

Metabolismo dei metalli.

Ferro e rame



ACS
Chemistry for Life®

PERIODIC TABLE OF ELEMENTS

PERIOD	GROUP 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	H Hydrogen 1.008																	He Helium 4.002
2	Li Lithium 6.94	Be Beryllium 9.012											B Boron 10.81	C Carbon 12.01	N Nitrogen 14.01	O Oxygen 16.00	F Fluorine 18.99	Ne Neon 20.18
3	Na Sodium 22.99	Mg Magnesium 24.31											Al Aluminum 26.98	Si Silicon 28.09	P Phosphorus 30.97	S Sulfur 32.06	Cl Chlorine 35.45	Ar Argon 39.95
4	K Potassium 39.10	Ca Calcium 40.08	Sc Scandium 44.96	Ti Titanium 47.88	V Vanadium 50.94	Cr Chromium 52.00	Mn Manganese 54.94	Fe Iron 55.85	Co Cobalt 58.93	Ni Nickel 58.69	Cu Copper 63.55	Zn Zinc 65.39	Ga Gallium 69.72	Ge Germanium 72.64	As Arsenic 74.92	Se Selenium 78.96	Br Bromine 79.90	Kr Krypton 83.79
5	Rb Rubidium 85.47	Sr Strontium 87.62	Y Yttrium 88.91	Zr Zirconium 91.22	Nb Niobium 92.91	Mo Molybdenum 95.96	Tc Technetium (98)	Ru Ruthenium 101.1	Rh Rhodium 102.9	Pd Palladium 106.4	Ag Silver 107.9	Cd Cadmium 112.4	In Indium 114.8	Sn Tin 118.7	Sb Antimony 121.8	Te Tellurium 127.6	I Iodine 126.9	Xe Xenon 131.3
6	Cs Cesium 132.9	Ba Barium 137.3	57-71 Lanthanides	Hf Hafnium 178.5	Ta Tantalum 180.9	W Tungsten 183.8	Re Rhenium 186.2	Os Osmium 190.2	Ir Iridium 192.2	Pt Platinum 195.1	Au Gold 197.0	Hg Mercury 200.5	Tl Thallium 204.38	Pb Lead 207.2	Bi Bismuth 208.9	Po Polonium (209)	At Astatine (210)	Rn Radon (222)
7	Fr Francium (223)	Ra Radium (226)	89-103 Actinides	Rf Rutherfordium (261)	Db Dubnium (268)	Sg Seaborgium (271)	Bh Bohrium (278)	Hs Hassium (285)	Mt Meitnerium (288)	Ds Darmstadtium (291)	Rg Roentgenium (293)	Cn Copernicium (285)	Nh Nihonium (284)	Fl Flerovium (289)	Mc Moscovium (288)	Lv Livermorium (293)	Ts Tennessine (294)	Og Oganesson (294)
	La Lanthanum 138.9	Ce Cerium 140.1	Pr Praseodymium 140.9	Nd Neodymium 144.2	Pm Promethium (145)	Sm Samarium 150.4	Eu Europium 152.0	Gd Gadolinium 157.2	Tb Terbium 158.9	Dy Dysprosium 162.5	Ho Holmium 164.9	Er Erbium 167.3	Tm Thulium 168.9	Yb Ytterbium 173.0	Lu Lutetium 175.0			
	Ac Actinium (227)	Th Thorium 232.0	Pa Protactinium 231.0	U Uranium 238.0	Np Neptunium (237)	Pu Plutonium (244)	Am Americium (243)	Cm Curium (247)	Bk Berkelium (247)	Cf Californium (251)	Es Einsteinium (252)	Fm Fermium (257)	Md Mendelevium (258)	No Nobelium (259)	Lr Lawrencium (262)			

- Alkali Metals
- Alkaline Earth Metals
- Transition Metals
- Other Metals
- Metalloids
- Non-metals
- Halogens
- Noble Gases
- Lanthanides
- Actinides

78 — Atomic Number
Pt — Symbol
Platinum — Name
195.1 — Average Atomic Mass

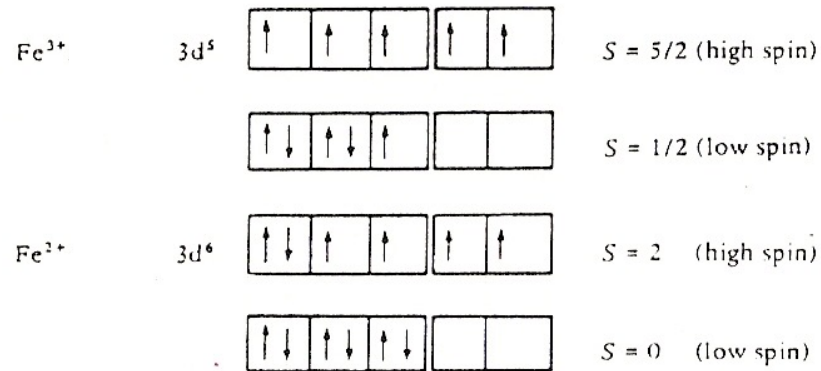
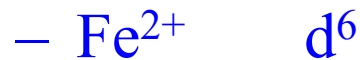
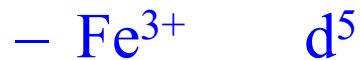
Ruolo biologico del ferro e del rame

Ferro e rame sono metalli **essenziali** per tutti gli organismi perchè sono legati a proteine indispensabili per la vita della cellula: respirazione, fotosintesi, fissazione dell'azoto, ciclo di Krebs, trasporto dell'ossigeno, sintesi di DNA, regolazione genica etc.

- Fe
 - citocromo ossidasi – proteine a **eme** (citocromi, emoglobina) – proteine con **cluster Fe-S** (catena di trasporto degli elettroni) – proteine a ferro non-eme
- Cu
 - citocromo ossidasi – superossido dismutasi – ceruloplasmina – lisil ossidasi – tirosinasi – dopamina β idrossilasi - metallotioneina

Il ferro

- In condizioni fisiologiche il ferro si trova in due stati di ossidazione:

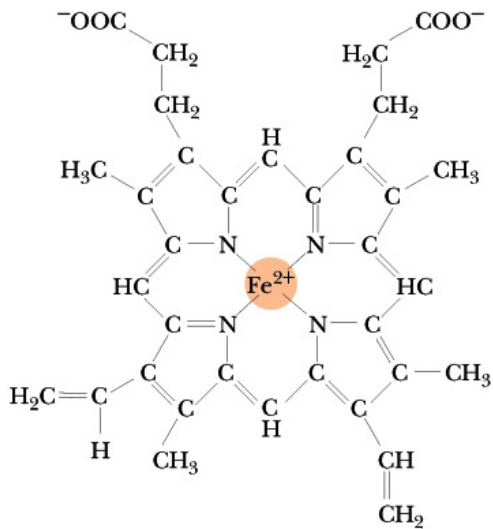


Il potenziale redox del ferro nelle proteine varia da -300 mV a +700 mV

Fe^{2+} è instabile in aerobiosi ed è rapidamente ossidato a pH 7

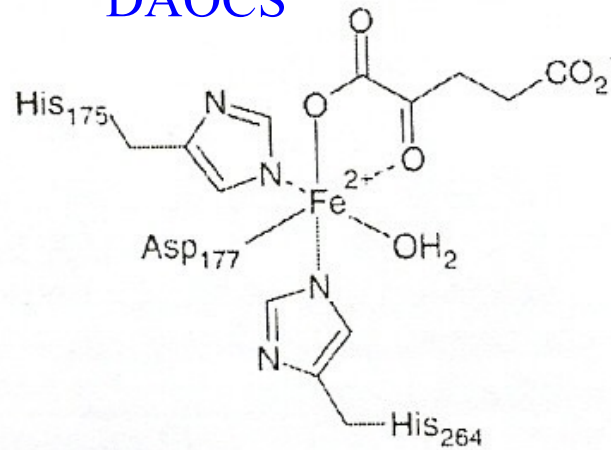
Fe^{3+} è insolubile a pH 7 (10^{-18} M)

Strutture di siti di legame del ferro nelle proteine

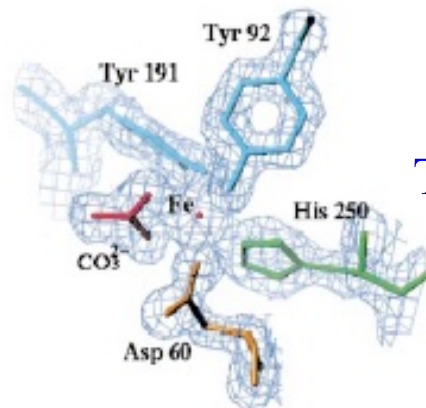
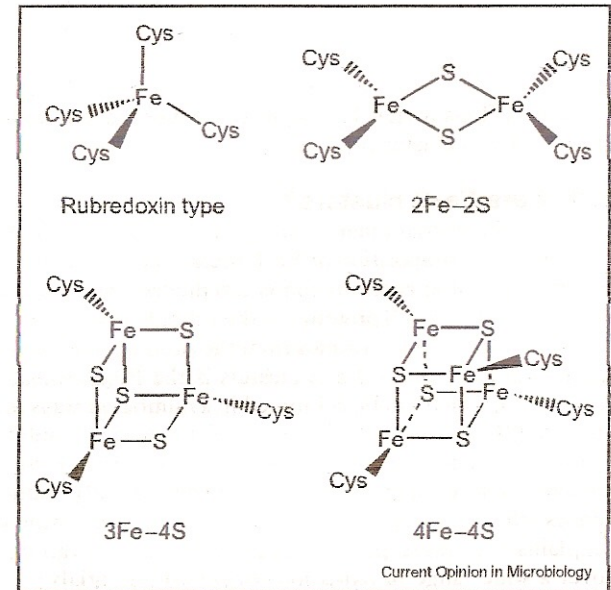


Heme
(Fe-protoporfirina IX)

DAOCS



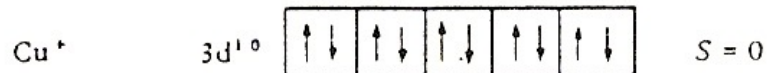
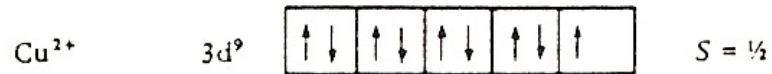
Cluster Fe-S



Transferrina

Il rame

- In condizioni fisiologiche il rame si trova in due stati di ossidazione :

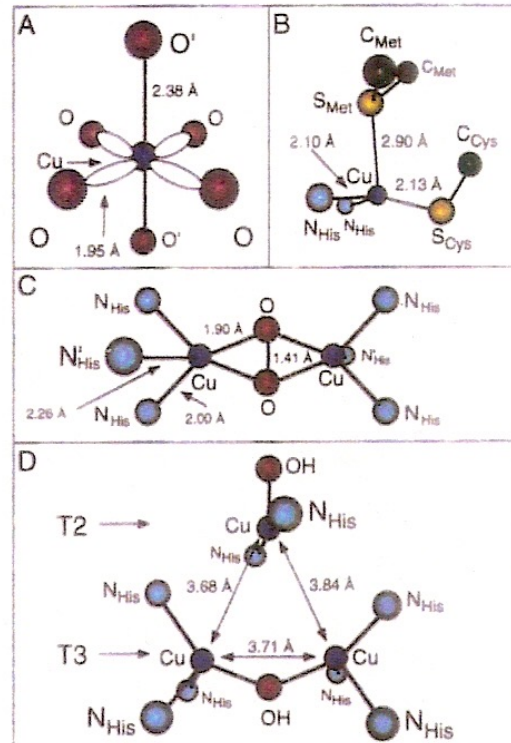
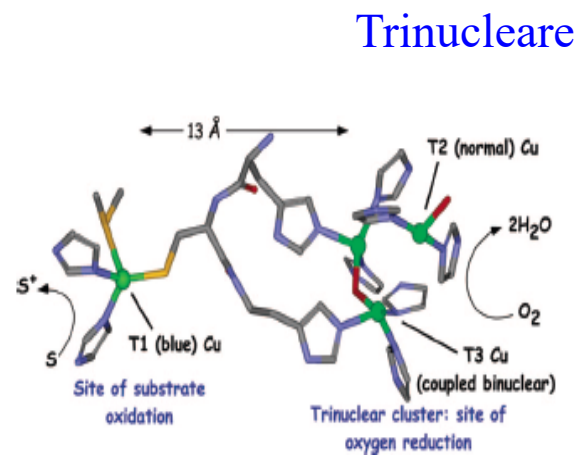
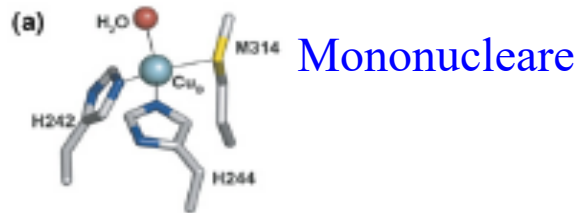


Il potenziale redox del rame nelle proteine varia da +200 mV a +750 mV

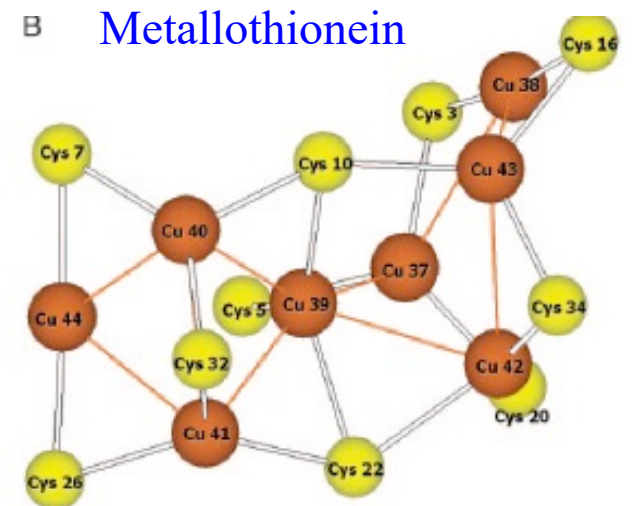
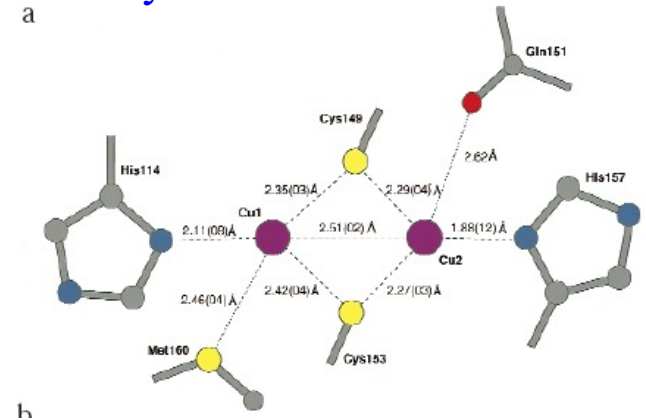
Cu^+ è instabile in aerobiosi ed è rapidamente ossidato a pH 7

Sia Cu^{2+} che Cu^+ sono solubili a pH 7

Strutture di siti di legame per il rame nelle proteine



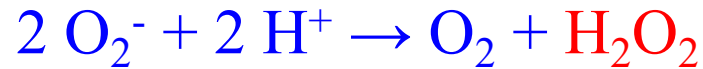
CuA cytochrome oxidase



Ruolo biologico del ferro e del rame

Ferro e rame sono **tossici** se presenti a livelli elevati e se non sono complessati a proteine perché reagiscono con O₂ generando specie reattive dell'ossigeno (ROS) che danneggiano proteine, DNA e lipidi (membrane)

Reazione di Haber-Weiss catalizzata da metalli



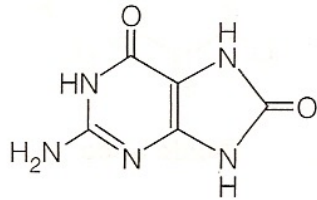
Reazioni di ossidazione catalizzate da metalli

- Proteine: modificazioni degli ammino acidi

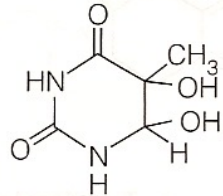
Ammino acido	Prodotto di ossidazione
Cysteine	Disulfide, cysteic acid
Methionine	Methionine sulfoxide, sulfone
Tryptophan	Hydroxytryptophan, nitrotryptophan, kynurenine
Phenylalanine	2,3-dihydroxyphenylalanine, hydroxyphenylalanine
Tyrosine	3,4 dihydroxyphenylalanine, tyrosine dimers, dinitrotyrosine
Histidine	2-oxohistidine, asparagine, aspartate
Arginine	Glutamic semialdehyde
Lysine	α -aminoadipic semialdehyde
Proline	2-pyrrolidone, hydroxyproline, glutamic semialdehyde
Threonine	2- amino- 3- ketobutirrate
Glutamate/glutamine	Oxalate, piruvate

Reazioni di ossidazione catalizzate da metalli

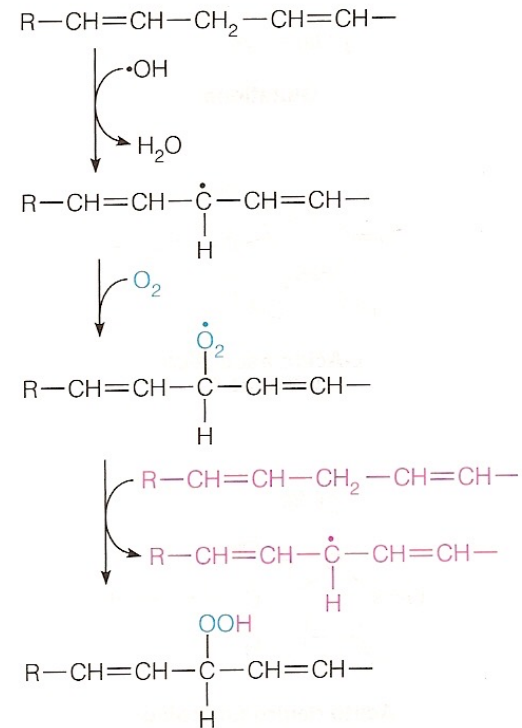
- DNA: ossidazione delle basi
- Lipidi: perossidazione



8-Ossoguanina



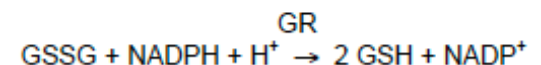
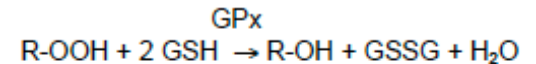
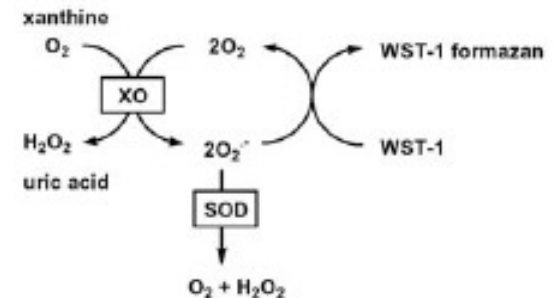
Glicole della timina



Perossidazione dei lipidi

Come si misura lo stress ossidativo?

- Indicatori di stress ossidativo
 - Enzimi antiossidanti (SOD, catalasi, perossidasi): misura dell'attività enzimatica o dei livelli di espressione
 - Antiossidanti non-enzimatici (glutathione, vitamina E)
- SOD
 - Misura spettrofotometrica a 440 nm dell'inibizione della produzione di formazano in presenza di superossido
- Catalase
 - Misura spettrofotometrica di H_2O_2 a 240 nm
- Glutathione peroxidase
 - Saggio accoppiato che misura il consumo di NADPH a 340 nm



Come si misura lo stress ossidativo?

- Misura di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto con sonde fluorescenti come DCFDA (dichlorofluorescein diacetate) o DAF (diaminofluorescein) o cromogeis come NBT (nitroblue tetrazolium)
- Saggi di misura di molecole danneggiate da stress ossidativo
 - Malondialdeide (MDA), proteine ossidate

Controllo della tossicità di ferro e rame

- Sistemi di detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)
 - Enzimatici: superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi
 - Non enzimatici: vitamine E e C, glutazione, acido uric, bilirubina ecc.
- Sistemi di riparo e proteine di deposito
 - Ferritina
 - Metallothioneina
- I meccanismi cellulari di acquisizione del ferro e del rame sono finemente regolati per mantenere adeguati livelli intracellulari di questi metalli

Trasporto del ferro in batteri

- I batteri producono **siderofori**, molecole a basso peso molecolare che chelano il Fe^{3+} ad alta affinità ($K_a > 10^{30}$ M).
- I siderofori formano complessi ottaedrici esadentati con il ferro, mediante gruppi idrossammati, α -idrossi-carbossilati o catecolati.
- La maggior parte dei siderofori è prodotta da NRPS.
- I siderofori sono internalizzati attraverso un meccanismo recettore-mediato.
- I siderofori fanno parte dei **fattori di virulenza** dei batteri patogeni.

Strutture di siderofori

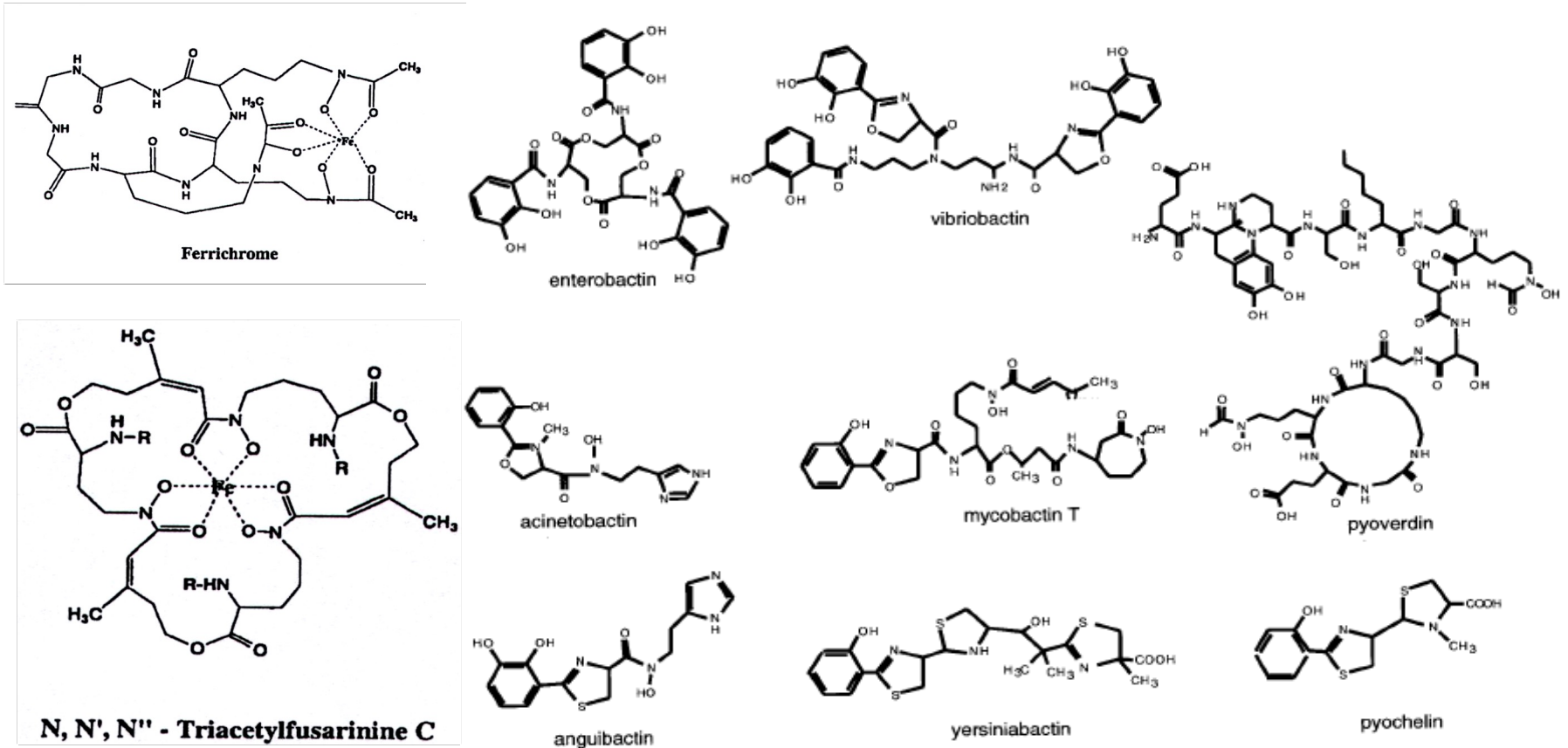
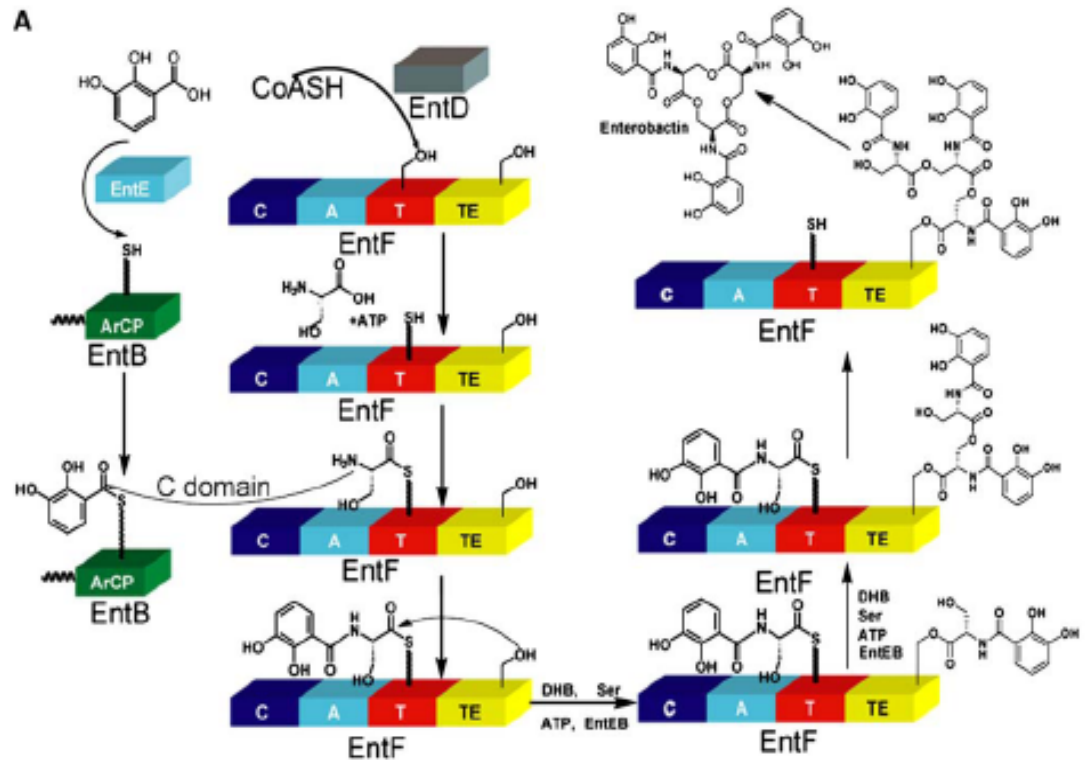
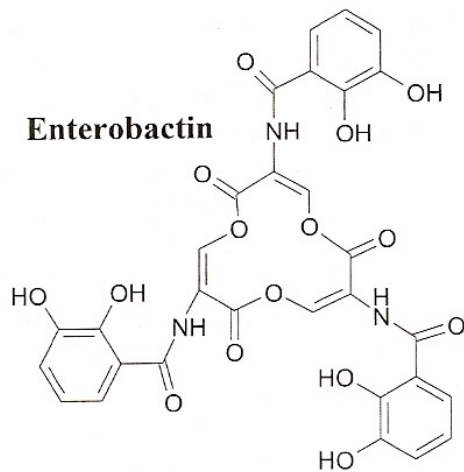


FIG. 1. Structures of various bacterial siderophores: enterobactin from *E. coli*; vibriobactin from *V. cholerae*; acinetobactin from *Acinetobacter calcoaceticus*; mycobactin T from *M. tuberculosis*; pyoverdinin and pyochelin from *P. aeruginosa*; anguibactin from *V. anguillarum*; and yersiniabactin from *Y. pestis*.

Sintesi dell'enterobactina in *E. coli*

L'enterobactina è prodotta da una NRPS a partire da acido 2,3-diidrossibenzoico (DHB) e serina. I geni EntE e EntB sintetizzano il DHB e lo trasferiscono sull'NRPS codificata dal gene EntF dove avviene la condensazione con la serina e l'assemblaggio del sideroforo.



Meccanismi di trasporto dei siderofori in batteri

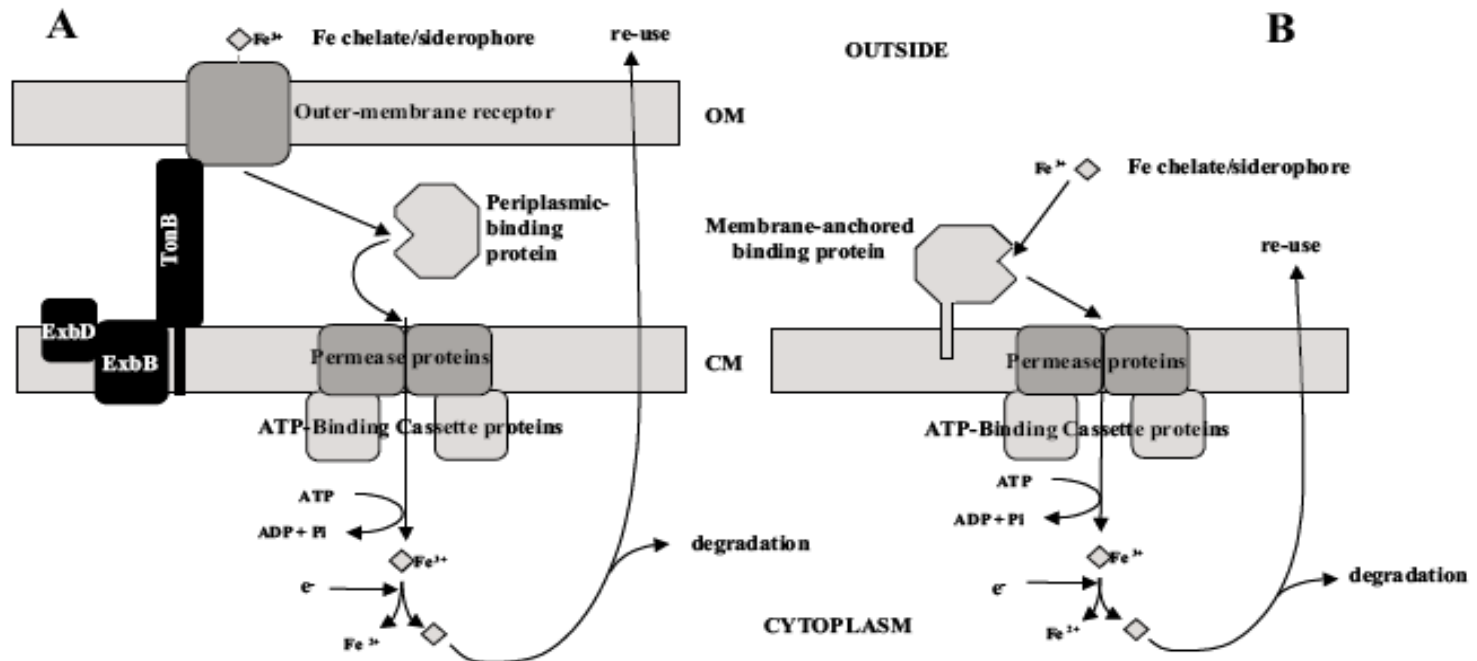


Fig. 1. Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake in Gram-negative (A) and Gram-positive (B) bacteria.

Meccanismi di trasporto dei siderofori in *E. coli*

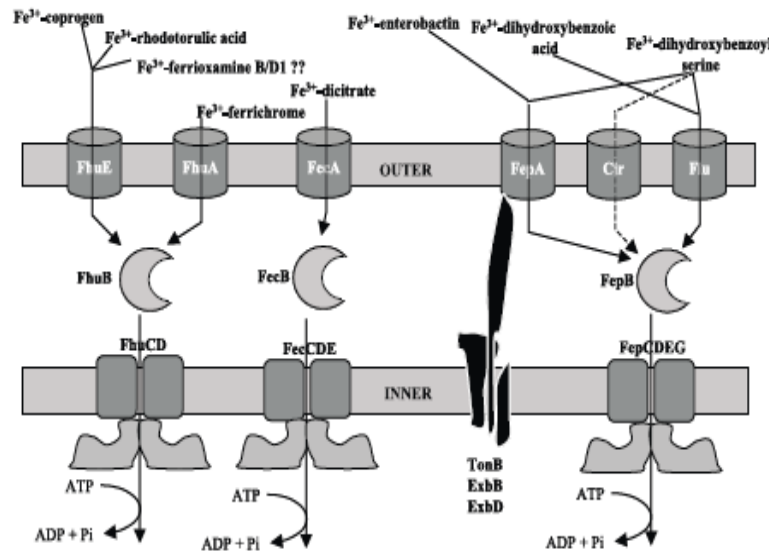


Fig. 4. Schematic representation of siderophore-mediated iron uptake systems in *E. coli* K-12. Note that the TonB-ExbB-ExbD interacts with all the OM receptors shown (not just FepA).

Sono presenti sistemi specifici per ciascun sideroforo

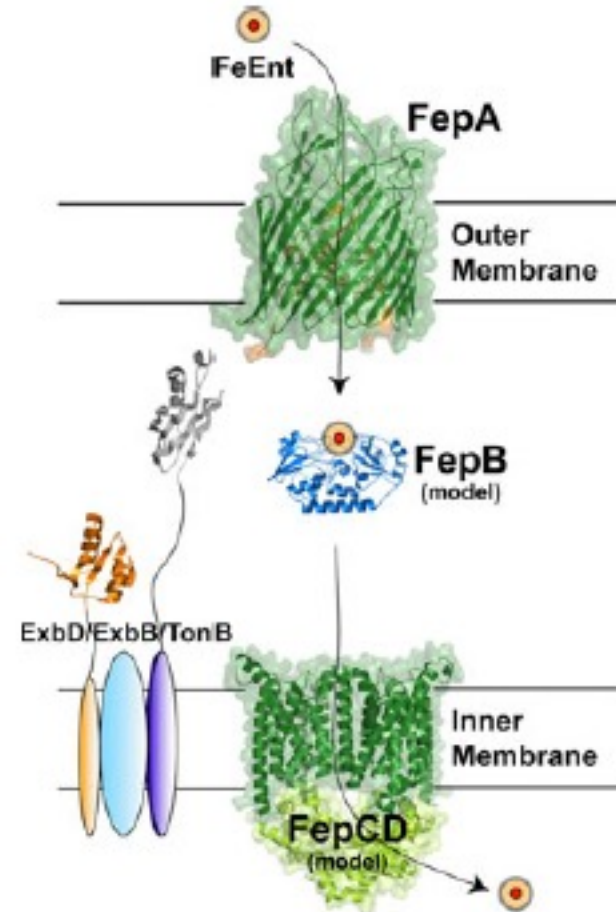


Fig. 3 A representation of the siderophore uptake pathway in *E. coli* using ferric-enterobactin (FeEnt) transport as an example (see text for details)

Trasporto del ferro in batteri.

Modello strutturale del complesso FhuA-TonB-FhuD per l'internalizzazione del ferricromo

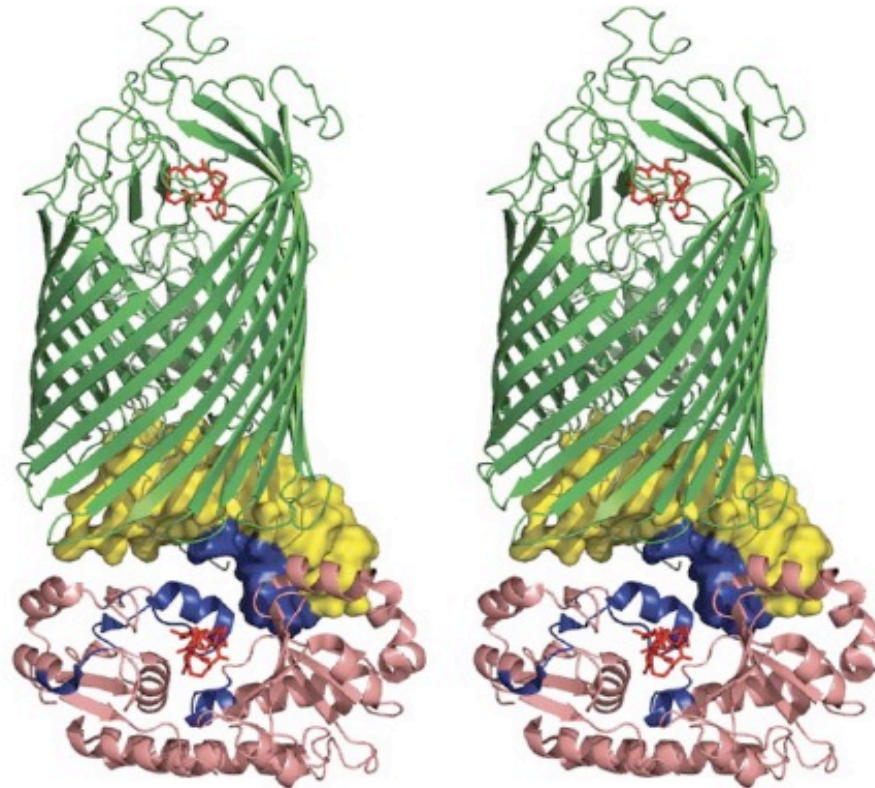


FIGURE 9. Model of a FhuA-TonB-FhuD ternary complex. Stereo image depicting a possible ternary complex between FhuA, TonB, and FhuD. FhuD (PDB code 1EFD) was manually docked under the TonB-FhuA crystal structure (PDB code 2GRX) using phage display-identified protein-protein interaction surfaces as docking constraints. Complementary phage display-identified surfaces are colored *blue* on both TonB (*yellow*, surface representation) and FhuD (*salmon*, ribbon representation). The orientation localizes the FhuD siderophore-binding site beneath the lumen of FhuA (*green*, ribbon representation). For clarity, a molecular surface is projected on TonB.

Meccanismi di trasporto del ferro in batteri

- Trasporto del Fe^{2+} : sistema feoAB
 - Indotto in anaerobiosi
- Batteri patogeni: acquisizione anche mediante recettori per ferro-proteine dell'ospite
 - Recettori per transferrina e lattoferrina
 - Recettori per l'eme

Questi recettori sono analoghi a quelli per il trasporto dei siderofori in quanto sono TonB-dipendenti e richiedono un sistema ABC-permeasi

Proteine di deposito del ferro batterioferritina e Dps

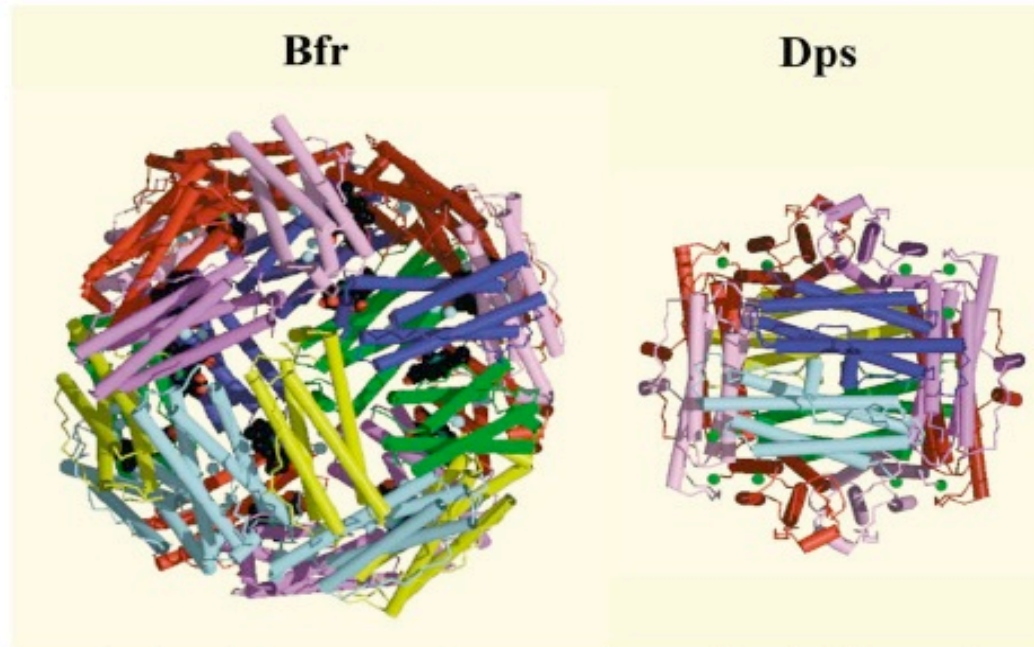


Fig. 6. Structures of the 24-meric and 12-meric iron storage proteins. Structures shown are of bacterioferritin [77] and Dps [78] from *E. coli*, and are approximately to scale. The haem groups and Mn atoms associated with Bfr are shown as black/red and blue space-filled molecules; sodium ions in the Dps structure are in green. Pictures were obtained from the Protein Data Bank [23].

Regolazione del trasporto del ferro in batteri

Il repressore Fur è un omodimero che si lega tra le sequenze -35 e -10 dei promotori dei geni regolati, a sequenze consenso

NAT(A/T)AT NAT(A/T)AT N AT(A/T)ATN

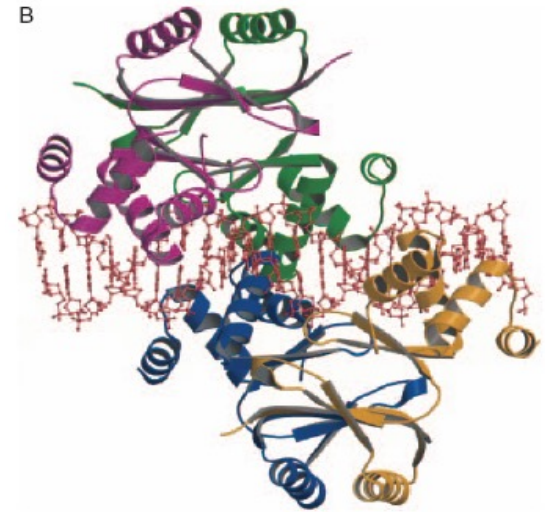
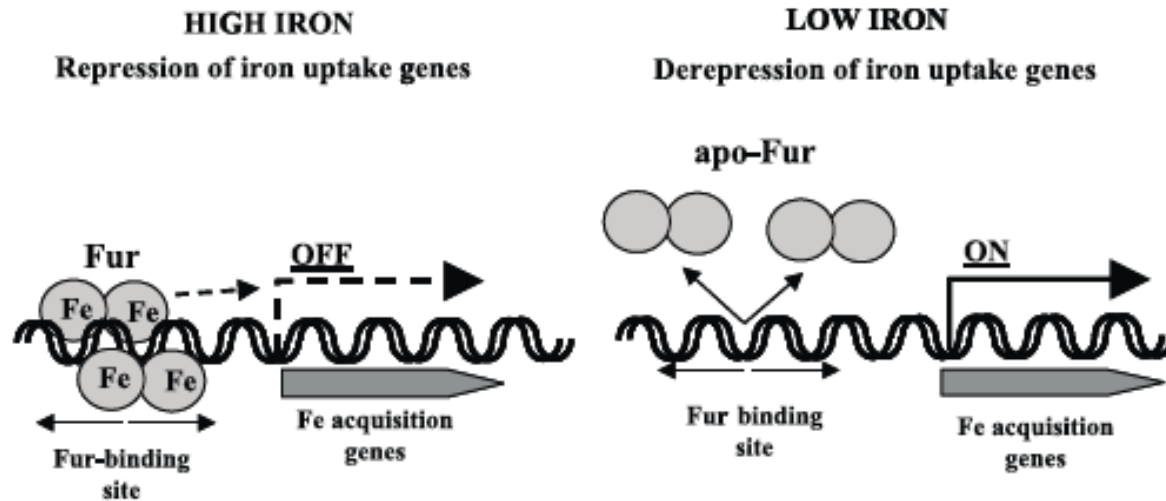
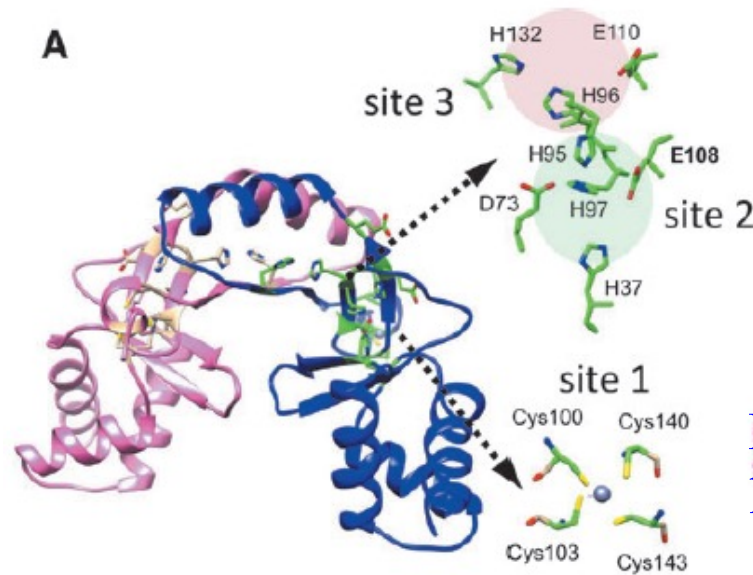


Fig. 8. Schematic representation of Fur-mediated gene repression.

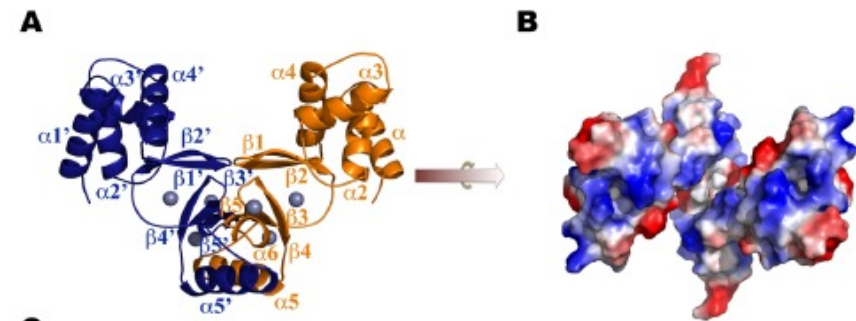
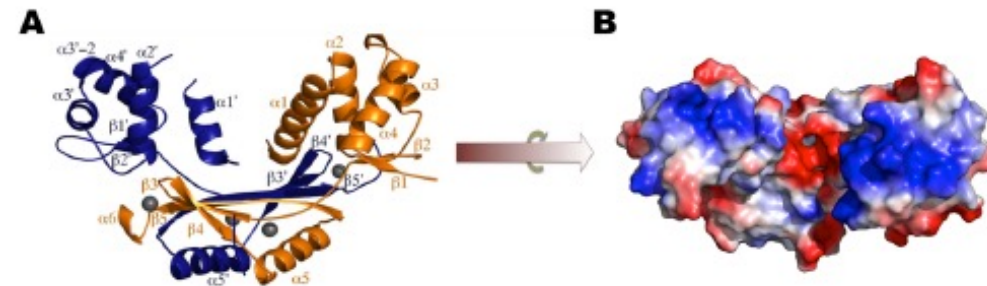
Fur possiede tre siti di legame per i metalli



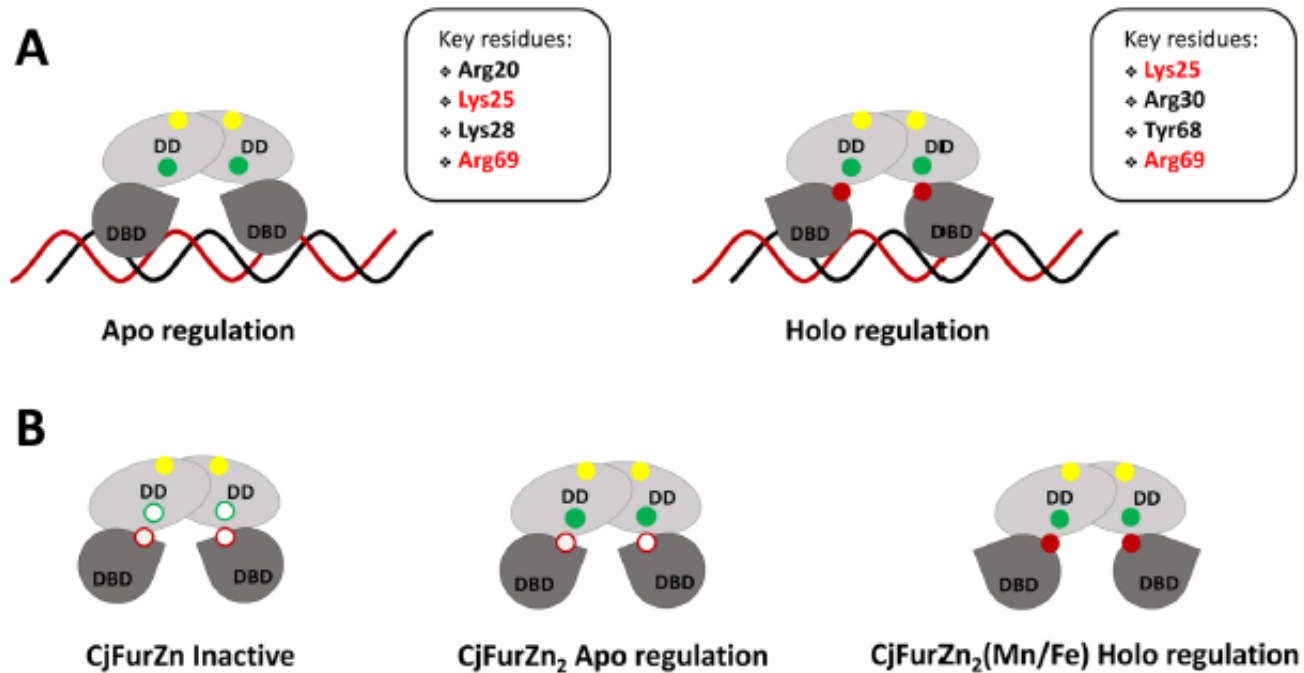
Lo Zn è necessario per la dimerizzazione

Struttura di apo-Fur

Struttura di holo-Fur



Modello della regolazione mediata da Fur



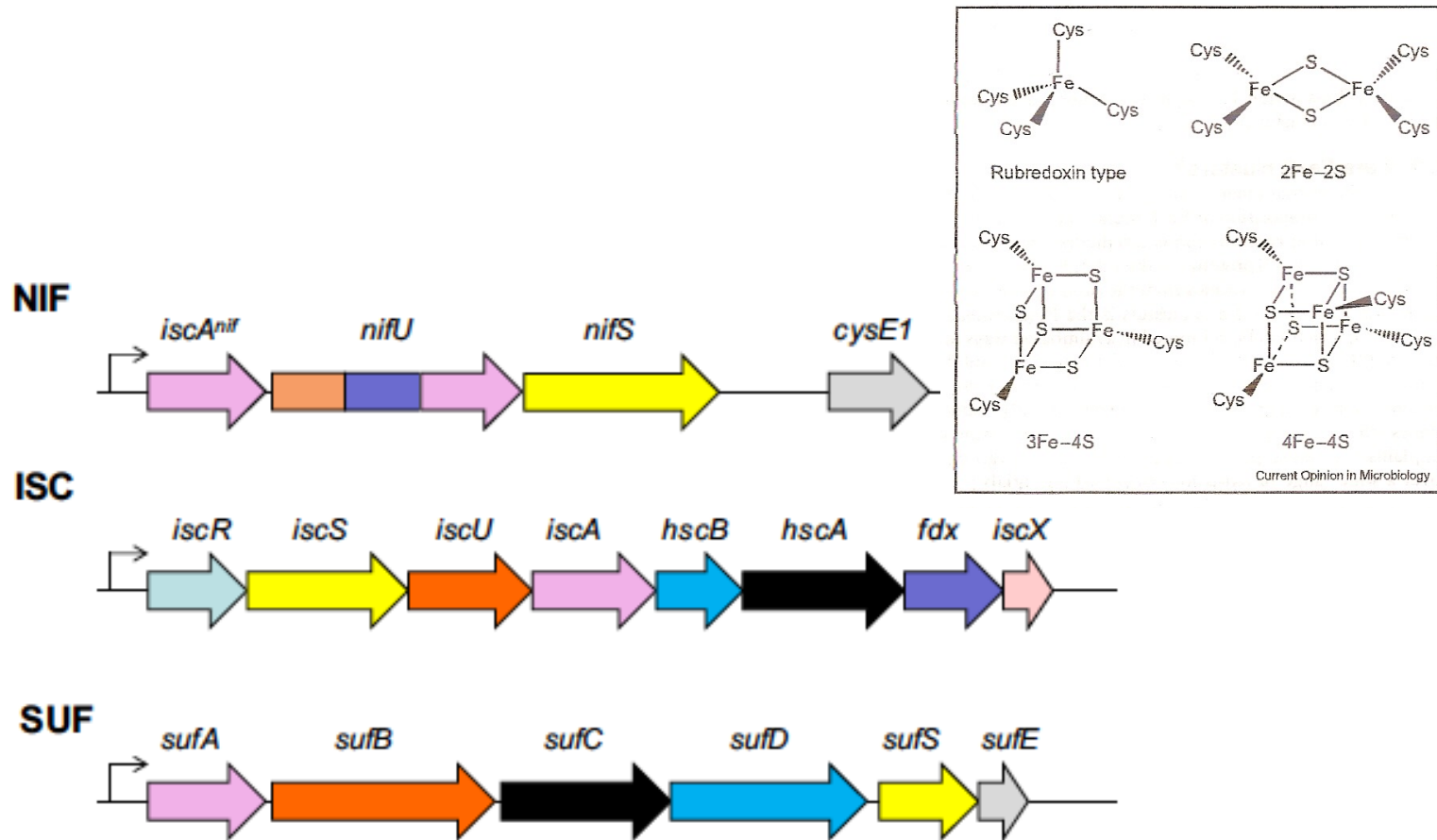
Geni regolati da Fur in *E. coli*

Table 1
Fur- and iron-regulated genes in *E. coli* K-12

Gene	Function	+/-
<i>acnA</i>	Aconitase, [Fe-S] protein	+
<i>bfd</i>	Release of iron from Bfr?	-
<i>bfr</i>	Iron storage	+
<i>cir</i>	Ferric dihydroxybenzoate uptake	-
<i>cyoA</i>	Terminal respiratory oxidase subunit	-
<i>entABCDEF</i>	Enterobactin biosynthesis	-
<i>entS</i>	Export of enterobactin	-
<i>exbBC</i>	Siderophore and vitamin B ₁₂ transport	-
<i>fecABCDE</i>	Ferric dicitrate transport	-
<i>fepA</i>	Ferri-enterobactin transport	-
<i>fepBCDEG</i>	Ferri-enterobactin transport	-
<i>fes</i>	Ferri-enterobactin utilisation	-
<i>fluABCD</i>	Ferric hydroxamate uptake	-
<i>fluE</i>	Ferric coprogen rhodotorulate uptake	-
<i>fluF</i>	Ferrioxamine utilisation	-
<i>fiu</i>	Dihydroxybenzoyl serine uptake	-
<i>flbB</i>	Motility	-
<i>ftnA</i>	Iron storage	+
<i>fumA</i>	Aerobic fumarase, [Fe-S] protein	+
<i>fumB</i>	Anaerobic fumarase, [Fe-S] protein	+
<i>fumC</i>	Non-[Fe-S] fumarase	+
<i>fur</i>	Ferric uptake regulation	-
<i>nohA</i>	Phage recombinase	-
<i>nrdHIEF</i>	Deoxyribonucleotide reductase 2	-
<i>orf78</i>	Unknown	-
<i>gpmA</i>	Glycolysis	-
<i>metH</i>	Methionine biosynthesis	-
<i>nohB</i>	Phage function	-
<i>purR</i>	Purine regulon regulation	-
<i>ryhB</i>	Small regulatory RNA	-
<i>sdhCDAB</i>	TCA cycle	+
<i>sodA</i>	Mn-superoxide dismutase	-
<i>sodB</i>	Fe-superoxide dismutase	+
<i>tonB</i>	Siderophore and vitamin B ₁₂ transport	-
<i>ygaC</i>	Unknown	-
<i>yhhY</i>	Unknown	+

'+/-' indicates induction (+) or repression (-) by the Fe²⁺-Fur complex.

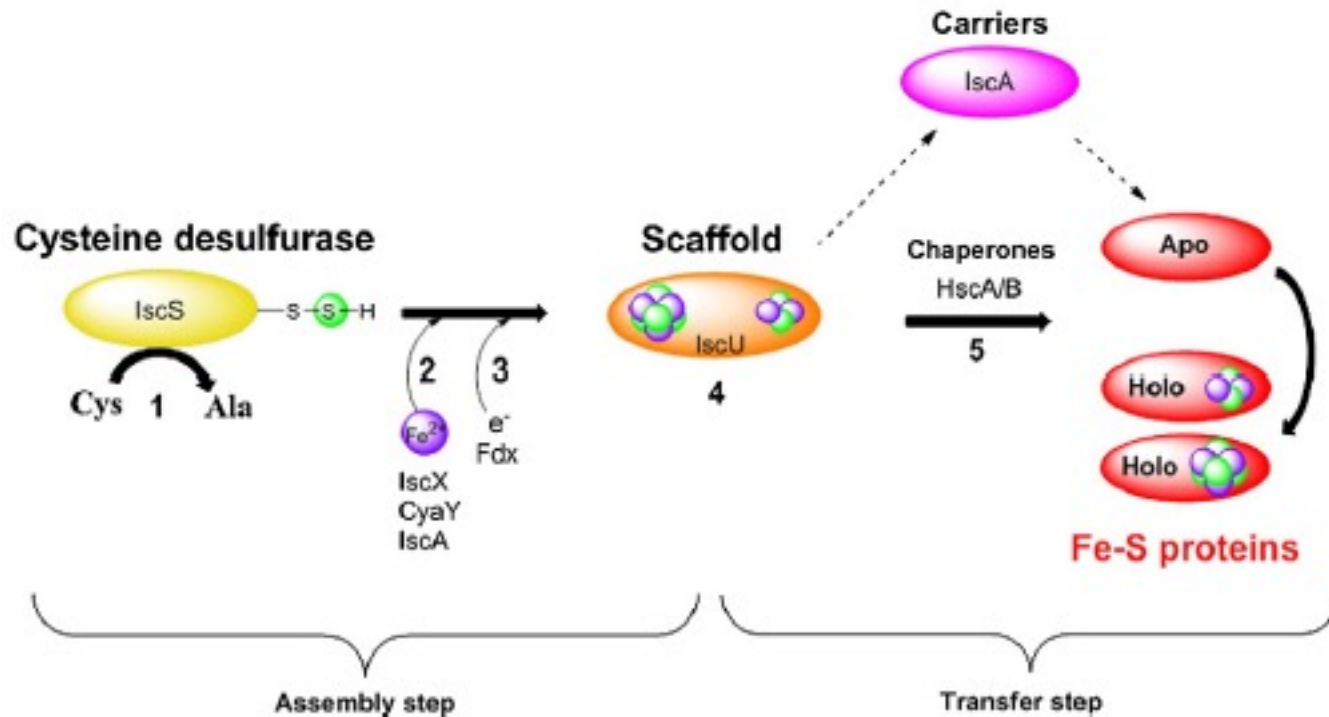
Biosintesi di cluster Fe-S in *E. coli*



Current Opinion in Microbiology

Fig. 1. Various systems involved in Fe/S assembly in bacteria and comparison of their genetic organization in operons: NIF, ISC and SUF (5,7,8). Genes or regions having homologous sequences or similar functions between the three systems are color-coded. Different colors within *nifU* indicate different domains within this modular protein.

Biosintesi di cluster Fe-S in *E. coli*



Trasporto del ferro in lievito

- Nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* il trasporto del ferro all'interno della cellula avviene attraverso diversi meccanismi:
- Trasporto reduttasi-indipendente
 - Recettori/trasportatori di siderofori (Arn1-4)
- Trasporto reduttasi-dipendente
 - Metalloreductasi NADPH-dipendenti Fre1 e Fre2
 - Sistema a bassa affinità (K_m 30 μ M) Fet4
 - Sistema ad alta affinità (K_m 0.15 μ M) Fet3-Ftr1

Trasporto del ferro in lievito sistema a bassa affinità

- **Fet4** è un trasportatore di metalli bivalenti Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} .
- È regolato dai livelli di ferro ed è indotto in anaerobiosi.

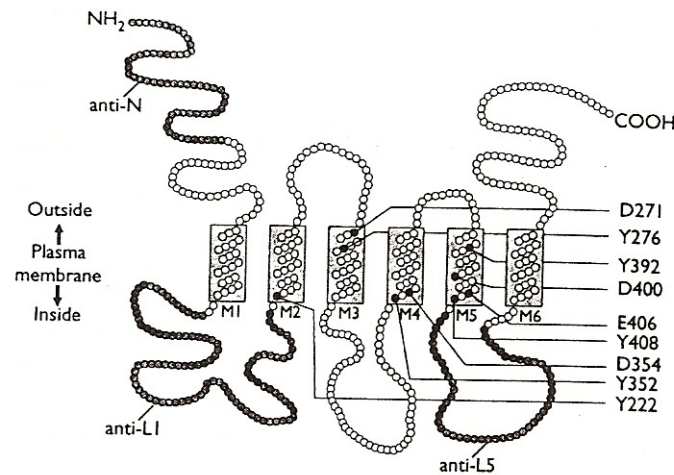
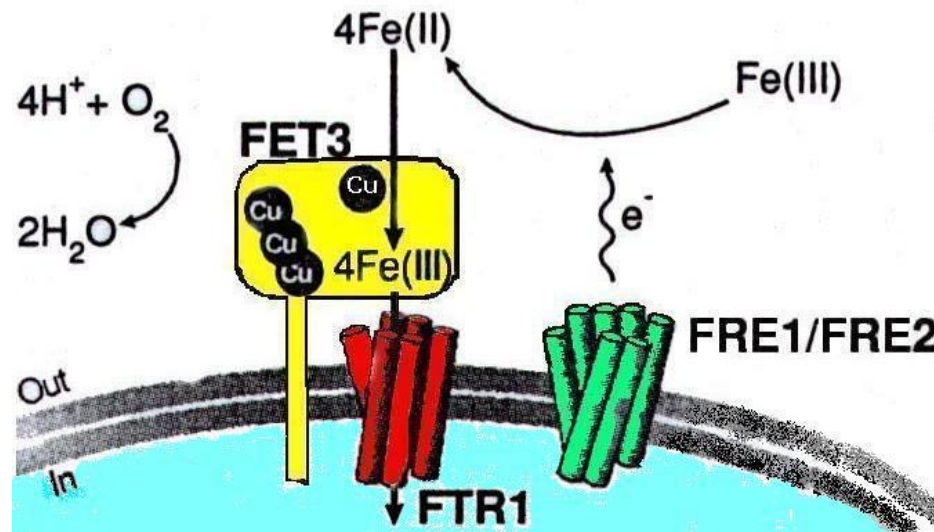


FIG. 1. A model of FET4 membrane topology. Transmembrane domains M1 through M6 are depicted as rectangles, and individual amino acid residues are indicated by the circles. Segments of the protein used in antibody preparation are shaded in gray. Mutated residues are filled and labeled using the single-letter amino acid code followed by the number of their position in the primary sequence.

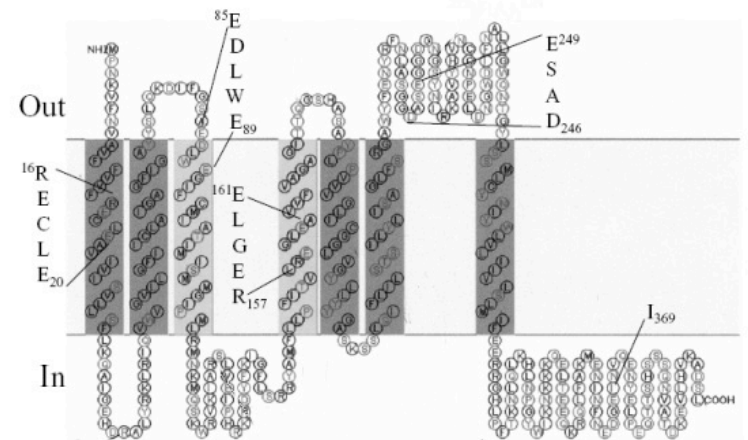
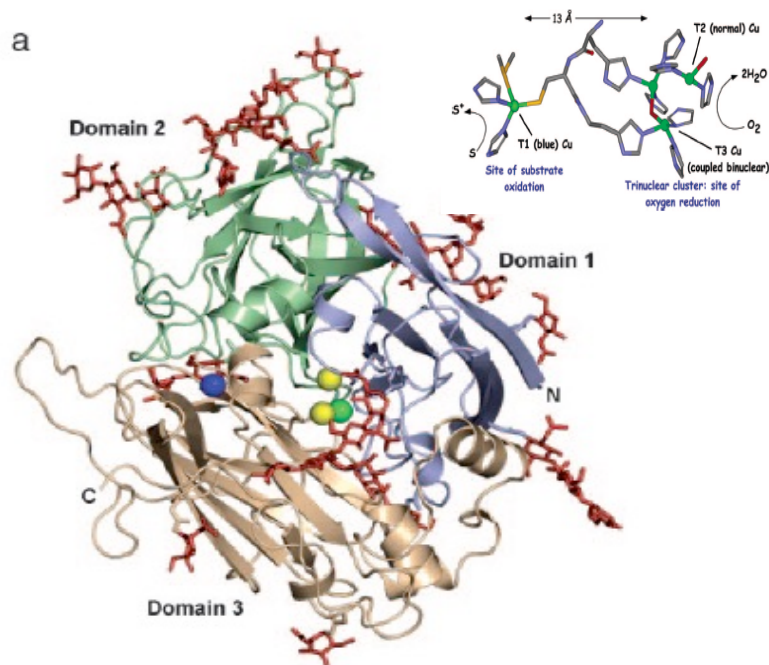
Trasporto del ferro in lievito sistema ad alta affinità

- La ferrossidasi **Fet3** catalizza la reazione
$$4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O}$$
- La permeasi **Ftr1** trasporta il Fe^{3+} all'interno della cellula
- Il sistema Fet3-Ftr1 è conservato in diversi lieviti, quali *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e *Pichia pastoris*.



Il complesso ferrossidasi-permeasi Fet3-Ftr1

- Fet3 appartiene alla famiglia delle ossidasi blu multinucleari a rame (MCO), enzimi che legano più atomi di Cu e accoppiano la ossidazione monoelettronica del substrato alla riduzione dell'ossigeno ad acqua.
- Ftr1 è una permeasi che presenterebbe 7 eliche transmembrana. Un motivo di sequenza REGLE nel quarto segmento TM è necessario per la funzionalità della proteina.

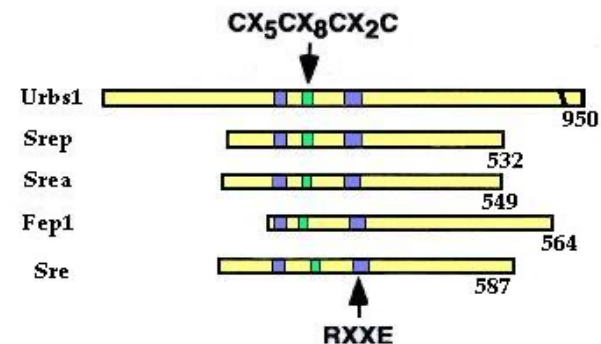


Metabolismo del ferro vacuolare e mitocondriale

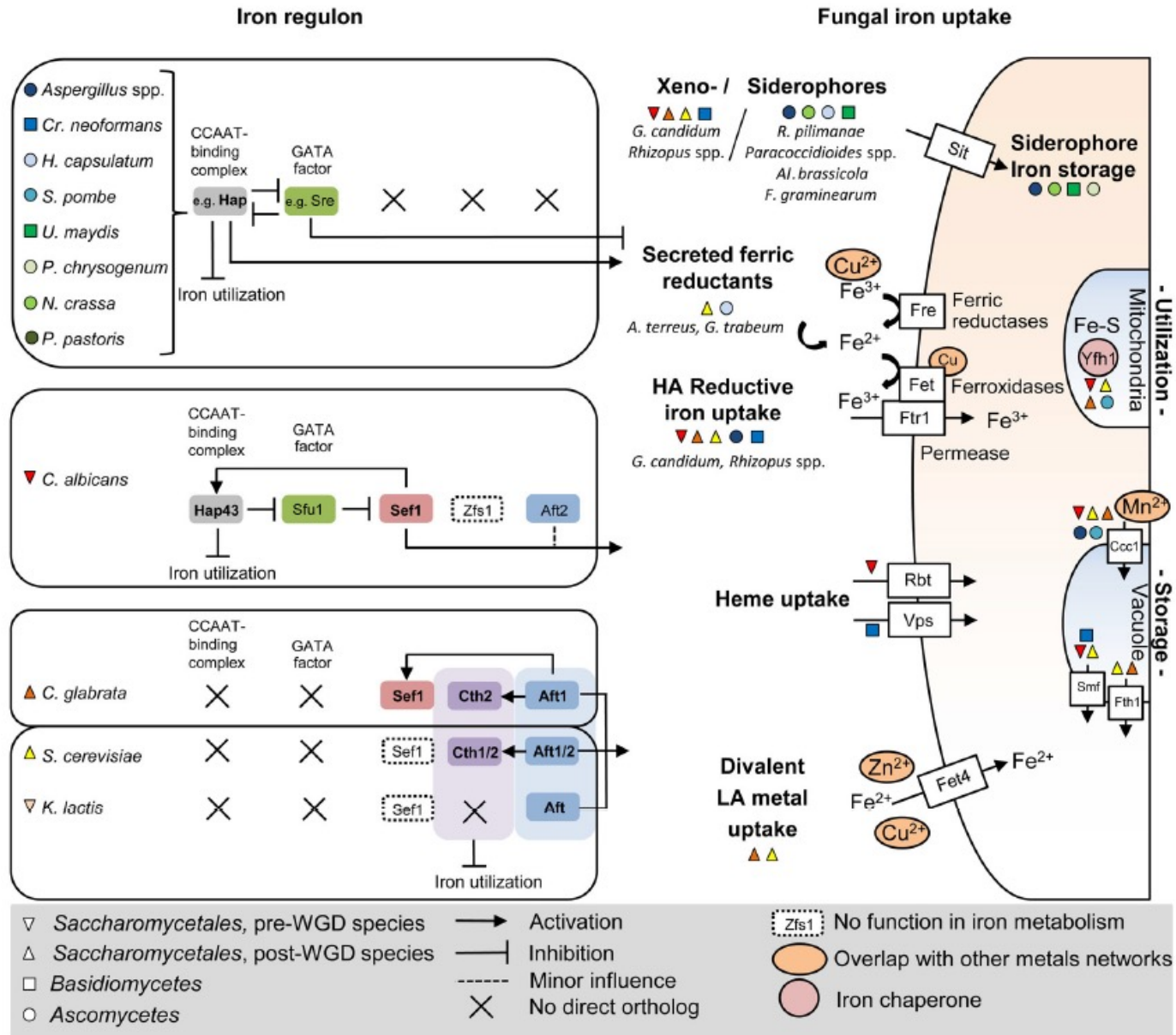
- Il **vacuolo** è il sito di deposito del ferro. Ccc1 è il trasportatore del ferro dal citosol all'interno del vacuolo, mentre un complesso ferrossidasi-permeasi formato dalle proteine Fet5 e Fth1 è necessario per la mobilizzazione del metallo.
- Nel **mitocondrio** avvengono alcune tappe della sintesi dell'eme e la sintesi dei cluster Fe-S. Le proteine Atm1, Mrs3, Mrs4 e Yfh1 sono coinvolte nel trasporto del ferro nel mitocondrio e/o nel trasporto di cluster Fe-S dal mitocondrio al citosol.

Regolazione del trasporto del ferro in lievito

- In *S. cerevisiae* **Aft1** e **Aft2** sono fattori trascrizionali che regolano numerosi geni in condizioni di carenza di ferro.
- Aft1 trasloca dal cytosol al nucleo quando il ferro è limitante e attiva la trascrizione dei geni bersaglio.
- Aft1 e Aft2 contengono un motivo Cys-X-Cys nel dominio di legame al DNA.
- In *S. pombe*, *C. albicans*, *P. pastoris* e altri funghi, la regolazione ferro-dipendente è mediata da repressori trascrizionali appartenenti alla famiglia dei **fattori GATA** a dita di zinco



Regolazione del trasporto del ferro in lievito e funghi



Fattori che regolano Aft1

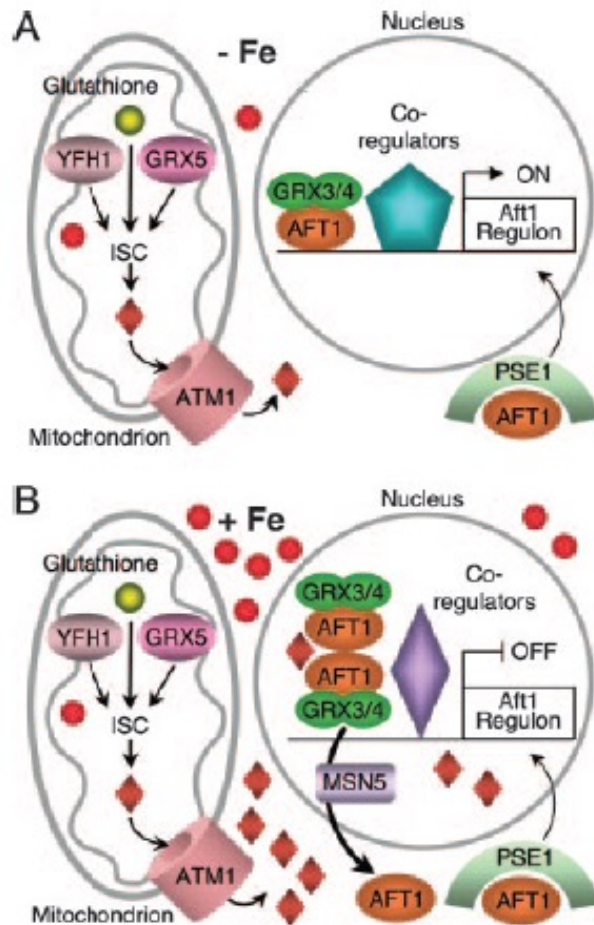


FIG. 1. Iron-dependent transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Activation of Aft1p under conditions of iron deprivation. The nuclear importin Pse1p mediates Aft1p translocation into the nucleus. Aft1p forms a complex with Grx3p and Grx4p, binds to DNA, and activates transcription. Although complex formation is not regulated by iron, it is not known whether complex formation occurs exclusively in the nucleus or also in the cytosol. "Coregulators" represent the numerous coactivators and corepressors that contribute to the regulation of the Aft1p regulon. These include the mediator complex, Snf1p/Snf4p, Ssn6, Nhp6p, Tup1, Hda1p, Cti6p, and heme. (B) Regulation of Aft1 activity under iron-replete conditions. Yfh1p, Grx5p, and glutathione are required for the production of ISC and the formation of an unknown compound that is a substrate for Atm1p. This compound is exported from mitochondria and may possibly be targeted to the nucleus. Under iron-replete conditions, Aft1p forms dimers that are recognized by the nuclear exportin Msn5p and lead to the accumulation of Aft1p in the cytosol. In a hypothetical model for the regulation of Aft1p, the production of the substrate for Atm1p is proportional to cellular iron levels. This substrate accumulates in the nucleus and leads to the dimerization of Aft1p, perhaps through the formation of a mixed disulfide bridge, and the complex is exported from the nucleus.

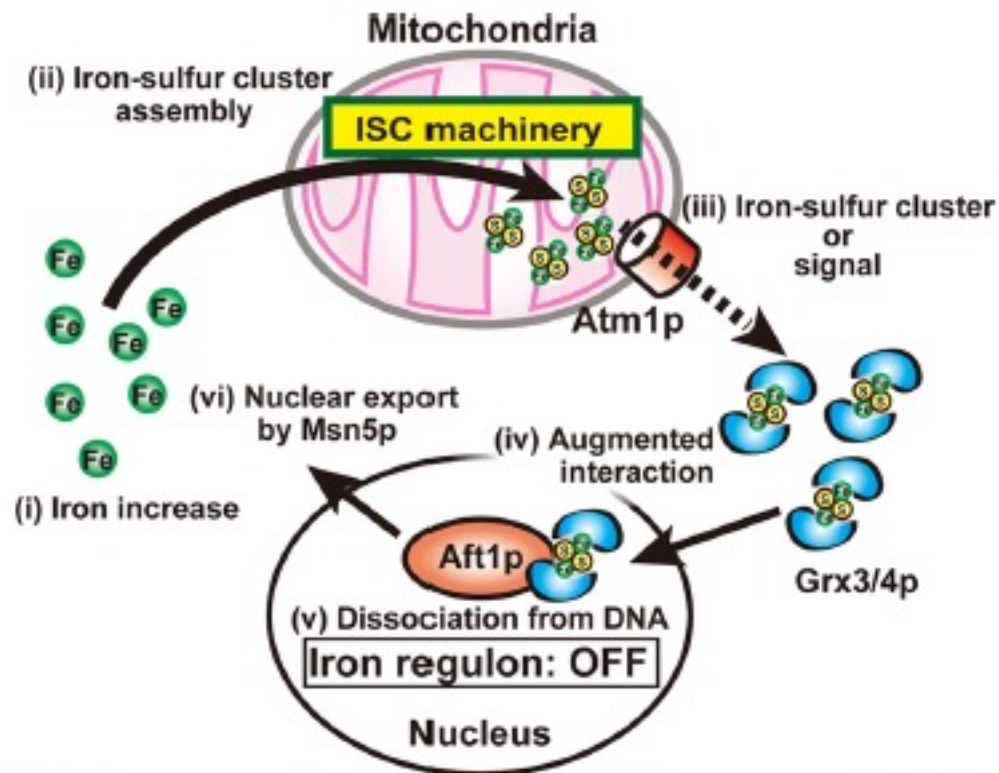


FIG 8 Proposed model for iron sensing by Aft1p. During iron starvation, iron-sulfur assembly in the mitochondria and dimeric Grx3/4p with bound iron-sulfur clusters are minimal. Under these conditions, Grx3/4p binding to Aft1p is attenuated, and Aft1p binds to target promoters to increase the expression of the iron regulon. In response to iron availability (i), iron-sulfur cluster assembly in the mitochondria increases (ii), and the iron-sulfur clusters, or signals that invoke iron-sulfur cluster formation, are delivered to the monothiol glutaredoxins Grx3/4p, which reside in both the nucleus and cytoplasm, via the mitochondrial ABC exporter Atm1p (iii). Grx3/4p with bound iron-sulfur clusters bind to Aft1p (iv), which induces dissociation of Aft1p from its target promoters (v), leaving Aft1p available for nuclear export by Msn5p (vi). The expression of the iron regulon is thereby downregulated.

Geni regolati da fattori di trascrizione ferro-dipendenti in lievito

Transcription factor	Description	Gene
Aft1	Transporters	FET4, FTR1, FTH1, SMF3, MRS4, CCC2, COT1
	Cu chaperone	ATX1
	Ferroxidase	FET3, FET5
	Metalloreductase	FRE1, FRE2, FRE3, FRE4, FRE5, FRE6
	Cell wall proteins	FIT1, FIT2, FIT3
	Siderophore transport	ARN1, ARN2, ARN3, ARN4
	Biosynthesis of Fe-S cluster	ISU1, ISU2
	Other	TIS11, HMX1, AKR1, PCL5, ICY2, PRY1
Aft2	Transporters	SMF3, MRS4, FTR1, COT1
	Cu chaperone	ATX1
	Ferroxidase	FET3, FET5
	Metalloreductase	FRE1
	Cell wall proteins	FIT1, FIT2, FIT3
	Biosynthesis of Fe-S cluster	ISU1
	Other	BNA2, ECM4, LAP4, TIS11
Fep1	Transporters	fip1 ⁺
	Ferroxidase	fiol ⁺
	Siderophore transport	str1 ⁺ , str2 ⁺ , str3 ⁺

Risposta alla carenza di ferro in *S. cerevisiae*

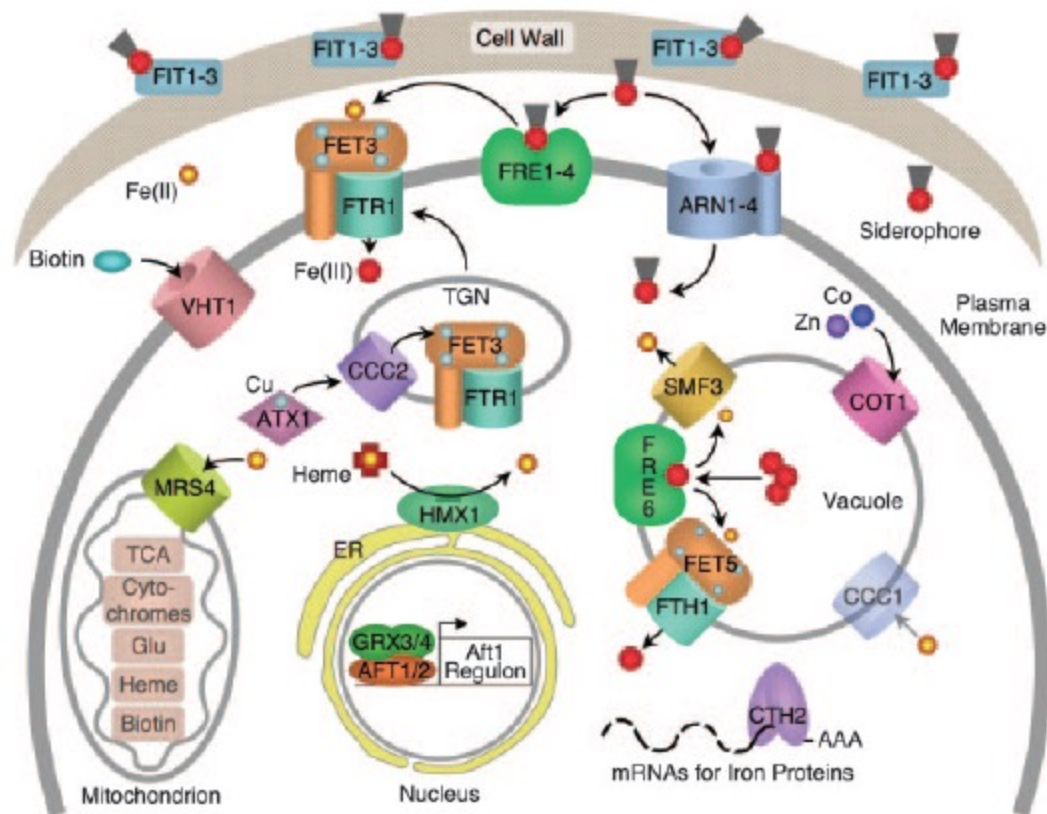


FIG. 2. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proteins under the transcriptional control of Aft1p and Aft2p are labeled with black text. Ccc1p, proteins of the tricarboxylic acid cycle, the respiratory cytochromes, and the glutamate, heme, and biotin biosynthetic pathways are down-regulated during iron deficiency and are indicated with grey text.

Regolazione trascrizionale ferro-dipendente in *S. pombe*

