

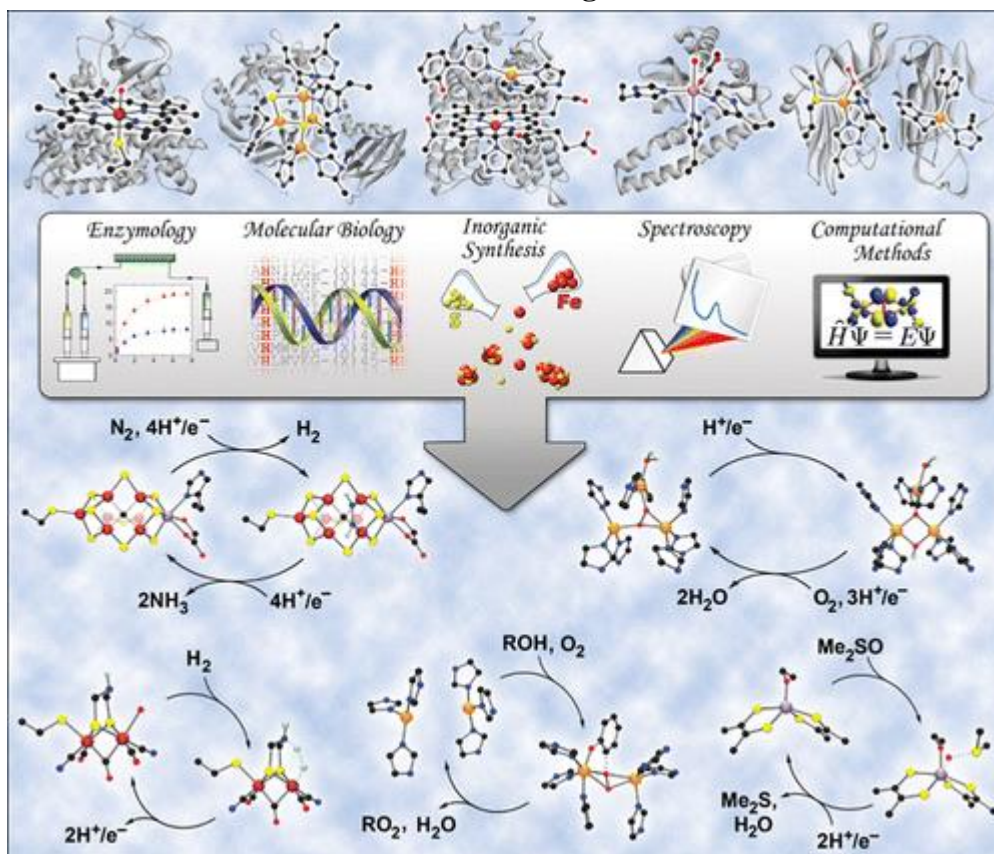
**LM in Chimica**

**Lezioni di  
Chimica  
Bioinorganica**

**Anno Accademico 2023–2024**

**Prof. Enzo Alessio**

## Chimica Bio-inorganica



### Il contenuto di elementi negli organismi viventi

Sono note circa 2 milioni di specie di organismi viventi (si calcola però che le specie realmente esistenti siano circa 10 milioni). Analisi compiute su un vasto numero di specie hanno permesso di stabilire il numero e l'identità degli elementi chimici presenti negli organismi viventi e riconoscere quelli che sono essenziali (figura).

**Undici elementi** chimici (quelli viola con la cornice rossa nella figura della tabella periodica) sono circa costanti (percentualmente) e nettamente predominanti in tutti i sistemi biologici; nel corpo umano essi costituiscono il 99.9% del totale degli atomi, ma il 99% del totale è raggiunto con solo quattro di essi: **C, H, O, N**. Gli altri 7 degli 11 elementi, che rappresentano quindi circa lo 0.9% del totale, sono: **Na, K, Ca, Mg, P, S, Cl**. Il fosforo gioca un ruolo molto importante, oltre che nella struttura di DNA e RNA, nell'adenosina trifosfato (ATP) che è implicata negli scambi energetici delle cellule tramite la formazione o rottura del legame P–O. I non-metalli (P, S e Cl) forniscono anche anioni come  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ; ossa e denti sono formati da fosfato di calcio.

Oltre a questi 11 elementi, che sono assolutamente essenziali, ce n'è un'altra decina tra metalli e non-metalli (8 per gli umani, **Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Se e I**), che sono richiesti dalla maggior parte dei sistemi biologici, ma non necessariamente da tutti. Ce ne sono poi circa altrettanti, alcuni dei quali sono generalmente richiesti da piante e animali, altri solo da piante o solo da animali, e altri ancora soltanto da alcune specie. Essi sono: **Ni, V, Cr, F, B, Si, W(?), As(?), Br(?), Sn(?)**. Di alcuni non si sa ancora se siano effettivamente essenziali o meno, anche per gli uomini (vedi dopo).

Per quanto riguarda in maniera specifica i **metalli**, al momento sono **12/13 gli elementi metallici che sono essenziali** per piante e/o animali. Quattro di essi, i metalli del blocco s **Na, K, Mg e Ca** sono presenti in grosse quantità e sono noti come *bulk metals*. I restanti nove che sono presenti in quantità più piccole sono elementi del blocco d: **V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn** e sono noti come *trace metals*.

Legend:

- Essential for humans (Purple)
- Suggested to be essential for humans (Green)
- Nonessential for humans (Grey)

Elements highlighted in red boxes: H, Na, Mg, K, Ca, C, N, O, P, S, Cl.

## Metalli nei sistemi biologici

I *bulk metals* formano l'1 – 2% in peso del corpo umano; un adulto di 75 kg ha circa 170 g di K, 100 g di Na, 1100 g di Ca e 25 g di Mg.

Metallo	g/75 kg
Na	70 – 120
K	160 – 200
Ca	1100
Mg	25
V	$15 \times 10^{-3}$
Cr	$2 \times 10^{-3}$
Mn	$1 \times 10^{-2}$
Fe	4 – 5
Co	$1.2 \times 10^{-3}$
Cu	$80 - 120 \times 10^{-3}$
Zn	2 – 3
Mo	$10 \times 10^{-3}$
Ni	?

I *trace metals* rappresentano meno dello 0.01% in peso nel corpo umano e necessitiamo di soli 4 – 5 g persino di quello più abbondante, il ferro. Essi possono essere divisi in due sottogruppi: Fe, Cu, Zn formano un sottogruppo, mentre gli altri sei vengono definiti *ultra-trace metals*.

Ferro, rame e zinco, i tre più abbondanti, sono metalli essenziali per tutte le specie, seppure il livello richiesto per questi elementi può variare da specie a specie.

Solo per cinque dei cosiddetti *ultra-trace metals* (Mn, Mo, Co, Ni e V) è stato individuato un ruolo in metallo-enzimi. Per l'ultimo, il Cr, da molti anni si parla di un suo ruolo nel metabolismo del glucosio nei mammiferi, ma non esiste alcuna prova definitiva della sua essenzialità.

La tabella sotto (da altra fonte) riporta le quantità dei vari *trace elements* espresse in mg/70 kg di peso corporeo e per ognuno riassume il ruolo biologico (presunto nel caso del cromo).

Metal	Mass / mg	Biological roles
V	0.11	Enzymes (nitrogenases, haloperoxidases)
Cr	14	Claimed (not yet proven) to be essential in glucose metabolism in higher mammals
Mn	12	Enzymes (phosphatase, mitochondrial superoxide dismutase, glycosyl transferase); photoredox activity in Photosystem II (see <a href="#">equation 22.54</a> and discussion)
Fe	4200	Electron-transfer systems (Fe-S proteins, cytochromes); O <sub>2</sub> storage and transport (haemoglobin, myoglobin, haemerythrin); Fe storage (ferritin, transferritin); Fe transport proteins (siderophores); in enzymes (e.g. nitrogenases, hydrogenases, oxidases, reductases)
Co	3	Vitamin B <sub>12</sub> coenzyme
Ni	15	Enzymes (urease, some hydrogenases)
Cu	72	Electron transfer systems (blue copper proteins); O <sub>2</sub> storage and transport (haemocyanin); Cu transport proteins (ceruloplasmin)
Zn	2300	Acts as a Lewis acid (e.g. in hydrolysis processes involving carboxypeptidase, carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase); structural roles
Mo	5	Enzymes (nitrogenases, reductases, hydroxylases)

Sebbene ferro, rame e zinco vengano comunemente definiti come *trace metals*, dal punto di vista della cellula questa definizione non è corretta. Studi condotti su *Escherichia coli* (un batterio) hanno per esempio dimostrato che il singolo batterio riesce a concentrare al suo interno Zn e Fe di parecchi ordini di grandezza rispetto alla loro concentrazione in un tipico terreno di coltura, finché raggiungono un livello di **circa  $2 \times 10^5$  atomi per cellula**, che è equivalente ad una concentrazione totale di circa **0.1 mM**. Metalli come Cu e Mn sono mantenuti in un intervallo di concentrazione fra 10 e 100  $\mu$ M. Anche altri metalli essenziali sono concentrati da *E. coli* fino a raggiungere uno stretto e ben preciso intervallo di concentrazione totale.

Chiaramente quindi molti metalli di transizione sono piuttosto abbondanti all'interno delle cellule.

Recenti misure quantitative hanno stabilito che la concentrazione cellulare media dei tre principali biometalli, cioè ferro, rame e zinco, sono pressoché costanti nei diversi tipi di **cellule eucariote** e non molto dissimili da quella nei batteri (vedi sopra):

$$[\text{Fe}]_{\text{totale}} = 0.5 \text{ mM}$$

$$[\text{Zn}]_{\text{totale}} = 0.5 \text{ mM}$$

$$[\text{Cu}]_{\text{totale}} = 50 \text{ }\mu\text{M}$$

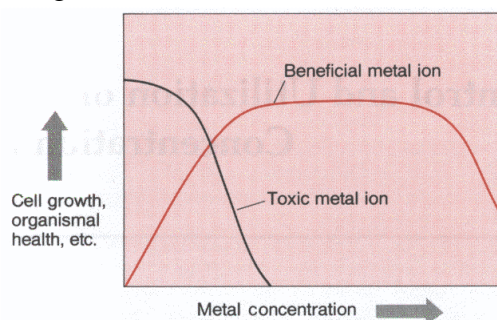
Cioè le concentrazioni di ferro e zinco sono pressoché uguali e circa 10 volte superiori a quella del rame. Vi sono poi cellule specializzate che accumulano alcuni metalli essenziali. Ad esempio i globuli rossi hanno una concentrazione di ferro che è circa 9 volte quella media (perché ricche di emoglobina, contenente ferro, per il trasporto dell'ossigeno).

Da sottolineare che ferro e zinco sono abbondanti nelle cellule indipendentemente dalla quantità di metallo presente nel mezzo di coltura cellulare, cioè **le cellule sono in grado di accumulare gli ioni metallici essenziali**.

In anni recenti è stato introdotto il concetto che ogni specie presenta, oltre ad uno specifico **genoma** (insieme dei geni) e **proteoma** (insieme delle specifiche proteine di quella specie) anche uno specifico **metalloma**, definito come l'insieme dei metalli contenuti in ciascun tipo di cellula di quella specie, ognuno con la sua specifica quantità, speciazione e localizzazione all'interno di ogni cellula.

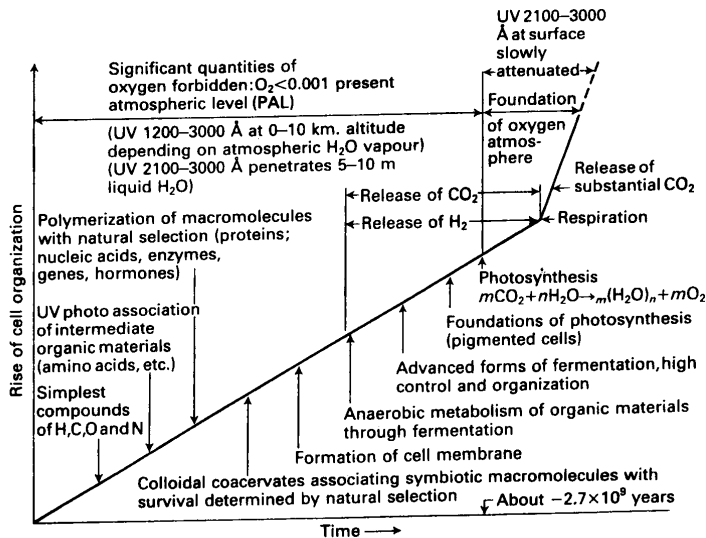
L'uptake di un certo elemento da parte di un sistema biologico non significa necessariamente che tale elemento sia essenziale, così come la sua determinazione analitica in tracce: sono possibili contaminazioni (e.g. da aria, acqua, contenitori) e elementi diversi possono competere per gli stessi siti chimici. Inoltre è noto che certe specie accumulano elementi senza apparente motivo. Quindi l'accumulo di un elemento non costituisce una prova che vi sia necessità fisiologica di tale elemento. Per esempio vi sono organismi marini che sono noti avere alti contenuti di Ti, V, Cr, Ni, Th e infatti i molluschi sono comunemente utilizzati come bio-indicatori per stabilire la purezza delle acque in cui crescono.

Si definisce quindi **essenziale** un elemento sistematicamente presente in una certa specie biologica e tale che la sua assenza (o carenza) nelle fonti nutritive di quella specie sia causa di malattie, disturbi metabolici o dello sviluppo. L'effetto di un elemento essenziale sulla crescita di un organismo ha un tipico andamento a campana in funzione della concentrazione, con sofferenze dovute sia a carenza che a eccesso (curva dose-risposta, figura).



Una prima conclusione a cui si può arrivare esaminando l'elenco degli elementi essenziali è che la "chimica della vita" è essenzialmente la chimica degli elementi più leggeri, metalli e non-metalli con numero atomico minore di 36. Degli elementi richiesti solo Mo, I e W hanno numero atomico più elevato e, in genere, non sembra che essi siano necessari a *tutte* le specie viventi. D'altra parte gli elementi richiesti vengono da tutti i gruppi della tavola periodica, e questo significa che praticamente tutte le proprietà chimiche sono associate ai processi della vita nei limiti imposti dall'ambiente (solvente acquoso, pH, temperatura,...).

In genere, un elemento che debba essere utilizzato da un sistema biologico deve avere un suo ruolo utile, ma – se possibile – deve anche essere abbondante nell’ambiente esterno ed essere **bio-disponibile**, cioè facilmente ottenibile/estraibile dall’ambiente. Si può vedere che gli elementi essenziali per la vita sono anche i più abbondanti nell’universo e sulla terra. La disponibilità di un elemento in soluzione acquosa dipende, oltre che dall’abbondanza, anche dalla **speciazione** (cioè



sotto che forma si trova) e dalla solubilità dei suoi composti.

In genere si può dire che la Natura abbia selezionato, fra gli elementi che possono svolgere una certa funzione, quelli che richiedono meno dispendio di energia per il loro *uptake*, in base alla loro abbondanza e bio-disponibilità. Bisogna però anche tenere conto che nel corso della storia della Terra le condizioni ambientali, a causa principalmente della vita stessa, sono notevolmente cambiate (figura), basti pensare allo sviluppo di  $O_2$  che ha trasformato l’atmosfera inizialmente riducente in ossidante (il cosiddetto **Great Oxidation Event**, o anche **catastrofe**

**dell’ossigeno**, che in “soli” 200 milioni di anni ha visto un aumento della concentrazione di  $O_2$  di 10mila volte, causando l’estinzione di massa dei batteri anaerobi).

A pH 7 i potenziali redox accessibili in acqua sono compresi nell’intervallo fra  $-0.4$  e  $+0.8$  V rispetto all’elettrodo standard a idrogeno, cioè nell’intervallo delle coppie redox  $H^+/H_2$  e  $O_2/OH^-$  (vedi diagramma di Pourbaix). Quindi un metallo di transizione ha a disposizione un numero limitato di stati di ossidazione, ma i non-metalli possono averne parecchi; ad esempio S può esistere da  $-2$  a  $+6$ , C da  $-4$  a  $+4$ , N da  $-3$  a  $+5$ .

Come conseguenza ci sono metalli che hanno un unico stato di ossidazione stabile (metalli alcalini, alcalino-terrosi, Zn e Cd) e diversi non-metalli (B, Si, P) che compaiono solo nei loro stati di ossidazione più alti ( $+3$ ,  $+4$ ,  $+5$ ), rispettivamente come borati, silicati e fosfati. Ne deriva ancora che solo pochi non-metalli possono essere usati come “interruttori” redox reversibili, in particolare H e C, che possono andare rispettivamente da  $+1$  a  $-1$  e da  $+4$  a  $-4$ , seguiti da S e Se.

I bio-elementi sono disponibili o dall’atmosfera, nel caso di C ( $CO_2$ ), O ( $O_2$ ), N ( $N_2$ ) e H ( $H_2O$ ), o da soluzioni acquose nelle quali sono probabilmente presenti come specie relativamente semplici.

Sono sostanzialmente le reazioni idrolitiche degli elementi con l’acqua in presenza di  $O_2$  che hanno determinato la odierna disponibilità (o meno) degli elementi. Così il ferro è presente solo in tracce in acqua perché vi si trova come  $Fe^{3+}$ , che precipita come  $Fe(OH)_3$  insolubile (e non può esistere come catione solubile  $Fe^{2+}$ , o come anione ferrato,  $FeO_4^{2-}$ ).

Anche se queste considerazioni possono mettere dei limiti allo sviluppo della vita, si è visto che la Natura ha trovato modo di estrarre certi elementi, quando necessario.

Elemento	Biodisponibilità	
	Ambiente riducente	Ambiente ossidante
Fe	$Fe(II)$ , (alta)	$Fe(III)$ , (bassa)
Cu	Come solfuro (bassa)	$Cu(II)$ , (moderata)
S	$HS^-$ (alta)	$SO_4^{2-}$ (alta)
Mo	$MoS_2$ , $(MoO_nS_{4-n})^{2-}$ (bassa)	$MoO_4^{2-}$ (moderata)
V	$V^{3+}$ , solfuri di V(IV) (moderata)	$VO_4^{3-}$ (moderata)

Questi equilibri idrolitici non sono validi per le condizioni esistenti al tempo dello sviluppo della vita, che erano condizioni sostanzialmente anaerobiche. Si può vedere come il **passaggio da condizioni anaerobiche ad**



**aerobiche** (attuali) abbia sostanzialmente **mutato la biodisponibilità** di alcuni elementi; nella tabella sono riportate la forma e la disponibilità degli elementi in condizioni anaerobiche ed aerobiche.

Le condizioni dell'ambiente primordiale, sia atmosfera che acqua, erano probabilmente limitate dall'intervallo di potenziale delle coppie redox  $S_n/H_2S$  e  $H^+/H_2$  (piuttosto che da  $H_2$  e  $O_2$ ), che va da  $-0.4$  V a 0 a pH 7; questo permette l'esistenza di composti organici da  $CO_2$  a  $CH_4$ . In questa atmosfera l'azoto, quando disponibile, sarebbe stato ridotto a  $NH_3$  o  $HCN$ . Ma queste condizioni devono avere avuto un effetto molto notevole sulla disponibilità di altri elementi, specialmente metallici. Infatti, per gli elementi dei primi due periodi, fino a Cl, e quelli dei primi quattro gruppi, la chimica dei solfuri ha scarsa importanza, ma le cose cambiano drasticamente per i metalli di transizione o gli elementi dai gruppi da 12 a 16, che danno solfuri notevolmente stabili anche a concentrazioni di  $H_2S$  in acqua piuttosto basse ( $10^{-3}$  M). Ai primordi il ferro deve essere stato il metallo più abbondante e il Fe(II)-solfuro è abbastanza solubile a pH 7, per cui la biologia primordiale è dominata dalla chimica dei cluster Fe/S (che vedremo). Fato opposto ha subito il rame, che doveva essere poco disponibile ai primordi come Cu(I) ( $Cu_2S$  è molto poco solubile) mentre è diventato più disponibile come Cu(II) nell'atmosfera ossidante.

Da notare che il Mn ha più affinità per l'ossigeno che per lo zolfo e questo ha permesso la produzione fotochimica di  $O_2$  su centri di manganese (vedi capitolo fotosintesi), che non è impedita da reazioni con solfuri (cioè ha potuto svilupparsi anche in un ambiente ricco di solfuri).

### Funzioni biologiche degli elementi inorganici

I grandi sforzi fatti dagli organismi per procurarsi, accumulare, trasportare elementi inorganici sono giustificati dalla loro importante funzione, che altrimenti non sarebbe garantita. Gli ioni metallici nei sistemi biologici possono avere sostanzialmente due ruoli, **strutturale** o **funzionale**. Nel primo, lo ione metallico serve a stabilizzare delle strutture, soprattutto proteiche, mentre nel secondo il metallo è coinvolto nella reattività di un bio-sito (essenzialmente nei metallo-enzimi). Da notare che circa 1/3 di tutte le proteine note possiede cofattori contenenti ioni metallici e la gran maggioranza di queste funzionano come metallo-enzimi essenziali.

Segue una lista più dettagliata di funzioni per le quali i metalli sono particolarmente adatti:

- 1) **Funzione strutturale.** Ioni metallici vengono utilizzati nella costruzione di strutture rigide nella forma di endo- o eso-scheletri, tramite il processo di bio-mineralizzazione. Ma, ad esempio, anche il DNA, un polianione, ha una struttura che si mantiene solo in presenza di cationi mono- e di-valenti che riducono sostanzialmente la repulsione elettrostatica tra i fosfati. Funzioni strutturali sono svolte essenzialmente da Ca e Mg come dicationi e da P, O, C, S, Si, F come parti di anioni.
- 2) **Trasportatori di carica** per trasferimento di informazioni molto rapido. Questo ruolo viene svolto superbamente da semplici ioni monoatomici. Gli impulsi elettrici nei nervi o altri meccanismi più complessi, come il controllo della contrazione muscolare, vengono prodotti nel modo più rapido possibile (velocità di diffusione) da flussi di cationi monoatomici di diversa carica e dimensioni,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , sotto controllo di gradienti.
- 3) **Produzione, metabolismo e degradazione di composti organici.** Dal momento che il pH fisiologico è sostanzialmente 7, l'aumento della velocità di queste reazioni, normalmente piuttosto lente, non può essere ottenuto tramite semplice catalisi acida o basica, ma richiede come catalizzatori **acidi di Lewis** che coinvolgono ioni metallici. Molti enzimi idrolitici contengono gli ioni relativamente piccoli  $Zn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (ma ne vedremo anche altri).
- 4) **Trasferimento di elettroni.** Questo processo, che è fondamentale per la conversione di energia negli organismi, è principalmente (anche se non esclusivamente) condotto da centri metallici redox-attivi. Da notare che leganti biologici riescono a stabilizzare stati di ossidazione che paiono piuttosto anomali in condizioni fisiologiche (in grassetto): **Fe(II)/Fe(III)/Fe(IV)**; **Cu(I)/Cu(II)**; **Mn(II)/Mn(III)/Mn(IV)**; **Mo(IV)/Mo(V)/Mo(VI)**; **Co(I)/Co(II)/Co(III)**; **Ni(I)/Ni(II)/Ni(III)**.

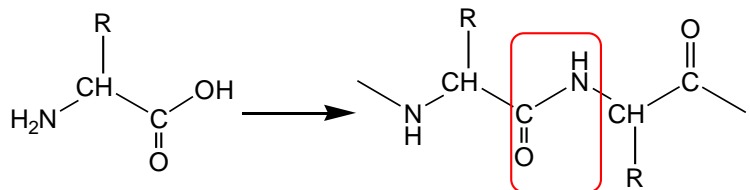
- 5) **Attivazione di piccole molecole altamente simmetriche.** Queste molecole hanno elevate energie di legame e la loro attivazione è particolarmente impegnativa per i catalizzatori. La capacità dei metalli di transizione di fornire elettroni spaiati e di accettare e donare allo stesso tempo carica elettronica consente agli organismi di condurre in condizioni fisiologiche reazioni energeticamente e meccanicisticamente difficoltose come: a) uptake reversibile, trasporto, immagazzinamento e conversione (Fe, Cu) e anche generazione (Mn) del diossigeno paramagnetico; b) la fissazione dell'azoto molecolare  $N_2$  e la sua conversione ad ammoniaca (Fe, Mo, V); c) la riduzione di  $CO_2$  con  $H_2$  per dare metano (Ni, Fe).
- 6) **Reattività organometallica.** Il coenzima cobalamina, che contiene un legame Co–Me, presenta una tipica reattività organometallica, tipo alchilazione riduttiva o la facile produzione di radicali per il rapido riarrangiamento dei substrati.

### Leganti biologici per ioni metallici

In generale i *bulk metals* (metalli del blocco s) sono circondati da donatori *hard*, come  $-O-$  e  $-O^-$ ; gli ioni alcalini sono relativamente mobili e formano complessi molto deboli, mentre i metalli alcalino-terrosi, che usano gli stessi donatori ma formano complessi più forti, sono da semi-mobili a statici. Gli ioni dei metalli di transizione generalmente formano complessi forti e sono quindi di natura relativamente statica.

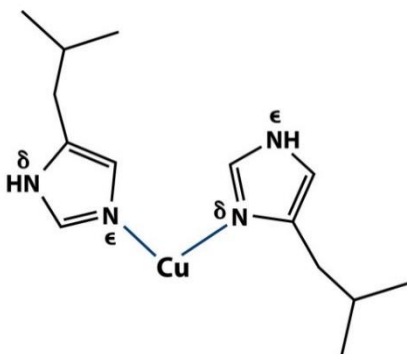
Vediamo quali composti organico-biologici possono venire utilizzati come leganti naturali per ioni metallici, in aggiunta ai fosfati, al carbonato, al cloruro, al solfuro  $S^{2-}$ , e all' $H_2O$  (compresi  $OH^-$  e  $O^{2-}$ ). Verranno esaminate brevemente tre classi principali di bio-leganti: peptidi, nucleobasi e macrocicli.

**Coordinazione con proteine.** Le proteine, e quindi gli enzimi (gli enzimi sono proteine con funzioni catalitiche), sono polimeri fatti di L-amminoacidi connessi tramite legami peptidici  $-CO-NH-$ . Questo gruppo amidico ha funzioni leganti piuttosto scarse; però i gruppi funzionali R nelle catene laterali dei seguenti amminoacidi sono particolarmente adatti alla coordinazione dei metalli:



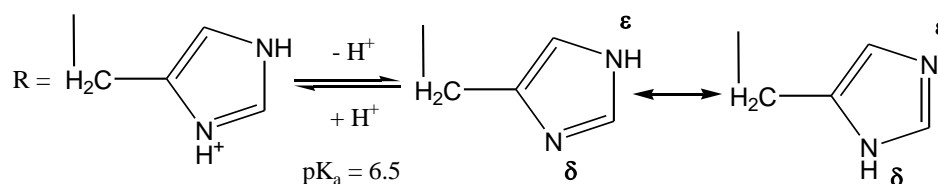
### Istidina (His):

porta un imidazolo in catena laterale e può coordinare essenzialmente tramite l'azoto  $\delta$  (e, a volte, tramite l'azoto  $\epsilon$  nell'altro tautomero, vedi in figura il caso della coordinazione al Cu).



Dato il  $pK_a$  dell'imidazolo (6.5), a pH fisiologico l'istidina esiste come una miscela di equilibrio contenente quantità pressoché equivalenti di imidazolo e imidazolio (imidazolo protonato). La deprotonazione dell'imidazolo per dare l'imidazolato ha un  $pK_a$  elevato, 14, e quindi non è teoricamente accessibile a pH fisiologico. Tuttavia essa può venire indotta da metalli, in particolare quando l'imidazolato può mettersi a ponte fra 2 centri metallici. Bisogna inoltre tenere ben presente che la coordinazione

di uno ione metallico all'azoto  $\delta$  può alterare notevolmente il  $pK_a$  del gruppo  $NH \epsilon$ .



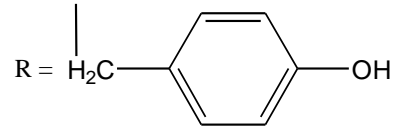
**Metionina (Met):**  $R = -CH_2CH_2SCH_3$

coordina gli ioni metallici via  $\sigma$  tramite l'atomo di zolfo neutro del tioetere.

**Cisteina (Cys, come cisteinato):**  $R = \text{CH}_2\text{SH}$

dopo deprotonazione ( $\text{pK}_a = 8.5$ ), contiene un centro tiolato negativo, che può anche fungere da ponte fra due (o più) centri metallici.

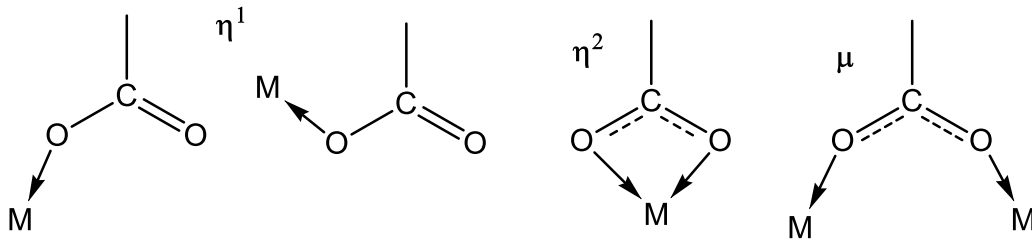
**Tirosina (Tyr, come tirosinato):**



la coordinazione al metallo avviene essenzialmente tramite l'ossigeno negativo del fenolato dopo deprotonazione a tirosinato ( $\text{pK}_a = 10$ ).

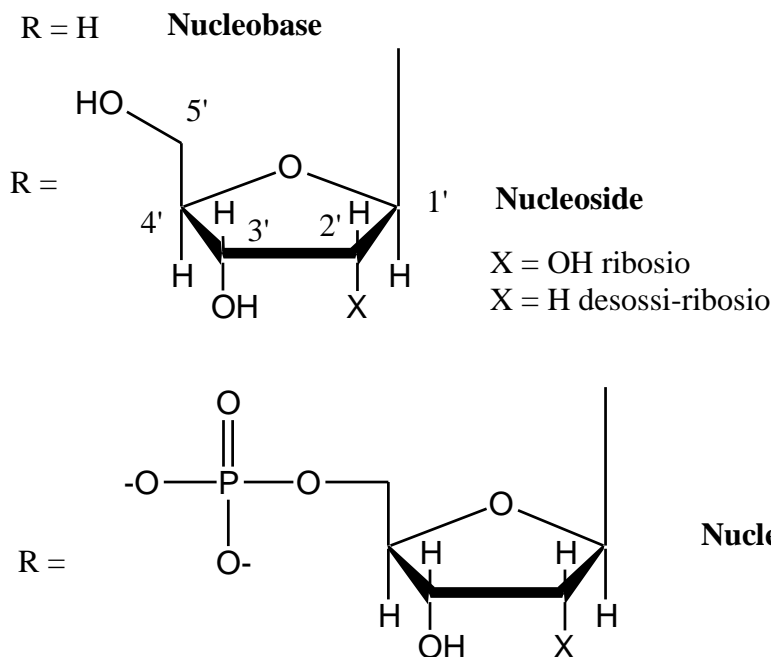
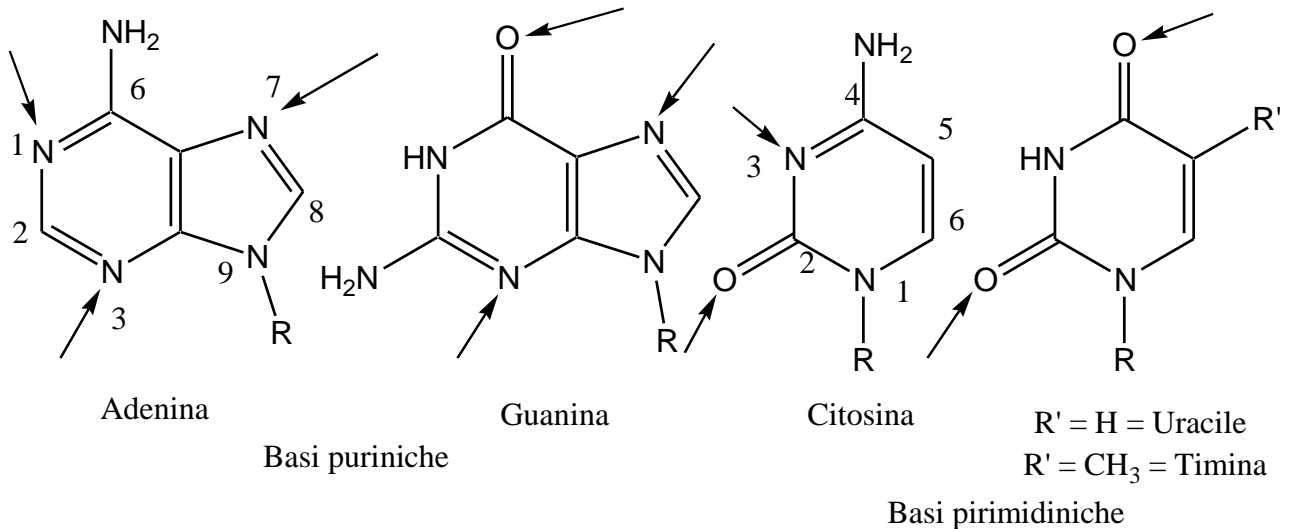
**Glutammato (Glu):**  $R = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$  e **Aspartato (Asp):**  $R = -\text{CH}_2\text{COO}^-$

Legano tramite il carbossilato carico negativamente (la funzione acidica ha un  $\text{pK}_a$  di circa 4.5). I carbossilati possono coordinarsi in modo terminale ( $\eta^1$ ), chelante ( $\eta^2$ ) o a ponte fra due ioni metallici ( $\mu$ ): La formazione del chelato ( $\eta^2$ ) riguarda principalmente cationi larghi, tipo  $\text{Ca}^{2+}$ .



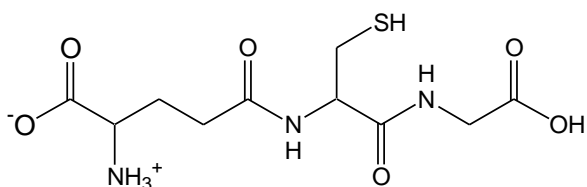
Anche gli oligo- e poli-nucleotidi possono fungere da leganti per ioni metallici. Le **nucleobasi costituenti il DNA** sono potenzialmente leganti politopici che, anche quando fanno parte di nucleosidi o nucleotidi, offrono diversi siti di coordinazione per ioni metallici indicati con frecce nella figura (funzioni imminiche, amminiche, amidiche, osso e idrosso).





Nel DNA, tuttavia, molti di questi siti basici non sono disponibili per la coordinazione a ioni metallici perché impegnati nei legami a idrogeno di tipo Watson-Crick che uniscono i due filamenti. Da notare poi che – come notato per gli aminoacidi – la coordinazione di una nucleobase a uno ione metallico induce notevoli variazioni nel pK<sub>a</sub> degli altri potenziali siti di legame presenti nella molecola. Quindi la reattività di basi azotate già metallate può essere anche notevolmente diversa rispetto a quella attesa in base ai pK<sub>a</sub> misurati in assenza di metalli.

Non bisogna pensare che solo macromolecole, come proteine e polinucleotidi (e.g. DNA) leghino ioni metallici. Vi sono nel citosol cellulare anche numerose molecole piccole ma piuttosto abbondanti che sono in grado di coordinare gli ioni metallici con buona affinità. In particolare le cellule presentano concentrazioni millimolari di nucleotidi, aminoacidi liberi e glutazione. Il **glutazione (GSH, figura)** è un tripeptide formato da **acido glutammico, cisteina e glicina**. Il glutazione è il più importante tiolo intracellulare, essendo presente nelle cellule in elevata concentrazione (0.5 – 10 mM), ed ha numerose funzioni, compresa la detossificazione di vari ioni metallici esogeni. Inoltre è un ottimo riducente mono-elettronico: due molecole di GSH si ossidano per dare GSSG che contiene un ponte disolfuro, perdendo ognuna un elettrone.



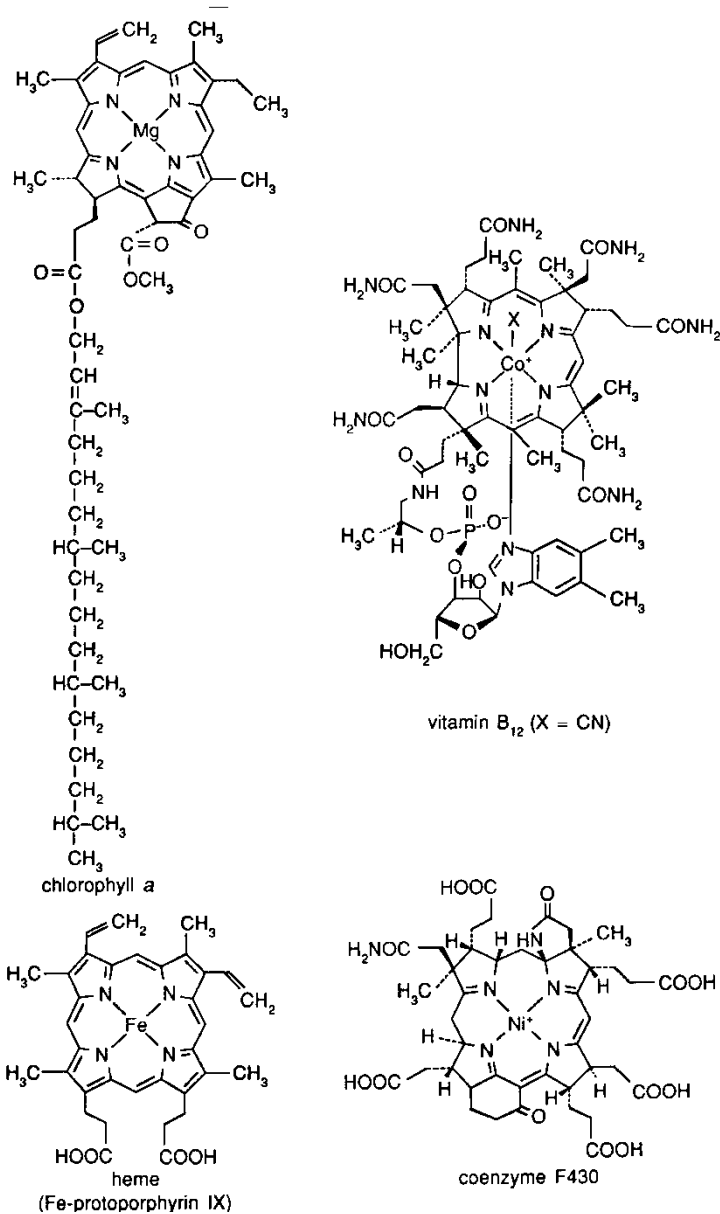
GSH

Con certi centri metallici, ad esempio  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , gli amminoacidi formano complessi termodinamicamente stabili, ma cineticamente labili, cioè l'energia di attivazione per dissociare il metallo è piccola e lo scambio è rapido. Tale situazione non è accettabile per il funzionamento efficiente di un metallo-enzima, per cui la Natura ha provveduto alla stabilizzazione cinetica di tali ioni metallici tramite speciali leganti macrociclici, i tetrapirroli.

I **tetrapirroli** (figura) sono leganti macrociclici tetradentati almeno parzialmente insaturi che, nella forma deprotonata, legano fortemente anche ioni divalenti sostanzialmente labili. I complessi risultanti sono fra i più comuni e meglio noti composti bio-inorganici. Le **clorofille**, delle porfirine parzialmente idrogenate e sostituite (con un anello a 5 termini), contengono lo ione  $Mg^{2+}$  (altrimenti molto labile). Il **gruppo eme**, che è formato da un centro Fe inserito in una porfirina sostituita, lo ritroveremo nella emoglobina, nella mioglobina, nei citocromi e nelle perossidasi. Nel 1980 poi è stato isolato un complesso porfirinoide di Ni, il coenzima F430, in archeobatteri metanogenici. Le **cobalamine**, i coenzimi della vitamina B<sub>12</sub>, contengono il Co in un anello corrinico parzialmente coniugato.

Vediamo quali sono le caratteristiche principali di questi bioleganti tetrapirrolici:

- il macrociclo, planare o quasi, è altamente stabile;
- dopo deprotonazione hanno una carica negativa singola (corrine, F430) oppure doppia (porfirine) e legano i cationi labili come leganti tetradentati; gli addotti sono molto stabili sia dal punto di vista termodinamico che cinetico (inerti).
- I macrocicli tetrapirrolici sono piuttosto rigidi a causa dell'estesa coniugazione e quindi sono piuttosto selettivi rispetto alle dimensioni degli ioni che possono coordinare; in genere un raggio ionico di 0.6 – 0.7 Å è considerato ottimale.
- Come conseguenza dell'estesa coniugazione  $\pi$ , i tetrapirroli ed i loro complessi metallici hanno bande di assorbimento intense nel visibile; inoltre i processi redox monoelettronici (acquisto o perdita di un elettrone) sono piuttosto facili (piccola differenza di energia tra HOMO e LUMO). I risultanti mono-anioni e mono-cationi radicali sono infatti relativamente stabili. Sia le proprietà fotochimiche che redox rendono i complessi dei macrocicli tetrapirrolici componenti essenziali nelle più importanti trasformazioni energetiche in biologia: la fotosintesi e la respirazione.
- I macrocicli tetrapirrolici sono chelanti tetradentati e l'arrangiamento intorno al centro metallico è planare o quasi; assumendo per il metallo un numero di coordinazione 6 ed una geometria approssimativamente ottaedrica, questa situazione lascia i due siti assiali disponibili. In un sito può ad esempio legare il substrato e l'altro può servire per regolare l'attività catalitica, ad esempio tramite l'effetto *trans*.



Per complessazione di monocationi estremamente labili i sistemi biologici utilizzano altri leganti macrocicli multidentati che spesso hanno struttura tridimensionale, gli ionofori (e.g. la valinomicina che trasporta selettivamente lo ione  $K^+$  attraverso la membrana dei mitocondri), che vedremo in dettaglio in seguito.

L'elevato numero di strutture ai raggi X di metallo-proteine ormai disponibili ha evidenziato come esista un ampio spettro di **intorni di coordinazione** (numero di coordinazione e geometria) per i metalli nei bio-siti. Al procedere nel primo periodo di transizione dal manganese allo zinco e al variare dei possibili stati di ossidazione di questi ioni, c'è una variazione degli atomi donatori preferiti secondo il principio *hard/soft*: i leganti di tipo *hard* stabilizzano gli ioni dei gruppi s e gli stati di ossidazione più elevati degli ioni di transizione, mentre i leganti *soft* stabilizzano gli stati di ossidazione più bassi (tabella):

Tipo	Cationi	Atomi donatori
<i>Hard</i>	H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Mn <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	Ossigeno in H <sub>2</sub> O, OH <sup>-</sup> , OR <sup>-</sup> , O <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , RCOO <sup>-</sup> (inclusi glu, asp, tyr, ser, thr), -C=O (peptide), F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , NH <sub>3</sub>
<i>Soft</i>	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Pt <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	CN <sup>-</sup> , CO, S <sup>2-</sup> , RSH e R <sub>2</sub> S (inclusi cys e met), I <sup>-</sup>
<i>Borderline</i>	Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	Qualsiasi donatore N, O ed S

Alcuni esempi di intorni di coordinazione di bio-siti, da studi strutturali di metallo-proteine ai raggi X, sono riportati in tabella.

metal oxidation state	bond stability	typical number and type of side chain ligands	typical coordination geometry
Zn(II)	high	3: His, Cys <sup>-</sup> , (Glu <sup>-</sup> )	severely distorted tetrahedron
Cu(I)	high	3,4: His, Cys <sup>-</sup> , Met	severely distorted tetrahedron
Cu(II)	high	3,4: His, (Cys <sup>-</sup> )	distorted square planar arrangement
Fe(II), Ni(II) Co(II), Mg(II)	low	4-6: His, Glu <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup>	distorted octahedron
Fe(III)	high	4-6: Glu <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup> , Tyr <sup>-</sup> , Cys <sup>-</sup>	distorted octahedron

Ci sono due aspetti di questi arrangiamenti che sono non comuni rispetto ai normali composti di coordinazione:

- 1) i centri metallici sono spesso **coordinativamente insaturi**, cioè rispetto ad un numero di coordinazione regolare manca spesso un residuo amminoacidico. Questo sito vacante è necessario alla catalisi per coordinare il substrato; nella maggior parte dei casi quel sito è occupato temporaneamente, nel “*resting state*” dell’enzima, da una molecola facilmente rimpiazzabile, come l’H<sub>2</sub>O. Quelle proteine che, come funzione, trasferiscono elettroni non necessitano di insaturazione coordinativa in quanto non devono coordinare il substrato direttamente al centro catalitico, tuttavia per loro vale il seguente punto 2:
- 2) per i numeri di coordinazione più comuni, 4 e 6, la geometria di coordinazione di molti centri metallici legati a proteine non è regolare e devia anche parecchio dagli ideali tetraedri o ottaedri. Anche se un po’ di **distorsione** deve essere attesa, dal momento che i leganti amminoacidici sono spesso tutti diversi tra loro e l’ambiente è altamente asimmetrico, queste distorsioni sono spesso così pronunciate che non possono essere casuali. Questo è stato razionalizzato da Vallee e Williams con la loro **teoria dello stato entatico** (dal greco, sotto tensione, *strained*) per gli enzimi catalitici (almeno il 30% degli enzimi sono metallo-enzimi).

Nella catalisi con metallo-enzimi si forma spesso, nello stato di transizione, un complesso ternario fra substrato, centro metallico dell’enzima ed un secondo reagente, spesso un coenzima o un gruppo acido o basico. La funzione catalitica del centro metallico è almeno duplice: attivare elettronicamente una o entrambe le specie reattive e posizionarle nello spazio, molto spesso in una specifica posizione relativa (questo produce una elevata concentrazione effettiva dei due reagenti in quella zona di spazio). Con questa visione classica dell’effetto catalitico, la differenza di energia fra stato iniziale e stato finale della reazione non è alterata.

Secondo la teoria dello stato entatico, la sorprendente efficienza degli enzimi catalitici si spiega tramite la “pre-formazione dello stato di transizione”, cioè il sito attivo dell’enzima già possiede in buona parte la geometria necessaria per raggiungere lo stato di transizione substrato/catalizzatore. In questo stato entatico dell’enzima (o *strained*, ad alta energia), buona parte dell’energia necessaria a

raggiungere lo stato di transizione è già stata spesa ed è immagazzinata e distribuita su molteplici legami nella zona del sito attivo dell'enzima.

Le piccole variazioni di geometria che devono avvenire tra lo stato iniziale e lo stato di transizione del complesso enzima/substrato comportano a questo punto solo una piccola energia di attivazione e quindi le cinetiche sono veloci. Il diagramma energia di attivazione/coordinata di reazione viene modificato in questo modo rispetto alla variazione classica indotta da un catalizzatore (Figura).

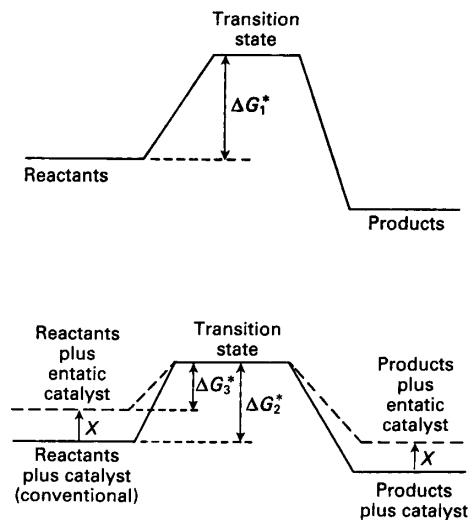
Per questo motivo quindi il sito attivo dei metallo-enzimi non dovrebbe contenere un metallo con un intorno coordinativo regolare (che corrisponde ad uno stato rilassato, a bassa energia), ma al contrario l'obiettivo principale dell'enzima è quello di destabilizzare lo stato iniziale. Da notare che l'**energizzazione** da parte dell'enzima (X in figura) riguarda sia substrato che prodotto, e può essere diversa per i due (al limite anche invertendo l'ordine di stabilità).

Un approccio largamente usato dai chimici bio-inorganici per simulare le principali caratteristiche spettroscopiche, strutturali e di reattività dei grossi sistemi bio-inorganici è quello di studiare **composti modello** di basso peso molecolare. Tali studi sono particolarmente utili quando, ad esempio, non siano noti dettagli strutturali di metallo-proteine.

Si possono distinguere tre tipi di modelli:

- *Corroboranti (corroborative, a supporto)*, quando la struttura del bio-sito è nota ed il modello viene costruito per studiare *in vitro* proprietà del sito e per determinare se le proprietà della metallo-proteina (e.g. proprietà spettroscopiche e le caratteristiche strutturali essenziali) sono determinate essenzialmente dalla prima sfera di coordinazione intorno al metallo.
- *Speculativi*: quando la struttura del bio-sito non sia nota ma viene prevista in base a una serie di studi spettroscopici; in questo caso il modello è usato per riprodurre queste proprietà spettroscopiche in modo da poter fare un paragone predittivo.
- *Funzionali*: che riproducono cioè il funzionamento vero e proprio del bio-sito. Questo è decisamente l'aspetto più difficile, e in pratica non è stato ancora raggiunto. La funzionalità può essere sia qualitativa che anche quantitativa. Già la riproduzione qualitativa della reattività dei sistemi naturali è stata raggiunta solo per pochi modelli; molto spesso i modelli possiedono una attività stechiometrica e non catalitica, verso il substrato naturale. L'ultimo stadio del *modeling*, cioè la simulazione più o meno quantitativa della reattività, sia rispetto alla velocità di reazione che alla specificità verso il substrato, sono quasi sempre impossibili da ottenere con sistemi a basso peso molecolare. L'elevata selettività (analogia chiave – lucchetto) e la elevata reattività (stato entatico) necessitano la struttura altamente complessa dei sistemi biochimici.

Non sempre i modelli speculativi si sono rivelati corretti (come vedremo dopo).



## Elementi dei gruppi s

I raggi ionici (ioni non solvatati, in Å) degli elementi biologicamente rilevanti di questi gruppi sono riportati in tabella:

Ione	Raggio (Å)	Ione	Raggio (Å)
Na <sup>+</sup>	1.02	Mg <sup>2+</sup>	0.72
K <sup>+</sup>	1.38	Ca <sup>2+</sup>	1.00

Sono ioni tipicamente *hard*, e prediligono donatori all'ossigeno, anche se Mg<sup>2+</sup> è coordinato all'azoto in alcune biomolecole molto importanti come la clorofilla. Gli ioni acquati Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> sono estremamente labili e scambiano l'acqua coordinata con altri leganti con cinetiche dell'ordine  $k \sim 10^8 \text{ s}^{-1}$ ; al contrario il Mg<sup>2+</sup> ha cinetiche decisamente più lente,  $k \sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ . Questi ioni sono diamagnetici (non hanno elettroni spaiati) e incolori, e quindi il loro monitoraggio è molto difficile. Tecniche utilizzate vantaggiosamente sono l'NMR per il <sup>23</sup>Na (spin nucleare  $I = 3/2$ , 100% abbondanza naturale) (tuttavia non bisogna dimenticare che l'NMR è una tecnica spettroscopica "lenta", con una scala dei tempi dell'ordine dei secondi, e dà quindi informazioni mediate) e la sostituzione con metalli più facilmente analizzabili (ad esempio Ca<sup>2+</sup> con Eu<sup>2+</sup>, che con gli orbitali f parzialmente riempiti può essere studiato sia tramite spettroscopia EPR che Mössbauer). Per la determinazione di rapide variazioni delle loro concentrazioni, importanti soprattutto per l'analisi dei segnali mediati dal Ca<sup>2+</sup>, si è rivelato molto importante l'uso di **sensori fluorescenti**, sia naturali che sintetici, che si legano specificamente al calcio (alterando in questo modo la propria fluorescenza). Questi composti permettono di compiere studi microscopici con una elevata risoluzione spaziale e temporale (le variazioni di fluorescenza avvengono entro millisecondi) in concentrazioni  $10^{-1} - 10^{-5} \text{ M}$  di Ca<sup>2+</sup>. Ad esempio, delle proteine luminescenti da meduse come l'**equorina** (che emette luce blu - UV) o la **Green Fluorescent Protein** (GFP, che emette luce verde) in presenza di ossigeno emettono luce in seguito alla coordinazione del Ca<sup>2+</sup>, agiscono selettivamente anche in presenza di forti quantità di Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e sono sensibili a piccole variazioni nella concentrazione del calcio.

I cationi del blocco s, insieme agli anioni Cl<sup>-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, costituiscono gli **elettroliti dei sistemi viventi**. Dal momento che possono esistere come ioni acquati a pH fisiologico (non tendono a precipitare, come farebbero gli ioni dei metalli di transizione), possono fungere da trasportatori di carica e creare **gradienti di carica** attraverso le membrane.

Con l'eccezione di Na<sup>+</sup>, questi ioni svolgono anche il ruolo di stabilizzatori di biomateriali (ad esempio Mg<sup>2+</sup> stabilizza il DNA), e promuovono cambiamenti conformazionali in molte proteine (soprattutto Ca<sup>2+</sup>). Magnesio e calcio servono anche per stabilizzare la membrana cellulare esterna.

## Trasporto di ioni

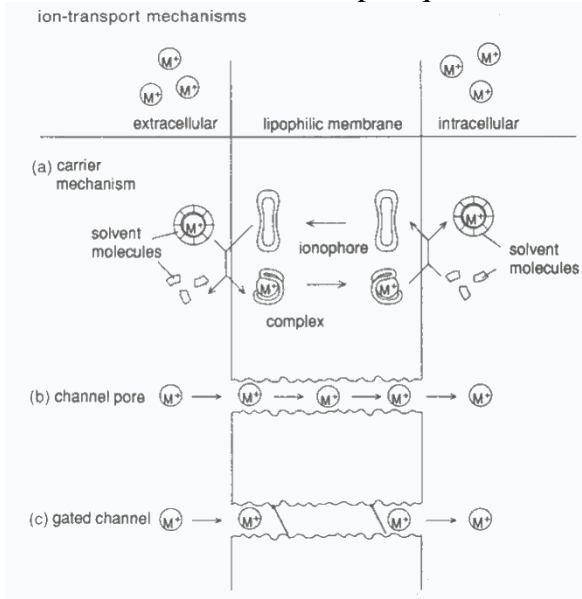
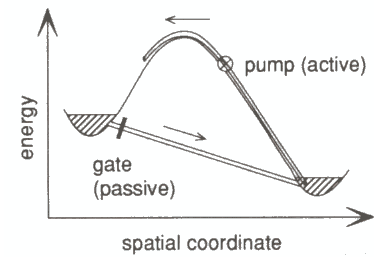
Gli ioni metallici devono spesso essere spostati fra diversi compartimenti di organismi multicellulari. Nel corpo, sia gli ioni alcalini che alcalino-terrosi possono venire trasportati nel siero come ioni acquati in quanto sono solubili a pH fisiologico. La diversa distribuzione dei cationi fra l'interno e l'esterno della cellula richiede che gli ioni metallici siano continuamente trasferiti attraverso la membrana fosfolipidica che racchiude la cellula per mantenere l'**omeostasi**. Il gradiente trans-membrana di gran lunga più grande è quello dello ione **calcio**, per il quale la concentrazione intracellulare può essere inferiore a quella extracellulare di un **fattore 10<sup>4</sup>**.

Ione	Intracellulare (mM)	Extracellulare (mM)
Na <sup>+</sup>	10	150
K <sup>+</sup>	100	5
Mg <sup>2+</sup>	2.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	0.1 <sup>a</sup>	2.5
Cl <sup>-</sup>	4	100

<sup>a</sup> Nel citoplasma della cellula a riposo la concentrazione di ione calcio è solo  $\sim 0.1 \mu\text{M}$ .



La mobilità di queste particelle cariche, che può avvenire in modo estremamente rapido tramite diffusione lungo gradienti di concentrazione creati appositamente, può venire utilizzata per il trasferimento di informazioni. Il principale requisito per utilizzare la diffusione di ioni come uno dei processi “chimici” più rapidi (il limite di velocità è ovviamente quello della diffusione) è il mantenimento costante di un gradiente di concentrazione, che richiede consumo di energia. Come nel tipico modello mostrato in figura, gli ioni devono venire pompati *attivamente* attraverso la membrana biologica finché non venga raggiunto uno stato stazionario di non-equilibrio; l’equilibratura di concentrazione controllata dalla diffusione può quindi avvenire *passivamente* tramite appositi *ion channels* regolati da *gate* controllati chimicamente o elettricamente.

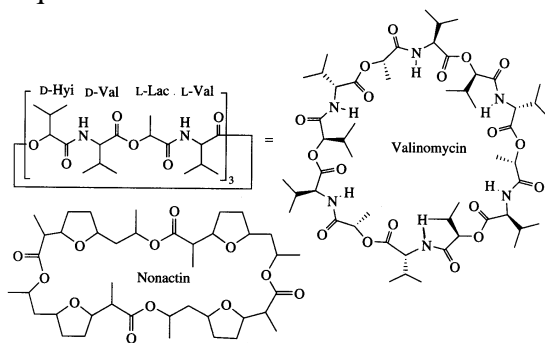


Il trasporto dei cationi idrofili  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso la regione centrale idrofobica della membrana non è ancora compreso in maniera soddisfacente e completa. Ci sono essenzialmente **tre meccanismi** per il trasporto trans-membrana di questi cationi (due sono mostrati in figura):

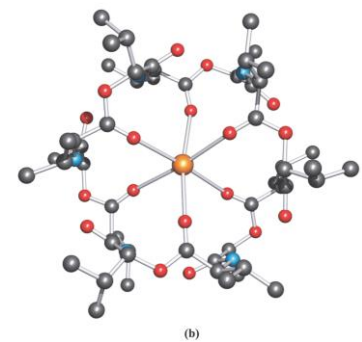
1) il catione deve venire incapsulato da un legante, detto ionoforo. Gli **ionofori** sono biomolecole che fungono da *carrier* per il trasporto di cationi attraverso le membrane biologiche (lipofile). Un *carrier* deve essere capace sia di legare selettivamente un certo catione che di schermarlo dalla regione lipofila della membrana, cioè deve avere un “interno” polare ed un “esterno” lipofilo.

Gli ionofori naturali meglio noti sono la *Valinomicina* e la *Nonactina* (figura).

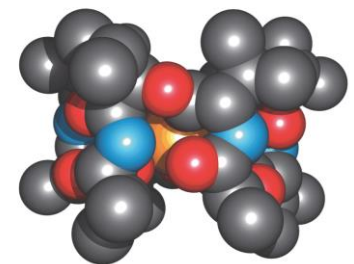
La *valinomicina*, che trasporta ioni  $\text{K}^+$  attraverso la membrana dei mitocondri senza alterare la concentrazione di  $\text{Na}^+$ , è un dodeca-peptide ciclico fatto dalla ripetizione per tre volte di una sequenza di quattro amminoacidi.



Sia la *valinomicina* che la *nonactina* sono in grado di ripiegarsi per creare un sistema di atomi di ossigeno carbonilici (*hard*) in un arrangiamento circa ottaedrico che è delle giuste dimensioni per ospitare  $\text{K}^+$  tramite



interazioni ione-dipolo. In figura è mostrata la struttura ai raggi X dell’addotto *valinomicina-K<sup>+</sup>* (sotto in formato *space-filling*). Questo ripiegamento è anche favorito dalla formazione di legami a idrogeno intra-molecolari. In questo modo i gruppi isopropile, lipofili, puntano verso l’esterno rendendo così il tutto lipofilo. Si osserva che  $\text{Rb}^+$  e  $\text{Cs}^+$  sono troppo grandi per la cavità, mentre  $\text{Na}^+$  è troppo piccolo e lo ionoforo non può contrarsi a sufficienza per coordinarlo stabilmente. La *valinomicina* è in grado di trasportare circa  $10^3 - 10^4$  ioni  $\text{K}^+$  al secondo attraverso la membrana mitocondriale, con una selettività  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  dell’ordine di  $10^4$ .



Sia la valinomicina che la nonactina (ottenute da funghi e organismi marini) sono potenti antibiotici a causa della loro capacità di alterare il bilancio ionico trans-membrana nei batteri.

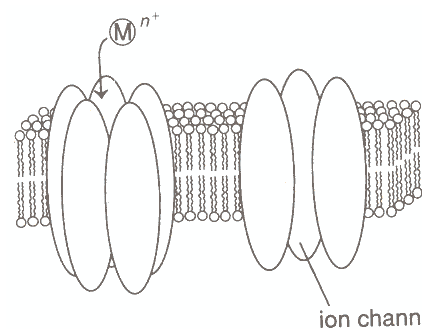
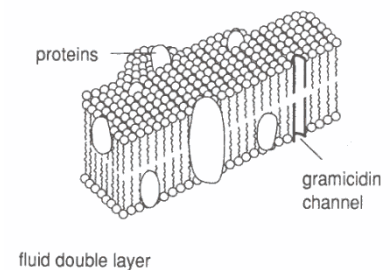
2) Il trasporto passivo di cationi attraverso una membrana mediato da *carrier* (ionofori) è un processo relativamente lento (vedi sopra), a causa dei necessari stadi di complessazione, migrazione e decomplessazione. Un meccanismo di diffusione controllata di cationi più efficiente e rapido (sempre secondo il gradiente), anche se di più complessa realizzazione, è quello che prevede l'integrazione di canali o tunnel (*ion channels*) di varia complessità all'interno del doppio strato fosfolipidico fluido delle membrane biologiche. Gli *ion channels* possono essere formati da proteine che attraversano la membrana. Negli *ion channels* la velocità di trasporto dei cationi è prossima a quella di diffusione,

cioè ca.  $10^7 - 10^8$  ioni per canale per secondo, e il sistema può quindi essere usato nella generazione di gradienti di carica alla base degli impulsi nervosi. Al contrario, il sistema di trasporto degli ioni attraverso una membrana tramite ionofori è troppo lento per generare impulsi nervosi.

Un esempio di questo tipo è fornito dalla *Gramicidina A*, un polipeptide di

origine batterica composto da 15 residui ed usato come antibiotico fin dal 1940. A causa della

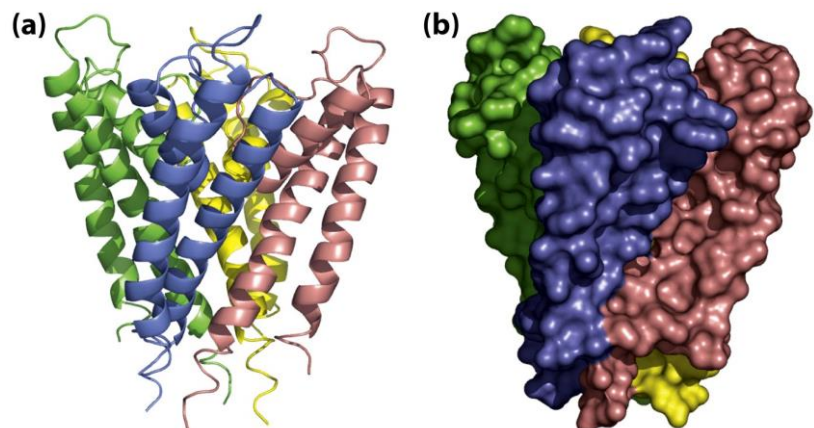
formazione di dimeri, per aggregazione anti-parallela tramite legami a idrogeno di due molecole di gramicidina A in forma di elica, si forma un canale del diametro di 4 Å e della lunghezza di circa 3 nm (struttura ai raggi X; a destra i pori di gramicidina visti dall'alto). Dal momento che lo spessore di un doppio strato fosfolipidico (cioè di una membrana) è di circa 5 – 6 nm, due canali dimerici di gramicidina devono disporsi in sequenza (sempre tramite legami a idrogeno) per formare un poro trans-membrana. La dimensione del poro della gramicidina permette il passaggio di cationi monovalenti, ma non dei cationi divalenti (il  $\text{Ca}^{2+}$  blocca i pori).



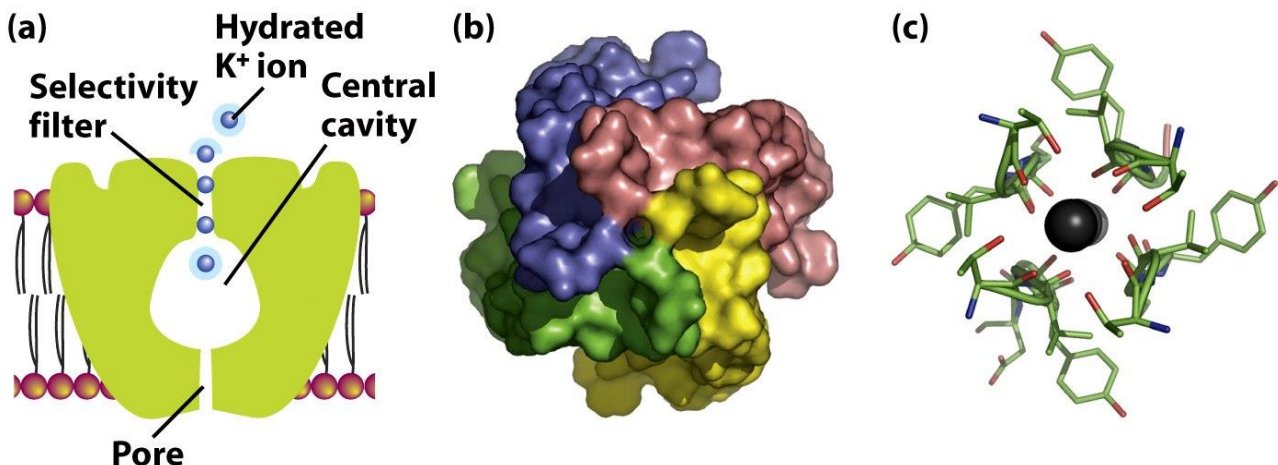
esempio è riportato nella figura successiva, che mostra la struttura ai raggi X delle quattro sub-unità di un canale del  $\text{K}^+$  inserito (*embedded*) nella membrana cellulare (a sinistra per evidenziare la struttura secondaria, a destra nel modo *space-filling*). Il catione si muove lungo il canale idrofilo definito dalla proteina, spesso tramite interazioni deboli e transienti con atomi donatori, solitamente gruppi carbonilici, del

Gli *ion channels* formati da **proteine di membrana integrali**, cioè sempre presenti nelle membrane, sono strutture molto più complesse.

Il tipo di costruzione comune a diversi gruppi di canali ionici prevede l'arrangiamento di 4 o 5 proteine omologhe, formate da diverse  $\alpha$ -eliche trans-membrana, disposte intorno a un asse di simmetria 4 o 5 che passa per il centro del poro (figura). Un

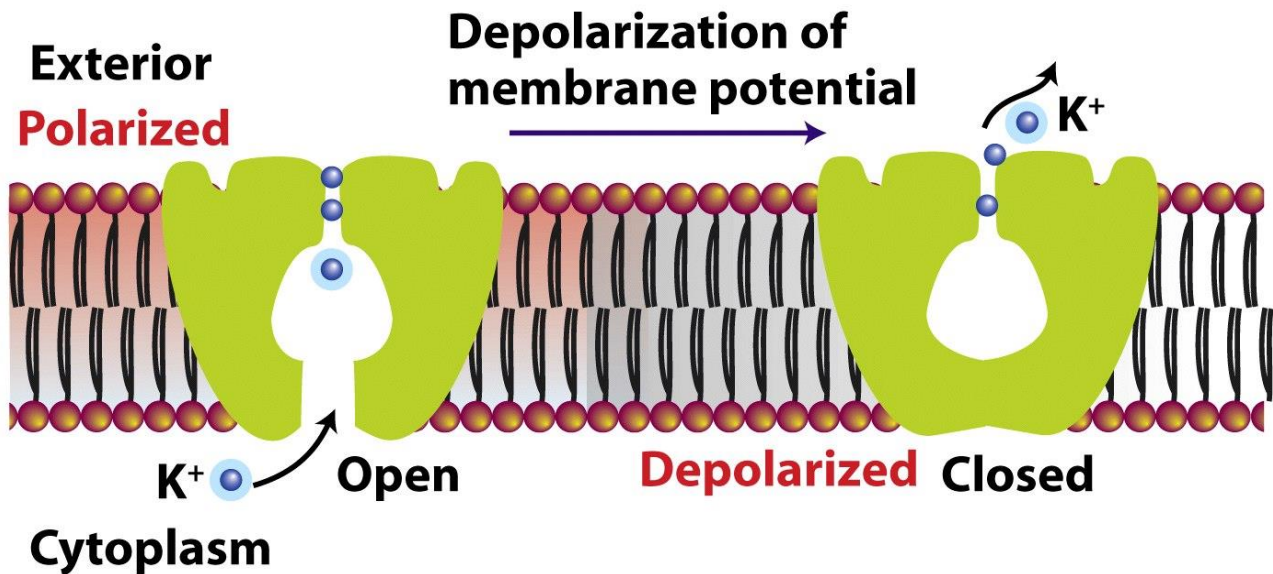


polipeptide. La regione di ingresso del poro è particolarmente importante, dove amminoacidi carichi negativamente promuovono la diffusione dei cationi e possono così contribuire alla selettività e al meccanismo di *gate* che controlla il flusso. Negli *ion channels* il *gate* (quando esiste) è normalmente chiuso per garantire il mantenimento del gradiente di concentrazione. L'apertura del *gate* può essere indotta da composti a basso peso molecolare, sia endogeni che esogeni (e.g. neurotrasmettitori, nucleotidi), dal rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , da altre proteine o da un cambiamento nella differenza di potenziale elettrico trans-membrana (causato dalla stessa variazione di concentrazione dello ione che viene trasportato, secondo l'equazione di Nernst). Canali controllati dal voltaggio (*potential-gated*) sono quindi interruttori biologici che servono nella trasformazione di segnali da elettrici a chimici. La figura mostra i principali aspetti strutturali di un canale del potassio *potential-gated*. Partendo dalla superficie interna della membrana, dove  $[\text{K}^+]$  è circa 100 mM, il canale presenta un poro (che può aprirsi o chiudersi in seguito alla ricezione di un segnale) che porta ad una cavità centrale dal diametro di circa 1 nm. Fino a questo punto gli ioni  $\text{K}^+$  possono rimanere idratati. Eliche polipeptidiche rivolte verso questa cavità hanno le loro parziali cariche negative dirette in modo tale da favorire la popolazione di cationi, tanto che la concentrazione locale di  $\text{K}^+$  può essere ca. 2 M. Al di sopra di questa cavità centrale, il canale si restringe in un **filtro selettivo**: gli ioni  $\text{K}^+$  devono deidratarsi per poter entrare. Il filtro ha siti di coordinazione per  $\text{K}^+$ , ciascuno fornito da una delle quattro unità peptidiche del poro, formati da gruppi carbonilici peptidici ravvicinati che forniscono una coordinazione 8 a ogni  $\text{K}^+$ . Lo ione  $\text{Na}^+$  non è in grado di legarsi efficacemente (troppo piccolo) ed è quindi escluso, mentre i più larghi ioni  $\text{Rb}^+$  e  $\text{Cs}^+$  vengono presi dal canale (rimangono bloccati) e sono stati utilizzati per le determinazioni strutturali ai raggi X in quanto hanno maggior densità elettronica (diffrangono di più) rispetto al potassio.



Il canale opera secondo un meccanismo illustrato nella figura successiva. Gruppi carichi si muovono in risposta ad una variazione del **potenziale di membrana** e causano l'apertura del poro e quindi l'ingresso degli ioni  $\text{K}^+$ . Nella regione del filtro avviene la coordinazione selettiva degli ioni  $\text{K}^+$  deidratati, inducendo una caduta di potenziale trans-membrana che porta alla chiusura del poro. A questo punto il filtro si apre verso la superficie esterna, dove la concentrazione di  $\text{K}^+$  è bassa, ca. 5 mM, e gli ioni  $\text{K}^+$  vengono nuovamente idratati e rilasciati. Il loro rilascio induce la proteina a ritornare alla conformazione originale e nuovi ioni  $\text{K}^+$  possono entrare. La selettività di questi pori per  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  è dell'ordine di  $10^4$ . Da notare che le interazioni tra l'interno del canale e i cationi sono comunque deboli e molto labili perché lo scopo è quello di spostare molto rapidamente (la velocità di trasporto si avvicina a quella diffusiva), non di intrappolare gli ioni  $\text{K}^+$  nel poro.

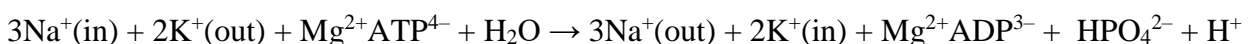




A causa del fondamentale ruolo fisiologico dei canali ionici, lo sviluppo di agenti esterni in grado di bloccare o stimolare selettivamente *gate* per specifici ioni è uno dei settori più attivi nella ricerca farmaceutica.

3) **Meccanismo a pompa ionica.** I due meccanismi illustrati sopra sono di tipo passivo, in quanto il flusso di ioni avviene secondo il gradiente di concentrazione. In contrasto, il terzo metodo di trasporto, detto a pompa ionica attiva, fa muovere gli ioni **contro il gradiente** e quindi richiede un **input energetico** dalla cellula. In questo meccanismo una proteina trans-membrana è in grado di spostare (“pompare”) gli ioni attraverso la membrana, ad esempio tra lo spazio intra ed extra-cellulare. Questi enzimi, che richiedono ATP da idrolizzare come fonte energetica, appartengono al gruppo delle **ATPasi**. Le pompe ioniche sono sistemi grossi e complessi, e quindi molto sensibili (ad esempio alla temperatura). Di solito esistono diversi tipi di pompe ioniche per ogni ione e ci sono diverse pompe ioniche in siti diversi, spesso accoppiate fra loro per dare trasporto di coppie di ioni (e.g.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$ ) nella stessa direzione o in direzione opposta. A causa della sempre necessaria compensazione di cariche, le pompe ioniche possono operare in due modi alternativi: il primo è per i processi di tipo **simporto**, nei quali cationi ed anioni vengono trasportati simultaneamente nella stessa direzione. Nei processi **antiporto** invece ioni della stessa carica vengono scambiati muovendosi in direzioni opposte. Nel bilancio della carica bisogna considerare anche i protoni che si liberano nell'idrolisi dell'ATP; questo permette l'esistenza di alcuni processi di tipo **uniporto**, che riguardano solo uno ione inorganico e  $\text{H}^+$ .

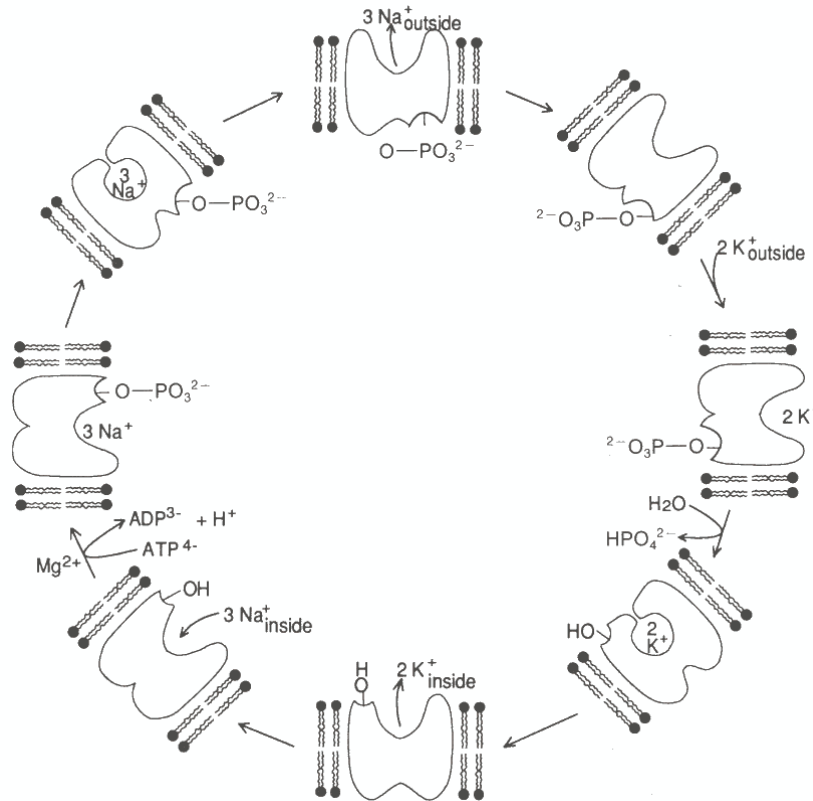
La pompa ionica meglio nota è la **antiporto  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi**, uno dei maggiori componenti del sistema di pompaggio sodio/potassio che è essenziale per creare i potenziali di membrana. La proteina integrale di membrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi è molto simile in tutti gli organismi eucarioti, ed è formata da due subunità, ognuna fatta da una coppia di polipeptidi (eterodimero  $\alpha_2\beta_2$ ) con una massa molare complessiva di circa 294 kDa ( $2 \times 112(\alpha) + 2 \times 35(\beta)$ ). La funzione di questa proteina è quella di promuovere il trasporto di  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  in **modo antiporto** contro i rispettivi gradienti di concentrazione secondo l'equazione:



Il flusso di  $\text{K}^+$  verso l'interno e  $\text{Na}^+$  verso l'esterno della cellula è appunto **opposto** ai normali gradienti di concentrazione, ma richiesto costantemente, e procede finché non si raggiunge uno stato stazionario di non-equilibrio ad energia elevata. La necessaria energia deriva dall'idrolisi dell'ATP catalizzata da  $\text{Mg}^{2+}$ . Si ritiene che la proteina **possa assumere almeno due conformazioni marcatamente differenti,  $E_1$  ed  $E_2$** , una fosforilata e l'altra no, nelle quali la coordinazione degli

ioni metallici deve essere molto diversa. La figura illustra questa ipotesi. Le variazioni conformazionali sono indotte dalla fosforilazione/defosforilazione.

Dal punto di vista funzionale, un sistema di questo tipo deve prevedere la possibilità di traslocazione degli ioni, cioè il trasporto tra regioni intra- ed extra-cellulari, e l'accoppiamento energetico (intracellulare) con l'idrolisi dell'ATP. Per quello che si sa finora, i siti di coordinazione degli ioni sono tutti sulle unità  $\alpha$ . Il ruolo delle glicoproteine  $\beta$  non è ben compreso.



Alcune molecole a basso peso molecolare come la digitalina, un alcaloide estratto dalla digitale (una pianta), possono inibire il funzionamento di questo enzima, il che comporta un ritardo nell'uscita del sodio dalle cellule. Di conseguenza viene stimolata la pompa antiporto per lo scambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , portando ad un aumento della concentrazione intracellulare del calcio. In questo modo, aumentando la concentrazione del calcio a livello del muscolo cardiaco, la digitale regola e rafforza il battito cardiaco ed è perciò usata come farmaco (cardiotonico).

Al trasporto di ioni, in particolare di  $\text{Na}^+$ , sono spesso collegati altri processi di trasporto transmembrana come ad esempio il trasporto di amminoacidi e carboidrati o la modificazione del gradiente di protoni tramite il sistema antiporto  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , molto importante dal punto di vista bioenergetico.

Un'altra pompa di cationi estremamente efficiente è la  **$\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasi** che, tramite un processo antiporto accoppiato al processo simporto  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ , è responsabile dello straordinario arricchimento di protoni (più di  $10^6$  volte) all'interno dello stomaco ( $\text{pH} \sim 1$ ).

Sono molto studiate le **pompe per lo ione  $\text{Ca}^{2+}$** , che sono delle ATPasi estremamente efficienti (sono concentrate nel reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari); per generare l'enorme gradiente di concentrazione tra l'interno (circa  $10^{-7}$  M) e l'esterno della cellula (circa  $10^{-3}$  M) queste pompe devono essere presenti in elevata concentrazione ed essere molto efficienti. Data l'importanza biologica del calcio (vedi dopo), riuscire ad inibire o stimolare queste pompe ioniche è molto importante dal punto di vista medico.

Esistono sistemi di trasporto specifici anche per gli anioni. Ad esempio è noto che una malattia genetica ereditaria piuttosto comune come la fibrosi cistica deriva dal malfunzionamento dei canali per il cloruro.

## Magnesio e Calcio

### Magnesio

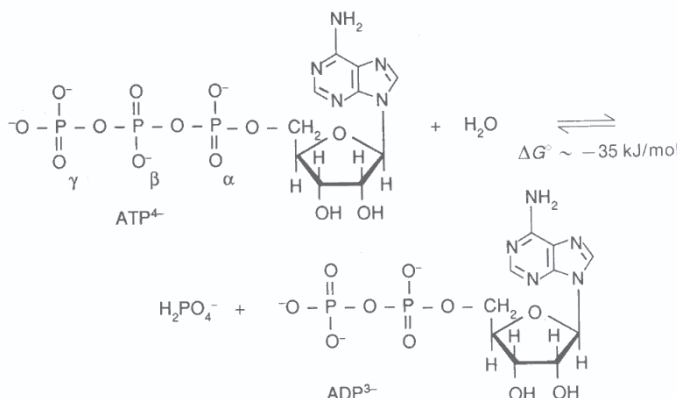
Lo ione  $Mg^{2+}$  è un acido di Lewis decisamente *hard* (ha un rapporto carica/raggio piuttosto elevato a causa delle sue piccole dimensioni), preferisce leganti *hard* con carica negativa multipla, specialmente polifosfati, e non forma legami inerti con semplici donatori N o S, come istidina o cisteina deprotonata. Inoltre  $Mg^{2+}$  ha una **forte preferenza per il numero di coordinazione 6**, con geometria pressoché ottaedrica, mentre gli altri ioni con funzioni biologiche paragonabili preferiscono numeri di coordinazione più bassi ( $Zn^{2+}$ ) o più alti ( $Ca^{2+}$ ).

La carenza cronica di magnesio induce ritardi nella crescita, mentre la carenza temporanea di magnesio induce una sovrabbondanza relativa di  $Ca^{2+}$  nelle cellule, dato che questi due ioni sono fra loro antagonisti. Una concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  più elevata del normale provoca un aumento dell'eccitabilità muscolare (crampi!).

La principale funzione del  $Mg^{2+}$  risiede nella sua interazione con gli anioni di oligonucleotidi (ATP, ADP) e polinucleotidi (DNA e RNA). In effetti circa il 90% del magnesio intracellulare si trova nei **ribosomi**, cioè i complessi RNA-proteine che mediano la sintesi proteica, o nei **polinucleotidi**. Il magnesio stabilizza le strutture di questi polianioni neutralizzandone le cariche.

Il magnesio ha anche importanti **funzioni catalitiche** (nelle quali funge da acido di Lewis) e strutturali in numerosi enzimi. Lo ione  $Mg^{2+}$  è meno polarizzante rispetto a  $Zn^{2+}$  (cioè  $Mg^{2+}$  è un acido di Lewis più debole di  $Zn^{2+}$ ) ma rispetto allo zinco è molto più mobile e presente in maggior concentrazione. Per quanto riguarda l'attività enzimatica,  $Mg^{2+}$  è un fattore essenziale per il **trasferimento biochimico di gruppi fosfato** (vedi prima le pompe ioniche ATPasi) e per molte reazioni di rottura non-ossidativa (*cleavage*) degli acidi nucleici tramite nucleasi o ribozimi. In anni recenti si è scoperto infatti che l'RNA (cioè una non-proteina) può fungere da enzima, catalizzando una serie di reazioni che riguardano RNA o DNA. Questi RNA catalitici sono stati chiamati **ribozimi** e tutti richiedono per l'attività la presenza di uno ione divalente, spesso  $Mg^{2+}$ ; quindi i ribozimi rappresentano una nuova classe di metallo-enzimi (non proteici). Si ritiene che nei ribozimi il magnesio possa avere sia funzioni strutturali (nel loro *folding*) che catalitiche (come acido di Lewis).

I gruppi mono-, di- e trifosfato non sono solo parti dei nucleotidi che costituiscono RNA e DNA, ma sono anche costituenti essenziali delle molecole che fungono da **trasportatori di energia** negli organismi e che possono venire interconvertite da una semplice idrolisi di un gruppo fosfato. La reazione di gran lunga più importante è quella che interconverte ATP ed ADP (figura).

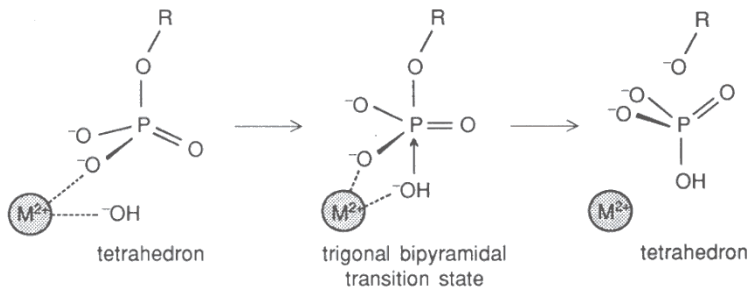


In media, un adulto sintetizza ed usa ogni giorno una quantità di ATP che corrisponde al proprio peso corporeo. I componenti della interconversione ATP/ADP partecipano a più reazioni chimiche di qualsiasi altro composto sulla superficie della terra. Tutte le reazioni biologiche di trasferimento di gruppi fosfato (sia **fosforilazioni** che **defosforilazioni**) richiedono la presenza di **ioni metallici di-positivi** come catalizzatori. Oltre al  $Mg^{2+}$ , ci può essere  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ .

Vi sono diversi aspetti che devono essere considerati nel ruolo esercitato dagli ioni metallici di-positivi nel catalizzare il trasferimento di gruppi fosfato, compresa l'idrolisi. Innanzitutto lo ione compensa l'alta carica negativa di substrato e prodotto, dovuta alla ionizzazione dei mono- e polifosfati a pH fisiologico; la compensazione di carica riguarda sia reagenti che prodotti, e quindi contribuisce ad abbassare l'energia di attivazione della reazione. Cationi trivalenti  $M^{3+}$  compenserebbero ancora meglio la carica negativa, ma sono meno efficienti come catalizzatori in quanto stabilizzano troppo l'intermedio di reazione. Inoltre lo ione elettrofilo  $M^{2+}$  attiva basi di Lewis deboli, come l'acqua, creando il **sistema nucleofilo  $M^{2+}-OH$**  a pH fisiologico. Inoltre i polifosfati



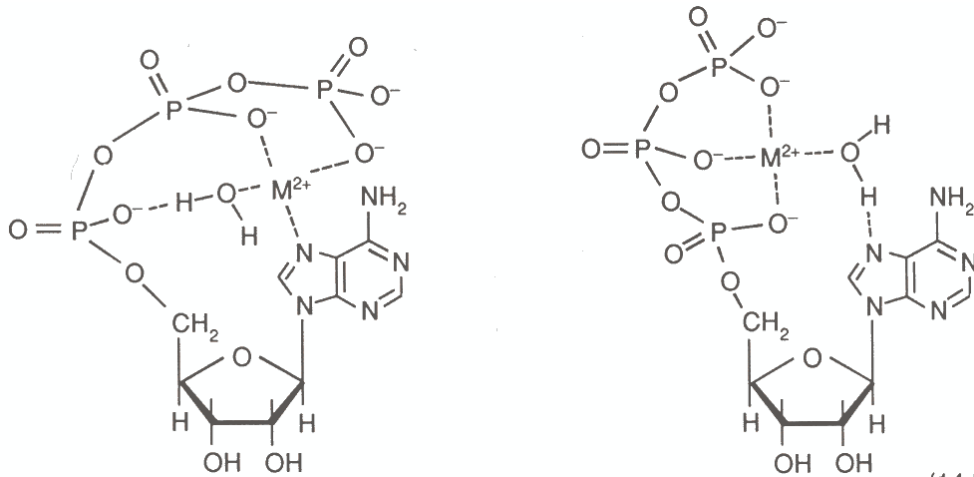
possono coordinare un dicazione fortemente polarizzante in maniera chelante, tramite gli atomi di ossigeno di vari gruppi fosfato; in questo modo viene “fissata” una certa geometria inducendo uno *strain* di anello che contribuisce all’attivazione. Infine, lo ione metallico può abbassare l’energia dello



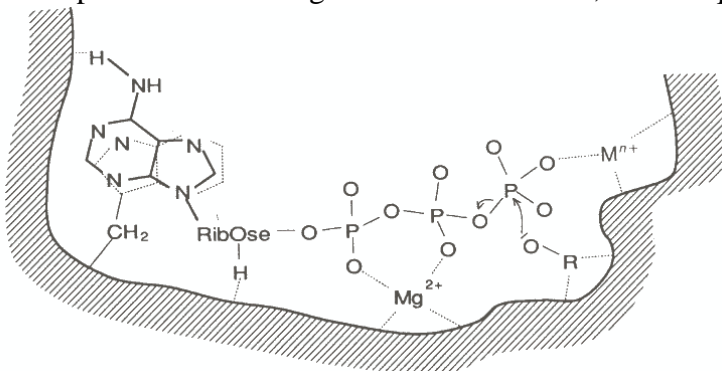
stato di transizione di una reazione associativa tramite la coordinazione di entrambi i reagenti. In figura viene riportato un semplice modello per l’idrolisi del fosfato catalizzata da uno ione  $M^{2+}$ . Si presume che l’idrolisi del fosfato, che è una **sostituzione nucleofila**, avvenga con **meccanismo associativo  $S_N2$**  e che quindi

nell’intermedio il fosfato abbia numero di coordinazione 5, con geometria a bipyramide trigonale.

Per quanto riguarda specificamente il meccanismo di idrolisi dell’ATP o di altri nucleosidi-trifosfati, si ipotizza la formazione di intermedi macrochelati in cui il dicazione si coordina contemporaneamente ad un atomo O di ognuno dei gruppi fosfato  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  e, nel nucleotide libero, anche all’N iminico della base purinica. La coordinazione può essere anche mediata da una molecola di acqua (figura).

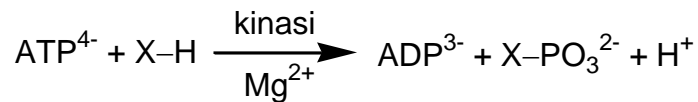


Quando il  $Mg^{2+}$  faccia parte di un enzima questa variabilità coordinativa può essere ridotta; la specie reattiva può anche coinvolgere due ioni metallici, uno dei quali attacca il gruppo fosfato  $\gamma$ , più basico, tramite un OH coordinato. L’attacco può avvenire anche da parte di un alcossido (vedi figura). Si può anche ipotizzare lo *stacking* dell’adenina con un triptofano.

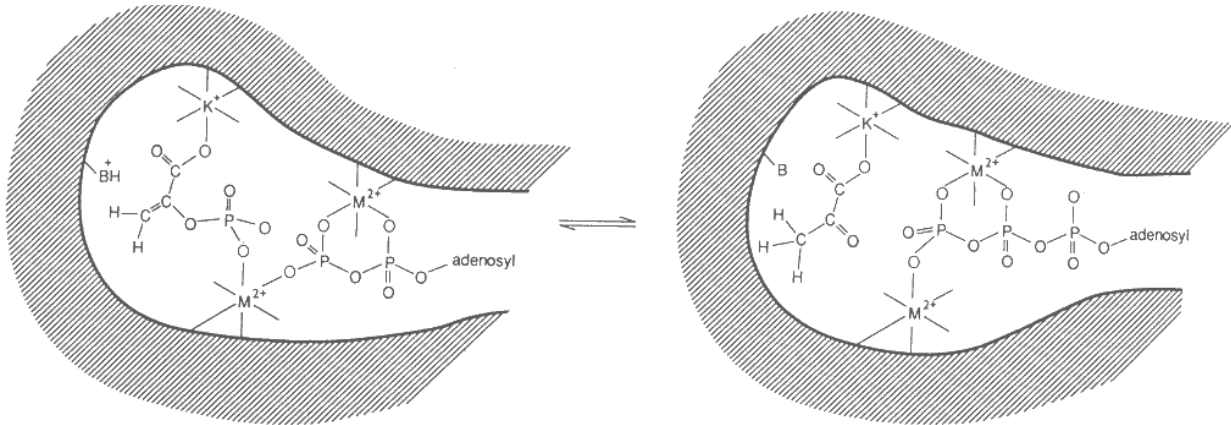


Nei cicli metabolici le **kinasi** sono una vastissima famiglia di enzimi che catalizzano il trasferimento di gruppi fosfato ad altri substrati, come carboidrati (e.g. il glucosio), carbossilati (e.g. il piruvato) o

guanidine (e.g. la creatina). Il loro substrato è il complesso  $Mg$ -ATP.

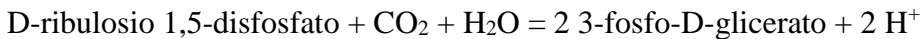


L'enzima **piruvato-kinasi** (controllato dalle calmoduline, vedi dopo) richiede la presenza anche di un grosso mono-catione, preferibilmente  $\text{K}^+$ , oltre a due di-cationi. Il meccanismo d'azione proposto per il trasferimento di fosfato catalizzato da questo enzima è mostrato in figura.



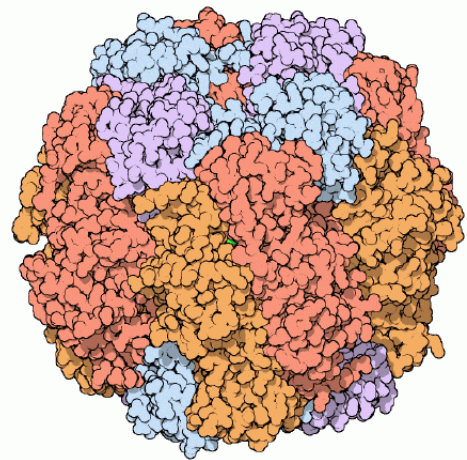
### Rubisco

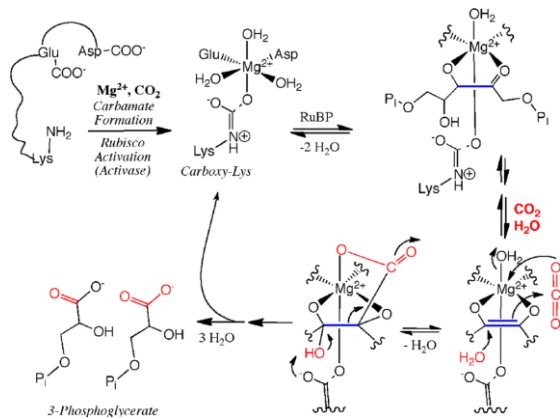
Un esempio importante di un enzima al Mg che **non** prevede il coinvolgimento di ATP è il **ribulosio bisfosfato carbossilasi**, spesso abbreviato con '**RuBisCo**'. L'enzima, appartenente alla classe delle liasi, catalizza la seguente reazione:



Questo è l'**enzima più abbondante nella biosfera** ed è responsabile per la **produzione di biomassa** da parte degli organismi fotosintetici e della **rimozione di  $\text{CO}_2$  dall'atmosfera**, cioè della **fissazione del carbonio** (la quantità di  $\text{CO}_2$  trattata complessivamente dal rubisco ogni anno si stima sia dell'ordine di  $10^{11}$  tonnellate). Infatti il rubisco è un enzima del ciclo di Calvin, lo stadio della fotosintesi che avviene in assenza di luce, nel quale esso catalizza l'incorporazione di  $\text{CO}_2$  in una molecola di ribulosio 1,5-disfosfato. L'enzima è molto grande, composto dall'**auto-assemblaggio di 16 unità** ( $\text{L}_8\text{S}_8$ ), 8 di una proteina più grande (*large*, L, in giallo e arancio in figura) e 8 più piccole (*small*, S, in viola e azzurro). All'interfaccia di ogni coppia  $\text{L}_2$  ci sono due siti attivi di Mg, e non c'è cooperatività fra i vari siti attivi. L'enzima è uno dei meno efficienti fra quelli noti, dal momento che è in grado di fissare "solo" tre molecole di  $\text{CO}_2$  al secondo. Per questo motivo, cioè per compensare la sua scarsa attività, esso è molto abbondante (i cloroplasti delle piante sono pieni di Rubisco).

Il meccanismo di azione dell'enzima è riportato in figura. Lo ione  $\text{Mg}^{2+}$  è coordinato con geometria ottaedrica a gruppi carbossilato di residui asparato e glutammato, a tre molecole d'acqua e a un carbammato derivante da un residuo di lisina. Questo carbammato si forma per reazione fra una molecola di  $\text{CO}_2$  (detta "attivatrice") e il gruppo  $-\text{NH}_2$  in catena laterale della lisina. Nel ciclo catalitico la coordinazione del ribulosio 1,5-disfosfato sposta due molecole d'acqua ed esso

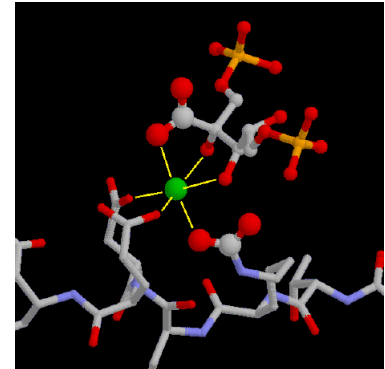




attivo, e soltanto una minima parte della catena proteica (in grigio e azzurro). Si notino, sotto il Mg la molecola di  $CO_2$  “attivatrice” inserita nella lisina e, sopra al Mg, quella che viene fissata (sfere grigie e rosse più grandi).

Nell’ipotesi che venisse utilizzato lo Zn al posto di Mg come acido di Lewis, esso favorirebbe la coordinazione da parte di leganti più *soft* e un numero di coordinazione più basso. L’azione del rubisco necessita di uno ione metallico in grado di combinare una buona acidità di Lewis con una elevata abbondanza e la formazione di legami di coordinazione deboli.

diventa un enolato in seguito all’estrazione di un protone da parte del carbammato. Questo intermedio reagisce con  $CO_2$  formando un **nuovo legame C–C**, quindi il prodotto si spezza in due, dando due nuove specie contenenti ognuna tre atomi di carbonio, e il ciclo ricomincia. L’enolato reattivo è in grado di reagire anche con  $O_2$  (cioè l’enzima non riesce a distinguere bene  $CO_2$  da  $O_2$ ), nel qual caso si ha l’ossidazione degradativa del substrato; per questo motivo l’enzima viene spesso chiamato rubuloso 1,5-disfosfato carbossilasi/ossigenasi. La figura mostra la struttura del sito



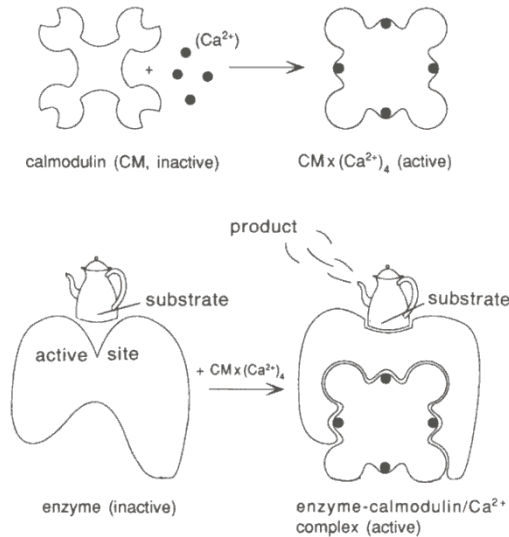
## Calcio

Il **calcio** svolge numerosi ruoli importanti. Si può anzi dire che il calcio come  $Ca^{2+}$  è, insieme al ferro (e forse addirittura più del ferro), il più importante e versatile degli elementi bio-inorganici. Un adulto contiene circa 10 g di calcio che non fa parte di materiali solidi (ossa, denti,.. contengono circa 1.2 kg di Ca in un adulto).

In generale, il  $Ca^{2+}$  agisce come **messaggero secondario all’interno delle cellule** in quanto la sua concentrazione può variare rapidamente in risposta ad uno stimolo esterno (i messaggeri primari sono agenti extracellulari, e.g. ormoni o segnali elettrici, che danno inizio a una risposta in seguito ad un accadimento extracellulare; il segnale viene trasmesso all’interno della cellula tramite un messaggero secondario), oppure agisce come una specie per lo **stimolo, la regolazione e l’amplificazione di segnali**. Il metabolismo del calcio, dato il ruolo centrale di questo ione in molti processi fisiologici, è estremamente complesso. Disordini nel metabolismo del calcio possono avere gravi conseguenze per la salute (e.g. se la permeazione di  $Ca^{2+}$  nelle cellule cardiache è troppo elevata si ha una eccitazione eccessiva del muscolo cardiaco; si usano quindi come farmaci dei “calcio-antagonisti” che bloccano i canali del calcio). Ma perché il  $Ca^{2+}$  si presta così bene a svolgere una funzione di trasferimento, conversione e amplificazione di informazioni?  $Ca^{2+}$  è uno ione divalente senza funzioni redox che ha tipicamente numeri di coordinazione elevati e una geometria di coordinazione spesso irregolare nei suoi complessi a causa dell’elevato raggio ionico di circa 1.0 – 1.2 Å. Gli ioni  $Cd^{2+}$  (0.95 Å) e  $Pb^{2+}$  (1.19 Å) hanno dimensioni simili ma sono tossici perché – essendo *soft* – si coordinano fortemente ai tiolati ( $Cys^-$ ). Numeri di coordinazione 7 (e.g. bpiramide pentagonale) o 8 sono comuni per il calcio nelle proteine, in contrasto con la forte preferenza di  $Mg^{2+}$  per una coordinazione ottaedrica. Questi numeri di coordinazione elevati vengono raggiunti facilmente in quanto il grosso ione  $Ca^{2+}$  coordina volentieri molecole di acqua, ossigeni carbonilici di legami peptidici, gruppi idrossilici di carboidrati chelanti, e gruppi carbossilici (potenzialmente chelanti) che sono abbondanti nelle proteine acide. Il grande raggio dello ione calcio, oltre a richiedere una geometria di coordinazione proteino-specifica, garantisce anche una elevata velocità di complessazione-decomplessazione e quindi un trasferimento di informazioni più veloce (nel  $Mg^{2+}$  la velocità di scambio delle molecole di acqua coordinata è  $10^3$ – $10^4$  volte più lenta che nel  $Ca^{2+}$ ). Sembra inoltre

che gli elevati numeri di coordinazione del calcio servano a mediare interazioni specifiche proteina-proteina e proteina-carboidrati.

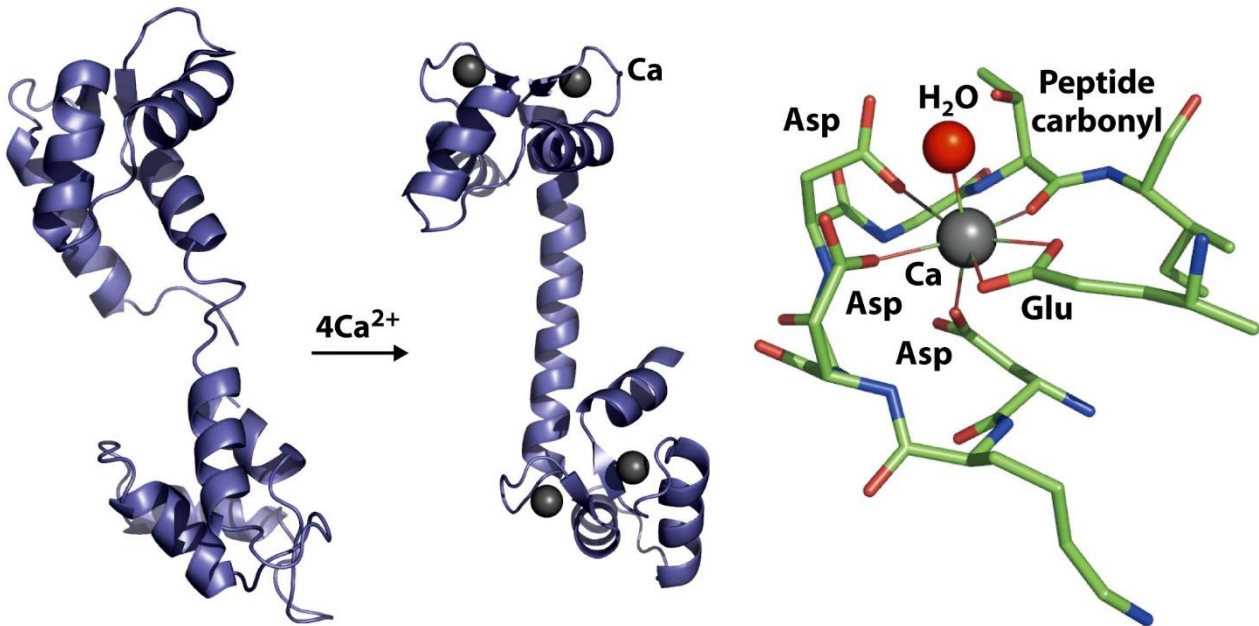
Il controllo della concentrazione del calcio nei fluidi corporei è essenziale perché questo ione può avere una differenza di concentrazione assai elevata, fino a 4 ordini di grandezza, attraverso la membrana cellulare ed altre membrane. All'interno della cellula (nel citosol) la concentrazione di calcio libero è normalmente molto bassa (ca.  $10^{-7}$  M), mentre all'esterno è all'incirca  $10^{-3}$  M. Esistono gradienti notevoli anche fra comparti all'interno della cellula. Come già ricordato, questo gradiente è mantenuto dal continuo funzionamento di pompe ioniche specifiche per il  $\text{Ca}^{2+}$ . La variazione di



concentrazione del calcio è anche controllata da cosiddette “ **$\text{Ca}^{2+}$  binding proteins**” (ne sono già state individuate più di 200). Certe regioni della cellula vicine alla membrana – *calcium-releasing regions* – contengono proteine molto acide per l’immagazzinamento (*storage*) di  $\text{Ca}^{2+}$ , le *calsequestrine*, che possono legare fino a 50 ioni calcio ciascuna. Le grosse quantità di ioni calcio richieste per la trasmissione e amplificazione di informazioni e per indurre la contrazione muscolare sono rilasciate da queste proteine, con meccanismi non ancora ben compresi. Un’altra classe di “ $\text{Ca}^{2+}$  binding protein” molto diffusa e ben nota è quella delle **calmoduline** (piccole proteine, ca. 17 kDa, con residui glu e asp che legano gli ioni calcio) la cui funzione, attivata da variazioni della concentrazione di calcio, è quella di attivare o disattivare un elevato numero di proteine ed enzimi, quali ad esempio l’NO sintasi (un

Fe-enzima responsabile per la generazione di NO), l’adenilato e guanilato ciclasti (catalizzano la formazione di cAMP e cGMP), la NAD chinasi (catalizza la fosforilazione per la sintesi di NADP). Lo schema di funzionamento delle calmoduline è riportato nella figura sopra. La conformazione della proteina viene cambiata in seguito alla coordinazione cooperativa di 4 ioni calcio. La figura sotto mostra appunto la **variazione conformazionale** subita dalla apo-calmodulina in seguito alla coordinazione di 4  $\text{Ca}^{2+}$ : da notare che la elevata proporzione di  $\alpha$ -elica è tipica di proteine che vengano attivate tramite coordinazione di ioni metallici. Nella conformazione finale la Ca-calmodulina è in grado di legarsi specificamente ad un enzima (e.g. una chinasi) ed attivarlo. La figura a lato mostra uno dei siti di coordinazione del  $\text{Ca}^{2+}$  della apo-calmodulina, composto interamente da atomi di O di varia origine.





La *parvalbumina*, presente nel tessuto muscolare liscio, le *troponine* del tessuto muscolare striato, e le *proteine S100*, del sistema nervoso, appartengono tutte alla famiglia delle calmoduline.

La **contrazione muscolare** è un esempio tipico del ruolo di messaggero dello ione calcio. Il largo aumento della concentrazione del calcio in soluzione da  $0.1 \mu\text{M}$  (cellula a riposo) a  $10 \mu\text{M}$  (in seguito all'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico) induce la coordinazione del calcio alla **troponina C**, della famiglia delle calmoduline. La troponina C, 18 kDa, contiene due siti per il calcio ad elevata affinità ( $K > 10^6 \text{ M}$ ), sempre occupati da due ioni calcio con funzioni strutturali, e due siti ad affinità minore che servono per la stimolazione indotta dal calcio. La figura mostra le variazioni conformazionali indotte nella troponina C dalla coordinazione di questi due ioni  $\text{Ca}^{2+}$  aggiuntivi. La contrazione muscolare ha un meccanismo molto complesso. Il  $\text{Ca}^{2+}$  viene rilasciato dalle proteine di *storage* del reticolo sarcoplasmatico in seguito a un impulso elettrico, indotto da un neurone che – tramite il rilascio di neurotrasmettitori – induce la depolarizzazione della membrana cellulare. Il rapido aumento di concentrazione dello ione calcio va a saturare i siti della troponina, inducendo una variazione conformazionale che viene trasmessa ad altri **componenti proteici del filamento muscolare**: la troponina si lega ai filamenti di *actina* inducendo la liberazione di siti che consentono all'actina di interagire con i filamenti di *miosina*, che scorrono l'uno sull'altro (un processo che richiede energia tramite idrolisi di ATP dipendente da  $\text{Mg}^{2+}$ ) provocando in definitiva un movimento spaziale. Lo spostamento delle fibre indotto dal  $\text{Ca}^{2+}$  viene quindi trasformato in energia meccanica che induce la contrazione del muscolo. Il  $\text{Ca}^{2+}$  viene infine rilasciato e ri-pompato indietro alle proteine di *storage*, liberando i siti della troponina, e riportando anche le fibre di actina e miosina nelle posizioni iniziali. Chi voglia maggiori dettagli può vedere <https://www.youtube.com/watch?v=nTZnBdeIb5c>.

Da notare che le “Ca<sup>2+</sup> binding proteins” devono essere in grado di coordinare rapidamente e specificamente il calcio anche in presenza di più elevate concentrazioni di ioni K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (la concentrazione di magnesio è 10<sup>3</sup> più elevata di quella del calcio, vedi tabella). **Le costanti di associazione dei siti per il calcio intracellulari sono dell’ordine di 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.**

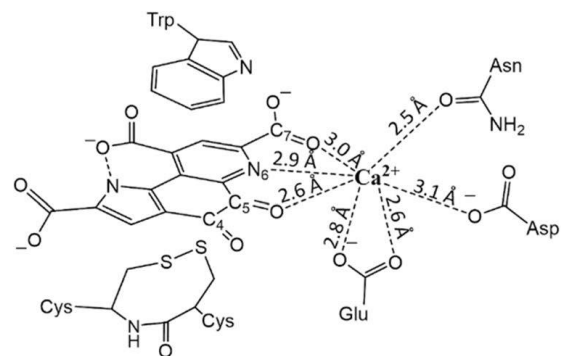
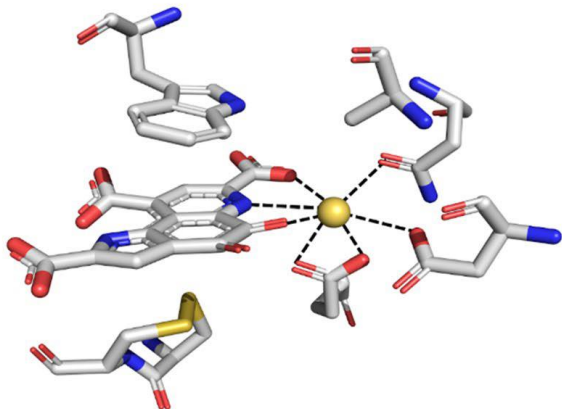
Il calcio fa anche parte integrante di numerosi **enzimi extracellulari** (ad esempio la *tripsina*, un enzima per la digestione dell’amido). Dal momento che la concentrazione extracellulare di Ca<sup>2+</sup> è millimolare, lo ione sarà in grado di coordinarsi in quantità consistente a biomolecole anche con costanti di affinità solo dell’ordine di 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. Il ruolo del calcio in questi enzimi è sia di tipo strutturale che catalitico (ad esempio nelle fosfolipasi, enzimi digestivi che catalizzano l’idrolisi dei fosfolipidi di membrana).



### Enzimi a base di Ca<sup>2+</sup> e Ln<sup>3+</sup>

Gli enzimi alcol deidrogenasi (ADHs) sono ampiamente presenti in natura, dai batteri ai mammiferi, e catalizzano la reazione generale di ossidazione di un gruppo idrossilico tramite un elettrone-accettore (che deve prendersi due elettroni). A seconda della natura del cofattore usato come primo elettrone-accettore gli enzimi che ossidano gli alcol sono stati classificati in quattro gruppi (NAD(P), FAD, eme + cofattore F420, pirrolochinolin chinone (PQQ, pyrroloquinoline quinone)). Le deidrogenasi dipendenti da PQQ si trovano in protobatteri; la maggior parte contiene il sistema Ca<sup>2+</sup>-PQQ nel sito attivo (e alcune anche un gruppo eme). Intorno al 2010 si è scoperto che alcune ADH-PQQ il sito attivo è costituito da uno ione lantanide, e.g. La<sup>3+</sup> o Ce<sup>3+</sup>, al posto del calcio, costituendo così il primo esempio di un ruolo biologico di questo gruppo di elementi.

In tutte le strutture note di Ca<sup>2+</sup>-PQQ lo ione Ca<sup>2+</sup> ha coordinazione 7, ed è coordinato a 3 atomi donatori del PQQ (2O e 1N), a un glutammato chelante, e ai carbossilati monodentati di una asparagina e un acido aspartico.

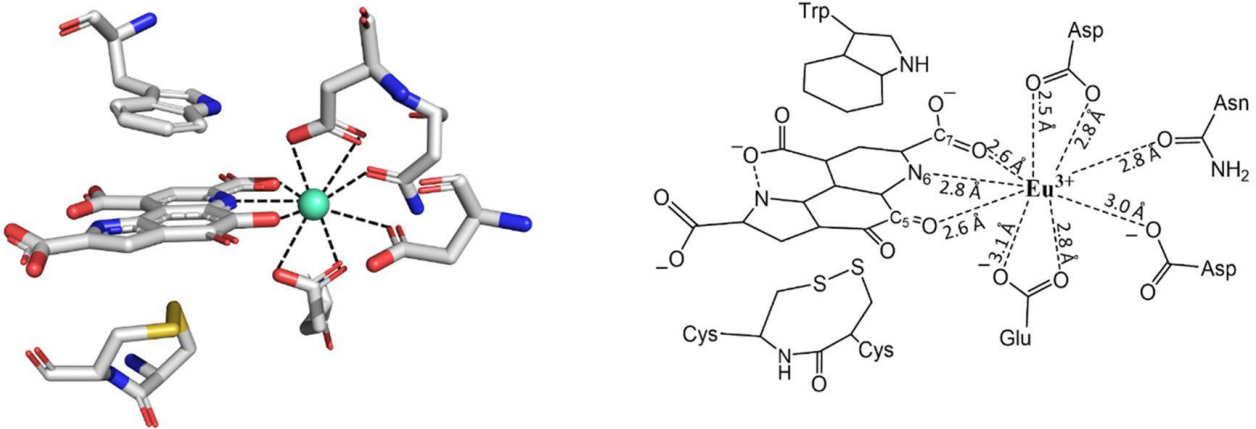


Si ritiene che la deidrogenazione dell’alcol avvenga tramite un meccanismo detto di trasferimento di idruro e che non coinvolge direttamente il calcio, ma il PQQ.

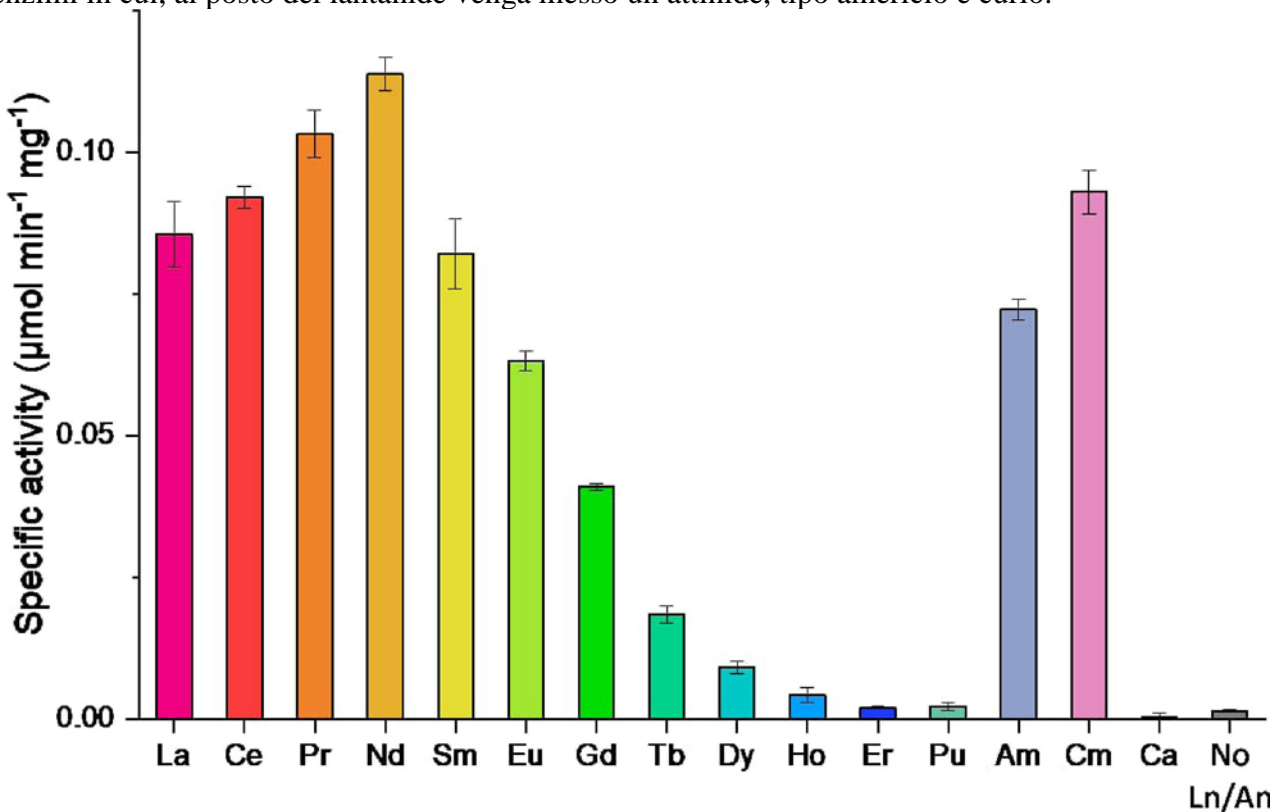
Nel 2011 si è trovato che in alcuni di questi batteri metilotropici, che conducono l’ossidazione del metanolo a formaldeide, la presenza di concentrazioni nanomolari di uno ione lantanide induce il cosiddetto **lanthanide switch**, cioè il batterio sostituisce Ca<sup>2+</sup> con Ln<sup>3+</sup> (in assenza di lantanidi l’ossidazione del metanolo è condotta dall’enzima al calcio, MxaF-MDH). Si è poi trovato che alcuni batteri hanno soltanto l’enzima al lantanio (MDH del tipo XoxF), che così è diventato essenziale per il loro metabolismo del C<sub>1</sub>. Le strutture ai raggi X di MDH dipendenti da ioni lantanidi sono tutte molto simili tra loro e simili a quella dei corrispondenti enzimi al calcio. Tuttavia il numero di



coordinazione dello ione è 9, anziché 7, in accordo con la carica positiva maggiore dello ione e con le tipiche preferenze coordinative dei lantanidi. I due ulteriori siti di legame sono dovuti al carbossilato chelante di un aspartato.



L'aspartato chelante aggiuntivo è indispensabile per la coordinazione del lantanide e per l'attività dell'enzima: quando è stato sostituito con un'alana, e la proteina "caricata" con  $\text{Ca}^{2+}$ , non si è trovata attività catalitica, neppure in presenza di  $\text{La}^{3+}$ . Si è infine trovato che l'attività dipende dal tipo di lantanide, ed è maggiore con quelli più leggeri (e quindi più grandi). Sono risultati attivi anche enzimi in cui, al posto del lantanide venga messo un attinide, tipo americio e curio.



## Biominerali

Il calcio è, infine, anche uno dei componenti principali di ossa, denti e conchiglie, principalmente a causa dell'insolubilità a pH fisiologico di calcio carbonato e fosfato (la saliva umana è una soluzione basica sovrasatura di calcio fosfato, che viene usato per la protezione e la ricalcificazione dello smalto dei denti. La precipitazione viene evitata grazie ad una proteina, la *staterina*, che lega il calcio). I biominerali possono venire prodotti dagli organismi viventi sia internamente che esternamente (esoscheletro, gusci, corazze) e possono essere sia (micro)cristallini che amorfi.

La tabella riassume i principali biominerali di elementi alcalino-terrosi in sistemi biologici:

Composto	Minerale	Presenza negli organismi viventi
MgCO <sub>3</sub>	Magnesite	Scheletro del corallo
CaCO <sub>3</sub>	Aragonite	Conchiglie e perle
CaCO <sub>3</sub>	Calcite	Uova di uccello, sistemi gravitazionali nell'orecchio interno
CaCO <sub>3</sub> ·nH <sub>2</sub> O	Amorfo	Immagazzinamento di calcio nelle piante
Ca(C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )·nH <sub>2</sub> O	Whewellite (n = 1) Weddellite (n = 2)	Immagazzinamento di calcio nelle piante, calcoli renali
3Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·Ca(OH) <sub>2</sub>	Idrossiapatite	Ossa e denti nei vertebrati
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Gesso	Sistema gravitazionale nelle meduse
SrSO <sub>4</sub>	Celestite	Esoscheletro di certo plankton
BaSO <sub>4</sub>	Barite	Sistema gravitazionale nelle alghe

Il processo di biomineralizzazione porta invariabilmente ad un **materiale composito**, contenente il minerale ed una matrice organica, la cui composizione relativa può anche variare durante la crescita. Per esempio, lo smalto negli infanti è composto essenzialmente da matrice proteica, mentre negli adulti contiene circa il 90% di idrossiapatite. Il composto inorganico introduce nel materiale la durezza e la resistenza alla pressione; la matrice organica, che è composta solitamente da fibre di collagene, glicoproteine e mucopolisaccaridi, fornisce al materiale la elasticità, e resistenza alla tensione, piegamento e rottura. Dal momento poi che la struttura del biomminerale è controllata dalla cellula che ne promuove la sintesi, non è raro che ne risulti una struttura cristallina insolita; ad esempio, mentre la forma cristallina più stabile del CaCO<sub>3</sub> è la calcite, esso cristallizza come aragonite nelle conchiglie. Il biomminerale può venire formato all'interno della cellula, sulla sua superficie o nello spazio extracellulare. Oltre che funzioni di supporto meccanico, i biominerali possono avere anche funzioni come componenti di sensori (e.g. cristalliti pesanti in organi sensibili alla gravità o micro-cristalliti magnetici nei batteri magneto-tattici) e di storage di certi ioni.

È chiaro che sia la composizione chimica che la morfologia contribuiscono alla piena funzionalità di un biomminerale (ad esempio, denti ed ossa hanno composizione simile, ma ovviamente diversa morfologia e funzione). I componenti organici possono avere una funzione di matrice o di templanti per quanto riguarda la crescita vettoriale, cioè indirizzata e controllata, dei cristalliti inorganici. Dal momento poi che la crescita dei biominerali deve avvenire in tempi relativamente brevi, di solito essi sono composti o da domini cristallini piuttosto piccoli, oppure da cristalli singoli ma con grossa area superficiale (ad esempio spicole) in quanto meglio accessibili dal solvente. Disfunzioni dovute a variazioni patologiche nelle normali velocità metaboliche dei biominerali sono piuttosto comuni, ad esempio il deposito di sali di calcio o magnesio (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, apatite, MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>) nei vasi sanguigni o nelle vie urinarie (calcoli), insufficiente mineralizzazione delle ossa nei bambini (rachitismo), demineralizzazione, soprattutto senile, di denti (carie) e ossa (osteoporosi). Dato che il processo di biomineralizzazione è soggetto a un equilibrio cinetico, l'avvelenamento cronico da ioni pesanti quali Cd<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> può portare alla progressiva sostituzione del Ca<sup>2+</sup> nella struttura ossea, generando alterazioni nelle loro proprietà meccaniche e dolorose deformazioni.

Si possono distinguere diversi processi di biomineralizzazione, a seconda della complessità del meccanismo di controllo. Il meccanismo più primitivo, che riguarda batteri e alghe, è la

crystallizzazione spontanea da soluzioni sovrassature ottenute tramite pompe ioniche; gli aggregati policristallini con orientazioni casuali si formano nello spazio extracellulare. Più rilevanti dal punto di vista della scienza dei materiali sono i processi di biomineralizzazione meglio controllati biologicamente. I materiali bioinorganici avanzati sono solitamente dei composti (vedi sopra) ben definiti. Si possono distinguere **quattro tipi di biomateriali**, con crescente funzione della matrice organica: 1) cristalliti inorganici disposti casualmente, a cui la matrice organica impartisce solo stabilità meccanica (e.g. denti dei chitoni contenenti ossidi di ferro); 2) formazione di cristalli indotta dalla matrice organica in siti predeterminati, ma con scarso controllo sulla crescita dei cristalli (e.g. uova di uccello); 3) fase minerale amorfa, con la matrice organica che ha funzione di dirigerne la nucleazione e la crescita vettoriale (e.g. depositi di silice in alcune piante, in particolare per costruire spine difensive contro i predatori, e nelle diatomee); 4) alto grado di controllo da parte della matrice sia per la nucleazione che per la crescita orientata (i.e. epitassiale) dei cristalli (ossa, denti, conchiglie). Ad esempio le ossa sono formate principalmente da piccoli cristalliti (ca.  $5 \times 50$  nm) di idrossiapatite connessi alle fibre di collagene (una proteina fibrosa formata da tre polipeptidi avvolti a tripla elica). Nello smalto dei denti i domini cristallini sono molto più grandi rispetto a quelli delle ossa, e si presentano come lunghi prismi di idrossiapatite fortemente orientati, che conferiscono durezza e durata.

In particolare quest'ultimo meccanismo richiede un rigoroso controllo del trasporto attivo degli ioni, per creare e mantenere una soluzione sovrassatura in un determinato comparto cellulare, e dei processi di nucleazione che avvengono su superfici di membrane. Si possono distinguere due casi limite nella formazione di microstrutture: crescita cristallina puramente epitassiale su matrici organiche o l'assemblaggio di cristalliti inorganici preformati da parte di materiale organico che funge da cemento. L'importanza della matrice quindi riguarda il controllo della nucleazione, l'orientazione e la limitazione della crescita dei cristalli, e infine l'immobilizzazione dei cristalliti. Uno degli aspetti più affascinanti e importanti dei biominerali è il fatto che la loro forma non deve coincidere affatto con le forme cristalline regolari del materiale inorganico. Per quanto riguarda la morfologia finale del biominerale sono molto più significative le limitazioni spaziali indotte da biopolimeri, membrane o vescicole durante la sua formazione.

C'è notevole interesse a riprodurre artificialmente i processi di biomineralizzazione per ottenere **materiali biocompatibili**, in particolare bio-ceramiche in grado di fornire dei sostituti artificiali per ossa e denti, composti da idrossiapatite. Nello smalto dei denti  $F^-$  sostituisce in parte l' $OH^-$  dell'idrossiapatite e c'è una ben nota correlazione, la cui causa non è del tutto compresa, fra la quantità di fluoruro (fra 30 e 3000 ppm) e la resistenza ai batteri che generano le carie (la fluorapatite è meno solubile della idrossiapatite, ma il fluoruro potrebbe anche inibire enzimi specifici coinvolti nella corrosione dello smalto). Il cloruro (cloroapatite) è presente in quantità anche maggiori del fluoruro (0.1 – 0.5%), ma non sembra avere alcuna funzione.