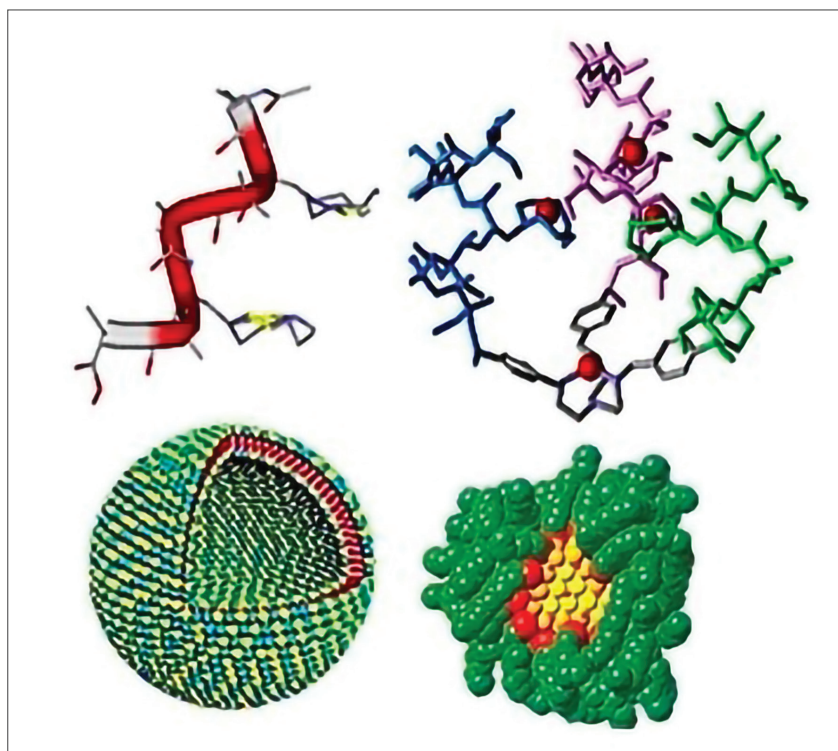




ALLA RICERCA DELLA COOPERATIVITÀ IN CATALISI

La cooperazione tra molecole o gruppi funzionali presenta molto spesso vantaggi molto rilevanti nell'accelerare processi catalitici o nell'attivare meccanismi di reazione non presenti quando le molecole sono isolate. Tale cooperazione (o cooperatività, come si definisce in ambito chimico) per instaurarsi richiede che i partner svolgano ruoli diversi ma finalizzati allo stesso obiettivo.



Se tra gli esseri viventi la cooperazione rappresenta un vantaggio sia per il gruppo che per il singolo individuo [1] cosa possiamo dire delle molecole? In realtà anche fra di esse la sinergia tra gruppi funzionali (come nel caso del sito catalitico di un enzima) o tra molecole diverse (come tra i lipidi di una membrana) avviene molto più di frequente di quanto si possa credere. Per questo è stato coniato il termine cooperatività per differenziarlo dalla cooperazione. La cooperati-

vità tra molecole porta a effetti catalitici sorprendenti, come pure a costanti di affinità aumentate di diversi ordini di grandezza. Quest'ultimo aspetto è stato oggetto di diversi studi che hanno cercato di definire e quantificare la cooperatività tra molecole diverse [2, 3]. La descrizione della cooperatività in ambito catalitico è invece ancora elusiva, almeno dal punto di vista quantitativo. Nel nostro laboratorio da molti anni studiamo sistemi in grado di accelerare una reazione chimica con un meccanismo cooperativo e qui cercherò di illustrare alcuni esempi significativi del nostro lavoro [4].

La cooperatività richiede la presenza in una stessa molecola di più gruppi funzionali (almeno due) o la formazione di cluster di molecole in uno stesso sistema, tenute assieme da interazioni covalenti (es. dendrimeri) o non covalenti

(es. micelle). Molti di questi sistemi sono anche multivalenti [5] per la contemporanea presenza di diverse copie di uno stesso gruppo funzionale o di clusters di gruppi funzionali. Multivalenza e cooperatività spesso sono proprietà di uno stesso sistema.

Le reazioni di cui ci siamo occupati sono prevalentemente reazioni di idrolisi di esteri carbossilici o fosforici in ragione del fatto che il loro meccanismo è in genere ben compreso e vi sono esempi di confronto

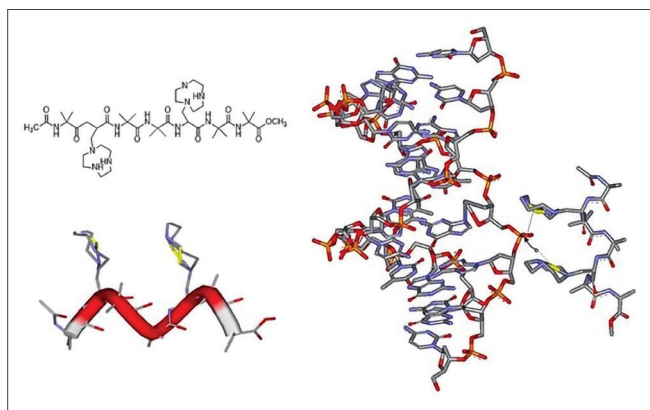


Fig. 1 - In alto a sinistra è riportata la struttura del peptide che assume una conformazione ad elica in soluzione acquosa come è riportato in basso a sinistra. A destra un possibile meccanismo cooperativo per la scissione del DNA plasmidico utilizzando lo stesso peptide come complesso con 2 ioni Zn(II)

assai stimolanti, come quelli costituiti dagli enzimi idrolitici. Per poter asserire che un sistema catalitico è davvero cooperativo bisogna dimostrare che la sua attività è superiore a quella che si osserverebbe con un analogo sistema i cui componenti operassero in maniera indipendente l'uno dall'altro. L'analisi è resa più complessa dal fatto che ciascuno dei componenti di un sistema cooperativo molto spesso opera con un meccanismo diverso, anche se si tratta dello stesso gruppo funzionale. Per illustrare questo concetto prenderò in considerazione come primo esempio l'idrolisi di un estere fosforico catalizzata da ioni metallici. Usualmente una fosfoesterasi presenta almeno due di essi nel suo sito catalitico, ciascuno con ruoli ben precisi e diversi dall'altro: attivazione del nucleofilo, attivazione del substrato ed, infine, attivazione del gruppo uscente [6]. Nell'eptapeptide elicoidale di Fig. 1 sono presenti due copie di un amminoacido sintetizzato nel nostro laboratorio che è in grado di complessare ioni Zn(II) con una costante di affinità assai elevata attraverso il triazaciclononano presente in catena laterale [7]. La conformazione ad elica consente di collocare i due complessi metallici ad una distanza appropriata per cooperare nel processo idrolitico di un estere fosforico, come abbiamo verificato sia usando un substrato modello che il DNA plasmidico. In quest'ultimo caso abbiamo potuto dimostrare che l'analogo peptide con un solo ione metallico è almeno 300 volte meno reattivo del sistema dinucleare [8]: un chiaro esempio di cooperatività.

Se nell'esempio precedente i due ioni metallici erano in grado di interagire ambedue direttamente con la funzione fosfoesterea, i due ioni Co(III) del macrociclo di Fig. 2 sono collocati ad una distanza tale da non poter interagire direttamente con il fosfato [9]. Ciononostante siamo riusciti a dimostrare che anche in questo caso esiste cooperatività tra i due mediata da una molecola d'acqua coordinata ad uno dei due ioni Co(III): un meccanismo diverso da quello presente nel caso del peptide di Fig. 1 e probabilmente presente in enzimi che presentano più di due ioni metallici in prossimità del sito catalitico. Si tratta di un contributo meno importante ma quantificabile. Con questo risultato abbiamo potuto dimostrare che questo ione metallico "remoto", sul cui ruolo esistevano ipotesi diverse, può portare ad un'accelerazione della reazione significativa.

Nei sistemi precedenti la struttura delle molecole era stata progettata per disporre gli ioni metallici nella posizione migliore per cooperare nel processo idrolitico. L'esempio che segue invece mostra come la realizzazione del sito catalitico cooperativo possa essere il risultato di un cambiamento conformazionale. Nel caso specifico, tale cambiamento conformazionale è il risultato della complessazione di uno ione metallico che svolge quindi un ruolo allosterico. Il sistema è costituito da una piattaforma tetramminica (tris-amminoetilammina, TREN) nella quale, a ciascuna delle ammine primarie, è stato legato un piccolo peptide ad elica che include una copia dello stesso amminoacido che abbiamo visto nell'esempio di Fig. 1, in grado

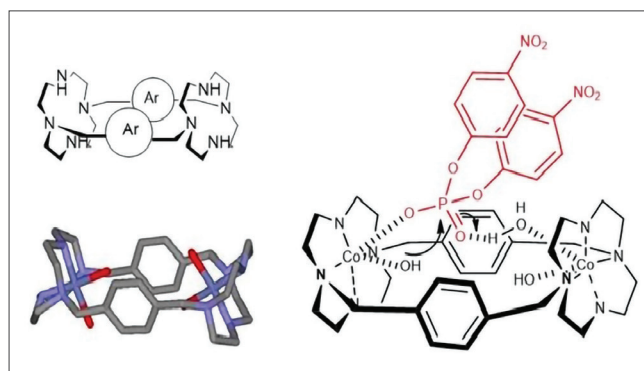


Fig. 2 - In alto a sinistra la serie di macrocicli in grado di complessare due ioni Co(III) sintetizzati. In basso a sinistra è riportata invece la struttura ottimizzata del complesso dinucleare più efficiente nell'idrolisi di un diestere dell'acido fosforico. A destra è riportato il meccanismo suggerito dai dati cinetici

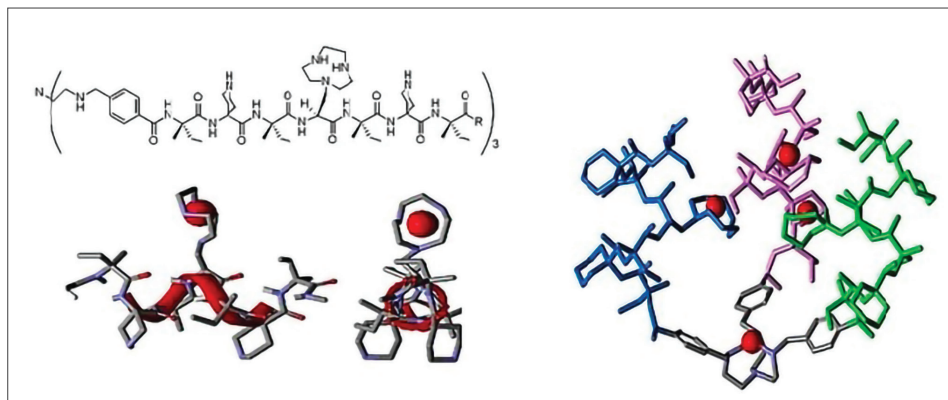


Fig. 3 - In alto a sinistra è riportata la formula della molecola ottenuta legando ad una piattaforma costituita dalla tris(1,2-diamminoetil)ammina (TREN) tre copie del peptide riportato in basso a sinistra (visto lateralmente e lungo il suo asse). A destra la struttura del complesso tetranucleare di Zn(II) dove si crea il sito catalitico per la scissione del diestere fosforico

di formare un complesso con Zn(II) [10]. La realizzazione del sito catalitico in cui si vanno a collocare i tre ioni Zn(II) viene garantita da un quarto ione Zn(II) che coordinandosi al TREN provoca la chiusura dei tre bracci funzionalizzati con i peptidi. L'orientamento dei complessi metallici, come illustrato in Fig. 3, è favorito dalla presenza di ioni ammonio, su ciascuno dei peptidi, rivolti verso la soluzione acquosa. Il sistema tetrametallico si è rivelato un ottimo catalizzatore del processo di transesterificazione di un estere fosforico modello del RNA. È interessante mettere in evidenza come anche la fosfatasi alcalina, un enzima deputato alla scissione di un legame fosfoestereo, presenti uno ione metallico non coinvolto nella catalisi ma che gioca un ruolo di controllo della conformazione (o allosterico) dell'enzima, indispensabile perché esso possa svolgere la sua azione catalitica.

Sistemi più complessi dei precedenti sono costituiti da nanoparticelle di oro (AuNP) [11] costituite da cluster di atomi di oro(0) la cui superficie è stata passivata con un monostrato di molecole organiche funzionalizzate da una parte con un tiolo (per l'ancoraggio alla superficie dell'oro) e dall'altra con un legante in grado di formare un complesso stabile con ioni Zn(II) [12]. Ciascuna nanoparticella presenta sulla superficie diverse unità di complessi di Zn(II) (circa 60 per un diametro del nocciolo d'oro di 2 nm): si tratta quindi di un sistema multivalente. Sfruttando un meccanismo come quello illustrato in Fig. 1, è quindi possibile realizzare fino a circa 30 siti catalitici cooperativi per l'idrolisi di un diestere fosforico. Usando un substrato modello del RNA, abbiamo potuto dimostrare che,

in effetti, questo è quello che succede (Fig. 4). La straordinaria situazione che si realizza nel monostrato che passa il nocciolo d'oro (prossimità tra gli ioni metallici, desolvatazione rispetto alla soluzione acquosa, ottimizzazione dell'interazione del substrato con il sito catalitico) ci ha permesso di realizzare quello che è il miglior catalizzatore sintetico per l'idrolisi di questo substrato modello che sia mai stato realizzato fino ad

oggi [13]. La caratteristica chiave di questi sistemi sta nelle cooperatività che si esercita sia nella complessazione del substrato che nel processo catalitico vero e proprio. Per questo, in analogia con gli enzimi, li abbiamo chiamati nanozimi. Reattività e complessazione possono essere determinati, come negli enzimi, sfruttando l'equazione di Michaelis-Menten. AuNP, funzionalizzate con un legante diverso da quello utilizzato in precedenza, hanno dimostrato una straordinaria proprietà nell'idrolisi del DNA plasmidico: la capacità di scindere legami fosfoesterei in filamenti diversi portando alla linearizzazione del polimero

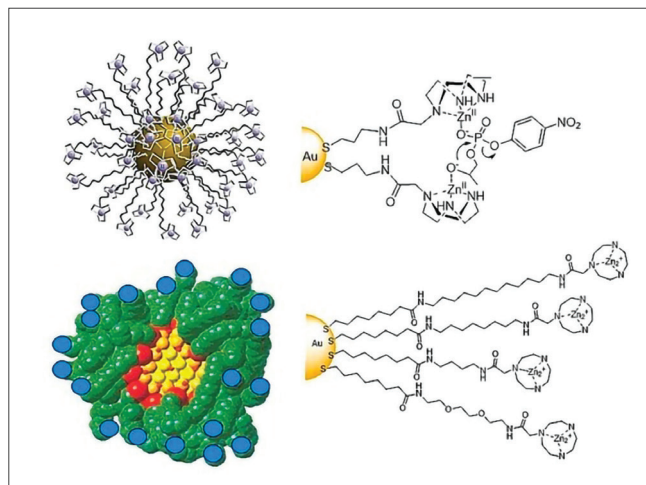


Fig. 4 - In alto la rappresentazione tridimensionale di una particella di oro cui è legato un tiolo (tra quelli indicati schematicamente in basso a destra) funzionalizzato con un legante per Zn(II). In basso a sinistra è rappresentata ancora la particella d'oro dove si mettono in evidenza il nocciolo metallico ed il monostrato organico. In alto a destra è riportato il meccanismo cooperativo di scissione dell'estere suggerito dai dati cinetici

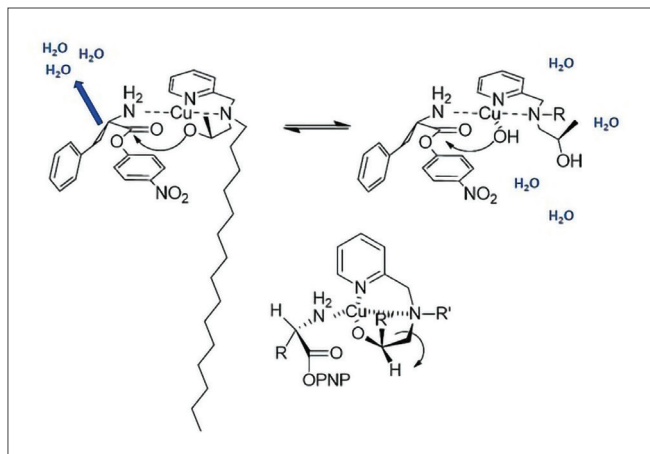


Fig. 5 - In alto è illustrato l'equilibrio tra di due modi di coordinazione allo ione Cu(II) del legante chirale: a sinistra con il gruppo alcolico coordinato, a destra con lo stesso sostituito da un idrossile. L'equilibrio comporta la rotazione del braccio che porta l'ossidrilico come illustrato in basso ed è legato alla presenza o meno di acqua nell'intorno del complesso

[14]. Si tratta di un evento assai difficile da realizzare con un catalizzatore sintetico e che si è reso possibile in questo caso per la multivalenza del sistema. La presenza di più siti catalitici sulla superficie della nanoparticella e la notevole affinità della stessa per il doppio filamento del DNA plasmidico rendono possibile l'idrolisi di due legami appartenenti a due diversi filamenti in modo quasi contemporaneo.

La cosa molto interessante che abbiamo osservato nel corso dei nostri studi è stato l'emergere, in maniera del tutto inattesa, di meccanismi cooperativi nuovi in seguito al confinamento di gruppi funzionali in un modello di una membrana biologica, come può essere quello costituito da un aggregato micellare o dal monostrato che passiva il nocciolo d'oro di una nanoparticella. Il primo caso che illustrerò qui è quello costituito dal legante piridinico chirale riportato in Fig. 5. Esso forma complessi molto stabili con ioni Cu(II) ed è stato studiato come potenziale catalizzatore della scissione enantioselettiva di un estere di un amminoacido [15]. La cosa sorprendente che abbiamo osservato è che solamente l'aggregato micellare formato dal legante dotato di una catena idrocarburica (e quindi anfifilico) era in grado di catalizzare il processo con una buona enantioselettività mentre il legante incapace di formare aggregati micellari non solo non presentava enantioselezione ma era addirittura un inibitore del processo di scissione dell'estere. Abbiamo spiegato questo diverso comportamento con un cambia-

mento di conformazione del legante nell'aggregato micellare che comporta il coinvolgimento della funzione alcolica nella coordinazione allo ione metallico. Tale funzione alcolica diventa poi il nucleofilo nei confronti dell'estere. Nel caso del complesso che non aggrega, l'acqua compete favorevolmente con la funzione alcolica, rimpiazzandola nella coordinazione allo ione Cu(II). In questo modo il braccio chirale del legante non svolge più il suo ruolo di nucleofilo. Il risultato è un'efficienza molto minore e, soprattutto, la perdita del riconoscimento chirale del substrato. L'aggregazione, un classico processo cooperativo, attiva quindi un meccanismo completamente diverso da quello che si osserva con lo stesso legante in forma isolata in soluzione acquosa.

Un altro esempio di nuovo meccanismo catalitico abbiamo avuto modo di osservarlo quando abbiamo funzionalizzato il monostrato di nanoparticelle di oro con piccoli peptidi (Fig. 6) che presentavano gruppi funzionali potenzialmente attivi nella reazione di idrolisi di un estere e tipicamente presenti nel sito catalitico di esterasi o peptidasi [16]. Amminoacidi potenzialmente coinvolti nella scissione di un estere modello erano l'istidina (con la funzione imidazolica) e la tirosina (con la funzione fenolica), oltre all'arginina (con il gruppo guanidinico). In effetti utilizzando il peptide in soluzione acquosa e seguendo la velocità di reazione in funzione del pH si osserva il coinvolgimento come nucleofili sia della tirosina (a pH ca.

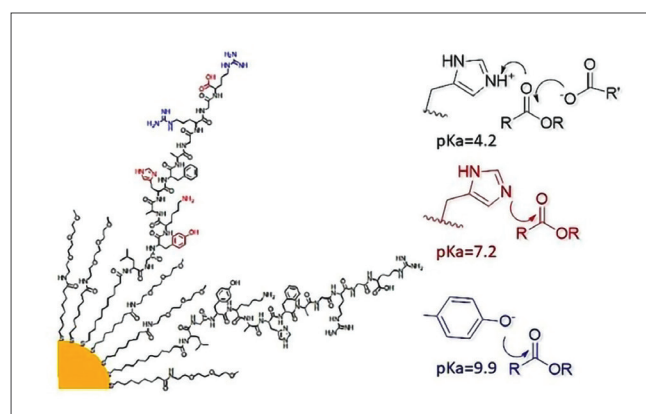


Fig. 6 - A sinistra è riportata schematicamente la nanoparticella d'oro funzionalizzata con una sequenza peptidica opportunamente funzionalizzata in catena laterale con gruppi in grado di scindere un estere usato come substrato. A destra sono illustrati i vari nucleofili coinvolti ai differenti pH. A pH 4,2 si instaura un meccanismo che è presente solo quando il peptide è legato alla nanoparticella

9) che dell'imidazolo (a pH ca. 7). Quando tuttavia il peptide viene confinato nel monostrato che passiva una nanoparticella d'oro, oltre ai due meccanismi precedenti se ne instaura un terzo a pH relativamente basso (ca. 5) che coinvolge sia un gruppo imidazolico protonato che una funzione carbossilato come nucleofilo [17]. Si tratta di un nuovo meccanismo cooperativo chiaramente associato alla vicinanza dei gruppi funzioni di due peptidi diversi nello stesso monostrato di passivazione.

Le nanoparticelle di oro si prestano molto bene, come abbiamo visto negli esempi precedenti, per sfruttare appieno la cooperatività sia a livello di riconoscimento molecolare che di catalisi. La loro efficienza catalitica può essere modulata o del tutto soppressa con l'aggiunta di una molecola in grado di competere in maniera efficiente con il substrato fosfoestereo. I polianioni si legano molto fortemente ad AuNP cationiche (come quelle funzionalizzate con complessi di Zn(II)) con costanti di affinità che crescono in funzione della carica: maggiore è la carica maggiore è l'affinità, una classica interazione tra specie multivalenti [18]. Ad esempio, se a nanoparticelle d'oro analoghe a quelle di Fig. 4 aggiungiamo ATP o un oligopeptide polianionico questi si legheranno alla superficie della AuNP, impedendo l'interazione con il substrato e, quindi, inibendo il processo catalitico che porta alla sua scissione. L'attività catalitica può però essere riattivata qualora l'inibitore polianionico venga esso stesso scisso in frammenti più piccoli, ciascuno con una carica limitata e quindi con un'affinità molto minore per la superficie cationica della nanoparticella. Una peptidasi specifica per il peptide polianionico o una ATPasi possono svolgere molto bene questo ruolo di scindere l'inibitore e, conseguentemente, riattivare l'attività catalitica della AuNP. Ci troviamo quindi di fronte alla possibilità di determinare quantitativamente la concentrazione dell'enzima utilizzato attraverso un meccanismo a cascata (Fig. 7). Nel primo passaggio l'enzima idrolizza l'inibitore mentre nel secondo è la nanoparticella che, riacquistata la sua attività, scinde un substrato cromogenico che funge da indicatore indiretto della presenza dell'enzima da cui tutto è iniziato. Poiché ambedue i passaggi sono processi catalitici caratterizzati da un elevato turn-over, il risultato finale è una doppia amplificazione del segnale di presenza dell'enzima con con-

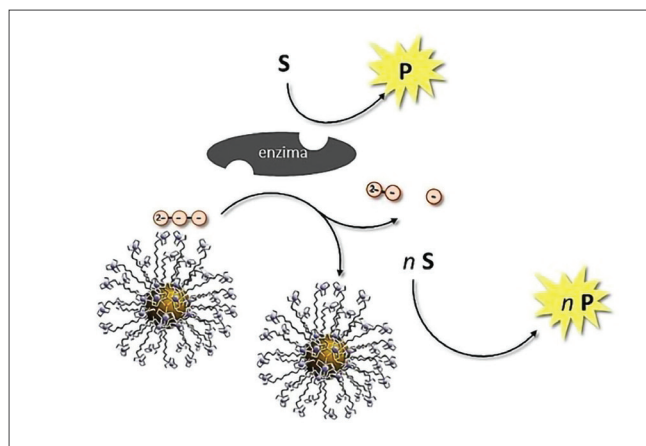


Fig. 7 - Da sinistra a destra sono riportati gli eventi che portano alla riattivazione dell'attività catalitica della nanoparticella inibita dall'aggiunta di ATP. Dapprima l'enzima idrolizza l'ATP, successivamente la nanoparticella riprende la sua azione catalitica rilasciando una molecola colorata che indica la presenza dell'enzima che ne ha riattivato l'attività catalitica

seguente elevata sensibilità nel suo riconoscimento. L'interazione tra specie multivalenti a carica opposta è alla base della formazione transiente di aggregati di vescicole che abbiamo avuto modo di studiare [19]. Il tensioattivo costituito dal complesso di Zn(II) con il triazaciclononano funzionalizzato con una catena idrocarburica aggrega, in soluzione acquosa, a concentrazioni relativamente elevate (mM). Tuttavia, in presenza di ATP, gli aggregati (vescicole costituite da membrane a doppio strato) si formano a concentrazioni molto più basse di tensioattivo. Possiamo quindi affermare che ATP funge da agente "templante" per la formazione degli aggregati che a quella concentrazione altrimenti non esisterebbero. Tuttavia, in presenza di una ATPasi, l'idrolisi scinde l'ATP in frammenti troppo piccoli per indurre la formazione di aggregati che quindi si distruggono (Fig. 8). L'aggiunta di ATP in presenza dell'enzima porta alla nuova formazione di aggregati, fintantoché è nuovamente idrolizzato dall'enzima, così il processo può continuare in maniera ciclica. La presenza delle vescicole può essere verificata monitorando la fluorescenza di un'opportuna sonda attiva solamente nell'ambiente lipofilo della membrana vescicolare. Parimenti la presenza della membrana delle vescicole consente di condurre reazioni chimiche che non avvengono in soluzione acquosa. Il complesso meccanismo cooperativo che sta alla base dell'interazione ATP-tensioattivi metallici e dei tensioattivi tra di loro crea quindi delle specie

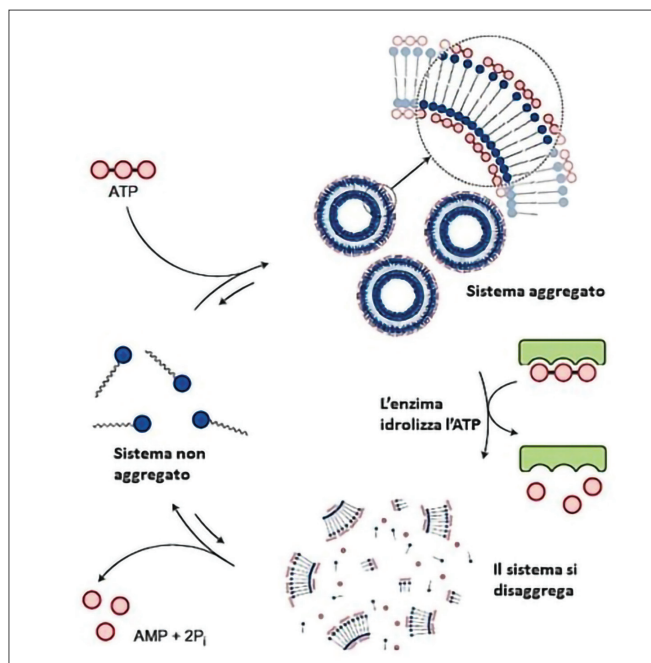


Fig. 8 - Da sinistra in senso orario: un complesso metallico di Zn(II) anfifilico si aggrega in presenza di ATP. Il sistema aggregato, in presenza di una ATPasi ha una vita limitata al tempo di permanenza dell'ATP: quando questo viene idrolizzato dall'enzima il sistema si disaggrega. Una nuova aggiunta di ATP consente di riprendere il ciclo aggregazione/disaggregazione

transienti (gli aggregati vescicolari) che attivano la fluorescenza oppure reazioni chimiche. Queste specie transienti esistono nell'intervallo di tempo necessario per l'idrolisi di ATP da parte dell'ATPasi. Tutto il processo costituisce un prototipo di chimica "fuori dall'equilibrio", uno sviluppo importante della chimica che consente di attivare processi in condizioni termodinamiche instabili o ad alta energia.

Gli esempi che ho sopra riportato costituiscono una parte del lavoro che abbiamo svolto nel nostro laboratorio negli ultimi anni. Essi servono a creare la curiosità nel lettore a scoprire quanto la cooperatività tra molecole sia un fenomeno diffuso ed importante. La chimica che avviene dentro alle cellule [20] o nelle loro membrane ne è certamente un esempio significativo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Ridley, *The origins of virtue*, Penguin, 1998.
- [2] C.A. Hunter, H.L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 7488.
- [3] G. Ercolani, L. Schiaffino, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 1762.

- [4] C. Guarise, F. Manea *et al.*, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 174.
- [5] F. Mancin, L. Prins *et al.*, *Molecules*, 2016, **21**, 1014.
- [6] N. Williams, B. Takasaki *et al.*, *Accounts Chem. Res.*, 1999, **32**, 485
- [7] P. Rossi, F. Felluga *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6948.
- [8] C. Sissi, P. Rossi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 3169.
- [9] E.S. Bencze, C. Zonta *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2018, 5375.
- [10] A. Scarso, U. Scheffer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, **99**, 5144.
- [11] (a) M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 293; (b) P. Zhao, N. Li, D. Astruc, *Coordin. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 638.
- [12] F. Manea, F.B. Houillon *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, **43**, 6165.
- [13] M. Diez-Castellnou, F. Mancin, *P. Scrimin, J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1158.
- [14] R. Bonomi, F. Selvestrel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15744.
- [15] (a) G. De Santi, P. Scrimin, U. Tonellato, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 4791; (b) P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 4194.
- [16] P. Pengo, S. Polizzi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 1616.
- [17] P. Pengo, L. Baltzer *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 400.
- [18] R. Bonomi, A. Cazzolaro *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2011, **50**, 2307.
- [19] S. Maiti, I. Fortunati *et al.*, *Nat. Chem.*, 2016, **8**, 725.
- [20] A. Norvell, S. McMahon, *Science*, 2010, **327**, 964.

Looking for Cooperation in Catalysis

Cooperation between molecules or functional groups often provides impressive rate acceleration of chemical reactions or activate new reaction mechanisms not present when molecules are isolated. The activation of cooperation (or cooperativity as it has been dubbed in chemistry) requires the partners play different roles aimed at the same goal.