

453367

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA, BIOFISICA E CHIMICA  
DELLE MACROMOLECOLE

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA  
- IX CICLO -

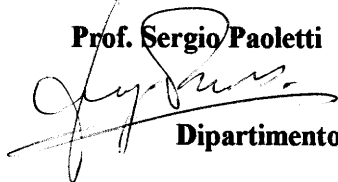
## LE TRANSGLICOSILAZIONI COME NUOVO APPROCCIO BIOTECNOLOGICO PER LA SINTESI DI OLIGOSACCARIDI BIOLOGICAMENTE ATTIVI

*Dottorando:* Dott. Amedeo Vetere 164

en

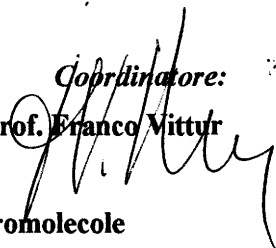
*Tutore:*

**Prof. Sergio Paoletti**



*Coprintore:*

**Prof. Franco Vittur**



Università degli Studi di Trieste

Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole

Trieste - 1997

DR 060/11

*Alla mia Famiglia  
e a  
Antimo D'Aniello, Giovanna Nardi e Sergio Paoletti  
"Maestri di Vita e di Scienza"*

# INDICE

INTRODUZIONE	1
Capitolo 1 Aspetti Generali	2
1.1 Premessa	2
1.2 Importanza degli Oligosaccaridi nelle Attività Biologiche	6
1.3 Bibliografia	9
Capitolo 2 Oligosaccaridi Semplici	9
2.1 Oligosaccaridi delle Piante	9
2.2 Frutto-Oligosaccaridi	13
2.3 Oligosaccaridi del Latte Umano	14
2.4 Bibliografia	19
Capitolo 3 Oligosaccaridi Complessi (Glicoconiugati)	20
3.1 Lectine Animali	20
3.2 Gruppi Sanguigni	22
3.3 Bibliografia	25
Capitolo 4 Strategie di Sintesi di Oligosaccaridi	26
4.1 Sintesi Chimica	26
4.2 Sintesi Enzimatica	27
4.2.1 Sintesi enzimatica mediante glicosiltransferasi	28
4.2.2 Sintesi enzimatica mediante glicosidasi	30
4.3 Bibliografia	38

Capitolo 5	Scopo della Tesi	41
5.1	Obiettivi	41
5.2	Bibliografia	43
PARTE SPERIMENTALE, RISULTATI E DISCUSSIONE		44
Capitolo 6	Sintesi del Trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	45
6.1	Premessa; Strategia e Stadi di Sintesi	45
6.2	Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi: Sintesi del Disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	47
6.2.1	Determinazione dell'attività enzimatica della $\beta$ -D-galattosidasi da <i>Bacillus circulans</i>	47
6.2.2	Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di transgalattosilazione	48
6.2.3	Cinetica di sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	48
6.2.4	Produzione del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	51
6.2.5	Determinazione della <i>N</i> -acetilglucosammina	52
6.2.6	Determinazione del glucosio	55
6.2.7	Determinazione del lattosio	57
6.3	Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi: Sintesi del Trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	58
6.3.1	Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di trans-sialilazione	58
6.3.2	Coltura delle cellule di <i>Escherichia coli</i> contenenti il plasmide pTS154cat per l'espressione della trans- sialidasi da <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
6.3.3	Estrazione e purificazione della trans-sialidasi	59
6.3.4	Determinazione dell'attività enzimatica della trans- sialidasi	62

6.3.5	Produzione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	64
6.3.5.1	Sintesi e purificazione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ottenuto utilizzando 3'-Sialil-Lattosio come donatore	64
6.3.5.2	Sintesi e purificazione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ottenuto utilizzando NeuAc-mU come donatore	65
6.4	Risultati e Discussione	67
6.4.1	Sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	67
6.4.2	Sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	70
6.5	Materiali e Strumenti	78
6.5.1	Materiali	78
6.5.2	Strumenti	78
6.6	Bibliografia	80

## Capitolo 7 Sintesi del Trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis<sup>x</sup> 82

7.1	Premessa; Strategia e Stadi di sintesi	82
7.2	Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi: Sintesi del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc	84
7.2.1	Determinazione dell'attività enzimatica della $\alpha$ -L-fucosidasi da <i>Aspergillus niger</i>	84
7.2.2	Tecniche di caratterizzazione del prodotto di transfucosilazione	87
7.2.3	Produzione del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc	87
7.3	Purificazione della $\beta$ -D-Galattosidasi da <i>Bacillus circulans</i>	89

7.4	Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi: Sintesi del Trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc	91
7.4.1	Determinazione dell'attività enzimatica della $\beta$ -D-galattosidasi da <i>Bacillus circulans</i>	91
7.4.2	Tecniche di caratterizzazione del prodotto di transgalattosilazione	91
7.4.3	Produzione del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis <sup>x</sup>	91
7.5	Risultati e Discussione	94
7.5.1	Sintesi del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc	94
7.5.2	Purificazione della $\beta$ -D-galattosidasi da <i>Bacillus circulans</i>	98
7.5.3	Sintesi e purificazione del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis <sup>x</sup>	99
7.6	Materiali e Strumenti	104
7.6.1	Materiali	104
7.6.2	Strumenti	104
7.7	Bibliografia	106
Capitolo 8	Sintesi del Tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis <sup>x</sup>	107
8.1	Premessa; Strategia di Sintesi	107
8.2	Metodologie Impiegate per la Sintesi del Tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis <sup>x</sup>	109
8.2.1	Tecniche di caratterizzazione del prodotto di trans-sialilazione	109
8.2.2	Produzione del tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis <sup>x</sup>	109

8.3	Risultati e Discussione	112
8.4	Materiali e Strumenti	115
	8.4.1 Materiali	115
	8.4.2 Strumenti	115
8.5	Bibliografia	116
Capitolo 9	Sintesi del Trisaccaride	
	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	117
9.1	Premessa; Strategie e Stadi di Sintesi	117
9.2	Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi; Sintesi del Disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	120
	9.2.1 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di transgalattosilazione	120
	9.2.2 Cinetica di sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	120
	9.2.3 Produzione del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	124
9.3	Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi; Sintesi del Trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	126
	9.3.1 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di trans-sialilazione	126
	9.3.2 Produzione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	126
9.4	Risultati e Discussione	128
	9.4.1 Sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	128
	9.4.2 Sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	137
9.5	Materiali e Strumenti	143
	9.5.1 Materiali	143

9.5.2	Strumenti	143
9.6	Bibliografia	144
CONCLUSIONI		145
Capitolo 10 Conclusioni		141
10.1	Risultati Raggiunti	146
10.2	Prospettive di Sviluppo	146
10.3	Bibliografia	150
Elenco delle Abbreviazioni Usate		151
Elenco delle Pubblicazioni Relative al Dottorato		156
Elenco delle Comunicazioni a Congressi Relative al Dottorato		157
Ringraziamenti		159



# **INTRODUZIONE**

# Capitolo 1

## Aspetti Generali

### 1.1. Premessa

I carboidrati costituiscono un ampio gruppo di composti di grande importanza sia dal punto di vista qualitativo, che quantitativo. Essi infatti costituiscono la classe di molecole organiche più abbondante in natura.

Per molto tempo l'attenzione rivolta ai carboidrati è stata esclusivamente limitata alla loro fondamentale *importanza metabolica*, in quanto essi rappresentano la principale, e in alcuni casi l'unica, fonte da cui le cellule ricavano l'energia, e per il loro importante *ruolo strutturale*. Ad esempio, sono tipici omopolisaccaridi strutturali la *cellulosa*, il principale componente della parete delle cellule vegetali, e la *chitina* dell'esoscheletro degli invertebrati. In maniera analoga le pareti batteriche sono costituite da polisaccaridi associati a peptidi (Sharon, 1975).

In realtà la distribuzione funzionale dei carboidrati è molto più ubiquitaria; infatti sono presenti in numerose molecole biologicamente importanti quali gli acidi nucleici, le glicoproteine, i glicolipidi, molti coenzimi ed antibiotici e mediano importanti processi quali il riconoscimento cellulare e la comunicazione intercellulare (Sharon, 1980).

L'avvento di tecniche preparative più efficienti e di sistemi analitici più sensibili come la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), la spettrometria di massa (MS) e l'analisi diffrattometrica con i raggi X hanno permesso un notevole miglioramento delle tecniche di caratterizzazione che hanno consentito, e consentono tuttora, di isolare ed identificare nuovi carboidrati (Sharon, 1980).

Il legame acetalico che si forma per condensazione dell'ossidrile semiacetalico del carbonio anomero di un carboidrato con un alcol (come ad esempio un altro carboidrato), un'ammina o un tiolo porta alla formazione del *legame glicosidico* e si parlerà quindi di legame O-glicosidico, N-glicosidico e S-glicosidico rispettivamente. Il carbonio anomero, se è coinvolto nel legame glicosidico, non è libero di stereoisomerizzare, ma è fisso nella configurazione propria della molecola, mentre nella forma semiacetalica (estremità riducente), è in equilibrio tra le strutture  $\alpha$ ,  $\beta$  ed a catena aperta (Moran et al., 1996).

In un disaccaride, il carbonio anomero di un monosaccaride può essere legato con uno qualsiasi dei diversi gruppi ossidrilici dell'altro. Pertanto, quando si

considera la struttura di un oligosaccaride è importante indicare non solo i tipi di monosaccaridi costituenti, ma anche quali ossidrili siano coinvolti nella formazione dei legami glicosidici (Fig. 1.1).

Le forme oligo- e polimeriche dei carboidrati normalmente presentano una direzionalità basata sulle estremità riducenti e non riducenti. Un polimero lineare presenta un'unica estremità riducente (carbonio anomero libero) e una non riducente; un polisaccaride ramificato ha numerose estremità non riducenti, ma una sola estremità riducente. Comunemente si indica una struttura oligo- o polisaccaridica a partire dalla estremità non riducente (Moran et al., 1996). Esistono comunque importanti forme disaccaridiche che coinvolgono il carbonio anomero di ciascun zucchero (es. trealosio, saccarosio, Fig. 1.1).

I polisaccaridi, a differenza delle proteine le cui strutture primarie sono codificate dal genoma e la cui lunghezza è specificatamente determinata, sono biologicamente prodotti per semplice addizione di residui di particolari monosaccaridi e/o oligosaccaridi, che possono variare nell'ambito di molecole molto simili. Pertanto, la struttura primaria di un polisaccaride, anche complesso, è sempre riconducibile ad una o più strutture oligosaccaridiche componenti.

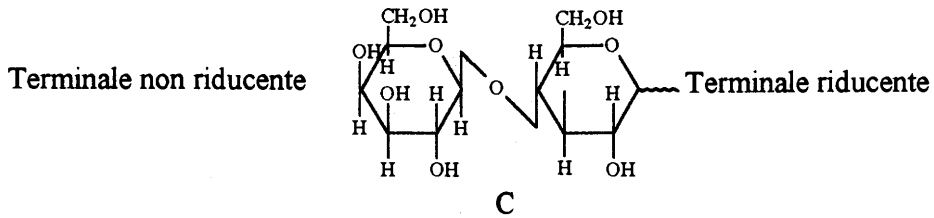
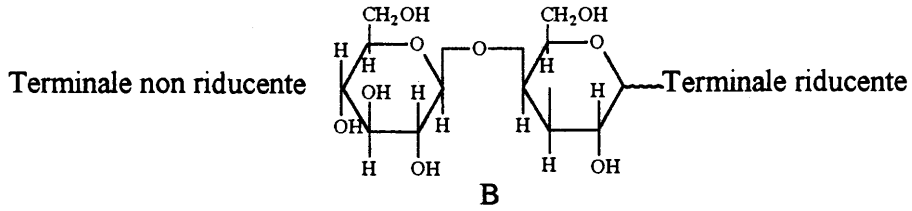
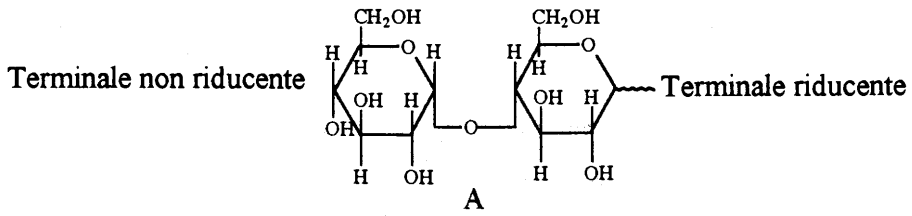
Ad esempio, il più comune polisaccaride di deposito, mediante il quale vengono conservate le molecole di glucosio nelle piante e nei funghi è l'amido, mentre negli animali è il glicogeno. L'amido è presente come miscela di un polimero lineare (amilosio) e di uno ramificato (amilopectina). L'amilosio è costituito dal concatenamento di residui di D-glucosio uniti con legami glicosidici  $\alpha$ 1-4 riconducibile al *disaccaride maltosio*. L'amilopectina è un polimero ramificato che, oltre ai suddetti legami  $\alpha$ 1-4 presenta punti di ramificazione con legami  $\alpha$ 1-6.

Il glicogeno è un polimero analogo all'amilopectina caratterizzato dalla presenza di un numero maggiore di ramificazioni e nel quale le catene laterali sono più corte.

La cellulosa è un omopolisaccaride strutturale lineare di residui di D-glucosio uniti da legami  $\beta$ 1-4, riconducibile al *disaccaride cellobiosio*.

I proteoglicani sono strutture macromolecolari costituite da uno scheletro proteico a cui sono legate catene di glicosaminoglicani di diversa struttura. Queste molecole sono ampiamente distribuite nella matrice extracellulare, dove svolgono diverse funzioni importanti: contribuiscono a conservare la forma degli organi ed interagiscono con gli altri componenti della matrice, quali il collagene, l'elastina e la fibronectina (Moran et al., 1996).

DISACCARIDI RIDUCENTI



DISACCARIDI NON RIDUCENTI

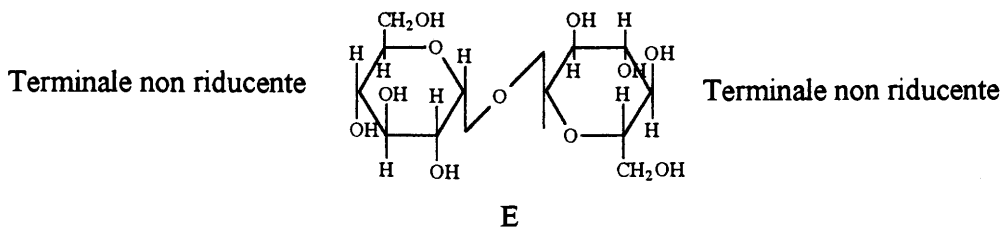
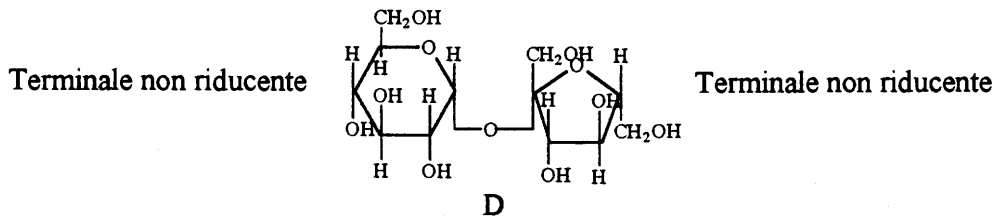


Fig. 1.1 Struttura del 4-O- $\alpha$ -D-Glucopiranosil-D-glucosio (Maltosio) (A), del 4-O- $\beta$ -D-Glucopiranosil-D-glucosio (Cellobiosio) (B), del 4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-D-glucosio (Lattosio) (C), del  $\beta$ -D-Fruttofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranoside (Saccarosio) (D) e del  $\alpha$ -D-Glucopiranosil- $\alpha$ -D-Glucopiranoside (Trealosio) (E)

Molto più diffuse e molto più note per le loro attività sono le glicoproteine. Si tratta di strutture ubiquitarie; comprendono composti molto diversi da un punto di vista sia funzionale che strutturale, tra le quali possiamo menzionare proteine plasmatiche, proteine di membrana, gli anticorpi, le lectine, alcuni enzimi e numerosi ormoni (Sairam, 1989). Nella loro organizzazione generale si individua la componente proteica predominante cui sono unite *catene oligosaccaridiche*.

Le glicoproteine sono normalmente classificate in base alla natura del legame che unisce la parte glucidica alla proteina. Le due classi principali presentano: 1) un legame O-glicosidico, tra l'*N*-acetilgalattosammina e il gruppo ossidrilico di un residuo di serina o di treonina; 2) un legame N-glicosidico, tra l'*N*-acetilglucosammina e l'azoto del gruppo ammidico di un'asparagina (Moran et al., 1996), (Fig. 1.2). Esistono casi di glicoproteine contenenti entrambi i tipi di legame relativi a componenti glicidiche diverse.

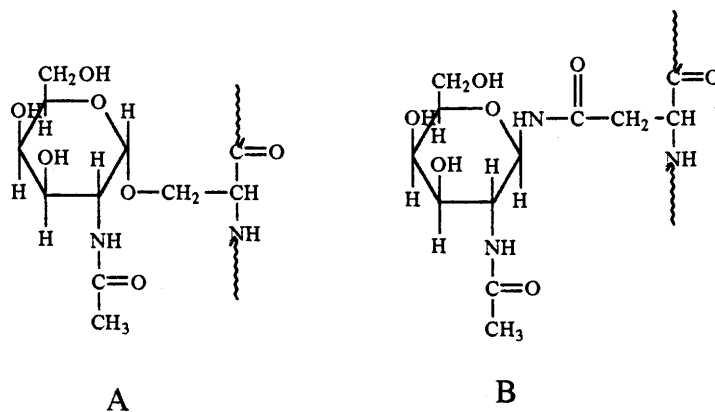


Fig. 1.2 Esempio di legame O-glicosidico (A) e N-glicosidico (B)

Una caratteristica generale, che si può desumere da quanto detto fino ad ora, è la notevole variabilità strutturale e funzionale dei carboidrati complessi conferita loro dalla "quasi" equivalenza dei gruppi ossidrilici (non anomerici) di un monosaccaride che possono reagire in modo molto simile per formare un legame glicosidico. Ad esempio due monosaccaridi identici possono formare 11 disaccaridi diversi, mentre due  $\alpha$ -amminoacidi possono originare solo un unico  $\alpha$ -dipeptide. Quindi un numero anche piccolo di monosaccaridi può dare luogo ad una grande varietà di composti diversi (Sharon e Lis, 1993) (Tabella I).

Questa straordinaria variabilità rende gli oligosaccaridi vettori estremamente efficaci di informazione: le "parole" costruite con essi differiscono per il tipo di unità presente, per le differenze nei legami che li uniscono, per la

presenza o meno di ramificazioni e, infine, per la presenza o meno di sostituenti non saccaridici (gruppi solfato, fosfato, piruvici, ecc.) (Sharon e Lis, 1993).

Tabella I

Prodotto	Composizione	Peptide	Derivati saccaridici
omotetramero	Z <sub>4</sub>	1	1'424
omopentamero	Z <sub>5</sub>	1	17'872
eterodimero	YZ	2	20
eterotrimero	XYZ	6	720
eterotetramero	WXYZ	24	34'560
eteropentamero	VWXYZ	120	214'640

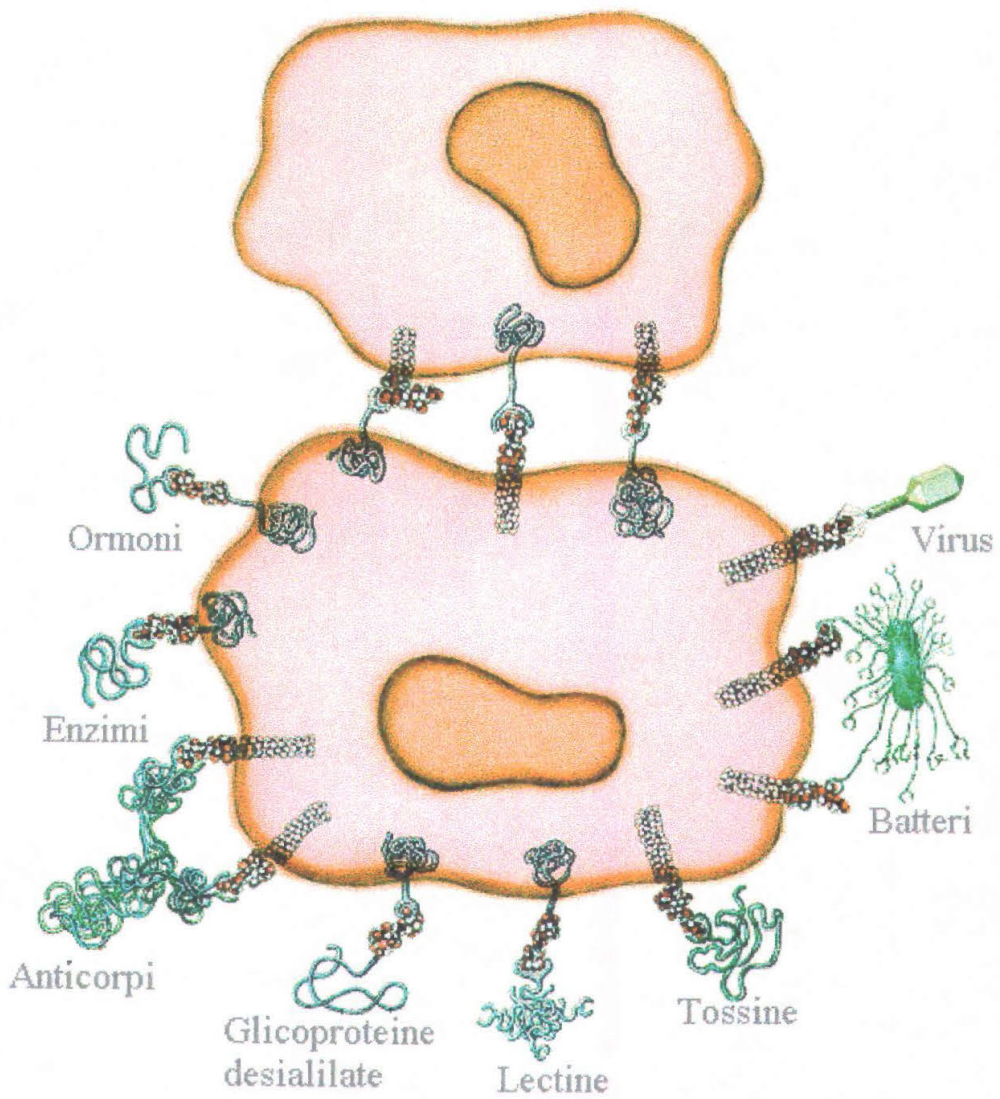
## 1.2 Importanza degli Oligosaccaridi nelle Attività Biologiche

Il ruolo biologico degli oligosaccaridi è certamente molteplice. Da un punto di vista puramente *strutturale* porzioni oligosaccaridiche sono coinvolte nel corretto ripiegamento dei polipeptidi a livello del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e nel successivo mantenimento conformazionale; infatti le proteine erroneamente glicosilate non si ripiegano in maniera corretta e vengono di conseguenza degradate (Varki, 1993). Diversi meccanismi di regolazione del *catabolismo* epatico delle *glicoproteine* plasmatiche e degli ormoni glicoproteici sono mediati da oligosaccaridi. Per esempio gli asialo-recettori epatici riconoscono le glicoproteine che espongono all'estremità delle loro porzioni saccaridiche dei residui di galattosio smascherati dopo la rimozione dei residui di acido sialico (Opdenakker et al., 1993). Le glicoproteine così riconosciute vengono rimosse dal circolo, trasferite ai lisosomi e degradate. In generale, nelle glicoproteine, la presenza di oligosaccaridi conferisce una maggiore resistenza all'attacco delle proteasi o perchè ne incrementano la rigidità strutturale, o perchè gli zuccheri proteggono stericamente i siti soggetti all'azione di questi enzimi (Sharon e Lis, 1993). In generale la glicosilazione è un mezzo per diversificare le proteine permettendo di rispondere rapidamente ai cambiamenti ambientali (Opdenakker et al., 1993).

Da un punto di vista più *funzionale* certi oligosaccaridi possono agire come *recettori* altamente specifici per una varietà di virus, batteri e parassiti, oppure come recettori di molte tossine vegetali e batteriche o servire come *antigeni* in reazioni auto- e alloimmuni (Varki, 1993). Le relazioni simbiotiche tra alcuni microrganismi e i loro ospiti sembrano essere mediate dall'interazione tra specifici oligosaccaridi che permettono un riconoscimento interspecifico tra gli organismi coinvolti (Varki, 1993). Le cellule riconoscono la loro omologia grazie a coppie di strutture complementari di natura saccaridica presenti sulle loro superfici; cioè una struttura presente su una cellula contiene informazioni che vengono decifrate da strutture corrispondenti e complementari presenti sull'altra cellula. Tutte le cellule hanno un rivestimento costituito da carboidrati complessi sotto forma di glicoproteine o di glicolipidi. Queste strutture di superficie vanno incontro a varie modificazioni durante l'ontogenesi e la differenziazione cellulare, ma anche nel corso di varie manifestazioni patologiche (Fig. 1.3).

Data la notevole importanza *dei carboidrati nei processi di riconoscimento* verrà preliminarmente esaminata una serie di esempi specifici di tali processi che dipendono dalla presenza di carboidrati su una o entrambe le controparti coinvolte. In particolare verranno presi in esame una serie di esempi riguardanti il ruolo biologico di oligosaccaridi liberi, cioè molecole che non sono parte di strutture macromolecolari più complesse.

Verranno infine considerate le lectine animali e i gruppi sanguigni quali esempi di oligosaccaridi complessi.



*Fig. 1.3 Rappresentazione schematica di alcune delle interazioni che coinvolgono carboidrati*



### 1.3 Bibliografia

Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Horton, H.E., Ochs, R.S. e Rawn, J.D. (1996)  
*Biochemistry* McGraw-Hill

Opdenaker, G., Rudd, P.M., Ponting, C.P. e Dwek, R.A. (1993) *FASEB J.* 7:  
1330-1337

Sharon, N. (1975) *Complex Carbohydrates, their Chemistry, Biosynthesis, and  
Functions* Addison-Wesley Publishing Company

Sharon, N. (1980) *Sc. Amer.* 243: 80-97

Sharon, N. e Lis, H. (1993) *Sc. Amer.* 268: 80-97

Varki, A. (1993) *Glycobiology* 3: 97-130

## Capitolo 2 Oligosaccaridi Semplici

### 2.1 Oligosaccaridi delle Piante

Il ruolo di particolari oligosaccaridi come modulatori di diverse attività biologiche delle piante è noto da almeno un decennio. Una pianta si difende dalle infezioni batteriche o da quelle fungine producendo degli antibiotici (le fitoalexine). Non essendo molecole proteiche, le fitoalexine non sono sotto il diretto controllo genetico, mentre lo sono gli enzimi responsabili della loro sintesi. Il problema iniziale da chiarire per la comprensione del meccanismo di difesa era quello di stabilire quale/i fossero i "messaggi" che inducevano l'espressione di questi geni e la conseguente produzione di antibiotici. Il coinvolgimento di composti oligosaccaridici in questo fenomeno è stata la conseguenza dell'osservazione che la pianta della soia riconosceva un oligosaccaride della parete del fungo da cui era stata infettata. Si stabilì in seguito che le dimensioni minime di questa "oligosaccarina", per essere funzionale, erano quelle di un eptasaccaride. Da un punto di vista strutturale si tratta di un eptasaccaride di  $\beta$ -D-glucosio. Tuttavia queste informazioni non sono di per sé sufficienti, in quanto le combinazioni di sette residui di glucosio possono dare origine a 300 diversi tipi di oligosaccaridi dei quali solo uno è quello attivo. La struttura biologicamente attiva di questo oligosaccaride è riportata in Fig. 2.1

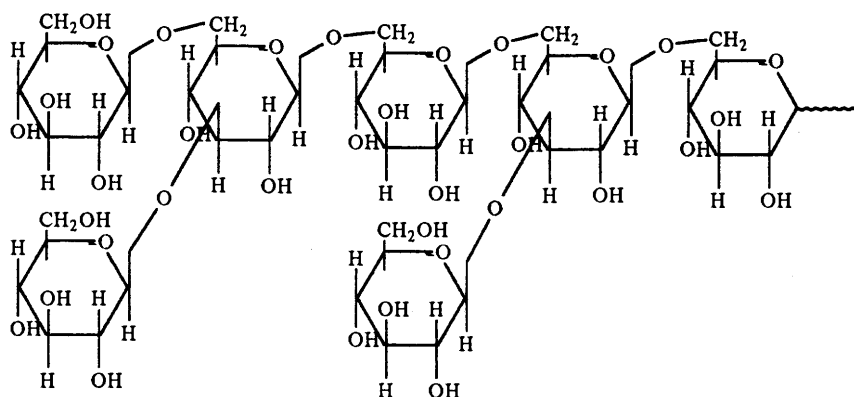


Fig. 2.1 Struttura dell'eptasaccaride induttore della sintesi delle fitoalexine

Strutture analoghe che differiscono solo per la posizione dei due residui di glucosio in catena laterale danno origine a molecole completamente inattive (Sharp et al, 1984).

La specificità di questa oligosaccarina è così elevata che sono sufficienti 10 ng di composto per indurre la sintesi di una quantità sufficiente di fitoalexina (Sharp et al, 1984). In maniera del tutto analoga si pone il problema nel caso di infezioni batteriche, le quali sono in grado, altrettanto efficacemente, di indurre la produzione di fitoalexine. La differenza, rispetto all'infezione fungina, è che l'oligosaccarina non è un prodotto del patogeno, ma dell'ospite stesso. In altre parole il batterio induce l'azione di alcuni enzimi glicolitici della pianta in grado di idrolizzare parte della sua parete cellulare liberando una oligosaccarina, segnatamente un dodeca- $\alpha$ -D-1,4-galatturonide (Nothnagel et al., 1983). In realtà il meccanismo è complicato dal fatto che entrambi gli eventi possono avvenire, cioè vi può essere produzione di oligosaccarine da parte del patogeno, indotta da enzimi dell'ospite, così come produzione di oligosaccarine dell'ospite stesso indotte da enzimi glicolitici propri. Il vantaggio sarà un'azione sinergica di entrambe le oligosaccarine riducendo ulteriormente la loro quantità totale necessaria per la risposta difensiva.

Una forma di difesa particolarmente diffusa tra le piante è la necrosi dello strato di cellule più vicino all'invasione microbica. Questa cosiddetta "*Risposta Ipersensibile da Resistenza*" è una strategia usata dalle piante per impedire l'ulteriore infezione per un tempo abbastanza lungo da consentire l'attivazione di un insieme di meccanismi che porteranno alla sintesi di quelle oligosaccarine che indurranno la sintesi di fitoalexine. Sembra che la "*Risposta Ipersensibile da Resistenza*" sia indotta essa stessa da oligosaccarine, come dimostrerebbe il fatto che sono state isolate oligosaccarine che possono provocare la morte delle cellule della pianta stessa.

Oltre a queste attività più propriamente difensive è stato osservato che le oligosaccarine possono funzionare anche come *regolatori* di attività come la *crescita*, lo *sviluppo* e la *riproduzione delle piante*. Ad esempio, è stato visto che un nonasaccaride derivato dallo xiloglucano, un polisaccaride presente nella parete cellulare delle piante, od oligosaccaridi strettamente correlati ad esso, inibisce la crescita indotta dall'auxina.

La molteplicità e la notevole specificità di azione delle oligosaccarine induce a pensare che questi composti rappresentino un tassello nella gerarchia del *sistema ormonale della pianta* e probabilmente potranno essere usate, da un punto di vista biotecnologico, ad esempio per indurre la resistenza "naturale" alle

infezioni e/o per indurre la crescita e il differenziamento. I complessi processi di segnale indotti dagli oligosaccaridi biologicamente attivi delle piante non sono ancora del tutto chiari. Tuttavia sono disponibili alcune informazioni. Ad esempio sembra che alcune oligosaccarine, in particolare gli oligogalatturonidi, inducano l'attivazione dei geni della difesa tramite la via dell'acido ottadecanoico (Doares et al., 1995) che incrementa i livelli di acido jasmonico, inducendo la trascrizione dei geni della difesa (Doares et al., 1995).

Parallelamente agli studi sulle oligosaccarine come segnali di regolazione di diversi eventi biologici, quelli relativi alle "comunicazioni chimiche" alla base della simbiosi tra batteri del suolo azoto-fissatori (*Rhizobia*) e le leguminose hanno portato alla scoperta di una nuova classe di oligosaccaridi biologicamente attivi, i cosiddetti fattori Nod (NFs) o lipo-chito-oligosaccaridi (LCOs). Queste molecole regolano gli eventi iniziali della simbiosi tra *Rhizobia* e leguminose. Essi inducono importanti modificazioni morfologiche delle radici e la comparsa di nuovi organi, i noduli (Dénarié et al., 1996). Il primo contatto tra i *Rhizobia* e l'ospite avviene a livello delle cellule epidermiche della superficie della radice dove si verifica una deformazione della radice stessa. È stato osservato che gli NF ad una concentrazione nano- o femtomolare sono in grado di indurre la deformazione della radice. La via biosintetica degli NF è ormai ben chiara. I geni *nod* sono raggruppati in tre categorie: i geni regolatori, comuni a tutti i *Rhizobia* e i geni specifici. I geni *nodABC*, comuni a tutti i *Rhizobia*, codificano per gli enzimi responsabili della sintesi dello scheletro di base dei lipochito-oligosaccaridi (Geremia et al., 1994; Mergaert et al., 1995). In particolare la proteina NodC è risultata essere una *N*-acetilglucosaminiltransferasi responsabile della sintesi di chito-oligomeri fino a cinque residui utilizzando come substrato UDP-GlcNAc. Un aspetto molto interessante da sottolineare è che la sintesi delle oligosaccarine è il risultato dell'attività di enzimi glicolitici, mentre quella degli NF è una sintesi *de-novo* di tipo classico basata sull'uso di glicosiltransferasi e di NDP-zuccheri. Dopo la loro sintesi gli NF vanno incontro a modificazioni tra cui acilazione, deacilazioni, solfatazioni, ecc., rendendo-specie specifica la simbiosi dei *Rhizobia*. Con un interessante meccanismo autoregolativo gli NF sono in grado anche di indurre l'attivazione di chitinasi dall'ospite, le quali idrolizzeranno lo scheletro chitinoso dei chito-oligomeri. In questo modo la pianta può controllare la composizione degli NF (Staehelin et al., 1994).

Il meccanismo d'azione degli NF è estremamente rapido (le prime modificazioni si verificano entro i primi cinque minuti) ed a livelli di concentrazioni piuttosto basse, tutto ciò fa pensare ad un meccanismo di riconoscimento basato su

recettori ad alta affinità. Ad esempio un recettore per gli NF è stato isolato da *Medicago truncatula* (Bono et al., 1995). Il legame a questo recettore non sembra dipendere da nessun particolare tipo di modificazione della componente saccaridica. Il meccanismo di trasduzione del segnale indotto dagli NF non è ancora ben chiaro. In particolare non è noto il ruolo della acilazione e/o deacilazione.

In conclusione gli oligosaccaridi delle piante appaiono svolgere ruoli di fondamentale importanza da un punto di vista biologico, quali la regolazione delle interazioni pianta-patogeno e/o pianta-simbionte. Ancora molto rimane da capire in particolare per quanto concerne i meccanismi di trasduzione del segnale; tuttavia appare sorprendente, da un punto di vista biologico, il notevole potenziale informativo portato dagli oligosaccaridi nel mondo vegetale.

### 2.2 Frutto-oligosaccaridi

I carboidrati dal punto di vista nutrizionale sono classificati come *digeribili* e *non digeribili* in base al loro comportamento nell'intestino tenue. Quelli digeribili sono utilizzati come fonti di energia, e sono digeriti e assorbiti dall'intestino. Gli oligosaccaridi non digeribili, cioè le fibre, passano integri attraverso l'intestino tenue e giungono nell'intestino crasso dove sono utilizzati dai microrganismi della flora batterica intestinale producendo acido acetico, acido lattico e acidi grassi a catena corta, abbassando il pH del tratto digestivo e proteggendolo dalla crescita eccessiva di batteri nocivi. Studi recenti hanno evidenziato l'importanza delle fibre dietetiche non digeribili nella prevenzione dell'ipercolesterolemia e del cancro al colon.

Molti oligosaccaridi biologicamente attivi sono prodotti commercialmente per usi alimentari (Hidaka et al., 1991). Tra questi i frutto-oligosaccaridi (FOSs) hanno suscitato particolare interesse da oltre un ventennio. Strutturalmente possono essere considerati oligosaccaridi del fruttosio, di tipo *inulinico*, con legami  $\beta$ 2-1 e con un residuo di glucosio all'estremità riducente della catena. Si tratta di una serie omologa di oligosaccaridi derivati del saccarosio con formula generale  $GF_n$  che comprendono essenzialmente 1-kestoso ( $GF_2$ ), nistoso ( $GF_3$ ) e 1F-fruttofuranosil-nistoso ( $GF_4$ ). I FOS sono prodotti enzimatici ottenuti per tansfruttosilazione catalizzata da vari enzimi. Questi ultimi possono essere suddivisi in due grandi categorie: enzimi di origine vegetale e quelli di origine microbica. La nomenclatura di questi enzimi è ancora dibattuta. Alcuni indicano questi enzimi

come  $\beta$ -D-fruttofuranosidasi altri fruttosiltransferasi. La resa quantitativa dei FOS varia in relazione alla fonte di enzima; è bassa per gli enzimi dalle piante e strettamente correlata alle condizioni stagionali. Molto più interessanti sono le rese di FOS da enzimi da microrganismi, in particolare dai funghi *Aureobasidium* sp e da *Aspergillus niger*. Il ruolo dei FOS nei processi metabolici dei funghi sembra essere duplice. Da un lato sembra servire per l'eliminazione del fruttosio che, quando presente ad elevate concentrazioni insieme al glucosio, provoca inibizione della crescita; dall'altro lato questi oligosaccaridi servono come deposito di glucosio (Won Yun, 1996).

I FOS mostrano una serie interessanti di proprietà. Hanno un basso potere dolcificante (circa un terzo di quello del saccarosio), hanno un basso livello calorico, perchè non idrolizzati dagli enzimi digestivi e non sono cariogenici perchè non possono essere utilizzati da *Streptococcus mutans*, che forma gli acidi e i  $\beta$ -glucani insolubili responsabili della carie dentaria. Infine, ma non ultimo, i FOS stimolano la crescita dei bifidobatteri e hanno uno spiccato effetto ipocolesterolizzante (Hidaka et al., 1991).

### 2.3 Oligosaccaridi del Latte Umano

Il latte umano contiene molte glicoproteine, glicolipidi e oligosaccaridi che si trovano solo in questa secrezione, in particolare nei primi stadi dell'allattamento (Kobata, 1977). Il latte umano comparato con quello di altre specie è unico rispetto al suo contenuto di oligosaccaridi complessi. Per molti anni si era pensato che questi componenti giocassero un ruolo solo nello sviluppo di una specifica flora batterica intestinale nei neonati allattati al seno. In realtà le loro attività sono molto più complesse. Innanzitutto è stato osservato che il pool di anticorpi fornito al neonato dalla madre non è tale da giustificare una così alta protezione nei confronti dei microrganismi patogeni, ed infatti, oltre ai *componenti immunologici*, devono esistere altri fattori non immunologici che si pensa agiscano come *agenti anti-infettivi* per il lattante (Kunz e Rudloff, 1993). Diversi dati sperimentali tendono a dimostrare che proprio gli oligosaccaridi liberi del latte umano sono potenti inibitori dell'adesione batterica alla superficie cellulare.

I maggiori componenti oligosaccaridici del latte umano sono derivati del *lattosio* a cui vengono aggiunti, all'estremità riducente, residui di *GlcNac* con legami  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 1-6, che vengono ulteriormente allungati con residui di *Gal* con

legame  $\beta$ 1-3,  $\beta$ 1-4. In questo modo si ottiene una serie di strutture base (Tabella III).

Ulteriori variazioni strutturali comportano *fucosilazione* e *sialilazione* di queste strutture (Tabella IV). Come appare evidente i principali componenti oligosaccaridici sono lattosio e latte-*N*-tetraosio con i loro derivati mono- e difucosilati e i derivati fucosilati di latte-*N*-esaosi e latte-*N*-ottaosi. Tra i derivati sialilati si trovano il sialil-lattosio, le tre forme del latte-*N*-tetraosio (LNT *a*, *b* e *c*) e il disialil-*N*-tetraosio. Spesso molti di questi oligosaccaridi sono presenti in quantità paragonabili a quelle delle proteine del latte. Ad esempio il latte-*N*-tetraosio e i suoi derivati fucosilati rappresentano circa il 50-70% di tutti gli oligosaccaridi del latte (Tabella V). L'importanza biologica della componente oligosaccaridica del latte umano è nota sin dal 1926 quando, stabilita la predominanza del *Bifidobacterium bifidum* nella flora intestinale dei neonati allattati al seno, si scoprì che gli oligosaccaridi contenenti residui di GlcNAc, quindi gran parte degli oligosaccaridi del latte, agiscono da fattori di crescita per questi microrganismi (Schönfeld, 1926). La presenza di questo e di altri bifidobatteri contribuisce a mantenere un pH ambientale piuttosto acido sfavorevole per lo sviluppo di numerosi batteri patogeni. Oltre a questo effetto indiretto degli oligosaccaridi del latte umano ne sono stati osservati altri molto più diretti. L'adesione batterica alla cellula bersaglio è noto essere un fenomeno mediato da un'interazione ligando-recettore. Se si confronta la struttura dei recettori normalmente utilizzati da alcuni patogeni, si può osservare la notevole somiglianza tra questi e molti degli oligosaccaridi presenti nel latte umano. In termini più concreti è stato osservato che gli oligosaccaridi del latte umano possono inibire l'adesione specifica di *Haemophilus influenzae*, responsabile del 70% delle otiti nei neonati, a livello delle cellule epiteliali della faringe (Andersson et al., 1986). Allo stesso modo è stato osservato che gli oligosaccaridi sialilati sono in grado di impedire il legame di quei ceppi di *Escherichia coli* che provocano la meningite e la sepsi neonatale (Parkkinen et al. 1983; Korhonen et al., 1985). In definitiva la somiglianza strutturale tra i recettori della superficie delle cellule epiteliali e gli oligosaccaridi del latte umano rende evidente l'importanza biologica di queste molecole nel prevenire le infezioni da parte di diversi microrganismi (Kunz e Rudloff, 1993). Questo tipo di considerazione, limitata alla protezione dei neonati, può essere estesa in termini più generali immaginando una serie di strategie terapeutiche e quindi una serie di *oligosaccaridi come agenti anti-infettivi* (Zopf e Roth, 1996), basate sull'uso di molecole di sintesi capaci di mimare la "chiave" del meccanismo "chiave-serratura" che è alla base dell'interazione oligosaccaride-recettore. I vantaggi sono molteplici: gli oligosaccaridi sono molto

solubili e stabili al trattamento termico; a differenza delle proteine, possono essere sterilizzati senza perdere la loro attività, la loro omologia con le strutture naturali rende praticamente nullo il rischio di tossicità. Oltre al loro utilizzo di per sé, questi agenti terapeutici potrebbero essere utilizzati come *coadiuvanti* dell'attività degli *antibiotici* classici, riducendo la dose media di utilizzo (Zopf e Roth, 1996).

Tabella III. Strutture "core" degli oligosaccaridi del latte umano

Nome	Struttura
Lattosio	Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -tetraoso (tipo 1)	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -neo-tetraoso (tipo 2)	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -esaoso	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6   Gal $\beta$ 1-4Glc   Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3
Latto- <i>N</i> -neo-esaoso	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6   Gal $\beta$ 1-4Glc   Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3
Latto- <i>N</i> -ottaoso	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6   Gal $\beta$ 1-4Glc   Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3
Latto- <i>N</i> -neo-ottaoso	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6   Gal $\beta$ 1-4Glc   Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3



Tabella IV. Oligosaccaridi complessi del latte umano

Nome	Struttura
2'-Fuc-lattosio	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc
3-Fuc-lattosio	Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]Glc
3'-NeuAc-3-Fuc-lattosio	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-4]Glc
Difucosil-lattosio	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-pentaosio I	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-pentaosio II	Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-pentaosio III	Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-pentaosio V	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-esaosio I	Fuc $\alpha$ 1-2GGal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Latto- <i>N</i> -fuco-esaosio II	Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]Glc
Sialil $\alpha$ 2-6lattosio	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Sialil $\alpha$ 2-3lattosio	NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4Glc
Sialil-latto- <i>N</i> -tetraosio a	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Sialil-latto- <i>N</i> -tetraosio b	Gal $\beta$ 1-3[NeuAc $\alpha$ 2-6]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Sialil-latto- <i>N</i> -tetraosio c	NeuAc $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc

Tabella V. Contenuto, in g/l, di oligosaccaridi del latte umano

	g/l
Lattosio	55-70
Latto-N-tetraosio	0.5-1.5
Latto-N-fucopentaosio I	1.0-1.5
Latto-N-fucopentaosio II	0.5-1.0
Sialil $\alpha$ 2-6lattosio	0.3-0.5
Sialil $\alpha$ 2-3lattosio	0.1-0.3
Sialil $\alpha$ -latto-N-tetraosio a	0.03-0.2
Sialil $\alpha$ -latto-N-tetraosio c	0.1-0.6
Sialil $\gamma$ $\alpha$ -latto-N-tetraosio a	0.2-0.6
Oligosaccaridi totali	3.0-6.0

## 2.4 Bibliografia

- Andersson, B., Porras, O., Hanson, L.A., Lagergard, T. e Svanborg Edén, C. (1986) *J. Infect. Dis.* 153: 232-237
- Bono, J.J., Riond, J., Nicolaou, K.C., Bockovich, N.J., Estevez, V.A., Cullimore, J.V. e Raneiva, R. (1995) *Plant. J.* 7: 253-260
- Dénarié, J., Debellé, F. e Promé, J.C. (1996) *Ann. Rev. Biochem.* 65: 503-535
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W. e Ryan, C.A. (1995) *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 4095-4098
- Geremia, R.A., Margaert, P., Geelen, D., Van Montagu, M. e Holsters, M. (1994) *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2669-2673
- Hidaka, H., Hirayama, M. e Yamada, K. (1991) *J. Carbohydr. Chem.* 10: 509-522
- Kobata, A. (1977) in *The Glycoconjugates* (Horowitz, M.I. e Pigman, W. Eds.) Academic Press, Vol. I, pp 423-440
- Korhonen, T.K., Valtonen, M.V. e Parkkinen, (1985) *J. Infect. Immun.* 48: 486-491
- Kunz, C. e Rudloff, S. (1993) *Acta Paediatr.* 82: 903-912
- Margaert, P., D'Haese, W., Geelen, D., Promé, D., Van Montagu, M., Geremia, R., Promé, J.C. e Holsters, M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 29217-29223
- Nothnagel, E.A., McNiel, M. Albersheim, P. e Dell, A. (1983) *Plant Physiol.* 71: 916-926
- Parkkinen, J., Finne, J., Achtmann, M., Vaisanen, V. e Korhonen, T.K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111: 456-461
- Schönfeld, H. (1926) *Jahrb Kinderheilkd* 113: 19-60
- Sharp, J.K., McNiel, M. e Albersheim, P. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 11321-11336
- Staelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Mellor, R.B., Boller, T. e Kondorosi, A. (1994) *Plant J.* 5: 319-330
- Won, Y.J. (1996) *Enz. Microb. Technol.* 34: 521-546
- Zopf, D. e Roth, S. (1996) *The Lancet* 347: 1017-1021

## Capitolo 3 Oligosaccaridi Complessi (Glicoconiugati)

### 3.1 Lectine animali

Le lectine sono proteine, prive di attività enzimatica, a cui sono legati oligosaccaridi. Gli animali producono una gran varietà di lectine sia cellulari (di superficie) che solubili. Il ruolo delle lectine è quello di riconoscere le strutture saccaridiche proprie dell'animale (Drickamer e Taylor, 1993). La maggior parte delle lectine animali si presentano come strutture proteiche alquanto complesse costituite da vari tipi di moduli. La regione responsabile del legame con i carboidrati si presenta molto costante. Le lectine animali vengono raggruppate sulla base delle similarità del "*Carbohydrate-Recognition Domain (CRD)*". Fino ad ora sono stati individuati tre principali tipi di CRD. I CRD di *tipo P* delle *Pentraxine* che legano in maniera selettiva il mannosio-6-fostato (Man-6-P), i CRD di *tipo S* delle *Galectine* che legano i  $\beta$ -galattosidi e, infine, i CRD di *tipo C* delle *Selectine* (Drickamer e Taylor, 1993).

Esistono due tipi di recettori per il Man-6-P funzionalmente distinti in base alla necessità o meno di cationi bivalenti per svolgere la loro attività. Il recettore del Man-6-P indipendente dai cationi bivalenti serve per il trasferimento di enzimi lisosomiali neosintetizzati verso i lisosomi e nell'endocitosi di enzimi lisosomiali extracellulari. Al contrario, il recettore del Man-6-P dipendente dai cationi bivalenti partecipa solo al trasferimento degli enzimi lisosomiali verso i lisosomi (von Figura e Hasilik, 1986; Kornfeld, 1987; Kornfeld, 1992; Dahms et al., 1989).

Le Galectine sono state isolate e caratterizzate da varie specie animali. Presentano una notevole distribuzione tissutale e sono tipicamente intracellulari. Fino ad oggi sono state caratterizzate quattro Galectine, numerate progressivamente da 1 a 4. Tutte le Galectine riconoscono lo stesso determinante strutturale sul lattosio e su altri  $\beta$ -galattosidi. In particolare le interazioni riguardano il residuo di galattosio. Nonostante il gran numero di glicoproteine contenenti il galattosio, solo poche di esse sono in grado di legarsi alle Galectine *in vitro*. In particolare risulta che le glicoproteine contenenti polilattosammina sono dei buoni ligandi delle galectine (Barondes, 1994).

Le lectine di tipo C sono caratterizzate non tanto dalla comune natura del ligando quanto, piuttosto dalla assoluta dipendenza dal  $\text{Ca}^{2+}$ . Si distinguono vari gruppi di lectine di tipo C. Le lectine C del *gruppo I* sono proteine "core" di proteoglicani secreti nella matrice extracellulare dai fibroblasti e dai condrociti. Le

lectine C del *gruppo II* sono recettori di membrana. La proteina meglio conosciuta è il recettore per le asialoglicoproteine (Speiss, 1990). Le lectine C del *gruppo III* comprendono le *Collectine*, così chiamate per la presenza di segmenti con struttura collagenica. Le *Collectine* reagiscono con residui di Man, Glc, ManNAc e GlcNAc (Drickamer, 1993; Holmskov et al., 1994).

Le lectine C del *gruppo IV* comprendono le *Selectine* strettamente legate al funzionamento leucocitario. I leucociti sono normalmente presenti nel circolo sanguigno, dove svolgono una funzione unica ricercando di continuo in tutto l'organismo antigeni estranei (virus, batteri e simili). Il richiamo di queste cellule verso i siti tissutali, dove si è sviluppata una infezione o un processo infiammatorio, inizia con l'interazione tra le cellule endoteliali e i leucociti, seguita dal trasferimento nei tessuti di questi ultimi. È richiesto, perciò, un riconoscimento estremamente preciso tra i leucociti in circolo e le cellule endoteliali; tale riconoscimento è mediato dalle *Selectine* (Sharon e Lis, 1993). Si tratta di glicoproteine di membrana, composite, estremamente asimmetriche, con una insolita struttura a mosaico; presentano tre domini funzionali: un primo dominio ancora la selectina alla membrana cellulare; il secondo costituisce la maggior parte della molecola; il terzo, localizzato all'estremità extracellulare della molecola, è il CRD. Si conoscono tre tipi di *Selectine*; la *Selectina-E*, la *Selectina-P* e la *Selectina-L*. Tutte presentano un CRD con elevato grado di omologia. La *Selectina-E* è indotta dall'attivazione di alcune citochine. La *Selectina-P* è localizzata nei granuli secernenti delle piastrine e nelle cellule endoteliali. La *Selectina-L* è continuamente espressa sui leucociti. In seguito ad un danno tissutale vengono liberate delle citochine che inducono l'espressione e l'esposizione della *Selectina-E* a livello delle cellule endoteliali. I leucociti si legano alla *Selectina-E* tramite un oligosaccaride, il 3'-*Sialil-Lewis<sup>x</sup>* (SLe<sup>x</sup>) presente in alcune glicoproteine e glicolipidi della membrana dei leucociti. Le cellule endoteliali, sotto l'effetto delle citochine, modificano anche la loro forma in modo da permettere ai leucociti di lasciare il sangue ed entrare nei tessuti (Parekh e Edge, 1994; Bevilacqua e Nelson, 1993; Moran et al., 1996).

In generale sembra che il SLe<sup>x</sup> sia un ligando comune a tutte e tre le *Selectine*. Si tratta di un tetrasaccaride avente la struttura NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc (Fig. 3.1).

Le informazioni attualmente disponibili sul ruolo delle *Selectine* nel mediare i processi infiammatori e su quello delle loro controparti saccaridiche, consentono di preparare una serie di strategie terapeutiche che permettano di controllare questi eventi. Per esempio il SLe<sup>x</sup>, o un suo analogo, può essere somministrato allo scopo

di saturare i siti di legame delle molecole di Selectina-E, impedendo l'interazione tra i leucociti e le cellule endoteliali. Si avrebbe così l'inibizione della reazione infiammatoria, che in alcuni casi può essere dannosa per l'organismo. La presenza del SLe<sup>x</sup>, anche a livello di molte cellule neoplastiche, amplia notevolmente le potenzialità terapeutiche dell'uso del SLe<sup>x</sup> libero o di suoi analoghi sintetici. Sono già disponibili in letteratura una serie di esempi relativi agli effetti positivi della somministrazione di SLe<sup>x</sup> in vari processi patologici. Ad esempio il danno da riperfusione è un danno tissutale che ricorre spesso quando, dopo un infarto miocardico, si ristabilisce il flusso sanguigno; si ha una disfunzione endoteliale, caratterizzata dal rilascio ridotto di monossido d'azoto (NO), che può portare all'adesione e all'attivazione dei neutrofilii. È stato dimostrato, *in vitro*, che il SLe<sup>x</sup>, il Le<sup>x</sup> o loro analoghi, somministrati immediatamente prima del danno indotto sperimentalmente, sono in grado di inibire l'adesione dei neutrofilii all'endotelio (Buerke et al., 1994; Skurk et al., 1994).

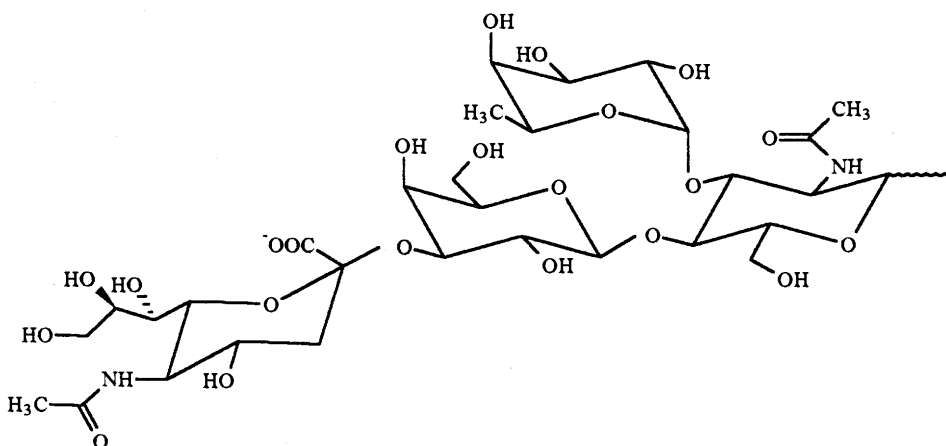


Fig. 3.1 Struttura del Sialil-Lewis<sup>x</sup>

### 3.2 Gruppi sanguigni

La membrana degli eritrociti umani contiene numerose molecole su cui sono espressi gli *antigeni del gruppo sanguigno*, molti dei quali sono carboidrati complessi (Telen, 1995). Dalla scoperta del sistema AB0, agli inizi del secolo, ad oggi sono stati descritti numerosi antigeni presenti sui globuli rossi e il loro numero continua ad aumentare. Ci si limiterà, perciò alla descrizione del sistema AB0, che coinvolge gli antigeni A, B e H e del sistema Lewis, coinvolgente gli antigeni Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, Le<sup>x</sup> e Le<sup>y</sup>.

Gli antigeni dei sistemi ABO e Lewis sono stati trovati anche in secrezioni quali la saliva, il succo gastrico o il fluido delle cisti ovariche, che è la fonte più ricca delle forme solubili dei determinanti sanguigni.

Indipendentemente dal tipo di gruppo sanguigno, le glicoproteine purificate dalle cisti ovariche sono costituite per l'85-90% da carboidrati, principalmente galattosio, fucosio, *N*-acetilglucosammina e *N*-acetilgalattosammina, e per il restante 15-20% da amminoacidi. In Tabella II sono riportate le strutture minime che vengono riconosciute come determinanti antigenici.

Tabella II. Strutture responsabili delle specificità dei gruppi sanguigni

Specificità	Strutture
A	GalNAc $\alpha$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]Gal $\beta$ 1-R
B	Gal $\alpha$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]Gal $\beta$ 1-R
AB	GalNAc $\alpha$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]Gal $\beta$ 1-R
	e
	Gal $\alpha$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]Gal $\beta$ 1-R
0	—
H	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-R
Le <sup>a</sup>	Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ 1-R
Le <sup>b</sup>	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-4]GlcNAc $\beta$ 1-R
SLe <sup>a</sup>	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[Fuc $\alpha$ 1-2]GlcNAc $\beta$ 1-R
Le <sup>x</sup>	Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc $\beta$ 1-R
Le <sup>y</sup>	Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc $\beta$ 1-R
SLe <sup>x</sup>	NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc $\beta$ 1-R

La specificità sierologica di queste molecole è determinata dalla natura e dal legame dei monosaccaridi all'estremità non riducente delle loro catene di carboidrati. Si possono riconoscere almeno cinque tipi diversi di strutture base per questi determinanti: tipo-1, tipo-2, tipo-3, tipo-4 e tipo- 6 (Watkins, 1995). Il tipo-1, contiene una sequenza del tipo Gal $\beta$ 1-3GlcNAc; il tipo-2 una sequenza di tipo Gal $\beta$ 1-4GlcNAc. A queste strutture possono essere legati fucosio, galattosio e *N*-acetilgalattosammina per formare i determinanti delle specificità A, B, H, Le<sup>a</sup> e Le<sup>b</sup>.

I primi si possono originare sia da catene di tipo-1 che di tipo-2, mentre i determinanti  $Le^a$  e  $Le^b$  possono essere formati solo da catene di tipo-1 in quanto contengono sequenze  $Fuc\alpha 1-4GlcNAc$ .

Il tipo-3 è caratterizzato da una struttura del tipo  $Gal\beta 1-3GalNAc\alpha$  direttamente legato a residui di serina o treonina ed è caratteristico dei determinanti ABH.

Il tipo-4 è maggiormente diffuso nei glicosfingolipidi. Si presenta, strutturalmente, come una estensione di un globoside ( $GalNAc\beta 1-3Gal\alpha 1-4Gal\beta 1-4Glc-Cer$ ) alla cui estremità non riducente si trova un residuo di galattosio legato in  $\beta 1-3$ . Questa struttura costituisce il substrato per la sintesi della struttura H e di conseguenza di quelle A o B.

Il tipo-5 è un disaccaride sintetico di tipo  $Gal\beta 1-3Gal\beta-R$ .

Il tipo-6 è una struttura del tipo  $Gal\beta 1-4Glc$ .

Lo zucchero immunodominante per la specificità H è il fucosio nella sequenza  $Fuc\alpha 1-2Gal$ ; per la specificità A la GalNAc nella sequenza  $GalNAc\alpha 1-3Gal$ ; per la specificità B il galattosio nella sequenza  $Gal\alpha 1-3Gal$ ; per la specificità  $Le^a$  il fucosio nella sequenza  $Fuc\alpha 1-4GlcNAc$  e per la specificità  $Le^b$  sono richiesti due residui di fucosio nella sequenza  $Fuc\alpha 1-2Gal\beta 1-3[Fuc\alpha 1-4]GlcNAc$  (Ginsburg, 1972).

Studi familiari hanno dimostrato che l'eredità dei gruppi sanguigni AB0(H) e Lewis, cioè la capacità di formare le corrispondenti ben determinate strutture saccaridiche, è controllata dall'azione dei geni presenti in quattro loci indipendenti. Questi geni non sono responsabili della produzione dell'intero determinante, ma solo per la formazione di enzimi che attaccano gli zuccheri esterni o immunodominanti alla catena centrale, comune a tutti i fenotipi. Il *locus* AB0 è responsabile per due enzimi: una N-acetilgalattosaminil-transferasi specificata dal gene A e una galattosiltransferasi specificata dal gene B; entrambi questi enzimi trasferiscono l'appropriato esoso al galattosio e formano legami  $\alpha 1-3$ . Il terzo gene di questo locus, il gene O è inattivo e non produce glicosiltransferasi. Il *locus* Hh è responsabile per una fucosiltransferasi che trasferisce il fucosio al galattosio, formando legami  $\alpha 1-2$ ; mentre il *locus* Lele produce la fucosiltransferasi che trasferisce il fucosio alla GlcNAc e forma legami  $\alpha 1-4$  (Ginsburg, 1972). La presenza o l'assenza della fucosiltransferasi specificata dal gene H negli organi secretori è la base per la capacità di secernere glicoproteine esibenti le specificità A, B o H.

A differenza dei determinanti A, B o H, quelli del sistema Lewis presenti sugli eritrociti non sono parti integrali della membrana, ma sfingoglicolipidi



acquisiti dal plasma, in cui circolano associati alle lipoproteine del siero (Watkins, 1995).

### 3.3 Bibliografia

- Barondes, S.H., Cooper, D.N.W., Gitt, M.A. e Leffer, H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 20807-20810
- Bevilacqua, M.P. e Nelson, R.M. (1993) *J. Clin. Invest.* 91: 379-387
- Buerke, M., Weyrich, A.S., Zheng, Z., Gaeta, F.C.A., Forrest, M.J. e Lefer, A.M. (1994) *J. Clin. Invest.* 93: 1140-1148
- Dahms, N.M., Lobel, P. e Kornfeld, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 12115-12118
- Drickamer, K. e Taylor, M.E. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.* 9: 237-264
- Drickamer, K. (1993) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 45: 207-232
- Ginsburg, V. (1972) in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Meister, A. Ed.) Interscience Publishers, Vol. 36, pp 131-149
- Holmskov, U., Malhorta, R., Sim, R.B. e Jensenius, J.C. (1994) *Immunol. Today* 15: 67-74
- Kornfeld, S. (1992) *Ann. Rev. Biochem.* 61: 307-330
- Kornfeld, S. (1987) *FASEB J.* 1: 462-468
- Moran, L.A., Scrimgeour, K.G., Horton, H.E., Ochs, R.S. e Rawn, J.D. (1996) *Biochemistry* McGraw-Hill
- Opdenaker, G., Rudd, P.M., Ponting, C.P. e Dwek, R.A. (1993) *FASEB J.* 7: 1330-1337
- Parekh, R.B. e Edge, C.J. (1994) *Trends Biotechnol.* 12: 339-345
- Sharon, N. e Lis, H. (1993) *Sc. Amer.* 268: 80-97
- Sharon, N. e Lis, H. (1989) *Science* 246: 227-233
- Skurk, C., Buerke, M., Guo, J.P., Paulson, J. e Lefer, A.M. (1994) *Am. J. Physiol.* 267: H2124-H2131
- Speiss, M. (1990) *Biochemistry* 29: 10009-10018
- Telen, M.J. (1995) *Blood* 85: 299-306
- von Figura, K. e Hasilik, A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* 55: 167-193
- Watkins, W.M. (1995) in *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil, J.; Vliegthart, J.F.G. e Schachter, H. Eds) Elsevier Science, Vol. 29a, pp 313-390

## Capitolo 4

### Strategie di Sintesi di Oligosaccaridi

I glicoconiugati (e gli oligosaccaridi in particolare) sono molecole tra le più variabili sia dal punto di vista strutturale che funzionale; inoltre giocano un ruolo fondamentale in vari processi biologici quali la fecondazione, l'embriogenesi, lo sviluppo neuronale, l'attività ormonale, la proliferazione delle cellule e la loro organizzazione in tessuti specifici. Cambiamenti notevoli avvengono sui carboidrati di superficie con la differenziazione oncologica, che sembrano associati con il processo di metastasi (Kannagi, 1997). L'aumentata rivalutazione del ruolo dei carboidrati nelle scienze biologiche e farmaceutiche ha determinato un notevole impulso all'elaborazione di strategie di sintesi efficienti e rapide. Fondamentalmente si possono individuare due principali approcci, non completamente alternativi l'uno all'altro, ma certamente competitivi: la sintesi chimica e la sintesi enzimatica.

#### 4.1 Sintesi Chimica

È quella che storicamente si è sviluppata per prima. La sintesi chimica degli oligosaccaridi è molto più complicata di quella di altri biopolimeri, in quanto prevede schemi di sintesi molto elaborati che coinvolgono *strategie di protezione e deprotezione* (Boons, 1996). Come visto in precedenza i carboidrati in genere contengono tre o più gruppi ossidrilici oltre a quello anomero ed è proprio il gruppo ossidrilico ad essere coinvolto nel legame tra zuccheri. Perciò la completa protezione di ogni monosaccaride elementare di solito richiede da tre a sette passaggi. La reazione di glicosilazione porta spesso ad una miscela anomera; quindi il composto desiderato deve essere cromatograficamente separato e deprotezionato (Kanie e Hindsgaul, 1992).

Il metodo classico per la sintesi di oligosaccaridi, risalente al 1901, è quello di *Koenigs-Knorr*. Sono previsti due passaggi chiave: l'introduzione di un gruppo uscente sul carbonio anomero, con formazione di un alogeno derivato (1-bromuro o 1-cloruro sono i più usati) e l'attacco nucleofilo a quest'ultimo da parte dell'accettore glicosidico; la sostituzione nucleofila è catalizzata da metalli pesanti. La scelta dell'alogeno, del catalizzatore e del tipo di gruppo proteggente influenza la reattività del donatore glicosidico.

Scegliendo opportuni gruppi vicinali al carbonio anomero o grazie ad opportuni catalizzatori, è possibile raggiungere il controllo della *stereoselettività*

della reazione. La scelta dei gruppi protettori, in base ai loro effetti sterici ed elettronici, e la modificazione della struttura base dell'unità saccaridica influenzano la reattività dell'accettore glicosilico.

Nonostante il metodo di Koenigs-Knorr sia la tecnica più diffusa per la sintesi degli oligosaccaridi, esso presenta alcuni svantaggi: sono necessarie *condizioni* relativamente *drastiche* per ottenere gli alogeni derivati, questi ultimi sono termicamente *poco stabili*, si degradano facilmente e sono altamente sensibili all'idrolisi; i sali di metalli pesanti sono *molto costosi*, hanno un'*elevata tossicità* e possono esplodere (Koenigs e Knorr, 1901).

Un metodo alternativo è quello di *Fischer-Helferich*, consistente in una glicosilazione catalizzata da acidi con formazione di un intermedio non instabile di tipo acetalico. La stereoselettività è assente in quanto la reazione è parzialmente reversibile e necessita di condizioni particolarmente drastiche; perciò non è ritenuto un metodo del tutto soddisfacente.

Il *metodo del tioglicoside* consiste nella sintesi di un oligosaccaride usando come donatori glicosidici i tioglicosidi, composti stabili alle normali condizioni di protezione e deprotezione dei gruppi ossidrilici. Questa metodologia è stata utilizzata per la sintesi dell'antigene associato ai tumori Le<sup>x</sup> (Boons, 1996). Estese informazioni sulle sintesi chimiche di oligosaccaridi sono state recentemente pubblicate (Kunz, 1997; Schmidt e Jung, 1997; Nicolau e Ueno, 1997; Fraser-Reid e Madsen, 1997)

### 4.2 Sintesi Enzimatica

La sintesi enzimatica degli oligosaccaridi è una via alternativa molto promettente per ottenere questi composti, in quanto non necessita delle tediose protezioni e deprotezioni e non si formano prodotti secondari durante tali reazioni. Inoltre la glicosidazione enzimatica è altamente stereo- e regioselettiva.

Sono disponibili tre strategie: la prima prevede l'*uso di glicosiltransferasi della via di Leloir*, richiedenti, come donatori, zuccheri attivati con nucleotidi; la seconda l'*uso di enzimi non appartenenti alla via di Leloir*, richiedenti zuccheri-1-fosfato come donatori; la terza l'*uso di glicosidasi*, che di solito idrolizzano i legami glicosidici, ma che *in vitro*, in condizioni appropriate possono essere usate per la catalisi sintetica (Ichikawa et al., 1992).

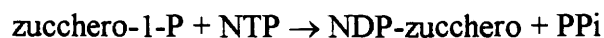
Gli enzimi possono essere usati in forma solubile o immobilizzati su una fase solida; l'uso simultaneo di glicosidasi e glicosiltransferasi in forma solubile o immobilizzate può essere vantaggioso in quanto facilita la conversione degli

oligosaccaridi, formati come intermedi, nel prodotto finale, rendendo non necessaria la purificazione. Secondariamente, l'idrolisi è minimizzata e un trisaccaride (o un oligosaccaride ancora maggiore) può essere sintetizzato in un numero minimo di tappe (Nilsson, 1989).

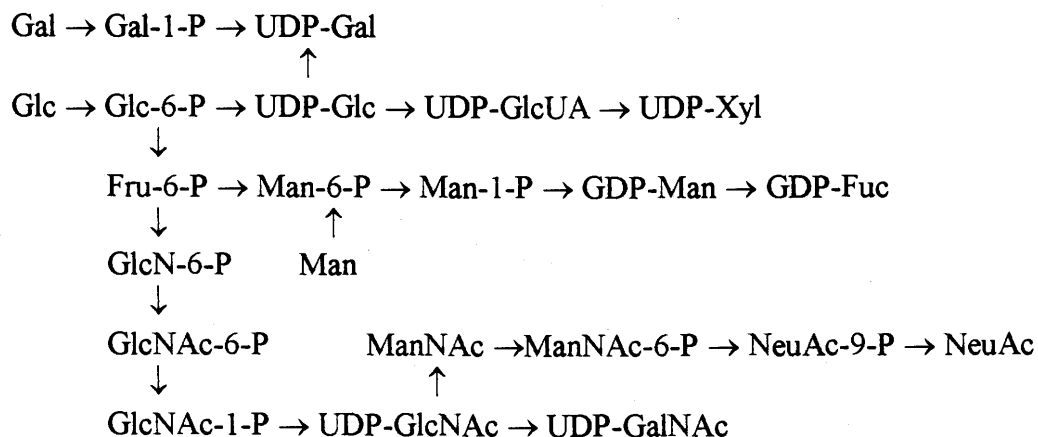
#### 4.2.1 Sintesi enzimatica mediante glicosiltransferasi

La natura si serve di due gruppi di enzimi nella biosintesi degli oligosaccaridi: gli enzimi della via di Leloir (Leloir, 1971), che sono responsabili della sintesi della maggior parte delle glicoproteine e di altri glicoconjugati nei sistemi dei mammiferi, e gli enzimi non appartenenti a questa via. Le glicosiltransferasi della via di Leloir utilizzano, come *donatori*, *monosaccaridi attivati* come *esteri glicosidici di nucleotidi* mono o difosfati che sono UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA e CMP-NeuAc, mentre le transferasi non appartenenti a questa via utilizzano tipicamente *glicosilfosfati* come donatori attivati (Wong et al., 1995).

La maggior parte degli zucchero-nucleotidi usati come substrati dalle glicosiltransferasi è biosintetizzata *in vivo* dai corrispondenti monosaccaridi. Il primo passaggio prevede la formazione di un glicosil-1-fosfato ad opera di una chinasi. Questo glicosil-1-fosfato reagirà poi con un nucleotide trifosfato (NTP) per fornire uno zucchero-nucleoside difosfato attivato in una reazione catalizzata da una nucleoside transferasi. La reazione può essere schematizzata in questo modo:



Da un numero limitato di NDP-zuccheri ne derivano altri come schematizzato qui di seguito:



Un caso particolare è rappresentato dall'acido sialico in quanto il CMP-NeuAc si forma direttamente da NeuAc e da CTP secondo questo schema:



In generale, per ogni zucchero-nucleotide donatore glicosidico, esistono molte glicosiltransferasi, ognuna delle quali trasferisce il donatore a ciascun diverso accettore.

Questi enzimi sono generalmente considerati specifici sia per i glicosil donatori e accettori, che per la posizione e la configurazione del nuovo legame glicosidico formato. Questa specificità ha portato all'idea di "un enzima, un legame" (Wong et al., 1995).

L'utilizzo delle glicosiltransferasi a fini biosintetici si basa su due presupposti; la disponibilità degli NDP-zuccheri e la disponibilità delle stesse glicosiltransferasi. La prima condizione è ormai soddisfatta; la maggior parte degli NDP-zuccheri sono commercialmente disponibili, ma sicuramente non in maniera accessibile da consentire un loro utilizzo per sintesi su larga scala. Le sintesi chimiche e/o enzimatiche di questi substrati sono possibili, ma appaiono alquanto complicate. Per quanto riguarda l'approccio chimico, questo comporta una reazione tra un nucleoside monofostato (NMP) attivato (fosforimidazolati o fosforomorfolinoati) con un glicosil-fosfato per produrre un NDP-zucchero. Gli stessi glicosil-fosfati possono essere ottenuti per via chimica (Heidlas et al, 1973). Per quanto riguarda l'approccio enzimatico, esso si basa sull'uso di NMP attivati disponibili in commercio come materiale di partenza. Il vero e proprio processo enzimatico prevede l'uso, in sequenza, di due chinasi che consentono di trasformare gli MNP in NTP, utilizzando il nucleoside difosfato (NDP) corrispondente. Almeno tre chinasi possono essere utilizzate per la sintesi degli NTP, ognuna delle quali utilizza un diverso donatore di gruppi fosfato; la piruvato chinasi che utilizza il fosfoenolpiruvato (PEP), l'acetato chinasi che utilizza l'acetyl-fosfato e la nucleoside difosfato chinasi che utilizza, invece l'ATP come donatore di gruppi fosfato. La piruvato chinasi è, in genere, l'enzima più utilizzato per la maggior stabilità chimica del suo substrato, il PEP. La preparazione degli NDP dai corrispondenti NTP è molto più complicata e coinvolge enzimi specifici per ciascun NMP.

Per evitare le complesse preparazioni degli zucchero-nucleotidi sono stati studiati sistemi di *rigenerazione in situ* di questi cofattori; queste metodologie possono essere applicate alle sintesi di oligosaccaridi mediate da glicosiltransferasi

su larga scala (Ichikawa et al., 1992). Il primo esempio di un tale tipo di approccio riguarda la sintesi della *N*-acetillattosammina. L'UDP-Gal utilizzato nella sintesi della *N*-acetillattosammina, viene rigenerato a partire da UDP e Gal utilizzando una serie di enzimi e quantità stechiometriche di agenti fosforilanti. In particolare l'UDP viene convertito a UTP per azione della piruvato chinasi. L'UTP così ottenuto verrà utilizzato per la sintesi dell' UDP-Glc a partire da Glc-1-P utilizzando come enzima la UDP-Glc pirofosforilasi. Infine una UDP-Glc epimerasi provvederà a convertire l'UDP-Glc in UDP-Gal, alimentando in questo modo la reazione catalizzata dalla galattosiltransferasi (Wong et al., 1982). Diversi sono gli esempi di sintesi di oligosaccaridi con questo tipo di approccio (Auge et al., 1984; Palcic et al., 1987). Parallelamente sono stati sviluppati anche sistemi di rigenerazione di altri NDP-zuccheri; ad esempio sono stati descritti sistemi per la rigenerazione del CMP-NeuAc (Ichikawa et al., 1991), dell'UDP-GlcNAc (Look et al., 1993), del GDP-Man (Wang et al., 1993), del GDP-Fuc e dell' UDP-GlcUA (Ichikawa et al., 1992).

Gli oligosaccaridi possono anche essere preparati usando le glicosiltransferasi "non della via di Leloir". Esempi interessanti di questo approccio sono forniti dalla sintesi del saccarosio e del trealosio. Entrambi sono stati sintetizzati *in vitro* utilizzando reversibilmente le vie metaboliche di degradazione catalizzate rispettivamente dalla trealosio fosforilasi e dalla saccarosio fosforilasi (Wong et al., 1995). Altri esempi di questo tipo di approccio biosintetico sono stati utilizzati per la sintesi dei destrani e dei levani.

Interessanti anche dal punto applicativo, sono le transferasi come la ciclodestrina glucano-transferasi (CGTasi) e la ciclofruttano-transferasi. Le ciclodestrine vengono sintetizzate per azione della CGTasi microbica su molecole di amilosio che vengono convertite in oligomeri ciclici di 6, 7 o 8 termini legati con legami  $\alpha$ -1-4 producendo rispettivamente  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodestrine. Recentemente è stata individuata una ciclofruttano transferasi che catalizza la sintesi di molecole di ciclofruttani utilizzando come substrati l'inulina.

### 4.2.2 Sintesi enzimatica mediante glicosidasi

Le glicosidasi, o idrolasi dei glicosidi, sono enzimi molto importanti e abbondanti, che degradano poli- e oligosaccaridi in monomeri o scindono i legami tra zuccheri e agliconi. Hanno molte funzioni essenziali per l'esistenza e la sopravvivenza dei sistemi viventi (Stütz, 1996).

Una classificazione piuttosto generale di questi enzimi si basa sul loro sito di attacco per l'idrolisi: le *esoglicosidasi* attaccano l'estremità non riducente di un saccaride, mentre le *endoglicosidasi* agiscono lungo la catena polisaccaridica. Indipendentemente da ciò, le glicosidasi possono essere ulteriormente suddivise in base al loro meccanismo d'azione. Si distinguono *glicosidasi "inverting"* e *glicosidasi "retaining"*. Nel caso delle prime, cioè le "inverting", in seguito ad idrolisi si ha inversione della configurazione del carbonio anomero provocato da un spostamento diretto del gruppo uscente ad opera dell'acqua (McCarter e Withers, 1994). In Fig. 4.1 viene schematicamente rappresentato il meccanismo d'azione delle glicosidasi "inverting".

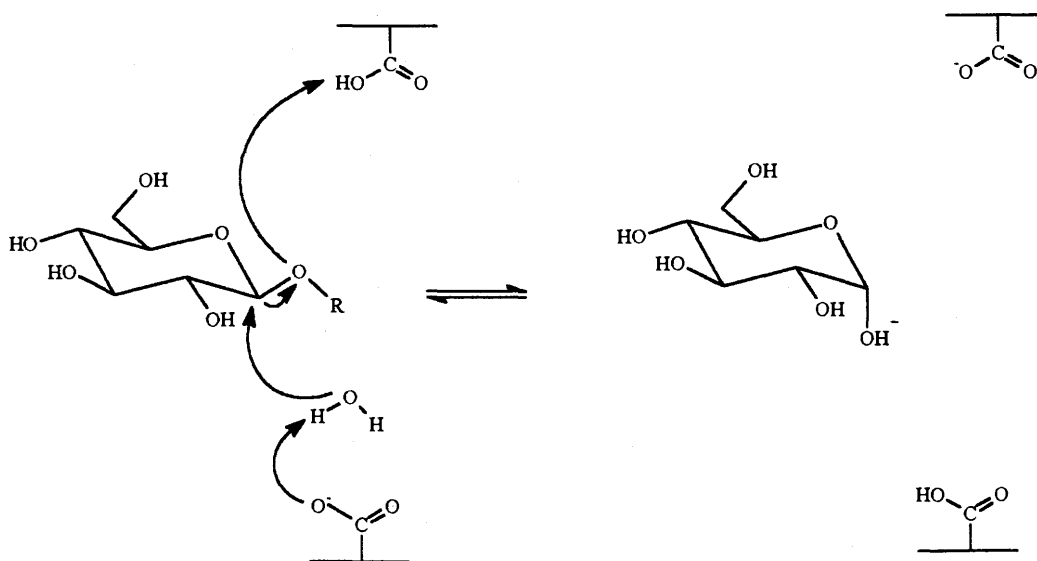


Fig. 4.1 Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione di una glicosidasi "Inverting"

Al contrario le glicosidasi "retaining" mantengono la configurazione del carbonio anomero coinvolto nel legame glicosidico, grazie ad un meccanismo di doppio spostamento con la formazione di un intermedio glicosil-enzima (McCarter e Withers, 1994) come schematizzato di seguito in Fig. 4.2.

Entrambi i tipi di glicosidasi utilizzano lo stesso meccanismo molecolare per l'idrolisi di un legame glicosidico. Un acido carbossilico, cataliticamente attivo, protona il glicoside. A questo punto un gruppo carbossilico dell'enzima stabilizza l'intermedio di transizione, che possiede le caratteristiche di un ossicarbonio, mediante la formazione di un legame covalente e conseguente inversione della

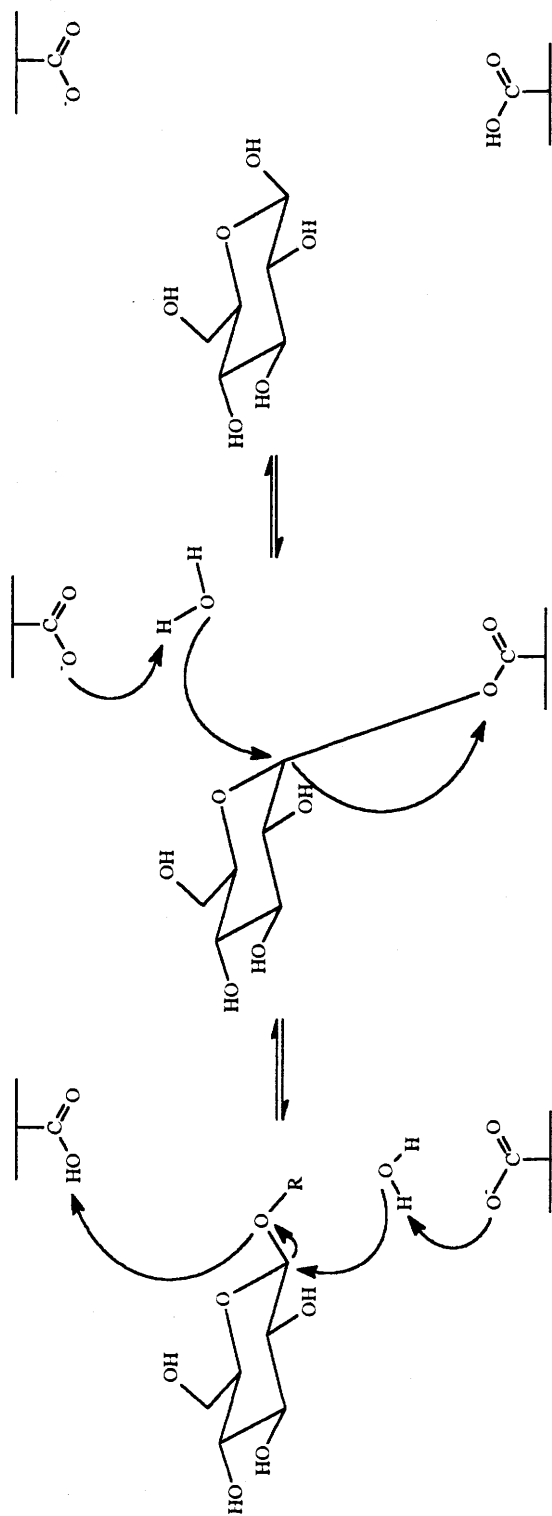


Fig 4.2 Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione di una glicosidasi "retaining"



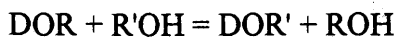
configurazione del carbonio anomero. Con la tappa di idrolisi l'attacco dell'acqua consente la liberazione del mono- od oligosaccaride (Stütz, 1996).

Più recentemente è stata utilizzata una suddivisione delle glicosidasi in una serie di "famiglie" in base alle *similarità di sequenza* aminoacidica. Fino ad ora sono state identificate 57 famiglie (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993; Henrissat e Bairoch, 1996). La nomenclatura adottata fino ad ora era basata sul tipo di reazione catalizzata da questi enzimi e sulla specificità di substrato. Tuttavia questo tipo di classificazione non tiene conto delle caratteristiche strutturali di questi enzimi trascurando in tal modo fenomeni di divergenza o convergenza evolutiva. La diretta correlazione tra sequenza e somiglianza di organizzazione tridimensionale delle proteine è alla base del nuovo tipo di classificazione delle glicosidasi. In questo tipo di approccio nell'ambito di una stessa famiglia potranno trovarsi glicosidasi con diverso codice E.C., mentre enzimi con una specificità di substrato simile potranno trovarsi in famiglie diverse. In precedenza è stato visto che le glicosidasi possono essere suddivise in "inverting" e "retaining" in base al diverso meccanismo d'azione. Questo tipo di suddivisione è una caratteristica conservata nelle varie famiglie. In altre parole esiste una diretta correlazione tra sequenza proteica e meccanismo d'azione di una glicosidasi. Una tale osservazione non sarebbe stata possibile utilizzando la classificazione precedente (Henrissat e Bairoch, 1996).

Se si osservano attentamente gli schemi rappresentati nelle Fig 4.1 e 4.2 si nota che le reazioni sono tutte reversibili. Già questa semplice osservazione rivela *l'utilità biosintetica delle glicosidasi*. In termini più precisi si deve immaginare che l'intermedio di reazione di idrolisi può essere intercettato da un nucleofilo diverso dall'acqua, che può essere rappresentato da un altro carboidrato.

Esistono due meccanismi mediante i quali le glicosidasi catalizzano il trasferimento: un processo basato su un *controllo dell'equilibrio*, o *idrolisi inversa*, in cui vengono utilizzati una glicosidasi e il corrispondente monosaccaride come nucleofilo donatore, e un *processo controllato cineticamente*, o *transglicosilazione*, in cui invece viene utilizzato come donatore un glicoside che verrà idrolizzato normalmente e l'intermedio che si forma verrà catturato da un secondo nucleofilo, diverso dall'acqua, con la formazione di un nuovo glicoside (Toone et al., 1989). Quest'ultimo è solitamente il metodo scelto, in quanto consente rese molto più elevate. La maggioranza delle applicazioni delle transglicosilazioni prevede l'uso di glicosidasi "retaining". La prima osservazione di un fenomeno transglicolitico risale al 1935, quando Rabaté osservò l'attività transglicolitica delle glicosidasi utilizzando Glc $\beta$ OPh (Rabaté, 1935). Diversi tipi di

glicosidi, aril-glicosidi, glicosil-fluoruri e oligosaccaridi, possono essere utilizzati come donatori. Il meccanismo della transglicosilazione può essere schematizzato come segue:



dove DOR rappresenta il donatore e R'OH l'accettore.

Nella sintesi di un oligosaccaride la *regiospecificità* è chiaramente uno dei parametri più importanti. Normalmente le glicosidasi mostrano una preferenzialità nei confronti degli ossidrili primari dell'accettore formando essenzialmente legami 1-6. Tuttavia è possibile controllare la *regioselettività* in vari modi. La scelta dell'enzima è di primaria importanza per controllare questo parametro. Ad esempio la  $\beta$ -D-galattosidasi da testicoli bovini e/o suini catalizza la formazione preferenziale di Gal $\beta$ 1-3GlcNAc e di Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ SEt, utilizzando il lattosio come donatore, GlcNAc e GlcNAc $\beta$ SEt come accettori (Hedbys et al, 1989a, 1989b). Invece la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli* preferenzialmente sintetizza Gal $\beta$ 1-6GalNAc, mentre l'enzima da *Lactobacillus bifidus* tende preferenzialmente a formare l'isomero  $\beta$ 1-4 (Larsson et al., 1987; Zilliken et al 1955). Anche la struttura e la configurazione anomeric dell'accettore e del donatore possono influenzare la regioselettività. Ad esempio la  $\alpha$ -D-galattosidasi da *Coffea arabica* catalizza la sintesi di Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ OME utilizzando Gal $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph come donatore e Gal $\beta$ OME come accettore. Quando invece vengono utilizzati Gal $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph o Gal $\alpha$ OME come accettori si ottengono rispettivamente disaccaridi con legami  $\alpha$ 1-2 e  $\alpha$ 1-3 (Nilsson, 1987, Nilsson, 1988, Nilsson, 1989). Altri interessanti esempi di questo tipo di controllo sono quelli che riguardano la galattosilazione di xilosidi (López et al., 1991; López e Fernández-Mayoralas, 1992; López e Fernández-Mayoralas, 1994). Ad esempio utilizzando la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Aspergillus oryzae*, come enzima, il Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph, come donatore e il Xyl $\beta$ -OBn come accettore, si forma preferenzialmente l'isomero Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ -OBn (López et al., 1991). Molto più dettagliate sono le informazioni riguardanti l'uso della  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli*. In questo caso utilizzando Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph, come donatore e vari xilosidi (alifatici e aromatici) come accettori venivano prodotti essenzialmente gli isomeri Gal $\beta$ 1-3Xyl-R e Gal $\beta$ 1-4Xyl-R in un rapporto variabile (López e Fernández-Mayoralas, 1992; López e Fernández-Mayoralas, 1994). Gli autori osservano una preferenzialità dell'enzima per gli xilosidi che presentino come aglicone una porzione aromatica. Inoltre, la

regioselettività della reazione sembra dipendere da piccole variazioni nella struttura dell'accettore.

Un aspetto particolarmente interessante delle reazioni di transglicosilazione, anche se non ancora pienamente sviluppato, è la *sintesi di derivati glicosilici di aminoacidi*. Gli esempi di reazioni di questo tipo descritti in letteratura non sono molto numerosi. Nella maggior parte dei casi si tratta di reazioni di glicosilazione a carico di residui di serina. In nessuno dei casi descritti è stato possibile ottenere la glicosilazione dell'idrossiaminoacido senza una preventiva protezione dei gruppi  $\alpha$ -amminico e  $\alpha$ -carbossilico. Infatti usando la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli* come enzima, e il lattosio come donatore, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando una serina in cui il gruppo amminico era stato protetto con un metil estere e il gruppo carbossilico con il gruppo *tert*-butossicarbonilico (Cantacuzene e Attal, 1991). Un approccio interessante degli stessi autori è stato quello di utilizzare come accettori non più aminoacidi semplici, bensì dipeptidi costituiti da almeno un residuo di serina alternativamente in posizione N- e C-terminale. I migliori risultati sono stati osservati utilizzando dipeptidi con la serina in posizione N-terminale (Attal e Cantacuzene, 1992).

Altri autori hanno esaminato un maggior numero di enzimi, da diverse fonti, e, oltre la serina, anche la treonina (Johansson et al., 1991). Questi autori sono riusciti ad ottenere una glicosilazione con aminoacidi non protetti solo con la  $\alpha$ -D-mannosidasi e con la  $\alpha$ -D-N-acetilgalatosaminidasi e solo con l'idrolisi inversa.

Risultati più interessanti sono stati ottenuti utilizzando la  $\beta$ -galattosidasi dal mollusco *Achatina achatina*, utilizzando lattosio come donatore e serina e idrossiprolina come accettori. In entrambi i casi si è resa necessaria la preventiva protezione dei gruppi amminico e carbossilico degli aminoacidi rispettivamente con un gruppo benzilossicarbonilico ed un estere metilico (Leparoux et al., 1994). Utilizzando lo stesso enzima e lo stesso donatore ma con dipeptidi contenenti residui di serina in posizione N-terminale, come accettori, i risultati ottenuti si sono rivelati più interessanti di quelli analoghi ottenuti utilizzando la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli* (Leparoux et al, 1996; Attal e Cantacuzene, 1992).

Più recentemente la N-acetilesosaminidasi da *Aspergillus oryzae* è stata utilizzata per la sintesi di derivati glicosilati della serina utilizzando GlcNAc $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e/o GalNAc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph come donatori. Di nuovo si è resa necessaria la protezione dell'aminoacido (Nilsson et al., 1997).

Per un'ampia descrizione di esempi di reazioni di transglicosilazione si possono consultare le ampie "reviews" sull'argomento (Nilsson, 1988; Bucke e Rastall, 1990; Ichikawa et al, 1992; Wong et al, 1995; Watt et al., 1997).

Un particolare tipo di glicosidasi con un'elevata attività transglicolitica è rappresentato dalle *transglicosidasi*. Si tratta di enzimi correlati con le glicosidasi in quanto agiscono sui legami glicosidici. Tuttavia presentano una spiccata tendenza a trasferire la porzione glicosidica ad un altro accettore con un bassissimo grado di idrolisi. Esempi sono rappresentati dalle cosiddette *glicansaccarasi*. Questi enzimi sono normalmente responsabili della polimerizzazione, di uno o entrambi i monosaccaridi che costituiscono il saccarosio, che porta a polisaccaridi come il destrano e il levano. In presenza di altri carboidrati accettori esse possono invece formare nuovi tipi di oligosaccaridi. Ad esempio l'enzima destransaccarasi di *Leuconostoc mesenteroides* può dare origine a disaccaridi come il leucrosio (Glc $\alpha$  1-5Fru) (Stodola et al, 1952). Altri carboidrati possono funzionare come accettori della destransaccarasi, come ad esempio l'isomaltosio, il maltosio, il melibiosio e altri (Koepsell et al, 1953; vedi Cote e Tao, 1990 per una "review"). Altri esempi simili sono la levansaccarasi che forma una serie di analoghi del saccarosio come lo xil-saccarosio e il gal-saccarosio in cui il residuo di glucosio del saccarosio è stato sostituito rispettivamente da un residuo di xilosio e di galattosio. La specificità di substrato di questo enzima è piuttosto bassa, per cui possono essere utilizzati come accettori un'ampio spettro di composti (Cote e Tao, 1990).

Un esempio particolarmente interessante di transglicosidasi è rappresentato dalla trans-sialidasi di *Trypanosoma cruzi*. Si tratta di un enzima che tende a trasferire residui di acido sialico su oligosaccaridi che presentino un residuo di galattosio in configurazione  $\beta$  all'estremità non riducente (Colli, 1993; Scudder et al, 1993). Questo enzima può utilizzare varie molecole come donatori di acido sialico. Oltre al suo substrato naturale, il sialilattosio, si possono utilizzare anche substrati sintetici come il NeuAc $\alpha$ -mU e il NeuAc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph (Vandekerckhove et al, 1992). Questo enzima è stato utilizzato per la sialilazione di vari oligosaccaridi come ad esempio la *N*-acetillattosammina ottenendo la 3'-sialil-*N*-acetillattosammina (Nishimura et al, 1994).

In termini generali una reazione di transglicosilazione può essere vista come una competizione tra due nucleofili; nel caso dell'idrolisi il nucleofilo accettore è l'acqua, nel caso della transglicosilazione il secondo nucleofilo (un carboidrato, un alcol o altro) deve competere con l'acqua per il donatore. Una via per favorire la reazione di transglicosilazione è quella di ridurre l'attività dell'acqua, cioè, in ultima analisi, la quantità di acqua. Il mezzo più efficiente per ridurre l'attività dell'acqua è quella di aggiungere cosolventi organici. L'effetto è molto vario al variare del tipo di cosolvente, della sua concentrazione e, soprattutto, dal tipo di enzima utilizzati. Mentre, in generale, la presenza di cosolventi provoca una progressiva

denaturazione dell'enzima, con relativa perdita di attività, sono molto numerosi i casi di enzimi che invece presentano una notevole attività transglicolitica in presenza di miscele tampone/cosolvente organici. Ad esempio Sauerbrei e Thiem hanno sintetizzato Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph e Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph utilizzando la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Aspergillus oryzae* e da *Escherichia coli* in miscele tampone/acetonitrile 50/50. Questi autori non danno nessuna indicazione della stabilità degli enzimi in presenza di 50% di acetonitrile (Sauerbrei e Thiem, 1992). Con un approccio diverso Beecher et al. hanno descritto reazioni di transglicosilazioni catalizzate dalla  $\beta$ -D-galattosidasi da *Aspergillus oryzae* modificata con polietilenglicole (PEG). Questa modificazione stabilizza la proteina rendendola più stabile alla presenza di solventi organici (Beecher et al, 1990). Alcune glicosidasi mostrano una notevole attività transglicolitica in presenza di alte concentrazioni di solventi organici. Ad esempio l'amilasi da *Pseudomonas stutzeri* catalizza la formazione di *p*-nitrofenil- $\alpha$ -maltopentaoside a partire da maltopentaosio come donatore e Glc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph come accettore in soluzioni contenenti fino al 50% di metanolo. L'aspetto interessante è che l'attività transglicolitica cresceva con l'aumentare della quantità di metanolo presente (Usui e Murata, 1988). Il caso più sorprendente di incrementata attività transglicolitica di una glicosidasi in presenza di cosolventi organici è quello della endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasi da *Arthrobacter protomorphiae*. L'attività transglicolitica di questo enzima in soluzioni acquose è del 32%, utilizzando Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Asn come donatore e GlcNAc come accettore. In miscele contenenti fino al 30% di acetone, diossano, dimetilformammide o dimetilsolfossido la resa passa al 75% e può raggiungere l'89% (Fan et al., 1995).

A causa della sostanziale inattivazione degli enzimi idrolitici, come appunto le glicosidasi, in solventi organici, l'obiettivo ideale sarebbe quello di disporre di un enzima idrolitico "solubile" in solventi organici. Da questo presupposto nasce l'idea di ricoprire alcuni enzimi idrolitici con delle molecole lipidiche. La  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli* così preparata è stata usata con successo per la transglicosilazione di vari alcoli idrofobici, utilizzando un sistema bifasico acquoso-organico. Nella fase acquosa viene sciolto il donatore, ad esempio il lattosio, mentre quella organica contiene l'alcol idrofobico accettore e l'enzima (Okahata e Mori, 1997; Mori, et al., 1997). Lo stesso approccio è stato utilizzato con successo anche su altre glicosidasi (Mori e Okahata, 1997).

Questi e molti altri esempi rendono le glicosidasi molto promettenti per la sintesi di oligosaccaridi e i limiti di questo tipo di approccio non sembrano costituire un ostacolo insormontabile.

### 4.3 Bibliografia

- Attal, S. e Cantacuzene, D. (1992) *Tetrahedron Lett.* 48: 9251-9260
- Augé, C., David, S., Mathieu, C. e Gautheron, C. (1984) *Tetrahedron Lett.* 25: 1467-1470
- Beecher, J.E., Andrews, A.T. e Vulfson, E.N. (1990) *Enz. Microb. Technol.* 12: 955-959
- Boons, G.J. (1996) *Tetrahedron* 52: 1095-1121
- Bucke, C. e Rastall, R.A. (1990) *Chem. Britain* 26: 675-678
- Cantacuzene, D. e Attal, S. (1991) *Carbohydr. Res.* 211: 327-331
- Colli, W. (1993) *FASEB J.* 7: 1257-1264
- Cote, G.L. e Tao, B.Y. (1990) *Glycoconj. J.* 7: 145-162
- Fan, J.Q., Quesenberry, M.S., Takegawa, K., Iwahara, S., Kondo, A., Kato, I. e Lee, Y.C. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 17723-17729
- Fraser-Reid, B. e Madsen, R. (1997) in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian, S. Ed) Marcel Dekker, Inc., pp 339-356
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P.O., Gunnarson, A. e Svensson, S. (1989a) *Carbohydr. Res.* 186: 217-223
- Hedbys, L., Johansson, E., Mosbach, K., Larsson, P.O., Gunnarson, A., Svensson, S. e Lönn, H. (1989b) *Glycoconj. J.* 6: 161-168
- Heidlas, J.E., Williams, K.W. e Whitesides, G.M. (1992) *Acc. Chem. Res.* 25: 307
- Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280: 309-316
- Henrissat, B. e Bairoch, A. (1993) *Biochem. J.* 293: 781-788
- Henrissat, B. e Bairoch, A. (1996) *Biochem. J.* 316: 695-696
- Ichikawa, Y., Look, G.C. e Wong, C-H. (1992) *Anal. Biochem.* 202: 215-238
- Ichikawa, Y., Liu, J.J.-C., Shen, G.-J. e Wong, C.-H. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 6300-6302
- Johansson, E., Hedbys, L. e Larsson, P-O (1991) *Enzyme Microbiol. Technol.* 13: 781-787
- Kannagi, R. (1997) *Glycoconj. J.* 14: 577-584
- Koenigs, W. e Knorr, E. (1901) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 34: 957-
- Koepsell, H.J. Tsuchiya, H.M., Hellman, N.N., Kazenko, A., Hoffman, C.A., Sharpe, E.S. e Jackson, R.W. (1953) *J. Biol. Chem.* 200: 793-801
- Kunz H. (1997) in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian, S. Ed) Marcel Dekker, Inc., pp 265-281
- Larsson, P.O., Hedbys, L., Svensson, S. e Mosbach, K. (1987) *Methods Enzymol.* 136: 230-233

- Leloir, L.F. (1971) *Science* 172: 1299-1303
- Leparoux, S., Fortun, Y. e Colas, B. (1994) *Biotechnol. Lett.* 16: 677-682
- Leparoux, S., Padrines, M., Fortun, Y. e Colas, B. (1996) *Biotechnol. Lett.* 18: 135-138
- Look, G.C., Ichikawa, Y., Shen, G.-J., Cheng, G.J. e Wong, C.-H. (1993) *J. Org. Chem.* 58: 4326-4330
- López, R., Fernández-Mayoralas, A. e Martín-Lomas M. (1991) *Biotechnol. Lett.* 13: 705-710
- López, R. e Fernández-Mayoralas, A (1992) *Tetrahedron Lett.* 33: 5449-5452
- López, R. e Fernández-Mayoralas, A (1994) *J. Org. Chem.* 59: 737-745
- McCarter, J.D. e Whitters, S.G. (1994) *Curr. Op. Struct. Biol.* 4: 885-892
- Mori, T. e Okahata, Y. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38: 1971-1974
- Mori, T., Fujita, S. e Okahata Y. (1997) *Carbohydr. Res.* 298: 65-73
- Nicolau, K.C. e Ueno, H. (1997) in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian, S. Ed) Marcel Dekker, Inc., pp 313-338
- Nilsson, K.G.I. (1989) *Carbohydr. Res.* 188: 9-17
- Nilsson, K.G.I. (1987) *Carbohydr. Res.* 167: 95-103
- Nilsson, K.G.I. (1988) *Carbohydr. Res.* 180: 53-59
- Nilsson, K.G.I., Eliasson, A. e Larsson-Lorek, U. (1995) *Biotechnol. Lett.* 17: 717-722
- Nilsson, K.G.I., Ljunger, G. e Malin, P.M. (1997) *Biotechnol. Lett.* 19: 889-892
- Nishimura, S.I., Lee, K.B., Matsuoka, K. e Lee, Y.C. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189: 249-254
- Okahata, Y. e Mori, T. (1997) *Trends Biotechnol.* 15: 50-54
- Palcic, M.M., Srivastava, O.P. e Hindsgaul, O. (1987) *Carbohydr. Res.* 159: 315-324
- Rebaté, M.J. (1935) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 17: 572
- Sauerbrei, B. e Thiem, J. (1992) *Tetrahedron Lett.* 33: 201-204
- Schmidt, R.R. (1986) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25: 212-235
- Schmidt, R.R. e Jung K.-H. (1997) in *Preparative Carbohydrate Chemistry* (Hanessian, S. Ed) Marcel Dekker, Inc., pp 283-312
- Scudder, P.R., Doom, J.P., Chenkova, M., Manger, I.D. e Pereira, M.E.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 9886-9891
- Stodola, F.H., Koespsell, H.J. e Sharpe, E.S. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74: 3202-3203
- Stütz, A.E. (1996) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1926-1928

- Toone, E.J., Simon, E.S., Bednarski, M.D. e Whitesides, G.M. (1989) *Tetrahedron* 45: 5365-5422
- Usui, T. e Murata, T. (1988) *J. Biochem.* 103: 969-972
- Vandekerckove, F., Schenkman, S., de Carvalho, L.P., Tomlinson, S., Kiso, M., Yoshido, M., Hasegawa, A. e Nussenzweig, V. (1992) *Glycobiology* 2: 541-548
- Wang, P., Schuster, M., Wang, Y.-F. e Wong, C.-H. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115: 10487-10491
- Watt, G.M., Lowden, P.A.S. e Flitsch, S. (1997) *Curr. Op. Struct. Biol.* 7: 652-660
- Wong, C-H., Halcomb, R.L., Ichikawa, Y. e Kajimoto, T. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34: 521-546
- Wong, C-H., Haynie, S.L. e Whitesides, G.M. (1982) *J. Org. Chem.* 47: 5416-5418
- Zilliken, F., Smith, P.N., Rose, C.S. e György, P. (1955) *J. Biol. Chem.* 217: 79-82



## Capitolo 5 Scopo della Tesi

### 5.1 Obiettivi

Nell'ultimo decennio è divenuta sempre più evidente l'importanza dei carboidrati in molte attività biologiche grazie al loro notevole potenziale informativo. Infatti, benchè solo sette o otto residui monosaccaridici vengano effettivamente utilizzati per la costruzione di molecole più complesse, la multifunzionalità di ciascun residuo consente di ottenere da un numero limitato di residui un numero elevatissimo di strutture complesse. Multifunzionalità che non riguarda solo il numero di gruppi ossidrilici che possono essere coinvolti nella formazione di un legame glicosidico, ma che riguarda anche la stereochimica del legame stesso e la presenza o meno di ramificazioni e/o di sostituenti non saccaridici. In definitiva gli oligosaccaridi possono, a buon diritto, essere considerate come *molecole altamente informative*. Non a caso fenomeni come il riconoscimento, l'adesione cellulare, la trasduzione del segnale, il differenziamento, lo sviluppo, ecc. coinvolgono una controparte saccaridica altamente specifica. La disponibilità di oligosaccaridi sintetici consentirebbe, in linea di principio, di controllare molte di queste importanti attività. In effetti sono già noti esempi di oligosaccaridi sintetici utilizzati come agenti terapeutici o addirittura come agenti anti-infettivi. Il vantaggio di un tale tipo di approccio è subito evidente. Gli oligosaccaridi sono stabili al trattamento termico (a differenza delle proteine); la loro omologia con le strutture naturali rende praticamente nullo il rischio di tossicità; non sono antigenici. Oltre a ciò, potrebbero essere utilizzati come coadiuvanti ai più classici trattamenti con antibiotici, riducendo la dose media da utilizzare (Zopf e Roth, 1996).

Nonostante tutto ciò, lo sviluppo di agenti farmaceutici basati sui carboidrati è ancora lento rispetto ad altre classi di molecole. In parte ciò è dovuto all'indisponibilità sostanziale di efficienti processi di sintesi. Infatti non esistono processi o strumenti per la sintesi rapida e specifica di oligosaccaridi. La sintesi di oligosaccaridi lineari, o ramificati biologicamente attivi, con metodi chimici convenzionali, richiede passaggi multipli di protezione e deprotezione. I metodi enzimatici sono spesso più vantaggiosi, grazie alla loro alta stereo- e regioselettività. Sono stati descritti esempi di sintesi enzimatica utilizzando glicosiltransferasi. Tuttavia, l'alta specificità delle reazioni catalizzate da questi enzimi, l'indisponibilità pratica della maggior parte di essi e la poca

maneggevolezza dei substrati naturali (NDP-zuccheri), non permettono alle glicosiltransferasi di essere utilizzate nella preparazione su larga scala di oligosaccaridi. Quest'ultimo approccio è anche complicato dal fatto che il numero preciso di glicosiltransferasi coinvolte nella sintesi di diversi oligosaccaridi non è sempre ben definito.

Da un punto di vista pratico, l'impiego delle reazioni di transglicosilazione catalizzate dalle glicosidasi è più interessante. Ci sono molti esempi dell'uso delle transglicosilazioni per la sintesi di oligosaccaridi e di nuovi glicoconjugati. Minori sono gli esempi dell'utilizzo di glicosidasi per la sintesi di oligosaccaridi biologicamente attivi. *In nessuno dei casi riportati la transglicosilazione ha portato alla sintesi di oligosaccaridi ramificati.*

Scopo della presente ricerca è di dimostrare la possibilità di utilizzare le transglicosilazioni per la sintesi di oligosaccaridi biologicamente attivi, gettando le basi per un nuovo approccio biotecnologico alternativo a quello chimico classico ed a quello enzimatico basato sull'uso delle glicosiltransferasi. In particolare l'obiettivo è stato rivolto verso la sintesi completamente transglicolitica dei seguenti oligosaccaridi:

1) NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (3'-Sialil-*N*-acetillattosammina).

Si tratta di un oligosaccaride le cui attività biologiche sono ben note. E' presente nel latte umano dove agisce come recettore per vari batteri patogeni.

Recentemente questo oligosaccaride è stato trovato sulla superficie delle cellule endoteliali di maiale e potrebbe avere un ruolo nel fenomeno del "rigetto iperacuto" degli xenotrapianti.

2) Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc (Lewis<sup>x</sup>).

Questo oligosaccaride è uno dei rappresentanti degli antigeni di superficie dei gruppi sanguigni della famiglia Lewis. Questo determinante è un componente normale delle cellule ed è coinvolto nei processi di adesione dei leucociti nel corso di processi infiammatori.

3) NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc (Sialil-Lewis<sup>x</sup>).

Tra gli oligosaccaridi sialilati il Sialil-Lewis<sup>x</sup> occupa una posizione particolare per le sue attività biologiche tra le quali è utile ricordare il suo ruolo come ligando naturale delle Selectine.

### 4) NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4XylOp-NO<sub>2</sub>Ph.

Numerosi dati sperimentali dimostrano come la presenza di xilosidi nel mezzo di coltura di cellule endoteliali può indurre la sintesi di nuovi derivati oligosaccaridici. Solo di recente si va chiarendo il ruolo di questi ultimi. Infatti sembra che alcuni di questi nuovi derivati oligosaccaridici possano agire come regolatori della biosintesi dei glicosaminoglicani. Tra i vari derivati oligosaccaridici di questo tipo il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4XylOp-NO<sub>2</sub>Ph sembra agire come un inibitore della biosintesi dei glicosaminoglicani.

## 5.2 Bibliografia

Zopf, D. e Roth, S. (1996) *The Lancet* 347: 1017-1021

# **PARTE SPERIMENTALE, RISULTATI E DISCUSSIONE**

## Capitolo 6 Sintesi del Trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

### 6.1 Premessa; Strategie e Stadi di Sintesi

Gli *oligosaccaridi sialilati* sono coinvolti in numerosi ed *importanti eventi biologici*. In particolare, come componenti strutturali di glicoproteine e glicolipidi, essi agiscono come determinanti antigenici, come recettori per proteine, virus o batteri e sono alla base di fenomeni come il riconoscimento cellulare (Philips et al, 1990; Paulsen e Tietz, 1984).

Il trisaccaride 3'-sialil-*N*-acetillattosammina (3'-SLN, Fig. 6.1) è stato trovato, in forma libera, nelle urine umane sia di soggetti sani che di quelli affetti da qualche patologia (Parkkinen e Finne, 1983; van Pelt et al, 1989). Particolarmente interessante è la sua presenza nel *latte umano* dove svolge importanti attività (Kunz e Rudloff, 1993). Recentemente questo oligosaccaride è stato individuato sulla superficie delle cellule endoteliali di maiale e sarebbe uno degli *antigeni* riconosciuti da anticorpi naturali umani responsabili del *rigetto* degli *xenotrapianti* (Oriol et al, 1993).

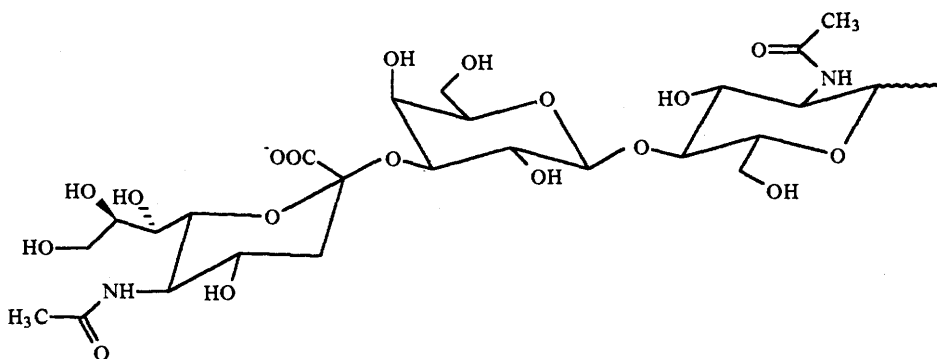


Fig. 6.1 Struttura della 3'-sialil-*N*-acetillattosammina

Il trisaccaride 3'-sialil-*N*-acetillattosammina è stato ottenuto in due tappe di sintesi. La prima si basa sulla galattosilazione regioselettiva della GlcNAc libera per ottenere la *N*-acetillattosammina. La seconda tappa comporta la sialiazione, regiospecifica, della *N*-acetillattosammina per ottenere il trisaccaride desiderato. Entrambe le tappe sono schematicamente riportate in Fig. 6.2.

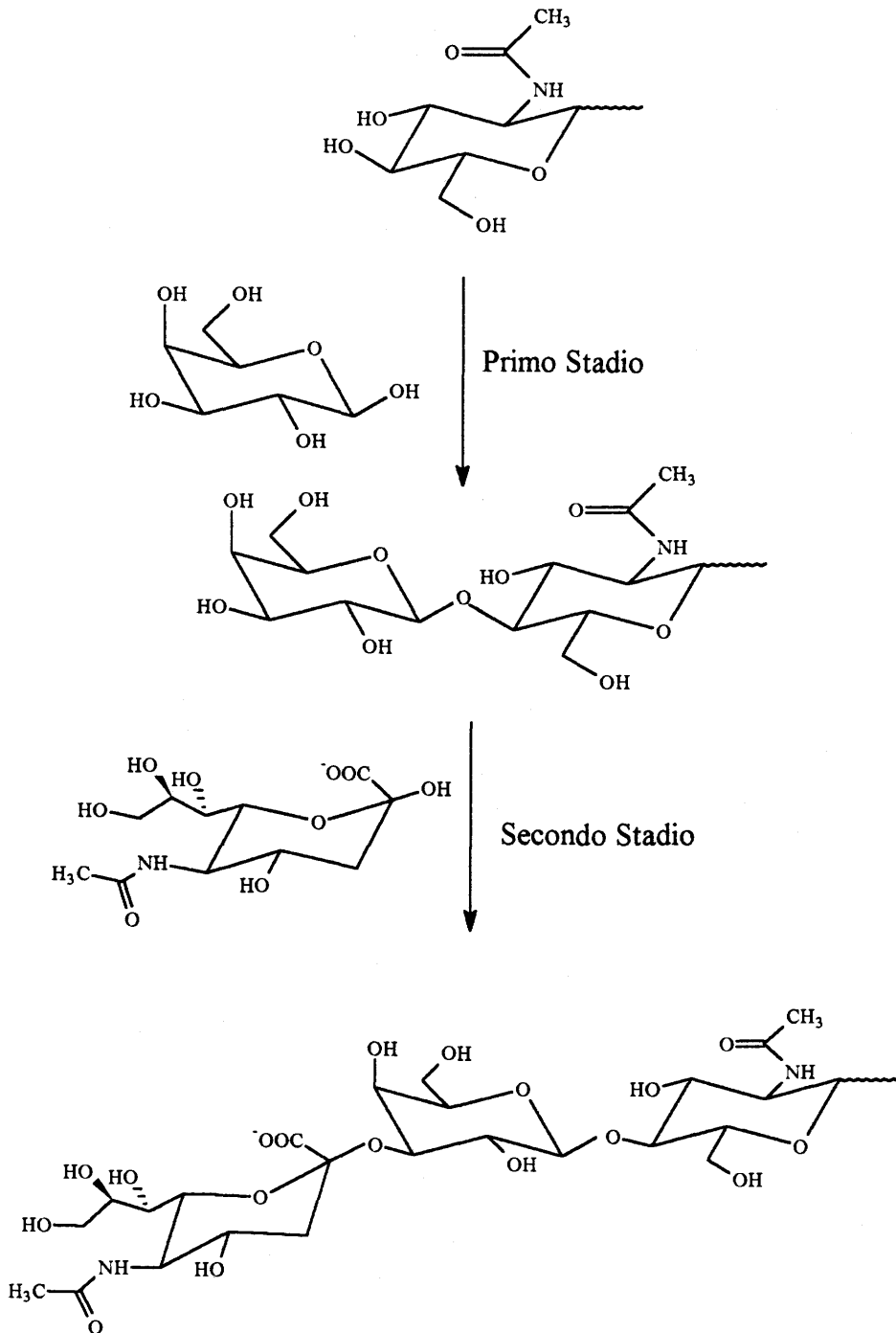


Fig. 6.2 Rappresentazione schematica delle tappe di reazione utilizzate per la sintesi della 3'-sialil-N-acetillattosammina

## 6.2. Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi: Sintesi del Disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

### 6.2.1 Determinazione dell'attività enzimatica della $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*

Per la sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc è stato utilizzato come enzima un preparato grezzo di  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans* (Biolacta N10); come donatore di residui di galattosio è stato utilizzato il lattosio, mentre come accettore è stato utilizzato GlcNAc.

La valutazione dell'attività enzimatica della  $\beta$ -D-galattosidasi è stata effettuata misurando la quantità di *o*-nitrofenolo (*o*-NO<sub>2</sub>Ph) liberatosi in seguito ad idrolisi enzimatica del substrato cromogeno *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (Gal $\beta$ O<sub>o</sub>-NO<sub>2</sub>Ph) utilizzando un protocollo di questo tipo:

Gal $\beta$ O <sub>o</sub> -NO <sub>2</sub> Ph 4 mM (in K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5)	450 $\mu$ l
$\beta$ -D-galattosidasi	50 $\mu$ l

La miscela è stata incubata per 4 minuti a 37°C. La reazione è stata bloccata mediante aggiunta di 1 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M. Le letture sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 410 nm, usando una soluzione di riferimento preparata in questo modo:

Gal $\beta$ O <sub>o</sub> -NO <sub>2</sub> Ph (4 mM in K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5)	450 $\mu$ l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.2 M)	1 ml

Le unità enzimatiche sono state calcolate in base alla formula:

$$\frac{\text{Abs}_{410} \times V}{\epsilon \times t \times d \times v} = U / \text{ml}$$

dove:

Abs<sub>410</sub> : assorbanza a 410 nm.

V : volume totale miscela di reazione, pari a 0.5 ml

$\epsilon$  : coefficiente di estinzione molare, pari a 4.6 cm<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>;

t : tempo di incubazione, pari a 4 minuti;

d : percorso ottico, pari a 1 cm;

v : volume soluzione enzima, pari a 0.050 ml.

### 6.2.2 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di transgalattosilazione

L'identificazione dei prodotti di transgalattosilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ) e del carbonio ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 210 nm, a cui assorbono i gruppi *N*-acetilici. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  Milli-Q (85:15). È stata utilizzata una colonna LiChrosorb-NH<sub>2</sub>. L'identificazione è stata ottenuta effettuando un confronto tra i profili cromatografici dei prodotti di sintesi con quelli di uno standard originale.

Le caratteristiche degli strumenti impiegati sono riportate nel paragrafo 6.5.

### 6.2.3 Cinetica di sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

Nella sintesi transglicolitica di un oligosaccaride la regiospecificità è chiaramente uno dei parametri più importanti. Normalmente le glicosidasi mostrano una preferenzialità nei confronti degli ossidrili primari dell'accettore formando essenzialmente legami 1-6. Tuttavia è possibile controllare la regioselettività in vari modi. La scelta dell'enzima è di primaria importanza per controllare questo parametro. Nel caso particolare della  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*, questo enzima presenta già di per sé una buona regioselettività verso la formazione di legami  $\beta$ 1-4 (intorno al 77%). Tuttavia per i nostri scopi la contaminazione da parte dell'isomero  $\beta$ 1-6 è ancora troppo alta. Infatti, dal momento che l'interesse è volto solo all'ottenimento della *N*-acetillattosammina (NAcLac), sono stati esaminati alcuni parametri sperimentali che potessero influenzare la regioselettività della reazione di transglicosilazione catalizzata dalla  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*. In particolare sono stati analizzati parametri come il pH e la temperatura in una serie di esperimenti di cinetica enzimatica. Sono state confrontate le rese (assolute e relative) e la regioselettività della reazione di transgalattosilazione a 15°C, 25°C e a 55°C e a tre diversi valori di pH (pH 5.0, pH 6.4 e pH 8.0).

Da un punto di vista sperimentale si è proceduto in questo modo:



Lattosio	12.5 mmoli
GlcNAc	4.06 mmoli
H <sub>2</sub> O	8.1 ml

Questa soluzione è stata suddivisa in tre gruppi di tre aliquote da 900  $\mu$ l ciascuna. Alle tre aliquote di ciascun gruppo è stato aggiunto, rispettivamente, 1 ml di uno dei seguenti tamponi:

CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH 100 mM pH 5.0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 6.5

Tris-HCl 100 mM pH 8.0

Infine a tutte le aliquote sono stati aggiunti 100  $\mu$ l (corrispondenti a 6 U) di una soluzione di  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*. I tre gruppi di aliquote, contenenti ciascuno i tre diversi tamponi, sono stati incubati rispettivamente a 15°C, a 25°C e a 55°C. Durante l'incubazione, ad ogni ora, sono stati prelevati 100  $\mu$ l di ciascuna soluzione che sono stati aggiunti a 900  $\mu$ l di acqua distillata ed immediatamente incubati a 100 °C per 10 minuti per inattivare l'enzima. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrinatante è stato analizzato mediante HPLC come sopra descritto. Le concentrazioni dei prodotti (NAcLac e NAcAlloLac) sono state determinate mediante delle rette di calibrazione ottenute analizzando all'HPLC le seguenti soluzioni standard di NAcLac e NAcAlloLac.

Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 2.6 mM	iniettati 20 $\mu$ l (52 nmoli)
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc "	"
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 2.0 mM	iniettati 20 $\mu$ l (40 nmoli)
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc "	"
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 1.5 mM	iniettati 20 $\mu$ l (30 nmoli)
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc "	"
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 1.04 mM	iniettati 20 $\mu$ l (20.8 nmoli)
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc "	"
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc 0.52 mM	iniettati 20 $\mu$ l (10.4 nmoli)
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc "	"

Riportando in grafico le nmoli iniettate in funzione dell'area dei picchi corrispondenti si ottengono le seguenti curve di calibrazione (Fig. 6.3):

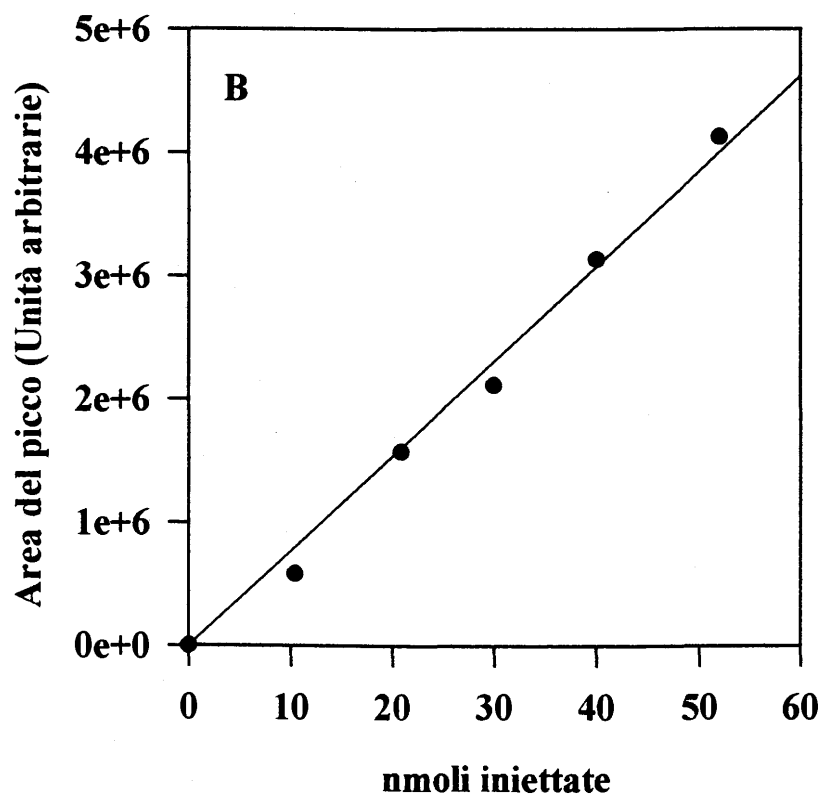
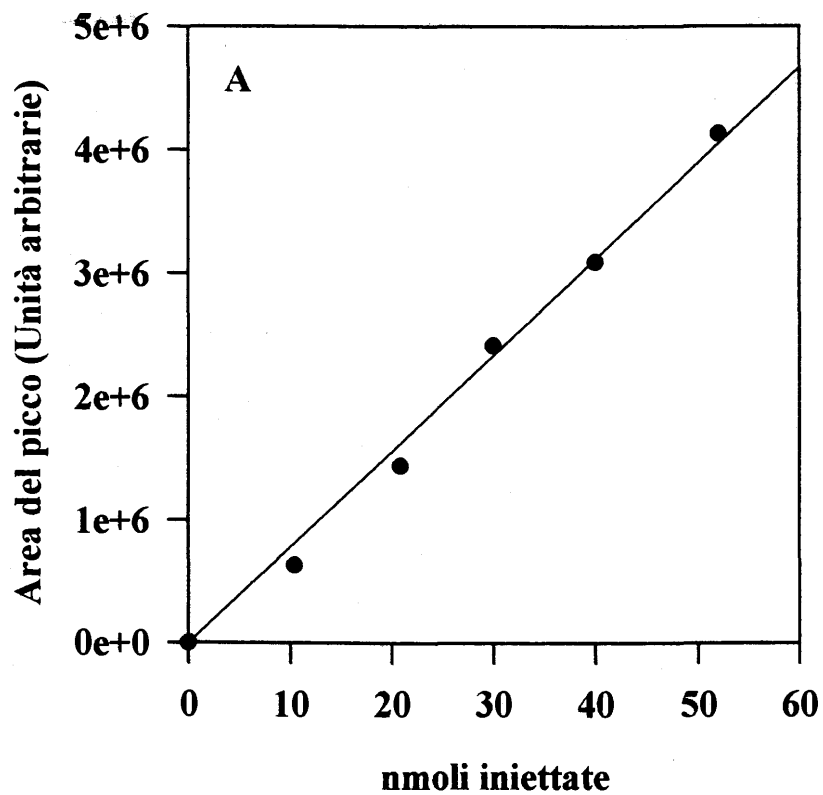


Fig. 6.3 Curve di calibrazione per la NAcLac (A) e per la NAcAlloLac (B)

Da queste è stato possibile calcolare i coefficienti angolari delle rette, dalle quali sono state calcolate la quantità dei prodotti di transglicosilazione (NAcLac e NAcAlloLac) utilizzando la seguente relazione:

$$\frac{A \times 10}{C.A. \times v} = \text{mM di prodotto di transglicosilazione}$$

dove:

A: Area del picco

10: Fattore di diluizione dell'aliquota della miscela di reazione

C.A.: Coefficiente angolare della retta di calibrazione

v: Volume iniettato (in  $\mu$ l)

### 6.2.4 Produzione del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

La reazione utilizzata per la sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc è schematicamente rappresentata in Fig. 6.4

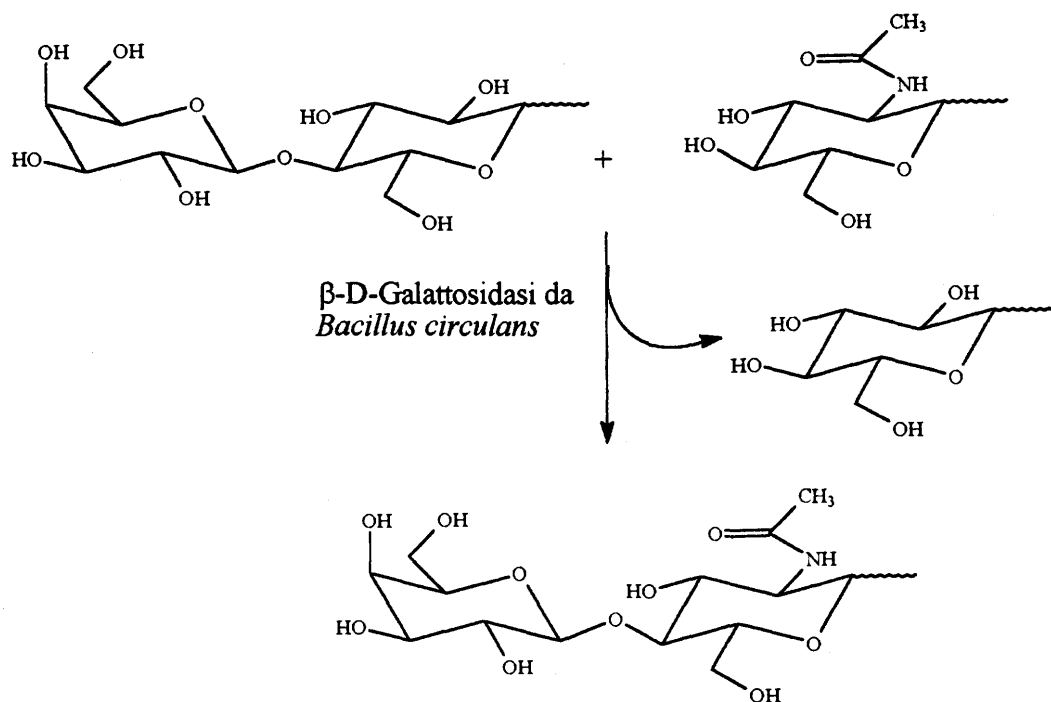


Fig. 6.4 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi della N-acetilglucosammina

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc si è operato in questo modo:

Lattosio	1.4 mmoli
GlcNAc	0.452 mmoli
CH <sub>3</sub> COONa/CH <sub>3</sub> COOH 50 mM pH 5.0	2.0 ml
$\beta$ -D-galattosidasi	6 U

La miscela è stata incubata a 15°C per tre ore. Al termine del periodo di incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato purificato su un sistema di due colonne di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) collegate in serie ed equilibrate in acqua distillata. L'andamento della purificazione è stato seguito utilizzando un rivelatore ad indice di rifrazione. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante HPLC, come sopra descritto, e quelle corrispondenti al prodotto di transglicosilazione sono state riunite e liofilizzate. Su un'aliquota del liofilo è stato determinato il grado di contaminazione della *N*-acetilglucosammina, del glucosio e del lattosio.

### 6.2.5 Determinazione della *N*-acetilglucosammina

La *N*-acetilglucosammina è stata determinata utilizzando una modificazione del saggio colorimetrico di Morgan-Elson per la determinazione delle esosammine (Reissig et al., 1955). Il saggio si basa sulla formazione di un composto intermedio, un gluco-ossazolino, in seguito a reazione a caldo delle acetilesosammine con alcali. La reazione di questo intermedio con 4-(*N,N*-dimetilammino)-benzaldeide in ambiente acido porta alla formazione di un composto colorato.

I reattivi sono stati preparati in questo modo:

K <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·4H <sub>2</sub> O	6.1 g
H <sub>2</sub> O	100 ml

10 grammi di 4-(*N,N*-dimetilammino)-benzaldeide sono stati sciolti in una soluzione così costituita:

H <sub>2</sub> O	1.5 ml
HCl	11 ml
CH <sub>3</sub> COOH	87.5 ml

Il saggio viene eseguito seguendo un protocollo di questo tipo:

Campione (1 mg/ml)	da 0 a 250 $\mu$ l (A)
H <sub>2</sub> O	da 250 a 0 $\mu$ l (B)
Soluzione di K <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50 $\mu$ l (C)

La miscela è stata incubata per 3 minuti a 100 °C e raffreddata rapidamente. Ad essa sono stati aggiunti 1.5 ml della soluzione di 4-(*N,N*-dimetilammino)-benzaldeide diluita 1:5 con CH<sub>3</sub>COOH. La miscela è stata incubata a 37 °C per 20 minuti. Le letture sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 585 nm, usando come riferimento una soluzione composta dalle soluzioni B e C e acqua fino ad un volume finale di 300  $\mu$ l e trattata come il campione.

Una retta di calibrazione è stata ottenuta utilizzando le seguenti soluzioni standard:

GlcNAc 1 mg/ml	10 $\mu$ l (10 $\mu$ g)
GlcNAc 0.8 mg/ml	10 $\mu$ l (8 $\mu$ g)
GlcNAc 0.6 mg/ml	10 $\mu$ l (6 $\mu$ g)
GlcNAc 0.4 mg/ml	10 $\mu$ l (4 $\mu$ g)
GlcNAc 0.2 mg/ml	10 $\mu$ l (2 $\mu$ g)

Si segue poi il protocollo descritto sopra.

Riportando in grafico i  $\mu$ g saggiati in funzione dell'assorbanza si ottiene la seguente curva di calibrazione (Fig. 6.5).

Da questa è stato possibile calcolare il coefficiente angolare della retta così ottenuta, dal quale è stata calcolata la quantità di di *N*-acetilglucosamina utilizzando la seguente relazione:

$$\frac{\text{Abs.}_{585 \text{ nm}}}{\text{C.A.} \times v} = \text{mg / ml di GlcNAc}$$

dove:

Abs<sub>585</sub>: Assorbanza dei campioni

C.A.: Coefficiente angolare della retta di calibrazione

v: volume del campione (in  $\mu$ l)

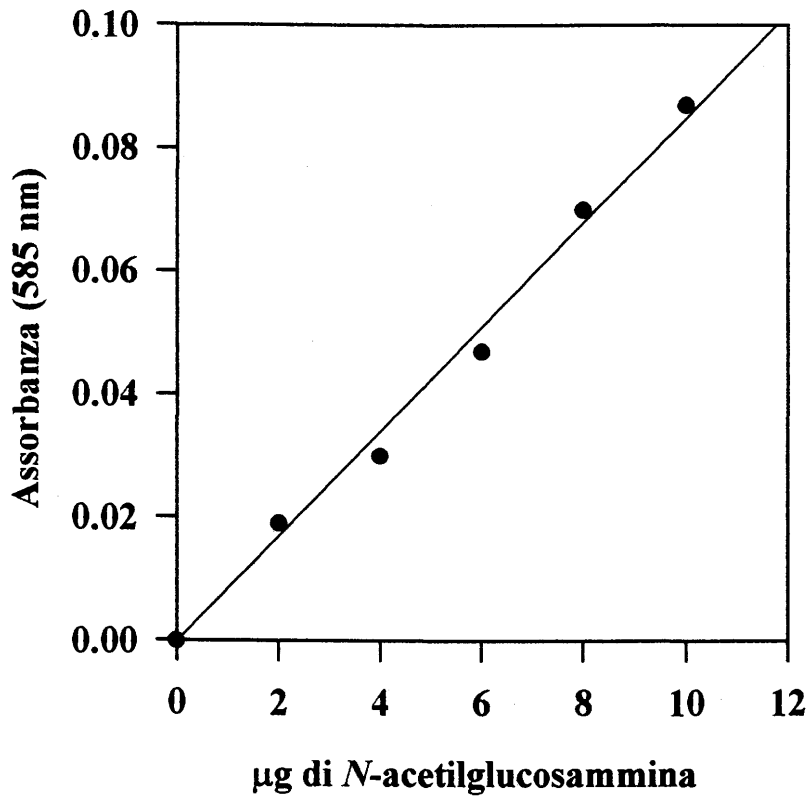


Fig. 6.5 Curva di calibrazione per la N-acetilglucosamina

### 6.2.6 Determinazione del glucosio

Il glucosio è stato determinato utilizzando un kit commerciale basato su un saggio colorimetrico. Il glucosio viene trasformato dalla glucosio ossidasi (GOD) in acido gluconico e perossido di idrogeno che, in presenza di perossidasi (POD), ossida il cromogeno (4-aminofenazone/fenolo) formando un composto rosso (Trinder, 1969).

La soluzione di reazione è così costituita:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 170 mM, pH 7.0	1 l
GOD	5000 U
POD	3000 U
4-Aminofenazone	0.280 mmoli
Fenolo	16 mmoli

Il saggio viene eseguito seguendo un protocollo di questo tipo:

Campione (1 mg/ml)	da 0 a 20 $\mu$ l (A)
H <sub>2</sub> O	da 20 a 0 $\mu$ l (B)
Miscela di reazione	2.5 ml (C)

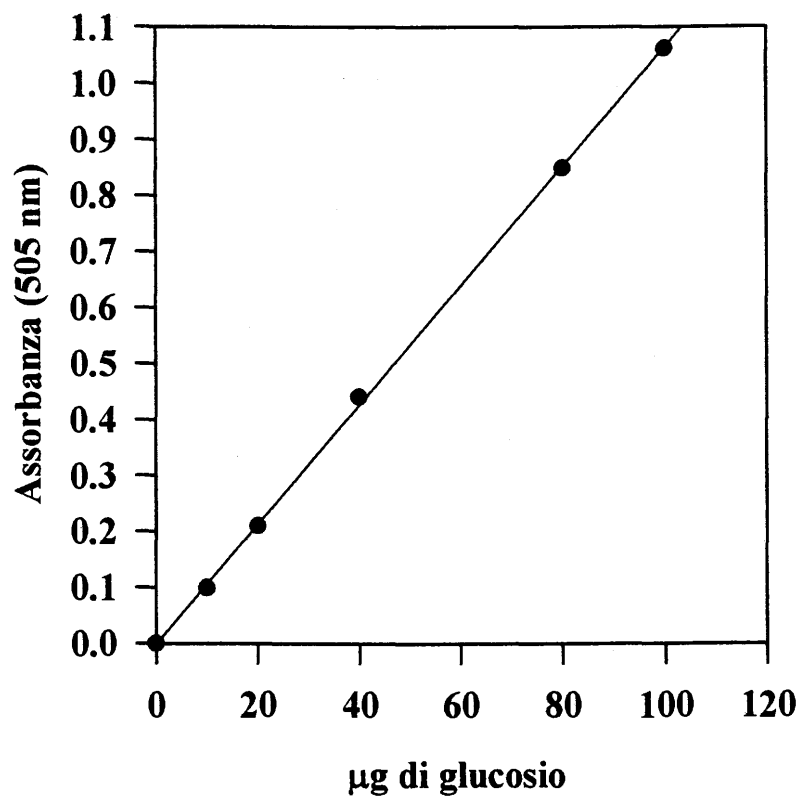
La miscela è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. Le letture sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 505 nm, usando come riferimento una soluzione composta dalle soluzioni B e C e acqua fino ad un volume finale di 2.540 ml.

Una retta di calibrazione è stata ottenuta utilizzando le seguenti soluzioni standard:

Glc 10 mg/ml	10 $\mu$ l (100 $\mu$ g)
Glc 8 mg/ml	10 $\mu$ l (80 $\mu$ g)
Glc 6 mg/ml	10 $\mu$ l (60 $\mu$ g)
Glc 4 mg/ml	10 $\mu$ l (40 $\mu$ g)
Glc 2 mg/ml	10 $\mu$ l (20 $\mu$ g)

Si segue poi il protocollo descritto sopra.

Riportando in grafico i  $\mu$ g saggiati in funzione dell'assorbanza si ottiene la seguente curva di calibrazione (Fig. 6.6).



*Fig. 6.6 Curva di calibrazione per il glucosio*



Da questa è stato possibile calcolare il coefficiente angolare della retta così ottenuta, dal quale è stata calcolata la quantità di di glucosio utilizzando la seguente relazione:

$$\frac{\text{Abs}_{505}}{\text{C.A.} \times v} = \text{mg / ml di Glc}$$

dove:

Abs<sub>505</sub>: Assorbanza dei campioni a 505 nm.

C.A.: Coefficiente angolare della retta di calibrazione.

v: volume del campione (in  $\mu$ l)

### 6.2.7 Determinazione del lattosio

Il lattosio è stato determinato come glucosio prodotto, utilizzando il saggio sopra descritto, in seguito ad idrolisi enzimatica mediante  $\beta$ -D-galattosidasi.

Da un punto di vista sperimentale si è operato in questo modo:

Campione 1 mg/ml (in K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5)	1 ml
$\beta$ -D-galattosidasi	1 U

La miscela viene incubata un'intera notte a 37°C. Dopo inattivazione dell'enzima mediante riscaldamento a 100°C e centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, sul sovrinatante è stato determinato il contenuto di glucosio come descritto in precedenza.

### 6.3 Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi: Sintesi del Trisaccaride<sup>4</sup> NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

#### 6.3.1 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di trans-sialilazione

L'identificazione dei prodotti di trans-sialilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ) e del carbonio ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 210 nm, a cui assorbono i gruppi *N*-acetilici. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{KH}_2\text{PO}_4$  (50:50). E' stata utilizzata una colonna LiChrosorb-NH<sub>2</sub>. L'identificazione è stata ottenuta effettuando un confronto tra i profili cromatografici dei prodotti di sintesi con quelli di uno standard originale.

Le caratteristiche degli strumenti impiegati sono riportate nel paragrafo 6.5.

#### 6.3.2 Coltura delle cellule di *Escherichia coli* contenenti il plasmide pTS154cat per l'espressione della trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi*

Il ceppo di di *Escherichia coli* contenente il plasmide pTS154cat che esprime il gene per la trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi*, è stato coltivato in capsula Petri su un terreno solido di Luria-Bertani (LB-Agar) così costituito:

Bacto-triptone	10 g
Bacto-yeast estratto	5 g
NaCl	5 g
Bacto-agar	14 g
H <sub>2</sub> O	1 l

La soluzione così preparata è stata sterilizzata mediante autoclavaggio. La soluzione è stata fatta raffreddare fino a 50°C. A questo punto sono stati aggiunti 50 mg di ampicillina. La soluzione è stata poi versata in piastre Petri e lasciata raffreddare a temperatura ambiente.

Con un'ansa da batteriologia sono state prelevate alcune cellule di *Escherichia coli* pTS154cat da una riserva mantenuta a -20°C (50% glicerolo e 50% sospensione batterica). Le piastre sono state poi incubate a 37°C per 12 ore. Successivamente si procede ad una coltura in terreno liquido di Luria-Bertani (LB) così preparato:

Bacto-triptone	10 g
Bacto-yeast estratto	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	1 l

La soluzione così preparata è stata sterilizzata mediante autoclavaggio. La soluzione è stata fatta, poi, raffreddare fino a 37°C. Una singola colonia della coltura in LB-Agar è stata trasferita in 10 ml di terreno liquido LB contenente 500 µg di ampicillina. Le cellule sono state fatte crescere a 37°C per 12 ore. Successivamente questa coltura è stata diluita 1:50 con terreno liquido LB contenente 25 mg di ampicillina. La coltura è stata mantenuta a 37°C, sotto agitazione, fino ad assorbanza a 600 nm pari a 0.7. A questo punto è stato aggiunto IPTG fino ad una concentrazione finale pari a 2 mM, per indurre l'espressione della trans-sialidasi. Dopo altre 5 ore di incubazione a 37°C sotto agitazione, le cellule sono state fatte sedimentare mediante centrifugazione a 3'000 rpm per 10 minuti a 4°C.

### 6.3.3 Estrazione e purificazione della trans-sialidasi

Il precipitato di cellule, ottenuto come sopra descritto, è stato ripreso in un tampone di permeabilizzazione secondo il seguente rapporto: 20 ml di tampone/litro di coltura.

Il tampone di permeabilizzazione è così costituito:

Tris 100 mM pH 7.8  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 32 mM pH 7.8  
Triton X-100 4%

Dopo breve agitazione su vortex per risospendere le cellule, alla soluzione è stato aggiunto Polimixina B fino ad ottenere una concentrazione finale pari a 200 µ

g/ml. La sospensione di cellule è stata poi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente seguiti, da 30 minuti di incubazione in ghiaccio (Schupp et al., 1995).

Al termine di questa operazione la sospensione di cellule è stata centrifugata a 11'000 rpm per 10 minuti e sul sovrinatante è stato aggiunto imidazolo fino ad ottenere una concentrazione finale pari a 10 mM. A questo punto sono stati aggiunti 2 ml di resina Ni-agarosio preparata in questo modo: in una provetta tipo Eppendorf, 2 ml di una sospensione di Ni-agarosio sono stati centrifugati a 2'000 rpm per 1 minuto. Il sovrinatante è stato sostituito con acqua, la resina risospesa e ricentrifugata come sopra. Il lavaggio con acqua è stato ripetuto almeno due volte. Dopo l'ultima centrifugazione l'acqua è stata sostituita con un tampone di legame così costituito:

Tris 100 mM pH 7.8

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 32 mM pH 7.8

Triton X-100 0.5%

Imidazolo 10 mM

Si procede come descritto per il lavaggio con acqua. Dopo l'ultima centrifugazione la resina è stata trasferita nell'estratto cellulare e mantenuto sotto costante rotazione per 30 minuti a 4°C. Al termine l'intera sospensione è stata trasferita in una colonnina (6.5 x 1.0 cm) e la resina è stata lavata con 30 volumi di tampone di legame raccogliendo frazioni da 1 ml.

L'enzima è stato successivamente recuperato mediante eluizioni successive con le seguenti soluzioni:

PBS contenente imidazolo 33 mM

PBS contenente imidazolo 67 mM

PBS contenente imidazolo 125 mM

PBS contenente imidazolo 250 mM

Di tutte le eluizioni sono state raccolte frazioni da 1 ml.

Sulle frazioni pari degli eluati con PBS contenenti imidazolo si effettua una corsa elettroforetica in SDS secondo il protocollo di Laemmli (Laemmli, 1970). È stato utilizzato un gel di acrilammide al 7.5% preparato nel seguente modo:

Per il "running" gel:

Acrilammide/bis-acrilammide (30:0.8)	2.5 ml
Tampone di "running"	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	4.9 ml
SDS 10%	100 $\mu$ l
(NH <sub>4</sub> )S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	100 $\mu$ l
TEMED	7.5 $\mu$ l

Per lo "stacking" gel:

Acrilammide/bis-acrilammide (30:0.8)	625 $\mu$ l
Tampone di "stacking"	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	3.1 ml
SDS 10%	50 $\mu$ l
(NH <sub>4</sub> )S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	50 $\mu$ l
TEMED	4 $\mu$ l

Il tampone di "running" è costituito da Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 (4x).

Il tampone di "Stacking" è costituito da Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 (4x).

I campioni sono stati preparati come segue:

Campione di proteine	10 $\mu$ l
Tampone di "Loading"	10 $\mu$ l

Il tampone di "Loading" è così costituito:

Tampone di "Stacking"	125 $\mu$ l
SDS 1%	200 $\mu$ l
Glicerolo	100 $\mu$ l
2-Mercaptoetanolo	50 $\mu$ l
Blu di bromofenolo 0.4%	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	500 $\mu$ l

I campioni sono stati bolliti per 1 minuto, raffreddati e caricati sul gel elettroforetico. La separazione è avvenuta utilizzando un voltaggio fisso di 50 V

per 60 minuti e 150 V per 90 minuti utilizzando come tampone di corsa Tris-Glicina 25 mM pH 8.3 contenente SDS 0.1%.

Al termine della corsa il gel è stato colorato per 2 ore con una soluzione di Coomassie R250 preparata nel seguente modo:

Coomassie R250	0.2%
CH <sub>3</sub> OH: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH	(5:4:1)

L'eccesso di colore è stato rimosso mediante frequenti lavaggi con una soluzione di decolorazione costituita da:

CH <sub>3</sub> COOH	70 ml
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	250 ml
H <sub>2</sub> O	680 ml

### 5.3.4 Determinazione dell'attività enzimatica della trans-sialidasi

Sulle frazioni pari dei lavaggi con il tampone di legame e sulle corrispondenti degli eluati con PBS contenenti imidazolo è stata determinata l'attività enzimatica della trans-sialidasi nel seguente modo:

3'-Sial-Lattosio 2 mM	25 $\mu$ l
[ <sup>14</sup> C]-Lattosio	1 $\mu$ l
PBS 100 mM pH 7.2	4 $\mu$ l
BSA 1%	10 $\mu$ l
Frazione	10 $\mu$ l

La miscela di reazione è stata incubata per 1 ora a 37°C. Al termine è stato aggiunto 1 ml di H<sub>2</sub>O e la miscela di reazione è stata caricata su una colonnina di QAE-Sephadex A25 (1.5 x 1.0 cm) preventivamente equilibrata in acqua. La resina è stata lavata con 10 x 1ml di acqua ed infine con 10 x 1 ml di formiato di ammonio 1M. Tutte le frazioni sono state raccolte in "vials" per scintillazione. Ad esse sono stati aggiunti 5 ml di cocktail di scintillazione e contate per 10 minuti.

Le nmoli di 3'-sialil-[<sup>14</sup>C]-Lattosio prodotte sono state determinate mediante la seguente relazione:

$$\frac{\text{dpm} \times 4 \times 30}{4.4 \cdot 10^5 \times t \times v} = \text{U} / \text{ml}$$

dove:

dpm: dpm contate

4: nmoli di [ $^{14}\text{C}$ ]-Lattosio

30: 30 minuti

$4.4 \cdot 10^5$ : dpm corrispondenti a 4 nmoli di [ $^{14}\text{C}$ ]-Lattosio

t: tempo di incubazione della miscela di reazione (in minuti)

v: volume di enzima utilizzato (in  $\mu\text{l}$ )

Una unità di trans-sialidasi corrisponde alla quantità di enzima che produce 1 nmole di 3'-sialil- [ $^{14}\text{C}$ ]-Lattosio in 30 minuti nelle condizioni di saggio.

Sulla base dell'analisi elettroforetica e del saggio enzimatico tutte le frazioni corrispondenti alle eluizioni con PBS contenente imidazolo 33 mM e 67 mM sono state riunite in un unico pool. Mediante una serie di centrifugazioni a 4'000 rpm a 4°C su membrane coniche Centriflo CF25 si è provveduto a ridurre il volume della soluzione enzimatica e a cambiare tampone sostituendolo con PBS.

### 6.3.5 Produzione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

Le reazioni utilizzate per la sintesi di questo prodotto sono schematizzate in Fig. 6.7.

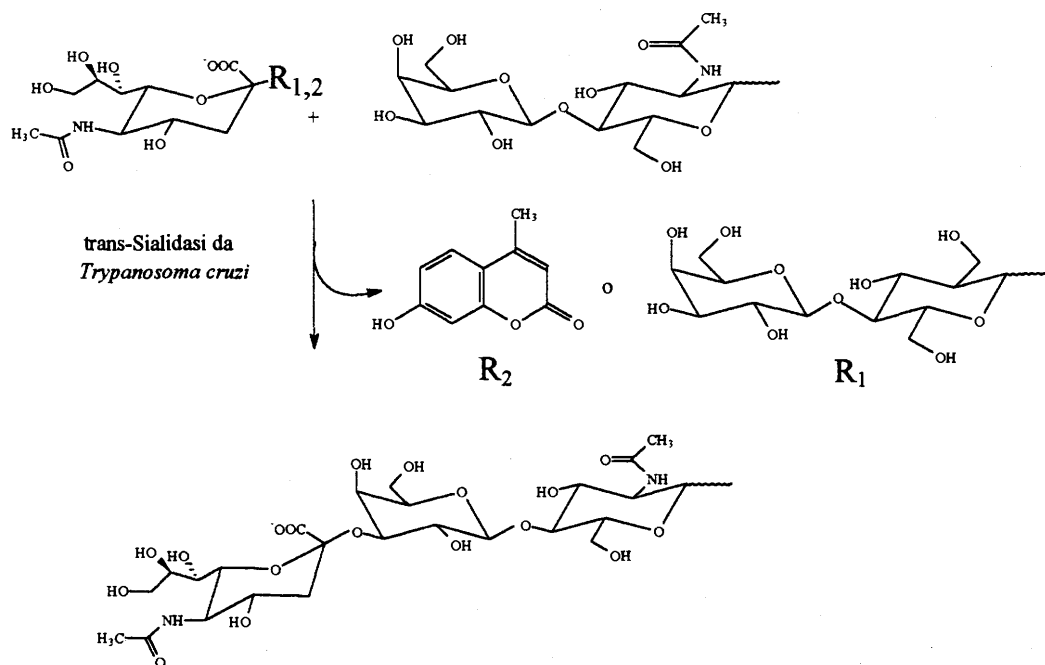


Fig. 6.7 Rappresentazione schematica delle reazioni utilizzate per la sintesi del trisaccaride 3'-sialil-N-acetilglucosammina

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc si è operato seguendo due diversi approcci.

#### 6.3.5.1 Sintesi e purificazione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ottenuto utilizzando 3'-Sialil-Lattosio come donatore

Per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc utilizzando 3'-Sialil-Lattosio come donatore si è operato in questo modo

3'-Sialil-Lattosio	7.8 $\mu$ moli
NAcLac	7.8 $\mu$ moli
BSA 1%	100 $\mu$ l
PBS 100 mM pH 7.2	fino a 500 $\mu$ l
trans-sialidasi	13 U



La miscela è stata incubata a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato diluito 20 volte con acqua e purificato su una colonna di QAE-Sephadex A25 (15 x 1.5 cm) equilibrata in acqua. La colonna è stata lavata con circa 10 volumi di acqua ed infine eluita con 10 volumi di formiato d'ammonio 1M. L'andamento della purificazione è stato seguito mediante TLC sviluppata in CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH : NH<sub>4</sub>OH (1N) : H<sub>2</sub>O (6:2:1) e rivelata mediante uno spray costituito da una soluzione di orcinolo allo 0.2% in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Tutte le frazioni che presentavano un R<sub>f</sub> corrispondente a quello dello standard sono state riunite. Il pool così ottenuto è stato sottoposto a desalificazione su di una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in acqua distillata. L'andamento della desalificazione è stato seguito utilizzando un rivelatore ad indice di rifrazione. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante TLC come descritto sopra. Le frazioni che presentavano un R<sub>f</sub> corrispondente a quello dello standard sono state riunite e liofilizzate.

### 6.3.5.2 Sintesi e purificazione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc ottenuto utilizzando NeuAc-mU come donatore

Per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc utilizzando NeuAc-mU come donatore si è operato in questo modo:

NeuAc-mU	10 $\mu$ oli
NAcLac	10 $\mu$ oli
BSA 1%	100 $\mu$ l
PBS 100 mM pH 7.2	fino a 500 $\mu$ l
trans-sialidasi	13 U

La miscela è stata incubata a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato sottoposto a estrazione in fase solida su una cartuccia di C<sub>18</sub> preventivamente condizionata mediante lavaggio con 3 volumi di metanolo, seguiti da un lavaggio con 3 volumi di acqua distillata. Dopo caricamento del campione la colonna è stata

lavata con 3 volumi di acqua distillata, seguiti da 3 volumi di metanolo. Con questo primo passaggio di purificazione i composti polari, come il NAcLac e il prodotto di transsialilazione, sono stati eluiti con il lavaggio acquoso, mentre i composti meno polari, come il NeuAc-mU e il mU, sono stati eluiti con il metanolo. La fase acquosa è stata portata a secco mediante evaporazione sottovuoto e il residuo secco è stato risospeso in 5 ml di acqua distillata. La completa separazione e purificazione del prodotto di trans-sialilazione è stata ottenuta come descritto sopra.

## 6.4 Risultati e Discussione

### 6.4.1 Sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

Per la prima reazione di transglicosilazione è stato utilizzato come enzima la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*. Le proprietà transglicolitiche di questo enzima sono ben note (Mozaffar et al., 1985; Mozaffar et al., 1986; Mozaffar et al., 1989). Altrettanto ben descritto è il suo utilizzo biotecnologico per la sintesi transglicolitica di oligosaccaridi e glicosidi (Sakai et al, 1992; Usui et al, 1993; Vic et al, 1996).

Come aspetto preliminare sono stati esaminati gli effetti di parametri sperimentali come il pH e la temperatura sulla sintesi della NAcLac (Fig. 6.8). Quello che emerge dall'esame della Fig. 6.8 è che con una incubazione a 15°C o a 25°C si ottiene la massima produzione di NAcLac dopo circa 3 ore. In questo breve intervallo di tempo la sintesi dell'isomero NAcAlloLac si mantiene sempre a livelli mai superiori al 10%. Il risultato migliore, in termini di regioselettività, è stato osservato con una incubazione a 15°C (Fig 6.8 A e 6.8 B) condizione in cui in corrispondenza della massima produzione di NAcLac, la quantità dell'isomero NAcAlloLac è inferiore al 2%. Con una incubazione a 25°C, in corrispondenza dello stesso valore temporale l'isomero NAcAlloLac corrisponde al 10% del totale. Con una incubazione a 55°C la produzione massima di NAcLac viene ottenuta dopo 1 ora di incubazione, ma la resa è comunque inferiore a quella osservata, per lo stesso tempo, per le altre due temperature esaminate. In più, essa decresce nei tempi immediatamente successivi. Al contrario, la comparsa dell'isomero NAcAlloLac aumenta costantemente per tutto l'intervallo di incubazione considerato, e, in particolare, in quantità superiori al 20% fin dalla prima ora.

Per quanto riguarda l'effetto del pH, considerando solo le temperature alle quali la resa e la regioselettività sono più significative (15°C e 25°C) i risultati migliori sono stati osservati a pH 5.0.

Stabilite le migliori condizioni sperimentali, in termini di resa e regioselettività (15°C e pH 5.0) è stata effettuata una sintesi preparativa della NAcLac al fine di ottenere una quantità di prodotto sufficiente da poter permettere la caratterizzazione dello stesso e la disponibilità di substrato per la successiva reazione di trans-sialilazione. La purificazione mediante cromatografia di gel filtrazione su Bio-Gel P2 ha permesso una buona separazione della miscela di reazione (Fig. 6.9). L'analisi HPLC ha permesso di identificare il picco III come quello a cui corrispondeva il maggior contenuto di prodotto ed il minor grado di

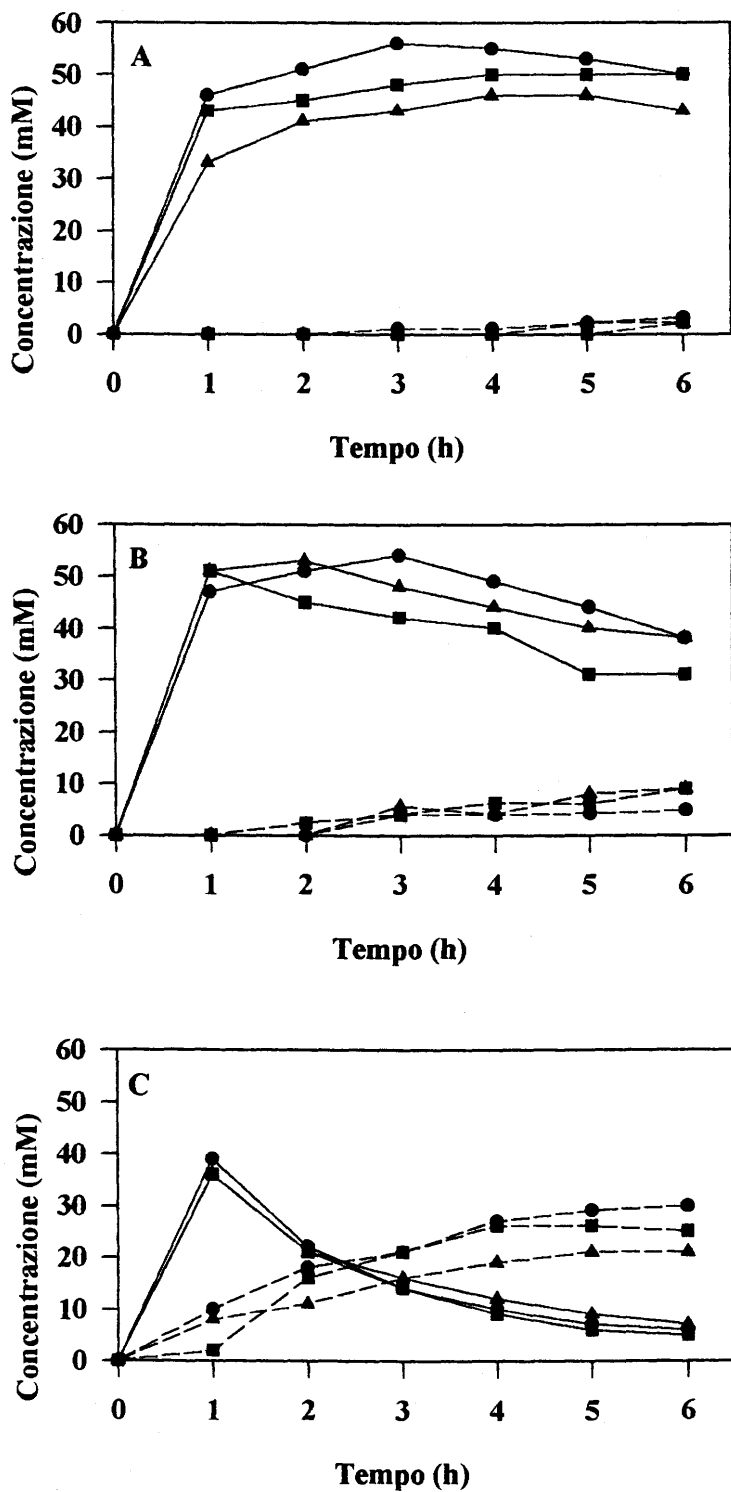


Fig. 6.8 Cinetica di sintesi della NAcLac (—) e della NAcAlloLac (---) a pH 5.0 (●), pH 6.4 (■) e a pH 8.0 (▲) a 15°C (A), 25°C (B) e 55°C (C)

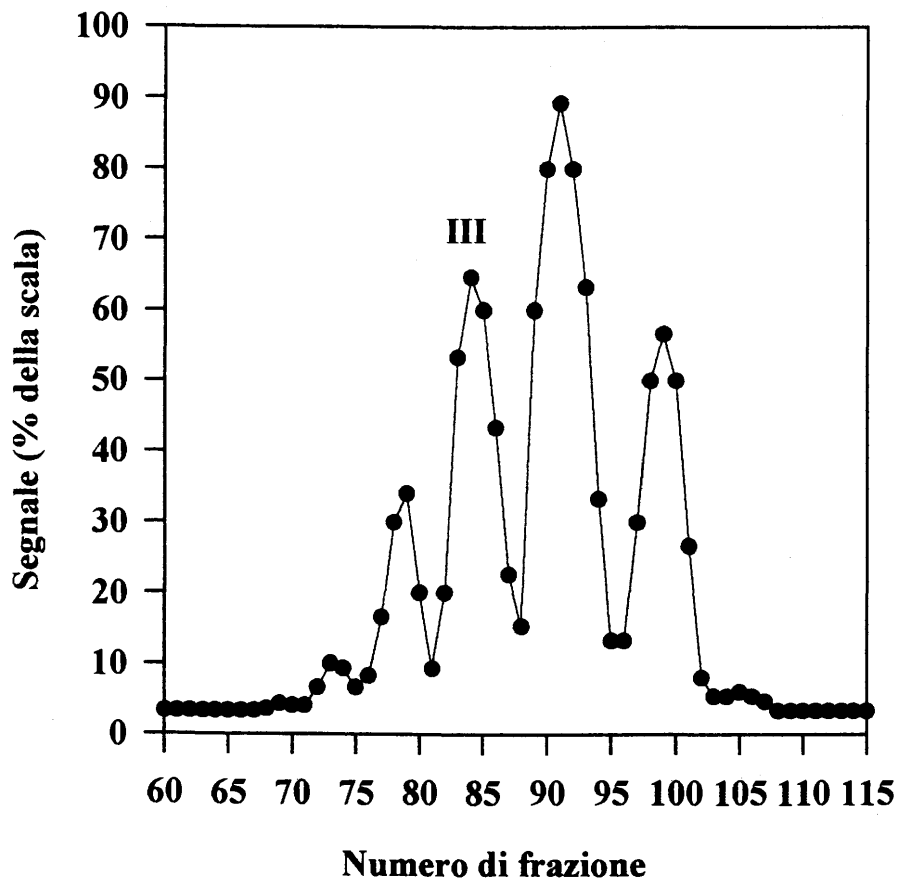


Fig. 6.9 Profilo della prima cromatografia su Bio-Gel P2

contaminazione. Tuttavia, un'analisi più precisa della composizione del picco ha rivelato che, anche se la NAcLac costituiva l'83% dell'intera composizione del picco, il 17% era ancora rappresentato da monosaccaridi e disaccaridi contaminanti. Pertanto le frazioni corrispondenti al picco III sono state sottoposte ad una ulteriore analisi cromatografica sullo stesso sistema di colonne (Fig. 6.10).

Il picco IIIa corrisponde alla NAcLac pura. Dopo liofilizzazione delle frazioni corrispondenti a questo picco sono stati ottenuti 40-42 mg di un solido amorfo che corrispondono ad una *resa molare* pari al 42% rispetto all'accettore. Il prodotto così ottenuto è stato sottoposto alla caratterizzazione per l'identificazione. Il profilo HPLC del prodotto di sintesi e di uno standard danno tempi di ritenzione perfettamente coincidenti (Fig. 6.11). In più le condizioni di separazione hanno consentito anche una buona separazione della NAcLac rispetto alla NAcAlloLac, il che ha permesso anche una valutazione quantitativa della contaminazione da parte di quest'ultimo. I dati di caratterizzazione strutturale ottenuti mediante NMR coincidono con quelli riportati in letteratura per lo stesso disaccaride. Dall'analisi dello spettro di massa sono stati evidenziati i seguenti ioni: 384.2 e 406.0 che corrispondono, rispettivamente, a  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  (Fig. 6.12).

In conclusione, analizzando i risultati ottenuti, da un punto di vista comparativo rispetto a quelli di letteratura (Sakai et al., 1992) si osserva un miglioramento significativo della resa molare del prodotto che passa dal 23% riportato in letteratura (Sakai et al., 1992) al 42% con un miglioramento relativo quasi del 100%. Anche la regioselettività è notevolmente migliorata passando dal 90% (Sakai et al., 1992) al 98%. Il tempo di incubazione è passato dalle 24 ore alle 3 ore attuali. Infine anche la quantità di enzima si è ridotta passando dalle 15U della letteratura alle attuali 6U.

### 6.4.2 Sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc

Il prodotto ottenuto dalla prima reazione di transglicosilazione è stato utilizzato come accettore per la reazione di trans-sialilazione catalizzata dalla trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi*. Come già descritto nella parte introduttiva (vedi Capitolo 4), la trans-sialidasi appartiene a quella particolare classe di glicosidasi note come transglicosidasi. La loro caratteristica più interessante è quella di trasferire residui glicosidici da una molecola donatrice ad un accettore *con un basso grado di idrolisi*. Nel caso della trans-sialidasi possono essere utilizzati come

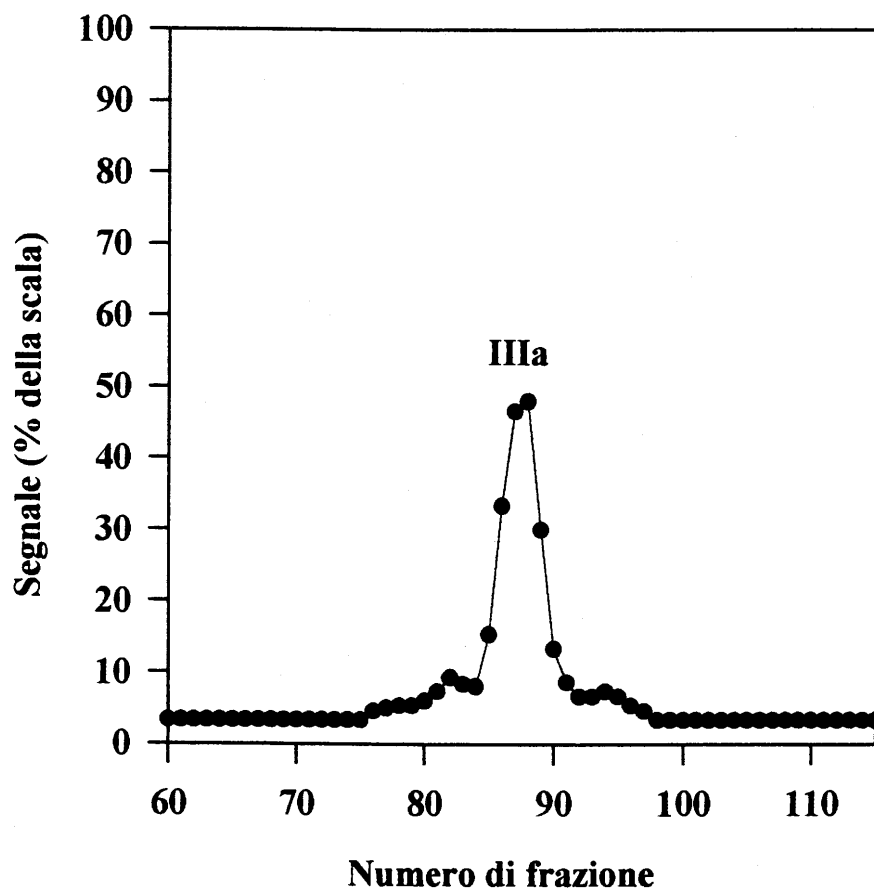


Fig. 6.10 Profilo della seconda cromatografia su Bio-Gel P2

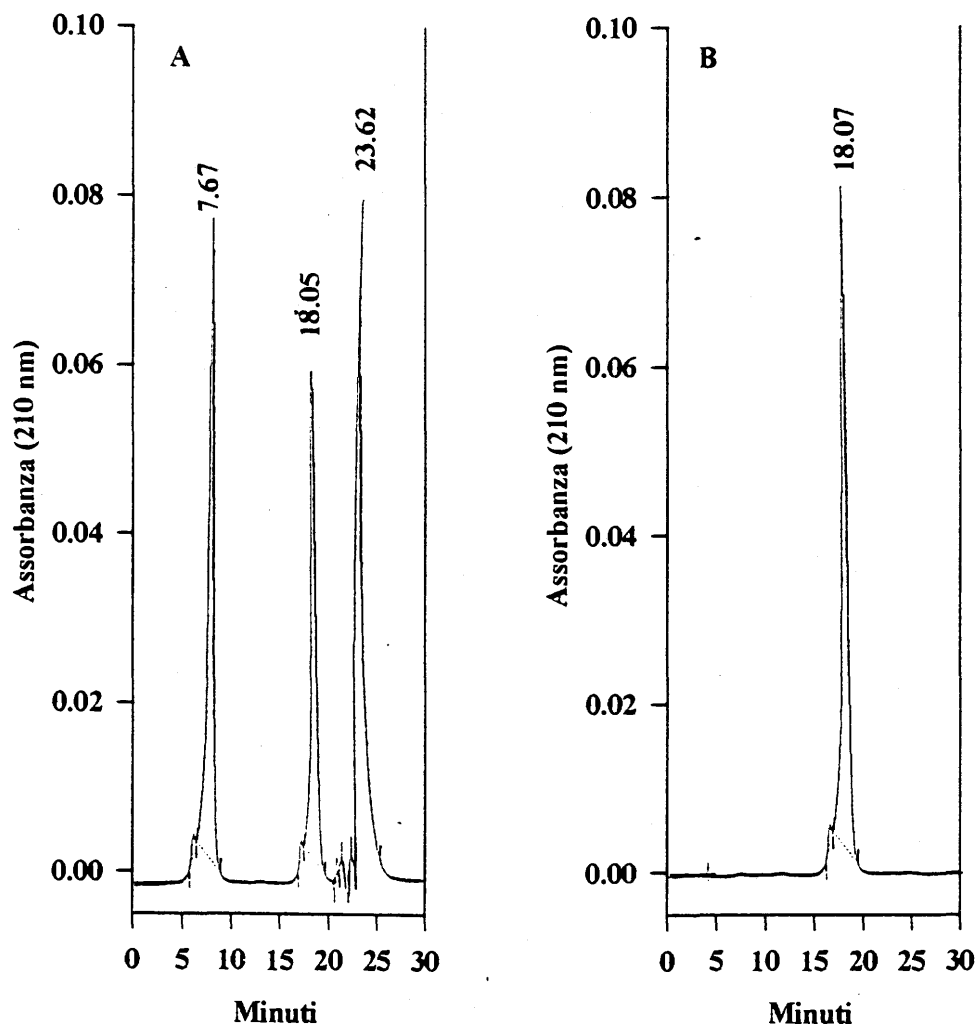


Fig. 6.11 Profili HPLC di una miscela standard di GlcNAc (7.67), NAcLac (18.05) e NacAlloLac (23.62) (A) e di NAcLac da sintesi enzimatica (B)



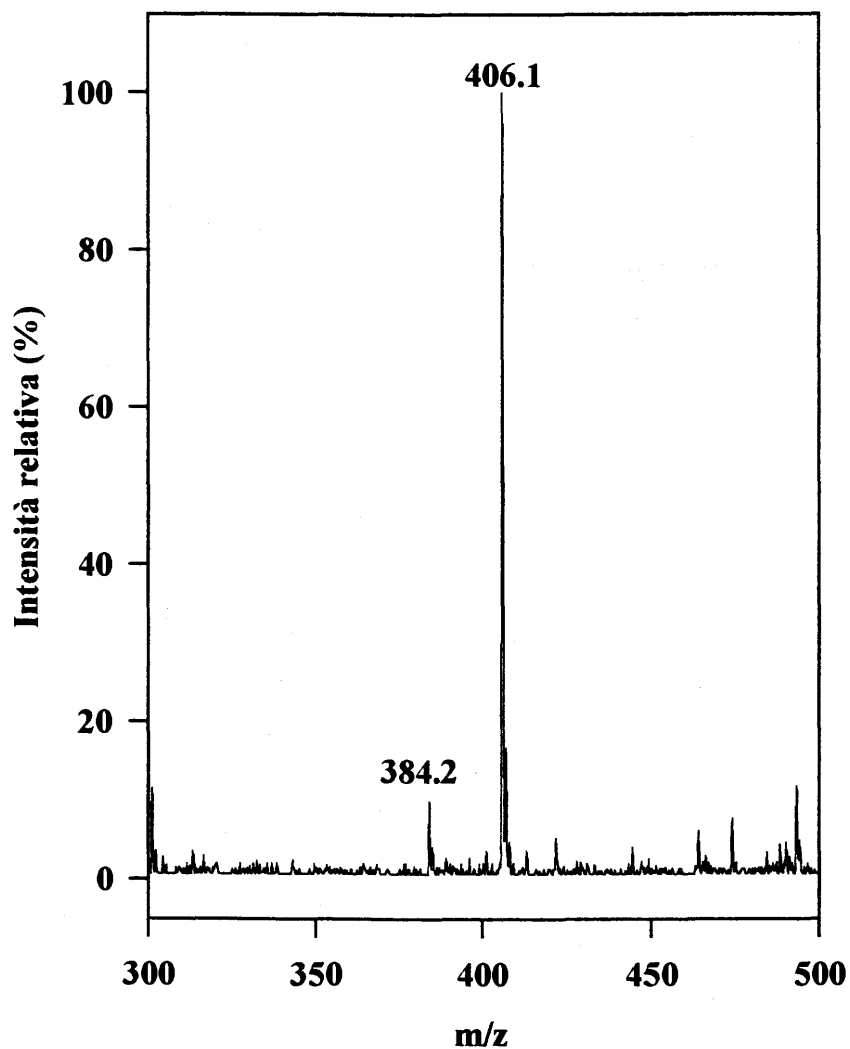


Fig. 6.12 Spettro di massa "ionspray" della NAcLac da sintesi enzimatica

donatori molecole "naturali" come il 3'-sialil-lattosio o molecole "sintetiche" come il NeuAc-mU o il NeuAc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph. L'accettore, invece, deve essere una molecola che presenti, in posizione non riducente, un residuo di galattosio in configurazione  $\beta$  rispetto al carbonio anomero. Il prodotto che ne risulta è un oligosaccaride in cui il residuo di NeuAc è legato al galattosio con un legame  $\alpha$ 2-3 (Scuder et al, 1993; Colli, 1993; Vandekerckhove et al, 1992).

Nel nostro caso sono stati utilizzati due tipi di donatori per la sintesi del 3'-SLN. Un donatore "naturale", il 3'-SL e un donatore "sintetico", il NeuAc-mU. In entrambi i casi è stato sintetizzato il prodotto, il 3'-SLN, ma con rese diverse. Infatti utilizzando il 3'-SL è stata ottenuta una *resa molare* pari al 23%, mentre utilizzando il NeuAc-mU è stata ottenuta una *resa molare* pari al 60%. Da un punto di vista pratico l'uso del substrato sintetico presenta maggiori vantaggi. Ad esempio, la sua sintesi è ben descritta (Myers et al., 1980) ed inoltre la parte agliconica (il metilumbelliferone) non può essere utilizzata, dall'enzima, come accettore rendendo la reazione praticamente irreversibile e quindi completamente spostata verso la sintesi del 3'-SLN. Vi è anche un vantaggio operativo nell'usare il NeuAc-mU; la natura apolare di questo substrato consente una semplificazione notevole delle operazioni di separazione dei prodotti di reazione mediante una semplice estrazione in fase solida.

La caratterizzazione mediante HPLC del prodotto di reazione e di uno standard di 3'-SLN danno profili sovrapponibili. (Fig. 6.13). Le assegnazioni degli spettri NMR del prodotto e dello standard coincidono e corrispondono a quelli riportati in letteratura (Berman, 1984). Lo spettro di massa ionspray ha evidenziato ioni a  $m/z$  675.2, 697.2 e 713.1 che corrispondono rispettivamente a  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$  (Fig. 6.14).

La sintesi enzimatica di oligosaccaridi sialilati, in generale, e del 3'-SLN in particolare, non è una novità assoluta. Tuttavia in tutti i casi descritti è stata utilizzata o una galattosiltransferasi (Kren e Thiem, 1995; Nishimura et al., 1994) o una sialiltransferasi (Nilsson, 1989) o entrambi (Thiem e Treder, 1986; Thiem e Sauerbrei, 1991). In quei casi in cui è stata utilizzata una transsialilazione (Ajisaka et al., 1994; Maru et al., 1992; Tanaka et al., 1995) si è sempre ottenuta una *bassa regioselettività*.

Da un punto di vista biotecnologico la trans-sialidasi è poco utilizzata (Lee e Lee, 1994; Takahashi et al., 1995). Esiste solo un esempio dell'utilizzo di questo enzima per la sintesi del 3'-SLN chimicamente legato a poliacrilammide. La *resa molare* è stata, però, solo del 35%.

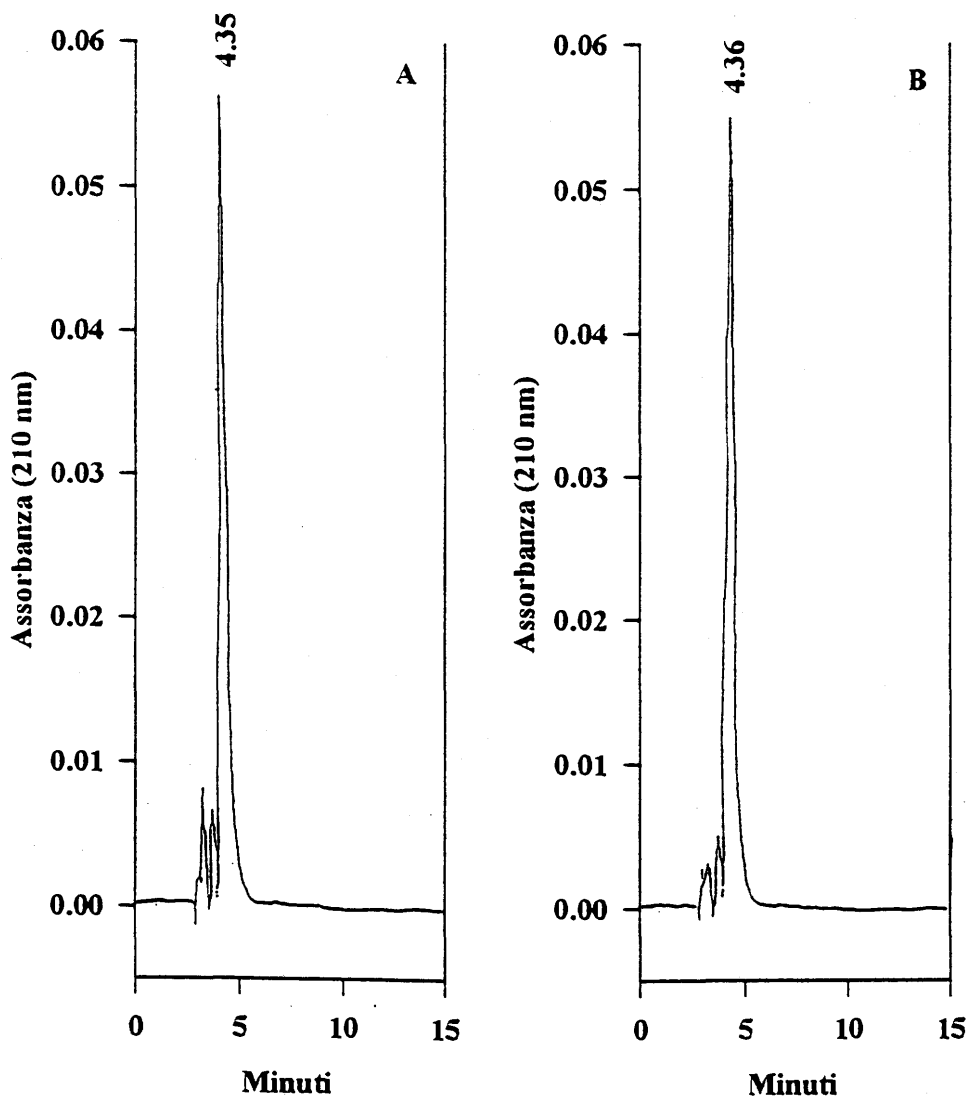


Fig 6.13 Profili HPLC di uno standard di 3'-SLN (A) e del prodotto di trans-sialilazione (B)

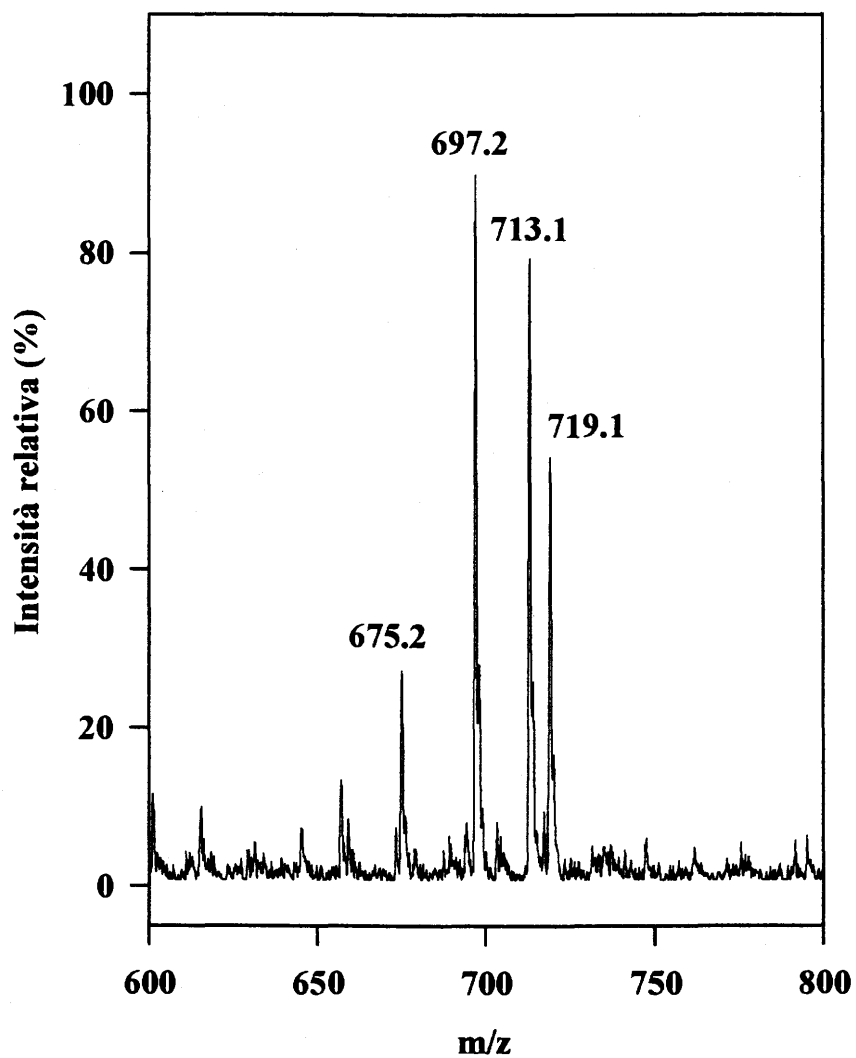


Fig. 6.14 Spettro di massa "ionspray" della 3'-sialil-N-acetilglucosamina da sintesi enzimatica

In conclusione, l'approccio sperimentale qui descritto consente la sintesi completamente transglicolitica e regiospecifica di un oligosaccaride biologicamente importante come il 3'-SLN, confermando l'importanza e l'utilità delle reazioni di transglicosilazione per la sintesi di oligosaccaridi biologicamente utili, partendo da substrati economici.

## 6.5 Materiali e Strumenti

### 6.5.1 Materiali

Il lattosio, la GlcNAc, l'o-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph), il metilumbelliferil- $\alpha$ -D-acido *N*-acetilneuraminico (NeuAc-mU), il 3'-sialillattosio (3'-SL), i disaccaridi standard Gal $\beta$ 1-4GlcNAc e Gal $\beta$ 1-6GlcNAc, la polimixina B, l'ampicillina, l'isopropil-tiogalattoside (IPTG) sono stati ottenuti dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). Il trisaccaride standard 3'-sialil-*N*-acetillattosammina (3'-SLN) è stato fornito dalla Dextra Laboratories Ltd (Reading, GB). Il [D-(glucosio)-1-<sup>14</sup>C]lattosio ([<sup>14</sup>C]lattosio; 50  $\mu$ Ci, 60 mCi/mmol) è stato fornito dalla Amersham (Buckinghamshire, GB). Il cocktail di scintillazione INSTA-GEL è stato fornito dalla Packard (Camberra, Australia). Il Bacto-triptone e il Bacto-yeast sono stati forniti dalla DIFCO (Detroit, Mi, USA). Il kit colorimetrico per la determinazione del glucosio è stato fornito dalla Bayer Diagnostics (Milano, IT). La  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*, Biolacta N10, è stata ottenuta dalla Daiwa Kasei K.K. (Osaka, Giappone). Il ceppo di *Escherichia coli* contenente il plasmide pTS154cat, che esprime il gene per la trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi*, è stato gentilmente fornito dal Dr. D. Eichinger del Department of Medical and Molecular Parasitology della New York University School of Medicine. La Bio-Gel P2 è stata ottenuta dalla Bio-Rad (Richmond, CA, USA). La QAE-Sephadex A25 è stata fornita dall Pharmacia-Biotech (Uppsala, Svezia). La Niagarosio è stata fornita dall QIAGEN (Hilden, Germania). Le membrane coniche Centriflo CF25 sono state fornite dalla Amicon (Beverly, MA, USA). L'acetoneitrile HiperSolv, l'acrilammide, la bis-acrilammide e il Coomassie R250 sono stati ottenuti dalla BDH (Poole, GB). La colonna HPLC LiChrosorb-NH<sub>2</sub> ( $\mu$ m, 250 x 4 mm I.D.) è stata fornita dalla Merck (Darmstadt, Germania).

### 6.5.2 Strumenti

Per l'analisi HPLC è stato utilizzato un sistema composto da una pompa JASCO BIP-1 a cui è connesso un rivelatore UV-VIS JASCO UVIDEC-100-V. Come rivelatore per le cromatografie di gel filtrazione è stato usato un rivelatore ad indice di rifrazione R401 della Waters.

Gli esperimenti di spettroscopia NMR <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sono stati condotti su uno spettrometro Bruker AC 200 (<sup>13</sup>C 50.3 MHz, <sup>1</sup>H 200 MHz) utilizzando una sonda

multinucleare da 5 mm. Per tutte le misure sono stati utilizzati 500  $\mu$ l di di acqua deuterata, con una concentrazione di campione pari a 5 mg/ml per le misure del  $^1\text{H}$  e di 30 mg/ml per quelle del  $^{13}\text{C}$ . Tutti gli spettri sono stati registrati a 37°C.

Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa API-1 PE SCIEX. I campioni sono stati dissolti in una soluzione al 50% di acetonitrile in ammonio acetato 5 mM, con una concentrazione finale di campione di 20  $\mu\text{M}$  e iniettati ad un flusso di 7  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Gli spettri sono stati registrati in positivo utilizzando come agente ionizzante ammonio acetato 60  $\mu\text{M}$ , utilizzando un intervallo di 0.1 amu, un potenziale di orifizio di 50 V e un voltaggio dello "ionspray" di 5'000 V.

Le misure di radioattività (dpm), per la determinazione dell'attività enzimatica della trans-sialidasi, sono state determinate mediante uno scintillatore Betamatic Liquid Scintillation Counter della Kontron Instruments.

## 6.6 Bibliografia

- Ajisaka, K., Fujimoto, H. e Isomura, M. (1994) *Carbohydr. Res.* 259: 103-115
- Berman, E. (1984) *Biochemistry* 23: 3754-3759
- Colli, W. (1993) *FASEB J.* 7: 1257-1264
- Kren, V. e Thiem, J. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34: 893-895
- Kunz, C. e Rudloff, S. (1993) *Acta Paediatr.* 82: 903-912
- Laemli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685
- Lee, K.B. e Lee, Y.C. (1994) *Anal. Biochem.* 216: 358-364
- Maru, I., Ohta, Y., Okamoto, K., Suzuki, S., Takehi, K. e Tsukada, Y. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1557-1561
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K. e Matsuno R. (1985) *J. Food Sci.* 50: 1602-1606
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K. e Matsuno R. (1986) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 224-228
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K. e Matsuno R. (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 59-60
- Myers, R.W., Reiko, T.L., Lee, Y.C., Thomas, G.H., Reynolds, L.W. e Uchida, Y. (1980) *Anal. Biochem.* 101: 166-174
- Nilsson, K.G.I. (1989) *Carbohydr. Res.* 188: 9-17
- Nishimura, S.I., Lee, K.B., Matsuoka, K. e Lee, Y.C. (1994) *Biochem Biophys. Res. Comm.* 199: 249-254
- Oriol, R., Ye, Y., Koren, E. e Cooper, D.K.C. (1993) *Transplantation* 56: 1433-1442
- Parkkinen, J. e Finne, J. (1983) *Eur. J. Biochem.* 136: 355-361
- Paulsen, H. e Tietz, H. (1984) *Carbohydr. Res.* 25: 47-64
- Philips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S.L. e Paulson, J.C. (1990) *Science* 250: 1130-1131
- Reissig, J.L., Strominger, J.L. e Leloir, L.F. (1955) *J. Biol. Chem.* 217: 959-966
- Sakai, K., Katsumi, R., Ohi, H., Usui, T. e Ishido, Y. (1992) *J. Carbohydr. Chem.* 11: 553-565
- Schupp, J.M., Travis, S.E., Price, L.B., Shand, R.F. e Keim, P. (1995) *Biotechniques* 19: 18-20
- Scuder, P., Doom, J.P., Chuenkova, M., Manger, I.D. e Pereira, M.E.A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 9886-9891
- Takahashi, N., Lee, K.B., Nakagawa, H., Tsukamoto, Y., Kawamura, Y., Li, Y.T. e Lee, Y.C. (1995) *Anal. Biochem.* 230: 333-342
- Tanaka, H., Ito, F. e Iwasaki, T. (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 638-643



- Thiem, J. e Treder, W. (1986) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 25: 1096-1097
- Thiem, J. e Sauerbrei, B. (1991) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 30: 1503-1505
- Trinder, P. (1969) *Ann. Clin. Biochem.* 6: 24-
- Usui, T. Kubota, S. e Ohi, H. (1993) *Carbohydr. Res.* 244: 315-323
- van Pelt, J., Hard, K., Kamerling, J.K., Vliegthart, J.F.G., Reuser, A.J.J. e Galjaard, H. (1989) *Biol. Chem Hoppe-Seyler* 370: 191-203
- Vandekerckove, F., Schenkman, S., de Carvalho, L.P., Tomlinson, S., Kiso, M., Yoshida, M., Hasegawa, A. e Nussenzweig, V. (1992) *Glycobiology* 2: 541-548
- Vic, G., Hastings, J.J., Howarth, O.W. e Crout, H.G. (1996) *Tetrahedron Asymmetry* 7: 709-720

## Capitolo 7

### Sintesi del Trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis<sup>x</sup>

#### 7.1 Premessa; Strategia e Stadi di Sintesi

Numerosi glicoconiugati biologicamente importanti, presentano alla loro *estremità non riducente* residui di *fucosio*. Il gruppo  $\alpha$ -L-fucopiranosidico può essere unito a un residuo di galattosio con un legame  $\alpha$ 1-2 o alla *N*-acetilglucosammina con legami  $\alpha$ 1-3,  $\alpha$ 1-4 o  $\alpha$ 1-6. Gli oligosaccaridi contenenti fucosio sono ampiamente diffusi. Ad esempio sono stati trovati nel *latte umano* (Kobata, 1977; Egge, et al. 1983; Kunz e Rudloff, 1993) e nel *colostro bovino* dove, come è stato visto, svolgono un ruolo biologico molto importante. Il disaccaride Fuc $\alpha$ 1-2Gal fa parte della porzione saccaridica delle glicoproteine e dei glicolipidi specifici dei *gruppi sanguigni* (Watkins, 1995). Alcuni glicopeptidi di *cellule tumorali* umane di origine neuroectodermica contengono una proporzione insolitamente alta di Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc (Santer e Glick, 1980). La  $\beta$ 1-4galattosilazione del residuo di GlcNAc nel disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc porta alla formazione dell'antigene *Lewis<sup>x</sup>* (Le<sup>x</sup>) (Fig. 7.1).

Questo determinante da solo, in forma dimerica o trimerica, è un componente normale delle cellule e/o tende ad accumularsi in una grande varietà di tumori umani (Itzkowitz et al., 1986; Cordon-Cardo et al. 1988; Sakamoto et al., 1989). La sua forma sialilata, il Sialil-Le<sup>x</sup>, è espressa sulla superficie dei granulociti normali ed è coinvolta nell'adesione dei leucociti all'endotelio attivato. Il ruolo del Le<sup>x</sup>, come un potenziale inibitore dei processi infiammatori cronici, ha di recente notevolmente stimolato la messa a punto di strategie efficienti per la sua sintesi.

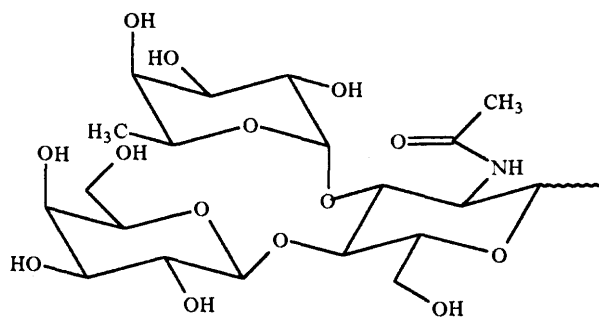


Fig. 7.1 Struttura dell'antigene Lewis<sup>x</sup>

In questo studio il trisaccaride Lewis<sup>x</sup> è stato ottenuto mediante due tappe biosintetiche. La prima si basa sulla fucosilazione regiospecifica della GlcNAc libera per ottenere il disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc. La seconda tappa comporta la galattosilazione, anch'essa regiospecifica, del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc per ottenere il prodotto desiderato. Entrambe le tappe sono schematicamente riportate in Fig. 7.2.

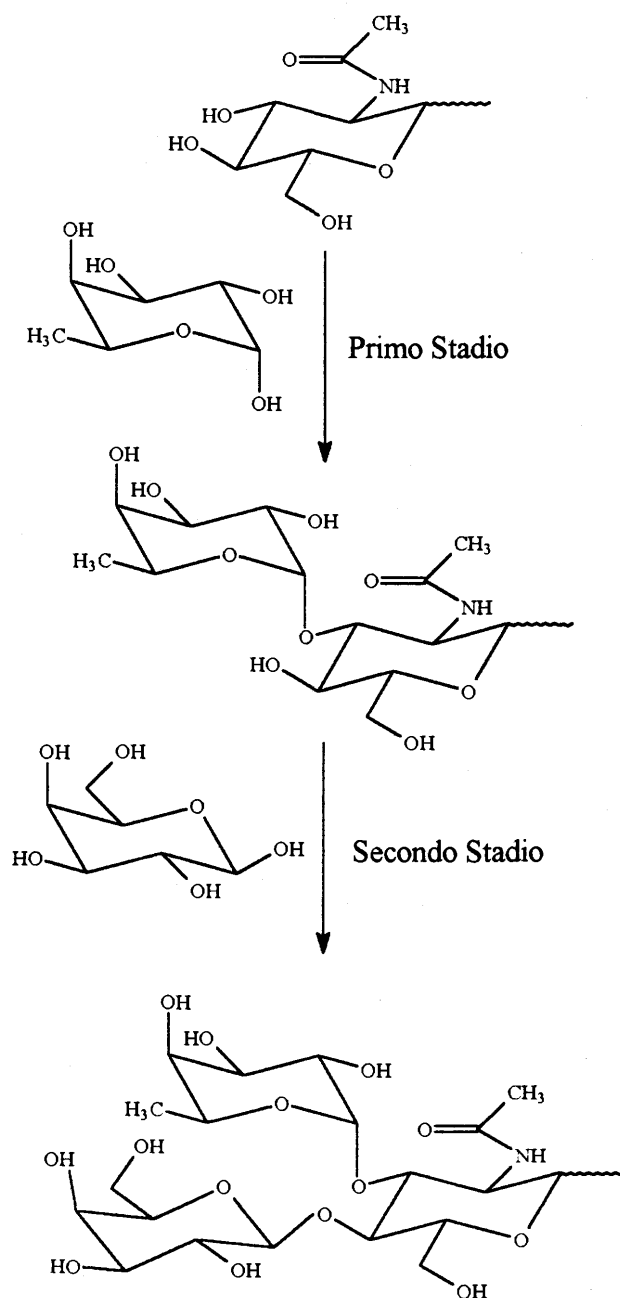


Fig. 7.2 Rappresentazione schematica delle tappe di reazione utilizzate per la sintesi del Lewis<sup>x</sup>

## 7.2 Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi: Sintesi del Disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc

### 7.2.1 Determinazione dell'attività enzimatica della $\alpha$ -L-fucosidasi da *Aspergillus niger*

Per la sintesi del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc è stato utilizzato come enzima un preparato grezzo di  $\alpha$ -L-fucosidasi da *Aspergillus niger*; come donatore di residui di fucosio è stato utilizzato il Fuc $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, mentre come accettore è stato utilizzato GlcNAc.

La valutazione dell'attività enzimatica della  $\alpha$ -L-fucosidasi è stata effettuata mediante determinazione con HPLC del fucosio, dopo derivatizzazione con PMP come descritto da Honda et al. (Honda et al., 1989), prodotti dal disaccaride Fuc $\alpha$ 1-2 Gal in seguito ad idrolisi enzimatica. A tal fine si è operato in questo modo

Fuc $\alpha$ 1-2 Gal (15 mM in acqua distillata)	50 $\mu$ l
$\alpha$ -L-fucosidasi	50 mg
CH <sub>3</sub> COONa/CH <sub>3</sub> COOH 100 mM pH 5.0	50 $\mu$ l

La miscela è stata incubata a 37°C per 2 ore. Dopo inattivazione enzimatica mediante riscaldamento a 100°C e centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, parte del sovrinatante è stato sottoposto a derivatizzazione con PMP nel seguente modo:

Sovranatante	10 $\mu$ l
NaOH 0.3 M	40 $\mu$ l
PMP (0.5 M in etanolo)	50 $\mu$ l

L'intera miscela è stata incubata per 30 minuti a 70°C. Al termine dell'incubazione la miscela è stata trattata nel seguente modo

Mix reazione	100 $\mu$ l
HCl 0.15 M	100 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	200 $\mu$ l
CHCl <sub>3</sub>	200 $\mu$ l

Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 2 minuti, la fase acquosa è stata utilizzata per l'analisi HPLC utilizzando il sistema sopra descritto. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela CH<sub>3</sub>CN : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM pH 7.0) (20:80). E' stata utilizzata una colonna Ultrasphere-ODS. Sono stati iniettati 20  $\mu$ l di soluzione. Il rilevatore era fissato alla lunghezza d'onda 245 nm.

Una retta di calibrazione è stata ottenuta derivatizzando nello stesso modo le seguenti soluzioni standard:

Fuc 6.4 mM	10 $\mu$ l (64 nmoli)	iniettati 20 $\mu$ l (3.2 nmoli)
Fuc 4.7 mM	10 $\mu$ l (47 nmoli)	iniettati 20 $\mu$ l (2.2 nmoli)
Fuc 3.8 mM	10 $\mu$ l (38 nmoli)	iniettati 20 $\mu$ l (1.8 nmoli)
Fuc 2.5 mM	10 $\mu$ l (25 nmoli)	iniettati 20 $\mu$ l (1.2 nmoli)

Riportando in grafico le nmoli iniettate in funzione dell'area del picco corrispondente si ottiene la curva di calibrazione riportata in Fig. 7.3

Da questa è stato possibile calcolare il coefficiente angolare della retta così ottenuta, dal quale è stata calcolata la quantità di fucosio prodottasi in seguito dell'idrolisi enzimatica utilizzando la seguente relazione:

$$\frac{A \times V \times v \times 2}{C.A. \times v_1 \times v_2} = \text{nmoli di fucosio}$$

dove:

A: Area del picco.

V: Volume della miscela dopo derivatizzazione (in  $\mu$ l).

v: Volume della miscela di reazione enzimatica (in  $\mu$ l).

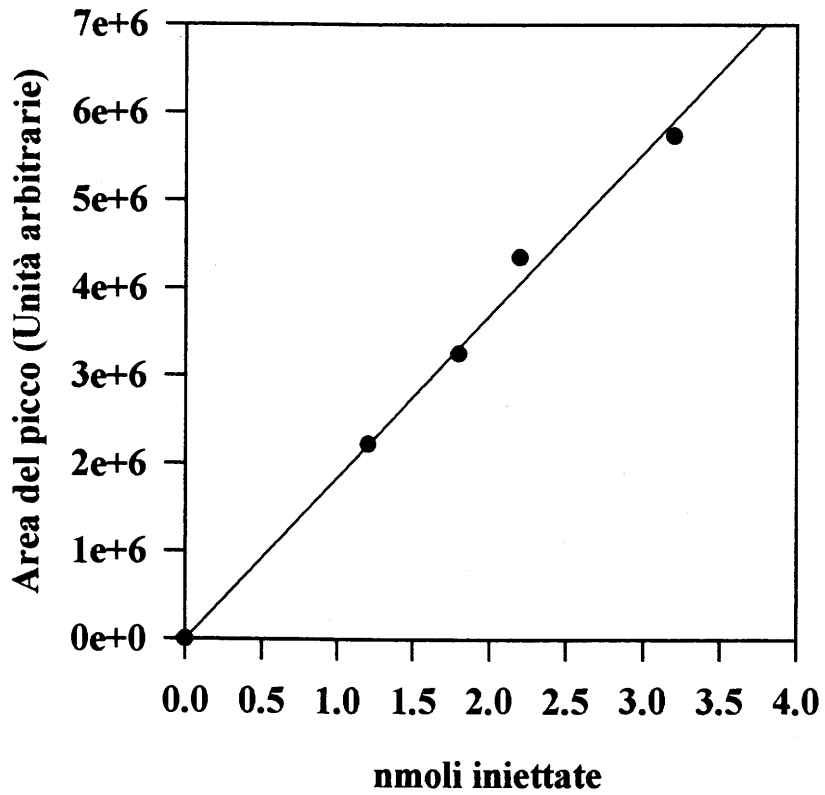
2: Fattore di diluizione della soluzione di Fuc $\alpha$ 1-2 Gal.

C.A.: Coefficiente angolare della retta di calibrazione.

v<sub>1</sub>: Volume iniettato (in  $\mu$ l).

v<sub>2</sub>: Volume di campione derivatizzato (in  $\mu$ l).

Una unità di  $\alpha$ -L-fucosidasi corrisponde alla quantità di enzima che produce 1 nmole di fucosio all'ora.



*Fig. 7.3* Curva di calibrazione per il fucosio

## 7.2.2 Tecniche di caratterizzazione del prodotto di transfucosilazione.

L'identificazione del prodotto di transfucosilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ) e del carbonio ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 210 nm, a cui assorbono i gruppi *N*-acetilici. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una soluzione  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$  Milli-Q (85:15) e una colonna LiChrosorb-NH<sub>2</sub>. L'identificazione è stata ottenuta effettuando un confronto tra i profili cromatografici dei prodotti di sintesi con quelli di uno standard originale.

Le caratteristiche degli strumenti sono riportate nel paragrafo 7.6

## 7.2.3 Produzione del Disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc

La reazione utilizzata per la sintesi di questo prodotto è schematicamente rappresentata in Fig. 7.4.

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc si è operato in questo modo:

Fuc $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	90 $\mu\text{moli}$
GlcNAc	560 $\mu\text{moli}$
CH <sub>3</sub> COONa/CH <sub>3</sub> COOH 50 mM pH 5.0	2 ml
$\alpha$ -L-fucosidasi	1680 U

La miscela è stata incubata a 37°C per 4 giorni sotto continua agitazione. Al termine del periodo di incubazione, al fine di inattivare l'enzima, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrinatante è stato purificato su una colonna a fase inversa di C<sub>18</sub> (2.5 x 6.0 cm) condizionata mediante lavaggio con 3 volumi di metanolo seguito da un lavaggio con 3 volumi di acqua distillata. Dopo caricamento del campione la colonna è stata lavata con 3 volumi di acqua distillata, seguiti da 3 volumi di metanolo. Con questo primo passaggio di

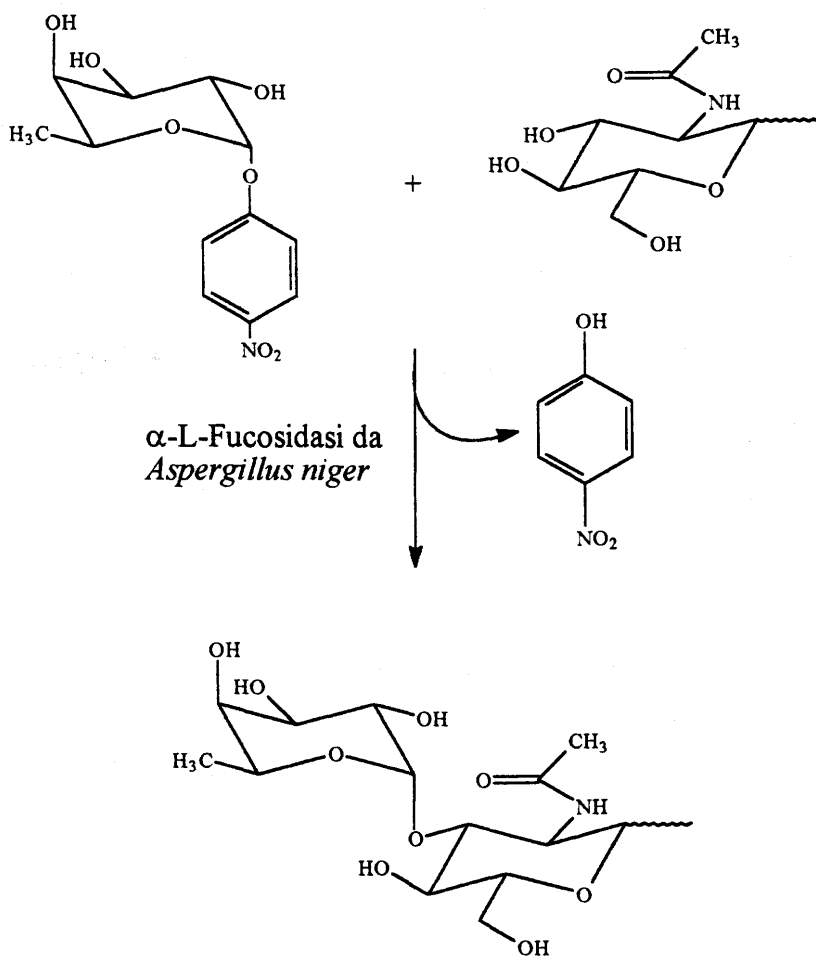


Fig. 7.4 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc



purificazione i composti polari, come Fuc, GlcNAc, e il prodotto di transfucosilazione sono stati eluiti con il lavaggio acquoso, mentre i composti meno polari, come Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e p-NO<sub>2</sub>Ph, sono stati eluiti con il metanolo. La fase acquosa è stata portata a secco mediante evaporazione sottovuoto e il residuo secco è stato ripreso in 3 ml di acqua distillata. La completa separazione e purificazione del prodotto di transfucosilazione è stata ottenuta mediante cromatografia di gel filtrazione su una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in acqua distillata. L'andamento della purificazione è stato seguito utilizzando un rivelatore ad indice di rifrazione. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante HPLC, come sopra descritto, e quelle corrispondenti al prodotto di transfucosilazione sono state riunite e liofilizzate

### 7.3 Purificazione della $\beta$ -D-Galattosidasi da *Bacillus circulans*

La  $\beta$ -D-galattosidasi è stata parzialmente purificata utilizzando una colonna di affinità Gal-Sepharose 6B, che è stata preparata, con il metodo descritto da Iglesias et al. (Iglesias et al., 1982), nel seguente modo:

Sepharose 6B	100 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub> 0.5 M, pH 11.00	100 ml
DVS	10 ml

La sospensione è stata mantenuta a temperatura ambiente per 70 minuti, sotto leggera agitazione, quindi lavata completamente con acqua distillata su di un filtro di vetro. In seguito è stata risospesa in 100 ml di una soluzione al 10% (peso/volume) di galattosio nel tampone carbonato e lasciata tutta la notte a 4°C. La resina è stata infine lavata con:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub> 0.5 M, pH 11.00	1 l
H <sub>2</sub> O	2 l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5	500 ml

La resina attivata con DVS contiene dei gruppi vinilici che possono reagire con composti contenenti gruppi amminici, ossidrilici e tiolici. La resina è stata quindi inattivata mediante trattamento con 2-mercaptoetanolo secondo il seguente protocollo descritto da Porath et al. (Porath et al., 1975):

Resina attivata	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5	200 ml
2-mercaptoetanolo	1 ml

Dopo incubazione per tutta la notte la resina è stata abbondantemente lavata con acqua e poi con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5. La resina è stata poi conservata in questo tampone a 4°C fino al momento dell'uso.

Tutte le operazioni di purificazione sono state condotte a 4°C. 50 mg di  $\beta$ -D-galattosidasi sono stati disciolti in 5 ml di tampone K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 6.5. La soluzione è stata poi dializzata contro lo stesso tampone per tutta la notte. La soluzione dell'enzima è stata caricata sulla colonna (2 x 15 cm) di Gal-Sepharose 6B, equilibrata con lo stesso tampone. La colonna è stata lavata con il tampone fino a raggiungimento del valore zero dell'assorbanza a 280 nm delle frazioni raccolte. L'enzima legato alla colonna è stato eluito con una soluzione di galattosio al 5% (peso/volume) nello stesso tampone. L'eluizione è stata seguita spettrofotometricamente con il monitoraggio dell'assorbanza a 280 nm. L'attività enzimatica è stata determinata nel modo sopra descritto (vedi paragrafo 6.2.1). Le frazioni in cui è presente l'enzima sono state riunite e dializzate contro il tampone e il volume è stato ridotto mediante centrifugazione, a 4°C e a 3'000 rpm, su una membrana conica Centrifilo CF25.

L'eventuale presenza di  $\alpha$ -L-fucosidasi è stata determinata procedendo come per la  $\beta$ -D-galattosidasi, utilizzando come substrato Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph. La purezza dell'enzima è stata valutata mediante elettroforesi in SDS secondo il protocollo di Laemmli (Laemmli, 1970) e descritto in precedenza (vedi paragrafo 6.3.3). Da tali prove risulta che il campione di  $\beta$ -D-galattosidasi è privo di ogni residua attività  $\alpha$ -L-fucosidasica.

## 7.4 Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi: Sintesi del Trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis<sup>x</sup>

### 7.4.1 Determinazione dell'attività enzimatica della $\beta$ -D-galattosidasi

Per la sintesi del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc è stato utilizzato come enzima un preparato parzialmente purificato di  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*; come donatore di residui di galattosio è stato utilizzato lattosio, mentre come accettore è stato utilizzato il disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc ottenuto dalla reazione precedente.

Per la valutazione dell'attività enzimatica della  $\beta$ -D-galattosidasi si è operato nel modo descritto in precedenza (vedi paragrafo 6.2.1).

### 7.4.2 Tecniche di caratterizzazione del prodotto di transgalattosilazione

L'identificazione del prodotto di transgalattosilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone (<sup>1</sup>H-NMR) e del carbonio (<sup>13</sup>C-NMR).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 210 nm, a cui assorbono i gruppi *N*-acetilici. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una soluzione CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O Milli-Q (85:15) e una colonna LiChrosorb-NH<sub>2</sub>. L'identificazione è stata ottenuta effettuando un confronto tra i profili cromatografici dei prodotti di sintesi con quelli di uno standard originale.

Le caratteristiche degli strumenti sono riportate nel paragrafo 7.6.

### 7.4.3 Produzione del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis<sup>x</sup>

La reazione utilizzata per la sintesi di questo prodotto è schematicamente rappresentata in Fig. 7.5.

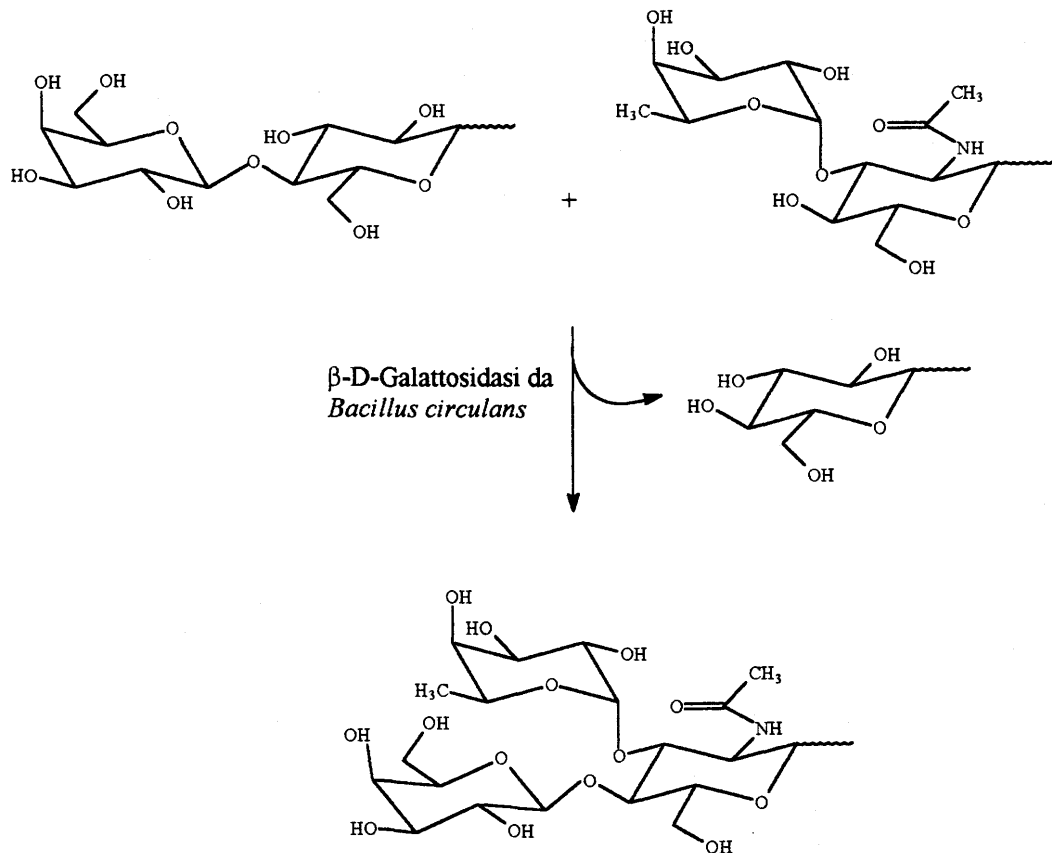


Fig. 7.5 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi del trisaccaride Lewis<sup>x</sup>

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc si è operato nel seguente modo:

Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc	270 $\mu$ mol
Lattosio	1460 $\mu$ mol
CH <sub>3</sub> COONa/CH <sub>3</sub> COOH 50 mM pH 5.0	2 ml
$\beta$ -D-galattosidasi	6U

La miscela è stata incubata per 12 ore a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti, per inattivare l'enzima, e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato purificato mediante cromatografia di gel filtrazione su una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in acqua distillata. L'andamento della purificazione è stato seguito utilizzando un rivelatore ad indice di rifrazione. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state

analizzate mediante HPLC, come sopra descritto, e quelle corrispondenti al prodotto di transgalattosilazione sono state riunite e liofilizzate.

## 7.5 Risultati e Discussione

### 7.5.1 Sintesi del Disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc

La  $\alpha$ -L-fucosidasi da *Aspergillus niger* ha permesso la sintesi regiospecifica del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc. L'utilizzo del Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, come donatore di fucosio, e della GlcNAc, come accettore, ha reso possibile una facile separazione dei composti polari, quali GlcNAc e Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc, da quelli apolari, Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e *p*-NO<sub>2</sub>Ph, mediante l'estrazione in fase solida su cartucce C<sub>18</sub>. La differenza rilevante del peso molecolare tra GlcNAc e Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc è stata utilizzata per separare e purificare prodotti dai substrati mediante cromatografia di gel filtrazione su colonna di Bio-Gel P2, ottenendo un semplice profilo di eluizione (Fig. 7.6). Non è stata necessaria la purificazione dell'enzima, poichè la presenza di altre glicosidasi non interferisce con la reazione di transfucosilazione.

La caratterizzazione del prodotto con HPLC mostra una perfetta identità di tempi di ritenzione tra lo standard e il prodotto ottenuto nella forma pura dopo purificazione (Fig. 7.7). I dati di caratterizzazione strutturale, particolarmente quelli di NMR, coincidono perfettamente con quelli riportati in letteratura per lo stesso disaccaride (Ajisaka e Shirakabe, 1992). Lo spettro di massa ionspray ha rivelato la presenza degli ioni 368.3, 385.2, 390.1 e 406.3 corrispondenti, rispettivamente a [M+H]<sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup> (Fig. 7.8).

Tra le glicosidasi, le fucosidasi sono gli enzimi meno utilizzati nelle reazioni di transglicosilazione. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che non tutte le fucosidasi potenzialmente utili, essenzialmente quelle ottenute da microrganismi, utilizzano come substrato il Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph. In realtà questo è un falso problema. Infatti normalmente si valuta l'attività transglicolitica di un enzima dalla sua capacità di idrolizzare un determinato substrato. Tuttavia non si tiene conto del fatto che l'idrolisi viene normalmente determinata su brevi periodi di incubazione. La scarsa attività idrolitica potrebbe trarre in inganno lo sperimentatore. Anche nel caso della sintesi del Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc la fucosidasi presenta apparentemente poca attività idrolitica nei confronti del Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, tuttavia, sui lunghi periodi di incubazione (4 giorni nel caso della sintesi di Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc), questo basso livello di idrolisi è stata la condizione per ottenere una elevata regioselettività. Gli esempi di tranfucosilazione descritti in letteratura sono limitati. Svensson e Thiem hanno descritto la purificazione della  $\alpha$ -L-fucosidasi da fegato di maiale e le attività transglicolitiche dello stesso enzima nei confronti del Gal $\beta$ OME come accettore e

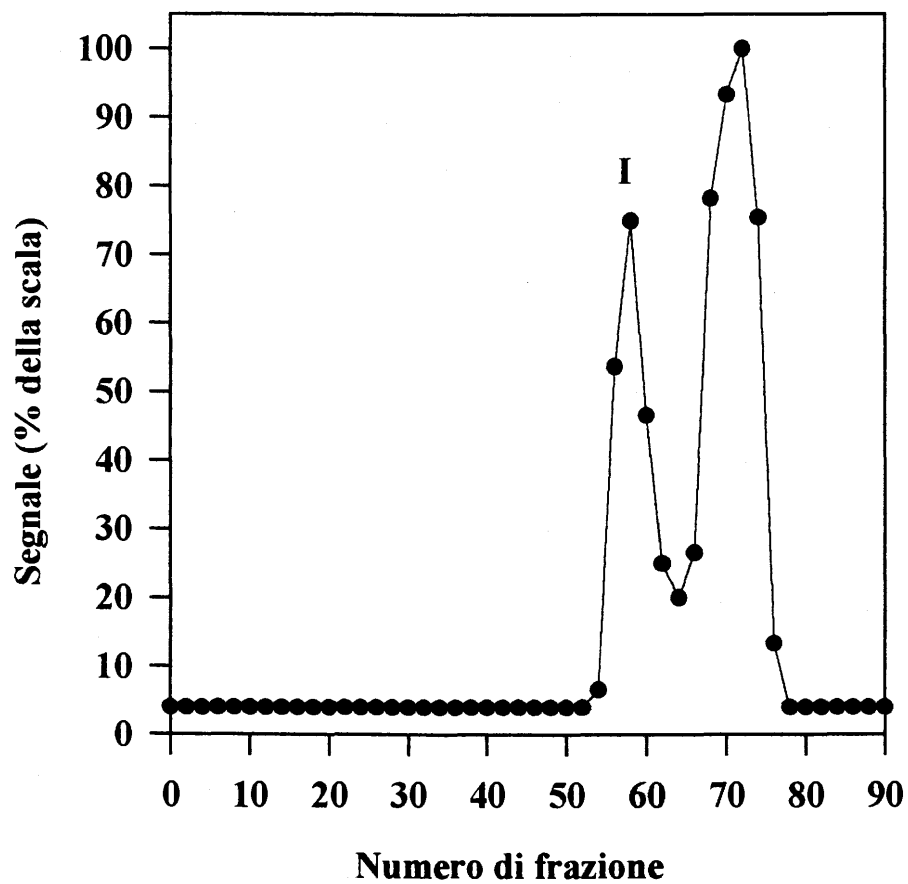


Fig. 7.6 Profilo di eluzione della cromatografia su Bio-Gel P2 del prodotto di transfucoosilazione

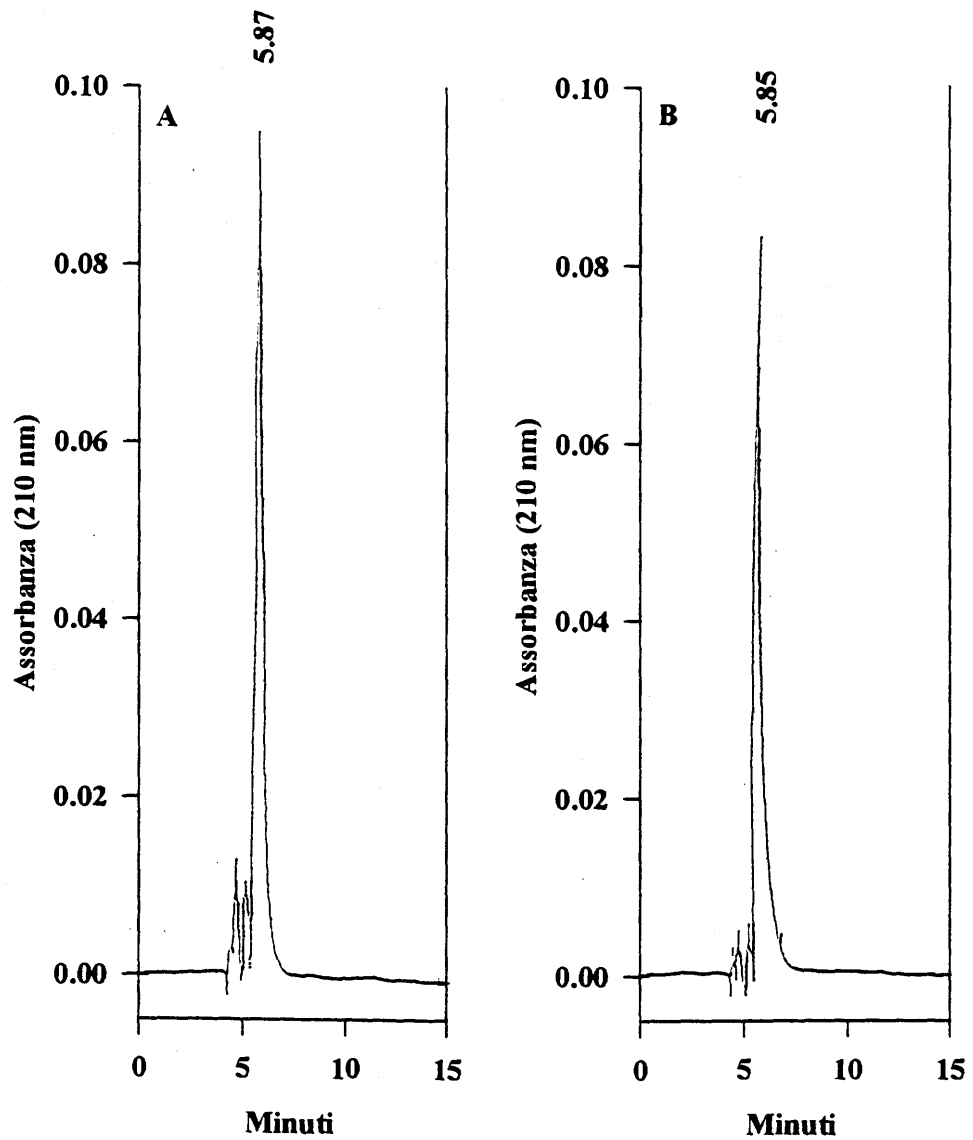


Fig. 7.7 Profili HPLC di uno standard di Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc (A) e del prodotto di transfucosilazione (B)



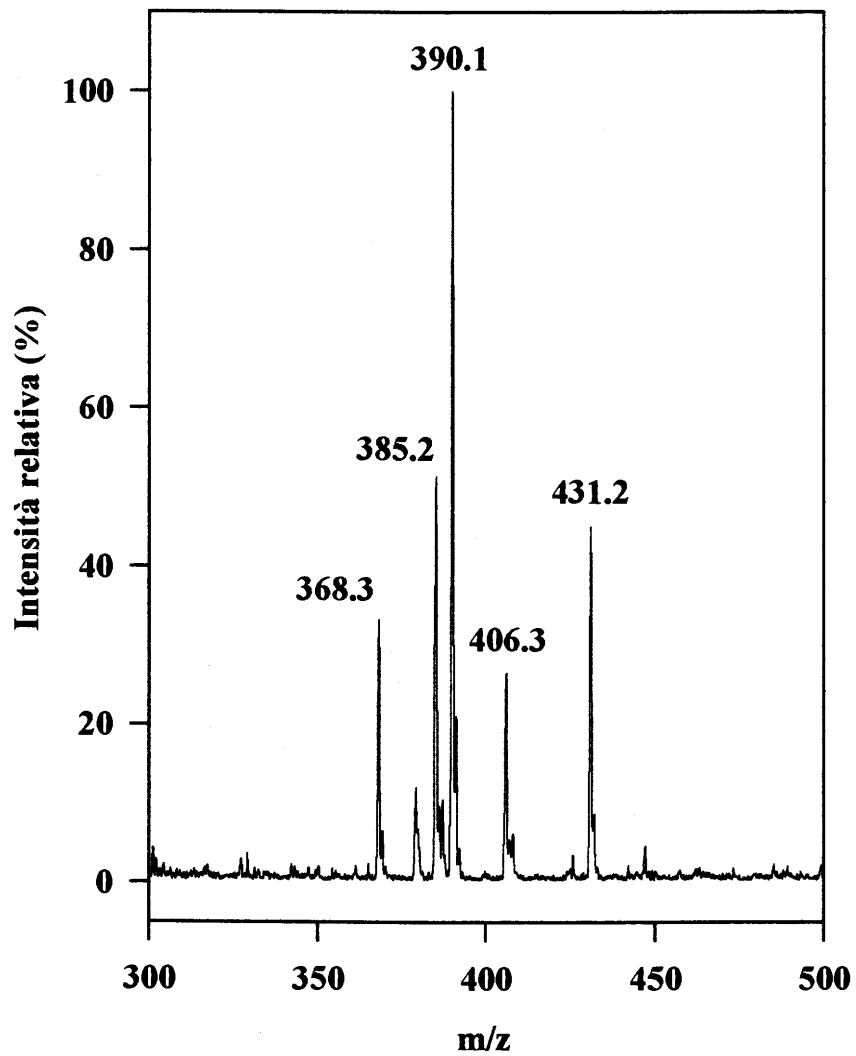


Fig. 7.8 Spettro di massa "ionspray" del disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc da sintesi enzimatica

utilizzando Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e Fuc $\alpha$ -F come donatore. In entrambi i casi, questi autori hanno osservato la sintesi di Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ OME e Fuc $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ OME con rese piuttosto basse e con parziale inattivazione dell'enzima causata dalla presenza di cosolventi organici utilizzati per favorire la solubilizzazione dei substrati (Svensson e Thiem, 1990).

Ajisaka e Shirakabe hanno esaminato varie  $\alpha$ -L-fucosidasi valutando le loro attività transglicolitiche e le loro regioselettività (Ajisaka e Shirakabe, 1992). Essi hanno osservato che, ad esempio, gli enzimi da *Corynebacterium* sp. e da *ampullaria* catalizzano una transfucosilazione. In particolare la  $\alpha$ -L-fucosidasi da *Corynebacterium* sp in presenza di Gal $\beta$ OME o Gal, quali accettori, e Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, quale donatore, catalizza la sintesi preferenziale di Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ OME. Con gli stessi substrati l'enzima da *ampullaria* consente la sintesi di Fuc $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ OME. Questi enzimi mostrano una buona specificità di substrato. Infatti non catalizzano nessuna transglicosilazione quando, come accettori, vengano utilizzati Glc o GlcNAc. Tra le  $\alpha$ -L-fucosidasi esaminate vi era anche quella da *Aspergillus niger*. Gli autori hanno osservato una buona regioselettività di sintesi nei confronti sia del Glc che del GlcNAc quali accettori. Molto più recentemente Nilsson et al. (Nilsson et al., 1995) hanno descritto una transfucosilazione catalizzata dalla  $\alpha$ -L-fucosidasi da rene bovino, utilizzando Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph come donatore e un residuo di glucosammina parzialmente protetto per via chimica, nella sua funzione alcolica primaria, con un gruppo *N*-ftalimmidico.

Come si può dedurre da questo breve esame delle informazioni disponibili in letteratura, le transfucosilazioni non sono mai state effettuate per ottenere più di un disaccaride e molte volte senza preoccuparsi eccessivamente della regioselettività del prodotto.

L'approccio sperimentale descritto in questa tesi è stato diverso in quanto non sono stati utilizzati cosolventi organici per favorire la solubilità del Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, che è risultata buona anche solo dopo un lieve riscaldamento, né protezioni chimiche. Inoltre l'attività enzimatica è stata calcolata in termini più precisi, utilizzando un substrato facilmente e rapidamente idrolizzato quale è il Fuc $\alpha$ 1-2Gal.

### 7.5.2 Purificazione della $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*

Il problema principale della seconda reazione di transglicosilazione è la presenza, nel preparato grezzo utilizzato, di una  $\alpha$ -L-fucosidasi. È stato quindi

necessario purificare parzialmente la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*. A tal fine è stata impiegata una rapida purificazione mediante cromatografia di affinità. Questo tipo di approccio permette di ottenere un enzima puro in un solo passaggio. Il supporto cromatografico utilizzato è stato una colonna di Sepharose 6B attivata con galattosio mediante il metodo del divinilsulfone, preparata come descritto in precedenza. La purificazione ha avuto un successo parziale in termini di resa, in quanto una porzione di enzima non si è legata alla resina. Lo stesso risultato è stato ottenuto impiegando un supporto cromatografico commerciale appositamente studiato per la purificazione delle  $\beta$ -D-galattosidasi. L'eluizione della colonna con una soluzione di galattosio al 5% nel tampone fosfato 50 mM a pH 6.5, permette di rimuovere le  $\beta$ -D-galattosidasi legate, senza la contaminazione di altre glicosidasi e, in particolare, dell' $\alpha$ -L-fucosidasi. Gli enzimi, ottenuti in questo modo, sono stati utilizzati per la successiva transglicosilazione. La presenza di una frazione enzimatica non legata alla resina costituisce un'aspetto inatteso. Dalle informazioni disponibili dalla letteratura risulta che la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans* è costituita da due forme isoenzimatiche distinte che sono state purificate e caratterizzate (Mozaffar et al., 1984). La componente non legata alla resina è risultata essere una terza isoforma di  $\beta$ -D-galattosidasi distinta dalle altre due che vengono, invece, trattenute dalla resina di affinità ed eluite successivamente dalla soluzione di galattosio al 5%. La presenza di questa terza isoforma di enzima rende necessario un riesame completo delle caratteristiche di queste tre forme di  $\beta$ -D-galattosidasi, sia dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche che da quelle transglicolitiche. Questo aspetto sperimentale non è stato riportato perchè esula dagli scopi di questa tesi.

### 7.5.3 Sintesi e purificazione del trisaccaride Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Lewis<sup>X</sup>.

Il disaccaride Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc, ottenuto dalla prima reazione di transglicosilazione, è stato usato come molecola accettrice per la seconda reazione di transglicosilazione catalizzata dalla  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*, parzialmente purificata, utilizzando il lattosio come donatore del residuo di galattosio.

Oltre a quello desiderato nessun altro prodotto di transglicosilazione è stato rilevato. Come nel caso precedente la differenza tra i pesi molecolari del prodotto di transglicosilazione, un trisaccaride, e del substrato, un disaccaride, ha consentito

una facile separazione e purificazione del prodotto di transgalattosilazione (Fig. 7.9).

La caratterizzazione HPLC di uno standard commerciale di Lewis<sup>x</sup> e del prodotto di transglicosilazione ha dato lo stesso "pattern" cromatografico (Fig. 7.10). L'analisi NMR ha fornito dati perfettamente coincidenti con quelli descritti in letteratura (Miller et al., 1992). Lo spettro di massa ionspray rivela la presenza degli ioni 530.2, 547.1, 552.1 e 568.1, corrispondenti, rispettivamente a [M+H]<sup>+</sup>, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup> (Fig. 7.11).

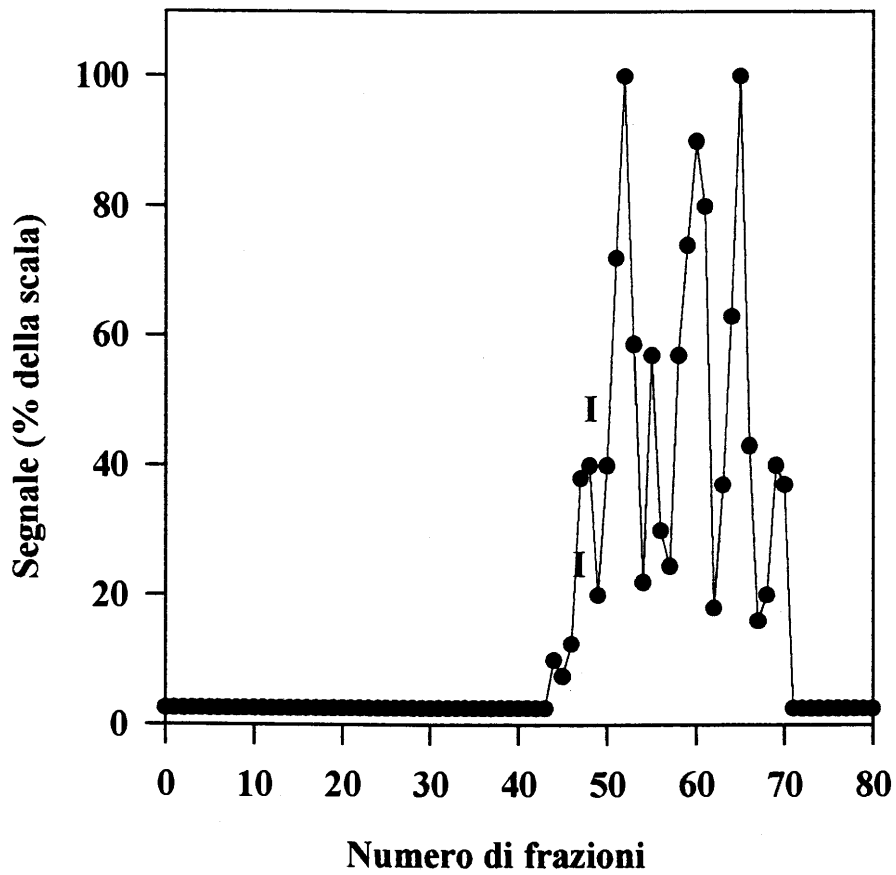


Fig 7.9 Profilo di eluzione della cromatografia su Bio-Gel P2 del prodotto di transgalattosilazione

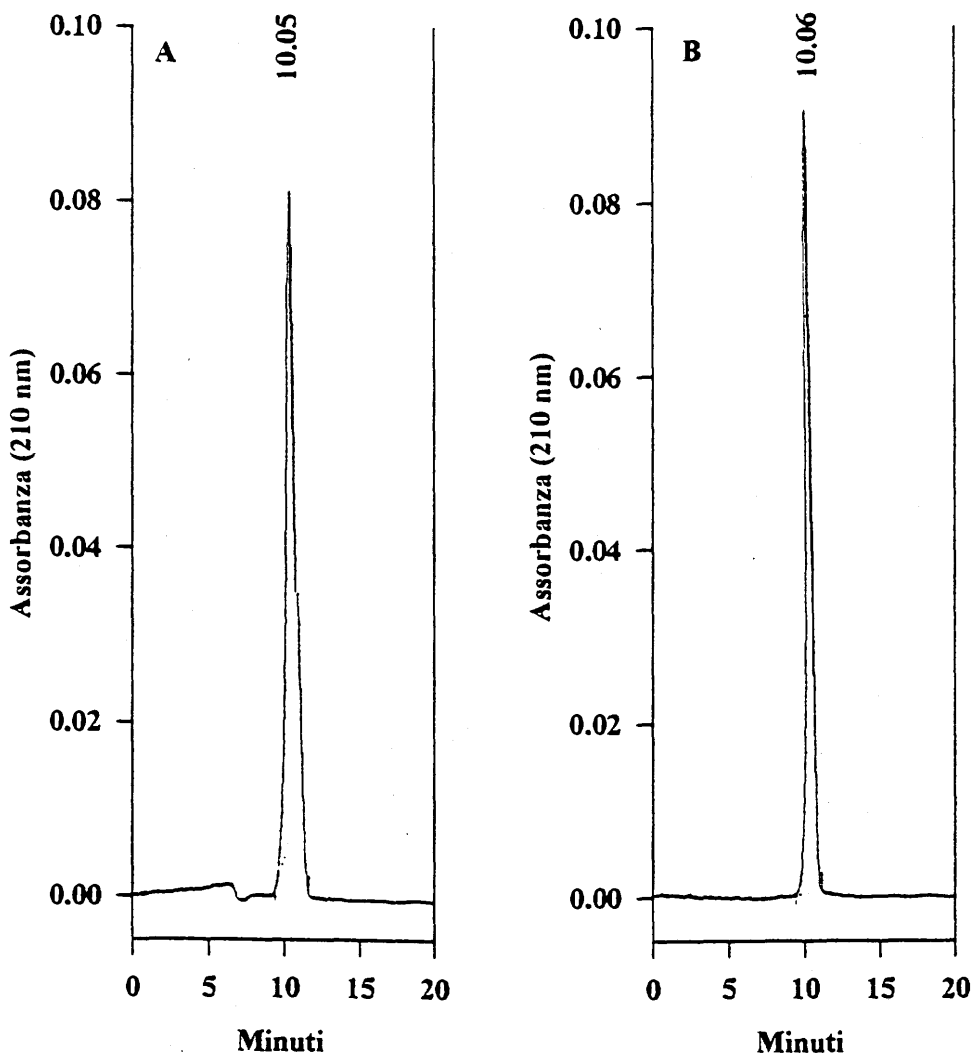


Fig. 7.10 Profilo HPLC di uno standard di Lewis<sup>x</sup> (A) e del prodotto di transgalattosilazione (B)

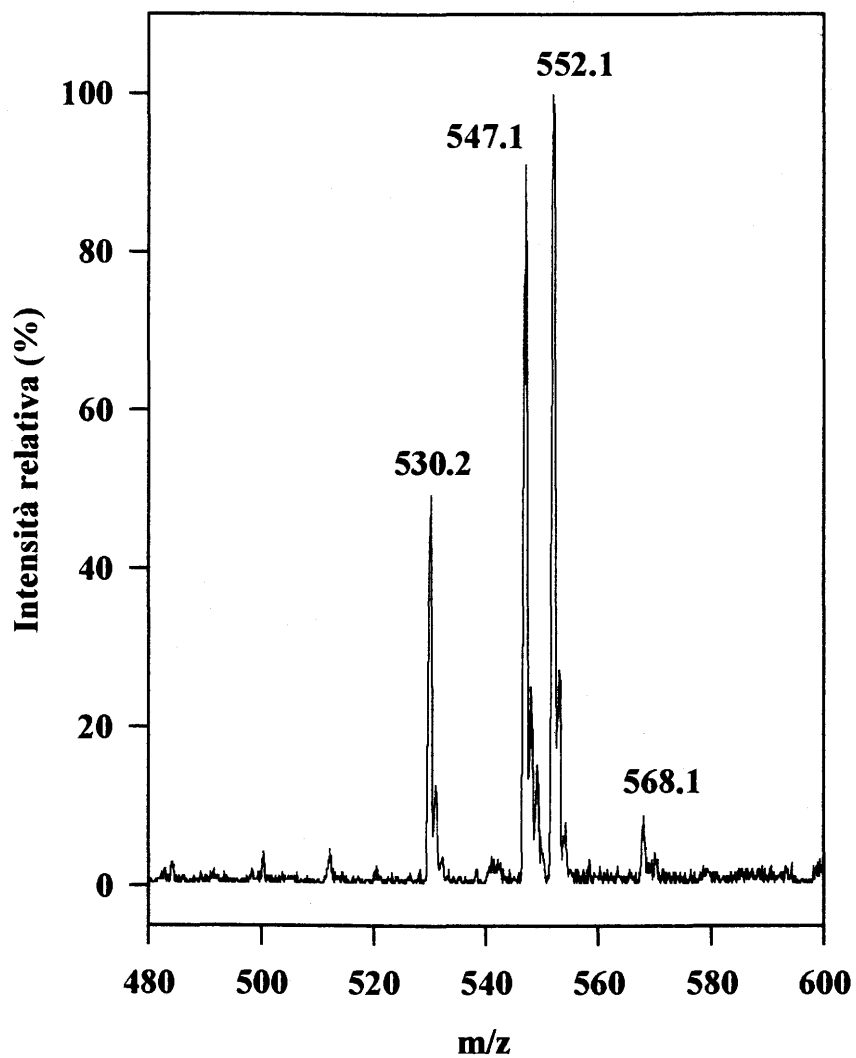


Fig. 7.11 Spettro di massa "ionspray" del Lewis<sup>x</sup> da sintesi enzimatica

## 7.6 Materiali e Strumenti

### 7.6.1 Materiali

Il lattosio, la GlcNAc, il *p*-nitrofenil-fucopiranoside (Fuc $\alpha$ Op-NO<sub>2</sub>Ph), l'*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galattopiranoside (Gal $\beta$ Oo-NO<sub>2</sub>Ph), il Fuc $\alpha$ 1-2Gal, il fucopiranosio (Fuc), il 3-metil-1-fenil-5-pirazolone (PMP), il TEMED, l'ammonio persolfato ((NH<sub>4</sub>)S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), il SDS, il 2-mercaptoetanol, il blu di bromofenolo e il glicerolo sono stati ottenuti dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). Il preparato grezzo di  $\alpha$ -L-fucosidasi da *Aspergillus niger*, Rhozyme HP150, è stato ottenuta dalla InterSpex Products, Inc. (Foster City, CA, USA). La  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans*, Biolacta N10, è stata ottenuta dalla Daiwa Kasei K.K. (Osaka, Giappone). Il trisaccaride standard Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc (Lewis<sup>x</sup>), è stato ottenuto dai Dextra Laboratoires Ltd. (Reading, GB). Il disaccaride standard Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc è stato ottenuto dalla Toronto Research Chemical (Toronto, CA). La colonna a fase inversa, Sep-Pak C<sub>18</sub>, è stata ottenuta dalla Waters (Milliford, MA, USA). La Bio-Gel P2 è stata ottenuta dalla Bio-Rad (Richmond, CA, USA). La Sepharose 6B è stata ottenuta dalla Pharmacia-Biotech (Uppsala, Svezia). Il divinilsulfone (DVS) è stato ottenuto dalla Fluka AG (Buchs, Svizzera). Le membrane coniche Centrifilo CF25 sono state ottenute dalla Amicon (Beverly, MA, USA). L'acetonitrile HiperSolv, l'acrilammide, la bis acrilammide e il Coomassie R250 sono stati ottenuti dalla BDH (Poole, GB). La colonna per HPLC Ultrasphere-ODS (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm I.D) è stata ottenuta dalla Beckman (San Ramon, CA, USA) e la colonna HPLC LiChrosorb-NH<sub>2</sub> (5  $\mu$ m, 250 x 4 mm I.D.) dalla Merck (Darmstadt, Germania).

### 7.6.2 Strumenti

Per l'analisi HPLC è stato utilizzato un sistema composto da una pompa JASCO BIP-1 a cui è connesso un rilevatore UV-VIS JASCO UVIDEC-100-V. Come rilevatore per le cromatografie di gel filtrazione è stato usato un rivelatore ad indice di rifrazione R401 della Waters.

Gli esperimenti di spettroscopia NMR <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C sono stati condotti su uno spettrometro Bruker AC 200 (<sup>13</sup>C 50.3 MHz, <sup>1</sup>H 200 MHz) utilizzando una sonda multinucleare da 5 mm. Per tutte le misure sono stati utilizzati 500  $\mu$ l di acqua



deuterata con una concentrazione di campione pari a 5 mg/ml per le misure del  $^1\text{H}$  e di 30 mg/ml per quelle del  $^{13}\text{C}$ . Tutti gli spettri sono stati registrati a 37°C.

Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa API-1 PE SCIEX. I campioni sono stati dissolti in una soluzione al 50% di acetonitrile in ammonio acetato 5 mM con una concentrazione finale di campione di 20  $\mu\text{M}$  e iniettati ad un flusso di 7  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Gli spettri sono stati registrati in positivo utilizzando come agente ionizzante ammonio acetato 0.25  $\mu\text{M}$ , utilizzando un intervallo di 0.1 amu, un potenziale di orifizio di 50 V e un voltaggio dello "ionspray" di 5'000 V.

## 7.7 Bibliografia

- Ajisaka, K. e Shirakabe, M. (1992) *Carbohydr. Res.* 224: 291-299
- Cordon-Cardo, C., Reuter, V.E., Lloyd, K.O., Fair, W.R., Old, L.J. e Melamed, M.R. (1988) *Cancer Res.* 48: 4113-4120
- Egge, H., Dell, A. e Nicolai, H (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 224: 235-253
- Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., Kakehi, K. e Nakamura, J. (1989) *Anal. Biochem.* 180: 351-357
- Iglesias, J.L., Lis, H. e Sharon, N. (1982) *Eur. J. Biochem.* 123: 247-252
- Itzkowitz, S.H., Yuan, M., Fukushi, Y., Palekar, A., Phelps, P.C., Shamsuddin, A.M., Trump, B.F., Hakamori, S.I. e Kim, Y.S. (1986) *Cancer Res.* 46: 2627-2632
- Kobata, A. (1977) in *The Glycoconjugates* (Horowitz, M.I. e Pigman, W. Eds.) Academic Press, Vol. I, pp 423-440
- Kunz, C. e Rudloff, S. (1993) *Acta Paediatr.* 82: 903-912
- Laemli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685
- Miller, K.E., Mukhopadhyay, C., Cagas, P. e Bush, C.A. (1992) *Biochemistry* 31: 6703-6709
- Mozaffar, Z., Nakanishi, K., Matsuno, R. e Kamikubo, T. (1984) *Agric. Biol. Chem.* 48: 3053-3061
- Nilsson, K.G.I., Eliasson, A. e Larsson-Lorek, U. (1995) *Biotech. Lett.* 17: 717-722
- Porath, J., Låås, T. e Janson, J-C. (1975) *J. Chromatogr.* 103: 49-62
- Sakamoto, J., Watanabe, T., Tokumaru, T., Takagi, H., Nakazato, H. e Lloyd, K.O. (1989) *Cancer Res.* 49: 745-752
- Santer, U.V. and Glick, M.C. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96: 219-226
- Svensson, S.C.T. e Thiem, J. (1990) *Carbohydr. Res.* 200, 391-402
- Watkins, W.M. (1995) in *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil, J.; Vliegthart, J.F.G. e Dchachter, H. Eds.) Elsevier Science, Vol. 29a, pp 313-390

## Capitolo 8

### Sintesi del Tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis<sup>x</sup>

#### 8.1 Premessa; Strategia di Sintesi

Tra gli oligosaccaridi sialilati il Sialil-Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>, Fig. 8.1) occupa una posizione particolare per le sue importanti attività biologiche. Si tratta di un tetrasaccaride ben noto come determinante antigenico dei gruppi sanguigni (Watkins, 1995). In tempi relativamente recenti è stato identificato come il ligando naturale delle Selectine (Phillips et al., 1990; Brandley et al., 1990; Zhou et al., 1991; Tyrrel et al., 1991; Springer e Lasky, 1991; Foxall et al., 1992; Lasky, 1992; McEver et al., 1995). Come già osservato nella parte introduttiva di questa tesi, le Selectine sono una particolare classe di glicoproteine il cui ruolo fondamentale è quello di mediare le interazioni tra i leucociti in particolare durante i processi infiammatori.

Sono state anche osservate delle correlazioni interessanti tra l'incidenza di certe forme tumorali e la distribuzione tissutale di questo determinante (Itzkowitz et al., 1986; Cordon-Cardo et al., 1988; Sakamoto et al., 1989; Kannagi, 1997).

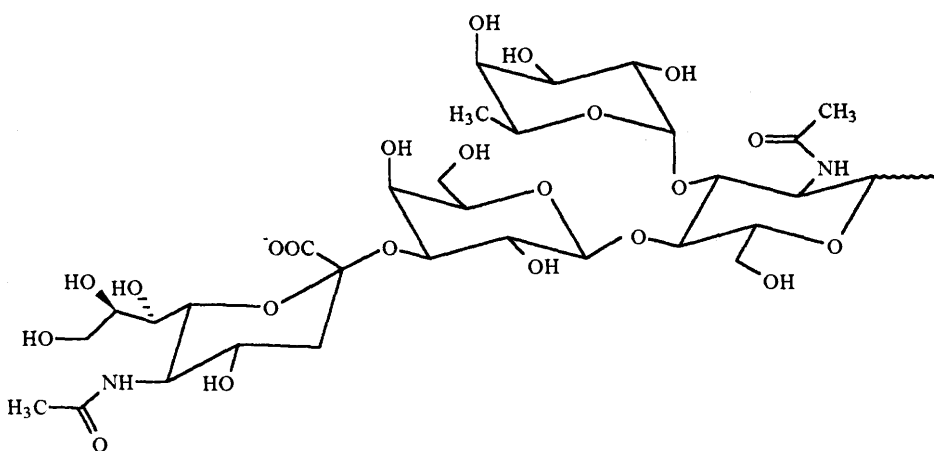


Fig. 8.1 Struttura dell'antigene Sialil-Lewis<sup>x</sup>

Il tetrasaccaride Sialil-Lewis<sup>x</sup> è stato ottenuto mediante un'unica tappa biosintetica che ha comportato la sialilazione regiospecifica del trisaccaride Lewis<sup>x</sup> ottenuto come descritto nel Capitolo 7. La tappa di sintesi è schematicamente riportata in Fig. 8.2.

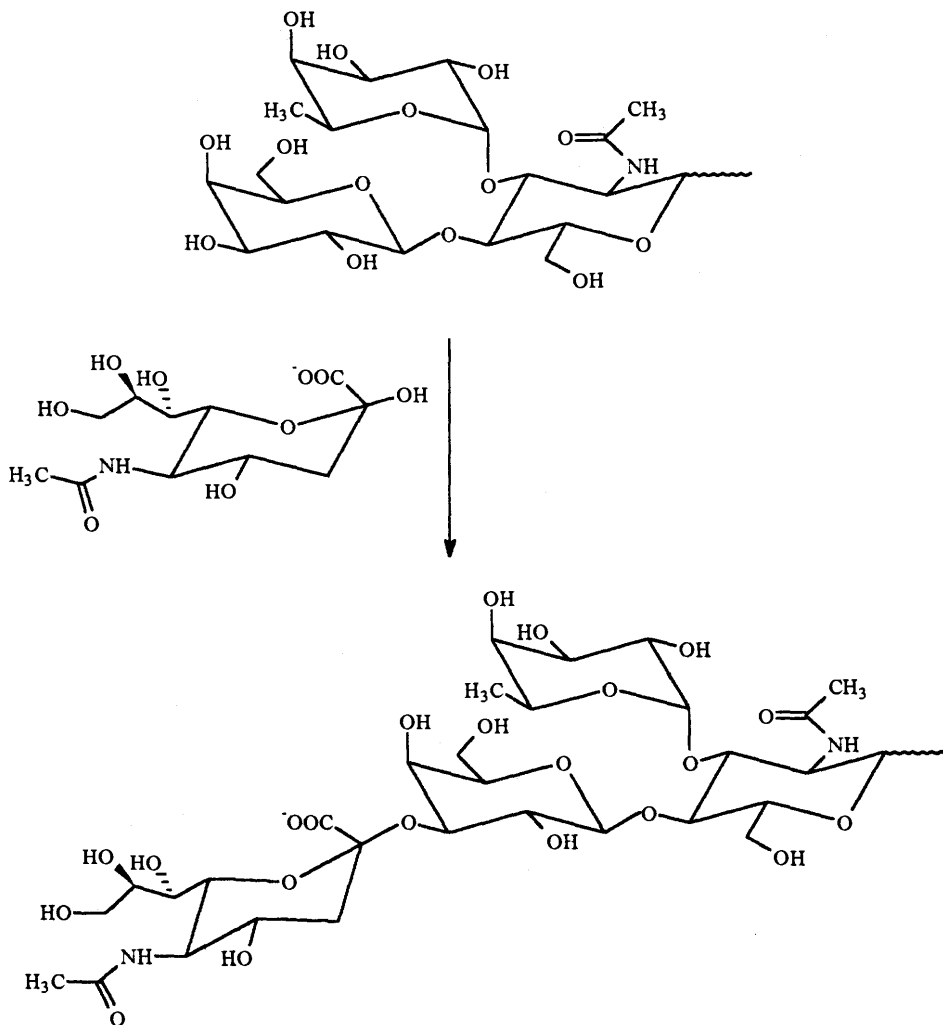


Fig. 8.2 Rappresentazione schematica della tappa di sintesi del tetrasaccaride Sialil-Lewis<sup>x</sup>

## 8.2 Metodologie Impiegate nella Sintesi del Tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis<sup>x</sup>

Per la descrizione della sintesi del substrato accettore e della purificazione dei vari enzimi utilizzati si rimanda ai capitoli precedenti.

### 8.2.1 Tecniche di caratterizzazione del prodotto di trans-sialilazione

L'identificazione dei prodotti di trans-sialilazione è stata ottenuta mediante HPLC e spettrometria di massa ionspray.

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore fissato alla lunghezza d'onda di 210 nm, a cui assorbono i gruppi *N*-acetilici. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela CH<sub>3</sub>CN : 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50:50). E' stata utilizzata una colonna LiChrosorb-NH<sub>2</sub>. L'identificazione è stata ottenuta effettuando un confronto tra i profili cromatografici dei prodotti di sintesi con quelli di uno standard originale.

Le caratteristiche degli strumenti sono riportate nel paragrafo 8.4.

### 8.2.2 Produzione del tetrasaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc; Sialil-Lewis<sup>x</sup>

La reazione utilizzata per la sintesi di questo prodotto è schematizzata in Fig. 8.3.

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuc $\alpha$ 1-3]GlcNAc si è operato nel seguente modo:

NeuAc-mU	13.5 $\mu$ mol
Lewis <sup>x</sup>	13.5 $\mu$ mol
BSA 1%	100 $\mu$ l
PBS 100 mM pH 7.2	fino a 500 $\mu$ l
trans-sialidasi	13 U

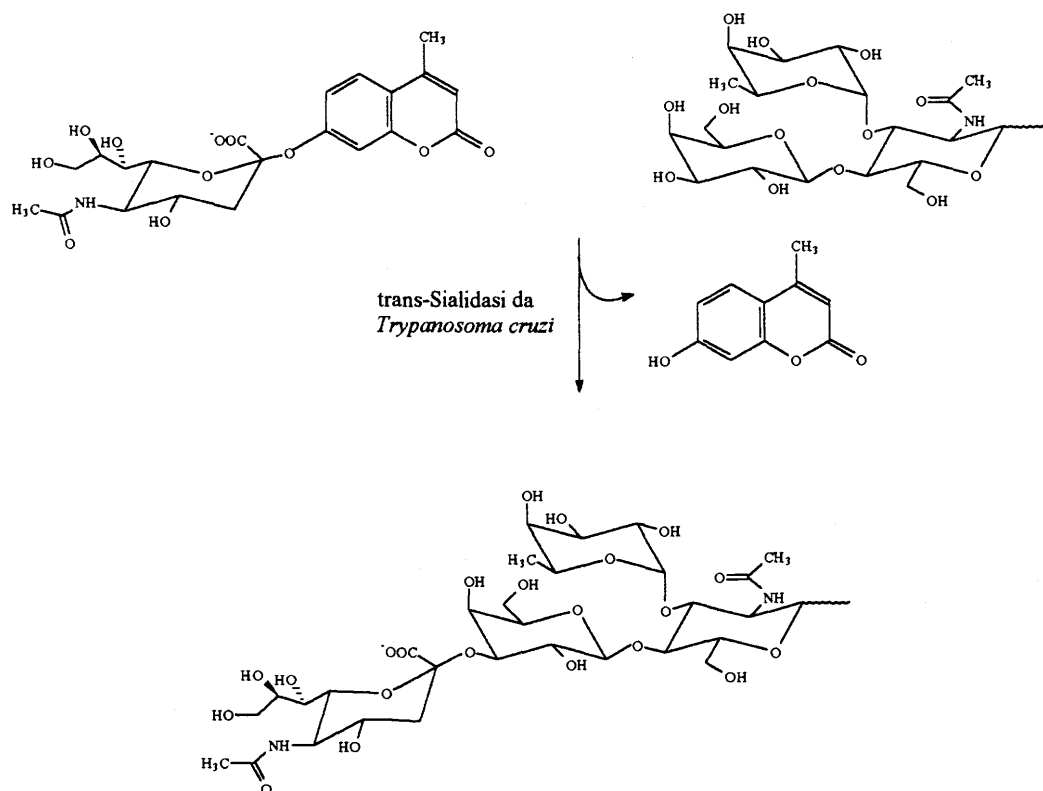


Fig. 8.3 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi del tetrasaccaride Sialil-Lewis<sup>x</sup>

La miscela è stata incubata a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovranatante è stato sottoposto a estrazione in fase solida su una cartuccia di C<sub>18</sub> preventivamente condizionata mediante lavaggio con 3 volumi di metanolo, seguiti da un lavaggio con 3 volumi di acqua distillata. Dopo caricamento del campione la colonna è stata lavata con 3 volumi di acqua distillata, seguiti da 3 volumi di metanolo. Con questo primo passaggio di purificazione i composti polari, come il Le<sup>x</sup> e il prodotto di trans-sialilazione, sono stati eluiti con il lavaggio acquoso, mentre i composti meno polari, come il NeuAc-mU e il mU, sono stati eluiti con il metanolo. La fase acquosa è stata portata a secco mediante evaporazione sottovuoto e il residuo secco è stato ripreso in 5 ml di acqua distillata. La completa separazione e purificazione del prodotto di trans-sialilazione è stata ottenuta mediante purificazione su una colonna di QAE-Sephadex A25 (15 x 1.5 cm) equilibrata in acqua. La colonna è stata lavata con circa 10 volumi di acqua ed infine eluita con 10 volumi di formiato di ammonio 1M. L'andamento della purificazione è stato seguito mediante TLC sviluppata in CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH : NH<sub>4</sub>OH 1N : H<sub>2</sub>O (6:2:1) e rivelata mediante uno spray costituito da una soluzione di orcinolo allo 0.2% in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Tutte le frazioni che presentavano un R<sub>f</sub> corrispondente a quello dello standard sono state riunite. Il pool così ottenuto è stato sottoposto a desalificazione su di una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in acqua distillata. L'andamento della desalificazione è stato seguito utilizzando un rivelatore ad indice di rifrazione. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante TLC come descritto sopra. Le frazioni che presentavano un R<sub>f</sub> corrispondente a quello dello standard sono state riunite e liofilizzate.

### 8.3 Risultati e Discussione

La sintesi del tetrasaccaride SLe<sup>x</sup>, pur coinvolgendo un ulteriore importante contributo nell'ambito delle reazioni di transglicosilazioni, ha comportato l'applicazioni di tutte le informazioni sperimentali ottenute nelle sintesi precedenti. La sintesi del Le<sup>x</sup> ha infatti permesso non solo di ottenere una molecola già di per sé molto importante, ma anche di poter disporre della molecola accettrice per la reazione di trans-sialilazione. Allo stesso modo la sintesi del 3'-SLN ha consentito la messa a punto delle migliori condizioni sperimentali per la trans-sialilazione. In base ai risultati ottenuti è stato deciso di utilizzare come donatore il NeuAc-mU e come accettore il Le<sup>x</sup>. Va onestamente rilevato che la *resa molare* della reazione è stata, in questo caso, estremamente bassa, pari all'1%. Tuttavia difficoltà di sialilazione di un substrato fucosilato da parte della trans-sialidasi, sono ben descritte in letteratura (Vandekerckhove et al., 1992).

La bassa resa è stato il limite fondamentale per l'ottenimento di quantità sufficienti alte di materiale tali da poter permettere una caratterizzazione del prodotto mediante spettroscopia NMR. Sono state invece possibili solo le caratterizzazioni mediante HPLC e mediante spettrometria di massa ionspray. Nel caso dell'analisi HPLC (Fig. 8.4) è stato ottenuto un picco il cui tempo di ritenzione coincide perfettamente con quello di uno standard di SLe<sup>x</sup>. Le misure di spettrometria di massa ionspray hanno rivelato uno ione a  $m/z$  819.4 che corrisponde, come previsto a  $[M-H]^-$  (Fig. 8.5).

Se si tiene conto della specificità di reazione della trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi* la quale catalizza unicamente la formazione di legami  $\alpha$ 2-3 tra il residuo di NeuAc e un residuo di galattosio in posizione non riducente, le informazioni strutturali sopra esposte sono sufficienti per poter affermare con certezza che il prodotto ottenuto è effettivamente il SLe<sup>x</sup>.



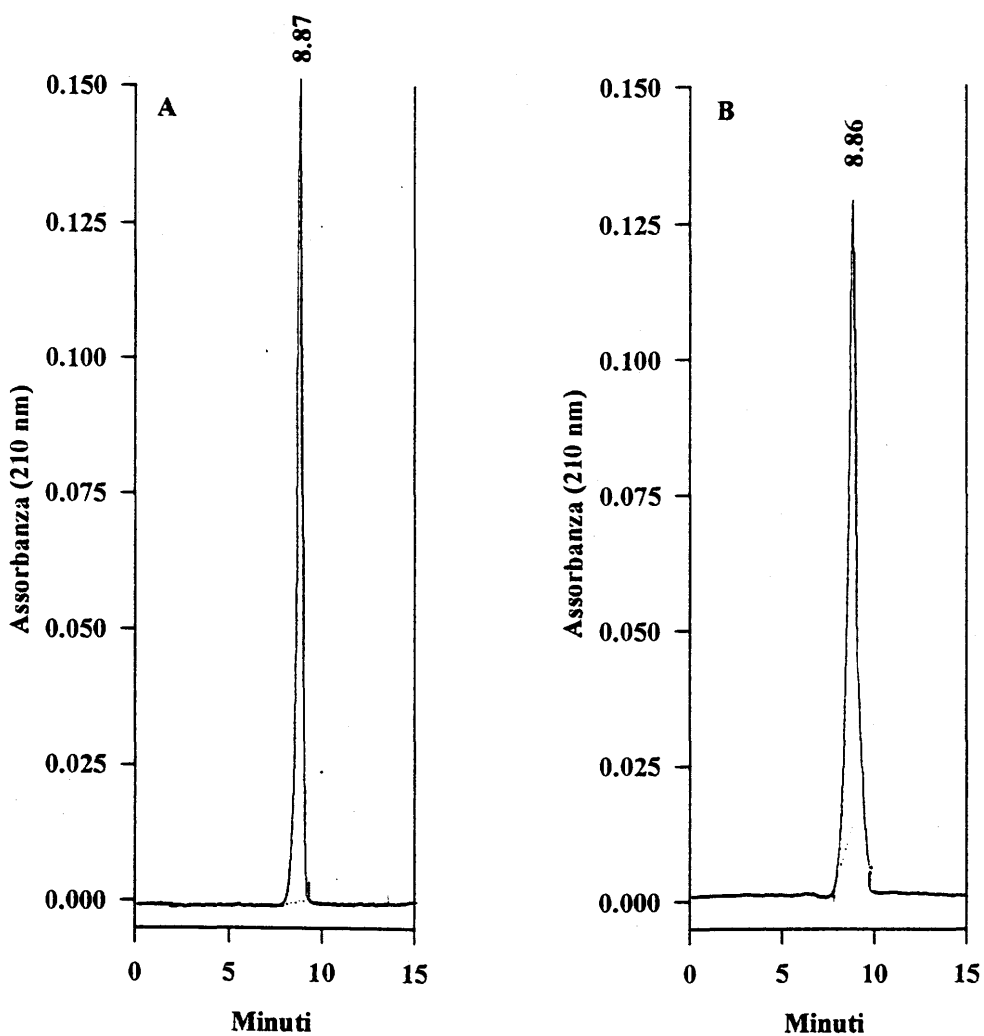


Fig. 8.4 Profilo HPLC di uno standard di Sialil-Lewis<sup>x</sup> (A) e del prodotto di *trans*-sialilazione (B)

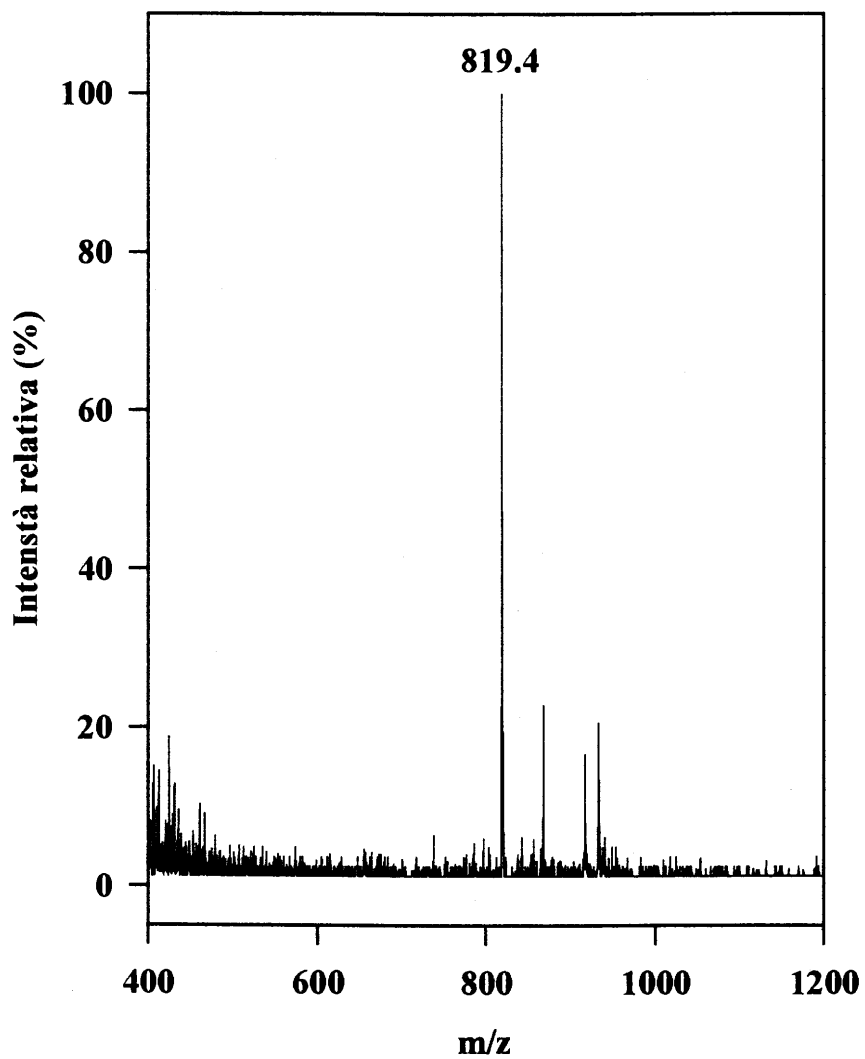


Fig. 8.5 Spettro di massa "ionspray" del Sialil-Lewis<sup>x</sup> da sintesi enzimatica

## 8.4 Materiali e Strumenti

### 8.4.1 Materiali

Il metilumbelliferil- $\alpha$ -D-acido *N*-acetilneuraminico (NeuAc-mU) è stato ottenuto dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). Il tetrasaccaride standard Sialil-Le<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>) è stato fornito dalla Toronto Research Chemical (Toronto, CA). La Bio-Gel P2 è stata ottenuta dalla Bio-Rad (Richmond, CA, USA). La colonna a fase inversa, Sep-Pak C<sub>18</sub>, è stata ottenuta dalla Waters (Milliford, MA, USA). La QAE-Sephadex A25 è stata fornita dall Pharmacia-Biotech (Uppsala, Svezia). Le membrane coniche Centriflo CF25 sono state fornite dalla Amicon (Beverly, MA, USA). L'acetonitrile HiperSolv è stato ottenuto dalla BDH (Poole, GB). La colonna HPLC LiChrosorb-NH<sub>2</sub> (5  $\mu$ m, 250 x 4 mm I.D.) è stata ottenuta dalla Merck (Darmstadt, Germania).

### 8.4.2 Strumenti

Per l'analisi HPLC è stato utilizzato un sistema composto da una pompa JASCO BIP-1 a cui 3è connesso un rivelatore UV-VIS JASCO UVIDEC-100-V. Come rivelatore per le cromatografie di gel filtrazione è stato usato un rivelatore ad indice di rifrazione R401 della Waters.

Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa API-I PE SCIEX. I campioni sono stati dissolti in una soluzione al 50% di acetonitrile in ammonio acetato 5 mM, con una concentrazione finale di 20  $\mu$ M, e iniettati ad un flusso di 7  $\mu$ l/min. Gli spettri sono stati registrati in negativo utilizzando come agente ionizzante ammonio acetato 0.25 mM, utilizzando un intervallo di 0.1 amu, un potenziale di orifizio di -50 V e un voltaggio dello "ionspray" di -5'000 V.

## 8.5 Bibliografia

- Brandley, B.K., Swiedler, S.J. and Robbins, P.W. (1990) *Cell* 63, 861-863
- Cordon-Cardo, C., Reuter, V.E., Lloyd, K.O., Fair, W.R., Old, L.J. e Melamed, M.R. (1988) *Cancer Res.* 48, 4113-4120
- Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D. e Brandley, B.K. (1992) *J. Cell Biol.* 117, 895-902
- Iitzkowitz, S.H., Yuan, M., Fukushi, Y., Palekar, A., Phelps, P.C., Shamsuddin, A.M., Trump, B.F., Hakomori, S.I. e Kim, Y.S. (1986) *Cancer Res.* 46, 2627-2632
- Kannagi, R. (1997) *Glycoconj. J.* 14: 577-584
- Lasky, L.A. (1992) *Science* 258, 964-969
- McEver, R.P. Moore, K.L. e Cummings, R.D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 11025-11028
- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S.I. e Paulson, J.C. (1990) *Science* 250, 1130-1132
- Sakamoto, J., Watanabe, T., Tokumaru, T., Takagi, H., Nakazato, H. e Lloyd, K.O. (1989) *Cancer Res.* 9, 745-752
- Springer, T.A. e Lasky, L.A. (1991) *Nature* 349, 196-197
- Tyrrell, D., James, P., Rao, N., Foxall, C., Abbas, S., Dasgupta, F., Nashed, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Kidd, J. e Brandley, B.K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10372-10376
- Watkins, W.M. (1995) in *New Comprehensive Biochemistry* (Montreuil, J., Vliegthart, J.F.G. e Schachter, H. Eds) Elsevier Science, Vol. 29a, pp 313-390
- Vandekerckhove, F., Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., Tomlinson, S., Kiso, M., Yoshida, M., Hasegawa, A. e Nussenzweig, V. (1992) *Glycobiology* 2, 541-548
- Zhou, Q., Moore, K.L., Smith, D.F., Varki, A., McEver, R.P. e Cumming, R.D. (1991) *J. Cell Biol.* 115, 557-564

## Capitolo 9

### Sintesi del Trisaccaride

#### NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph

### 9.1 Premessa; Strategie e Stadi di Sintesi

I glicosaminoglicani rappresentano la principale componente saccaridica dei proteoglicani, glicoconjugati complessi costituiti da uno scheletro proteico a cui essi sono legati (Poole, 1986). La componente polisaccaridica è legata alla proteina "core" mediante una regione di legame la cui struttura, costante, è GlcUA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-O-Ser (Lindhal and Rodén, 1972). La sua sintesi inizia con il trasferimento di un residuo di xilosio dall'UDP-Xyl alla serina a cui seguono l'aggiunta degli altri residui mediante reazioni che coinvolgono specifiche glicosiltransferasi. Proprio la prima reazione, quella di xilosilazione della serina, è particolarmente suscettibile all'azione di xilosidi. Ad esempio è stato osservato che quando Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph viene aggiunto a colture di condrociti embrionali di pollo, questo può agire come substrato per la galattosiltransferasi coinvolta nell'allungamento del residuo di xilosio legato alla serina (Okayama et al., 1973; Schwartz, 1977, 1979) inibendo, allo stesso tempo, il processo di glicosilazione dei glicosaminoglicani (Mitchell e Hardingham, 1982). Recentemente gli stessi risultati sono stati ottenuti utilizzando analoghi di xilosidi in cui alcuni ossidrili erano stati sostituiti da vari gruppi (Lugemwa et al., 1996). Oltre a tutto ciò, esistono una serie di evidenze sperimentali secondo cui gli xilosidi possono indurre la sintesi di nuovi derivati oligosaccaridici (Takagaki et al, 1991, 1996; Izumi et al., 1994; Nakamura et al., 1994; Shibata et al., 1995). Tra questi, il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl-mU è particolarmente interessante poichè sembra avere un effetto inibitorio sulla biosintesi dei glicosaminoglicani (Takagaki et al., 1996). Non sono disponibili, tuttavia, informazioni sull'effetto di derivati oligosaccaridici di questo tipo quando vengano somministrati al mezzo di coltura. Poichè le quantità recuperabili dal mezzo di coltura sono estremamente basse non è possibile pensare ad una purificazione su larga scala di questi derivati per cui occorre un'approccio biosintetico efficiente. I dati riportati in questo capitolo riguardano proprio la sintesi di un derivato oligosaccaridico, il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph (Fig. 9.1), un analogo strutturale del NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl-mU, ritrovato nel mezzo di coltura di fibroblasti umani (Takagaki et al., 1996).

Il trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è stato ottenuto in due tappe di sintesi. La prima si basa sulla galattosilazione regioselettiva dello Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph per ottenere il disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. La seconda tappa comporta la sialilazione regiospecifica di questo prodotto per ottenere il trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. Entrambe le tappe di sintesi sono schematicamente riportate in Fig. 9.2.

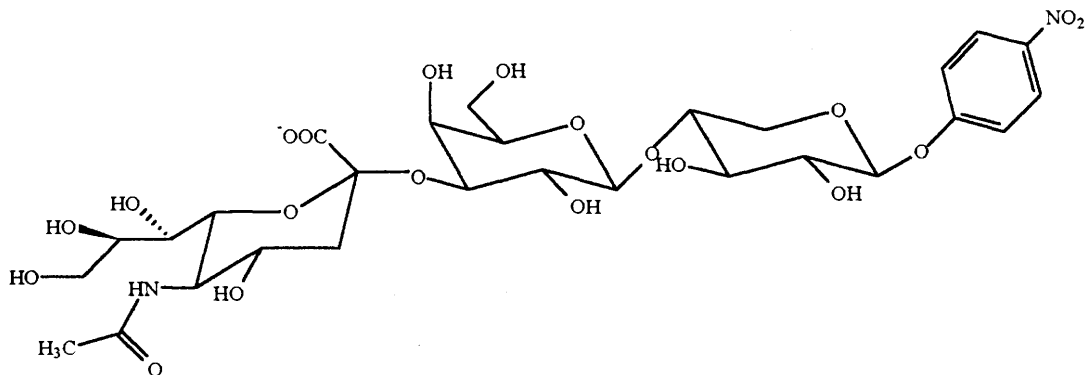


Fig. 9.1 Struttura del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

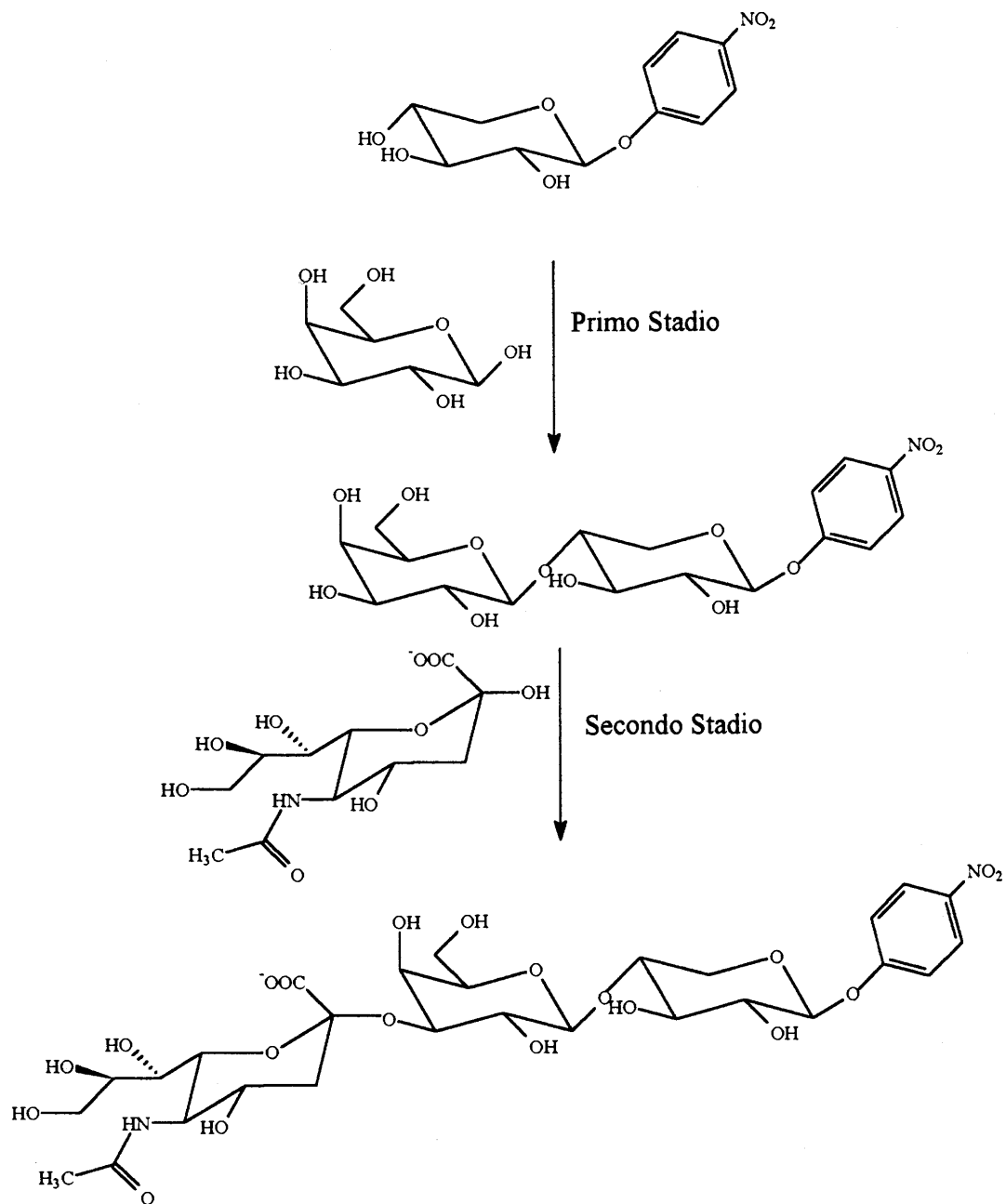


Fig. 9.2 Rappresentazione schematica delle reazioni utilizzate per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

## 9.2 Metodologie Impiegate nel Primo Stadio di Sintesi: Sintesi del Disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

### 9.2.1 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di transgalattosilazione

L'identificazione dei prodotti di transgalattosilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone ( $^1\text{H-NMR}$ ) e del carbonio ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 280 nm. La separazione è stata ottenuta ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela CH $_3$ CN (solvente A):H $_2$ O Milli-Q (solvente B) il cui rapporto veniva modulato secondo il seguente gradiente: 0-15 min, un gradiente lineare dal 10% al 2% di B; 15-17 min, un gradiente lineare dal 2% al 10% di B; 17-50 min, un'eluizione isocratica con il 10% di B. E' stata utilizzata una colonna Ultrasphere-ODS.

Le caratteristiche degli strumenti impiegati sono riportate nel paragrafo 9.5.

### 9.2.2 Cinetica di sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

Analogamente a quanto fatto in precedenza in relazione allo studio della  $\beta$ -D-galattosidasi da *Bacillus circulans* (vedi paragrafo 6.2.3) sono stati esaminati gli effetti di vari parametri sperimentali sulla modulazione della regioselettività della reazione catalizzata dalla  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli*. Dalle informazioni reperibili in letteratura sulla sintesi di galatto-xilopiranosidi, questo enzima presenta già di per sé una buona regioselettività verso la formazione di legami  $\beta$ 1-4 (intorno al 75%). La contaminazione da parte dell'isomero  $\beta$ 1-3 è, tuttavia, ancora troppo alta. Dal momento che la sintesi regiospecifica del derivato Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è l'obiettivo da raggiungere, in una serie di esperimenti di cinetica enzimatica è stato esaminato l'effetto della variazione di alcuni parametri sperimentali sulla regioselettività della reazione di transglicosilazione catalizzata dalla  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli*, ed in particolare il pH e la temperatura. Sono state confrontate le rese (assolute e relative) e la regioselettività della reazione di transgalattosilazione a 15°C, 25°C, a 37°C e a 55°C e a tre diversi valori di pH (pH 5.0, pH 7.0 e pH 8.0).



Da un punto di vista sperimentale si è proceduto in questo modo:

Lattosio	10.4 mmoli
Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	743 $\mu$ moli
H <sub>2</sub> O	7.5 ml

Questa soluzione è stata suddivisa in tre gruppi di quattro aliquote da 500  $\mu$ l ciascuna. Alle aliquote di ciascuno dei tre gruppi sono stati aggiunti 500  $\mu$ l rispettivamente, di uno dei seguenti tamponi:

CH<sub>3</sub>COONa/CH<sub>3</sub>COOH 100 mM pH 5.0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, mercaptoetanolo 10 mM  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7.0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, mercaptoetanolo 10 mM  
 Tris-HCl 100 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, mercaptoetanolo 10 mM

Infine a tutte le aliquote sono stati aggiunti 10  $\mu$ l (corrispondenti a 2.5 U) di una soluzione di  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli*. Per ogni gruppo, le quattro aliquote componenti sono state incubate rispettivamente a 15°C, a 25°C, 37°C e a 55°C. Durante l'incubazione, ad ogni ora, sono stati prelevati 100  $\mu$ l di ciascuna soluzione che sono stati aggiunti a 900  $\mu$ l di acqua distillata ed immediatamente incubate a 100°C per 10 minuti per inattivare l'enzima. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato analizzato mediante HPLC come sopra descritto. Le concentrazioni dei prodotti (Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph) sono state determinate mediante delle rette di calibrazione ottenute analizzando all'HPLC le seguenti soluzioni standard di Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph.

Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph 0.475 mM	iniettati 20 $\mu$ l (9.5 nmoli)
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph "	"
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph 0.378 mM	iniettati 20 $\mu$ l (7.56 nmoli)
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph "	"
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph 0.286 mM	iniettati 20 $\mu$ l (5.72 nmoli)
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph "	"
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph 0.190 mM	iniettati 20 $\mu$ l (3.8 nmoli)
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph "	"
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph 0.096mM	iniettati 20 $\mu$ l (1.92 nmoli)
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph "	"

Riportando in grafico le nmoli iniettate in funzione dell'area dei picchi corrispondenti si ottengono le seguenti curve di calibrazione (Fig. 9.3):

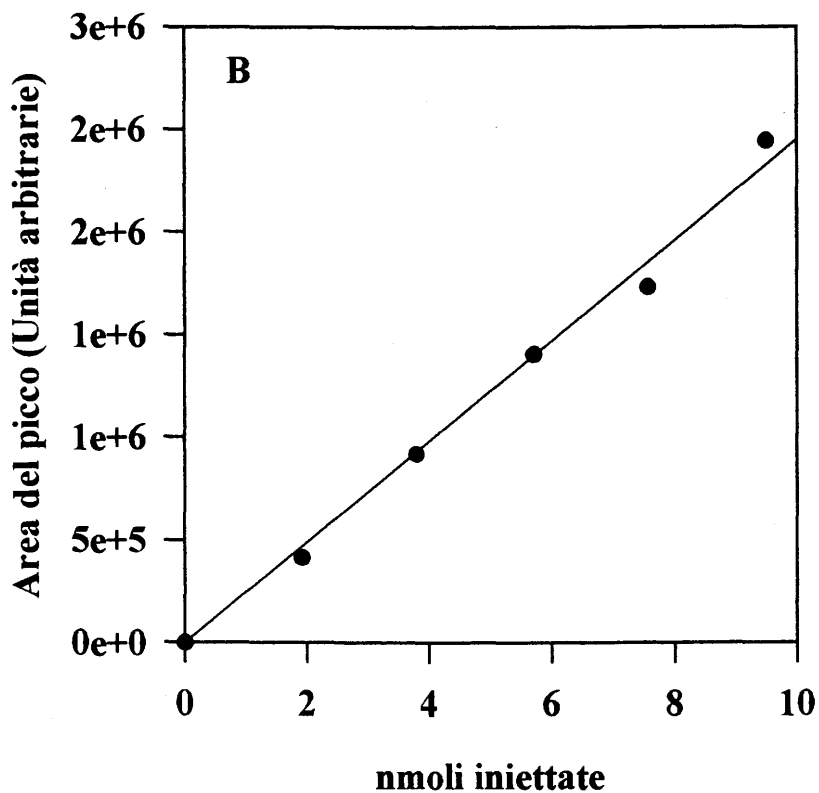
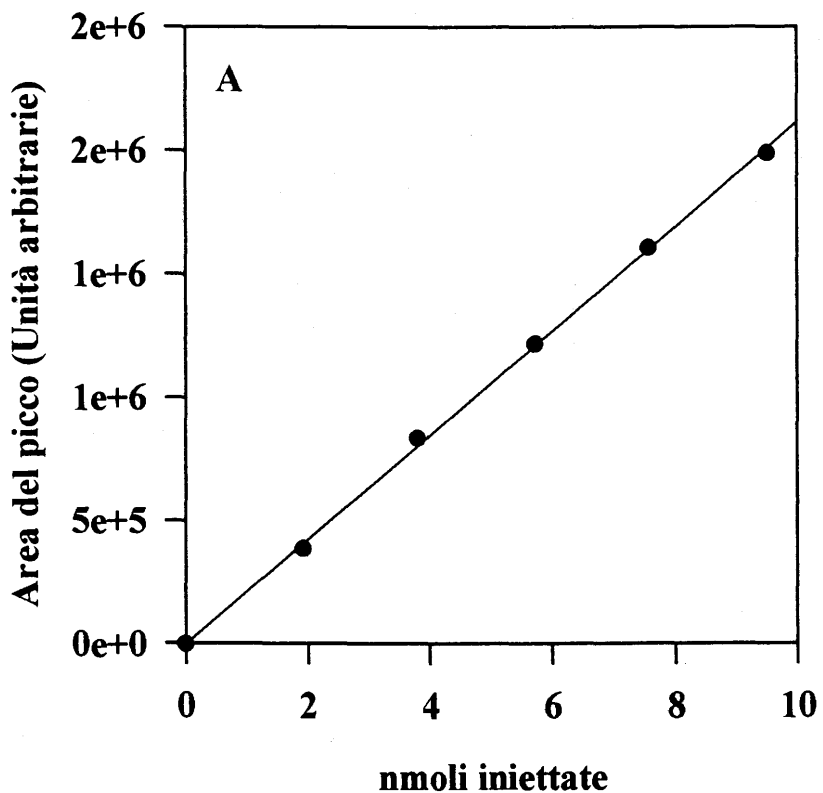


Fig. 9.3 Curve di calibrazione per il disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (A) e per il disaccaride Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (B)

Da queste è stato possibile calcolare i coefficienti angolari delle rette, dalle quali sono state calcolate la quantità dei prodotti di transglicosilazione (Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph) utilizzando la seguente relazione:

$$\frac{A \times 10}{C.A. \times v} = \text{mM di prodotto di transglicosilazione}$$

dove:

A: Area del picco

10: Fattore di diluizione dell'aliquota della miscela di reazione

C.A.: Coefficiente angolare della retta di calibrazione

v: Volume iniettato (in  $\mu$ l)

### 9.2.3 Produzione del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

La reazione utilizzata per la sintesi di questo prodotto è schematicamente rappresentata in Fig. 9.4.

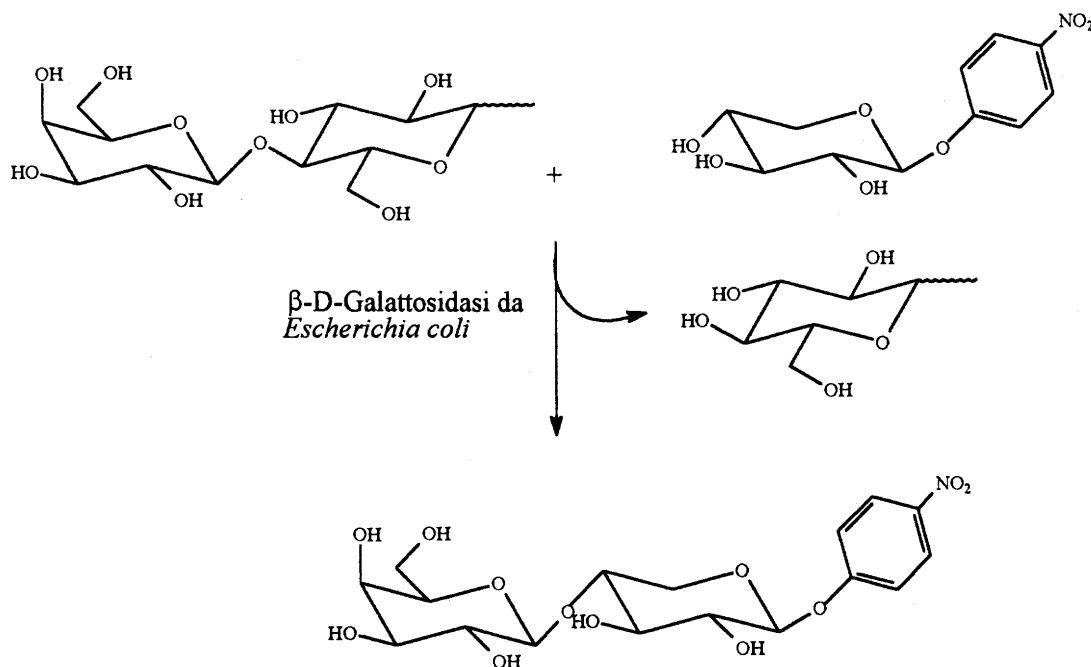


Fig. 9.4 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph si è operato in questo modo:

Lattosio	6.9 mmoli
Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph	0.497 mmoli
Tris-HCl 50 mM pH 8.0, MgCl $_2$ 1 mM, MeEtOH 5 mM	10 ml
$\beta$ -D-galattosidasi	25 U

La miscela è stata incubata a 37°C per cinque ore. Al termine del periodo di incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è stato purificato su una colonna a fase inversa di C $_{18}$  (2.5 x 6.0 cm) condizionata mediante lavaggio con 3 volumi di metanolo seguito da un

lavaggio con 3 volumi di acqua distillata. Dopo il caricamento del campione la colonna è stata lavata con 3 volumi di acqua distillata, seguiti da 3 volumi di metanolo. Con questo primo passaggio di purificazione i composti polari, come il lattosio, il Gal, il Glc e lo Xyl vengono eluiti con il lavaggio acquoso, mentre i composti meno polari, come il Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph, il Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph, lo Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e il *p*-NO $_2$ Ph, vengono eluiti con il metanolo. La fase metanolica viene portata a secco mediante evaporazione sottovuoto e il residuo secco viene ripreso in 3 ml di acqua distillata. La separazione dei prodotti di transgalattosilazione è stata ottenuta mediante cromatografia di gel filtrazione su una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in acqua distillata. L'andamento della purificazione è stato seguito misurando l'assorbimento, a 280 nm, delle frazioni pari raccolte. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante HPLC, come sopra descritto, quelle corrispondenti ai prodotti di transgalattosilazione sono state riunite ed il pool così ottenuto è stato portato a secco mediante evaporazione sottovuoto; il residuo secco è stato ripreso in 1 ml di acqua distillata.

La completa separazione e purificazione delle due forme isomeriche dei prodotti di transgalattosilazione (Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph, Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph) è stata ottenuta mediante HPLC semipreparativa utilizzando lo stesso sistema descritto in precedenza con il rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 280 nm. La separazione è stata effettuata ad un flusso di 2 ml/min, utilizzando una miscela CH $_3$ CN : H $_2$ O Milli-Q (10:90). E' stata utilizzata una colonna semipreparativa Resource RPC.

### 9.3 Metodologie Impiegate nel Secondo Stadio di Sintesi: Sintesi del Trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph

Per la preparazione della trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi* si rimanda al Capitolo 6.

#### 9.3.1 Tecniche di caratterizzazione dei prodotti di trans-sialilazione

L'identificazione dei prodotti di trans-sialilazione è stata ottenuta mediante HPLC, spettrometria di massa ionspray e spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone (<sup>1</sup>H-NMR) e del carbonio (<sup>13</sup>C-NMR).

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando un sistema di pompe a cui è collegato un rivelatore UV-VIS alla lunghezza d'onda di 280 nm. La separazione è stata ottenuta in maniera isocratica, ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando una miscela CH<sub>3</sub>CN :15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10:90). E' stata utilizzata una colonna Ultrasphere-ODS.

Le caratteristiche degli strumenti impiegati sono riportate nel paragrafo 9.5.

#### 9.3.2 Produzione del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph

La reazione utilizzata per la sintesi di questo prodotto è schematizzata in Fig. 9.5.

Da un punto di vista sperimentale per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph si è operato nel seguente modo:

NeuAc-mU	10 $\mu$ moli
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	10 $\mu$ moli
BSA 1%	100 $\mu$ l
PBS 100 mM pH 7.2	fino a 500 $\mu$ l
trans-sialidasi	13 U

La miscela è stata incubata a 37°C per 24 ore. Al termine dell'incubazione, la soluzione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e immediatamente raffreddata in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 11'000 rpm per 10 minuti, il sovrantante è

stato purificato mediante cromatografia di gel filtrazione su una colonna di Bio-Gel P2 (2.0 x 100 cm) equilibrata in NaCl 0.1 M. L'andamento della purificazione è stato seguito misurando l'assorbimento, a 280 nm, delle frazioni pari raccolte. Le frazioni corrispondenti ai picchi eluiti sono state analizzate mediante HPLC, come sopra descritto, e quelle corrispondenti ai prodotti di trans-sialilazione sono state riunite e il pool così ottenuto è stato portato a secco mediante evaporazione sottovuoto; il residuo secco è stato ripreso in 1 ml di acqua distillata. La completa desalificazione è stata ottenuta mediante estrazione in fase solida su una cartuccia di Sep-Pak C $_{18}$  condizionata come descritto in precedenza. La fase metanolica è stata portata a secco mediante evaporazione sottovuoto; il residuo secco è stato ripreso in 1 ml di acqua distillata, congelato e liofilizzato.

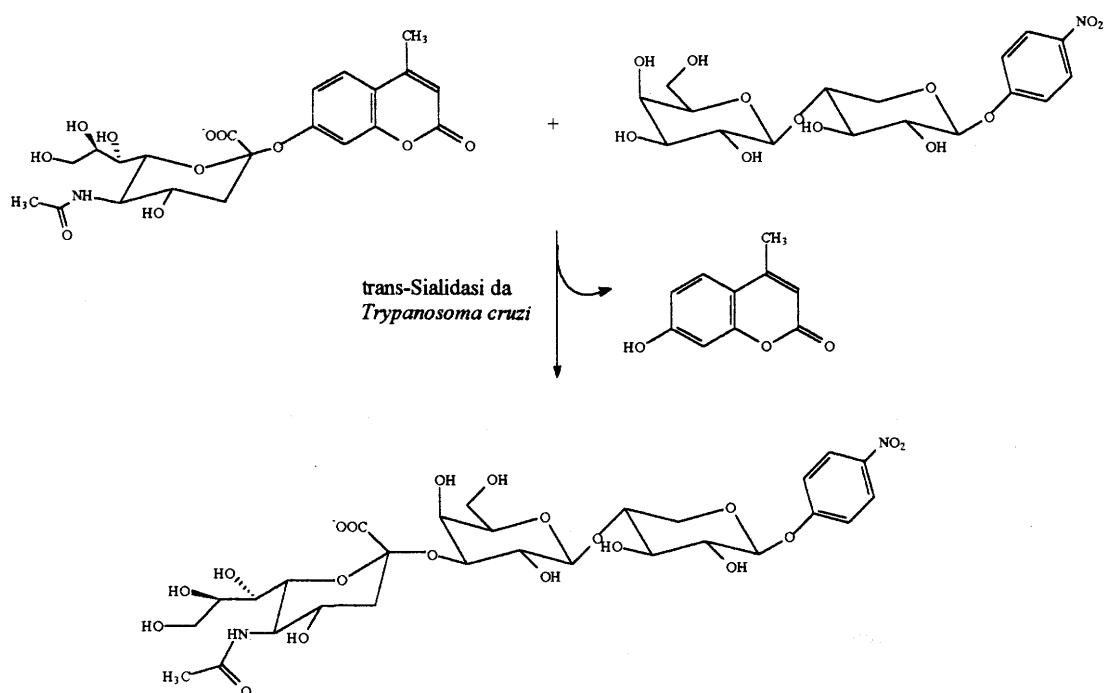


Fig. 9.5 Rappresentazione schematica della reazione utilizzata per la sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

## 9.4 Risultati e Discussione

### 9.4.1 Sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph

Per la prima reazione di transglicosilazione è stato utilizzato come enzima la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli*. Questo enzima, rispetto ad altre  $\beta$ -D-galattosidasi come quelle da *Bacillus circulans* e *Aspergillus oryzae*, mostra una buona regioselettività di formazione del legame  $\beta$ 1-4 quando viene usato Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph come accettore. Tuttavia la contaminazione da parte dell'isomero  $\beta$ 1-3 è troppo elevata. Dalle informazioni ottenute in precedenza (vedi Capitolo 6) è emersa la possibilità di controllare la regioselettività di una reazione di transglicosilazione modulando parametri come la temperatura e il pH. In conseguenza di ciò, anche per la sintesi del derivato disaccaridico Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph sono stati esaminati gli effetti dei suddetti parametri con l'obiettivo di spostare la regioselettività verso l'isomero desiderato (Fig. 9.6). Quello che emerge dall'esame della Fig. 9.6 è che con una incubazione a 15°C o a 25°C la reazione appare piuttosto lenta, ottenendo la massima produzione di Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph dopo più di 24 ore. Nello stesso intervallo di tempo la sintesi dell'isomero Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è del tutto trascurabile. Un incremento della temperatura da 25°C a 37°C è accompagnato da una notevole riduzione del tempo di incubazione richiesto per ottenere la produzione massima di prodotti di transgalattosilazione (Fig. 9.6 C). Quasi nessun miglioramento si osserva con un incremento della temperatura da 37°C a 55°C (Fig. 9.6 D). Il pH induce un notevole effetto inibitorio ai valori più estremi esaminati, pH 5.0 e pH 8.0, soprattutto ai valori estremi di temperatura, 15°C e 55°C, in corrispondenza dei quali non si osserva praticamente nessuna reazione di transgalattosilazione (Fig 9.6 A e 9.6 D). Solo ai valori di temperatura intermedi, 25°C e 37°C, compare un prodotto di transgalattosilazione, anche se con una resa bassa (Fig. 9.6 B e 9.6 C). La regioselettività risente dell'effetto sinergico della temperatura e del pH. Come osservazione generale si denota che la sintesi del Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è sempre favorita rispetto a quella del suo isomero Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. Ad esempio a 15°C e 25°C la reazione è spostata preferenzialmente verso la sintesi dell'isomero Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph con una regioselettività intorno all'80-90% soprattutto a pH 7.0 quando la resa diventa anch'essa significativa (Fig. 9.6 B). L'incremento della temperatura si accompagna ad una *riduzione* della regioselettività, che passa, sempre per un valore di pH di 7.0, dai valori precedenti al 78-80% (Fig 9.6 C e 9.6 D). Al contrario a pH 8.0 la regioselettività rimane elevata (86-90%) (Fig 9.6 C e



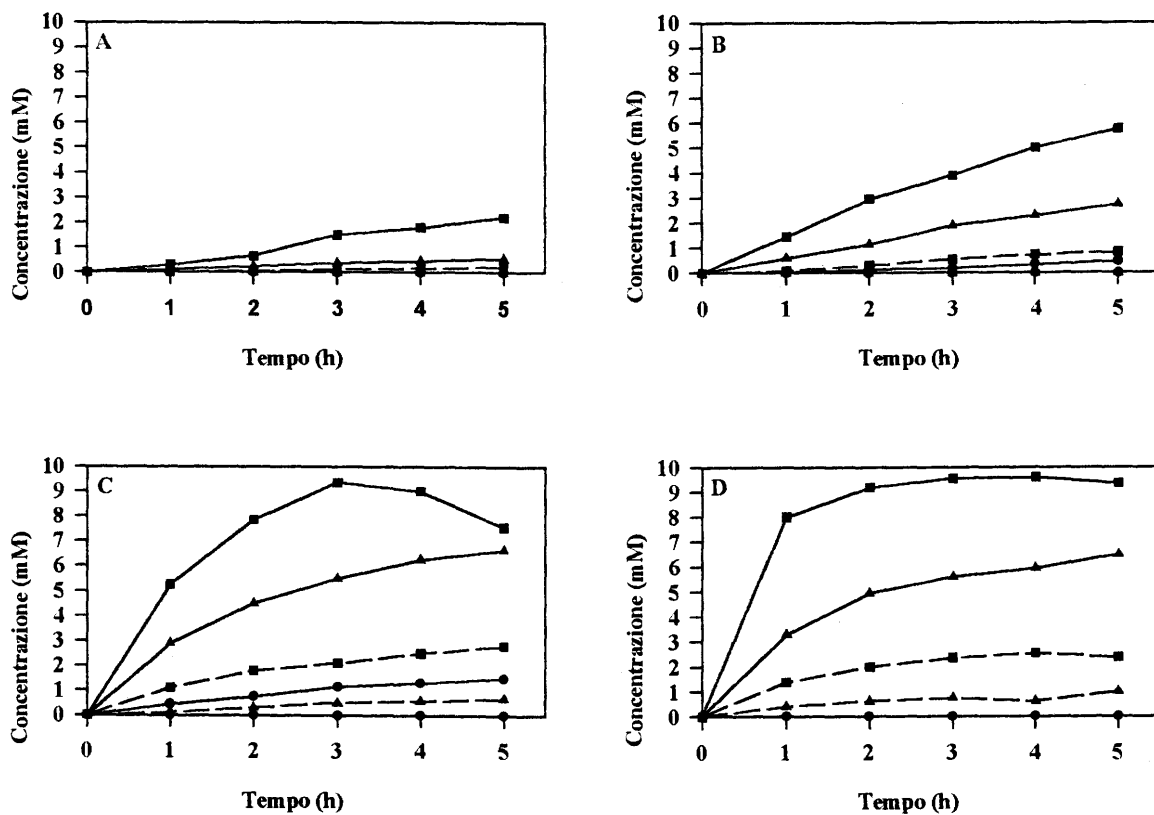


Fig. 9.6 Cinetica di sintesi del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (—) e del disaccaride Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (- - -) a pH 5.0 (●), pH 7.0 (■) e a pH 8.0 (▲) a 15°C (A), 25°C (B), 37°C (C) e a 55°C (D)

9.6 D). La sintesi del derivato disaccaridico Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è già stata descritta in letteratura (López et al, 1991; López e Fernández-Mayoralas, 1992, 1994; Fukase et al., 1996) tuttavia non sono mai stati esaminati gli effetti della variazione di parametri sperimentali, come la temperatura ed il pH, sulla resa e sulla regioselettività. Soltanto la natura dell'aglicone è stata oggetto di uno studio più approfondito, come modulatore sia delle reazioni di transglicosilazione in generale (Nilsson, 1987, 1988) che delle reazioni di transgalattosilazione degli xilopiranosidi in particolare (López e Fernández-Mayoralas, 1992, 1994). I risultati dell'indagine cinetica della sintesi enzimatica del derivato disaccaridico Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph, confermano l'importanza della temperatura e del pH quali modulatori sperimentali della resa e della regioselettività. Infatti, nel caso in esame, un incremento della temperatura è sempre accompagnato da un incremento della resa dei prodotti di transglicosilazione, eccetto che a pH 5.0 e a 55°C dove subentrano, probabilmente, fenomeni di denaturazione dell'enzima. I risultati riguardanti la regioselettività sono molto più interessanti. Infatti, considerando solo i dati a 37°C e a 55°C in corrispondenza dei quali le rese sono significative, i valori di pH più elevati mostrano un effetto positivo sulla regioselettività. Infatti a parità di resa si osserva una regioselettività pari al 75% a pH 7.0 e del 91% a pH 8.0. Poiché il nostro interesse è rivolto all'ottenimento del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph le condizioni sperimentali più appropriate prevedono un'incubazione di 5 ore a 37°C a pH 8.0.

Stabilite le migliori condizioni sperimentali, in termini di resa e regioselettività (37°C e pH 8.0) è stata effettuata una sintesi preparativa del Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph al fine di ottenere una quantità di prodotto sufficiente da poter permettere la caratterizzazione dello stesso e la disponibilità di substrato per la successiva reazione di trans-sialilazione.

L'estrazione in fase solida su colonne di C $_{18}$  ha portato all'eliminazione dei prodotti indesiderati (lattosio, galattosio e glucosio). semplificando la successiva purificazione mediante cromatografia di gel filtrazione su Bio-Gel P2 (Fig. 9.7). Mediante analisi HPLC il picco I è stato identificato come quello a cui corrispondevano i prodotti di transgalattosilazione (Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph), mentre il picco II corrispondeva allo Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (Fig 9.7). Tutte le frazioni corrispondenti al picco I sono state riunite. La separazione dei due isomeri, Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph, è stata possibile mediante HPLC semipreparativa. Al termine di questa operazione le frazioni corrispondenti al disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph sono state raccolte, il loro volume ridotto mediante evaporazione sotto vuoto ed infine liofilizzate.

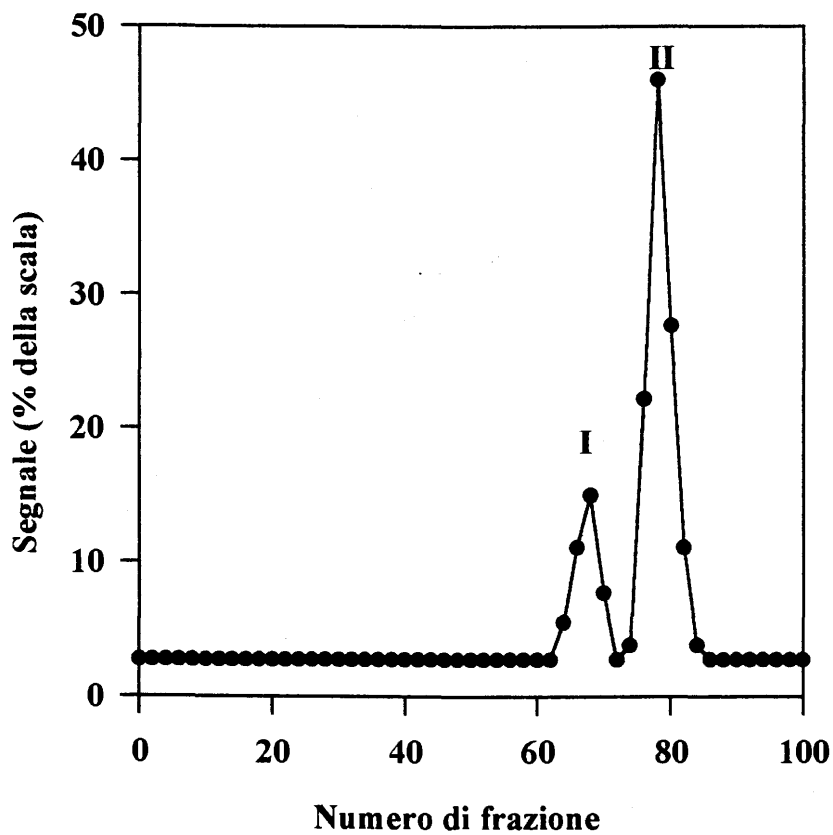


Fig. 9.7 Profilo di eluizione della cromatografia su Bio-Gel P2 del prodotto di transgalattosilazione

Mediante questa operazione sono stati ottenuti circa 30 mg di liofilo corrispondenti ad una *resa molare* pari al 14% rispetto all'accettore. Il prodotto così ottenuto è stato sottoposto a caratterizzazione come descritto in precedenza. In Fig 9.8 sono riportati i profili HPLC del prodotto di sintesi, il Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (Fig. 9.8 A), e di una miscela dei disaccaridi Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e del substrato Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (Fig. 9.8 B). In mancanza di informazioni strutturali di letteratura e di campioni commerciali di riferimento, si è anche proceduto ad un'approfondita analisi mediante spettroscopia NMR per la quale sono state fornite le assegnazioni e le costanti di accoppiamento determinabili per tutti i prodotti ottenuti. Nel caso particolare dei prodotti di transgalattosilazione i risultati di questo tipo di analisi sono riportati nelle Tabelle I e II. Le assegnazioni del  $^{13}\text{C}$ -NMR per entrambi i disaccaridi sono stati ottenuti per confronto con quelli del substrato Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. Infatti è ben noto che la glicosilazione induce uno spostamento, verso bassi campi per circa 6-8 ppm, del "chemical shift" ( $\delta$ ) del carbonio coinvolto nel legame ed un piccolo spostamento verso campi alti del "chemical shift" degli atomi di carbonio più prossimi a quello coinvolto nel legame. Nel caso del disaccaride Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph il  $\delta$  del C3 dello xilosio è passato da 76.452 ppm, valore del substrato, a 84.886 ppm (Tabella II). Allo stesso modo i  $\delta$  di C2 e C4 sono spostati leggermente verso campi più elevati (Tabella I). Come previsto nel caso del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph è il C4 dello xilosio a risentire dello spostamento verso campi più bassi. Infatti il valore del suo "chemical shift" passa da 70.070 ppm, nel substrato, a 77.491 ppm nel prodotto (Tabella II). Gli atomi di carbonio vicinali che risentono dell'effetto di spostamento verso campi più alti sono il C3 e il C5 (Tabella II). Con l'analisi dello spettro di massa sono stati evidenziati i seguenti ioni: 434.1, 451.2 e 456.3 che corrispondono rispettivamente a  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  e  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Fig. 9.9).

In conclusione, l'analisi complessiva dei risultati ottenuti dimostra un insieme di interessanti novità. Sono state individuate le condizioni sperimentali ottimali per la sintesi altamente regioselettiva del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph; tale sintesi usa come donatore di residui di galattosio il lattosio, che è un substrato estremamente economico; la sua elevata solubilità permette la preparazione di soluzioni ad elevata concentrazione e la sua natura polare permette il suo allontanamento dalla miscela di reazione per mezzo di una semplice e rapida estrazione in fase solida. In più, da un punto di vista comparativo rispetto ai dati di letteratura si osserva un miglioramento significativo della regioselettività del prodotto che passa dal 75% riportato in precedenza (López-Fernández-Mayoralas,

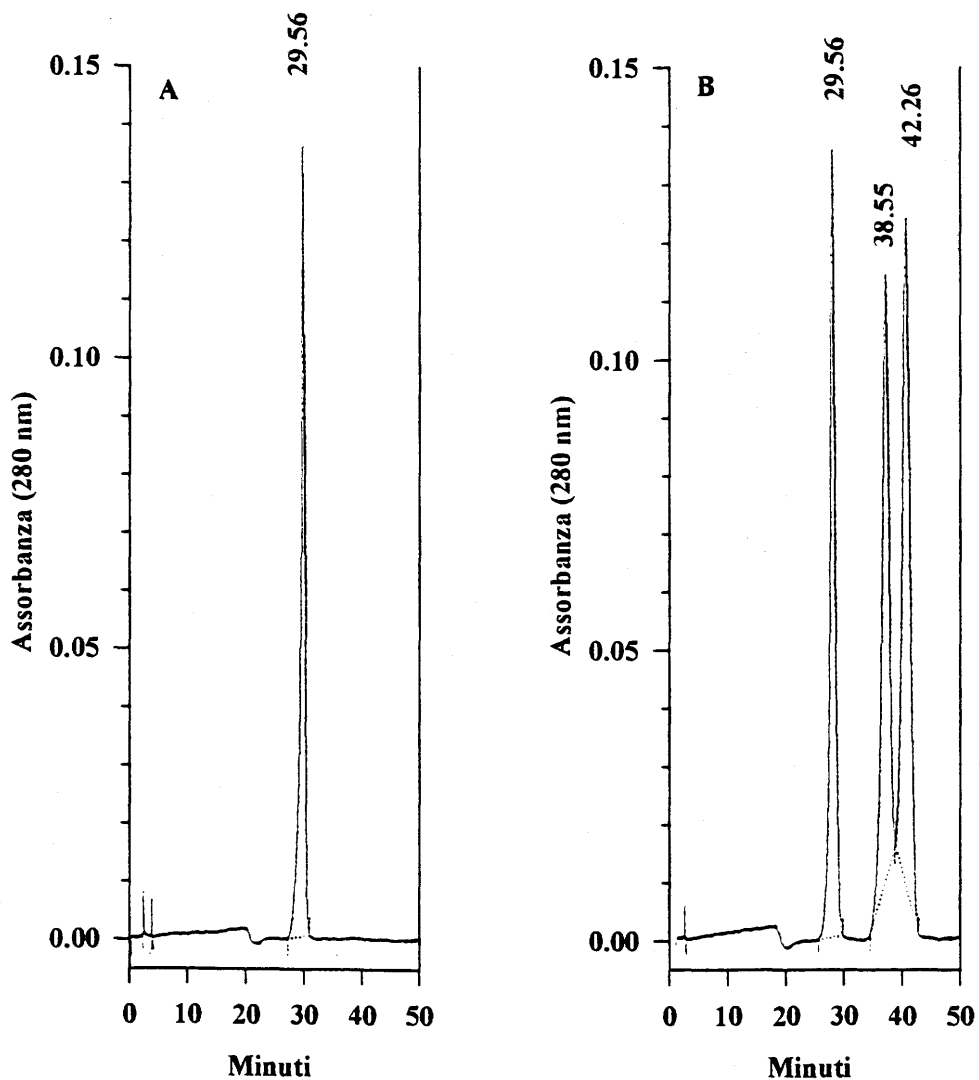


Fig. 9.8 Profilo HPLC del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (A) e di una miscela di Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (29.56), Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (38.55) e Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph (42.26) (B)

Tabella I. "Chemical shift" del  $^1\text{H}$ - e del  $^{13}\text{C}$ -NMR e costanti di accoppiamento ( $J_{\text{HH}}$ ) per il disaccaride Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e "Chemical shift" del  $^{13}\text{C}$ -NMR per il substrato Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. nd non determinato.

	$^{13}\text{C}$ $^1\text{H}$	Gal( $\beta$ 1-	-3)Xyl( $\beta$ 1-	Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph
1	C	104.409	101.103	101.113
	H	4.71 (7.6)	5.27 (7.2)	
2	C	72.444	73.305	73.684
	H	nd	nd	
3	C	73.833	84.886	76.452
	H	nd	nd	
4	C	69.823	68.943	70.007
	H	nd	nd	
5	C	76.512	66.067	66.366
	Ha	nd	4.11	
	Hb		nd	
6	C	62.272		
	H	nd		

Tabella II. "Chemical shift" del  $^1\text{H}$ - e del  $^{13}\text{C}$ -NMR e costanti di accoppiamento ( $J_{\text{HH}}$ ) per il disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph e "Chemical shift" del  $^{13}\text{C}$ -NMR per il substrato Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph. nd non determinato.

	$^{13}\text{C}$	Gal( $\beta$ 1-	-4)Xyl( $\beta$ 1-	Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph
	$^1\text{H}$			
1	C	103.040	101.122	101.113
	H	4.50 (7.6)	5.26 (7.2)	
2	C	71.877	73.657	73.684
	H	3.53 (9.9)	3.68 ( $\approx$ 9)	
3	C	73.872	74.85	76.452
	H	3.66 (3.4)	3.76 ( $\approx$ 9)	
4	C	69.862	77.491	70.007
	H	3.93 (0.3)	3.97 (9.9)	
5	C	76.552	64.442	66.366
	Ha	nd	4.21 (5.2)	
	Hb		3.64 (-11.5)	
6	C	62.311		
	H	nd		

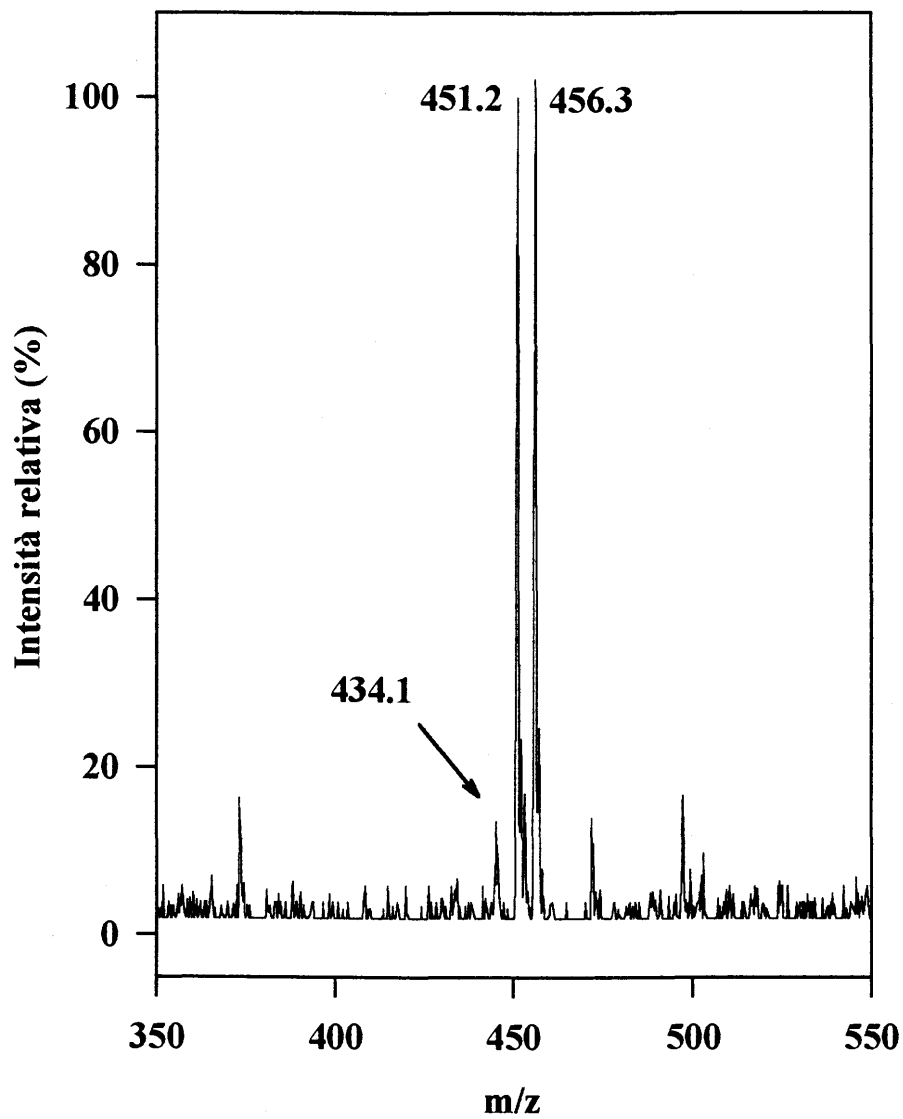


Fig 9.9 Spettro di massa "ionspray" del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph



1992, 1994) al 91%, senza nessuna significativa riduzione della resa molare che rimane intorno al 14%.

### 9.4.2 Sintesi del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph

Il prodotto ottenuto dalla prima reazione di transglicosilazione è stato utilizzato come accettore per la reazione di trans-sialilazione catalizzata dalla trans-sialidasi da *Trypanosoma cruzi*. Come substrato donatore di NeuAc è stato utilizzato il NeuAc-mU. La purificazione dei prodotti è stata ottenuta direttamente mediante cromatografia di gel filtrazione su di una colonna di Bio-Gel P2. Il profilo che si ottiene è riportato in Figura 9.10 dove il picco Ia è stato identificato, mediante analisi HPLC, come il prodotto di transsialilazione, il picco IIa come l'eccesso del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph ed infine il picco IIIa come l'eccesso di NeuAc-mU. Tutte le frazioni corrispondenti al picco Ia sono state riunite, il volume ridotto mediante evaporazione sotto vuoto e sottoposte a desalificazione mediante estrazione in fase solida su cartucce di C<sub>18</sub>. La fase metanolica è stata raccolta, completamente portata a secco mediante evaporazione sottovuoto e ripresa in 2 ml di acqua per poi essere congelata e liofilizzata. Il residuo così ottenuto corrispondeva ad una *resa molare* di circa il 33%.

In Fig. 9.11 sono riportati i profili HPLC del prodotto di sintesi, il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph (Fig. 9.11 A), e di una miscela di quest'ultimo sia con il disaccaride accettore, Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, che con quello donatore, NeuAc-mU (Fig. 9.11 B). Le assegnazioni degli spettri NMR del prodotto sono riportate in Tabella III. Questi valori sono stati ottenuti per confronto con valori riportati in letteratura e relativi ad un oligosaccaride con lo stesso residuo terminale (NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-) (Berman, 1983; Sabersan et al., 1991). Lo spettro di massa ionspray ha evidenziato uno ioni a  $m/z$  723.2 che corrisponde a  $[M-H]^-$  (Fig. 9.12). Tutto ciò conferma pienamente l'identità del prodotto ottenuto come NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph.

Un coinvolgimento del derivato trisaccaridico ottenuto, il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph, nella regolazione della biosintesi dei glicosaminoglicani è altamente probabile. Infatti, un suo analogo strutturale, il NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl-mU è stato rinvenuto in colture di fibroblasti umani quando questi venivano fatte crescere in presenza di Xyl-mU (Takagaki et al., 1996). Tale composto sembra regolare la sintesi dei glicosaminoglicani. Fino ad ora nessuna informazione è

disponibile circa il reale effetto di questo oligosaccaride o di suoi analoghi strutturali, quando aggiunti al mezzo di coltura.

In conclusione, le reazioni di transglicosilazioni si sono ancora una volta rivelate uno strumento utile per la sintesi di composti biologicamente importanti in quantità significative, con substrati economici e con un approccio sperimentale efficiente.

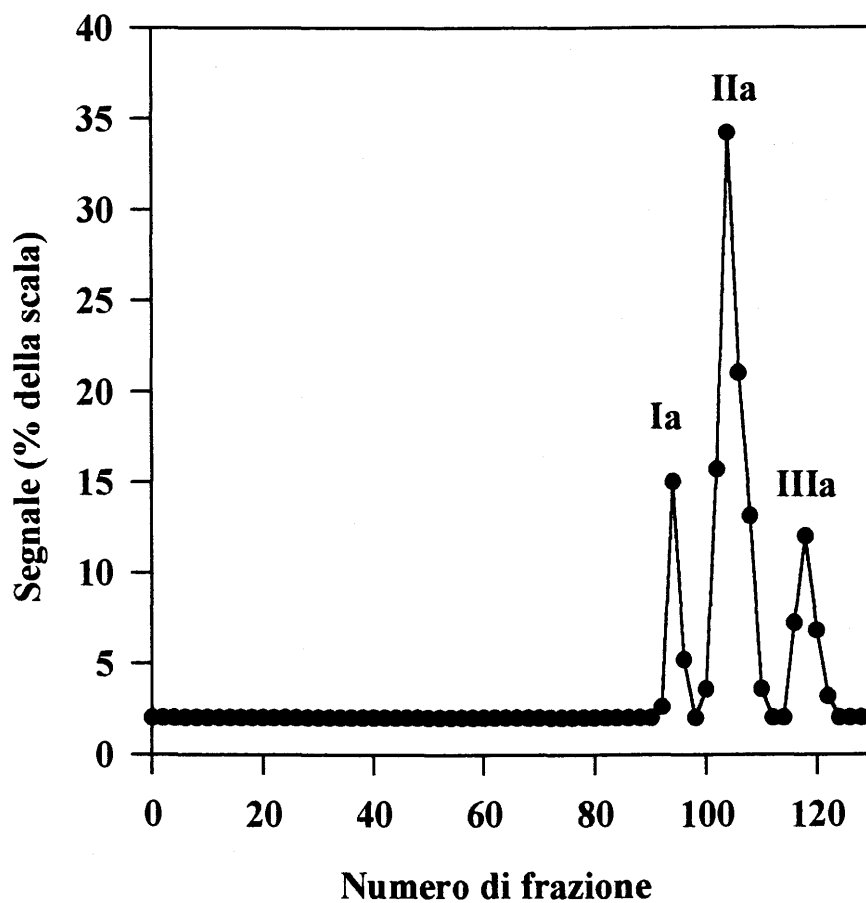


Fig. 9.10 Profilo di eluzione della cromatografia su Bio-Gel P2 del prodotto di trans-sialilazione

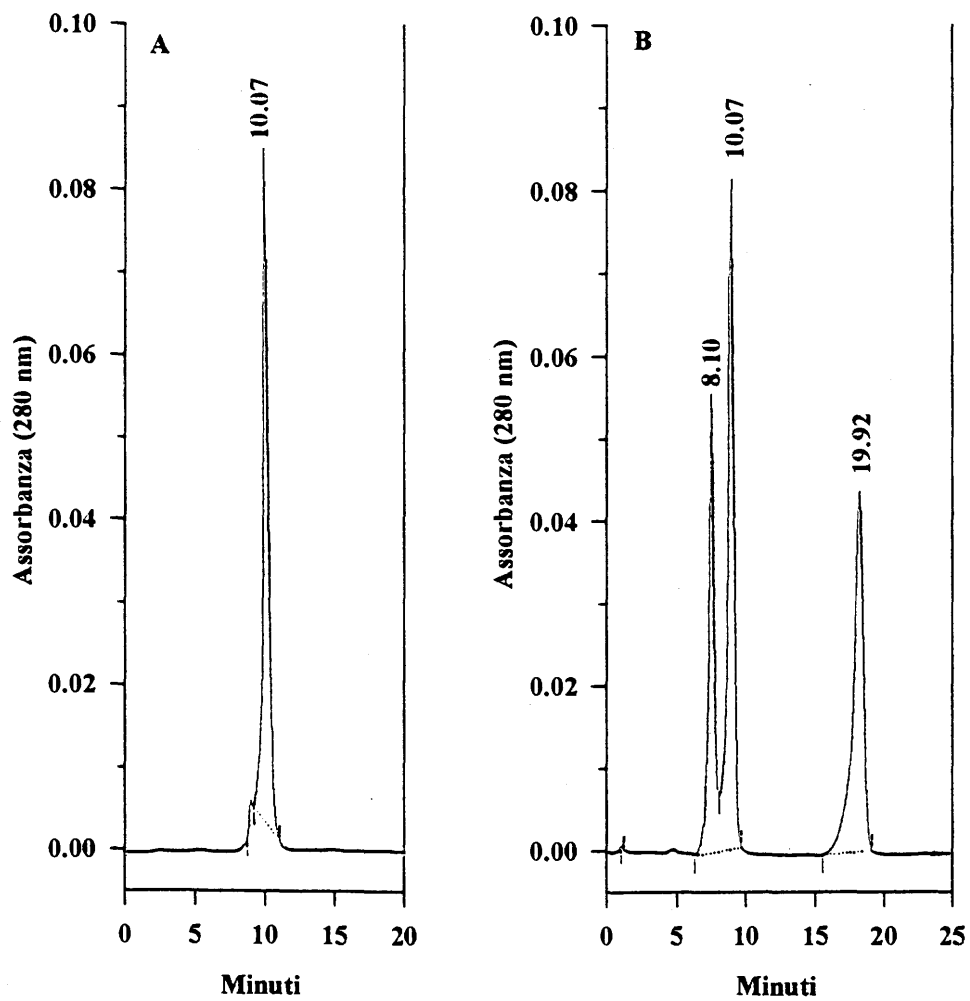


Fig. 6.11 Profili HPLC di una miscela standard di GlcNAc (7.67), NAcLac (18.05) e NacAlloLac (23.62) (A) e di NAcLac da sintesi enzimatica (B)

Tabella III. "Chemical shift" del <sup>1</sup>H- e del <sup>13</sup>C-NMR e costanti di accoppiamento (*J*<sub>HH</sub>) per il trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph. nd non determinato.

	<sup>13</sup> C <sup>1</sup> H	NeuAc( $\alpha$ 2-	-3)Gal( $\beta$ 1-	-4)Xyl( $\beta$ 1-
1	C	175.202	102.665	101.140
	H	nd	4.60 (7.8)	5.26 (7.2)
2	C	101.140	70.427	73.752
	H	nd	3.58 (9.8)	3.67
3	C	40.927	76.413	74.926
	Ha	1.81 (4.4)	4.11 (3.2)	nd
	Hb	2.77 (-12.5)		
4	C	69.683	68.81	77.274
	H	3.71	3.96	3.99 (5.4)
5	C	52.997	76.921	64.499
	Ha	nd	nd	4.23 (-11.6)
	Hb			3.64
6	C	74.163	62.425	
	H	nd	nd	
7	C	69.566		
	H	nd		
8	C	73.068		
	H	nd		
9	C	64.069		
	H	nd		
10	C	176.337		
	H	nd		
11	C	23.360		
	H	2.04		

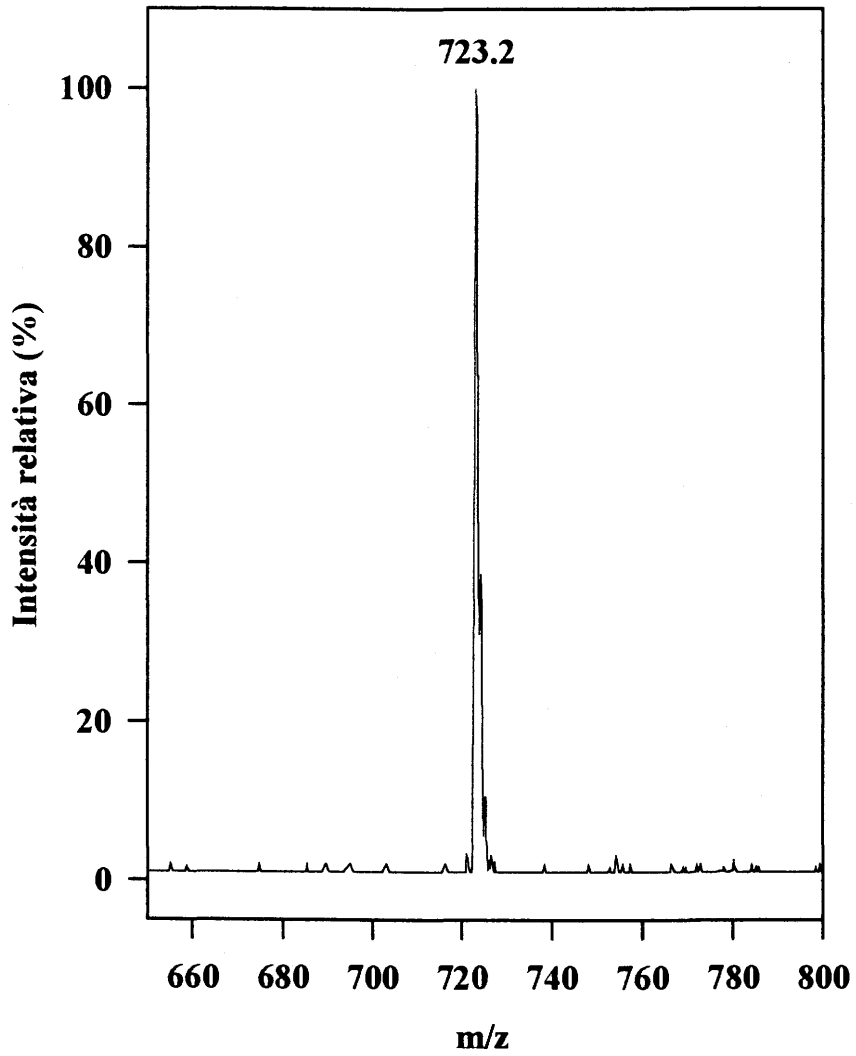


Fig. 9.12 Spettro di massa "ionspray" del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO<sub>2</sub>Ph

## 9.5 Materiali e Strumenti

### 9.5.1 Materiali

Il lattosio, il *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranoside (Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph), il metilumbelliferil- $\alpha$ -D-acido *N*-acetilneuraminico (NeuAc-mU) e la  $\beta$ -D-galattosidasi da *Escherichia coli* sono stati ottenuti dalla Sigma (St. Louis, MO, USA). La colonna a fase inversa, Sep-Pak C $_{18}$ , è stata ottenuta dalla Waters (Millford, MA, USA). La Bio-Gel P2 è stata ottenuta dalla Bio-Rad (Richmond, CA, USA). L'acetonitrile HiperSolv è stato ottenuto dalla BDH (Poole, GB). La colonna analitica per HPLC Ultrasphere-ODS (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm I.D.) è stata fornita dalla Beckman (San Ramon, CA, USA). La colonna semipreparativa per HPLC Resource RPC è stata fornita dalla Pharmacia-Biotech (Uppsala, Svezia).

### 9.5.2 Strumenti

Per l'analisi HPLC è stato utilizzato un sistema composto da una pompa JASCO BIP-1 a cui è connesso un rivelatore UV-VIS JASCO UVIDEC-100-V.

Gli esperimenti di spettroscopia NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sono stati condotti su uno spettrometro Bruker AC 200 ( $^{13}\text{C}$  50.3 MHz,  $^1\text{H}$  200 MHz) utilizzando una sonda multinucleare da 5 mm. Per tutte le misure sono stati utilizzati 500  $\mu$ l di acqua deuterata con una concentrazione di campione pari a 5 mg/ml per le misure del  $^1\text{H}$  e di 30 mg/ml per quelle del  $^{13}\text{C}$ . Tutti gli spettri sono stati registrati a 37°C.

Gli spettri di massa sono stati registrati su uno spettrometro di massa API-I PE SCIEX. I campioni sono stati dissolti in una soluzione al 50% di acetonitrile in ammonio acetato 2 mM, con una concentrazione finale di campione di 20  $\mu$ M e iniettati ad un flusso di 0.3  $\mu$ l/min. Gli spettri del disaccaride Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph sono stati registrati in positivo utilizzando come agente ionizzante ammonio acetato 60  $\mu$ M, utilizzando un intervallo di 0.1 amu, un potenziale di orifizio di 50 V e un voltaggio dello "ionspray" di 5'000 V. Gli spettri del trisaccaride NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO $_2$ Ph sono stati registrati in negativo utilizzando come agente ionizzante ammonio acetato 0.25  $\mu$ M, utilizzando un intervallo di 0.1 amu, un potenziale di orifizio di -50 V e un voltaggio dello "ionspray" di -5'000 V.

## 9.6 Bibliografia

- Berman, E. (1983) *Carbohydr. Res.* 118: 9-20
- Fukase, K., Yasukochi, T., Suda, Y., Yoshida, M. e Kusumoto, S. (1996) *Tetrahedron Lett.* 37: 6763-6766
- Izumi, J., Takagaki, K., Nakamura, T., Shibata, S., Kojima, K., Kato, I. e Endo, M. (1994) *J. Biochem.* 116: 525-529
- Lindhal, U. e Rodén, L. (1972) in *Glycoproteins* (Gottschalk, A. Ed.) Elsevier Scientific Publishing, pp 491-517
- López, R., Fernández-Mayoralas, A., Martín Lomas, M. e Guisan, J.M. (1991) *Biotechnol. Lett.* 13: 705-710
- López, R. e Fernández-Mayoralas, A. (1992) *Tetrahedron Lett.* 33: 5449-5452
- López, R. e Fernández-Mayoralas, A. (1994) *J. Org. Chem.* 59: 737-745
- Lugemwa, F.N., Sarkar, A.K. e Esko, J.D. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 19159-19165
- Mitchell, D. e Hardingham, T. (1982) *Biochem. J.* 202: 387-395
- Nakamura, T., Izumi, J., Takagaki, S., Kojima, K., Kato, K. e Endo, M. (1994) *Biochem. J.* 304: 731-736
- Nilsson, K.G.I. (1987) *Carbohydr. Res.* 167: 95-103
- Nilsson, K.G.I. (1988) *Carbohydr. Res.* 180: 53-59
- Okoyama, M., Kimata, K. e Suzuki, S. (1973) *J. Biochem.* 74: 1069-1073
- Poole, R.A. (1986) *Biochem. J.* 236: 1-14
- Sabersan, S., Duus, J.Ø., Fukunaga, T., Bolk., K. e Ludvigsen, S. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113: 3236-3246
- Schwartz, N.B. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 6316-6321
- Schwartz, N.B. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 2271-2277
- Shibata, S., Takagaki, K., Nakamura, T., Izumi, J., Kojima, K., Kato, I. e Endo, M. (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 13794-13798
- Takagaki, K., Nakamura, T., Kon, A., TamUra, S. e Endo, M. (1991) *J. Biochem.* 109: 514-519
- Takagaki, K., Nakamura, T., Shibata, S., Higuchi, T. e Endo, M. (1996) *J. Biochem.* 119: 697-702



# **CONCLUSIONI**

## Capitolo 10 Conclusioni

### 10.1 Risultati Raggiunti

L'obiettivo fondamentale di questa tesi, la sintesi transglicolitica di oligosaccaridi biologicamente attivi, è stato pienamente raggiunto.

Le implicazioni di questo risultato sono molto importanti. Da un punto di vista più fondamentale è stata dimostrata per la prima volta la fattibilità della sintesi total-transglicolitica di *oligosaccaridi ramificati*, come il Lewis<sup>x</sup> e il Sialil-Lewis<sup>x</sup>. D'altro lato, l'implicazione pratica di questo risultato è di una portata potenzialmente enorme nel campo delle biotecnologie. Infatti, le sintesi riportate, lungi da costituire una mera conferma della generica utilità delle reazioni di transglicosilazione, si pongono largamente come alternative valide ed economiche ai classici approcci di tipo chimico e/o di tipo enzimatico basato sull'uso delle glicosiltransferasi.

Risulta facilmente evidente come la grande variabilità strutturale e la versatilità funzionale dei carboidrati, unita all'efficacia delle glicosidasi coinvolte, porti con facilità a molti prodotti diversi, a partire da un numero limitato di reagenti. Ad esempio se si osserva la Fig. 10.1, dove viene riportata la via transglicolitica seguita per la sintesi degli antigeni Lewis<sup>x</sup> e Sialil-Lewis<sup>x</sup>, si nota come anche il trisaccaride 3'-sialil-*N*-acetillattosamina, che pur non essendo stato usato come intermedio nelle sintesi del Sialil-Lewis<sup>x</sup>, ma come "modello" per la verifica della efficacia della reazione di trans-sialilazione, rappresenti di per sé un oligosaccaride dotato di un suo autonomo rilevante significato biologico.

### 10.2 Prospettive di Sviluppo

L'importanza degli oligosaccaridi nei fenomeni biologici ha avuto una rilevanza così crescente, da far sorgere una nuova scienza, la *glicobiologia*. La *glico-biotecnologia* è una nuovissima tecnologia da essa derivata e ad essa collegata che consente la preparazione di composti, anche di concezione e struttura "non-naturale" (i *neoglicconiugati*), che trovano un ampio spettro applicativo che va dalla chimica fine alla clinica.

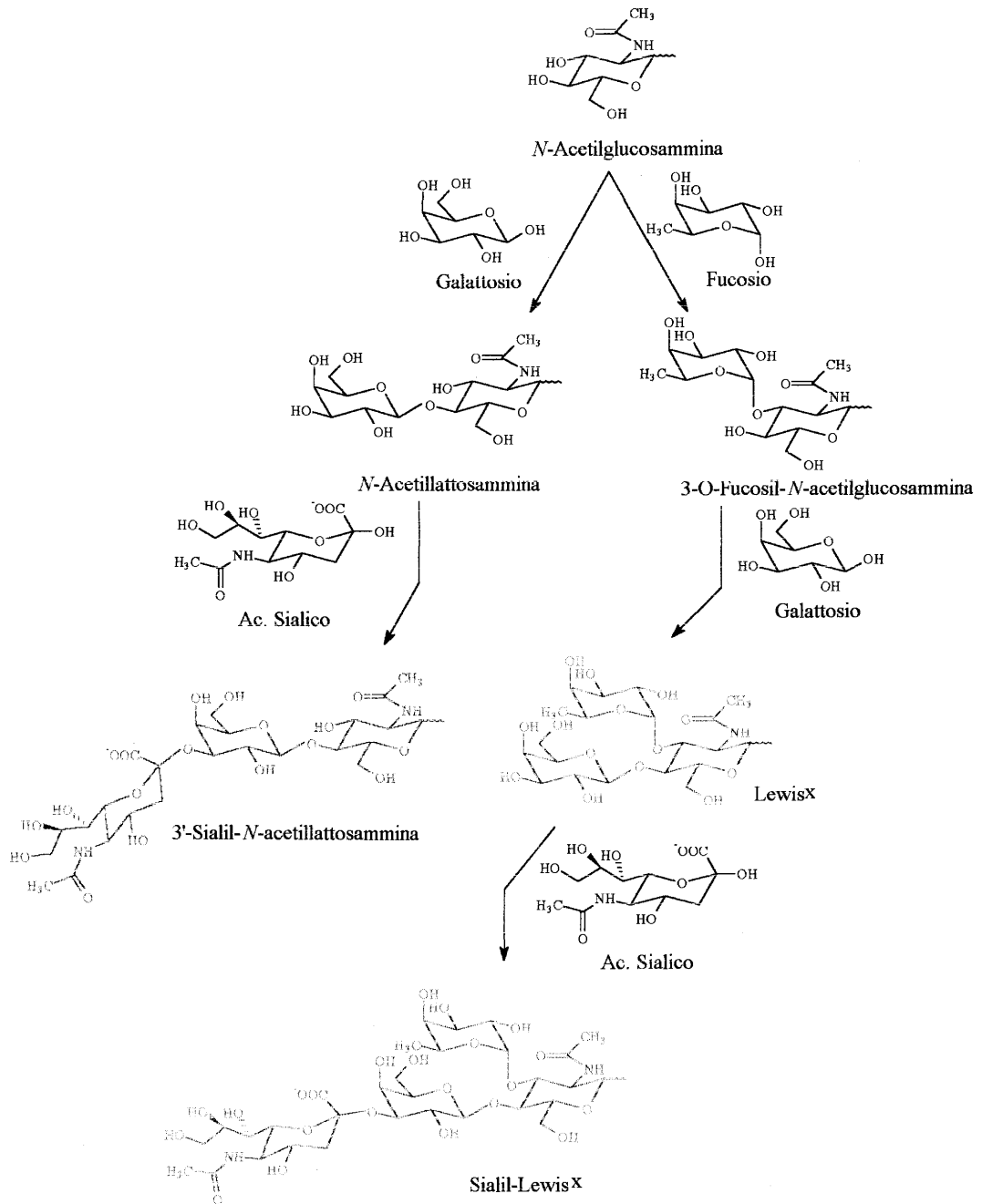


Fig. 10.1 Rappresentazione schematica del "pathway" delle reazioni di transglicosilazione descritte in questa tesi

In quest'ottica vanno considerate le sintesi descritte in questa tesi. In particolare, il fondamentale ruolo del Lewis<sup>x</sup> e quello del suo derivato sialilato, il Sialil-Lewis<sup>x</sup>, quali modulatori dell'interazione tra leucociti e cellule endoteliali durante i fenomeni infiammatori cronici e non, rendono questi oligosaccaridi particolarmente interessanti come mezzi terapeutici assolutamente naturali per la cura di diverse forme patologiche accompagnate da stati infiammatori cronici. L'utilizzo di molecole naturali, o ad esse strettamente correlate, impiegate nel controllo e nella modifica mirata di fenomeni fisio-patologici è la nuova sfida terapeutica del futuro.

Si possono individuare una serie di ambiti applicativi piuttosto interessanti per le reazioni di transglicosilazione. Tra i vari possiamo ricordare quello delle applicazioni nella "farmaceutica" e nel campo dei "biomateriali".

### "Farmaceutica":

E' oramai ben nota l'attività antineoplastica e antivirale di molti analoghi strutturali dei nucleotidi come ad esempio l'1- $\beta$ -D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), la 2'-deossi-5-fluorouridina o la 3'-azido-3'-deossitimidina (AZT). Il limite fondamentale al loro ampio utilizzo è la loro notevole citotossicità nei confronti delle cellule normali. Un incremento della loro specificità dovrebbe, sostanzialmente, aumentarne le potenzialità terapeutiche. Ad esempio la citotossicità potrebbe essere notevolmente ridotta, se non completamente abolita, mediante glicosilazione del farmaco. In questo modo una glicosidasi (specificatamente o preferenzialmente espressa dalle cellule neoplastiche e/o infettate) consentirebbe di rendere funzionalmente disponibile il farmaco in modo altamente specifico. E' ben noto, infatti, che in alcune cellule neoplastiche alcune attività glicosidasiche sono notevolmente incrementate (Bosmann, 1969; Bosmann e Bernacki, 1970; Whitehead et al., 1979; Whitehurst et al., 1982; Bernacki et al., 1985; Niedbala et al. 1987). Sulla base di notizie di questo tipo è possibile scegliere il tipo di glicosilazione più opportuna. Nonostante le notevoli potenzialità di questo tipo di approccio la glicosilazione chimica di queste molecole è ostacolata dalla ben nota scarsissima reattività dell'ossidrile 5' del pentofuranosio (Krepinsky et al., 1994). Di conseguenza l'unico approccio possibile è una glicosilazione enzimatica. Tra queste le transglicosilazioni potrebbero essere il metodo di elezione, in quanto le glicosidasi sono gli unici enzimi dotati dell'ampia specificità necessaria per poter agire su substrati così diversi tra di loro.

### "Biomateriali":

Le reazioni di transglicosilazione potrebbero essere utilizzate per la sintesi di precursori di natura vinilica, suscettibili di successiva polimerizzazione, recanti come sostituenti mono- od oligosaccaridi. Quali accettori possono essere presi in considerazione monomeri dell'alcol allilico, in cui sequenze di gruppi spaziatori possono opportunamente modulare la mobilità del sostituyente saccaridico rispetto alla catena principale vinilica inserita nel reticolo di ramificazione.

La sintesi di reticoli bioattivi di questo tipo consentirebbe di ottenere un effetto di "clusterizzazione" della componente mono- e/o oligosaccaridica biologicamente attiva. Infatti dal momento che l'interazione che si stabilisce tra l'oligosaccaride e la cellula e/o il tessuto è di tipo ligando/recettore, la possibilità di disporre in uno spazio ristretto (il reticolo) di un elevato numero di molecole bioattive (l'oligosaccaride) consentirebbe una notevole amplificazione dell'effetto biologico che altrimenti richiederebbe una concentrazione elevatissima di oligosaccaride libero. Esempi di "clusterizzazione" di questo tipo di oligosaccaridi sono già descritti in letteratura, tuttavia essi si basano o sull'uso di polimeri non biocompatibili come l'acrilammide (Kobayashi et al., 1992; Nishimura et al., 1992) o, nel caso di polimeri biocompatibili, venivano utilizzati mono- o disaccaridi che non avevano nessuna rilevante attività biologica (Patil et al., 1991; Martin et al., 1992; Chen et al., 1995). Più specificamente, in questi esempi non è mai stata presa in considerazione la possibilità di *ricoprire* un supporto *strutturale* (il biomateriale), immobilizzando su di esso le molecole bioattive.

### 10.3 Bibliografia

- Bernacki, R.J., Niedbala, M.J. e Korynyk, W. (1985) *Cancer Metast. Rev.* 4: 81-102
- Bosmann, H.B. e Bernacki, R.J. (1970) *Exp. Cell Res.* 61: 379-386
- Bosmann, H.B. (1969) *Exp. Cell Res.* 54: 217-221
- Chen, X., Martin, B.D., Neubauer, T.K., Linhardt, R.J., Dordick, J.S. e Rethwisch, D.G. (1995) *Carbohydr. Polym.* 28: 15-21
- Kobayashi, K., Akaike, T., e Usui, T. (1992) *Methods Enzymol.* 242: 226-235
- Krepinsky, J.J., Whitfield, D.M., Douglas, S.P., Lupescu, N., Pulleyblank, D. e Moolten, F.L. (1994) *Methods Enzymol.* 247: 144-153
- Martin, B.D., Ampofo, S.A., Linhardt, R.J. e Dordick, J.S. (1992) *Macromolecules* 25: 7081-7085
- Niedbala, M.J., Madiyalakan, R., Matta, K., Crickard, K., Sharma, M. e Bernacki, R.J. (1987) *Cancer Res.* 47: 4634-4661
- Nishimura, S.-I., Fukuike, T. e Matsuoka, K. (1992) *Methods Enzymol.* 242: 235-246
- Patil, D.R., Dordick, J.S. e Rethwisch, D.G. (1991) *Macromolecules* 24: 3462-3463
- Whitehead, J.S., Fearney, F.J. e Kim, Y.S. (1979) *Cancer Res.* 39: 1259-1263
- Whitehurst, G.B., Mashburn, J.P., Pretlow, T.G., Bradley, E.L. e Boohaker, E.A. (1982) *Cancer Res.* 42: 4300-4303

## Elenco delle Abbreviazioni Usate

Ara-C	Citosina $\beta$ -D-arabinofuranoside
ATP	Adenosintrifosfato
AZT	3'-Azido-3'-deossitimidina
BSA	Albumina di siero bovino
CGTasi	Ciclodestrina glucano-transferasi
CMP-NeuAc	Citosinmonofosfo acido <i>N</i> -acetilneuraminico
CRD	Dominio di Riconoscimento dei Carboidrati
CTP	Citosintrifosfato
dpm	Disintegrazioni al minuto
DVS	Divinilsulfone
E.C.	Enzyme Commission
FOS	Frutto-oligosaccaridi
Fru	Fruttofuranosio
Fuc	Fucopiranosio
Fuc $\alpha$ 1-2Gal	2-O- $\alpha$ -L-Fucopiranosil-Galattopiranosio
Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc	3-O- $\alpha$ -L-Fucopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Glucopiranosio
Fuc $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -L-Fucopiranoside
Fuc-6-P	Fucopiranosio-6-fosfato
Gal	Galattopiranosio
Gal $\alpha$ 1-3Gal	3-O- $\alpha$ -D-Galattopiranosil-Galattosio
Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$	3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -nitrofenil galattopiranosil-3-O- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$	3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi- $\alpha$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ 1-3GlcNAc	3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Glucopiranosio

Gal $\beta$ 1-3GlcNAc	3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi- $\beta$ -D-Glucopiranosio
Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ SEt	Tioetil 2-acetammido-2-deossi -3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Glucopiranoside
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ OBn	Benzil 3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Xilopiranoside
Gal $\beta$ 1-3Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil 3-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Xilopiranoside
Gal $\beta$ 1-4Glc	4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Glucopiranosio
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Glucopiranosio
Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil 4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Xilopiranoside
Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ Me	Metil 6-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil-Galattopiranosil-6-O- $\beta$ -Galattopiranoside
D-Gal $\beta$ 1-6GalNAc	6-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi- $\beta$ -D-Galattopiranosio
Gal $\beta$ 1-6GalNAc	6-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Galattopiranosio
Gal $\beta$ 1-6GalNAc $\beta$ OMe	Metil 2-acetammido-2-deossi -6-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ 1-6GlcNAc	6-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Glucopiranosio
Gal $\beta$ o-NO <sub>2</sub> Ph	<i>o</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ OMe	Metil- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal $\alpha$ OMe	Metil- $\alpha$ -D-Galattopiranoside
Gal $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -D-Galattopiranoside
Gal $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil- $\beta$ -D-Galattopiranoside
Gal-1-P	Galattopiranosil-1-fosfato



GalNAc	2-acetammido-2-deossi-D-Galattopiranosio
GalNAc $\alpha$ 1-3Gal	3-O- $\alpha$ -D-2-cetammido-2-deossi-Galattopiranosil-Galattosio
GDP-Fuc	Guanosindifosfo-L-Fucopiranoside
GDP-Man	Guanosindifosfo-D-Mannopiranoside
Glc $\alpha$ 1-5Fru	5-O- $\alpha$ -Glucopiranosil-Fruttofuranosio
Glc $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -D-Glucopiranoside
Glc $\beta$ OPh	Fenil- $\beta$ -D-Glucopiranoside
Glc-1-P	Glucopiranosil-1-fosfato
Glc-6-P	Glucopiranosio-6-fosfato
GlcN-6-P	2-ammino-2-deossi-D-Glucopiranosio-6-fosfato
GlcNAc	2-acetammido-2-deossi-D-Glucopiranosio
GlcNAc $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil-2-acetammido-2-deossi- $\beta$ -D-Glucopiranoside
-	
GlcNAc $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil-2-acetammido-2-deossi- $\alpha$ -D-Glucopiranoside
GlcNAc $\beta$ SEt	Tioetil-2-acetammido-2-deossi- $\beta$ -D-Glucopiranoside
GlcNAc-1-P	2-acetammido-2-deossi-D-Glucopiranosil-1-fosfato
GlcNAc-6-P	2-acetammido-2-deossi-D-Glucopiranosio-6-fosfato
GOD	Glucosio ossidasi
HPLC	Cromatografia liquida ad alta risoluzione
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalattopiranoside
LB	Luria-Bertani
LCO	Lipo-chito-oligosaccaridi
Le <sup>a</sup>	Lewis <sup>a</sup>
Le <sup>b</sup>	Lewis <sup>b</sup>
Le <sup>x</sup>	Lewis <sup>x</sup>
Le <sup>y</sup>	Lewis <sup>y</sup>
LNT	Latto-N-tetraoso
Man-1-P	Mannopiranosil-1-fosfato

Man-6-P	Mannopiranosio-6-fosfato
ManAc-6-P	2-acetammido-2-deossi-D-Mannopiranosio-6-fosfato
ManNAc	2-acetammido-2-deossi-D-Mannopiranosio
MeEtOH	Mercaptoetanolo
mU	4-Metilumbelliferone
NAcAlloLac	<i>N</i> -acetilAllolattosammina
NAcLac	<i>N</i> -acetillattosammina
NDP	Nucleoside difosfato
NeuAc	Acido <i>N</i> -acetil-Neuramminico
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	3-O- $\alpha$ -D-Neuramminil-4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil-2-acetammido-2-deossi-Glucopiranosio
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil 3-O- $\alpha$ -D-Neuramminil-4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Xilopiranoside
NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4Xyl-mU	4-Metilumbelliferil 3-O- $\alpha$ -D-Neuramminil-4-O- $\beta$ -D-Galattopiranosil- $\beta$ -D-Xilopiranoside
NeuAc $\alpha$ Op-NO <sub>2</sub> Ph	2-O-( <i>p</i> -nitrofenil) acido <i>N</i> -acetil-Neuramminico
NeuAc-9-P	Acido <i>N</i> -acetil-Neuraminico-9-fosfato
NeuAc-mU	2'-(4-metilumbelliferil) acido <i>N</i> -acetil-Neuramminico
NF	Fattori Nod
NMP	Nucleosidemonofosfato
<sup>13</sup> C-NMR	Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare del carbonio
<sup>1</sup> H-NMR	Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare del protone
NTP	Nucleoside trifostato
<i>o</i> -NO <sub>2</sub> Ph	<i>o</i> -Nitrofenolo
<i>p</i> -NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenolo
PBS	Tampone fosfato salino
PEG	Polietilenglicole
PEP	Fosfoenolpurivato

PMP	3-Metil-1-fenil-5-pirazolone
POD	Perossidasi
PPi	Pirofosfato
rpm	Rotazioni al minuti
SDS	Sodio dodecilsolfato
3'-SL	3'-Sialil-Lattosio
SLe <sup>x</sup>	Sialil-Lewis <sup>x</sup>
3'-SLN	3'-Sialil- <i>N</i> -acetillattosammina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiammina
TLC	Cromatografia su strato sottile
TRIS	Tris(idrossimetil)amminometano
UDP	Uridindifosfato
UDP-Gal	Uridindifosfo-D-Galattopiranoside
UDP-GalNAc	Uridindifosfo-2-acetammido-2-deossi-D-Galattopiranoside
UDP-Glc	Uridindifosfo-D-Glucopiranoside
UDP-GlcNAc	Uridindifosfo-2-acetammido-2-deossi-D-Glucopiranoside
UDP-GlcUA	Uridindifosfo-D-Glucopiranoside
UDP-Xyl	Uridindifosfo-D-Xilopiranoside
UTP	Uridintrifosfato
XylβOBn	Benzil-β-D-Xilopiranoside
XylβOp-NO <sub>2</sub> Ph	<i>p</i> -Nitrofenil-β-D-Xilopiranoside
Xyl-mU	4-Metilumbelliferil-β-D-Xilopiranoside

## Elenco delle Pubblicazioni Relative al Dottorato

Vetere A. and Paoletti S.

High-yield synthesis of *N*-acetylactosamine by regioselective transglycosylation.

(1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219: 6-13

Vetere A. and Paoletti S.

Complete synthesis of 3'-sialyl-*N*-acetylactosamine by regioselective transglycosylation.

(1996) *FEBS Letters* 399: 203-206

Vetere A., Galateo C. and Paoletti S.

All-aqueous, regiospecific transglycosylation synthesis of 3-O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, a building block for the synthesis of branched oligosaccharides.

(1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 234: 358-361.

Vetere A., Ferro S., Bosco M., Cescutti P. and Paoletti S.

All-transglycolytic synthesis and characterization of sialyl $\alpha$ 2-3galactosyl $\beta$ 1-4xylosyl $\beta$ 1-(*p*-nitrophenyl), an oligosaccharide derivative related to the glycosaminoglycans biosynthesis.

(1997) *Eur. J. Biochem.* 247: 1083-1090.

Vetere A. and Paoletti S.

Separation and characterization of three  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*.

(1997) *Biochim. Biophys. Acta* (In corso di stampa)

Vetere A., Bosco M. and Paoletti S.

Enzymatic synthesis and characterization of 6-O- $\beta$ -xylopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, a structural analog of promeverose, a biologically relevant disaccharide.

(1998) *Carbohydr. Res.* (inviato)

## Elenco delle Comunicazioni a Congressi Relative al Dottorato

Vetere A. and Paoletti S.

"Purification and characterization of three isoforms of  $\beta$ -galactosidases from *Bacillus circulans*".

40° Congresso Nazionale Società Italiana di Biochimica, Torino, 12-15 Settembre 1995

Vetere A. and Paoletti S.

"High-yield synthesis of *N*-acetylglucosamine by highly regioselective transglycosylation".

40° Congresso Nazionale Società Italiana di Biochimica, Torino, 12-15 Settembre 1995

Vetere A., Cescutti P., Bosco M. and Paoletti S.

Complete synthesis of 3'-sialyl-*N*-acetylglucosamine by regioselective transglycosylation reactions.

XVIII International Carbohydrate Symposium, Milano, 21-26 Luglio 1996

Vetere A. and Paoletti S.

A novel biotechnological approach for the synthesis of biologically important oligosaccharides.

New Trends in Biotechnology '97. Science and Education, Capri, Maggio 26-28 1997

Vetere A., Ferro S., Bosco M., Cescutti P. and Paoletti S.

All-transglycolytic synthesis and characterization of sialyl $\alpha$ 2-3galactosyl $\beta$ 1-4xylosyl $\beta$ 1-(*p*-nitrophenyl), an oligosaccharide derivative related to the glycosaminoglycans biosynthesis.

9th European Carbohydrate Symposium, Utrecht, The Netherlands, Luglio 6-11 1997

Vetere A. and Paoletti S

All-transglycolytic synthesis of branched oligosaccharides belonging to the blood group determinants.

8th Bratislava Symposium on Saccharides, Smolenice, Slovakia, Settembre 1-5 1997

## Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti i membri del Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole per il loro prezioso aiuto "materiale" e "morale". Vorrei rivolgere un ringraziamento particolare al Prof. F. Vittur, al Prof. B. de Bernard e alla Prof.ssa G. Sandri i quali, in veste di Coordinatore, il primo e di "Referres", i secondi, sono sempre stati attenti ed efficaci critici del lavoro svolto.

Alla Prof.ssa G. Sandri va un affettuoso ringraziamento per l'abnegazione che ha sempre mostrato per risolvere i problemi che spesso mi hanno accompagnato durante questi quattro anni.

Un debito di riconoscenza va al servizio NMR della POLY-tech S.C.R.L. ed in particolare al Dott. Marco Bosco il quale non solo ha fatto il possibile ma, spesso, anche l'impossibile per la parte NMR del mio lavoro di tesi.

Un ringraziamento dovuto e sentito va al Centro Grandi Strumenti dell'Università degli Studi di Trieste per l'utilizzo dello spettrometro di massa ionspray API-I PE SCIEX ed in particolare alla Dott.ssa P. Cescutti per il suo prezioso e competente supporto scientifico nell'analisi ed interpretazione degli spetti di massa.

Un grazie va anche a tutti gli amici e colleghi vecchi e nuovi del Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole (Milena, Marianna, Sandra, Paola, Federica, Fabiana, Ilaria, ecc. ecc.) per il loro sostegno e la pazienza che hanno sempre mostrato nei miei confronti.

Infine, ma non ultimo, un grazie di cuore va al mio tutore (o giustamente maestro come io ed altri hanno cominciato a definirlo), il Prof. S. Paoletti senza la cui assoluta fiducia e senza il cui appoggio questo lavoro non sarebbe stato possibile.