Omeostasi dei *trace metals*: *uptake*, trasporto, *storage*

Considerazioni generali

Gli ioni dei metalli di transizione essenziali, che vengono avidamente accumulati dalle cellule (anche di diversi ordini di grandezza in più rispetto alla loro concentrazione nell'ambiente esterno o nel mezzo di coltura), presentano **due aspetti opposti**: da un lato vengono utilizzati come co-fattori indispensabili, ma possono anche originare reazioni citotossiche, cioè dannose per la cellula.

Come per gli ioni dei gruppi s, visti in precedenza, c'è una distribuzione cellulare diseguale anche per gli ioni dei metalli di transizione (ad esempio il Cu è principalmente extracellulare, mentre lo Zn è principalmente intracellulare), quindi anche per loro è necessario il trasporto continuo attraverso le membrane. Tuttavia vi sono grosse differenze fra gli ioni dei metalli dei gruppi s e d. Innanzitutto, **gli ioni dei metalli di transizione precipitano a pH fisiologico** (a parte Cu^{2+}) e quindi essi richiedono dei leganti.

In anni recenti la ricerca ha scoperto numerose famiglie di proteine che controllano l'attività degli ioni metallici all'interno delle cellule e limitano il loro utilizzo soltanto in ruoli vitali. In altre parole le cellule sono in grado di controllare con precisione tutti i processi di *uptake* e trasporto dei metalli essenziali e, in generale, la loro omeostasi, cioè il delicato bilancio tra afflusso ed efflusso per mantenere livelli appropriati minimizzando gli effetti tossici. L'omeostasi degli ioni metallici è garantita da una complessa serie di proteine che comprendono proteine di *storage*, proteine trans-membrana deputate al trasporto degli ioni (*transporters*, cioè pompe di ioni), sensori con funzioni metallo-regolatorie e metallo-*chaperones* solubili e mobili nel citoplasma che legano in modo reversibile gli ioni metallici, li proteggono e li "scortano" nel citosol fino al target finale, cioè la apo-proteina alla quale sono destinati.

Sta inoltre emergendo la consapevolezza che molte di queste proteine usano una **chimica di coordinazione atipica** per svolgere i loro specifici ruoli, e solitamente diversa da quella delle proteine *target* destinate ad incorporare questi ioni, sia per quanto riguarda i numeri di coordinazione, i tipi di residui impiegati nella coordinazione e l'accessibilità al solvente.

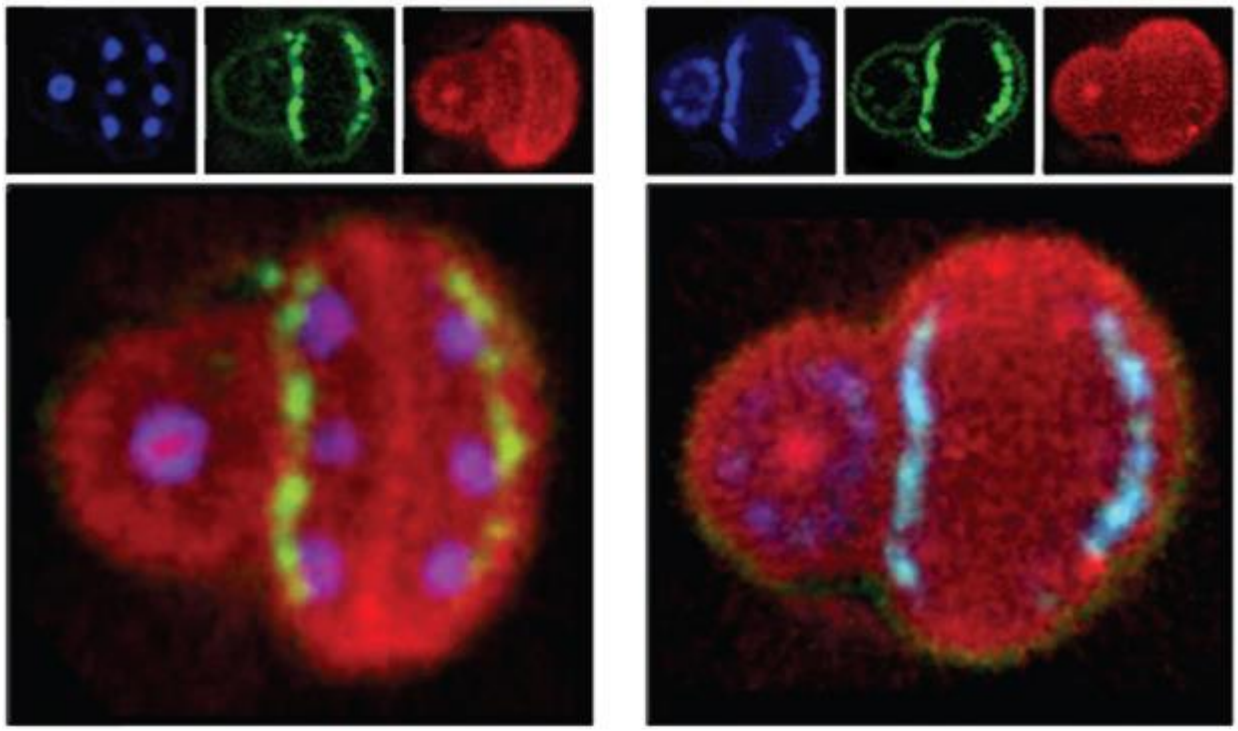
Come già osservato all'inizio del corso, è ormai chiaro che molti ioni di metalli di transizione sono abbondanti all'interno delle cellule, con concentrazioni da ca. 0.1 mM (Fe e Zn) a ca. 10 μM (Cu, Mn, Mo). D'altra parte anche le metallo-proteine sono molto abbondanti nella cellula.

Questi dati fanno sorgere una serie di domande:

1. Quanta parte di ogni metallo è presente in forma libera/aquata, o comunque in forma labile, cioè facilmente assumibile dalle apo-proteine?
2. Come fa la cellula a regolare il numero di ioni metallici presenti al suo interno?
3. Quando e dove una metallo-proteina ottiene il suo specifico metallo?
4. Come fa il giusto metallo ad arrivare alla giusta proteina (e, al suo interno, nel giusto sito) al momento giusto, cioè quando è richiesto? In altre parole, come fa la cellula a far sì che un certo metallo riconosca un sito di legame specifico in una proteina in presenza di un eccesso di chelanti non-specifici ed evitando fenomeni di tossicità che potrebbero derivare da concentrazioni di metalli così elevate?

Per quanto riguarda la speciazione degli ioni metallici nelle cellule, secondo alcuni ricercatori si può affermare che, **in condizioni normali, praticamente non esistono ioni rame o ferro (e forse anche zinco) liberi**, cioè non coordinati a biomolecole. Per ioni liberi si intendono ioni coordinati a molecole di acqua o altri leganti labili. Queste valutazioni (ad esempio nel caso del rame che è quello meglio conosciuto) sono state fatte tenendo conto della concentrazione nella cellula delle proteine al rame (*copper proteome*) e delle piccole molecole che lo possono coordinare e della loro affinità per il rame. In base a questi dati si calcola che la concentrazione (all'equilibrio!) di ione Cu(I) libero nelle cellule sia di 10^{-21} M, cioè meno di 1 atomo per cellula! Similmente si è calcolato che le cellule mantengono una bassissima soglia di Zn(II) libero pari a 0.5 fM (10^{-15} M!), in quanto al di sopra di questa concentrazione viene disattivata l'espressione delle pompe per l'*uptake* di zinco ed attivata quella per la produzione di pompe per l'efflusso di zinco (tuttavia vi sono a questo proposito pareri discordi, vedi dopo). Considerando il volume della cellula, la concentrazione 0.5

fM è 6 ordini di grandezza inferiore a quella che si avrebbe con 1 singolo ione Zn(II) nel citosol per cellula! Quindi, almeno per Cu(I) (e probabilmente anche per Zn(II) e Fe(II)) non esiste nelle cellule un *pool* di ioni liberi dai quali le apo-proteine possano attingere.
Recenti progressi nel campo dell'*imaging* stanno iniziando a permettere di ottenere dati in tempo reale relativi al contenuto ed al movimento di alcuni metalli all'interno della singola cellula: questi dati saranno sempre più essenziali per comprendere il metabolismo cellulare dei metalli. L'immagine in figura mostra una **micro-tomografia di fluorescenza a raggi X** condotta su un seme, a sinistra un *wild type* e destra un mutante a cui manca il sistema per lo *storage* del ferro e che germina male in terreni carenti di ferro. Nelle figure piccole si vede la localizzazione (in colori artificiali) di **ferro (blu), manganese (verde) e zinco (rosso)**, che è differente per i tre metalli e, per il ferro, tra *wild type* e mutante. Le figure grandi sono la sovrapposizione di quelle dei singoli metalli. L'analisi ha dimostrato che la quantità di ferro è praticamente la stessa nei due semi, ma queste immagini hanno evidenziato che ci sono grosse variazioni nella localizzazione del ferro fra *wild type* e mutante. In altre parole non conta solo la quantità di un certo ione, ma anche dove si va a localizzare nella cellula.



Simili analisi in cellule endoteliali hanno mostrato che, durante il processo di angiogenesi (cioè di formazione e crescita di nuovi capillari) si ha lo spostamento del rame da compartimenti intracellulari alle punte dell'endotelio e che il trattamento con chelanti specifici per il rame porta all'arresto della crescita dei capillari. Evidentemente il rame è direttamente coinvolto nei processi che avvengono sulle punte dell'endotelio, cioè alla crescita del capillare.

Omeostasi del Ferro

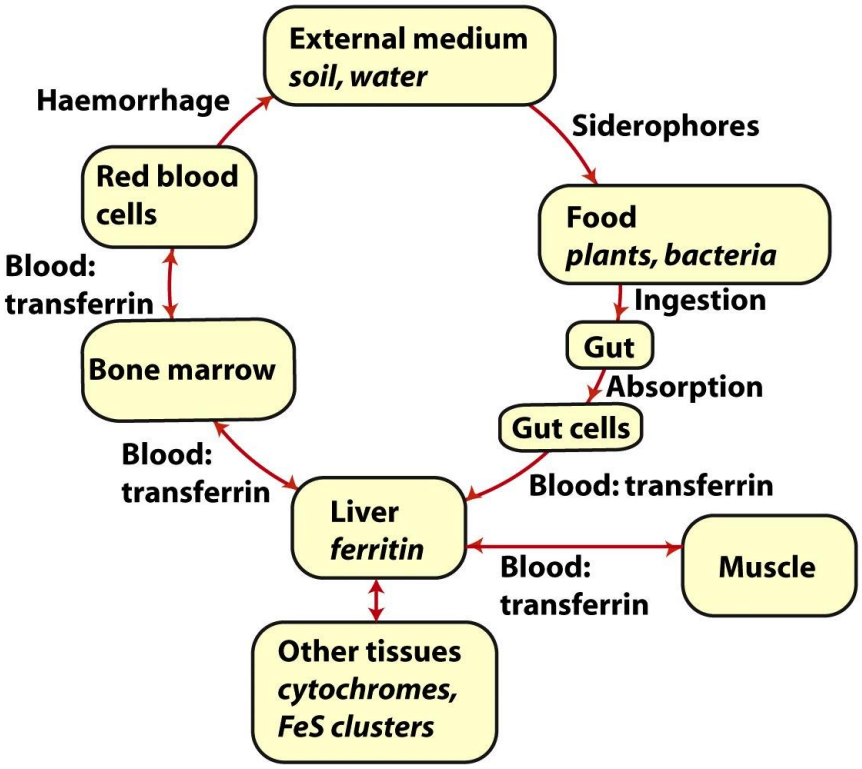
Il ferro, il più abbondante metallo di transizione in biologia, è essenziale per tutti gli organismi (tranne i latto-bacilli) ed è l'elemento per cui i processi di omeostasi sono meglio compresi. Essi possono essere divisi in:

a) ***Uptake***, cioè assorbimento attivo o passivo in seguito all'ingestione di cibo, che può implicare dissoluzione, reazioni redox o di complessazione;
b) **trasporto selettivo** del ferro all'interno delle cellule attraverso le membrane;
c) **processazione** nelle cellule, cioè incorporazione in apo-proteine;
d) eliminazione dal metabolismo, o come **escrezione** o per un **immagazzinamento temporaneo**.

Nell'uomo il ferro è considerato un micronutriente in quanto il suo **fabbisogno giornaliero è di alcuni milligrammi**. Nonostante tale fabbisogno sia relativamente modesto, la deficienza di ferro (anemia) è un problema sanitario di rilevanza mondiale dovuto in parte alla bassa abbondanza di ferro in molti cibi associata alla **modesta biodisponibilità del ferro non-eme**, una risorsa comune di ferro nella dieta. Danni alla salute causati da carenza nutrizionale di ferro colpiscono più di 2 miliardi di persone e l'OMS, Organizzazione Mondiale della Salute, elenca la carenza di ferro tra i primi 10 fattori di rischio che possono produrre danni gravi alla salute o addirittura morte.
Sia l'accumulo che la carenza di ferro nelle cellule hanno conseguenze negative. La carenza di ferro comporta non solo anemia, ma anche una serie di altri disordini; l'accumulo di ferro genera sostanzialmente tossicità dovuta alla formazione (indotta dal ferro) di *Reactive Oxigen Species* (ROS) che danneggiano le cellule (chimica di Fenton).
Inoltre tutti i microorganismi patogeni richiedono ferro come fattore di crescita; dal momento che non riescono ad attivare il ferro legato fortemente nel siero, essi devono utilizzare specie di ferro "libero", il cui livello deve quindi essere sempre mantenuto molto basso. Per questo motivo molecole "*scavenger*" ("spazzine") del ferro hanno effetto antibiotico. I mammiferi, le cui cellule si dividono molto meno frequentemente di quelle dei batteri, sfruttano questa vulnerabilità dei micro-organismi ed utilizzano la *iron starvation strategy* come strategia difensiva contro le infezioni batteriche. In risposta ad un'infezione i mammiferi sequestrano il ferro in specifiche *iron-binding proteins* (e.g. ferritina, lattoferrina, vedi dopo) e in siti meno accessibili alla maggior parte dei microbi (citoplasma dei macrofagi e degli epatociti). Tuttavia il sequestro del ferro ha anche effetti secondari negativi per l'ospite, in quanto viene ridotta la disponibilità del ferro per gli eritrociti in formazione nel midollo spinale e, a lungo andare, questo fattore può limitare la sintesi dell'emoglobina. Il deficit (cumulativo) che deriva dalla differenza tra la sintesi dell'emoglobina e la perdita di emoglobina attraverso il normale *turnover* degli eritrociti genera una *anemia da infiammazione*.

Assorbimento del ferro

In condizioni fisiologiche la forma stabile del ferro è il Fe(III). In assenza di agenti complessanti, gli ioni Fe(III) idrati idrolizzano rapidamente per formare aggregati insolubili di ferro-idrossido (K_{ps} di $Fe(OH)_3 = 10^{-38}\ M^4$, per cui la concentrazione di Fe(III) libero sarebbe solo dell'ordine di 10^{-17} M a pH 7) e quindi l'evoluzione ha sviluppato sistemi sofisticati per complessare il Fe(III) e mantenerlo in soluzione. Per ottenere il ferro necessario alla loro sopravvivenza, i batteri e altri micro-organismi e piante, sopravvissuti nell'evoluzione allo sviluppo di un'atmosfera ossidante, hanno sviluppato delle molecole chelanti per il ferro, i **siderofori**, con affinità estremamente elevate per poter competere con la bassissima solubilità del Fe(III) idrossido. Gli animali più evoluti, che assumono il ferro dal cibo, utilizzano invece una proteina, la transferrina.
Quindi si può dire che la Natura deve fronteggiare due problemi connessi all'uso del ferro: da una parte la elevata insolubilità del Fe(III) a pH fisiologico, che rende difficile il suo *uptake*, e dall'altra la tossicità del cosiddetto ferro libero, per via della produzione di radicali attraverso la chimica di Fenton. La Natura ha sviluppato dei sofisticati sistemi chimici per gestire tutti questi aspetti, dall'acquisizione primaria del ferro, al suo seguente trasporto, immagazzinamento e utilizzo nei tessuti (quest'ultimo aspetto già visto), come riassunto nel cosiddetto "ciclo del ferro" (figura).



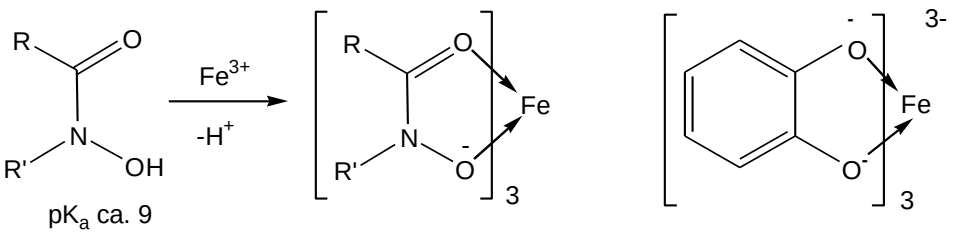
Siderofori

Sono noti più di 200 diversi siderofori, isolati da batteri aerobici, lieviti e funghi. La loro biosintesi è regolata da una proteina che si lega al DNA (**FUR** da *Fe Uptake Regulation*), e che è attivata dal Fe(II). La coordinazione del Fe(II) provoca variazioni conformazionali alla proteina. Quando la concentrazione di ferro è ragionevolmente elevata la proteina FUR, contenente ioni Fe coordinati, si lega a specifiche sequenze di DNA con funzione di regolazione e inibisce così la trascrizione dei geni relativi alla biosintesi dei siderofori. Se la concentrazione di Fe^{2+} si abbassa, la proteina FUR non lo coordina più, cambia conformazione, e non si coordina neppure al DNA e quindi può avvenire la trascrizione dei geni.

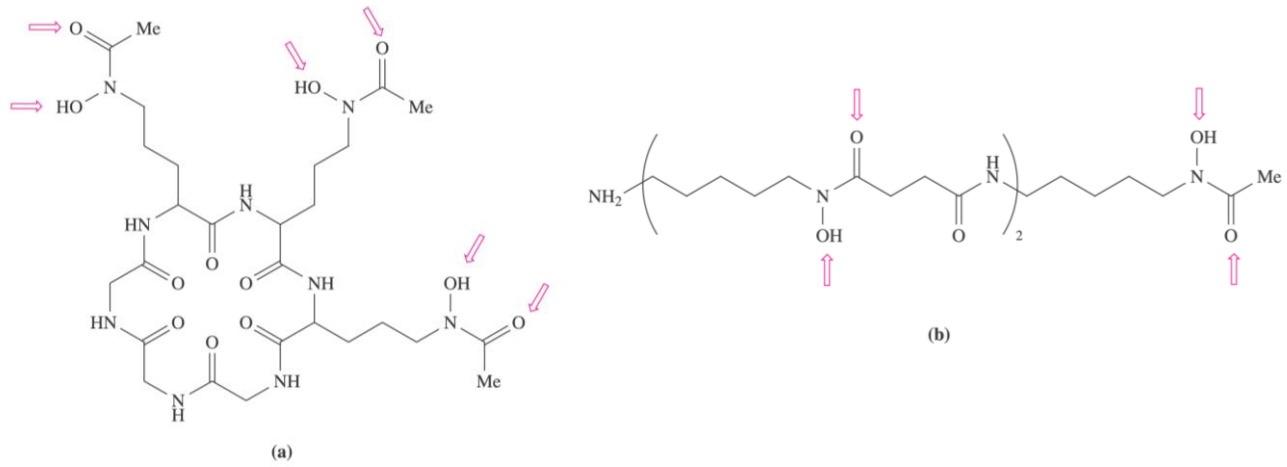
Tutti i siderofori, composti a basso peso molecolare compreso fra 500 e 1000, formano complessi chelati molto stabili con il **Fe(III) alto-spin**, d^5, che viene coordinato con geometria pressoché ottaedrica.

Le costanti di formazione, sempre molto elevate, variano tuttavia in un intervallo fra 10^{23} e 10^{49} (enterobactina); le costanti per i corrispondenti complessi di Fe(II) sono molto più piccole, a causa della carica più piccola e raggio ionico più grande di tale ione, e quindi un meccanismo di rilascio del ferro può essere effettuato tramite riduzione (oltre che per degradazione enzimatica del sideroforo).

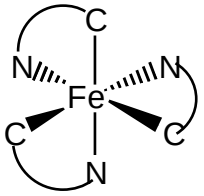
La maggior parte dei siderofori possono essere divisi in due gruppi a seconda che coordinino il ferro tramite leganti **idrossammati** (a sinistra, e.g. ferricromi, ferrioxamine) o **catecolati** (a destra, e.g. enterobactina):



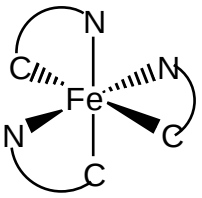
Mentre i complessi trischelati con gli idrossammati sono neutri, quelli con i catecolati sono carichi negativamente (3–). In entrambi i casi si formano anelli chelati a 5 termini molto stabili. Un tipico sideroforo di tipo idrossamico è la desferrioxamina B, che possiede tre gruppi idrossammato non equivalenti come parte di una **catena lineare peptidica** (figura b). La ***Desferrioxamina B*** è sintetizzata *in vivo* dagli streptomiceti e viene utilizzata nella terapia per prevenire (o contrastare) l'avvelenamento da accumulo di ferro (vedi dopo), ad esempio dopo le trasfusioni di sangue nei pazienti affetti da talassemia (la talassemia è un tipo di anemia; chi soffre di questo disturbo genetico non è in grado di produrre l'emoglobina). Un altro esempio è il ***Ferricromo*** (figura a), un esapeptide ciclico formato da tre glicine e tre *N*-idrossil-L-ornitine.



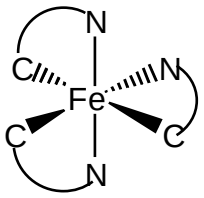
Complessi ottaedrici trischelati sono chirali, in quanto generano enantiomeri Λ e Δ. Nel caso della *desferrioxamina B*, per ognuna delle configurazioni assolute Λ e Δ ci sono 5 possibili stereoisomeri (in figura sono mostrati i 5 possibili isomeri Λ, C ed N simboleggiano gli atomi di ossigeno ad essi legati). In vivo, i complessi del Fe(III) con le desferrioxamine (e anche con i ferrocromi e l'aerobactina) sono sinistrorsi del tipo Λ-*cis* (lo stereoisomero facciale); i corrispondenti enantiomeri Δ sono molto meno efficaci per il trasporto del ferro.



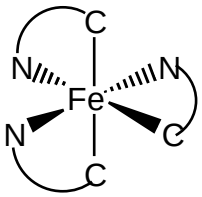
Λ-N-*cis,cis*



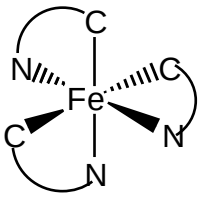
Λ-C-*trans,cis*



Λ-N-*trans,cis*

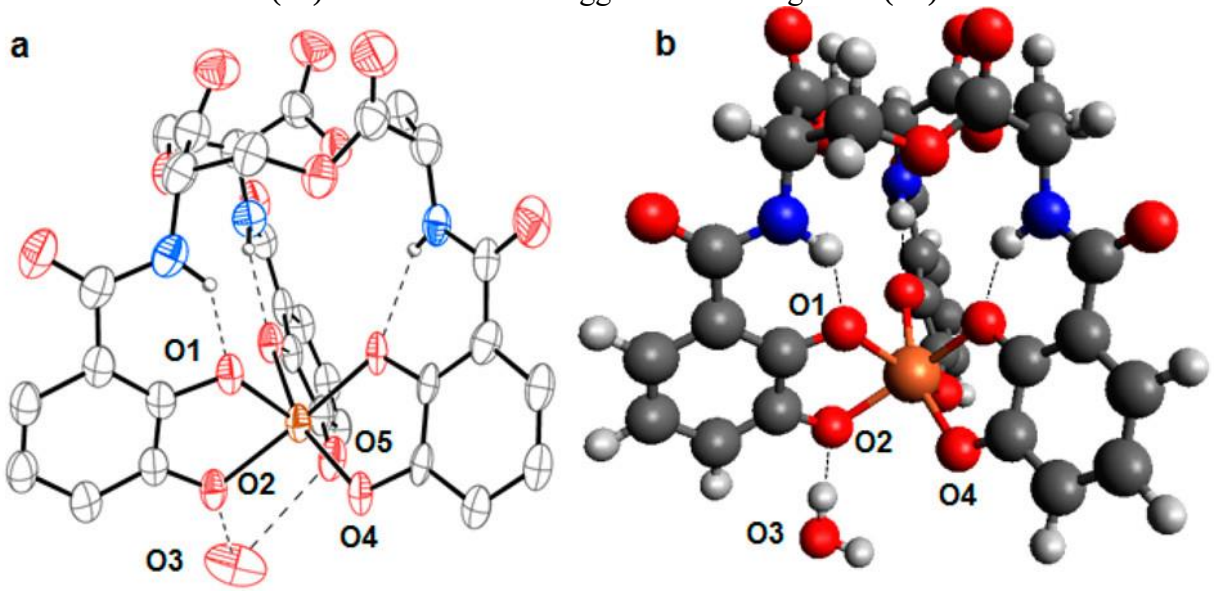


Λ-C-*cis,trans*



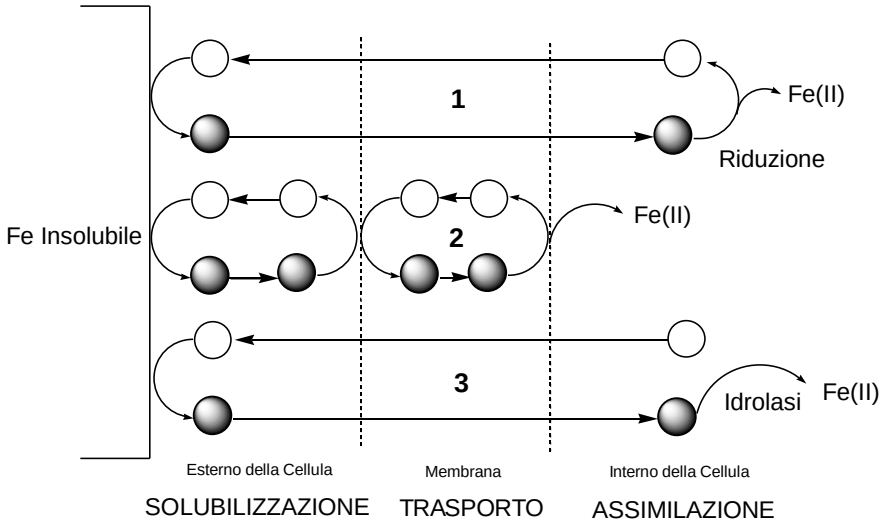
Λ-N-*trans,cis*

Mentre i siderofori idrossammati sono prodotti essenzialmente da micro-organismi più evoluti, tipo funghi e lieviti, i siderofori catecolati sono prodotti essenzialmente da batteri. Quello meglio noto è l'***enterobactina*** (figura), estratto da *Salmonella* ed *E. coli*, che ha una affinità enorme per il ferro (K ~ 10^{52}, i batteri che la producono riescono a corrodere l'acciaio inox!). La straordinaria stabilità del complesso del ferro con l'enterobactina è dovuta anche alla formazione di legami a idrogeno multipli tra i gruppi amidici NH e gli ossigeni dei catecolati impegnati nella coordinazione del ferro. La struttura ai raggi X del complesso tra enterobactina e ferro è stata determinata pochi anni fa, nel 2017 (figura). La configurazione dell'addotto col ferro è destrorsa con configurazione Δ, confermando quanto in precedenza ipotizzato in base a misure spettroscopiche (CD) su un addotto isomorfo del Cr(III) e alla struttura ai raggi X dell'analogo di V(IV).

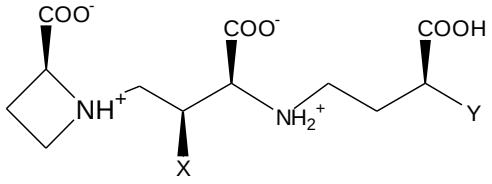


Sono stati proposti **tre meccanismi per il funzionamento dei siderofori**, rappresentati in figura. Nel meccanismo 1 il sideroforo (ad esempio un ferricromo) trasporta il metallo attraverso la membrana all'interno della cellula, dove viene rilasciato tramite un processo non distruttivo, ad esempio la riduzione a Fe(II), e così il legante è disponibile per il riuso. Nel meccanismo 2, detto a taxi, il sideroforo (e.g. la desferriossamina) consegna il metallo alla superficie della membrana esterna, dove esso è trasferito a un trasportatore secondario che lo porta all'interno della cellula dove viene poi rilasciato. Il terzo meccanismo, tipico ad esempio dell'enterobactina, prevede che il sideroforo trasporti il metallo attraverso la membrana cellulare all'interno della cellula dove poi il complesso viene distrutto da una idrolasi (quindi il legante non può venire riutilizzato). Nello

specifico, il complesso Fe^{3+}-enterobactina viene riconosciuto sulla superficie cellulare del batterio e trasportato nel periplasma dalla pompa trans-membrana *gated* FepA.



Le piante necessitano di ferro per la fotosintesi e anche per la biosintesi della clorofilla. Il ferro deve essere estratto da ossidi minerali tramite le radici e reso disponibile alla pianta. Molto spesso le piante sfruttano siderofori prodotti da micro-organismi simbiotici. Tipici **fito-siderofori** sono degli amminoacidi a basso peso molecolare, derivati dell'acido mugineico e della nicotianamina (figura). Questi composti, contenenti l'anello azetidinico a quattro termini e 4 centri chirali in configurazione *S*, si comportano da leganti esadentati per il ferro sia tramite i gruppi carbossilici che i gruppi aminici.



X = OH, Y = OH: acido mugineico
X = H, Y = NH_2: nicotianamina

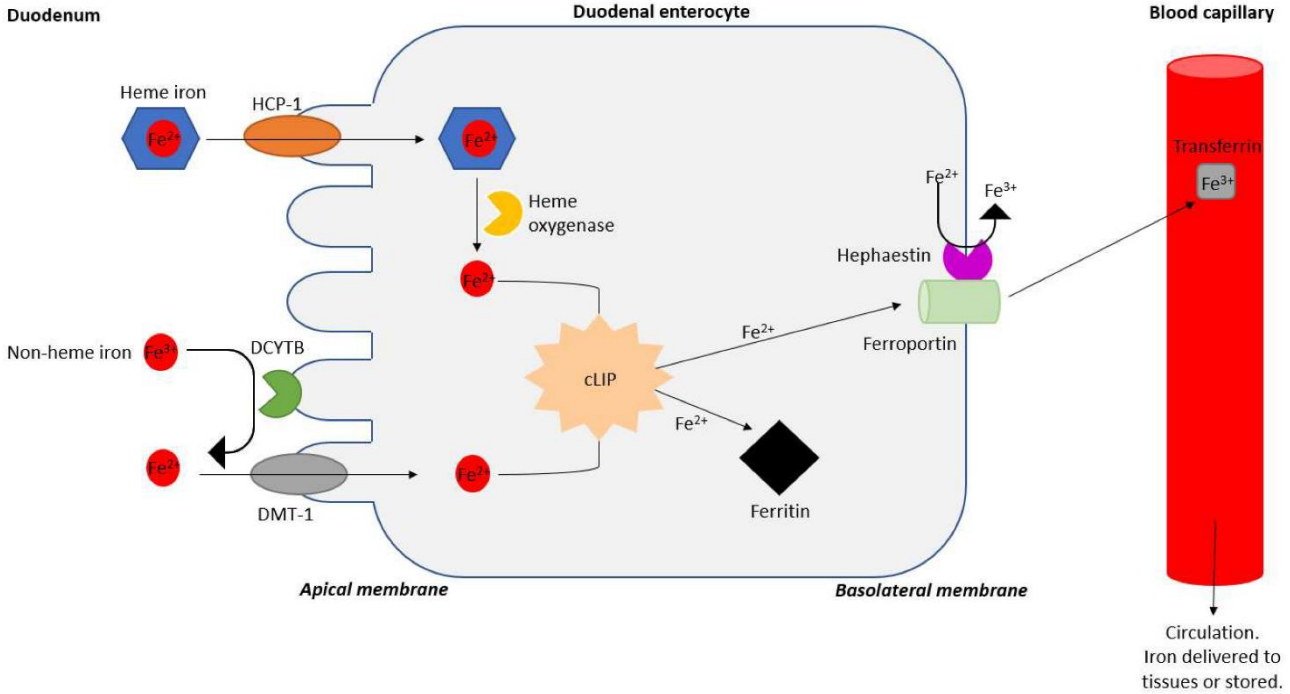
Organismi superiori

Negli organismi superiori l'*uptake* e il trasporto del ferro non sono effettuati da siderofori a basso peso molecolare, ma da proteine piuttosto grosse, non-eme, le cosiddette **transferrine** (Tf). Il ferro non utilizzato deve poi essere immagazzinato, e questa funzione è svolta da una proteina non-eme con funzioni di *storage*, la **ferritina**. I sistemi di trasporto e immagazzinamento devono funzionare rapidamente ed essere completamente reversibili in condizioni fisiologiche per prevenire i sintomi da deficienza o eccesso locali.

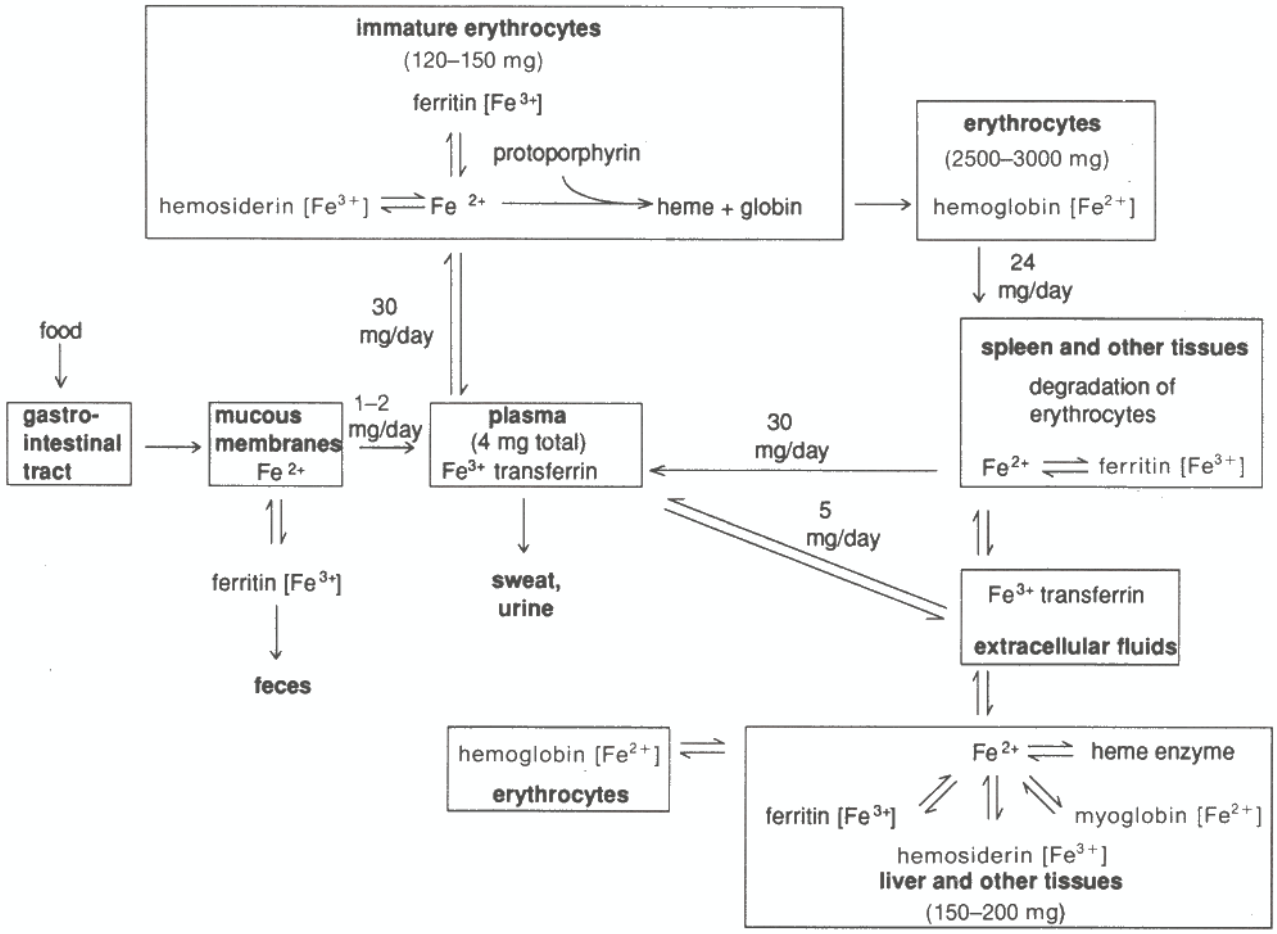
Negli organismi superiori, e quindi anche nei mammiferi, l'assorbimento del ferro avviene solo tramite il cibo. L'identificazione dei trasportatori e di altre proteine che svolgono funzioni nell'assorbimento del ferro tramite la dieta ha contribuito a comprendere questo processo, che è fondamentale per il controllo del contenuto di ferro dell'organismo. Il ferro può essere assorbito come eme o non-eme; **il ferro-eme viene assorbito con maggiore efficienza**; infatti nell'eme il ferro è "protetto" dal macrociclo, quindi interagisce meno con i potenziali leganti biologici e non necessita di riduzione. Il ferro-eme viene trasportato all'interno degli enterociti del duodeno dalla proteina di trasporto **HCP-1** (Heme Carrier Protein 1), e nel citoplasma il ferro viene poi rimosso dal macrociclo (cioè la protoporfirina IX) dalla eme-ossigenasi. Il ferro, come ione Fe^{2+}, entra a far parte del cosiddetto **cLIP** (*cytosolic labile iron pool*).

Il ferro non-eme viene assorbito dal cibo sempre nel tratto gastro-intestinale. Esso è presente nella forma insolubile di Fe^{3+} e quindi per entrare negli enterociti nel duodeno deve venire prima ridotto a

Fe^{2+} o dall'acido ascorbico (vitamina c) o da qualche ferro-riduttasi, molto probabilmente da **DCYTB** (Duodenal CYTochrome B) una ferro-riduttasi presente nella membrana dell'intestino tenue, e poi importato attraverso la membrana tramite l'azione della proteina di trasporto (o pompa) **DMT1** (Divalent Metal Transporter 1). Il Fe^{2+} del cLIP può essere immagazzinato nella ferritina o venire trasportato fuori dall'enterocita, tramite l'azione di ferroportina ed **epestina** (una multi-copper blue oxidase) che ossida il ferro a Fe^{3+}, il quale viene quindi catturato nel sangue dalla proteina di trasporto transferrina.



Nella figura successiva viene rappresentata, in modo schematico ma anche quantitativo, la distribuzione del ferro in un organismo.



Nel plasma quasi tutto il ferro è normalmente legato alla Tf, che è una proteina molto abbondante. La concentrazione extracellulare del ferro, nell'uomo tipicamente compresa nello stretto intervallo **10–30 μM**, è controllata dall'ormone peptidico epcidina (vedi dopo).

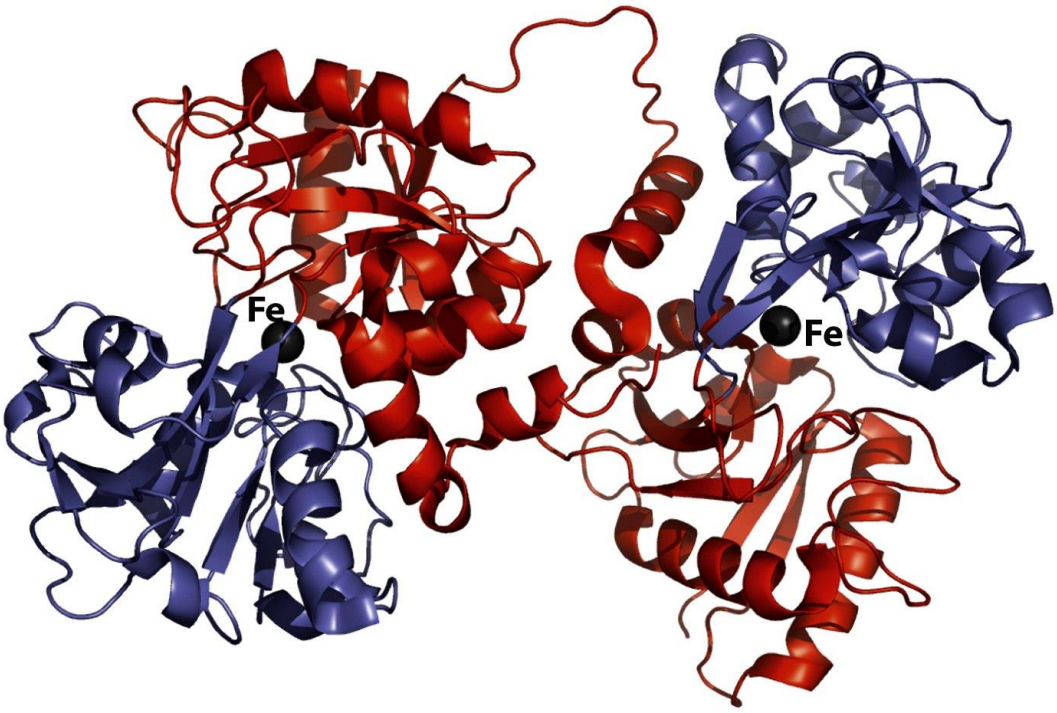
Il Fe(III) viene liberato dal sistema di trasporto transferrina nelle cellule del midollo spinale, dove si forma l'emoglobina, e quello non utilizzato è assunto dalla ferritina. L'incorporazione del ferro nella porfirina durante la bio-sintesi dell'eme avviene tramite l'enzima *ferrochelatasi*; i globuli rossi, ricchi di emoglobina, hanno un tempo di vita limitato e vengono quindi degradati, in particolare nella milza, dove il ferro rilasciato viene di nuovo catturato e immagazzinato dalla ferritina. La transferrina rilascia ferro anche nel fegato e nelle cellule muscolari, dove viene utilizzato nella bio-sintesi di Fe-enzimi o mioglobina.

Circa 2/3 del ferro totale è incorporato nell'eme dell'emoglobina che si trova nei globuli rossi (eritrociti maturi) o nei loro precursori. Normalmente gli eritrociti vivono circa 120 giorni, e tipicamente circa 20 mL di sangue, contenenti complessivamente circa 30 mg di ferro, vengono distrutti ogni giorno. Quindi, per mantenere l'omeostasi sono richiesti circa 30 mg di ferro ogni giorno per produrre l'emoglobina per i nuovi eritrociti. Tuttavia, l'assorbimento di ferro tramite la dieta fornisce soltanto 1–2 mg al giorno. Il resto deriva dal riciclo del ferro dai globuli rossi senescenti. Questo processo avviene principalmente nella milza. L'eme viene degradato dall'eme-ossigenasi e il ferro viene recuperato ed esportato nel plasma per essere riutilizzato.

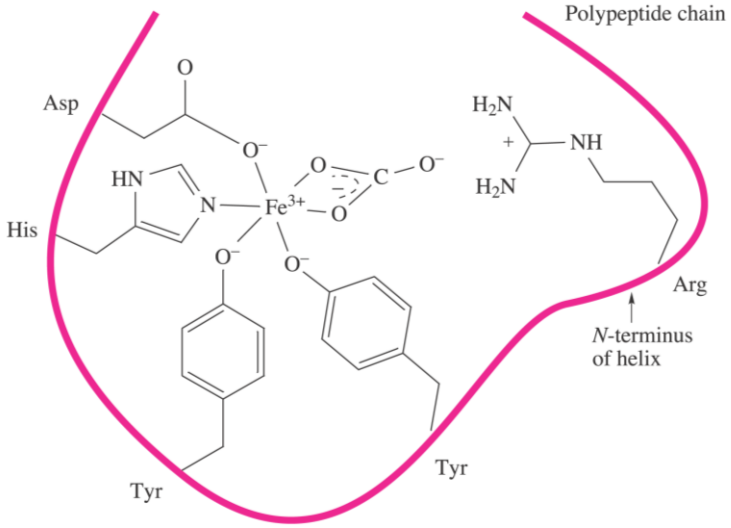
Transferrine

Tutte le transferrine, inclusa la lactoferrina (che si trova nel latte e nel muco) legano fortemente due ioni Fe(III) insieme ad una quantità stechiometrica di **ione carbonato CO_3^{2-}**. Il ruolo principale della transferrina è quello di trasportare il ferro dai siti di assorbimento (dai cibi), o da quelli di immagazzinamento o di degradazione degli eritrociti, alle cellule del midollo che generano nuovi globuli rossi. La maggior parte del ferro è poi utilizzato dalle cellule precursori dei nuovi eritrociti

(eritrociti immaturi) per formare emoglobina. Una seconda funzione essenziale della transferrina è quella di protezione verso le malattie infettive; la proteina lega il ferro con affinità così elevata (logK ≅ 20), che non rimane ferro disponibile per i micro-organismi.
Le transferrine sono glico-proteine, cioè proteine con catene polisaccaridiche (attaccate, di solito, a catene laterali recanti gruppi –OH o $–NH_2$) con massa di circa 80 kDa; la singola catena polipeptidica è ripiegata a formare **due lobi**, ognuno dei quali contiene un sito di legame per il ferro. La coordinazione del Fe^{3+} a ciascuno dei due siti (C–terminale ed N–terminale) quasi equivalenti comporta la simultanea e sinergistica coordinazione di uno ione carbonato e il rilascio di $3H^+$.

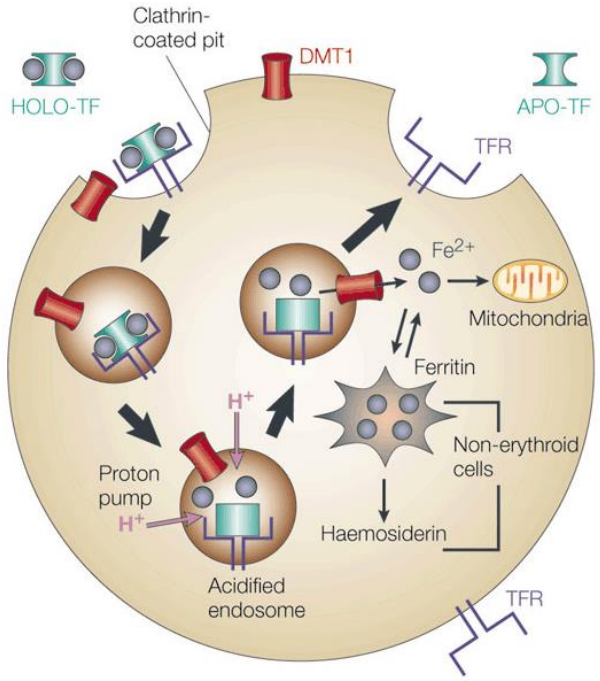


Mentre l'apo-transferrina è incolore, la coordinazione del Fe^{3+} genera un colore rosso-bruno. Tutte le transferrine possono legare anche altri ioni, tipo Cr^{3+}, Al^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+},… Il sito di coordinazione del ferro è formato da due tirosinati, responsabili del colore (bande a trasferimento di carica, LMCT, dai fenolati al ferro), un aspartato coordinato η_1, una istidina ed il carbonato legato come chelante (η_2), che forma legami a idrogeno con le catene laterali di un'arginina e una treonina. La coordinazione del Fe^{3+} e del CO_3^{2-}, che sono sinergiche, inducono una notevole **variazione conformazionale** della proteina, nel senso che l'apoproteina è molto più aperta (figura).



La stabilità del complesso col Fe^{3+} (ca. 10^{20}) diminuisce fortemente al diminuire del pH; ad esempio in vitro a pH 4.5 l'aggiunta di citrato è sufficiente a rimuovere il ferro.
Il ciclo con il quale il ferro legato alla transferrina viene reso disponibile alle cellule è descritto in figura. La transferrina si lega a un recettore sulla superficie della membrana per il successivo

trasporto nelle cellule. Questo processo è un esempio del fenomeno generale di **endocitosi** mediata da recettori. Il recettore della transferrina è una glicoproteina dimerica che **riconosce la Fe-transferrina, ma non la apo-transferrina**, che ha affinità molto minore. Le grosse variazioni conformazionali che avvengono nella transferrina in seguito alla coordinazione del ferro e del carbonato sono essenziali per questa differenziazione tra Fe- e apo-transferrina. Una volta che il recettore ha legato la Fe-transferrina, una porzione della membrana che lo contiene si ripiega per formare una cosiddetta vescicola ricoperta (la ricopertura è fatta da una proteina detta clatrina, che facilita la formazione della vescicola). All'interno della cellula la vescicola perde la sua copertura, per formare un endosoma. La membrana dell'endosoma contiene la pompa DMT1 per il ferro e delle pompe di protoni, attivate da ATP, che pompano protoni all'interno dell'endosoma per abbassarne il pH tra 5 e 6. A questo pH il ferro viene rilasciato in seguito alla protonazione del carbonato e dei tirosinati; il ferro rilasciato viene quindi ridotto e pompato nel citosol dalla DMT1 ed è disponibile o per l'uso o per l'immagazzinamento nella ferritina. La vescicola con la apo-transferrina si fonde quindi di nuovo con la membrana e, in seguito all'esposizione al pH circa 7.4 all'esterno della cellula, la apo-transferrina viene rilasciata e il ciclo (che sembra durare circa 15 minuti) può riprendere.



Questo ciclo spiega come mai la quantità relativamente piccola di transferrina è in grado di trasportare circa 40 mg di ferro al giorno, mentre la capacità globale (stechiometrica) della transferrina umana sarebbe di soli 7 mg di ferro.

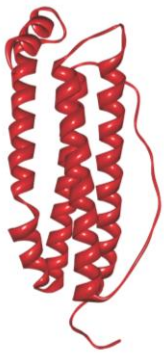
***Storage* del ferro - Ferritina**

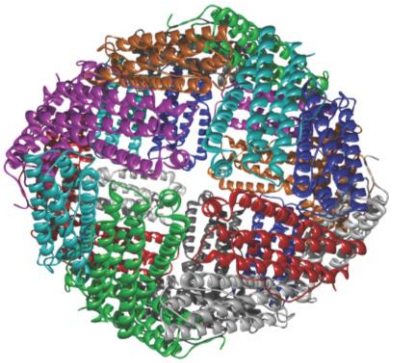
Il ferro rilasciato nella cellula deve venire utilizzato immediatamente per biosintesi o venire immagazzinato in una forma sicura, per evitare le reazioni radicaliche incontrollate con perossido e superossido viste prima. Questo ruolo è svolto da una proteina molto grossa ma solubile, la ferritina.

La ferritina si trova sia negli animali che nelle piante (solo i funghi non ce l'hanno); negli animali è essenzialmente nel fegato, milza e midollo spinale. Contiene circa il 13% del ferro totale del corpo umano ed il contenuto di Fe può raggiungere il 20% del suo peso. La ferritina è una proteina cava, di forma sferica, che racchiude un *core* inorganico, formato sostanzialmente da ossido di ferro(III) idrato (una "particella di ruggine"). Da notare che il bio-minerale è un concentrato di ferro per il nutrimento della cellula, ma funge anche da anti-ossidante per via del consumo di Fe(II) e di O_2 nel processo di mineralizzazione. In pratica si può anche dire che la ferritina utilizza l'ossigeno per concentrare il ferro della cellula.

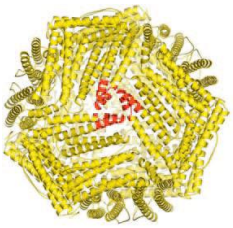
L'apo-ferritina ha una massa molecolare media di 440 kDa, è solubile in acqua, ed è formata da **24 sub-unità equivalenti** che si assemblano per formare una sfera cava del diametro esterno di circa 12 nm ed interno di circa 7.5 nm (figura). Le 24 sub-unità peptidiche della ferritina sono (negli animali) di due tipi, detti H- ed L-ferritina (*Heavy* o *Light-chain ferritin*). La H-ferritina lega il Fe(II) ed ha anche **attività ferrossidasica** (ossida il Fe^{2+} a Fe^{3+}), cioè possiede le due proprietà necessarie alla mineralizzazione del nucleo della ferritina (le sub-unità L-ferritina, specifiche solo degli animali, non hanno attività catalitica). Secondo i dati strutturali sulla apo-ferritina, ogni unità strutturale è formata da quattro α-eliche più lunghe, che formano un fascio, con una quinta α-elica più corta e perpendicolare alle prime (figura). Le 24 sub-unità si **auto-assemblano** in modo altamente simmetrico e in modo tale da lasciare delle aperture (8 pori di tipo idrofilico, con assi di

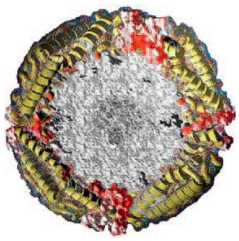
simmetria ternaria, e 6 pori di tipo idrofobico con assi di simmetria quaternaria) rispettivamente per l'entrata e – forse – per l'uscita del ferro; ogni poro è quindi all'interfaccia di 3 o 4 sub-unità proteiche. È interessante notare che le sequenze di amminoacidi (e, di conseguenza, del DNA che le codifica) delle componenti delle ferritine sono piuttosto variabili, soprattutto nei batteri, ma le strutture terziarie e quaternarie sono conservate, indicando che evidentemente le varie sequenze amminoacidiche contengono informazioni molto simili per il *folding*, in modo da portare alla stessa struttura della nanocavità.

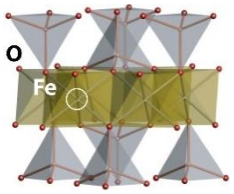


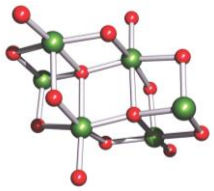


Un'immagine della struttura ai raggi X della ferritina, che mostra la compattezza del guscio proteico auto-assemblato, è mostrata in figura (con evidenziato un poro centrato su un asse di simmetria quaternario). Un'altra immagine, con evidenziato uno degli otto pori centrati su un asse ternario, è mostrata nella figura seguente, che mostra anche un poro quaternario in sezione. Il core inorganico della ferritina può contenere fino a 4500 atomi di Fe come ossido, ma tipicamente ne contiene una media di 1200. Dal punto di vista della stechiometria si può formulare come $Fe_9O_9(OH)_8(H_2PO_4)$, ma la quantità di fosfato è variabile e non influenza la struttura, che è molto simile a quella del minerale metastabile **Ferridrite**, $5Fe_2O_3{\cdot}9H_2O$ (figura). Sembra che i gruppi fosfato abbiano sostanzialmente un ruolo di leganti terminali, per interrompere il reticolo di ioni Fe(III), osso e idrosso, e probabilmente anche per legare il core inorganico alla proteina. Sono stati fatti numerosi oligomeri Fe(III)/OH^-/O^{2-} ben caratterizzati strutturalmente quali modelli sintetici del core ferroso della ferritina. Uno è riportato in figura sotto a destra.

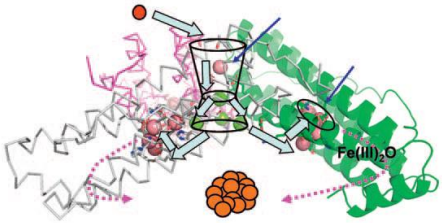








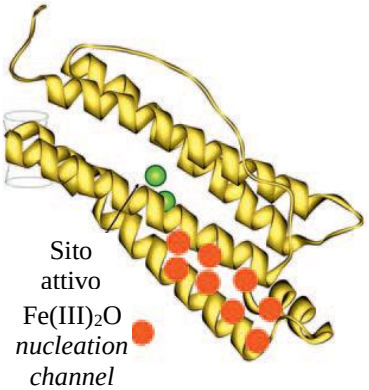
Il processo di formazione della ferritina a partire dalla apo-proteina già assemblata è schematizzabile come:



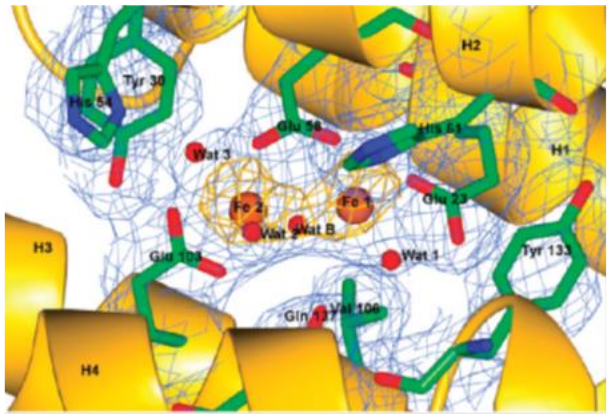
$$Fe^{2+} + H^+ + O_2 + \text{apo-ferritina} \rightarrow \text{ferritina (= apo-ferritina}{\cdot}FeO(OH))$$

È molto probabile che il ferro sia veicolato come ione Fe^{2+}, che è solubile a pH fisiologico, ma è più probabile che sia trasportato dentro e fuori da qualche molecola *carrier*, un cosiddetto *chaperone* (vedi dopo la proteina PCBP1).

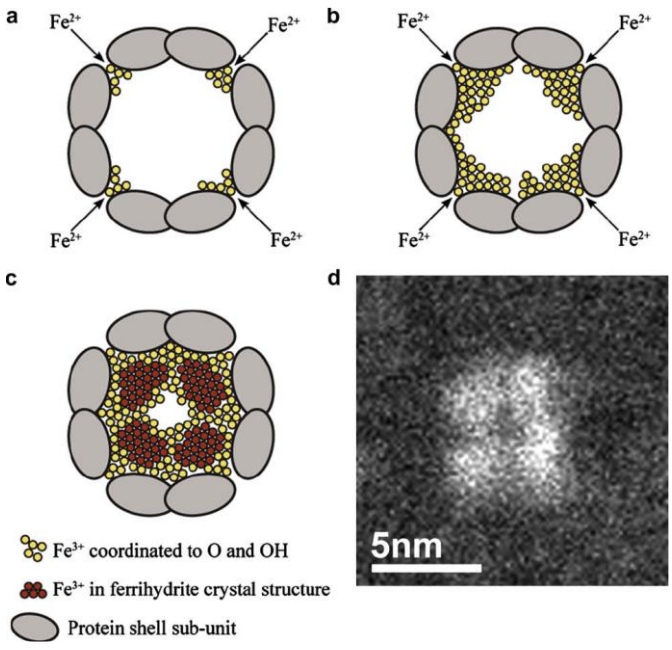
Il Fe(II) entra nel guscio proteico attraverso degli *ion channels* e raggiunge il sito attivo, noto come **sito ferrossidasico**, in grado di legare due ioni ferro tramite glutammati e un'istidina. Qui i due substrati, cioè Fe(II) e O_2 vengono 'accoppiati' per ottenere i precursori del biominerale a base di Fe(III). In altre parole, il primo stadio nella biomineralizzazione del ferro mediata dalla ferritina è l'ossidazione – al sito attivo ferrossidasico – di due ioni ferrosi a una specie di-ferrica con un ponte osso o idrosso. Da notare tuttavia che l'H-ferritina umana coordina il Fe(II) con **affinità piuttosto bassa, 15 μM**, una concentrazione ben più alta del livello di ferro(II)



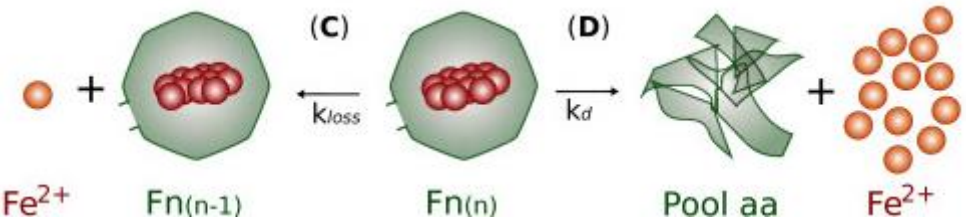
'libero' che si ritiene sia presente nel citosol (cioè per legare Fe(II) libero dovrebbe avere un'affinità maggiore). Questo dato fa pensare che sia necessaria la presenza di uno specifico *carrier* che porti il ferro dal citosol alla ferritina, cioè uno (o più) *Fe-chaperone*. La bassa affinità ha anche reso difficile la determinazione di strutture ai raggi X di ferritine con i siti ferrossidasici occupati. Solo in tempi abbastanza recenti (JACS 2012) è stata descritta una struttura ai raggi X di ferritina da rana 'carica' di ferro, che è il primo esempio di questo tipo per una specie eucariotica superiore. I cristalli di ferritina sono stati immersi in una soluzione di Fe(II) (*soaking*) in condizioni aerobiche e il processo di ingresso del ferro è stato bloccato a tempi diversi tramite *flash freezing*. Per tempi di immersione di 90 min sono stati ottenuti cristalli con i siti ferrossidasici occupati da coppie Fe(III) (Figura); la distanza media Fe–Fe di 3.1 ± 0.1 Å è in accordo con la presenza di un ponte osso o idrosso fra i due metalli. Con tempi di immersione molto brevi (1 min) sono stati ottenuti cristalli nei quali, molto probabilmente, almeno alcuni dei siti ferrossidasici sono occupati da coppie Fe(II). Le strutture forniscono una buona ipotesi per il meccanismo della reazione che avviene al sito ferrossidasico: l'ossidazione del Fe(II) da parte di O_2 è accompagnata da una diminuzione della distanza intermetallica che fa diminuire il numero di residui amminoacidici coinvolti nella coordinazione dei metalli, facilitando così il rilascio dei prodotti come specie dinucleari verso la cavità a seguito dell'arrivo di nuovo Fe(II). Il prodotto $Fe(III)_2O$ entra poi in un cosiddetto '*nucleation channel*', sempre all'interno del guscio proteico, dove vengono prodotti i nuclei del biominerale con cinetiche molto più lente rispetto alla attività ferrossidasica.



Studi abbastanza recenti (2009) suggeriscono che il *core* metallico della ferritina sia in realtà costituito da 8 sub-unità con un arrangiamento che riflette la simmetria cubica del guscio proteico e dei suoi 8 pori con simmetria ternaria per l'ingresso del Fe^{2+}. Una sezione della ferritina, vista lungo uno dei 6 pori con simmetria quaternaria, che mostra schematicamente il processo ipotizzato è mostrata in figura. Si ritiene che all'inizio il ferro si depositi come ossido/idrossido di Fe^{3+} in forma poco impaccata sulla superficie interna della proteina (sfere gialle), vicino ai siti di ingresso con attività ferrossidasica. Al crescere della concentrazione di ferro nella cellula, altro Fe^{2+} entra nella ferritina e si deposita in forma ossidata sulla superficie dei depositi già esistenti vicini ai pori di ingresso. L'ossidazione di ulteriore Fe^{2+} in ingresso fa si che il Fe^{3+} depositato in precedenza diffonda verso l'interno andando a formare i nuclei delle sub-unità di ferridrite ad elevato impaccamento (sfere rosse). La figura d mostra la struttura atomica di una di tali sub-unità, ottenuta tramite tecnica STEM-HAADF (*Scanning Transmission Electron Microscopy – High Angle Annular Dark Field*). La superficie di ciascuna sub-unità ferridritica è disordinata e quindi facilita il processo dinamico di deposizione/rilascio del ferro, in accordo col modello cosiddetto '*last-in first-out*'. Il fatto che le sub-unità non si incontrino al centro è anche in accordo col dato sperimentale che il contenuto medio di ferro non supera il 40% della capacità massima.

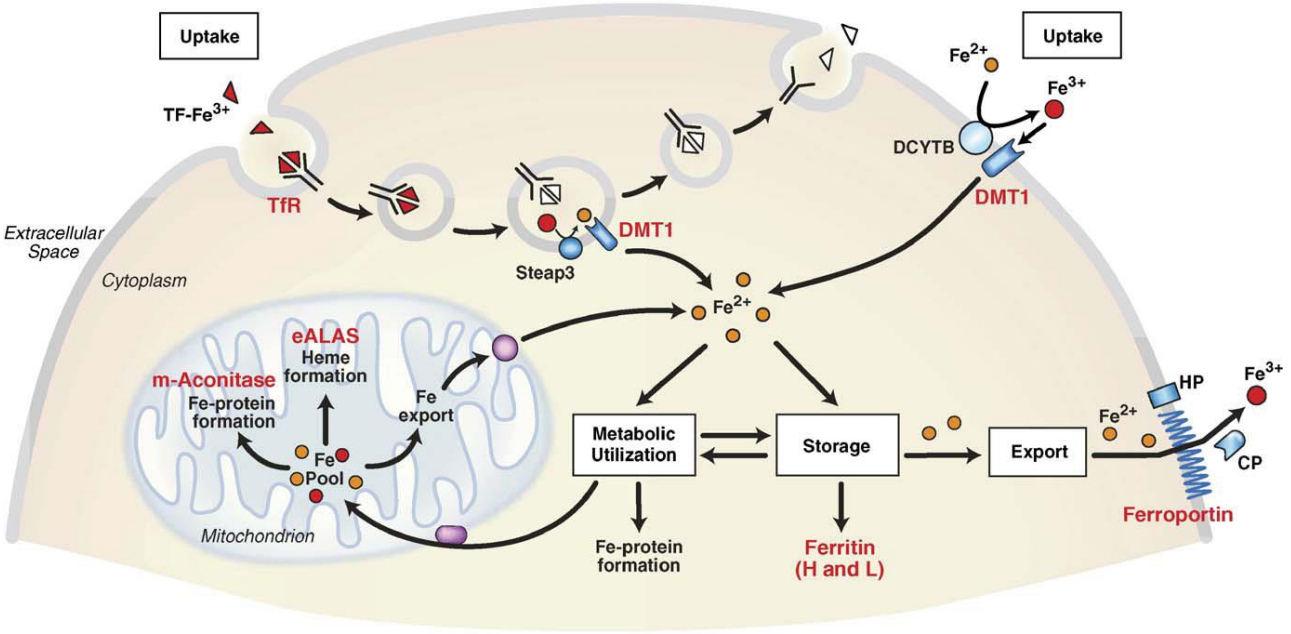


Il **rilascio del ferro** dalla ferritina come Fe(II) richiede l'aggiunta di elettroni, protoni e acqua (la formazione delle unità Fe–O–Fe è di solito accompagnata dal rilascio di acqua) al biominerale. La comprensione del meccanismo di rilascio è ancora molto limitata, nonostante i numerosi studi effettuati. Gli ioni Fe(II) generati sulla superficie del biominerale nella ferritina potrebbero derivare da un contatto diretto con riducenti esterni (e.g. acido ascorbico) attraverso le aperture dei pori, oppure per trasferimento elettronico attraverso la proteina. Entrambi i modelli possono essere in accordo con le attuali conoscenze. Si è visto che inducendo parziale *unfolding* intorno ai pori il rilascio di Fe(II) in presenza di riducenti diventa molto più veloce. Questo processo potrebbe avvenire anche *in vivo* ed essere regolato da piccoli metaboliti o proteine specifiche. I pori con asse di simmetria quaternario, non essendo polari (contengono all'interno l'amminoacido non polare leucina) potrebbero anche non servire per l'uscita degli ioni ferro, ma piuttosto potrebbero essere il sito per il trasferimento di elettroni che servono per ridurre gli ioni Fe(III) nel minerale a Fe(II). Tuttavia, il meccanismo del trasferimento elettronico non è ancora chiaro.
Un'ulteriore possibilità, emersa da studi recenti, è che in realtà il rilascio del ferro avvenga in seguito alla degradazione della proteina nei **lisosomi** (vescicole presenti nel citoplasma delle cellule eucariote, ne rappresentano il "sistema digerente"); la ferridrite cristallina esposta si scioglierebbe poi nel fluido lisosomiale e gli ioni Fe(II) verrebbero pompati fuori da DMT1. È stato dimostrato che cristalli di ferridrite isolati da ferritina vengono sciolti a pH 5 e 7 da GSH, ascorbato, e citrato. Le due ipotesi di rilascio del ferro sono riassunte nella seguente figura (ipotesi lisosomiale a destra):



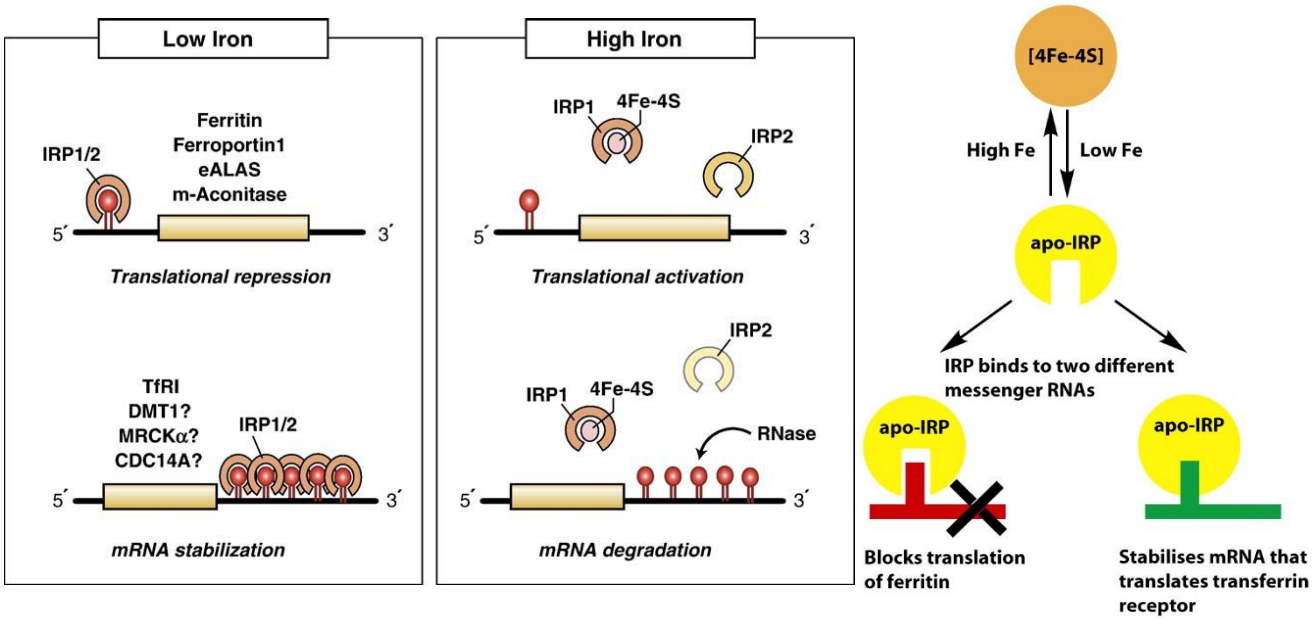
Abbastanza recentemente (Science 2008) si è trovato che la proteina **PCBP1**, una proteina (fa parte di una famiglia di *RNA binding proteins*) che è espressa da tutte le cellule di mammifero ed è presente sia nel citosol che nel nucleo, potrebbe fungere anche da **chaperone per il trasporto del ferro** dal citosol alla ferritina. In pratica si è visto che, esprimendo la ferritina umana in cellule di lievito – che non possiede la ferritina – questa contiene poco ferro, ma la quantità di ferro aumenta notevolmente in presenza della proteina umana PCBP1; risultati congruenti sono stati ottenuti anche direttamente in cellule umane, dove si è visto che la quantità di ferro accumulato nella ferritina è correlata alla PCBP1: bassi livelli di PCBP1 corrispondono a basso *loading* di ferro nella ferritina e al corrispondente aumento di ferro nel citosol. Si è anche verificato che la proteina PCBP1 è in grado di legare tre ioni Fe(II) (con affinità fra 1 e 6 μM) e facilita l'accumulo di ferro nella ferritina tramite un'interazione diretta (in alternativa si potrebbe ipotizzare un meccanismo indiretto, che necessiti di altri fattori cellulari). PCBP1 si lega alla ferritina solo in presenza di Fe(II). Da notare che, secondo questa ipotesi, PCBP1 è una **proteina bifunzionale**, in quanto funge sia da Fe-chaperone per la ferritina che da regolatore di sequenze specifiche di RNA.
La insolubile **emosiderina** è l'altra proteina che si riteneva fosse utilizzata per lo *storage* del ferro. E' una proteina molto grossa (4000 Da) ed ha un rapporto ferro/materiale proteico ancora più alto che la ferritina (può arrivare ad avere il 35% di Fe). In realtà si è visto che la emosiderina deriva dalla decomposizione lisosomiale della ferritina e che il ferro nella emosiderina è tossico in quanto il bio-minerale ha superfici esposte, non protette dalla proteina.

Omeostasi del ferro nelle cellule – Sistema IRP/IRE



La figura riassume la movimentazione del ferro nelle cellule, incluse quelle del duodeno. Come già visto, la transferrina "loaded" con Fe(III) nel plasma, Tf-Fe^{3+}, si lega al suo recettore TfR sulla superficie delle cellule, e il complesso Tf-Fe^{3+}/TfR subisce endocitosi. L'acidificazione dell'endosoma induce il rilascio del Fe^{3+} (sfere rosse) dalla Tf ; la successiva riduzione a Fe^{2+} (sfere gialle) avviene a carico di una ferro-reduttasi, **Steap3**, prima che lo ione venga esportato fuori dall'endosoma dalla già citata proteina di trasporto **DMT1** (Divalent Metal Transporter 1). Il complesso ApoTf/TfR torna poi sulla superficie della cellula dove si dissocia ed inizia un nuovo ciclo di uptake del ferro. L'uptake di ferro mediato dalla transferrina è ubiquito, ma soprattutto importante nelle cellule del midollo spinale, precursori dei globuli rossi dove è la fonte primaria del ferro per la sintesi dell'eme. DMT1 è presente anche sulla membrana degli enterociti duodenali (assorbimento del ferro non-eme dal cibo) dove funge al trasporto del Fe^{2+}, probabilmente ridotto dalla riduttasi di membrana DCYTB (vedi sopra). (Notare che in figura in alto a destra c'è un errore: il Fe^{3+} viene ridotto a Fe^{2+} da DCYTB, non il viceversa; inoltre il Fe^{2+} è più grande del Fe^{3+})
Il ferro introdotto nel citosol entra a far parte del cosiddetto "**free iron pool**", che si pensa consista di Fe^{2+} legato a una serie di molecole di basso peso molecolare. Il ferro nel citosol può venire usato per il metabolismo e per la formazione di Fe-proteine sia nei mitocondri che nel citosol stesso. I mitocondri svolgono un ruolo particolarmente importante nella formazione di Fe-proteine dal momento che la maggior parte delle proteine Fe-S sono fatte in questo organello e anche numerosi stadi critici nella formazione dell'eme avvengono nella matrice mitocondriale dove si trovano la 5-aminolevulinato sintasi (ALAS) e la ferrochelatasi.
Nel citosol l'eccesso di ferro può essere accumulato nella ferritina oppure essere esportato dalla **ferroportina** (FPN), espressa però soltanto da alcuni tipi di cellule (enterociti duodenali, epatociti e macrofagi). Quello della ferroportina è l'unico meccanismo individuato finora per l'esportazione del ferro cellulare ed è regolato dall'ormone peptidico epcidina (vedi dopo). L'esportazione del ferro è accoppiata alla sua ossidazione a Fe^{3+}, probabilmente tramite la proteina multi-rame **ceruloplasmina** (CP) che è libera nel siero oppure tramite la proteina multi-rame di membrana **epestina** (HP). Il sistema di regolazione, il cosiddetto **sistema IRP, Iron Regulatory Proteins**, deve essere in grado sia di "sentire" la quantità di ferro nel citosol che di regolare di conseguenza l'espressione di tutte le proteine coinvolte nei vari processi elencati sopra.
Il **sensing del ferro** nel citosol è realizzato dai cosiddetti **IRE**, **Iron Responsive Elements**, normalmente delle corte sequenze di nucleotidi nell'RNA messaggero (mRNA), insieme a *RNA*-

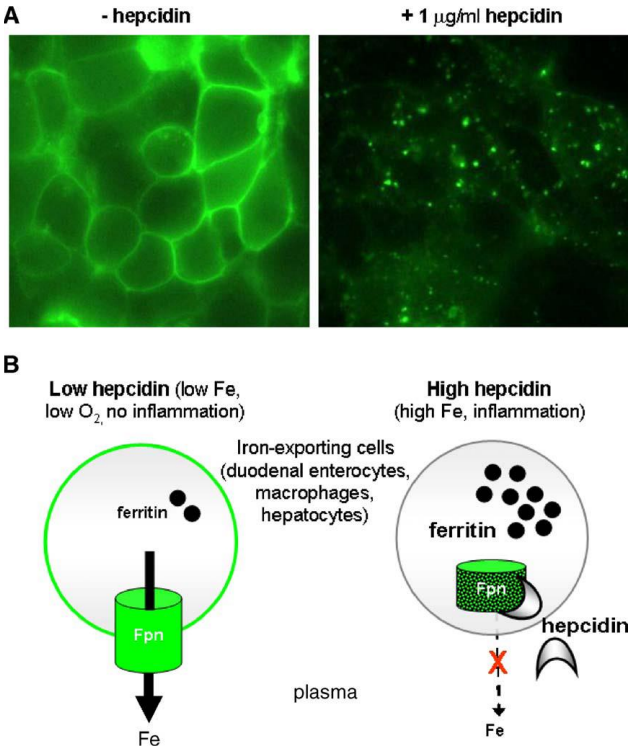
binding proteins regolate dal ferro, appartenenti quindi al sistema IRP, come **IRP1** e **IRP2**. Queste sono proteine Fe-S che, attivando o disattivando sequenze dell'mRNA, controllano il livello delle proteine dell'omeostasi del ferro. Il binding delle IRP ha effetti diversi sulla sintesi proteica a seconda della posizione dello specifico IRE: come schematizzato in due modi diversi nelle figure, per **alti livelli di ferro** nel citosol IRP1 e IRP2 sono "cariche" di ferro (come cluster [4Fe-4S]) e non si legano alle zone IRE dell'RNA, che quindi può svolgere le sue funzioni; per **bassi livelli di ferro** gli apo-IRP si legano fortemente alle regioni IRE dell'RNA. Quindi, in condizioni di carenza di ferro, attraverso questo meccanismo la concentrazione di ferritina diminuisce (tramite il suo naturale turnover) mentre aumenta quella del TfR, andando cioè verso condizioni che aumentano la quantità di ferro disponibile per il metabolismo.



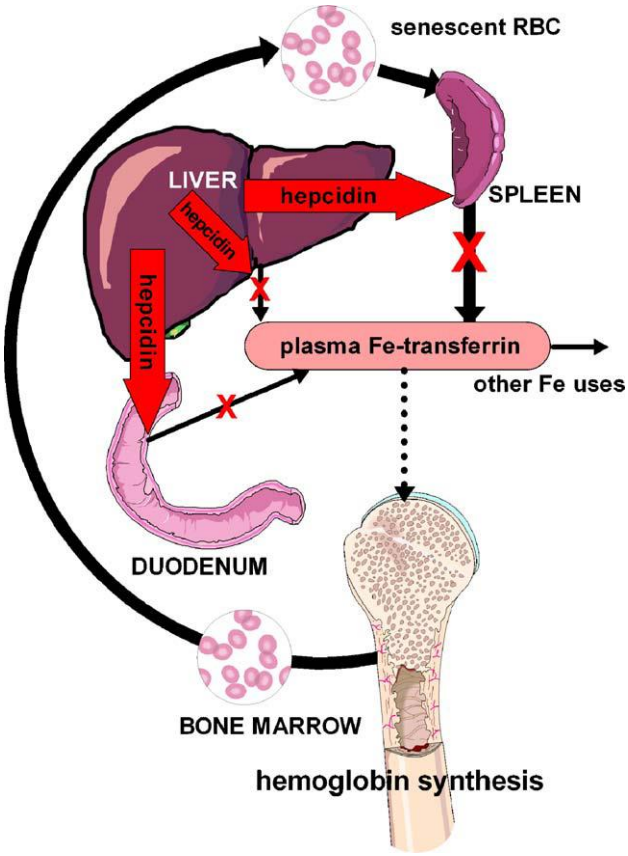
Quindi, in definitiva, nei vertebrati il sistema accoppiato IRE/IRP costituisce un network per la regolazione del metabolismo del ferro **a livello post-trascrizionale** (cioè dopo la trascrizione del DNA in RNA). Gli esseri umani sono particolarmente sensibili all'accumulo di ferro (*Fe overload*) in condizioni di elevato *uptake* di ferro, in quanto non possiedono alcun meccanismo per l'escrezione attiva dell'eccesso di ferro. In condizioni fisiologiche normali essi evitano l'accumulo di Fe mantenendo una stretta regolazione (mediata da ormoni) del suo uptake dal cibo.

Export del ferro dalle cellule

La **concentrazione extracellulare del ferro** (ricordiamo che nel plasma il ferro è legato alla transferrina) è controllata dall'ormone peptidico **epcidina** (25 amminoacidi), prodotto nel fegato. L'epcidina (scoperta solo da alcuni anni) agisce legandosi alla **Ferroportina**, la sola proteina che esporta il ferro dalle cellule (enterociti duodenali) nel plasma, inducendone la internalizzazione e degradazione (come schematizzato in figura; le immagini sopra visualizzano la ferroportina sulla superficie di un cluster di cellule, e sono state ottenute attaccando alla ferroportina la proteina fluorescente GFP, *green fluorescent protein*, oggetto del Nobel per la chimica 2008).



La ferroportina è trovata nei siti maggiormente coinvolti nei flussi del ferro: gli enterociti duodenali coinvolti nell'assorbimento del ferro dal cibo, i macrofagi che riciclano il ferro da eritrociti senescenti, e gli epatociti che accumulano ferro. La sintesi dell'epcidina è controllata dalle concentrazioni del ferro, ma anche da ipossia e stati di infiammazione. Si stanno appena iniziando a comprendere i meccanismi che regolano la produzione di epcidina, non è ancora chiaro come il ferro (presumibilmente tramite la saturazione della transferrina) regoli la produzione ed il rilascio di epcidina. Tuttavia è chiaro che la sua mancata regolazione è alla base dell'insorgere di numerose patologie legate a disordini del ferro, in particolare la deficienza di epcidina causa *overload* di ferro mentre la sua sovra-espressione causa anemia da carenza di ferro. Il loop omeostatico che comprende epcidina e ferriportina controlla il livello extracellulare del ferro (figura). Quando aumenta la saturazione della transferrina nel plasma, ad esempio per via di *intake* di ferro con la dieta, questo funge da stimolo per il rilascio di epcidina. L'aumento della concentrazione di epcidina comporta (tramite l'inibizione della ferroportina) una diminuzione dell'efflusso di ferro dalle cellule.



Omeostasi e Trasporto del Rame

Abbiamo già visto come, nel corso dell'evoluzione, la reattività chimica dei metalli di transizione sia stata sfruttata dagli organismi viventi per avere reazioni catalizzate in sistemi biologici in condizioni controllate. Le proprietà redox del rame si sono dimostrate particolarmente utili per catalizzare reazioni di facile trasferimento elettronico. Inoltre molte proteine che, in diversi processi biochimici, sono coinvolte nel *binding* o nell'attivazione di O_2 si sono evolute in modo da incorporare il rame. Il rame è dunque un elemento essenziale di tutti gli organismi aerobici: e.g. trasporto e rilascio dell'ossigeno nei molluschi (*emocianina*), la formazione di melanina (*tirosinasi*) la biosintesi del tessuto connettivo tramite *cross-linking* di elastina, collagene (*lisina-ossidasi*) e cheratina (*sulfidril ossidasi*), la biosintesi di neurotrasmettitori (*dopamina β-idrossilasi*), respirazione cellulare (*citocromo c ossidasi*), l'omeostasi del ferro (*ceruloplasmina*), e la difesa anti-ossidanti (*SOD*). Si stima che le proteine al rame (*copper-proteome*) rappresentino circa l'1% del proteoma totale sia di batteri che di organismi eucarioti. Anche la solubilità e la relativa abbondanza di questo metallo nell'ambiente hanno contribuito alla sua selezione. Un umano adulto e sano contiene circa **110 mg di rame** (di cui circa 9 mg nel cervello). L'assunzione giornaliera raccomandata per il rame in adulti è 0.9 mg, con un massimo di 10 mg. Sono tollerate solo variazioni piccole della quantità di

Table 1. Some copper enzymes in humans

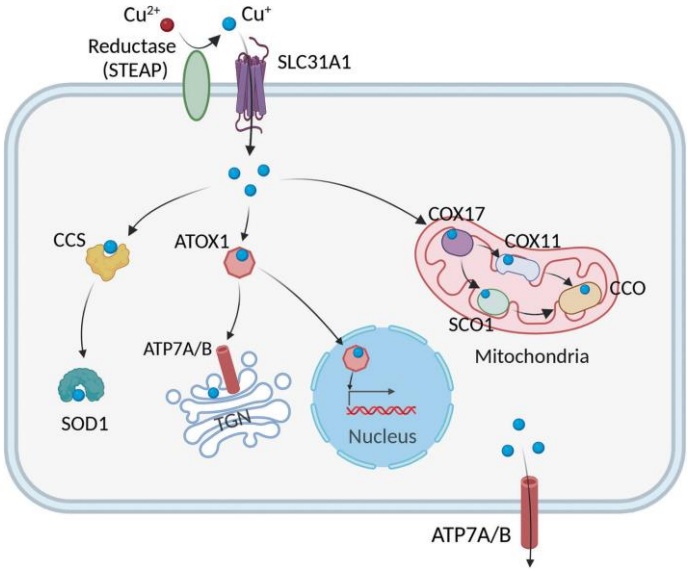
Enzyme	Function	Consequences of deficiency
Ceruloplasmin	Copper and iron transport	Iron accumulation and neurological damage
Cytochrome c oxidase	Electron transport chain	Brain abnormalities, hypothermia, muscle weakness
Dopamine β-monoxygenase	Catecholamine formation	Neurological effects, possible hypothermia
Lysyl oxidase	Cross-linking collagen, elastin	Connective tissue defects
Peptidylglycine α amidating monooxygenase (PAM)	Neuropeptide processing	Unknown
Superoxide dismutase	Free radical defence	Sensitivity to oxidative stress
Tyrosinase	Formation of melanin	Hypopigmentation
Unknown enzyme	Cross-linking of keratin	Steely hair (wool)

Cu e ci sono disturbi patologici gravi, spesso ereditari, dovuti al malfunzionamento (eccesso o carenza) dei sistemi regolatori del rame (vedi dopo la sindrome di Menkes e la sindrome di Wilson). In questo capitolo il rame verrà preso come esempio per mostrare come si cercano di capire i principi che governano l'**incorporazione degli ioni metallici nelle proteine**.

I sistemi biologici, per garantirsi di poter movimentare e utilizzare efficacemente il rame, devono soddisfare tutti i requisiti fondamentali che derivano dalle proprietà chimiche ed elettrochimiche degli ioni rame. È evidente che gli ioni Cu(I) devono essere solubilizzati e stabilizzati nelle cellule, per evitare precipitazione e disproporzione. Il glutatione (GSH, vedi parte introduttiva) è il principale legante a basso peso molecolare per la complessazione e stabilizzazione del Cu(I) nell'ambiente intracellulare, essendo presente in praticamente tutti i tipi di cellule in concentrazione millimolare. Oltre alla solubilizzazione, l'altro requisito fondamentale è quello di sopprimere la pericolosa formazione di ROS e HROS (e quindi impedire l'ossidazione indiscriminata di proteine, lipidi e acidi nucleici) e questo viene fatto riducendo al minimo il *pool* intracellulare di ioni rame liberi, a tal punto che si stima che una cellula di lievito contenga meno di uno ione di rame libero! Se questa concentrazione ultra-bassa di rame libero è positiva per evitate la chimica di Haber-Weiss e di Fenton, d'altra parte potrebbe rappresentare un limite per rifornire di rame le rame-proteine di nuova sintesi, impedendone quindi l'attivazione.

L'assorbimento del Cu dal cibo avviene principalmente a livello del duodeno e dell'intestino tenue. L'ingresso del Cu nelle cellule epiteliali intestinali è mediato principalmente dalla proteina di trasporto **CTR1**, (Copper transporter 1 anche chiamato SLC31A1) una pompa di ioni rame, una proteina omo-trimerica situata sul lato apicale degli enterociti e altamente conservata dal lievito all'uomo, che trasporta il rame, come Cu(I), attraverso la membrana con elevata affinità e selettività. CTR1 è ricco di metionine, plausibilmente per la coordinazione del rame. Questo processo è facilitato dall'attività delle metalloreduttasi STEAP (*six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*) e DCYTB (*duodenal cytochrome b*) che riducono il Cu^{2+} divalente a Cu^{+} monovalente; lo stato ionico in cui CTR1 trasporta il Cu. Dopo l'assorbimento da parte del tratto gastrointestinale, il Cu viene secreto nel flusso sanguigno (come Cu(II)) e legato a *chaperones* solubili, come l'albumina, la ceruloplasmina, le istidine e le macroglobuline. Una volta raggiunto il fegato, gli epatociti mediano l'assorbimento del Cu tramite CTR1. All'interno del citoplasma, il Cu viene poi trasportato da Cu-chaperones a proteine specifiche (vedi dopo) o chelato dalla metallotioneina (MT, vedi dopo) per essere immagazzinato. Nell'organismo, il Cu viene immagazzinato principalmente nel fegato, e l'eccesso di Cu viene eliminato nelle feci.

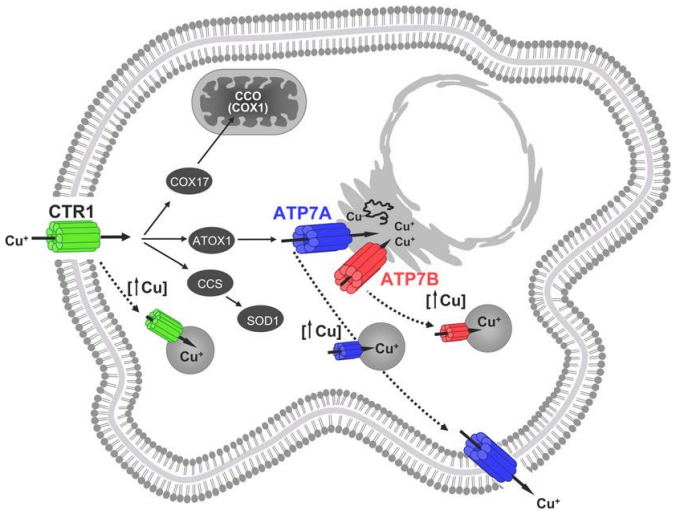
Al momento non è ancora compreso a fondo il meccanismo con cui le cellule riescono a controllare la concentrazione del rame per permettere la sua consegna e incorporazione in apo-proteine appena sintetizzate, impedendo al contempo ogni possibilità che esso si accumuli fino ad un livello tossico. Inoltre anche i meccanismi che regolano l'*uptake* e la seguente distribuzione del metallo ai vari *chaperones* non sono ancora chiariti.



Copper-chaperones

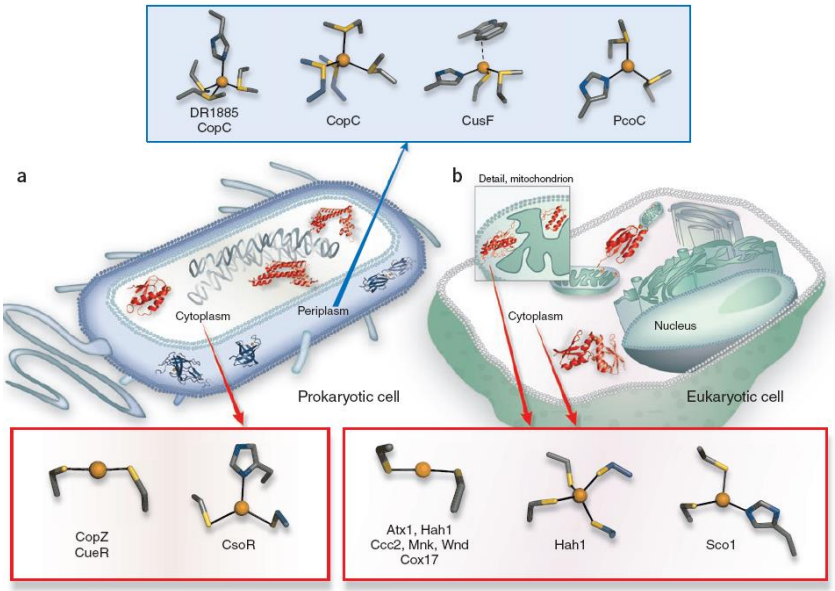
Studi compiuti in anni recenti hanno permesso di compiere enormi passi avanti nella comprensione del metabolismo cellulare del rame. In particolare, negli ultimi 30 anni sono state individuate e caratterizzate diverse **proteine solubili** presenti nel citosol che vengono utilizzate per il trasporto del rame (e quindi per la sua protezione da possibili chelanti intracellulari) e la sua consegna a specifiche apo-proteine "target" tramite interazioni dirette proteina-proteina durante le quali avviene lo scambio del rame. Tali proteine sono state chiamate **copper-**

chaperones.
Fino ad ora sono stati caratterizzati in dettaglio tre percorsi per il trasporto-rilascio di rame mediato da *copper-chaperones*; questi percorsi sono **conservati a livello evolutivo**, il che suggerisce un comune meccanismo per la sintesi di Cu-proteine in specie diverse.
I tre percorsi per il *trafficking* del rame nelle cellule di mammifero sono descritti schematicamente nella figura. Sono indicati i tre principali *copper-chaperones*, la proteina chiamata **COX17** (COX = *cytochrome c oxidase copper chaperone*) che consegna il Cu alla citocromo c ossidasi, **CCS** (*Cu chaperone for superoxide dismutase*) che consegna il Cu alla superossido dismutasi 1 e **ATOX1** (*antioxidant 1 copper chaperone*) che consegna il Cu ad **ATP7A** e **ATP7B**. Nello spazio intermembrana mitocondriale, COX17 si lega e consegna Cu ad altri chaperones, **SCO1** (*synthesis of cytochrome c oxidase* 1) o **COX11**, che trasferiscono Cu alle subunità della citocromo c ossidasi. Da notare che il compito degli *chaperones* che devono fornire Cu alla CcO è particolarmente complesso, in quanto il rame deve essere trasferito dal citosol ai mitocondri e inoltre deve essere incorporato in due sub-unità diverse di CcO (siti Cu_A e Cu_B). SCO1 trasporta il rame al sito dinucleare Cu_A mentre lo *chaperone* Cox11 trasporta il rame al sito Cu_B, quello catalitico.

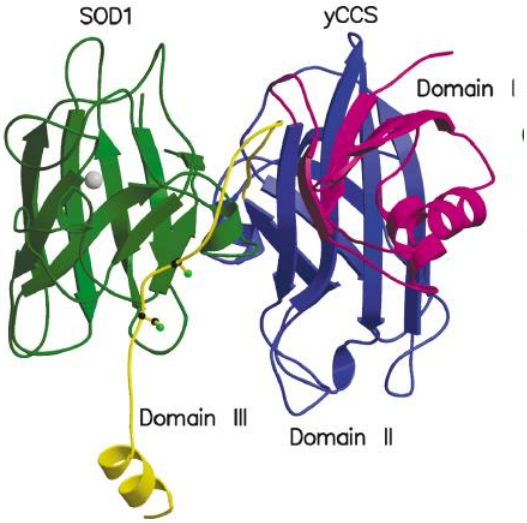


ATP7A e ATP7B sono proteine di trasporto trans-membrana del Cu(I) chiamate anche Wilson/Menkes ATPasi, sono sostanzialmente delle pompe ioniche azionate da ATP, e svolgono il duplice ruolo di trasporto del rame essenziale nel *network* trans-Golgi (TGN in figura) e di trasporto verso l'esterno della cellula del rame quando è in eccesso (vedi dopo). Il *trans-Golgi network*, l'ultima parte di una membrana fittamente ripiegata (apparato di Golgi), è un cosiddetto comparto secretorio, dove avviene l'inserimento del rame in molte proteine destinate poi alla membrana esterna o a membrane interne o ad essere secrete fuori dalla cellula. Mutazioni nei geni che codificano le pompe di Cu^+ ATP7A (espressa nella maggior parte di tessuti e organi tranne che nel fegato) e ATP7B (espressa prevalentemente nel fegato) causano, rispettivamente, le sindromi (ereditarie) di Menkes e di Wilson. La sindrome di Menkes (nota anche come "*brittle hair* o *kinky hair disease*", malattia genetica legata al cromosoma X) comporta una disfunzione letale del Cu: iper-accumulazione intestinale con conseguente severa deficienza nei tessuti periferici e quindi in rame-enzimi. La sindrome di Wilson, all'opposto, è caratterizzata da un accumulo di rame a livello epatico e neuronale, con conseguenti gravi tossicità, e richiede una terapia cronica per ridurre l'*overload*, aumentando l'escrezione del rame o riducendone l'assorbimento. Da notare che la carenza del rame-*chaperone* Atox1, che sta a monte di entrambe le pompe, causa la morte del feto prima della nascita, cioè è più letale delle sindromi di Menkes e di Wilson. La figura successiva evidenzia come elevate concentrazioni di Cu ([↑Cu]) stimolino l'endocitosi e la degradazione di Ctr1 e la esocitosi di ATP-7A e ATP-7B in vescicole "post-Golgi" o sulla membrana cellulare per esportare l'eccesso di metallo.
Si è visto che lo chaperone CCS è altamente specifico verso la SOD1 e non rilascia il rame ad altre cupro-proteine nella cellula. Senza il rame la Cu/Zn SOD non catalizza la dismutazione del superossido, e quindi organismi mancanti CCS o SOD1 sono più esposti a stress ossidativi. Esistono anche delle vie di inserzione del Cu nella SOD1 indipendenti dallo CCS, quindi l'assenza di CCS può non essere letale per il metabolismo cellulare.
Una volta stabilite le funzioni fisiologiche dei *copper-chaperones*, rimane da chiarire **a livello molecolare** come avviene il trasporto e la consegna del rame. In generale, le proteine metallo-*chaperones* (anche dette *metal-trafficking proteins*) devono legare gli ioni metallici che trasportano

in modo sufficientemente forte da evitare reazioni indesiderate o il loro rilascio, ma il loro intorno coordinativo deve anche essere tale da consentire il facile trasferimento del metallo alla proteina di destinazione a seguito del *docking* tra le due. Quindi non è sorprendente che i metallo-*chaperones* spesso presentino **tipologia di coordinazione inusuale** rispetto a quella delle proteine a cui cedono il metallo. Un motivo ricorrente in queste proteine di trasporto del rame prevede la coordinazione di Cu(I) con un **basso numero di coordinazione**, 2 o 3. Questa coordinazione è sufficientemente forte ma permette tuttavia l'ingresso di un terzo (o quarto) residuo o legante esterno alla proteina. Nessuno di questi intorni coordinativi è simile a quelli caratterizzati in altre proteine con siti Cu(I) mononucleari, che tipicamente hanno numero di coordinazione 4.
Le proteine coinvolte nel trasporto del rame intracellulare (e anche nel *sensing*, vedi dopo) presentano spesso siti a basso numero di coordinazione **CysX$_2$Cys** che favoriscono la coordinazione del Cu(I), come **[Cu(I)(Cys)$_2$]$^-$** (cioè con carica negativa) e sfavoriscono quella di Cu(II) e di altri ioni divalenti. In anni più recenti sono state individuate anche altre proteine che trasportano il rame e sono caratterizzate da siti di coordinazione ricchi di metionine, anziché cisteine. Anche in questi casi, come negli *chaperones* ricchi di cisteine, la coordinazione del Cu(I) è notevolmente diversa da quella canonica degli enzimi al rame. In entrambe le classi di *chaperones* i siti per il rame sono **facilmente accessibili** ed hanno una coordinazione flessibile che consente selettività per lo ione Cu(I) ed il suo facile trasferimento. Tuttavia le due classi di *chaperones* operano in compartimenti subcellulari ben distinti.
Ricordiamo alcune caratteristiche del tioetere della metionina rispetto al tiolato della cisteina che sono rilevanti nel riconoscimento dei metalli: il tioetere della metionina è meno polare e più idrofobico della cisteina (per via della catena laterale) ed ha maggiore flessibilità conformazionale; ha un maggiore, anche se di poco, ingombro sterico (per via del metile). Ma soprattutto la cisteina, che si lega sempre come cisteinato, ha una componente elettrostatica nel legame che è assente nella metionina (e quindi la metionina è un legante più debole per il Cu(I)) e infine il cisteinato si può ossidare facilmente a dare ponti disolfuro. Il citosol cellulare è un ambiente riducente, con potenziale di riduzione stimato fra –190 e –250 mV (vs NHE). Per questo le proteine presenti nel citosol raramente contengono ponti disolfuro stabili (tendono a venire ridotti a SH). Quindi le proteine per *sensing* e *trafficking* del Cu(I) nel citosol sono quelle con siti alla cisteina. Al contrario il periplasma, cioè l'involucro cellulare dei batteri, e la superficie esterna delle cellule eucariote sono ambienti più ossidanti e le proteine per il *sensing* e il trasporto del rame hanno siti ricchi di metionine (la cisteina si ossiderebbe con facilità in questi ambienti più ossidanti). Da notare che i siti **[Cu(I)(Met)$_n$]$^+$** hanno carica positiva e di solito hanno numero di coordinazione più elevato di quelli Cys, tipicamente 3 o 4, spesso includono anche istidina, forse per compensare la minore affinità dei tioeteri rispetto ai tiolati per il Cu(I).

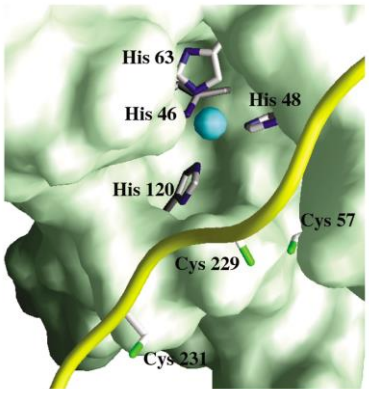


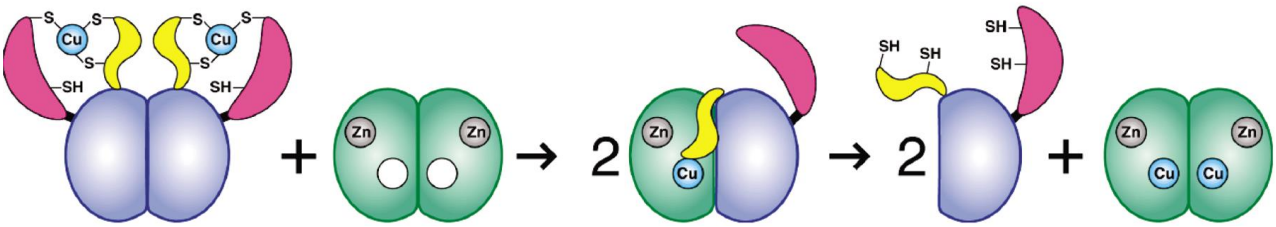
Quindi, in conclusione, la maggior parte dei siti per il rame(I) a base di cisteina si trovano in compartimenti intracellulari a carattere riducente, mentre quelli a base di metionina si trovano in compartimenti cellulari a carattere ossidante o nel mezzo extra-cellulare. Una caratteristica importante dei siti a base di metionina è la loro **selettività negativa** nei confronti dei due ioni di metalli di transizione più abbondanti all'interno delle cellule, ferro e zinco. Questi ioni a carica 2+ non hanno affinità per i siti ricchi di metionina, mentre si trovano centinaia di esempi di Zn^{2+} e Fe^{2+} legati in proteine a sequenze amminoacidiche Cys–X–X–Cys in siti che hanno però più elevato numero di coordinazione o come cluster (ad esempio negli *zinc-fingers* e nelle proteine con cluster ferro-zolfo).



Vediamo alcuni **esempi specifici** dei siti di coordinazione e del meccanismo di trasferimento del rame nei *copper-chaperones* intracellulari meglio caratterizzati, CCS e Atox1.

E' stata determinata la struttura ai raggi X dell'etero-dimero formato dal Cu-*chaperone* yCCS (da lievito, *yeast*, da cui la y) e SOD1. CCS ha tre domini di *binding*; il dominio II ricorda strutturalmente quello della SOD1 e facilita molte delle interazioni CCS/SOD1 ma è cataliticamente inattivo. I domini I e III hanno dei siti cisteinici di *binding* per Cu^{+}, rispettivamente $CysX_2Cys$ e CysXCys. La figura mette in evidenza il sito di binding nel dominio III (in giallo) e lo zinco (sfera grigia) già presente in SOD1. Il complesso CCS/SOD1 è tenuto insieme da interazioni idrofobiche e quattro forti legami a idrogeno (responsabili anche della formazione degli omo-dimeri $yCCS_2$ e $(SOD1)_2$). Nella formazione dell'etero-dimero a livello molecolare avvengono notevoli variazioni conformazionali sia nello *chaperone* che nella SOD1. Data la vicinanza fra i siti di *binding*, si ipotizza che il rame venga trasferito dal sito nel dominio III a quello nella SOD1 (tre istidine). Un **modello** dei due siti di binding (in verde quello nella SOD1Zn, in giallo quello sul dominio III di CCS, formato da Cys229 e Cys231) è mostrato in figura a lato. Il meccanismo di trasferimento (come lo si capisce al momento) è illustrato schematicamente nella figura successiva, partendo dagli omo-dimeri.

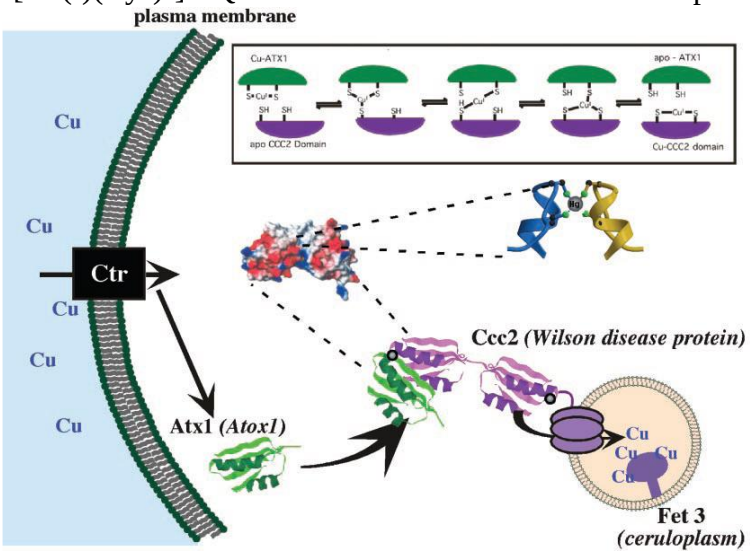




Non si comprende ancora come sia possibile che uno ione rame coordinato a tiolati possa venire trasferito direttamente al sito di sole istidine della SOD1. È stato dtuttavia imostrato che l'attivazione della SOD da parte di CCS richiede la presenza di O_2, e ciò suggerisce che potrebbe essere necessaria l'ossidazione dei residui di cisteina per consentire il rilascio dello ione metallico dal dominio III nel sito attivo della SOD1

Nel *copper-chaperone* Atox1, uno dei meglio caratterizzati, la coordinazione del Cu(I) avviene tramite due cisteine; una lisina adiacente al sito di coordinazione del rame impedisce stericamente l'approccio di un terzo legante, ma variazioni conformazionali che possono essere associate alla formazione dell'addotto con la proteina *target* (in questo caso si chiama Ccc2, appartenente alla

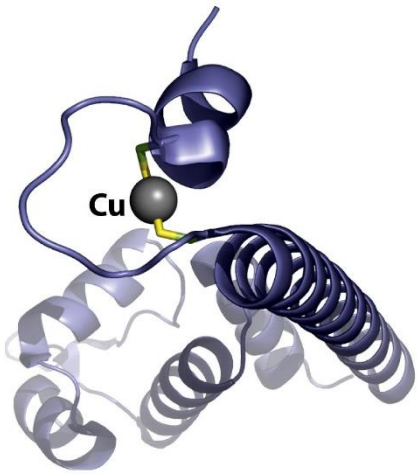
classe delle *Wilson disease* ATP-asi) permettono a quest'ultima di accedere al sito anionico $[Cu(I)(Cys)_2]^-$. Questo meccanismo è illustrato nella parte superiore della figura.



La proteina Ccc2 poi porta il rame all'interno di un compartimento della regione cosiddetta trans-Golgi dove viene incorporato in multi-Cu ossidasi come la ceruloplasmina e Fet3, così come in altri enzimi al rame. La figura mostra anche un ipotetico (ma ragionevole) meccanismo per il trasferimento del Cu(I) che richiede il docking elettrostatico dei due partner. La formazione di un intermedio con il metallo a ponte fra le due proteine è supportato dalla struttura ai raggi X dell'addotto con Hg(II).

Proteine sensori di rame

La maggior parte di quello che al momento sappiamo su come venga rilevato il livello di rame e su come questo dato venga poi convertito in un segnale per la cellula deriva da studi su *E. coli*. In questo batterio è stato individuato un **fattore di trascrizione** chiamato **CueR** (figura). Questa proteina lega il Cu(I) con elevata selettività, con una coordinazione lineare tramite due cisteinati che porta a una costante di affinità estremamente elevata (10^{21}). Come si può immaginare, una coordinazione lineare tramite due soli leganti è selettiva per ioni d^{10}, e infatti CueR lega anche gli ioni esogeni Ag(I) e Au(I) con affinità confrontabili. La coordinazione del Cu(I) induce una **variazione conformazionale** che permette a CueR di legarsi al DNA a un sito che codifica per l'enzima ATPasi CopA, che è una pompa per il rame (attivata da ATP) situata nella membrana del citoplasma e che ha la funzione di **esportare Cu** nel periplasma.

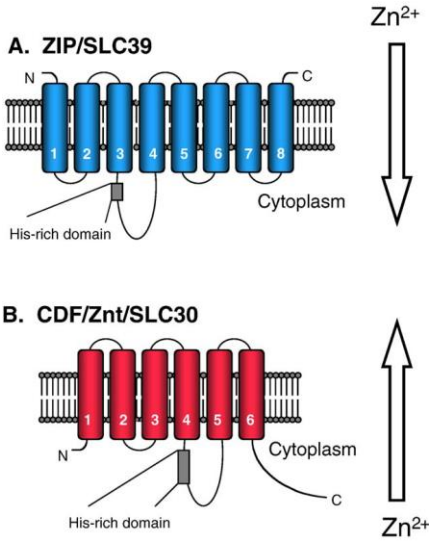


Omeostasi e trasporto dello zinco

Lo zinco è un co-fattore essenziale per la struttura e il funzionamento di molte proteine. Abbiamo già visto che la concentrazione media intracellulare dello zinco (considerando la cellula come un contenitore unico) è dell'ordine 0.1–0.5 mM, anche se poi varia notevolmente nei vari compartimenti cellulari. Vi sono poi alcune cellule, come certi neuroni e cellule della prostata, che presentano livelli di zinco molto più alti delle altre, riflettendo il ruolo speciale rivestito dallo zinco in queste cellule. Secondo una pubblicazione del 2006, circa il 10% del proteoma umano è fatto da proteine che hanno sequenze potenzialmente in grado di legare lo zinco, cioè potrebbero costituire lo **zincosoma** o zinco-proteoma (più di 300 già individuate). Nelle cellule eucariote le zinco-proteine si trovano sia nel citosol che in numerosi compartimenti subcellulari (organelli come nucleo, mitocondri, trans-Golgi network,…). Quindi le cellule devono bilanciare la distribuzione dello zinco intracellulare così da mantenere livelli di zinco sufficienti, ma non tossici, sia nel citosol che negli organelli.

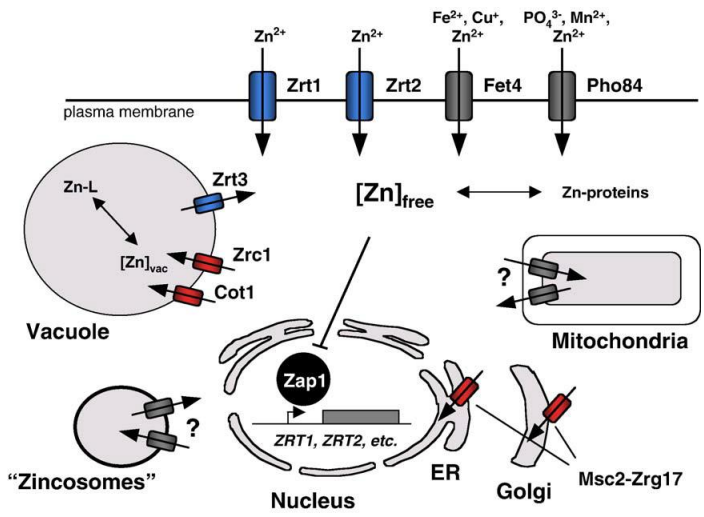
In base a questi dati, è molto probabile che lo zinco "libero" nelle cellule sia a livelli molto bassi, anche se non così bassi come nel caso del rame (sulla base delle affinità di *binding* di alcune proteine deputate al traffico e al *sensing*, si ritiene che in una cellula tipica le concentrazioni medie dello Zn(II) libero siano nell'intervallo da nanomolare a picomolare, mentre quelle di Cu(I) siano dell'ordine attomolare). Con il termine "libero" in questo contesto si intende zinco labile che è

facilmente disponibile per essere legato dalle zinco-proteine di nuova sintesi. Da sottolineare che la determinazione sperimentale dello zinco labile con buona precisione è molto difficile, e infatti in letteratura si trovano dati molto discordanti, a seconda dei metodi utilizzati.
In questo settore non c'è ancora un forte consenso fra i ricercatori. Secondo gli autori che ritengono che non ci sia praticamente zinco libero, esso deve essere soggetto a un sistema di trasporto e *delivery* tramite opportuni *chaperone* come il rame (che tuttavia non sono stati ancora individuati). Secondo gli oppositori di questa ipotesi non è però plausibile che tutto lo zinco venga trasportato alle rispettive proteine tramite appositi zinco-*chaperone*, prima di tutto perché ci sono centinaia di proteine nella cellula che inglobano zinco e non è pensabile che vi siano altrettanti *chaperone* (sarebbe molto anti-economico per la cellula, e comunque non ci sono evidenze sperimentali in questo senso). Si potrebbe pensare che pochi zinco-*chaperone* portino lo zinco, ognuno a molte zinco-proteine; tuttavia in questo caso si dovrebbe pensare che l'interazione proteina-proteina fra uno zinco-*chaperone* e tutte le zinco-proteine da lui servite sia simile, e che quindi tali proteine abbiano fra loro delle similitudini, ad esempio nelle sequenze amminoacidiche responsabili per il *docking*. Tuttavia tali similitudini non sono state trovate neanche in classi di proteine simili (e.g. gli *zinc-fingers*). Quindi, secondo questi autori, è possibile che alcune zinco-proteine particolarmente importanti abbiano priorità e quindi utilizzino degli *chaperone* specifici, ma questo meccanismo non può valere per tutte. Quindi la maggior parte delle apo-proteine dello *zinc-proteome* devono procacciarsi lo zinco da un *pool* di zinco libero o comunque abbastanza labile. Secondo questi autori le considerazioni fatte sopra sull'affinità di *binding* valgono in un sistema in equilibrio, ma le cellule non lo sono, essendo soggette a variazioni delle condizioni ambientali, del metabolismo intracellulare e delle risposte dei sistemi regolatori. Quindi ritengono probabile che le cellule passino ciclicamente e rapidamente da periodi di carenza di zinco a periodi di sovrabbondanza. Per esempio, una cellula in carenza di zinco "risponderebbe" aumentando l'espressione di trasportatori (pompe tipo Zur e ZntR, vedi dopo) per l'*uptake* di zinco e diminuendo quella per i sistemi di efflusso. L'aumento di concentrazione di zinco nella cellula induce lo *shut off* dell'espressione delle pompe di *uptake* mentre attiverebbe quella per le pompe di efflusso. Poiché queste risposte non sono istantanee, la cellula per un certo periodo accumulerebbe zinco in eccesso rispetto alla sua necessità, prima che l'aumentato efflusso lo possa eliminare. In questi periodi di "abbondanza" lo zinco in eccesso verrebbe sfruttato per zincare le nuove zinco-proteine.

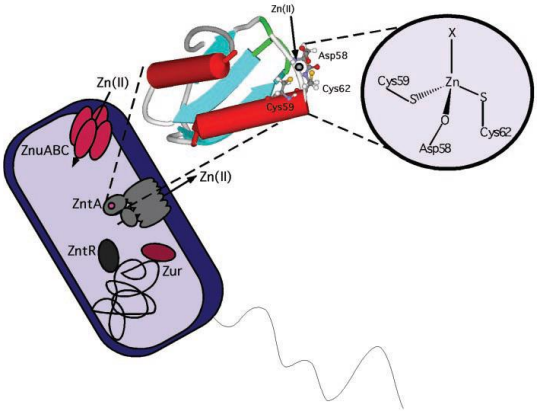


In ogni caso, l'*uptake* dello zinco nelle cellule e il suo trasporto dentro e fuori gli organelli intracellulari richiede delle proteine di trasporto (pompe) che attraversano queste membrane. Sono state individuate almeno **6 famiglie** di trasportatori dello zinco, due delle quali nelle cellule eucariote, denominate **ZIP** e **CDF/ZnT** (CDF = Cation Diffusion Facilitator). Le proteine transmembrana di tipo ZIP traportano lo Zn^{2+} (o altri ioni) dallo spazio extracellulare o dal *lumen* di organelli (e.g. vacuoli nelle cellule di lievito) nel citosol, cioè servono prevalentemente per l'*uptake* dal plasma. Viceversa le proteine di tipo CDF trasportano lo zinco e/o altri ioni metallici dal citoplasma nel lumen di organelli intracellulari o all'esterno della cellula (cioè servono all'export dello zinco). La figura mostra le attuali conoscenze per le cellule eucariote di lievito, in rosso trasportatori della famiglia CDF, in blu della famiglia ZIP, in grigio trasportatori ipotetici o di altre famiglie di proteine. Ancora poco o nulla si sa sulla coordinazione dello zinco in queste pompe, costituite da numerosi domini trans-membrana (6 o 8). Il meccanismo di trasporto delle pompe ZIP è ignoto, mentre quelle di tipo CDF sembrano adottare un meccanismo antiporto Zn^{2+}/H^{+} o K^{+}.

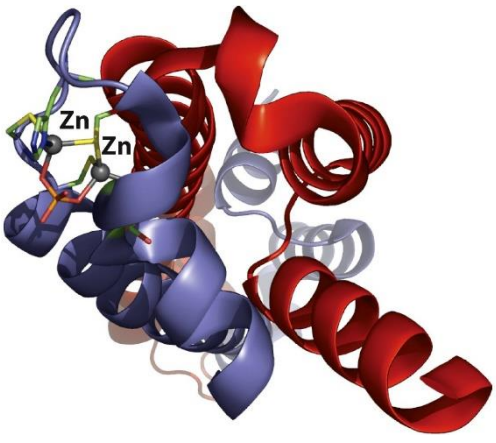
La figura mostra anche schematicamente una particolare vescicola detta **zincosoma**. Gli studi effettuati utilizzando dei fluorofori sensibili allo zinco per determinare la distribuzione intracellulare dello zinco "labile" hanno individuato in molti tipi di cellule la presenza di vescicole legate alla membrana cellulare molto ricche di zinco "labile". Tali vescicole sono state chiamate zincosomi. Si ritiene che essi possano essere dei siti vescicolari di *storage* dello zinco. Tuttavia non è ancora chiara la relazione fra gli zincosomi e altri organelli delle cellule; alcuni ritengono che siano degli endosomi "maturi". Sostanzialmente, l'identità e la funzione di questi compartimenti, così come il loro ruolo nel metabolismo e nell'omeostasi dello zinco, sono ancora sostanzialmente ignoti.



La figura successiva rappresenta in modo schematico quanto si sa del meccanismo di omeostasi dello zinco in *Escherichia coli*. Nel batterio il traffico del metallo è controllato dalle proteine regolatorie (o **fattori di trascrizione**) sensibili allo zinco **Zur** e **ZntR**, che regolano rispettivamente la trascrizione delle **pompe ZnuABC e ZntA** (pompe dello zinco della famiglia P-type ATPasi). L'ingrandimento mostra la struttura del *metal-binding domain* di ZntA. Si vede che esso è molto simile a quello di Atox1, il *copper-chaperone* visto prima, in quanto presenta il motivo di binding –CysXXCys–. In questo caso lo zinco, oltre che dai due cisteinati, è coordinato tramite l'ossigeno di un aspartato. Vi è poi un altro sito di legame potenzialmente occupato da un legante all'ossigeno o all'azoto proveniente dal solvente o dal tampone. Questo intorno coordinativo dello zinco non era mai stato trovato prima in nessuna delle molte Zn-proteine caratterizzate strutturalmente. Come la proteina possa discriminare fra Cu(I) e Zn(II) non è noto. La coordinazione di due cisteinati e un aspartato allo Zn(II) conferisce una carica complessiva –1, che servirebbe a prevenire la ionizzazione di una eventuale molecola di acqua coordinata nella quarta posizione, sopprimendo così l'attività catalitica tipica del sistema Zn–OH, lasciando al contempo un sito di coordinazione labile disponibile per la successiva proteina che dovrà acquisire lo ione Zn(II).



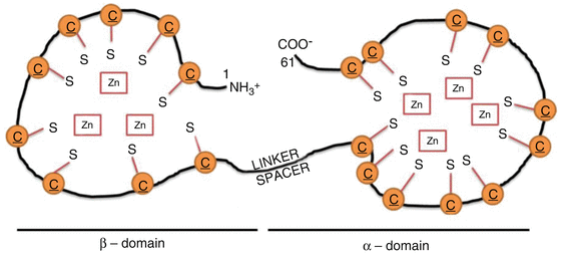
Il **fattore di trascrizione** sensibile allo zinco **ZntR** è strettamente correlato a CueR, visto prima. Presenta due siti per il legame dello zinco, ognuno dei quali coordina una coppia di ioni Zn^{2+} tramite cisteine ed istidine ed un fosfato a ponte. Parte della struttura ai raggi X è mostrata in figura.



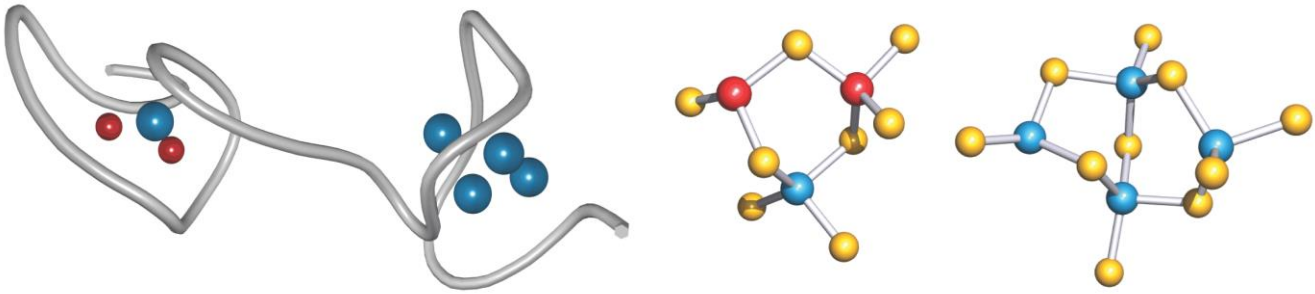
Ci sono anche ipotesi che le metallotioneine (vedi sotto) abbiano un ruolo per lo *storage* temporaneo dello zinco. Queste proteine coordinano lo zinco tramite le molte cisteine. Osserviamo infine che lo ione Zn^{2+} è naturalmente redox-inerte, ma **il legame Zn–S è redox-attivo** (anche se lo Zn^{2+} rimane redox-inattivo), in quanto il solfuro del cisteinato può venire facilmente ossidato a disolfuro rilasciando al contempo lo zinco. Si ipotizza quindi che le zinco-tioneine possano rispondere

a segnali redox rilasciando lo zinco. In altre parole potrebbero trasformare uno stimolo di tipo redox in reazioni chimiche mediate dallo zinco: per esempio, lo zinco rilasciato potrebbe attivare dei geni o inibire altre proteine.

Metallotioneine



Le metallotioneine (MT) sono piccole proteine (ca. 60 amminoacidi, 6 kDa) presenti praticamente in tutti gli esseri viventi e molto ricche in cisteina (fino al 30%, figura). Esse legano facilmente ioni di metalli *soft*, sia esogeni e tossici come Cd^{2+} e Hg^{2+}, che essenziali come Zn^{2+} e Cu^{+}. La sequenza amminoacidica di queste proteine mostra una elevata omologia fra le varie specie, soprattutto per quanto riguarda le cisteine, segno che la loro ottimizzazione è avvenuta nei primi stadi evolutivi e che devono avere (o avere avuto) funzioni essenziali. Come discusso più in dettaglio in seguito, il loro ruolo non è chiaro, ma si ipotizza che siano implicate nel metabolismo di rame e zinco (trasporto e *storage*) e nella detossificazione di metalli tossici. Nell'uomo vengono espresse 4 isoforme di MT, e due di queste, MT1 e MT2 sono quelle di gran lunga più abbondanti e sono presenti praticamente in tutti gli organi. La biosintesi delle isoforme MT1 e MT2 viene indotta da una varietà di condizioni di stress e di composti, tra cui gluco-corticoidi, citokine, ROS e ioni metallici. I più potenti induttori della biosintesi di MT1 e MT2 sono ioni metallici come zinco e cadmio. Vari studi spettroscopici (soprattutto NMR del ^{113}Cd) e strutturali hanno evidenziato che le metallotioneine possono legare 7 centri metallici divalenti e fino a 12 ioni Cu^{+} (le MT non coordinano Cu^{2+}). Gli ioni divalenti, come Zn^{2+} o Cd^{2+} sono tutti tetracoordinati, disposti in due clusters rispettivamente di 3 e 4 ioni (e.g. [3Cd–3S] e [4Cd–5S]) tenuti insieme da **cisteine terminali e a ponte** (9 cisteinati, di cui 3 a ponte, nel cluster piccolo e 11, di cui 5 a ponte, in quello grande, figura). La figura successiva riporta la struttura ai raggi X di una Cd/Zn-metallotioneina e, in particolare, i due cluster metallo-cisteina (cadmio blu, zinco rosso). Lo ione Cu^{+} può venire coordinato dalle MT con diverse stechiometrie, con un minimo di 7 Cu^{+} per MT. Nei mammiferi le MT coordinano prevalentemente lo zinco (o miscele zinco/rame), ma esso può venire rapidamente sostituito da rame o cadmio. Infine, i siti Cys possono venire ossidati, con conseguente rilascio dei metalli coordinati.



Da anni c'è un ampio dibattito per capire quale sia il ruolo (principale) di queste proteine ubiquitarie. Nonostante decenni di studi di vario tipo, la loro vera funzione biologica non è ancora chiara. Molto probabilmente le metallotioneine sono **proteine multifunzionali**, la cui funzione principale può dipendere dal tipo di organismo e dalla variante specifica della proteina. Alcuni sostengono che la loro funzione principale sia quella di detossificazione/protezione da metalli xenobiotici, principalmente per il Cd^{2+}, ed eventualmente altri ioni pesanti soft come Ag^{+} e Hg^{2+} che hanno elevata affinità per il cisteinato. Dal momento che, rispetto al Cd^{2+}, questi ioni preferiscono anche numeri di coordinazione inferiori a quattro, se ne possono legare più di 7, fino a 18, per unità proteica. Sembra tuttavia improbabile che lo scopo evolutivo di queste proteine sia la detossificazione dal cadmio. La tossicità da cadmio è rara, piuttosto recente e sempre dovuta all'uomo. Sembra quindi più probabile (anche se si può sempre pensare che quando le MT si sono

sviluppate a livello evolutivo le condizioni ambientali erano diverse e magari la tossicità di metalli come il Cd poteva essere un problema) che la detossificazione dal cadmio sia una proprietà delle MT piuttosto che la loro funzione a livello di evoluzione. Sembra più probabile che la funzione delle MT nei mammiferi e negli altri organismi sia in qualche modo correlata a metalli fisiologicamente rilevanti come zinco e/o rame. Si è pensato che le MT possano fungere da *chaperone* per la sintesi di metallo-proteine, o come siti di *storage* temporaneo di metalli essenziali in modo da prevenirne la tossicità ma essere tuttavia in grado di fornirli alle apo-metalloproteine quando necessario. Esperimenti condotti *in vitro* hanno indicato che queste reazioni sono possibili, ma tuttavia esperimenti genetici (e.g. soppressione nei topi dei geni che codificano per MT1 e MT2, oppure sovra-espressione di MT1 o MT2) hanno dimostrato che il trasferimento di Cu o Zn dalle MT ad altre proteine non è essenziale: tutte le metallo-proteine essenziali possono venire sintetizzate anche senza l'aiuto di MT-*chaperones*. Un'altra ipotesi ricorrente è che, se le MT non sono essenziali per *storage* e *trafficking* dei metalli essenziali, allora forse servono per proteggere dalla loro potenziale tossicità. In realtà però la prima linea di difesa delle cellule in presenza di un afflusso straordinario di un metallo (e.g. Zn o Cu) consiste nell'aumentarne l'efflusso. Quindi, l'induzione delle MT per la cattura di questi ioni metallici rappresenta al più una seconda linea di difesa, che diventa operativa in cellule private dei normali meccanismi di efflusso. La detossificazione del cadmio conta solo sulle MT perché nei mammiferi non c'è un sistema che gestisca l'efflusso di questo metallo. Un'ulteriore ipotesi che trova crescente consenso è che le MT possano avere un ruolo protettivo nei confronti dello *stress* ossidativo. Come già detto, *in vitro* i cluster metallo-tiolato sono facilmente ossidati, e quindi potrebbero catturare e disattivare i ROS, radicali liberi ossidanti come OH•.

In conclusione, anche se è del tutto probabile che esista qualche condizione, comune alla maggior parte degli organismi viventi, nella quale la presenza di queste proteine ubiquitarie fornisca un chiaro vantaggio a livello evolutivo, tale condizione non è ancora stata individuata.