

Lezione 13

Carboidrati ed enzimi correlati

I carboidrati sono metaboliti primari molto importanti. I carboidrati possono essere definiti chimicamente come *poliidrossialdeidi* o *poliidrossichetoni*. Sono composti che contengono principalmente C, H ed O, ma possono contenere anche atomi di N e S in sostituzione dell'O. Hanno tutti un gruppo carbonilico C=O e gruppi ossidrilici OH.

Aldeidi e chetoni subiscono attacco nucleofilo da parte degli alcoli, quindi i carboidrati possono fare reazioni intramolecolari. La reazione intramolecolare tipica è la formazione dell'emiacetale ciclico, che fa sì che i monosaccaridi non si trovino generalmente in forma lineare, ma in forme cicliche di furanoside e piranoside. La forma emiacetale è fondamentale per i monosaccaridi, perché permette di sfruttare la funzione emiacetale per convertirla in funzione acetale attraverso reazione di condensazione intermolecolare, portando alla formazione di polimeri, i polisaccaridi.

I carboidrati sono i composti organici più importanti sul pianeta, in forma di cellulosa, polimero del glucosio.

I carboidrati complessi sono polisaccaridi con varie funzioni, tra cui la funzione energetica e strutturale. Ci sono poi i glicoconjugati, in forma di glicoproteine e glicolipidi, in cui la parte saccaridica è coniugata ad un accettore, che può essere proteine o lipidi.

Gli amminoacidi normalmente glicosidati sono *serina* e *treonina*, che danno luogo alle proteine O-linked, e residui di *asparagina*, che danno luogo a proteine N-linked, in cui l'azoto ammidico della catena laterale dell'asparagina è glicosidato con una catena saccaridica. Le glicoproteine N-linked sono difficili da ottenere per via chimica, perché l'azoto ammidico della catena laterale dell'asparagina non è un buon nucleofilo, perché il suo doppietto elettronico è impegnato nella risonanza con il carbonile adiacente. A causa di questo l'N non può dare attacco nucleofilo sulla funzione emiacetale dell'unità da glicosidare. Il carbonio emiacetale che deriva dal carbonio carbonilico è un carbonio elettronpovero, quindi la sua elettronegatività sarà complementare ad un elemento elettronricco.

In vivo ci sono enzimi che effettuano la glicosilazione dell'N ammidico dell'asparagina, che è una reazione difficile da eseguire per mezzi chimici. Le glicoproteine sono abbondanti.

I carboidrati vengono suddivisi in base al numero di unità monosaccaridiche di cui sono composti.

- Monosaccaridi: 1 unità
- Disaccaridi: 2 unità
- Oligosaccaridi: da 3 a 10 unità
- Polisaccaridi: >10 unità

I polimeri a base di carboidrati garantiscono una ampia varietà strutturale, nettamente superiore a quanto può essere ottenuto da aminoacidi o nucleotidi. Una ampia varietà strutturale indica anche una ampia variabilità biologica. La variabilità è data dalla presenza del carbonio anomerico, che può portare alla formazione di stereoisomeri diversi (isomeri α e β).

Questa variabilità porta a 120 strutture diverse usando 3 unità di un singolo monomero. Se si usano invece 3 unità di monomeri differenti, possiamo ottenere 720 strutture diverse.

I monosaccaridi particolarmente abbondanti nell'organismo umano sono 9.

La glicosilazione delle proteine è quindi la modifica post-traduzionale che dona maggior variabilità biologica nella struttura proteica. La disciplina che abbina la genomica e la proteomica allo studio della variabilità nella glicosilazione è la **glicomica**.

La difficoltà nello studio delle modifiche post-traduzionali è alta, ma queste modificazioni sono di grande importanza nella medicina personalizzata.

Nei nucleotidi la presenza di carboidrati è fondamentale, dato che per definizione sono costituiti da uno zucchero, una base azotata ed un gruppo fosfato. Si pensa che inizialmente il codice genetico primordiale fosse a base di carboidrati, e che i nucleotidi siano una evoluzione di questi. L'eccessiva variabilità strutturale potrebbe essere stata poco efficiente nel mantenere inalterata l'informazione.

I monosaccaridi possono essere classificati in funzione della posizione del gruppo carbonilico. Gli aldosi hanno un gruppo carbonilico aldeidico, i chetosi avranno un gruppo carbonilico chetonico, spesso sul carbonio 2.

Possono anche essere classificati in base al numero di atomi di carbonio nella catena. Si hanno quindi esosi, a 6 atomi di C, pentosi a 5 atomi di C e così via.

I carboidrati possono essere classificati anche in base alla configurazione degli stereocentri, secondo la classificazione di Fischer D e L. La maggior parte dei monosaccaridi sono della serie D. Tra i 9 monosaccaridi rilevanti per l'uomo, c'è il fucosio che fa parte della serie sterica L. Altri sono della serie sterica D.

Il numero di atomi di carbonio dei monosaccaridi è variabile da un minimo di 3 (gliceraldeide e diidrossi acetone) a 9 atomi di C, come l'acido neuramminico o sialico, glicoconjugato che si trova nella parte finale di oligosaccaridi che fanno parte di glicoproteine e glicolipidi. Oppure il KDO, ad 8 atomi di C, che è presente nella parete batterica. Questi ultimi sono poli-idrossichetoni che hanno un gruppo carbossilico sul C1.

Nomenclatura e stereochimica nei carboidrati

Il descrittore D o L fa sempre riferimento allo stereocentro più lontano rispetto alla funzione carbonilica del carboidrato con più di 3 atomi di C.

Nei tetrosi, il prefisso eritro- in eritrosio ci dice che i gruppi ossidrilici del carboidrato stanno dalla stessa parte, mentre il prefisso treo- ci dice che stanno su lati opposti della molecola.

Ogni stereoisomero ha un nome differente, che cambia a seconda della stereochimica (ribo-, gluco-, manno-), e dal suffisso -osio che è caratteristico degli aldosi.

Il mannosio è un epimero in posizione 2 del glucosio. Per epimero si intende una struttura che varia solo in uno stereocentro.

È bene ricordare la struttura del D-ribosio e del D-glucosio. La struttura del glucosio in proiezione di Fischer si può ricordare nel seguente modo:

se è D, l'ultimo ossidrile è sulla destra. Quello prima è dallo stesso lato (Same), quello prima ancora è sul lato opposto (Opposite), e quello prima ancora è di nuovo dallo stesso lato (Same). Partendo dall'ultimo ossidrile OH che è a destra nel D glucosio, si può risalire alla forma degli altri la sigla S-O-S, di same-opposite-same.

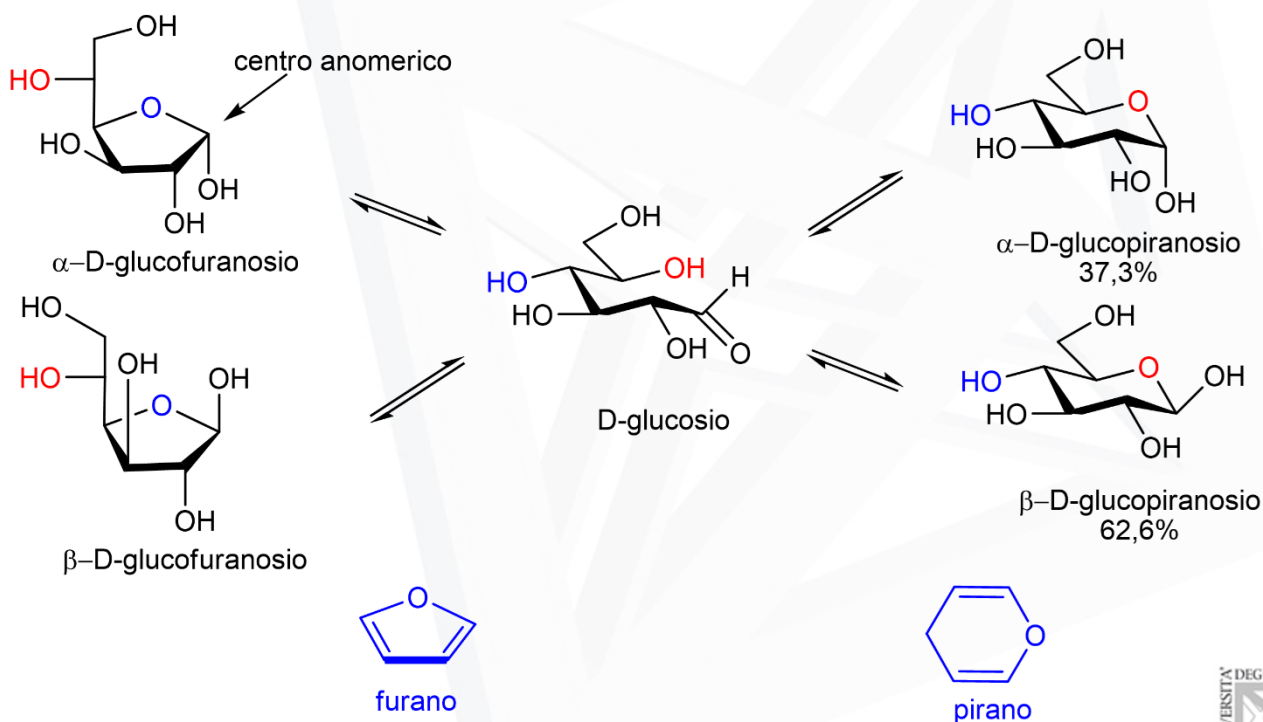
Il mannosio è l'epimero in posizione 2 del D-glucosio, quindi basta invertire i gruppi sul C2 per ottenere il glucosio.

Il galattosio è l'epimero in posizione 4 del glucosio.

Il ribosio ha tutti gli ossidrili dallo stesso lato. Ha 5 carboni.

Furanosi e Piranos

I carboidrati hanno normalmente una conformazione ciclica data da una reazione intramolecolare, tra la funzione carbonilica ed una delle funzioni ossidriliche, che porta alla formazione di un emiacetale, in modo da formare cicli a 6 centri o a 5 centri, di cui uno è l'ossigeno. I cicli a 6 atomi prendono il nome di piranos, e non sono aromatici. I cicli a 5 atomi prendono il nome di furanos e sono aromatici.



Nel caso del glucosio in soluzione sono in genere presenti tutte e quattro le strutture, con una preponderanza del ciclo a 6 centri a configurazione β nel carbonio anomero. I fattori che entrano in gioco nel definire la configurazione più stabile in soluzione dipendono dalla stereochimica degli ossidril presenti sulla struttura, che indirizzano la formazione del ciclo verso il più stabile, cioè quello che garantisce la minore interazione sterica tra i vari ossidril oppure maggiore interazione di legame idrogeno intramolecolare tra gli ossidril.

Il ribosio principalmente ciclizza con un anello furanosidico, ma sono note strutture in cui il ribosio ha un anello piranosidico, ad esempio nei polimeri vegetali.

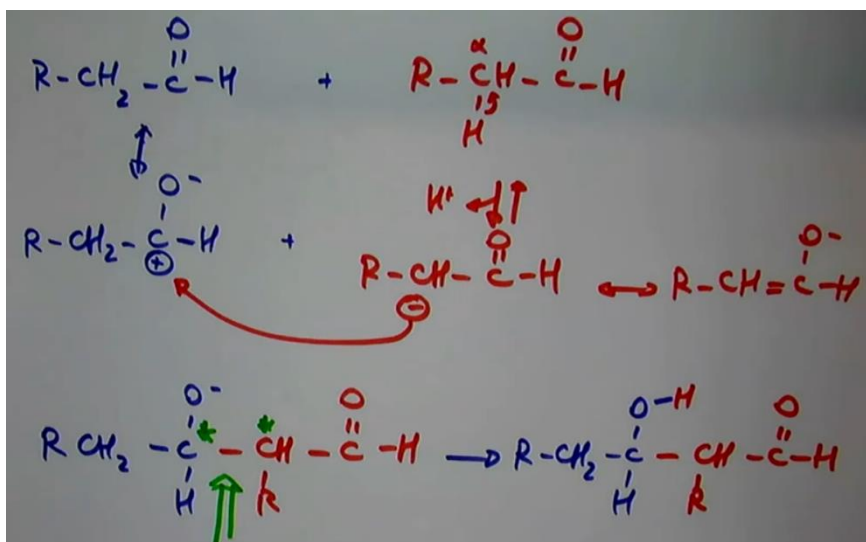
Aldolasi

Le aldolasi catalizzano la reazione di condensazione aldolica, quindi la formazione di legami C-C, oppure la reazione retro-aldolica, che è la rottura di legami C-C.

Per condensazione si intende la formazione di un legame C-C.

La condensazione aldolica prevede la condensazione di due aldeidi o due chetoni. Una molecola di aldeide agisce da elettrofilo, sfruttando la risonanza del gruppo carbonilico. L'altra molecola di aldeide sfrutta un equilibrio acido-base derivante dal fatto che i protoni sul C in α hanno caratteristiche acide perché la base coniugata che si forma è stabilizzata per risonanza, rilasciando un protone dal C più prossimo al C carbonilico. Le due molecole avranno quindi reattività complementare, in quanto una si trova ad avere un carbonio elettronpovero e l'altra un carbonio elettronricco.

Queste due molecole reagiscono tra loro dando un prodotto di condensazione. Il prodotto di condensazione non è stabile perché porta una carica negativa sull'O, che viene stabilizzata dall'acquisizione di un protone dalla soluzione (il protone precedentemente rimosso). Si forma così un prodotto di condensazione stabile.



Questo prodotto appena formato non ha solo un nuovo legame C-C, ma ha anche 2 stereocentri. Se questa reazione procede per via chimica si ha la possibilità di avere 4 stereoisomeri diversi.

Le aldolasi possono quindi essere di grande aiuto nell'industria, perché la loro stereoselettività permette di effettuare la condensazione aldolica producendo uno solo dei 4 possibili stereoisomeri.

Le aldolasi finora ottenute non sono riuscite ad arrivare ad un livello di utilizzo industriale importante, perché la reazione che catalizzano è una reazione di equilibrio, in cui non si è ancora riusciti a spostare l'equilibrio verso i prodotti.

Caratteristiche

Le aldolasi sono enzimi ubiquitari, coinvolti nel metabolismo dei carboidrati, appartenenti al gruppo delle liasi, enzimi che catalizzano la lisi del legame C-C. In condizioni opportune è possibile spostare l'equilibrio verso la formazione del legame C-C.

Questi enzimi hanno il vantaggio di catalizzare la reazione di addizione aldolica in maniera altamente stereoselettiva. La reazione è catalizzata in maniera reversibile.

Il nucleofilo dona elettroni, ed è detto *donatore*. L'elettrofilo che riceve elettroni è detto *accettore*. Nella reazione di condensazione aldolica catalizzata dall'aldolasi, accettore e donatore sono molecole diverse; l'enzima favorisce quindi la formazione dell'accettore su una molecola, e la formazione del donatore su un'altra molecola. In questo modo l'enzima indirizza la reattività delle molecole. Se la reazione fosse fatta con mezzi chimici, dato che la reattività dei substrati di partenza è identica, non si potrebbe fare in modo che una delle due molecole agisca esclusivamente da donatore, e l'altra esclusivamente da accettore. L'enzima svolge quindi una chemoselezione, data dal disporsi delle due molecole nel sito catalitico.

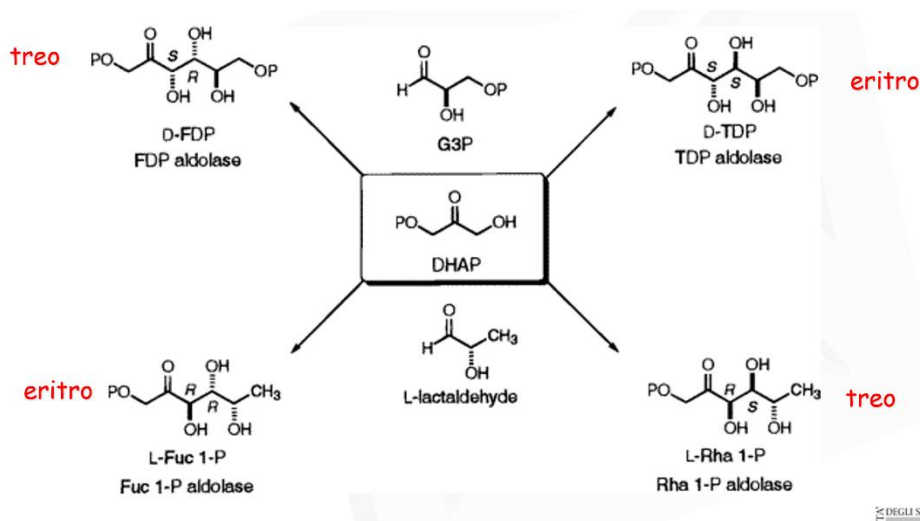
Dal punto di vista del meccanismo di reazione, le aldolasi sono distinte in:

- Tipo I
Utilizzano una base di Schiff, in un meccanismo in cui è necessaria una lisina catalitica che forma un intermedio covalente col substrato.
- Tipo II
Utilizzano come cofattore uno ione metallico come lo Zn^{2+} .

Le aldolasi di tipo I sono tipiche degli organismi superiori, mentre le aldolasi di tipo II sono tipiche degli organismi inferiori.

Le aldolasi possono anche essere classificate in base al tipo di donatore che utilizzano.

Partendo da una molecola come donatore (DHAP: diidrossiacetone fosfato) ed utilizzando accettori diversi (G3P oppure L-lactaldeide) si vede che cambiando l'aldolasi si possono ottenere dei prodotti con stereochimica diversa.



Glicosidasi

Le glicosidasi sono enzimi che idrolizzano legami glicosidici *in vivo*. La sintesi dei legami glicosidici è catalizzata dalle **glicosiltransferasi**.

Le glicosil transferasi hanno ancora scarso interesse industriale perché sono enzimi poco abbondanti, difficili da reperire, instabili e molto specifici.

Le glicosidasi sono interessanti perché, nonostante *in vivo* abbiano la funzione di idrolizzare legami glicosidici, sono state ottenute, attraverso tecniche di ingegneria genetica, glicosidasi in grado di sintetizzare legame glicosidici per la produzione di oligosaccaridi. Le glicosidasi sono meno selettive delle glicosiltransferasi e facilmente reperibili e purificabili. Resta il problema che la loro resa nella glicosidazione *ex vivo* è bassa.

Gli oligosaccaridi hanno svariati utilizzi, dei quali uno di rilievo è la loro aggiunta al latte artificiale. Il latte materno contiene centinaia di oligosaccaridi diversi (oltre 900), che risultano utili a favorire lo sviluppo di una sana e variegata flora intestinale nel neonato. Il problema è la difficoltà nella sintesi chimica degli oligosaccaridi, per questo la biocatalisi è molto ricercata al livello industriale.

Meccanismo di reazione

Le glicosidasi vengono classificate in base al meccanismo di reazione con cui lavorano. Le glicosidasi vengono classificate in glicosidasi che lavorano con inversione di configurazione (***inverting glycosidasi***), e glicosidasi che lavorano con ritenzione di configurazione (***retaining glycosidase***). La ritenzione o inversione di configurazione si riferisce alla stereochimica sul carbonio anomero che porta il legame glicosidico che viene idrolizzato.

Indipendentemente dalla stereochimica con cui lavorano le glicosidasi, questi enzimi presentano 2 amminoacidi conservati nel sito attivo, che sono due gruppi carbossilici, di cui uno in forma acida ed uno in forma basica (carbossilato).

Ciò che cambia tra le glicosidasi per inversione e quelle che ritengono la configurazione è la dimensione del sito attivo, che è doppio nelle *inverting glycosidase* rispetto alle *retaining glycosidase*.

Nelle glicosidasi che lavorano per ritenzione si forma un intermedio covalente tra il substrato ed il residuo basico presente nel sito attivo enzimatico.

Inverting glycosidase

Le *inverting glycosidase* prevedono che il carbonio anomero che porta il legame glicosidico alla fine della reazione porti ad un prodotto che abbia inversione di configurazione. Quindi se il nostro enzima è una β -glicosidasi che lavora con inversione di configurazione, il prodotto che si otterrà avrà configurazione α sul carbonio anomero. L'inversione di configurazione su uno stereocentro viene garantita da reazioni di sostituzione nucleofila bimolecolare SN_2 , dove l'attacco nucleofilo avviene dalla parte opposta all'uscita del gruppo uscente. La reazione SN_2 è una reazione stereospecifica perché si ha un vincolo meccanicistico che garantisce l'andamento stereochimico, e quindi l'inversione di configurazione.

Retaining glycosidase

Le glicosidasi che operano con ritenzione di configurazione porteranno ad un prodotto che mantiene la stereochimica al centro anomero dell'intermedio di partenza. La reazione SN_1 manca di specificità, quindi non ci si può basare su questo tipo di sostituzione perché darebbe luogo ad un racemo. Questo problema è stato risolto dalla natura facendo 2 reazioni SN_2 , in modo da effettuare una doppia inversione, che porta il prodotto ad avere la configurazione di partenza del primo substrato.

Meccanismo di reazione

Inverting glycosylase

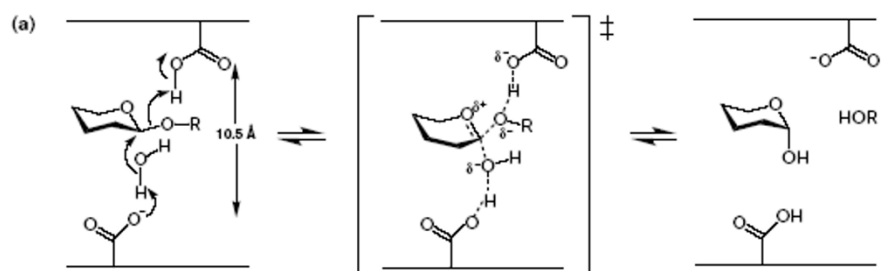
Nelle glicosidasi che lavorano per inversione di configurazione il sito catalitico è grande rispetto a quello delle glicosidasi che lavorano per ritenzione, perché la reazione che prevede inversione procede attraverso un meccanismo SN_2 che deve essere concertato. Ciò significa che si ha la conversione del gruppo uscente in forma protonata da parte del gruppo carbossilico acido (perché l'alcolato è un cattivo gruppo uscente e quindi viene convertito in alcol), e contemporaneamente il residuo basico che si trova dalla parte opposta attiva l' H_2O , che viene reso un ottimo nucleofilo, che è lo ione carbossilato.

Il sito catalitico deve essere sufficientemente grande da permettere un meccanismo concertato, che consiste nell'ingresso del substrato con contemporanea protonazione, ed una molecola di acqua che va resa nucleofila. Motivi questi per cui la distanza tra i due gruppi carbossilico e carbossilato nel sito catalitico è di 10.5 Angstrom, perché contemporaneamente entrano sia il substrato che deve essere idrolizzato che la molecola di H_2O che deve agire da nucleofilo.

Dopo la protonazione del gruppo uscente e l'attivazione dell'acqua, si ha la formazione di uno stato di transizione, in cui si ha una parziale rottura del legame O-H del gruppo carbossilico, una parziale formazione del legame O-N, una parziale rottura del legame O-C anomero, parziale formazione del legame tra C-anomerico - O di H_2O , che incomincia rompere il legame con l'idrogeno, con parziale formazione del legame tra ione carbossilato ed H di H_2O .

Lo stato di transizione evolve nei prodotti di reazione in cui il nucleofilo H_2O è attaccato dalla parte opposta rispetto al gruppo uscente. Si ha l'uscita del gruppo uscente e lo spostamento del gruppo acido e basico in funzione del trasferimento di protoni. Vengono eliminati i prodotti e si ha nuovo trasferimento di protoni tra i due gruppi, in modo che venga ripristinata la coppia di residui catalitici.

INVERTING
GLYCOSIDASES



Nell'immagine sopra si ha una reazione da parte di una β -glicosidasi. Se fosse stata una reazione catalizzata da una α -glicosidasi sarebbe stato uguale, solo con partenza da un substrato con legame α -glicosidico e posizionamento dei due residui carbossilici ordinati in maniera opposta, perché l' H_2O entrerà dalla parte opposta per dare attacco in posizione β .

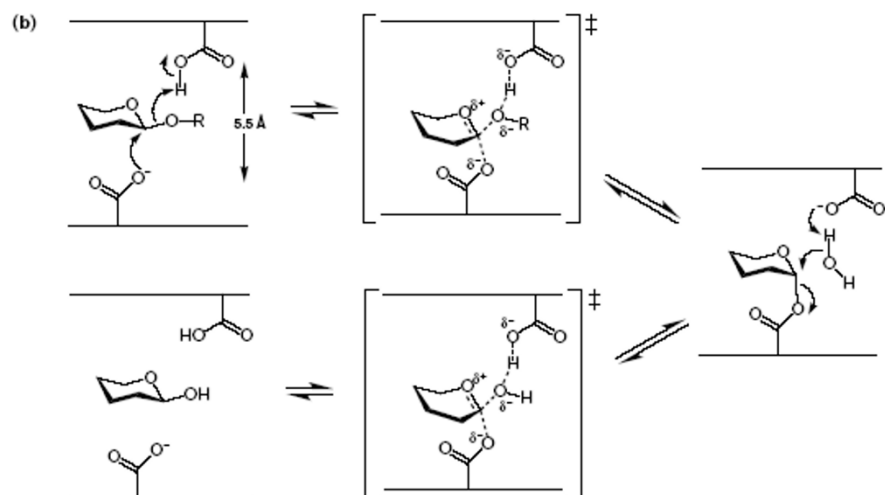
Retaining glycosylase

Le glicosidasi che lavorano con ritenzione di configurazione catalizzano la reazione effettuando due reazioni SN_2 , si otterranno quindi due stati di transizione. Nel primo meccanismo SN_2 il nucleofilo non sarà l'acqua, ma sarà il residuo basico di carbossilato. Il carbossilato deve dare attacco diretto al carbonio anomero, per cui deve trovarsi vicino a quest'ultimo. Per questo la dimensione della tasca è ridotta, e la distanza tra i due residui catalitici è di soli 5,5 Angstrom, e deve esserci la possibilità di garantire il legame covalente tra il carbossilato l'enzima ed il substrato.

All'ingresso del substrato nel sito catalitico il gruppo uscente sullo stereocentro viene protonato dal gruppo carbossilico del residuo acido e contemporaneamente, secondo un meccanismo SN_2 il carbossilato attacca sul carbonio anomero. Si ha quindi lo stato di transizione con rottura e formazione di nuovi legami per arrivare all'intermedio enzima-substrato con inversione di configurazione del substrato e legame covalente del substrato con il residuo carbossilato.

Essendo uscito il gruppo uscente in forma di alcol può entrare l'acqua. L'acqua viene attivata dal residuo basico come nucleofilo. L'O attaccherà il substrato con meccanismo SN_2 e si avrà lo stato di transizione con parziale rottura e formazione dei legami. Infine si avrà l'attacco dell'acqua dalla parte opposta al gruppo uscente, che è il carbossilato. Questa seconda inversione dello stereocentro lo riporta alla configurazione iniziale.

RETAINING
GLYCOSIDASES



Transglicosilazione con le glicosidasi

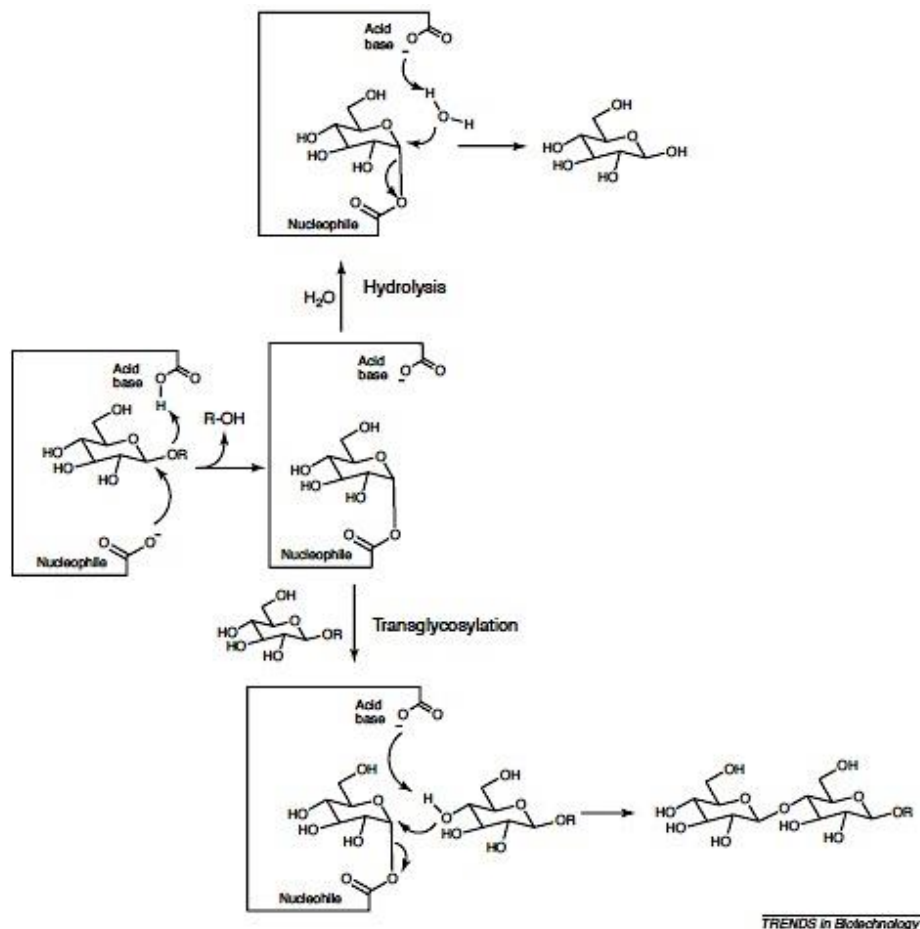
Consiste nell'usare le glicosidasi per effettuare reazione di formazione del legame glicosidico, invece dell'idrolisi finora descritta.

In vivo la reazione di idrolisi prevede un attacco nucleofilo di una molecola d'acqua. *Ex vivo* si può sostituire l'acqua con un nuovo nucleofilo, secondo lo stesso principio di lipasi e fosfolipasi nel processo di transesterificazione.

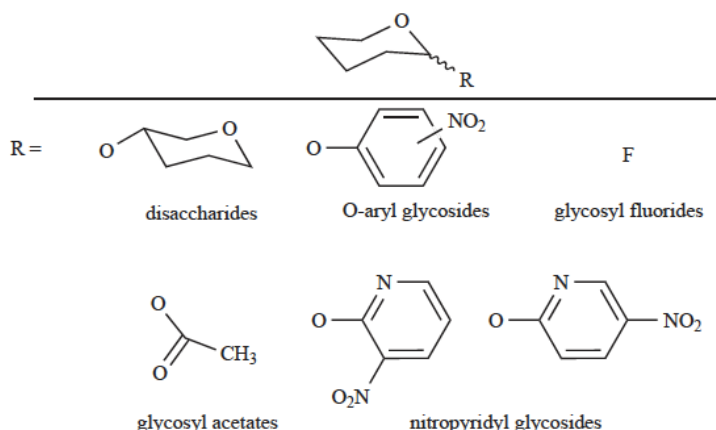
A questo scopo è più utile usare le glicosidasi che formano un intermedio covalentemente legato all'enzima, quali le glicosidasi con ritenzione di configurazione, perché si ha uno stato intermedio in cui il substrato si trova ad essere attivato e legato all'enzima. Non si inserisce H_2O , ma un nucleofilo quale un alcol o uno zucchero, ad esempio un monosaccaride.

La base carbossilato del sito attivo attiverà l'OH nella posizione adeguata affinché si abbia l'attacco nucleofilo sull'intermedio covalente enzima-substrato.

La reazione sarà stereoselettiva e regioselettiva.



Lo zucchero di partenza che viene utilizzato dalle glicosidasi per le reazioni di transglicosidazione, sul carbonio anomero ha talvolta dei derivati particolari. In alcuni casi l'O-R è un altro monosaccaride, quindi la molecola sarà un disaccaride; altre volte sul gruppo R vengono messi degli alcol, che sono ottimi gruppi uscenti, che non rientrano più in reazione, o glicosidi con un gruppo nitro NO₂ sull'anello. Il gruppo nitro è un elettrone attrattore, quindi il gruppo uscente non è più un buon nucleofilo. I glicosil fluoruri sono validi perché accettati dalle glicosidasi; in questi gruppi il fluoruro esce e non è più un buon nucleofilo per rientrare.



Glicosintasi – le glicosidasi che sintetizzano

Va rimossa l'acqua per effettuare la reazione di transglicosilazione, ed a questo punto il problema è se l'enzima è stabile in solvente organico. I carboidrati sono inoltre molecole idrofile, che non si sciolgono in solvente organico.

Tra i gruppi R sono abbastanza usati i glicosil fluoruri, perché il F è un ottimo gruppo uscente che non rientra come nucleofilo.

Immaginiamo di lavorare con una β -glicosidasi che lavora con ritenzione di conformazione, e di usare come substrato un glicosil fluoruro in cui il legame tra monosaccaride e fluoruro è di tipo β .

Il gruppo uscente sullo stereocentro del substrato viene protonato ed attivato, il carbossilato dell'enzima attacca il carbonio anomero e si forma l'intermedio covalentemente legato tra substrato-enzima. A questo punto se c'è acqua questa viene attivata e si ha la reazione di idrolisi dell'intermedio substrato enzima. Se il solvente è un alcol, questo viene attivato dall'enzima e l'O dell'alcol attivato da attacco nucleofilo sull'intermedio enzima substrato, esce il carbossilato dallo stereocentro e si forma il nuovo glicoside.

Questo non è efficiente, quindi sono state proposte delle soluzioni interessanti.

Una è quella di usare sempre ad esempio una β glicosidasi, ma fornire poi un substrato con legame α -glicosidico. L' α -glicoside viene ugualmente accettato dal sito attivo dell'enzima β -glicosidasi, perché mima la disposizione dell'intermedio α del complesso enzima-substrato. Contemporaneamente, per migliorare le interazioni con l'enzima ed evitare la formazione dell'intermedio covalente, è stata fatta una mutazione da acido glutammico ad alanina, dove quindi invece di un gruppo carbossilico si viene a trovare un gruppo metilico, idrofobico, che interagisce bene col glicoside fluoruro.

Il carbossilato dell'enzima attiva il nucleofilo, che attacca sullo stereocentro, da cui esce il fluoruro come gruppo uscente. Avviene tutto in un solo passaggio, con inversione di configurazione ma partendo da un substrato con configurazione α se ne ottiene uno in configurazione β .

La mutazione nel sito attivo che sostituisce l'acido glutammico con l'alanina dà un aminoacido idrofobico che stabilizza il substrato e non forma l'intermedio covalentemente legato al substrato; il mantenimento del carbossilato dalla parte opposta del sito attivo serve a catalizzare la reazione di attivazione del nucleofilo.

Applicazioni industriali delle glicosidasi

Le glicosidasi utilizzate in ambito industriale comprendono le *fruttosiltrasferasi*, che possono essere utilizzate per la sintesi dei FOS (fruttosil oligosaccaridi).

Anche la *galattosidasi* può essere utilizzata per la sintesi dei GOS (galattosil oligosaccaridi).