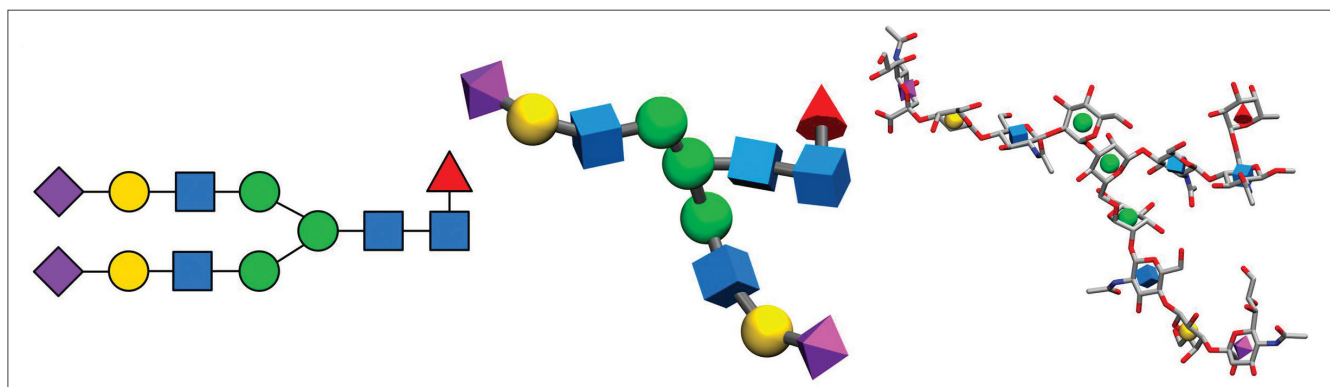




## I GLICANI, MOLECOLE A BASE DI CARBOIDRATI, RESPONSABILI DELLA SOCIALITÀ DELLE CELLULE

*I glicani ricoprono ogni cellula vivente e sono alla base di qualsiasi comunicazione molecolare tra cellule di qualsiasi regno. La “Glicoscienza” include la biologia cellulare e strutturale dei glicani e dei loro derivati e gioca un ruolo cruciale nella biologia, biotecnologia e medicina moderne, estendendosi all’agricoltura e alle scienze veterinarie. I glicani presenti sulla superficie cellulare giocano un ruolo fondamentale nella interazione cellula-cellula in ogni forma vivente. I glicani di ospiti e microbi partecipano nelle patologie, nella simbiosi e nella difesa di entrambe le parti. Infatti, il riconoscimento dei glicani microbici o eucariotici, la sintesi di loro analoghi da parte dei microbi porta ad esiti benefici o letali. Glicani e loro derivati pertanto giocano un ruolo fondamentale nell’interazione dinamica tra ospite e microbo anche se i dettagli molecolari di tale interazione non sono ancora completamente chiari, precludendo, perciò, ogni loro utilizzo per scopi benefici.*



### I glicani “for dummies”

Cosa s’intende per carboidrati? La IUPAC ci dice che il termine generico “carboidrati” include mono-, oligo- e polisaccaridi e loro derivati. Cosa sono allora i glicani? Una categoria complessa di molecole a base di carboidrati ma che possono anche legare covalentemente lipidi, proteine, acidi nucleici ad altro. Possono essere anche chiamati glicoconjugati. La scien-

za che studia la struttura, la funzione e la chimica di tali molecole è semplicemente detta Glicoscienza. I glicani sono una delle quattro classi fondamentali di macromolecole appartenenti ai sistemi viventi, insieme con acidi nucleici, proteine e lipidi, e sono costituiti da singole unità di monosaccaridi collegate l’una all’altra attraverso il legame glicosidico in modi differenti.



Una delle chiavi di diversità dei glicani rispetto alle altre biomolecole è proprio nel legame glicosidico e nella possibilità di legare i singoli residui monosaccaridici in diversi modi, anche non linearmente, attraverso il legame glicosidico. Ogni monosaccaride presenta diversi gruppi ossidrilici che possono essere sito di “legame” da parte di un altro monomero attraverso la sua posizione anomerica. Ogni monosaccaride può essere in forma furanica o piranica, e la sua orientazione anomerica essere alfa o beta. Queste variabili fanno sì che quattro unità di monosaccaride, danno luogo a differenti oligosaccaridi (più di 7 milioni!), mentre, ad esempio, quattro unità di amminoacido, daranno luogo a 256 tetrapeptidi. Oltretutto, rispetto alle catene polipeptidiche e di acidi nucleici, molti polimeri di carboidrati (polisaccaridi) possono essere ramificati, proprio in virtù delle caratteristiche chimiche dei loro monomeri costituenti. Per cui essi sono molecole complicate e assolutamente cruciali per la vita di qualsiasi cellula, dal virus alle cellule complesse come quelle delle piante superiori o quelle umane.

I glicani sono stati ritenuti a lungo la “Cenerentola” delle biomolecole, attribuendo ad essi solo funzioni strutturali (cellulosa, parete cellulare delle piante) o di riserva energetica (amido e glicogeno).

Che i glicani potessero essere importanti componenti come glicolipidi e glicoproteine è stato soltanto recentemente accettato in maniera definitiva. Basti pensare che la scoperta delle glicoproteine, cioè della esistenza del legame covalente tra glicani e proteine è datata all’inizio degli anni Sessanta del secolo scorso, ben dopo la scoperta della struttura del DNA. E comunque nel caso specifico delle glicoproteine per molti anni si è ritenuto che esse fossero una peculiare forma e bassa percentuale di molecole dove invece la gran parte delle proteine fosse soltanto “pura”, cioè scevra da carboidrati. Durante il mio periodo di tesi di dottorato ricordo con chiarezza che un mio collega dottorando in biochimica combatteva per purificare la sua desiderata proteina dai glicani “contaminanti”, salvo poi scoprire a fine dottorato che essi in realtà ne facevano parte integrante, essendo i *N*-glicani covalentemente legati ad essa! Ora nel terzo millennio si sa che circa il 60% delle proteine (di tutte le proteine) è glicosilato.

### **Glicani, una classe di biomolecole trasversale e silentemente ubiquitaria**

Perché in effetti è vero, i glicani, sono talmente inseriti nel “mainstream” della chimica, della biochimica e delle scienze della vita da essere diventati sottofondo, ignorati per essere così fondamentali!

Alcuni esempi?

La cellulosa, interamente costituita da glucosio, è il composto organico più abbondante del pianeta; il secondo composto organico più abbondante è ancora un glicano, la chitina, ovvero l’esoscheletro degli insetti, che è un polimero interamente costituito da *N*-acetil-glucosammina, ancora una volta un monosaccaride.

La proteina più abbondante del pianeta è la RUBISCO, Ribulosio BISfosato Carbossilasi/Ossigenasi; essa è una proteina chiave per la vita, è l’enzima coinvolto nella fissazione della CO<sub>2</sub>, ovvero nell’organizzazione dell’anidride carbonica, la reazione che rende gli organismi vegetali i nostri indissolubili partner di vita. Ed è questa una reazione che avviene a carico di un monosaccaride, il ribulosio.

Gli acidi nucleici sono una classe di biomolecole fondamentale per la vita e depositari dell’informazione genetica a tutti i livelli e in tutti i regni i cui monomeri sono i nucleotidi. I nucleotidi sono formati da una base azotata, da un gruppo fosfato e da un monosaccaride, ribosio o 2-deossiribosio, cioè un terzo del contenuto degli acidi nucleici è monosaccaridico! Ed il monosaccaride negli acidi nucleici non ha soltanto funzione strutturale ma la sua conformazione e l’orientazione di alcuni dei suoi atomi conferiscono differente struttura supramolecolare all’acido nucleico e differente funzionalità.

### **I glicani in quanto tali, la glicoscienza e la vita reale**

Comprendere le strutture e le funzioni dei glicani è centrale per comprendere la biologia e la medicina. Qualunque cellula vivente è circondata da glicani, essi sono le molecole che permettono interazione, adesione, riconoscimento e immunità ad ogni cellula (Fig. 1). Sono infatti le molecole che permettono la socialità delle cellule e la loro comunicazione a livello molecolare. Svolgono diverse funzioni nel riconoscimento molecolare, nell’immunità e infiammazione.

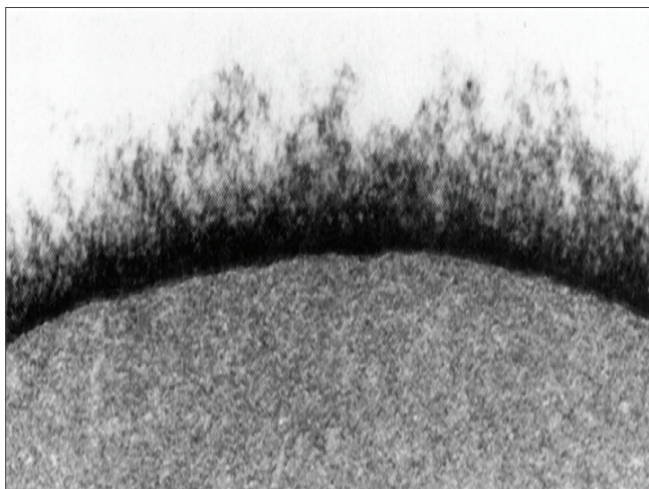


Fig. 1 - La superficie cellulare di un eritrocita, interamente ricoperta di catene carboidratiche (da S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 41527)

Farò di seguito alcuni esempi, giusto per fare intendere al lettore a digiuno di carboidrati (*in senso scientifico...*) quanto siano importanti i glicani e quanto impattino sulla vita reale: i glicani ed i gruppi sanguigni, i glicani ed il doping da eritropoietina, la cellulosa come potenziale “carburante”.

Il gruppo sanguigno è una delle numerose caratteristiche di un singolo individuo e viene classificato dalla presenza o dall'assenza di antigeni sulla superficie dei globuli rossi. Il sistema immunitario di ogni individuo è naturalmente capace di reagire contro il sangue non proprio, producendo anticorpi che possono specificatamente legarsi a dei particolari antigeni di superficie. Questi anticorpi si legano alla superficie dei globuli rossi trasfusi (o di altre cellule tessutali) “marcandoli” e portano a una distruzione di queste cellule attraverso l'intervento di altri componenti del sistema immunitario.

Quando gli anticorpi IgM si legano alle cellule trasfuse, queste ultime possono essere agglutinate e distrutte. È quindi vitale che sia selezionato sangue compatibile per le trasfusioni. Reazioni post-trasfusione possono portare a una risposta vigorosa da parte del sistema immunitario con una massiccia distruzione di globuli rossi, bassa pressione sanguigna e, nei casi più estremi, morte. Sono i glicani, e quindi la chimica degli

zuccheri che li compone, a determinare gli antigeni che definiscono i gruppi sanguigni A,B, oppure O, che definiscono, cioè, la capacità di un individuo di ricevere sangue da un altro (Fig. 2). Da un punto di vista chimico, tutti presentano sui globuli rossi l'antigene O, un oligosaccaride associato alla membrana plasmatica. Questo è costituito da quattro residui monosaccaridici i cui tre ultimi sono *N*-acetil glucosammina, galattosio e fucosio; quest'ultimo oligosaccaride si chiama anche antigene H ed è la struttura minima plausibile su un globulo rosso. Questa struttura trisaccaridica viene ulteriormente modificata da glicosiltransferasi che portano all'aggiunta di residui monosaccaridici in diversi siti dell'oligosaccaride per formare i diversi antigeni: viene legata *N*-acetil galattosammina nel caso del gruppo A, viene legato il galattosio nel caso del gruppo B, mentre gli individui del gruppo AB presentano entrambi i residui. Gli individui del gruppo O sono invece sprovvisti delle glicosiltransferasi e quindi presentano semplicemente l'antigene H.

I glicani sono covalentemente legati in posizioni specifiche su molte proteine eucariotiche, modulando aspetti della loro attività biologica attraverso il riconoscimento molecolare o influenzando il loro tempo di circolazione nel sangue. Ad esempio, l'eritropoietina è una glicoproteina coinvolta nella produzione dei globuli rossi e quindi direttamente coinvolta nella ossigenazione muscolare. La differenza chimica tra molecole di glicano nell'eritropoietina “naturale” e quella assunta per doping, serve come base per i test antidoping negli atleti.

I glicani sono fondamentali biomolecole anche nel mondo vegetale. I costituenti delle pareti cellulari

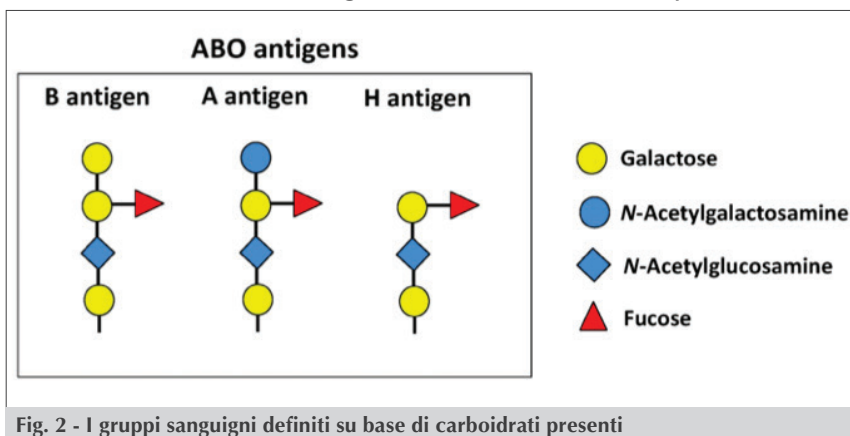


Fig. 2 - I gruppi sanguigni definiti su base di carboidrati presenti

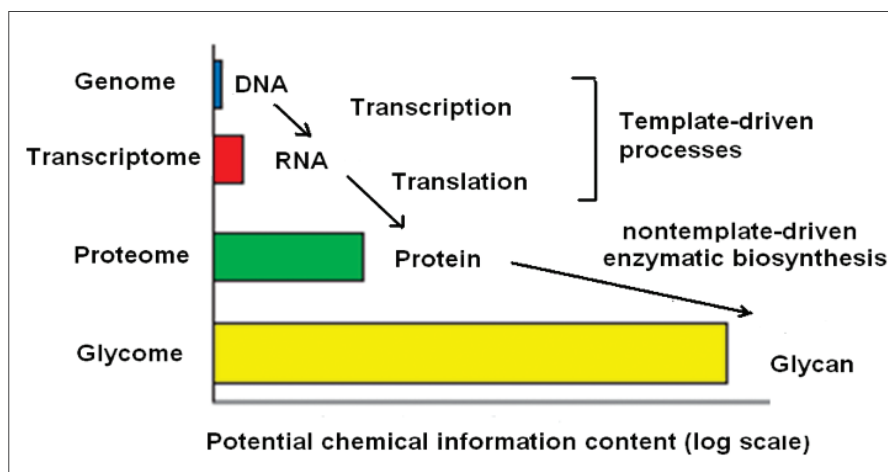


Fig. 3 - Illustrazione dell'ampliamento di informazione su scala esponenziale in seguito a glicosilazione post-traduzionale di proteine

vegetali includono glicani come la cellulosa e l'emi-cellulosa combinati in una matrice di altri biopolimeri a base di carboidrati. Alquanto attuale è la ricerca di fonti di energia alternative ai combustibili fossili, sfruttando l'energia immagazzinata in questi glicani vegetali. La conversione efficace dei glicani in biocarburanti liquidi richiede la scissione enzimatica delle pareti cellulari vegetali per liberare i carboidrati costituenti per l'elaborazione successiva. I progressi nella comprensione della struttura dei glicani che comprendono la parete cellulare, nella struttura e funzione degli enzimi impegnati nella biosintesi e degradazione e come essi possano essere modificati per ottimizzare il processo di degradazione della parete cellulare, sono studi cruciali che daranno un contributo significativo allo sfruttamento di questa fonte di energia alternativa.

### Perché all'improvviso i glicani?

I progressi nelle scienze della vita negli ultimi decenni hanno portato a una maggiore comprensione di molti dei meccanismi di base presenti in sistemi biologici. Stimolati dal Progetto Genoma Umano, ci sono stati grandi progressi nella comprensione del dogma centrale della biologia molecolare: DNA-RNA-PROTEINE; cioè sequenze di geni del DNA sono trascritti in RNA, che a loro volta, sono tradotti per formare proteine. A dispetto dei grandi avanzamenti di conoscenza dopo la chiarificazione del genoma umano è parso ovvio a tutti che il numero di geni e conseguenti funzioni codificate dal genoma

fosse nettamente più basso, di vari ordini di grandezza, rispetto a tutte le funzioni richieste dalle cellule umane. È diventato infatti chiaro che le modifiche proteiche post traduzione sono parte integrante della decodificazione genica e che sono una aggiunta fondamentale per la compartimentalizzazione e la specificazione della funzione di ogni singola proteina (Fig. 3). La glicosilazione proteica, una delle forme più comuni di modifica post traduzione, è importante per molti processi biologici e spesso serve come un interruttore che è in

grado di modulare con precisione l'attività proteica. Attraverso la glicosilazione post traduzione è di fatto aumentato su scala esponenziale il "contenuto informativo e funzionale" di ogni singola proteina a causa delle intrinseche proprietà chimiche dei carboidrati e della loro complessità. Infatti, a differenza di DNA e proteine, i glicani non vengono sintetizzati seguendo un modello di sequenza (cosiddetto "template driven") ma piuttosto attraverso reazioni enzimatiche che dipendono da diversi fattori fisici e chimici, tra cui le concentrazioni di enzimi e molti diversi substrati. La diversità delle possibili strutture dei glicani rende conto della enorme possibilità di ampliamento della informazione.

### Glicani microbici e glicani eucariotici

Di seguito un paio di esempi, uno per procarioti ed uno per eucarioti in cui i glicani di superficie cellulare giocano un ruolo fondamentale.

#### Glicosilazione microbica

Come detto precedentemente i glicani ricoprono la superficie di ogni cellula sia essa microbica, di piante o animali. I glicani presenti sulle cellule microbiche possono essere anche coniugati ad altre molecole, cioè essere glicolipidi o glicoproteine; in tutti i casi i glicani presenti sulla parete cellulare dei batteri sono chimicamente molto peculiari e diversi da quelli presenti negli eucarioti. Questa diversità chimica fa sì che essi e i corrispondenti glicconiugati della parete cellulare batterica siano ritenuti "tar-

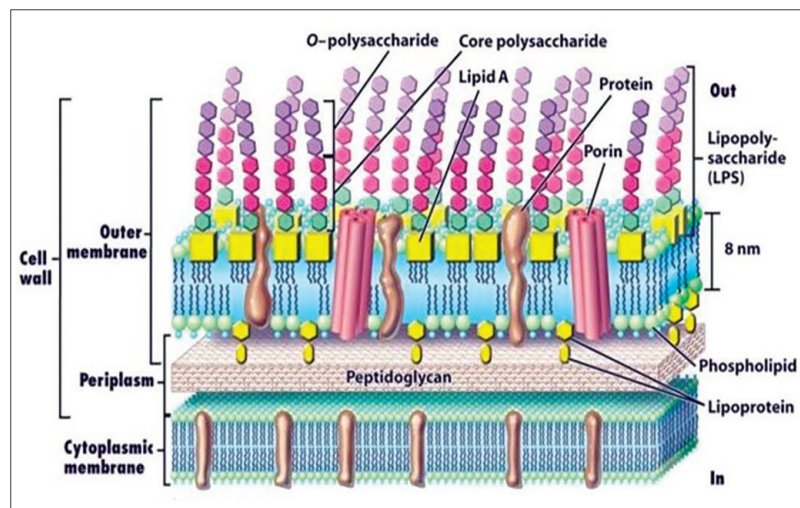


Fig. 4 - Illustrazione di una sezione di cellula batterica Gram negativa ed evidente preponderanza sulla sua superficie di particolari glicani, i lipopolisaccaridi

get" cruciali per combattere le infezioni da batteri. L'immunità innata è il primo livello di sorveglianza degli eucarioti ed è un sistema di controllo precoce per qualsiasi microrganismo approcci una cellula eucariotica. Essa è comune agli animali (uomo incluso) e alle piante, in quest'ultime è l'unico sistema immunitario presente, spesso chiamato anche difesa basale.

L'immunità innata si avvale del riconoscimento precoce di molecole appartenenti soltanto ai microrganismi e che quindi possano rappresentare un sistema identificativo univoco ed infallibile. Tra le molecole microbiche identificate come campione "marker" ci sono diverse classi di glicani, tutti presenti sulla superficie cellulare dei microbi, ad esempio, nei Gram negativi, i lipopolisaccaridi (Fig. 4). Sulla base del riconoscimento di questi glicani e derivati si scatena la risposta immunitaria innata che porta all'eliminazione del microbo da parte di cellule specifiche che secernono proteine killer in grado di neutralizzare il microrganismo. Certamente è cruciale conoscere intimamente, cioè a livello molecolare, la struttura di tutti i glicani di superficie dei microrganismi e capire come avviene il loro riconoscimento. Questo ha infatti molteplici interessanti vantaggi. L'identificazione dei frammenti molecolari che direttamente si legano alle proteine recettori dei glicani può essere punto di partenza per studi di sintesi organica all'uopo di nuovi mimici che siano riconosciuti da tali proteine e scatenino la risposta immunitaria in

anticipo. Inoltre è molto importante capire la struttura dei glicani di superficie microbica perché a livello intestinale, ed in generale in tutto il cavo oro-faringeo, siamo in contatto continuo con microbi simbiotici, cioè benefici che coadiuvano il nostro metabolismo a tutti i livelli. Questi microbi posseggono anche essi gli stessi glicani/glicocongiugati di superficie che saranno ovviamente strutturalmente diversi poiché non vengono riconosciuti dal nostro sistema immunitario e quindi non scatenano alcuna risposta. O forse vengono diversamente riconosciuti? In ogni caso la chimica organica strutturale è scienza necessaria in questo campo. L'identificazione dei glicocongiugati dal "microbiota" umano/animale sarà un passo fondamentale al fine di comprendere il meccanismo di azione del "microbiota" stesso.

Identico discorso è applicabile al mondo vegetale in cui, associato alle radici ed alle foglie, c'è un microbiota simbiotico che collabora attivamente al metabolismo vegetale; infatti si parla di vero e proprio "secondo codice genetico" della pianta, alludendo alla potenzialità genica conferita alla pianta dai numerosi ceppi batterici ad essa associati. In conclusione, lo studio del microbiota sembra essere il nuovo incrocio di discipline come la biologia cellulare, l'immunologia, la medicina e le biotecnologie. In questo campo specifico, la chimica organica, in particolare la chimica strutturale dei carboidrati, sono essenziali.

### Glicosilazione eucariotica

Più del 65% delle proteine eucariotiche animali ed umane è glicosilata. Esse sono di solito glicosilate in più punti, attraverso un legame *N*-glicosidico, da un oligosaccaride il cui primo monosaccaride è la glucosammina. Questi oligosaccaridi (chiamati *N*-glycans) hanno uno scheletro comune dovuto alla comune biosintesi e pochissime variazioni sul tema. Prove cumulative su diversi organismi e nell'uomo hanno dimostrato che i cambiamenti nella glicosilazione accompagnano l'acquisizione delle caratteristiche cellulari e biomolecolari necessarie per la crescita e la progressione del tumore. La miriade



di microalterazioni della glicosilazione descritte nel cancro include la sintesi incompleta e l'espressione di strutture glicaniche troncate, l'aumentata espressione di *N*-glicani ramificati complessi, l'espressione *de novo* di glicani con acido sialico (un monosaccaride a nove atomi di carbonio) e l'apposizione di fucosio sul secondo monosaccaride della catena, la cosiddetta "core fucosylation". Si evince quindi che negli eucarioti e nell'uomo la glicosilazione è un meccanismo cellulare chiave che regola diverse funzioni fisiologiche ed anche patologiche, quali l'insorgenza del tumore. Alterazioni in glicoproteine, glicosfingolipidi e proteoglicani sono caratteristiche comuni delle cellule tumorali. La sovraespressione delle strutture ramificate degli *N*-glicani interferisce ancora una volta con la socialità delle cellule impedendo l'adesione cellula-cellula mediata da caderina epiteliale, favorendo la dissociazione e l'invasione delle cellule tumorali. Modifiche di proteine con *N*-glicani ramificati, e/o strutture differenti dal punto di vista chimico modulano le interazioni cellula-matrice del tumore, favorendo il processo di migrazione delle cellule tumorali. La glicosilazione alterata dei recettori del fattore di crescita e l'espressione modificata dei glicolipidi di membrana influenzano le vie di trasduzione del segnale delle cellule tumorali, modulando la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali. I glicani e le corrispondenti proteine (lectine) di riconoscimento dei carboidrati endogeni sono i principali regolatori dell'infiammazione e della risposta immunitaria verso le cellule tumorali.

Diversi marcatori sierologici attualmente utilizzati in terapie oncologiche/immunologiche si basano sulla rilevazione di glicoproteine circolanti o glicoproteine con glicosilazione alterata. I glicani avranno sempre più un ruolo fondamentale nel migliorare la diagnosi precoce, la determinazione della prognosi e la quantificazione del rischio tumorale, oltre a servire come marcatori di specifici bersagli terapeutici.

### Conclusioni

La glicoscienza è un campo vibrante pieno di problematiche impegnative ed attuali.

È passato del tempo (anno 2004) da un famoso articolo/report dal titolo "Glycoscience finally comes of age", cioè le glicoscienze finalmente diventano

attuali. Adesso le glicoscienze sono al centro di un "incrocio scientifico" tra biologia, chimica, medicina e biotecnologie. Comprendere i glicani e applicare queste conoscenze può aiutare a trovare soluzioni guidate ai problemi e a una serie diversificata di sfide. Alcuni esempi comprendono la diagnosi precoce del cancro e di altre malattie attraverso l'identificazione di glicani biomarkers di malattia, oppure lo sviluppo di analoghi di glicani per la protezione contro malattie infettive, o la modulazione di microbiota intestinale attraverso una maggiore comprensione del ruolo dei glicani ed, infine, dal punto di vista biotecnologico, la creazione di prodotti e carburanti derivati da materie prime a base di carboidrati.

Per qualsiasi approfondimento su tale argomento suggerisco quello che ritengo un imprescindibile manuale di Glicoscienza, disponibile gratis online: *Essentials of Glycobiology*, 3<sup>rd</sup> Ed., A. Varki *et al.* (Eds.), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015-2017.

### Glycans, Molecules based on Carbohydrates, Responsible for the Sociality of Cells

Glycans cover any living cell and are at the basis of any communication among cells of any kingdom. Glycoscience embodies the cellular and structural biology of glycans and glycoconjugates, and makes key contributions to modern biology, biotechnology, and medicine, spanning from human health to agriculture and veterinary sciences. Cell surface glycans play pivotal roles in cell-cell interactions in all living forms. Glycans of host and microbes participate in disease, defense and symbiosis. Indeed, microbial recognition of host glycans, host recognition of microbial glycans, and molecular mimicry of host glycans by microbes, lead to either beneficial or detrimental outcomes. Glycans and glycoconjugates thus play key roles in the dynamic interplay (molecular dialogue) between host and microbes, but the molecular details of these interactions are not well understood, precluding us from the ability to modulate them in beneficial ways to mankind.