

Chimica bioinorganica

- Introduzione : l'importanza dei metalli

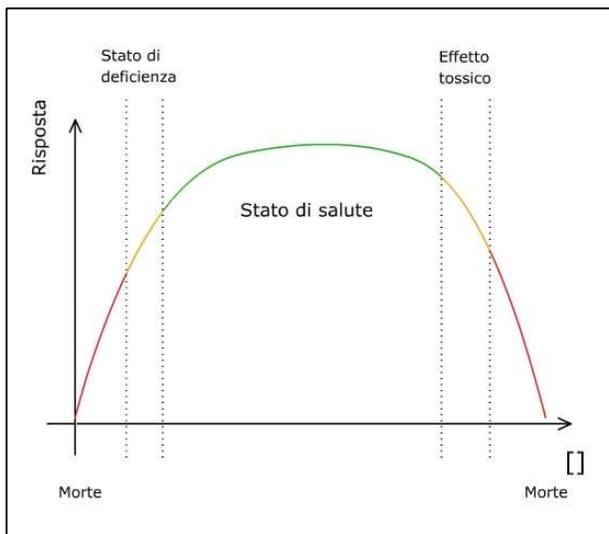
Le molecole inorganiche rappresentano solo una minima parte nella composizione di un essere vivente, tuttavia molti elementi inorganici sono importanti per la vita: abbiamo elementi di *bulk* come Na, K, Ca, Mg, S, P, ma anche elementi presenti in minor quantità ma comunque necessari, quali i metalli della prima transizione V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn e il Mo, che fa parte della seconda transizione.

Inoltre altri elementi, quali Pt, Au, Hg, Ag, Y, Tc, Gd sono usati in terapia e diagnostica.

In modo particolare, il Tc (tecnezio) ed il Gd^{3+} (gadolinio) rivestono ruoli importanti in questo campo. Il Gd^{3+} , infatti, è usato come mezzo di contrasto per la risonanza magnetica nucleare e deve essere somministrato come composto di coordinazione (è infatti molto tossico come acquoione). Il ^{99}Tc è invece un elemento di sintesi (sintetizzato a partire da isotopi del Mo) con un tempo di vita in cui è metastabile ed emette radiazioni γ : esso può essere somministrato in modo che si accumuli in zone di iperattività, ed è usato nelle scintigrafie, ad esempio per visualizzare metastasi.

In generale i metalli sono essenziali per:

- trasporto di piccole molecole e loro attivazione
- scambio di elettroni e reazioni redox
- funzioni strutturali
- funzioni idrolitiche
- trasposizioni molecolari
- funzioni di messaggeri



Un elemento si dice essenziale se si verifica una perdita di funzione vitale in caso di una sua presenza insufficiente. Inoltre se questa insufficienza viene rimossa, la funzione viene ripristinata. Molto spesso anche l'eccessiva presenza dello stesso elemento può causare tossicità.

Se andiamo ad osservare la composizione in metalli di diversi *habitat*, quali un organismo vivente, l'acqua marina ed il suolo, notiamo che per alcuni di essi osserviamo concentrazioni praticamente identiche (ad es. Mo), mentre per altri vediamo grandi differenze (es. Fe).

Queste differenze sono spiegabili osservando la stabilità delle varie specie nelle diverse condizioni di pH, potenziale e temperatura.

In acqua, le due coppie redox fondamentali sono H^+/H_2 e O_2/H_2O .

Possiamo vedere come il potenziale sia dipendente dal pH:

$$H^+ + e^- \rightleftharpoons 1/2 H_2$$

$$E = 0.0 - \frac{0.059}{1} \log \frac{(P_{H_2})}{[H_3O^+]} \xrightarrow{\text{in condizioni std}} E = 0.059 \log \frac{1}{[H_3O^+]} = -0.059 pH$$

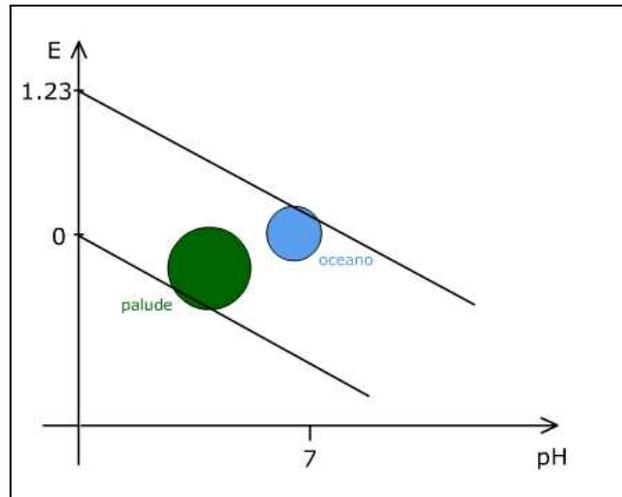
Allo stesso modo, per l'ossigeno:

$$\text{O}_2 + 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{O}$$

$$E_{\text{condiz.std}} = 1.23 - \frac{0.059}{4} \log \frac{1}{[\text{H}_3\text{O}^+]^4} = 1.23 - 0.059 \text{pH}$$

Quindi a pH 7 $E_{\text{H}} \approx -0.42$ e $E_{\text{O}_2} \approx 0.81$

Possiamo inoltre visualizzare i risultati in un grafico, sul quale potremo anche individuare le condizioni nei vari habitat.



Consideriamo ora il ferro, che può essere Fe^{2+} o Fe^{3+} .

In presenza di H_2O , sia Fe^{2+} che Fe^{3+} possono precipitare come $\text{Fe}(\text{OH})_2$ o $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Il ferro in soluzione si ritrova nell'acqua di mare come idrossido, mentre si ritrova in quantità molto più grandi sulla crosta terrestre.

Le prime forme di vita si trovavano in un ambiente molto più riducente di quello attuale, che permetteva una biodisponibilità molto alta di Fe^{2+} , più solubile in quelle condizioni.

Con il modificarsi dell'atmosfera vennero selezionati dei sistemi biologici in grado di mantenere solubilizzato il Fe, necessario alla vita.

Altri metalli, come il Cu, vennero "alla ribalta" solo con un ambiente più ossidante: infatti il solfuro di rame(I) è molto meno biodisponibile del solfato di rame(II).

Elemento	Ambiente riducente	Ambiente ossidante
Fe	Fe^{2+}	Fe^{3+}
Cu	Cu^+	Cu^{++}
S	HS^-	SO_4^{2-}
Mo		MoO_4^{2-} (NOX 6, solubile)

- Composti di coordinazione

I composti di coordinazione sono addotti acido-base di Lewis*, che hanno come acido di Lewis un metallo di transizione.

Ad esempio, $\text{BCl}_3 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Cl}_3\text{B} \leftarrow \text{NH}_3$, dove il boro fa da acido e l'azoto dell'ammoniaca dona il suo doppietto elettronico, NON è un composto di coordinazione, ma solo un addotto acido-base di Lewis. Invece, $\text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^-$ (eccesso) $\rightarrow \text{FeCl}_6^{3-}$ è un composto di coordinazione con un atomo centrale metallico legato da 6 leganti.

In generale un composto di coordinazione:

- E' una specie derivata dall'interazione tra un atomo centrale ed altre specie, ioniche o neutre in numero superiore alla "valenza" dell'atomo centrale.
- Possiede specie coordinate, con almeno un doppietto elettronico da donare, dette leganti.
- Ha un **numero di coordinazione**, che corrisponde al numero di leganti (es. per FeCl_6^{3-} il numero di coordinazione è 6). Questo numero ha un valore compreso tra 2 e 12, i più comuni sono 3, 4, 5 e 6.

Il numero di coordinazione, insieme al tipo di legante, alla sua carica etc. determina la geometria del complesso. Ad esempio:

Numero di coordinazione 3: geometria triangolare, piramidale, "a T".

Numero di coordinazione 4: geometria quadrata o tetraedrica.

Numero di coordinazione 5: geometria a piramide con base quadrata o a bipiramide con base triangolare.

Numero di coordinazione 6: geometria ottaedrica.

I leganti possono essere composti neutri, come NH_3 o H_2O , anionici, come Cl^- o $\text{S}^{=}$ o più raramente cationici, come NO^+ . L'addotto che si forma può a sua volta essere carico o neutro.

Ad esempio il Fe^{++} in acqua è presente come $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$, ma con il Cl^- può formare $[\text{FeCl}_6]^{3-}$;

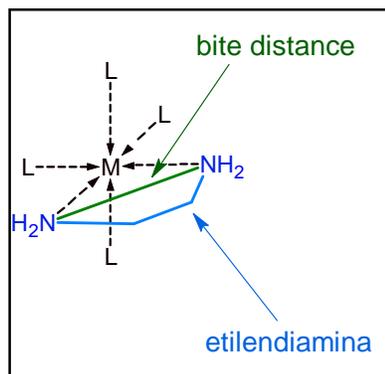
tuttavia il Cl^- può anche formare composti neutri, come il cisplatino $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$.

Inoltre i leganti possono essere mono- o polidentati (es. NH_3 mono-, EDTA poli-), a seconda del numero di centri donatori di elettroni presenti.

- Chelazione

Se i vari "denti" di un legante polidentato legano un solo metallo centrale, si parla di chelazione; inoltre si definisce "bite distance", la distanza fra i due donatori.

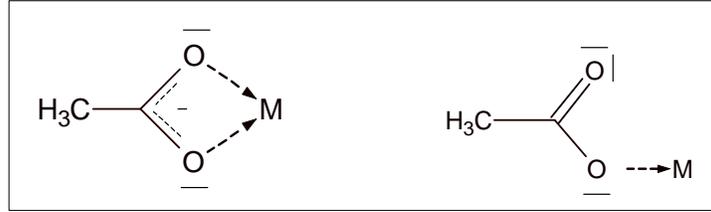
In figura l'etilendiammina (en) chela il metallo con i due gruppi NH_2 ; la bite distance è la distanza tra i due azoti.



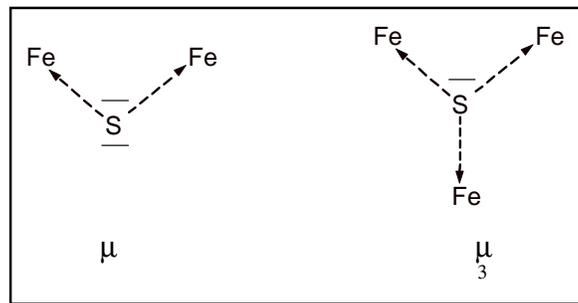
* Acido di Lewis → sostanza con carenza di elettroni

Base di Lewis → sostanza con eccesso di elettroni

Un acido carbossilico, invece, può sia comportarsi da monodentato che da bidentato. Tuttavia, rispetto alla en, la struttura bidentata a 4 atomi è più tensionata (anche se non così tensionata come un ciclo a 4 C), e il bite è minore. Questo può essere utile per spiegare le differenti reattività dei vari leganti.



Un legante può anche mettersi a ponte tra due metalli avendo più coppie di elettroni sullo stesso atomo (es. H_2O , Cl^- , OH^- , SO_4^{2-}). Questo tipo di coordinazione è detto "a ponte" (μ).



- Considerazioni elettroniche

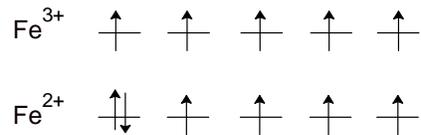
Il processo di ionizzazione di un metallo di transizione, coinvolge gli orbitali d, mentre gli elettroni donati dai leganti sono di solito elettroni di non legame o, soprattutto nei casi di catalisi enzimatica, elettroni di legame π , e a volte anche σ .

Il complesso di coordinazione che si viene a formare, è una nuova specie chimica, diversa sia dal ligando che dal legante.

Spesso i composti di coordinazione sono colorati, e hanno quindi transizioni elettroniche nell'UV-visibile, e sono paramagnetici*, quindi sono attratti da un campo magnetico (uno stesso atomo centrale può presentare magnetismo differente se legato a leganti diversi).

Bisogna anche tenere conto del fatto che un numero pari di elettroni di valenza è condizione necessaria ma NON sufficiente per affermare che la sostanza sia diamagnetica.

Ad esempio nè il Fe^{3+} (... $3d^5$) nè il Fe^{2+} (... $3d^6$) sono diamagnetici:



Se andiamo a vedere le configurazioni dei complessi di coordinazione del Fe^{3+} troviamo composti con ancora 5 elettroni spaiati o composti con 1 solo elettrone spaiato ($S =$ numero totale di spin = Σ numeri di spin = $5/2$ o $1/2$), mentre per il Fe^{2+} abbiamo composti con 4 o 0 elettroni spaiati ($S = 2$ o 0).

* Una sostanza è diamagnetica se, immersa in un campo magnetico, ne è respinta. Ciò accade se ha tutti gli orbitali esterni pieni (l'HOMO per una molecola). Alternativamente, la sostanza è paramagnetica.

Questo comportamento può essere spiegato con diverse teorie, che descrivono più o meno precisamente i composti di coordinazione.

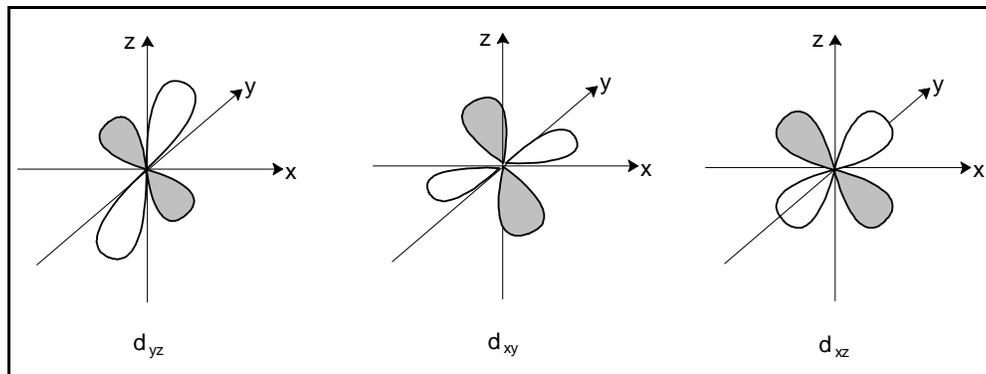
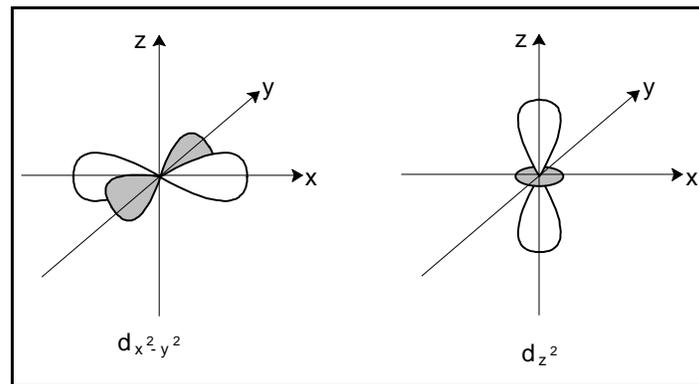
Per semplicità cominciamo a considerare un composto ML_6 , con geometria ottaedrica e tutti i leganti uguali.

- Teoria del campo cristallino

Consideriamo un centro metallico con i suoi orbitali d esterni.

Gli orbitali d sono 5:

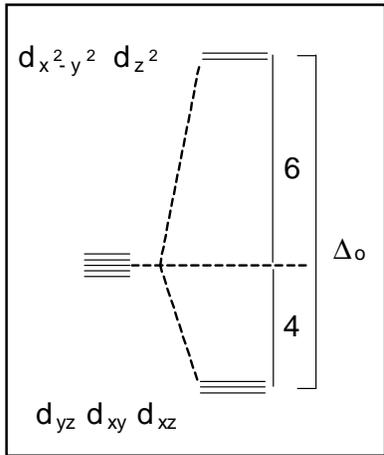
Gli orbitali $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} hanno i lobi che puntano verso gli assi del sistema cartesiano, mentre i d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} hanno i lobi che puntano verso le bisettrici dei rispettivi piani.



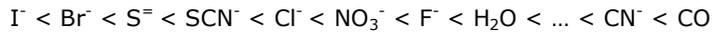
Prima del legame i cinque orbitali hanno la stessa energia, ma dopo il legame la situazione cambia: i d_{z^2} e $d_{x^2-y^2}$, infatti, sono destabilizzati, contrariamente agli altri 3, stabilizzati, in quanto i primi due puntano verso i leganti (che nel sistema ottaedrico sono posti sugli assi); la destabilizzazione segue la regola del baricentro (cioè i 3 orbitali stabilizzati lo sono di meno dei 2 destabilizzati). Si definisce inoltre Δ_o lo sbalzo energetico tra i due gruppi di orbitali.

Il Δ_o dipende dalla carica e dalla natura dell'atomo centrale e dai leganti.

In generale il Δ_o è minore del salto che si aveva, prima del legame, tra gli orbitali d e il successivo orbitale, e corrisponde ad energie nell'UV-visibile. Il fatto che molti composti di coordinazione siano colorati dipende proprio dalla possibilità degli elettroni degli stati più stabili (d_{xy} , d_{xz} e d_{yz}) di eccitarsi al livello superiore ed emettere quindi nel visibile una volta tornati allo stato iniziale.



A parità di carica e di legante, il Δ_o aumenta andando a destra ed in basso nella tavola periodica. Stesso vale per il legante: si può infatti definire una **serie spettrochimica dei leganti**:

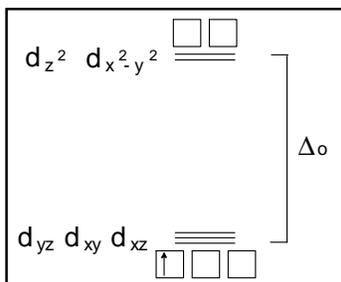
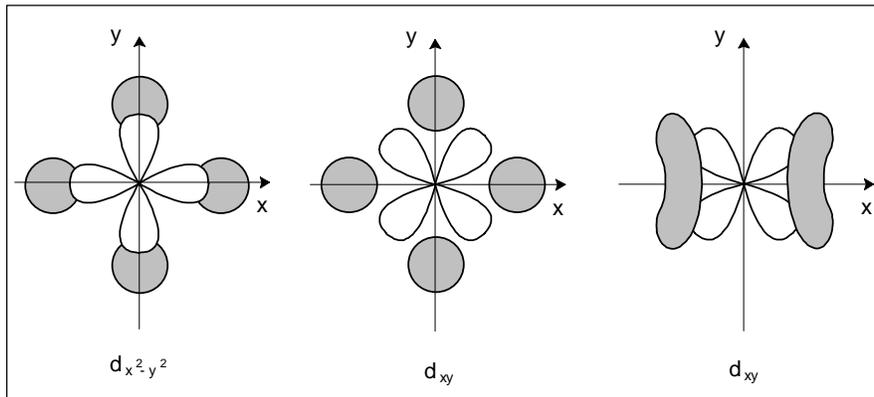


Questa considerazione mi mostra che non si tratta solo di un fatto di repulsione elettronica perché non c'è correlazione tra carica del legante e Δ_o ad esso associato (tra l'altro CO, che non ha carica è il legante con Δ_o maggiore).

Si elabora quindi un'altra teoria:

- Teoria del campo dei leganti

Considerando un $d_{x^2-y^2}$ ed un d_{xy} , e le loro interazioni con un orbitale σ di un legante, si può facilmente notare che le interazioni dell'orbitale $d_{x^2-y^2}$ saranno molto più intense, rispetto al d_{xy} . Tuttavia se il legante possiede anche orbitali p, è possibile avere la formazione di orbitali π che possono interagire meglio con d_{xy} . Lo stesso può avvenire con orbitali di non legame di una molecola biatomica.*

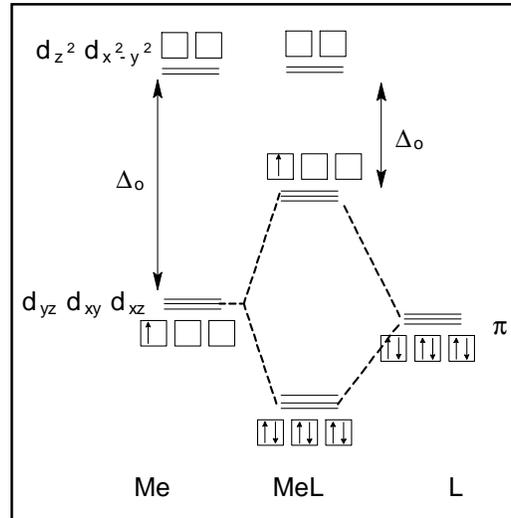


Consideriamo un complesso metallo (d_1) con un legante alogeno: La situazione degli orbitali d, considerando solo la presenza di σ , si presenterà come nella figura a lato.

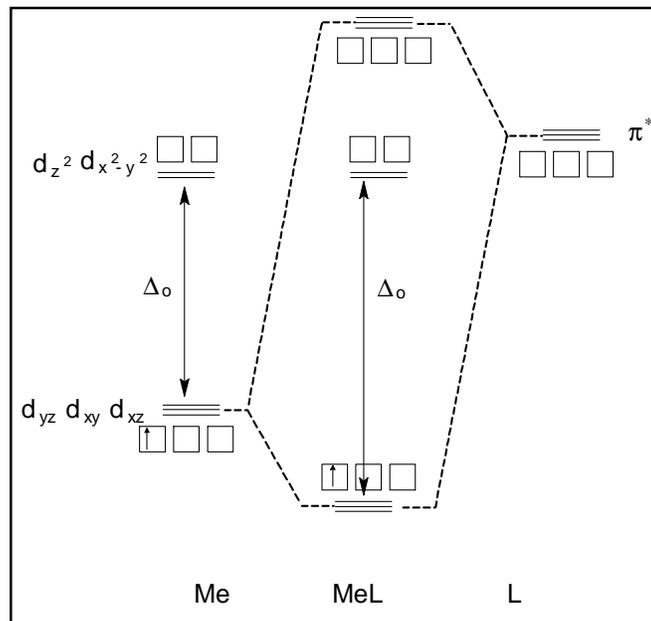
* In una molecola biatomica, come C=O, abbiamo degli orbitali σ tra C ed O, degli orbitali di legame π , formati dall'interazione degli orbitali p, e degli orbitali π^* di antilegame, che sono VUOTI, e puntano verso l'esterno del doppio legame, contrariamente a quelli di legame, che lo circondano.

Se, tuttavia consideriamo che i tre orbitali inferiori hanno una simmetria opportuna per interagire con gli orbitali π , la situazione viene modificata.

La formazione del complesso, infatti, porta alla stabilizzazione degli orbitali p e alla destabilizzazione dei d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} , portando quindi ad un aumento dell'energia di questi orbitali, e quindi ad una diminuzione del Δ_0 :



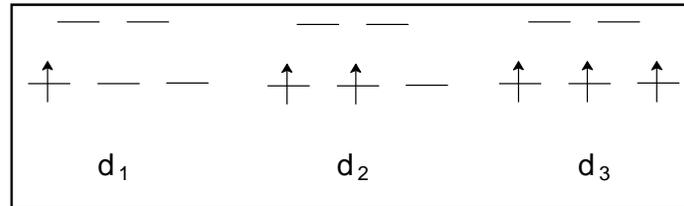
La situazione opposta si ha invece quando il legante possiede orbitali π di non legame (es. CO). In questo caso l'alta energia degli orbitali di non legame porta ad una loro destabilizzazione, con conseguente stabilizzazione degli orbitali d del metallo che vi interagiscono. In questo caso, quindi si registra un aumento di Δ_0 .



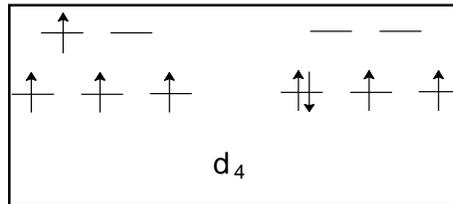
Si spiega quindi in questo modo il motivo per cui CO, pur senza carica, abbia una separazione di campo molto maggiore rispetto ad un alogeno, con carica negativa.

Si possono inoltre fare delle considerazioni sulla distribuzione degli elettroni negli orbitali d, in complessi ottaedrici.

La situazione è semplice nel caso di metalli d^1 (es. Ti^{3+}), d^2 (es. V^{3+}) e d^3 (es. Cr^{3+}), in cui gli elettroni si dispongono negli orbitali d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} , che sono a minore energia:



Se però consideriamo atomi con un maggior numero di elettroni d, ad esempio il Mn^{3+} (d^4), abbiamo due possibilità:



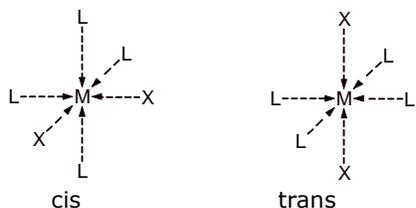
La prima possibilità (il quarto elettrone si posiziona negli orbitali d a maggiore energia) avviene nel caso in cui la "pairing energy", cioè l'energia necessaria per inserire un elettrone in un orbitale che già ne contiene uno, sia maggiore della separazione di campo (Δ_0): questa situazione viene detta ad alto spin (4 elettroni spaiati, $S=2$).

Se consideriamo l'altra possibilità, con due elettroni accoppiati e due liberi, otteniamo una situazione a basso spin ($S=1$), che si trova nel caso in cui la separazione di campo sia maggiore della pairing energy. Nel caso di un legante a campo debole ho spin alto, nel caso di un legante a campo forte ho spin basso. Si può fare lo stesso discorso per d^5 , d^6 etc., ottenendo i seguenti risultati:

Configurazione elettronica	Situazione a basso spin	Situazione ad alto spin
d^5 (es. Fe^{3+})	$S=1/2$. Due elettroni accoppiati negli orbitali più bassi e uno spaiato.	$S=5/2$. Tutti gli orbitali sono occupati da elettroni spaiati.
d^6 (es. Fe^{2+})	$S=0$. Tutti gli elettroni accoppiati negli orbitali più bassi.	$S=2$. Uno degli orbitali più bassi contiene due elettroni, gli altri uno solo.
d^7	$S=1/2$. Gli orbitali più bassi sono tutti occupati. In uno di quelli superiori c'è un elettrone spaiato.	$S=3/2$. Due degli orbitali più bassi contengono due elettroni, gli altri uno solo.
d^8	$S=1$. Gli elettroni si possono localizzare solo con i tre orbitali più bassi pieni e quelli superiori con due elettroni spaiati.	
d^9	$S=1/2$. Gli elettroni si possono localizzare solo con i tre orbitali più bassi pieni e quelli superiori con un elettrone spaiato.	
d^{10} (Cu^+ , Au^+)	$S=0$. Tutti gli orbitali sono pieni. Sono composti diamagnetici e non sono colorati.	

- Complessi tetracoordinati

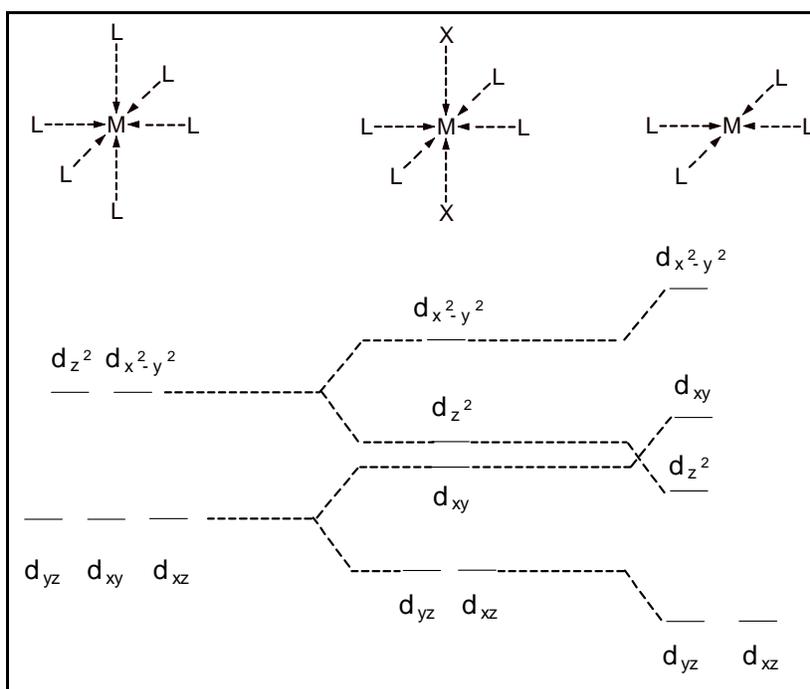
Ovviamente, tutto ciò vale solo in caso di un complesso ottaedrico ML_6 , con tutti i leganti uguali; vediamo invece cosa succede se consideriamo un complesso ML_4X_2 , con quattro leganti uguali e due diversi. Si possono avere due situazioni differenti:



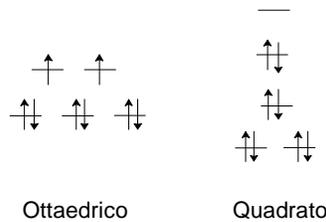
Consideriamo un composto trans, con i leganti X sull'asse z più deboli di L.

In questo caso la separazione degli orbitali non sarà più quella precedentemente vista con il composto ML_6 , in quanto gli orbitali contenenti una componente su z (cioè d_{z^2} , d_{xz} e d_{yz}) saranno lievemente stabilizzati rispetto a quelli che non la contengono, pur mantenendo la separazione tra gli orbitali che puntano verso le bisettrici e gli altri due.

Se poi si va a diminuire progressivamente la potenza di X fino a renderla nulla, si ottiene un sistema ML_4 , non più ottaedrico, ma planare quadrato, che presenta addirittura un'inversione degli orbitali:

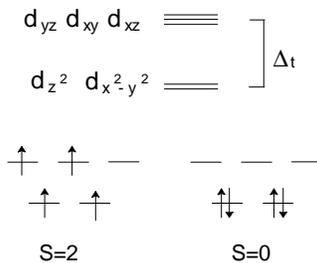


Questo effetto di separazione può essere così forte che gli elettroni preferiranno appaiarsi negli orbitali più bassi (con z) prima di andare in quelli più alti. Ad esempio un metallo d^8 esacoordinato ottaedrico sarà paramagnetico, contrariamente ad un tetracoordinato quadrato come il cisplatino ($Pt(NH_3)_2Cl_2$) è diamagnetico.



Oltre alla conformazione quadrata, un metallo tetracoordinato può anche disporsi in conformazione tetraedrica; in questo caso i leganti sono sulle bisettrici degli ottanti, quindi non sono diretti verso nessun orbitale, anche se sono più vicini ai tre orbitali diretti lungo le bisettrici dei tre piani. Si avrà quindi destabilizzazione di questi ultimi rispetto ai $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} , anche se in misura minore rispetto ad un complesso ottaedrico ($\Delta_{\text{tetraedrico}} = \Delta_t \approx 4/9 \Delta_o$).

Poiché la separazione di campo è bassa, gli elettroni riempiranno prima tutti gli orbitali, prima di accoppiarsi: avremo quindi preferenzialmente situazioni ad alto spin. Ad esempio un d^4 avrà $S=2$ e non $S=0$.



- Termodinamica e cinetica della formazione dei complessi.

Per utilizzare e mantenere in soluzione ioni come Zn^{++} , Cu^{++} o Fe^{3+} , che in un sistema biologico sono presenti in basse concentrazioni ($Zn^{++} < 10^{-9}$ M, $Cu^{++} < 10^{-12}$ M, $Fe^{3+} < 10^{-17}$ M), è necessario che esistano dei sistemi coordinanti che leghino solo questi ioni e non quelli presenti a più alte concentrazioni (es. Na^+ e K^+ 10^{-1} M, Mg^{++} e Ca^{++} 10^{-3} M).

Ci saranno diversi sistemi di trasporto (spesso con una componente proteica) che permetteranno la solubilizzazione, il trasporto all'interno della cellula, e lo storage di questi metalli. Questi passaggi possono essere compiuti da diverse proteine che devono permettere reazioni di legame termodinamicamente e cineticamente favorite sia per la complessazione specifica che per il rilascio, che spesso è mediato da variazioni dell'ambiente esterno, come variazioni di pH e potenziale.

Si può cercare di capire, per quanto riguarda gli aspetti termodinamico e cinetico, se esista una preferenza tra lo ione da legare ed il legante.

La teoria **HSAB** (hard-soft acid-basis) dice appunto che questa preferenza esiste, distinguendo gli acidi e le basi in soft e hard e stabilendo che un legame acido hard - base hard o acido soft - base soft è cineticamente e termodinamicamente favorito rispetto ad un legame hard-soft.

Il concetto di hard e soft si riferisce agli elettroni di valenza: un acido è hard se gli elettroni di valenza sono molto "controllati" dal nucleo, cioè si trovano in orbitali molto stabili.

Un esempio di acido hard è il Fe^{3+} che ha carica alta e [relativamente] piccole dimensioni.

La situazione opposta si trova negli acidi soft, di grandi dimensioni e bassa carica, come il Cu^+ , con molti elettroni poco controllati dal nucleo.

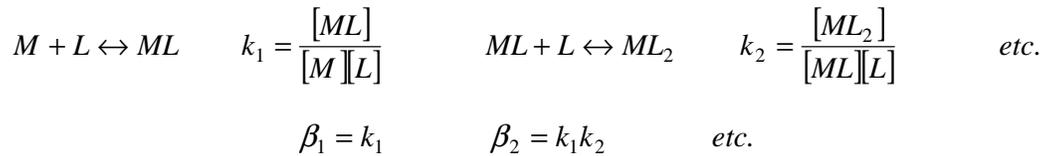
Allo stesso modo un legante hard ha doppietti da donare in orbitali molto controllati ed uno soft in orbitali poco controllati.

Ovviamente il concetto di hard e soft non è proprio assoluto, quindi potremmo anche trovare situazioni intermedie, dette border-line.

Acidi hard	$H^+, Mn^{++}, Cr^{3+}, Na^+, Al^{3+}, Fe^{3+}$
Acidi border-line	$Fe^{++}, Ni^{++}, Zn^{++}, Cu^{++}$
Acidi soft	$Cu^+, Pt^{++}, Pt^{4+}, Au^+, Cd^{++}, Pb^{++}, Hg^{++}$
Basi hard	$H_2O, CO_2^-, ROH, RNH_2, NO_3^-, Cl^-$
Basi border-line	NO_2^-, N_2, N_3^-
Basi soft.	$R_2S, RS^-, RSH, SCN^-, H^-$

Ad esempio, le metallotioneine sono proteine contenenti molti residui cisteinici, che si comportano da leganti soft (RSH), e possono quindi legare acidi soft come Pb^{++} o Hg^{++} e comportandosi quindi da agenti detossificanti.

Quando consideriamo la formazione di un complesso, possiamo definire dei parametri che ne indichino la stabilità, come le k di formazione e le k complessive di stabilità (β):

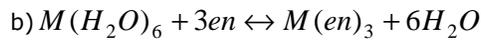
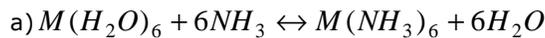


Consideriamo un ML_6 , ad es. $[Ni(NH_3)_6]^{++}$ o $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, con una certa β_a , e un ML_3 , ad es. $[Ni(en)_3]^{2+}$ (sempre esacoordinato, perché l'etilendiammina è un legante bidentato), con β_b .

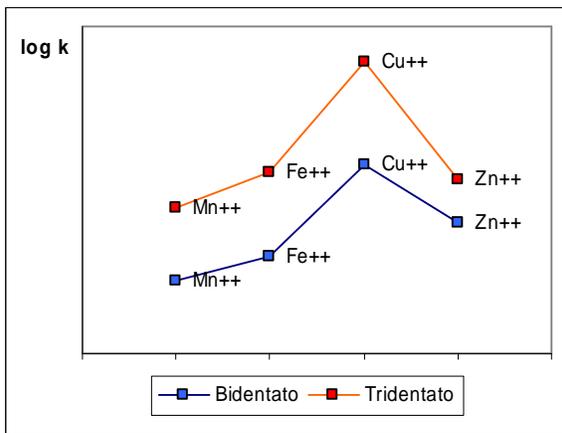
Vedremo che $\beta_a \gg \beta_b$; il motivo in questo caso non sta tanto nella geometria di legame, quanto in un problema di entropia.

Un Ni^{++} o un Fe^{++} , infatti, è solvatato in modo diverso da un K^+ o un Ca^{++} : questi ultimi ioni fanno solo delle deboli interazioni dipolo-dipolo con l'acqua, mentre Ni^{++} e Fe^{++} sono degli acquoioni, cioè si trovano coordinati all'acqua, ad es. nella forma $[Ni(H_2O)_6]^{++}$.

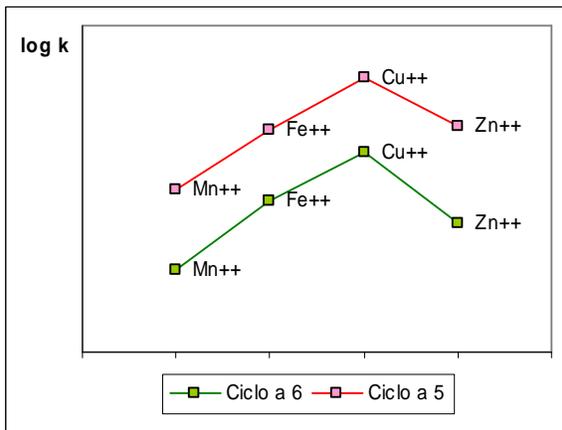
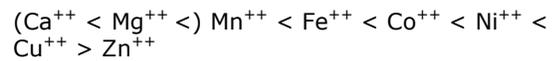
Se andiamo a scrivere le reazioni di complessazione dei due composti con NH_3 e en vediamo:



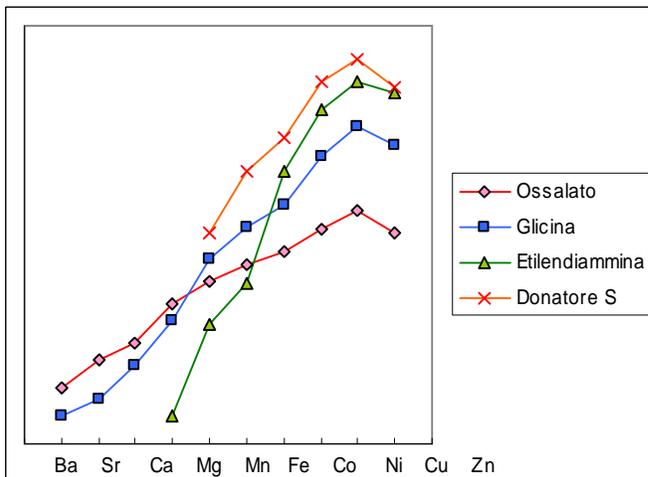
Nel caso b) abbiamo un aumento di entropia (si passa da quattro a sette molecole), cosa che non succede in a): questa è la ragione dell'aumentata β . Quindi possiamo dire che, termodinamicamente, il legame con un legante polidentato è più favorito di quello con uno monodentato.



Se però andiamo a vedere il variare di k in funzione del metallo coordinato vediamo che k cresce andando in alto e a destra nella tavola periodica, fino al Cu⁺⁺, per poi ridiscendere: si può quindi definire la serie di Irving-Williams, che per i metalli 2+ della prima transizione è:



Un'altra considerazione può essere fatta sulla geometria di legame: l'en o l'acido ossalico, legandosi al metallo formano un ciclo a cinque termini, mentre l'acido malico forma un ciclo a sei termini, meno stabile*: quindi le k dell'ossalico saranno più elevate di quelle del malico (sempre secondo la serie di Irving-Williams).



Un comportamento analogo si vede a seconda del donatore: più si va verso metalli soft, più sono stabili leganti soft, e viceversa.

Confrontiamo ad esempio ossalato, glicina, etilendiammina e un donatore allo S. L'ossalato con donatore COO⁻, hard, è più stabile degli altri con metalli hard come Ba e Sr, mentre l'en, con donatore soft NH₂, o il donatore allo S sono più stabili degli altri solo con metalli soft come Ni, Cu e Zn. La glicina che ha sia un NH₂ sia un COO⁻ si trova fra l'ossalato e l'en.

* Notare che per gli eterocicli, contrariamente ai cicli carboniosi, i cicli a cinque sono più stabili rispetto a quelli a sei termini (e ovviamente a quelli a quattro, più tensionati).

Un altro parametro che si può valutare è la cinetica dello scambio $H_2O \rightarrow$ legante, che è diverso a seconda dello ione.

Per ioni alcalini abbiamo, delle k_{vel} molto alte, dell'ordine di 10^8 (es. per Li^+ , Na^+ , K^+); molto varia è invece la situazione dei metalli di transizione, (es. Sn^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+}) con k molto varie, da 10^2 a 10^{-9} : nel primo caso parliamo di acqua labile, nel secondo di acqua inerte.

Un'eccezione a quanto detto è il Gd^{3+} , con una k molto alta ($\sim 10^9$), che permette la formazione di complessi in cui si ha facilmente scambio tra acqua e leganti, caratteristica che lo rende molto buono come mezzo di contrasto nelle scintigrafie.

Infine un'ultima considerazione si può fare sul potere ossidante/riducente dei centri metallici.

Ad esempio il normale potenziale di 0.77V della coppia Fe^{3+}/Fe^{2+} varia a seconda dei leganti: con la fenantrolina diventa 1.10V, quindi il Fe^{3+} è più ossidante, con l'EDTA diventa -0.12, rendendo il Fe^{3+} molto più riducente.

Ovviamente questa variazione di potenziale non dipende solo dal legante, ma può essere modificata anche dall'ambiente proteico che circonda il complesso.

- Coordinazione dei metalli nei sistemi biologici

Le principali componenti dei sistemi biologici sono i lipidi, gli zuccheri e le proteine; tuttavia solo le proteine (e quindi gli amminoacidi) hanno struttura e gruppi funzionali opportuni e specifici per un legame ad un centro metallico.

Come noto, la struttura di una proteina è determinata dalla sequenza degli amminoacidi (sequenza primaria) e dai legami idrogeno, covalenti e interazioni idrofobiche che si possono instaurare tra di essi (sequenze secondaria, terziaria e quaternaria).

Gli amminoacidi possono essere divisi in diverse classi, e si può quindi definire la diversa specificità e modalità di legame ai diversi metalli: un esempio di classificazione è la seguente:

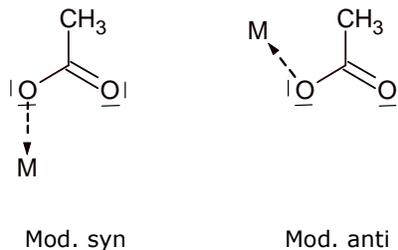
- Idrofili acidi : Glu, Asp
- Idrofili basici : His, Lys, Arg
- Idrofili amidi degli acidi : Gln, Asn
- Polari : Ser, Thr, Tyr
- Lipofili : Ala, Val, Ile, Leu
- Lipofili importanti per la flessibilità : Gly, Pro
- Lipofili aromatici : Phe, Trp

Un parametro importante da considerare è anche la pK_a , perché l'amminoacido deve essere in condizioni di protonazione tali da avere dei doppietti da donare per il legame al metallo.

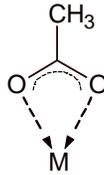
Ad esempio, l' NH_3 non è a pH plasmatico (7) un buon legante, poiché la pK_a è 9 e a pH 7 è praticamente tutta protonata ($NH_4^+ : NH_3 \sim 100:1$), mentre Glu e Asp, con $pK_a = 4.1$ e 3.9 rispettivamente, a pH 7 sono dissociati (quindi $RCOO^-$) e hanno doppietti disponibili per coordinare il metallo.

Esistono diverse modalità di legame di un COO^- ad un metallo:

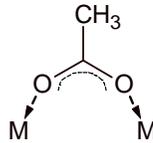
- Modalità η_1 : il COO^- si comporta da legante monodentato, e può legarsi in due modalità.



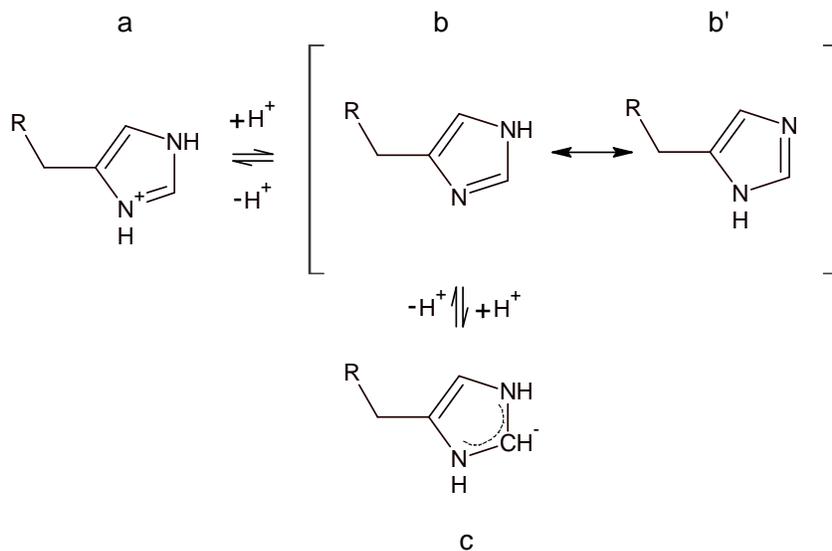
· Modalità η_2 : il COO^- si comporta da legante bidentato, formando un ciclo a quattro termini, instabile (anche se meno di un ciclo a quattro C).



· Modalità $\mu - \eta_1:\eta_1$: si ha una coordinazione a ponte, con coordinazione η_1 su ciascun O. Spesso i due metalli interagiscono tra di loro.



Consideriamo un His ($\text{p}K_a$ 6.5, $\text{p}K_{a2}$ 14)



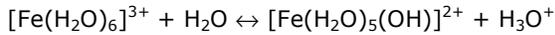
Nella forma a non ci sono doppietti disponibili, mentre le forme b e b' (in risonanza) hanno un doppietto libero (solitamente nelle metalloproteine è l'azoto ϵ il donatore, quindi avremo la forma b'); infine la forma c ha una carica negativa delocalizzata sui due azoti, ed è più rara.

Altri amminoacidi, come Met, Cys ($\text{p}K_a$ 8.3), SeCys (selenocisteina, $\text{p}K_a \sim 5$) e Tyr ($\text{p}K_a$ 10.1), pur non essendo carichi a pH fisiologico contengono doppietti che possono essere donati, su atomi di O e di S.

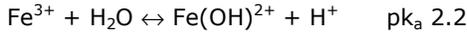
Inoltre, come già detto, i metalli di transizione sono coordinati con l'acqua e ciò comporta una modifica del comportamento dell'acqua.

Ad esempio il Fe^{3+} in H_2O è presente come $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, con l'O dell'acqua che dona un doppietto al Fe: il legame di coordinazione va ad aumentare la polarizzazione del legame O-H dell'acqua e favorisce quindi il rilascio di H^+ .

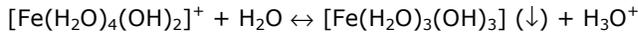
Possiamo quindi dire che $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ è un buon acido di Brønsted.



oppure, più incorrettamente:



La reazione può anche proseguire, in questo modo:



Ovviamente avremo differenti valori di $\text{p}K_a$ per le diverse coppie metallo-ligando.

Ad esempio per $\text{H}_2\text{O} + \text{M}^{++} \leftrightarrow \text{MOH}^+$ abbiamo $\log k_a$ che da 14 (senza M^{++}) scende a 10 utilizzando come metallo Ca, Mn, Cu, Zn.

Cambiando legante, ad esempio CH_3COOH , vediamo che $\log k_a$ da 4 diminuisce cambiando ligando (come sopra).

Tutto questo avviene non solo per l'acqua, ma anche per qualsiasi altro legante che abbia un H su un legame iperpolarizzato dal legame con il metallo. Anche amminoacidi come Cys e Tyr, normalmente non dissociati a pH fisiologico, diventano ioni cisteinato e tirosinato quando coordinano un metallo.

Anche nel caso degli amminoacidi possiamo distinguere leganti hard e soft:

Hard: Glu, Asp, Tyr, Ser, Thr (donatore O)

Soft: Cys, Met (donatore S)

Borderline: His (donatore N)

Le caratteristiche border-line dell'istidina la rendono importante per la capacità di legare sia metalli hard che soft (che ovviamente borderline).

Poiché la presenza del metallo può modificare il comportamento dei singoli amminoacidi, in alcuni casi può anche modificare la struttura dell'intera proteina.

Ad esempio proteine contenenti zinc-fingers perdono la propria struttura in assenza di Zn; tuttavia proteine come plastocianina ed azzurrina hanno struttura uguale in presenza ed in assenza di rame. In altri casi, ad esempio nella calmodulina, la proteina ha una struttura diversa in presenza o in assenza di Ca.

Ma come è possibile la selezione di un metallo rispetto ad un altro, soprattutto nel caso il metallo da legare abbia concentrazioni molto basse?

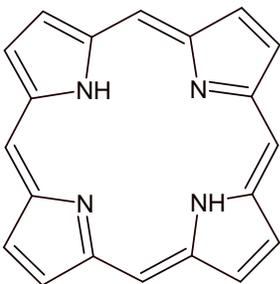
La specificità è garantita essenzialmente dal tipo di leganti e dalla loro disposizione.

Ad esempio nella calmodulina abbiamo come donatori 3Asp, un Glu (bidentato), un C=O ed una molecola di H_2O .

Ho quindi sette posizioni leganti che coordinano bene il Ca^{++} e non il Mg^{++} ($k_{\text{Ca}} \sim 10^4 k_{\text{Mg}}$) perchè il calcio è più grande e *fitta* meglio la tasca di coordinazione.

Un altro esempio è la SOD (superossidodismutasi) che ha uno Zn ed un Cu legati in parti differenti della molecola con 4 His e un H_2O che coordinano il Cu e 3 His e un Asp che coordinano lo Zn. Una delle His è in comune ai due centri metallici (è quindi istidinato, senza entrambi i protoni) e la geometria dei leganti è fatta in modo da non poter inserire altri metalli né di poter scambiare tra loro il Cu con lo Zn.

Un altro legante molto importante nei sistemi biologici è la porfirina:



Questo è un sistema piano, ciclico e stabile che può chelare un metallo centrale con i quattro atomi di N sullo stesso piano, lasciando anche altre due posizioni assiali per altri due leganti (così da ottenere una geometria di coordinazione ottaedrica).

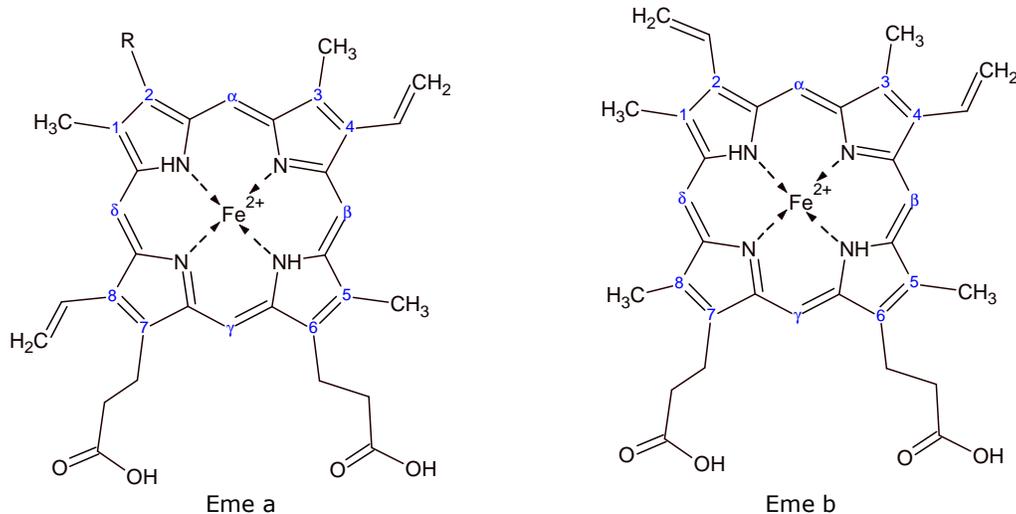
Le dimensioni dell'anello (in particolare lo spazio tra gli N), implicano la possibilità di legare ioni di dimensioni comprese tra 60 e 70 pm, come Mg^{++} (72pm) ma non Be^{++} (45pm) o Ca^{++} (100pm).

Il Fe^{2+} low spin (61pm) si lega all'anello, ma resta fuori dal piano, mentre il Fe^{2+} high spin (65pm) si lega bene al centro dell'anello, restando sul piano.

Il legame del metallo al di fuori del piano può anche deformare l'anello, ad esempio con una deformazione "a sella", con due anelli pirrolici (non adiacenti) ripiegati verso l'alto e due verso il basso, oppure con tutti gli anelli ripiegati verso il basso o si può avere la torsione dell'intero anello lungo un asse orizzontale (o verticale).

Molto spesso le porfirine si ritrovano, nei sistemi biologici, legate al Fe, con dei sostituenti sugli anelli, a costituire il gruppo eme: esistono diversi tipi di eme, a seconda dei sostituenti sugli anelli pirrolici.

In 6 e 7 abbiamo sempre gruppi propionato, nell'eme b 1, 3, 5 e 8 sono CH₃, 2 e 4 vinili, nell'eme a 1, 3 e 5 sono CH₃, 4 e 8 vinili e 2 dei residui idrofobici; l'eme c, invece è direttamente legato ad una Cys della proteina in cui è contenuto



Esistono anche porfirine modificate come le corrine, senza il carbonio δ e senza doppi legami sugli anelli come la vitamina B₁₂ che coordina Co e le clorine, senza il doppio legame esterno sull'anello D (gli anelli sono A, B, C e D, dall'alto a sinistra in senso orario) come la clorofilla, che coordina il Mg.

Infine, anche gli acidi nucleici possono interagire con con dei centri metallici.

In particolare, il DNA può interagire, tramite i fosfati, con Mg²⁺ e Ca²⁺ in modo labile.

Abbiamo anche dei centri donatori nelle singole basi, ma non tutti sono disponibili per il legame. Ad esempio, il cisplatino lega con il Pt gli N⁷ di due guanine (su piani diversi) e con gli NH₃ può fare legami idrogeno con i fosfati. Anche il tRNA può formare complessi di Pb o di Pt.

Questi complessi possono essere studiati con NMR e spettroscopia RX, anche se in soluzione la molecola potrebbe avere comportamento differente.

Un'altra situazione in cui si ha coordinazione è nei telomeri: qui troviamo zone "G-rich" (4G-2T ripetute) e si formano complessi in cui ogni guanina ne lega altre due e coordinano K⁺.

- Trasporto di ioni

Per il trasporto passivo di ioni possiamo distinguere diversi tipi di molecole: gli ionofori, i siderofori e i canali.

Gli ionofori che trasportano metalli alcalini o alcalino-terrosi usano dei donatori all'O, o comunque hard, legando metalli hard.

Un esempio è la nonactina, una molecola ciclica, flessibile con molti ossigeni carbonilici e in anelli eterociclici; in acqua la molecola ruota liberamente in modo da avere le parti polari esposte verso il solvente. In presenza di ioni (ad es. K⁺) la nonactina ruoterà in modo da avere gli 8 ossigeni all'interno, a coordinare il K⁺, lasciando così all'esterno la parte idrofobica, che può attraversare la membrana e trasportare lo ione.

Un altro tipo di meccanismo è quello della gramicidina A: due molecole di questo ionoforo si possono posizionare in membrana e formare un canale che faccia passare gli ioni.

Questi composti, ovviamente, non agiscono in modo controllato, e possono sconvolgere i gradienti ionici

(e sono quindi, ad es., utilizzabili come antibiotici). La specificità per lo ione dipende dalla sua dimensione, dall'energia liberata dal legame e da quella spesa per desolvatare. Queste sostanze, sono in genere prodotte da funghi e licheni e possono essere macrocicli o anche piccoli peptidi, spesso con amminoacidi L.

- Attività ottica e dicroismo circolare

Un composto che non abbia assi impropri di simmetria è definito chirale.

Se consideriamo una radiazione polarizzata su di un piano, possiamo considerarla come la combinazione di due radiazioni polarizzate circolarmente in senso opposto (orario ed antiorario). Quando una radiazione polarizzata attraversa un mezzo chirale, le due componenti si comportano diversamente, per diverso indice di rifrazione e coefficiente di estinzione molare.

Se quindi una delle due radiazioni viene rallentata dal mezzo chirale, non sarà più in fase con l'altra e le due componenti si combineranno in un piano diverso, ruotato di α gradi.

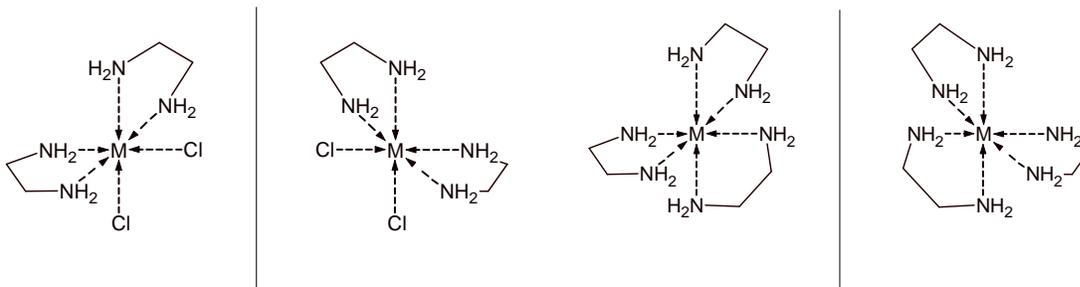
L'effetto dipende dal campione, dalla concentrazione, dal cammino ottico e dalla lunghezza d'onda, secondo la formula:

$$[\alpha]_{\lambda} = \alpha / l * C$$

In corrispondenza di un massimo di assorbimento nello spazio elettronico, gli indici di rifrazione cambiano velocemente; possiamo quindi andare a misurare l'andamento dell'angolo in funzione della lunghezza d'onda (spettro ODR, o di dispersione ottica rotatoria).

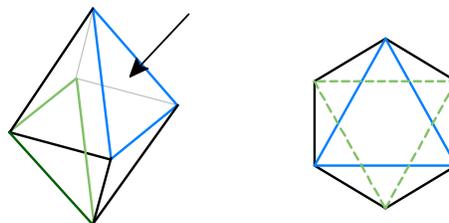
Se all'aumentare dell'energia (quindi diminuendo λ), l'angolo di rotazione va da positivo a negativo, si parla di effetto Cotton positivo; nel caso contrario di effetto Cotton negativo.

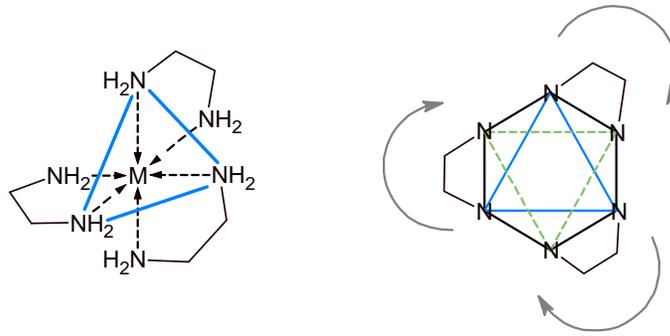
Consideriamo ad esempio un composto chirale MCl_2en_2 cis (il trans e i composti MCl_6 , MCl_4en non sono chirali), o anche un composto Men_3 .



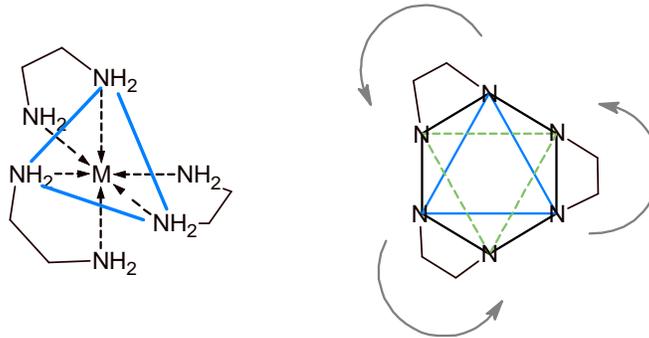
Per meglio visualizzare la chiralità è possibile rappresentare il composto come un ottaedro e guardarlo da una faccia contenente tre leganti diversi.

Se per collegare i leganti bidentati bisogna compiere un giro in senso orario, il composto si chiama Δ , nel caso opposto Λ .





Isomero Δ .



Isomero Λ .

Composti con uguale chiralità avranno anche lo stesso effetto Cotton.

Una misura più utile è però quella del dicroismo circolare (CD).

Le due componenti della luce polarizzata sono assorbite differenzialmente dalla sostanza; possiamo quindi definire la differenza di assorbimento $\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r$.

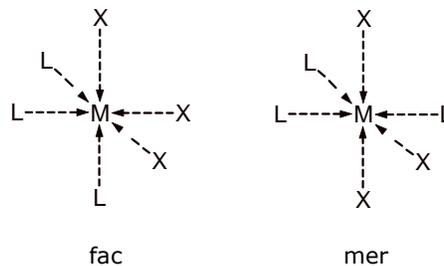
Se c'è assorbimento differente, i due vettori emergono fuori fase e con modulo (intensità) diversa: la radiazione risulta quindi polarizzata ellitticamente.

Lo spettro CD mostra la variazione del $\Delta\varepsilon$ in funzione della lunghezza d'onda.

Rispetto ad uno spettro di assorbimento UV, con uno spettro CD e con un ODR riusciamo a distinguere due enantiomeri.

Ad esempio in una proteina ho donatori N e O, che formano un composto ML_3X_3 . Posso definire due isomeri: fac (face, 3 leganti uguali sulla stessa faccia) e mer (meridian, 3 leganti uguali su un meridiano).

Inoltre degli isomeri fac e mer ho anche gli enantiomeri Δ e Λ (se i leganti sono bidentati).

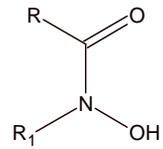


Entrambi gli enantiomeri fac ed entrambi i mer hanno lo stesso assorbimento UV (diverso però tra fac e mer), mentre gli spettri CD sono diversi tra fac e mer e speculari (rispetto all'asse x) tra Δ e Λ .

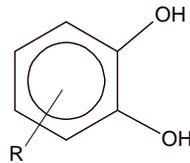
- Trasporto del ferro

Come già detto, sono necessari dei metodi per mantenere e trasportare il Fe all'interno dell'organismo. Organismi inferiori producono e secernono piccole molecole che riescono a solubilizzare il Fe e poi sono endocitate.

Queste molecole, dette siderofori, sono distinguibili in due categorie, a seconda dei gruppi funzionali contenuti:



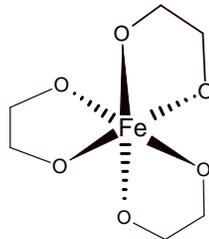
Idrossamati
(funghi, lieviti)



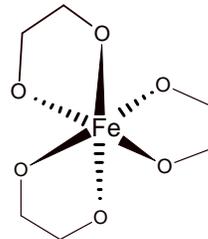
Catecolati
(batteri)

Questi gruppi sono solitamente presenti tre volte, in modo da avere sei leganti che coordinano il Fe; i catecoli si coordinano come catecolati, con entrambi gli idrossili dissociati (perché la chelazione, come già visto, ne aumenta l'acidità), mentre gli idrossamati hanno una sola carica negativa (c'è solo un OH che si possa dissociare), quindi chelando Fe^{3+} i primi saranno 3- mentre i secondi saranno neutri.

Oltre alla carica bisogna anche considerare la stereochimica del legame, che può essere Δ o Λ

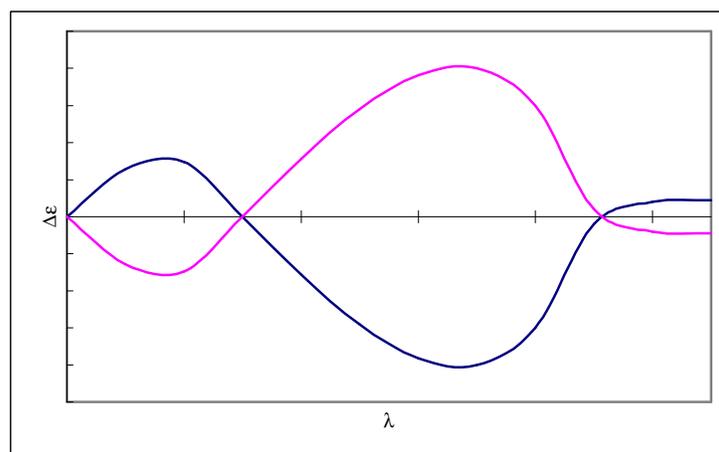


Δ



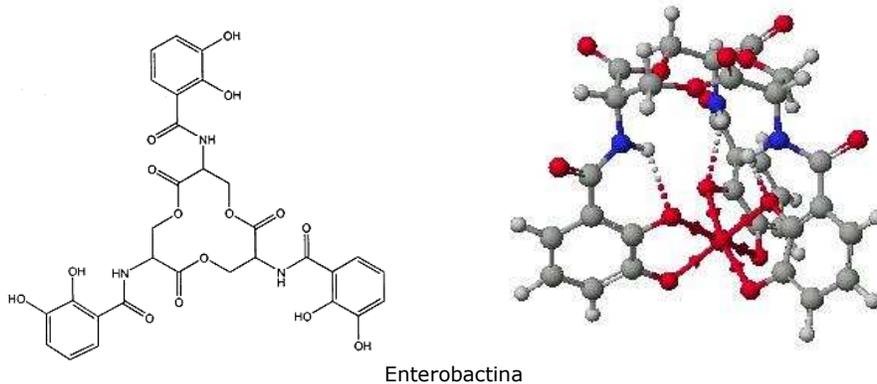
Λ

I due stereoisomeri sono distinguibili per la differente rotazione che impongono alla luce polarizzata su di un piano ad una certa lunghezza d'onda. Posso misurare la differenza di assorbimento tra la luce polarizzata in senso orario ed antiorario (misura del dicroismo circolare, CD): i due isomeri avranno comportamento opposto.



Spesso per gli esperimenti CD si usano composti di Cd^{3+} , che forma composti stabili cineticamente ed ha un buon assorbimento; in generale anche composti di Fe presentano andamento simile.

Un esempio di questi composti è l'enterobactina, che lega il Fe, poi viene riconosciuta da recettori sulla parete batterica ed è inglobata.



La struttura dell'enterobactina è stata molto studiata, e sono stati sintetizzati degli analoghi, utilizzati per sequestrare il Fe in patologie caratterizzate da iperferremia o legare il Fe senza poi essere riconosciute dai recettori batterici (antibiotici).

L'enterobactina è molto affine per il Fe ($k \sim 10^{49}$) ed ha un potenziale molto negativo (-790 mV a pH 7.4) che la porta ad una maggiore affinità per il Fe^{3+} , rispetto al Fe^{2+} .

L'enterobactina è riconosciuta da un sistema molto complesso che la deve legare, farla passare nello spazio periplasmico, farla entrare nella cellula etc.

Negli organismi superiori la situazione è anche più complessa: il Fe^{2+} è più facilmente assorbito, quindi il Fe^{3+} sarà ridotto a Fe^{2+} , assorbito e poi riossidato a Fe^{3+} .

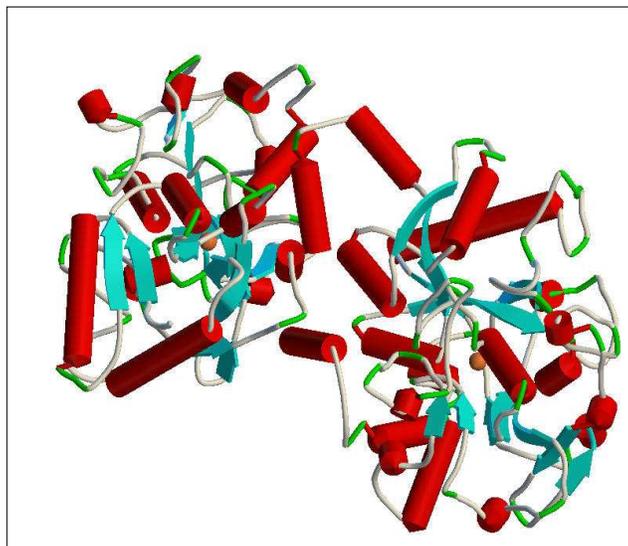
Le molecole che trasportano il Fe sono ubiquitarie nei liquidi biologici e sono dette

TRANSFERRINE: sono glicoproteine (la glicosilazione sembra essere importante per il corretto legame al recettore) monomeriche, da 600-700 amminoacidi (~ 80 kDa) che coordinano due ioni Fe^{3+} , probabilmente derivate da una duplicazione genica.

Queste proteine sono protettive nei confronti del Fe^{2+} che, libero, può reagire con l'ossigeno (reazioni di Fenton):



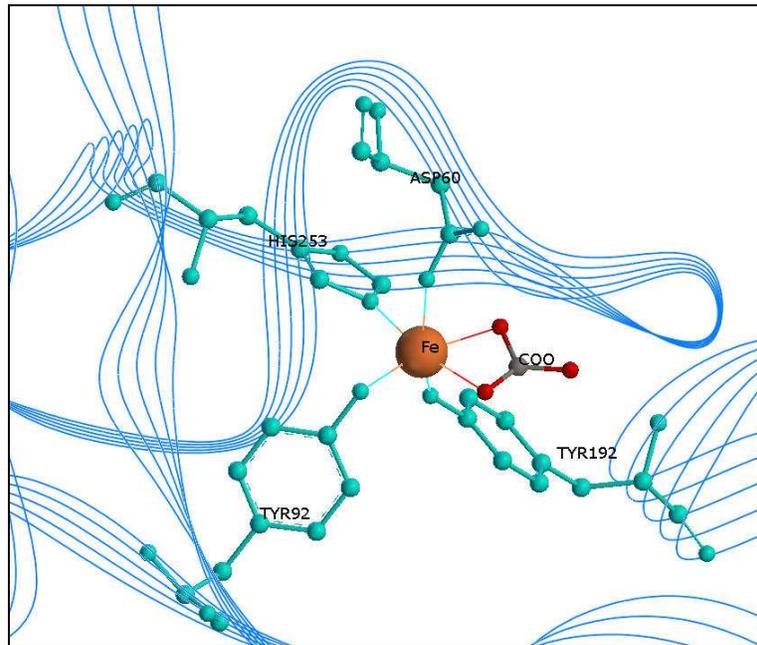
Le transferrine sono formate da due lobi, ciascuno contenente due domini, detti C1, C2 e N1, N2; i due lobi hanno omologia attorno al 90% e presentano ciascuno un sito di legame per il Fe. La catena che collega i due lobi è variabile a seconda della transferrina e non ha struttura determinata; la struttura dei lobi è in parte ad α -elica, in parte a β -strand.



Lattoferrina.

Consideriamo, ad esempio, la lattoferrina umana: questa proteina coordina il Fe^{2+} , anche se ha un'alta affinità anche per il Fe^{3+} . Il ferro è coordinato ottaedricamente da quattro amminoacidi (nel dominio N terminale, lo stesso vale per il C terminale): Asp⁶⁰ (N1), Tyr¹⁹² (N2) e Tyr⁹² (sul raccordo) con donatore ossigeno, e His²⁵³ (sul raccordo) con donatore N. Inoltre c'è uno ione carbonato (CO_3^-) che coordina le altre due posizioni del ferro. Sulla tasca si affaccia, inoltre, anche la parte terminale dell'elica 5, che contiene residui carichi positivamente, in grado di stabilizzare il carbonato che, oltre a coordinare il Fe, scherma anche queste cariche che altrimenti allontanerebbero il Fe.

Il legame del ferro alla proteina porta ad una rotazione di 54° di un dominio sull'altro, impedendo l'accesso dell'acqua nella tasca.

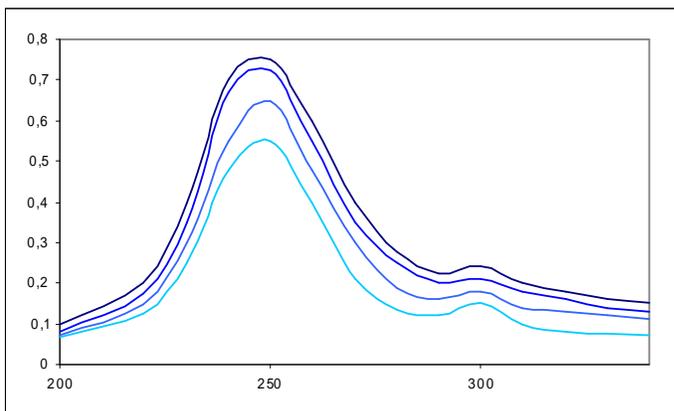


Sito di legame della lattoferrina.

La transferrina è in grado di legare non solo il ferro, ma anche altri metalli, come Al^{3+} , Ga^{3+} , Zn^{++} , Ni^{++} , oltre a lantanidi ed attinidi (come Th e Pd), che possono quindi dare intossicazioni. L'affinità per il Fe^{3+} è molto alta ($k=10^{20.7}$ e $10^{19.4}$ per i due lobi) e lo è anche quella per Al e Ga ($\sim 10^{15}$). Sembra che l'alta affinità per l'alluminio possa essere in qualche modo importante per alcune malattie neurodegenerative, come l'Alzheimer.

Per quanto riguarda il Ga, invece, si era pensato di utilizzare la ferritina come carrier per il Ga radioattivo, da usare per la radioterapia.

Il legame del Fe alla transferrina è visibile guardando gli spettri UV: il legame infatti, implica il legame di due Tyr che diventano tirosinato e ciò si riflette in un cambiamento dello spettro UV nella regione di assorbimento della Tyr (250,300 nm).



Si può notare come all'aggiunta di metallo (nell'esempio Yb^{3+} o V^{3+}) i due picchi della curva di assorbimento diminuiscano.

Se vado a vedere la differenza di ϵ all'aggiunta di metallo vedo che la differenza di assorbimento sale fino all'aggiunta di due equivalenti di metallo, a dimostrazione del fatto che la proteina lega due molecole di ferro.

Se titolo la transferrina con il ferro, tuttavia, ho un comportamento differente, in quanto con Yb^{3+} e V^{3+} ho transizioni $n \rightarrow \pi^*$ (elettroni di non legame che passano in orbitali di antilegame) o $\pi \rightarrow \pi^*$ (da orbitali di legame π a orbitali di antilegame), mentre con il Fe^{3+} ho passaggi $n \rightarrow d$. Questo comporta la formazione di bande, dette LMCT (ligand to metal electron transfer) a λ più alte (446 nm, blu): il composto è quindi rossastro.

La curva di titolazione, comunque, ha sempre un massimo all'aggiunta di due equivalenti di metallo (a parte il caso di alcune transferrine, come la melanotransferrina, che legano un solo atomo di Fe, ed hanno quindi il massimo all'aggiunta di un equivalente).

Un altro studio effettuabile su queste proteine è lo studio della diminuzione di fluorescenza della proteina all'aggiunta del metallo (dovuta al quenching del Fe): anche in questo caso la fluorescenza diminuisce fino all'aggiunta di due equivalenti di Fe (o di uno per la melanotransferrina).

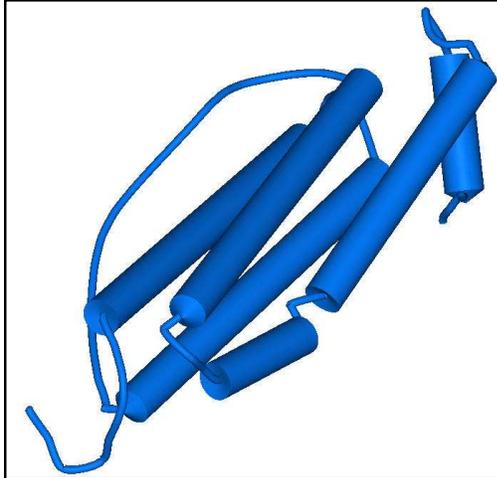
Il ferro, dopo essersi legato alle transferrine, deve entrare nelle cellule: per questo scopo esistono dei recettori di membrana, dimeri connessi da un ponte disolfuro che riconoscono solo le transferrine legate a due atomi di ferro; questo riconoscimento è mediato da sequenze glicosilate che fanno interazioni deboli con il recettore.

Dopo il legame con il recettore si ha endocitosi della transferrina mediata da clatrine e, dopo diminuzione del pH dell'endosoma fino a 5 la transferrina viene rilasciata; inoltre in queste condizioni il ferro viene rilasciato dalla transferrina, probabilmente con uno dei seguenti meccanismi: la protonazione del CO_3^- ($k_b=10^{-4}$) o delle Tyr ($k_b=10^{-6}$) e quella di due Lys, normalmente legate da un legame idrogeno, che fa cambiare la conformazione della transferrina (meccanismo di *lysine trigger*).

Una volta liberato, il Fe viene trasportato dove necessario grazie alle chaperonine, il recettore resta legato alla transferrina apo, viene riportato in membrana e rilascia la transferrina, che torna in circolo ([] plasmatica: 30-40 $\mu\text{g/l}$), il 30% nella forma diferrica.

L'affinità delle transferrine diferriche per il recettore è molto alta, mentre quella per il ferro cambia tra le diverse transferrine (es. la lattotransferrina è molto più affine della transferrina).

Il ferro, una volta liberato, va a fare parte di metalloenzimi o rimane in deposito, complessato con la ferritina, un insieme di 24 subunità che contiene circa il 20% in peso di ferro, trattenendone il 13% del totale. La ferritina è una proteina molto conservata, costituita da subunità H e L (heavy e light), presenti nella proteina in proporzione diversa tra di loro a seconda del tipo di ferritina. La presenza di ferritina nel plasma è sintomo di patologie, quali la emocromatosi.



La struttura di H e L è simile, costituita da quattro α -eliche grandi, dette A, B, C e D, parallele tra di loro, oltre ad un'elica più piccola, detta E, perpendicolare alle altre quattro. Le subunità si assemblano in coppie antiparallele, che poi si associano tra di loro, creando così zone di particolare simmetria, che rendono accessibile la cavità interna al solvente ed al ferro, ad esempio una zona centrale con simmetria C_4 , formata dall'incrocio di quattro eliche E, con prevalenza di aminoacidi idrofobici (Leu, Ile) ed una laterale, con simmetria C_3 , formata dalle regioni N terminali di tre subunità, con prevalenza di aminoacidi polari (Asp, Glu, Ser). Sembra che questa regione (C_3) sia la responsabile dell'entrata del ferro nella ferritina (determinato con esperimenti di mutagenesi).

Nelle subunità H, inoltre, esistono residui che catalizzano una reazione ferrossidasica: ci sono degli aminoacidi acidi (come tirosinato), che legano due ioni Fe^{II} vicini e ne permettono l'interazione con l'ossigeno che diventa perossidico, portando il ferro a Fe^{III} ; il legame O-O è quindi rotto da una molecola di acqua che diventa H_2O_2 , poi metabolizzata dalle catalasi, e lasciando $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$, che diffonde verso la cavità interna della proteina, passando fra vari aminoacidi. La parete interna, quindi, si ricopre di un primo strato di Fe^{III} , coordinato dai carbossilati di cui è ricca la cavità interna, e da molecole di acqua che, iperpolarizzate, si deprotonano e consentono la coordinazione di nuovi ossidi di ferro. Si formano quindi degli aggregati di ossido di ferro idrato che precipitano e possono formare col tempo ossido di ferro che cristallizza ordinatamente a formare ferridrite, fino anche a 5000 centri di ferro per proteina. Nella cavità è possibile anche ritrovare ioni fosfato, che vanno a formare ferridrite fosfato (in misura minore rispetto alla ferridrite).

Quando poi il ferro deve essere redistribuito deve essere nuovamente ridotto: esistono due ipotesi a riguardo:

- 1) I canali C_4 permettono l'entrata di molecole riducenti, che riducono il Fe che poi esce dai C_3 .
- 2) C'è un passaggio di elettroni fino all'interno del guscio; il ferro ridotto esce da C_4 grazie alle chaperonine entrate dallo stesso canale.

Utilizzando ferro marcato è possibile notare come anche il rilascio del ferro sia ordinato: l'ultimo ferro ad entrare è anche il primo ad uscire.

Nei batteri l'espressione delle proteine coinvolte nell'omeostasi del ferro è genericamente regolata, grazie all'espressione di una proteina da 17kDa, detta FUR (Ferric Uptake Regulation) che, una volta legato il ferro, è in grado di regolare l'espressione delle altre proteine.

Negli eucarioti, esiste una proteina FUR-simile, detta IRE-BP che lega gli IRE (Iron Responsive Elements), regioni a loop sugli mRNA del recettore per la transferrina e della ferritina.

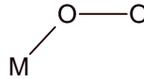
Gli IREs si possono ritrovare sia a monte (in 5') che a valle (in 3') del gene, con esiti differenti: in presenza di elevate concentrazioni di ferro IRE-BP-Fe non ha alta affinità per IRE, e vengono trascritti solo gli mRNA con IRE a monte (perché gli altri non sono stabilizzati). In caso di poco ferro IRE-BP lega l'mRNA, impedendo la trascrizione degli mRNA con IRE a monte.

Anche altri geni con IRE sono legati al metabolismo del ferro o a proteine che legano ferro: ad esempio l'aconitasi, che contiene un centro Fe-S si può legare alle sequenze IRE.

- Legame dell'ossigeno con i metalli

Il legame dell'ossigeno con i centri metallici è mediato dagli orbitali π e π^* e può avvenire in diversi modi:

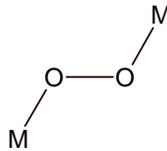
Modalità η^1 - *end on* : solo un atomo di O si lega al metallo, la struttura è *bent*.



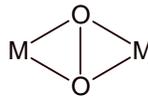
Modalità η^2 - *side on* : si ha un forte indebolimento del doppio legame O-O.



$\mu : \eta^1 : \eta^1$ *end on bridging*

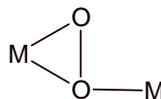


$\mu : \eta^2 : \eta^2$ *side on bridging*

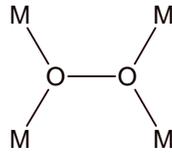


Inoltre esistono anche le seguenti modalità, non ritrovate in sistemi biologici :

$\mu : \eta^1 : \eta^2$ *end on / side on bridging*



η^4 end on fourfold bridging



Più l'O₂ è ridotto (anione superossido e perossido) più gli elettroni andranno in orbitali π^* di antilegame, il legame sarà indebolito ed allungato e diminuirà la frequenza di stretching.

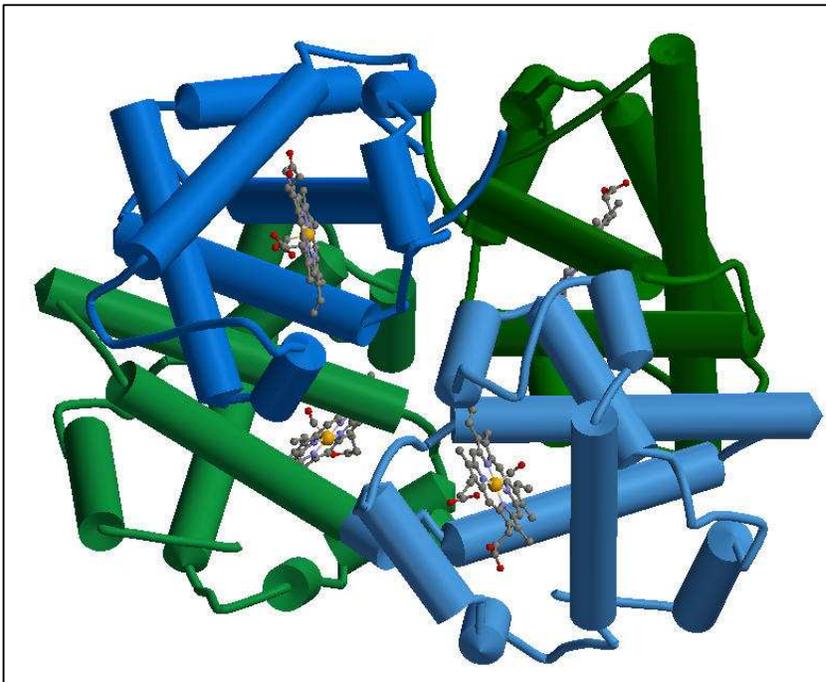
Analizzando un complesso O₂-M si può valutare la lunghezza del legame (ad esempio con spettroscopia RX) e valutare la frequenza di stretching (ad esempio con spettroscopia RAMAN).

In una conformazione end-on ho formalmente la presenza di superossido, con il metallo che ha donato un elettrone all'ossigeno con allungamento del legame (da 120 a 130 pm) e diminuzione della $\nu_{stretch}$ da 1500 a 1100 cm⁻¹.

Nel side-on, invece ho perossido, poiché il metallo dona due elettroni all'ossigeno.

L'end-on bridging può essere sia perossido che superossido.

Nei sistemi biologici i più importanti trasportatori di ossigeno sono la mioglobina e l'emoglobina. Queste proteine sono costituite da otto alfa eliche ripiegate con il tipico pattern delle globine che comporta il mascheramento di molti amminoacidi idrofobici a formare una tasca che accoglie gruppo prostetico e metallo: la presenza di amminoacidi idrofobici è necessaria per il corretto posizionamento e mantenimento in sede dell'eme (l'eliminazione o sostituzione con amminoacidi non idrofobici, comporta un aumentato rilascio dell'eme).



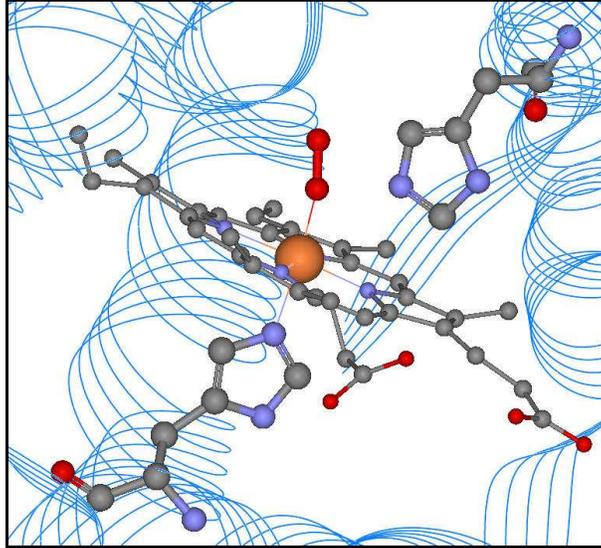
L'eme è di tipo b, quindi senza legami covalenti diretti con la proteina; l'eme coordina quattro posizioni del ferro e la proteina lega con un His una quinta posizione del ferro. I propionati dell'eme sono esposti verso il solvente ed il ferro non si trova esattamente sul piano dell'eme, ma è più spostato verso l'His che lo coordina.

Emoglobina.

La tradizionale nomenclatura delle globine indica gli amminoacidi con la lettera dell'elica a cui appartengono (da A ad H) o, nel caso si trovino su un raccordo, con il nome del raccordo (AB, BC, CD...) seguito dalla posizione dell'amminoacido: ad esempio il quarto amminoacido dell'elica C viene indicato come C4. Nella forma desossi il Fe è Fe^{II} alto spin (S=2), coordinato dall'His F8 (His prossimale); nella forma ossi il Fe diventa Fe^{III}, esacordinato.

Esiste poi una terza forma di emoglobina, con Fe^{III}, senza aver legato l'ossigeno: questa forma è detta forma meta.

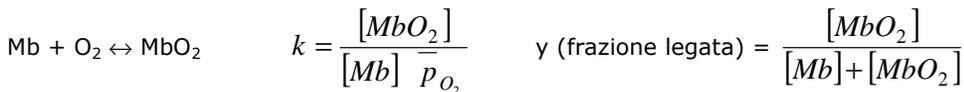
Benchè il legame dell'ossigeno sia molto veloce, è un processo piuttosto complesso: l'ossigeno si lega sul Fe, dalla parte opposta rispetto all'His proximale, nella cosiddetta cavità distale, con conformazione η^1 end on. Dopo il legame si può osservare un allungamento del legame della molecola di ossigeno, compatibile con un passaggio da ossigeno molecolare ad anione superossido. Inoltre il Fe diventa Fe^{III} basso spin ($S=1/2$), con raggio minore, che gli permette quindi di entrare sul piano dell'eme, trascinando con sé anche l'His proximale, che si avvicina quindi all'eme. Il legame dell'ossigeno è anche stabilizzato da un legame idrogeno tra l'atomo di O più lontano dal ferro ed l'Nε dell'His E7 (His distale).



Sito di legame dell'ossiemoglobina.

Osservazioni fatte sulla mioglobina mostrano che il complesso $\text{Mb}[\text{Fe}^{\text{III}}]:\text{O}_2^-$ è diamagnetico ($S=0$), benchè derivi da due sostanze paramagnetiche ($\text{Mb}[\text{Fe}^{\text{II}}, \text{h.s}]$ con $S=2$ e O_2 con $S=1$). Per spiegare questo comportamento, e meglio definire il legame dell'ossigeno alla molecola, sono stati sviluppati dei modelli.

Consideriamo gli equilibri di formazione degli addotti con O_2 :



$$[\text{MbO}_2] = k \cdot \bar{p}_{\text{O}_2} [\text{Mb}] \quad \rightarrow \quad y = \frac{k \cdot \bar{p}_{\text{O}_2}}{1 + k \cdot \bar{p}_{\text{O}_2}} \quad \text{Quando } [\text{MbO}_2] = [\text{Mb}] \quad k = \frac{1}{p_{\text{O}_2}}$$

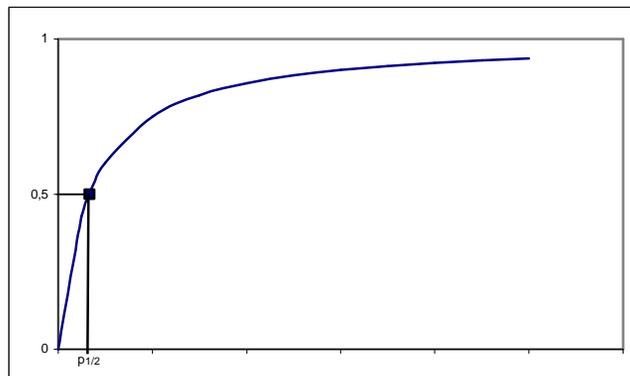


Grafico di y in funzione della pressione parziale di ossigeno.

Esistono molecole che possono competere con l'ossigeno per il legame all'emoglobina, come il CO: questa molecola si dispone in modo lineare (e non *bent*, come l'O₂) ed ha un'affinità per l'eme isolato ~25000 volte superiore all'ossigeno. Tuttavia l'affinità dell'eme inserito nel contesto della proteina è molto maggiore per l'ossigeno che per l'ossido di carbonio (~200 volte), soprattutto grazie alla stabilizzazione data dall'His distale.

Lo spettro UV della mioglobina (e di tutte le eme proteine) è caratterizzato da tre bande: la banda Soret, attorno a 400 nm dovuta a transizioni $\pi-\pi^*$ della porfirina (è una banda molto stretta a causa della rigidità della struttura della porfirina) e due bande dette bande Q o banda α e banda β attorno ai 550 nm. Osservando lo spettro UV possiamo vedere alcune differenze tra Mb, MbO₂ e MbCO: ad esempio la Soret dell'HbCO è molto più alta rispetto alle altre, e nella MbO₂ le due bande α e β sono unite a formare un unico picco.

- Emoglobina

L'emoglobina è un eterotetramero $2\alpha 2\beta$ costituito da quattro subunità con struttura simile alla mioglobina e disposte a formare una struttura abbastanza simmetrica.

Le curve di saturazione di Hb e Mb sono differenti: infatti mentre la curva di saturazione della Mb è un'iperbole, per l'Hb abbiamo una curva di saturazione sigmoideale, a causa del fenomeno della cooperatività.

Nello studio di questi trasportatori di ossigeno è utile utilizzare il grafico di Hill che, in funzione della pressione parziale di ossigeno, dà il valore di legato/libero (come $\log y/(1-y)$).

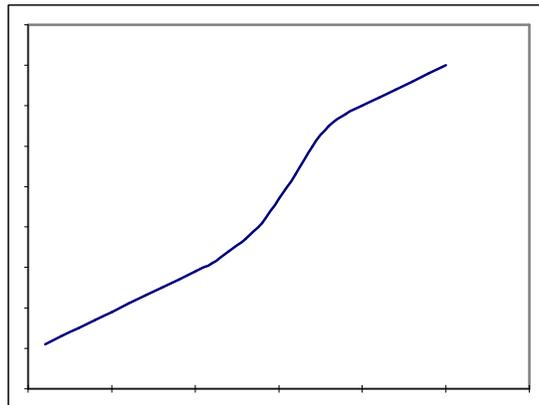
$$\text{Poiché, come già detto, per la Mb } y = \frac{k \cdot \bar{p}_{O_2}}{1 + k \cdot \bar{p}_{O_2}}, \quad 1 - y = \frac{1}{1 + k \cdot \bar{p}_{O_2}} \quad \text{e} \quad \frac{y}{1 - y} = k \cdot \bar{p}_{O_2}.$$

$$\text{Quindi } \log \frac{y}{1 - y} = \log k + \log \bar{p}_{O_2}.$$

Per la mioglobina il grafico di Hill sarà quindi una retta con pendenza 1 e intercetta in $\log k$. Per l'emoglobina, invece, abbiamo:

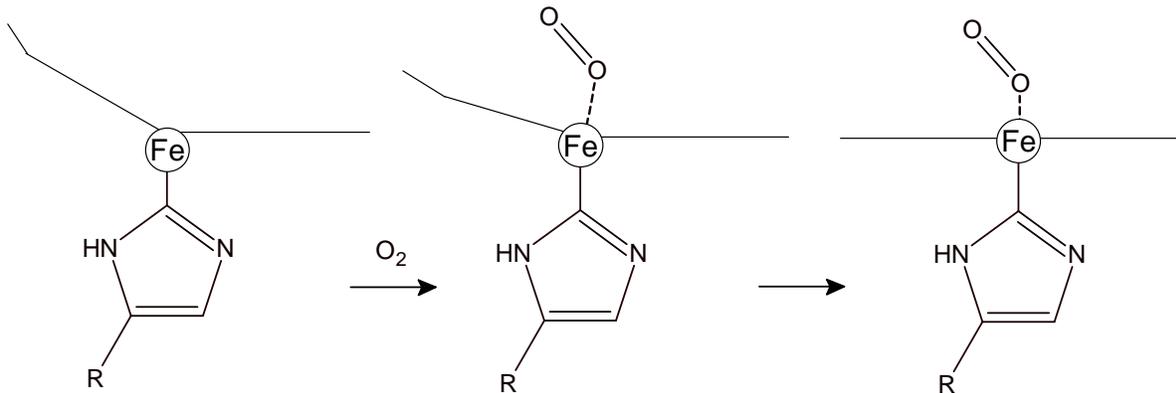
$$\text{Hb} + n\text{O}_2 \leftrightarrow \text{Hb}(\text{O}_2)_n, \quad k = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}](\bar{p}_{O_2})^n} \quad \text{e quindi} \quad \log \frac{y}{1 - y} = \log k + n \log \bar{p}_{O_2}$$

Se tutte le quattro subunità si comportassero indipendentemente dovremmo avere $n=4$. La situazione è invece la seguente:



A valori bassi di pressione parziale di ossigeno abbiamo $n=1$, poi c'è una transizione con $n=2.9$ ed infine un ritorno a $n=1$, ma con una k più alta, cioè con più alta affinità.

Il modello oggi accettato è quello di Monod-Wyman-Changeux, che assume due forme estreme per ogni subunità dell'emoglobina: la forma R (rilassata) e T (tensionata), con proprietà strutturali e termodinamiche differenti.



Nella forma T desossi (a bassa affinità per O₂) il Fe³⁺ high spin deforma il piano dell'eme in modo da formare una "cupola", l'attacco dell'ossigeno diminuisce questa deformazione fino a passare alla forma R, in cui c'è alta affinità per l'ossigeno ed il Fe²⁺ è sul piano dell'eme.

Secondo questo modello l'interazione con l'ossigeno dipende dal rapporto T/R e da k_T/k_R (rapporto delle costanti di affinità delle due forme),* secondo i parametri

$$L = \frac{R_0}{T_0} \quad \text{e} \quad C = \frac{k_R}{k_T},$$

dove R_0 e T_0 sono il numero di subunità R e T con 0 molecole di ossigeno legate), e dove $L < 1$ e $C > 1$.

Quando il Fe si sposta nel piano dell'eme, si tira dietro l'His prossimale che deforma l'elica F, facendo allargare gli amminoacidi idrofobici, fatto che favorisce il rilassamento dell'eme.

Le diverse subunità hanno amminoacidi che sporgono verso le altre e trasmettono quindi la modificazione strutturale alle subunità vicine, aumentandone l'affinità per l'ossigeno favorendo il passaggio T → R.

L'ossigeno viene definito *effettore allosterico omotropico* dell'emoglobina.

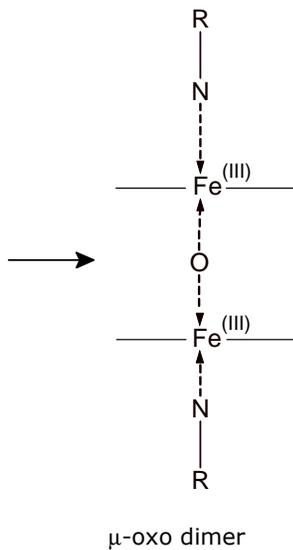
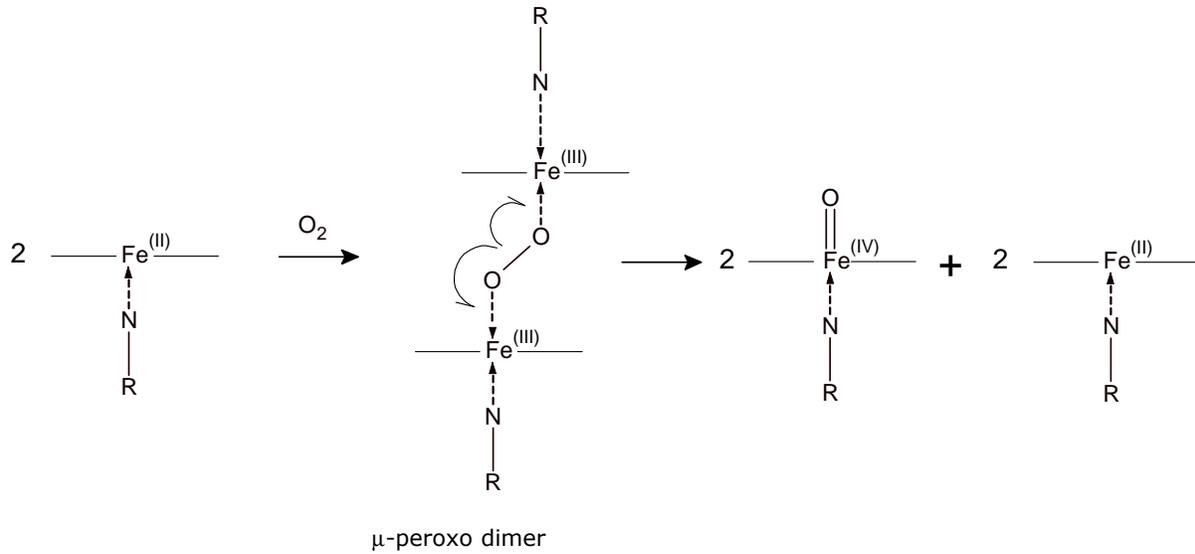
Un altro importante effettore sono gli H⁺ (effetto Bohr) che sono *effettori allosterici eterotropici*, poiché agiscono lontano dal sito di legame, diminuendo l'affinità dell'Hb per l'ossigeno e favorendone il rilascio (utile ad es. in situazioni di acidosi).

Gli idrogenioni stabilizzano la forma T rispetto alla forma R impedendo la rotazione (di circa 15°) delle subunità α_1 e β_1 rispetto a α_2 e β_2 che si ha dopo il legame dell'ossigeno, in quanto modificano alcuni legami idrogeno alle estremità delle subunità β .

Altri importanti effettori con simile funzionamento sono il BPG (bisfosfoglicerato) e la CO₂, che può formare *carbaminoemoglobina*, legandosi all'estremità N terminale e favorendo T rispetto a R.

Per determinare esattamente il funzionamento dell'Hb fu inizialmente riprodotto il centro metallico della proteina, con porfirina, Fe, O₂ ed un sesto legante, come una base azotata, o comunque un donatore N. Si vede che in questa situazione si viene a formare un particolare addotto perossidico con due porfirine che si può scindere a dare un intermedio ferridico (formalmente Fe^{IV}), che lega un'altra porfirina e forma un intermedio Fe-O-Fe stabile.

* Questo modello, detto concertato, era contrastato dal modello sequenziale, secondo il quale il legame di un ossigeno ad una subunità modificava la conformazione di una subunità adiacente, rendendola più affine e così via. Si avrebbero quindi diverse popolazioni, con Hb desossi, monossi, biossi etc., con differenti k tra le diverse subunità.



Questo dimostra che non è possibile utilizzare solo l'eme per il trasporto di ossigeno, ma è necessario anche un intorno proteico.

Gli studi sono comunque proseguiti, sintetizzando particolari porfirine che legassero e "proteggessero" l'ossigeno senza dimerizzare. Ad esempio sulle porfirine *picket-fence* (palizzata), che hanno dei particolari sostituenti che ne impediscono la dimerizzazione, l'ossigeno si lega come sull'eme, anche se manca la stabilizzazione cinetica/termodinamica della cavità distale.

Un parametro che viene utilizzato in questi studi è $M = \frac{\bar{p}_{1/2}(O_2)}{\bar{p}_{1/2}(CO)}$ che, a parte per l'Hb di *Ascaris* (un verme marino), che ha $M=0.02$, è maggiore di 1 (135 per l'Hb, 4280 per le porfirine *picket-fence*).

- Altri trasportatori (emoeritrina/mioeritrina)

Molti animali che vivono sott'acqua, soprattutto vermi, possiedono particolari proteine di trasporto per l'ossigeno, contenenti due centri di Fe collegati da un atomo di ossigeno a ponte (centro Fe-O(H)-Fe).

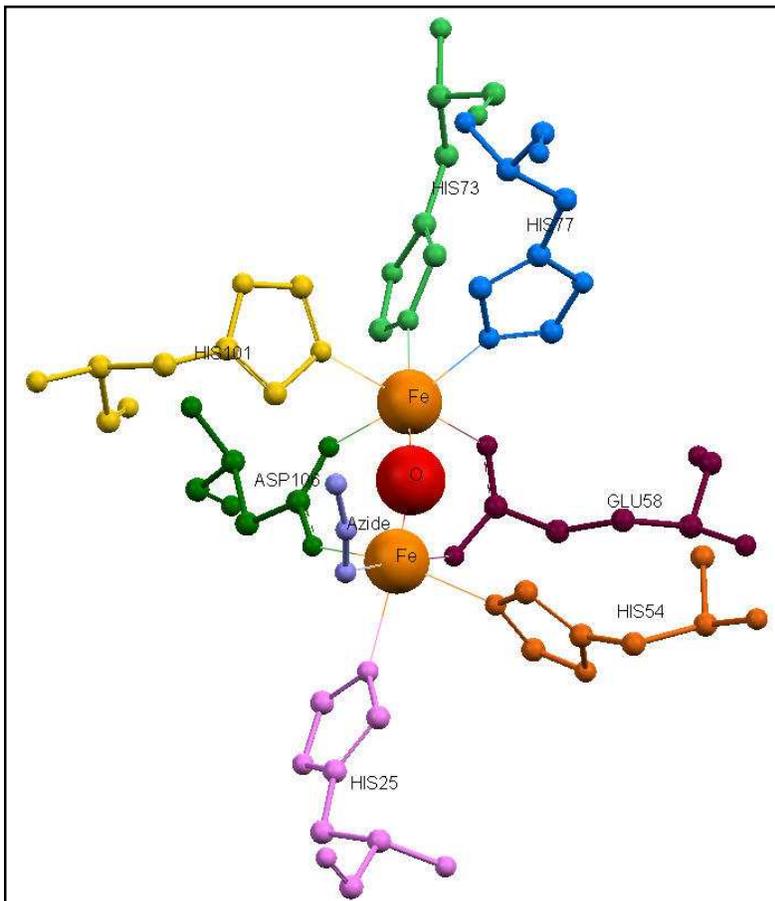


Una subunità dell'emoeritrina

L'emoeritrina è un omo-ottamero, con ciascuna subunità costituita da due coppie di α -eliche, probabilmente derivate da duplicazione genica, e ciascuna legante un atomo di ferro.

In realtà tutte e quattro le eliche contribuiscono, anche se in diversa misura, al legame di entrambi gli atomi di ferro. Esiste in forma desossi (incolore), ossi (rossa) e meta, come l'Hb.

Osservando la proteina dall'alto si può notare che le subunità sono disposte su due piani, quattro per ogni piano, legate da un asse C_4 (oltre a diversi assi C_2 che legano le subunità dei due piani).



Per studiare questa proteina si utilizzano dei piccoli leganti sonda come Cl^- o N_3^- che mimano l'ossigeno. La prima struttura determinata è stata quella della methr complessata con la sodioazide, che elettronicamente è simile a CO_2 ($[N=N=N]^-$, 16 elettroni).

L'azide si lega η_1 end-on ad uno dei due atomi di Fe del centro Fe-O-Fe.

Da questo si può dedurre che un atomo di Fe (quello sopra in figura) sarà sempre esacoordinato, mentre l'altro sarà normalmente pentacoordinato.

Il Fe esacoordinato lega tre His (73,77 e 101) sugli N_ϵ , e tre O, uno del centro Fe-O-Fe, gli altri di Asp¹⁰⁶ e Glu⁵⁸.

Il Fe pentacoordinato lega anche His²⁵ e His⁵⁴.

Il campo dei leganti del Fe è costituito da tre leganti border-line (N) e tre hard (O) in configurazione fac. Il campo dei leganti è basso, quindi il ferro è high spin, tuttavia la proteina è praticamente diamagnetica. Questa apparente contraddizione dipende essenzialmente dalla presenza dell'ossigeno a ponte tra i due atomi di Fe.

Infatti l'O, contrariamente ad altri leganti, favorisce un *accoppiamento antiferromagnetico* degli spin, cioè favorisce l'accoppiamento di elettroni a spin opposto rispetto a quello di elettroni a spin parallelo. Quindi, pur essendoci diversi elettroni spaiati ($S=5/2$), il momento magnetico sarà nullo in quanto gli spin si accoppiano in modo antiparallelo.

Gli studi seguenti sulle varie forme di Hr hanno in effetti dimostrato che uno dei due Fe è pentacoordinato, con la posizione che lega l'azide libera.

Nella forma desossi, inoltre, si vede che il legante a ponte è un OH e non O, e questo fa lievemente aumentare il momento magnetico (che rimane comunque molto basso).*

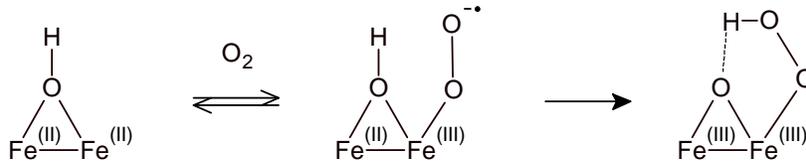
Inoltre si vede che nella forma ossi c'è una molecola di O₂ legata sulla sesta posizione del Fe.

Tramite spettroscopia RAMAN, infine è stato possibile stabilire che il legame dell'ossigeno avviene in modo asimmetrico: si utilizza una miscela di ¹⁶O-¹⁶O, ¹⁸O-¹⁸O, ¹⁸O-¹⁶O, si eccita a 500nm e si fa RAMAN. Si notano delle bande a numero d'onda attorno agli 800 cm⁻¹, che indicano la presenza di ossigeno perossidico. In particolare si notano tre bande, quella centrale più grande rispetto alle altre due. Si identificano chiaramente la banda più a sinistra come quella di ¹⁶O-¹⁶O, e quella a destra come quella di ¹⁸O-¹⁸O.

Dopo deconvoluzione si trova che la banda centrale è la somma di due bande, e da questo si conclude che il legame è asimmetrico perché queste due situazioni sono differenti:



Inoltre l'idrogeno dell'OH a ponte della desossi-Hr è trasferito sul perossido, che diventa idroperossido, stabilizzato da un legame idrogeno.



Benchè il passaggio da Fe^{II} a Fe^{III} implichi una modificazione degli angoli e delle distanze di legame, e della geometria, la proteina è fatta in modo da minimizzare questi cambiamenti.

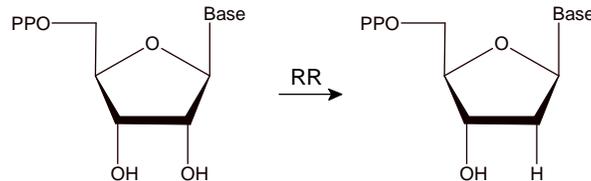
* Notare che i due COO⁻ a ponte non hanno effetto, né positivo né negativo sul momento magnetico.

- Ribonucleotide reduttasi

Le ribonucleotide reduttasi (in particolare quelle di classe I) sono un altro esempio di proteine in cui si ritrova un centro Fe-O-Fe.

Questa proteina è costituita da quattro subunità, 2 R₁ (o α) che possiedono l'attività catalitica e 2 R₂ (o β) con il centro Fe-O-Fe, disposto parallelamente alle α-eliche che lo individuano.

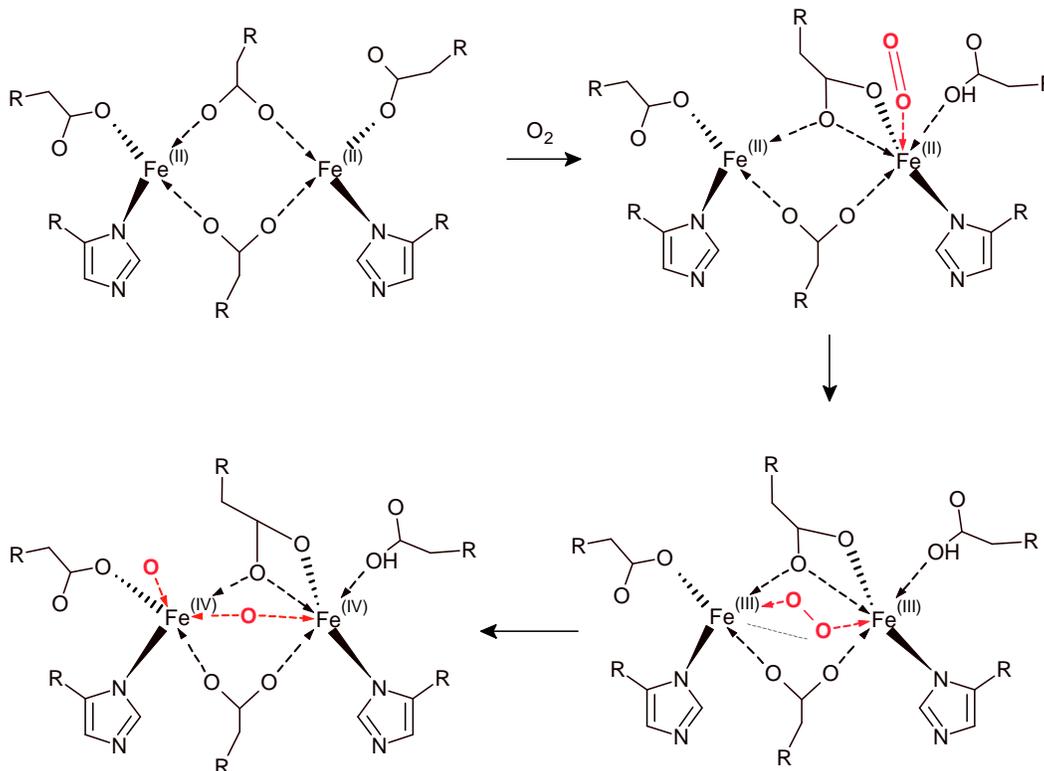
L'attività di questo enzima dipende dalla formazione di una Tyr radicalica stabile¹ che si trova nella subunità R₂ e che dopo una serie di trasferimenti elettronici attraverso diversi amminoacidi permette il trasferimento di questo elettrone spaiato sulla subunità R₁, catalitica, dove interviene in reazioni con delle Cys. La RR è attiva su tutti i nucleotidi, che riduce in 2', ed è attivata allostericamente dagli stessi.



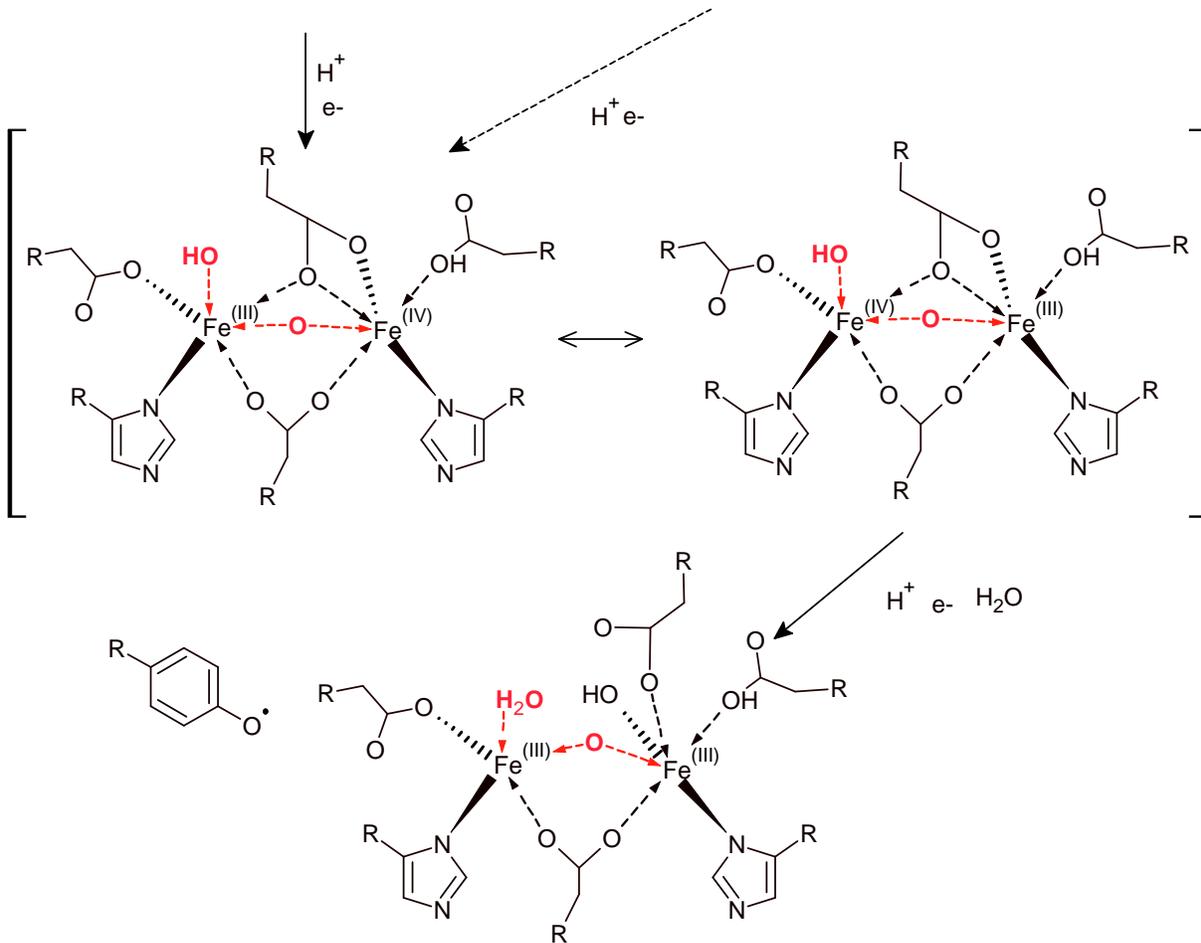
Il meccanismo di reazione di questo enzima è stato studiato principalmente su *E. Coli* e su *Salmonella T.*, anche perché lo studio dell'isoforma murina comporta problemi, in quanto in vitro non mantiene l'attività, poiché perde il Fe, necessario per l'attività.

Il Fe^{II} dell'enzima è tetracoordinato (anche se in alcune strutture RX si ritrovano anche delle molecole di H₂O che coordinano le altre posizioni), con quattro leganti hard che sono tre COO⁻ e un'His che coordina il Fe con Nδ. Alcuni ipotizzano l'intervento di altri donatori più lontani a completare la coordinazione del Fe.

La formazione della Tyr radicalica avviene in questo modo:



¹ La presenza di questo radicale è visualizzabile tramite EPR (spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica).



Il primo passaggio implica il legame di una molecola di ossigeno end-on su uno dei Fe^{III}, seguito dal riarrangiamento dei legami che porta ad avere un ossigeno perossidico con Fe^{III}. A questo punto il legame tra i due atomi di ossigeno si rompe e si formano formalmente due atomi di Fe^{IV}. La situazione è stabilizzata dalla reazione di un protone del solvente e di un elettrone derivato da un Trp (che diventa radicale) con il sito attivo: un Fe diventa Fe^{III} e l'altro resta Fe^{IV}, con possibilità di risonanza tra due forme; inoltre l'ossigeno non a ponte viene protonato.

A questo punto si ha la formazione del radicale sulla tirosina, con liberazione di H⁺ ed un elettrone che vanno a protonare ulteriormente l'OH coordinato che può quindi uscire come H₂O. A questo punto si può ristabilire la condizione iniziale, grazie all'intervento di flavine.

Il sito attivo attorno ai due atomi di ferro, è costituito da una cavità idrofobica che favorisce l'entrata dell'ossigeno e l'instabilità dei vari passaggi in modo da permettere la formazione dei radicali.

Grazie ad uno switch di idrogeni si ha la formazione (nella subunità R₁) di una Cys radicale (a partire dalla tirosina radicale) che trasferisce il radicale sullo zucchero del nucleotide che è legato con legami idrogeno alla proteina. Questo porta al legame dello zucchero ad un Glu e permette l'uscita dell'OH in 2' come H₂O, dopo aver legato un H⁺ derivante da una Cys.

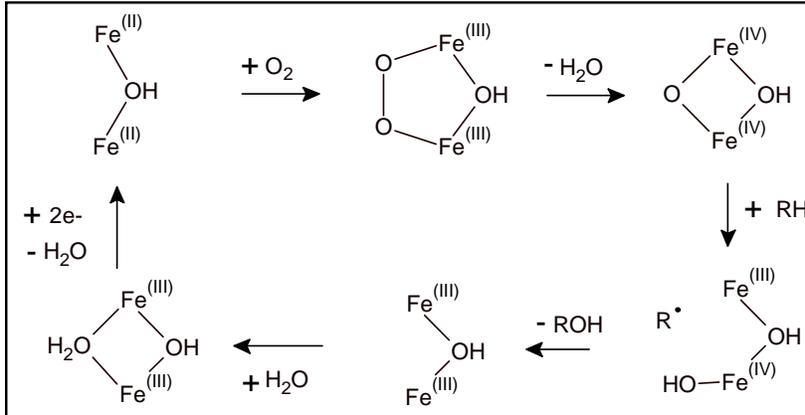
La Cys diventa quindi cisteinato e va a legare un'altra Cys, formando un radicale S-S, che in seguito si sposta nuovamente sullo zucchero e permette il distacco del Glu.

Le RR non di classe I non possiedono la subunità R₂ e la formazione del radicale dipende da altri centri metallici come Co, Mn o centri Fe-S.

- Metano monossigenasi

Sono enzimi che catalizzano l'ossidazione del metano, isolate principalmente da microorganismi termofili. Sono formate da sei subunità (2α , 2β , 2γ) e catalizzano la reazione $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$. Le subunità α contengono il centro Fe-O-Fe, mentre le altre hanno funzione catalitica e di trasporto di elettroni.

Il ciclo catalitico è il seguente:



Nello stato iniziale i centri di Fe sono Fe^{II}, per poter legare l'O₂, che si lega come perossido; uno dei due atomi di ossigeno esce come acqua (quindi come O⁻²), lasciando l'altro formalmente come O⁰, stabilizzato dal passaggio del Fe^{III} a Fe^{IV}. All'arrivo del substrato si ha distacco dell'O da un Fe, che torna Fe^{III}, e protonazione dello stesso O che diventa OH, formando un radicale sul substrato. L'OH si può quindi legare al radicale e staccarsi dal Fe, che torna Fe^{II}.

- Fosfatasi acida viola

È un enzima che agisce a pH acido (pH ottimale 6) su diesteri fosforici, idrolizzando uno dei due alcool con cui è esterificato il fosfato.

Il centro metallico contiene un centro Fe-O-Fe, ed è attivo quando uno è Fe^{II} e l'altro Fe^{III}.

La PAP è isolata da animali, ed è differente dalle fosfatasi vegetali, spesso alcaline e con più centri metallici. Al progredire dell'ossidazione passa da viola a trasparente.

I due atomi di ferro sono coordinati uno da un'His e un COO⁻, l'altro da un His, una Tyr e una molecola di acqua, oltre che da un O(H) e da un COO⁻ a ponte.

- Trasferimento di elettroni

Esistono due tipi di proteine che permettono il trasferimento di elettroni:

- proteine che trasportano elettroni da un donatore ad un accettore
- proteine che associano il trasferimento di elettroni ad una reazione chimica (ossidoreduttasi)

Solitamente nelle a) il centro metallico ha una sfera di coordinazione satura, nelle b) instatura ed ha la funzione di accettare e mantenere gli elettroni.

Ovviamente il tipo di reazione dipende anche dall'E⁰ del centro metallico: in generale possiamo dire che i centri Cu sono quelli a potenziale più elevato seguiti nell'ordine dai centri eme, Fe-S e dalle flavine, anche se ovviamente ci possono essere delle eccezioni.

- Citocromi

Sono metalloproteine contenenti Fe-eme, con il Fe esacoordinato e low-spin contrariamente, ad esempio, alla mioglobina o ad altre eme-proteine, con Fe-eme pentacoordinato high-spin o low-spin, in quanto deve legare l'ossigeno con l'altra posizione.

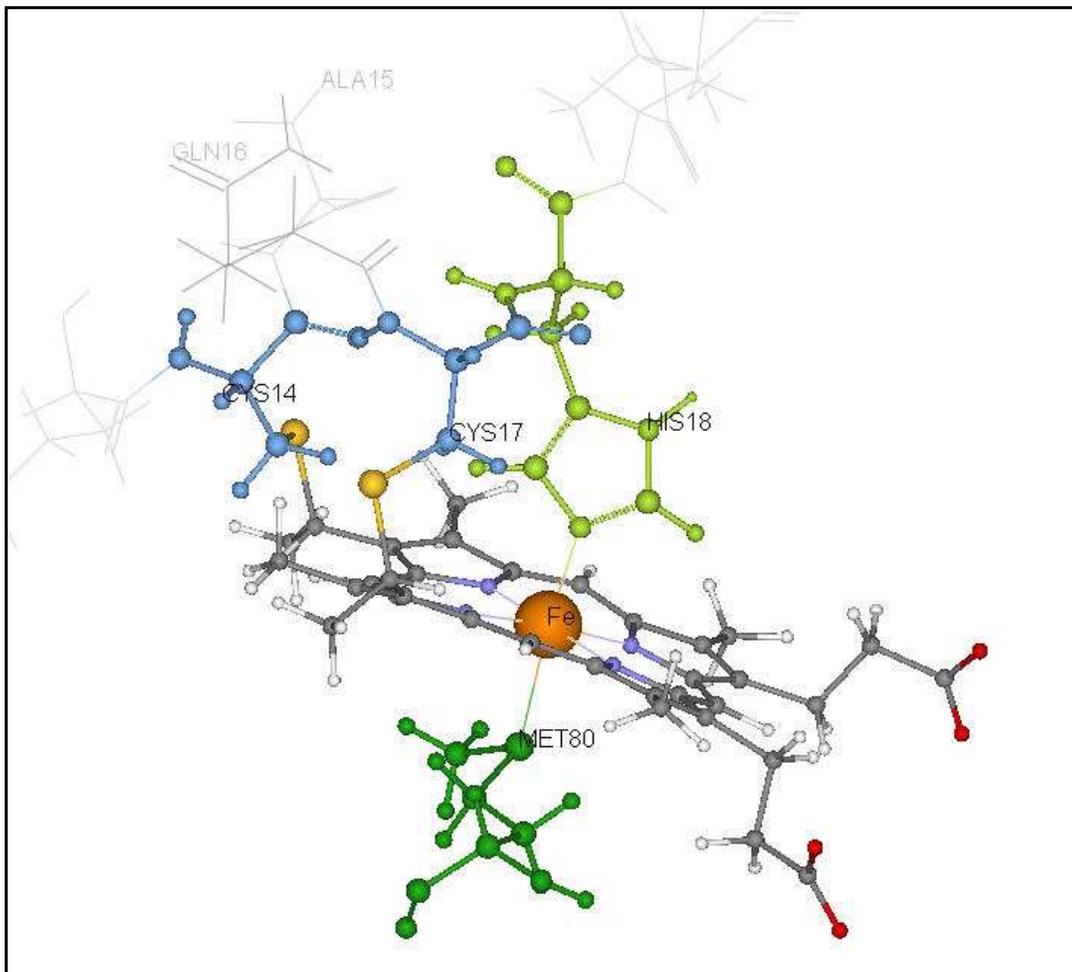
I citocromi si distinguono in base al tipo di eme (eme a \rightarrow cyt_a, eme b \rightarrow cyt_b, eme c \rightarrow cyt_c).

Nell'eme a e nell'eme b (quindi nel cyt_a e nel cyt_b) il Fe è coordinato ai 4 N dell'eme e a due amminoacidi della proteina, mentre nell'eme b i due vinili dell'eme c sono direttamente legati a due Cys della proteina. A causa di ciò denaturando un cyt_a o un cyt_b si ha distacco dell'eme, mentre denaturando un cyt_c l'eme rimane legato. Le due Cys che legano l'eme sono vicine nella struttura primaria, in un pattern CXXCH, dove H è l'His che coordina il Fe.

Nella nomenclatura dei citocromi spesso si ritrova la lunghezza d'onda della banda α di assorbimento dell'eme (es. cyt_c 550) o il numero della classe e della sottoclasse (es. cyt_{c1A}).

- Citocromo c

In questo citocromo l'eme si trova in una tasca con solo un lato esposto al solvente, il Fe è esacoordinato con la Met⁸⁰ che lo coordina con lo S tioeterico e l'His¹⁸ che lo coordina con N ϵ ; l'eme è legato alle Cys¹⁴ e Cys¹⁷. I due propionati non puntano verso il solvente, ma all'interno della proteina, dove formano dei ponti salini: la parte esposta al solvente è quindi idrofobica.



Sito attivo del cyt c.

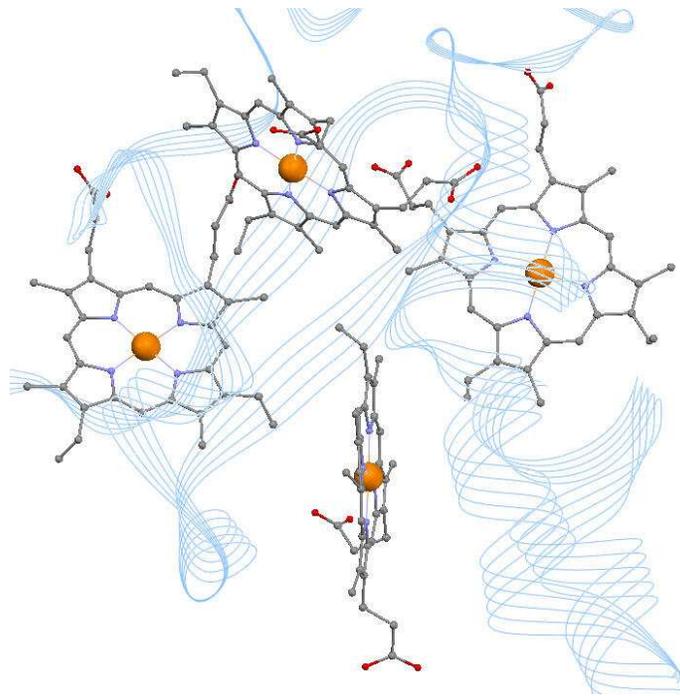
Durante il trasporto di elettroni il ferro resta sempre basso spin e passa da 2+ a 3+ quando perde un elettrone; poiché gli orbitali coinvolti sono solo d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} , la geometria di legame non cambia quando si acquista o perde un elettrone, così da permettere una reazione veloce ed efficiente.

Le modifiche nell'intorno del ferro durante l'ossidazione o la riduzione del ferro sono minime: si ha un piccolo spostamento dell'eme e si modificano alcuni legami idrogeno.

Il cyt_c deve interagire anche con altre proteine e questo è permesso dalla presenza di Lys sulla superficie della proteina che possono interagire con dei carbossilati.

Esistono diverse classi di cyt_c con caratteristiche diverse: in quelli di classe I, ad esempio, le Cys che legano l'eme sono verso la fine della sequenza; un esempio di citocromo appartenente a questa classe è il cyt_c' , costituito da quattro alfa-eliche parallele, con l'eme posizionato in modo circa parallelo a queste; l'eme in questo caso è pentacoordinato e sembra poter anche legare NO (e CO).

I cyt_c di classe III, invece, sono batterici, contengono più di un eme (3 o 4) ed hanno E^0 molto negativi (-150/-350 mV), con Fe esacoordinato con 2 His come leganti assiali: inoltre i piani degli eme sono perpendicolari tra di loro a coppie.



L'attribuzione dei citocromi c di classe IV è controversa: alcuni vi considerano, ad esempio, PRC (photo reaction center), altri i citocromi con altri gruppi metallici oltre all'eme, oppure quelli con più eme disposti in modo differente da quelli di classe III (in particolare quattro eme messi "a cascata" a differenti angolazioni tra loro con i primi tre eme legati da Met e His e il quarto da due His, e disposti spazialmente nell'ordine 1,2,4,3).

Quando si parla di trasferimento elettronico all'interno di una proteina solitamente interviene un legame a ponte fra i centri metallici per permettere il passaggio degli elettroni; quando invece gli elettroni devono passare da una proteina ad un'altra la situazione è differente.

Lo studio di queste interazioni è stato sviluppato dal premio Nobel Marcus, la cui teoria afferma che:

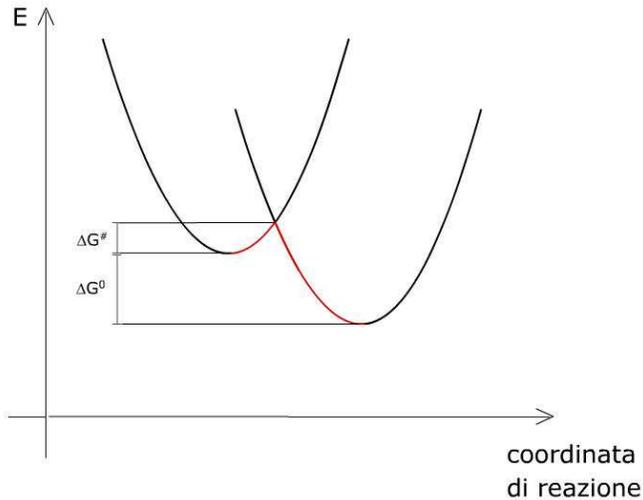
$$k_{et} = \frac{4\pi}{h} \cdot T_{DA}^2 \cdot FC$$

Dove k_{et} è la costante di velocità del trasferimento elettronico, T_{DA} è la matrice di tunneling, che è legata alla possibilità di trasferire un elettrone, determinata dalla distanza donatore-accettore (R) e dal mezzo in cui passano gli elettroni, e FC è il fattore di Frank-Condon.

Il fattore di Frank-Condon è calcolabile mediante la seguente equazione:

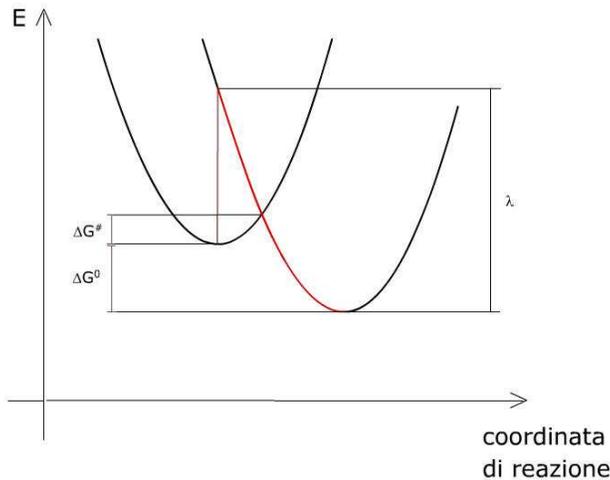
$$FC = \sqrt{4\pi\lambda kT} \cdot \left[\frac{\exp(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda kT} \right]$$

Dove ΔG^0 è l'energia libera di reazione e λ è l'energia di riorganizzazione. Consideriamo le due curve di potenziale di reagenti e prodotti:



Nel trasferimento dell'elettrone ci si muove sulla curva dei reagenti fino ad intersecare quella dei prodotti (ΔG^\ddagger), per poi ridiscendere (se i prodotti sono più stabili, ovviamente) fino al vertice di quella dei prodotti.

Se immaginassi invece, di trasferire l'elettrone da un centro all'altro senza modificare le geometrie, dovrei invece fare questo percorso:



Si definisce energia di riorganizzazione l'energia che dovrei compiere in questo caso (fino alla geometria dei prodotti).

Tanto più λ è simile a ΔG^0 , tanto più la reazione è efficiente, in quanto ΔG^\ddagger tende a zero, fino ad arrivare ad una situazione di inversione in cui $\lambda < \Delta G^0$.

Per studiare la velocità di trasferimento, possiamo ad esempio usare un cyt_c di cavallo, e legarvi ad un'His superficiale un complesso di Ru^I (pentaamminorutenio). Si può quindi indurre chimicamente, o in altri modi, il passaggio da Ru^{III} a Ru^{II}, facendo quindi migrare l'elettrone verso il ferro, che diventerà Fe^{II}.

¹ Il Ru è l'elemento sotto al Fe, nella tavola periodica.

Si è visto che, come già detto, la velocità dipende dalla distanza Fe-Ru, ma anche da ciò che li separa, cioè dal percorso che l'elettrone deve compiere.

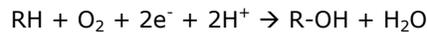
Inoltre per il corretto passaggio di elettroni tra due differenti proteine è necessario un corretto docking; questo si dimostra utilizzando il cyt_c di cavallo con cyt_c perossidasi equina o di lievito: nel secondo caso la presenza di alcuni metili impedisce un corretto docking, e quindi il trasferimento è più lento.

Infine dobbiamo anche considerare il fatto che le proteine sono solvatate ed è necessario che si desolvatino per interagire correttamente.

- Eme-proteine con funzione enzimatica : cyt_{p450} e perossidasi.

Quella dei cyt_{p450} è una superfamiglia enzimatica, contenente proteine con differenti attività catalitiche, tra cui la più importante è quella monossigenasica.

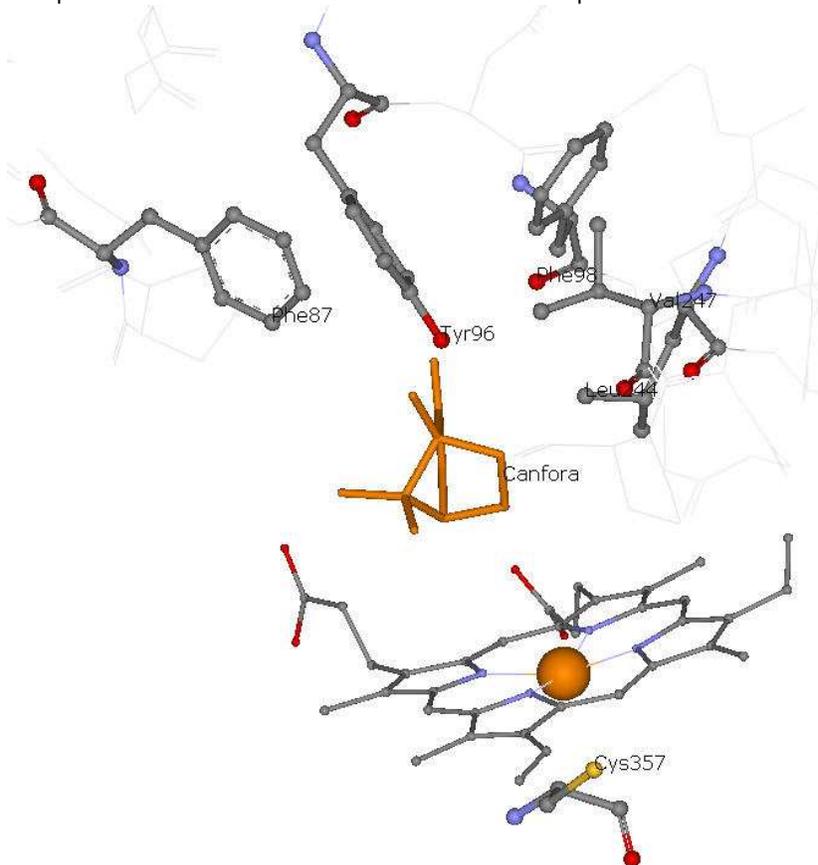
Un esempio di reazione di monossigenazione è il seguente:



Questi enzimi sono molto importanti per il metabolismo di sostanze sia endogene che esogene, che spesso ne inducono anche la sintesi. Sono essenzialmente enzimi di membrana (il che ne complica lo studio), anche se ne esistono delle forme solubili, come il $\text{cyt}_{p450 \text{ cam}}$ derivato da *P. putida*, che ha come substrato la canfora.

La struttura dei vari cyt_{p450} è molto conservata tra le varie sottoclassi: è costituita in parte da α -eliche, di cui è molto importante l'elica I, molto lunga ed implicata nella reazione, e in parte da β -strand.

L'eme è in una tasca molto interna alla proteina, quindi il substrato dovrà passare in un canale d'accesso e la proteina deve essere abbastanza flessibile da permetterne l'entrata.

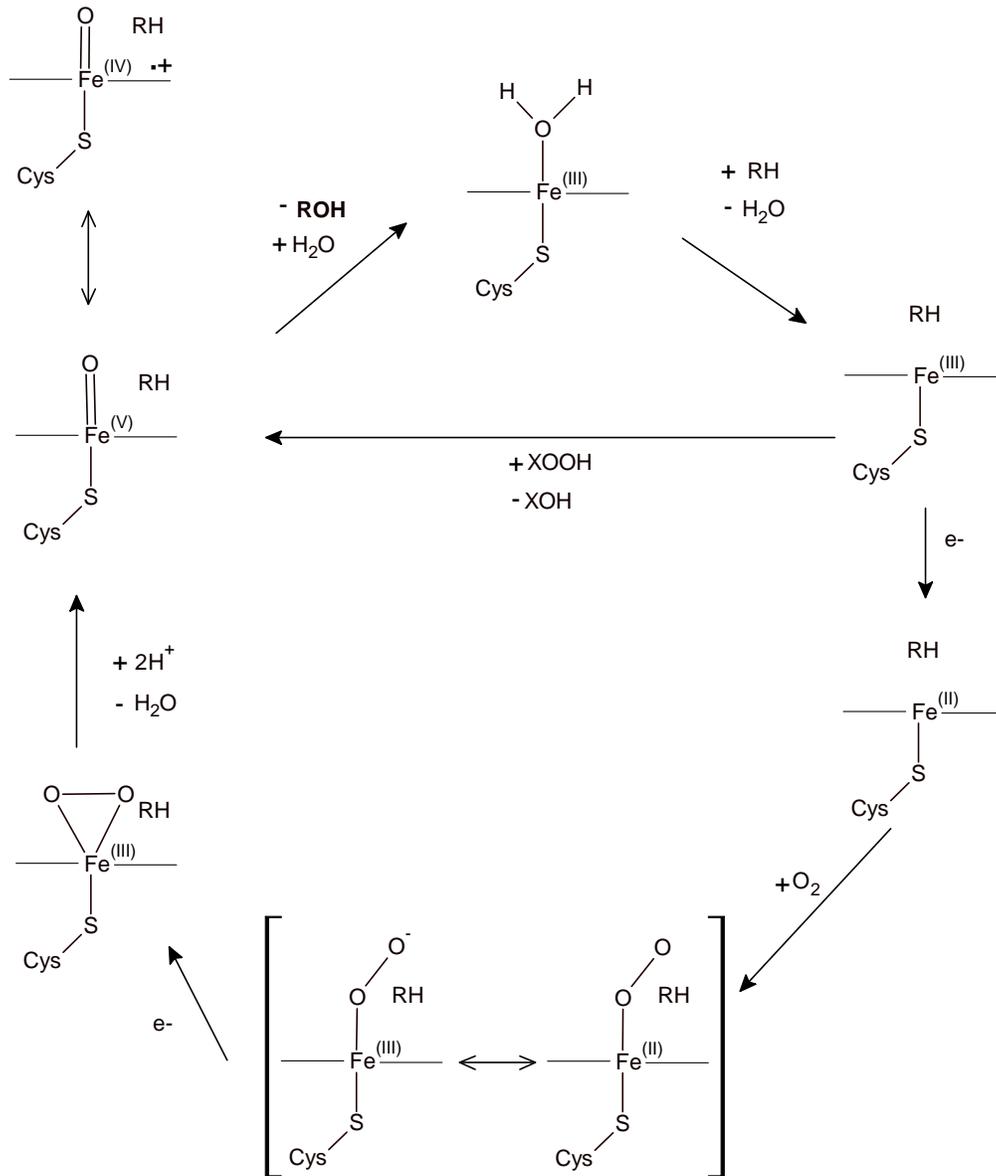


Consideriamo ora il $\text{cyt}_{p450 \text{ cam}}$: questo enzima possiede un eme di tipo b, che non è quindi direttamente legato alla proteina, ma indirettamente, tramite la Cys^{357} che coordina il Fe.

La Cys è un buon σ donatore, ed è importante per la catalisi. La parte che contiene la Cys (parte prossimale) è più vicina alla superficie di quella distale. Nella forma resting il Fe è +3 esacoordinato dai quattro N dell'eme, dalla Cys e da una molecola di H_2O (non in figura) che è legata ad altre molecole di acqua attorno. Inoltre uno dei due propionati forma un legame ionico con l'aminoacido che si trova due posizioni prima della Cys (His o Arg).

Questa forma ha un potenziale molto negativo ($\sim -300\text{mV}$).

CICLO CATALITICO:



Come primo passaggio la canfora entra nella cavità distale, probabilmente per "apertura" dell'enzima, visto che la cavità distale è lontana dalla superficie. L'entrata del substrato fa uscire l'acqua ed il Fe diventa Fe^{III} pentacoordinato high spin; il substrato NON lega direttamente il ferro e si posiziona facilmente nella cavità distale, ricca in aminoacidi aromatici/idrofobici, tranne la Tyr⁹⁶ che può fare un legame H con il carbonile della canfora, permettendone il corretto orientamento nella cavità.

Questo porta ad un aumento del potenziale del ferro (-173 mV) che può essere quindi ridotto a Fe^{II} high spin da un elettrone proveniente dall'esterno. A questo punto l'O₂ può legare il Fe^I come ossigeno superossidico e successivamente come ossigeno perossidico (dopo l'arrivo di un altro elettrone). Grazie ad un sistema ricco di elettroni, un ossigeno può uscire come H₂O (O²⁻) e lasciare l'altro *formalmente* come O⁰, formando l'intermedio oxenico (Fe^V con doppio legame con l'ossigeno). L'ossigeno è anche stabilizzato

¹ Notare che esiste anche una forma ridotta, legata a CO, non implicata nel ciclo catalitico, che assorbe a 450nm e che dà il nome all'enzima (pigment 450nm).

dalla porfirina che cede un elettrone, diventa radicale, e lascia Fe^{IV} : questo è anche confermato con spettroscopia, in quanto si evidenzia la presenza di un radicale organico.

Sembra esista anche una forma con O radicalico che può strappare un H al substrato, idrossilandolo con meccanismo radicalico. E' da notare che con la canfora, l'idrossilazione avviene sempre in 5, a causa della stereo/regioselettività dell'enzima che orienta sempre nello stesso modo il substrato; ciò è anche confermato dal fatto che usando il canfano (che non ha il carbonile) non si ha specificità.

Infine si può vedere che trattando con XOOH (*in vitro*) il $\text{cyt}_{\text{p450 cam}}$ a riposo, si ottiene direttamente l'intermedio oxenico.

Ma da dove arrivano gli elettroni??? Da altre proteine!!! Possiamo distinguere due classi di cyt_{p450} :

- **Classe I** (es. umano, *P. putida*): sistema a tre componenti, costituito dal cyt + due proteine, che sono una reduttasi che riceve gli elettroni dal NADPH e li trasferisce a delle ferredossine, con centri Fe-S.
NADPH \rightarrow reduttasi (con flavina) \rightarrow ferredossina \rightarrow cyt_{p450}
Sembra che la superficie di contatto con la ferredossina si a livello della cavità prossimale.
- **Classe II** : sistema a due componenti:
NADPH reduttasi (FAD-FMN) \rightarrow cyt_{p450}
L'unica variante è quella di *Bacillus Megaterium* che ha un'unica proteina con due domains
- **NOR** (NO reduttasi): accetta gli elettroni direttamente dal NAD(P)H.

E' da notare, infine, che i citocromi p450 di membrana sono ancorati con l'N-term ed il loop tra le eliche F e G: poiché il loop F-G sembra essere vicino al canale di ingresso del substrato, è probabile che il substrato attraversi la membrana per entrare nell'enzima.

L'altra classe di eme-proteine a funzione catalitica sono le perossidasi: queste proteine, ritrovate sia in sistemi animali che vegetali, catalizzano diverse reazioni, come l'ossidazione di piccoli substrati, utilizzando H_2O_2 (es. HRP, horse radish peroxidase, perossidasi di rafano) o la clorurazione (es. ChIP o CPO, cloroperossidasi); sono proteine altamente glicosilate quindi sono piuttosto difficili da studiare, perlomeno con spettroscopia RX.

Le perossidasi vegetali sono distinte essenzialmente per la natura del legante e per gli aminoacidi del sito catalitico:

- Classe I : citosoliche
- Classe II : secretorie di funghi
- Classe III : secretorie delle piante

Le prime perossidasi studiate sono state la cyt_c perossidasi (CcP) che ossida il cyt_c di lievito, ed appartiene alla classe I, e la lignina perossidasi (LiP), di classe II.

Un'altra molto studiata è la HRP, di cui oggi è anche possibile avere la struttura RX, grazie alla possibilità di farla esprimere in *Coli* (anche se si ottiene una forma non glicosilata). Esistono diverse HRP (HRP_a ... HRP_f), distinte per il punto isoelettrico (la a è la più acida, la f la più basica).

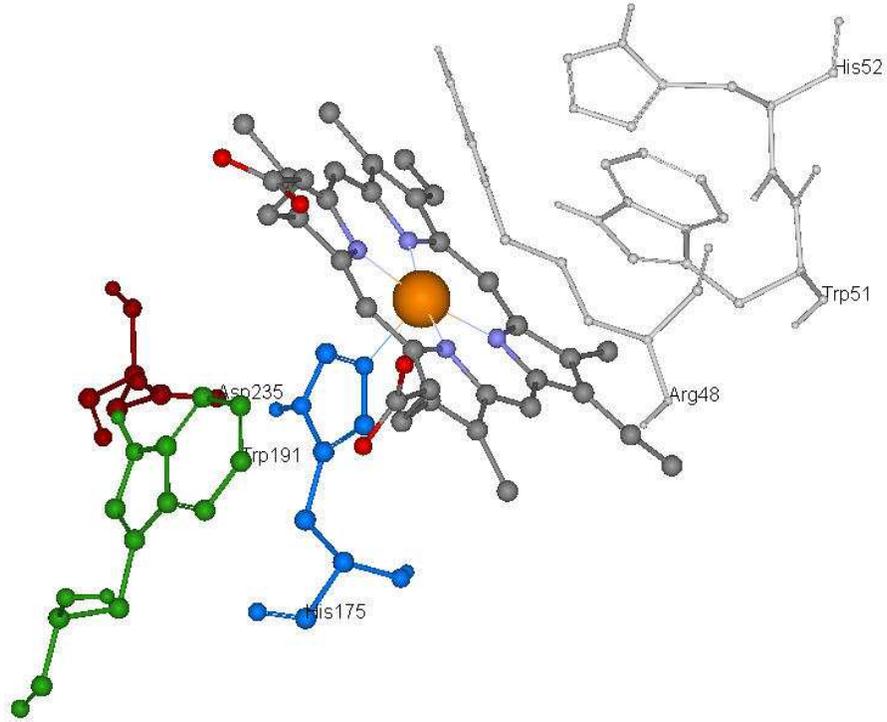
Altre perossidasi abbastanza studiate sono la CPO, la LP (lattoperossidasi animale) e la mieloperossidasi animale, implicata in processi infiammatori.

Il gruppo eme è in una tasca della proteina, con i propionati che danno ponti salini con alcuni aminoacidi della proteina e il lato δ esposto al solvente. A riposo, il Fe dell'eme è Fe^{3+} pentacoordinato high spin e la proteina ha E^0 negativo. Il quinto legante del ferro è spesso un'His, anche se ci sono eccezioni, come nella CPO dove è una Cys, o nella catalasi, dove è una Tyr.

La catalasi disproporziona l' H_2O che può essere generata da disproporzione del superossido.

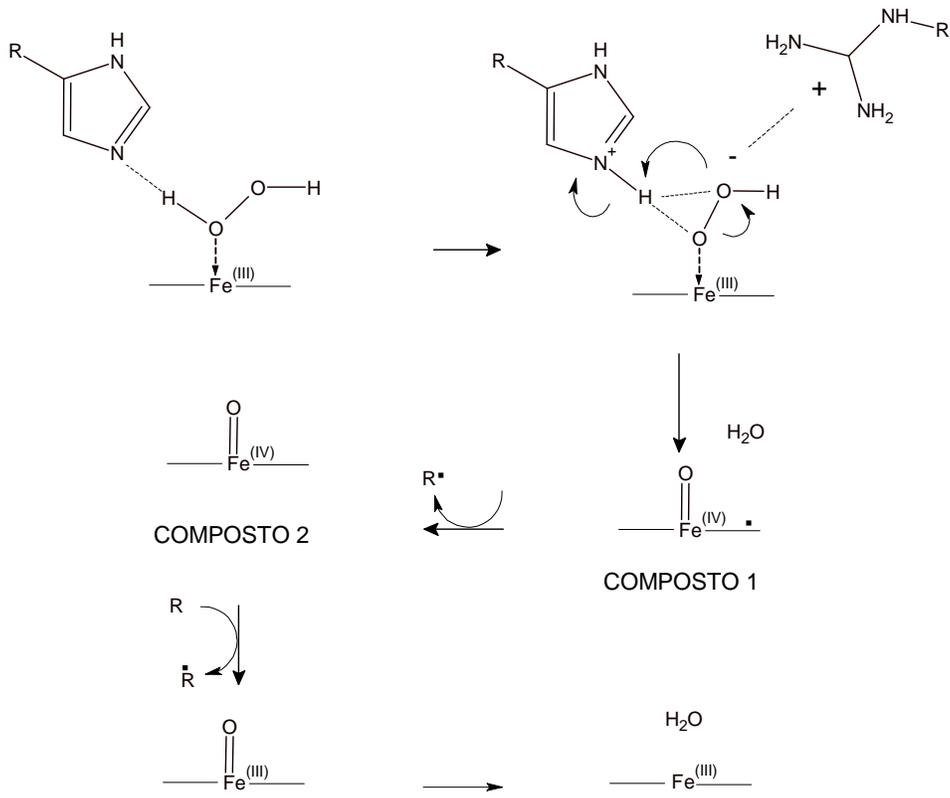
La CcP lega il Fe con l'N ϵ della His¹⁷⁵ che con l'N δ lega l'Asp²³⁵, a sua volta legato con il Trp¹⁹¹.

Nella cavità distale troviamo inoltre diversi aminoacidi conservati, come His⁵² e Arg⁴⁸, oltre ad altri aromatici, come il Trp⁵¹, orientati come l'eme che stabilizzano la proteina.



Cyt_c perossidasi.

CICLO CATALITICO:

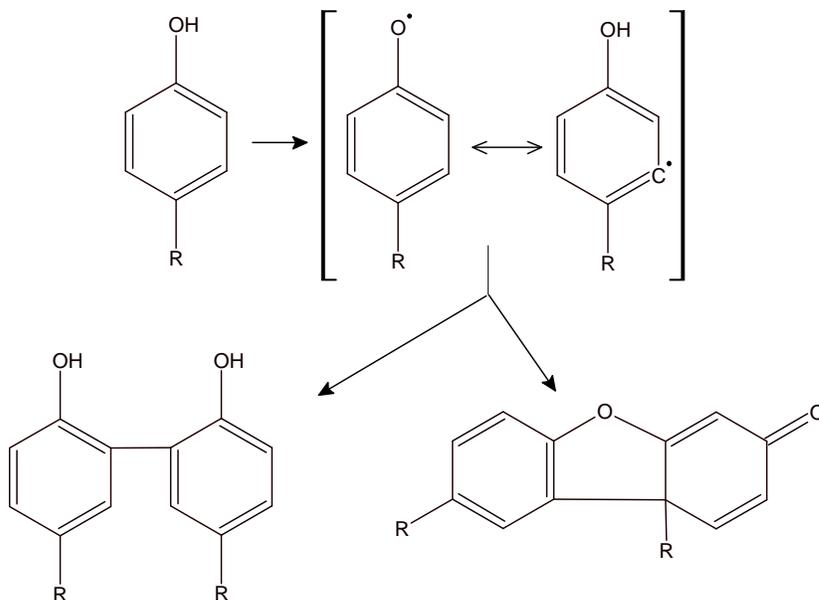


La cavità distale ha accesso limitato, a causa delle piccole dimensioni. Abbiamo Fe^{III} high spin pentacoordinato, che interagisce con H_2O_2 ; questa si coordina, deprotonandosi, quindi come ione idroperossido HO_2^- , η_1 end-on, stabilizzata dall'His e dall' Arg distali. A questo punto c'è scissione eterolitica del legame, si libera H_2O e rimane formalmente O^0 sul Fe. In questo caso non sembra esserci evidenza di Fe^{V} per stabilizzare l'ossigeno. L'intermedio che si forma è abbastanza stabile da essere studiato, si ha Fe^{IV} ed un radicale porfirinico nella maggior parte dei casi; tuttavia a volte il radicale è anche sul Trp¹⁹¹ che trasferisce l'elettrone attraverso Asp e His. Nel caso della LiP, ciò non accade, poiché manca il legame tra l'aromatico (che nella LiP è una Phe e non un Trp) ed il Fe.

Questo intermedio, detto "composto I", trasferisce quindi un elettrone al substrato, trasformato quindi in radicale, e formando il "composto II" che cede un altro elettrone.

Il substrato non entra nella cavità, ma si avvicina dal lato in cui l'eme è rivolto verso l'esterno e si ancora alla proteina con legami idrogeno o reazioni di stacking aromatico (dipende dal substrato). L'elettrone che fa diventare radicale il substrato passa attraverso il bordo dell'eme ed arriva sul Fe, in modo da risanare il deficit di elettroni su Fe e porfirina (o sulla proteina). A questo punto l'ossigeno esce come acqua.

Il destino del substrato è vario: dipende dalle sue caratteristiche, dal tipo di funzione della perossidasi e dalla localizzazione di questa.



Le reazioni più comuni derivano dall'accoppiamento di radicali, a formare dimeri α - α e chetone di Pummerer. Nel regno vegetale si formano spesso polimeri, come lignina e pectina; inoltre sembra che alcune oxine siano attaccate dalle perossidasi che servirebbero quindi per il controllo della crescita.

Oltre all'attività perossidasi si riconosce alla CcP un'attività monossidasica, poiché il sito attivo permette l'entrata di piccole molecole (infatti andando ad inserire molecole troppo grandi sparisce questa attività). Altre perossidasi sono la cloroperossidasi (CPO) e la lattoperossidasi (LP): la CPO può clorurare alcuni substrati, ha attività perossidasi, catalasica e di monossigenasi. Il quinto legante non è una Tyr ma una Cys (come cisteinato), come nei $\text{cyt}_{\text{p}450}$ ed è quindi più atta a reagire come monossigenasi; la cavità del sito attivo è molto grande, il che spiega la varietà di substrati che può trasformare.

La LP, invece, non è ancora stata studiata con RX e presenta un eme modificato in 8 con CH_2SH al posto del metile, anche se non è chiaro se questa modifica sia essenziale per l'attività o sia semplicemente un artefatto di purificazione.

Si possono inoltre effettuare degli studi di spettroscopia UV: nell'enzima a riposo vediamo le bande tipiche dell'eme, cioè la Soret attorno a 400 nm e le α e β attorno a 500-600 nm. Nel composto I la Soret è molto bassa, perché la porfirina è radicale, mentre nel composto II è tornata come prima, ma più a destra perché il ferro è diventato 3+ esacoordinato. Le curve sono anche modificate dal legante nella cavità prossimale.

Un altro tipo di studio possibile è l'analisi NMR paramagnetica: si può infatti sfruttare la presenza degli elettroni spaiati del Fe, che cambia il chemical shift e il tempo di rilassamento dei nuclei vicini. Questi effetti sono dipendenti da accoppiamenti scalari e dipolari, a causa dell'influenza del momento dipolare del Fe su quello degli idrogeni sia dei sostituenti dell'eme sia di alcuni aminoacidi della proteina. Questo spostamento rimane confinato solo ai nuclei vicini, mentre il resto degli H resta tra 0 e 14, quindi posso studiare l'intorno del sito attivo, non considerando il resto.

Le perossidasi, così come la met-Mb, hanno Fe^{III} high spin, quindi con 5 elettroni spaiati, che permettono uno studio di questo tipo, che infatti porta a spettri simili (non identici, perché l'intorno proteico influenza il risultato). Come nella normale analisi NMR, l'integrale del picco è proporzionale al numero di idrogeni sottesi, mentre il chemical shift non è prevedibile, in questo caso; generalmente, inoltre, i picchi sono larghi, a causa dell'aumentato tempo di rilassamento dei nuclei.

Per l'assegnazione dei segnali ci si può avvalere di porfirine sintetiche, sostituite in varie posizioni con ^2H invece di ^1H , e inserite nella proteina. Andando a vedere quale picco scompare, posso effettuare l'assegnazione dei segnali.

Spesso si utilizzano porfirine bisostituite, per facilitare l'assegnazione dei segnali dei sostituenti in 1, 3, 5 e 8 dell'eme; utilizzando infatti porfirine sostituite con deuterio in 1,3 e 1,5 è possibile identificare con solo due esperimenti le quattro posizioni: infatti il picco che verrà diminuito in entrambi i casi sarà quello di 1, quello che non viene mai toccato è quello in 8, mentre quelli in 3 e in 5 si abbassano solo in uno dei due esperimenti.

Consideriamo, ad esempio, le differenze tra gli spettri di globine e perossidasi: nelle globine il metile in 8 è a campi più bassi rispetto alle perossidasi, in cui il metile a campi più bassi è il 5. Queste differenze sono determinate dalla diversa posizione dell'eme nella proteina: nella met-Mb l'eme espone i propionati, mentre nella perossidasi no, facendo cambiare l'orientamento del quinto legante (His). Questa His che nelle globine ha l'asse che taglia gli anelli B e D, nelle perossidasi attraversa A e C: questo porta il metile in 8 (sull'anello D) ad essere più schermato dagli elettroni del ferro nelle globine, rispetto alle perossidasi in cui il metile in 5 (sull'anello C) è il più schermato.

Inoltre è utile effettuare questi studi anche inserendo piccole molecole "sonda" (come F^- , CN^- , N_3^- , OH^-) nel sito attivo per meglio valutarne la struttura, in quanto la cristallografia spesso non riesce a risolverlo in quanto altera le posizioni degli aminoacidi che vi si affacciano.

Ad esempio, inserendo F^- (legante a campo debole) nel cyt_c si nota un aumento dei ppm, perché il campo del ferro viene diminuito, anche se rimane sempre pentacoordinato e paramagnetico.

Se invece trattiamo la perossidasi con CN^- , legante a campo forte, vediamo che il Fe^{3+} diventa low spin (da $S=5/2$ a $S=1/2$), con conseguente diminuzione del paramagnetismo della molecola, restringimento dei picchi (meno influenza degli elettroni del ferro sui tempi di rilassamento) e spostamento dei picchi verso la zona diamagnetica, pur restandone sempre al di fuori.

L'effetto paramagnetico è direttamente proporzionale al numero di elettroni spaiati del centro metallico ed a volte è tanto forte che il segnale sparisce, in quanto il tempo di rilassamento viene drasticamente diminuito e il segnale non fa in tempo ad essere registrato.

Andando quindi ad unire lo studio di NMR paramagnetico con porfirine modificate e con molecole sonda ai risultati cristallografici, si può ricostruire la posizione degli aminoacidi del sito attivo.

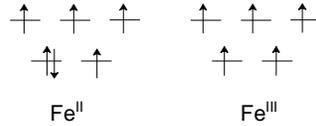
- Proteine Fe-S

Sono metallo proteine con Fe non eme che in genere trasportano elettroni da sole o associate a cofattori a dare complessi che fanno reazioni redox (idrogenasi, nitrogenasi, solforeduttasi) o di isomerizzazione (aconitasi). Tutte queste reazioni richiedono un alto numero di elettroni (6/8) e le Fe/S sono accumulatori di elettroni.

Le proteine Fe-S come trasportatori di elettroni si trovano ad esempio nella catena respiratoria e contengono più di un atomo di Fe e di S^- da cui la nomenclatura e la classificazione $[\text{nFemS}]^{\text{q}+}$, dove n e m indicano il numero di ioni Fe e S^- organizzati in una pseudoparticella con carica q, dipendente dallo stato di ossidazione del Fe (2 o 3) e dal numero di ioni presenti (lo S è sempre considerato S^-).

Questa pseudoparticella si inserisce nella proteina coordinando sempre e solo Cys della proteina, quindi i leganti del ferro, sono sempre S, siano essi cisteinati o S^- ; essendo lo S un atomo piuttosto grande, il ferro non è esacordinato ma tetracoordinato tetraedrico.

Gli orbitali del ferro sono separati in maniera opposta rispetto alla coordinazione ottaedrica, con campo basso: questo porta sempre a situazioni di Fe high spin.



La determinazione del tipo di proteina Fe/S è possibile grazie ad esperimenti di "core extrusion": la proteina viene infatti denaturata in presenza di un agente con gruppi tiolato che possano competere con le Cys per il legame del centro Fe/S. Si può quindi andare a determinare la quantità di Fe e di S presenti e quindi il tipo di proteina: se non sono presenti S^- si ha rubredossina, altrimenti ferredossina.

La rubredossina, infatti, è una proteina **[1Fe0S]^{+2/+3}**, con un atomo di ferro coordinato da 4 Cys in una conformazione tetraedrica.

Le proteine **[2Fe2S]** possono (teoricamente) avere tre stati: 0/+1/+2. Tuttavia queste proteine trasportano un solo elettrone e si ritrovano solo come +1 e +2, cioè con Fe^{2+}/Fe^{3+} o Fe^{3+}/Fe^{3+} ; lo ione S^- fa da legante μ a ponte su due Fe, usando due dei suoi quattro doppietti per coordinare due atomi di Fe. I quattro atomi si trovano su di un piano e le quattro Cys su di un piano perpendicolare a questo.

Le **[4Fe4S]** potrebbero avere 5 possibili cariche:

$$4S^- (-8) + 4 Fe^{2+} (+8) + 0 Fe^{3+} (+0) = 0$$

$$4S^- (-8) + 3 Fe^{2+} (+6) + 1 Fe^{3+} (+3) = 1$$

$$4S^- (-8) + 2 Fe^{2+} (+4) + 2 Fe^{3+} (+6) = 2$$

$$4S^- (-8) + 1 Fe^{2+} (+2) + 3 Fe^{3+} (+9) = 3$$

$$4S^- (-8) + 0 Fe^{2+} (+0) + 4 Fe^{3+} (+12) = 4$$

Gli stati 0 e +4 non sono mai osservati, mentre gli stati +1, +2 e +3 sono visti in due famiglie differenti:

- Ferredossine normali : $[4Fe4S]^{+1/+2}$

- HiPIP (High Potential Iron Proteins) : $[4Fe4S]^{+2/+3}$; queste proteine lavorano a +350mV (tutte le altre lavorano a -400mV, tranne i centri Rieske del complesso bc_1 della catena respiratoria a +280mV).

In queste proteine il centro FeS è un cubo in cui ogni S^- usa tre doppietti (μ^3) e lega tre atomi di Fe; ogni Fe coordina tre S^- e una Cys, quindi nel sito attivo ci sono 4 Cys.

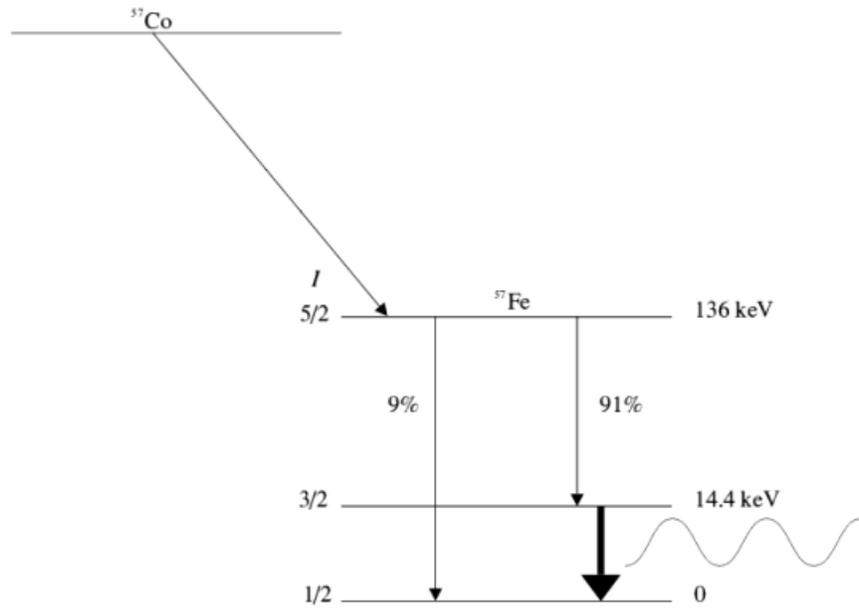
In realtà per calcolare la corretta carica di queste proteine si dovrebbero contare anche gli ioni cisteinato che, ad esempio nelle 4Fe4S danno un contributo -4 alla carica (l'indicazione corretta è $[Fe_n S_m (S-Cys)_p]^q$).

Per studiare queste proteine è utile avvalersi della spettroscopia Mössbauer. Questa è un tipo di spettroscopia che utilizza radiazioni a λ compatibile con i livelli energetici nucleari, cioè radiazioni γ . La spettroscopia Mössbauer non è applicabile a tutti i nuclei perché occorre utilizzare un'appropriata sorgente γ emittente, quindi si necessita di un isotopo radioattivo dell'elemento da sondare.

Per quanto riguarda il Fe, si può utilizzare il ^{57}Co che per cattura elettronica¹ decade, con $t_{1/2}$ di circa 270 gg, a $^{57}Fe^*$, uno stato metastabile ad alta energia; questo può rapidamente ($t_{1/2} = 99.3$ ns) decadere ad uno stato metastabile ad energia minore (nella maggior parte dei casi), che poi decade a ^{57}Fe , emettendo in questo caso radiazioni γ , oppure decadere direttamente a ^{57}Fe .

I diversi stati del ferro sono caratterizzati da numeri di spin nucleare I differenti: 5/2 per lo stato ad alta energia, 3/2 per quello intermedio e 1/2 per quello stabile.

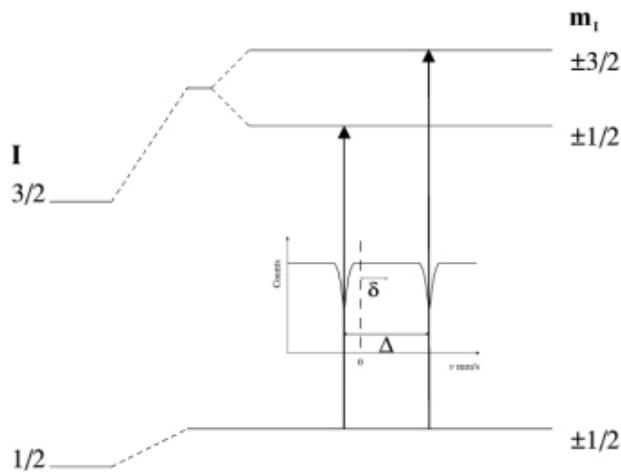
¹ Un elettrone interno si unisce ad un protone, dando così un neutrone.



Posso quindi andare ad eccitare il Fe della proteina in esame con una radiazione con energia pari al salto energetico tra lo stato stabile ed il primo metastabile; tuttavia, poiché il salto non dipende solo dal ferro, ma anche dall'intorno proteico, la sorgente di raggi γ sarà in movimento, dandò così per effetto Doppler

un'energia pari a $E = E_\gamma \left(1 + \frac{v}{c}\right)$ dove v è la velocità della sorgente e c quella della luce.

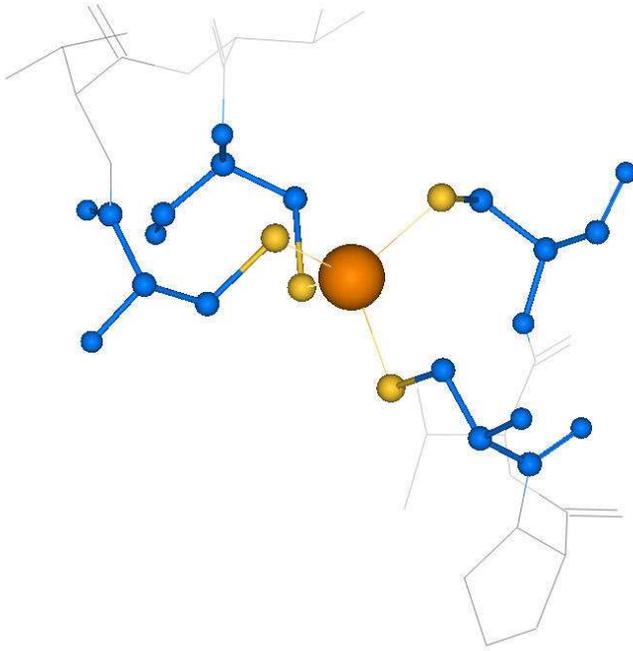
Il nucleo passerà quindi da $I=1/2$ a $I=3/2$; poiché i possibili numeri quantici di spin nucleari sono uguali a $2I+1$, nello stato a $I=1/2$ avremo 2 possibili spin ($\pm 1/2$), mentre in quello a $I=3/2$ ne avremo 4 possibili ($\pm 3/2, \pm 1/2$).



Se andiamo quindi ad eccitare una particella accoppiata, nello spettro vedrò un doppietto, dovuto ai due possibili salti (allo stato eccitato con spin $\pm 1/2$ o con spin $\pm 3/2$)

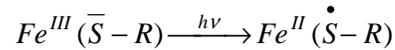
Questo tipo di analisi si rivela utile nello studio dei centri Fe-S, in quanto permette di distinguere i diversi stati di ossidazione del Fe.

- Rubredossina



Come già detto, è una proteina $[1\text{Fe0S}]^{2+/3+}$ con il ferro eccentrico rispetto all proteina e coordinato da 4 Cys, separate a coppie da due aminoacidi qualsiasi (pattern CXXC).

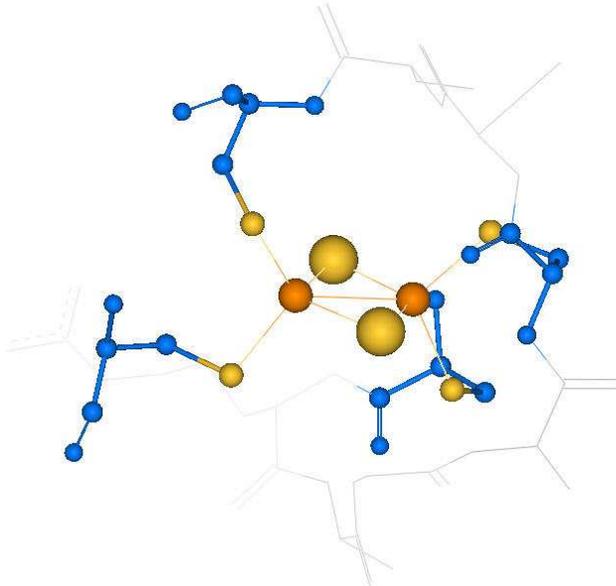
La rubredossina è incolore se ridotta (Fe^{II}), e rosso intenso se ossidata, a causa di una banda di trasferimento di carica S \rightarrow Fe. In pratica un elettrone passa dallo zolfo al ferro



assorbendo a 490 nm (cioè nel verde) e riemettendo istantaneamente.

Rubredossina

La spettroscopia Mössbauer ci permette di distinguere la Rd(Fe^{3+}) dalla Rd(Fe^{2+}), semplicemente andando a guardare la distanza fra i due picchi del doppietto: questi sono infatti separati da una distanza pari al Δ di energia tra lo spin $\pm 1/2$ e $\pm 3/2$, che è maggiore per il Fe^{2+} rispetto al Fe^{3+} . Quindi la Rd ridotta avrà picchi più ravvicinati di quella ossidata.

- Ferredossine $[2\text{Fe2S}]^{+2/+1}$ 

Le ferredossine $[2\text{Fe2S}]^{+2/+1}$ hanno 2 Fe^{3+} se ossidate, un Fe^{2+} e un Fe^{3+} se ridotte, con il Fe sempre high spin.

Nella forma ossidata sono diamagnetiche, poiché lo S a ponte favorisce l'accoppiamento antiferromagnetico (quindi entrambi gli atomi di Fe hanno 5 elettroni spaiati, ma con spin opposto), mentre nella forma ridotta hanno $S=1/2$, perché un elettrone rimane spaiato.

Ferredossina $[2\text{Fe2S}]^{+2/+1}$

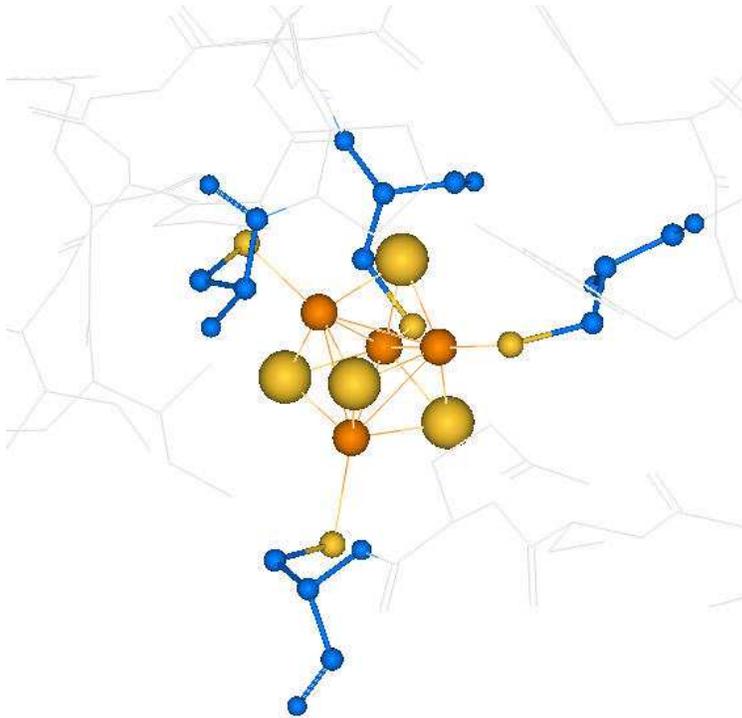
Vogliamo vedere se questo elettrone è fisso o se è delocalizzato fra i due Fe.

La spettroscopia Mössbauer ci fa vedere due picchi stretti nella forma +2, a conferma del fatto che entrambi i Fe sono +3, mentre mostra 4 picchi, due più stretti e due più larghi, nella forma +1, a conferma del fatto che c'è un Fe²⁺ e un Fe³⁺. Se però andiamo a fare una spettroscopia e.s.r. (spettroscopia di risonanza di spin elettronico), una spettroscopia simile all'NMR, che però permette di misurare il cambiamento di spin degli elettroni e lavora con radiazioni dell'ordine dei GHz (microonde), si vede che l'elettrone è delocalizzato.

Questo apparente paradosso è spiegato dal fatto che, quando si esegue un qualsiasi esperimento di spettroscopia, si possono distinguere due siti o due stati diversi solo se sono "statici", cioè se non si possono interconvertire in un tempo minore di quello necessario per l'osservazione. Ovviamente più si sale con le energie in gioco (IR, visibile, UV, Mössbauer) più l'osservazione sarà veloce.

Possiamo quindi dire che l'elettrone si muove tra i due siti con velocità intermedia fra quella di campionamento dell'e.s.r e quella della Mössbauer.

- Ferredossine [4Fe4S]^{+2/+1}



Ogni Fe è connesso a 3 S e viceversa, ed inoltre ogni Fe lega una Cys, a formare un cubo un po' deformato detto "cubano".

La forma ridotta (+1) la proteina ha 3Fe³⁺ ed 1Fe²⁺, mentre in quella ossidata (+2) ha 2Fe²⁺ e 2Fe³⁺.

Anche in questo caso, nella forma ossidata si ha accoppiamento antiferromagnetico, quindi la proteina è diamagnetica.

Ferredossina [4Fe4S]^{+2/+1}

Nella Mössbauer della proteina ossidata vedo solo due picchi, a distanza intermedia fra quella del Fe³⁺ e quella del Fe²⁺, ad indicare che gli elettroni sono delocalizzati su tutto il cluster.

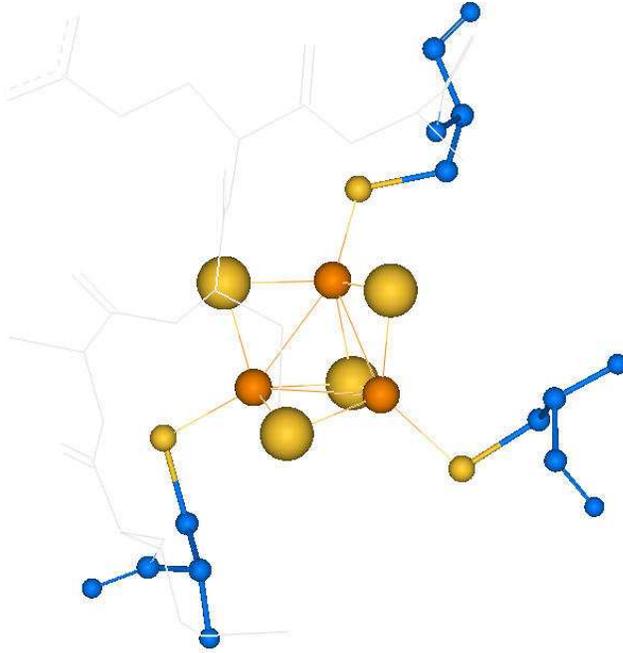
Se invece guardo la ridotta vedo due coppie di segnali (con due segnali sovrapposti che danno un unico picco ad integrale doppio). Una delle due coppie è ancora a stato di ossidazione intermedio, quindi gli elettroni sono delocalizzati, mentre l'altra corrisponde a Fe²⁺. Quindi ho 2Fe²⁺ e 2Fe^{2+/3+} delocalizzati.

Si possono inoltre creare dei composti sintetici che si possono considerare delle specie di centri Fe-S isolati, senza la proteina che dimostrano la possibilità di differenti stati di ossidazione (possono anche essere ossidati con 2 elettroni).

Si vede che andando ad ossidare il composto Fe₄S₄(SR)₄⁻ a Fe₄S₄(SR)₄⁼ e poi a Fe₄S₄(SR)₄³⁺, si allunga la distanza fra un Fe ed uno S da 2.2 Å a 2.6 Å ed il cubano si allunga a dare un parallelepipedo.

- Ferredossine [3Fe4S]^{0/+1}

Questo tipo di proteine ha dato diversi problemi nello studio, anche perché spesso i cluster 3Fe4S si trovano associati ad altri cluster, ad esempio i 4Fe4S.



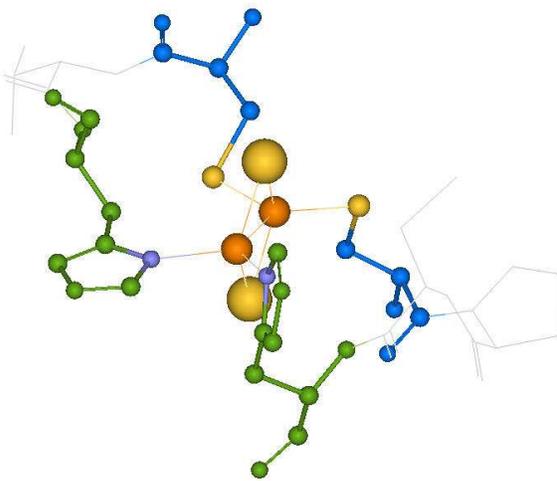
La struttura può essere considerata come quella di un centro [4Fe4S] con un ferro in meno (un cubano senza un vertice). Questi cluster, sono stati studiati soprattutto in *Desulfovibrio Gigas*: in questo caso si vede che la proteina è quadrimerica, ma in presenza di Fe i cluster diventano [4Fe4S] e la proteina cambia conformazione, e forma dei trimeri.

Ferredossina [4Fe4S]^{+2/+1}

Nella forma ossidata tutti i Fe sono Fe³⁺, come dimostra lo spettro Mössbauer che ha solo due picchi più stretti. La forma ridotta, invece, mostra due Fe³⁺ e un Fe²⁺, portando a carica totale 0: lo spettro, infatti, mostra due coppie di segnali, una corrispondente a Fe³⁺, con integrale 1 e l'altra con integrale 2 e valenza intermedia; si hanno quindi un Fe³⁺ e gli altri due con un elettrone delocalizzato.

- Altre ferredossine (complesso Rieske del bc₁ e HiPIP)

Queste ferredossine sono particolari perché lavorano a potenziali positivi: in particolare il centro Rieske a +280 mV e le HiPIP a +350 mV.



Il complesso bc₁ della catena respiratoria contiene 3 gruppi eme (due b e uno c) ed un centro [2Fe2S], detto centro Rieske, in una subunità transmembrana. Uno dei due Fe lega due Cys, l'altro 2His, portando quindi a proprietà strutturali e redox diverse dal normale.

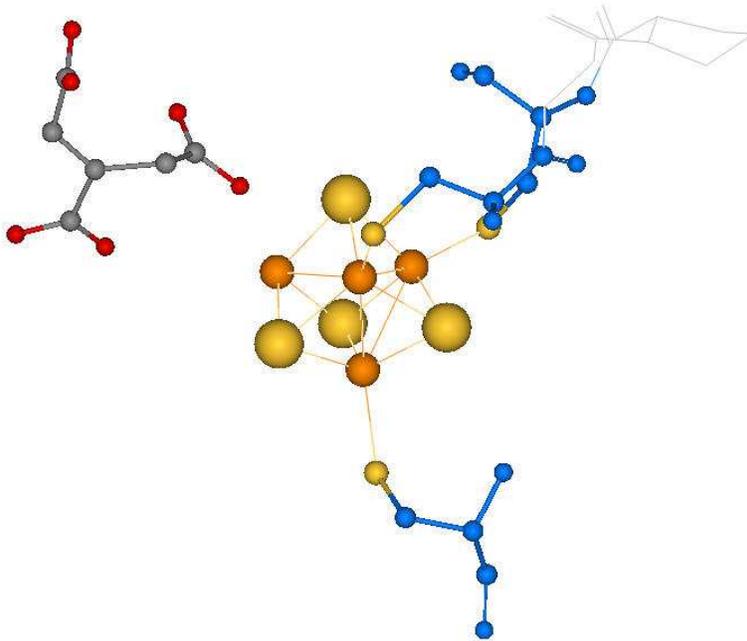
Centro Rieske del complesso bc₁

Le HiPIP (High Potential Iron-sulfur Proteins) hanno dei cluster [4Fe4S]^{+2/+3} (invece del normale +1/+2).

Il cluster è come quello delle altre [4Fe4S], con differenze però nell'intorno proteico che non è costituito da aminoacidi idrofilici, che possono "scaricare" in parte la carica, ma da aminoacidi idrofobici, che non stabilizzano una carica negativa elevata¹. Tra l'altro si può notare come nelle HiPIP il cluster sia molto meno accessibile al solvente rispetto alle altre ferredossine.

- Aconitasi

È la proteina che catalizza la conversione del citrato in isocitrato nel ciclo di Krebs.



Quando viene isolata si trova un centro [3Fe4S], ma diventa attiva solo se incubata con Fe²⁺, dopo aver formato una specie di centro [4Fe4S]. In questo caso, però, il Fe che viene incorporato, lega dei leganti labili (essenzialmente acqua), poi sostituiti dal substrato². L'assorbimento del ferro, cambia anche la conformazione della proteina, e permette il legame agli IRE (iron responsive elements), per esempio sugli mRNA dei recettori della transferrina.

Aconitasi

- Proteine contenenti rame

Il rame è un elemento biologicamente "recente" come Cu⁺⁺, rispetto alla forma Cu⁺, poco solubile e quindi poco biodisponibile; questo metallo è essenziale per l'uomo (circa 150mg totali), la sua assenza determinando diverse patologie.

Le proteine con centri di Cu hanno diverse funzioni, come il trasporto di elettroni, di ossigeno, permettono reazioni redox e di ossigenazione.

Il rame si trova come Cu⁺⁺ o Cu⁺, che prevederebbero geometria trigonale o tetraedrica per Cu⁺ e planare quadrata o pentacoordinata per Cu⁺⁺; in realtà però si trovano spesso forme distorte. Il Cu si trova solitamente coordinato direttamente agli aminoacidi della proteina (senza gruppi prostetici, come per il Fe eme) ed in sistemi a potenziali generalmente positivi.

La classificazione delle proteine contenenti rame si basa su considerazioni spettroscopiche, in particolare magnetismo, spettri UV/visibile e spettri e.s.r.

Il Cu⁰ ha configurazione 4s3d¹⁰, Cu⁺ 3d¹⁰ (perde il 4s), Cu⁺⁺ 3d⁹, quindi nel Cu⁺ non sono possibili transizioni d->d, né L->d, mentre nel Cu⁺⁺ sono possibili delle d->d molto deboli (con ε piccola) e L->d piuttosto intense.

¹ Se si considerano anche le cisteine, che sono cisteinati, si ha [4Fe4S4Cys]^{-3/-2} per le normali e [4Fe4S4Cys]^{-2/-1} per le HiPIP.

² Nelle proteine [3Fe4S] di *D. Gigas*, invece, il quarto ferro lega una Cys, come gli altri tre.

La classificazione più semplice è in proteine di tipo I, II e III, anche se sono state trovate diverse eccezioni che non rientrano in queste categorie.

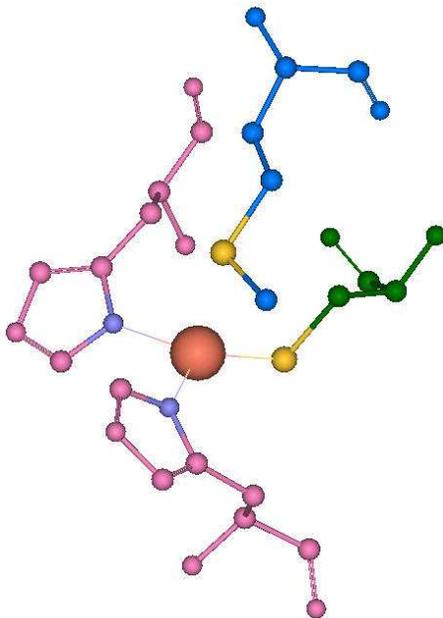
Tipo	UV/visibile	Magnetismo	e.s.r.	Centri di Cu
I (proteine blu)	Assorbimento attorno a 600nm che dà il colore blu intenso.	Sì	Spettro particolare, con A piccola.	1
II	poco intenso.	Sì	Normale, con A grande.	1
III	/	No (accoppiamento antiferromagnetico).	/	2

Gli spettri e.s.r. (che si effettuano su campioni solidi o in soluzione gelata), permettono di analizzare il comportamento degli elettroni d, andandone a cambiare lo spin. Questi sono elettroni "orientati", quindi danno segnali differenti a seconda della direzione del campo magnetico; in particolare le situazioni in cui il campo è parallelo o perpendicolare all'orbitale sono particolari.

Gli spettri così ottenuti sono piuttosto complessi e per facilitarne la lettura vengono presentati come derivata prima.

Poiché il numero di spin nucleare I del Cu è 3/2 (quindi i possibili spin sono $\pm 1/2$ e $\pm 3/2$), e questo può accoppiare con lo spin dell'elettrone, che è 1/2, nello spettro si rileverà un quartetto, con quattro picchi separati da una costante di accoppiamento, detta A, grande a meno che il Cu non sia legato in modo covalente forte al suo intorno (come nelle proteine di tipo I), nel qual caso A è piccola.

- Proteine di tipo I



Plastocianina.

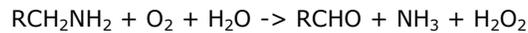
Le proteine di tipo I (ad esempio la plastocianina) hanno il centro di Cu coordinato con 2 His, 1 Cys ed 1 Met, e presentano una struttura a β -barrel, con il rame in posizione eccentrica. Sono essenzialmente scambiatori di elettroni, quindi il Cu deve passare da +2 a +1 (e viceversa) in breve tempo. La geometria di coordinazione è molto distorta, né tetraedrica né planare quadrata, con la Met spesso lontana dal centro di Cu. Questo è un esempio di stato entatico, cioè uno stato tensionato della proteina, con alta energia che comporta un $\Delta E_{attivazione}$ piuttosto basso; queste deformazioni, inoltre, fanno aumentare il potenziale redox.

Lo S è un legante soft, e forma con il metallo un legame dal carattere covalente che delocalizza gli elettroni del Cu. Ci sono due zone ben distinte della proteina, dove si legano donatore ed accettore di elettroni, collegate da un His che sta verso la superficie e dalla Cys che si affaccia nell'altra tasca, verso l'accettore.

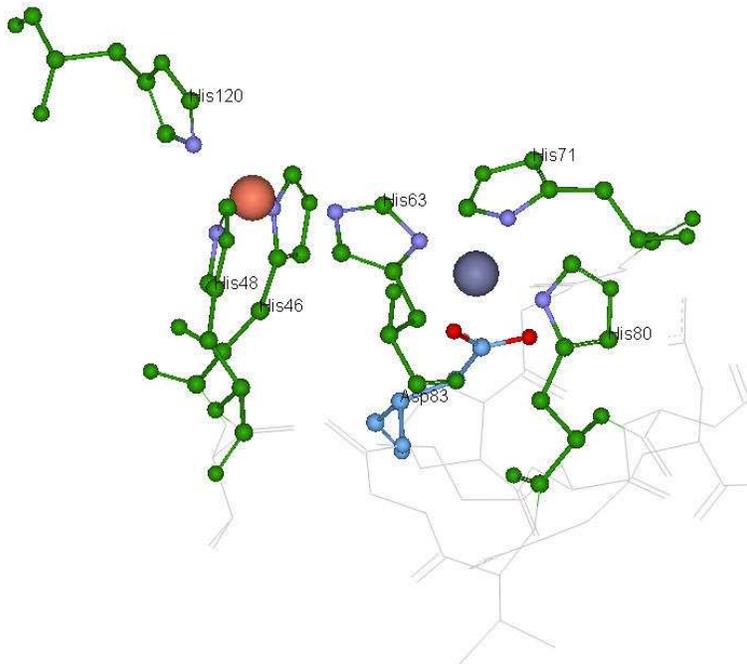
- Proteine di tipo II

Le proteine di tipo II presentano invece Cu tetra o pentacoordinato, soprattutto con His, ma a volte anche con una molecola di H₂O, labile, che può essere scambiata con il substrato; queste proteine sono infatti enzimi ad attività mono/biossigenasica, ossidasica o dismutasica, come la galattosio ossidasi che ossida il galattosio ad aldeide e H₂O₂, che presenta leganti His e Tyr.

Altre proteine di questa classe sono la dopamina β-ossigenasi che ossigena la dopamina a norepinefrina o la ammino ossidasi che catalizza la reazione



Una proteina più importante è la SOD (Cu/Zn), che catalizza: $2\text{H}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$.



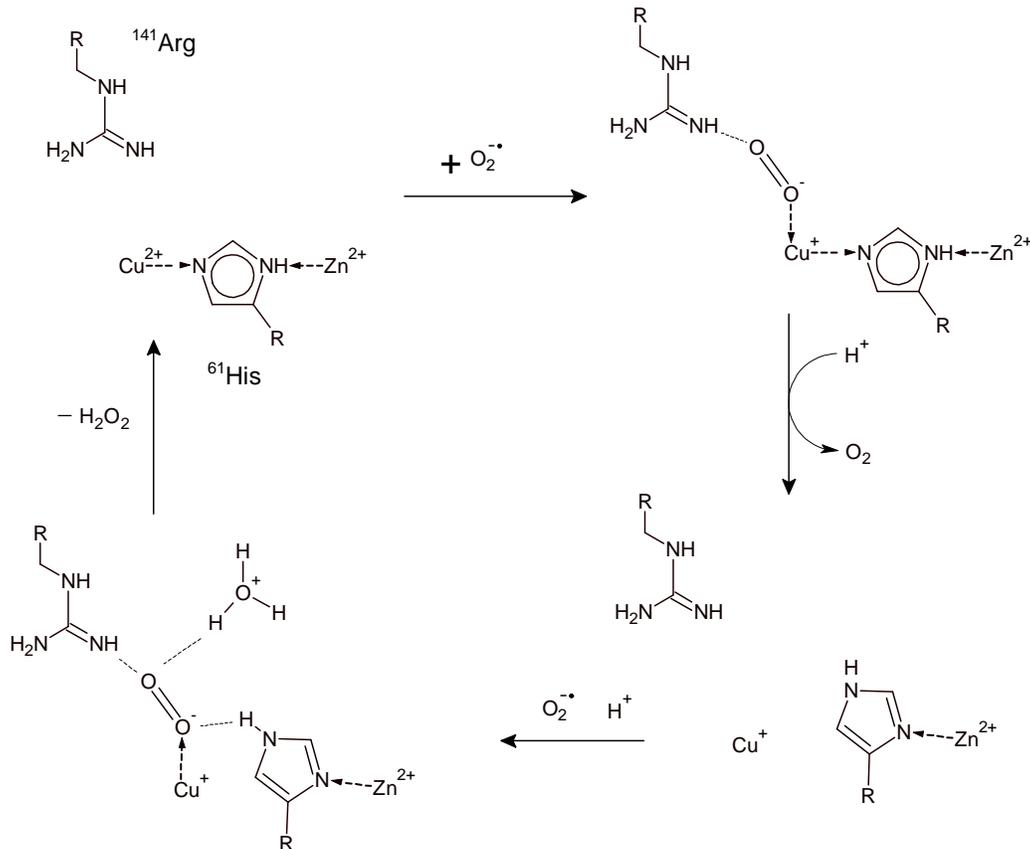
Questo enzima, dalla struttura prevalentemente a β-strand, si ritrova nel citoplasma degli eucarioti in dimeri da 2 x 16 kDa, con un Cu ed uno Zn per ogni subunità, ed è differente dalla SOD vegetale, con centri Fe e Mn. Il centro importante per l'attività catalitica è il Cu, mentre lo Zn non ha attività essenziale (può essere anche eliminato dalla proteina, riducendone solo in parte l'attività). Il Cu è pentacoordinato a piramide a base quadrata distorta con 4 His e 1 H₂O come leganti. L' His⁶³ è un istidinato a ponte tra Cu e Zn, legandoli con i due N. Lo Zn coordina 1 Asp e 3 His (1 in comune con Cu).

Superossidodismutasi.

Il Cu si trova in una tasca collegata con l'esterno da un canale ricco in Thr e Arg, idrofilici e carichi positivamente, che permettono la facile e veloce captazione e veicolazione di O₂^{•-}; una di queste Arg, è anche implicata nel ciclo catalitico.

CICLO CATALITICO:

All'inizio si ha Cu^{II} che lega $\text{O}_2^{\cdot-}$, rimanendo Cu^{I} (l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ è stabilizzato dalla ^{141}Arg).
 Il cambiamento del numero di ossidazione fa cambiare la geometria di coordinazione, facendo staccare dal Cu l'His a ponte, che prende un H^+ , dopo che il superossido è uscito come ossigeno molecolare.
 A questo punto un'altra molecola di $\text{O}_2^{\cdot-}$ prende un H^+ dall'His che torna a ponte, ed uno dal solvente diventando H_2O_2 e riossidando il Cu a +2.



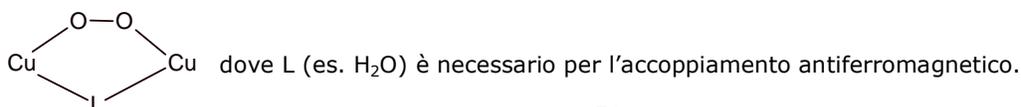
- Proteine di tipo III

Contengono due Cu legati a ponte, con accoppiamento antiferromagnetico e sono quindi diamagnetiche.

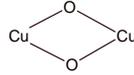
Un esempio di queste proteine è l'emocianina: questa proteina funziona da trasportatore di ossigeno in artropodi e molluschi; è un enzima extracellulare, formato da monomeri associati in oligomeri in numero non ben definito, il che ne rende difficoltoso lo studio, a causa dell'alto grado di libertà della molecola e della varietà di forme presenti (con più o meno subunità).

Nella forma desossi (o met) i due centri di Cu^{I} sono tricoordinati con 3 His; questa forma è incolore, quella ossi è blu. Lo spettro nel visibile riporta due bande a 350 e 600 nm che non dipendono dal Cu, bensì dalla presenza di O_2 e sono bande LMCT (ovviamente non ci sono nelle forme desossi e met). Poiché i due centri di Cu, dopo il legame con l'ossigeno diventano Cu^{II} , l' O_2 sarà perossidico; tuttavia la RAMAN mostra assorbimento a 750cm^{-1} , più bassa rispetto ai normali 850cm^{-1} del perossido.

Facendo esperimenti con ^{16}O - ^{18}O si vede che il legame è asimmetrico: all'inizio si era pensato ad una situazione quale :



L, tuttavia, non è mai stato definito, quindi si è pensato ad una situazione con legame $\mu:\eta_2-\eta_2$:

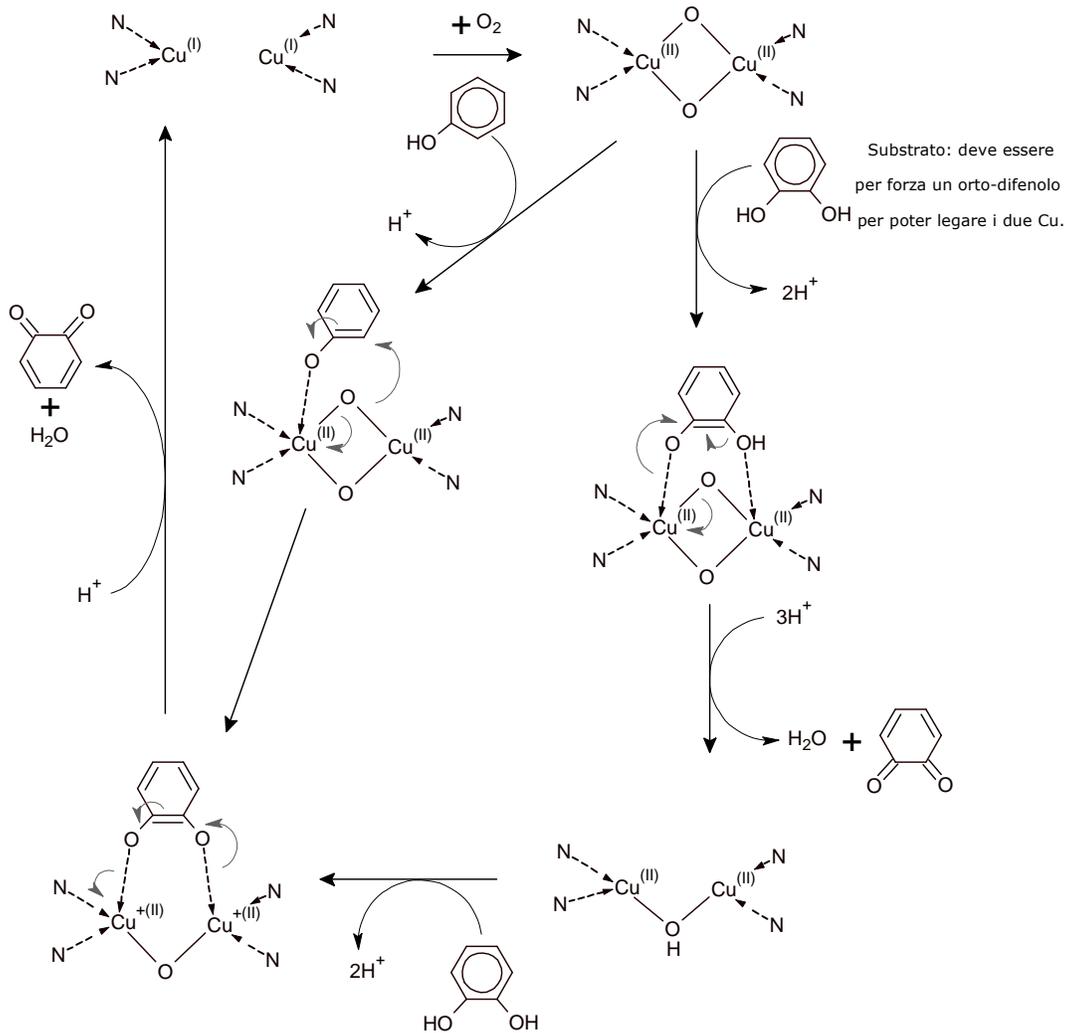


Questa ipotesi fu verificata (prima di avere la struttura RX) con piccole molecole con centri di Cu molto simili a quelli dell'emocianina e spettri UV/vis e RAMAN molto simili, di cui era facile ottenere spettri RX. Si vede che in realtà il legame O-O c'è ancora, ma molto *allentato* il che spiega la diminuita frequenza di stretching. La situazione è però particolare, in quanto l'ossigeno può staccarsi in modo assolutamente reversibile dalla molecola, tornando alla situazione originaria e senza modificare in modo particolare la conformazione. L'aggregazione in oligomeri è dovuta probabilmente alla necessità di diminuire la pressione osmotica.

Un'altra proteina di questa classe è la tirosinasi: questo è un enzima coinvolto, assieme a molti altri sistemi con Cu, in processi di sintesi di molecole complesse. La tirosinasi ha come substrato molecole mono o polifenoliche ed è coinvolta nell'ossidazione di Tyr a DOPA e successive ossidazioni, ad esempio fino a melanina. Nei sistemi vegetali è invece coinvolta nei processi di "browning" (ossidazione all'aria).

Non ci sono strutture RX, ma si sa che il sito attivo è simile a quello dell'emocianina, in quanto gli spettri UV e RAMAN sono simili sia per le forme ossi che per le desossi: possiamo quindi dire che l'ossigeno si lega in maniera simile. Il sito attivo, tuttavia, è più aperto di quello dell'emocianina: infatti molecole come F^- o N_3^- entrano in entrambi i siti, mentre composti più grandi entrano solo nella tirosinasi.

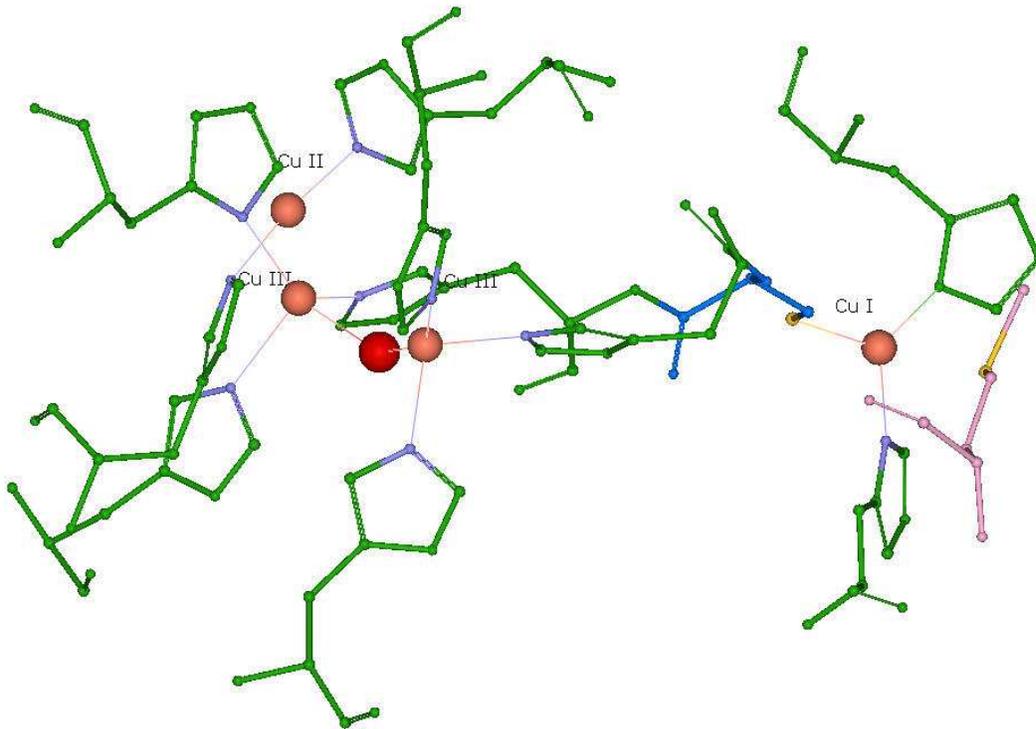
CICLO CATALITICO:



Ossidasi blu (proteine multirame)

Sono proteine che non rientrano nelle classi precedenti, poiché contengono più centri di rame I, II e III. Ad esempio ci sono le laccasi (1 Cu I, 1 Cu II ed 1 Cu III) e l'ascorbato ossidasi (due cluster Cu I, Cu II, Cu III), che derivano da vegetali, e la ceruloplasmina (2 Cu I, 1 Cu II e 1 Cu III) di origine animale. Sono proteine con attività ossidasica e, contenendo un centro di Cu I, sono blu. La presenza dei vari centri di rame si visualizza con e.s.r : lo spettro mostra il tipico quartetto che però deriva dalla somma dei quartetti a diversa ampiezza dei centri di tipo I e II.

L'ascorbato ossidasi è un dimero, costituito principalmente da β -strand, con i 4 Cu (il tipo III ha 2 Cu) posizionati in modo che uno sia isolato e gli altri tre formino un cluster. Tra i due Cu III c'è un OH a ponte, che li avvicina spazialmente; nel cluster troviamo anche il Cu di tipo II, mentre quello isolato è il Cu I.



Ascorbato ossidasi.

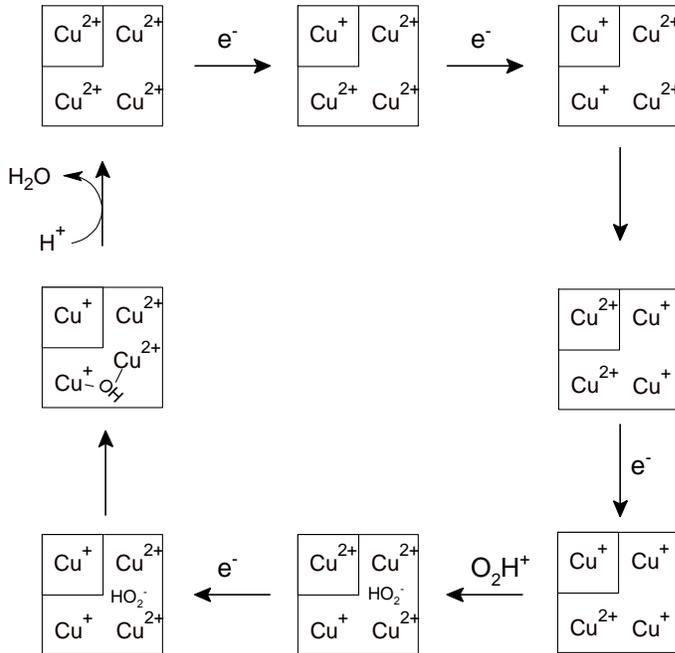
Il Cu I è coordinato da due His una Cys ed una Met, il Cu II da due His e il Cu III da 3 His per ogni Cu più l'O a ponte.

Uno dei reagenti di questi enzimi è l'O₂ che viene ridotto, ossidando differenti substrati, come l'acido ascorbico ad acido deidroascorbico.

La laccasi, invece, avendo una tasca poco strutturata, è poco selettiva ed ossida diverse molecole (ammine, fenoli etc.): la molecola da ossidare si lega vicino al Cu I, mentre l'O₂ si lega vicino al cluster trimramico.

L'ascorbato ossidasi è prodotta da vegetali (es. zucchine, cetrioli) ed è piuttosto complessa da studiare; la laccasi, invece, è più semplice e si ottiene da piante e funghi.

CICLO CATALITICO LACCASI:



Nel ciclo catalitico della laccasi si ha come prima cosa l'accumulo di elettroni su centri di rame, passando dal Cu I al cluster triramico (Cu II e III). Quando sono stati accumulati sufficienti elettroni, l'O₂ si può legare come idroperossido (HO₂⁻), per poi uscire come H₂O.

Sono anche stati eseguiti alcuni studi con molecole sonda (come N₃⁻ e F⁻), soprattutto per lo studio del cluster, visto che il Cu I è già tetracoordinato. Andando ad analizzare i diversi leganti del Cu si vede che la Cys, nella sequenza primaria, segue ed è preceduta da 2 His che legano il Cu III: questo dimostra quindi l'esistenza di una ben precisa connessione strutturale che permette il passaggio di elettroni.

- Ceruloplasmina

E' una proteina serica, molto abbondante (seconda dopo l'albumina) con due funzioni principali:

- storage di Cu
- attività ferrossidasi (Fe²⁺ -> Fe³⁺).

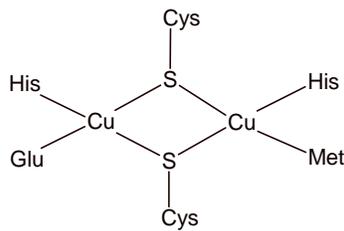
Ha una struttura primaria molto complessa, formata da sei domini, contenenti quattro Cu come nella laccasi, oltre a 2 (o 3) altri centri di Cu: questi due centri in più hanno caratteristiche di Cu di tipo I, ma uno dei due è sempre ridotto e non ha quindi attività redox, mentre l'altro sembra essere un centro "di salvataggio" in caso di problemi sugli altri centri. Questa proteina è indispensabile sia per il metabolismo del ferro che per il mantenimento del rame. Una proteina molto simile, con funzioni analoghe è anche FET 3.

- Citocromo c ossidasi

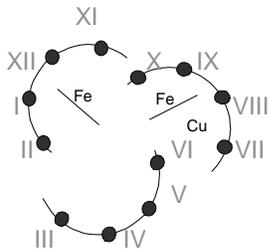
E' l'ultimo enzima della catena respiratoria, che passa gli elettroni all'O₂, riducendolo ad acqua e pompa protoni verso l'esterno della membrana. Recentemente sono state fatte due strutture RX: quella di una CcO batterica e quella della CcO mitocondriale di bue.

La proteina è costituita da 4 a 13 subunità, ed è un dimerico (4+4 o 13+13); le subunità I e II sono quelle contenenti i centri metallici, mentre le subunità accessorie sono prevalentemente ad α-elica e permettono l'ancoraggio alla membrana.

Nell'enzima batterico, la subunità II è parzialmente sovrapposta alla I, la III ha funzione di stabilizzazione ed ancoraggio, mentre la IV fa da "cerniera" per le altre. I gruppi metallici sono due Cu nella subunità II, due eme ed un Cu nella I. La prima ad accettare elettroni è la subunità II, che riceve elettroni dall'esterno, grazie al cyt_c. Questa subunità è ricca in cariche negative sulla sua superficie, il che rende possibile il corretto docking con il cyt_c, che è caratterizzato da un pI basico, e cariche positive sulla superficie.



I centri di Cu della subunità II non rientrano nella classificazione di tipo I, II o III, ma vengono detti di tipo A (sono ritrovati anche in altre proteine) e sono centri dimerici con due Cu vicini tetraordinati con due Cys a ponte e due altri ligandi (His/Met o His/Glu).



La subunità I è "immersa" nella membrana, con 12 α -eliche che attraversano la membrana, e sono disposte con angolazioni differenti a formare tre tasche, come a formare dei pori. In due di queste tasche sono presenti i due gruppi eme, con piani paralleli ai fosfolipidi e perpendicolari tra di loro; gli eme sono di tipo a, con uno dei due vinili sostituito da una lunga catena idrofobica e un fenile al posto di un CH_3 e sono definiti eme_a ed eme_{a3} . Il Fe dell' eme_a è esacoordinato (4 N eme e due His), mentre l'altro è pentacoordinato (4 N eme e una His); nella cavità dell' eme_{a3} è anche presente il Cu_B , coordinato con 3 His: questo è il sito dove si lega e viene ridotto l' O_2 .

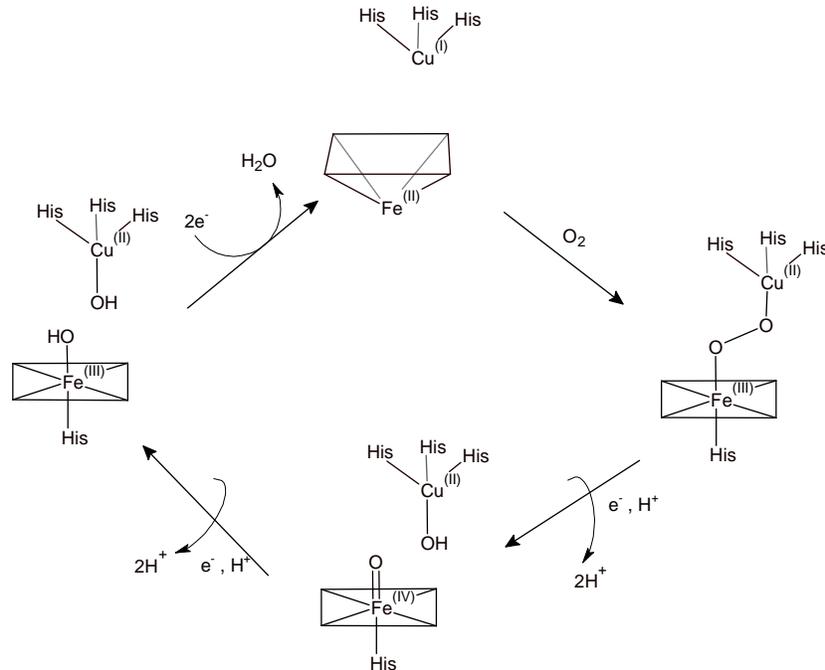
NOTA: il terzo poro è chiuso! Non è la via attraverso cui passano gli H^+ . In alcune strutture RX, inoltre, si ritrovano altri centri metallici, come Mg tra le subunità I e II, coordinato da aminoacidi di entrambe le subunità e da acqua, che faciliterebbe l'uscita dell' H_2O e degli H^+ ; a volte si trovano anche Na, Zn, Ca.

Gli elettroni che vanno sulla subunità II passano poi sull' eme_a ed in seguito sull' eme_{a3} , anche se strutturalmente (come distanze, leganti etc.) gli eme potrebbero prendere gli elettroni in modo equivalente. Probabilmente il passaggio è preferenziale per l' eme_a perché un His che coordina il Cu A della subunità II può fare ponti salini con un propionato dell'eme a che è rivolto verso l'esterno.

Inoltre due istidine che coordinano il Fe dei due eme sono vicine nella sequenza e questo potrebbe favorire il passaggio degli elettroni.

Il CuA è Cu^+ quando ridotto, a valenza mista (elettrone delocalizzato) quando ossidato.

CICLO CATALITICO:



Notare che i protoni che vengono buttati fuori per la creazione del gradiente NON sono gli stessi usati per ridurre l'ossigeno ad acqua, infatti i due "tipi" di protoni entrano da zone differenti della proteina: quelli per ridurre l'ossigeno arrivano dalla stessa parte di questo, mentre quelli che escono sono in realtà trasmessi da un aminoacido all'altro con meccanismi di protonazione e deprotonazione.

Tuttavia, esiste uno *switch* che determina se il protone debba uscire o meno: è una delle His che lega il Cu, che nella struttura 3D appare disordinata: probabilmente ha due posizioni che permettono o meno il passaggio di protoni.

Si può fare un confronto fra la cinetica del passaggio di elettroni nella CcO e nelle multirame ossidasi: in queste ultime il passaggio dal Cu I al Cu III ha una k di 200 s^{-1} attraverso 9 legami covalenti. Nella CcO, invece, i legami covalenti sono 14, oltre a 2 legami idrogeno, e ricoprono una distanza maggiore (19 \AA , contro 13 \AA); tuttavia la k è di circa $2 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$, quindi la reazione è 100 volte più efficiente, probabilmente per il diverso percorso compiuto dagli elettroni.

- Zinco proteine

Lo Zn è un metallo della prima transizione, con configurazione elettronica $4s^2d^{10}$, normalmente trovato come Zn^{2+} . Essendo d^{10} non ha particolari spettri UV, non presenta LMCT o particolari proprietà magnetiche, e per questo inizialmente non fu molto studiato, anche se poi si è visto essere molto importante in diversi processi metabolici. Spesso ha funzioni strutturali, ma anche catalitiche o co-catalitiche, con differenti tipi di coordinazione e con leganti Cys, His e Glu, principalmente: solitamente quando è catalitico si presenta tetracoordinato, con geometria tetraedrica distorta, spesso con una molecola di solvente come ligando, anche se in alcuni casi può essere pentacoordinato o esacoordinato. I leganti sono invece non labili quando lo Zn ha funzione strutturale.

Lo Zn si ritrova in praticamente ogni classe di enzimi; ad esempio è coinvolto nei processi di cicatrizzazione, e per questo vengono utilizzate pomate all'ossido di Zn per favorire questi processi. Poiché si trova solo come Zn^{2+} , non è coinvolto direttamente in processi redox o di trasporto di elettroni, tuttavia per le sue proprietà di acido di Lewis può catalizzare la formazione o la rottura di vari tipi di legami, come legami peptidici ed esterei e di catalizzare trasferimenti di H^+ o OH^- , come nell'ADH o nell'anidrase carbonica.

Lo Zn può funzionare da acido di Lewis, in particolare con l'acqua, che si deprotona facilmente per inde-

bolimento del legame O-H, formando OH^- che può dare attacchi nucleofili. La pK_a dell'acqua si abbassa tanto più, quanto più lo Zn riesce a stabilizzare l'intermedio ($\text{Zn-H}_2\text{O}^+$) che si forma (ad esempio arriva a 6 nell'anidrasi carbonica).

Si è provato a sostituire lo Zn con altri ioni con simile geometria, ma proprietà UV o magnetiche che permettano di studiarli più facilmente, come Co^{++} che è un d^7 , o il Cu^{++} che è un d^9 ; meno usati sono Mn^{++} e Cd^{++} che ha un isotopo con $I=1/2$, visibile con NMR.

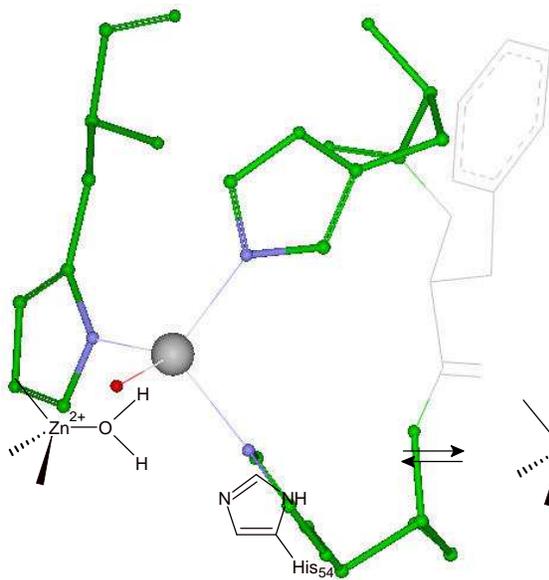
Per sostituire il metallo si denatura la proteina, si sequestra lo Zn e si rinatura, incubando con il nuovo metallo: il processo spesso diminuisce l'attività, come nell'ADH, dove la sostituzione con Co^{++} porta l'attività al 70% e con Cu^{++} addirittura all'1%, ma può anche aumentarla, come nel caso della termolisi-na, che ha attività del 200%, sostituendo il Co allo Zn.

- Anidrasi carbonica

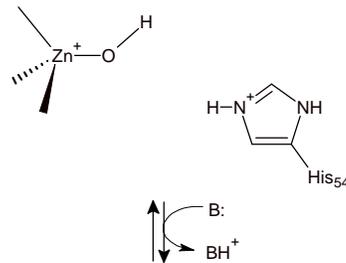
È l'enzima che catalizza la reazione $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$.

A pH fisiologico la k della reazione è 10^{-10} s^{-1} , mentre con l'AC diventa di 10^6 s^{-1} .

Esistono differenti isoenzimi con bassa omologia di sequenza al di fuori del sito attivo, che è invece molto conservato (sono state studiate quella umana e quella bovina).

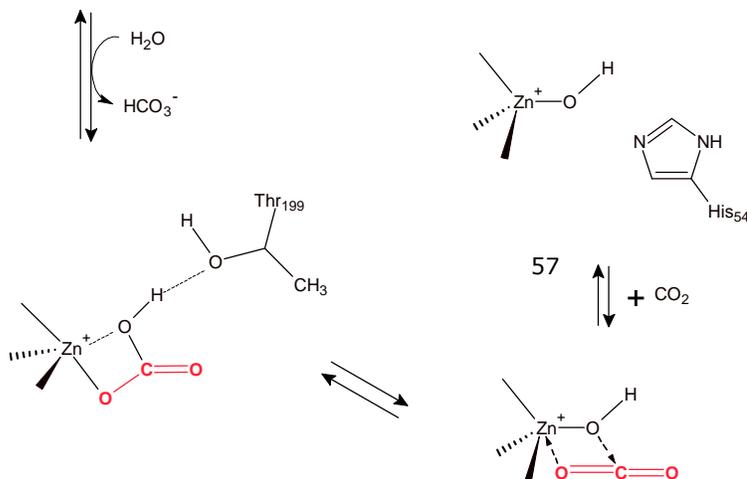


La proteina è globulare, senza particolare folding e con il sito attivo immerso profondamente in una tasca, con lo Zn coordinato da tre His e una molecola di acqua: due His (94 e 96) usano l'Ne, l'altra (119), usa invece Nd. Il legame dell'acqua è stabilizzato da altri aminoacidi (^{106}Glu e ^{199}Thr); inoltre la ^{64}His è importante nel ciclo catalitico, pur trovandosi all'esterno del sito attivo.



Sito attivo dell'anidrasi carbonica.

CICLO CATALITICO:



Il primo step è la deprotonazione dell'acqua, con protonazione della ⁶⁴His (NB: l'His è lontana, probabilmente c'è un passaggio di protoni tra varie molecole d'acqua nel sito attivo). A questo punto una base può prendere l'H⁺ dell'His. Si ha quindi l'interazione della CO₂ con l'enzima: lo Zn-OH fa da centro nucleofilo con l'OH sul C della CO₂ e da elettrofilo con lo Zn⁺ che è legato da un O dell'anidride carbonica. Si ha infine l'indebolimento del legame Zn-OH e l'uscita di HCO₃⁻.

- Carbossipeptidasi A

E' un enzima idrolitico, isolato dal pancreas di bue, di cui sono note tre forme, di una delle quali è disponibile la struttura ai raggi X. E' una proteina globulare di 34 kDa, che lavora preferenzialmente su aminoacidi idrofobici, meglio se aromatici.

Lo Zn è sito profondamente nella proteina, in una tasca con pareti costituite da aminoacidi carichi (Arg e Glu) vicino allo Zn e idrofobici nelle altre zone.

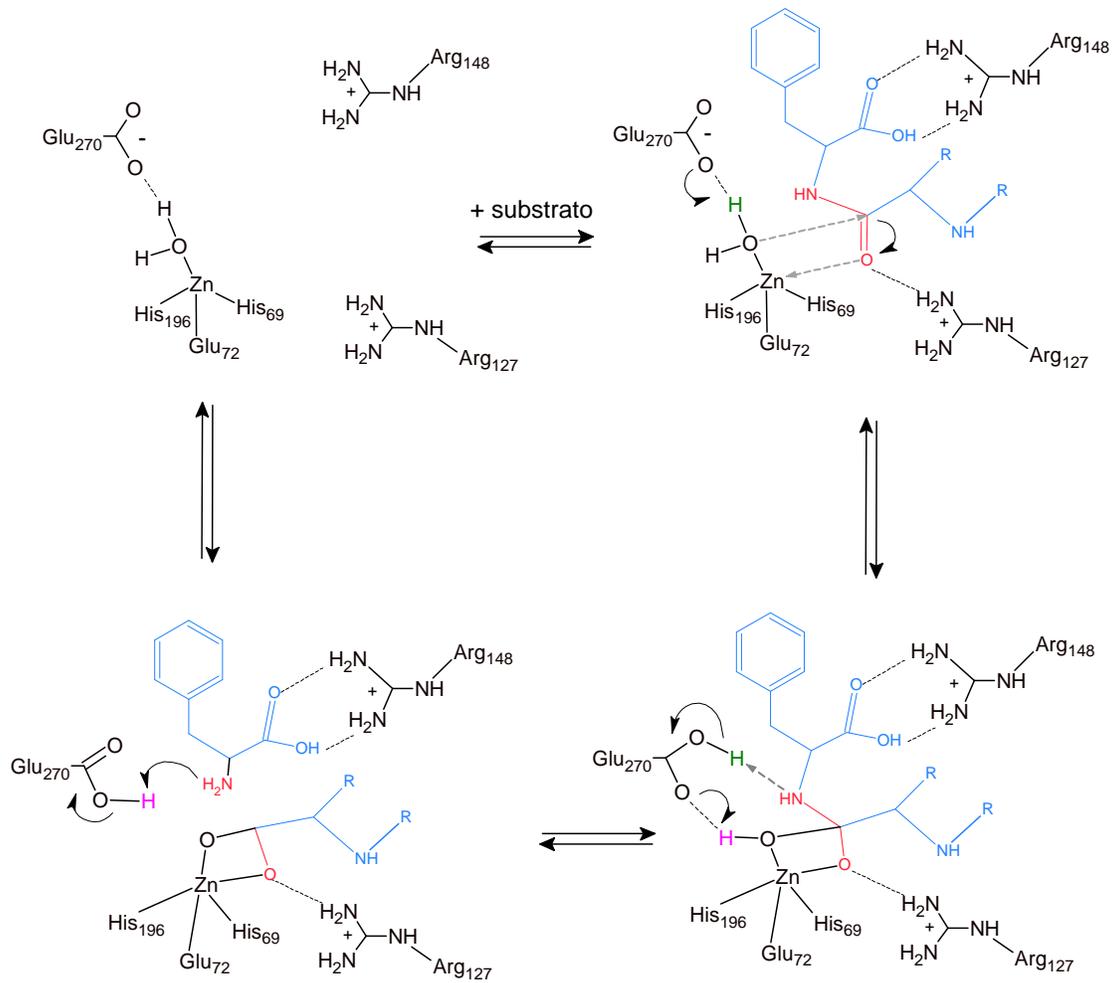
Lo Zn è coordinato da 2 His, 1 Glu bidentato ed una molecola di H₂O; il ²⁷⁰Glu è necessario per facilitare la deprotonazione dell'acqua, in quanto lo Zn è meno acido rispetto, ad esempio, a quello dell'anidrasi carbonica. L'entrata del substrato è stabilizzata dalla tasca idrofobica che favorisce il taglio su aminoacidi idrofobici e dall' ¹⁴⁵Arg che crea un ponte salino con il C-terminale del peptide.

CICLO CATALITICO

Il legame peptidico viene orientato in modo da permettere l'attacco dell'O sullo Zn e dell'OH sullo Zn verso il C del legame peptidico. (NB: il ⁷²Glu diventa monodentato quando si lega il substrato, in modo che lo Zn diventi pentacoordinato).

Un H dell'H₂O passa sul ²⁷⁰Glu che ruota in modo da essere vicino al gruppo NH del legame peptidico che viene protonato a NH₂ dopo rottura del legame e passaggio dell'altro protone dell'acqua sul ²⁷⁰Glu. Infine la Phe esce come zwitterione, prendendosi l'ultimo H⁺ del ²⁷⁰Glu.

L'importanza del Glu è stata dimostrata da studi di mutagenesi sito diretta, e vedendo che sotto pH 6 e sopra pH 9 diminuisce l'attività, per la protonazione del Glu o deprotonazione dell'acqua.



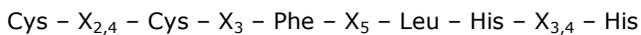
Anche in questo caso la k di velocità di idrolisi del legame peptidico, da 10^{-11} s^{-1} passa, con la carbossipeptidasi, a 10^4 s^{-1} . L'enzima, inoltre, ha anche attività esterasica.

La sostituzione dello Zn con altri metalli porta a diminuzione dell'attività peptidasi quasi sempre (tranne per la sostituzione con Co), mentre quella esterasica resta più o meno invariata.

- Zinc fingers

Sono motivi strutturali che si vengono a formare in presenza di Zn. Spesso nella stessa proteina si possono avere anche 8 o 9 Zn-fingers.

Tipicamente ci sono 2 His e 2 Cys che coordinano lo Zn, secondo il pattern :



Questo porta alla formazione di un motivo ad α -elica con le His ed uno a β -sheet con le Cys.

I vari Zn-fingers possono interagire con la *major groove* del DNA.

Queste sono i cosiddetti Zn-fingers C_2H_2 (2 Cys, 2 His), ma ne esistono anche di altri tipi, come i C_2HC , o i dimerici, con 2 Zn e 6 Cys, con 2 Cys a ponte.

- Fosfatasi alcalina

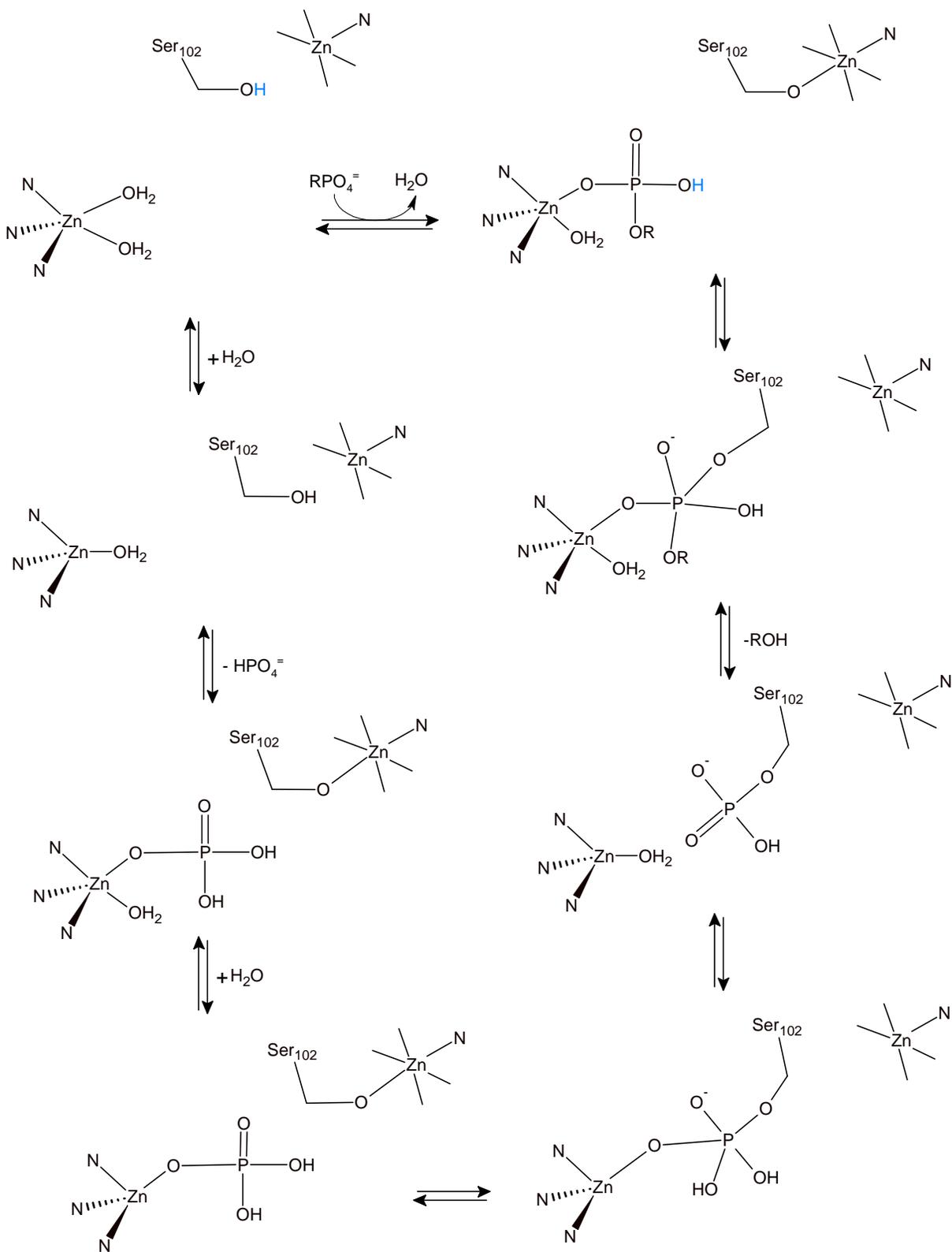
È un enzima dimerico, coinvolto nella rottura di legami fosfoesterici, in particolare di fosfomonoesteri, attiva ad un pH ottimale di 8. In una tasca dell'enzima sono presenti 2 Zn e 1 Mg, che non partecipa direttamente alla catalisi, ed ha funzione cocatalitica e strutturale. I due Zn sono uno catalitico ed uno cocatalitico, vicini nella tasca e legati da un Asp a ponte, mentre un altro Asp lega uno Zn e il Mg. Gli altri aminoacidi della tasca sono border-line (His) oltre alla ¹⁰²Ser, molto importante per il funzionamento dell'enzima, il cui ciclo catalitico non è molto chiaro.

Uno Zn sembra essere coordinato da 3 His e 2 molecole di acqua, oltre all'Asp a ponte. Ad ogni modo, sembra che ci siano diversi aminoacidi possibili donatori e non è detto che la situazione vista nel cristallo sia la stessa che in soluzione. L'altro Zn è vicino, ma non coordinato, alla ¹⁰²Ser.

CICLO CATALITICO:

Il substrato RPO_4^- si coordina al primo Zn, spostando una molecola di H_2O : questo porta ad un change conformazionale che fa legare la ¹⁰²Ser all'altro Zn. L'idrossile della Ser può quindi facilmente deprotonarsi e H^+ può andare sul fosfato. L'O della serina può ora attaccare il P, formando un intermedio a bipiramide trigonale, con il P con cinque legami.

A questo punto la seconda molecola di acqua legata allo Zn protona OR che esce come alcool, ROH. Questo fa destabilizzare il legame Zn-OP che si rompe, lasciando quindi un intermedio con la Ser fosforilata. A questo punto il fosfato si rilega al primo Zn, la Ser si stacca e si attacca all'altro Zn. Infine una molecola di acqua idrolizza il fosfato ed un'altra si va a ricollegare allo Zn.



- Alcool deidrogenasi (ADH)

E' un enzima che catalizza l'ossidazione di alcool, preferibilmente piccoli e primari, ad aldeidi, quindi ha bisogno di un cofattore (NAD^+), in quanto lo Zn non cambia stato di ossidazione.

Per la sua alta stereoselettività è spesso utilizzato nell'industria.

E' stata studiata quella di fegato di bue, un dimero 2×40 kDa, con uno Zn catalitico ed uno strutturale per ogni dominio, quello strutturale coordinato con 4 Cys, quello catalitico da 2 Cys, 1 His e H_2O .

Lo Zn catalitico è in una tasca molto profonda, dove si trova anche un dominio di legame per il NAD^+ , che si lega in modo da rivolgere la piridina verso lo Zn.

Quando è a riposo l'enzima è "aperto", con la tasca accessibile.

Il primo step è il legame del NAD^+ e quindi l'entrata del substrato ROH che lega lo Zn. A questo punto si ha un cambiamento conformazionale che fa chiudere la tasca (per impedire l'accesso all'acqua, che potrebbe idrolizzare il substrato).

L'alcool si dissocia, grazie al legame con lo Zn che lo rende più acido e il NAD^+ diventa NADH.

E' quindi possibile l'uscita dell'aldeide ed il ritorno alla situazione iniziale.

- Insulina

Anche questa proteina lega lo Zn, formando prima dimeri ed in seguito esameri (3 dimeri).

Questo fatto è sfruttato farmacologicamente per ritardare l'uptake dell'insulina, somministrandola in soluzione con Zn.

Lo Zn è in parte legato ad aminoacidi dell'insulina, in parte all'acqua.