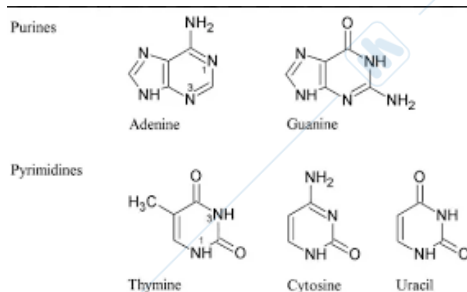


Biochimica funzionale, 20 maggio

Metabolismo di basi azotate e nucleotidi

Basi azotate: purine (guanina e adenina) e pirimidine (citosina, timina e uracile)



Purine: doppio anello

Pirimidine: singolo anello

Per formare i nucleotidi le basi vengono coniugate con lo zucchero, il ribosio; si trova in due possibili forme: il **ribosio classico** e il **deossiribosio** che è tipico del DNA. La struttura base è azotata + zucchero = **nucleoside**

Quando il nucleoside è fosforilato forma il **nucleotide**

Esistono tre forme: *monofosfato, difosfato, trifosfato*

Sia per i ribonucleotidi con il ribosio sia per i deossiribonucleotidi con il deossiribosio. Il pool di nucleotidi e nucleosidi presenti nell'organismo deriva da due differenti sorgenti, una è la sintesi **endogena**, l'altra il contributo **esogeno**. Il contributo esogeno è fornito dai vari nucleotidi e nucleosidi che sono presenti nel cibo che mangiamo; per quanto riguarda la sintesi endogena vi sono due diverse vie per sintetizzare i nucleotidi:

- Via che parte da zero: **sintesi de novo**;
- Via di salvataggio: **meccanismo di riciclo**, importante nel momento in cui vi è un eccesso di nucleotidi in cui alcuni possono venir degradati e altri riciclati;

Negli organismi superiori il principale sito di sintesi dei nucleotidi è il **fegato**, anche se una piccola parte viene sintetizzata un po' ovunque. Dal fegato devono essere distribuiti ai tessuti periferici e questo avviene attraverso il torrente circolatorio, in circolo il fegato rilascia le basi azotate e il ribosio-1-fosfato che vengono poi recuperate dalle cellule che riattaccano le basi azotate al ribosio (via di salvataggio) e poi ottenuto il nucleoside lo fosforila.

Come si recuperano i nucleotidi dagli acidi nucleici che mangiamo?

Abbiamo degli enzimi deputati alla degradazione degli acidi nucleici, prodotti dal **pancreas** che li rilascia nell'**intestino tenue**, la degradazione avviene quindi a livello intestinale.

Lo stomaco si limita alla denaturazione delle molecole degli acidi nucleici, esponendo i legami fosfodiesterici in modo tale che gli enzimi pancreatici possano scindere i singoli nucleosidi.

Gli enzimi che possediamo sono le **nucleasi** che degradano gli acidi nucleici a oligonucleotidi, le **fosfodiesterasi** che separano i singoli mononucleotidi.

Se la quantità di basi azotate supera la necessità delle cellule, queste vengono degradate.

Sintesi de novo

Sono necessari dei precursori da cui partire per sintetizzare i nucleotidi; il primo substrato da cui si parte è il ribosio in una forma attivata: **5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP)**

Il ribosio che serve per la sintesi dei nucleotidi è prodotto attraverso il ciclo dei pentosi ossidando il glucosio. Dal ciclo dei pentosi otteniamo quindi il ribosio-5-fosfato che è poi substrato di un enzima che si chiama 5-fosforibosil-1-pirofosfato sintetasi, che trasferisce il pirofosfato dall'ATP al 5-fosforibosio e lo trasferisce in posizione 1. Tutti gli zuccheri che vengono pirofosforilati in posizione 1 vengono poi indirizzati verso la sintesi dei nucleotidi (de novo). Questa pirofosforilazione ha due significati: da una parte **l'attivazione dello zucchero** a livello del carbonio 1, e dall'altra **l'incanalamento del substrato** in una determinata via metabolica.

L'enzima che sintetizza il 5-fosforibosilpirofosfato dev'essere regolato in maniera **allosterica** e sono inibitori *non competitivi* i nucleotidi AMP e GMP, mentre sono inibitori *competitivi* ADP e 2,3-BPG.

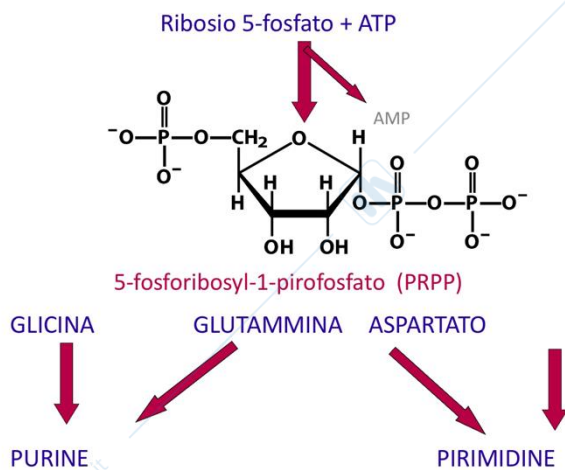
L'ADP compete per l'ATP e il 2,3-BPG per il ribosio. In questo modo la cellula sintetizza **PRPP** solo quando serve, ovvero quando si prepara alla divisione; è stato dimostrato che cellule confluenti contengono basse quantità di PRPP ma nel momento in cui si dividono le quantità aumentano.

Malattia di vonGlerke: glicogenosi, ovvero caratterizzata da accumulo di glicogeno, tra i vari effetti porta ad un aumento di PRPP nella cellula, aumenta il metabolismo sia nella fase anabolica che catabolica del nucleotide. Questo perché la malattia è causata dalla carenza di **glucosio-6-fosfato-fosfatasi**, significa che il fegato non riesce a convertire il glucosio-6-fosfato in glucosio libero e non potrà rilasciarlo nel torrente circolatorio, quindi vi è un accumulo di glucosio-6-fosfato all'interno della cellula, tutte le vie che utilizzano questo glucosio vengono aumentate perché è maggiore la quantità di glucosio, quindi si tenderà a produrre più glucosio, più glicolisi, più ciclo dei pentosi, in questo contesto del metabolismo dei nucleotidi, il glucosio-6-fosfato diventa ribosio-5-fosfato e aumenterà la sintesi di PRPP e di conseguenza la sintesi dei nucleotidi che però supererà la soglia necessaria.

I nucleotidi che una cellula sintetizza non sono solamente quelli che ci servono per fare gli acidi nucleici ma ci sono altri nucleotidi come per esempio il NAD e il FAD e per sintetizzarli le cellule devono utilizzare PRPP.

Per fare le basi azotate ci servono atomi di **carbonio** e **azoto**, i principali composti che forniscono alla biosintesi dei nucleotidi carbonio e azoto sono **glicina**, **glutammina** e **aspartato**.

PRECURSORI NELLA SINTESI DE NOVO

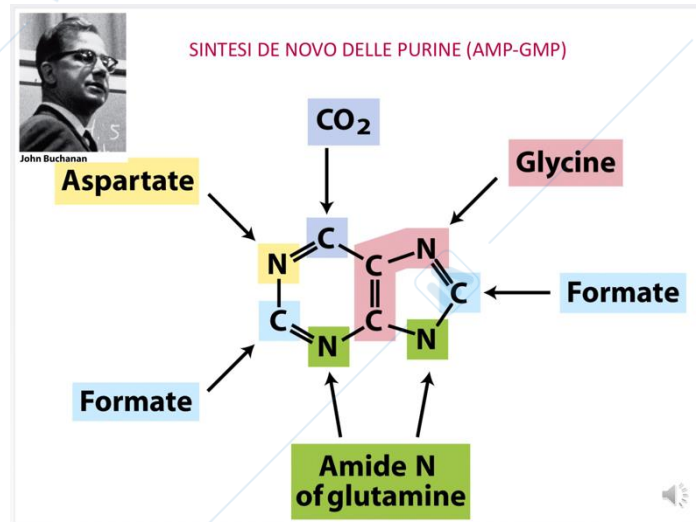


Le basi azotate che costituiscono i nucleotidi vengono costruite usando vie biosintetiche aggiungendo alla molecola che stiamo sintetizzando atomo per atomo, o gruppi piccoli di atomi, grazie a degli esperimenti di marcatura con amminoacidi gli scienziati sono stati in grado di dimostrare da dove deriva ogni singolo atomo di C o N che costituiscono gli anelli delle basi azotate.

Purine: la glicina è l'amminoacido che fornisce il maggior numero di atomi (2 C e 1 N), aspartato e glutammina forniscono gli atomi di azoto e per quanto riguarda gli altri tre atomi di carbonio due sono forniti dal **formiato** e uno dall'**anidride carbonica**.

Questa sintesi procede attraverso **10 reazioni**, gli atomi vengono aggiunti uno alla volta sullo zucchero.

Aggiungendo tutti gli atomi necessari si arriva alla sintesi del primo nucleotide purinico, l'**enosina monofosfato**; la base azotata che costituisce è l'**ipoxantina**.



Trasferimento del gruppo amminico della glutammina sul C1 dello zucchero, il pirofosfato viene scisso e ostruito da NH_2 , amidotransferasi, primo enzima della via di sintesi delle purine, è lo step limitante e punto di regolazione di tutta la sintesi delle purine. Una volta che lo zucchero viene aminato in posizione 1 questo viene deviato dal generico pool di nucleotidi di zuccheri che servono per la sintesi di nucleotidi nella sintesi delle purine. 5-fosfobetaribosilammina

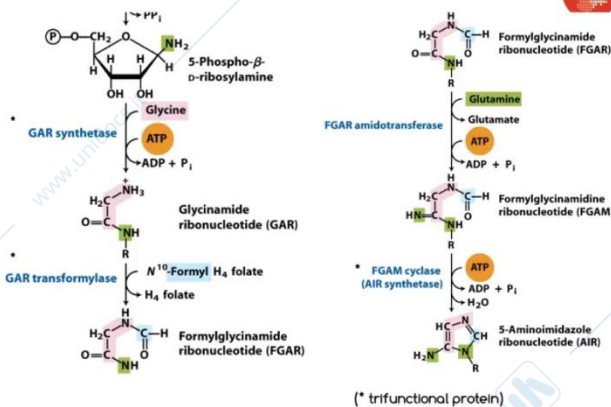
La glicina si lega all' NH_2 , quindi il gruppo carbossilico della glicina reagisce con l' NH_2 della ribosilammina.

Dopo aver inserito tutti e 5 gli atomi dell'anello non possiamo ancora chiuderlo, prima si deve incominciare a sintetizzare il secondo anello.

Si aggiunge un secondo gruppo NH_2 donato dalla glutammina e su questo carbonio carbossilico viene aggiunto l' NH_2 donato. A questo punto si chiude il primo anello.

Si forma un nuovo legame tra l'aldeide e l' NH , ci serve ATP, la molecola d'acqua esce e si forma così il composto 5-aminoimidazolo.

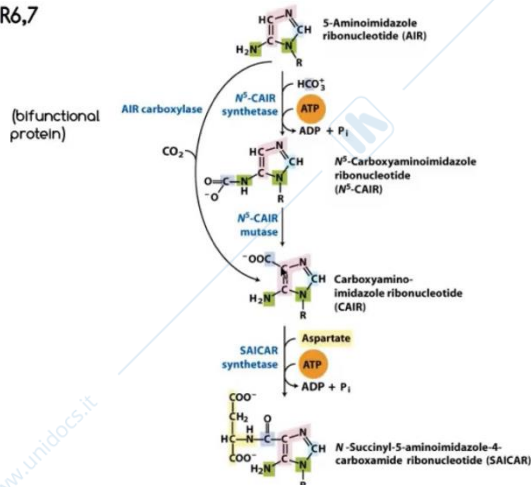
R2-b



Nell'uomo e negli organismi superiori, gli enzimi indicati con un asterisco fanno parte di una proteina trifunzionale; nei batteri e negli organismi meno evoluti questi sono distinti, e si ritiene che il fatto che il tutto sia catalizzato da un enzima trifunzionale permetta l'incanalamento dei substrati; la ribosilammina si lega all'enzima, subisce le trasformazioni senza dover essere rilasciata e legare un altro enzima. Questo rende efficiente la sintesi della molecola.

Il 5-amminoacili-imidazolo-ribonucleotide deve venire carbossilato, il donatore di C è la CO₂ o il bicarbonato e il prodotto che vogliamo ottenere è questo:

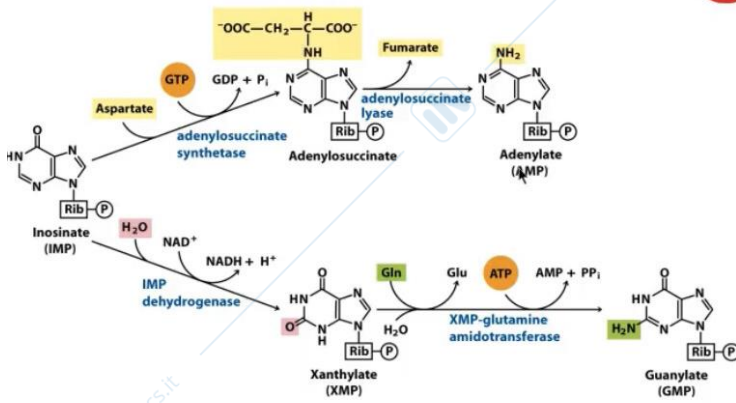
R6,7



Vengono utilizzati diversi enzimi per ottenere la sintesi di questo intermedio. Nei batteri sono presenti due diversi enzimi, il primo inserisce il gruppo carbossilico.

Sintesi di AMP e GMP da IMP

Servono a convertire l'inosinato in **adenilato** e **guanilato**.



La struttura dell'inosinato differisce dall'adenilato per la presenza di un chetone e di un NH₂. Il processo è semplice perché l'NH₂ è donato dall'aspartato.

- **Condensazione** dell'aspartato sull'anello della base: adenilo- succinato
- **Lisi** del legame con liberazione di fumarato e formazione di AMP

Questa reazione necessita di energia metabolica e viene fornita dall'idrolisi di un GTP.

La sintesi del guanilato

Si inserisce un ossigeno → ossidazione, necessita una **deidrogenasi**. L'ossigeno è fornito da una molecola d'acqua e gli equivalenti riducenti sono raccolti dal NADH, si forma così lo xantilato o xantina monofosfato. L'ossigeno introdotto viene sostituito da un gruppo amminico, il donatore è la glutammina che grazie ad una amminotransferasi dona il gruppo amminico che viene trasferito sull'anello.

Richiede energia metabolica che viene fornita dall'idrolisi dell'ATP.

GTP e ATP sono due molecole con più funzioni all'interno della cellula, sono idrolizzabili per produrre energia metabolica ma sono anche il nucleotide finale che può essere utilizzato per la sintesi degli acidi nucleici. Nel momento in cui siamo a inosinato e si vuole sintetizzare AMP che poi darà ATP, l'energia metabolica la si prende dal GTP, d'altro canto se si vuole sintetizzare GTP si userà come energia metabolica ATP.

Regolazione della sintesi delle purine

Quando si parla di sintesi delle purine oltre alla regolazione della sintesi di PRPP ci sono dei meccanismi che servono a regolare la sintesi solo delle purine, data la disponibilità di zucchero. Il primo enzima è quello regolato, ovvero la PRPP amidotransferasi, e presenta due conformazioni, una attiva e una inattiva. Quella attiva è monomerica, quella inattiva dimerica. Il passaggio da una conformazione all'altra è modulato da una serie di modulatori allosterici.

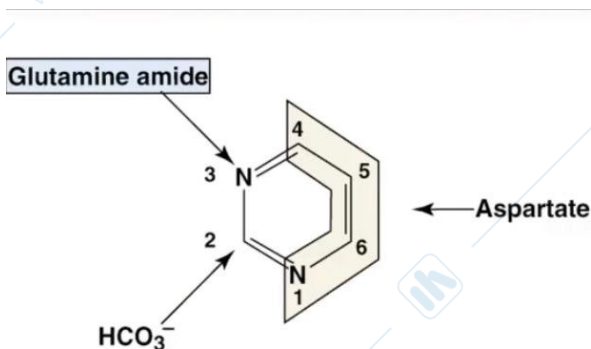
L'enzima è attivato dal substrato PRPP che si lega al sito attivo e al sito allosterico, quando è presente l'enzima passa dalla forma monomerica alla forma dimerica ed è inibito allostericamente dai prodotti della via metabolica, ovvero i tre nucleotidi monofosfato IMP, GMP e AMP.

Queste molecole sono in grado di inibire in maniera additiva l'attività dell'enzima.

Meccanismo di regolazione a feedback negativo

Il GMP e AMP inibiscono la loro stessa sintesi e vi sono due modulatori positivi ovvero il GTP e ATP, che vanno ad agire in maniera incrociata. ATP attiva la conversione di IMP in GMP e il GTP promuove la conversione di IMP in AMP, questo serve a bilanciare la quantità di purine che vengono sintetizzate.

Sintesi de novo delle pirimidine



La struttura della pirimidina è più semplice, ha meno atomi di carbonio.

Ha tre sorgenti:

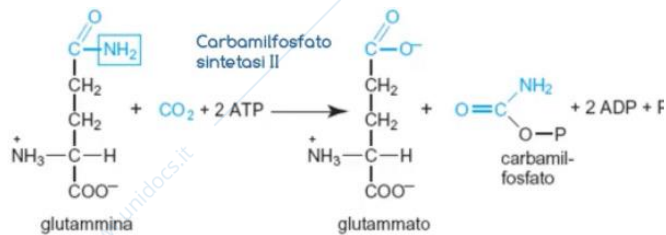
- Un C fornito dal bicarbonato;
- Un N fornito dalla glutammina;
- 3 C e 1 N forniti dall'aspartato, principale contributore di atomi per la sintesi delle pirimidine;

Viene prima costruito l'anello base della pirimidina e poi viene legato al PRPP, i prodotti finali della biosintesi sono i nucleotidi trifosfato: UTP e CTP

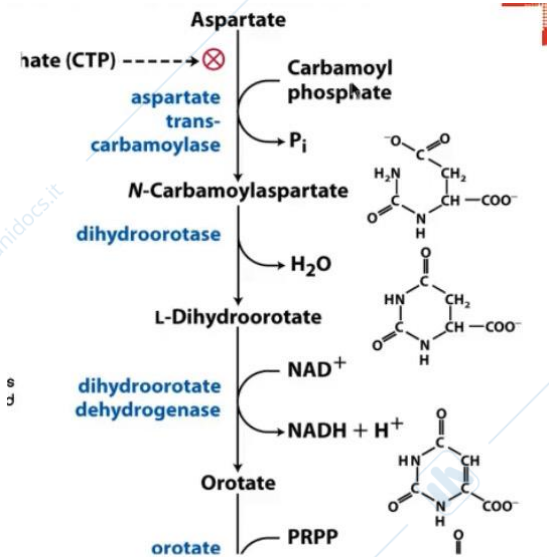
1. La **glutammina** reagisce con CO₂ e 2 ATP per mezzo della **carbamilfosfato sintetasi II (CPS II)** dando origine a **carbamilfosfato**, **2 ADP+Pi** e **glutammato**. La CPS II è inibita da UTP ma attivata da PRPP e da ATP. È l'unico enzima che sintetizza carbamilfosfato al di fuori del fegato, ma anche nel fegato quando è in corso un'intossicazione da ammoniaca CPS I (che è mitocondriale) produce carbamilfosfato e questo dopo tre reazioni è trasformato in orotato che viene espulso con l'urina. È inoltre il più importante sito di regolazione della sintesi delle pirimidine.
2. Il carbamilfosfato reagisce con **aspartato** per mezzo della **aspartato carbamiltransferasi** per dare N-carbamilaspartato e fosfato inorganico.
3. L'**N-carbamilaspartato** viene trasformato dalla **diidroorotasi** in **diidroorotato**. Gli enzimi delle tappe 1, 2 e 3 si trovano su un unico complesso proteico detto CAD.
4. Il **diidroorotato** reagisce con il NAD⁺ per mezzo della diidroorotato deidrogenasi per dare **orotato** (acido orotico) e **NADH+H⁺**. L'enzima diidroorotato deidrogenasi è mitocondriale (unica tappa mitocondriale delle sei).
5. L'orotato reagisce con PRPP per mezzo della orotato fosforibosiltransferasi e da **orotidina-5-monofosfato (OMP)** e **pirofosfato**.
6. L'OMP è decarbossilata perdendo CO₂ dalla OMP decarbossilasi e trasformata in **uridina-5-monofosfato (UMP)**. L'orotato fosforibosiltransferasi e l'OMP decarbossilasi si trovano su un unico complesso proteico, l'UMP sintasi, la cui deficienza provoca aciduria orotica ereditaria. L'OMP decarbossilasi è inibita da UMP, cioè dal suo prodotto.

L'UMP reagisce con ATP per mezzo dell'UMP chinasi per dare uridina-5-trifosfato (UTP) e ADP+P. L'UTP reagisce con la glutammina e ATP per mezzo della CTP sintetasi per dare citosina-5-trifosfato (CTP), ADP+P e glutammato. La glutammina serve per donare un gruppo amminico a UTP, attaccato alla molecola dall'enzima. Lo stesso CTP inibisce la CTP sintetasi quando in eccesso, regolandola e regolando anche il rapporto tra UTP e CTP all'interno della cellula.

Il carbamilfosfato viene condensato con l'aspartato per azione di un'attività enzimatica che si chiama aspartato trans-carbamilasi. Negli organismi superiori fa parte di un enzima trifunzionale, in quelli inferiori è un enzima a sé stante.



| | CPS I | CPS II |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| Localizzazione cellulare | Mitocondri | Citosol |
| Via metabolica coinvolta | Ciclo dell'urea | Sintesi delle pirimidine |
| Fonte degli atomi di azoto | Ammoniaca | Gruppo γ-ammidico della glutammina |
| Regolatori | Attivatore: N-acetil-glutamato | Inibitore: UTP Attivatore: ATP |



La sintesi delle pirimidine è sequenziale, quella delle purine avviene in parallelo.

Regolazione della sintesi delle pirimidine

È regolata in maniera allosterica, si hanno una serie di regolazione a feedback negativo, portate avanti dai vari prodotti finali della reazione, in particolare UTP e CTP, ma anche UDP può inibire l'attività della carbamilfosfato sintetasi-2. Nell'uomo l'intera proteina trifunzionale che serve a far partire l'intera sintesi dei nucleotidi. A questa si aggiunge l'inibizione da parte dell'UMP sulla sua stessa sintesi, in questo modo se non servono nucleotidi pirimidinici la sintesi si ferma alla sintesi dell'orotato monofosfato. Il PRPP agisce da attivatore di questa via, se c'è lo zucchero viene stimolata la sintesi dei nucleotidi e a questa attività positiva si aggiunge l'attività di modulatore positivo portato avanti dall'ATP.

L'ATP ha un doppio ruolo poiché fornisce energia metabolica e agisce da messaggio di abbondanza di nucleotidi purinici, per cui se nella cellula ci sono tanti nucleotidi purinici significa che sono in disequilibrio tra purine e pirimidine e viene stimolata la sintesi delle pirimidine anche se queste sono già presenti nella cellula. Per sintetizzare gli acidi nucleici è necessario che siano presenti tutti e quattro in concentrazioni adeguate. Le purine possono quindi spingere la sintesi delle pirimidine.

Sintesi dei nucleotidi trifosfati

Per sintetizzare l'RNA, l'RNAsintasi utilizza i nucleotidi trifosfato; per le pirimidine sono già state sintetizzate trifosfato e sono già pronte, per quanto riguarda i nucleotidi purinici sono stati sintetizzati monofosfato e devono essere convertiti in trifosfato. Questo si ottiene grazie all'azione combinata di due enzimi che nella cellula sono in grado di riequilibrare le concentrazioni dei 4 nucleotidi nelle varie forme fosforilate in modo tale da soddisfare le esigenze della cellula.

Vi è un enzima nucleoside monofosfato chinasi base-specifica, che riconosce AMP e GMP e utilizza ATP per fosforilare i nucleotidi monofosfato; a questo punto i nucleotidi difosfato sono substrati di una chinasi che è specifica per tutti i nucleotidi difosfato che consumando ATP li converte in nucleotidi trifosfato.

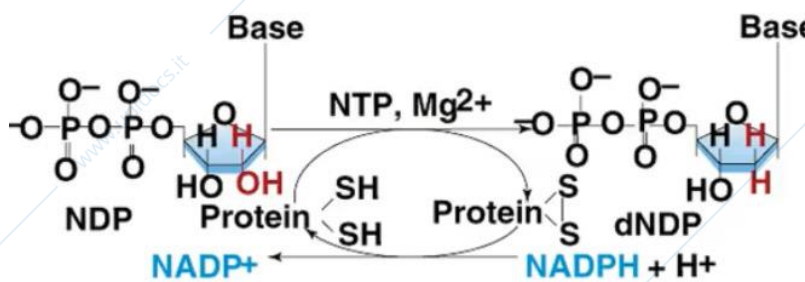


Qual è il processo metabolico che genera l'ATP da usare come moneta energetica? **Fosforilazione ossidativa**

Sintesi dei deossiribonucleotidi

I deossiribonucleotidi vengono sintetizzati per riduzione dei ribonucleotidi, gli organismi possiedono un enzima, il ribonucleotidi riduttasi, in genere esiste un solo tipo di enzima per la riduzione di tutti e quattro i ribonucleotidi

Isotipo I:



Presente nell'uomo e principale degli organismi inferiori. In questi ultimi esistono altre due isoforme e cambiano per il tipo di substrato. La 1 usa i ribonucleotidi difosfato, le altre isoforme sono in grado di usare anche i nucleotidi trifosfato.

La ribonucleotidi riduttasi riduce il carbonio 2 dello zucchero da gruppo ossidrilico dell'OH a due idrogeni (CH₂), per compiere questa azione servono degli equivalenti riducenti, forniti dal NADPH ma non passano direttamente da lì al substrato, perché i potenziali di riduzione sono troppo diversi. Esistono delle piccole catene di trasporto di questi equivalenti riducenti, ne esistono due, presenti nella stessa cellula.

- **Ribonucleotidi riduttasi:** possiede due cisteine nel sito attivo, che sono le effettive donatrici di equivalenti riducenti, i due H vengono passati dall'enzima al substrato così facendo si forma un ponte disolfuro, la prima catena di trasporto utilizza come componenti una tioredossina riduttasi che contiene FAD, la tioredossina che contiene titoli liberi;
- **Donatore di equivalenti riducenti:** usa glutaredossina, che contiene titoli liberi o la forma disolfuro, la riduttasi si chiama glutaredossina riduttasi e questa usa glutatone;

