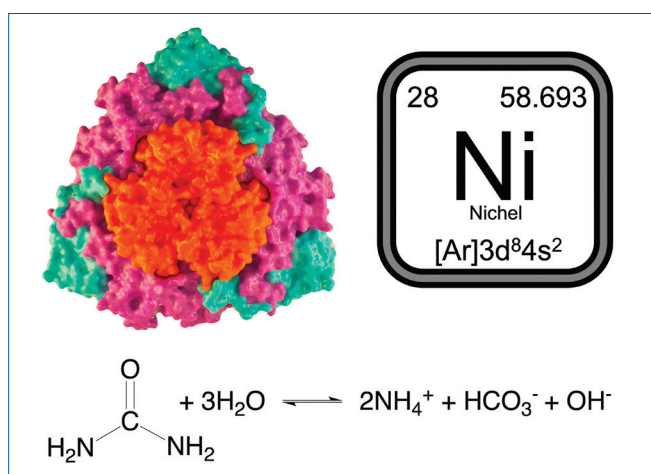




Luca Mazzei
 Laboratorio di Chimica Bioinorganica
 Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie
 Università di Bologna
luca.mazzei2@unibo.it

UREASI, UN NICHEL-ENZIMA

L'ureasi, un enzima nichel-dipendente in grado di convertire l'urea in ammoniaca e bicarbonato, è coinvolta in gravi problematiche legate a salute umana, agricoltura e ambiente. Sono qui riportati i recenti studi, condotti dal nostro gruppo di ricerca, sulla comprensione del meccanismo catalitico dell'ureasi e sullo sviluppo di una nuova strategia di inibizione.



Il problema biologico, la struttura e le ipotesi sul meccanismo di reazione dell'ureasi

L'ureasi è un enzima nichel-dipendente presente in numerosi organismi [1, 2] in grado di catalizzare l'idrolisi dell'urea in ammoniaca e bicarbonato, determinando un aumento del pH con conseguenze negative per la salute umana [3], l'agricoltura e l'ambiente [4]. Molti microrganismi patogeni umani, tra cui *Staphylococcus aureus* [5], *Yersinia enterocolitica* [6], *Mycobacterium tuberculosis* [7], *Helicobacter pylori* [8], ed altri associati a fenomeni di antibiotico-resistenza [9], sfruttano l'ureasi come fattore di virulenza. Inoltre, l'utilizzo dell'urea come fertilizzante e l'elevata presenza di ureasi nei suoli generano il rilascio di grandi quantità di ammoniaca, con conseguente perdita di efficienza della fertilizzazione azotata e formazione di particolato solido che contribuisce all'inquinamento atmosferico [10]. In aggiunta, la tossicità dell'ammoniaca e l'aumento del pH dei suoli causano danni alle vegetazioni [4]. Queste implicazioni hanno spinto

la comunità scientifica a indagare le relazioni struttura-funzione dell'ureasi per comprendere le basi molecolari del suo meccanismo di reazione e sviluppare composti in grado di modularne l'attività riducendone gli effetti avversi.

La prima ipotesi di meccanismo catalitico fu proposta nel 1975 da Zerner e collaboratori, in assenza di informazioni strutturali, e si basava sulla

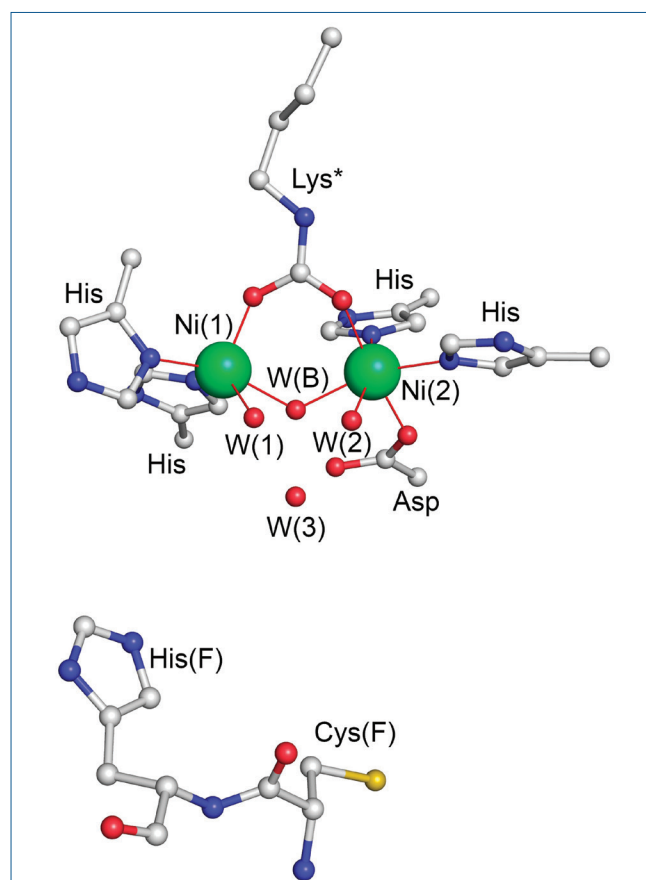


Fig. 1 - Sito attivo dell'ureasi

A Luca Mazzei il Consiglio Direttivo della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della Società Chimica Italiana ha assegnato all'unanimità il Premio Italfarmaco "De Santis" 2020.

presenza di due ioni Ni(II) nel sito attivo [11]. Dalla metà degli anni Novanta, con la determinazione delle strutture a raggi X dell'ureasi dai batteri *Sporosarcina pasteurii* e *Klebsiella aerogenes* [12, 13], è stata definita l'architettura tridimensionale dell'enzima. Nel sito attivo (Fig. 1) due ioni Ni(II) [Ni(1) e Ni(2)] sono legati a ponte dal carbammato di una lisina carbamilata (Lys*) e da uno ione idrossido [W(B)] e sono ulteriormente coordinati da atomi di N imidazolici di residui di istidina (His) e da un atomo di O carbossilico di un aspartato (Asp). La sfera di coordinazione di ciascuno ione Ni(1) e Ni(2) è completata da una molecola di acqua, W(1) e W(2), rispettivamente. W(1), W(2) e W(B) formano un cluster tetraedrico di molecole di solvente con un'altra molecola d'acqua presente nel sito, W(3). Il sito attivo è localizzato in una tasca coperta da un motivo strutturale di 30 amminoacidi (flap), il quale può trovarsi in conformazione aperta o chiusa ed è coinvolto nel meccanismo catalitico grazie alla sua mobilità e alla presenza di due residui conservati di cisteina [Cys(F)] e istidina [His(F)] (dettagli disponibili nella prossima sezione).

La conoscenza strutturale dell'ureasi e del suo sito attivo ha permesso la formulazione di due nuove ipotesi di meccanismo di reazione, proposte rispettivamente da Ciurli e suoi collaboratori [12, 14] e Hausinger e suoi collaboratori [13, 15, 16] (Fig.

2). Nelle loro forme originali esse condividono molti passaggi, ma presentano tre differenze sostanziali. Schematicamente, entrambe prevedono l'ingresso dell'urea nel sito attivo quando il flap è in conformazione aperta. Secondo il meccanismo proposto da Ciurli l'urea sostituisce le tre molecole di acqua W(1), W(2), e W(3) chelando il cluster bimetallico utilizzando l'atomo di O per legare Ni(1) ed un atomo di N ammidico per legare Ni(2), mentre l'ipotesi di Hausinger prevede che l'urea legghi solo Ni(1) con l'atomo di O, lasciando W(2) coordinata a Ni(2). Le due ipotesi propongono che la reazione inizi con l'attacco nucleofilo sull'atomo di C dell'urea: l'ipotesi di Ciurli attribuisce il ruolo di nucleofilo all'idrossido a ponte W(B) legato a ponte tra i due ioni Ni(II), mentre quella di Hausinger lo attribuisce a W(2) (coordinata a Ni(2)) sotto forma di ione idrossido. L'attacco nucleofilo porta alla formazione di un intermedio tetraedrico che evolve a prodotti in seguito alla chiusura del flap e all'interazione di un atomo di N imidazolico del residuo His(F), presente sul flap, con il gruppo -NH₂ distale dell'intermedio formato. Tuttavia, il ruolo assegnato ad His(F) diverge nelle due ipotesi: secondo l'ipotesi proposta da Ciurli His(F) svolge il ruolo di base catalitica in grado di ricevere un legame ad H dal gruppo -NH₃⁺ distale dell'intermedio precedentemente protonato da W(B) [17], mentre secondo Hausinger His(F) agisce da acido catalitico, trasferendo un protone al gruppo -NH₂ distale dell'intermedio. In entrambi i casi, la reazione termina con la rottura del legame C-NH₃⁺ e l'uscita dei prodotti (una molecola di ammoniaca e uno ione carbammato, il quale a sua volta si decompone spontaneamente in una seconda molecola di ammoniaca e bicarbonato) dal sito attivo e l'ingresso di nuove molecole d'acqua.

Le differenze fra le due ipotesi, cioè i) il modo di legame dell'urea nel sito attivo, ii) la natura del nucleofilo, e iii) il ruolo del residuo His(F) nella catalisi, hanno fino ad oggi impedito la completa caratterizzazione del meccanismo catalitico.

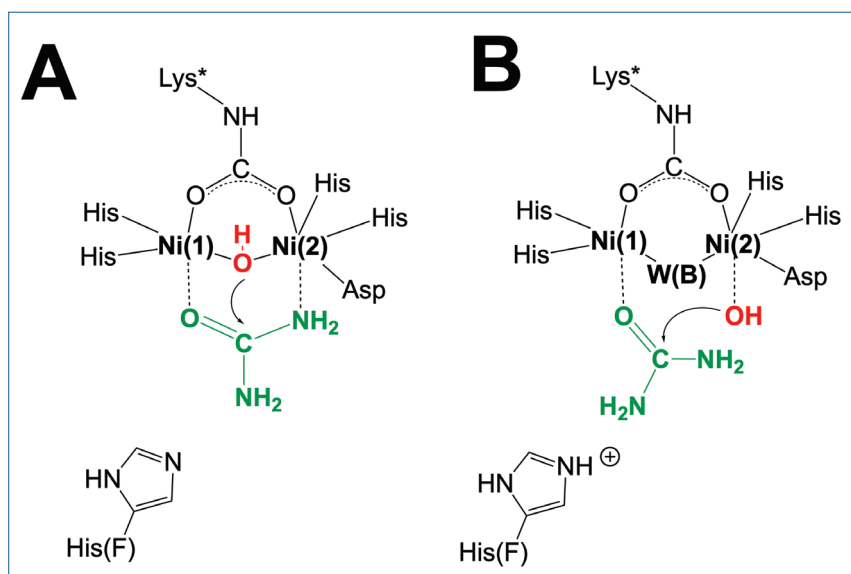


Fig. 2 - Differenze fra le ipotesi di meccanismo di reazione proposte da Ciurli (A) e Hausinger (B)

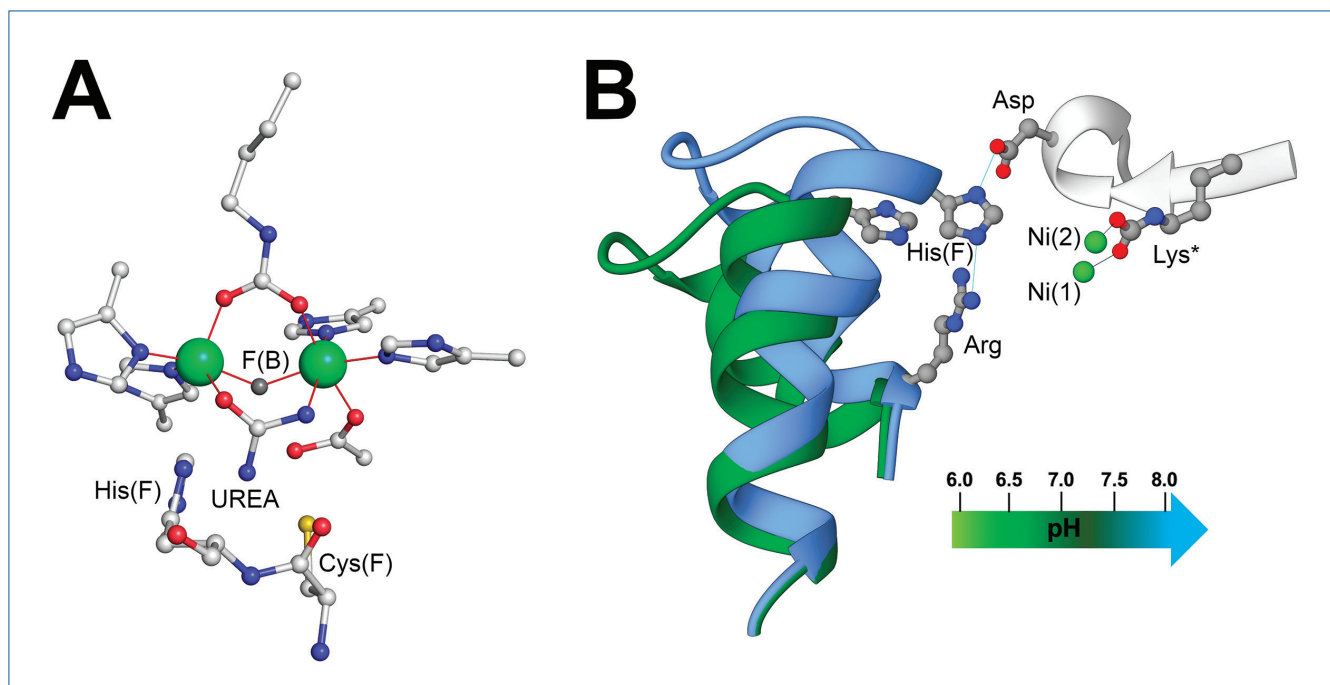


Fig. 3 - (A) Sito attivo dell'ureasi in complesso con l'urea e (B) rappresentazione del flap stabilizzato in conformazione aperta (verde) e chiusa (azzurro) in funzione del pH

In questo lavoro sono riportati i recenti risultati, ottenuti grazie al mio contributo all'interno del gruppo di ricerca coordinato dal prof. Ciurli, che hanno consentito la delucidazione dei passaggi sopra descritti e, più in generale, l'ottenimento di una visione dettagliata del meccanismo catalitico dell'ureasi, definendo il ruolo del flap mobile nella catalisi e permettendo lo sviluppo di una strategia di inibizione alternativa basata sul blocco della mobilità del flap stesso.

Il complesso enzima-substrato e la delucidazione del meccanismo di reazione

A partire da alcune evidenze riportate sulla capacità di inibizione del fluoruro (F^-) sull'ureasi [18], il nostro gruppo di ricerca ha recentemente contribuito a dimostrare che F^- inibisce l'enzima tramite la sostituzione dell'idrossido $W(B)$ a ponte fra i due $Ni(II)$, attribuendogli in modo chiaro il ruolo di nucleofilo della reazione [19]. Questa inibizione, che rimuove il co-substrato della reazione (ione idrossido), ha permesso di determinare la struttura a raggi X dell'ureasi legata al suo substrato [20] (Fig. 3A), dimostrando il modo di legame bidentato della molecola nel sito attivo. L'urea sostituisce

le molecole di solvente $W(1)$, $W(2)$ e $W(3)$, legando rispettivamente $Ni(1)$ e $Ni(2)$ tramite l'atomo di O e un atomo di N ammidico, come previsto dall'ipotesi di Ciurli e collaboratori. Il secondo N ammidico punta verso l'esterno della cavità ed interagisce tramite un legame ad H con un atomo di N dell'imidazolo di His(F) del flap, quest'ultimo stabilizzato in conformazione chiusa. His(F) interagisce, grazie all'altro atomo di N imidazolico, con due residui di Asp e Arg posti all'ingresso della tasca enzimatica mediante legami ad H (Fig. 3B). Il network di legami ad H presente impone che l'anello imidazolico di His(F) sia neutro e che l'atomo di N di His(F) che interagisce con il gruppo $-NH_2$ distale dell'urea sia deprotonato, indicando il ruolo di base catalitica di His(F) nel meccanismo, come suggerito da Ciurli e i suoi collaboratori.

Di recente è stato dimostrato, inoltre, il ruolo del pH nella stabilizzazione del flap in conformazione aperta o chiusa tramite la variazione dello stato di protonazione dell'anello imidazolico di His(F) (pK_a ca. 6,6) [21, 22] (Fig. 3B). A valori di pH maggiori del valore di pK_a l'anello imidazolico di His(F) è neutro e forma, come visto precedentemente, legami ad H con i residui di Asp e Arg posti all'ingresso della

tasca con la conseguente stabilizzazione dello stato chiuso del flap. Al contrario, a valori di pH minori della pK_a di His(F), la carica positiva dell'anello imidazolico impedisce l'interazione con i residui di Asp e Arg, causando l'apertura del flap. I dettagli completi degli studi che hanno permesso la descrizione accurata del meccanismo di reazione sono stati recentemente pubblicati in una monografia [23].

L'utilizzo del flap come target per una strategia di inibizione

La conoscenza dettagliata del funzionamento dell'ureasi ha permesso l'individuazione di numerose molecole che inibiscono l'enzima legando i due Ni(II) nel sito attivo [24, 25]. Tuttavia, la centralità del ruolo del flap mobile nel meccanismo di reazione ha suggerito di esplorare l'utilizzo di composti in grado di inibire l'enzima tramite l'interazione con il flap stesso. In particolare, le nostre ricerche hanno permesso di caratterizzare dal punto di vista strutturale e biochimico l'inibizione dell'ureasi da parte del catecolo [26] e di suoi derivati [27] (Fig. 4A). Queste molecole sono in grado di legare il residuo conservato Cys(F) presente sul flap formando un addotto covalente che, a fronte dell'aumento dell'ingombro

sterico del flap stesso, ne impedisce la chiusura e la conseguente stabilizzazione dell'intermedio di reazione, causando l'inattivazione dell'enzima. L'emergente capacità dei polifenoli e flavonoidi, composti naturali contenenti funzionalità catecoliche con proprietà antiossidanti e benefiche per la salute umana, di inibire ureasi da diversi organismi [28-31] rende i risultati ottenuti molto promettenti.

Un'altra ricerca svolta dal nostro gruppo ha riguardato la caratterizzazione strutturale della inibizione, già nota dal punto di vista biochimico [32], di ioni di metalli pesanti sull'ureasi. In particolare, è stato dimostrato che Ag(I) ed Au(I) sono in grado di interagire con il flap mobile formando un cluster bimetallico [33, 34] (Fig. 4B): gli ioni Ag(I) e Au(I) presentano una caratteristica geometria pseudo-lineare e sono legati a ponte dal gruppo tiolato della Cys(F), con il cluster che forma poi un legame di coordinazione con un atomo di N della His(F) ed un atomo di S del gruppo tioetere di una metionina (Met), residuo anch'esso altamente conservato e posizionato in una regione proteica rigida a ridosso del flap. La formazione di questo addotto determina il blocco del flap in conformazione aperta portando all'inattivazione dell'enzima.

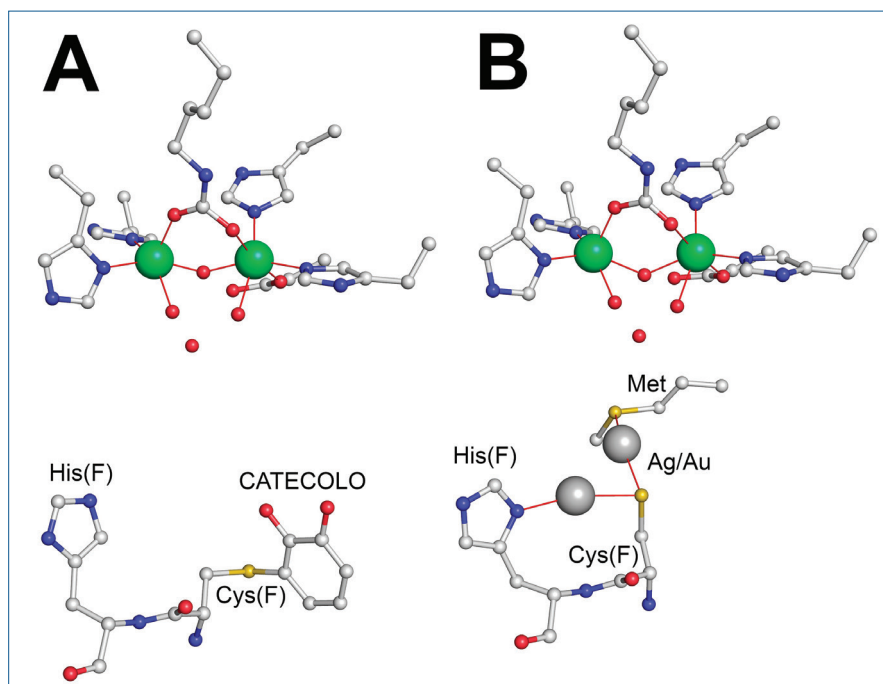
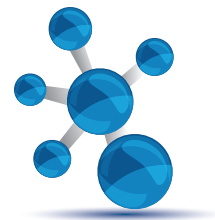


Fig. 4 - Cavità del sito attivo dell'ureasi inattivata da catecolo (A) e da ioni di metalli pesanti (B)

Conclusioni

La ricerca svolta dal sottoscritto all'interno del gruppo di ricerca coordinato dal prof. Stefano Ciurli ha portato alla delucidazione dei passaggi chiave del meccanismo catalitico dell'ureasi. La caratterizzazione del ruolo del flap mobile, che copre la cavità del sito attivo e che è direttamente coinvolto nel meccanismo catalitico, ha permesso l'individuazione di una strategia alternativa per l'inibizione dell'enzima, rendendo la modulazione dell'attività ureasica più efficiente. Ad oggi sono in fase di studio e caratterizzazione alcune molecole con doppia funzionalità, in grado sia di interagire con i due ioni Ni(II) che con la cisteina presente sul flap, in modo



che l'efficienza e la specificità di inibizione siano massimizzate, con l'obiettivo finale di minimizzare gli aspetti negativi dell'ureasi sull'ambiente e sulla salute umana.

Ringraziamenti

In questo articolo è descritto il frutto del lavoro svolto all'interno del Laboratorio di Chimica Bioinorganica - Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT), Università di Bologna. Il primo ringraziamento è per i componenti del gruppo di ricerca e il coordinatore, prof. Stefano Ciurli. Inoltre, un sentito ringraziamento va alla Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della Società Chimica Italiana e al suo Consiglio Direttivo per avermi conferito il Premio ItalFarmaco "Gastone De Santis" 2020.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R.P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1987, **51**, 22.
[2] H.L. Mobley and R. P. Hausinger, *Microbiol. Rev.*, 1989, **53**, 85.
[3] J.C. Rutherford, *PLoS Pathog.*, 2014, **10**, e1004062.
[4] S. Kiss, M. Simihaian, *Improving efficiency of urea fertilizers by inhibition of soil urease activity*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2002.
[5] C. Zhou *et al.*, *PLoS Pathog.*, 2019, **15**, e1007538.
[6] G. Young, D. Amid, V. Miller, *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 6487.
[7] W. Lin *et al.*, *Infect. Immun.*, 2012, **80**, 2771.
[8] B.J. Marshall and J. R. Warren, *Lancet*, 1984, **1**, 1311.
[9] WHO, <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>, 2017.
[10] F. Paulot, D.J. Jacob, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 903.
[11] N.E. Dixon *et al.*, *Can. J. Biochem.*, 1980, **58**, 1335.
[12] S. Benini *et al.*, *Structure*, 1999, **7**, 205.
[13] E. Jabri *et al.*, *Science*, 1995, **268**, 998.
[14] S. Benini *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3714.
[15] M.A. Pearson *et al.*, *Biochemistry*, 1997, **36**, 8164.
[16] P.A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Hausinger, *Acc. Chem. Res.*, 1997, **30**, 330.
[17] S. Benini *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 110.
[18] M.J. Todd, R.P. Hausinger, *Biochemistry*, 2000, **39**, 5389.
[19] S. Benini *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2014, **19**, 1243.
[20] L. Mazzei *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2019, **58**, 7415.
[21] L. Mazzei *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2019, **67**, 2127.
[22] L. Mazzei *et al.*, *Chemistry*, 2019, **25**, 12145.
[23] L. Mazzei, F. Musiani, S. Ciurli, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2020, **25**, 829.
[24] B. Krajewska, *J. Mol. Catal. B - Enzym.*, 2009, **59**, 9.
[25] L. Mazzei, F. Musiani, S. Ciurli, *The Biological Chemistry of Nickel*, The Royal Society of Chemistry, 2017, 60.
[26] L. Mazzei *et al.*, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **166**, 182.
[27] L. Mazzei *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2021, **60**, 6029.
[28] Z. P. Xiao *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5064.
[29] Z. P. Xiao *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **63**, 685.
[30] Z. P. Xiao *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 3703.
[31] Z. P. Xiao *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 10572.
[32] B. Krajewska, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2008, **23**, 535.
[33] L. Mazzei *et al.*, *Dalton Trans*, 2018, **47**, 8240.
[34] L. Mazzei *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, **10**, 564.

Urease, a Nickel-Enzyme

Urease, a nickel-dependent enzyme able to hydrolyze urea to ammonia and hydrogen carbonate, causes severe negative effects on human health, agriculture and environment. In this work recent results obtained by our research group are reported on the comprehension of the catalytic mechanism of urease and the development of a new inhibition strategy.