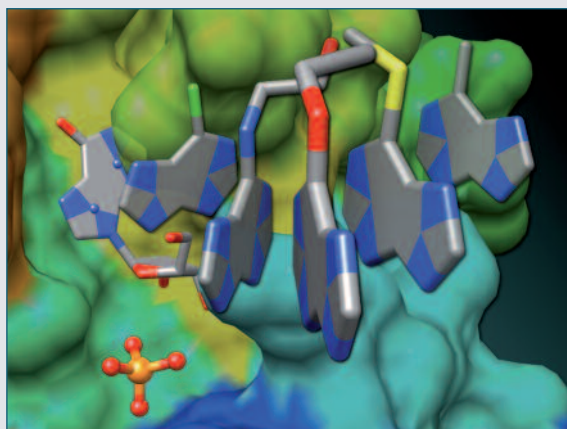




Carlo F. Morelli^a, Daniela Ubiali^{b,d}, Immacolata Serra^b, Marco Biagiotti^a, Giovanni Borghese^a, Valeria M. Pappalardo^a, Alessandra M. Albertini^c, Giovanna Speranza^{a,d}

^aDipartimento di Chimica

Università di Milano

^bDipartimento di Scienze del Farmaco

Università di Pavia

^cDipartimento di Biologia e Biotechnologie "Lazzaro Spallanzani"

Università di Pavia

^dItalian Biocatalysis Center

giovanna.speranza@unimi.it

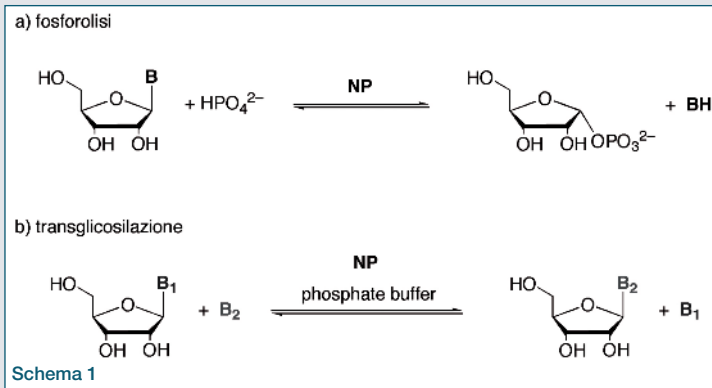
SINTESI CHEMOENZIMATICA DI NUCLEOSIDI

Le nucleosidi e fosforilasi (NP, E.C. 2.4.2) catalizzano la formazione del legame N-glicosidico di ribo- e 2'-desossiribonucleosidi. Una purina nucleoside fosforilasi da *Aeromonas hydrophila* è stata utilizzata per la sintesi di ribonucleosidi purinici modificati. L'enzima ha mostrato una buona stabilità e un'ampia specificità di substrato.

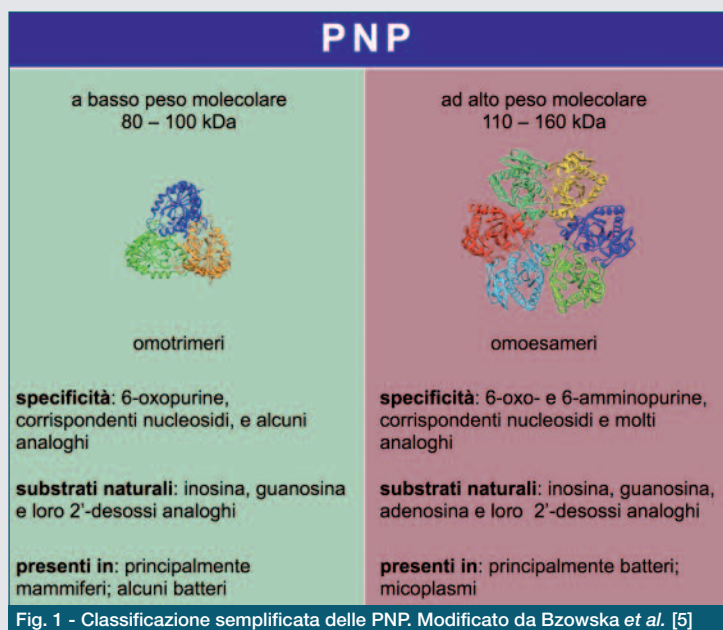
Due sono le strategie comunemente utilizzate per la sintesi dei nucleosidi [1]. La prima prevede la modificazione mirata di nucleosidi preformati, spesso ottenuti da fonti naturali o comunque facilmente accessibili e commercialmente disponibili. La seconda strategia consiste nel sintetizzare la base eterociclica e condensarla successivamente all'unità glicosidica, previa attivazione di quest'ultima, in un approccio di tipo convergente. Entrambi i metodi richiedono solitamente numerosi passaggi, in particolare reazioni di protezione e deprotezione di gruppi funzionali. Nella strategia convergente, inoltre, è necessario un attento controllo della regiochimica e della stereochimica di formazione del legame N-glicosidico, cosa che può rivelarsi non banale in alcuni contesti strutturali come, ad esempio, nel caso di 2'-desossiribonucleosidi [1].

Per la formazione del legame N-glicosidico un'alternativa conveniente può essere l'utilizzo di una reazione enzimatica [2]. Le biotrasformazioni hanno il vantaggio di procedere a temperatura ambiente, in assenza di reagenti aggressivi e in ambiente acquoso, addizionato eventualmente di piccole quantità di un cosolvente organico. Inoltre, gli enzimi mostrano elevata regio- e stereoselettività, rendendo così superfluo il ricorso a gruppi protettivi, e possono essere attivi anche verso composti diversi dai loro substrati naturali, risultando quindi strumenti molto utili in chimica organica.

Tra gli enzimi che catalizzano le reazioni di N-glicosilazione ci sono le nucleoside fosforilasi (NP, E.C. 2.4.2) [3, 4]. Questi enzimi sono coinvolti *in vivo* nella cosiddetta "via di recupero" delle basi azotate, il processo metabolico che permette alla cellula di riciclare i nucleotidi derivanti dalla degradazione degli acidi nucleici. Le NP catalizzano infatti la scissione reversibile del legame glicosidico di ribo- e 2'-desossiribonucleosidi, in presenza di ione fosfato come secondo substrato, a dare α -D-ribosio- o α -D-2-desossiribosio-1-fosfato e la nucleobase coniugata (Schema 1a). Si tratta pertanto di una reazione di fosforolisi, in cui il fosfato sostituisce la base azotata sul carbonio anomero



Questo contributo è stato presentato alla VII edizione della manifestazione "Incontro con l'Università, il CNR e l'Industria", svoltasi lo scorso febbraio a Milano e avente per tema "Sintesi e metodologie innovative in chimica organica", organizzata dal Dipartimento di Chimica Organica e Industriale dell'Università di Milano.



attraverso un attacco che porta a inversione di configurazione. Se nel mezzo è presente una seconda nucleobase, si può verificare una reazione di transglicosilazione, cioè il trasferimento dell'unità di ribosio o 2-desossiribosio dal nucleoside a una diversa base eterociclica con formazione di un nuovo nucleoside (Schema 1b).

Sono note molte NP, classificate secondo vari criteri non sempre facilmente conciliabili tra loro. Una classificazione semplificata distingue le NP che accettano come substrati i nucleosidi pirimidinici da quelle specifiche per i nucleosidi purinici (purina nucleoside fosforilasi, PNP) [3, 5]. Trascurando per semplicità le eccezioni che pure esistono, le PNP possono a loro volta appartenere a due categorie, che si differenziano per peso molecolare, struttura quaternaria della proteina, fonte biologica e specificità di substrato (Fig. 1). Le PNP a basso peso molecolare (80-100 kDa), qui indicate come PNPI, sono solitamente omotrimeriche e specifiche per le 6-oxopurine (guanosina, inosina e i corrispondenti 2'-desossiribonucleosidi). Sono le PNP tipiche dei mammiferi, ma si possono trovare anche in alcuni microrganismi. Le PNPII, invece, sono caratterizzate da un più elevato peso molecolare (110-160 kDa) e struttura quaternaria omoesamerica. Mostrano una specificità di substrato più ampia, accettando come substrati naturali sia le 6-oxopurine, sia le 6-amminopurine (adenosina e 2'-desossadenosina). Sono tipiche dei batteri e di alcuni micoplasmi e non sono state rinvenute nei mammiferi [5].

Sebbene la struttura terziaria dei membri delle due famiglie di PNP sia simile, essi non mostrano alcuna omologia di sequenza amminoacidica, che si riscontra

invece tra i membri di ciascuna classe. Si è ipotizzato pertanto che le due famiglie di PNP abbiano una derivazione filogenetica indipendente e rappresentino un esempio di convergenza evolutiva: si tratta cioè di enzimi che, pur non condividendo un antenato comune, si sono egualmente evoluti a dare strutture tridimensionali simili tra loro, sulla base della pressione evolutiva data dalla natura del substrato su cui entrambe le classi agiscono, i nucleosidi per l'appunto [3].

Obiettivo principale del nostro lavoro è la ricerca di una metodologia innovativa, basata sull'uso di NP, per la sintesi di nucleosidi purinici modificati. Composti di questo tipo possono trovare impiego come farmaci, in particolare antivirali e antitumorali.

L'enzima idoneo è stato scelto utilizzando i risultati di uno *screening* microbiologico condotto alcuni anni fa da ricercatori dell'Università Nazionale di Quilmes, Buenos Aires, che ha permesso di individuare nel batterio *Aeromonas hydrophila* una fonte di NP potenzialmente utili a fini sintetici [6]. Questo studio ci ha stimolato a isolare le PNP di questo microrganismo e ad utilizzarle come biocatalizzatori per la sintesi di nucleosidi.

Nel genoma sequenziato di *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966 [7] sono presenti tre geni codificanti PNP: *xapA*, *deoD1* e *deoD*. La nostra attenzione si è concentrata sul gene *deoD*, che codifica una PNP attiva su nucleosidi 6-oxo- e 6-amminopurinici. Il gene *deoD* è stato amplificato dal DNA genomico del ceppo fornito dagli Autori dello *screening* microbiologico [6]. L'enzima (*Ah* PNPII) è stato espresso in *E. coli* come proteina di fusione recante una coda di isti-

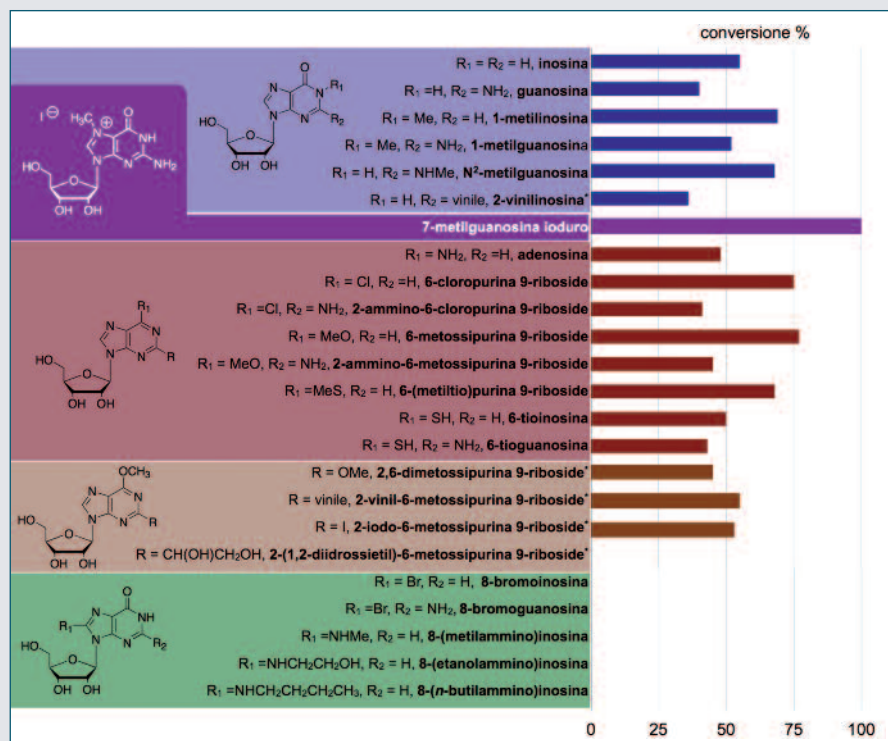


Fig. 2 - Specificità di substrato di PNPII da *Aeromonas hydrophila*. Il grafico riporta le percentuali di conversione determinate mediante HPLC dopo 6 ore. Condizioni di reazione: tampone fosfato pH 7,5/glicerolo (4:1, v/v), 20 mL; substrato: 1 mM; *Ah* PNPII: 1,15 IU; r.t.; standard interno: uracile 1 mM. [8]; * = unpublished

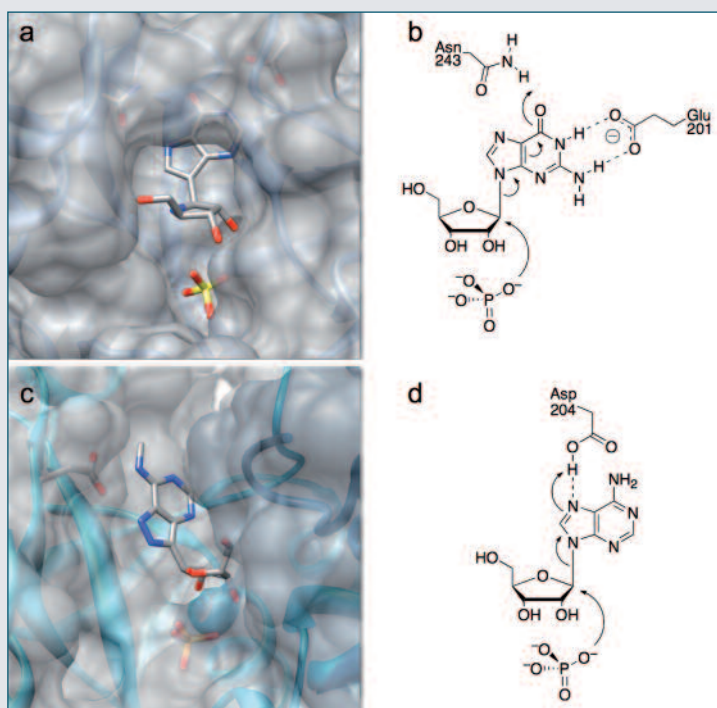


Fig. 3 - Meccanismo proposto e specificità di substrato per le reazioni di fosforolisi catalizzate dalle due famiglie di PNP. a) Orientazione reciproca dei substrati e disposizione dei residui catalitici Asn243 (in alto a sinistra) e Glu201 (in alto a destra) nel sito attivo della PNPI umana (pdb 1RT9). b) Meccanismo proposto per la reazione di fosforolisi catalizzata dalle PNPI. c) Sito attivo della PNPII di *E. coli* (pdb 1K9S) con il residuo catalitico Asp204 in evidenza. d) Meccanismo proposto per la reazione di fosforolisi catalizzata dalle PNPII. Le figure a) e c) sono state preparate con Chimera [20]

dine sulla porzione aminoterminale per facilitarne la purificazione mediante cromatografia di affinità [8]. Come atteso, l'enzima è risultato attivo nei confronti di nucleosidi 6-oxo- e 6-aminopurinici naturali. È stata inoltre verificata la stabilità di *Ah* PNPII in presenza di cosolventi organici, necessari per favorire la solubilizzazione dei substrati. L'enzima ha mostrato un'elevata stabilità, senza apparente perdita di attività, in presenza di glicerolo, che è stato quindi utilizzato come cosolvente in tutti gli esperimenti.

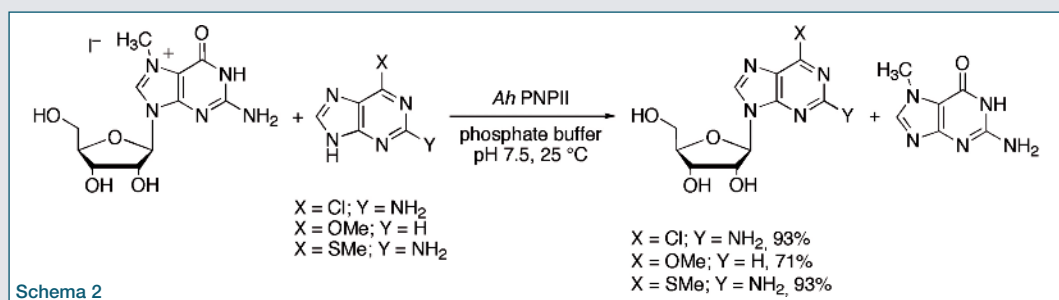
La specificità di substrato della PNP da *A. hydrophila* è stata studiata sottoponendo a reazione di fosforolisi una libreria di nucleosidi modificati appositamente sintetizzata. La reazione di fosforolisi rappresenta infatti un saggio standard per valutare l'attività di questi enzimi verso un determinato nucleoside ed è indicativa della possibilità di utilizzare l'enzima saggiato nella direzione opposta, cioè nella direzione della sintesi. I nucleosidi saggiati presentano modificazioni strutturali nelle posizioni 1, 2, 6, 7 e 8 della nucleobase, o sono modificati sia in posizione 2 sia in 6. Dall'analisi delle percentuali di conversione all'equilibrio riportate in Fig. 2 emerge che i nucleosidi modificati nelle posizioni 1, 2 e 7 sono accettati come substrati e che l'equilibrio è spostato nella direzione della fosforolisi sebbene in misura diversa per i singoli substrati. Solo nel caso della 7-metilguanosa ioduro la fosforolisi è completa, dal momento che la 7-metilguanina non è in grado di fungere da accettore dell'unità glicosidica nella reazione inversa. I nucleosidi modificati in posizione 6 sono riconosciuti come substrati e anche

la doppia sostituzione in 2 e 6 è tollerata dall'enzima, fatta eccezione per 2-(1,2-diidrossietil)-6-metossipurina 9-riboside, probabilmente a causa dell'ingombro sterico e della polarità del sostituito presente in 6. Invece, la sostituzione in posizione 8 dell'anello purinico porta a derivati che non sono attivi come substrati. Considerando che i nucleosidi purinici non sostituiti esistono in soluzione acquosa prevalentemente come conformeri *anti* e che l'introduzione di un sostituito ingombrante sul C-8 sposta l'equilibrio verso la conformazione *syn*, la mancanza di attività come substrati mostrata dai nucleosidi purinici sostituiti in 8 può indicare che la conformazione *syn* non è riconosciuta dall'enzima [8]. Il meccanismo della reazione di fosforolisi è stato studiato nel dettaglio attraverso studi cinetici [9-11], analisi del sito attivo delle PNP mediante cristallografia ai raggi X [12, 13] e calcoli teorici [14]. Questi studi hanno permesso anche di interpretare la differente specificità di substrato mostrata dalle due classi di PNP (PNPI e PNPII) in base ai residui amminoacidici del sito attivo implicati nella catalisi. L'ipotesi di meccanismo comunemente accettata per entrambe le classi di PNP prevede la formazione di uno stato di transizione con carattere di ione oxocarbenio sull'unità glicosidica e con la carica negativa, che si sviluppa in seguito alla rottura eterolitica del legame glicosidico, delocalizzata sulla base purinica che funge da gruppo uscente grazie all'intervento dei residui cataliticamente attivi. L'espulsione della base è completata dal concomitante attacco da parte del gruppo fosfato dal lato opposto (Fig. 3) [3].

L'azione catalitica delle PNP si esplica pertanto i) nell'orientare correttamente i due substrati, cioè nucleoside e fosfato (Fig. 3 a,c); ii) nell'indurre, a seguito del legame con l'enzima, un cambiamento conformazionale nell'anello furanico dell'unità glicosidica tale da promuovere la formazione dello ione oxocarbenio allentando il legame glicosidico; iii) nell'assistere l'uscita della base eterociclica stabilizzando, attraverso l'intervento di residui catalitici del sito attivo, la carica negativa che si viene a formare [3].

Le due classi di PNP sembrano differire soprattutto in quest'ultimo aspetto. Le PNPI stabilizzano la carica negativa che si sviluppa nello stato di transizione delocalizzandola sul gruppo 6-oxo del nucleo purinico per mezzo di un legame idrogeno che coinvolge un residuo di asparagina altamente conservato del sito attivo (Fig. 3b) [15]. Questo residuo di asparagina (Asn243 nella PNP umana) è essenziale per la catalisi, assieme al residuo Glu201, che orienta il substrato e mantiene la corretta forma tautomerica del nucleo purinico con il carbonile in posizione 6 (Fig. 3a,b). Si spiega in questo modo la ristretta specificità di substrato delle PNPI, limitata ai nucleosidi 6-oxopurinici.

Nelle PNPII l'unico residuo in grado di interagire con la base purinica è un residuo di acido aspartico nella forma indissociata (Asp204 nella PNP da *E. coli*, Fig. 3c), coinvolto in un legame idrogeno con l'atomo di azoto in posizione 7 del nucleo purinico. La protonazione dell'atomo di azoto in 7 della purina sembra infatti essere un prerequisito essenziale per la rottura eterolitica del legame glicosidico (Fig. 3d). Questa ipotesi meccanicistica, supportata da studi sulle modificazioni conformazionali dell'enzima in seguito al legame con i substrati e da



silazione, in uno schema sintetico del tipo “one-pot, one enzyme”.

La reazione di transglicosilazione è stata condotta a livello preparativo usando come accettori alcune purine 6-sostituite (2-ammino-6-cloropurina, 6-metossipurina e 2-ammino-6-(metil-tio)purina) in presenza di un eccesso di 7-metilguanosina ioduro (3-4 volte

calcoli teorici, rende anche ragione della più ampia specificità di substrato delle PNPII rispetto alle PNPI, non essendo l'attività catalitica delle PNPII vincolata alla natura del sostituito in posizione 6 della purina [16]. Risulta evidente che le PNPII, come la PNPII da *A. hydrophila*, rappresentano gli enzimi potenzialmente più versatili per essere utilizzati a scopi sintetici preparativi, in considerazione della loro più ampia specificità di substrato. Il passaggio successivo è stato proprio quello di esplorare la possibilità di sintetizzare nucleosidi modificati mediante reazioni di transglicosilazione (Schema 1b). A questo fine, la 7-metilguanosina ioduro appare una conveniente fonte di pentoso-1-fosfato: la sua fosforolisi catalizzata dalla *Ah* PNPII risulta infatti rapida, completa e irreversibile (cfr. Fig. 2), in grado quindi di spostare l'equilibrio della reazione nella direzione della sintesi del prodotto desiderato. La corrispondente base, 7-metilguanina, risulta inattiva nei confronti dell'enzima (non è né substrato, né inibitore) ed essendo poco solubile precipita nel mezzo di reazione sottraendosi all'equilibrio. Il medesimo enzima è quindi deputato sia alla formazione dell' α -D-ribosio-1-fosfato, sia all'utilizzo di questo reagente nella reazione di glico-

rispetto all'accettore per ottenere la massima conversione di quest'ultimo). I corrispondenti nucleosidi sono stati ottenuti con rese isolate elevate (70-93%) dopo purificazione mediante HPLC preparativo (Schema 2) [8]. Inoltre, studi recenti di immobilizzazione della PNPII da *A. hydrophila* su supporto solido [17] hanno consentito di ottenere un biocatalizzatore riutilizzabile, attivo e stabile in un più ampio range di condizioni sperimentali, requisito indispensabile per intraprendere l'ottimizzazione e lo scale-up delle sintesi biocatalizzate studiate, ma anche la realizzazione di nuove transglicosilazioni (*unpublished*). Sebbene le NP siano studiate da tempo in considerazione del ruolo chiave che rivestono nel metabolismo dei nucleosidi, l'applicazione di questi enzimi in biocatalisi è ancora poco diffusa [2, 8, 17-19]. L'importanza di nucleosidi e nucleotidi come farmaci antitumorali e antivirali, e l'esigenza di sostituire progressivamente, quando è possibile, vie sintetiche laboriose e sfavorevoli dal punto di vista energetico e dell'impatto ambientale con processi più rapidi, economici ed eco-compatibili fanno delle NP una classe di enzimi di sicuro interesse industriale.

Bibliografia

- [1] H. Vorbrüggen, C. Ruh-Pohlenz, in *Organic Reactions*, Vol. 55, L.A. Paquette *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, 2000, pp 1-51.
- [2] I.A. Mikhailopulo, A.I. Miroshnikov, *Mendeleev Commun.*, 2011, **21**, 57.
- [3] M.J. Pugmire, S.E. Ealick, *Biochem. J.*, 2002, **361**, 1.
- [4] E.S. Lewkowicz, A.M. Iribarren, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 1197.
- [5] A. Bzowska *et al.*, *Pharmacol. Ther.*, 2000, **88**, 349.
- [6] J.A. Trelles *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 2005, **27**, 759.
- [7] R. Seshadri *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 8272.
- [8] D. Ubiali *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, 2012, **354**, 96.
- [9] P.C. Kline, V.L. Schramm, *Biochemistry*, 1995, **34**, 1153.
- [10] L. Stein-Ross, E.H. Cordes, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 767.
- [11] P.C. Kline, V.L. Schramm, *Biochemistry*, 1993, **32**, 13212.
- [12] M.D. Erion *et al.*, *Biochemistry*, 1997, **36**, 11735.
- [13] G. Köllner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2002, **315**, 351.
- [14] S. Saen-oon *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**, 16543.
- [15] F. Canduri *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **327**, 646.
- [16] E.M. Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 47110.
- [17] I. Serra, D. Ubiali, J. Piškur *et al.*, *submitted*.
- [18] D. Ubiali *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, 2004, **346**, 1361.
- [19] S. Rocchietti *et al.*, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 2195.
- [20] E.F. Pettersen *et al.*, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1605.

ABSTRACT

Chemoenzymatic Synthesis of Nucleosides

A purine nucleoside phosphorylase from *Aeromonas hydrophila* was cloned, expressed in *Escherichia coli* and purified. The enzyme showed a good stability and a broad substrate specificity towards modified purine ribonucleosides. The enzyme was used for the synthesis of purine nucleosides structurally related to compounds of biological interest via a “one pot, one enzyme” transglycosylation reaction using 7-methyl guanosine iodide as the sugar donor and 6-substituted purines as acceptor.