

Prof. Giorgio Sartor

# Metabolismo dei nucleotidi

**1: introduzione**

**2: biosintesi de-novo delle purine**

3: biosintesi de-novo delle pirimidine

4: catabolismo delle purine

5: catabolismo delle pirimidine

6: sintesi deossiribonucleotidi

7: regolazione della sintesi deossiribonucleotidi

Copyright © 2001-2013 by Giorgio Sartor.  
All rights reserved.

N01 - Versione 0.2 - may 2013

## A cosa servono i nucleotidi

- **Informazione:**
  - Acidi nucleici: RNA e DNA (NMP; dNMP → NTP; dNTP)
- **Sintesi proteica e regolazione:**
  - Acidi nucleici: mRNA, tRNA, smRNA...
- **Trasporto di energia:**
  - ATP (GTP), ADP, AMP
- **Metabolismo:**
  - UTP, ATP
- **Segnali intracellulari:**
  - cAMP, cGMP
- **Trasporto di equivalenti ridotti:**
  - NAD<sup>+</sup>/NADH, NADP<sup>+</sup>/NADPH, FAD/FADH<sub>2</sub>
- **Trasporto di acili:**
  - CoA
- ...

V.0.2 © gsartor 2001-2013

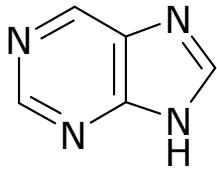
Metabolismo dei nucleotidi

- 2

## Le basi azotate

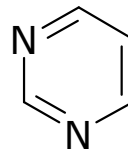
- PURINE

- Adenina
- Guanina
  
- *Inosina*
- *Xantina*



- PIRIMIDINE

- Uridina
- Ciditina
- Timidina
  
- *Orotidina*



V.0.2 © gsartor 2001-2013

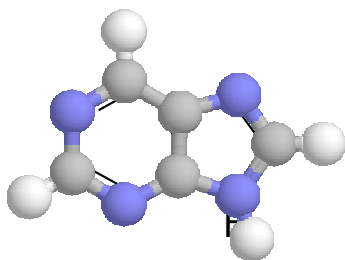
Metabolismo dei nucleotidi

- 3

## Le basi azotate

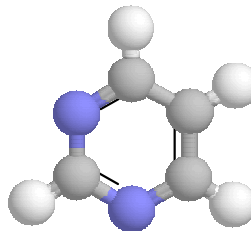
- PURINE

- Adenina
- Guanina
  
- *Inosina*
- *Xantina*



- PIRIMIDINE

- Uridina
- Ciditina
- Timidina
  
- *Orotidina*



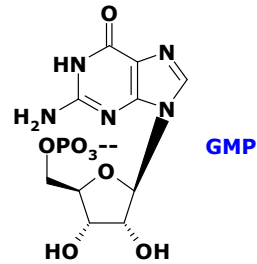
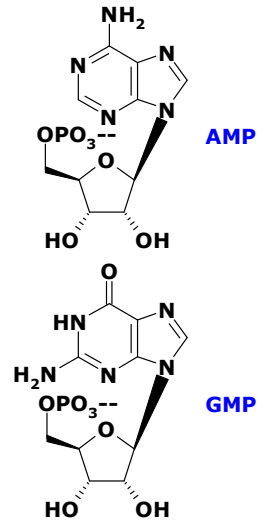
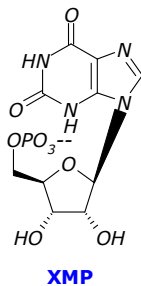
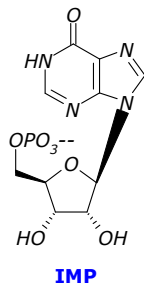
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 4

## Nucleotidi purinici

- Adenosinmonofosfato (AMP)
- Guanosinmonofosfato (GMP)
- Inosinmonofosfato (IMP)
- Xantinmonofosfato (XMP)

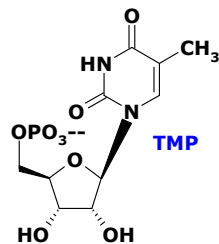
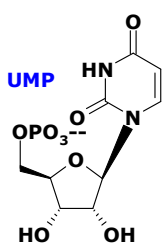


V.0.2 © gsartor 2001-2013

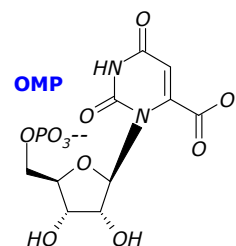
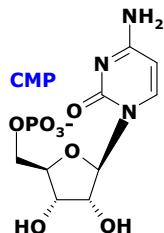
Metabolismo dei nucleotidi

- 5

## Nucleotidi pirimidinici



- Uridinmonofosfato (UMP)
- Timidinmonofosfato (TMP)
- Ciditinmonofosfato (CMP)
- Orotidinmonofosfato (OMP)

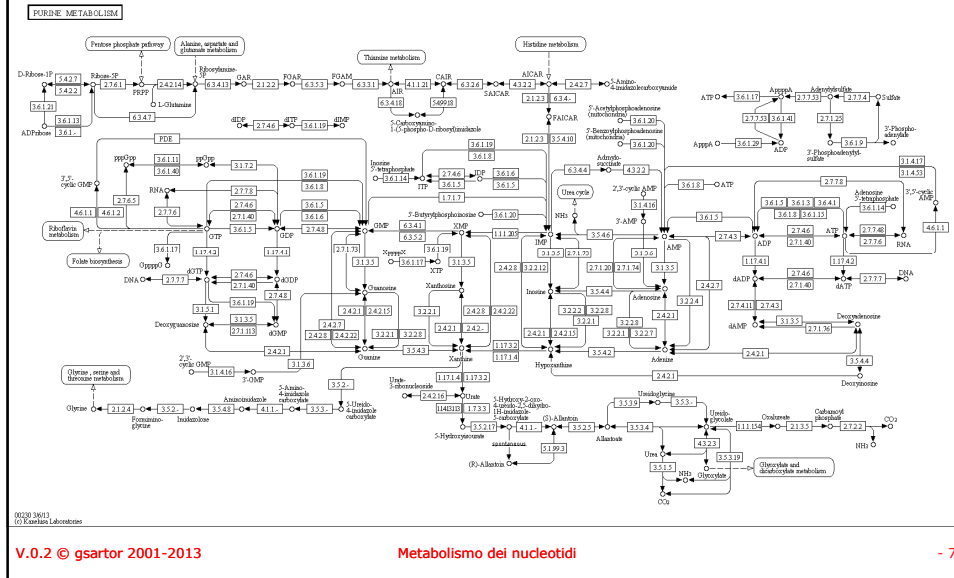


V.0.2 © gsartor 2001-2013

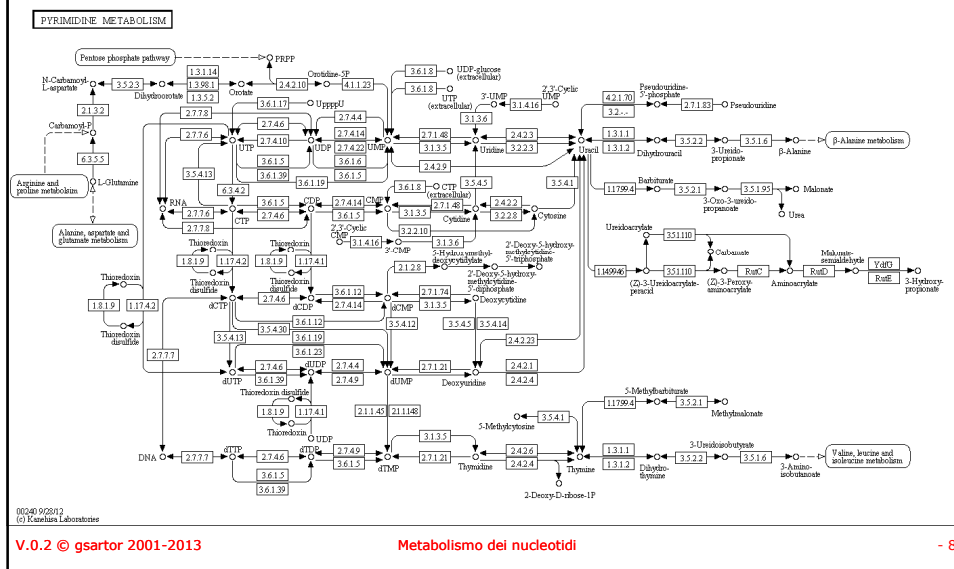
Metabolismo dei nucleotidi

- 6

# Metabolismo delle Purine

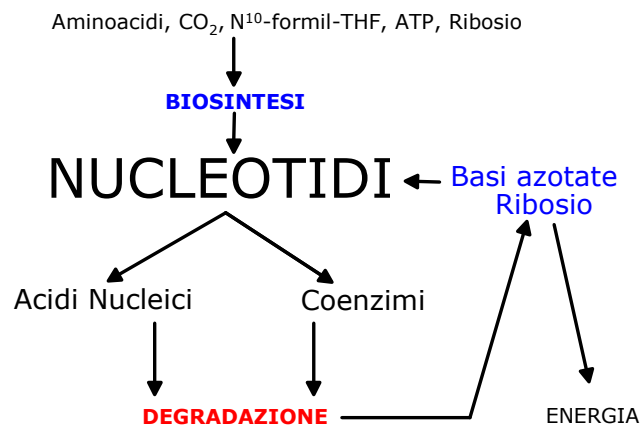


# Metabolismo delle Pirimidine



## Sintesi *de-novo*

- Quasi tutti gli organismi sintetizzano nucleotidi da zero:



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 9

## Chi sintetizza nucleotidi *de-novo*

- Tutte le cellule che proliferano!
  - Linfociti
  - Batteri
  - Tumori
  - ...
- *Le vie metaboliche di sintesi de-novo dei nucleotidi sono il bersaglio di farmaci antibatterici e antitumorali.*

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 10

## Sintesi *de-novo*

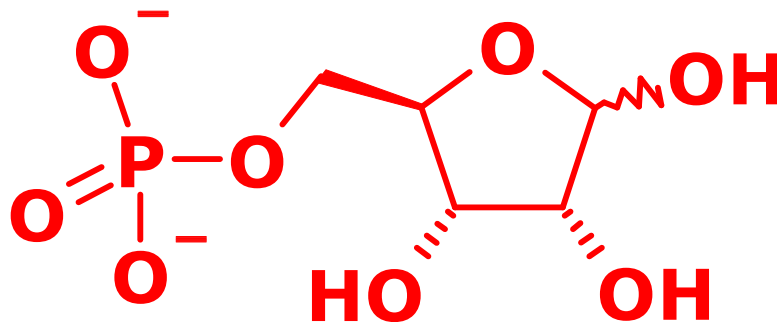
- Diversa strategia:
  - Nucleotidi purinici
    - La sintesi *de-novo* dei nucleotidi purinici avviene attraverso la costruzione dell'anello purinico sul ribosio-5-P per formare INOSINA MONO FOSFATO (**IMP**);
  - Nucleotidi pirimidinici
    - La sintesi *de-novo* dei nucleotidi pirimidinici avviene attraverso la sintesi di una pirimidina (OROTATO) e, quindi, legame al ribosio-5-P con conversione in URIDIN MONO FOSFATO (**UMP**)

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 11

## $\alpha$ -ribosio-5-fosfato



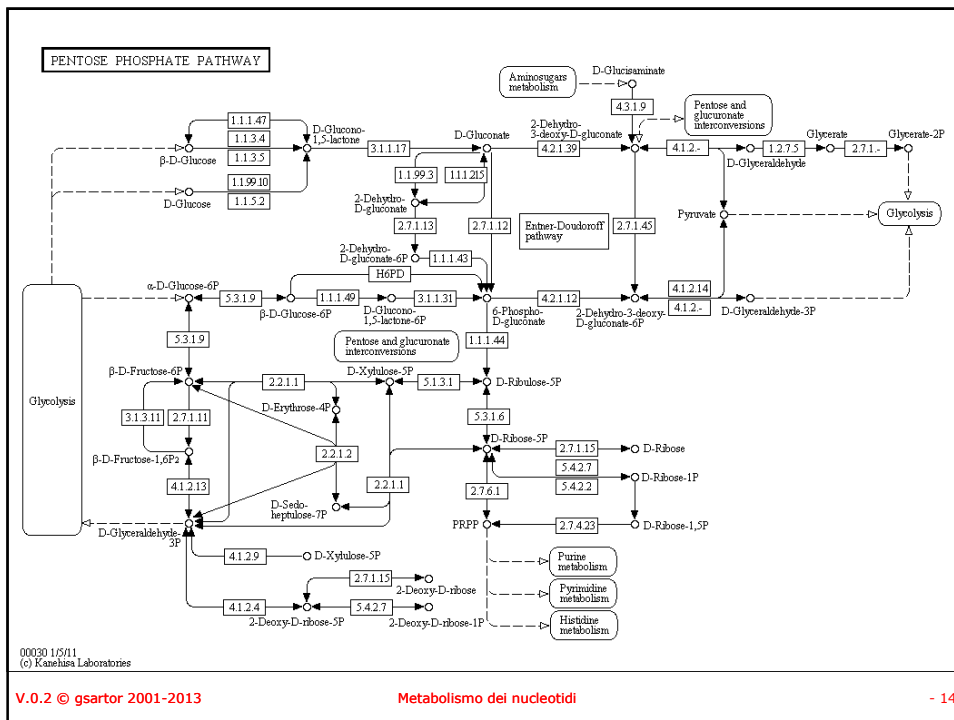
V.0.2 © gsartor 2001-2013

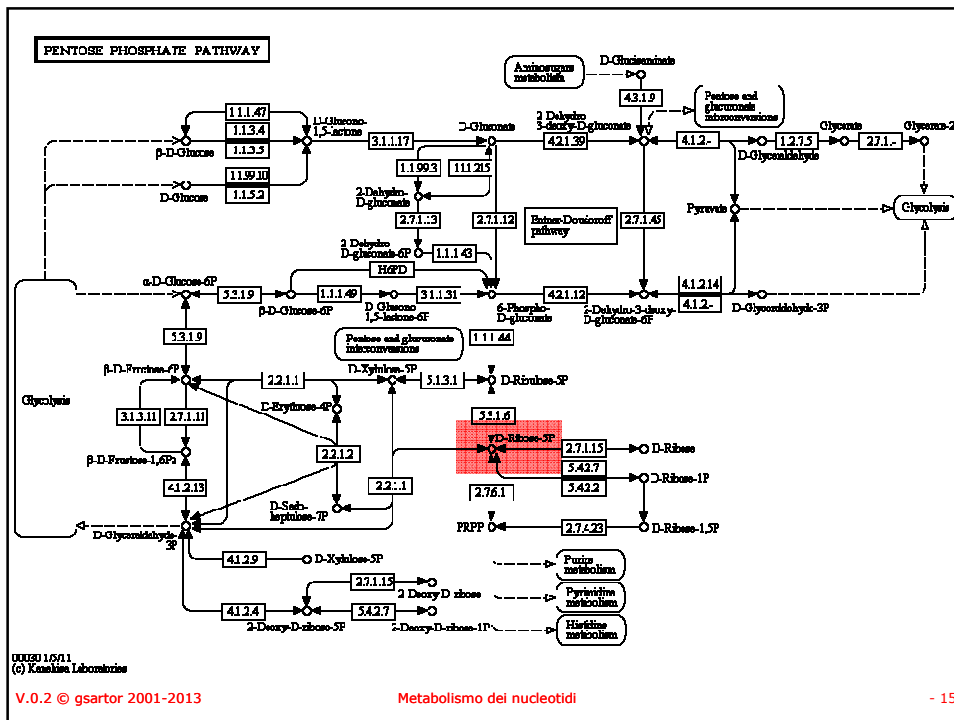
Metabolismo dei nucleotidi

- 12

# Via dei pentosi fosfati

- A secondo dei bisogni della cellula la via dei pentosi fosfati opera in vari modi per massimizzare la concentrazione dei diversi prodotti:
- **riboso-5-fosfato**, **NADPH**, e **ATP**,

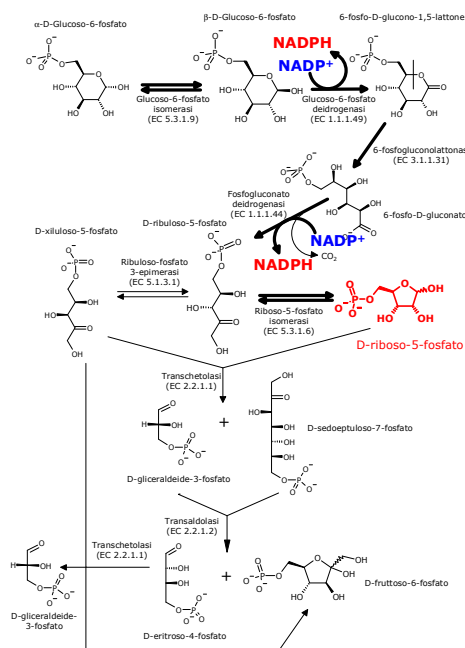




- 15

## Sintesi di riboso-5-P e NADPH

- Duplicazione cellulare.
  - Il ribuloso-5-fosfato viene convertito in riboso-5-fosfato, necessario per la sintesi di nucleotidi e acidi nucleici.
  - Viene anche prodotto del NADPH.



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 16



Prof. Giorgio Sartor

# Metabolismo dei nucleotidi

2: biosintesi de-novo delle purine

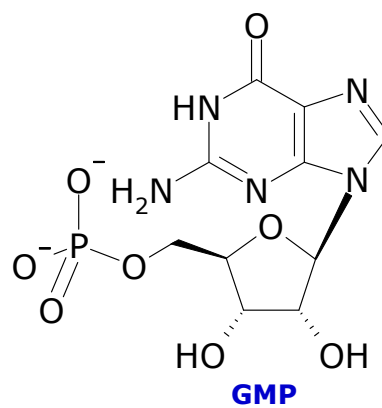
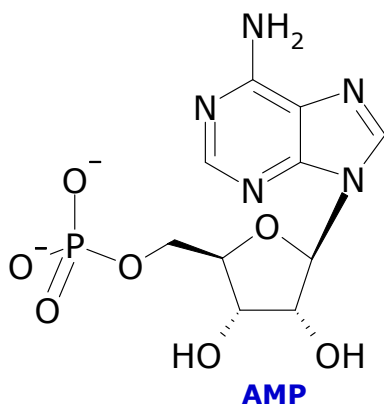


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 17

## BIOSINTESI delle PURINE

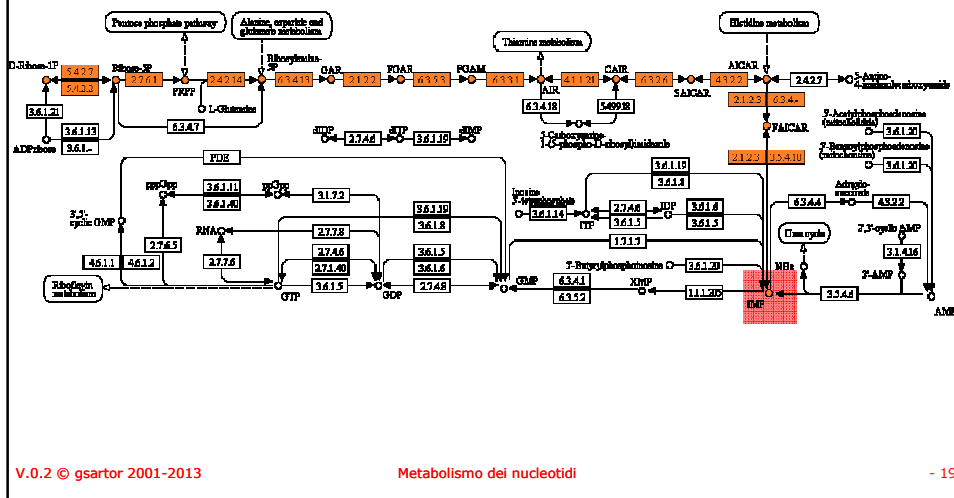


V.0.2 © gsartor 2001-2013

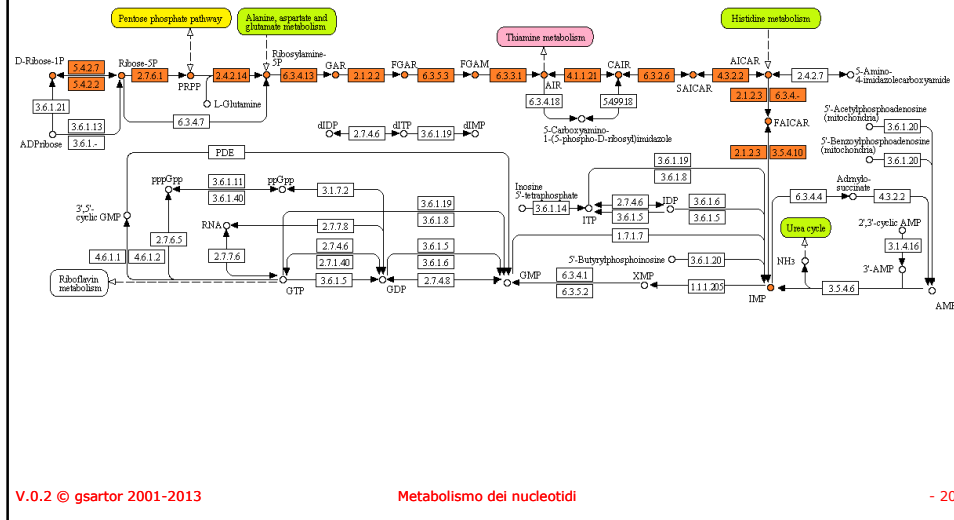
Metabolismo dei nucleotidi

- 18

# Purine



# Purine



## Metabolismo purinico

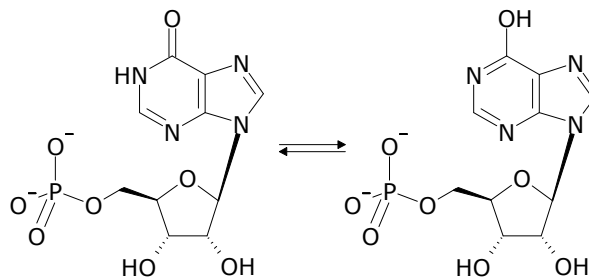
- I nucleotidi purinici sono sintetizzati sia a partire da precursori più semplici attraverso la **biosintesi de-novo**, sia mediante il riutilizzo delle basi azotate e dei nucleosidi attraverso le **vie di recupero**.
- L'IMP gioca un ruolo centrale nel metabolismo purinico in quanto è sia il prodotto della **biosintesi de-novo** che un intermedio metabolico necessario alla sintesi dell'AMP e del GMP.
- Un altro substrato chiave è il  $\alpha$ PRPP che è coinvolto sia nelle prime tappe della **biosintesi de-novo**, sia nelle **vie di recupero** delle basi puriniche.

## Metabolismo purinico

- La **biosintesi de-novo** delle purine avviene principalmente nel fegato;
- altri tessuti, nei quali la **biosintesi de-novo** è meno rappresentata (cervello) o del tutto assente (globuli rossi), dipendono dal fegato per fabbisogno di purine e si riforniscono di nucleotidi purinici attraverso le vie di recupero;
- il globulo rosso svolge un ruolo importante in questo processo in quanto incorpora le purine nel fegato e le cede agli altri tessuti.

## Biosintesi dei nucleotidi purinici

- La sintesi dei nucleotidi purinici (AMP e GMP) avviene attraverso la sintesi dell'intermedio comune
- IMP – inosinmonofosfato

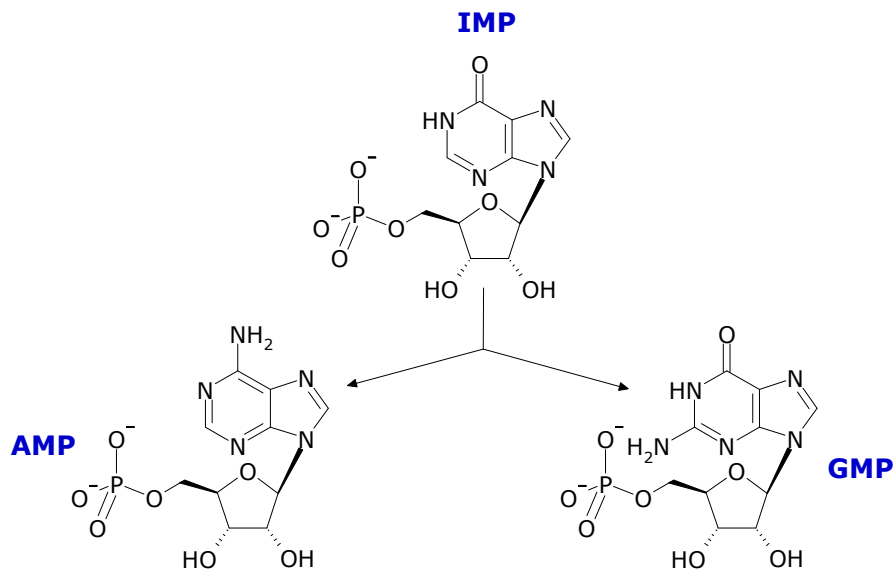


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 23

## Biosintesi dei nucleotidi purinici

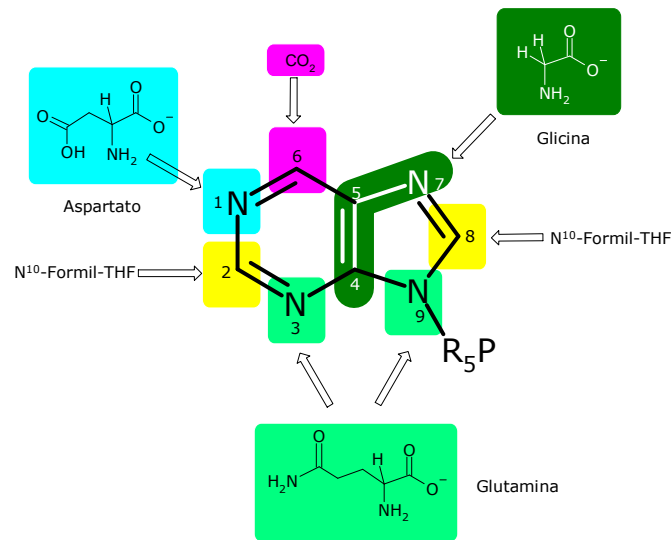


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 24

## Biosintesi del nucleo purinico



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 25

## Biosintesi IMP

### • Undici reazioni

- Tre reazioni per convertire il *riboso-5-P* a *fosforibosil glicinamide (GAR)*. L'azoto proviene da **Gln**. Si usano tre molecole di **ATP**: una per formare αPRPP (ad AMP), una per attivare la **Gln** e una per attivare la **Gly**;
- Quattro reazioni per la costruzione dell'anello a cinque termini *aminoimidazolo carbossilato (FGAR, FGAM, AIR, CAIR)* usando **<sup>10</sup>N-Formil-THF**, **Gln**, **CO<sub>2</sub>**. Si usano due molecole di **ATP**: una per usare la **Gln** e una per chiudere l'anello;
- Quattro reazioni per la chiusura dell'anello purinico dell'IMP (*SAICAR, AICAR, FAICAR*) usando, **Asp**, **<sup>10</sup>N-Formil-THF** e una molecola di **ATP** per usare **Asp**.

### • Si consumano sette legami P~O~P

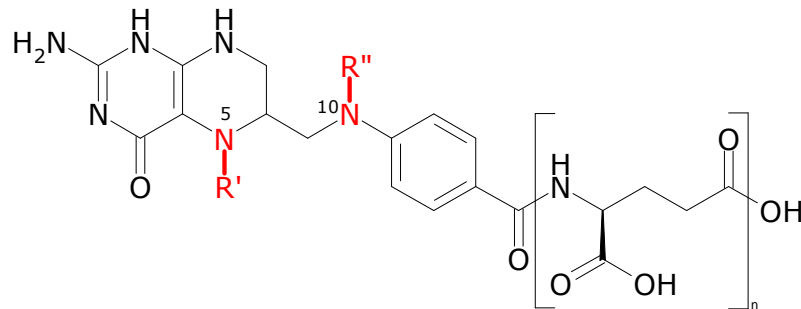
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 26

## Tetraidrofolato (THF)

- La sintesi avviene attraverso la cessione di unità monocarboniose veicolate dal tetraidrofolato (THF).



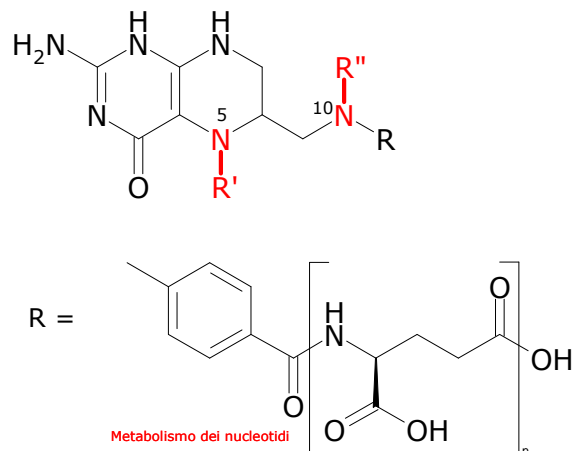
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 27

## Tetraidrofolato (THF)

- La sintesi avviene attraverso la cessione di unità monocarboniose veicolate dal tetraidrofolato (THF).

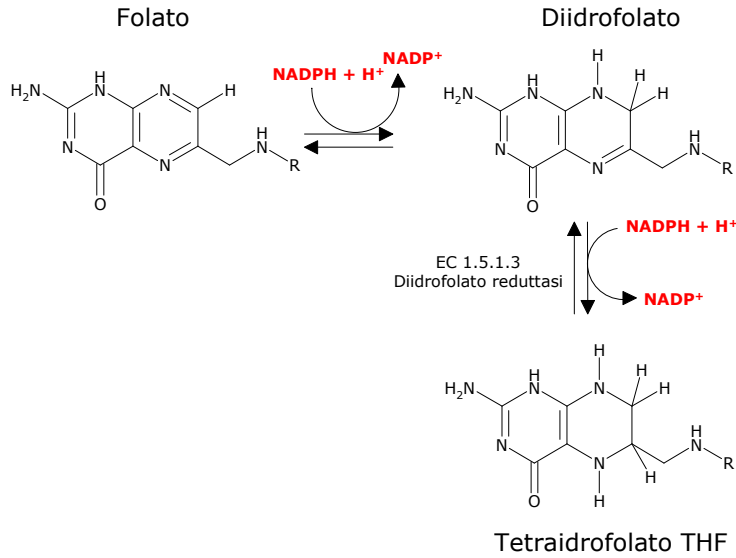


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 28

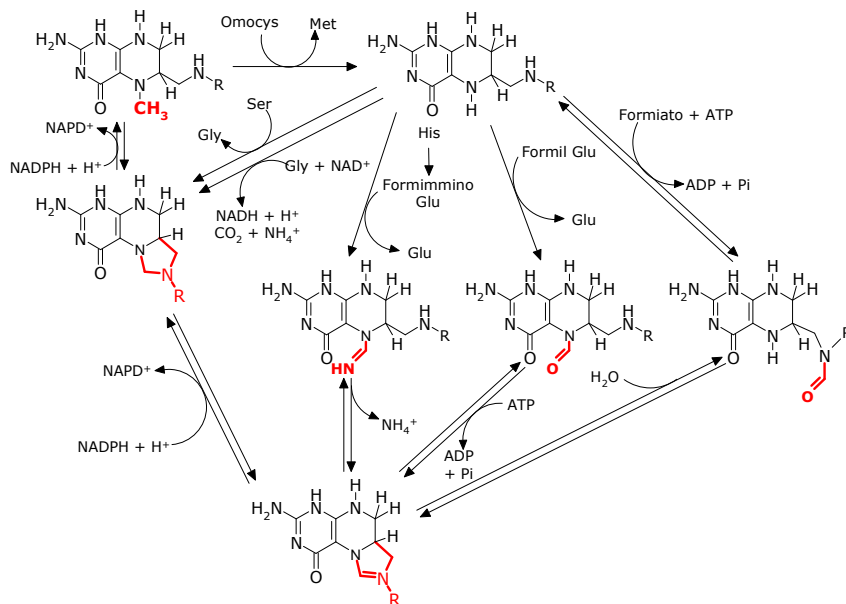
# Sintesi del THF



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

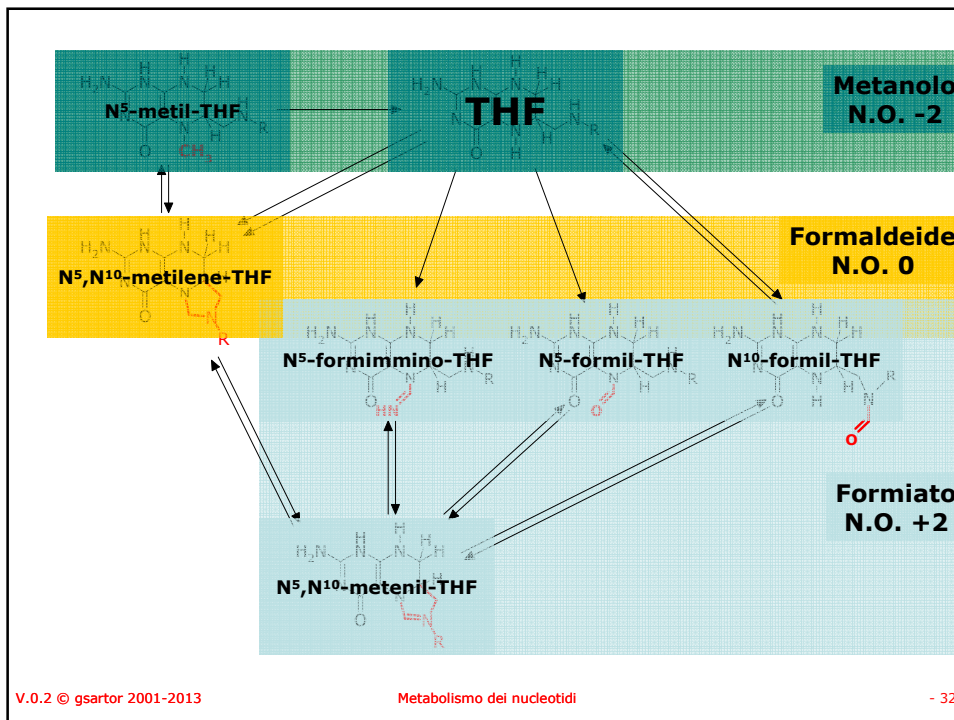
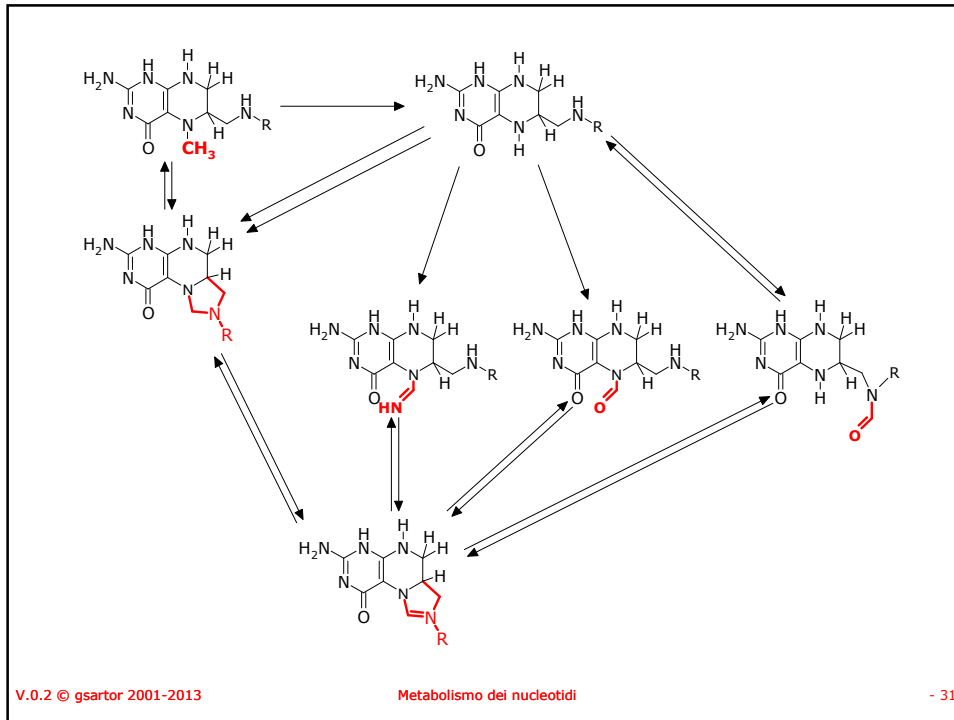
- 29



V.0.2 © gsartor 2001-2013

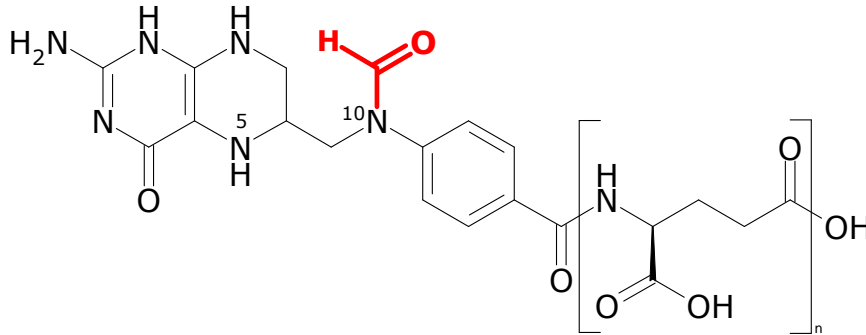
Metabolismo dei nucleotidi

- 30





## N<sup>10</sup>-formil-THF



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 33

## Folato

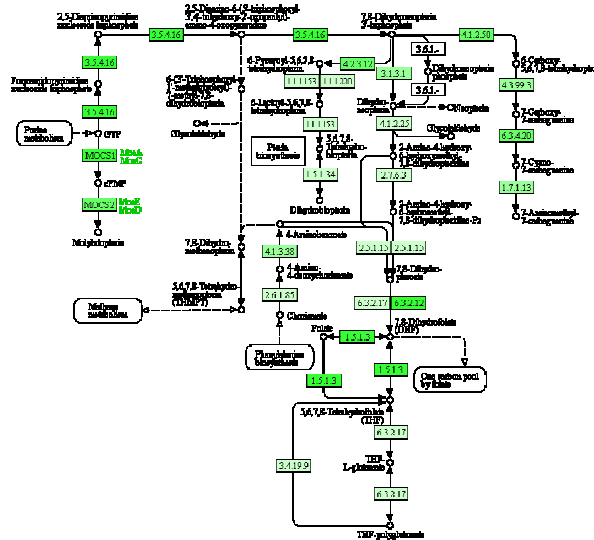
- Il folato è necessario per la sintesi, la riparazione e la metilazione degli acidi nucleici
- I mammiferi non possono sintetizzare folato de-novo;
- I batteri sono sensibili agli inibitori della sintesi del folato (Sulfonamidi);

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 34

# Biosintesi del folato



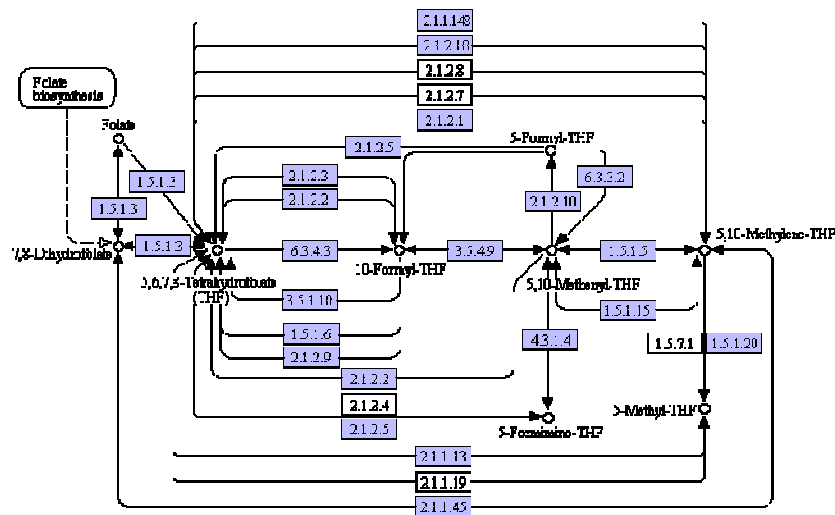
[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko00790](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00790)

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 35

# Pool del folato



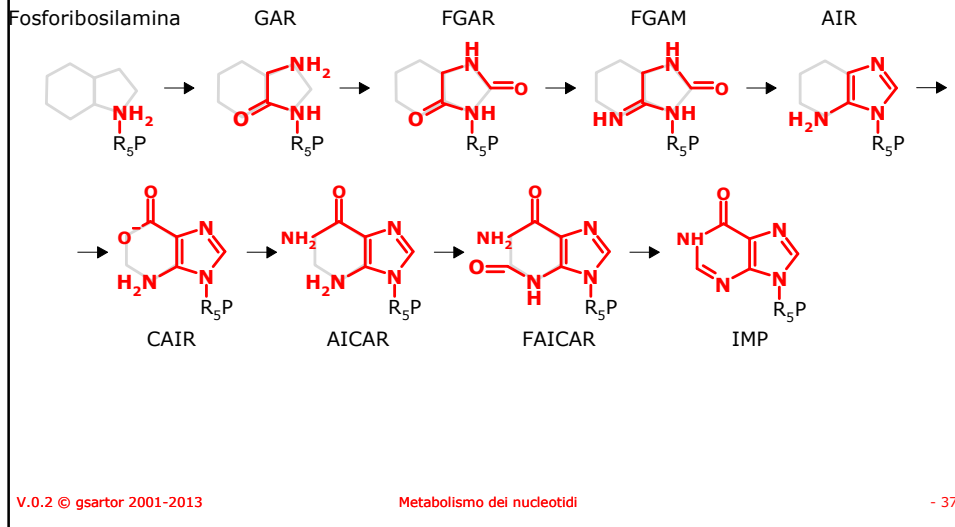
[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?ko00670](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00670)

V.0.2 © gsartor 2001-2013

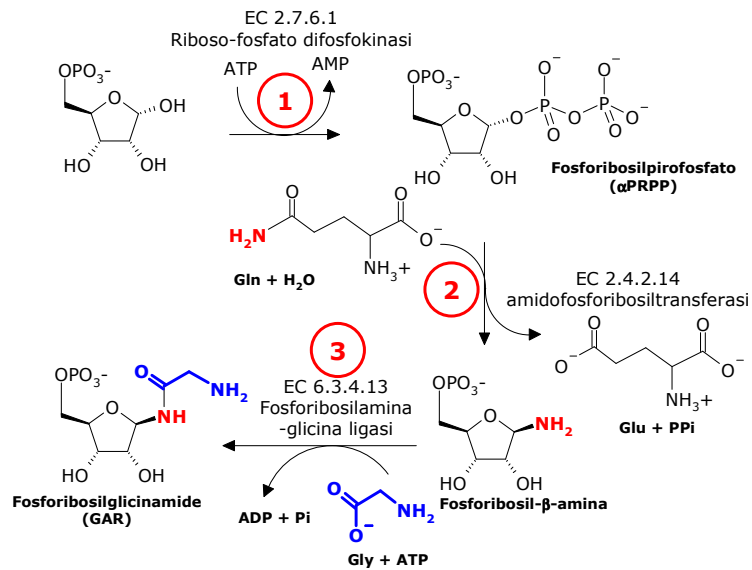
Metabolismo dei nucleotidi

- 36

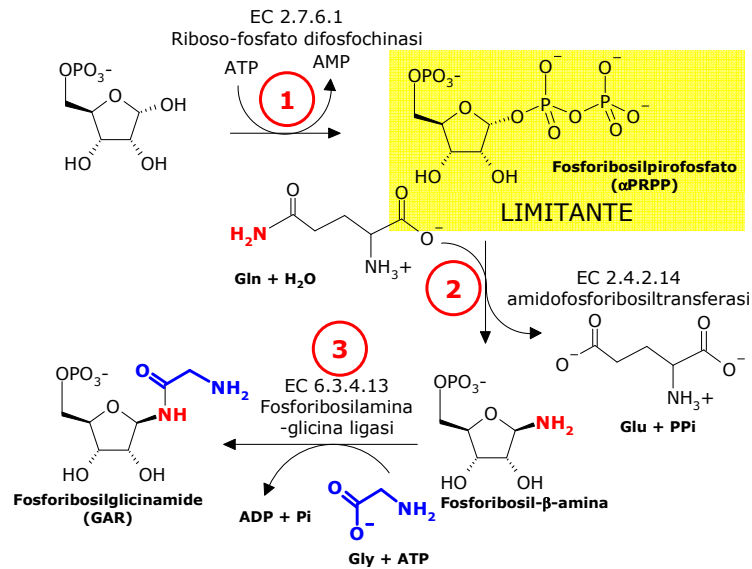
# Costruzione dell'IMP



## Tre reazioni per convertire il Riboso-5-P a fosforibosilglicinamide (GAR)



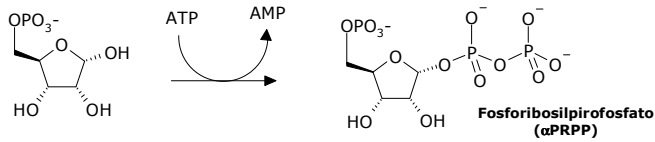
### Tre reazioni per convertire il Riboso-5-P a fosforibosilglicinamide (GAR)



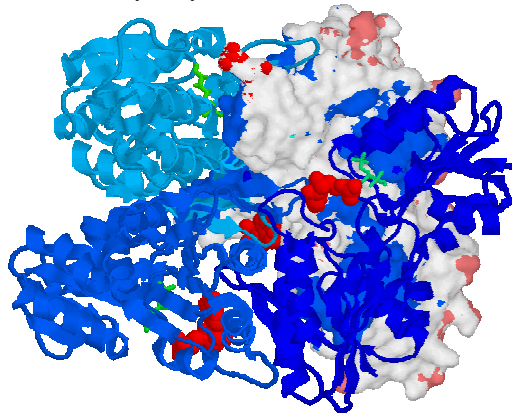
## Controllo

- Il prodotto fosforibosilpirofosfato (αPRPP) è il prodotto limitante;
- Il pirofosfato che si forma viene convertito in due ioni fosfato;
- Nella formazione della ribosilammina vi è inversione della configurazione di C<sup>1</sup> del ribosio che passa da α a β;
- La configurazione β di C<sup>1</sup> viene mantenuta in tutti i nucleotidi.

## 1. Riboso-fosfato difosfochinasi (EC 2.7.6.1)



- È presente sia come esamero (*B. subtilis*) che come tetramero (*Methanocaldococcus jannaschii*, 1U9Z)



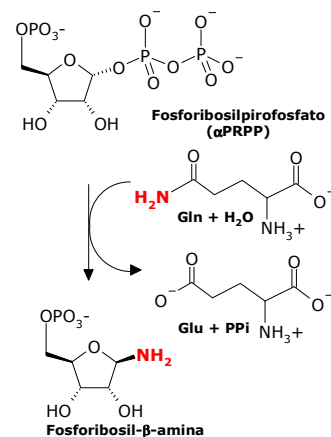
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

1U9Z - 41

## 2. Amidofosforibosiltransferasi (EC 2.4.2.14)

- La sintesi dei nucleotidi purinici è regolata, in parte, dai prodotti finali attraverso l'inibizione di amidofosforibosiltransferasi.
- Lo studio della struttura ternaria del complesso Enzima:ADP:GMP ha determinato che:
- ADP si lega nel sito allosterico A
- GMP si lega al sito catalitico e il legame di GMP aumenta l'affinità per ADP al sito A di venti volte



1A00

V.0.2 © gsartor 2001-2013

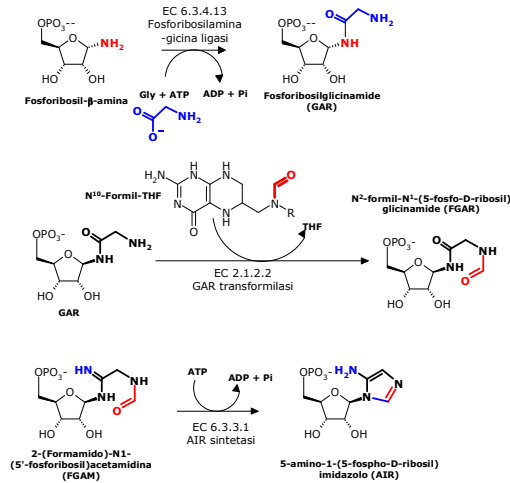
Metabolismo dei nucleotidi

- 42

### 3-4-6. Fosforibosilamina-glicina ligasi (EC 6.3.4.13)

- L'enzima GART umano (108 kDa, 1010 aminoacidi) è trifunzionale e catalizza le reazioni 3, 4 e 6 della via biosintetica *de-novo* delle purine:

- Glicinamide ribonucleotide sintetasi (GARS, PurD, E.C. 6.3.4.13),
- Glicinamide ribonucleotide transformilasi (GARTfase, PurN, E.C. 2.1.2.2.) e
- Aminoimidazolo ribonucleotide sintetasi (AIRS, PurM, E.C. 6.3.3.1).



V.0.2 © gsartor 2001-2013

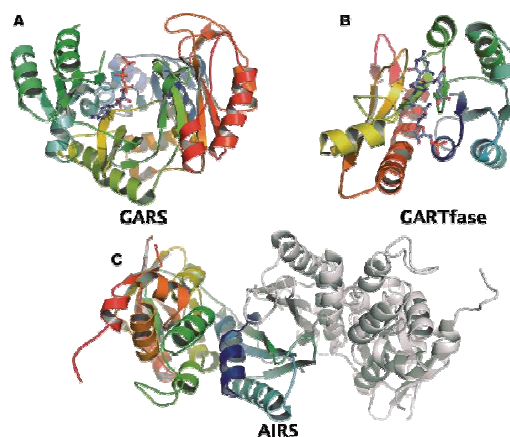
Metabolismo dei nucleotidi

- 43

## HsGART

- L'enzima GART umano (108 kDa, 1010 aminoacidi) è trifunzionale e catalizza le reazioni 3, 4 e 6 della via biosintetica *de-novo* delle purine:

- Glicinamide ribonucleotide sintetasi (GARS, PurD, E.C. 6.3.4.13),
- Aminoimidazolo ribonucleotide sintetasi (AIRS, PurM, E.C. 6.3.3.1) e
- Glicinamide ribonucleotide transformilasi (GARTfase, PurN, E.C. 2.1.2.2.).



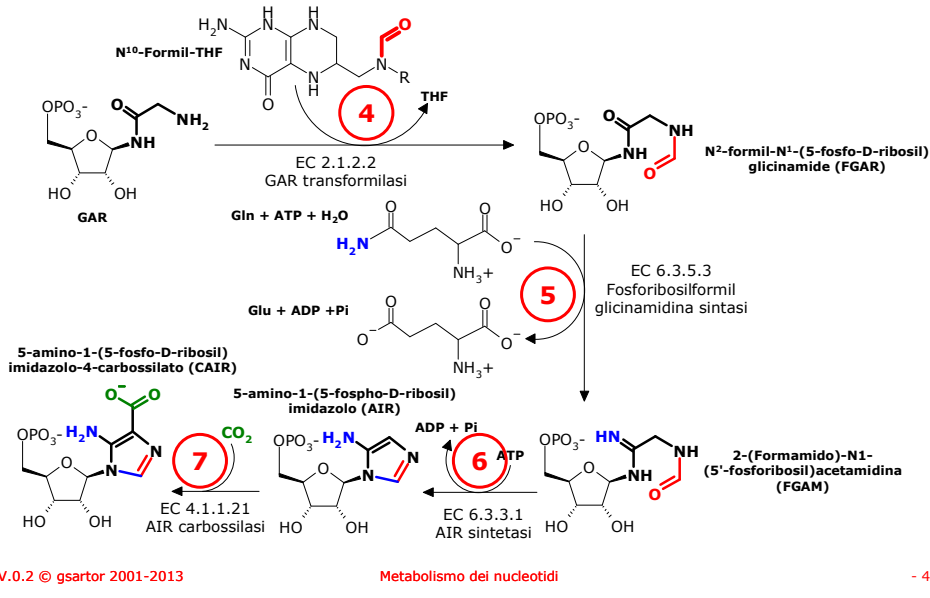
Schematic presentation of crystal structures of the HsGART domains. (A) GARS in complex with ATP. (B) Ternary complex of GARTfase with 10-(trifluoroacetyl) 5,10-dideazaacyclic-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid and substrate glycinamide ribonucleotide (PDB ID: 1RBY). (C) Dimeric structure of AIRS. M. Welin, J. G. Grossmann, S. Flodin, T. Nyman, P. Stenmark, L. Trésaugues, T. Kotenyova, I. Johansson, P. Nordlund and L. Lehtio Nucleic Acids Res. 2010 November; 38(20): 7308-7319.

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

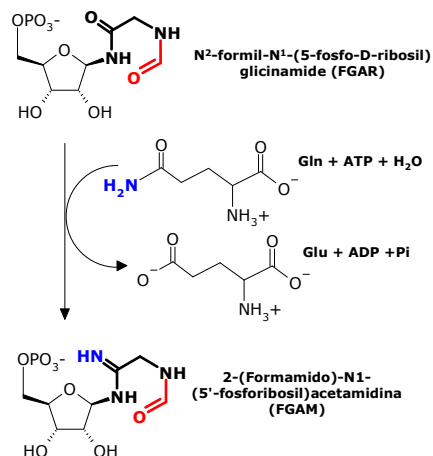
- 44

### Quattro reazioni per la costruzione dell'anello a cinque termini aminoimidazolo carbossilato



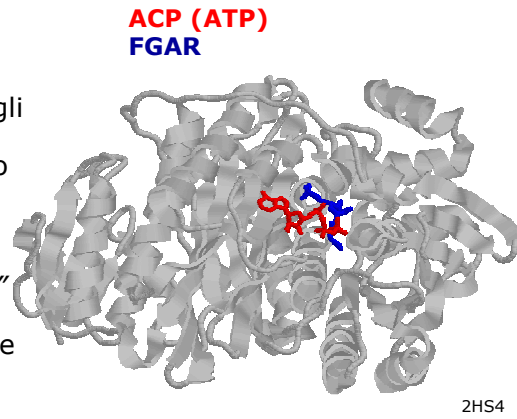
## 5. FGAM sintasi (EC 6.3.5.3)

- Ci sono due tipi di FGAM sintasi:
  - Il tipo I è presente negli eucarioti e batteri Gram- consiste in unico polipeptide di 140 kDa chiamato "large PurL" (lgPurL);
  - Il tipo II, "small PurL" (smPurL), è stato identificato in archaea e batteri Gram+ e consiste in un polipeptide di 80 kDa



## 5. FGAM sintasi (EC 6.3.5.3)

- Ci sono due tipi di FGAM sintasi:
  - Il tipo I è presente negli eucarioti e batteri Gram- consiste in unico polipeptide di 140 kDa chiamato "*large PurL*" (lgPurL);
  - Il **tipo II**, "*small PurL*" (smPurL), è stato identificato in *archæa* e batteri Gram+ e consiste in un polipeptide di 80 kDa.

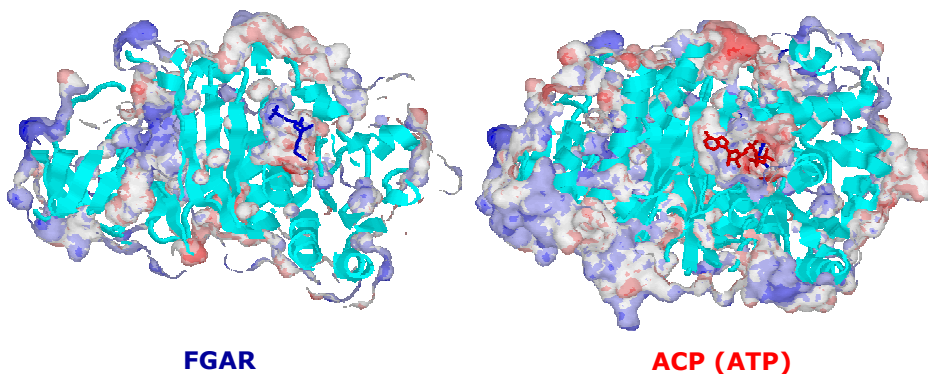


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 47

## 5. FGAM sintasi (EC 6.3.5.3)



V.0.2 © gsartor 2001-2013

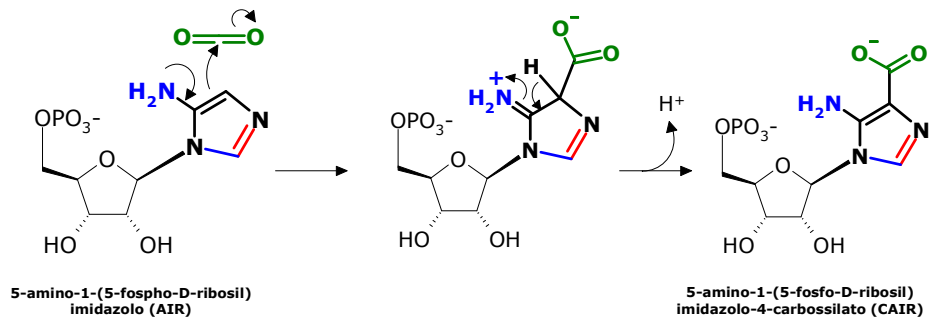
Metabolismo dei nucleotidi

- 48



## 7. AIR carbossilasi (EC 4.1.1.21)

- Diversa dalle solite carbossilasi: non sono necessari né ATP né biotina



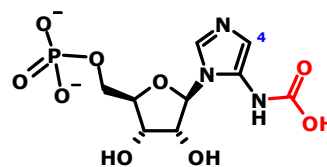
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 49

## 7. AIR carbossilasi (EC 4.1.1.21)

- Nei vertebrati la sintesi di CAIR è catalizzata da AIR carbossilasi (EC 4.1.1.21)
- In *Escherichia coli* sono necessari due enzimi:
  - 5-(carbossiamino)imidazolo ribonucleotide sintasi (EC 6.3.4.18) che forma **5-Carbossiamino-1-(5-fosfo-D-ribosil)imidazolo**
  - 5-(carbossiamino)imidazolo ribonucleotide mutasi (EC 5.4.99.18) che sposta il gruppo carbossilico sulla posizione 4 dell'anello imidazolico.

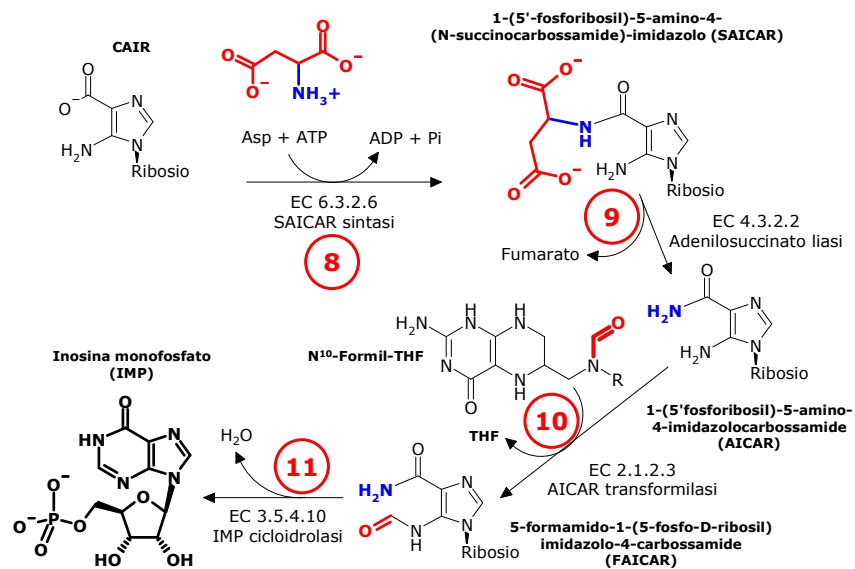


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 50

## Quattro reazioni per la chiusura dell'anello purinico dell'IMP



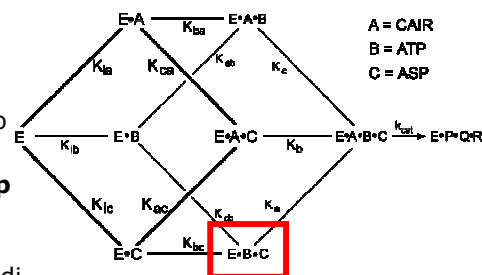
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 51

## 8. SAICAR sintasi (EC 6.3.2.6)

- I substrati possiedono mutuo antagonismo con maggiore antagonismo tra CAIR e ATP e Asp
- CAIR si lega all'enzima libero con un'affinità 200 volte maggiore rispetto al complesso Enzima-ATP-Asp
- Il complesso **Enzima-ATP-Asp** sembra esser la forma dominante in vivo
- IMP è un inibitore competitivo di CAIR, suggerendo la possibilità della formazione di un legame H tra il carbossile in 4 e l' NH<sub>2</sub> in 5 di CAIR legato all'enzima.



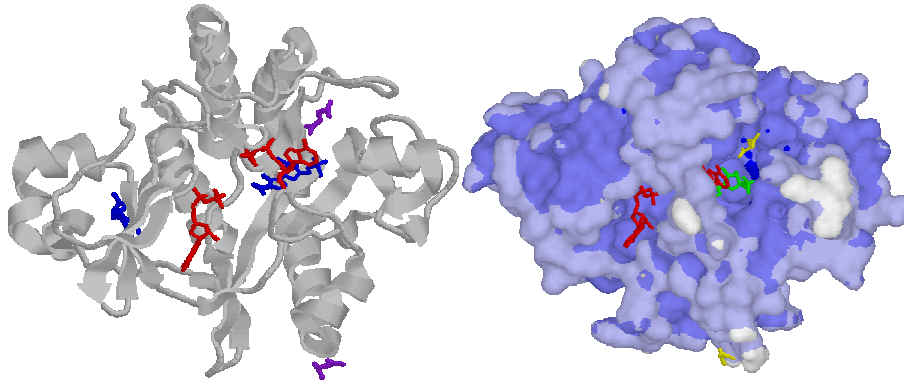
S.W. Nelson, D.J. Binkowski, R.B. Honzatko, H.J. Fromm  
 Properties of SAICAR Synthetase  
 Biochemistry, Vol. 44, No. 2, 2005

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 52

## 8. SAICAR sintasi (EC 6.3.2.6)



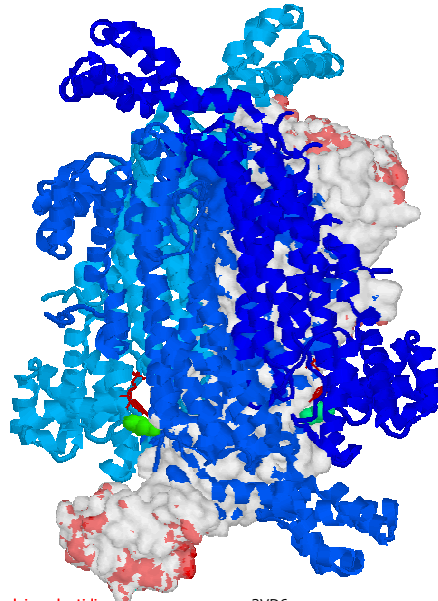
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 53

## 9. Adenilosuccinato liasi (EC 4.3.2.2 )

- La Adenilosuccinato liasi (ASL) ha diverse funzioni:
- Converte adenilosuccinato ad AMP e fumarato nella sintesi di AMP da IMP
- Converte SAICAR in AICA e fumarato
- ASL è parte della superfamiglia degli enzimi che catalizzano le  $\beta$ -eliminazioni
- È un omotetramero con tre domini in ogni monomero e quattro siti attivi per tetramero.



V.0.2 © gsartor 2001-2013

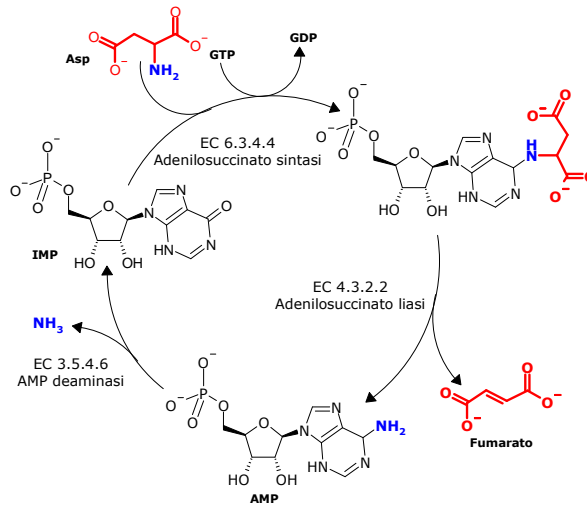
Metabolismo dei nucleotidi

2VD6

- 54

# AMP

- Nel muscolo scheletrico serve per rifornire il ciclo di Krebs di fumarato

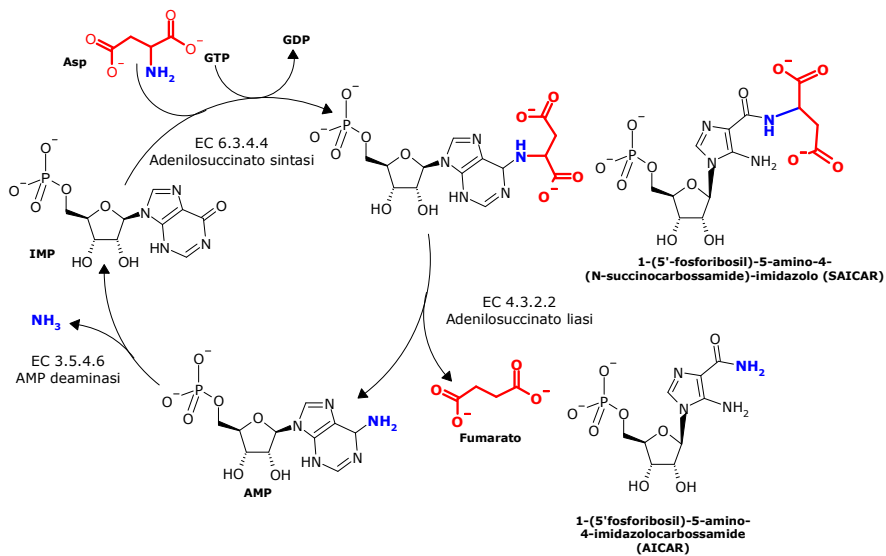


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 55

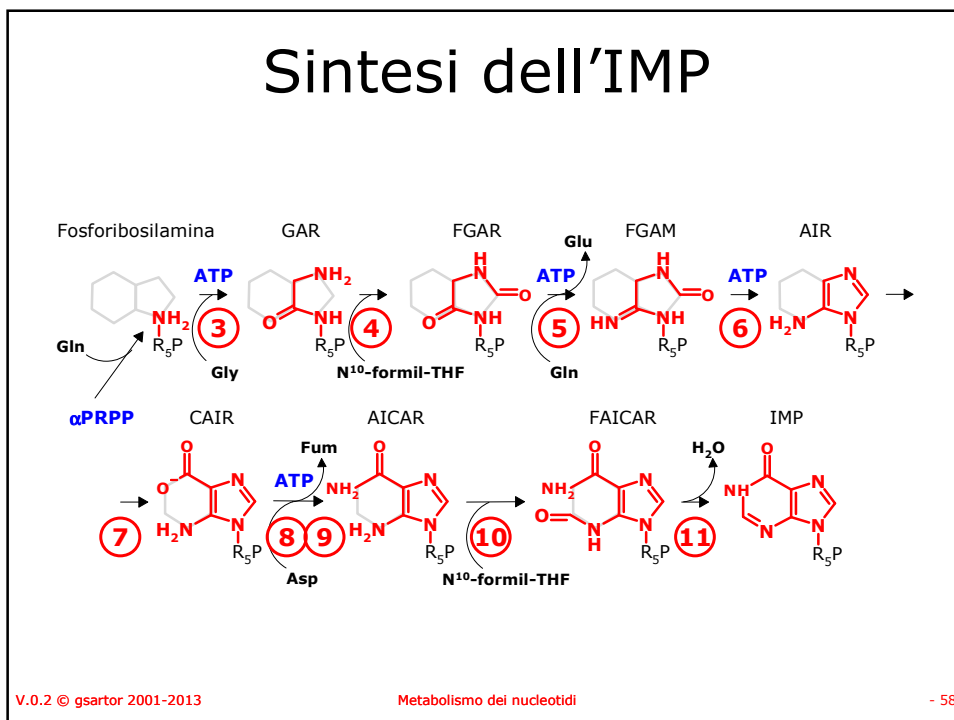
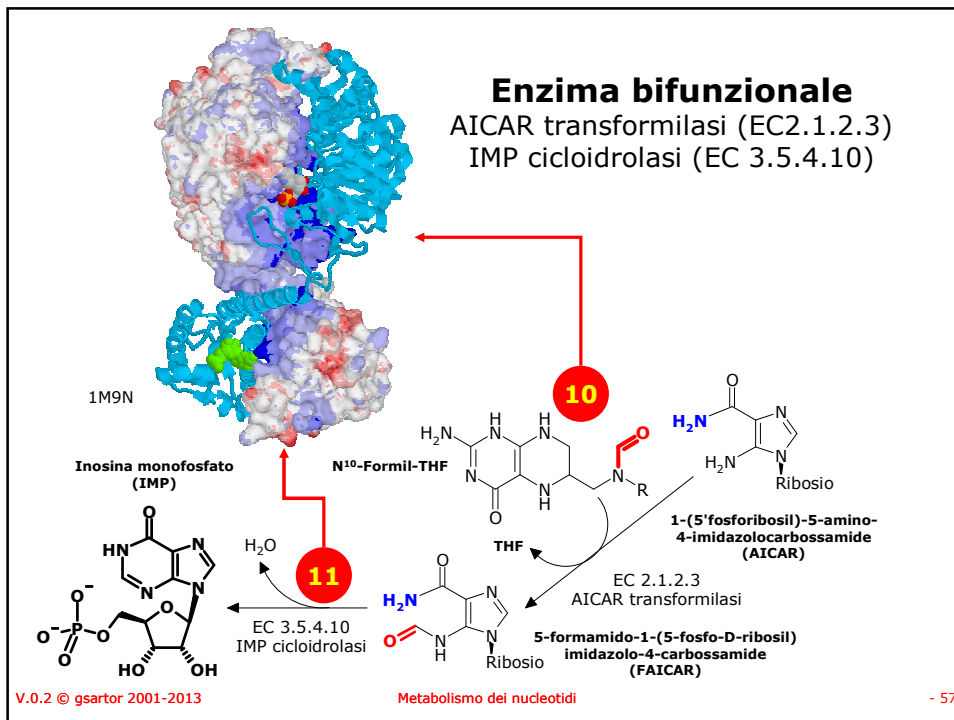
## 9. Adenosuccinato liasi (EC 4.3.2.2)



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 56



# Controllo della biosintesi IMP

- Concentrazione limitante di Fosforibosilpirofosfato ( $\alpha$ PRPP);
- Utilizzo di N<sup>10</sup>-Formil-THF
  - Negli eucarioti antagonisti dell'acido folico:
    - Metopteridina
    - Metotrexato
    - Amminopteridina
  - Nei batteri inibitori della sintesi del folato:
    - Sulfonamidi che competono con l'acido paraminobenzoico

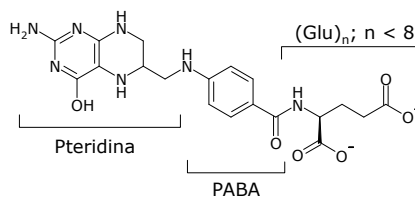
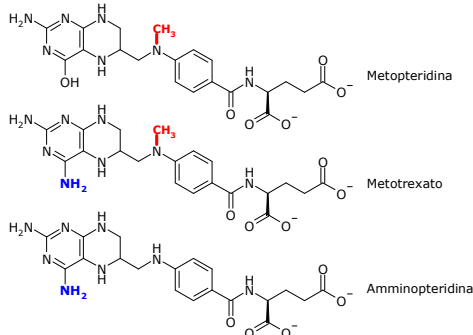
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

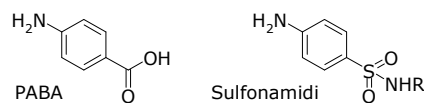
- 59

# Inibizione

- Antagonisti dell'acido folico



- Sulfonamidi che competono con l'acido paraminobenzoico



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 60

## Sintesi di AMP e GMP da IMP

- La sorgente di energia per la sintesi di **AMP** è il **GTP**
- **AMP:**
  - Il C=O in posizione 6 del **IMP** viene convertito in NH<sub>2</sub> utilizzando **Asp** e **GTP**
- la sorgente di energia per la sintesi di **GMP** è **ATP**
- **GMP:**
  - **IMP** viene ossidato a **XMP** e il C=O in posizione 2 viene convertito in NH<sub>2</sub> utilizzando **Gln** e **ATP** ad AMP

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 61

## Sintesi di AMP e GMP da IMP

- La sorgente di energia per la sintesi di **AMP** è il **GTP**
- **AMP:**
  - Il C=O in posizione 6 del **IMP** viene convertito in NH<sub>2</sub> utilizzando **Asp** e **GTP**
- la sorgente di energia per la sintesi di **GMP** è **ATP**
- **GMP:**
  - **IMP** viene ossidato a **XMP** e il C=O in posizione 2 viene convertito in NH<sub>2</sub> utilizzando **Gln** e **ATP** ad AMP

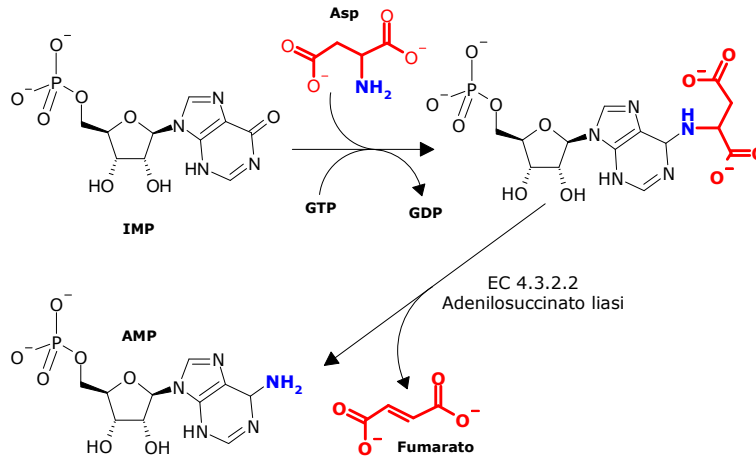
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 62

# AMP

EC 6.3.4.4  
Adenilosuccinato sintasi



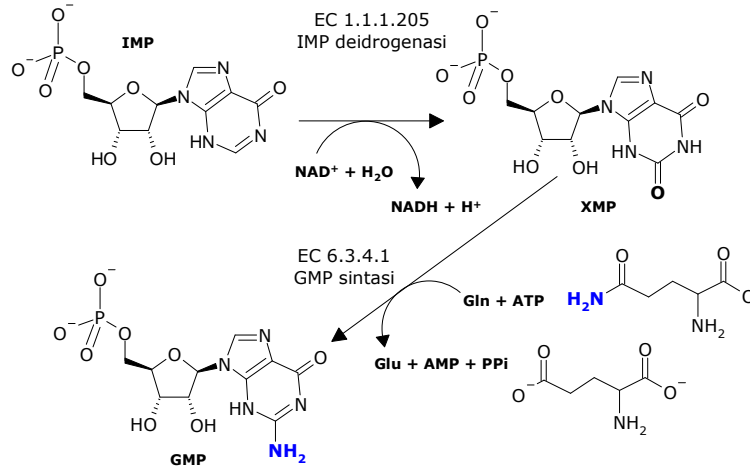
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 63

# GMP

EC 1.1.1.205  
IMP deidrogenasi



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 64



# Energia

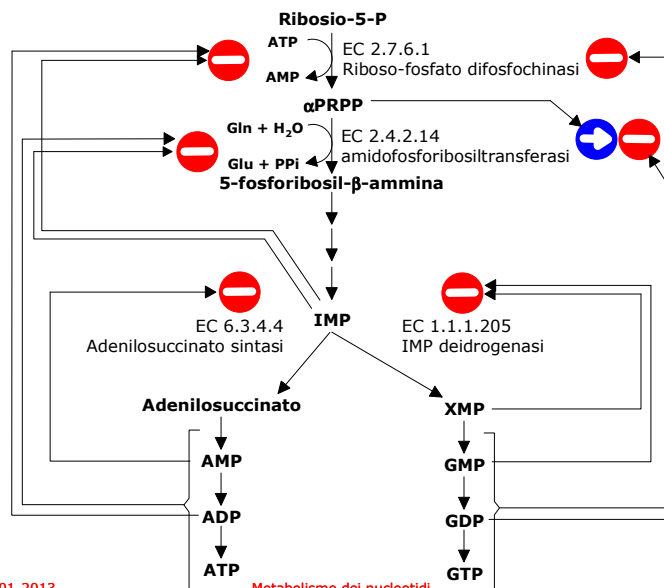
- Per sintetizzare NTP da ribosio5-fosfato vengono consumati:
  - **Sette ATP (6 ATP + 1 GTP) per AMP**
  - **Otto ATP per GMP**

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 65

# Regolazione



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 66

# Interconversione delle purine

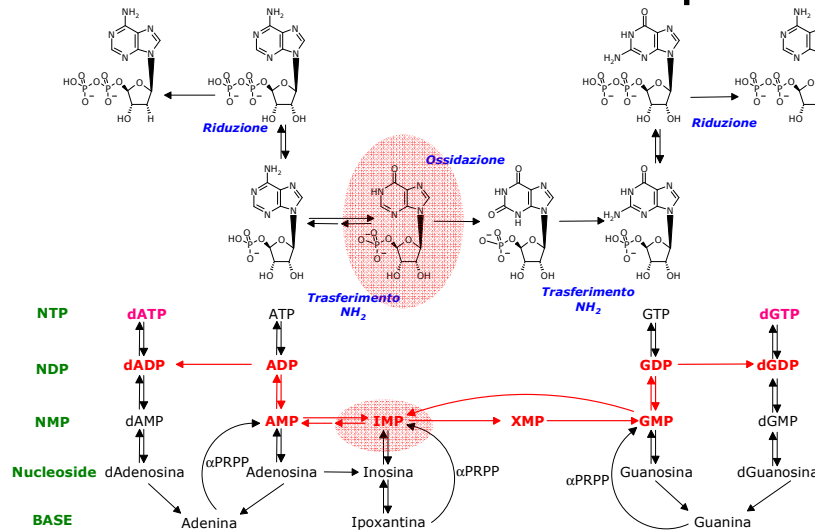
- Il turnover degli acidi nucleici (soprattutto mRNA) porta al rilascio di basi puriniche per formare adenina, guanina e ipoxantina.
- Visto il costo metabolico per la loro sintesi vengono riutilizzate per risintetizzare i nucleotidi attraverso le fosforibosil trasferasi (HGPRT):
 
$$\text{BASE} + \alpha\text{PRPP} \rightarrow \text{NMP} + \text{PPi}$$
- L'idrolisi di PPi rende la reazione irreversibile
- L'assenza, o la sintesi ridotta, di HGPRT è causa della sindrome di Lesch-Nyhan nella quale la sintesi di purine è circa 200 volte maggiore e la concentrazione di acido urico nel sangue è elevata
- Questo aumento è dovuto all'attivazione allosterica da  $\alpha\text{PRPP}$  della biosintesi *de-novo* delle purine.

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 67

# Interconversione delle purine



Traut TW. Enzymes of nucleotide metabolism: the significance of subunit size and polymer size for biological function and regulatory properties. CRC Crit Rev Biochem. 1988;23(2):121-69.

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 68

## Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
  - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] – Zanichelli
  - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
  - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - PICCIN
  - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] – Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
  - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
  - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
  - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
  - Rensselaer Polytechnic Institute:  
<http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da:

<http://www.ambra.unibo.it/giorgio.sartor/>, oppure da <http://www.qsartor.org/>

Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

**Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor**

Università di Bologna – Alma Mater

Giorgio Sartor - [giorgio.sartor@unibo.it](mailto:giorgio.sartor@unibo.it)