

Prof. Giorgio Sartor

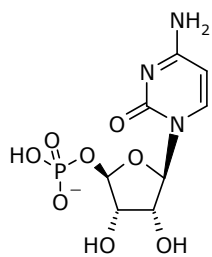
Metabolismo dei nucleotidi

- 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

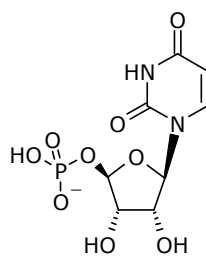
Copyright © 2001-2013 by Giorgio Sartor.
All rights reserved.

N01 - Versione 0.2 - may 2013

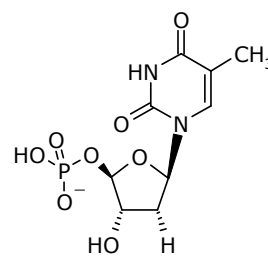
BIOSINTESI delle PIRIMIDINE



CTP



UTP



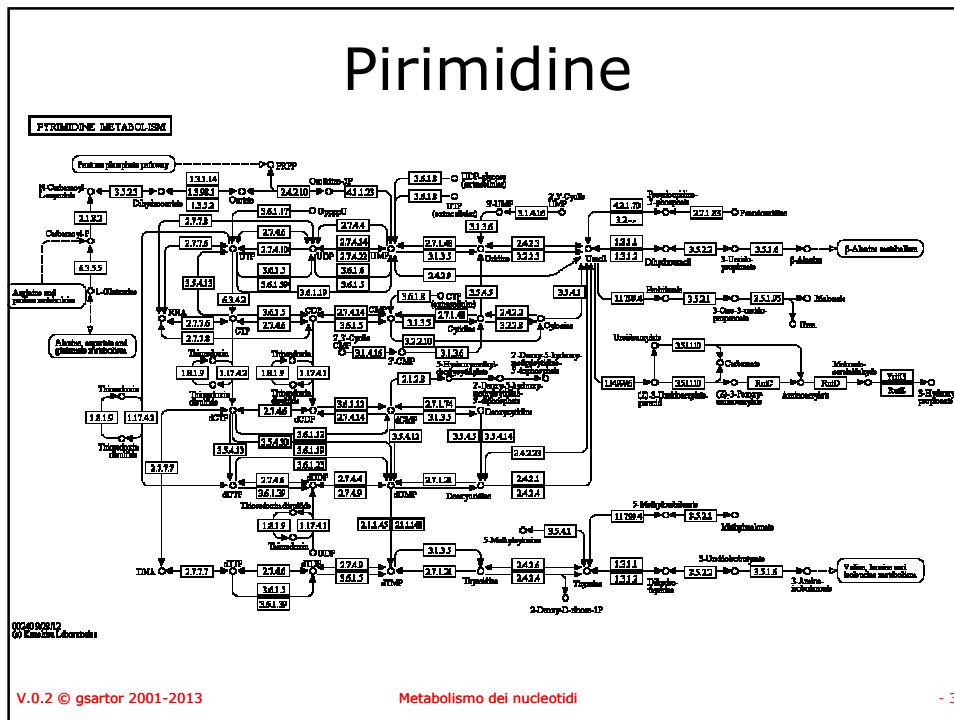
dTTP

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 2

Pirimidine



Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

- Contrariamente alle PURINE, le **PIRIMIDINE** vengono sintetizzate come anello purinico e **quindi** legate al riboso-5-P;
- I precursori sono:
 - Carbamilfosfato
 - Aspartato
- Si forma il **DIIDROOROTATO**

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

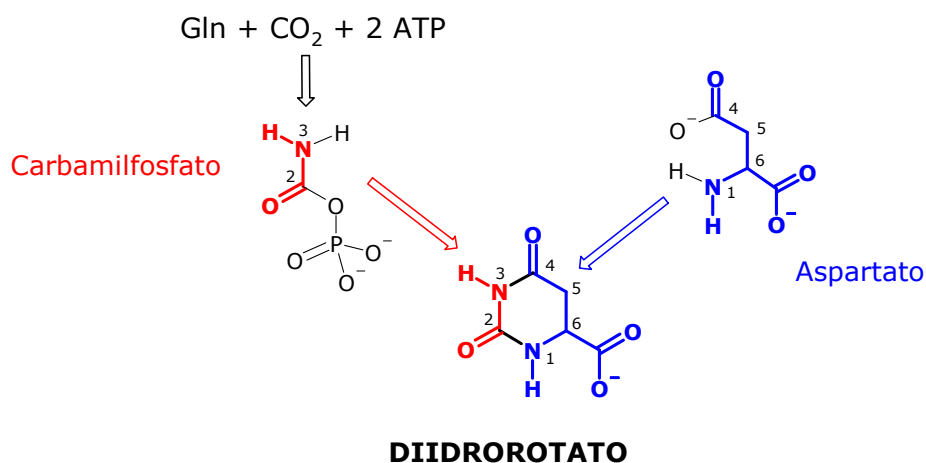
- **Sei reazioni per sintetizzare UMP;**
- **Sei substrati:**
 - HCO_3^-
 - ATP
 - Due aminoacidi (Gln, Asp)
 - Ribosio (αPRPP)
 - NADP^+ (CoQ, fumarato)
- **Sei prodotti/intermedi:**
 1. Carbamilfosfato
 2. Carbamilaspartato
 3. Diidrorotato
 4. Orotato
 5. Orotinina-5'-monofosfato (OMP)
 6. UMP
- **Sei enzimi:**
 1. Carbamilfosfato sintasi II (EC 6.3.5.5)
 2. Aspartato transcarbamilasi (EC 2.1.3.2)
 3. Diidrorotasi (EC 3.5.2.3)
 4. Diidrorotato deidrogenasi (EC 1.3.1.14)
 5. Orotato fosforibosiltransferasi (EC 2.4.2.10)
 6. OMP decarbossilasi (EC 4.1.1.23)
- Nei procarioti i sei enzimi sono separati;
- Negli eucarioti sono presenti in **tre proteine:**
 - CAD
 - Diidrorotato deidrogenasi
 - Uridina monofosfato sintasi

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 5

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 6

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

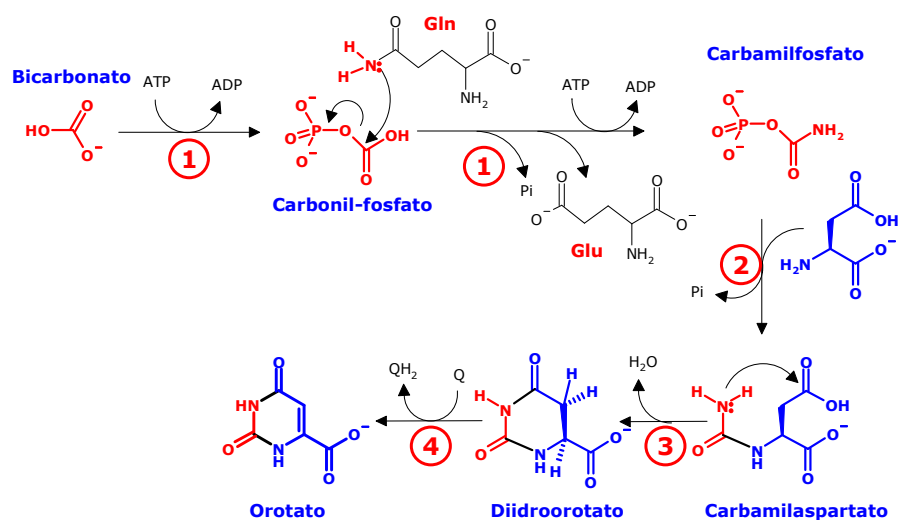
- Nel citosol degli eucarioti i tre enzimi che catalizzano le tre reazioni per la sintesi del **diidroorotato** da **Gln**, **CO₂** e **Asp**:
 - **C**arbamilfosfato sintasi II (EC 6.3.5.5) (CPSII)
 - **A**sparato transcarbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)
 - **D**iidorotasi (EC 3.5.2.3)
- sono presenti in unico peptide di 210 kD codificato da un unico gene (**CAD**).

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 7

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

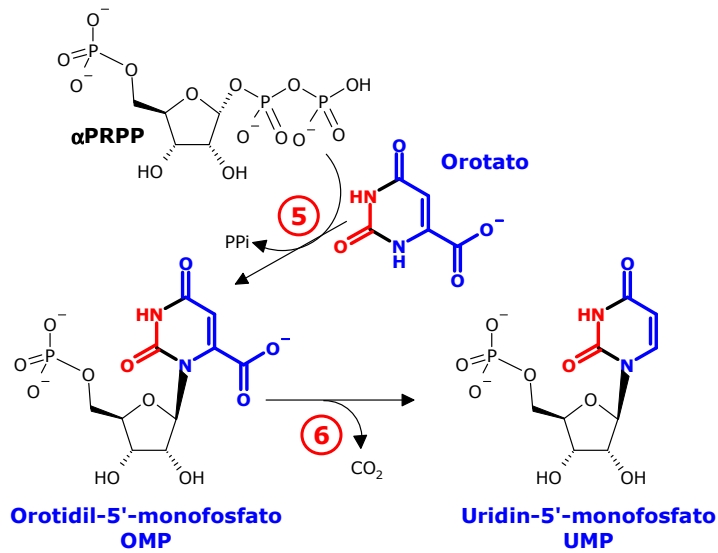


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 8

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

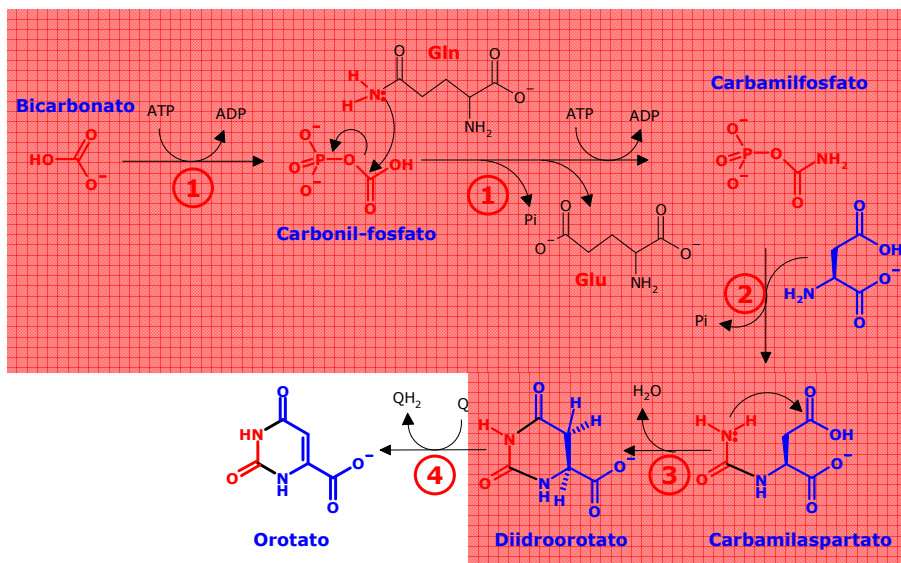


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 9

CAD



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 10

1. Carbamilfosfato sintasi

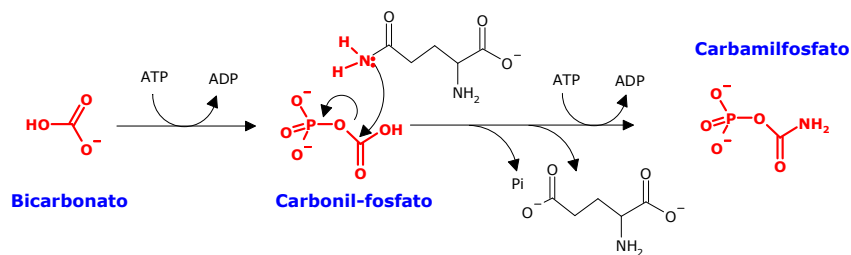
- La sintesi del carbamilfosfato è catalizzata dalla Carbamilfosfato sintasi che è diversa negli eucarioti e nei procarioti:
- Eucarioti:
 - Carbamilfosfato sintasi II (EC 6.3.5.5) (CPSII) con diverso substrato (**Gln**) rispetto all'enzima mitocondriale (CPS-I) (substrato **NH₃** nel ciclo dell'urea) con analogo meccanismo;
 - Il carbamilfosfato citosolico è inviato obbligatoriamente nella sintesi di **PIRIMIDINE**;
 - Il carbamilfosfato mitocondriale (ciclo dell'urea) va a sintetizzare arginina via ornitina e citrullina.
- Procarioti
 - Unico enzima Carbamilfosfato sintasi che ha come substrato sia **NH₃** che **Gln**

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 11

1. Carbamilfosfato sintasi II (EC 6.3.5.5) (CPSII)



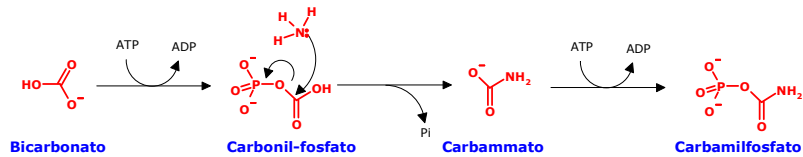
- Enzima citosolico
- L'attività di CPSII è presente in un unico peptide da 210kD che presenta anche l'attività ATCase e della Diidroorotasi;
- Due molecole di ATP:
 - la prima attiva il bicarbonato (CO_2) per formare il carbonil-fosfato,
- Il gruppo amminico della **Gln** si lega e forma il carbammato liberando il fosfato e **Glu**,
 - La seconda molecola di ATP lega il carbammato attivandolo.

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 12

Carbamilfosfato sintasi I (EC 6.3.4.16) (CPSI)



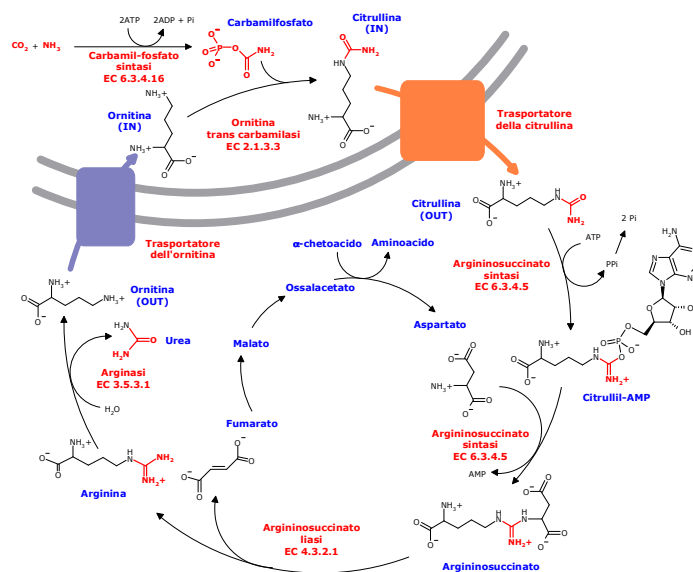
- Enzima mitocondriale (ciclo dell'urea) e nei procarioti
- Due molecole di ATP :
 - la prima attiva in carbonato (CO_2) per formare il carbonil-fosfato,
 - L'ammoniaca si lega e forma il carbammato liberando il fosfato,
 - La seconda molecola di ATP lega il carbammato attivandolo.

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 13

Ciclo dell'urea



V.0.2 © gsartor 2001-2013

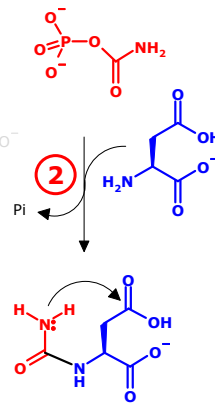
Metabolismo dei nucleotidi

- 14

2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

- Negli eucarioti l'attività ATCasica è presente in un unico peptide da 210kD che presenta anche l'attività di CPSII e diidrorotasi;
- Metallo enzima (Zn^{++})
- È codificato da un singolo gene

Carbamilfosfato



Carbamilaspartato

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 15

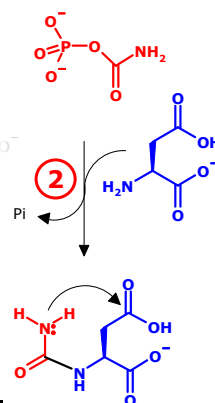
2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

- Diversa regolazione nei procarioti rispetto agli eucarioti

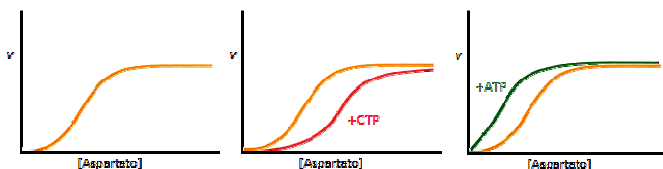
- Nei procarioti (*E. Coli*):

- è attivata da ATP e inibita da CTP;
- ATP e CTP competono per lo stesso sito;
- regola la conversione di carbamilfosfato in carbamilaspartato;
- controlla la sintesi di arginina e dei nucleotidi.

Carbamilfosfato



Carbamilaspartato

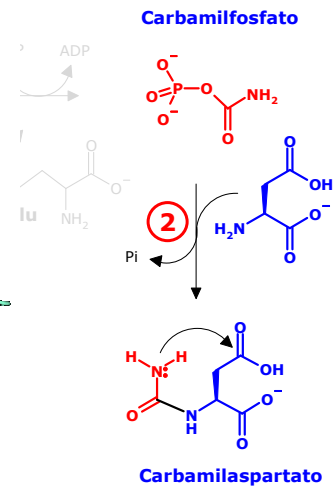
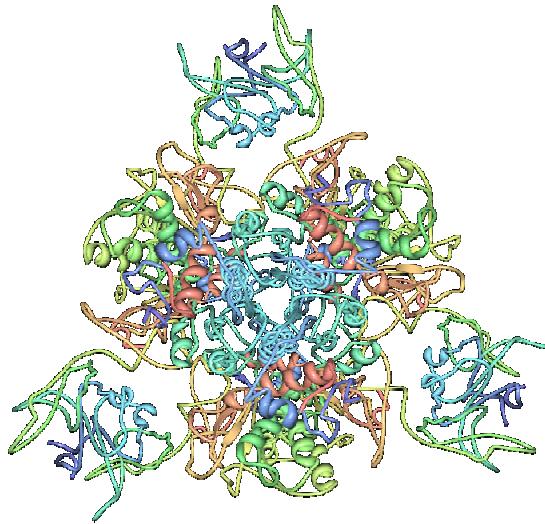


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 16

2. Aspartato trans carbamylasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

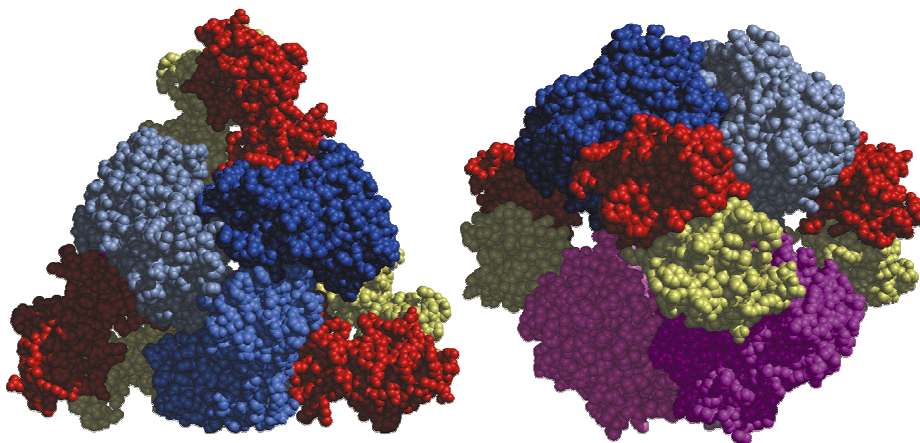


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 17

2. Aspartato trans carbamylasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

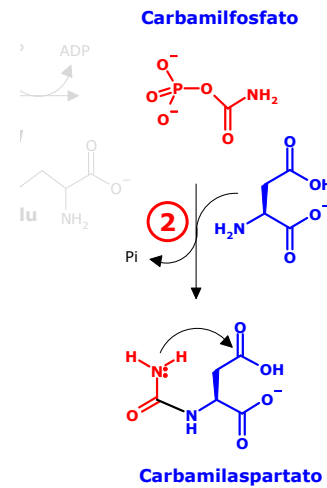
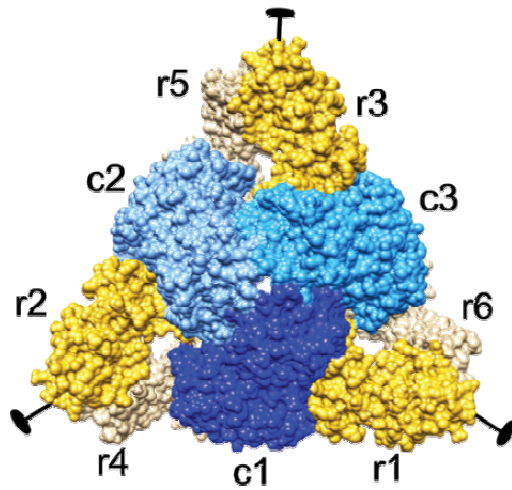


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 18

2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)



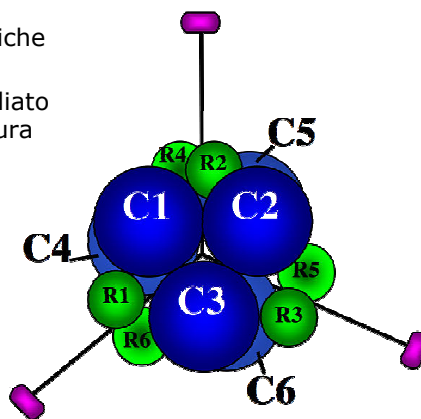
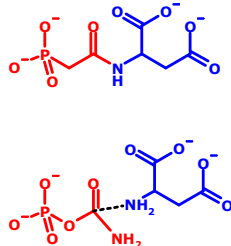
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 19

2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

- Il sito catalitico è localizzato all'interfaccia tra due catene catalitiche nello stesso trimero;
- Il legame dei substrati è stato studiato utilizzando un inibitore la cui struttura si suppone simile allo stato di transizione:
 - N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA)

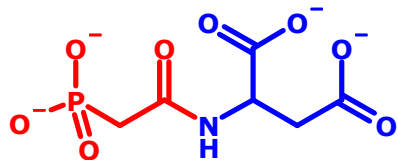


V.0.2 © gsartor 2001-2013

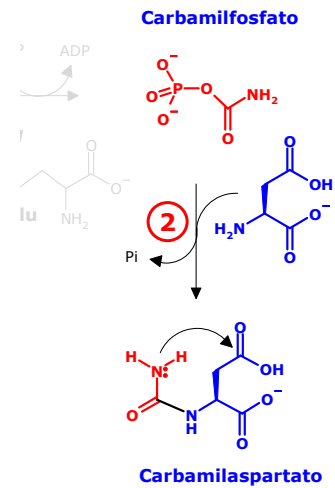
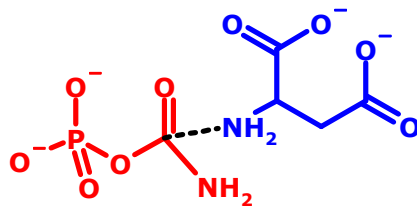
Metabolismo dei nucleotidi

- 20

2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)



N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA)

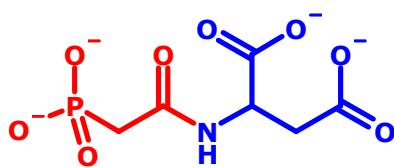


V.0.2 © gsartor 2001-2013

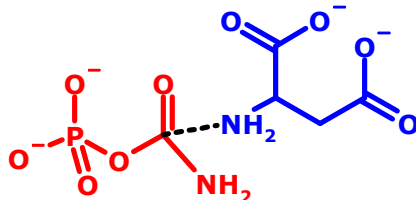
Metabolismo dei nucleotidi

- 21

2. Aspartato trans carbamilasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)



N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA)



Effettori allosterici	n_H (coefficiente di Hill)	$K_D(PALA)$ (nM)
Nessuno	2.0	110
ATP	1.4	65
CTP	2.3	270

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 22

2. Aspartato trans carbamylasi (EC 2.1.3.2) (ATCasi)

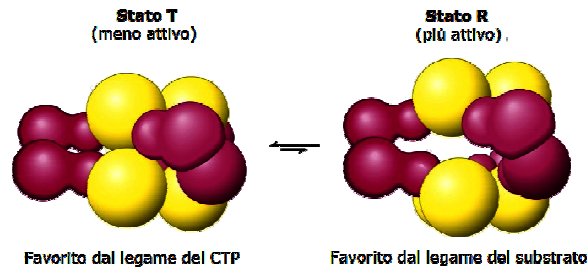


Figure 18-18
Biochemistry, 6th Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

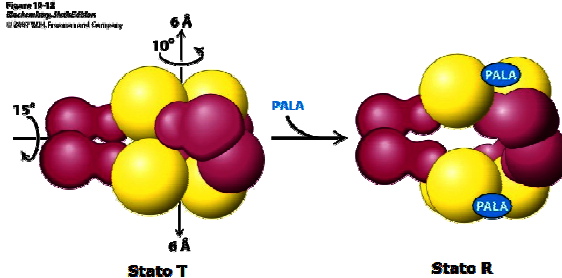


Figure 18-9
Biochemistry, 6th Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

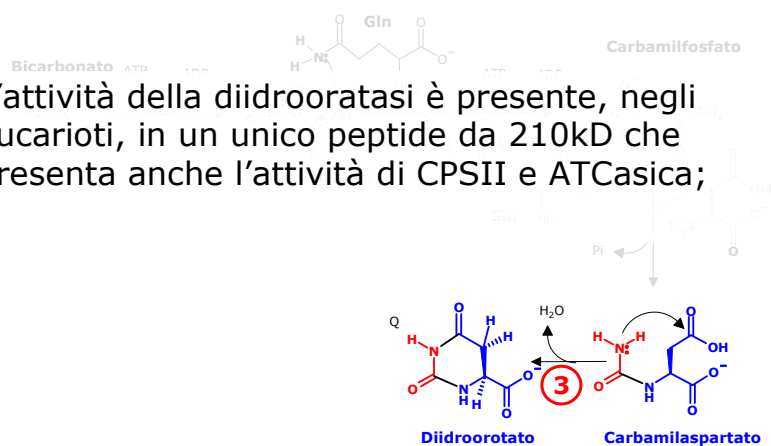
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 23

3. Diidroorotasi (EC 3.5.2.3)

- L'attività della diidroorotasi è presente, negli eucarioti, in un unico peptide da 210kD che presenta anche l'attività di CPSII e ATCasica;

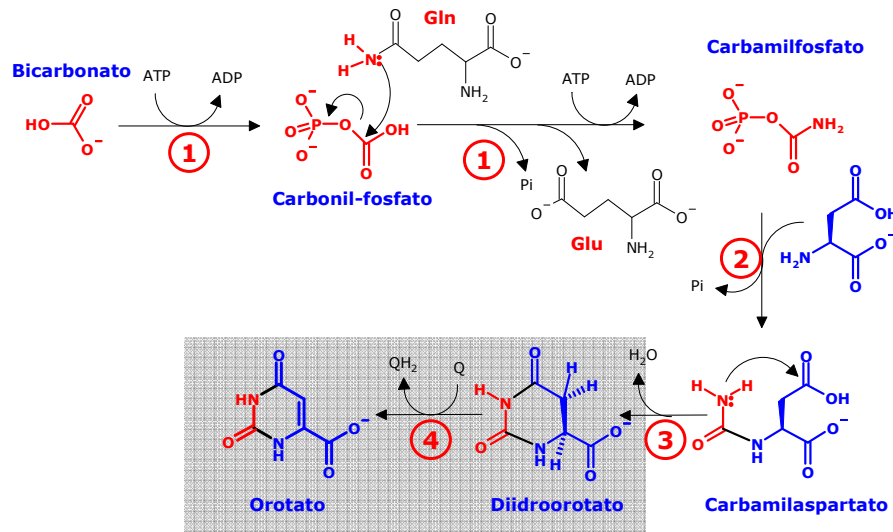


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 24

4. Diidrorotato deidrogenasi (EC 1.3.1.14)



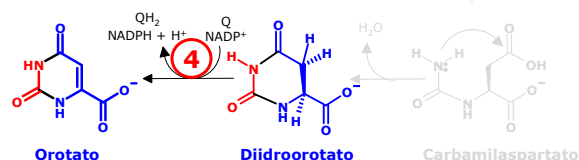
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 25

4. Diidrorotato deidrogenasi (EC 1.3.1.14)

- Lega FMN, FAD e un cluster [2Fe-2S].
- L'enzima consiste in due subunità;
 - Una subunità catalica che lega FMN
 - Una subunità deputata al trasferimento di elettroni che contiene FAD e un centro [2Fe-2S].
- La reazione avviene nel citosol ed è la sola reazione redox nella biosintesi *de-novo* dei nucleotidi pirimidinici.
- Un altro enzima di classe 1 usa fumarato (EC 1.3.98.1) o NADP⁺ (EC 1.3.1.15) come accettore di elettroni
- Un altro enzima di classe 2 legato alla membrana mitocondriale (EC 1.3.5.2) usa il chinone come accettore di elettroni.



V.0.2 © gsartor 2001-2013

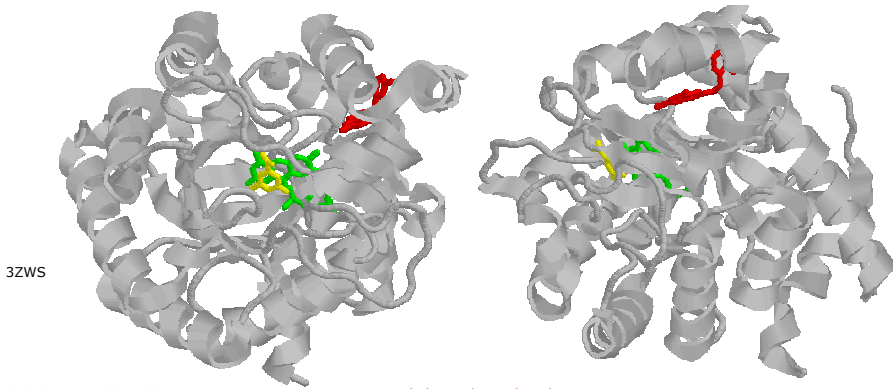
Metabolismo dei nucleotidi

- 26

4. Diidrorotato deidrogenasi (EC 1.3.1.14)

- Subunità catalitica:

- Orotato
- FMN
- Inibitore

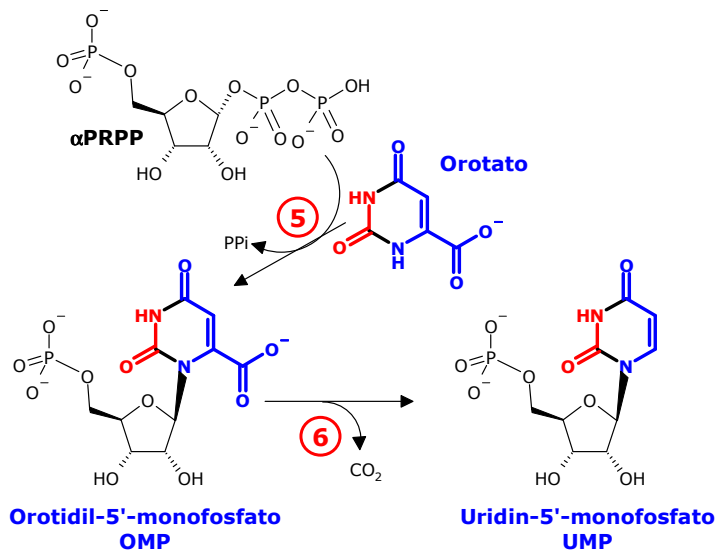


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 27

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

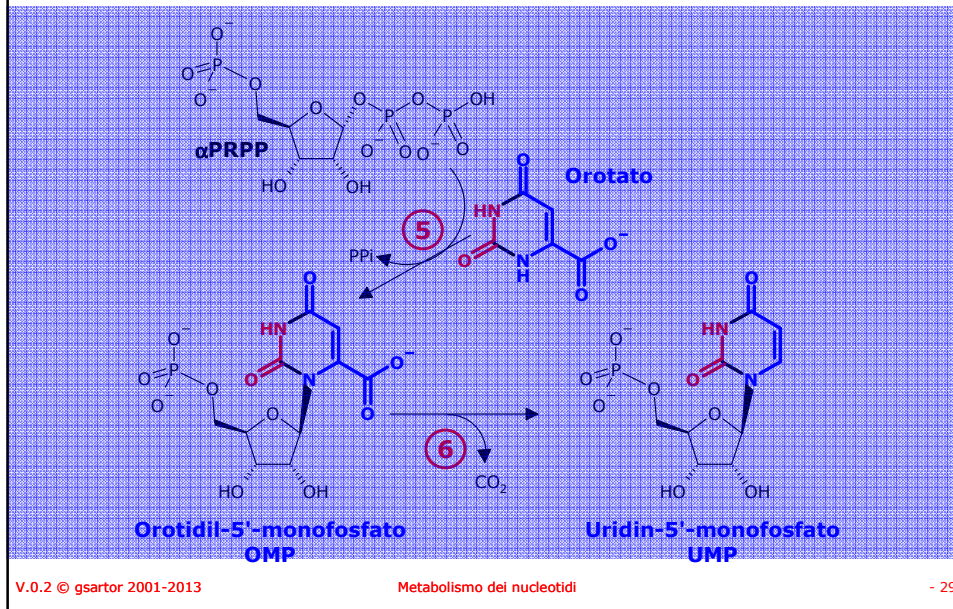


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 28

Biosintesi *de-novo* delle pirimidine

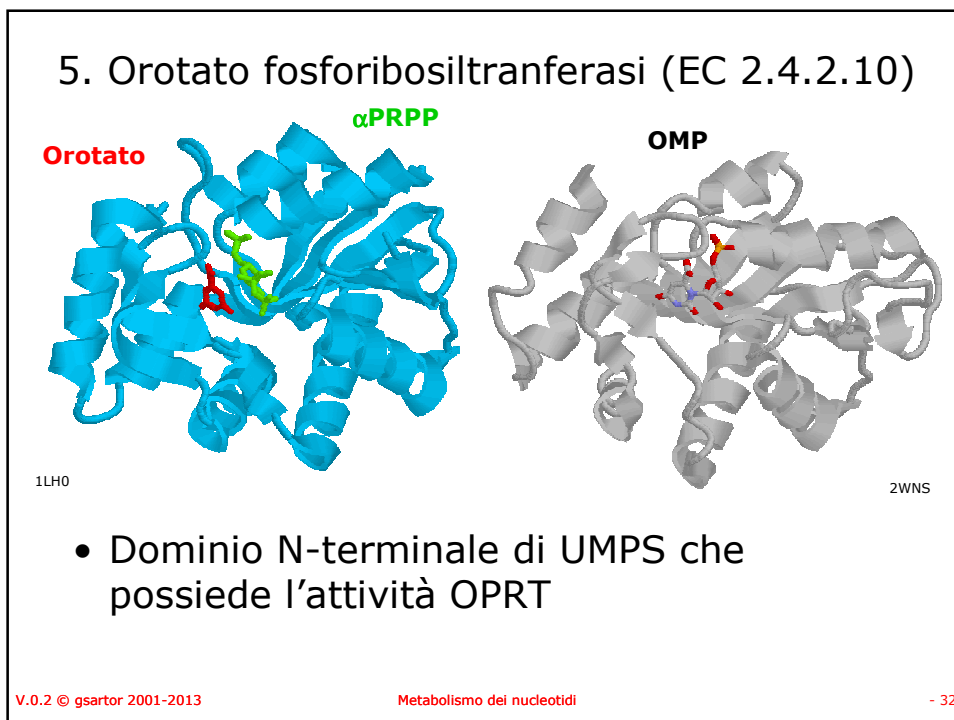
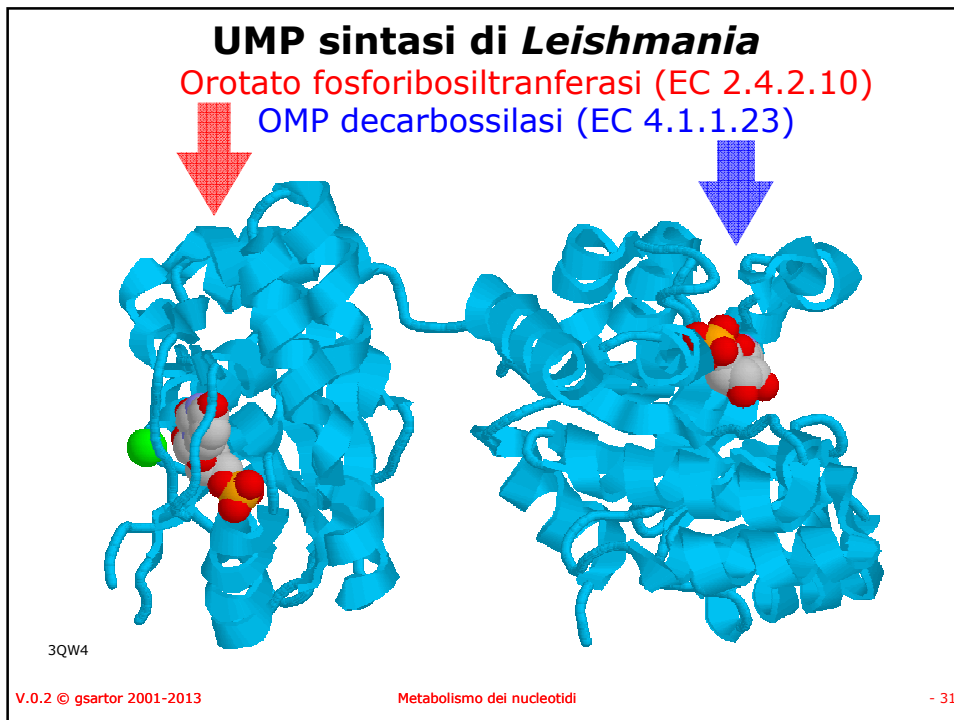


UMP sintasi

Orotato fosforibosiltransferasi (EC 2.4.2.10)

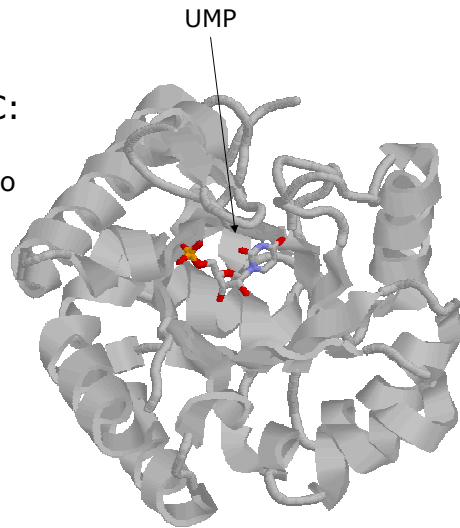
OMP decarbossilasi (EC 4.1.1.23)

- Negli mammiferi un unico gene codifica per l'enzima UMP sintasi (UMPS) che catalizza le ultime due reazioni nella sintesi *de-novo* delle pirimidine
- L'attività Orotato fosforibosiltransferasi (OPRT) è localizzata nella porzione N-terminale mentre l'OMP decarbossilasi (OMPDC) è presente al C-terminale
- Anche il protozoo *Leishmania* (e specie correlate) esprime un unico enzima (3QW4) ma con i domini invertiti rispetto alla UMPS umana.



6. OMP decarbossilasi (EC 4.1.1.23)

- Dominio C-terminale di UMPS con attività OMPDC:
 - Studi strutturali su OMPDC da microrganismi ha portato all'ipotesi che la decarbossilazione avvenga attraverso la formazione di intermedi non covalenti ad alta energia;
 - Dominio privo di cofattori estremamente efficiente.



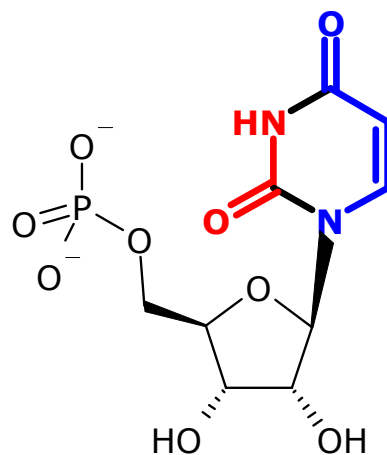
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

2QCD

- 33

Uridin-5'-monofosfato (UMP)



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 34

UTP

- A cosa serve:
 - Precursore dei nucleotidi e dei deossinucleotidi pirimidinici
 - Coinvolto nel metabolismo glucidico:
 - Lega il glucosio-1-fosfato per formare UDPG
 - Glicogenosintesi
 - Metabolismo del galattoso
 - Ossidazione del glucosio a acido glucuronico ...

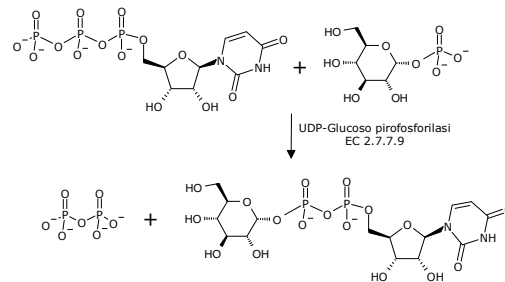
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 35

Glicogenosintesi

- Il glucosio uridin-difosfato (UDPG) è il precursore per la sintesi di glicogeno.
- Un residuo di glucosio è aggiunto al glicogeno e viene rilasciato un UDP.
- Gli zuccheri nucleotidi difosfati sono i precursori della sintesi di carboidrati complessi, glicoproteine ecc.
- Viene sintetizzato da glucosio-1-fosfato e UTP ad opera della UDP-Glucosio pirofosforilasi (EC 2.7.7.9).



V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 36

Glicogenosintesi

- Il processo viene ripetuto fino a che si forma una corta catena di glucoso (fino a cinque residui).

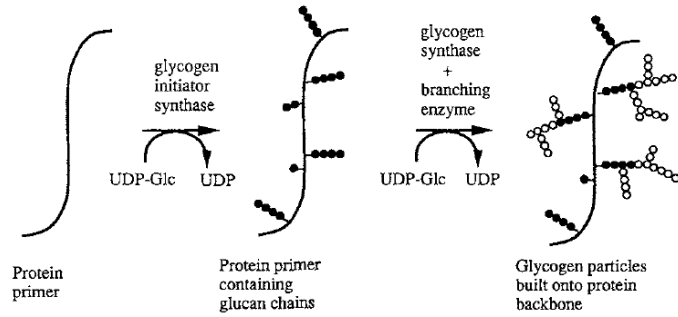


Fig. 1. *Krisman's model for the structure and biogenesis of glycogen.*

Eur. J. Biochem. 200, 625–631 (1991)

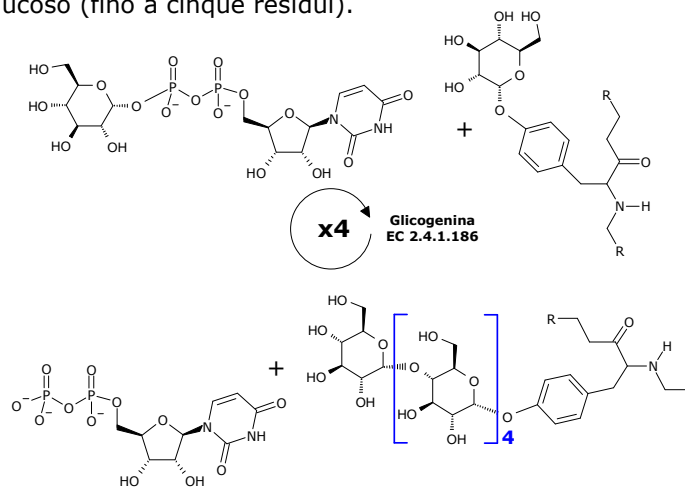
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 37

Glicogenosintesi

- Il processo viene ripetuto fino a che si forma una corta catena di glucoso (fino a cinque residui).

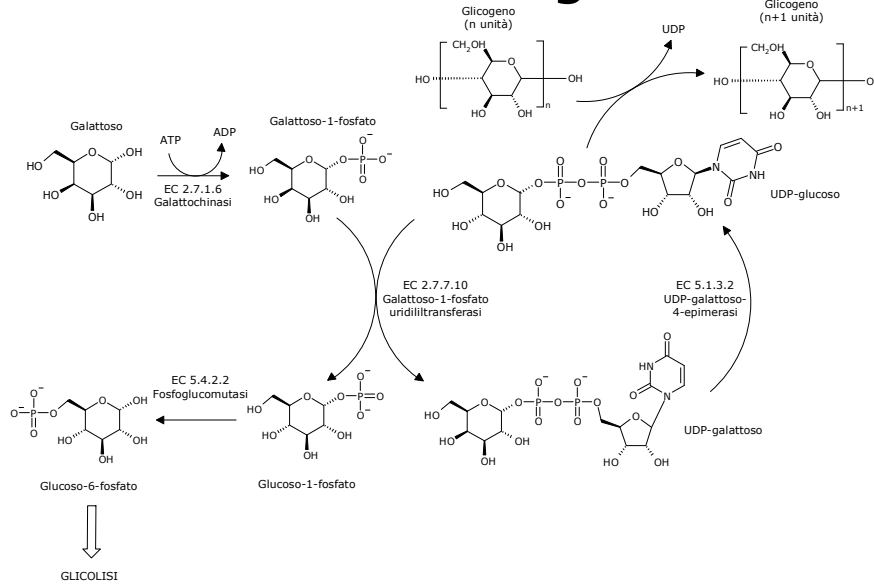


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 38

Metabolismo del galattoso



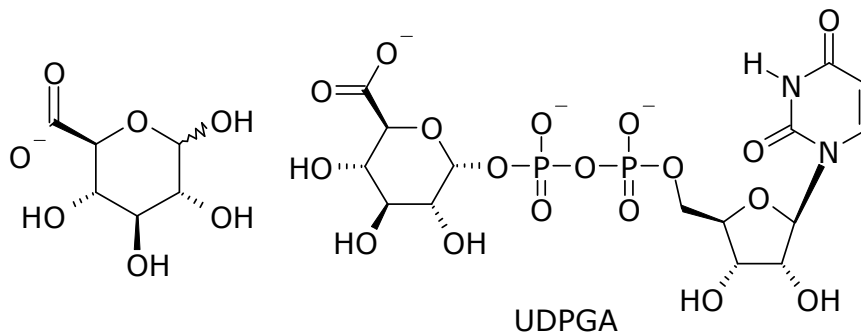
V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 39

Glucuronazione

- Coniugazione di xenobiotici con un H labile con acido glucuronico da acido uridindifosfoglicerico (UDPGA)

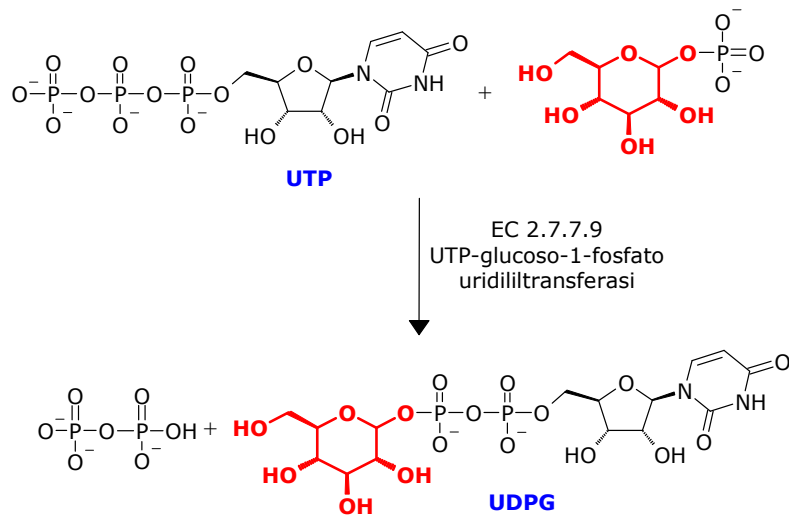


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 40

Formazione di UDPG

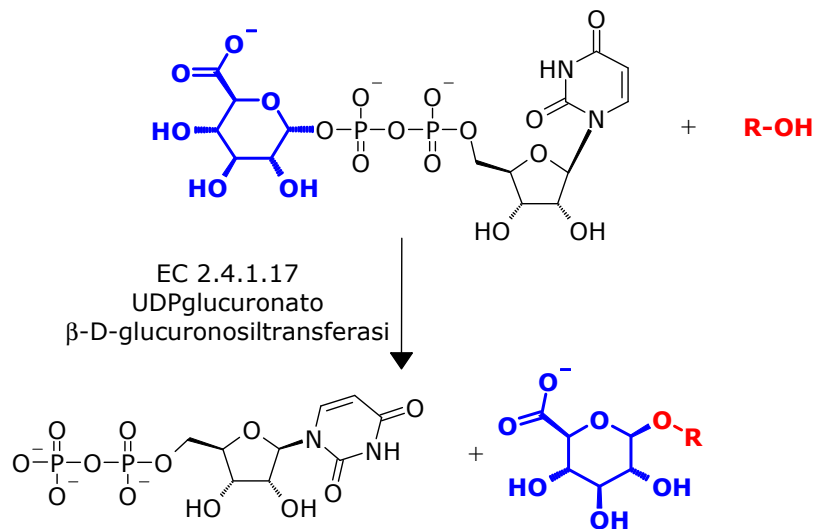


V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 41

Coniugazione con acido glucuronico

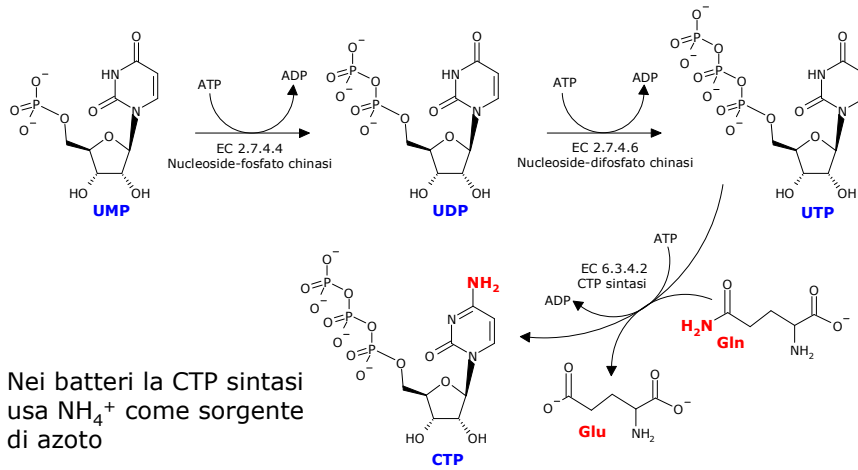


V.0.2 © gsartor 2001-2013

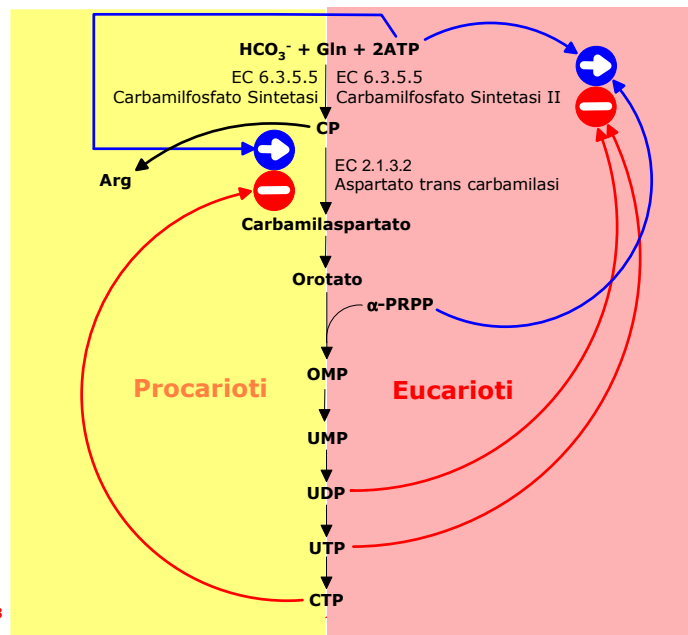
Metabolismo dei nucleotidi

- 42

UTP e CTP



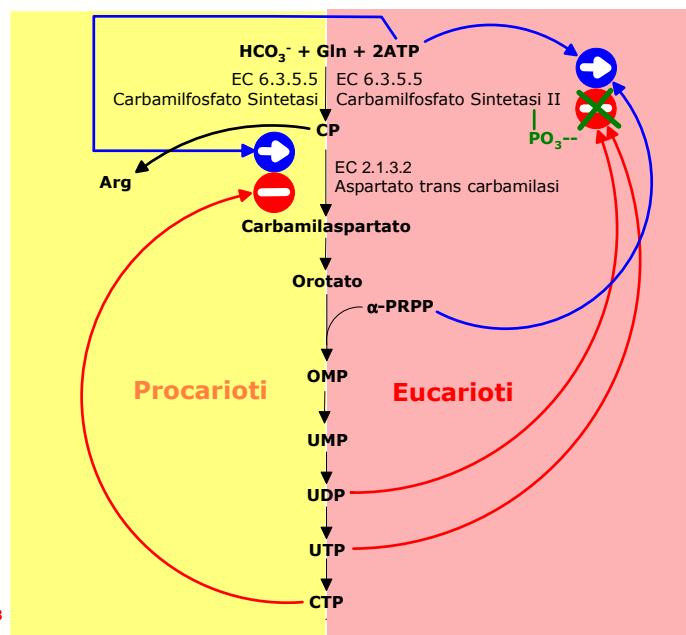
Regolazione



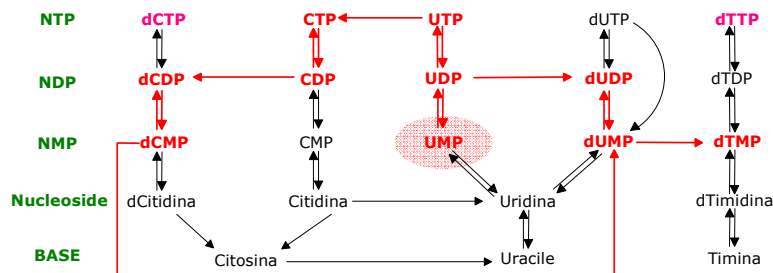
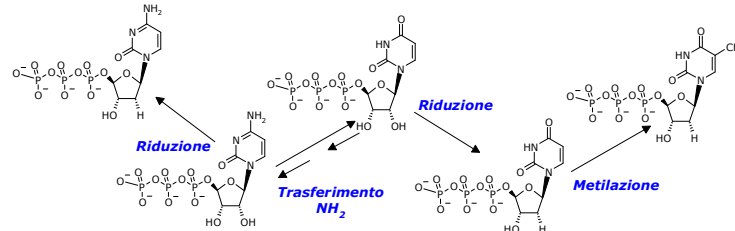
Regolazione

- CPS II è l'enzima chiave che controlla la sintesi di pirimidine nei mammiferi ed è sensibile all'inibizione da UMP,
- È stato dimostrato che la fosforilazione *in vitro* di CPS II da parte delle MAP chinasi abolisce l'inibizione da UMP, *in vivo* questo tipo di controllo è innescato da EGF.

Regolazione



Interconversione delle pirimidine



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

- 47

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.gsartor.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

V.0.2 © gsartor 2001-2013

Metabolismo dei nucleotidi

- 48