagnetico, ha comunque i suoi problemi come ossidante. Infatti, la reazione fra H_2O_2 e i metalli di transizione redox-attivi genera radicali idrossile (chimica di Fenton, vedi anche più avanti nella sezione omeostasi) che sono altamente distruttivi nei confronti dei siti attivi degli enzimi.

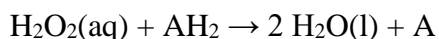


Quando nelle ossidasi vengono trasferiti i primi due elettroni sulla molecola di O_2 coordinata, questa diventa perossido, e quindi da questo punto in poi ossidasi e perossidasi si comportano allo stesso modo per compiere lo stadio fondamentale, cioè la **rottura del legame O–O**. Questo legame può venire rotto sia in maniera omolitica, generando due radicali idrossile, oppure in maniera eterolitica generando H_2O e un atomo di O “nudo”, con soli 6 elettroni di valenza. Dal momento che, nella maggior parte dei casi, il rilascio di radicali idrossile deve essere evitato, la Natura ha sviluppato/selezionato i siti attivi degli eme-enzimi in modo tale che **prevalga la rottura eterolitica**.



Perossidasi e Catalasi

Le perossidasi e catalasi contenenti eme usano la forma perossidica (cioè doppiamente ridotta) di O_2 e sono quindi anche, o innanzitutto, uno strumento per eliminare rapidamente questa molecola altamente reattiva e quindi potenzialmente dannosa. La reazione generica catalizzata è:



In pratica sono in grado di **estrarre due atomi di idrogeno da un generico substrato** del tipo AH_2 e trasformarlo in A. I substrati più comuni di questi enzimi sono fenoli e ammine aromatiche. In un organismo H_2O_2 si può generare come intermedio indesiderato nel corso dell'ossidazione fotosintetica dell' H_2O o tramite riduzione incompleta di O_2 durante la respirazione. Si valuta che soltanto circa l'80% dell' O_2 assunto durante la respirazione venga ridotto completamente ad acqua (riduzione che richiede 4 elettroni). Quindi le perossidasi devono anche essere considerate, almeno in parte, come **enzimi detossificanti**; questo è specialmente valido per le **catalasi**, dal momento che anche il loro substrato è H_2O_2 e la reazione catalizzata è la disproporzione dell' H_2O_2 , metastabile, a H_2O e O_2 :



Ci sono numerosi composti non facilmente ossidabili, come gli acidi grassi, ammine, fenoli oppure sostanze xenobiotiche (tossine), che fungono da substrati per le perossidasi. Ad esempio, una importante reazione svolta dalle perossidasi è la degradazione della lignina (*lignina perossidasi*).

L'enzima più studiato nel gruppo delle perossidasi è la **Horse-radish perossidasi (HRP)**, che ha una massa molecolare di circa 40 kDa (la maggior parte delle catalasi sono invece tetrameri con masse molecolari di circa 260 kDa). Altra perossidasi molto studiata è la **Citocromo c Perossidasi, CcP**, presente ad esempio nel lievito e nei batteri. **Questi enzimi rappresentano gli esempi meglio noti dell'esistenza di Fe(IV) in sistemi biologici.**

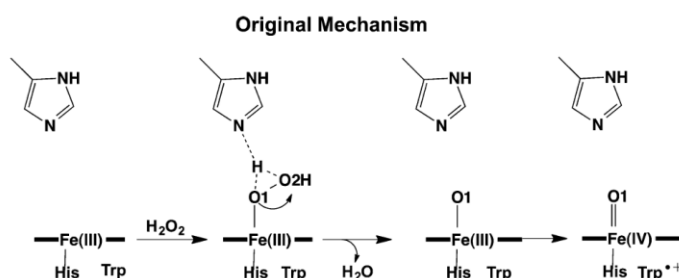
La figura mostra la struttura ai raggi X del sito attivo della CcP. L'eme è legato ad una istidina (legante prossimale, His175), la quale forma un legame a idrogeno con un aspartato (Asp235, conservato) che conferisce all'istidina maggior carattere di imidazolato (Im^-) e contribuisce ad abbassare il potenziale redox del ferro-eme rispetto alle globine (dove l'istidina prossimale fa un

legame a idrogeno solo con l'O di un carbonile peptidico). Il sito distale (sopra il piano dell'eme), come nella mioglobina, contiene un'altra istidina non coordinata al ferro (His 52), ma anche un gruppo guanidinio di una arginina (Arg-48). Il perossido si lega nel sito distale.

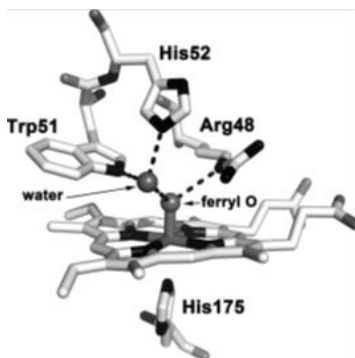
In condizioni fisiologiche il *resting-state* delle eme-

perossidasi (cioè quando l'enzima non è attivo) contiene Fe(III) alto-spin (guscio d mezzo pieno, $S = 5/2$, stato di sestetto, struttura *out-of-plane*). Una molecola di H_2O_2 si coordina al Fe(III) e l'istidina distale ha un ruolo fondamentale come catalizzatore acido-base nel mediare il trasferimento di un protone da O1 a O2, molto probabilmente mediato da una molecola d'acqua, in modo da promuovere la successiva **rottura eterolitica del legame O–O** (figura). In questo modo si ha l'uscita della prima molecola di H_2O .

L'ossigeno che resta coordinato al ferro (che ha solo 6 elettroni) produce un intermedio altamente ossidante, indicato come **Compound I**, o **HRP1** nel caso della HRP ($E^0 > 1 \text{ V}$). Questo intermedio, di colore verde (il *resting state* dell'enzima è invece rosso-bruno) contiene un **centro**



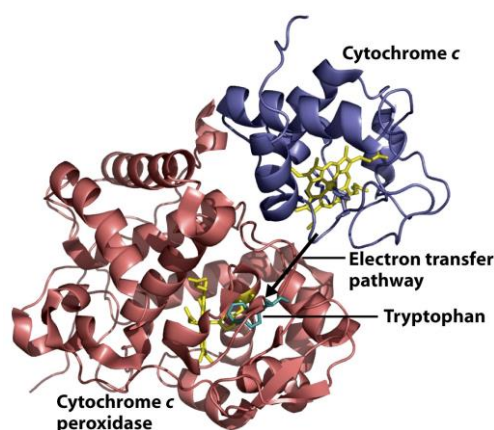
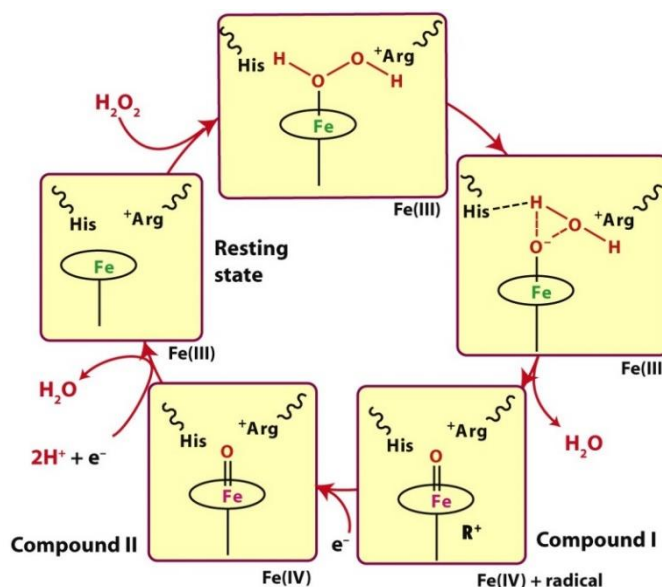
osso-ferrile(IV) con una porfirina radical-catione, cioè i due elettroni che vengono trasferiti sull'ossigeno per completarne l'ottetto provengono uno dal ferro e l'altro dalla porfirina, ed è



sufficientemente stabile da poter essere studiato spettroscopicamente e cristallizzato. Nel caso della CcP si ritiene che il radicale-catione non sia collocato sulla porfirina, ma su un residuo di triptofano (Try-191) vicino al sito distale. Si ritiene anche che il ruolo dell'arginina conservata Arg48 nel sito distale, con il suo residuo guanidinio, sia quello di stabilizzare l'ossigeno dell'osso-ferrile tramite legami a idrogeno, come evidenziato nella struttura ai raggi X (figura).

Il *Compound I* si riduce al *resting state* di Fe(III) tramite due trasferimenti consecutivi di un elettrone proveniente o da un substrato organico (e.g. il generico AH₂) o da un Citocromo c (nel caso della

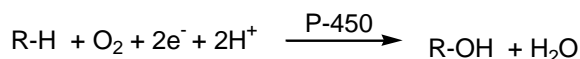
CcP, vedi figura dopo). L'intermedio dopo il trasferimento del primo elettrone, che va a riempire il buco sul radical-catione, viene detto *Compound II* (o **HRP2** nel caso di HRP), contiene un centro osso-ferrile(IV) (d⁴ diamagnetico, *S* = 1) coordinato ad una normale porfirina, ed è ancora sufficientemente ossidante da estrarre il secondo elettrone dal substrato. L'arrivo di due protoni porta alla formazione della seconda molecola di acqua. Il ciclo catalitico è mostrato nella figura. La HRP è una perossidasi piuttosto generica, che agisce su vari substrati. Questi (come si vede da strutture ai raggi X) si legano vicino al lato dell'eme esposto al solvente. Invece le perossidasi più specifiche, come la lignina-



perossidasi o l'ascorbato-perossidasi, hanno dei siti di legame specifici per il substrato. Diverso è il caso della Citocromo c Perossidasi (CcP), il cui substrato è il Citocromo c che deve fornire gli elettroni. La figura mostra la struttura ai raggi X del complesso per il trasferimento elettronico ottenuto dalla co-cristallizzazione della CcP con il citocromo c. E' piuttosto sorprendente che tra le due proteine non ci siano specifici contatti ionici ma piuttosto interazioni non-polari. È anche evidenziato il percorso degli elettroni e il triptofano (Try-191) dove si ritiene sia collocato il radicale e che deve quindi accogliere il primo elettrone.

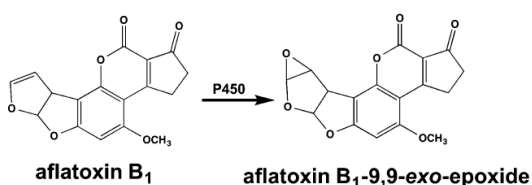
Citocromo P-450 (mono-ossigenasi)

Un'altra classe molto importante di eme-enzimi è costituita dai citocromi P-450, detti P-450 in quanto i derivati carbonilici (che legano cioè il CO) hanno una caratteristica banda di assorbimento nel visibile a 450 nm. Queste eme-proteine hanno **attività catalitica** come **mono-ossigenasi**, cioè in cooperazione con agenti riducenti (tipo NADH, flavine, proteine Fe-S) generano prodotti ossigenati a partire da O₂ e substrati spesso piuttosto inerti. Cioè i citocromi P-450 trasferiscono ossigeno da O₂ a substrati non attivati; l'altro O di O₂ viene ridotto ad H₂O:



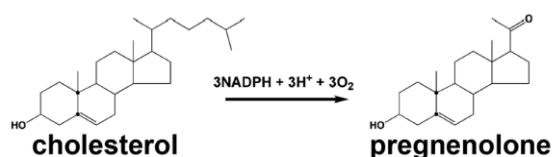
Da notare che nella reazione i due atomi di ossigeno ricevono 2 elettroni ciascuno, due dal substrato e due dal riducente esterno. Il primo citocromo P450 venne scoperto nel 1958 nel fegato di ratti e maiali. Quella del citocromo P450 è una **super-famiglia** che comprende attualmente circa 900 famiglie di P450. Sono stati individuati più di 18000 P450, e il loro numero è in continuo aumento. Nell'uomo si contano (attualmente) 57 P450, 102 nel topo e ben 323 nel riso. Pare che tutti i P450 derivino da un gene ancestrale comune, sviluppatosi circa 3.5 miliardi di anni fa. Nei mammiferi gli enzimi P450 sono enzimi di membrana e per questo sono difficili da cristallizzare; infatti la prima struttura ai raggi X di un P450 di mammifero risale soltanto al 2000. Invece i P450 dei batteri sono solubili.

Gli enzimi P-450 svolgono un **ruolo essenziale nel metabolismo** sia di sostanze endogene (ad esempio gli steroidi) che di sostanze esterne, "xenobiotiche". In questo senso i P450 sono i veri responsabili del successo evolutivo degli organismi aerobici che sono in grado di adattarsi ad ambienti in continua evoluzione dal punto di vista delle sostanze chimiche in essi contenute. Ad esempio, mono-ossigenasi che dipendono dal citocromo P-450 sono tipici **enzimi di**



detossificazione nel fegato, dove spesso mostrano scarsa selettività di substrato. In questo caso, di solito, la mono-ossigenazione viene seguita da uno stadio di funzionalizzazione per formare specie del tipo ROR', dove R' è un residuo molto idrofilo, tale da rendere molto polare e solubile in acqua il metabolita ROR' e consentirgli quindi di superare la barriera renale ed

essere così escreto. A volte però la mono-ossigenazione di sostanze xenobiotiche può portare a composti cancerogeni; ad esempio, in assenza di catene alifatiche ossidabili, i citocromi P-450 catalizzano l'epossidazione del benzene e di altri anelli aromatici a dare prodotti che sono spesso mutageni. Gli epossidi aromatici infatti riescono a intercalarsi fra le basi del DNA in doppia elica dove possono modificare il materiale genetico con conseguenze deleterie. Un esempio classico è quello dell'aflatossina, che viene attivata dal P-450 e il corrispondente epossido induce una modificazione selettiva del gene soppressore di tumori p53, inattivandolo. Inoltre, certi idrocarburi clorurati, tipo diossine e bifenili (PCB) non vengono degradati dai P-450 (quando le posizioni para più reattive degli anelli aromatici sono bloccate da legami C-Cl, non attaccabili), ma sembra stimolino comunque la sovra-produzione di enzimi P-450 scatenando reazioni immuno-tossiche.

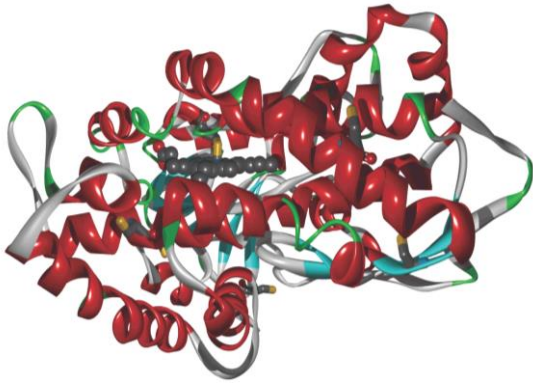


D'altra parte molecole endogene quali acidi grassi, amminoacidi e ormoni (steroidi, prostaglandine) sono metabolizzati da sistemi P-450 più specifici, solitamente anche in modo stereospecifico. L'esempio dell'ossidazione del colesterolo è mostrato in figura.

Per esempio nell'uomo, dei 57 P-450 individuati, 27 sono coinvolti nella biosintesi o metabolismo di composti endogeni (e.g. ormoni steroidei, alcune vitamine come la vitamina D), 15 hanno una funzione sconosciuta, e poi ci sono 15 o 16 P-450 che si occupano della ossidazione/degradazione di xenobiotici, ma in particolare 3 di questi sono responsabili per l'ossidazione di circa l'80% di tutti i farmaci noti. Questo significa che essi hanno una specificità di substrato molto bassa. In particolare, nel nostro fegato, un solo P450, chiamato CYP3A4, metabolizza almeno la metà di tutti i farmaci attualmente usati.

Sono stati caratterizzati molti enzimi tipo P-450, con masse molecolari tipicamente di circa 50 kDa; hanno tutti una struttura molto simile. Il ferro nei citocromi P-450 ha **un solo legante assiale**, un anione **cisteinato** -CH₂S⁻. L'atomo di zolfo del cisteinato riceve un legame a idrogeno da parte del gruppo NH di un peptide. Questo tipo di legame a idrogeno è molto comune nelle proteine con il frammento Fe-Cys e serve a modulare il potenziale redox del ferro. In sua assenza il potenziale

redox sarebbe troppo basso per i riducenti fisiologici. La struttura ai raggi X del P-450 dal batterio *Pseudomonas putida* è mostrata in figura.

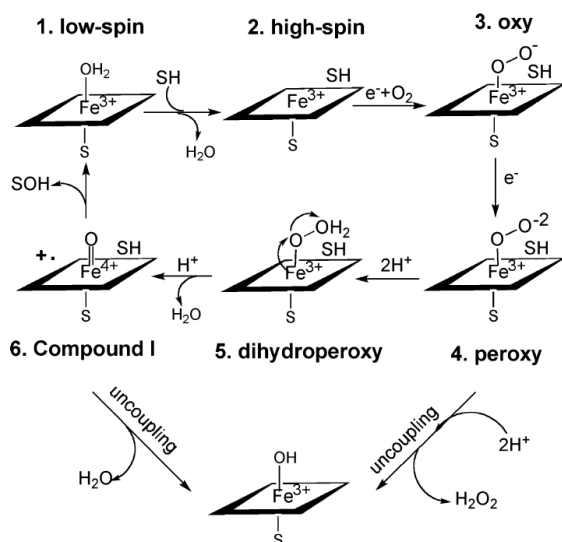
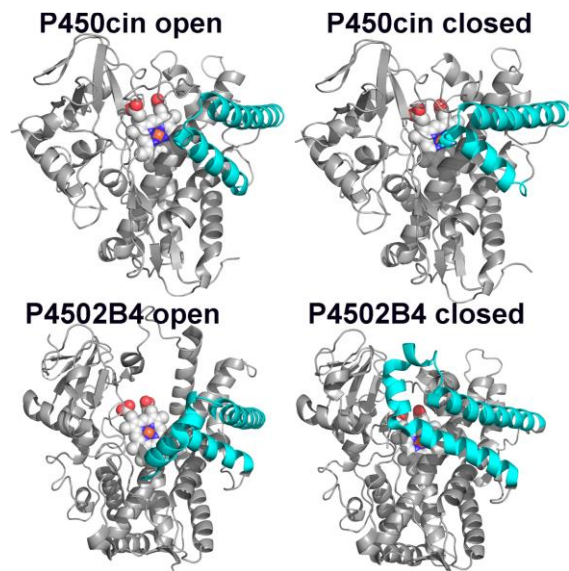


Al contrario dei tioeteri tipo metionina, che sono anche π -accettori, **i tiolati sono dei forti σ - e π -donatori** e sono quindi in grado di stabilizzare centri metallici in stati di ossidazione elevati. I P-450 sono anche piuttosto flessibili, in quanto devono consentire l'ingresso dei substrati e l'uscita dei prodotti. In generale, ci sono due forme estreme per un P-450: chiusa o *substrate-bound* e aperta o *substrate-free*. Il passaggio dall'una all'altra implica soprattutto il movimento di due settori ad α -elica, chiamati F e G, e il *loop* che li connette. In figura sono mostrate due

strutture di P-450 nelle due forme, con le eliche F e G in azzurro. Dall'analisi di varie strutture si è anche visto che nella forma chiusa il volume del sito attivo può variare notevolmente.

Il meccanismo più accreditato per l'attivazione del diossigeno e successivo trasferimento di O è riportato in figura. Dal ciclo si vede che sono richiesti 2 elettroni, che provengono da altre proteine redox, in genere combinazioni varie di flavine e proteine ferro-zolfo (ferridossine, vedi dopo). In alcuni P-450 la FAD/FMN riduttasi (FAD = Flavina Adenina Dinucleotide, FMN = Flavina Mono-Nucleotide) è fusa alla parte C-terminale del dominio contenente l'eme.

Il ciclo catalitico è comune a tutte le mono-ossigenasi dipendenti da citocromo P-450. Si parte da uno stato con Fe(III) basso-spin (da notare che nelle perossidasi appena viste si partiva da Fe(III) alto spin), in cui il ferro è esacoordinato: porfirina, cisteinato, acqua. Il substrato organico viene quindi legato, essenzialmente tramite interazioni idrofobiche, in una cavità della proteina vicina al sito di coordinazione assiale dell'eme, causando l'uscita dell' H_2O legata (e di quelle che si trovano nel sito attivo) e la transizione del Fe(III) ad alto-spin con aumento del potenziale redox (cioè diventa più ossidante). Ciò induce il trasferimento di un elettrone dal partner redox per dare un intermedio Fe(II) alto-spin che è predisposto per la coordinazione di $^3\text{O}_2$ (come nelle globine). La variazione di

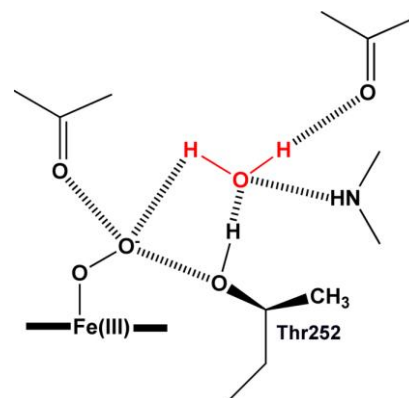


potenziale redox del Fe-eme indotta dal substrato evita che ci sia un inutile trasferimento di equivalenti di riduzione all'enzima in assenza di substrato, che porterebbero al rilascio di acqua o perossido (il cosiddetto *uncoupling*).

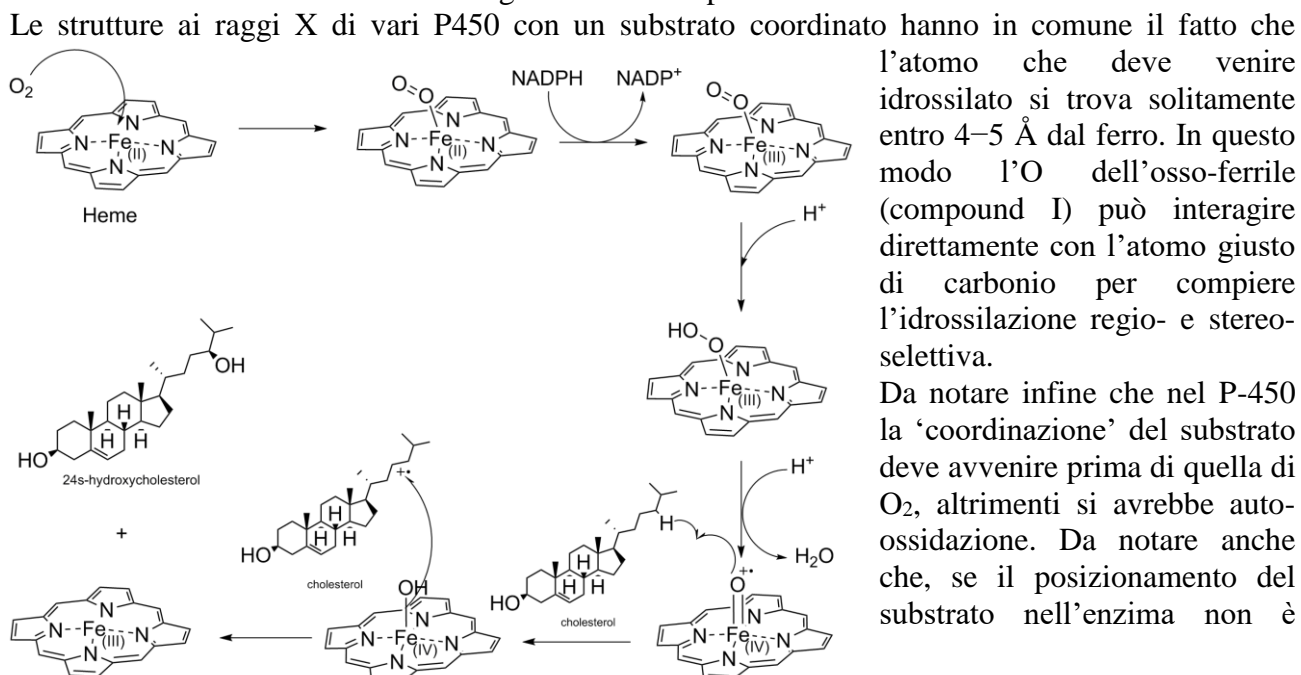
Con la coordinazione di O_2 si ottiene la specie **ossi**, coordinativamente satura a basso-spin, solitamente formulata come Fe(III)-O-O^- (ma potrebbe anche essere formulata Fe(II)O_2 , in analogia a quelle proposte per l'emoglobina). Seguono due intermedi, generati per successivo trasferimento di 1 elettrone esterno e 2 H^+ , formulati nell'ordine come Fe(III)-O-O^{2-} e Fe-OOH_2 (come quello visto prima nelle perossidasi) Da quest'ultimo, per la **rottura**

eterolitica del legame O–O (da pensare come rottura eterolitica verso l'ossigeno esterno) si ottiene una molecola di H₂O e la **specie osso-ferrile**, anche detta *Compound I*, contenente la porfirina come radical catione coordinata a Fe(IV)=O, l'unico intermedio nel ciclo catalitico sufficientemente ossidante per poter idrossilare il legame inerte C–H degli alcani. Da notare che i due atomi di O di O₂ hanno preso due elettroni ciascuno, due provenienti dall'esterno e due dal sistema Fe-eme. Il meccanismo proposto per i P-450 chiaramente ripercorre quello determinato per le perossidasi, anche nella terminologia e nella necessità di protonazione dell'atomo di ossigeno distale. Tuttavia nel P-450 gli intermedi mostrati in figura per lungo tempo sono stati solo postulati. Oggi però la maggior parte degli intermedi sono stati "intrappolati" e caratterizzati spettroscopicamente. L'intrappolamento del *Compound I* è stata la parte più difficile. Infatti, in presenza del substrato questo intermedio ha un tempo di vita estremamente breve. L'unica possibilità è stata quella di trattare l'enzima (in assenza di substrati) con dei peracidi per ossidare il Fe(III) e generare l'osso-ferrile.

Nel P-450 rimane il problema del meccanismo di attivazione del diossigeno. In analogia alle perossidasi si è visto che l'O distale deve venire protonato per garantire che avvenga la rottura eterolitica del legame O–O per generare la specie osso-ferrile. La grossa differenza tra le perossidasi e il P-450 sta nel fatto che nelle perossidasi il substrato, H₂O₂, entra nel sito attivo con i suoi protoni mentre O₂ ovviamente no. Quindi il compito delle perossidasi, svolto primariamente dall'istidina distale, è quello di redistribuire opportunamente i protoni del perossido. Nei P-450 la fonte di protoni è il solvente, ma non c'è alcun evidente amminoacido tradizionale, come l'istidina, che possa svolgere le funzioni acido-base richieste per favorire il processo di spostamento dei protoni. In base alle strutture ai raggi X si ritiene che la fonte di protoni sia una molecola d'acqua che entra nel sito in seguito alla coordinazione di O₂ e formazione della ossi-specie. L'ossigeno distale di O₂ nella ossi-specie (dove ha carica negativa) è vicino a un carbonile peptidico e all'ossigeno in catena laterale di una treonina adiacente, Thr252, situazione che è elettrostaticamente sfavorevole e favorisce la protonazione di tale ossigeno da parte dell'acqua (figura).



L'ossidazione (o meglio idrossilazione) del substrato avviene presumibilmente tramite il trasferimento del radicale ossigeno al substrato (l'altro elettrone del legame π Fe=O è andato a saturare il radical-catione), preceduto da estrazione di idrogeno radicale, il cosiddetto **oxygen rebound mechanism** illustrato nella figura successiva per il caso del colesterolo:

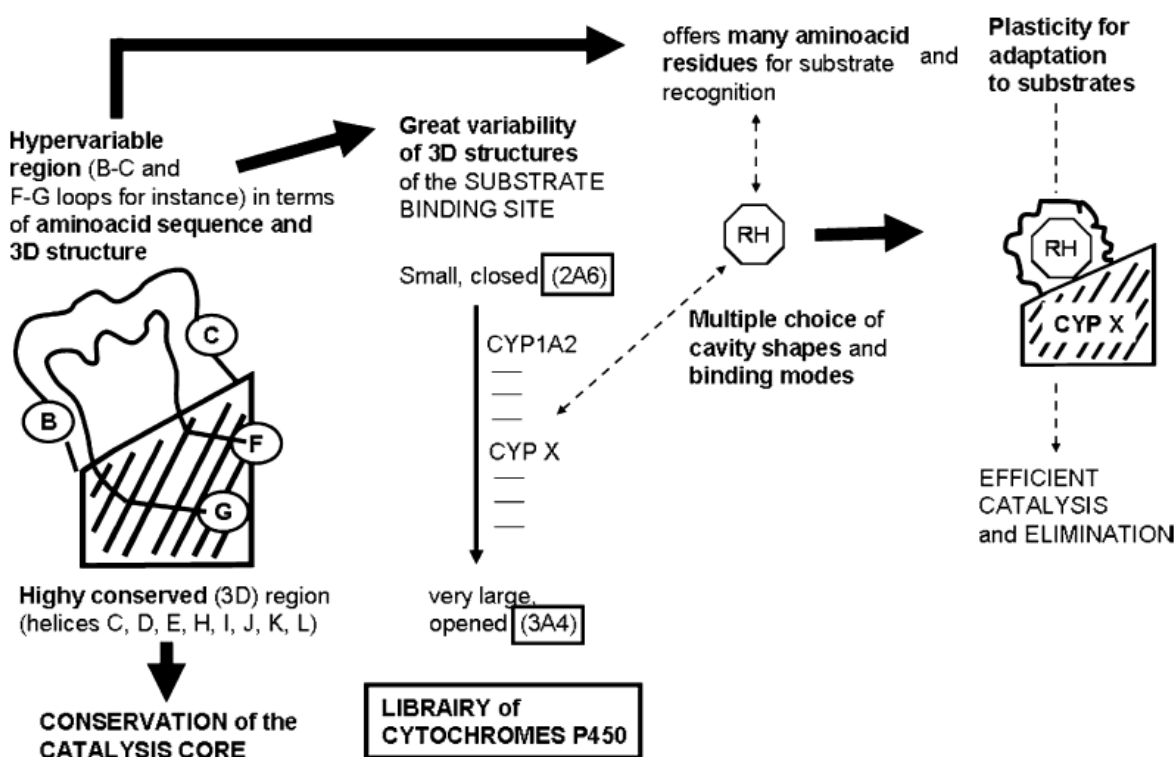


l'atomo che deve venire idrossilato si trova solitamente entro 4–5 Å dal ferro. In questo modo l'O dell'osso-ferrile (compound I) può interagire direttamente con l'atomo giusto di carbonio per compiere l'idrossilazione regio- e stereoselettiva.

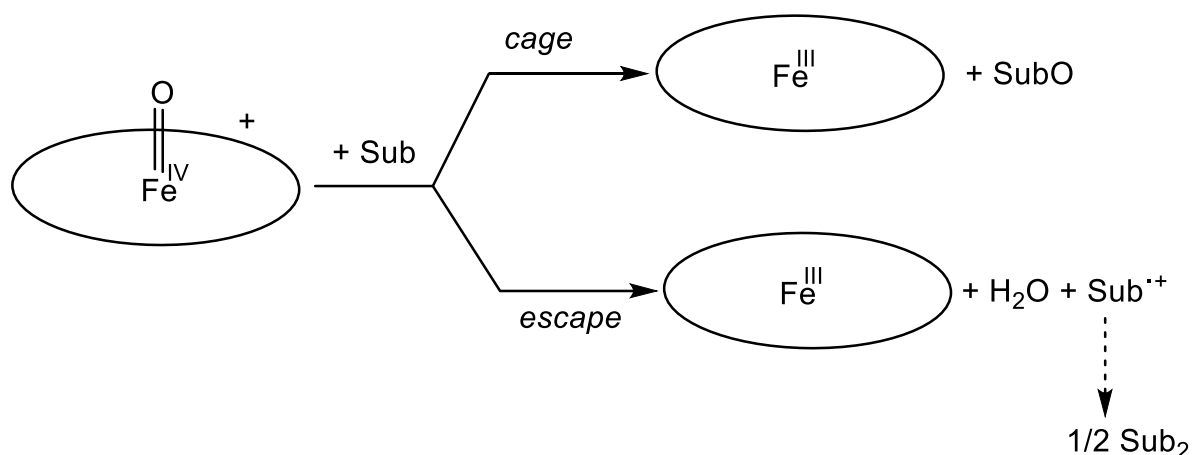
Da notare infine che nel P-450 la 'coordinazione' del substrato deve avvenire prima di quella di O₂, altrimenti si avrebbe auto-ossidazione. Da notare anche che, se il posizionamento del substrato nell'enzima non è

ottimale per avere rapidi trasferimenti di elettroni, protoni ed ossigeno, si possono innescare reazioni secondarie con rilascio di O_2^- , H_2O_2 o H_2O , che competono con il ciclo catalitico completo (*uncoupling*).

Abbiamo già notato che alcuni P-450 hanno scarsa selettività di substrato ma, nonostante questa scarsa specificità, hanno una elevata efficienza catalitica. Altri P-450 hanno una elevata regio/stereo-selettività per i substrati endogeni. Questo apparente paradosso è stato solo recentemente in parte chiarito con l'acquisizione di strutture ai raggi X, sia di P-450 da soli che con substrati coordinati. Queste hanno mostrato che i P-450 sono costituiti essenzialmente da **due parti**, una che è altamente conservata e serve per il *binding* dell'eme, per l'attivazione dell'ossigeno e per l'electron-transfer dalle riduttasi, mentre l'altra parte è molto flessibile e variabile ed è responsabile per il *binding* del substrato. Essendo molto flessibile, questa parte si adatta a substrati diversi. Il volume e la forma del sito di *binding* del substrato cambiano notevolmente fra un P-450 e l'altro. Un composto xenobiotico può "scegliere" fra una libreria di P450 con diversi siti di legame in termini di forma, volume e residui amminoacidici, che inoltre sono molto flessibili, e si legherà a quello che lo "soddisfa" meglio. Lo schema seguente riassume quanto detto.



Da sottolineare infine che nel citocromo P-450 i radicali che si formano si combinano subito per dare i prodotti ossigenati tramite l'*oxygen rebound mechanism*, che è un esempio di *cage reaction*. Invece nelle perossidasi la estrazione di elettroni dal substrato senza trasferimento di ossigeno porta ai tipici prodotti radicalici (*escape products*):



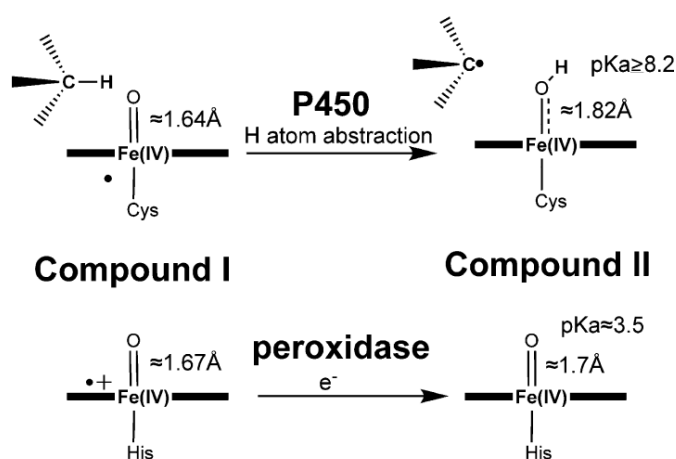
Ad esempio, se il substrato è un fenolo, con il P-450 si ottiene catecolo, mentre con le perossidasi si hanno prodotti di *coupling* arilico, tipo $\text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$, tipici di radicali fenolici.

Da notare ancora che, a prima vista, la mioglobina, che non ha attività perossidasi, ha una coordinazione dell'eme molto simile a quella dell'HRP. Quindi evidentemente in tutte le eme-perossidasi i legami a idrogeno dell'istidina prossimale e distale e del gruppo guanidinio devono giocare un ruolo molto importante nel modulare l'attività. Nella mioglobina ed emoglobina la reattività *potenzialmente elevata* dei centri osso-eme verso vari substrati deve essere evitata ad ogni costo, altrimenti ne risulterebbe una auto-ossidazione di questi sistemi che effettuano solo il trasporto e lo *storage* dell'ossigeno. Quindi bisogna apprezzare in modo particolare l'intorno proteico di Hb e Mb che riesce ad inibire questi processi ossidativi termodinamicamente favoriti.

Un altro eme-enzima simile al P-450 (con il sistema Fe-eme-Cys), ma con diversa funzione, è la **NO-sintasi (NOS)**. Questo enzima (che non trattiamo in dettaglio) catalizza l'ossidazione del semplice amminoacido L-arginina a L-citrullina e ossido d'azoto. NO è un importante mediatore nei sistemi cardiovascolare, immunitario e nervoso. L'attività dei NOS è attivata dalla Ca^{2+} -calmodulina (vedi prima).

Controllo del meccanismo di reazione del gruppo ossi-eme.

Dal momento che l'intermedio reattivo sia nelle perossidasi che nei P-450 viene chiamato *Compound I*, si potrebbe assumere che esso sia la stessa specie in entrambi gli enzimi. Tuttavia, le perossidasi non catalizzano l'inserzione di ossigeno in legami C-H, mentre i P-450 non catalizzano le reazioni di trasferimento elettronico tipiche delle perossidasi (cattura diretta di elettroni dal substrato, con formazione di un radical-catione e di H_2O). Si potrebbe pensare che parte di questa differenza sia dovuta alla presenza di ingombro sterico nelle perossidasi, che previene l'approccio ravvicinato del substrato al centro $\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}$, mentre i P-450 hanno dei siti di *binding* del substrato nelle dirette vicinanze dell'intermedio reattivo osso-ferrile. Il limite di questa ipotesi è che se la



reattività del gruppo $\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}$ fosse essenzialmente la stessa nei due tipi di enzimi, allora il *Compound I* delle perossidasi dovrebbe attaccare qualche residuo amminoacidico vicino al sito attivo, oppure avere un tempo di vita estremamente breve a causa della elevata reattività. Ma nessuna di queste cose è vera, e quindi la reattività dell'intermedio $\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}$ nelle perossidasi e nei P-450 è profondamente diversa (come illustrato in figura; le distanze provengono da misure EXAFS), chiaramente a causa dei diversi

intorni proteici.

Ovviamente il legante nel sito vicinale è importante nel controllare la reattività dell'osso-ferrile. Il legante anionico tiolato dei sistemi P-450 è un elettrone-donatore più forte in confronto alla neutra istidina delle perossidasi, cioè trasferisce più densità elettronica sul ferro, promuovendo così la rottura eterolitica del legame O–O e modulando la reattività del *Compound I*. Inoltre, la seconda sfera di coordinazione in P-450 e perossidasi è quasi opposta: nei P-450 il cisteinato ha vicino dei donatori di legami a idrogeno (che fanno aumentare il potenziale redox del ferro). In netto contrasto, l'istidina prossimale nelle perossidasi dona un legame H a un residuo aspartato che fa diminuire il potenziale redox.

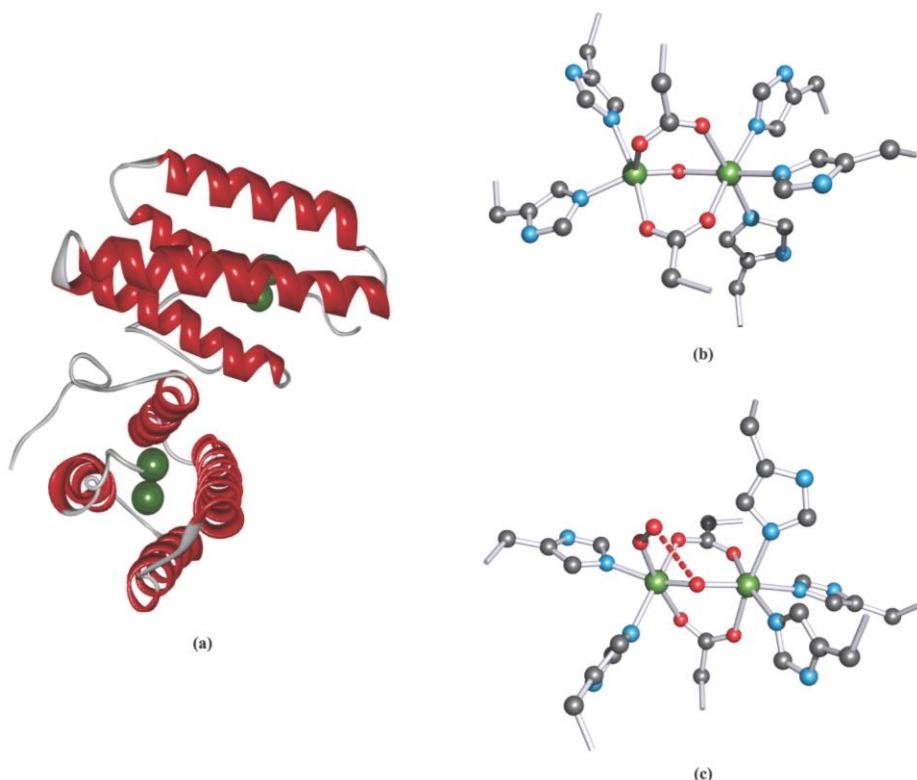
In breve, la differenza nella reattività del *Compound I* fra perossidasi e P-450 si può far risalire ai seguenti fattori: 1) il forte potere σ -donatore del legante cisteinato nei P-450 diminuisce la capacità del *Compound I* di comportarsi come un elettrone-accettore. Infatti, evidenze strutturali e spettroscopiche suggeriscono che il centro ferrile del *Compound I* sia simile per entrambi gli enzimi, ma mentre nei P-450 il radicale è molto probabilmente delocalizzato tra la porfirina e il cisteinato assiale, nelle perossidasi predomina il radical catione localizzato sulla porfirina o sul vicino triptofano; 2) Se l'O del ferrile del *Compound I* deve estrarre un atomo H dal substrato, allora la forza del legame O–H nella specie ferrile di arrivo, cioè il *Compound II*, deve essere sufficientemente grande, e quindi il pK_a sufficientemente alto, da superare la barriera richiesta per rompere il legame C–H nel substrato. Nei P-450 la forte σ -donazione del cisteinato contribuisce ad aumentare la lunghezza del legame Fe–O nel *Compound II*, generando un atomo di O ferrilico con elevato pK_a , il che favorisce il processo di estrazione del radicale H dal substrato. Nelle perossidasi invece il legame Fe–O nel *Compound II* rimane corto, con un pK_a basso (cioè l'ossigeno è acido e non protonato) e di conseguenza le perossidasi non hanno tendenza ad estrarre atomi H tramite l'ossigeno. Si valuta che nei P-450 il pK_a dell'ossidrile nel *Compound II* deve essere almeno intorno a 8.2 per poter attivare il C–H, mentre il pK_a dell'O ferrile nel *Compound II* delle perossidasi (e.g. HRP2) è inferiore a 3.5 e quindi non può attivare il legame C–H. 3) Il sito distale delle perossidasi è più polare rispetto a quello dei P-450 e questo contribuisce a far sì che l'O ferrile nelle perossidasi sia più acido rispetto ai P-450.

Emeritrina, proteine Fe-S e altre Fe-proteine non eme

Si distinguono altre due categorie di ferro-proteine, a seconda del tipo di leganti del ferro, oltre alle eme-proteine nelle quali il Fe è chelato da un macrociclo porfirinoide: 1) proteine in cui il Fe è coordinato esclusivamente da amminoacidi o H_2O , OH^- , O^{2-} , come nella emeritrina; 2) proteine che contengono centri Fe-S.

Emeritrina

Alcuni gruppi di invertebrati marini, molluschi e ragni usano metallo-proteine non porfirinoidi per l'*uptake* reversibile di O_2 . Una di queste è l'emertina, **Hr**, (che nonostante il suo nome non contiene l'eme) che è una proteina ottamerica di massa circa 108 kDa, ed ogni sub-unità è fatta da 113 amminoacidi. La cooperatività fra le 8 unità è decisamente inferiore a quella della emoglobina. La figura mostra le strutture ai raggi X di due di queste sub-unità, e del sito attivo sia nella forma desossi che ossi.



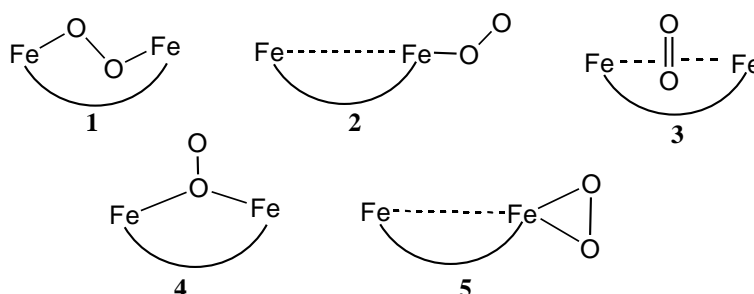
E' istruttivo vedere come molte proprietà fondamentali del sito attivo della proteina siano state individuate con misure spettroscopiche prima, e poi confermate con la struttura ai raggi X (figura). Misure di suscettività magnetica hanno indicato che la desossi-emeritrina, incolore, contiene Fe(II) alto-spin con quattro elettroni spaiati su ogni ferro e si osserva un leggero accoppiamento anti-parallelo spin-spin fra due centri Fe apparentemente vicini. La forma ossi- è viola, lega una molecola di O_2 per dimero di Fe e le misure di suscettività magnetica indicano la presenza di due centri con $S = \frac{1}{2}$ fortemente accoppiati in modo anti-ferromagnetico. Questo dato ha fatto concludere che ogni ossi-proteina monomerica contiene due centri Fe(III) basso-spin ($S = \frac{1}{2}$) che interagiscono fortemente fra loro.

L'assenza di bande di assorbimento elettronico nel visibile nella forma desossi indica che i centri metallici sono legati da amminoacidi, perché ci si aspetterebbe di osservare colore se fosse presente un sistema porfirinico. Il colore della forma ossi è stato attribuito a transizioni di trasferimento di carica permesse, e quindi intense (*LMCT bands*). Si è ipotizzato che possano essere trasferimenti di carica da un legante perossidico ricco di carica verso Fe(III). Molti complessi perossidici di metalli di transizione, in particolare in alto stato di ossidazione, sono colorati per questa ragione.

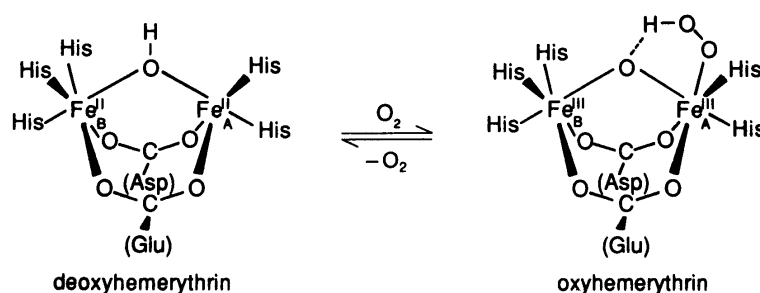
Quando si registra uno spettro Raman-risonante alla lunghezza d'onda di questo assorbimento LMCT per la ossi-Hr, si osserva una banda vibrazionale "resonance-enhanced" a 848 cm^{-1} , caratteristica dei perossidi con una **coordinazione fortemente asimmetrica**, ad esempio di tipo end-on. La spettroscopia Mossbauer infine mostra due risonanze nettamente differenti per due nuclei diversi di Fe(III) nella forma ossi, mentre nella forma desossi i due centri Fe(II) non sono distinguibili, cioè devono avere intorni coordinativi simili.

Sulla base di tutte queste informazioni spettroscopiche, delle possibili alternative per la coordinazione di O_2^{2-} nel sito dinucleare dell'emeritrina (figura), sono compatibili solo il caso 2, o i casi 4 e 5 se fortemente distorti.

Diverse strutture cristallografiche hanno dimostrato che nella desossi-



emeritina i due siti ferro sono collegati fra loro da due carbossilati ed un OH a ponte; 5 istidine completano poi la sfera di coordinazione dei due centri Fe, lasciando un sito libero da una parte (sul ferro a sinistra, nella figura precedente, su quello a destra nel disegno sotto). Quando O_2 si lega a questo sito, entrambi i Fe(II) vengono ossidati a Fe(III), donando due elettroni a O_2 che viene ridotto a O_2^{2-} e i due centri metallici sono legati più fortemente dal ponte, che da μ -idrosso diventa μ -osso (figura). L'ossigeno coordinato si trova presumibilmente come idroperossido, HOO^- (cioè prende l'H dal ponte OH della desossi), generando così un legame a idrogeno con l'ossigeno a ponte. Quello che appare difficilmente spiegabile è che la coordinazione del diossigeno da parte della proteina sia reversibile.



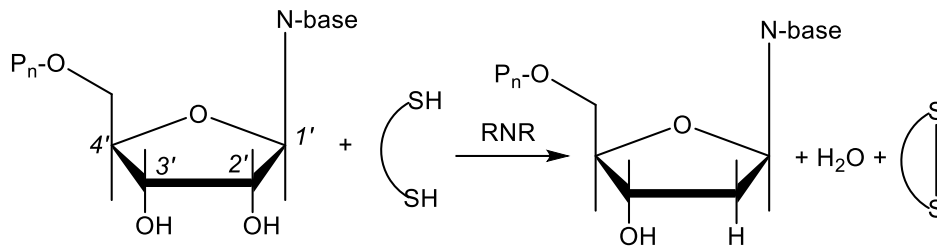
In conclusione, le analogie e differenze nella coordinazione di O_2 da parte dei sistemi eme (Hb, Mb) e dei sistemi dimerici non-eme (Hr) possono essere così sintetizzate:

1. Una caratteristica comune a Hb, Mb e Hr è la presenza di **Fe(II) alto-spin con 4 elettroni spaiati come centro metallico per la coordinazione di O_2** , e il suo successivo passaggio (in seguito alla coordinazione) ad un sistema a basso spin, formulato o come Fe(II) o come Fe(III).
2. Il diossigeno legato reversibilmente a un centro di ferro ha **sempre una coordinazione di tipo *end-on* (η^1)**, che sembra essere la più adeguata, rispetto a coordinazioni di tipo *side-on* o a ponte, per il necessario scambio rapido.
3. Le differenze stanno soprattutto nell'evidente trasferimento di 2 elettroni per creare un legante perossidico nei dimeri, rispetto a un minor trasferimento elettronico nelle specie ossi-eme, che legano il diossigeno come tale o, al massimo, come superossido, a seconda dei modelli.
4. La necessità del sistema di agire come *buffer* di elettroni per la coordinazione di piccole molecole insature e simmetriche può essere raggiunta o tramite la cooperazione metallo-metallo (effetto *cluster*) nei sistemi non-eme (Hr), oppure tramite l'interazione di un solo centro metallico redox-attivo (Fe) con il sistema π redox-attivo del legante porfirinico (Hb, Mb). Entrambi i sistemi sembrano essere più adatti per la coordinazione reversibile di O_2 rispetto ai semplici centri metallici isolati. Le eme-proteine rappresentano il sistema più elegante, flessibile ed efficiente, in particolare per quanto concerne la cooperatività.

Ferro-enzimi senza porfirine e zolfo

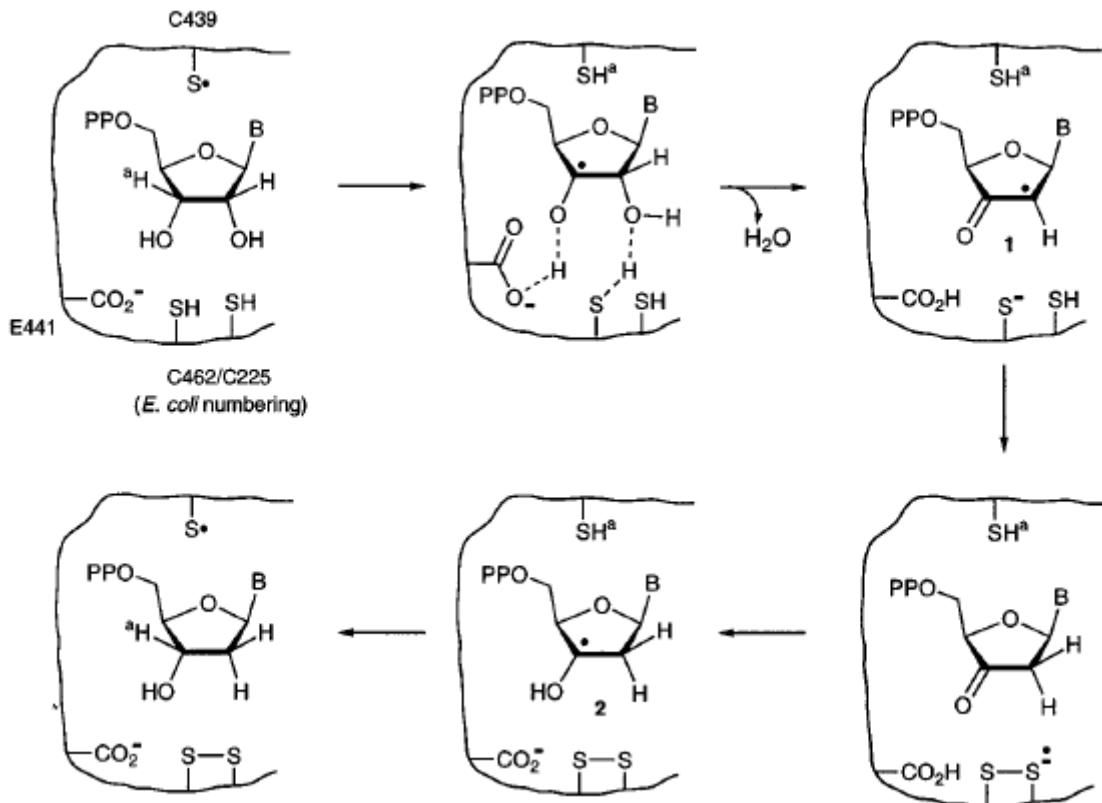
Abbiamo già visto l'emeritina, che ha un centro ferro dimerico con gli ioni Fe legati da amminoacidi; tuttavia essa funge al trasporto di O_2 e quindi non è un enzima. Vi sono però numerosi ferro-enzimi che non contengono né l'eme né zolfo, che si affidano similmente a centri ferro polinucleari con interazioni metallo-metallo per raggiungere sufficiente flessibilità elettronica. Noi vedremo alcuni esempi di importanti Fe-enzimi.

Negli organismi superiori (ma anche in certi batteri come *Escherichia coli*) la seguente reazione biologicamente fondamentale, la **desossidazione (riduzione)** dell'anello del ribosio per dare il 2'-desossiribosio, viene catalizzata da una **Ribonucleotide Riduttasi (RNR)** contenente ferro. I due elettroni richiesti vengono forniti da due cisteine che si ossidano formando un ponte disolfuro:



La conversione dei nucleotidi a desossinucleotidi occupa un ruolo centrale nel metabolismo degli acidi nucleici (sintesi di nuovo DNA, riparo di DNA danneggiato,...).

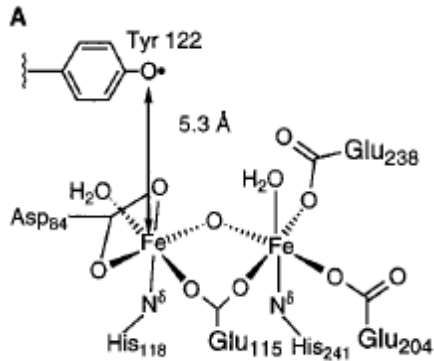
Tutti gli enzimi ribonucleotide riduttasi necessitano di un **cofattore a base di metalli** (ne sono state individuate quattro classi che differiscono per il cofattore ma non per il sito attivo) per **ossidare una cisteina situata nel sito attivo dell'enzima** (e molto ben conservata dal punto di vista evolutivo) a radicale tiile, che poi dà inizio alla riduzione dei nucleotidi (con una costante cinetica di $4 - 5 \text{ s}^{-1}$) estraendo innanzitutto l'idrogeno in posizione 3'. Il meccanismo radicalico comunemente accettato è mostrato nello schema.



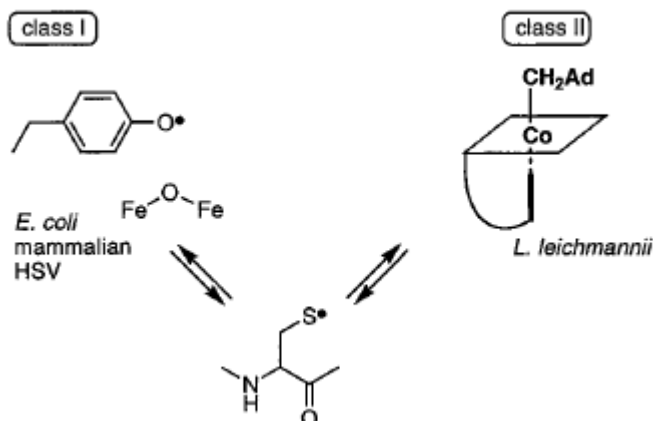
La riduzione dell'intermedio α -cheto radicale **1** tramite l'ossidazione di due cisteine al corrispondente disolfuro genera il radicale 3'-desossinucleotide **2**, il quale ri-estrae l'atomo di idrogeno, inizialmente rimosso, dalla terza cisteina (Cys-439) generando così il prodotto e rigenerando il radicale tiile. Il ponte disolfuro viene poi ridotto da NADPH catalizzato da una Tioredoxina riduttasi (TrxR).

Le RNR di classe I, come quella più studiata da *Escherichia coli*, sono composte di due sub-unità. La sub-unità più piccola β contiene il cofattore metallico, un centro di-ferro ed un **radicale tirosinato** $\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{-Y}\cdot$ (in quelle di classe IV il cofattore ha il manganese al posto del ferro, $\text{Mn}^{\text{III}}_2\text{-Y}\cdot$) che ossida questa cisteina nella sub-unità α , a **oltre 35 Å di distanza** (cioè 3.5 nm), dove avviene la riduzione del nucleotide. Quindi il radicale tirosinato non può essere direttamente coinvolto nella reazione catalitica, cioè nel processo di riduzione del ribosio. Dalle strutture ai raggi X si vede che l'ossigeno della tirosina dista 5.3 Å dall'atomo di ferro più vicino ed è sepolto all'interno della proteina, a 10 Å dalla superficie più vicina. La Figura (sotto) riporta la struttura del cofattore, centro

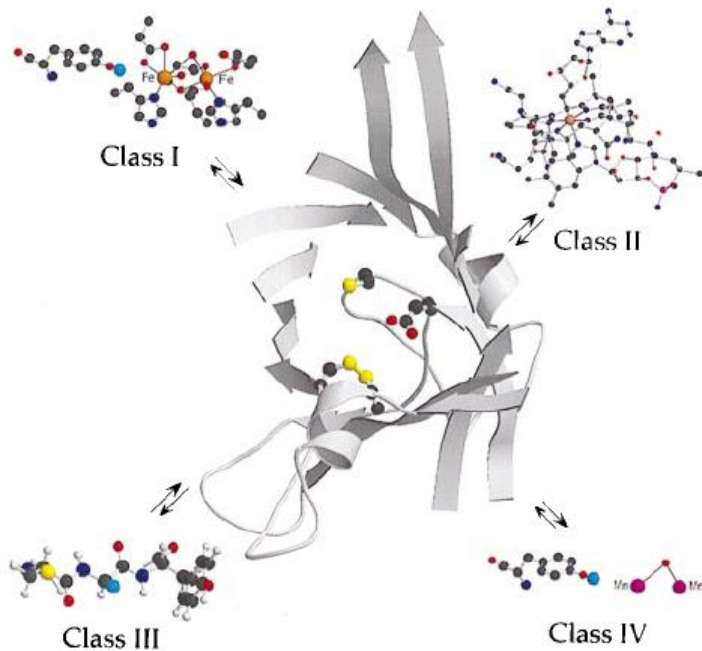
di-ferrico con i due atomi di ferro in stato di ossidazione III, che è abbastanza diversa da quella con il centro di-ferroso (vedi dopo). La RNR al ferro è stato il primo caso in cui si è stabilito che la presenza di un **radicale libero stabile** ($Y\cdot$) è una componente essenziale dell'enzima. La cosa sorprendente è che il radicale tirosinato rimane stabile all'interno dell'enzima durante l'intero processo di estrazione dalla fonte naturale (e.g. da *E. Coli*).



Vi sono anche altri tipi di RNR, e tutte contengono centri metallici e radicali. Ad esempio le RNR di classe II dipendono dal coenzima B_{12} , cioè un composto organometallico di cobalto (vedi dopo), che ha comunque sempre la funzione di generare il distante radicale tiile.

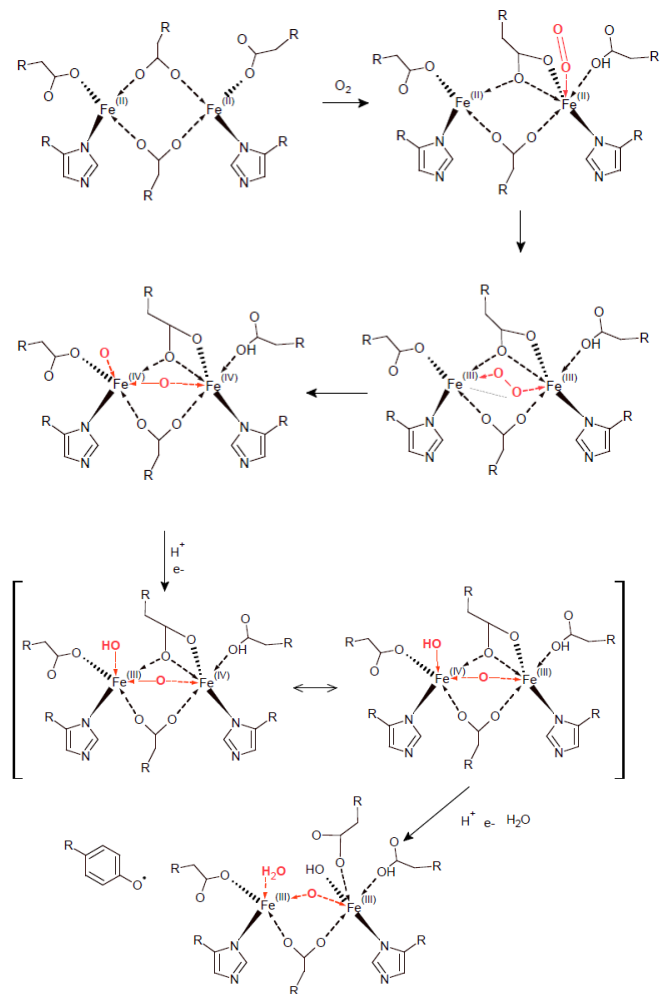


La figura successiva mostra il sito attivo dell'enzima da *E. Coli*, con la cisteina (Cys-439) che viene ossidata (nel loop). Viene evidenziato anche un ponte disolfuro fra Cys-225 e Cys-419, cioè le cisteine che producono i due equivalenti riduttivi (cioè forniscono i due elettroni) per fare il desossinucleotide. La figura mostra anche i cofattori presenti nelle varie classi di RNR, in alto a sinistra il cofattore $Fe^{III}_2-Y\cdot$ in quelle di classe I.



Il centro di-ferro gioca un ruolo fondamentale nella creazione del radicale tirosinato (e, a cascata, del radicale tiile), **mediata dall'interazione con O₂**. Nella forma ridotta Fe(II)/Fe(II), cioè quella attiva, ogni ferro è tetracoordinato (numero di coordinazione insolitamente basso), con due glutammati a ponte e non c'è il ponte μ -oxo osservato nel cluster di-ferrico (figura precedente). Secondo modelli sintetici, questo arrangiamento di due centri Fe collegati da leganti a ponte ha una elevata tendenza ad auto-assemblarsi e favorisce una buona interazione metallo-metallo, e quindi un certo grado di flessibilità elettronica.

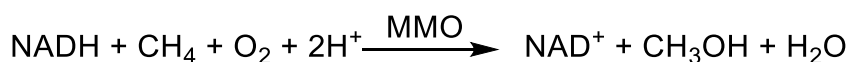
Si ritiene che la formazione del radicale tirosinico mediata da O₂ avvenga in questo modo: si ha prima il legame di una molecola di ossigeno *end-on* su uno dei Fe(II), seguito dal riarrangiamento dei legami che porta ad avere un perossido tra due Fe(III). A questo punto il legame tra i due atomi di ossigeno si rompe e si formano formalmente due atomi di Fe(IV). Da notare che ciascuno dei due atomi di Fe trasferisce due elettroni ad O₂. La situazione è stabilizzata dall'arrivo sul sito attivo di un protone del solvente e di un elettrone derivato da un Trp (che diventa radicale): un Fe diventa Fe(III) e l'altro resta Fe(IV), con possibilità di risonanza tra due forme; inoltre l'ossigeno non a ponte viene protonato. **A questo punto si ha la formazione del radicale sulla tirosina**, la quale fornisce un elettrone che va a ridurre il Fe(IV) e un H⁺ che va a protonare ulteriormente l'OH coordinato che può quindi uscire come H₂O. Si può infine ristabilire la condizione iniziale, grazie all'intervento di flavine che riducono la tirosina ed i centri Fe(III) a



Fe(II). Quindi il ruolo dei centri Fe è quello di favorire (tramite l'interazione con O₂) la formazione del radicale tirosinato, stabilizzarlo, proteggerlo ed eventualmente attivarlo in modo controllato. Non è ancora chiaro il percorso (sequenza di aminoacidi) per il trasferimento accoppiato elettrone/protone dal radicale tirosinato nella subunità β alla cisteina 439 nella subunità α.

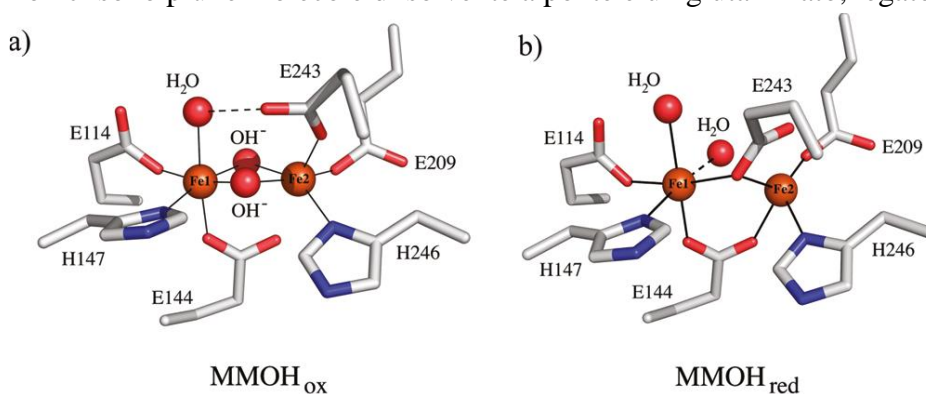
Metano Mono-Ossigenasi solubile (sMMO)

Questo enzima, un complesso multi-proteico con una massa molecolare di circa 300 kDa, viene impiegato da *micro-organismi metanotropici*, cioè che usano CH₄ sia come sorgente di carbonio che di energia, ossidandolo a metanolo. Altra cosa sono i micro-organismi *metanogenici* (o metanogeni) che producono CH₄. La reazione catalizzata dall'enzima sMMO (dove *s* sta per solubile, per distinguerlo da una metano-monoossigenasi al rame, detto *p*MMO – dove *p* sta per particolato – che è un enzima di membrana non solubile e che viene espresso dai batteri quando sono disponibili livelli di Cu elevati) è la seguente:



E' una **reazione del tutto simile a quella catalizzata dai P450**. Il metanolo viene poi ulteriormente metabolizzato a formaldeide, formiato, e infine CO₂. È bene ricordare che il metano, fra tutti gli idrocarburi, contiene il legame C–H più forte (104 kcal/mol) ed è il più difficile da attivare. La sMMO contiene come sito attivo un centro di-ferro simile a quello della emeritina, che è stato caratterizzato in diverse combinazioni di stati di ossidazione. Leganti del centro di-ferro sono due istidine e quattro glutammati, più molecole di acqua dal solvente a completare la sfera di coordinazione.

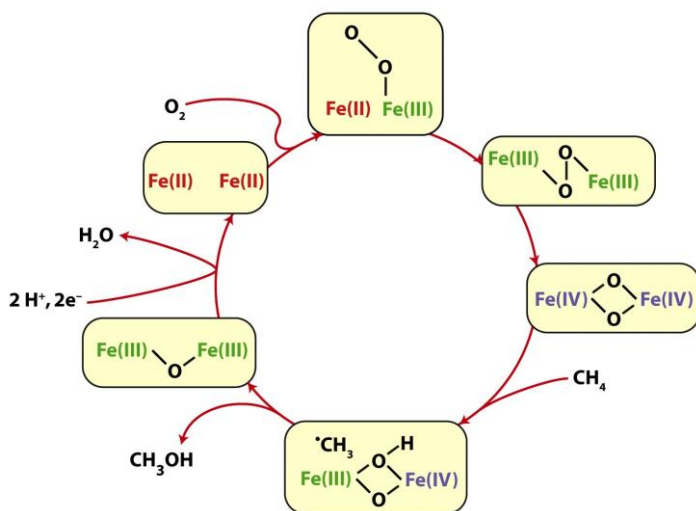
Nella forma di-ossidata Fe(III)/Fe(III) (*resting state*, MMOH_{ox} in Figura) ci sono due OH a ponte; il sistema è diamagnetico a causa del forte accoppiamento antiferromagnetico tra i due centri Fe(III) alto-spin, mediato dagli OH a ponte e non si osserva alcuna intensa banda di trasferimento di carica nel visibile (vedi emeritina che diventa colorata solo in seguito alla coordinazione dell'ossigeno come perossido). Quando si riduce, tramite il NADH, alla forma Fe(II)/Fe(II) (MMOH_{red} in Figura) non ci sono più le molecole di solvente a ponte e un glutammato, legato a Fe1 in MMOH_{ox}, si mette



a ponte tra Fe1 e Fe2. Di conseguenza si libera un sito di coordinazione e la distanza fra i due atomi di ferro aumenta. Entrambi i Fe(II) sono ad alto spin e l'accoppiamento è molto debole. Soltanto la forma Fe(II)/Fe(II) alto-spin è attiva per la coordinazione ed

attivazione di O₂ e presumibilmente il centro di-ferro è anche il sito catalitico (per il metano). Non sono stati trovati altri ioni metallici, co-fattori organici o radicali stabili.

Il meccanismo della reazione (figura) presumibilmente richiede la formazione di un centro dimetallico ossigenato con **gruppi osso-ferrile(IV)**, nel quale però gli ossigeni sono **a ponte** fra i due atomi di ferro e non terminali, i quali poi effettuano l'inserzione dell'atomo di ossigeno nel legame C–H del metano. Presumibilmente la reazione procede per **via radicalica**, tramite l'estrazione di un atomo di idrogeno dal substrato (metano), un po' come osservato nel meccanismo di azione del P-450. E' possibile/probabile che i sistemi catalitici P-450 siano la forma più recente,

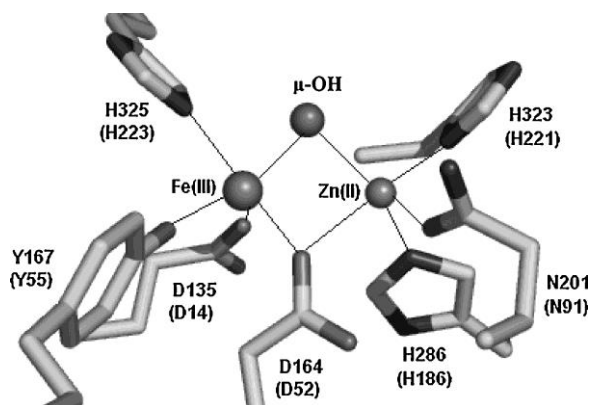


dal punto di vista evolutivo, di questo tipo di enzimi.

Da notare infine che in tutti gli enzimi contenenti il centro dinucleare Fe–O–Fe, questo è inserito in domini proteici ad α elica, che presumibilmente sono in grado di cambiare conformazione nel passaggio Fe(II) \rightarrow Fe(III) (si ha una contrazione $> 0.1 \text{ \AA}$ nel passaggio da Fe(II) alto spin a Fe(III) alto spin) e (nel caso della Ribonucleotide Riduttasi) alla formazione del radicale tirosinico. Cioè le proteine multi-elica sono meccanicamente flessibili.

Fosfatasi acida

L'enzima fosfatasi acida (PAP) catalizzano l'idrolisi di un'ampia gamma di **monoesteri fosforici** (un po' come gli enzimi al Mg) e funziona al meglio in condizioni leggermente acide. Questi enzimi sono stati identificati e caratterizzati da numerose fonti vegetali e animali ed è probabile che anche un numero limitato di organismi batterici utilizzi questo catalizzatore. Si trova in vari organi di



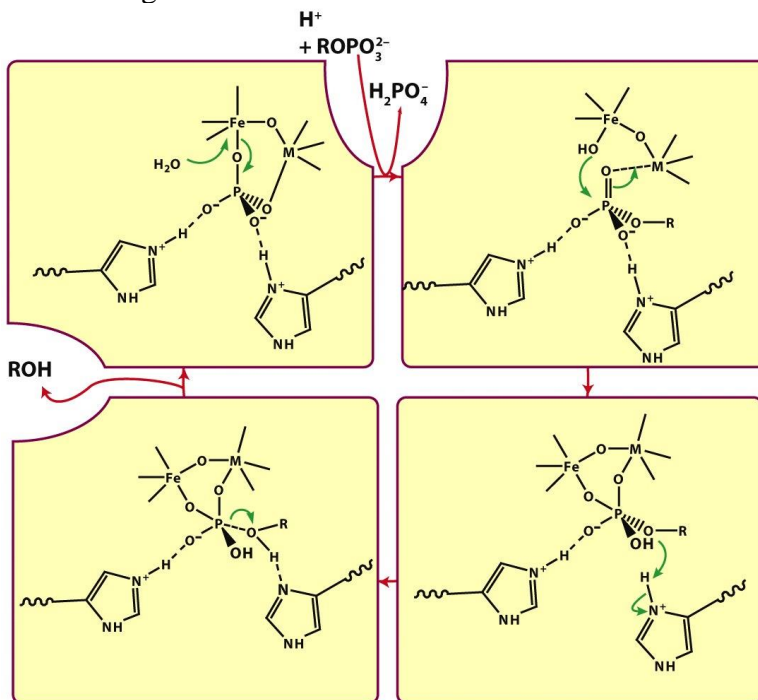
mammiferi, come la milza dei bovini e l'utero dei suini, e catalizza l'idrolisi di esteri fosforici durante la digestione. Mentre le PAP animali e vegetali condividono meno del 20% di identità di sequenza aminoacidica e possono differire notevolmente nelle dimensioni, i loro siti attivi cataliticamente rilevanti sono altamente conservati, con sette amminoacidi invariati che coordinano un Fe(III) e un M(II) (M = Fe nelle PAP animali, Zn o Mn in quelle vegetali). Tutte le PAP conosciute hanno un Fe(III) nel sito attivo (il sito "cromoforo") che si coordina con un tirosinato invariante. Le PAP hanno colore rosa o

violetto a causa di una transizione a trasferimento di carica molto intensa tra 510 e 550 nm dal tirosinato a Fe(III). I sette residui di coordinazione degli ioni metallici, un aspartato, una tirosina e un'istidina per il Fe(III) e due istidine e un'asparagina per l'M(II), con un residuo di aspartato a fare da ponte tra i due ioni. Nella figura (sito attivo di una PAP Fe–Zn) è mostrato anche l'idrossido ponte dello ione metallico, proposto come nucleofilo che avvia l'idrolisi.

Se il sito attivo contiene due centri Fe, la forma ossidata Fe(III)–Fe(III) è inattiva, mentre **in quella attiva un solo Fe(III) viene ridotto a Fe(II)**. In entrambe le forme gli atomi di Fe sono sempre ad alto spin.

Il meccanismo d'azione è mostrato nella figura successiva e prevede che il gruppo fosfato dell'estere fosforico si coordini rapidamente al sito metallico divalente M(II) (in alto a destra) e poi venga attaccato da uno ione OH^- che si forma sul sito Fe(III), più acido e quindi in grado di

deprotonare facilmente H_2O . Quindi la reazione procede con un meccanismo $\text{S}_{\text{N}}2$, come visto nel caso del Mg.

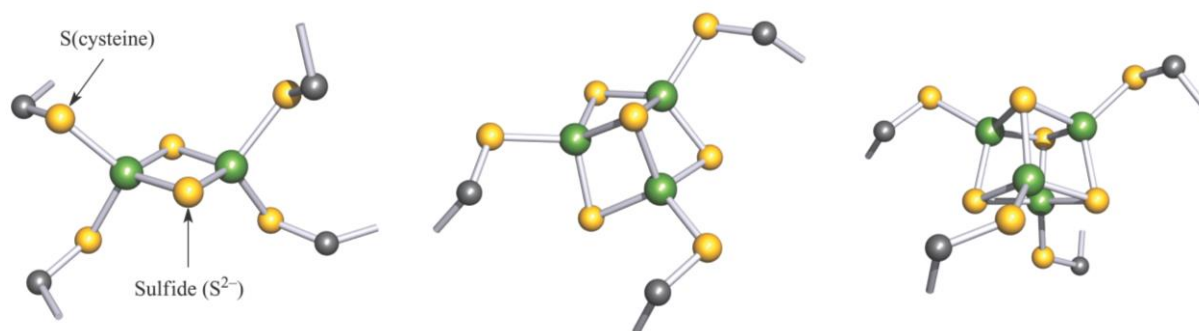


Proteine Fe-S

La maggior parte delle proteine con centri Fe-S sono coinvolte in **processi di trasferimento elettronico a potenziali redox negativi** (di solito più negativi di -0.2 V). Centri Fe-S hanno funzioni essenziali nella fotosintesi, nella respirazione delle cellule, nella fissazione dell'azoto e nel metabolismo di H_2 , NO_2^- e SO_3^{2-} . Circa l'1% del ferro nei mammiferi è presente in proteine Fe-S; il fatto che queste proteine siano molto robuste (in assenza di ossigeno), siano presenti in specie molto antiche e conservino sequenze critiche di amminoacidi fa pensare che esse abbiano svolto un ruolo fin dalle prime fasi evolutive, cioè in assenza di O_2 libero. A sostegno di questa ipotesi ci sono anche i potenziali redox tipicamente negativi, il fatto che si trovino anche in micro-organismi ipertermofili (cioè che resistono a $T > 100$ °C) e la sensibilità all'ossigeno degli stati ridotti.

Una caratteristica delle proteine ferro-zolfo è la coordinazione degli ioni ferro tramite l'atomo di zolfo di residui cisteinati (RS^-) della proteina e, nei centri Fe-S polinucleari, anche tramite solfuro inorganico (S^{2-}), che è acido-labile.

Si distinguono **quattro tipi di centri Fe/S**, a seconda del grado di aggregazione in cluster (figura); con poche eccezioni gli atomi di Fe in questi cluster sono coordinati da 4 atomi di S con **coordinazione tetraedrica distorta**. Il numero di coordinazione basso (4) rispetto alla tipica esacoordinazione del ferro biologico è dovuto al fatto che l'atomo di S è grande rispetto ai più piccoli atomi donatori N o O incontrati finora. Come conseguenza gli atomi di Fe nei centri Fe/S sono **esclusivamente alto spin**, a causa del piccolo *field splitting* imposto dai leganti con geometria tetraedrica. La figura mostra le strutture dei centri [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S] e le loro connessioni alla proteina tramite i residui cisteinato.



I centri Fe-S si trovano a volte come cluster isolati, come ad esempio nelle piccole ferridossine che svolgono funzioni di trasferimento elettronico (vedi dopo), ma spesso hanno interazioni con altri centri metallici, ad esempio Ni, Mo, V, Fe-eme. La figura mostra la struttura di un enzima [Ni-Fe]-

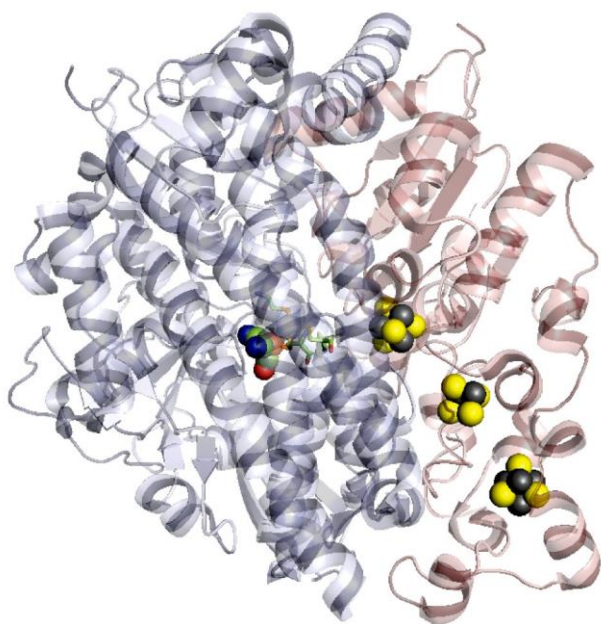
idrogenasi (trattato più avanti), dove il centro catalitico sepolto all'interno dell'enzima è collegato tramite tre cluster Fe-S in serie che forniscono una via per il trasferimento elettronico *long-range* richiesto per il funzionamento dell'enzima.

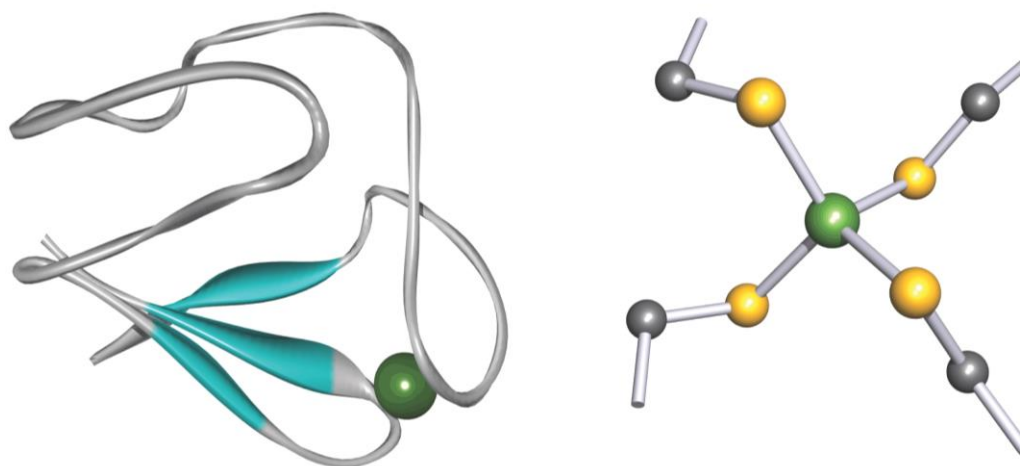
Vediamo esempi di proteine con i quattro tipi di centri Fe/S.

Rubredossine

Le rubredossine sono piccole proteine redox (peso molecolare circa 6000) che si trovano in certi batteri e contengono un solo centro Fe legato da quattro cisteinati appartenenti a due sequenze amminoacidiche del tipo -Cys-X₂-Cys- con geometria tetraedrica distorta. La transizione tra lo stato Fe(II), quasi incolore, e quello Fe(III), rosso, avviene senza grossi cambiamenti nelle distanze Fe-S (nell'ossidazione la lunghezza del

legame Fe-S si accorcia di circa 5 pm) e quindi ha bassa energia di attivazione (stato entatico). L'intenso colore rosso, da cui il nome di questi enzimi, deriva da transizioni a trasferimento di carica dai tiolati al Fe(III). La figura mostra la struttura ai raggi X di una rubredossina da batterio e del relativo sito attivo con l'arrangiamento tetraedrico delle cisteine. Il potenziale di riduzione per la coppia Fe(III)/Fe(II) è sensibile alla conformazione della catena proteica che definisce la tasca nella quale si trova il sito attivo. Di conseguenza sono stati trovati diversi potenziali a seconda della provenienza della rubredossina, ma tutti vicini a 0 V.



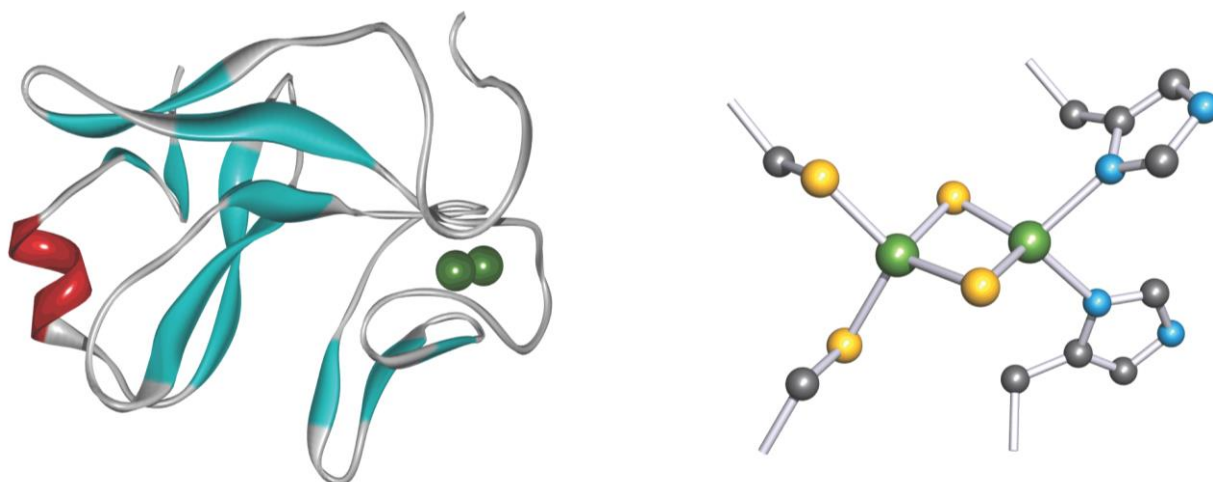


Ferridossine

Le ferridossine si trovano in batteri, piante e animali e ve ne sono di diversi tipi, a seconda del numero di atomi di Fe. Nelle [2Fe–2S]-ferridossine ognuno dei due centri Fe è coordinato da due residui cisteinato della proteina e da due zolfuri a ponte (e quindi condivisi). I centri [2Fe–2S] sono soprattutto comuni nei cloroplasti ed è particolarmente nota la ferridossina estratta dalle foglie di spinaci. Vi sono poi ferridossine con centri [3Fe–4S] e con centri [4Fe–4S]. Il vantaggio delle ferridossine rispetto alle rubredossine sta nel fatto che, combinando più centri Fe vicini, è possibile accedere a un intervallo più ampio di potenziali redox. Il potenziale dei cluster Fe–S sarà poi anche influenzato dalla conformazione della tasca proteica che lo contiene.

Il trasferimento elettronico biologicamente rilevante per le ferridossine [2Fe–2S] avviene in un range di potenziale fra –250 e –450 mV (ad esempio la ferridossina da spinaci opera a un potenziale di –420 mV) ed è una transizione monoelettronica da uno stato Fe(III)/Fe(III), con forte accoppiamento anti-ferromagnetico degli spin, alla forma mono-ridotta. Questa può essere scritta con una formulazione asimmetrica Fe(II)/Fe(III), che implica localizzazione, oppure in modo simmetrico $Fe^{2.5}/Fe^{2.5}$, che implica delocalizzazione nel *ground state*. Misure spettroscopiche, soprattutto di tipo Mossbauer, indicano che la descrizione localizzata, con valenze fisse Fe(II) e Fe(III), è quella più corretta.

Nel gruppo delle proteine [2Fe–2S] ci sono dei sistemi che contengono centri con proprietà spettroscopiche inusuali e potenziali redox relativamente elevati rispetto alle normali 2Fe ferridossine. Questi cosiddetti “**centri Rieske**” si trovano nelle membrane dei mitocondri (che contengono anche citocromi) e nei cloroplasti. Ad esempio, le proteine Rieske isolate dai cloroplasti di spinaci hanno un potenziale di riduzione decisamente positivo (+290 mV), in contrasto ai valori tipicamente negativi delle ferridossine [2Fe–2S]. La differenza deve essere attribuita principalmente al fatto che le proteine Rieske contengono due centri Fe decisamente differenti, uno dei quali è legato a due istidine anziché due cisteine, come si vede in figura dove è riportata la struttura ai raggi X della proteina Rieske da cloroplasti di spinaci.



I centri Fe–S più stabili e più comuni sono del tipo [4Fe–4S], che si possono trovare in ferridossine ma anche in numerosi enzimi complessi e in proteine per trasferimento elettronico. Abbiamo mostrato prima il caso di una idrogenasi che contiene tre centri [4Fe–4S] in serie, distanti fra loro più di 1 nm (cioè 10 Å). Centri [4Fe–4S] partecipano a quasi tutti i processi redox biologici complessi, come fotosintesi, respirazione, fissazione di N₂, dove agiscono sostanzialmente come centri di trasferimento elettronico a potenziali negativi, tipicamente a potenziali compresi fra –300 e –450 mV. I quattro atomi di Fe e quattro atomi di S sono disposti con geometria di **cuboide distorto**, con simmetria circa D_2 , e ogni centro Fe è ancorato alla proteina tramite un solo residuo cisteinato. I quattro solfuri sono a ponte ognuno fra tre Fe, con coordinazione μ_3 .

Lo stato normale dei centri [4Fe–4S] ha carica –2 (dovuta al nucleo $[4Fe-4S]^{2+} + 4Cys^-$) e contiene due coppie a valenza mista Fe(II)/Fe(III). Le ferridossine normali subiscono **riduzione monoelettronica** a una specie 3Fe(II)/1Fe(III), ma ci sono anche dei tipi di proteine in cui il centro [4Fe–4S] può venire ossidato reversibilmente a potenziali relativamente alti per dare un sistema 1Fe(II)/3Fe(III) (tabella). Queste proteine si chiamano **HiPIP**, da *High Potential Iron-sulfur Proteins*. Piccole variazioni nell'intorno proteico sembrano essere in grado determinare il potenziale redox e la stabilità dei singoli stati di ossidazione dei cluster [4Fe–4S]. In particolare, le HiPIP solitamente presentano più amminoacidi con residui idrofobici attorno al cluster 4Fe-4S delle ferridossine, con conseguente ridotto accesso a molecole di H₂O e minor numero di legami a idrogeno con il cluster.

HiPIP	normal ferredoxin	n in $[4Fe-4S]^{n+}$	EPR
oxidized HiPIP	super-oxidized ferredoxin	3	active
↕ + 350 mV	↕ –50 mV		
reduced HiPIP	oxidized ferredoxin	2	inactive
↕ –600 mV	↕ –400 mV		
super-reduced HiPIP	reduced Ferredoxin	1	active

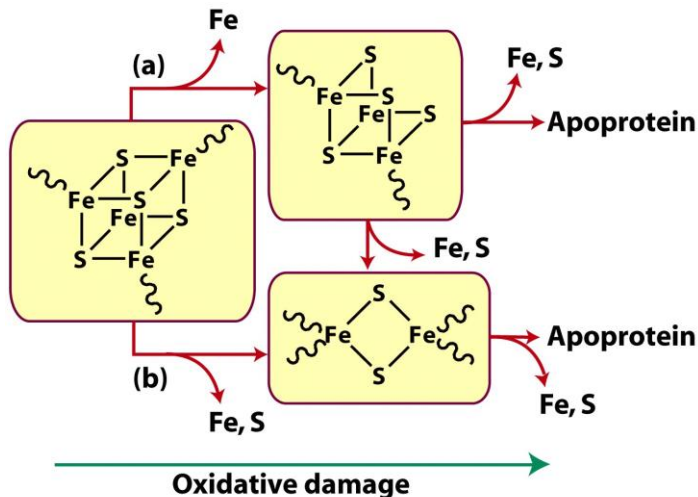
Al contrario dei sistemi $[2Fe-2S]^+$ in cui la carica era localizzata, i cluster $[4Fe-4S]^{n+}$ presentano un più elevato grado di delocalizzazione elettronica, attribuito alla ortogonalità degli orbitali metallici determinata dalla geometria del cluster, che interagiscono con i ponti solfuro in grado di dare super-scambio.

Come ci si può aspettare, la maggior parte dei modelli presentano velocità di trasferimento di carica minori delle proteine Fe–S naturali, perché il processo comporta delle variazioni geometriche più pronunciate. Inoltre, questi modelli presentano potenziali redox significativamente minori delle proteine, e quindi non fisiologici. Tutte queste differenze sono da attribuire all'assenza dell'intorno proteico.

Proteine Fe–S come sensori

Alcune metalloproteine vengono usate come sensori per individuare e quantificare la presenza di piccole molecole, in particolare O₂, NO e CO, ma anche metalli come Fe, Cu e Zn. Queste proteine-sensori allertano un organismo dell'eccesso o carenza di una particolare specie chimica e attivano di conseguenza variazioni metaboliche per porvi rimedio.

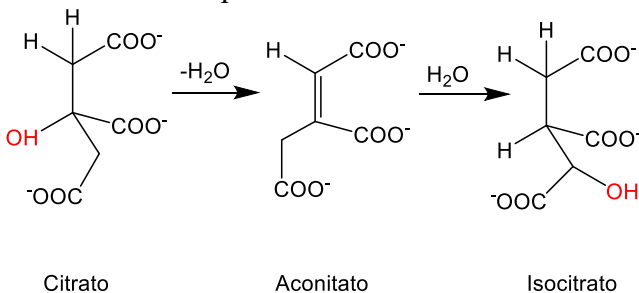
Un esempio è quello di proteine contenenti cluster Fe–S che fungono da **sensori di O₂**. I cluster Fe–S, legati alle proteine tramite cisteinati, sono sensibili all'O₂, al potenziale elettrochimico e alle concentrazioni di Fe/S, e possono quindi fungere da sensori. In figura è mostrata la degradazione di un cluster Fe–S che è alla



base del sistema sensorio. Il cluster [4Fe–4S] non resiste a uno stato in cui tutti gli atomi di ferro siano Fe(III); di conseguenza, condizioni fortemente ossidanti, compresa l'esposizione ad O₂, causano la rottura progressiva del cluster a [3Fe–4S] o [2Fe–2S] e poi eventualmente alla sua completa distruzione. La degradazione a [3Fe–4S] richiede la rimozione di un solo atomo di Fe, mentre la degradazione a [2Fe–2S] può richiedere il riarrangiamento dei leganti (cisteine) e indurre quindi una notevole variazione nella conformazione della proteina. In condizioni ossidanti estreme il cluster può venire completamente rimosso. Questi processi in pratica legano lo stato del cluster alla disponibilità di Fe, così come ai livelli di O₂ e di altri ossidanti; le **variazioni conformazionali** indotte nella proteina da questi processi degradativi influenzano la sua capacità di **interagire con il DNA** e quindi di attivare/disattivare processi di replicazione e trascrizione di particolari sequenze.

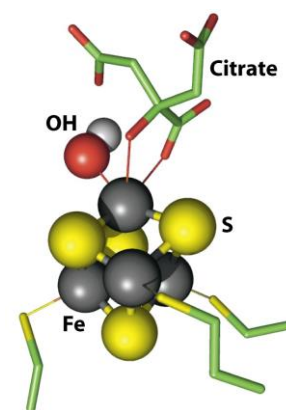
Proteine Fe–S con attività catalitica: Aconitasi

L'Aconitasi è un enzima essenziale nel **ciclo degli acidi tricarbossilici**, dove catalizza la interconversione del citrato in isocitrato in una reazione che – formalmente – prevede deidratazione e reidratazione e procede tramite l'intermedio aconitato (figura).



La forma attiva dell'enzima contiene un cluster [4Fe–4S], che si degrada a [3Fe–4S] se l'enzima è esposto all'aria. Il sito catalitico è proprio l'atomo di Fe che viene perso in seguito ad ossidazione. La struttura ai raggi X (figura) mostra che questo sito dalle caratteristiche uniche non è legato allo zolfo di una cisteina ma ad una molecola di acqua, il che spiega la labilità di questo atomo di Fe. Un meccanismo plausibile per l'aconitasi, basato su dati strutturali, cinetici e spettroscopici, richiede

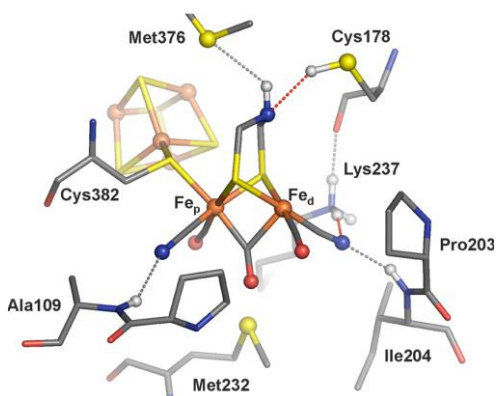
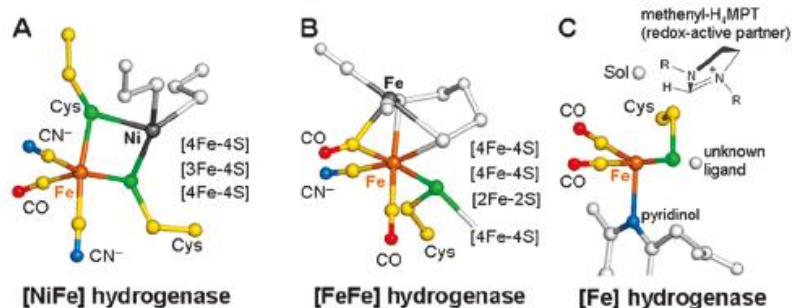
che il citrato si coordini come chelante – tramite l’OH ed il carbossilato geminale – al sito di Fe attivo, che in questo modo aumenta il suo numero di coordinazione a sei (con tre O e tre S, figura). L’atomo di Fe polarizza il legame C–OH e un gruppo OH viene estratto mentre un sito basico nelle vicinanze accetta un protone. A questo punto il substrato intermedio, cioè l’aconitato, “ruota” ed OH e H vengono reinseriti ma in posizioni differenti. Una forma di aconitasi che si trova nel citosol cellulare ha invece funzione di sensore del Fe e verrà trattata più avanti, a proposito dell’omeostasi del ferro.



Idrogenasi

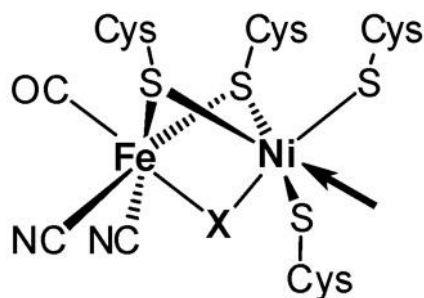
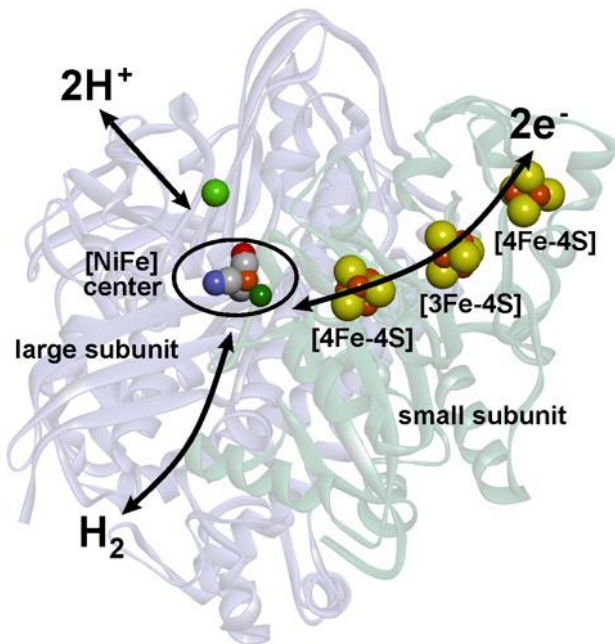
Si stima che quasi tutti i batteri (cioè circa il 99% di tutti gli organismi!) utilizzino H_2 ; per questo essi possiedono dei metalloenzimi estremamente attivi (**fino a 10^4 cicli/secondo**), noti come **idrogenasi** (risalenti – in termini evolutivi – addirittura a più di 1 miliardo di anni fa), che catalizzano l’interconversione reversibile fra H_2 e H^+ (come H_2O): $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$. Alcuni organismi producono H_2 come prodotto di scarto (si pensa per smaltire facilmente elettroni in eccesso), mentre altri usano questa molecola come fonte di energia; questo contribuisce a spiegare come mai nell’atmosfera si trovi così poco H_2 . Le funzioni primarie delle idrogenasi sono dunque quella di **fornire energia** al batterio dall’ossidazione di idrogeno molecolare e quella di **bilanciare il potenziale redox** del batterio. A seconda della loro collocazione nella cellula, le idrogenasi possono operare in un senso o in quello opposto, cioè evoluzione di idrogeno oppure *uptake* di idrogeno. Essendo solitamente la reazione strettamente reversibile, lo stesso microorganismo può condurla nelle due direzioni, a seconda delle condizioni, cioè del contesto fisiologico della cellula.

In base alla struttura del sito attivo, si distinguono **tre classi di idrogenasi**: tutte contengono Fe, alcune contengono anche Ni. I due tipi meglio caratterizzati sono noti come idrogenasi-[FeFe] e idrogenasi-[NiFe]; è stata poi più recentemente caratterizzata anche una idrogenasi nel cui sito attivo c’è un solo centro Fe (anche se questa idrogenasi non è reversibile e non produce H_2 ma catalizza l’idrogenazione di un substrato biologico). Le strutture ai raggi X dei siti attivi delle tre idrogenasi caratterizzate strutturalmente finora sono riportate in Figura. La prima struttura risale al 1995.

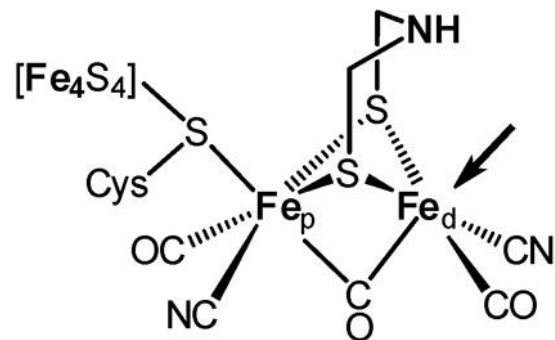
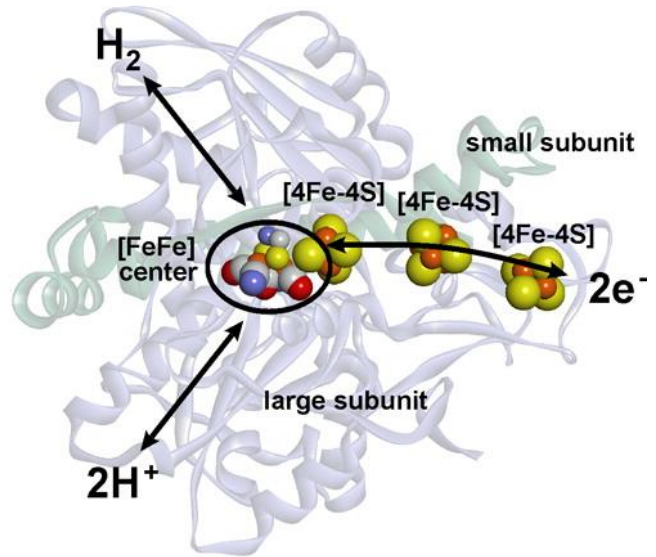


La cosa molto interessante è che i siti attivi contengono almeno **una molecola di CO come legante** e sono dunque **esempi di composti organometallici biologicamente attivi** (vedremo più avanti il coenzima B_{12} e il cofattore ferro-molibdeno nelle nitrogenasi). Il sito attivo delle idrogenasi [FeFe] è dinucleare (figura). Ogni atomo di ferro è coordinato a un CO terminale e un CN^- , altro legante atipico. Inoltre c’è un CO a ponte e un legante bidentato a ponte molto inusuale, la **ditiometilamina**, $NH(CH_2S^-)_2$. Un atomo di ferro (quello cataliticamente non attivo) è infine legato alla proteina solo tramite una cisteina che è a ponte con un cluster $[4Fe-4S]$ (unico punto di ancoraggio alla proteina, tutti gli altri leganti sono esogeni). L’altro atomo di

[NiFe] Hydrogenase



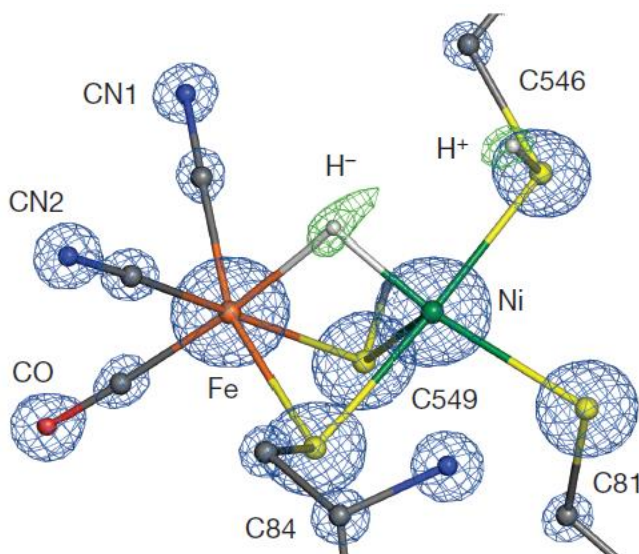
[FeFe] Hydrogenase



Nelle [NiFe] idrogenasi il centro catalitico, sepolto al centro dell'enzima, consiste di un complesso dinucleare Fe–Ni. Il Fe (Fe^{2+} basso spin) è coordinato a un CO e due CN^- . Due cisteine sono a ponte fra i due metalli e il Ni è coordinato ancora ai tiolati di due cisteine terminali (vedi dopo).

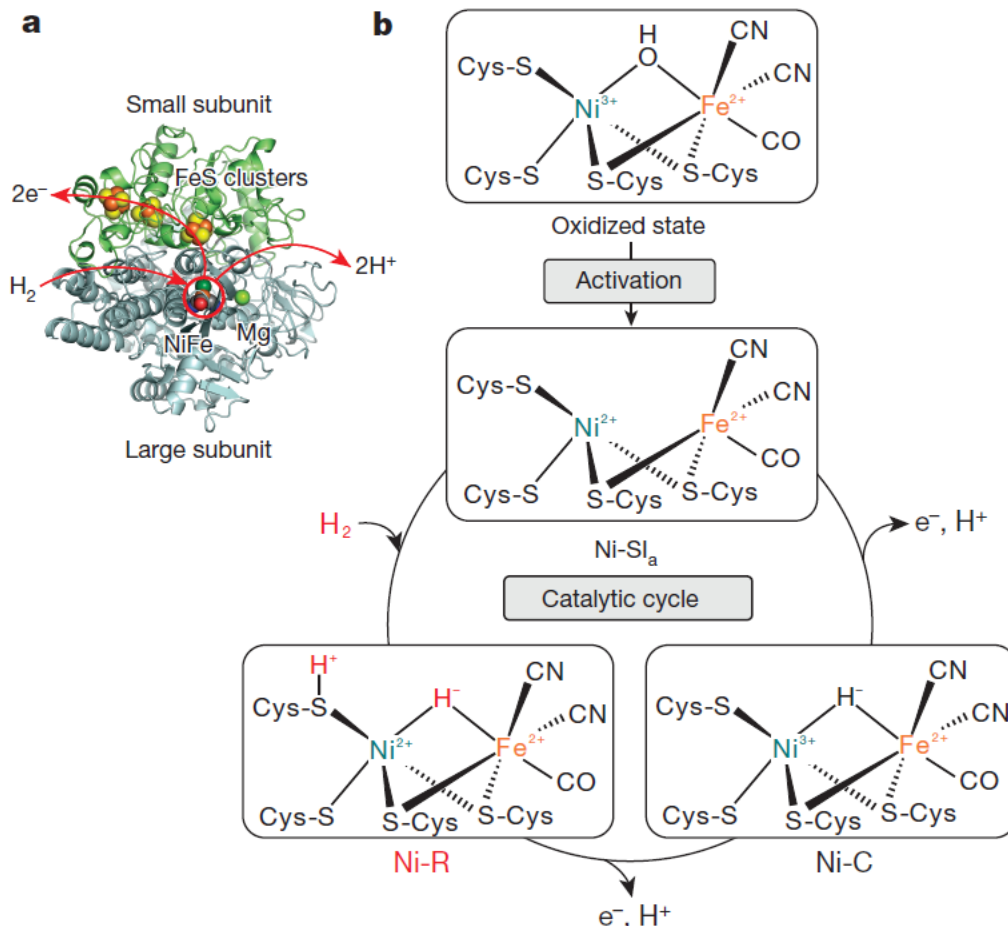
Nella forma ossidata, inattiva, c'è un OH^- come terzo legante a ponte, la cui natura però cambia durante il ciclo catalitico. Infatti, quando l'enzima viene attivato tramite riduzione con idrogeno, l'idrossido a ponte viene rimosso.

Nel 2015 è stata determinata la struttura di una [NiFe] idrogenasi nella forma ridotta a risoluzione ultra-elevata (0.89 Å), che ha permesso non solo di assegnare tutti i leganti CO e CN^- nel sito attivo (da notare che CO e CN^- sono isoelettronici e quindi è molto difficile distinguerli in base alla loro densità elettronica, vengono distinti perché i CN^- formano legami a idrogeno e CO no), ma soprattutto di posizionare la maggior parte degli atomi di idrogeno (che normalmente



non si “vedono”) nella struttura. In particolare si sono potuti individuare i prodotti dello *splitting* eterolitico di H_2 in un idruro (H^-) a ponte fra Ni e Fe e in un protone attaccato allo zolfo di un

legante cisteina. Questo protone verrà poi trasferito sulla superficie della proteina ed è stata anche individuata una possibile via di “*proton transfer*” fra amminoacidi dell’enzima. In base ai nuovi dati strutturali è stato possibile ipotizzare un ciclo catalitico, in accordo anche con tutti i dati spettroscopici finora ottenuti (figura). L’idruro si mette a ponte fra i due metalli e il protone va temporaneamente su una cisteina. Il ferro rimane sempre Fe(II), basso-spin, mentre **il nichel “cicla” fra Ni(III) e Ni(II)** (vedi anche dopo enzimi redox al nichel). Infatti lo stato indicato come Ni-C è paramagnetico, in accordo con la presenza di Ni(III), d^7 . Gli altri due stati sono diamagnetici, suggerendo che il Ni(II), d^8 , sia basso-spin, in accordo con una geometria planare quadrata o piramidale a base quadrata con un legame assiale lungo.



Nichel

Gli enzimi contenenti nichel nel sito attivo svolgono ruoli cruciali in batteri e archeo-batteri (*archei*), funghi, alghe e piante. In alcuni di essi il Ni non cambia stato di ossidazione (enzimi non-redox), mentre in numerosi altri esso ha un ruolo di metallo redox. Al momento non sono noti Ni-enzimi nei mammiferi, tuttavia il nichel appartiene a un gruppo di metalli (tra essi, ad esempio, il cromo) sui quali il dibattito è tuttora in corso e sono classificati come “elementi possibilmente essenziali” per animali e uomini. Dal momento che il normale *intake* quotidiano di nichel negli umani supera di gran lunga la richiesta metabolica stimata di 25 – 35 $\mu\text{g}/\text{giorno}$, non deve stupire che non siano mai state individuate sindromi da deficienza (sempre nell’ipotesi che possa essere un metallo essenziale).

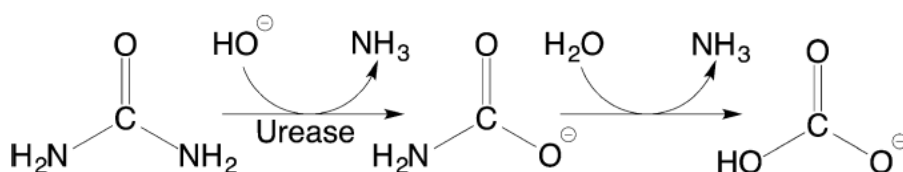
La scelta del nichel come sito catalitico per reazioni biologiche è da correlarsi alla sua **geometria di coordinazione flessibile**, che lo rende un elemento molto versatile per applicazioni biologiche. Al contrario dei più abbondanti metalli redox biologici, ferro e rame (vedi dopo), gli ioni Ni(II) acquati non hanno una chimica redox biologicamente rilevante poiché l’acqua si ossida e si riduce prima di questo ione (cioè in condizioni fisiologiche il nichel – come aquo-ione – esiste solo come Ni(II), d^8). Di conseguenza, l’intorno coordinativo svolge un ruolo fondamentale per portare il potenziale redox del Ni(II) in un intervallo biologicamente accessibile. Negli enzimi redox al nichel questo

viene solitamente ottenuto tramite la coordinazione di **donatori allo zolfo anionici**, solfuro e cisteinato (vedi prima la [NiFe] idrogenasi). In particolare, i cisteinati stabilizzano la coppia redox Ni(III)/Ni(II). Oltre a modulare il potenziale redox, l'ambiente coordinativo costituito da leganti S-donatori spesso favorisce complessi coordinativamente insaturi con strutture elettroniche a basso-spin (vedi idrogenasi). Noi vedremo tuttavia un esempio particolare di enzima redox al nichel che presenta Ni(I) nel **macrocielo tetrapirrolico F-430**.

Negli enzimi non-redox che utilizzano il nichel come un acido di Lewis, al contrario degli enzimi redox, l'ambiente coordinativo del nichel è composto esclusivamente da leganti O/N donatori; il Ni(II) in questi siti è tipicamente esacoordinato e la struttura elettronica è sempre alto-spin.

Verranno qui trattati solo due esempi, uno di un enzima non-redox ed uno di un enzima redox particolare (vedi sopra).

Come **enzima non-redox** trattiamo l'**ureasi**. L'ureasi è un enzima che si trova in alcuni batteri, *archei*, alghe, funghi e piante e catalizza l'apparentemente semplice idrolisi dell'urea in ammoniaca ed acido carbammico, il quale poi spontaneamente si decompone in un'altra ammoniaca e bicarbonato.

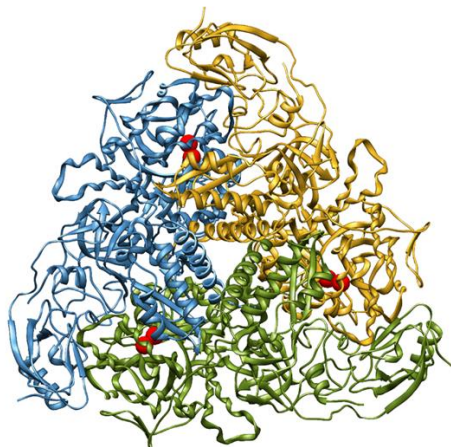


L'urea viene prodotta in quantità notevoli dai vertebrati, come prodotto del catabolismo dei composti contenenti azoto; ogni umano produce circa 10 kg di urea all'anno. L'aumento della concentrazione di ammoniaca e il conseguente aumento del pH a causa dell'attività catalitica dell'ureasi ha notevoli conseguenze in agricoltura e in medicina. In molti batteri patogeni l'ureasi è un fattore di virulenza; batteri ureolitici causano infezioni urinarie e gastrointestinali, ad esempio contribuiscono alla formazione di calcoli urinari, alcune nefriti, e altre malattie. Un esempio di patogeno ureolitico è l'*helicobacter pylori*, il batterio che è causa delle ulcere gastriche ed è capace di sopravvivere nell'ambiente acido dello stomaco grazie all'aumento localizzato di pH dovuto all'ureasi. Nel contesto agricolo, l'attività delle ureasi batteriche, ampiamente diffuse nell'ambiente, consente di utilizzare l'urea come fertilizzante. Quindi l'ureasi rappresenta una componente importante nel ciclo dell'azoto.

L'urea è una molecola molto stabile. La decomposizione non-enzimatica dell'urea in acqua ad ammoniaca ed acido cianico, $\text{N}\equiv\text{C}-\text{OH}$, ha un tempo di semi-vita estremamente lungo, stimato in circa 40 anni. L'idrolisi non catalizzata, mai osservata sperimentalmente, ha un tempo di semi-vita stimato ancora più lungo, addirittura 520 anni. In assenza di una degradazione enzimatica efficiente dell'urea si potrebbero avere dei seri problemi ambientali. D'altra parte l'idrolisi dell'urea catalizzata dall'ureasi ha un tempo di semi-vita solo di alcuni microsecondi, con un aumento di velocità rispetto alla reazione non catalizzata di 3×10^{15} volte, il che rende **l'ureasi la più efficiente tra le idrolasi note**. L'ureasi fu il primo enzima a venire cristallizzato, nel 1926, ma solo

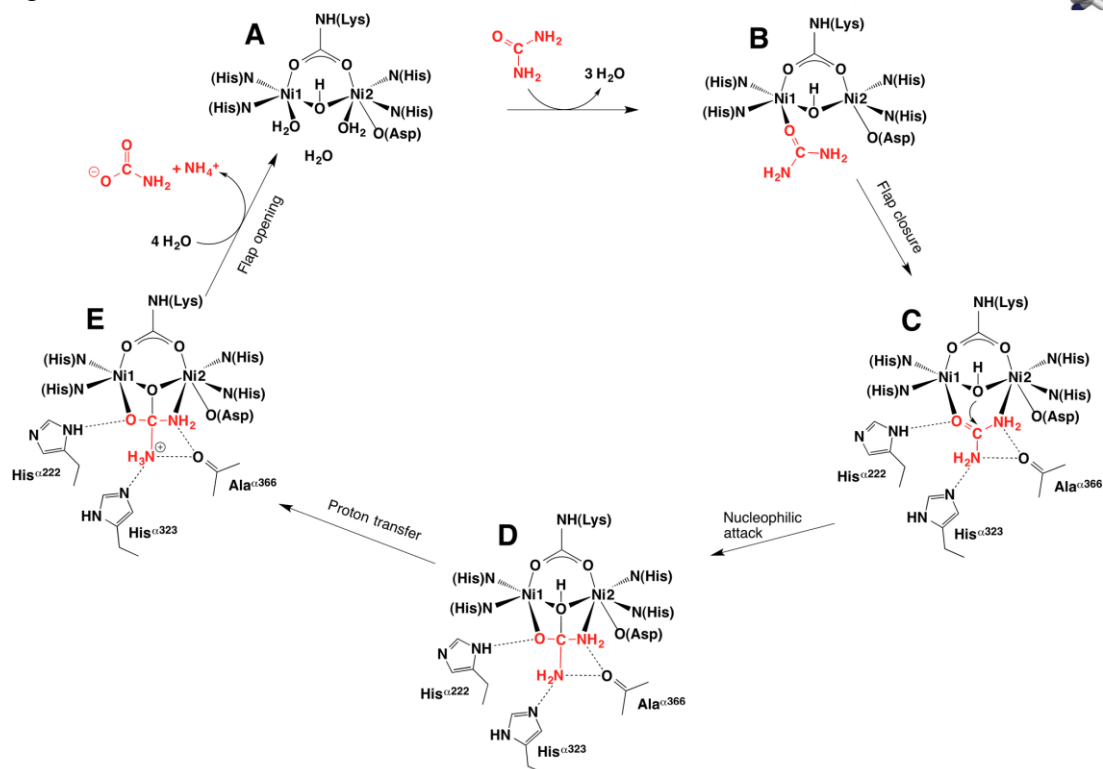
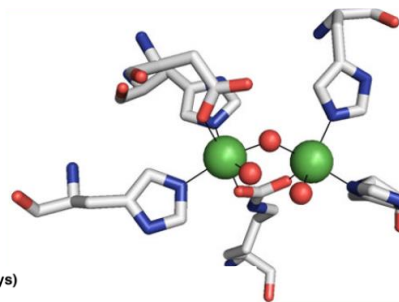
nel 1976 si scoprì che possedeva nichel nel sito attivo (primo esempio di enzima al nichel).

La maggior parte delle ureasi batteriche sono dei trimeri di trimeri del tipo $(\alpha\beta\gamma)_3$. Il sito attivo si trova nella subunità α , per cui ci sono tre siti attivi per unità biologica (figura). In tutte le strutture di ureasi finora determinate il sito attivo è **dinucleare** (figura), con i due ioni Ni(II) a una distanza di 3.5 – 3.7 Å, connessi dagli atomi di ossigeno carbossilici di un residuo di lisina carbamitato (come nel Rubisco) e da un OH a ponte. Ciascun Ni(II) è legato a due istidine, e uno dei due all'ossigeno carbossilico di un



aspartato. La sfera di coordinazione è completata da due molecole di acqua. Di conseguenza, uno dei due ioni è pentacoordinato, con geometria di piramide a base quadrata distorta (quello a destra in figura) e l'altro è esacoordinato, con una geometria ottaedrica distorta. Vicino al sito dinucleare c'è poi una ulteriore molecola di acqua non coordinata (non riportata in figura) che fa parte di un network di legami a idrogeno che interessa un cluster tetraedrico di quattro molecole di acqua/idrossido molto vicino agli ioni Ni(II).

Il ciclo catalitico proposto in base a considerazioni strutturali (anche in presenza di inibitori) e spettroscopiche è riportato in figura.

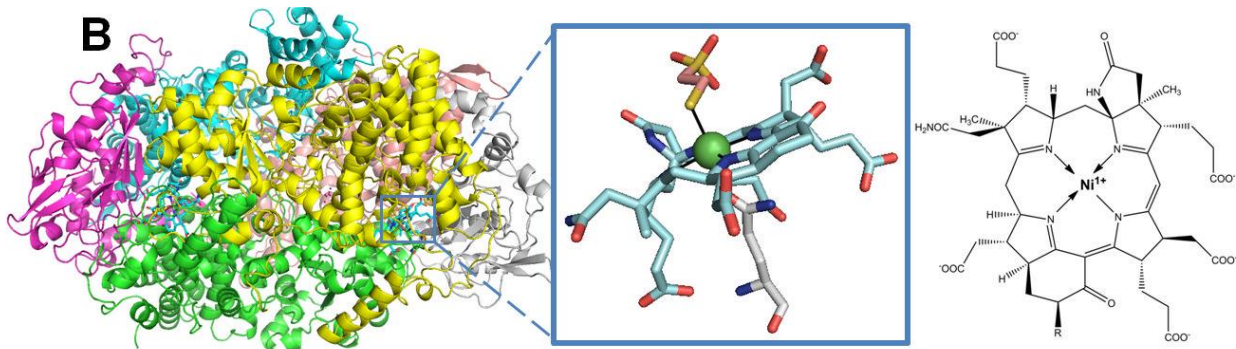
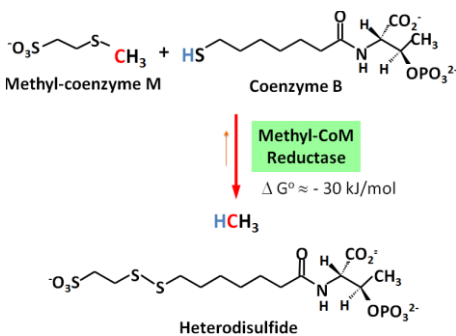


Si ritiene che l'urea si coordini prima in modo terminale tramite l'atomo di ossigeno al Ni(II) pentacoordinato (e più elettrofilo), facendo uscire le molecole di acqua (compresa quella di idratazione); segue la coordinazione all'altro atomo di nichel tramite un NH_2 (*flap closure*), situazione stabilizzata da legami a idrogeno con residui vicini al sito catalitico. L'urea infatti è un **chelante molto modesto** a causa della scarsa basicità di Lewis dei suoi gruppi NH_2 , ma la formazione di forti legami a idrogeno con gli ossigeni di carbonili adiacenti potrebbe aumentare la basicità di Lewis facilitando la coordinazione. Questo modo di legame del substrato prevede un ruolo di entrambi gli ioni Ni(II) nel legarlo e attivarlo, giustificando la presenza di un sito dinucleare. Si ritiene che poi l'OH a ponte faccia un attacco nucleofilo sull'atomo di carbonio dell'urea (il quale è diventato più elettrone-povero a causa della coordinazione a ponte), generando uno stato di transizione/intermedio tetraedrico (D nel ciclo), nel quale la distribuzione elettronica dell'urea è notevolmente cambiata. In particolare dopo l'attacco nucleofilo l'OH a ponte deve avere un pK_a molto basso, e trasferisce il protone sul gruppo NH_2 non coordinato, il cui pK_a è invece aumentato (anche in base a calcoli teorici). La formazione del frammento $\text{C}-\text{NH}_3^+$ causa la rottura del legame C-N, con formazione di ammoniaca e carbammato, il quale si decompone poi spontaneamente.

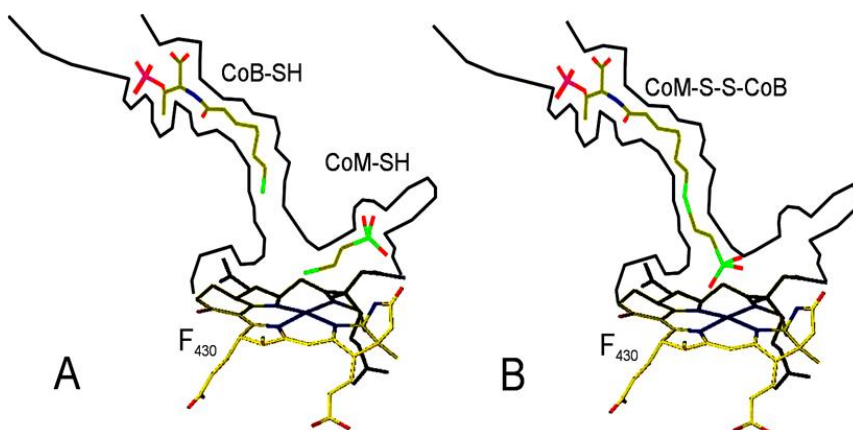
Si è molto discusso sul perché la Natura/evoluzione abbia selezionato il nichel come cofattore per l'ureasi al posto del più comune e meno tossico ione Zn(II) , d^{10} a guscio chiuso, che si trova comunemente in molti enzimi idrolitici (vedi dopo). Lo Zn(II) ha una grande densità di carica positiva, che lo rende adatto a comportarsi come un acido di Lewis polarizzando i substrati e

preparandoli a subire attacco nucleofilo da parte dell'idrossido, e inoltre non pone problemi di variazioni – potenzialmente dannose – di stato di ossidazione. Tuttavia, queste proprietà sono applicabili anche al Ni(II) – con questi leganti – che, in più, presenta una configurazione elettronica d^8 di guscio aperto che può indurre restrizioni stereo-elettroniche dovute alla LFSE non disponibili per lo zinco (maggiore direzionalità nei legami). Questa proprietà potrebbe essere sfruttata dal Ni(II) per posizionare i due substrati, urea ed acqua, in una topologia spaziale ottimale necessaria per la catalisi. Inoltre, il Ni(II) ha una affinità maggiore dello Zn(II) per i leganti azotati, stabilizzando meglio la coordinazione del gruppo NH_2 dell'urea. Infine, il Ni(II) – che preferisce una coordinazione ottaedrica – possiede più siti di coordinazione disponibili rispetto allo Zn(II), solitamente tetraedrico, facilitando in questo modo la coordinazione a ponte dell'urea e stabilizzando la coordinazione degli ioni metallici alla proteina tramite più siti di legame.

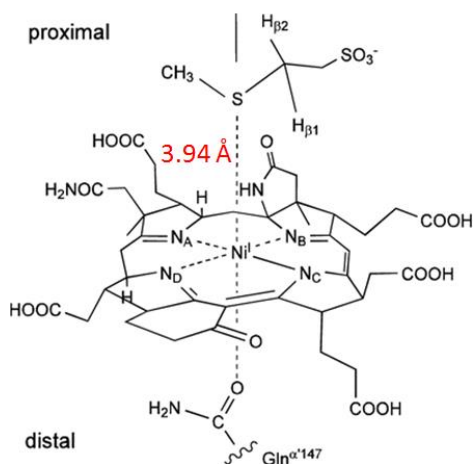
L'enzima redox che trattiamo è la **metil-coenzima M riduttasi (MCR)**. Questo enzima, che catalizza la formazione di metano negli archeo-batteri, fu scoperto negli anni 1970 in un archeo metanogenico che cresce utilizzando H_2 e CO_2 come uniche fonti di energia e di carbonio. La forma attiva contiene **Ni(I) nel coenzima F-430** (scoperto nel 1980): il gruppo prostetico tetrapirrolico catalizza la riduzione reversibile del metil-coenzima M ($CH_3-S-CoM$) con il coenzima B ($HS-CoB$) a CH_4 e $CoM-S-S-CoB$. L'enzima è anche coinvolto nella ossidazione anaerobica del metano nella reazione inversa alla metanogenesi.



Tutto il **metano biologico**, si stima un miliardo di tonnellate all'anno, viene prodotto da questi *archei* metanogenici. L'enzima è un esamero del tipo $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ e il sito attivo è nella unità α . Il coenzima F430 è un tetrapirrolo (monoanionico) che contiene **solo 5 doppi legami** ed è quindi il macrociclo tetrapirrolico più ridotto presente in Natura. Essendo poco coniugato, il cofattore F430 permette di coordinare il nichel con geometria più flessibile. Il coenzima è legato in modo non-covalente al fondo di un canale idrofobico dell'enzima, lungo ca. 50 Å (figura), che impedisce al solvente di accedere al sito attivo e consente invece la coordinazione del substrato. Il **Ni(I), d^9** , oltre



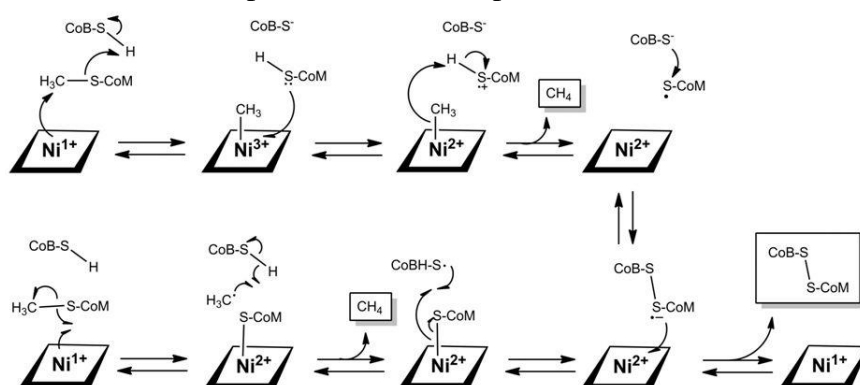
ai quattro azoti pirrolici, è legato assialmente (sito distale) al carbonile della catena laterale di una **glutammina**, un amminoacido non molto usuale che è la versione amidica dell'acido glutammico. Il coenzima M raggiunge F430 attraverso questo canale, con l'atomo di zolfo vicino al Ni nel sito prossimale (figura). Non è



ancora chiaro come il metano prodotto “esca” dall’enzima, non è stato individuato un cammino.

Sono stati proposti due meccanismi catalitici per l’enzima. Il primo, detto S_N2 prevede un attacco nucleofilo del Ni(I) di F430 sul gruppo metilico del metil-coenzima M, in una reazione appunto di tipo S_N2 (parte alta della figura), con formazione di una specie metile-Ni³⁺F430 e dell’anione tiolato CoM-S⁻, il quale sarà poi ragionevolmente protonato da CoB-SH. Trasferimento di un elettrone da CoM-SH al Ni(III) produce la specie intermedia metile-Ni²⁺F430, che dovrebbe riuscire a subire protonolisi, producendo metano, il cofattore Ni²⁺F430 e il radicale CoM-S[•]. Quest’ultimo si lega all’anione CoB-S⁻ generando il disolfuro radical-anione, il quale infine trasferisce un elettrone al cofattore ossidato

dando il disolfuro e rigenerando lo stato iniziale Ni¹⁺F430. Tuttavia, la formazione del proposto intermedio metile-Ni(III) non è mai stata osservata, diminuendo la credibilità di questo meccanismo. Un secondo meccanismo spesso citato (in basso nella figura), basato soprattutto su studi computazionali, propone che il cofattore Ni¹⁺F430 catalizzi la rottura omolitica del legame C-S del metil-CoM, generando un radicale CH₃ e il tiolato legato al Ni²⁺. Il radicale metile estrarrebbe un atomo di idrogeno da CoB-SH, formando il metano e il radicale tiile CoB-S[•]. Una ricombinazione genera lo stesso disolfuro radical-anione e la specie Ni²⁺F430 del meccanismo precedente, che verrebbe poi ridotta come sopra.



La domanda chiave alla base di questi meccanismi è come il poco-reattivo legame CH₃-S nel metil-coenzima M possa venire scisso in condizioni anaerobiche. La risposta sta probabilmente nel potenziale redox della coppia Ni(II)F-430/Ni(I)F-430, che è molto negativo, meno di -600 mV, e nella natura radicalica del Ni(I)F-430, d⁹, che è un **forte nucleofilo** (analogo al Co(I) che vedremo più avanti). Il potenziale redox così negativo rende questo uno degli enzimi noti più sensibili alla presenza di O₂.