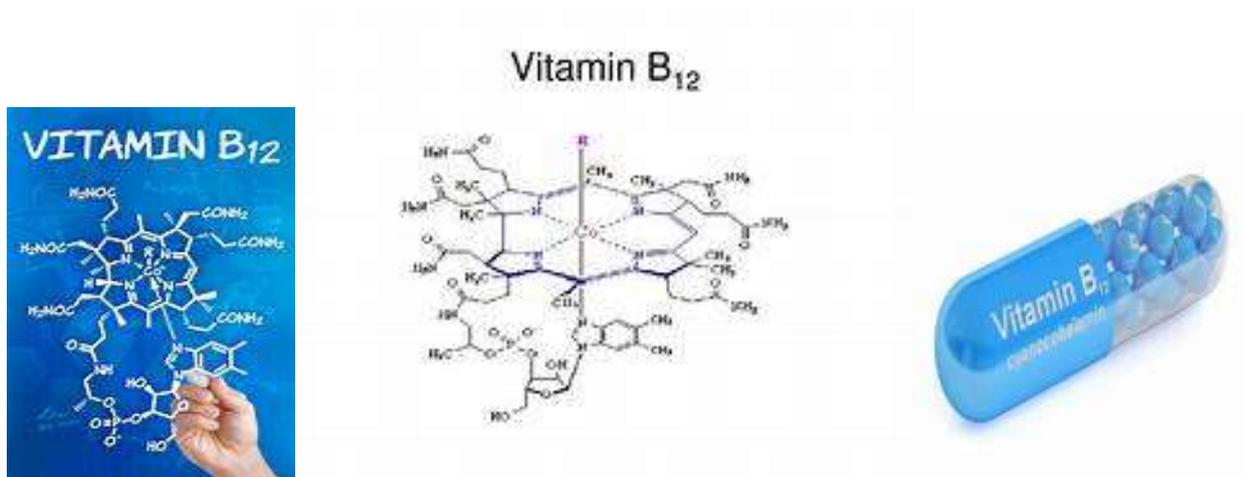


10. Ottobre

La prima volta: sintesi di vitamina B12 in un sistema cell-free

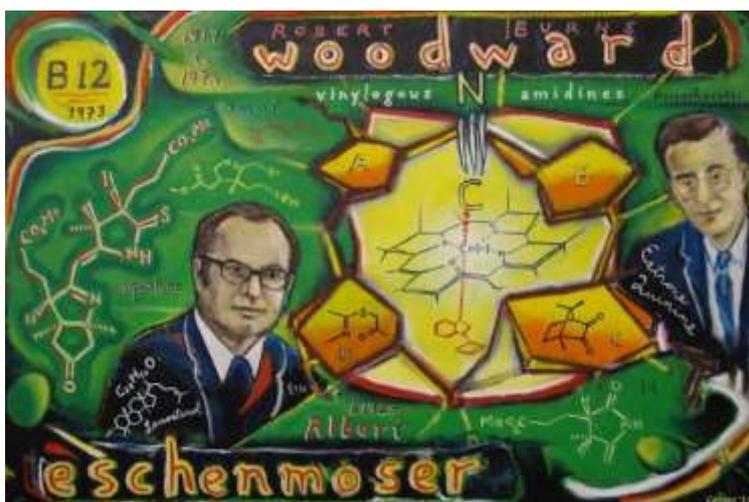
*Creare qualcosa che ancora non esiste
deve essere l'ambizione di tutti coloro che sono vivi.*
(Paulo Freire)

La **vitamina B 12** è una molecola estremamente complessa e svolge alcuni dei processi chimici più affascinanti di tutta la biologia. È una parte essenziale della catena alimentare animale ed è prodotto esclusivamente da microrganismi.



Svolge un ruolo importante nel metabolismo cellulare, in particolare nella sintesi del DNA, nella metilazione e nel metabolismo mitocondriale .

E' una vitamina essenziale composta da un *anello corrinoid*e contenente **cobalto** e ligandi superiori e inferiori.



Nel 1976 **Robert Woodward** ed **Albert Eschenmoser**, insieme a circa 100 studenti e ricercatori, hanno compiuto 11 anni di sforzi per sviluppare con successo un processo per la chemiosintesi completa della vitamina B 12

Woodward RB. The total synthesis of vitamin B 12 . Pure Appl Chem. 1973;33(1):145-77.

A causa del complesso e difficile processo chimico di sintesi, finora la produzione della vitamina **B 12** si è basata sulla fermentazione di microrganismi come

Pseudomonas denitrificans

Propionibacterium freudenreichii

Propionibacterium shermanii

Sinorhizobium meliloti

Sebbene questi ceppi producano titoli elevati di vitamina **B 12**, il loro lungo processo di fermentazione e i limitati strumenti di ingegneria genetica ostacolano ulteriori miglioramenti.

Tuttavia, a causa del percorso biosintetico intricato e prolungato della vitamina **B 12**, un'ulteriore ingegneria metabolica per migliorarne la produzione rimane una sfida significativa. Pertanto, c'è una grande richiesta di *metodi alternativi* per la sintesi della vitamina **B 12** che non si basi esclusivamente sulla *chemocatalisi* o sulla *fermentazione batterica*, il che ha portato a considerare di realizzare una piattaforma priva di cellule.

Un sistema enzimatico privo di cellule è un'alternativa emergente all'ingegneria metabolica perché *la catalisi a cascata* può fornire vantaggi distinti rispetto alla *fermentazione microbica*. La piattaforma priva di cellule ricostruita è composta da numerosi enzimi e cofattori necessari per ottenere una complessa biotrasformazione.

Rispetto all'ingegneria metabolica, la sintesi senza cellule è vantaggiosa in alcuni casi grazie all'ingegneria flessibile, all'efficiente separazione e purificazione degli intermedi e del prodotto, consente una 'elevata tolleranza ai composti intermedi tossici e all'alto titolo con una maggiore resa e produttività

Tuttavia, la *sintesi senza cellule* della **B12** non è stata (fino ad oggi) ancora realizzata a causa del lungo percorso sintetico e sono stati segnalati solo una manciata di intermedi sintetizzati mediante cascate enzimatiche.



Il team del **Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences** coordinato da **Quin Kang** sviluppato un sistema biosintetico privo di cellule per produrre **vitamina B 12** composto da quattro moduli e un totale di 26 enzimi individuali.

Oltre agli enzimi biosintetici, è stato utilizzato un complesso schema di rigenerazione per ricostituire cofattori e cosubstrati. La quantità di **B 12** prodotta in questo modo si avvicina a quella che può essere ottenuta con la fermentazione microbica e questo sistema dovrebbe essere suscettibile di ulteriore ottimizzazione e personalizzazione.

Il report

Kang Q et al

A synthetic cell-free 36-enzyme reaction system for vitamin B12 production.

Nat Commun. 2023 Aug 24;14(1):5177.

è una affascinante ricostruzione dei problemi tecnici affrontati e risolti per ricostruire con successo con successo una piattaforma sintetica priva di cellule per sintetizzare **B12**

Per raggiungere questo obiettivo, l'intero percorso sintetico, comprendente 32 passaggi complessivi catalizzati da 36 enzimi, comprese 8 reazioni di rigenerazione catalizzate da 10 enzimi aggiuntivi nei moduli di rigenerazione, da dieci diversi microrganismi, è stato implementato come sistema di produzione sintetico di AdoCbl. L'intero percorso è stato suddiviso in cinque moduli sintetici e cinque moduli di rigenerazione dei cofattori. Un ciclo di progettazione-test-ottimizzazione è stato eseguito separatamente per ciascun modulo sintetico.

In natura, la vitamina **B 12** viene sintetizzata attraverso un percorso biosintetico antico e intricato, che coinvolge molteplici reazioni a cascata con interazioni complesse. In modo corrispondente, assemblando e ottimizzando il sistema di produzione senza cellule della vitamina **B 12**, abbiamo riscontrato l'emergere di problemi metabolici che non si sono manifestati specificamente nelle reazioni a cascata parziali, ma sono diventati pronunciati dopo aver assemblato insieme tutti i moduli di sintesi.

Questo problema ha ostacolato la promozione del titolo e della resa finali, che concludono lo squilibrio delle reazioni a cascata, la competizione dei cofattori, l'inibizione del feedback, nonché l'instabilità dei prodotti intermedi. Inoltre, a causa della mancanza di fonti commerciali e di metodi di rilevamento diretto degli intermedi, era difficile effettuare anche lo screening degli intermedi accumulati. Tuttavia, sono state proposte diverse strategie per affrontare questi problemi.

Sebbene il titolo della **vitamina B 12** debba essere ulteriormente migliorato per rendere il processo fattibile a livello industriale, le strategie di sviluppo del sistema di reazione enzimatica a 36 cellule privo di cellule qui descritto saranno utili per costruire altri sistemi di reazione enzimatica privo di cellule per il test in vitro produzione di molecole complesse.

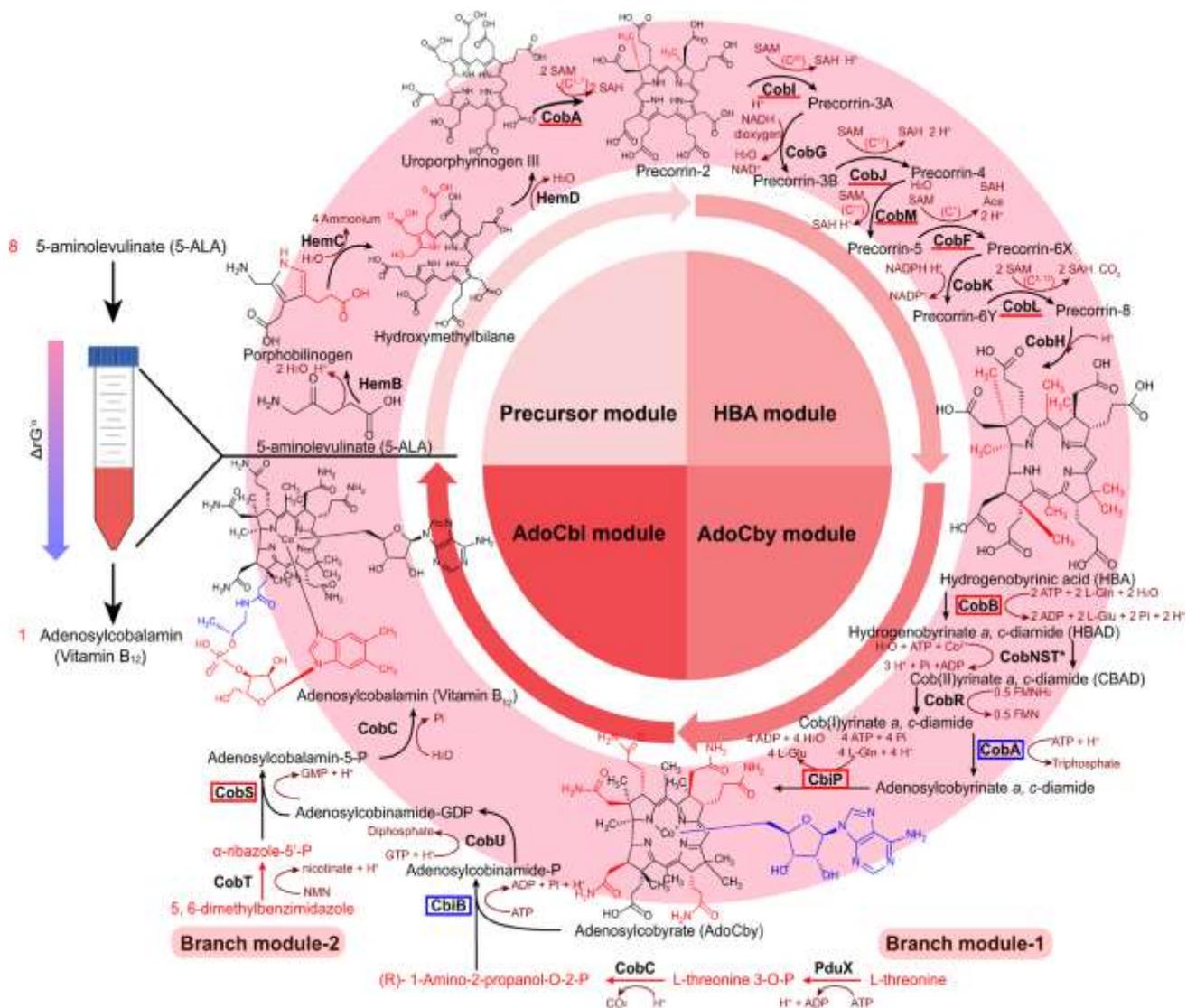


Diagramma schematico del percorso sintetico AdoCbl.

La freccia con gradiente di colore dal rosso al blu a sinistra dell'illustrazione significa che l'energia libera di Gibbs dell'intero percorso catalitico viene ridotta attraverso il processo catalitico dal 5-ALA all'adenosilcobalamina. L'intero percorso è stato suddiviso in cinque moduli, con i composti mostrati in nero e gli enzimi in grassetto nero. Cofattori e sottoprodotti sono mostrati in rosso marrone. Nel modulo precursore (in alto a sinistra del cerchio), otto unità 5-ALA sono assemblate in una precorrina-2 catalizzata da HemB, HemC e HemD, seguita dalla modifica da parte di CobA. La porzione rossa della formula di struttura indica la reazione catalizzata dalla precedente reazione enzimatica. Nel modulo HBA (in alto a destra del cerchio), la precorrina-2 è catalizzata da otto enzimi Cob per produrre HBA, inclusa la metilazione da parte di CobI, CobJ, CobM, CobF, CobL con SAM che funge da donatori di metile. La metiltransferasi è evidenziata con una sottolineatura rossa nella sintesi HBA e la posizione di metilazione è etichettata sopra le reazioni. Le porzioni rosse nella formula strutturale HBA indicano le otto modifiche metilate catalizzate dal modulo HBA (e CobA nel modulo precursore). Nel modulo AdoCby (in basso a destra del cerchio), l'HBA subisce amidazione, riduzione e adenilazione, dopo di che il gruppo adenosina viene assemblato sull'anello porfirinico come ligando superiore per produrre adenosilcobirato (AdoCby). I sei gruppi amidati introdotti da CobB e CbiP sono evidenziati in rosso nella formula della struttura, mentre il gruppo adenosile introdotto da CobA è evidenziato in blu, e gli enzimi sono contrassegnati con gli stessi riquadri colorati delle strutture. Gli enzimi CobNST con asterisco indicano il complesso enzimatico assemblato con CobN, CobS e CobT. Due moduli ramificati (parole rosse nella parte inferiore della figura) sono responsabili della fornitura

di (R)-1-ammino-2-propanolo-O-2-P e α -ribazolo-5'-P da L-treonina e 5,6-dimetilbenzimidazolo nei moduli di ramificazione-1 e -2, rispettivamente. Nel modulo AdoCbl (in basso a sinistra del cerchio), il ligando modificato del 5,6-dimetilbenzimidazolo viene assemblato sull'adenosilcobirato per formare adenosilcobalamina. Gli enzimi evidenziati sono mostrati con riquadri blu o rossi dello stesso colore che indicano rispettivamente le parti della struttura introdotte dal modulo di diramazione. 5-ALA 5-amminolevulinato, acido idrogenobirinic HBA, HBAD idrogenobirinato α , c -diammide, CBAD cob(II)yrinato α , c -diammide, AdoCby adenosilcobirato, AdoCbl, adenosilcobalamina, SAM S-adenosil-L-metionina, SAH

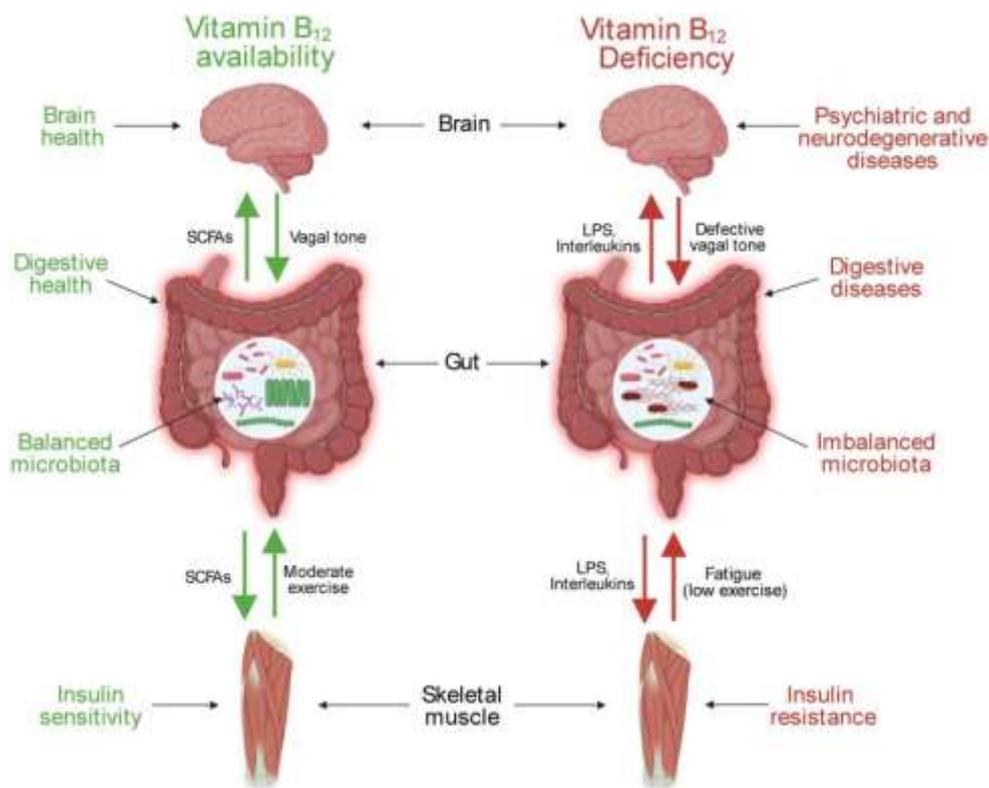
Vitamina B12 e post-Covid -19

Batista KS et al

The role of vitamin B12 in viral infections: a comprehensive review of its relationship with the muscle-gut-brain axis and implications for SARS-CoV-2 infection.

Nutr Rev. 2022 Feb 10;80(3):561-578.

Questa revisione completa stabilisce il ruolo della vitamina B12 come terapia aggiuntiva per le infezioni virali nel trattamento e nei sintomi persistenti di COVID-19, concentrandosi sui sintomi correlati all'asse muscolo-intestino-cervello. La vitamina B12 può aiutare a bilanciare le risposte immunitarie per combattere meglio le infezioni virali. Inoltre, dati provenienti da studi clinici randomizzati e meta-analisi indicano che la vitamina B12 nelle forme di metilcobalamina e cianocobalamina può aumentare i livelli sierici di vitamina B12 e comportare una diminuzione delle concentrazioni sieriche di acido metilmalonico e omocisteina, nonché una diminuzione dell'intensità del dolore, perdita di memoria e compromissione concentrazione.



Tra gli studi, vi sono molte variazioni nelle dosi di vitamina B12, nelle forme chimiche, nei tempi di integrazione e nelle vie di somministrazione.

