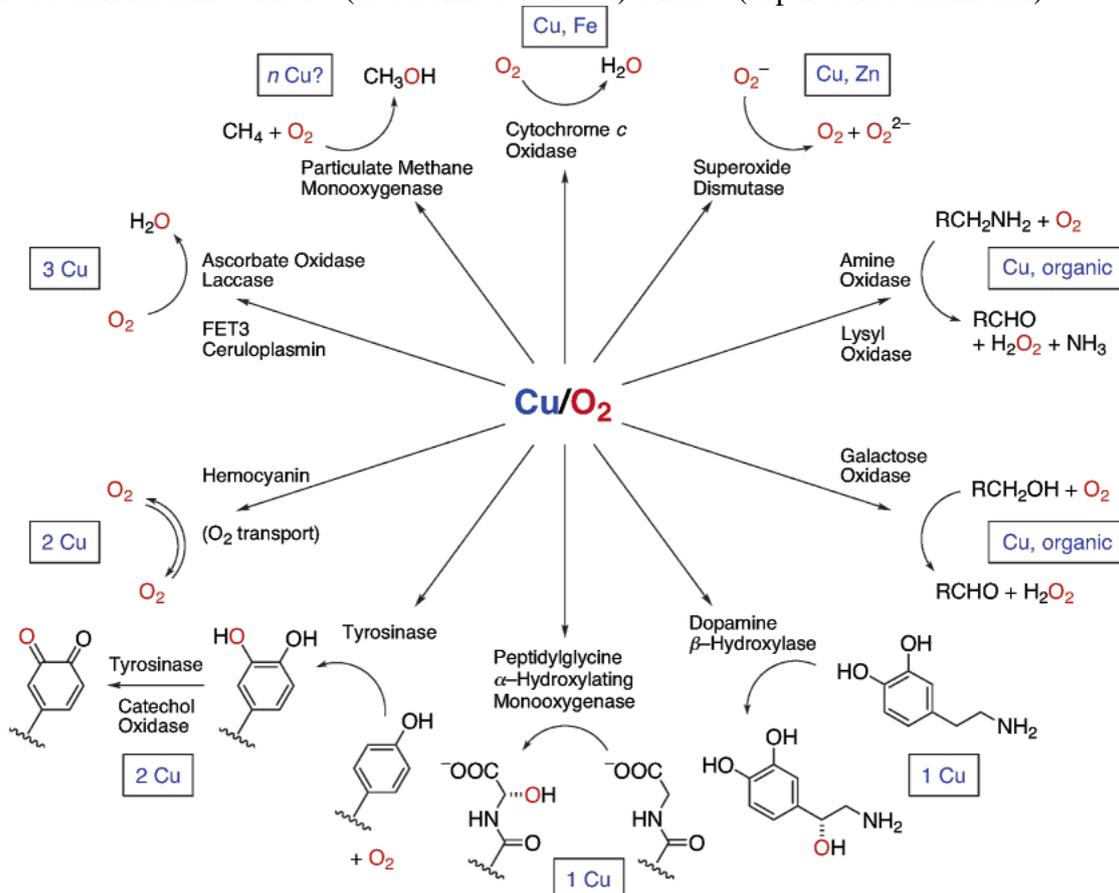


## Proteine al rame

Molte ferro-proteine posseggono un analogo, con funzioni comparabili, che contiene Cu anziché Fe. Ad esempio per *electron-transfer*, ma **soprattutto per reazioni in cui è coinvolto l'ossigeno**: trasporto di O<sub>2</sub> (emocianina), ossidazione ed attività ossidasica (mono-ossigenasi, di-ossigenasi, ossidasi e perossidasi), e nella disattivazione di intermedi tossici della riduzione di O<sub>2</sub> (perossidasi, superossido-dismutasi). La figura mostra una selezione di enzimi al rame che attivano O<sub>2</sub>, a volte insieme ad altri metalli come Fe (citocromo c ossidasi) e zinco (superossido-dismutasi).



Tuttavia, nonostante le similitudini di tipo funzionale, Fe e Cu mostrano anche alcune differenze:

- 1) Al contrario del ferro nell'eme, il rame "biologico" non si trova **mai** in composti tetrapirrolici. L'azoto dell'imidazolo istidinico è capace di formare legami forti e, cosa ancora più importante, sufficientemente inerti con il Cu in entrambi gli stati di ossidazione +1 e +2. Per cui il rame può essere incluso stabilmente in una proteina senza dover essere inserito in uno speciale macrociclo.
- 2) In generale il potenziale redox della coppia Cu(II)/Cu(I) è più grande di quello Fe(III)/Fe(II). Per cui rame-proteine, tipo la ceruloplasmina, sono in grado di catalizzare l'ossidazione di Fe(II) a Fe(III) (**reattività ferro-ossidativa**) con contemporanea riduzione di Cu(II) a Cu(I).
- 3) In soluzione acquosa neutra (e in acqua di mare) la forma ossidata Cu<sup>2+</sup> è più solubile di Cu<sup>+</sup>, il quale forma composti insolubili con alogenuri e solfuri, al contrario di quanto avviene per il ferro. Questo ha fatto sì che il rame diventasse biodisponibile più tardi rispetto al ferro, quando si è formata l'atmosfera ossidante.

Nell'uomo, che non necessita di rame-proteine per il trasporto dell'O<sub>2</sub>, sono richiesti circa **150 mg** di Cu, utilizzato soprattutto nella disattivazione del superossido (enzima superossido-dismutasi) e nella catena respiratoria (citocromo c ossidasi). Sono tollerate solo variazioni piccole della quantità di Cu e ci sono disturbi patologici gravi, spesso ereditari, dovuti al malfunzionamento (eccesso o carenza) dei sistemi regolatori del rame (vedi dopo quando si tratta l'omeostasi del rame).

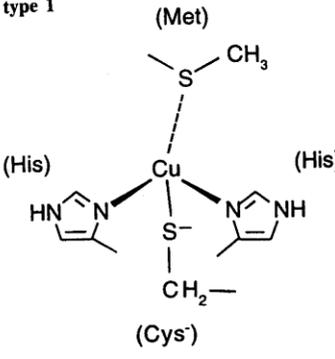
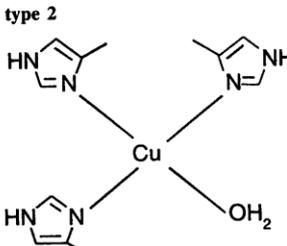
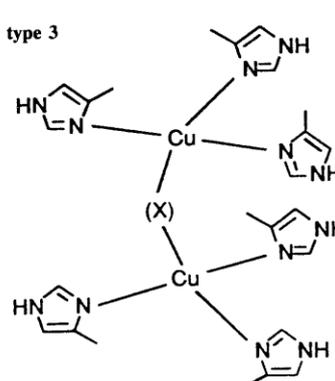
Nei sistemi biologici il rame esiste in due forme ioniche, Cu(II) e Cu(I), che sono prevalenti rispettivamente nell'ambiente extracellulare ossidante e in quello intracellulare riducente. È relativamente semplice “gestire” gli ioni Cu(II) in soluzione acquosa, poiché sono solubili e stabili grazie alla forte idratazione. Al contrario, gli ioni Cu(I) sono idratati debolmente e quasi insolubili in acqua a pH fisiologico. Inoltre, gli ioni Cu(I) tendono a disproporzionare a Cu(II) e rame metallico se non sono stabilizzati dalla formazione di complessi con leganti *soft*, e.g. leganti solforati o azoli. Per questi motivi, nell'ambiente riducente intracellulare la solubilizzazione e stabilizzazione degli ioni Cu(I) è particolarmente delicata. In soluzione acquosa il rame è un **metallo redox-attivo**. Il potenziale di riduzione della coppia Cu(II)/Cu(I) è +153 mV, ma tuttavia esso **depende fortemente dalla natura dei leganti** e dalla geometria del complesso (vedremo che nei sistemi biologici i valori di  $E^\circ$  sono compresi fra +200 e +800 mV), il che rende il rame un eccellente catalizzatore per numerose reazioni di trasferimento elettronico (lo stato di ossidazione Cu(III) viene generalmente considerato inaccessibile in quanto i potenziali redox per la coppia Cu(III)/Cu(II), quando il rame sia legato ai tipici amminoacidi, e.g. imidazolo o fenolato, sono sempre molto alti, fortemente positivi, ossia il Cu(II) è fortemente ossidante).

Per quanto riguarda la chimica di coordinazione di Cu(I) e Cu(II) ricordiamo che, oltre ad essere ovviamente Cu(I) più *soft* di Cu(II):

- Cu(I) ha configurazione elettronica  $d^{10}$  ed è quindi piuttosto indifferente alla geometria di coordinazione (no LFSE). Questa è dominata da fattori sterici e/o vincoli strutturali nel caso di leganti polidentati. La elevata flessibilità geometrica dei complessi di Cu(I) consente numerose geometrie. Anche se i complessi tetra-coordinati con geometria tetraedrica (più o meno distorta) sono i più comuni, si incontrano frequentemente anche complessi tricoordinati con geometria a T o a Y e anche complessi di-coordinati lineari. Il numero di coordinazione cinque è raro e in ogni caso tali complessi hanno almeno un legame Cu–legante che è significativamente più lungo degli altri.
- Il Cu(II) ha configurazione elettronica  $d^9$ , che in campo ottaedrico porta a notevoli distorsioni Jahn-Teller, che di solito si manifestano con una elongazione assiale. Quindi, i complessi di Cu(II) sono normalmente tetra- o penta-coordinati, con geometria planare-quadrata o piramidale quadrata. I leganti in posizione assiale hanno tipicamente legami piuttosto lunghi (2.3–2.6 Å). In tali complessi l'elettrone spaiato è localizzato nell'orbitale  $d_{x^2-y^2}$  (quello a energia più alta). Si incontra anche la coordinazione a bipiramide trigonale, nel qual caso l'elettrone spaiato occupa solitamente l'orbitale  $d_{z^2}$ . Sono comuni composti polinucleari, in cui due o più ioni Cu(II) sono connessi da leganti anionici (e.g. ossido, idrossido). Si può avere sia accoppiamento ferromagnetico che anti-ferromagnetico fra gli ioni Cu(II).

Da un punto di vista strutturale e spettroscopico si distinguono **tre tipi diversi di centri al rame** (detti di tipo 1, 2 e 3) e questi centri possono ripetersi anche parecchie volte in una proteina. Ci sono poi anche rari casi di centri al rame che non rientrano in questo schema classico, come nel caso della Citocromo c Ossidasi (vedi dopo).

**Table 10.2** Characteristics of 'classical' copper centers in protein

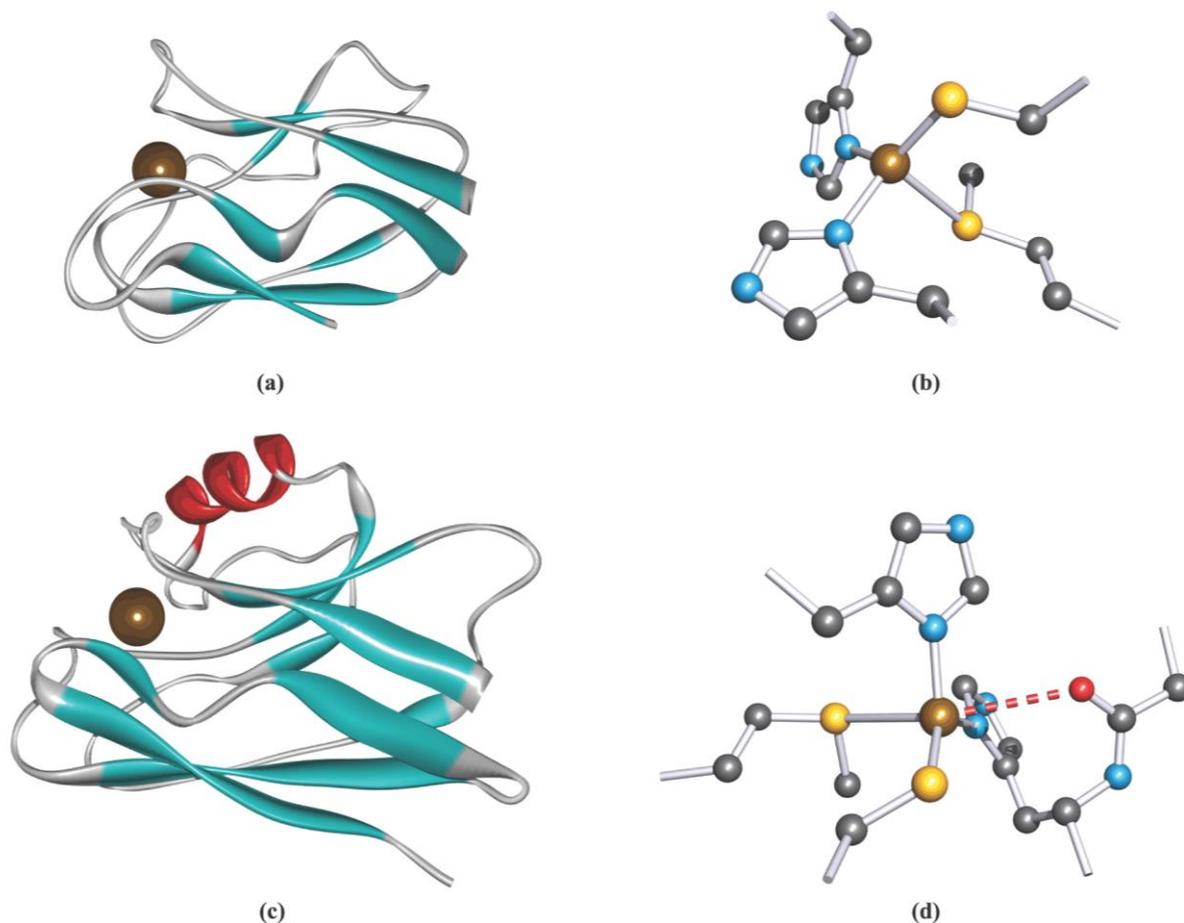
generalized coordination geometry	function, structure, characteristics
<p><b>type 1</b></p> 	<p><b>type 1: 'blue' copper centers</b>  function: reversible electron transfer  <math>\text{Cu}^{\text{II}} + e^- \rightleftharpoons \text{Cu}^{\text{I}}</math>  structure: strongly distorted, (3+1) coordination  absorption of the copper(II) form at about 600 nm, molar extinction coefficient <math>\epsilon &gt; 2000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}</math>; LMCT transition <math>\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}</math>  EPR/ENDOR of the oxidized form: small <math>^{63,65}\text{Cu}</math> hyperfine coupling and g anisotropy, interaction of the electron spin with <math>-\text{S}-\text{CH}_2-</math>; <math>\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{S}(\text{Cys})</math> spin delocalization</p>
<p><b>type 2</b></p> 	<p><b>type 2: normal, 'non-blue' copper</b>  function: <math>\text{O}_2</math> activation from the <math>\text{Cu}^{\text{I}}</math> state in cooperation with organic coenzymes  structure: essentially planar with weak additional coordination (Jahn-Teller effect for <math>\text{Cu}^{\text{II}}</math>)  typically weak absorptions of <math>\text{Cu}^{\text{II}}</math>, <math>\epsilon &lt; 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}</math>; ligand-field transitions (<math>d \rightarrow d</math>)  normal <math>\text{Cu}^{\text{II}}</math> EPR</p>
<p><b>type 3</b></p> 	<p><b>type 3: copper dimers</b>  function: <math>\text{O}_2</math> uptake from the <math>\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}</math> state  structure: (bridged) dimer, Cu-Cu distance about 360 pm after <math>\text{O}_2</math> uptake intense absorptions around 350 and 600 nm, <math>\epsilon \approx 20000</math> and <math>1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}</math>; LMCT transitions <math>\text{O}_2^{2-} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}</math>  EPR-inactive <math>\text{Cu}^{\text{II}}</math> form (antiferromagnetically coupled <math>d^9</math> centers)</p>

### Centri rame tipo 1: centri blu

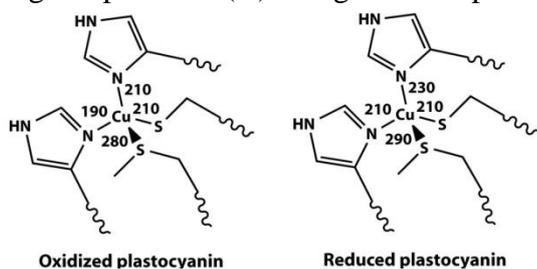
Questi centri rame di tipo 1 conferiscono alle corrispondenti proteine di  $\text{Cu}(\text{II})$  un **intenso colore blu** dovuto a un forte assorbimento intorno a 600 nm; queste proteine sono coinvolte in processi di **trasferimento elettronico long range** in batteri e piante (e.g. processo fotosintetico), molto efficienti e veloci, con velocità di trasferimento elettronico dell'ordine  $10^3\text{--}10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (rispetto a  $5 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  per la coppia  $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$  acquosa). Data la forte diluizione dei centri metallici nella matrice proteica delle metallo-proteine, solo transizioni elettroniche permesse, e quindi molto intense, possono dare origine a colori rilevabili. Ad esempio nel  $\text{Cu}^{2+}$  acquoso le transizioni  $d\text{--}d$  sono proibite e il coefficiente di estinzione è inferiore a  $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; nelle proteine blu invece è di circa  $3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Tra le **blue-copper proteins** ricordiamo in particolare **azurina** e **plastocianina**. Le plastocianine (circa 100 amminoacidi, peso molecolare circa 10500) sono presenti nelle piante e nelle alghe blu-verdi e trasferiscono elettroni fra i due sistemi fotosintetici (vedi dopo). Le azurine (circa 130 amminoacidi, peso molecolare circa 14600) si trovano in alcuni batteri e sono coinvolte in processi di trasferimento elettronico nella riduzione di  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{N}_2$ .

Strutture ai raggi X di diverse Cu-proteine blu hanno indicato che i centri Cu hanno una coordinazione **tetraedrica distorta** molto irregolare, con deviazioni anche di  $25^\circ$  rispetto all'angolo tetraedrico ideale di  $109.8^\circ$ . La figura riporta (sopra) la struttura ai raggi X della **plastocianina** da spinaci e del suo centro di  $\text{Cu}(\text{II})$ , che si trova in una tasca della catena proteica. La sfera di coordinazione del  $\text{Cu}(\text{II})$  consiste di una metionina, una cisteina e due istidine; la metionina è

coordinata piuttosto debolmente (legame Cu–S lungo) e quindi la coordinazione può essere descritta come di tipo 3+1, con le due istidine ed il cisteinato, legati fortemente, in una disposizione circa trigonale planare e la metionina in posizione assiale. Sotto è invece mostrata la struttura della **azurina** dal batterio *pseudomona putida*; anche in questo caso il centro Cu(II) è coordinato da una metionina, una cisteina e due istidine. Come nella plastocianina, anche nell'azurina la metionina è legata debolmente al Cu(II), e inoltre un atomo di O peptidico da un residuo di glicina adiacente è coinvolto in una debole interazione coordinativa. In questo caso la sfera di coordinazione può essere descritta come 3+1+1, con i tre leganti forti nel piano e i due leganti deboli assiali.



E' in particolare il legante cisteinato ad essere responsabile del comportamento spettroscopico inusuale dei centri Cu tipo 1; la banda intensa di assorbimento a circa 600 nm è attribuita a una transizione LMCT dal tiolato al Cu(II) (come nelle rubredossine era verso il Fe(III)). La forte distorsione della geometria di coordinazione deriva dall'incorporazione degli amminoacidi coordinati in sequenze molto ben conservate His–X<sub>k</sub>–Cys–X<sub>n</sub>–His–X<sub>m</sub>–Met (k grande; n, m = 2-4). In accordo con la loro funzione di trasferimento elettronico, nelle Cu-proteine blu sia il tipo di atomi donatori (2N e 2S) che l'arrangiamento fortemente distorto indicano una situazione di **stato entatico**, cioè la coordinazione del rame in queste proteine è una via di mezzo tra Cu(I), d<sup>10</sup>, che preferisce leganti *soft* come S con coordinazione tetraedrica o trigonale e Cu(II), d<sup>9</sup>, che preferisce leganti più *hard* (N) con geometria preferibilmente planare quadrata o di piramide a base quadrata.

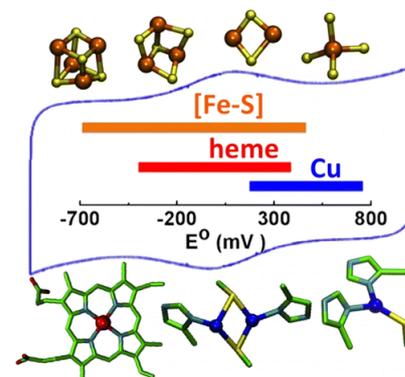


Determinazioni strutturali su plastocianina e azurina ridotte, con centri Cu(I), mostrano che la sfera di coordinazione del rame rimane invariata tranne per piccole variazioni nelle lunghezze dei legami Cu–L, che si allungano di 5 – 10 pm andando da Cu(II) a Cu(I) (figura). Le strutture delle apo-proteine sono ancora molto simili a quelle delle proteine con il rame, segno che **la geometria di coordinazione è imposta dalla**

**proteina al metallo e non viceversa.** In altre parole, la proteina, incluso il suo sito di metallazione, è fortemente preorganizzata prima di legarsi al metallo. Quindi le proteine blu del rame rappresentano un buon esempio di stato “entatico” nel quale la struttura della proteina è sufficientemente rigida da imporre costrizioni (vincoli) al centro metallico che sarebbero difficili da raggiungere con molecole meno “rigide”. Da notare infine che in entrambe le strutture vi sono tre leganti coordinati più fortemente, suggerendo che lo stato del Cu(I) è più favorito rispetto a quello con Cu(II). Questo dato è supportato dai potenziali di riduzione elevati misurati a pH 7 per plastocianina (+370 mV) ed azurina (+308 mV). (più il potenziale è alto e più il sito è ossidante, cioè viene favorita la sua forma ridotta con Cu(I)).

Le proprietà spettroscopiche tipiche delle rame-proteine di tipo 1 si possono ottenere in sistemi modello solo se il centro di coordinazione tiolato fa parte di un chelante multidentato; i tiolati semplici riducono immediatamente il Cu(II).

La figura seguente riassume i tre tipi di enzimi redox visti, due al ferro e uno al rame, con i loro tipici intervalli di potenziale. Più avanti verrà riportata una figura con maggior dettaglio.



### Centri Cu di tipo 2 e 3 in proteine che attivano O<sub>2</sub>

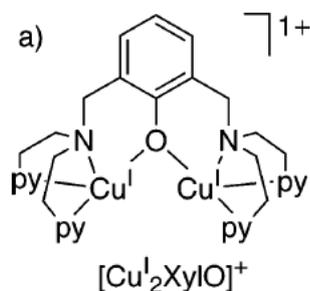
I centri di tipo 2 mostrano proprietà elettroniche e spettroscopiche tipiche del Cu(II) nei composti di coordinazione semplici, cioè non hanno nulla di inusuale. I centri di tipo 3 sono dinucleari e sono EPR inattivi nello stato ossidato (cioè appaiono diamagnetici) a causa dell'accoppiamento anti-ferromagnetico dei due Cu(II) (ognuno dei quali è d<sup>9</sup>, paramagnetico). Presentano un assorbimento a circa 330 nm. Questi centri si ritrovano in connessione con l'attivazione di O<sub>2</sub>, ad esempio nella emocianina (trasporto O<sub>2</sub>) e in diverse mono-ossigenasi (che catalizzano il trasferimento di un atomo di ossigeno da O<sub>2</sub> ad un substrato) ed ossidasi dipendenti da O<sub>2</sub> (trasferimento elettronico e catalisi). Il centro dinucleare di rame può trasferire 2 elettroni.

### Emocianina

Un centro dinucleare di **tipo 3** si trova appunto nella **emocianina**, la proteina per il trasporto di O<sub>2</sub> di molluschi (lumache, calamari) e artropodi (granchi, aragoste, gamberi, scorpioni). L'emocianina è cioè l'equivalente al rame della emoglobina, o – meglio – della emeritina. Da notare che l'emocianina si trova perlopiù in organismi che vivono in ambienti freddi e a bassa pressione di ossigeno, condizioni nelle quali l'efficienza della emoglobina per trasportare l'ossigeno è inferiore a quella della emocianina. L'emocianina è fatta da molte sub-unità proteiche, ognuna del peso di circa 75 kDa e contenente una coppia di atomi di Cu in grado di coordinare (reversibilmente) una molecola di O<sub>2</sub>. Le sub-unità si aggregano in dimeri o esameri, a seconda delle specie, e questi si aggregano a loro volta a formare catene o cluster che arrivano a pesare fino a 1500 kDa. Vi è cooperatività fra le sub-unità nella coordinazione dell'ossigeno, ma inferiore a quella osservata nel tetramero della emoglobina. A causa delle sue grosse dimensioni, la emocianina (aggregata) è libera nel sangue, al contrario della emoglobina che deve essere contenuta in cellule (i globuli rossi) perché altrimenti le sue piccole dimensioni porterebbero a intasamenti (trombi) e danni negli organi, come i reni, deputati al filtraggio del sangue.

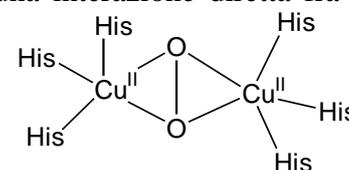
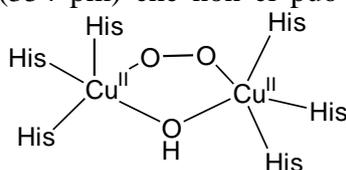
Prima delle determinazioni strutturali di desossi ed ossi-emocianina, diversi dati di tipo spettroscopico avevano dato indicazioni sulla natura del sito di legame e su come venga coordinata la molecola di O<sub>2</sub>. La forma desossi è incolore e contiene due centri Cu(I) coordinativamente insaturi, legati solo a 3 istidine ciascuno, e posti a una distanza di circa 3.5 Å. È notevole il fatto che O<sub>2</sub>, in stato di tripletto, venga coordinato molto rapidamente dai centri diamagnetici di Cu(I) (d<sup>10</sup>) presenti nelle forme desossi. La forma ossi è colorata (viola) e presenta forti bande di trasferimento di carica a 350 e 580 nm; inoltre è silente alla spettroscopia EPR, cioè non contiene elettroni spaiati (pur avendo due centri Cu(II) paramagnetici, d<sup>9</sup>, che quindi devono avere un forte

accoppiamento anti-ferromagnetico). In base a misure di spettroscopia IR ( $\nu_{\text{O-O}}$  a  $755 \text{ cm}^{-1}$ ) e Raman, si deduce che il diossigeno deve essere coordinato come perossido  $\text{O}_2^{2-}$  a ponte in **modo simmetrico** fra i due  $\text{Cu(II)}$ , o *end-on* o *side-on*. Quindi i dati spettroscopici indicano che la ossi-emocianina deve contenere il complesso simmetrico  $[\text{Cu(II)}]_2 \cdot \text{O}_2^{2-}$ . I primi modelli (figura)

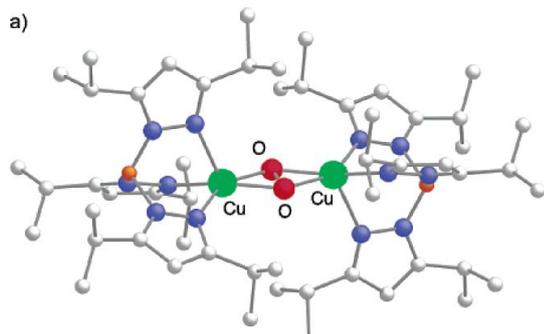


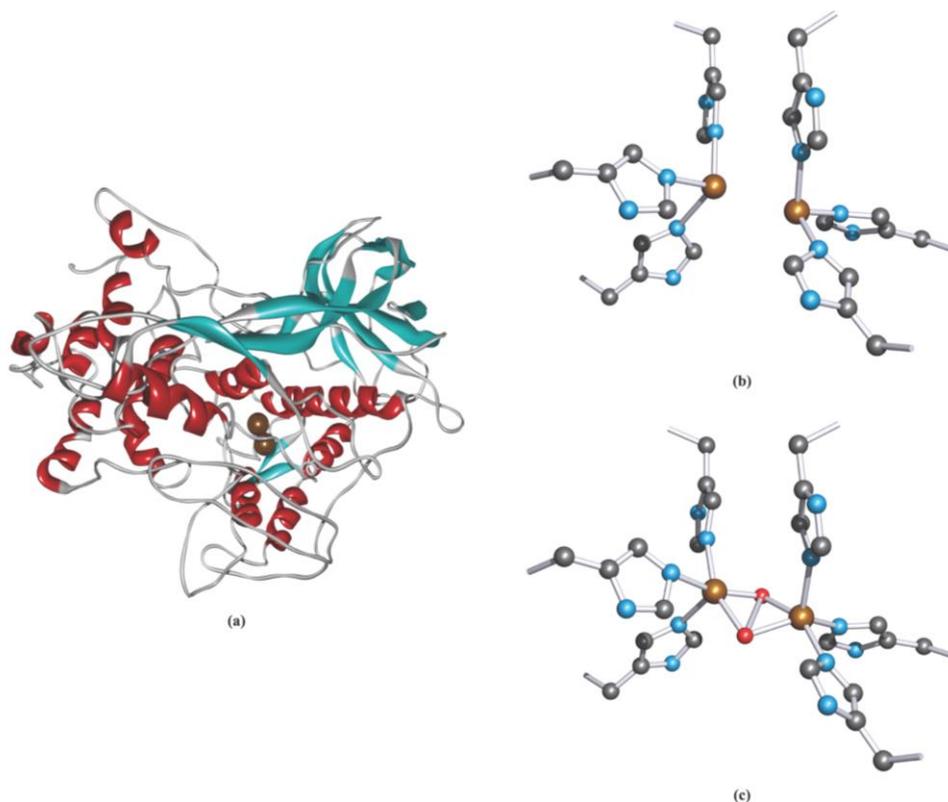
loro. In realtà questi modelli non riproducevano bene i dati spettroscopici. Un modello successivo, con  $\text{O}_2$  coordinato a ponte in modo simmetrico di tipo

*side-on* (e senza ponte aggiuntivo) (figura, il legante cappante sul Cu è il tris-pirazolborato) dava invece dati spettroscopici in miglior accordo con quelli della ossi-emocianina: in particolare il

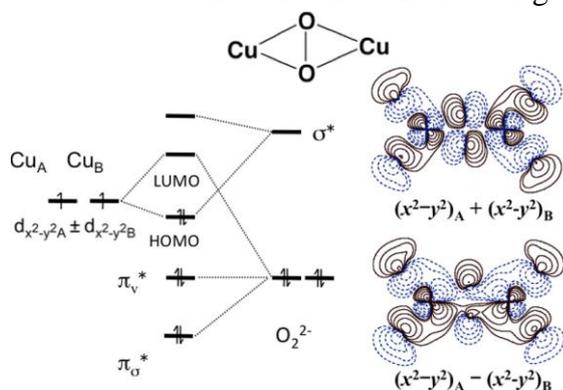


legame  $\text{O-O}$  è fortemente indebolito e il perossido stesso è il responsabile del forte accoppiamento antiferromagnetico fra i due  $\text{Cu(II)}$ . Questa inusuale coordinazione dell'ossigeno a ponte *side-on* venne poi confermata dalla determinazione della struttura ai raggi X della ossi-emocianina (figura). Da notare che nella forma desossi il  $\text{Cu(I)}$  è tricoordinato, mentre nella forma ossi il  $\text{Cu(II)}$  è penta-coordinato, cioè si rispettano le preferenze del rame nei due stati di ossidazione. La coordinazione dell'ossigeno comporta anche l'avvicinamento dei due siti rame.





La figura riporta il diagramma degli orbitali molecolari relativo al legame del perossido coordinato side-on fra i due siti Cu(II). Gli orbitali  $\pi^*$ , doppiamente degeneri (e pieni) nel perossido libero, si *splittano* in due livelli di energia in seguito al legame. L'orbitale  $\pi^*_\sigma$  è orientato secondo l'asse Cu...Cu e dà una forte interazione  $\sigma$ -legante con il LUMO del sistema 2Cu(II), la combinazione



simmetrica (somma) dei due orbitali  $d_{x^2-y^2}$  sui due ioni Cu(II). Il secondo orbitale  $\pi^*$  del perossido, ( $\pi^*_v$ ,  $v$  = verticale) è perpendicolare al legame Cu-O e interagisce solo debolmente con gli ioni Cu(II). Il legame è quindi formato essenzialmente dalla componente  $\pi^*_\sigma$  che è anche l'orbitale di partenza della intensa transizione CT a 350 nm nella ossi-Hc. Questa interazione di  $\sigma$ -donazione dal perossido ai 2Cu(II) rimuove densità elettronica dall'orbitale di anti-legame del perossido e dovrebbe fare aumentare la frequenza di stretching del legame O-O ben oltre i

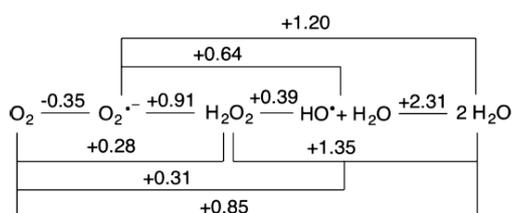
ca.  $750 \text{ cm}^{-1}$  osservati. Tuttavia c'è un'altra importante componente del legame, che opera in senso opposto. Il LUMO del perossido è il suo orbitale  $\sigma^*$ . Quando  $\text{O}_2^{2-}$  si lega *side-on* ai due Cu(II), esso può dare una interazione di legame con l'HOMO del sistema 2Cu(II), cioè la combinazione anti-simmetrica (differenza) dei due orbitali  $d_{x^2-y^2}$  sui due ioni Cu(II). Questa interazione sposta una quantità limitata di densità elettronica in senso opposto, cioè dagli ioni Cu(II) all'orbitale  $\sigma^*$  fortemente anti-legame del perossido (è una retro-donazione), inducendo una diminuzione della frequenza di stretching del perossido  $\nu_{\text{O-O}}$ .

Rimane sorprendente la reversibilità del processo di coordinazione di  $\text{O}_2$ , dati i cambiamenti di stati di ossidazione e di spin e la coordinazione multipla: infatti il *ground state* di tripletto del diossigeno deve venire convertito allo stato di singoletto, a causa dell'accoppiamento anti-ferromagnetico, di ossi-Hc, un processo formalmente spin-proibito. Secondo calcoli teorici i due elettroni vengono trasferiti simultaneamente su  $\text{O}_2$  ed è proprio il forte accoppiamento di scambio fra i due Cu(II) che

si instaura contestualmente alla coordinazione/riduzione di  $O_2$  che consente di superare la proibizione di spin del processo.

È anche molto notevole che questo ossigeno attivato a perossido non ossidi alcun substrato: si ritiene che questa assenza di reattività possa dipendere dal fatto che il sito del rame non è accessibile a potenziali substrati. Per quanto riguarda la coordinazione, è anche interessante notare che nelle tre strutture ai raggi X di proteine deputate al trasporto di  $O_2$  determinate (finora), il diossigeno è stato trovato legato al centro metallico in tre modi diversi.

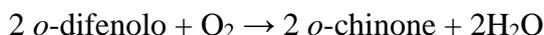
Vediamo ora esempi di **enzimi al Cu che attivano o riducono  $O_2$** . Da notare che normalmente in



questi enzimi l'attivazione di  $O_2$  richiede **almeno 2 elettroni**, dato il basso potenziale per la riduzione mono-elettronica a ione superossido. Come si vede dal diagramma di Latimer, la riduzione mono-elettronica a superossido è infatti termodinamicamente sfavorita ( $-350$  mV a pH 7.0 vs NHE). Dal momento che lo stato di ossidazione Cu(III) non è stato osservato nei sistemi biologici, fornire due elettroni richiede o la presenza di

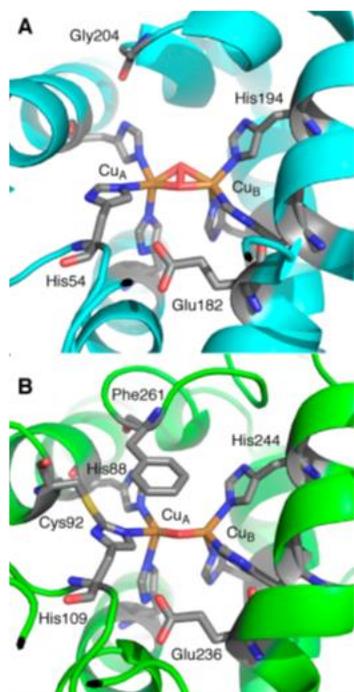
(almeno) due ioni Cu oppure di un Cu e di un cofattore organico redox-attivo (abbiamo visto invece che Fe, andando a Fe(IV), può fornire 2 elettroni).

Vi sono numerosi enzimi al Cu chiamati complessivamente **polifenolo-ossidasi** che contengono un sito catalitico con **un centro Cu di tipo 3** contenente due ioni rame a distanza ravvicinata (ca. 4 Å) accoppiati magneticamente (quindi del tutto simile a quello della emocianina) che attivano il diossigeno e catalizzano la produzione di chinoni. Ad esempio, catalizzano l'ossidazione bieletronica di *o*-difenoli a chinoni secondo la seguente reazione:



Quindi sono delle **ossidasi**, in quanto catalizzano un'ossidazione ma non c'è incorporazione dell'ossigeno nel substrato (come fanno le ossigenasi), e l'ossigeno viene ridotto ad  $H_2O$ . Esempi di enzimi di questo tipo, presenti praticamente in tutti gli organismi, sono la **tirosinasi (Ty)** e la **catecolo-ossidasi (CaOx)**, soprattutto nelle piante). Inoltre Ty (ma non CaOx) catalizza anche la conversione di fenoli a *o*-difenoli, cioè possiede anche attività di **mono-ossigenasi** (vedi dopo).

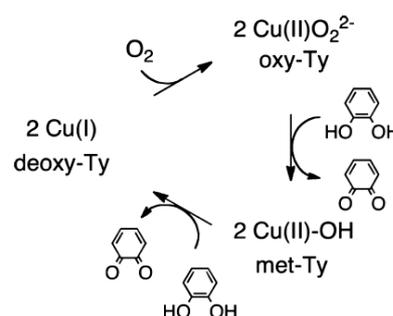
La formazione di *orto*-chinoni porta eventualmente alla formazione di **melanina**, un pigmento scuro. Nei vegetali la formazione di melanina è responsabile dell'annerimento della buccia della frutta. Negli umani la



tirosinasi catalizza la formazione dei pigmenti melaninici e della cheratina, che si trovano nella pelle e nei capelli (vedi dopo la sindrome di Menke); nei vertebrati la regolazione dell'espressione della tirosinasi è indotta da fattori ambientali, come la radiazione UV. L'inattivazione della

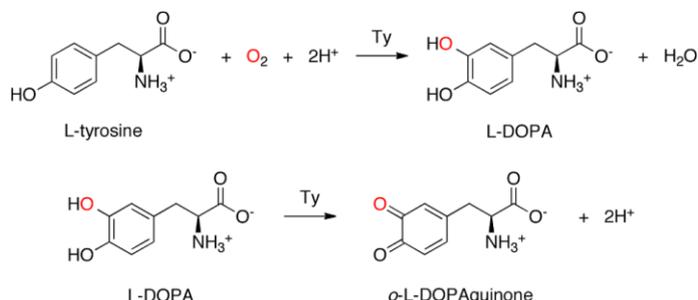
Ty causa l'ingrigimento dei capelli con l'età. La mancanza di Ty nei mammiferi genera individui albinici. Nei polipi e nelle seppie questo enzima è anche responsabile per la formazione dell'inchiostro!

Il ciclo catalitico di una catecolo-ossidasi o di Ty (quando funge da ossidasi) è riportato in figura. Sono stati individuati **tre stati**: desossi-Ty ( $[Cu^I_2]^{2+}$ ), **ossi-Ty** ( $Cu^{II}_2O_2]^{2+}$ ), e **met-Ty**, nel quale i due ioni Cu(II) sono accoppiati anti-ferromagneticamente tramite un OH a ponte. Mentre ossi-Ty è in grado di convertire sia i fenoli in *o*-difenoli (attività ossigenasica) che gli *o*-difenoli in *o*-chinoni, met-T è in grado

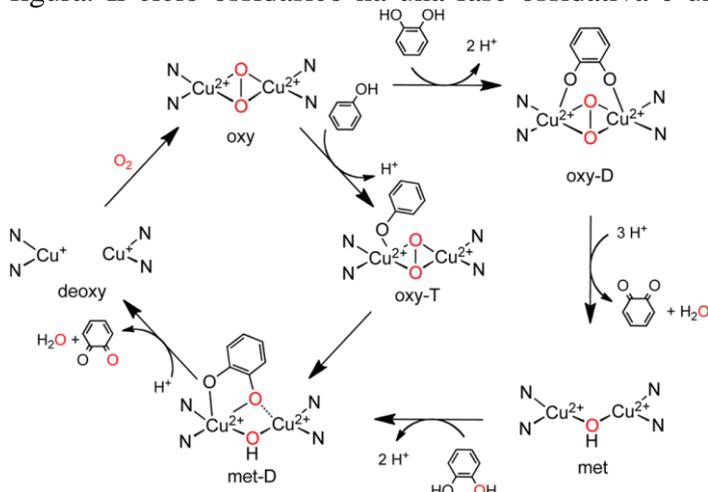


di ossidare soltanto *o*-difenoli a *o*-chinoni. Nello stato ossi-Ty l'ossigeno si lega esattamente come nella ossi-emocianina (Hc), cioè come perossido in modo  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ . La figura mostra sopra la struttura della forma ossi-Ty e sotto quella della met-Ty, con l'idrossido a ponte. Si ritiene che la diversa funzione di Hc e Ty, che pure hanno siti attivi molto simili, sia dovuta alla differente accessibilità del substrato nel sito attivo e anche alle diverse interazioni che il substrato può dare con l'intorno proteico all'interno del sito stesso.

Come già detto, Ty ha anche funzione di mono-ossigenasi su fenoli. In particolare, negli umani Ty catalizza prima l'ossidazione dell'amminoacido L-tirosina a 3,4-diidrossi-L-fenilalanina (L-DOPA), e successivamente catalizza pure l'ossidazione di L-dopa in L-DOPACHINONE (figura). Alla fine si ottengono la melanina rossa e nera, che sono responsabili del colore della pelle.



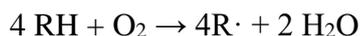
Quindi, il ciclo catalitico completo della tirosinasi è formato da due cicli interpenetrati, uno per l'attività mono-ossigenasica (ciclo interno) e l'altro per quella ossidasica (ciclo esterno), mostrati in figura. Il ciclo ossidasico ha una fase ossidativa e una riduttiva. In quella ossidativa  $\text{O}_2$  si lega a



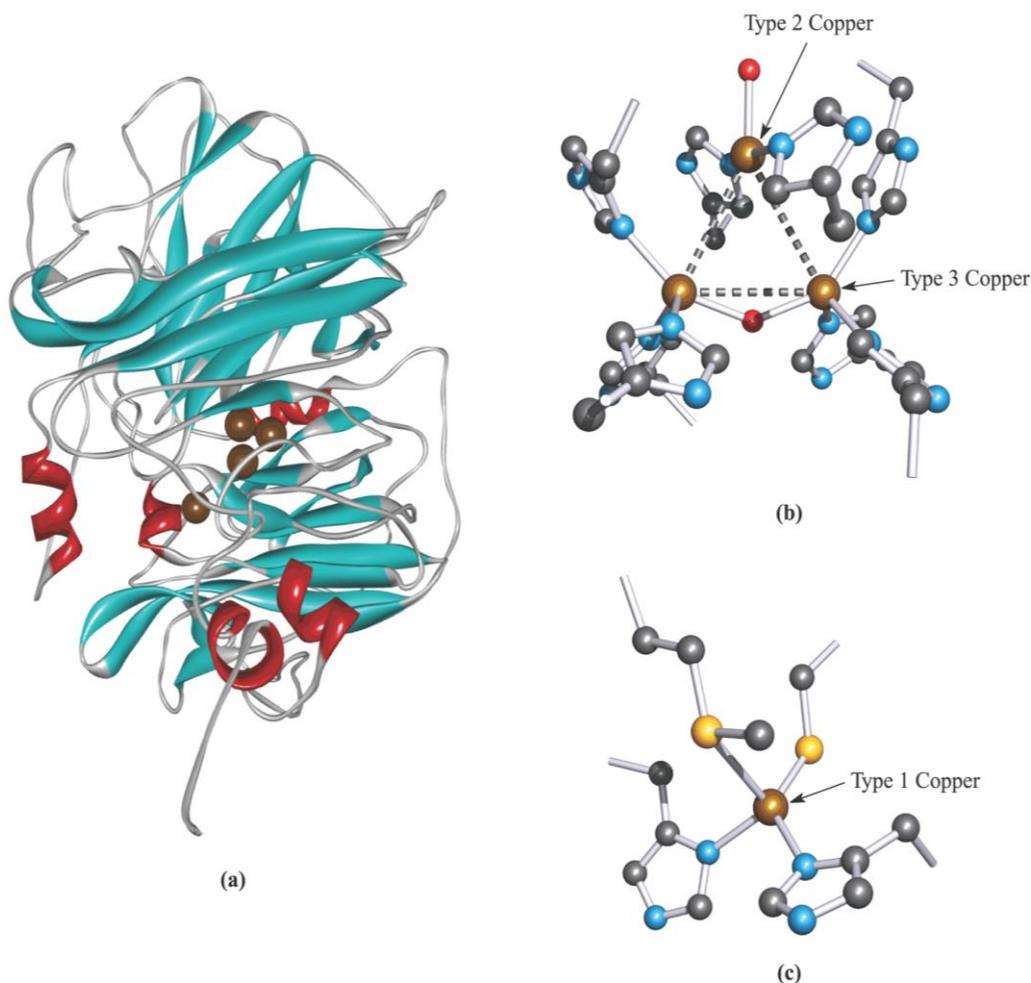
desossi-Ty, generando ossi-Ty (nel quale ciascun Cu ha ceduto, "anticipato", un elettrone a  $\text{O}_2$ ) che reagisce con l'1,2-catecolo generando lo stato chiamato ossi-D dal quale rilascia il chinone e una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$ , generando met-Ty (i due atomi di carbonio si ossidano perdendo 1 elettrone ciascuno, i 2 elettroni vanno a rompere il legame O–O ed entrambi gli atomi di O assumono numero di ossidazione  $-2$ , sia quello dell'acqua che l'idrossile). Nella fase riduttiva, la seconda molecola di catecolo si lega a met-Ty generando lo stato chiamato met-D. A questo punto il catecolo

coordinato rigenera lo stato desossi riducendo i due ioni Cu(II) a Cu(I) (ognuno dei due carboni cede 1 elettrone) ed allontanandosi come chinone. In definitiva l'enzima catalizza la riduzione a quattro elettroni del diossigeno ad acqua in due stadi bi-elettronici distinti, usando il substrato catecolo come donatore di due elettroni alla volta, senza rilasciare  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Il ciclo di mono-fenolasi (mono-ossigenasi) inizia con la formazione di ossi-Ty, che reagisce con fenolo generando lo stato detto ossi-T, che è l'intermedio chiave del ciclo anche se non è ancora stato osservato. Si ritiene (in base a dati spettroscopici) che il fenolo si coordini direttamente a un Cu(II), anziché collocarsi semplicemente nelle vicinanze del sito  $\text{Cu}_2\text{O}_2$  (come nel citocromo P450) e, in base a studi di mutagenesi, che si leghi al  $\text{Cu}_A$  (vedi struttura). Il legame del nuovo atomo di ossigeno all'anello aromatico nella specie ossi-T (in pratica una sostituzione elettrofila aromatica) richiede il trasferimento di due elettroni dal substrato nel legame  $\sigma^*$  del perossido per rompere il legame O–O e di un atomo di idrogeno. Nell'ultimo stadio altri due elettroni vengono trasferiti dal substrato ai due atomi di Cu che ritornano Cu(I). Complessivamente il fenolo fornisce 4 elettroni a  $\text{O}_2$ .

Un'altra famiglia di enzimi al rame, molto grande e diversificata, è quella delle **ossidasi blu**, o ossidasi multi-rame (**Multicopper oxidases, MCOs**). Questi enzimi di "tipo blu" con siti rame multipli (almeno 4 Cu) catalizzano l'ossidazione di vari substrati organici o metallici accoppiata alla riduzione a 4 elettroni di  $\text{O}_2$  ad  $\text{H}_2\text{O}$ , secondo la reazione complessiva:



Secondo i dati spettroscopici questi enzimi contengono tutti e tre i tipi di centri rame, come confermato anche dalla struttura ai raggi X dell'enzima **ascorbato ossidasi** da zucchini (figura).



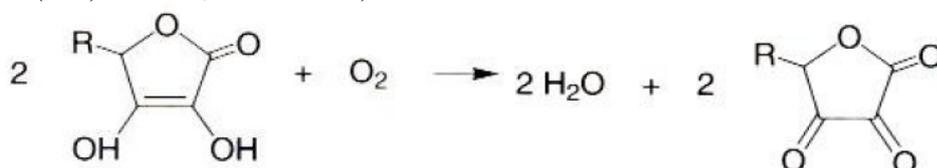
Nella struttura si osservano **quattro centri Cu(II)**, tre dei quali formano un sito a forma di triangolo isoscele, con distanze Cu...Cu di 340 pm per i due atomi del sito di **tipo 3** connessi da un ponte osso (o idrosso) e di 390 pm per le altre due. Il vertice del triangolo è un sito rame di **tipo 2**, coordinato a due istidine ed un OH<sup>-</sup> (o una molecola di H<sub>2</sub>O, indistinguibili dalla struttura). I primi due ioni Cu(II) sono accoppiati anti-ferromagneticamente tramite l'OH a ponte, mentre il terzo è magneticamente isolato. Il quarto ione Cu(II), notevolmente più lontano (> 12 Å), è un sito di **tipo 1** con una coordinazione simile a quella della forma ossidata della plastocianina: due istidine, un cisteinato (responsabile dell'intenso colore blu di questi enzimi) ed una metionina coordinata debolmente. La riduzione tetra-elettronica di O<sub>2</sub> avviene sui siti di tipo 2 e tipo 3, mentre il centro remoto di tipo 1 funge da principale accettore di elettroni, cioè **rimuove gli elettroni dal substrato organico**. I vari tipi di MCO differiscono fra loro soprattutto nel sito mononucleare di tipo 1, dove le differenze nell'intorno di coordinazione e nell'accessibilità al solvente comportano diverse specificità di substrato. Per esempio, nella posizione assiale al posto della metionina ci può essere un amminoacido non-legante, come leucina o fenilalanina, che in genere portano a potenziali redox elevati.

Su questa base, le MCO vengono divise in due classi, una – comprendente l'**Ascorbato Ossidasi** e le **Laccasi** – è composta da enzimi che ossidano una varietà di substrati organici (in genere fenolici o polifenolici, con bassa specificità di substrato) e l'altra – comprendente la **Ceruloplasmina**, la rame-ossidasi CueO (*Cuprous Oxidase*) e Fet3p – è composta invece da enzimi che hanno un'elevata specificità di substrato verso uno o due **metalli**. In generale, il Cu di tipo 1 nelle laccasi,

notevolmente esposto al solvente, è vicino al sito di *binding* del substrato; il sito è composto prevalentemente di residui idrofobici, e quindi è particolarmente accessibile a substrati idrofobici.

Le **laccasi** costituiscono il gruppo più numeroso di MCO, si trovano soprattutto nei funghi (catalizzano la degradazione della lignina delle piante), ma anche nelle piante (dove sono responsabili del cosiddetto *wound healing*, cioè in risposta a un taglio le laccasi iniziano una polimerizzazione ossidativa di catecoli che genera una “colla” che sigilla la ferita), batteri e insetti. Le laccasi hanno un sito simile a quello dell’ascorbato ossidasi, con quattro ioni Cu(II), con un centro trinucleare di tipo 2/tipo 3 ed un centro mononucleare di tipo 1. Tuttavia in questo caso il rame di tipo 1 è tri-coordinato con geometria trigonale planare a due istidine ed un cisteinato e non ha il legante assiale (cioè è ancora più vicino alle preferenze del Cu(I), in accordo con l’alto potenziale). La mancanza di questo legante è ritenuta responsabile dell’ampio intervallo di potenziale redox accessibile a questi enzimi. Le laccasi infatti operano in un intervallo di potenziale: da +500 mV per le cosiddette laccasi a basso potenziale fino a +800 mV per quelle dette ad alto potenziale.

La **ascorbato ossidasi** si trova nelle piante più evolute, ad esempio nella buccia di frutta e verdura, e, come dice il nome, catalizza con elevata selettività l’ossidazione dell’acido ascorbico (R = CH(OH)CH<sub>2</sub>OH, vitamina C):



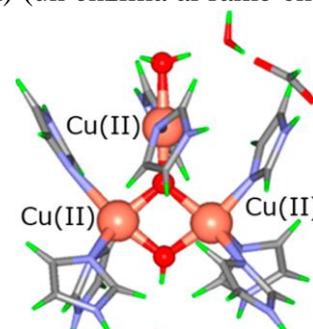
Nonostante i molti studi compiuti, la funzione biologica di questo enzima non è ancora compresa. È stato suggerito che potrebbe proteggere la polpa del frutto dall’O<sub>2</sub> e ossidare substrati fenolici a intermedi che vanno a costituire la buccia stessa. Oppure che è un meccanismo di difesa delle piante contro gli insetti. I dettagli del meccanismo non sono tuttora ben compresi. Tuttavia, come nelle laccasi, gli elettroni derivanti dall’acido ascorbico (substrato) entrano nella proteina attraverso un residuo istidinico (sulla superficie della proteina) che è un legante al centro di rame tipo 1. Gli elettroni sono quindi trasferiti rapidamente per ca. 13 Å al sito trinucleare nel quale il diossigeno è ridotto ad H<sub>2</sub>O.

Ceruloplasmina, epeptina e Fet3p sono enzimi con **attività ferrossidasica**, cioè sono in grado di ossidare Fe(II) a Fe(III) e sono quindi fortemente coinvolti nel metabolismo e nell’omeostasi del ferro (vedi più avanti). La **ceruloplasmina** è fra questi l’enzima più studiato, essendo presente nell’uomo. Oltre all’attività ferrossidasica, possiede altre proprietà fondamentali: trasporta la quasi totalità del Cu nel sangue ed ha anche attività ammino-ossidasi, cioè regola il contenuto di ammine nel sangue. La struttura ai raggi X della ceruloplasmina ha messo in evidenza che essa possiede un dominio catalitico unico, composto da 6 ioni Cu, di cui tre mononucleari di tipo 1 e uno trinucleare (tipo 3 + tipo 2).

Infine **CueO** (*Cuprous Oxidase*) è un enzima multi-rame coinvolto nell’omeostasi del rame (nei batteri). CueO ha una elevata affinità per Cu(I), che viene ossidato a Cu(II) (un enzima al rame che ossida rame!). Si ipotizza che abbia lo scopo di far diminuire la quantità di Cu(I) disponibile, che è pericoloso in quanto tramite la chimica di Haber – Weiss e Fenton può generare ROS (vedi dopo).

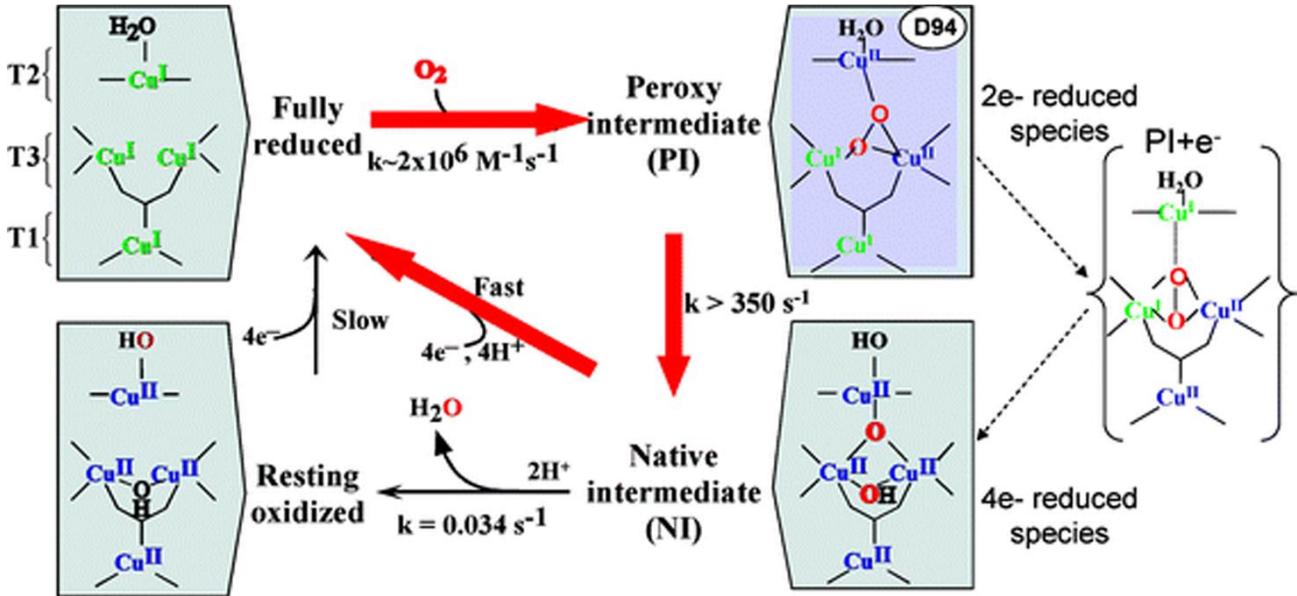
In questi enzimi metallo-ossidasi i dati strutturali mostrano che i siti rame mononucleari di tipo 1 sono molto meno esposti al solvente rispetto alle ossidasi “organiche”. Nelle vicinanze però c’è un sito esposto al solvente e ricco di residui carbossilati che si ritiene sia il sito di *binding* di Fe(II) o Cu(I): La vicinanza fra questo sito e il rame di tipo 1 dovrebbe facilitare il processo di *electron transfer* fra i due.

Per quanto riguarda il meccanismo di attivazione e riduzione di O<sub>2</sub> da parte del cluster trinucleare di Cu, studi spettroscopici e teorici suggeriscono (a partire dal *resting state*) la formazione di un



intermedio derivante dalla riduzione completa (4 elettroni) di  $O_2$ , con un  $\mu_3-O$  al centro del cluster e un  $\mu_2.OH$  aggiuntivo (figura sopra, struttura calcolata). La natura *all-bridged* di questo intermedio serve per modularne le proprietà redox e permettere il facile trasferimento elettronico dal Cu di tipo 1 a ciascuno dei tre Cu tramite l'ossigeno a ponte triplo.

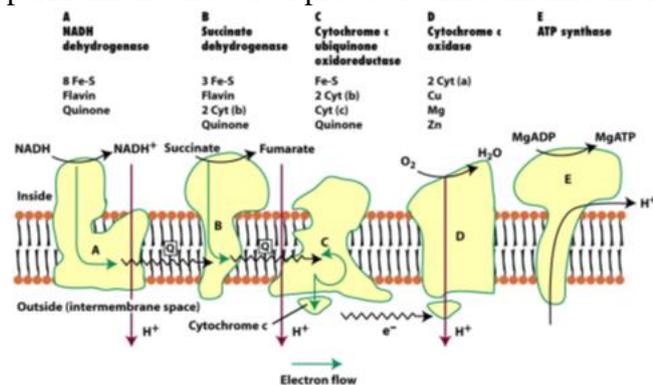
Il meccanismo complessivo, come lo si ipotizza con le conoscenze attuali, è illustrato nella figura successiva.



I quattro elettroni necessari alla riduzione completa di  $O_2$  vengono trasferiti al cluster trinucleare in **due stadi bieletronici**. Il *resting state* completamente ossidato (in basso a sinistra) deve venire inizialmente ridotto da 4 elettroni (provenienti dal substrato tramite il centro di tipo 1, T1) allo stato completamente ridotto (in alto a sinistra). Questo lega  $O_2$  che riceve 2 elettroni da parte di 2 ioni Cu, formando l'intermedio perossidico PI caratterizzato spettroscopicamente. PI riceve poi rapidamente altri 2 elettroni dai due Cu(I) rimasti che causano la rottura del legame O–O e la formazione dell'intermedio NI (*Native Intermediate*) contenente il  $\mu_3-O$  descritto prima, dove entrambi gli O del diossigeno di partenza sono stati ridotti completamente a  $O^{2-}$ , cioè al livello dell'acqua. In presenza del substrato NI acquisisce rapidamente 4 elettroni arrivando allo stato completamente ridotto ed eliminando due molecole di  $H_2O$ . In alternativa, in assenza di eccesso di substrato, NI decade lentamente al *resting state* completamente ossidato, più stabile termodinamicamente.

## Citocromo c Ossidasi

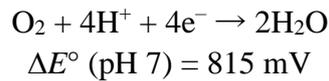
La Citocromo c Ossidasi (CcO) è un **enzima chiave nella respirazione cellulare**. Il cuore della **respirazione cellulare** è il cosiddetto processo di **fosforilazione ossidativa**, cioè la trasformazione esoergonica, ma cataliticamente controllata, dell'ossidante  $O_2$  e di composti a base di carbonio parzialmente ridotti ai prodotti termodinamicamente stabili (e a bassa energia)  $CO_2$  e  $H_2O$ . Questo



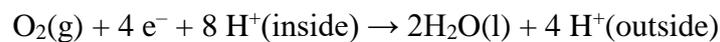
processo, spesso chiamato anche combustione fredda, è l'equivalente inverso della fotosintesi e, come essa, procede attraverso un numero di stadi redox che formano la catena respiratoria (figura). A questo processo, tramite un gradiente di protoni, è accoppiata la produzione di tre equivalenti di ATP (adenosina-trifosfato) da ADP. I processi della catena respiratoria, che avvengono nelle membrane dei mitocondri (sono processi

vettoriali, cioè la direzionalità del trasferimento di elettroni e di protoni è essenziale), comprendono numerosi composti sia organici che inorganici che fungono da **agenti di trasferimento elettronico**, a diversi potenziali redox. I più importanti componenti inorganici sono proteine al rame (che operano ad alto potenziale), proteine con centri ferro-zolfo (a bassi potenziali) e citocromi.

La CcO è un enzima rame-eme nella membrana mitocondriale che abbina la ossidazione del ferro-citocromo *c* (quello che fornisce gli elettroni, uno alla volta) alla **riduzione di O<sub>2</sub> ad acqua** (esoergonica):

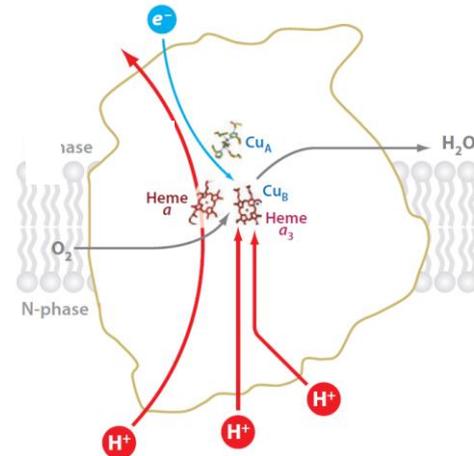


In realtà, la vera reazione catalizzata dalla CcO è più complessa:

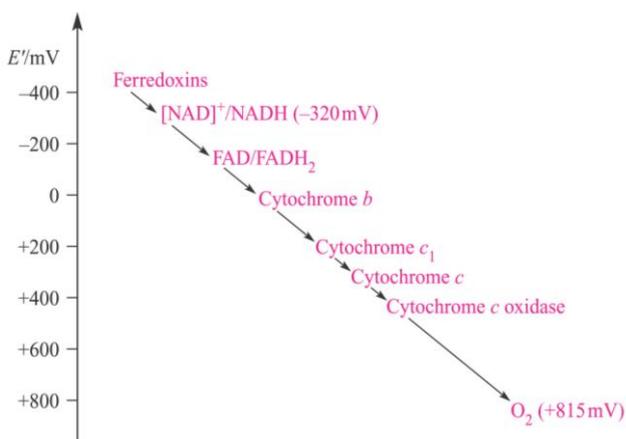


Cioè la reazione complessiva comprende anche quattro protoni che non vengono consumati chimicamente, ma vengono “pompati” attraverso la membrana **contro il gradiente** di concentrazione, cioè dal lato negativo a quello positivo. Quindi la CcO è anche una **pompa di protoni**. L’energia per pompare i protoni (che poi verrà trasformata in ATP) viene ovviamente dalla riduzione di O<sub>2</sub> (815 mV per elettrone) che, accoppiata all’ossidazione del riducente (Fe<sup>2+</sup>-citocromo *c* → Fe<sup>3+</sup>-citocromo *c* + 1e<sup>-</sup> a 235 mV), fornisce una *driving force* complessiva di 580 mV per elettrone (13 kcal/mol). Questa *driving force* anche chiamata forza “proton-motrice” (in analogia alla forza elettromotrice) viene usata per pompare i protoni attraverso la membrana mitocondriale (servono ca. 5 kcal/mol per protone). Il gradiente di protoni trans-membrana così generato porta alla sintesi di ATP.

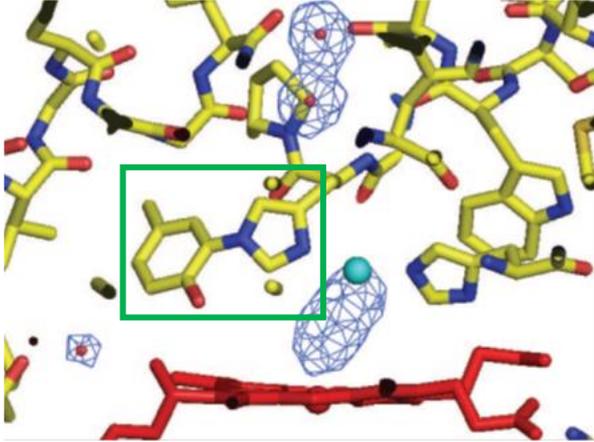
La Citocromo *c* Ossidasi è **il più ossidante fra gli electron carriers nella catena respiratoria degli eucarioti** (figura). Agendo la CcO nell’ultimo stadio nel processo di consumo di O<sub>2</sub>, essa rappresenta la controparte del cluster di Mn che produce O<sub>2</sub> nella membrana fotosintetica (vedi dopo). In entrambi i casi è richiesto un trasporto controllato, vettoriale, attraverso la membrana di elettroni e H<sup>+</sup> (un esempio di *proton coupled electron transfer*, PCET) durante i processi redox. La figura mostra una struttura schematica dell’enzima trans-membrana, con i percorsi che fanno gli elettroni (che vengono dal citocromo *c*) e i percorsi che si ritiene facciano l’ossigeno, l’acqua e i protoni. Sono state fatte diverse determinazioni strutturali ai raggi X



di CcO provenienti da diversi organismi e in diversi stati di ossidazione. Sono tutte strutturalmente molto simili. In tutti gli enzimi (che sono molto complessi, possono contenere fino a 13 sub-unità, con massa molecolare ca. 200 kDa) **la riduzione di O<sub>2</sub> avviene in un sito bimetallico rame-eme** (chiamati rispettivamente Cu<sub>B</sub> e Fe-eme citocromo *a*<sub>3</sub>), situato nella **sub-unità 1**, in cui la distanza Fe...Cu è sempre molto vicina a 5 Å. Il **citocromo *a*<sub>3</sub>** ha una sola istidina assiale, cioè è simile all’eme della

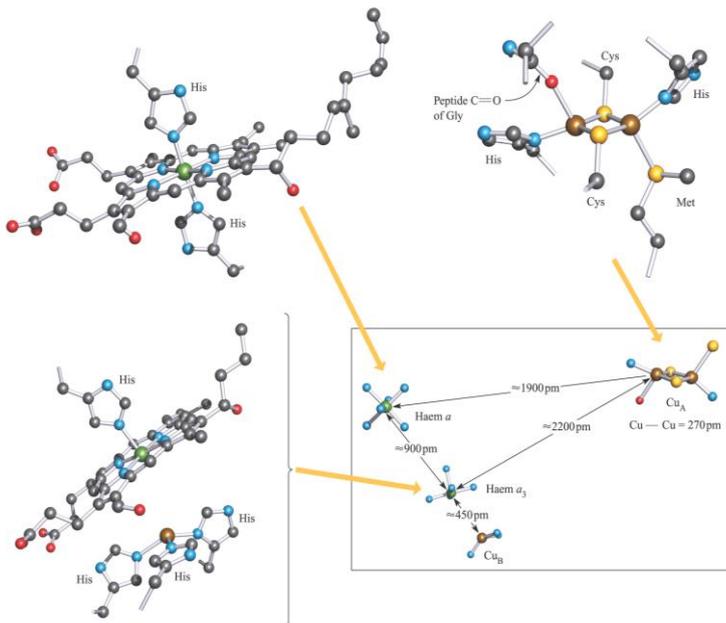


mioglobina, e **Cu<sub>B</sub>** è coordinato a tre istidine, cioè è un centro rame di tipo 2. I due metalli non sono connessi da un legante a ponte. In alcune strutture di CcO da bovini una delle istidine legate al Cu è modificata dalla formazione di un legame covalente con una tirosina adiacente (figura, riquadro verde), una modifica che sembra essere molto importante per il funzionamento dell'enzima, in quanto questa tirosina modificata potrebbe donare uno dei quattro elettroni necessari alla riduzione di O<sub>2</sub> (vedi dopo).



Oltre al sito catalitico bimetallico, dove si coordina l'ossigeno, la CcO contiene anche diversi **cofattori redox** e, in particolare, (sempre nella subunità 1) un altro Fe-eme (**citocromo a**), in cui il ferro è esacoordinato con due istidine assiali (come ci si aspetta per un sito per trasferimento elettronico) e, nella **sub-unità 2**, un centro bimetallico di rame, detto **Cu<sub>A</sub>**, in cui i due ioni rame sono coordinati a ponte da due cisteine (cioè con un *core* Cu<sub>2</sub>S<sub>2</sub> simile a quello delle ferridossine [2Fe-2S]). Questi componenti hanno essenzialmente funzioni di *electron-storage* ed *electron-transfer* dal riducente esterno, il Citocromo c, al sito catalitico. Quindi in

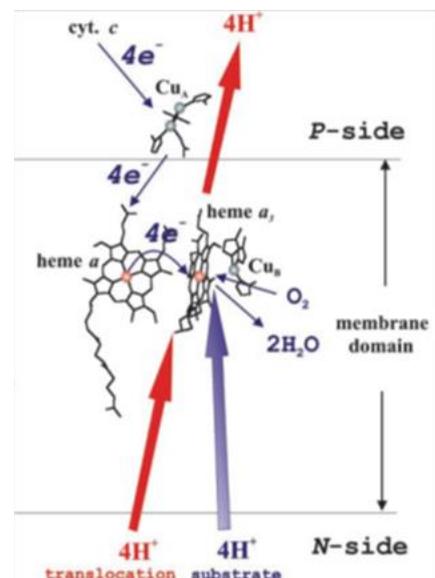
totale vi sono almeno cinque ioni metallici attivi, tre Cu e due Fe-eme, più uno Zn e un Mg che controllano il *folding* proteico.



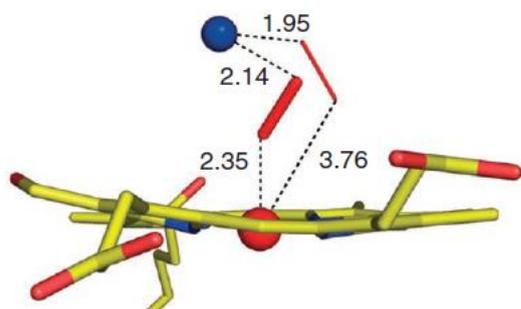
Il Citocromo a<sub>3</sub> e Cu<sub>B</sub> portano la molecola di O<sub>2</sub> attraverso i suoi 4 stadi di riduzione fino ad H<sub>2</sub>O; nel fare ciò neutralizzano 4 H<sup>+</sup> e – come già detto – pompano anche altri 4 H<sup>+</sup> attraverso la membrana (figura). Per i protoni sono stati individuati più percorsi possibili, definiti da network di legami a idrogeno fra residui amminoacidici che si “passano” i protoni. Non è ancora del tutto chiaro se i 4 protoni “substrato” e i 4 protoni “pompati” seguano lo stesso percorso o percorsi diversi. L'accoppiamento del trasferimento di elettroni con quello dei protoni (**proton coupled electron transfer, PCET**) è lo stadio più critico del funzionamento di questo enzima.

Il ciclo catalitico attualmente accettato per la riduzione di O<sub>2</sub> (figura) viene di solito descritto come una serie di stati del centro

Il centro dinucleare Cu<sub>A</sub> è il sito di ingresso degli elettroni da parte del Citocromo c. E' un centro a *valenza mista*, con la carica completamente delocalizzata, [Cu(1.5)···Cu(1.5)], in cui i due ioni Cu sono connessi da due cisteinati a ponte e sono inoltre legati a due istidine (vedi figura con struttura ai raggi X). La distanza Cu···Cu è molto corta (ca. 2.4 Å), suggerendo la presenza di un debole legame fra i due ioni metallici. Dal Cu<sub>A</sub> gli elettroni passano al centro catalitico tramite il ferro-eme a, come indicato in figura.



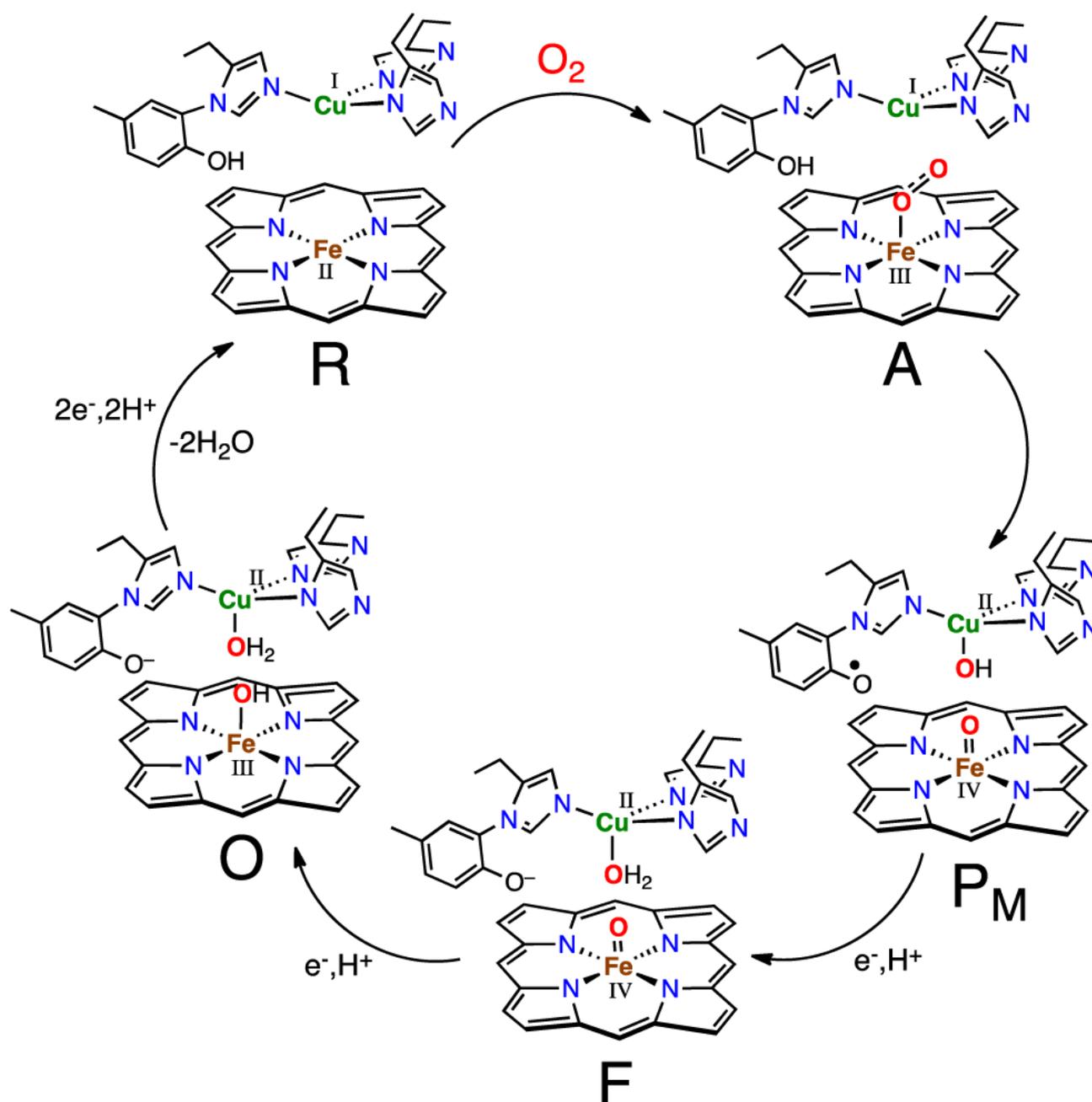
deputato alla coordinazione di  $O_2$ , formato dall'eme  $a_3$  e da  $Cu_B$ , che riceve un elettrone per volta dal donatore, cioè il Citocromo  $c$ , tramite i centri metallici  $Cu_A$  ed eme  $a$ . Nella cosiddetta “fase ossidativa”, il centro ridotto (R in figura, che contiene  $Cu_B(I)$  e  $Fe(II)-a_3$  alto spin) lega  $O_2$



formando l'intermedio A a tempo di vita molto breve. Secondo alcuni contiene perossido a ponte. Nel 2014 è stata determinata (*Nature*, 2014) la struttura (risoluzione 1.9 Å) dell'addotto con perossido,  $O_2^{2-}$ , coordinato a ponte fra  $Fe(III)$  e  $Cu(II)$  usando come sorgente un *X-ray free-electron laser* (XFEL) che non danneggia i cristalli (Figura; ci sono due molecole di perossido con orientazione diversa, una con fattore di occupazione 95% e l'altra 5%). Nella precedente

struttura con risoluzione comparabile, determinata con raggi X da sincrotrone, gli elettroni solvatati generati dai raggi X avevano ridotto il perossido per dare lo stato con due idrossidi legati, ( $Fea_3^{3+}-OH^-$ ,  $Cu_B^{2+}-OH^-$ ), con una distanza interatomica fra gli O maggiore. Non è tuttavia chiaro se quello perossidico sia un vero intermedio del ciclo catalitico o piuttosto un *resting state* ossidato. I dati spettroscopici sembrano infatti indicare che A contenga una specie mono-ridotta  $Fe(III)$ -superossido (analoga a quella di emoglobina e mioglobina). In questa ipotesi, il diossigeno deve ricevere ancora 3 elettroni nel rapido passaggio successivo.

Per l'ulteriore riduzione dell'ipotetico  $Fe(III)$ -superossido e rottura del legame  $O-O$ , arriva un elettrone dall'eme  $a_3$ , che forma la **specie eme osso-ferrile**  $Fe(IV)=O$ , uno da  $Cu_B$  che diventa  $Cu(II)$ , e l'ultimo dall'inusuale coniugato istidina-tirosina legato al  $Cu$ . Si forma così lo **stato P**, che è stato “intrappolato” e studiato spettroscopicamente (soprattutto spettroscopia EPR, Raman e di assorbimento elettronico). In P il protone che va a fare il gruppo  $Cu(II)-OH$  viene dalla tirosina. A questo punto devono essere “recuperati” i quattro elettroni. Quindi, il trasferimento di un elettrone (che va innanzitutto sul radicale organico) e di un protone genera lo **stato F**. Poi, in seguito ad un ulteriore trasferimento di un elettrone e un protone si forma lo stato ossidato “ferrico-cuprico” O, cioè  $Fe(III)$  e  $Cu(II)$ , che è lo stato in cui di solito viene isolato l'enzima. Il ciclo si completa con la fase riduttiva, nella quale due elettroni (e due protoni) vengono ancora trasferiti sul sistema eme  $a_3 - Cu_B$  che viene così ridotto allo stato R. E' stato anche dimostrato che CcO mutanti senza  $Cu_B$  mantengono la stessa velocità di electron-transfer rispetto al *wild type*, ma non catalizzano più la riduzione di  $O_2$ .



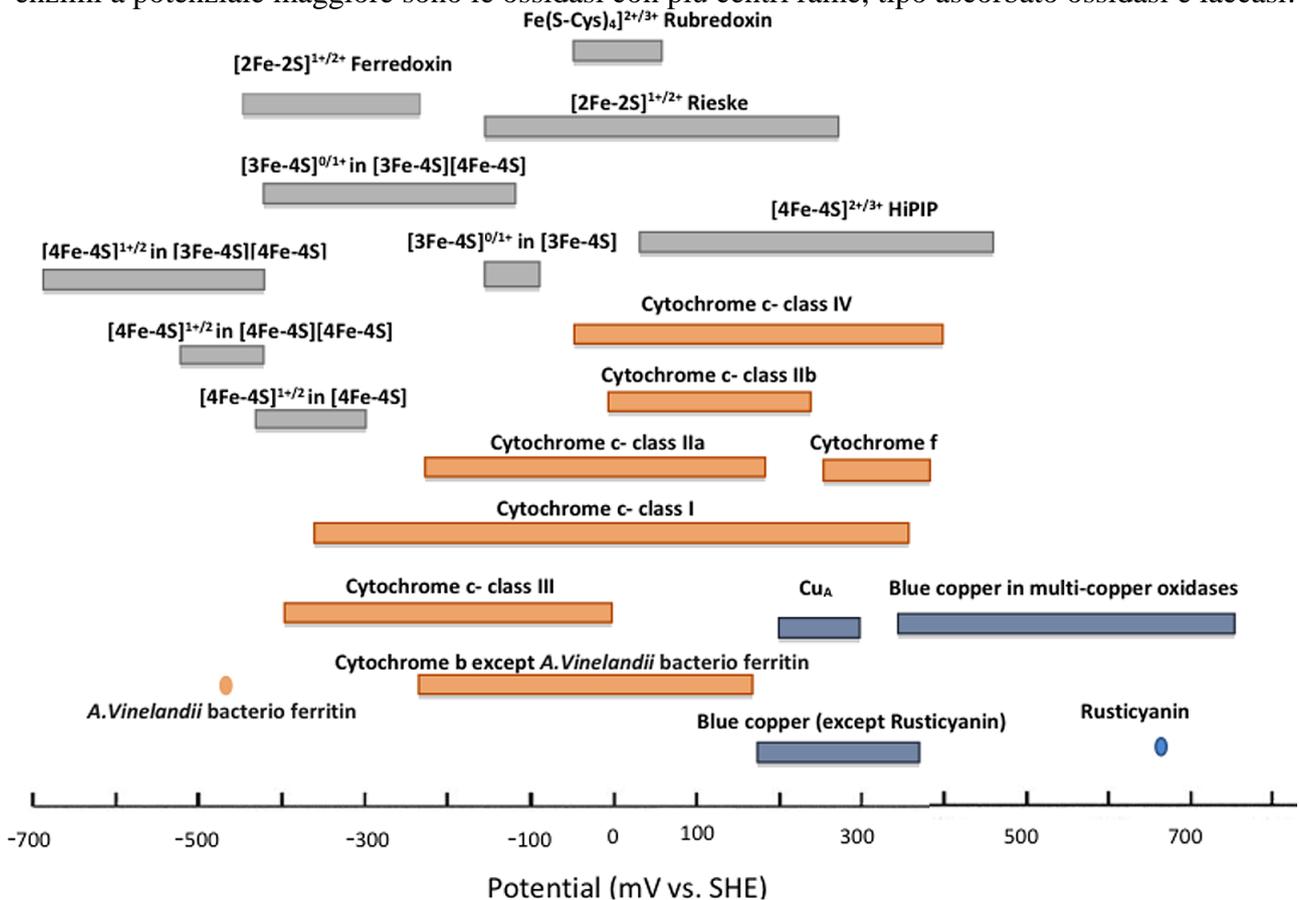
Il meccanismo di pompaggio degli altri quattro protoni, e come esso sia associato a quello di riduzione di  $O_2$ , non è ancora esattamente definito e non verrà trattato in questa sede. Si ritiene tuttavia che venga pompato un protone in coincidenza di ogni arrivo di un elettrone. Infatti, la *driving force* per il pompaggio dei protoni contro il gradiente deve essere in qualche modo collegata a variazioni di potenziali redox che avvengono in coincidenza con la riduzione di  $O_2$ .

Da notare infine che la rottura del legame O–O ad opera della CcO (passaggio da A a P) avviene entro 200  $\mu s$ , cioè con una velocità molto maggiore rispetto a quella con cui riceve un elettrone dal citocromo *c* (passaggio da P ad F, 5–20 ms). Questa differenza di velocità presumibilmente serve a minimizzare il tempo di vita di intermedi catalitici contenenti specie di ossigeno parzialmente ridotto, e quindi la possibilità che tali specie pericolose vengano rilasciate nell'ambiente cellulare. La riduzione tetra-elettronica di  $O_2$  procede così rapidamente che la maggior parte degli studi meccanicistici sono stati fatti a bassa temperatura e con spettroscopie *time-resolved*.

L'avvelenamento da cianuro avviene perché  $\text{CN}^-$  si coordina molto fortemente al Fe(III) pentacoordinato del citocromo  $a_3$ , con una posizione assiale libera per coordinare  $\text{CN}^-$ ; il  $\text{CN}^-$  invece non ha una grande affinità per il ferro della emoglobina, al contrario del CO.

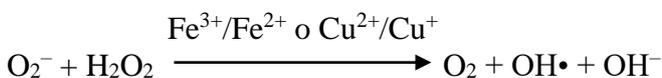
A conclusione di questa parte notiamo che le ossidasi, che catalizzano la riduzione a 4 elettroni di  $\text{O}_2$  ad  $\text{H}_2\text{O}$  sono degli enzimi unici, in quanto riescono a compiere questa reazione **in un solo stadio**, suggerendo che la barriera energetica per la seconda riduzione bi-elettronica del perossido prodotto dal primo stadio bi-elettronico deve essere molto bassa. Questo richiede o la presenza di un cluster trinucleare (nelle ossidasi multi-rame, tipo ascorbato-ossidasi) oppure il sistema Cu/tirosina/Fe-eme (nella Citocromo c ssidasi).

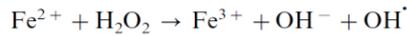
La figura successiva riassume, in dettaglio, gli intervalli di potenziali redox dei vari enzimi di trasferimento elettronico che abbiamo visto finora. Si notino gli elevati potenziali delle HiPIPs. Gli enzimi a potenziale maggiore sono le ossidasi con più centri rame, tipo ascorbato ossidasi e laccasi.



## ROS e metalli redox

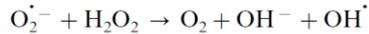
Gli ioni rame e ferro – metalli redox – possono anche originare reazioni indesiderate con derivati dell'ossigeno. Il perossido di idrogeno e il radicale superossido sono i più importanti derivati dell'ossigeno che possono interagire con metalli redox-attivi come il ferro e il rame. Nel 1934 Haber e Weiss presentarono la reazione che regola la conversione di perossido di idrogeno e superossido (che vengono prodotti da ogni cellula aerobica come sottoprodotti della respirazione) e porta alla generazione del radicale idrossile altamente reattivo. In realtà questa reazione è estremamente lenta, ma può venire catalizzata da parte di metalli redox-attivi:





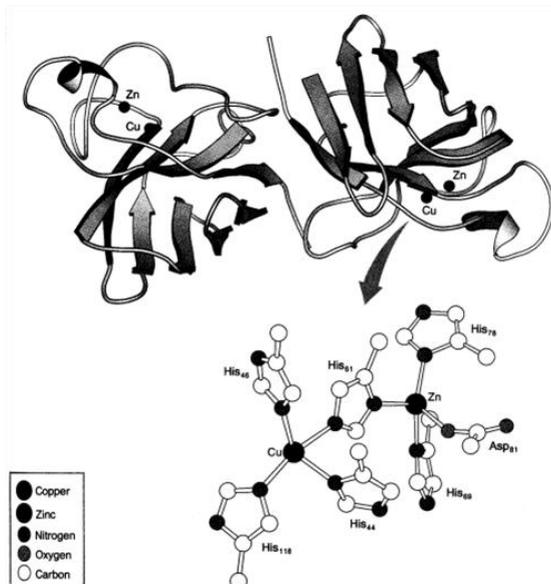
(Fenton reaction)

The net reaction:

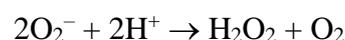


Il radicale idrossile ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) è il ROS (*Reactive Oxygen Species*) più reattivo, tanto da venir definito HROS (*Highly Reactive Oxygen Species*). La reazione di Haber-Weiss può generare anche un altro HROS, cioè l'ossigeno di singoletto  $^1\text{O}_2$ . Il radicale idrossile è un ossidante potente e non-selettivo, che reagisce a velocità diffusionale praticamente con qualsiasi tipo di biomolecola, DNA incluso, e può estrarre idrogeno da qualsiasi molecola organica. Come altri radicali può inibire la funzionalità di componenti cellulari, come lipidi o proteine in membrane, o il DNA nei mitocondri e nei cromosomi. Al contrario di  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $^1\text{O}_2$  (ossigeno di singoletto), il radicale idrossile è anche in grado di modificare tutte le basi del DNA e di causare rottura dei filamenti del DNA in seguito a degradazione del ribosio. Questo porta a errori di trascrizione, espressione incorretta dei geni e a mutazioni. In tutti i sistemi biologici c'è un delicato equilibrio tra la formazione di ROS e la loro rimozione da parte di diversi sistemi antiossidanti. La sovra-produzione di ROS o l'indebolimento dei sistemi antiossidanti porta come conseguenza all'aumento del danno ossidativo a carico di svariate biomolecole, cioè quello che è il *background* del cosiddetto **stress ossidativo**. È stato dimostrato che l'accumulo di danni ossidativi in condizioni di stress ossidativo normale è il più importante fattore del normale invecchiamento e che danni indotti dallo stress ossidativo sono coinvolti nella patogenesi di molti disturbi neurodegenerativi, così come nell'arteriosclerosi, il diabete e altri disturbi connessi con l'età. I sistemi biologici hanno creato un intero apparato di **sistemi antiossidanti**, che sono essenziali per il normale funzionamento e per la sopravvivenza degli organismi aerobici. La difesa anti-ossidativa comprende sia la riduzione della concentrazione intracellulare degli anioni superossido e perossido da parte di enzimi antiossidanti onnipresenti, come superossido-dismutasi (SOD, vedi dopo), catalasi e glutazione perossidasi, sia il *quenching* dei HROS da parte di anti-ossidanti a basso peso molecolare (e.g. la vitamina C (acido ascorbico) e il glutatione nel citosol e le vitamine C ed E nei lisosomi, e anche nutrienti provenienti dal cibo). Inoltre, la soppressione della reattività di Fenton/Haber – Weiss può essere ottenuta anche abbassando il livello degli ioni metallici redox-attivi “liberi” che fungono da catalizzatori per tale reazione. Questo aspetto verrà trattato più avanti, nella sezione sull'omeostasi del rame.

## Superossido dismutasi



Gli enzimi superossido dismutasi (**SODs**) catalizzano la disproporzione (dismutazione) del radicale superossido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , tossico, a  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e sono quindi i **principali enzimi detossificanti dei ROS della cellula**. Come già visto, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  che si forma in questo processo può disproporzionare ulteriormente ad  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  in reazioni catalizzate da catalasi, oppure può venire utilizzata da enzimi perossidasi, tipo glutazione perossidasi.



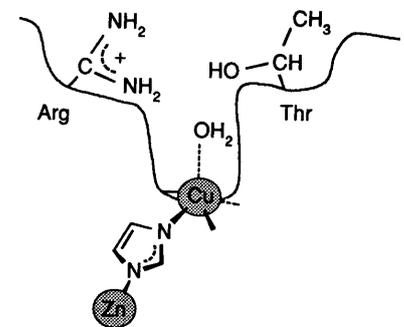
La cellule degli eucarioti esprimono tre tipi di SOD, codificati da geni separati. La SOD contenente rame e zinco (**CuZnSOD, SOD1**) è un omodimero localizzato principalmente nel citoplasma.

La SOD extracellulare (ECSOD) condivide una significativa omologia aminoacidica con la CuZnSOD (40-60%), contiene sia rame che zinco nel suo sito attivo, ma è localizzata nella regione extracellulare della cellula. La **MnSOD** è un omotetramero localizzato esclusivamente nella matrice mitocondriale (vedi dopo nel capitolo sul Mn).

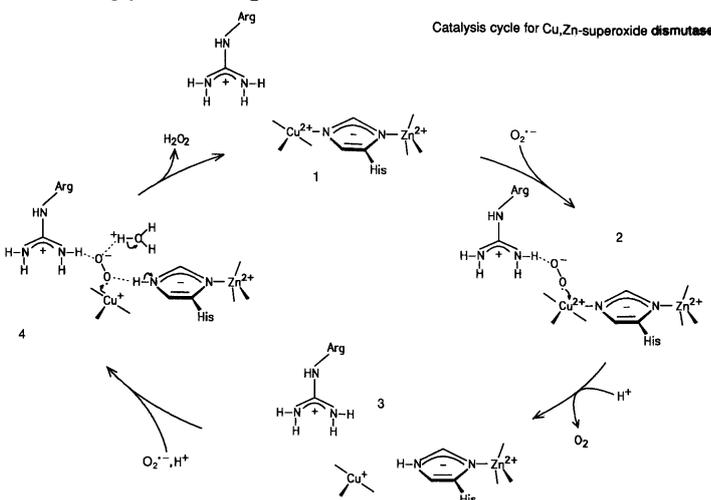
Considerando la metastabilità e reattività del radical-anione  $O_2^{\bullet-}$ , non sembra esserci motivo per avere un catalizzatore specifico per la sua dismutazione. Tuttavia, in condizioni fisiologiche, la dismutazione di  $O_2^{\bullet-}$  (che viene prodotto – per errore – in piccole quantità come sottoprodotto di riduzione mono-elettronica di  $O_2$  in processi che in realtà prevedono la riduzione bi- o tetra-elettronica, ad esempio proprio dalla Citocromo c Ossidasi appena trattata) deve procedere molto rapidamente, al limite della velocità di diffusione, per prevenire ossidazioni incontrollate da parte di questo radicale o dei suoi prodotti di reazione (ROS) con ioni metallici (chimica di Fenton). Lo ione superossido è stato associato a stati patologici come l'artrite e il morbo di Alzheimer; inoltre può produrre radicali  $\cdot OH$  (HROS), che sono ancora più dannosi. Mutazioni ereditarie che portano al malfunzionamento dell'enzima superossido dismutasi possono portare alla malattia neuro-degenerativa fatale nota come SLA (sclerosi laterale amiotrofica).

Uno dei principali requisiti delle SOD è che devono **resistere al loro aggressivo substrato**  $O_2^-$ , e anche ai prodotti  $O_2$  e  $O_2^{2-}$ . La SOD più importante è molto abbondante negli **eritrociti** (globuli rossi) e contiene Cu e Zn. La **Cu,ZnSOD** è relativamente piccola ed è stata ben caratterizzata strutturalmente. Essa è composta da **due subunità**, ognuna di 16 kDa e contenente 1 Cu ed 1 Zn con un imidazolato di un'istidina a ponte. Gli altri leganti sono 3 His per il Cu e 2 His ed un aspartato per lo Zn. La geometria di coordinazione per entrambi i metalli è di **tetraedro distorto**, e la distorsione è maggiore per il Cu che per lo Zn. Un sito di coordinazione addizionale per  $O_2^-$ , occupato temporaneamente da una molecola d'acqua labile, è inoltre presente sul **Cu, sito cataliticamente attivo**, che può essere in realtà considerato come possedere una geometria di **piramide a base quadrata** (figura sotto).

Un probabile ciclo catalitico è riportato in figura. Il centro redox-attivo, il Cu, deve essere in grado di ossidare  $O_2^-$  in uno stato di ossidazione e di ridurlo nell'altro stato. Si pensa che  $O_2^-$  venga ossidato ad  $O_2$  dalla specie con Cu(II) (**1**), nella quale il Cu(II) si riduce a Cu(I). A questo punto un protone può rimpiazzare il Cu(I) legato all'imidazolato per dare un complesso di Zn con istidina (**3**). Poi il Cu(I) coordinativamente insaturo, che è ancora ancorato alla proteina dalle altre istidine, può venire ossidato da una seconda molecola di  $O_2^-$  legata tramite legami a idrogeno, formando così l'idroperossido basico che viene quindi protonato, presumibilmente ad opera dell'imidazololo coordinato allo Zn (che torna a mettersi a ponte) e trasformato in  $H_2O_2$ .

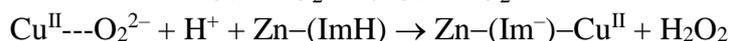
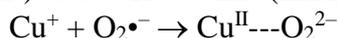
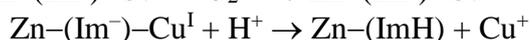
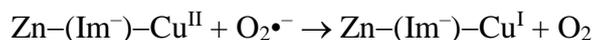
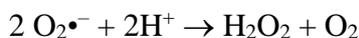


La *driving force* di quest'ultima reazione risiederebbe nell'affinità del Cu(I) per l'azoto imidazolico dell'istidina. Il ruolo dello Zn sembra essere quello di stabilizzare la struttura della proteina, dal momento che se viene rimosso l'attività catalitica enzimatica decresce di poco. L'alta concentrazione di Cu,ZnSOD nei globuli rossi ha fatto anche supporre che sia essenzialmente una proteina di *storage* del rame e che l'attività di dismutazione sia solo secondaria. La velocità estremamente elevata, quasi diffusiva, con la quale funziona l'enzima (praticamente ogni collisione



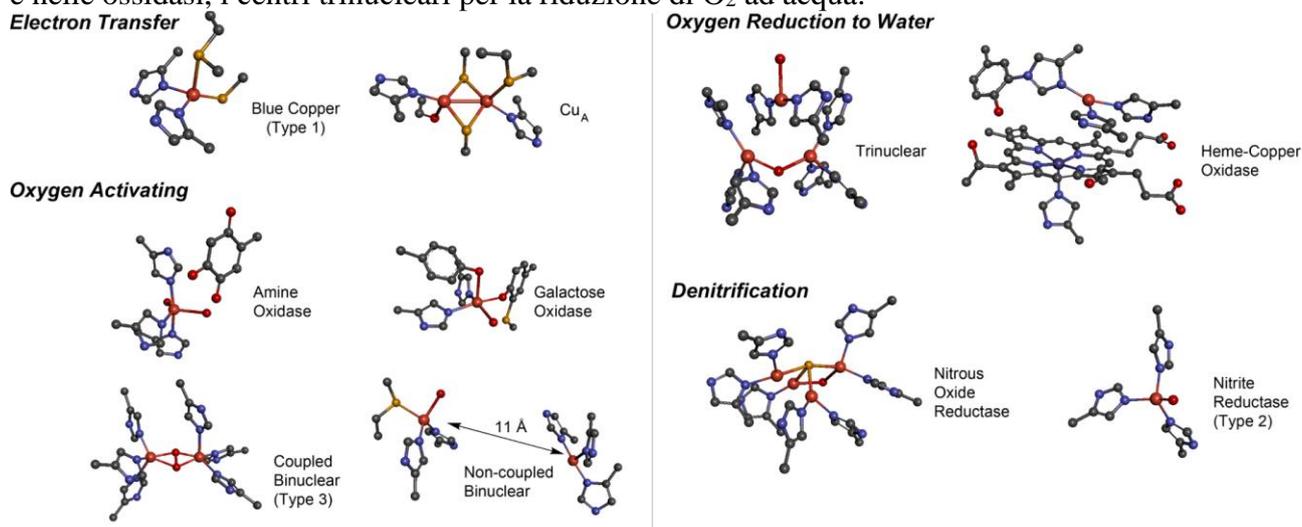
fra enzima e  $O_2^{\bullet-}$  dà origine ad una conversione in prodotti) è fortemente assistita da interazioni elettrostatiche che portano l'anione  $O_2^{\bullet-}$  all'interno della proteina lungo un canale a imbuto lungo 1 – 2 nm (figura precedente). Vicino al sito di reazione,  $O_2^{\bullet-}$  viene posizionato correttamente dal gruppo guanidinico positivo di un residuo argininico.

Si può scrivere il seguente meccanismo per la reazione complessiva catalizzata dalla Cu,ZnSOD:



In realtà  $O_2^{\bullet-}$ , pur essendo in apparenza un prodotto naturale tossico, può venire utilizzato – e persino prodotto deliberatamente – dagli organismi per scopi particolari. I globuli bianchi, ad esempio, che sono componenti essenziali nel sistema immunitario degli organismi superiori, producono grandi quantità di superossido e suoi derivati, come  $H_2O_2$  e  $ClO^-$ , per uccidere micro-organismi invasori. Tuttavia questo potente sistema di difesa può funzionare male, originando malattie auto-immuni tipo artrite reumatoide.

La figura finale riassume alcuni esempi di siti attivi in Cu-enzimi (non tutti descritti nel corso), evidenziando i centri rame di tipo 1, 2 e 3. Riconosciamo quelli per *electron transfer* nelle *blue copper proteins* e il centro binucleare  $Cu_A$  nella CcO, il centro binucleare di tipo 3 nella emocianina e nelle ossidasi, i centri trinucleari per la riduzione di  $O_2$  ad acqua.



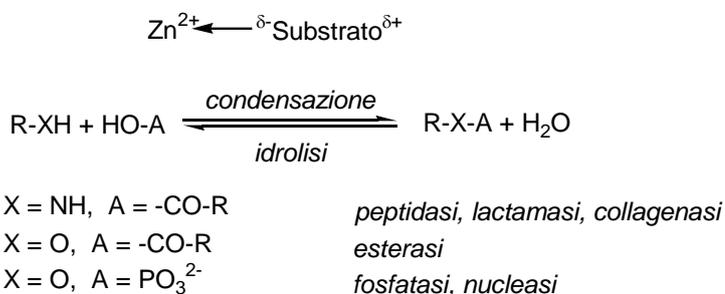
## Zinco

Lo zinco è il secondo bio-elemento più abbondante (dopo il ferro), con circa 2 g per 70 kg di peso nell'organismo umano. In condizioni fisiologiche lo zinco si trova esclusivamente come  $Zn^{2+}$ , non è redox-attivo, è diamagnetico ( $d^{10}$ ) e dà complessi incolori (quindi non è molto facile da studiare dal punto di vista spettroscopico).

La concentrazione complessiva di zinco nelle cellule è in un intervallo piuttosto stretto, 0.1 – 0.5 mM, a seconda del tipo di organismo. Questa similitudine generale fra cellule diverse in organismi diversi suggerisce che lo zinco abbia un ruolo comune nella biochimica cellulare in tutti gli organismi. La gran parte dello zinco si trova legato a proteine, che costituiscono lo **zinco-proteoma**. Al giorno d'oggi si conoscono più di 200 differenti zinco-proteine; esse includono enzimi essenziali che catalizzano conversioni metaboliche (sintasi, polimerasi, ligasi, transferasi) o degradazione (idrolasi) di proteine, acidi nucleici, lipidi, precursori di porfirine e altri importanti composti bio-inorganici. Inoltre, in molte proteine lo zinco ha funzioni strutturali, cioè stabilizza

certe conformazioni o anche complessi ormone/recettore. Esistono numerose patologie da carenza di zinco, mentre c'è una ampia tolleranza alla assunzione di dosi elevate prima di avere sintomi da avvelenamento.

Da un punto di vista chimico la funzione biologica più evidente dello ione  $Zn^{2+}$  risiede nella sua **acidità di Lewis**, cioè la capacità di catalizzare reazioni di condensazione e (in senso opposto) di idrolisi a pH fisiologico polarizzando i substrati, compresa l' $H_2O$ .



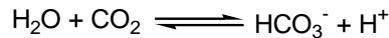
Nella sintesi chimica classica queste reazioni sono di solito catalizzate da acidi o basi forti in condizioni però che, tranne che per i fluidi gastrici, non sono fisiologiche. L'alternativa è quella di usare un agente elettrofilo polarizzante, cioè un catione metallico con una carica effettiva piuttosto elevata. Inoltre lo  $Zn^{2+}$  può anche attivare l' $H_2O$  coordinata (che è comunque molto labile), a un pH che nelle proteine può essere anche molto vicino a 7, generando la specie  $[Zn-OH]^+$ , che è una base di Lewis (cioè un nucleofilo). Lo ione idrossido coordinato al metallo è meno nucleofilo di  $OH^-$  libero, ma decisamente più nucleofilo di  $H_2O$ . Quindi, a pH neutro o leggermente alcalino, la piccola diminuzione di nucleofilicità dell'idrossido coordinato rispetto a quello libero è più che compensata dalla maggiore concentrazione delle specie reattive disponibili (cioè  $[Zn-OH]^+$  rispetto a  $OH^-$ ). Abbiamo visto che in certi enzimi il Mg(II) (e.g. idrolisi ATP, Rubisco) o il Fe(II) (fosfatasi acida), o ancora il Ni(II) (ureasi) si comportano come acidi di Lewis similmente allo Zn.

Come il  $Cu^{2+}$ , lo  $Zn^{2+}$  forma legami di coordinazione inerti con l'istidina, ma coordina anche cisteinati, cioè  $S^-$ , e glutammati, cioè  $O^-$ . Lo  $Zn^{2+}$  non è redox-attivo e, a causa della configurazione elettronica  $d^{10}$  non possiede *ligand-field stabilization energy* e gli effetti di polarizzazione sono isotropi, cioè non diretti spazialmente. Questo significa che Zn(II) ha **numeri di coordinazione e geometria piuttosto flessibili**. Può infatti avere numeri di coordinazione 4, 5 o 6, e non ha una marcata preferenza per nessuno di essi; di conseguenza l'interconversione fra diversi numeri di coordinazione, soprattutto fra 4 e 5, avviene facilmente. Il numero di coordinazione preferito è determinato dal bilanciamento fra le energie di legame e la repulsione (sia sterica che elettronica) fra i leganti. Negli enzimi lo zinco ha solitamente numero di coordinazione minore di 6, in modo da avere siti di coordinazione disponibili. Il substrato può coordinarsi allo zinco o aumentandone il numero di coordinazione o sostituendo una molecola d'acqua che quasi sempre si trova nella sfera di coordinazione nel *resting state*. Date le caratteristiche dello zinco, entrambe queste possibilità avranno bassa energia di attivazione.

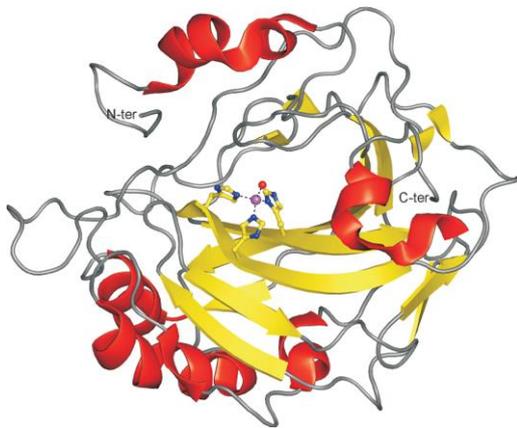
Vediamo ora in maggior dettaglio alcuni importanti enzimi contenenti zinco nel sito attivo.

## Anidraasi carbonica

Quella dell'anidraasi carbonica (CA) è una famiglia di metallo-enzimi ubiqui, presenti nella maggior parte degli organismi viventi, che catalizza l'equilibrio di idrolisi per la CO<sub>2</sub>:



Questa reazione, che normalmente procede piuttosto lentamente, viene accelerata enzimaticamente di un **fattore 10<sup>7</sup>** (con gli enzimi più efficienti, cioè da  $k \approx 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  a  $10^6 \text{ s}^{-1}$ ). Le anidraasi carboniche sono enzimi biologicamente molto importanti, che hanno un ruolo essenziale in processi come la fotosintesi (*uptake* efficiente di CO<sub>2</sub>), la respirazione (rapida rimozione della CO<sub>2</sub>) e nel controllo del pH (tampone). Le forme cosiddette  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\delta$ -CAs contengono uno ione Zn(II) nel sito attivo.



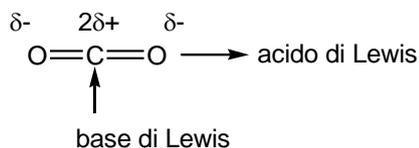
Tutte le anidraasi carboniche umane appartengono alla classe  $\alpha$ . Finora sono state identificate 12 isoforme cataliticamente attive che differiscono per attività catalitica, localizzazione a livello cellulare (e.g. citosol, mitocondri, trans-membrana) e per la distribuzione a livello di organi e tessuti. Nei globuli rossi umani, per esempio, una forma di anidraasi carbonica (CA II) è la proteina più abbondante dopo l'emoglobina. Inoltre vi sono tre isoforme non catalitiche.

La CA umana (CA II) è composta da 259 amminoacidi, con un peso molecolare di circa 30 kDa (figura) ed ha grossomodo la forma di un pallone da rugby. Il sito attivo

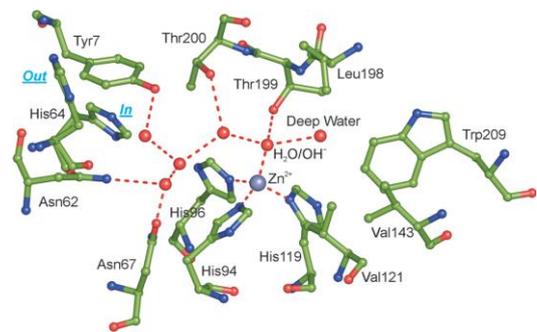
è posto in una cavità di forma conica e piuttosto ampia, larga circa 12 Å e profonda 13 Å, che va dalla superficie dell'enzima al suo centro. Al fondo di questa cavità, che contiene regioni idrofile e lipofile, si trova il sito attivo, lo Zn<sup>2+</sup> che è esposto al solvente ed ha **coordinazione tetraedrica**. Lo

zinc è coordinato a tre istidine e ad una molecola di acqua/idrossido (figura). Il legante OH<sub>2</sub>/OH è impegnato in un **network di legami a idrogeno**, sia a molecole d'acqua che a residui amminoacidici, in particolare alla adiacente treonina-199 (conservata in tutte le isoforme catalitiche) che ne aumenta la nucleofilicità. Anche le altre isoforme di CA sono strutturalmente molto simili, come immaginabile in base al confronto delle sequenze amminoacidiche molto simili.

Essendo CO<sub>2</sub> una molecola senza momento di dipolo permanente, la sua attivazione richiede l'attacco combinato di un acido di Lewis all'ossigeno e di una base di Lewis al carbonio:

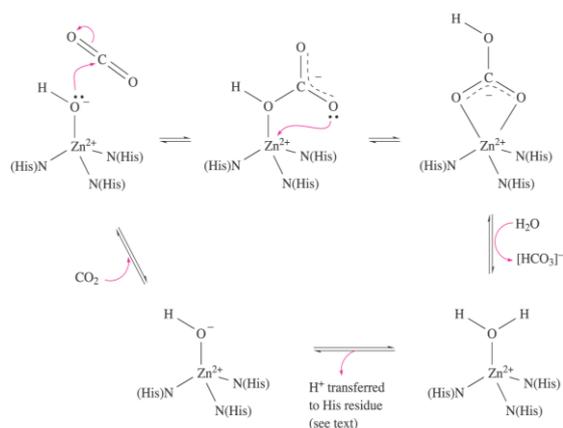


carbonio di CO<sub>2</sub>, mentre lo Zn<sup>2+</sup> (o altri amminoacidi) continua ad attrarre, orientare e polarizzare la molecola di CO<sub>2</sub> interagendo con l'ossigeno.

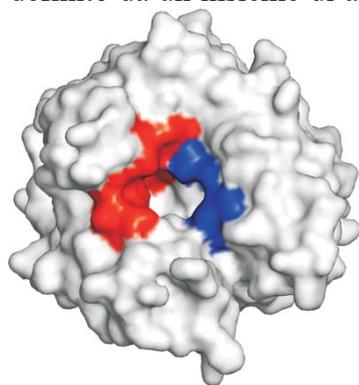


Nelle anidraasi carboniche l'acqua coordinata allo zinco viene deprotonata da una istidina (His64, vedi figura precedente) ad OH (il pKa dell'acqua coordinata allo zinco è abbassato di circa tre unità rispetto all'acqua non-coordinata) e il gruppo idrossido coordinato allo Zn funge da centro per l'attacco nucleofilo al

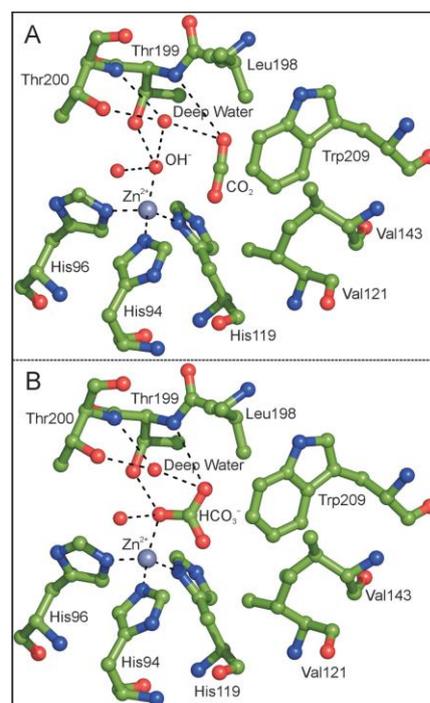
Un probabile ciclo catalitico per l'anidasi carbonica è riportato in figura. L'istidina 64 è connessa allo zinco tramite il network di molecole di acqua che formano fra loro legami a idrogeno: a partire dall'aquo-complesso, un protone viene trasferito indirettamente, tramite questo network, a questa istidina 64 (il protone è poi rilasciato a molecole di tampone). Il legante OH è sufficientemente nucleofilo da attaccare rapidamente la  $\text{CO}_2$  (opportunamente orientata da altri residui aminoacidici presenti nel sito) formando lo stato di transizione. Si ottiene quindi il prodotto con  $\text{HCO}_3^-$  coordinato allo zinco, ma questo è un legante molto labile ed è rimpiazzato molto rapidamente dall' $\text{H}_2\text{O}$ . Il ciclo catalitico si chiude con un ultimo stadio, che è *rate limiting*, che rigenera il sito cataliticamente attivo  $\text{Zn-OH}$  tramite il trasferimento di un protone da  $\text{Zn-OH}_2$  al residuo His64 vicino al sito.



In tutte le isoforme di CA la cavità del sito attivo presenta due “ambienti” ben distinti: il primo è definito da un insieme di aminoacidi idrofobici, mentre l'altro da aminoacidi idrofilici (nella figura



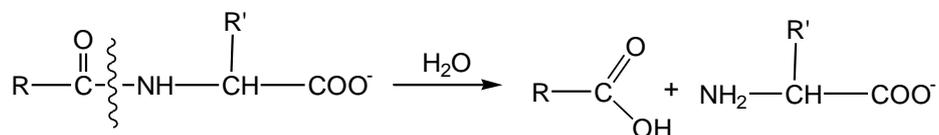
la parte idrofobica è in rosso e quella idrofila in blu). Si ritiene che queste due regioni siano responsabili per la rapida trasformazione di  $\text{CO}_2$  a bicarbonato: la regione idrofobica è necessaria per sequestrare il substrato  $\text{CO}_2$  e orientare l'atomo di carbonio per l'attacco nucleofilo da parte dell'idrossido legato allo zinco, mentre la regione idrofila crea il *network* ordinato di legami idrogeno fra molecole di acqua, necessario per permettere il trasferimento di un protone da  $\text{Zn-OH}_2$  al solvente *bulk* (tramite His64) e creare così l'idrossido nucleofilo. Il legame e l'orientazione del substrato  $\text{CO}_2$  e del prodotto bicarbonato sono stati evidenziati alcuni anni fa (2008-2009) anche tramite strutture ai raggi X. In A si vede che, come atteso,  $\text{CO}_2$  si lega effettivamente nella regione idrofobica del sito attivo, con un'orientazione che favorisce l'attacco nucleofilo di  $\text{Zn-OH}$  sull'atomo di carbonio. Da notare che la presenza di  $\text{Zn}^{2+}$  non sembra essere rilevante per la coordinazione e orientazione del substrato. Nella struttura con il prodotto, B, si vede che il piano del bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$  giace nello stesso piano definito dalla molecola di  $\text{CO}_2$  e dall'idrossido legato allo zinco in A e, tramite uno dei suoi atomi di ossigeno, è coordinato allo zinco (sempre tetraedrico) formando il quarto legante.



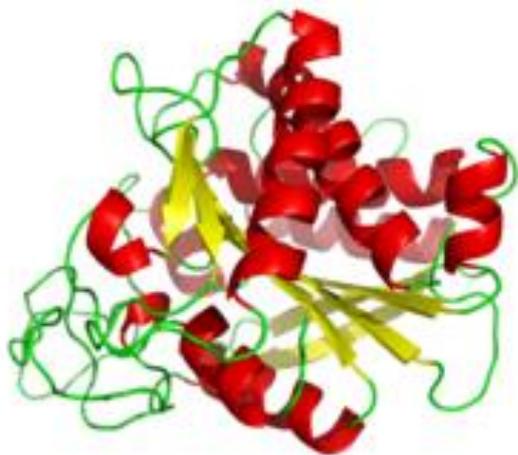
Da notare infine che è noto che livelli, o attività catalitiche, abnormi di questi enzimi sono spesso associati a diverse patologie (ad esempio glaucoma, epilessia, obesità, cancro,...). Di conseguenza, lo sviluppo di specifici inibitori o attivatori per le varie isoforme di CA può avere interessanti applicazioni biomediche. Per esempio, inibitori di CA sono utilizzati come diuretici, agenti anti-glaucoma e anti-epilettici.

### Carbossi peptidasi A (CPD A)

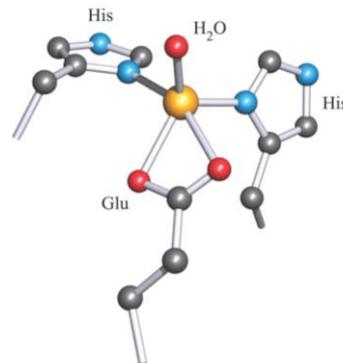
La carbossi peptidasi A, uno zinco-enzima digestivo tipicamente isolato dal pancreas dei bovini, è uno degli enzimi più studiati tra quelli che catalizzano l'idrolisi dei peptidi. Catalizza l'**idrolisi di amminoacidi C-terminali**, in particolare se contenenti residui aromatici o larghi residui alifatici in catena laterale (R')



Questa specificità verso certi residui amminoacidici deriva dal fatto che l'enzima presenta, vicino al sito attivo, una **tasca idrofobica** che è compatibile, ad esempio, con la sistemazione di un gruppo fenile. Il tempo di semi-vita per l'idrolisi non catalizzata del legame carbossi-amidico è di circa 7 anni a pH 7, quindi è ovvio che l'idrolisi rapida e selettiva di peptidi e proteine in condizioni fisiologiche richieda dei catalizzatori sofisticati. La catalisi da parte della carbossipeptidasi fa aumentare la velocità di reazione di molti ordini di grandezza, da  $k \approx 10^{-11} \text{ s}^{-1}$  fino a  $10^4 \text{ s}^{-1}$ .



Sono note le strutture cristalline non solo dell'enzima CPD A (figura), ma anche di vari complessi enzima-inibitore, che danno un'idea delle diverse fasi del ciclo catalitico dell'enzima. CPD A ha dimensioni simili alla anidrasi carbonica, 300 amminoacidi con una massa molecolare di circa 34 kDa; anche in questo caso c'è un solo atomo di zinco che sta al fondo di una cavità (meno profonda e più larga che nella CA). Qui lo zinco, esposto al solvente, è coordinato da due istidine, un glutammato chelante tipo  $\eta_2$  e da una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  (in figura il

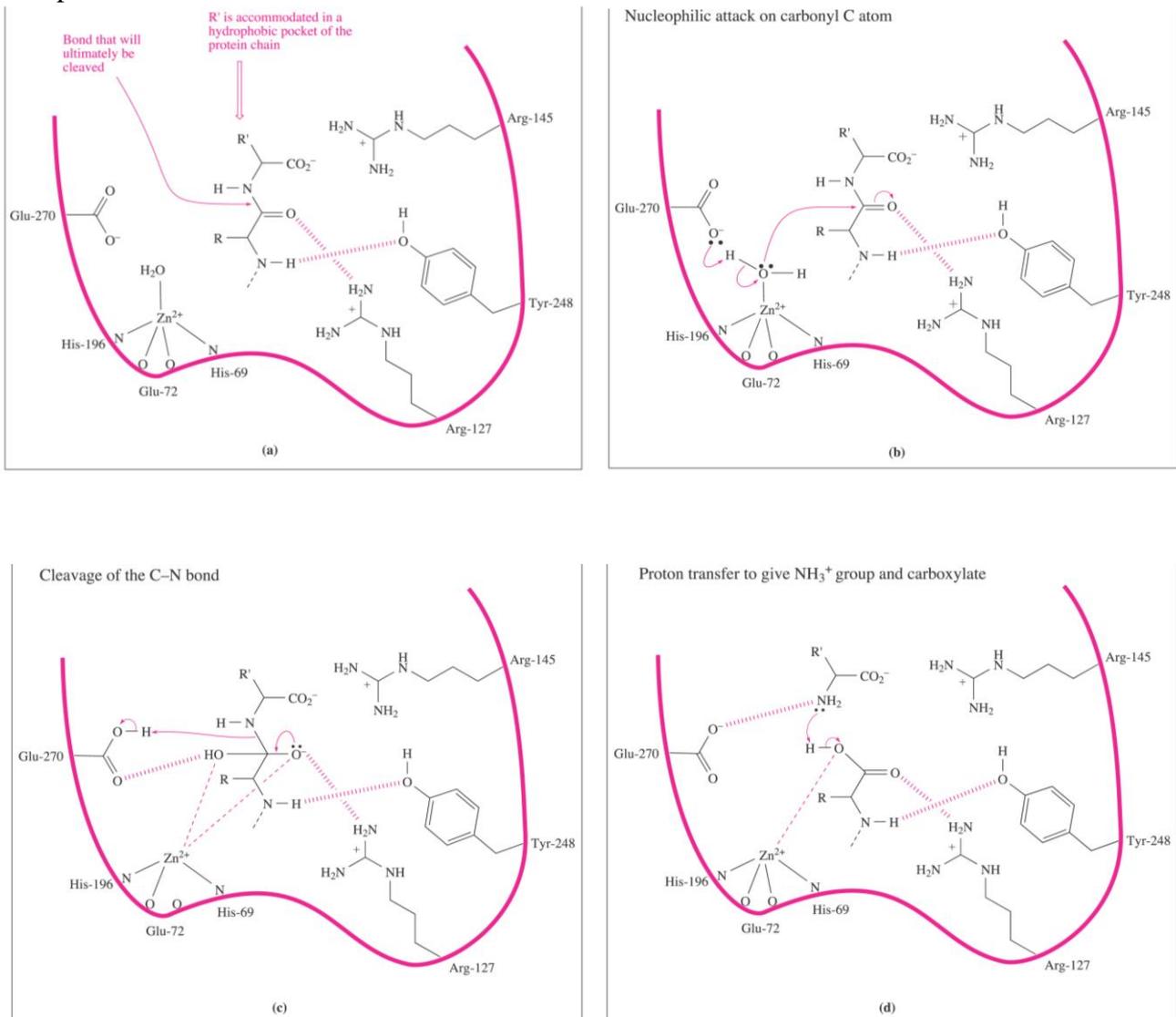


sito attivo della CPD A da bovino). Come nella CA, diversi residui amminoacidici acidi o basici nelle vicinanze del sito attivo sono importanti per l'attività dell'enzima. In particolare un altro glutammato (Glu-270) è molto vicino al centro metallico (figura a).

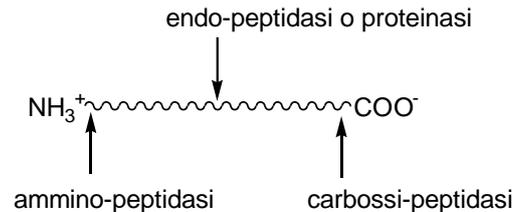
Il gruppo amidico è polarizzabile e, come per l'attivazione della  $\text{CO}_2$ , è necessario un **attacco bifunzionale** di reagenti elettrofili e nucleofili. D'altra parte, data l'elevata quantità di sistemi idrolizzabili (in teoria è anche possibile l'auto-proteolisi dell'enzima stesso!) è richiesta una **elevata specificità di substrato**.

Il meccanismo attualmente più accreditato, illustrato schematicamente nelle quattro figure successive, è il seguente: nel primo stadio il peptide che deve essere scisso viene "posizionato" vicino al sito dello zinco. Le interazioni proteina-substrato che prevalgono in questo stadio sono la formazione di ponti salini (interazioni elettrostatiche) fra il gruppo carbossilato C-terminale del substrato e il residuo Arg-145 che è carico positivamente, e delle interazioni intermolecolari fra il gruppo non-polare R' e residui nella tasca idrofobica della proteina. Come indicato in figura a, queste interazioni possono venire implementate da legami a idrogeno fra l'OH della Tyr-248 e il gruppo NH indicato, e anche fra Arg-127 ed il gruppo C=O adiacente al legame peptidico che verrà tagliato. Quest'ultima interazione polarizza il gruppo carbonilico e lo attiva nei confronti di un attacco nucleofilo. Si ritiene che il nucleofilo sia l' $\text{H}_2\text{O}$  coordinata allo  $\text{Zn}^{2+}$ ; come già detto, essa è polarizzata dall'acidità di Lewis dello zinco e si ritiene che venga deprotonata, probabilmente con l'assistenza del gruppo carbossilico di Glu-270 (figura b). Nel terzo stadio del meccanismo

proposto (figura c) avviene la rottura del legame peptidico C–N, il protone è probabilmente fornito da Glu-270. Sembra probabile che il secondo protone necessario per la formazione del gruppo  $\text{NH}_3^+$  sul residuo amminoacidico che si allontana venga dal gruppo  $\text{COOH}$  terminale della porzione di substrato rimanente (figura d). Nella figura c il residuo Glu-72 è mostrato come coordinato in modo monodentato allo zinco, mentre è bidentato nello stato fondamentale (*resting state*). Si ritiene che il passaggio da una coordinazione bidentata a quella monodentata sia associato con la formazione dell'interazione  $\text{Zn}^{2+} \cdots \text{O} \cdots \text{H}(\text{Arg-127})$ , illustrata in figura c; allo svilupparsi di questa interazione lo ione zinco si muove verso Arg-127. Per completare il ciclo catalitico una molecola di  $\text{H}_2\text{O}$  va a riempire il sito vacante sullo  $\text{Zn}^{2+}$ .



Vi sono poi altri zinco-enzimi che catalizzano l'idrolisi delle proteine all'amminoacido N-terminale (amino-peptidasi) o all'interno delle proteine (endo-peptidasi). Con uno schema si può riassumere:



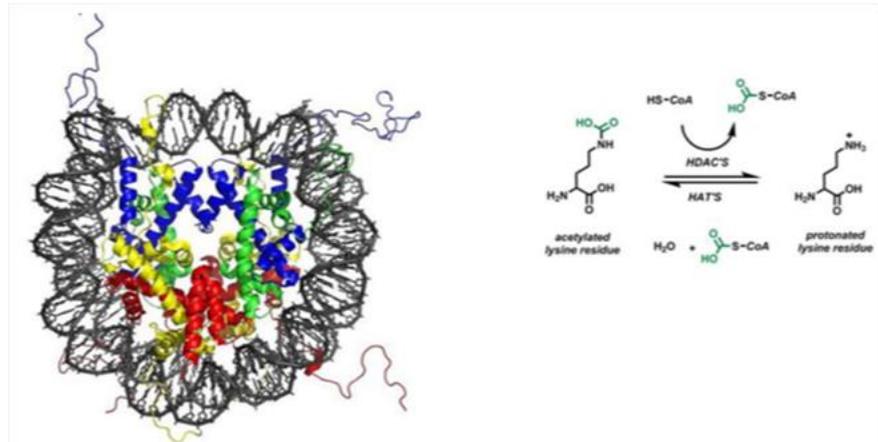
Zinco-proteasi sono costituenti essenziali delle tossine di molti serpenti velenosi; simili neurotossine vengono prodotte dal tetano o dal botulino (in particolare degradano le proteine delle membrane sinaptiche).

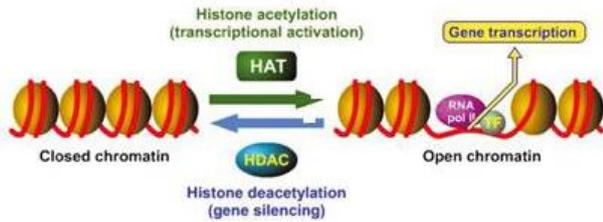
## MMPs

Una famiglia molto importante di zinco-endopeptidasi è quella delle *matrix metalloproteinases* (MMPs). Gli zinco-enzimi di questa famiglia, strettamente correlati fra loro dal punto di vista strutturale e funzionale, sono in grado di degradare, sia *in vitro* che *in vivo*, tutti i tipi di proteine che costituiscono le matrici extracellulari, ad esempio membrane basali e interstiziali, collagene, e così via. Di conseguenza essi sono implicati nei processi di *remodeling* dei tessuti connettivi associati, ad esempio, con sviluppo embrionale, gravidanza, crescita e risanamento dei tessuti dopo una ferita. Normalmente il potenziale degenerativo delle MMP è tenuto sotto controllo da inibitori endogeni specifici chiamati **TIMP** (*Tissue Inhibitors of MetalloProteinases*). Al momento nell'uomo sono stati identificati 17 tipi di MMP, accomunate da notevoli omologie di sequenza. La figura mostra la struttura ai raggi X della MMP-2 co-cristallizzata con il suo inibitore TIMP-2 (viola). Sono enzimi calcio dipendenti (sfere viola in figura) e contengono sia uno zinco catalitico che uno strutturale (sfere rosse). Lo zinco catalitico è coordinato come al solito da tre istidine (His218, 222 and 228) e da una molecola d'acqua che forma legami a idrogeno al gruppo carbossilato di un glutammato "catalitico" (Glu219). Se il bilanciamento MMP/TIMP viene sconvolto si possono sviluppare patologie molto gravi come arteriosclerosi, artrite reumatoide, osteoartriti, crescita tumorale, sviluppo di metastasi... È chiaro quindi che questi enzimi siano un *target* farmacologico molto rilevante. Praticamente tutti gli inibitori sintetici delle MMP che sono stati sviluppati finora contengono un gruppo chelante (ad esempio un acido idrossamico, o un carbossilato o un tiolo) per coordinarsi allo zinco (al posto dell'acqua) e un frammento peptidico o peptido-mimetico che mima il substrato per favorire il *binding* al sito di riconoscimento.

## Istone Deacetilasi (HDAC)

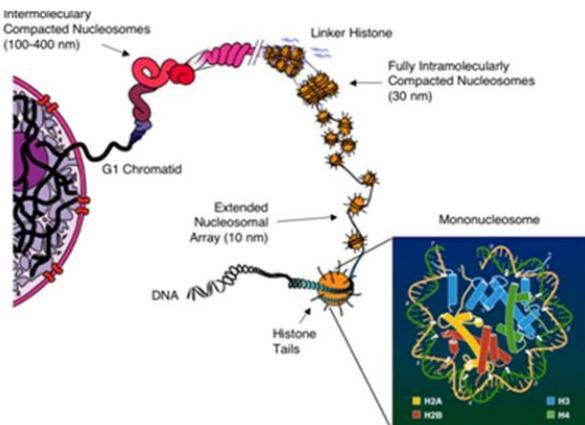
Un'ultima idrolasi mono-metallica di grande rilevanza fisiologica che consideriamo è l'istone deacetilasi 8 (HDAC8). Questo enzima, insieme ad altri della stessa famiglia, partecipa alla regolazione dell'espressione dei geni. L'**istone deacetilasi** (HDACs) e l'**istone acetiltrasferasi** (HATs) sono due classi di enzimi che





la cromatina più aperta (i residui acetilati sono neutri e le interazioni elettrostatiche col DNA sono di conseguenza ridotte) che permette la trascrizione del DNA (cioè l'espressione genica, *upregulation*), mentre le lisine deacetilate sono associate a un DNA fortemente impaccato (a pH fisiologico il gruppo amminico in catena laterale delle lisine è protonato e si generano delle forti interazioni elettrostatiche attrattive con lo scheletro carico negativamente del DNA), che non consente la trascrizione. Quindi, la deacetilazione è connessa al silenziamento dei geni (*downregulation*).

HDAC8 è l'istone deacetilasi meglio caratterizzata ed è generalmente classificata come uno zinco-enzima, anche se il suo sito di legame, formato da due aspartati e un'istidina (figura, in arancione il substrato, la lisina acetilata) è inusuale per lo zinco. In alternativa, potrebbe essere un ferro-enzima.

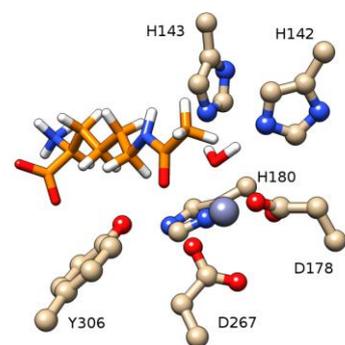


lavorano in tandem acetilando (HAT) o deacetilando (HDAC) residui lisinici degli istoni che protrudono dai nucleosomi (figura). Gli istoni sono i principali componenti proteici della **cromatina**, "l'imballo" di DNA e proteine che sta nel nucleo cellulare (figura). L'acetilazione delle lisine degli istoni induce una struttura della

Infatti, gli studi compiuti dimostrano che HDAC8 ha un'affinità per Zn(II)  $10^6$  volte maggiore che per Fe(II), tuttavia il Fe-enzima ha un'attività catalitica almeno doppia rispetto allo Zn-enzima. La questione di quale sia il metallo contenuto nell'enzima *in vivo* si pone in quanto i tipici metodi usati per estrarre e purificare l'enzima potrebbero causare l'ossidazione del ferro a Fe(III), che verrebbe così rilasciato e rimpiazzato dallo zinco. Inoltre, nonostante la maggiore affinità per Zn(II), le tipiche concentrazioni intracellulari di Fe(II) "libero" sono ritenute considerevolmente maggiori ( $0.2\text{--}6\ \mu\text{M}$  per  $\text{Fe}^{2+}$  vs  $5\text{--}400\ \text{pM}$  per  $\text{Zn}^{2+}$ ), il che

potrebbe consentire al ferro di soppiantare lo zinco in assenza di considerazioni non termodinamiche (e.g. la presenza di metallo-chaperone, vedi dopo).

È evidente che anche questi enzimi HDAC e HAT sono dei potenziali *target* farmacologici, essendo direttamente collegabili all'*upregulation* o *downregulation* di geni e quindi di proteine. Ad esempio gli HDAC regolano anche l'espressione e l'attività di molte proteine correlate allo sviluppo e alla progressione del cancro. In particolare è stato dimostrato che HDAC7, localizzato nella membrana mitocondriale interna, svolge un ruolo importante nella proliferazione delle cellule tumorali e nel regolare l'apoptosi (morte cellulare). Di conseguenza, alcuni inibitori di HDAC (**HDACi**) costituiscono una classe di potenti agenti antitumorali. Gli HDACi possono riattivare l'espressione di geni e inibire la crescita e la sopravvivenza di cellule tumorali. Questi farmaci non interagiscono direttamente col DNA, ma ne modulano l'espressione, cioè operano una cosiddetta *modulazione epigenetica*.



## Zinc fingers

Le *zinc finger proteins* (ZFPs), o semplicemente *zinc fingers*, sono i più abbondanti fattori di trascrizione nel genoma umano, cioè proteine che si legano al DNA. Le ZFPs partecipano alla regolazione dell'espressione di un gran numero di geni, compresi geni costitutivi (cioè che vengono attivamente trascritti e tradotti a un livello relativamente elevato) e oncogeni. Le ZFPs svolgono anche ruoli importanti in numerosi processi cellulari, come riconoscimento, replicazione e riparo del DNA. In queste proteine lo zinco ha **funzioni strutturali** e non catalitiche.

L'elevato contenuto di zinco negli organi riproduttivi (ad esempio nel liquido seminale) aveva da tempo suggerito che questo metallo potesse essere coinvolto anche nei processi di trasferimento dell'informazione genetica (trascrizione, replicazione del DNA). Tuttavia solo negli anni 1980 sono state individuate queste proteine speciali che riconoscono sequenze di DNA e servono quindi all'attivazione selettiva e al controllo della trascrizione genetica.

Gli *zinc fingers* si possono suddividere in tre tipi, (C4, C3H, e C2H2), a seconda del numero di residui cisteinici (C) nel cosiddetto *zinc binding motif*, cioè una sequenza amminoacidica (contenente da 25 a 30 amminoacidi) che presenta in posizioni ben conservate quattro amminoacidi per la coordinazione dello zinco. Le ZFPs più comuni sono di **tipo C2H2** (due cisteine e due istidine) e svolgono principalmente il ruolo di fattori di trascrizione che riconoscono sequenze specifiche di DNA. Quelle di tipo C3H si legano prevalentemente a RNA e svolgono anche un ruolo importante nella replicazione del DNA. Infine, le ZFPs di tipo C4 svolgono prevalentemente un ruolo a livello del riparo di DNA. Una eventuale perturbazione strutturale delle ZFPs può portare ad alterare la loro funzionalità e causare anche gravi malattie, incluso il cancro e disordini neurologici.

Da notare quindi che in queste proteine lo zinco è coordinato stabilmente a quattro residui, mentre nei siti catalitici era tipicamente coordinato a tre residui e la quarta posizione era occupata da una molecola di acqua.

La coordinazione allo zinco dei quattro residui provoca un *folding* della sequenza e si forma una specie di estrusione, lo *zinc-finger* appunto, che ha una struttura secondaria ad  $\alpha$ -elica dalla parte delle istidine e a  $\beta$ -foglietto dalla parte dei cisteinati (figura). Ogni "punta del dito" fa dei contatti di riconoscimento con sequenze specifiche di basi azotate del DNA. Di solito queste sequenze (domini) si ripetono più volte di fila nella proteina, generando ogni volta uno *zinc-finger*. Il numero di domini di questo tipo in una singola proteina varia da alcuni fino a 37.

La sequenza caratteristica di uno *zinc finger* è del tipo: - (Tyr, Phe)-X-Cys-X<sub>2-4</sub>-Cys-X<sub>3</sub>-Phe-X<sub>5</sub>-Leu-X<sub>2</sub>-His-X<sub>3-5</sub>-His- dove l'amminoacido indicato con X è di natura variabile.

Le proteine *zinc-finger* si avvolgono strettamente intorno al DNA e, in particolare, la regione degli *zinc-finger* forma molteplici contatti specifici tra la proteina e le coppie di basi del DNA, portando al mutuo riconoscimento e al *binding* specifico. Nell'ultima figura viene appunto mostrata la struttura ai raggi X di due *zinc fingers* che interagiscono con un frammento di DNA (co-cristallizzati).

