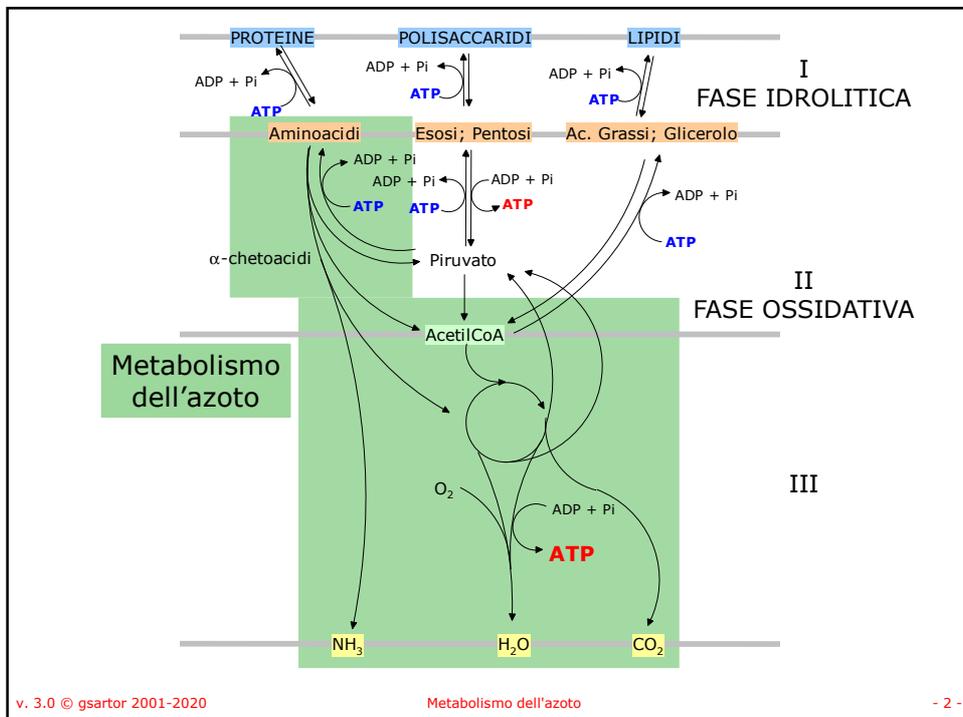
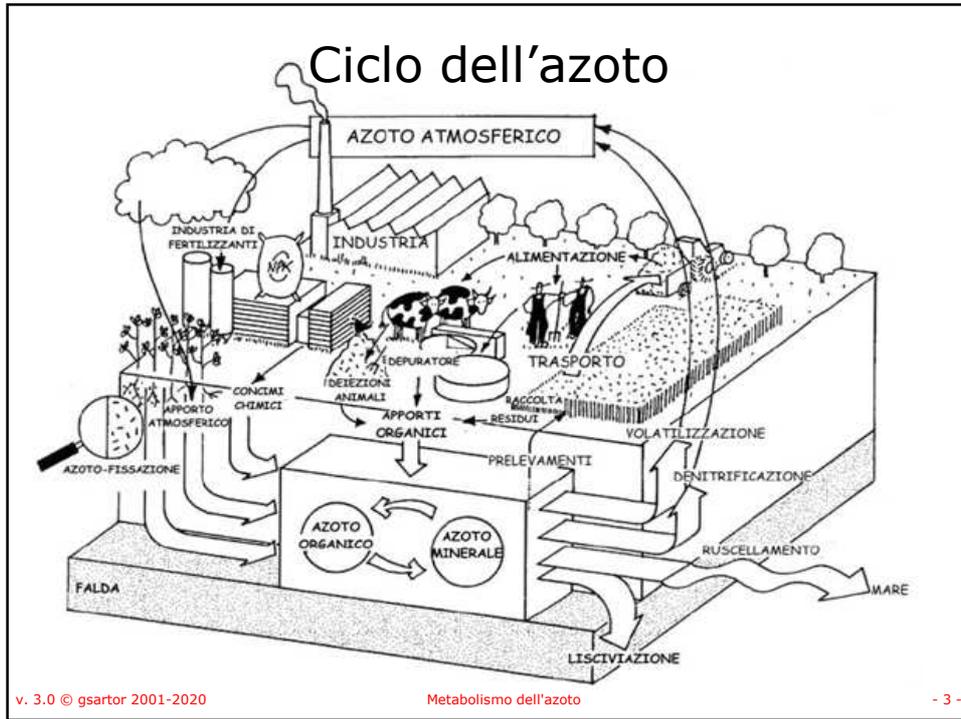




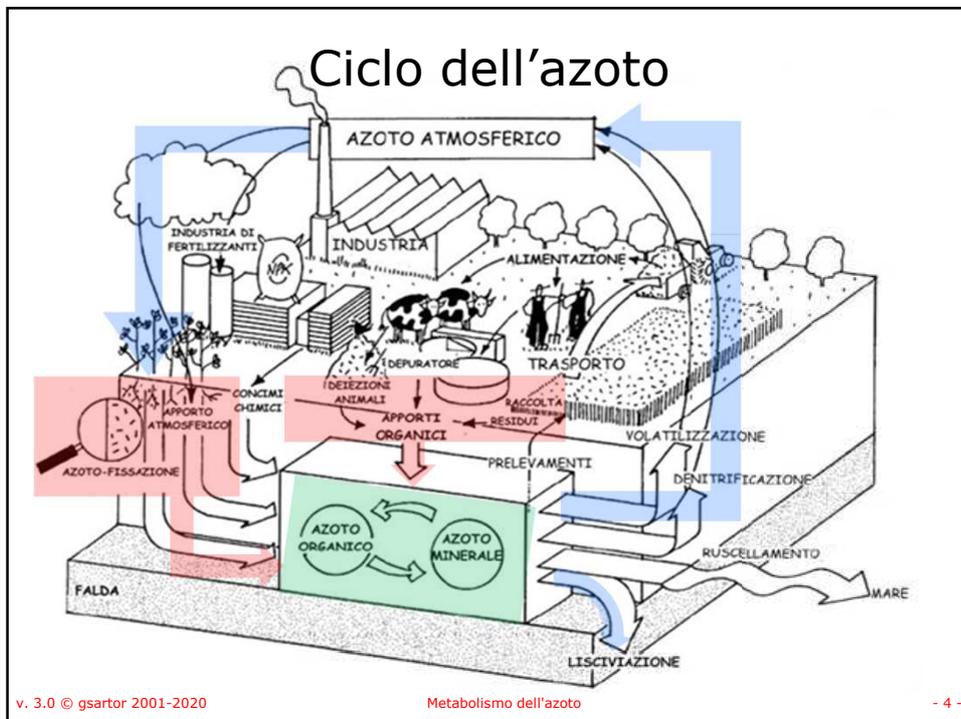
1



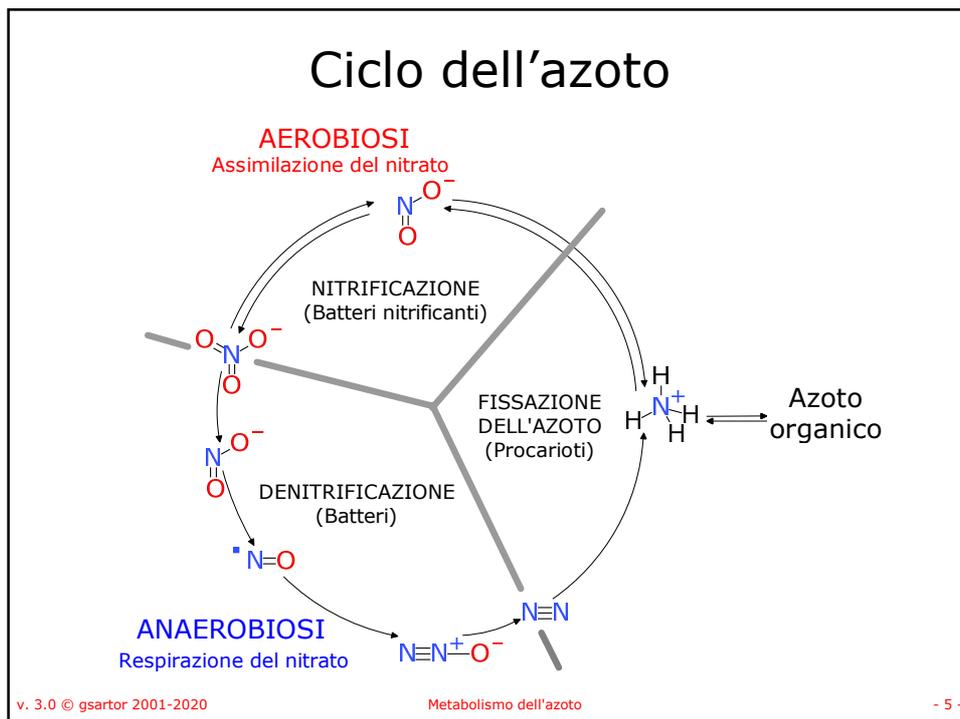
2



3



4



5

Metabolismo dell'azoto

- L'azoto è presente nei composti organici in forma ridotta (-3).

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ H-N^+-H \\ | \\ H \end{array}$$
- Nell'ambiente l'azoto è presente in forma ossidata (0 e +5)

$$N \equiv N \quad \begin{array}{c} O \\ // \\ O=N^+-O^- \\ // \\ O \end{array}$$

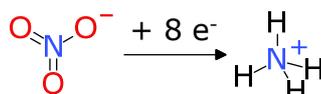
v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 6 -

6

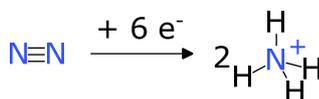
Metabolismo dell'azoto

- Le specie ossidate vengono convertite nella specie ridotta da due diversi processi:

- Assimilazione del nitrato (avviene negli eucarioti fototrofi, piante verdi)



- Fissazione dell'azoto (avviene nei procarioti sia autonomi che simbiotici di eucarioti)



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 7 -

7

Assimilazione del nitrato

- Nelle piante **verdi** (eucarioti) l'assimilazione del nitrato avviene in due successivi passaggi:



Nitrato reduttasi

Respiratoria - EC 1.7.99.4

NADH - EC 1.7.1.1

NAD(P)H - EC 1.7.1.2

NADPH - EC 1.7.1.3

Ferredossina - EC 1.7.7.2

Cyt c - EC 1.9.6.1



Nitrito reduttasi

NAD(P)H - EC 1.7.1.4

Ferredossina - EC 1.7.7.1

Cyt c - EC 1.7.2.2

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

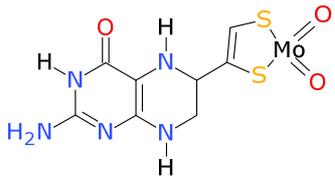
Metabolismo dell'azoto

- 8 -

8

Nitrato reduttasi

- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- Contiene come cofattori:
 - FAD
 - Cofattore molibdeno →
 - Citocromo b₅₇₇

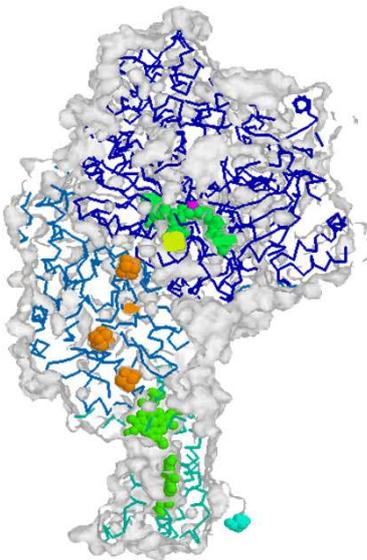


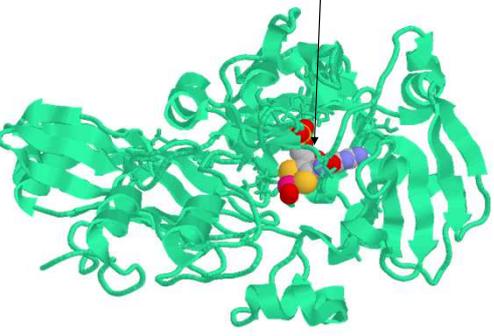
$$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \xrightarrow{2\text{NADH}} \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + 2\text{NAD}^+$$

v. 3.0 © gsartor 2001-2020
Metabolismo dell'azoto
- 9 -

9

Nitrato reduttasi





Cofattore molibdeno

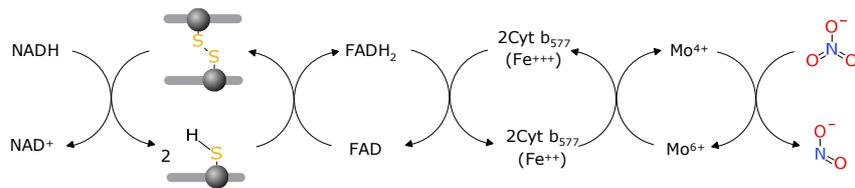
Dominio catalitico

v. 3.0 © gsartor 2001-2020
Metabolismo dell'azoto
- 10 -

10

Nitrato reduttasi

- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- La catena di trasferimento elettronico:



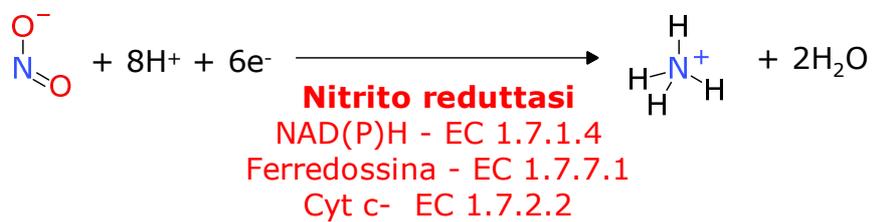
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 11 -

11

Nitrito reduttasi



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

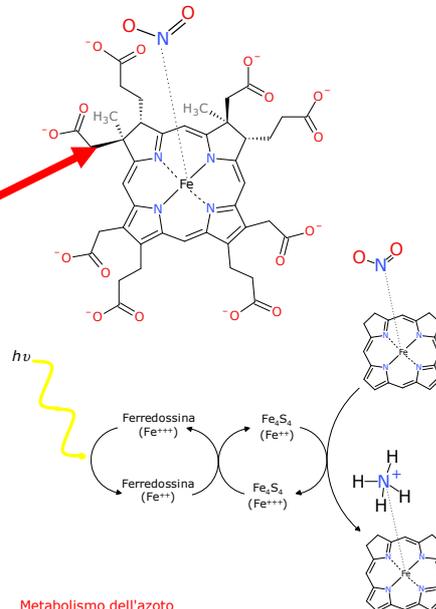
Metabolismo dell'azoto

- 12 -

12

Nitrito reduttasi EC 1.7.1.4

- La nitrito reduttasi presente nei cloroplasti agisce attraverso la ferredossina ridotta dalla fotosintesi,
- Il trasferimento di elettroni coinvolge un gruppo sioeme nel quale il ferro complessa lo ione nitrito che viene ridotto a ione ammonio.



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 13 -

13

Fissazione dell'azoto

- Avviene nei procarioti che possono essere sia simbiotici di piante superiori che avere vita autonoma
- Requisiti essenziali per la fissazione dell'azoto:
 - Un riducente
 - ferredossina, EC 1.18.6.1
 - flavodossina, EC 1.19.6.1
 - ATP
 - Anaerobiosi
 - Meccanismi di regolazione

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 14 -

14

Il complesso enzimatico della nitrogenasi

- Il complesso enzimatico della nitrogenasi è composta di due proteine entrambe richieste per l'attività:
 - La nitrogenasi reduttasi e
 - La nitrogenasi
- La nitrogenasi reduttasi è una proteina 4Fe-4S che, legando due molecole di ATP e una ferredossina, genera un elettrone che viene trasferito alla nitrogenasi.
- La nitrogenasi, catalizza la reazione:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

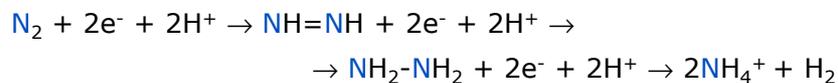
- 15 -

15

Il complesso enzimatico della nitrogenasi

- La nitrogenasi riduce l'azoto a ione ammonio attraverso tre riduzioni successive nella quale utilizza due elettroni per volta.

- La riduzione avviene come:



- La riduzione porta alla formazione di H_2 .
- Lo stesso enzima porta alla produzione di etilene (e etano) da acetilene, di azoto e ammonio da azide e metano e ammonio dal cianuro. In assenza di un substrato disponibile si ha la lenta produzione di H_2 .
- La ferredossina può essere rimpiazzata dalla flavodossina (EC 1.19.6.1).

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 16 -

16

Il complesso enzimatico della nitrogenasi

- Richiede la presenza di Mg^{++}
- Richiede ATP nonostante che la reazione:

$$N_2 + 8e^- + 10H^+ \rightarrow 2NH_4^+ + H_2$$
 sia termodinamicamente favorita, ($\Delta G \ll 0$), è invece elevata l'energia di attivazione ($\Delta G^* > 0$)
- Il sistema è fortemente inibito dall' O_2 , ma richiede ATP, formato da O_2 ,
- gli organismi simbiotici che usano la nitrogenasi operano al limite tra il poco ossigeno per evitare l'inibizione e l'ossigeno necessario a formare ATP, sfruttando l'emoglobina dell'ospite.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

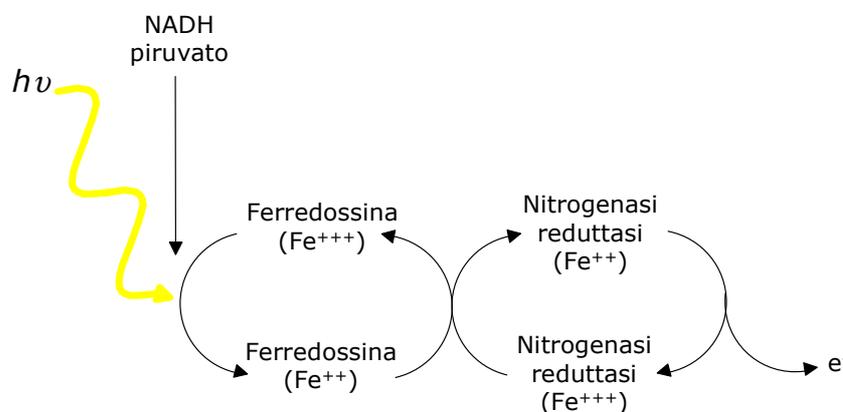
Metabolismo dell'azoto

- 17 -

17

Il complesso enzimatico della nitrogenasi

- Nitrogenasi reduttasi: un enzima che opera in anaerobiosi (sensibile all O_2), peso molecolare 60KD, contiene un centro Fe_4S_4 .

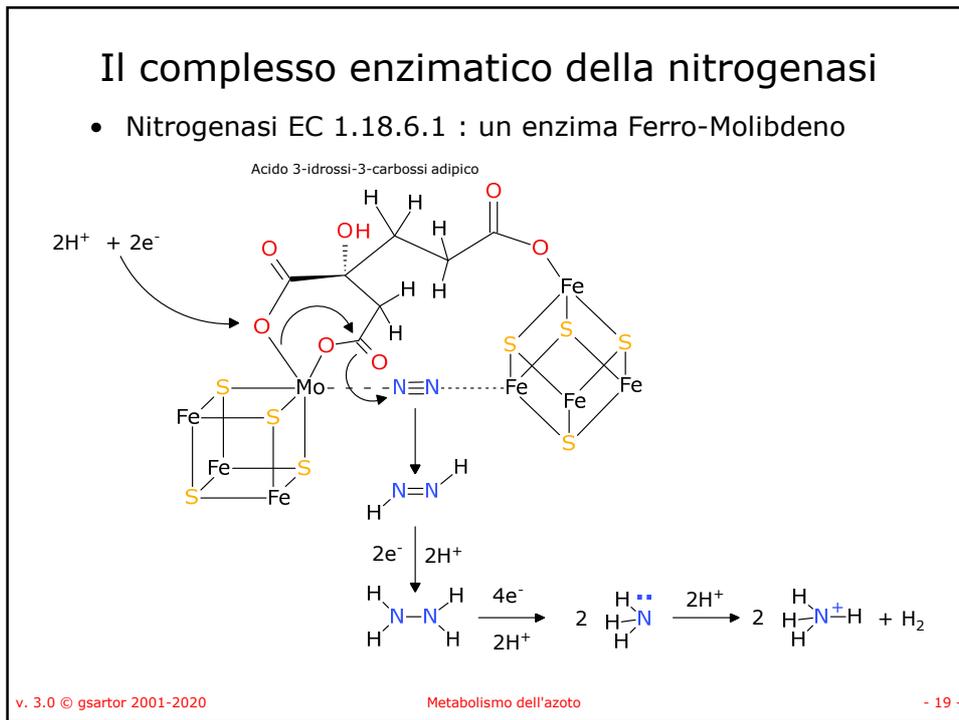


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

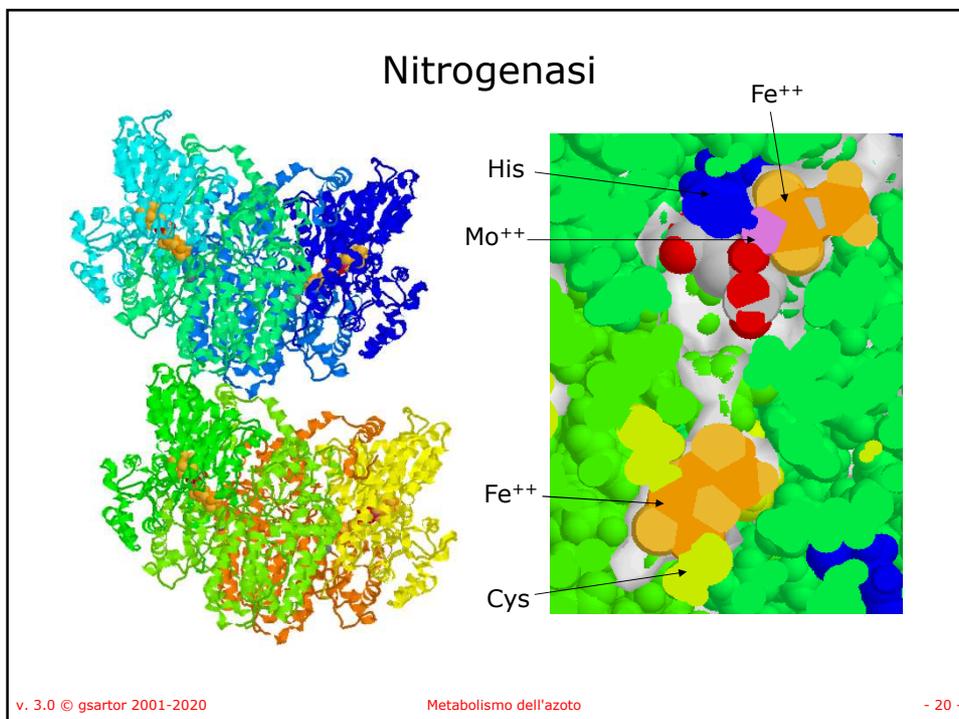
Metabolismo dell'azoto

- 18 -

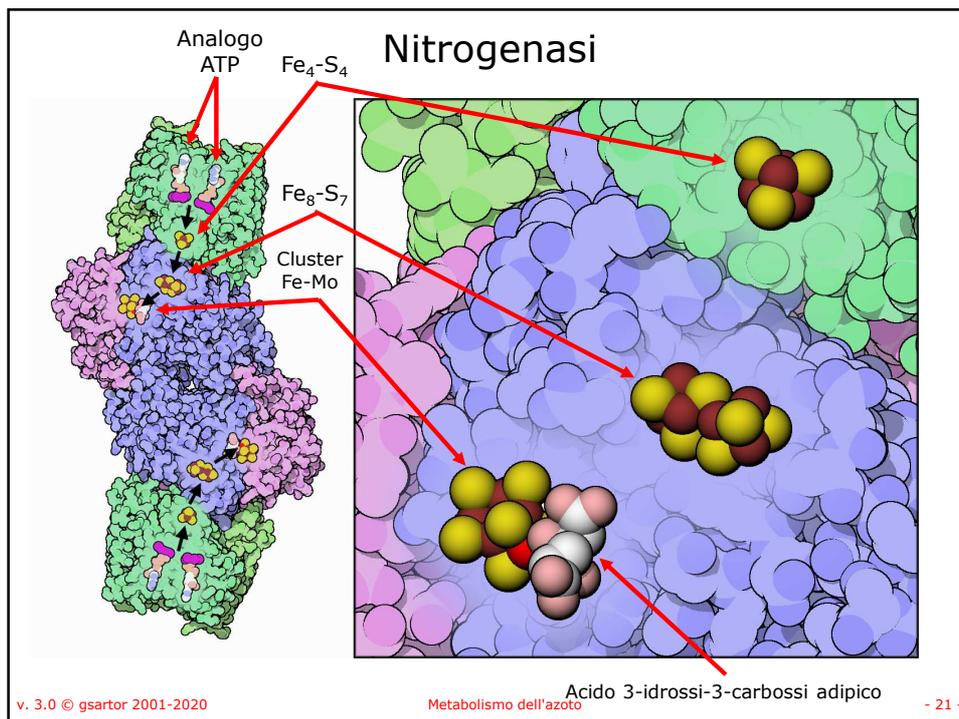
18



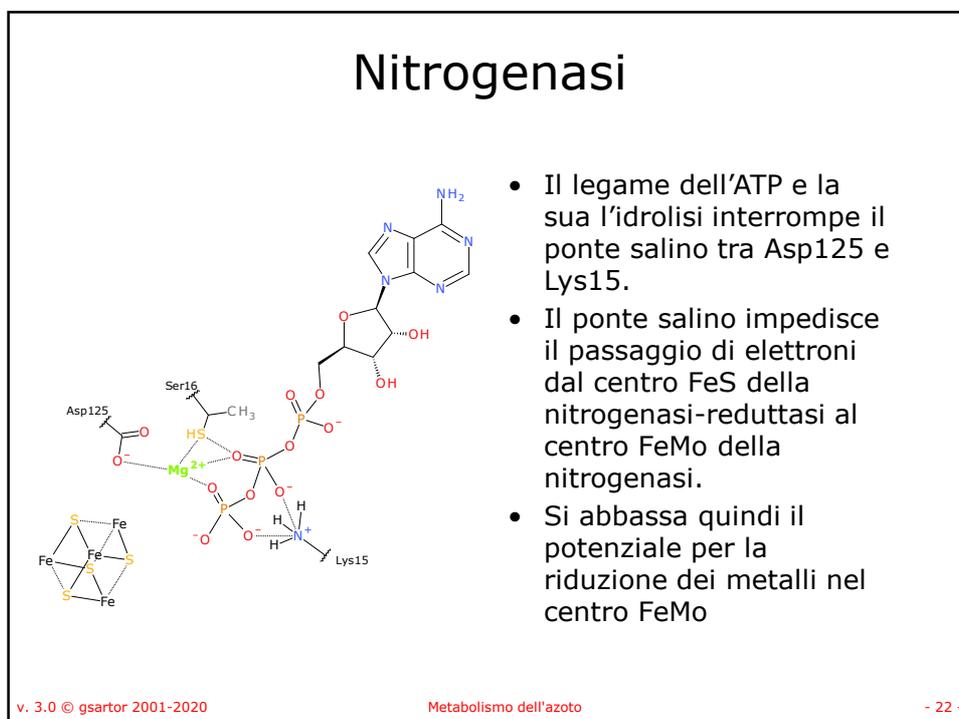
19



20



21



22

Regolazione della nitrogenasi

- I geni per la nitrogenasi e la nitrogenasi reductasi fanno parte di un complesso genico chiamato regulone *nif*.
- Il regulone *nif* comprende:
 - i geni strutturali per il complesso della nitrogenasi,
 - i geni per il complesso FeMo,
 - i geni che controllano le proteine implicate nel trasporto di elettroni,
 - diversi geni regolatori.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 23 -

23

Regolazione della nitrogenasi

- La nitrogenasi è sottoposta a una regolazione molto rigorosa.
 - La fissazione dell'azoto è inibita da O_2
 - dalla presenza di azoto combinato, NH_3 , NO_3 e alcuni aminoacidi.
- La regolazione avviene soprattutto a livello della trascrizione:
 - La trascrizione dei geni *nif* strutturali è
 - *attivata* dalla proteina NifA (regolazione positiva)
 - e
 - *repressa* dalla proteina NifL, (regolazione negativa)

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

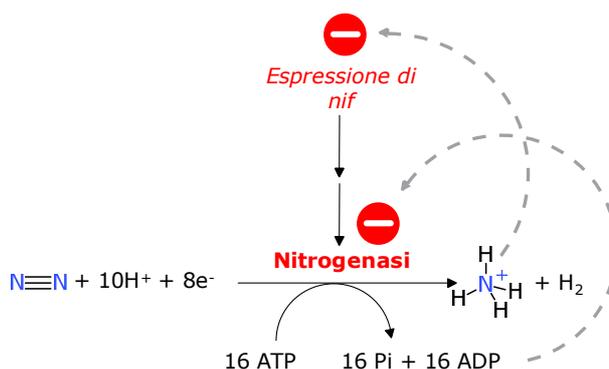
Metabolismo dell'azoto

- 24 -

24

Regolazione della nitrogenasi

- Il sistema della nitrogenasi è regolato sia a livello dell'attività enzimatica (feedback negativo da prodotto) che a livello dell'espressione genica della nitrogenasi:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

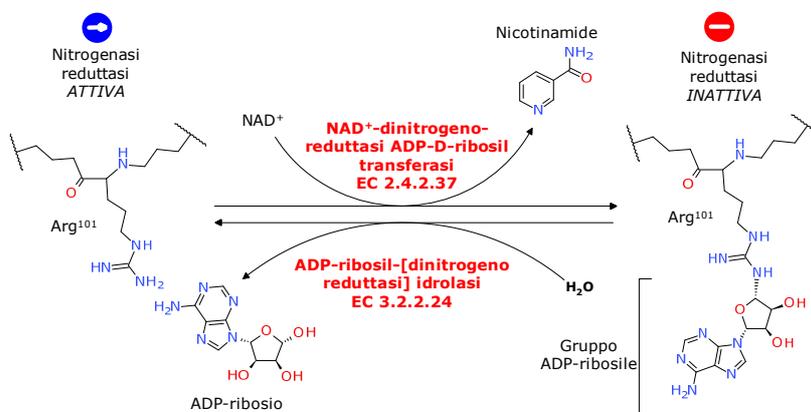
Metabolismo dell'azoto

- 25 -

25

Nitrogenasi reductasi

- Il sistema della nitrogenasi è regolato anche a livello della reductasi attraverso la formazione di un derivato ADP-ribosilato:

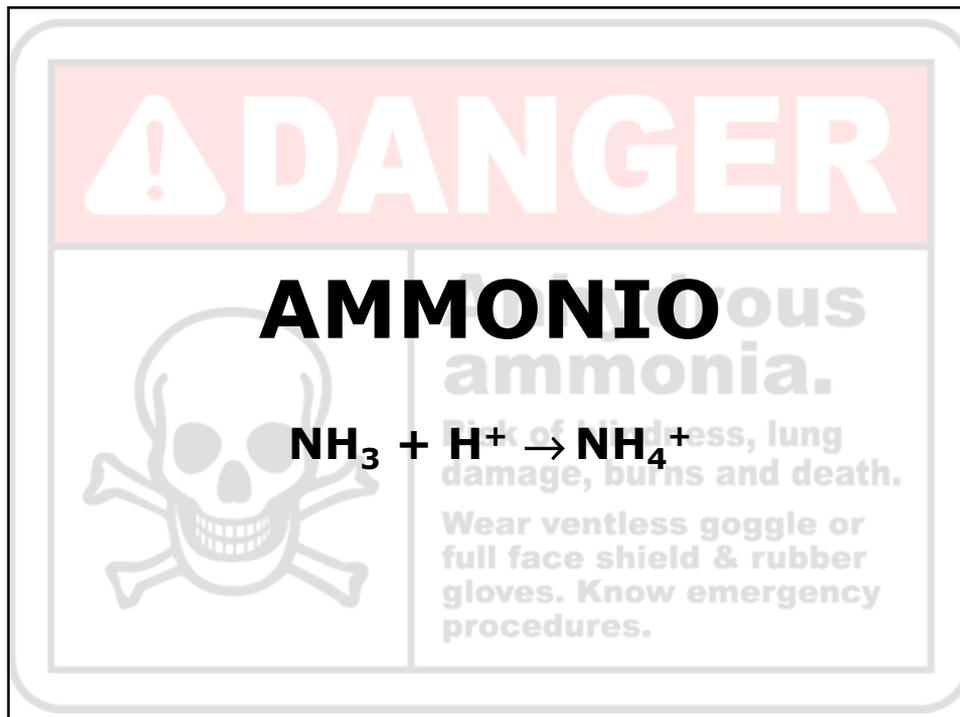


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

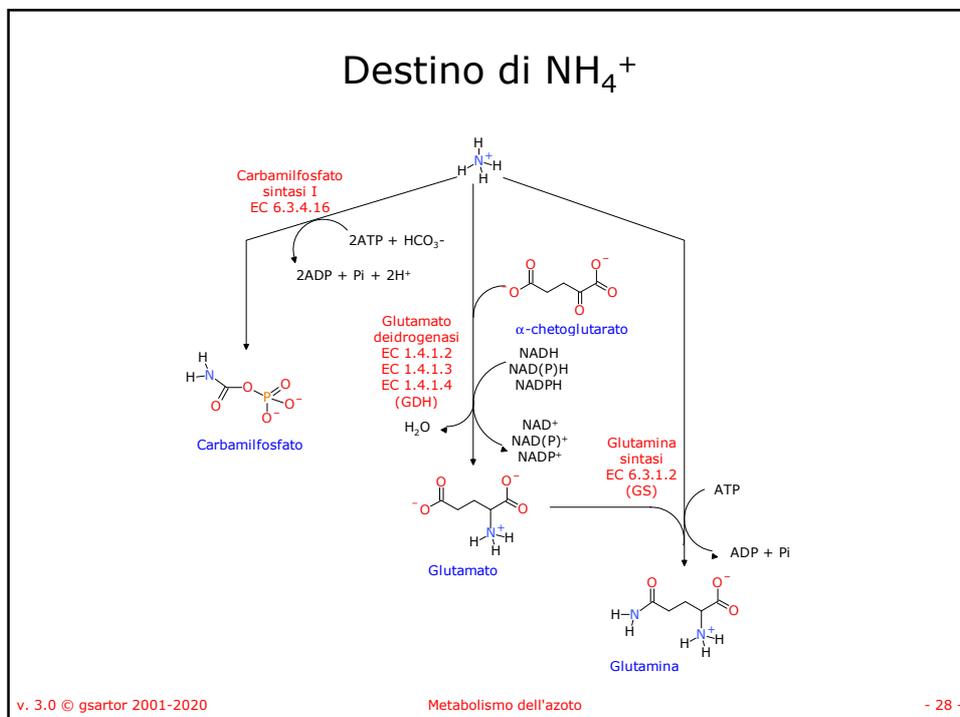
Metabolismo dell'azoto

- 26 -

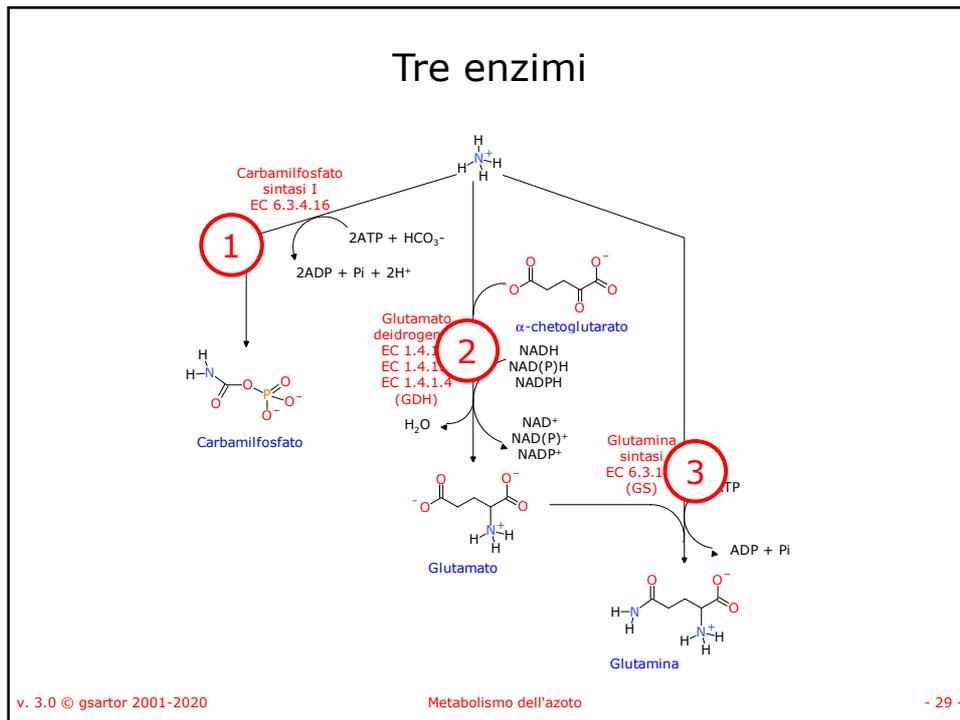
26



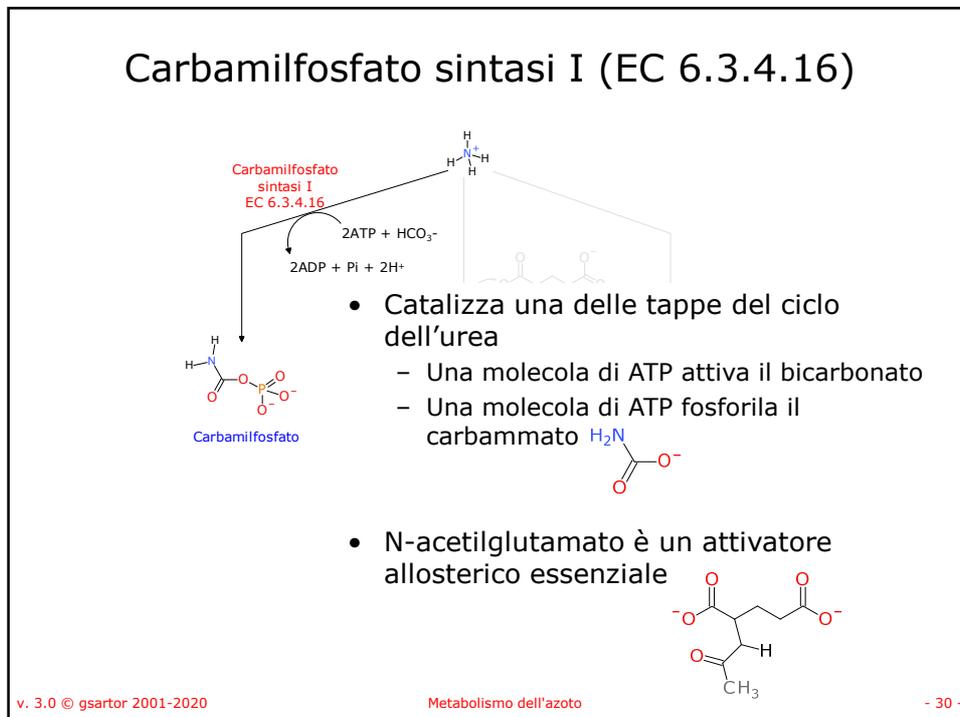
27



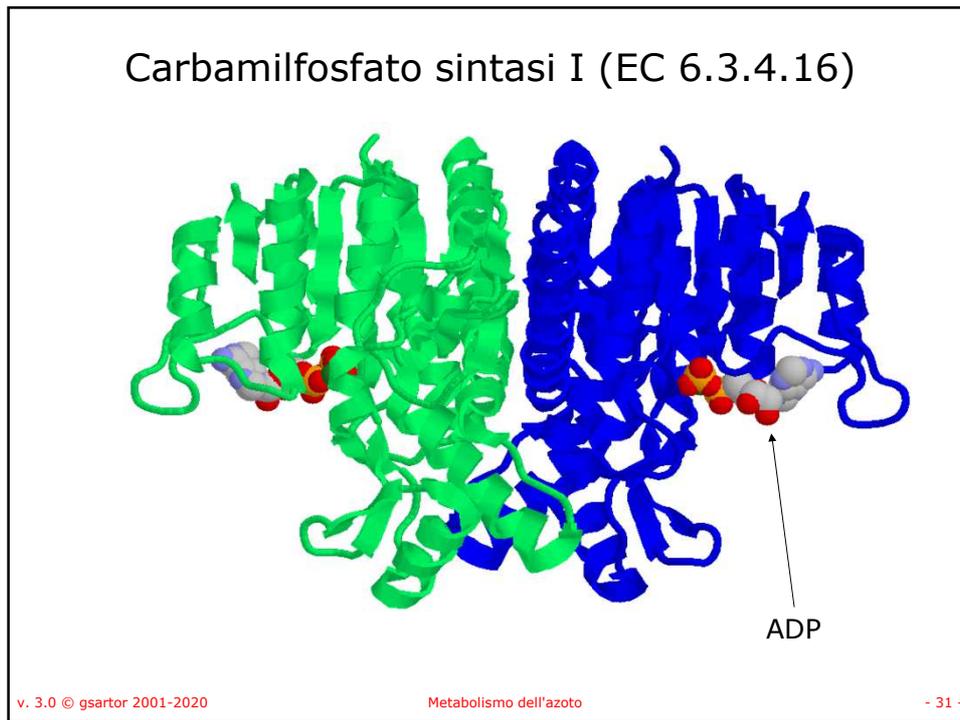
28



29



30



31

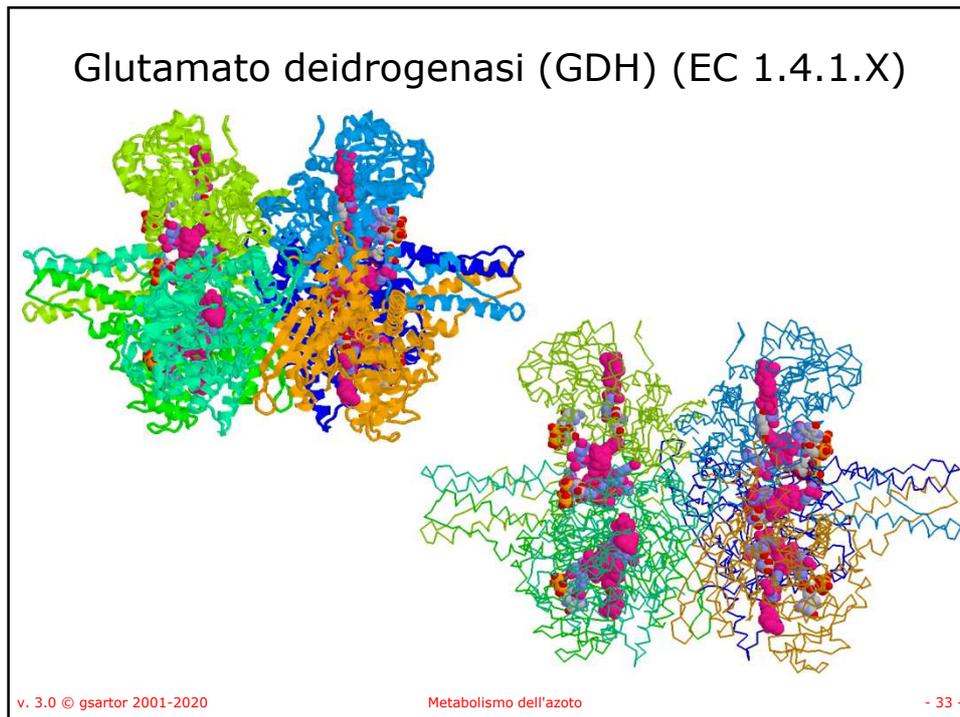
Glutamato deidrogenasi (GDH) (EC 1.4.1.X)

- È un esamero
- Tre diversi enzimi che usano NADH o NADPH o uno dei due.
 - EC 1.4.1.2 → NADH
 - EC 1.4.1.3 → NAD(P)H
 - EC 1.4.1.4 → NADPH
- Può operare sia nella via biosintetica che degradativa.

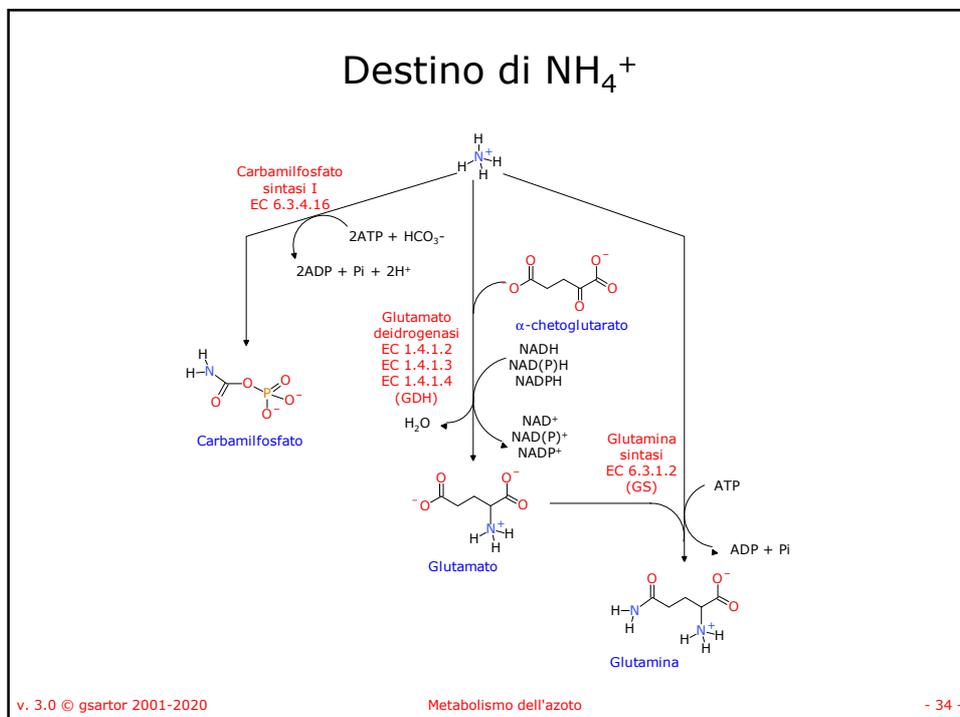
- Nel secondo caso è attivata allostericamente da ADP e inibita da GTP.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 32 -

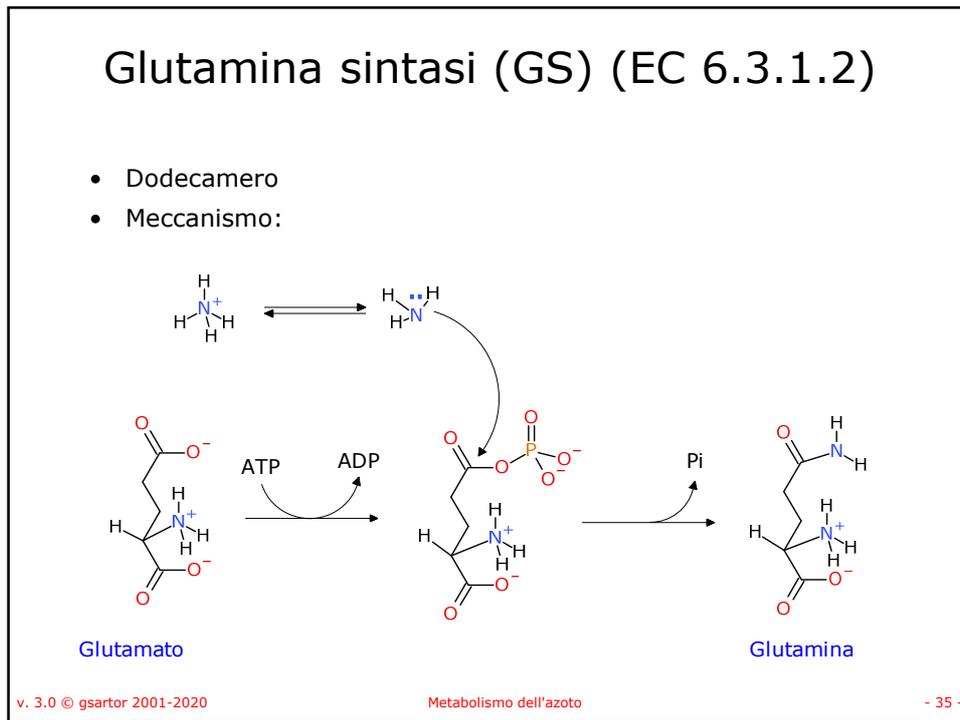
32



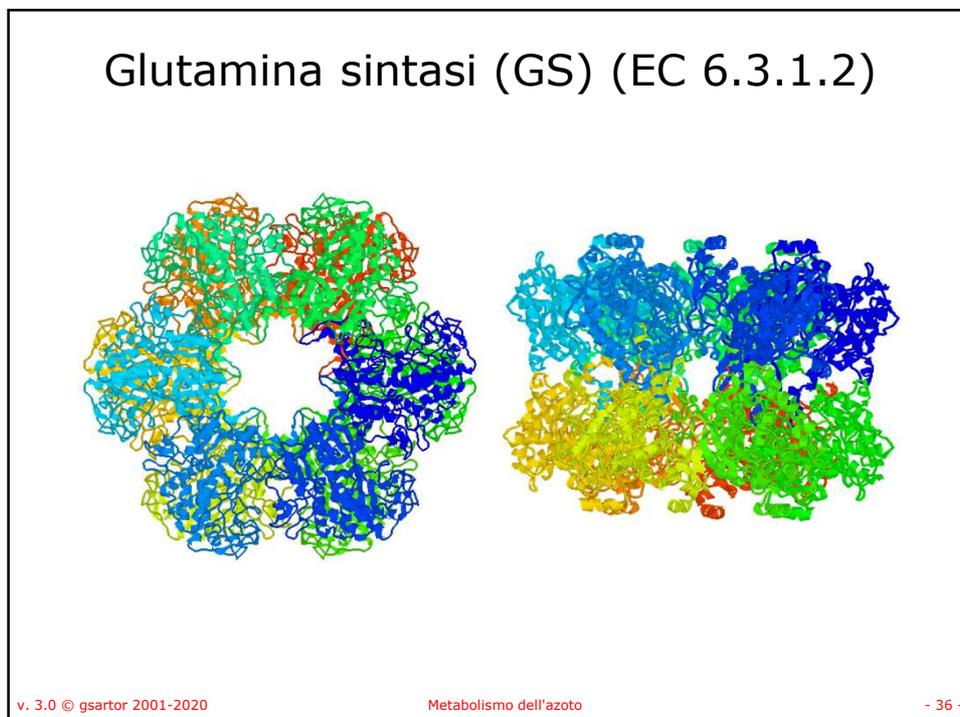
33



34



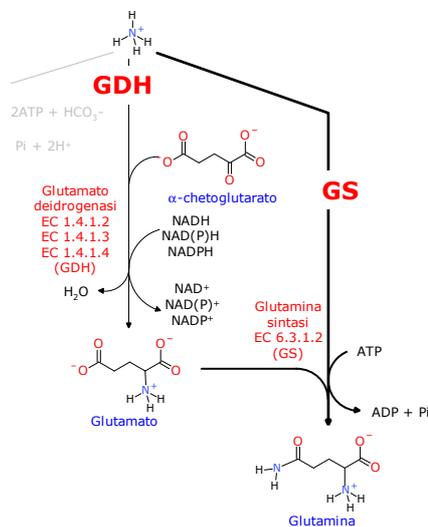
35



36

Correlazione e competizione tra GDH e GS

- La K_m per lo ione ammonio è diversa:
 K_m (GDH) > K_m (GS)
- la conseguenza è che ci si trova in carenza di glutamato che viene consumato più in fretta di quanto la GDH riesca a produrlo.
- Vi è un sistema di ripristino del glutamato a spese dell' α -chetoglutarato e della glutamina.



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

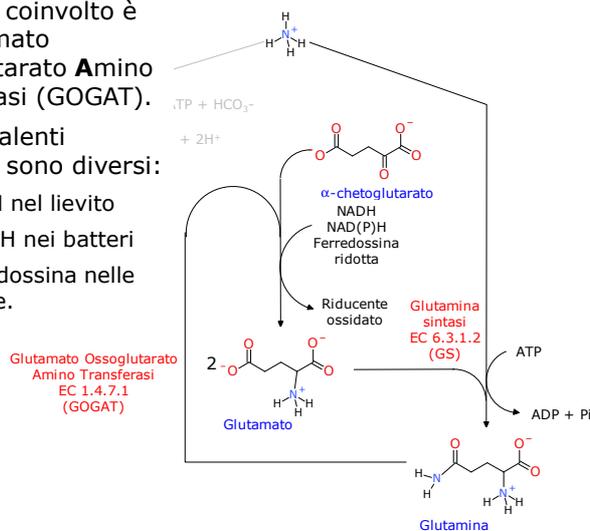
Metabolismo dell'azoto

- 37 -

37

GOGAT

- L'enzima coinvolto è la **Glutamato Ossoglutarato Amino Transferasi (GOGAT)**.
- Gli equivalenti riducenti sono diversi:
 - NADH nel lievito
 - NADPH nei batteri
 - Ferredossina nelle piante.

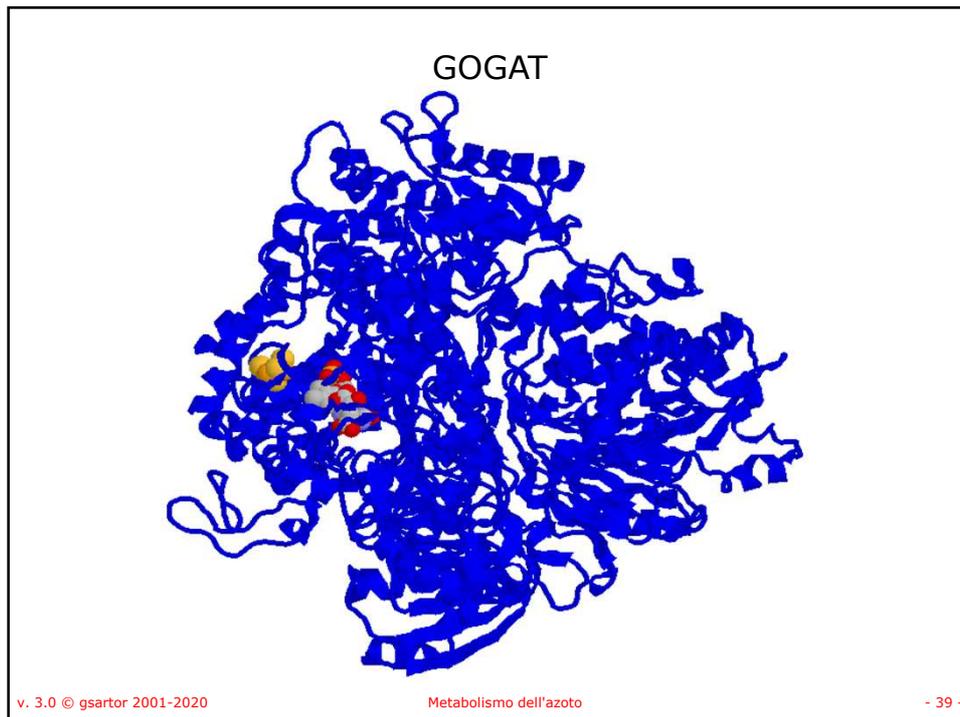


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 38 -

38



39

Regolazione allosterica della GS

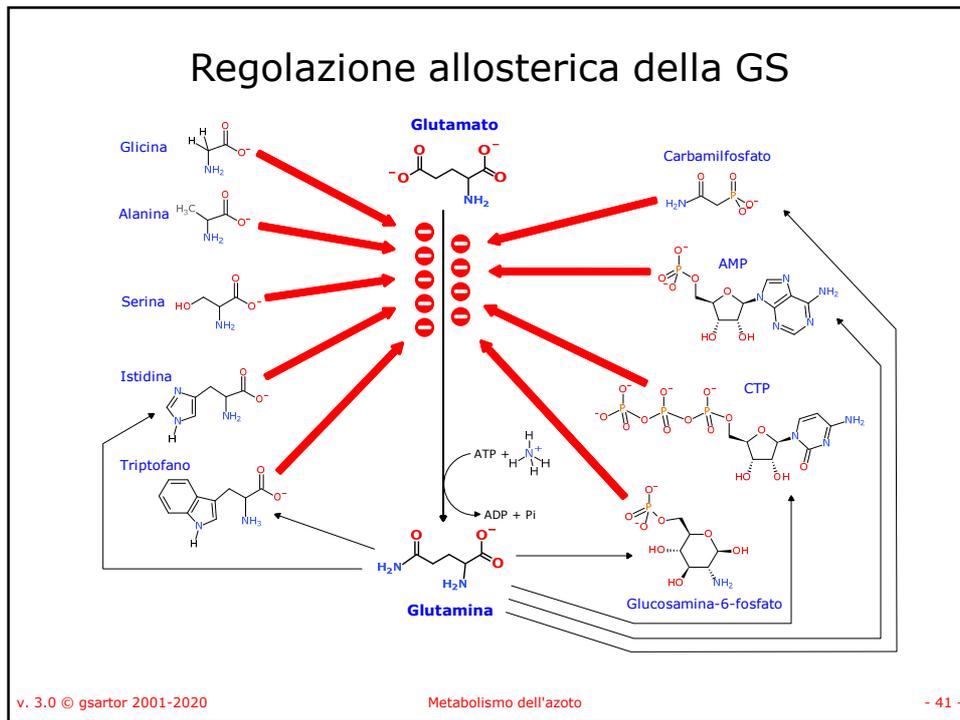
- La glutamina è un componente centrale nella biosintesi degli aminoacidi e dei nucleotidi,
- La sua sintesi è estremamente regolata:
 - In modo allosterico, da prodotti che provengono dalla glutamina,
 - In modo covalente,
 - Attraverso la regolazione genica.
- L'inibizione allosterica, da prodotti, è cumulativa,
 - mediamente ogni inibitore presente a concentrazione saturante satura l'11% dell'attività.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

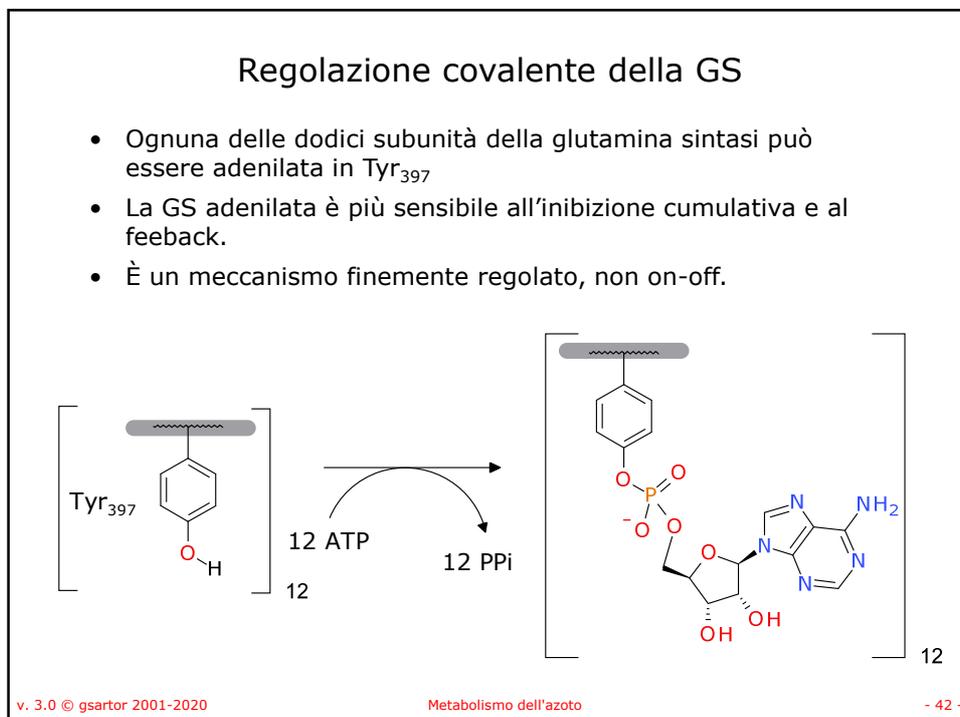
Metabolismo dell'azoto

- 40 -

40



41



42

Regolazione covalente della GS

- Nella regolazione covalente sono coinvolti due enzimi:
 - Il complesso adenililtransferasi, un tetramero di 11kD che viene regolato covalentemente attraverso il legame con il gruppo uridile:

$$P_{IIA} \rightarrow \text{Uridil-}P_{IID}$$
 - L'uridiltransferasi che catalizza la formazione di Uridil- P_{IID}
- Lo stato di P_{II} controlla la direzione in cui l'adenililtransferasi agisce.
- L'adenililtransferasi (nelle due forme) e l'uridiltransferasi sono regolate in modo allosterico da α -chetoglutarato e glutamina.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 43 -

43

Regolazione genica della GS

- Il gene che codifica per GS (*GlnA*) è attivato solo se uno specifico attivatore della trascrizione NR_I è fosforilato ($NR_I-PO_3^{--}$)

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 44 -

44

Biosintesi degli aminoacidi

- Non tutti gli organismi viventi riescono a sintetizzare gli aminoacidi a partire dallo ione NH_4^+ :
- Piante, batteri e lieviti:
 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{glutamato} \rightarrow \text{Aminoacidi}$
- Nei mammiferi:
- Aminoacidi essenziali:
 - **Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val.**
- Aminoacidi non essenziali:
 - Ala, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, Pro, Ser, Tyr.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

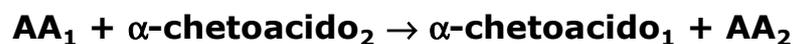
Metabolismo dell'azoto

- 45 -

45

Biosintesi degli aminoacidi

- Gli aminoacidi vengono, nella maggior parte dei casi, sintetizzati a partire dall' α -chetoacido corrispondente attraverso una specifica aminotransferasi (transaminasi):



- Le transaminasi trasferiscono un gruppo aminico da un AA ad un α -chetoacido

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 46 -

46

Transaminazione

- Le reazioni di transaminazione usano come coenzima il piridossal fosfato.
- Il piridossal fosfato forma una base di Schiff con un residuo di Lys della transaminasi

Piridossina
(Vit B₆)

Piridossal
fosfato

Piridossamina
fosfato

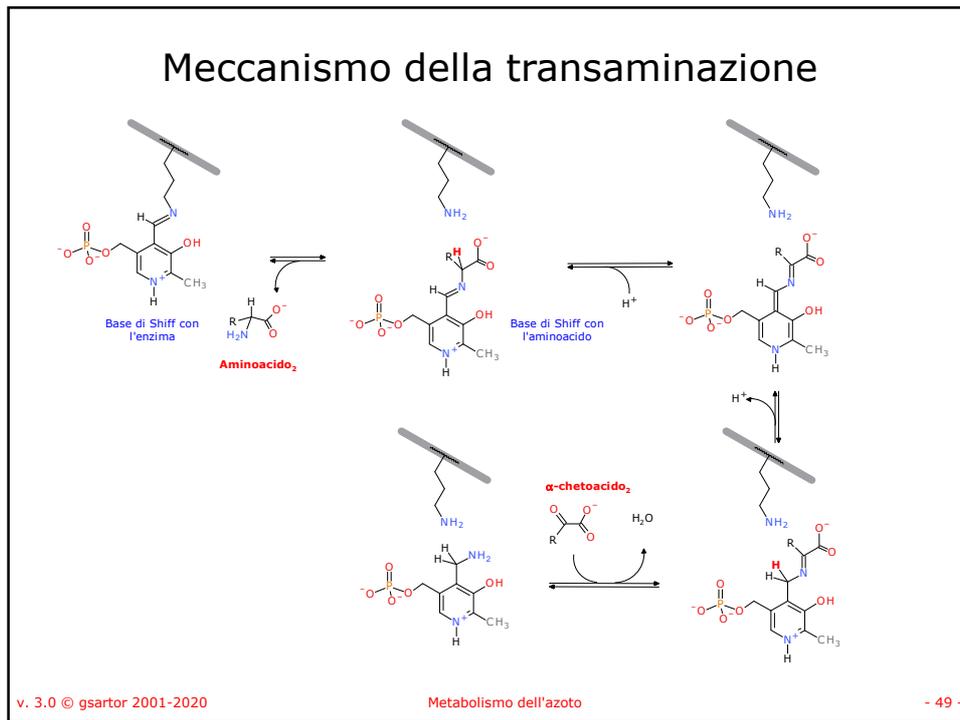
v. 3.0 © gsartor 2001-2020
Metabolismo dell'azoto
- 47 -

47

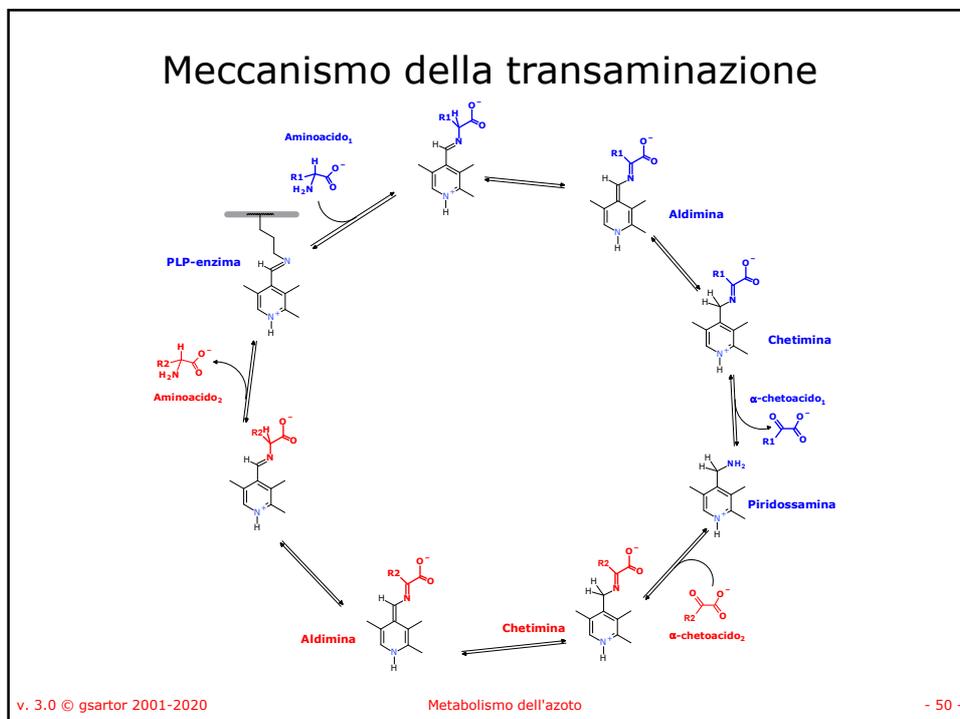
Meccanismo della transaminazione

v. 3.0 © gsartor 2001-2020
Metabolismo dell'azoto
- 48 -

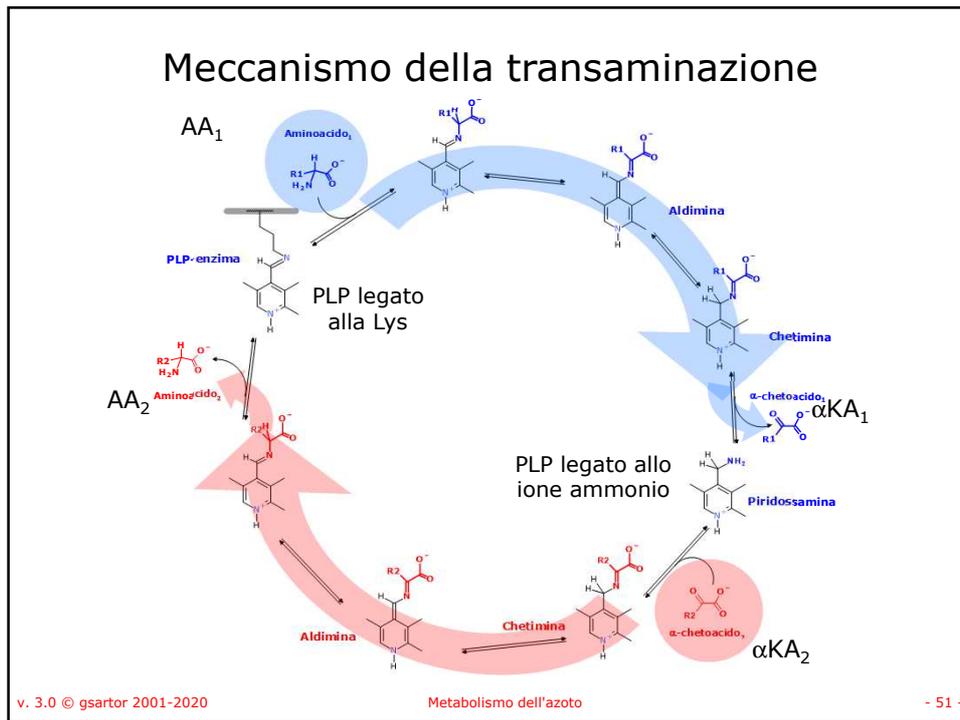
48



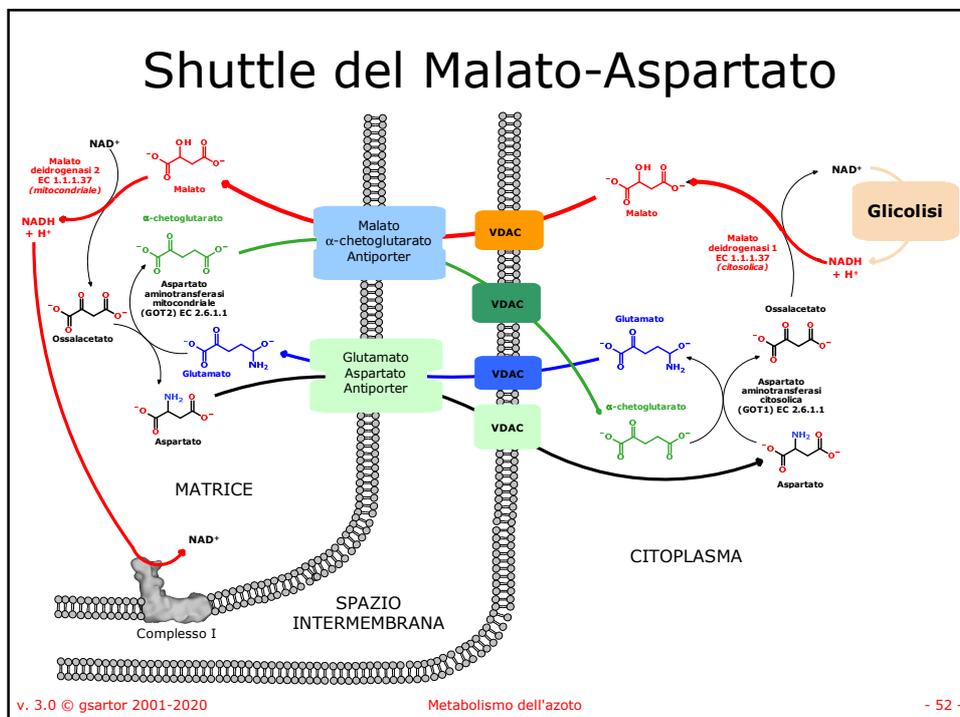
49



50



51



52

Biosintesi degli aminoacidi

- Gli aminoacidi possono essere raggruppati in base agli intermedi dai quali provengono:
 - Famiglia dell' α -ketoglutarato:
 - Glu, Gln, Pro, **Arg, Lys.**
 - Famiglia dell'aspartato:
 - Asp, Asn, **Met, Thr, Ile, Lys.**
 - Famiglia del fosfoenolpiruvato e dell'eritrosio-4-fosfato:
 - Tyr, **Phe, Trp**
 - Famiglia del piruvato:
 - Ala, **Val, Leu**
 - Famiglia del 3-fosfoglicerato:
 - Ser, Gly, Cys
 - Dal fosforibosilpirofosfato:
 - **His**

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

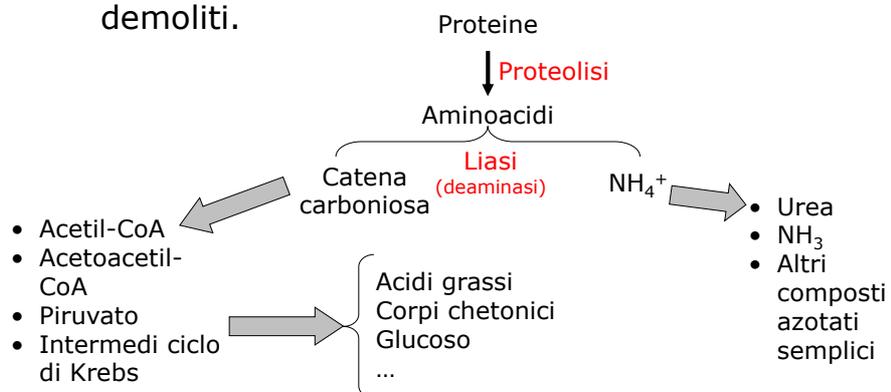
Metabolismo dell'azoto

- 53 -

53

Degradazione degli aminoacidi

- A differenza degli acidi e grassi e dei glucidi gli aminoacidi in eccesso non possono né essere immagazzinati in macromolecole di deposito né essere escreti come tali, vengono quindi demoliti.



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 54 -

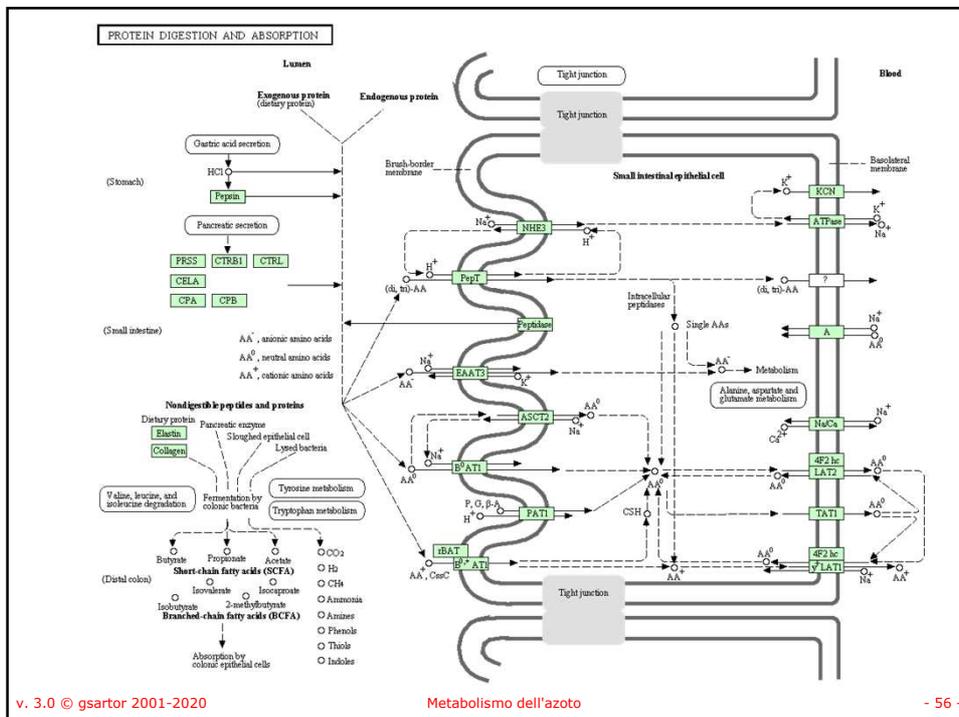
54

Proteolisi

- **Idrolisi del legame peptidico**
 - Nell'intestino dell'uomo sono presenti diverse proteasi secrete da diversi organi digestivi:
 - Dallo stomaco: pepsina
 - Dal pancreas: chimotripsina e tripsina
 - Dall'intestino tenue: peptidasi intestinali (leucina aminopeptidasi).

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 55 -

55



56

Pepsina

- Secreta dalle cellule della mucosa gastrica (che secernono anche HCl) come pepsinogeno inattivo (40 kD):

Pepsinogeno

pH acido ↓

Pepsina ↻ -42AA

↓

...-AA-AA-AA-AA-... → AA + AA-AA + AA-AA-AA

- Taglia con maggior frequenza legami tra aminoacidi aromatici, Met, Leu e produce peptidi e pochi aminoacidi liberi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 57 -

57

Chimotripsina e tripsina

Chimotripsinogeno

↓

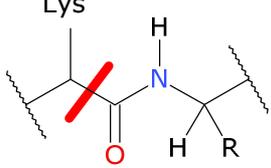
Chimotripsina + 2 peptidi

Tripsinogeno

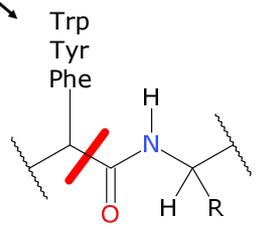
↓

Tripsina + peptide 6 AA N-terminale

Arg
Lys

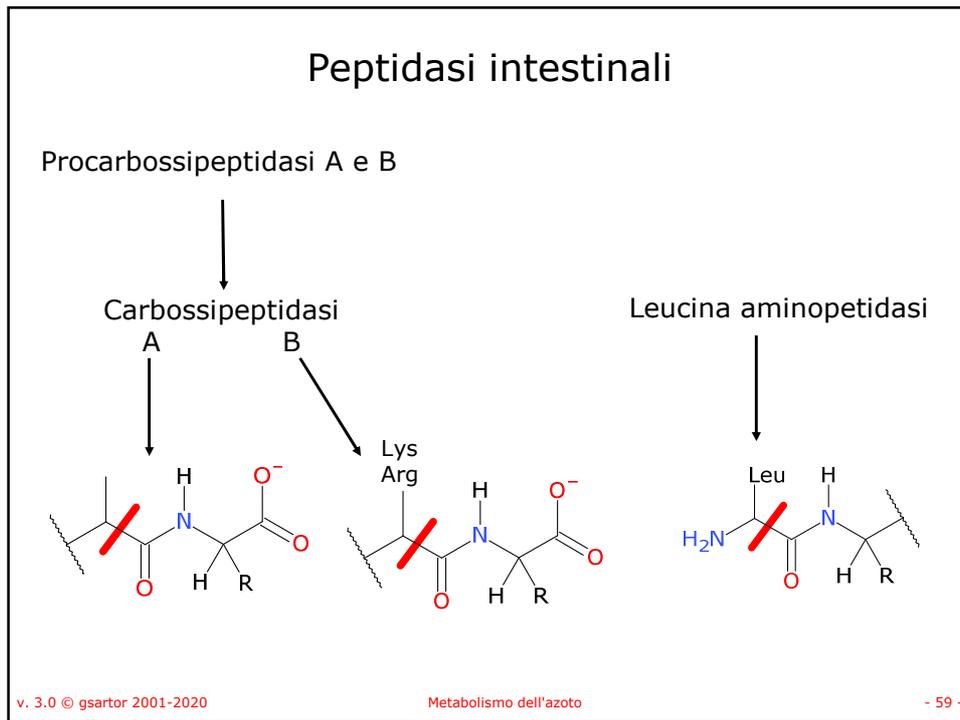


Trp
Tyr
Phe

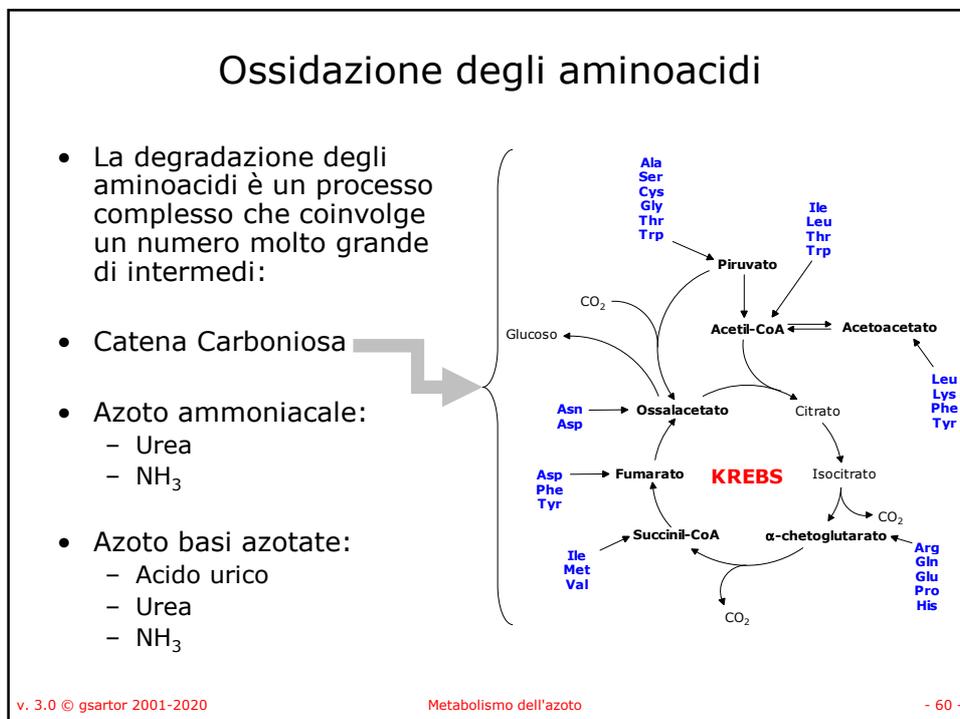


v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 58 -

58



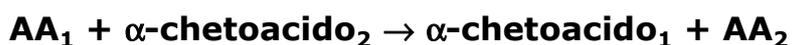
59



60

Azoto

- Il primo stadio della degradazione degli aminoacidi è la rimozione del gruppo amminico attraverso le aminotransferasi:



- Oppure attraverso le deaminasi:



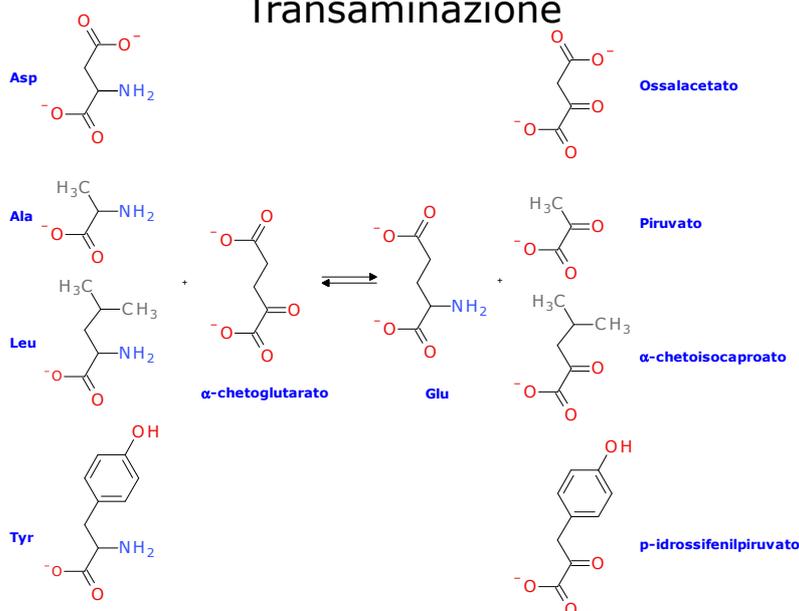
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 61 -

61

Transaminazione

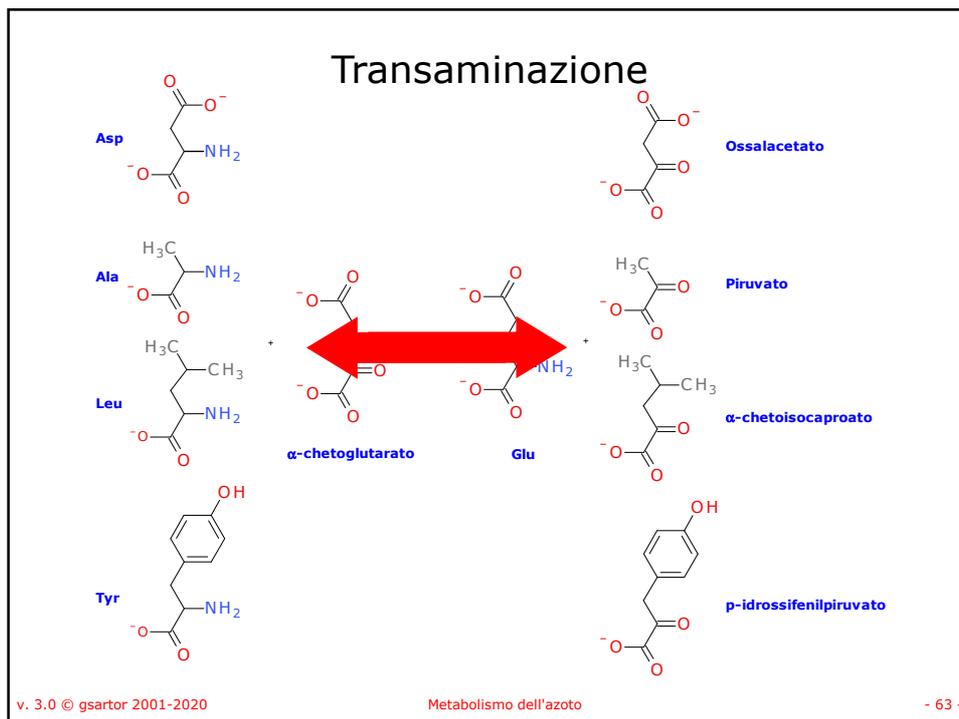


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

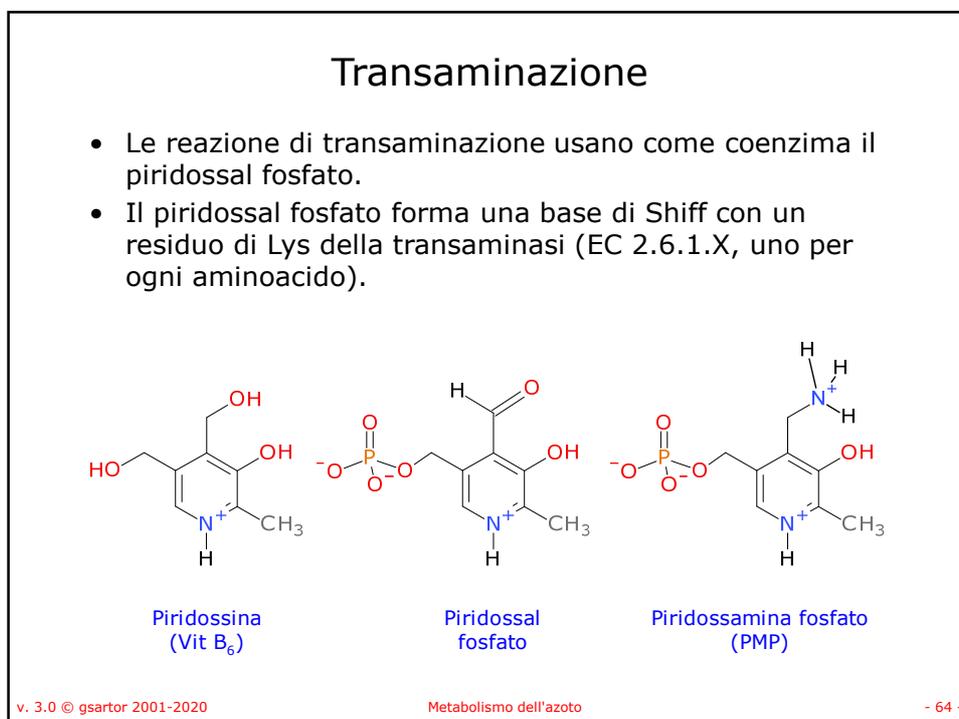
Metabolismo dell'azoto

- 62 -

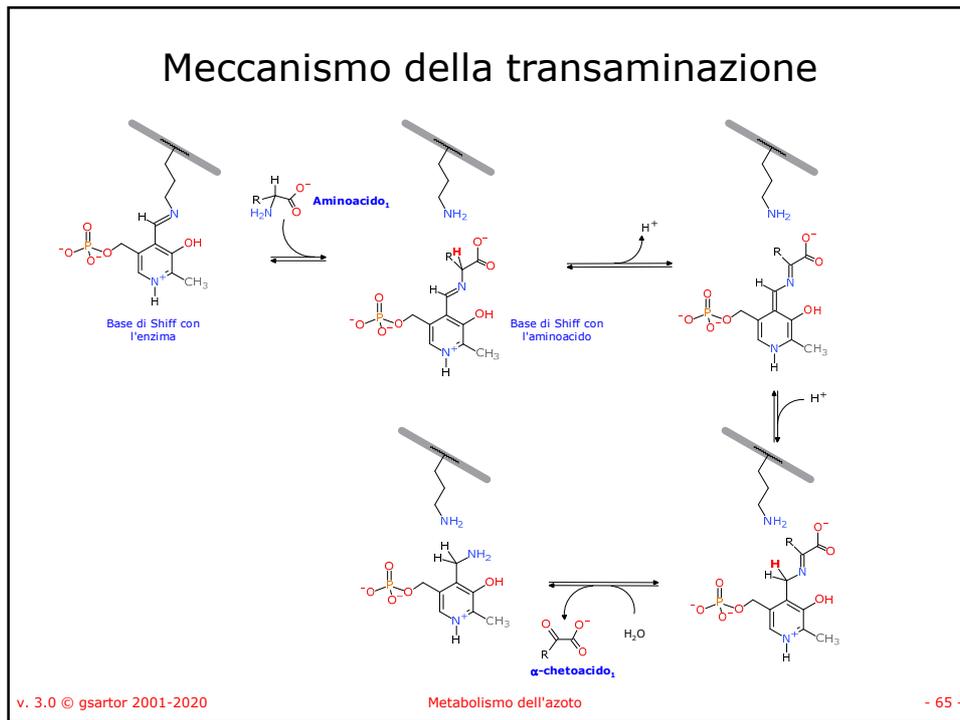
62



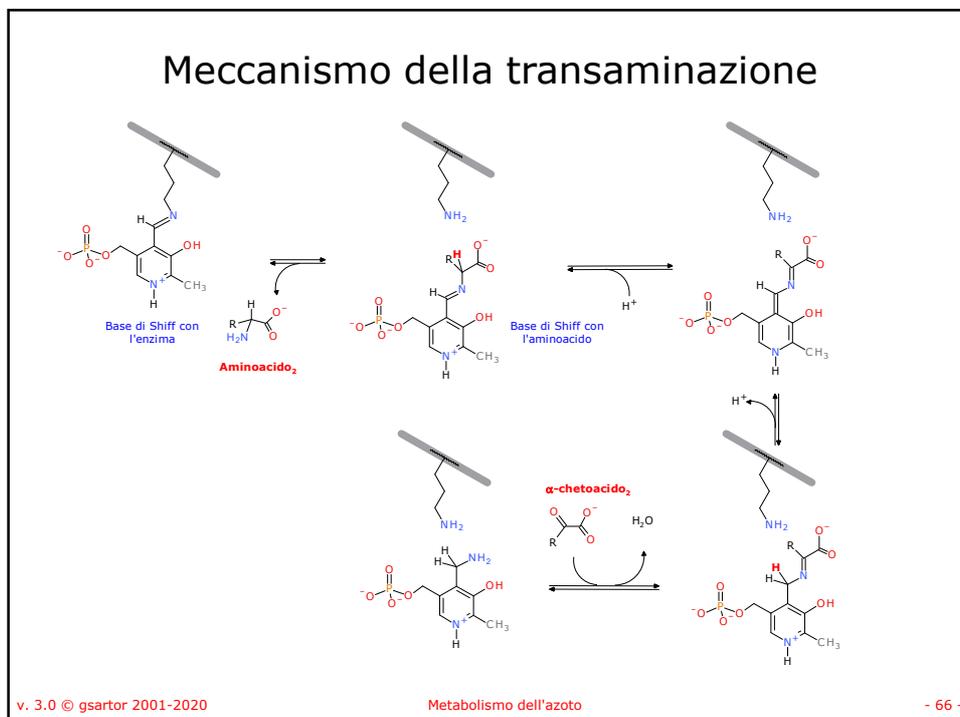
63



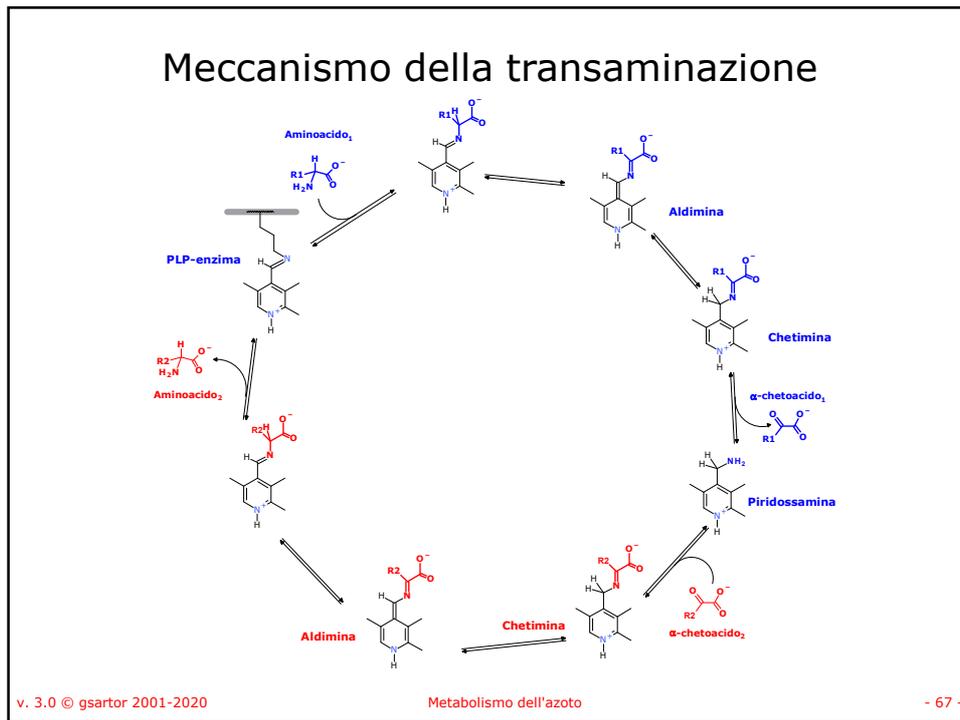
64



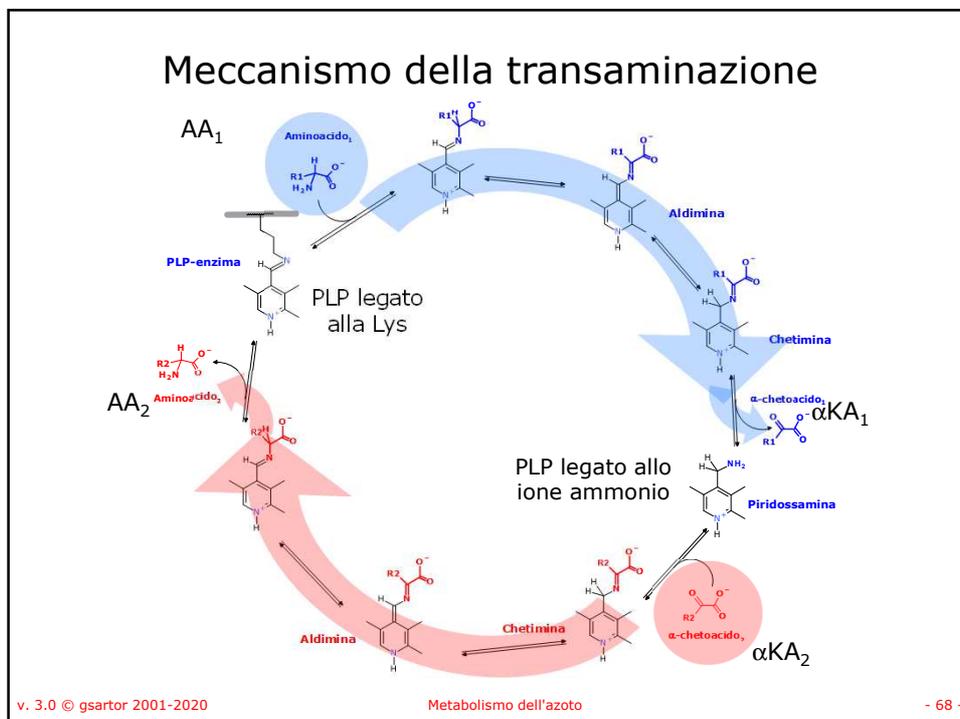
65



66



67



68

Meccanismo della transaminazione

- Il PLP è legato alla Lys come base di Schiff

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 69 -

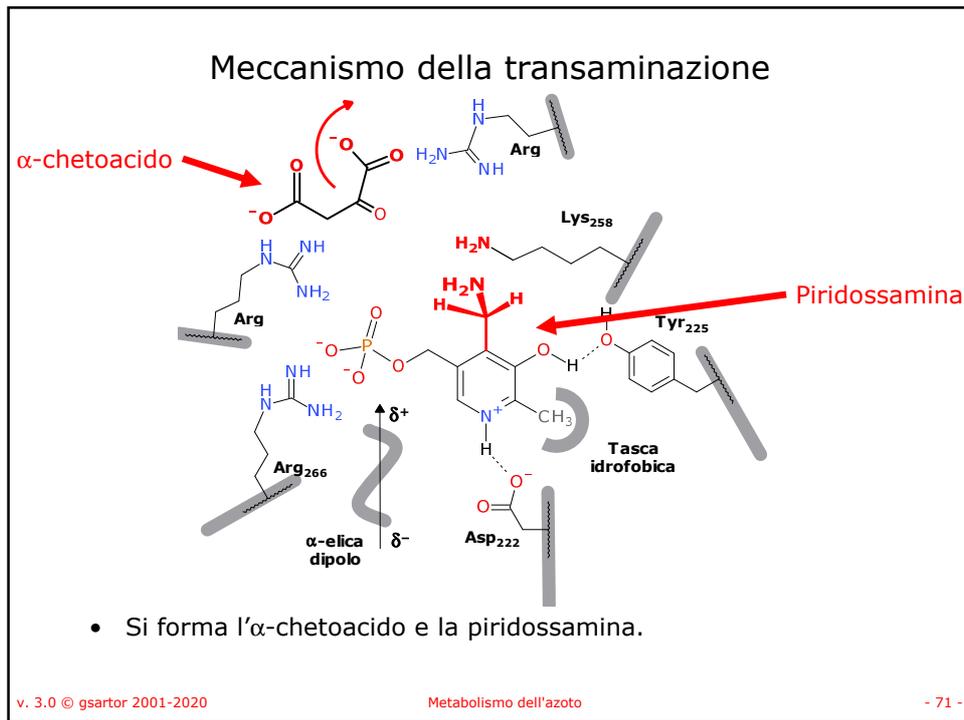
69

Meccanismo della transaminazione

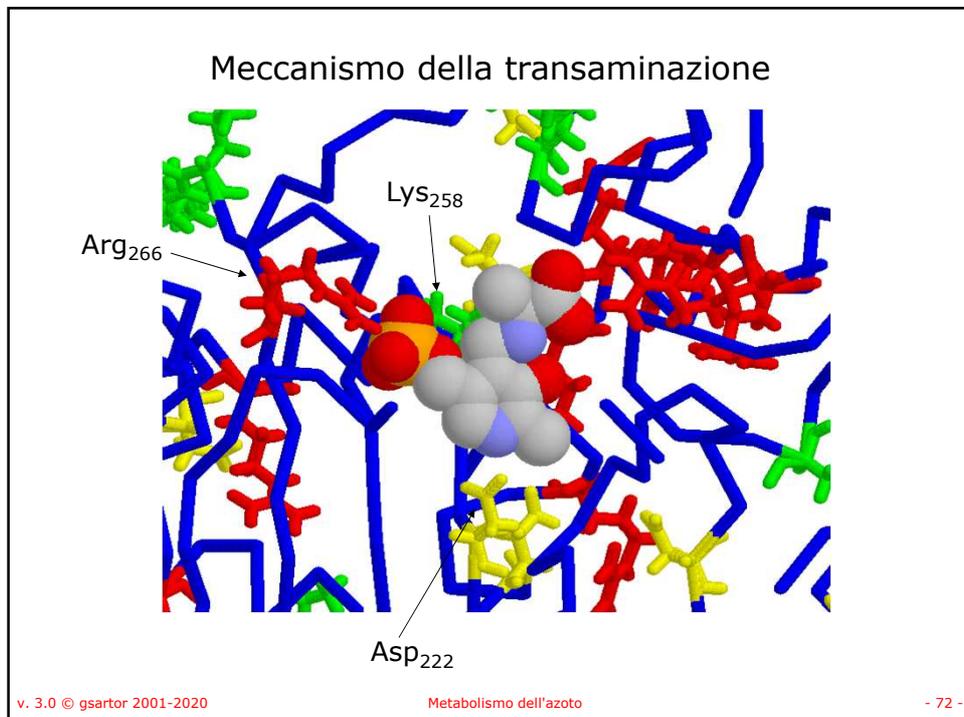
- Si lega l'AA, la molecola è tenuta in sede da due Arg che danno la specificità

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 70 -

70



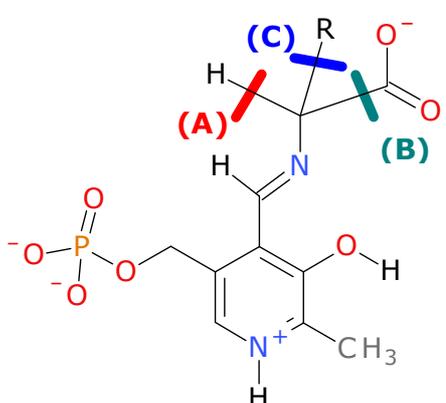
71



72

PLP

- Il PLP è un sistema molto versatile per trasformare aminoacidi:
 - Il legame C-H **(A)** è reso più labile nelle transaminasi
 - Il legame C-COO⁻ **(B)** è reso più labile nelle decarbossilasi
 - Il legame C-R **(C)** è reso più labile nelle aldolasi
 - Gli enzimi con PLP catalizzano anche reazioni al C β e C γ .



v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 73 -

73



74

Eliminazione dell'azoto (purinico)

- La forma molecolare con la quale viene eliminato da un organismo dipende dalla disponibilità di acqua:
- **Ammonio:** Ammoniotelici
 - Invertebrati acquatici
- **Urea:** Ureotelici
 - Pesci, anfibi, bivalvi di acqua dolce
- **Acido allantoico**
 - Alcuni teleostei
- **Allantoina**
 - Molluschi, insetti, mammiferi (non primati)
- **Acido Urico:** Uricotelici
 - Insetti, vermi, rettili, uccelli, primati.

Disponibilità di acqua

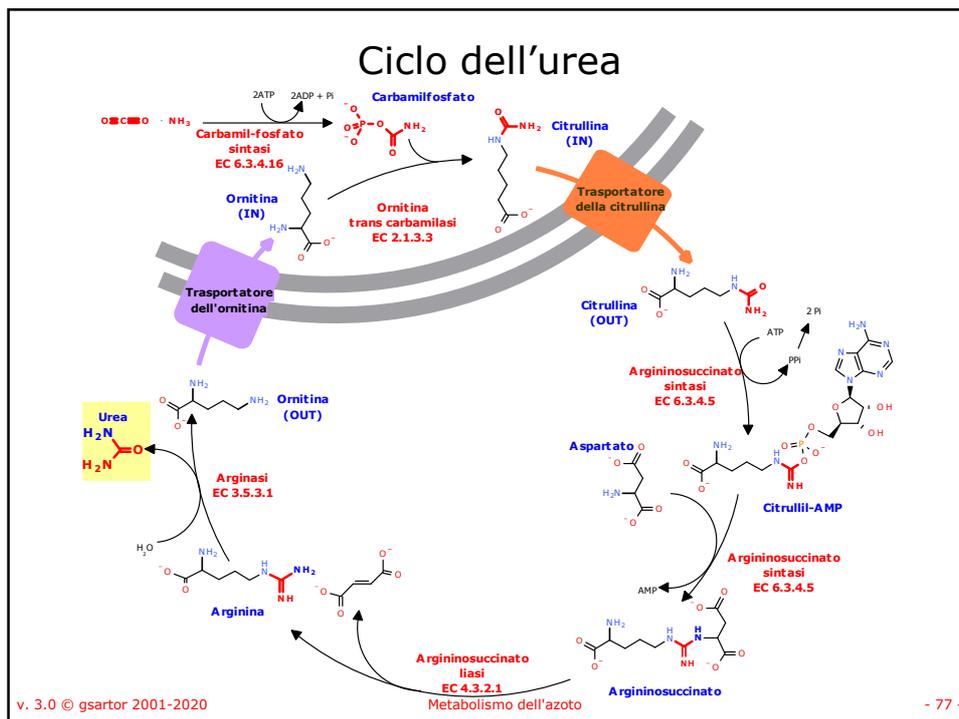
v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 75 -

75

Eliminazione dell'azoto

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 76 -

76



77

Ciclo dell'urea

- La carbamil-fosfato sintasi catalizza la reazione di formazione di carbamil-fosfato da CO_2 e NH_3 .
- Intervengono due molecole di ATP,
- L'enzima deve essere attivato da un effettore allosterico, il N-Acetilglutamato.
- Questo derivato proviene da acetil-CoA e glutamato quando la concentrazione dei quest'ultimo è alta, segnale di un eccesso di aminoacidi liberi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 78 -

78

Ciclo dell'urea

The diagram illustrates the first three steps of the urea cycle:

- Bicarbonato** reacts with CO_2 and H_2O in a reaction catalyzed by **Carbonil-fosfato sintasi** (EC 6.3.4.16), consuming **ATP** and producing **ADP** to form **Carbonil-fosfato**.
- Carbonil-fosfato** reacts with **NH₃** and H_2O in a reaction catalyzed by **Ornitina trans carbamilasi** (EC 2.1.3.3), releasing **Pi** to form **Carbammato**.
- Carbammato** reacts with **ATP** in a reaction catalyzed by **Carbamilfosfato sintasi** (EC 2.1.3.3), consuming **ATP** and producing **ADP** to form **Carbamilfosfato**.

- Le due molecole di ATP operano in questo modo:
 - 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. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 79 -

79

Ciclo dell'urea

The diagram shows the reaction where **Carbamilfosfato** and **Ornitina (IN)** are converted to **Citrullina (IN)** by the enzyme **Ornitina trans carbamilasi** (EC 2.1.3.3). This reaction consumes **2ATP** and produces **2ADP + Pi**. The enzyme is also referred to as **Carbamil-fosfato sintasi** (EC 6.3.4.16). The **Citrullina (IN)** is then transported out of the mitochondrion by a specific **Trasportatore della citrullina**.

- Il carbamil-fosfato si lega all'ornitina per formare la citrullina.
- Queste due reazioni avvengono nella matrice mitocondriale dove l'ornitina è stata trasportata da un trasportatore specifico

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 80 -

80

Ciclo dell'urea

- La citrullina viene trasportata al di fuori dalla matrice mitocondriale da un trasportatore specifico e, nel citoplasma, si combina con l'aspartato per dare l'argininosuccinato.
- L'enzima responsabile è l'argininosuccinato sintasi che catalizza prima la formazione del Citrullil-AMP a spese di ATP e quindi il legame con l'aspartato.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 81 -

81

Ciclo dell'urea

- Una liasi (Argininosuccinato liasi) promuove la scissione dell'arginino succinato in fumarato e arginina.
- L'arginina è anche precursore dell'ossido di azoto (NO).

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 82 -

82

Ciclo dell'urea

- Il fumarato può venire riciclato ad aspartato attraverso la formazione di malato e ossalacetato,
- queste trasformazioni sono catalizzate da isoenzimi citosolici di analoghi enzimi del ciclo di Krebs (mitocondriali).
- Le transaminasi si occupano poi di convertire l'ossalacetato in aspartato che viene riutilizzato nella tappa precedente.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 83 -

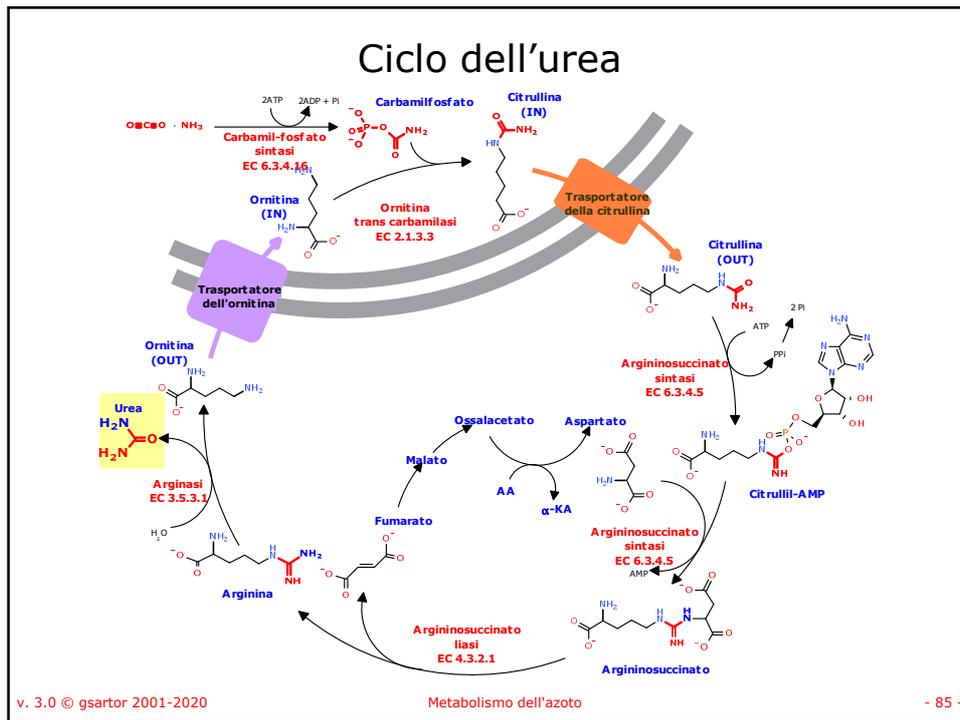
83

Ciclo dell'urea e NO

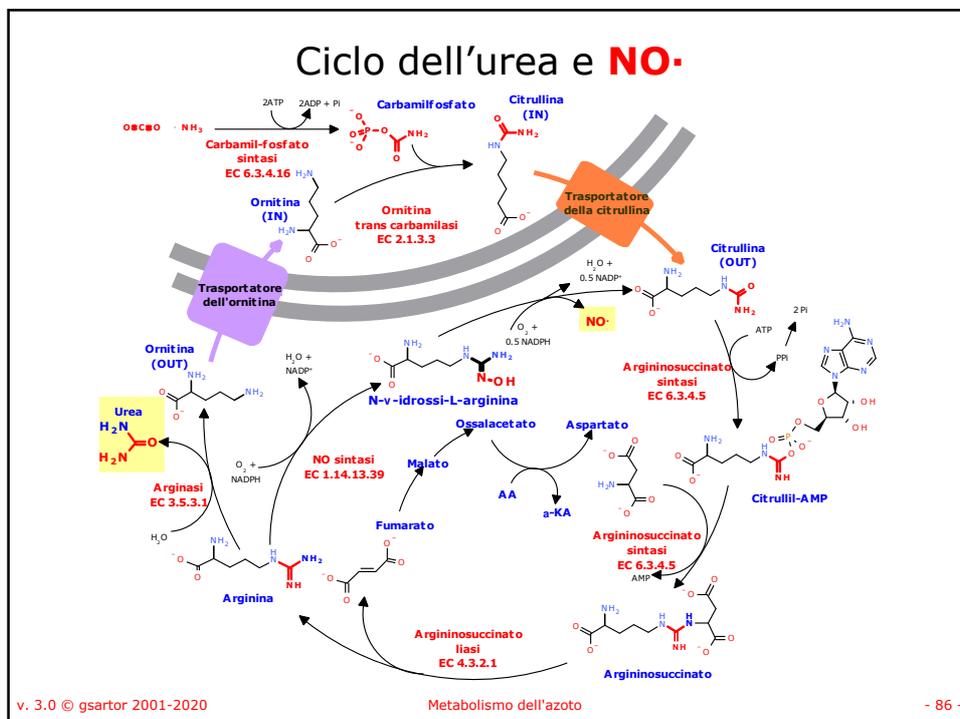
- L'arginina viene infine convertita in ornitina (OUT) e Urea da una arginasi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 84 -

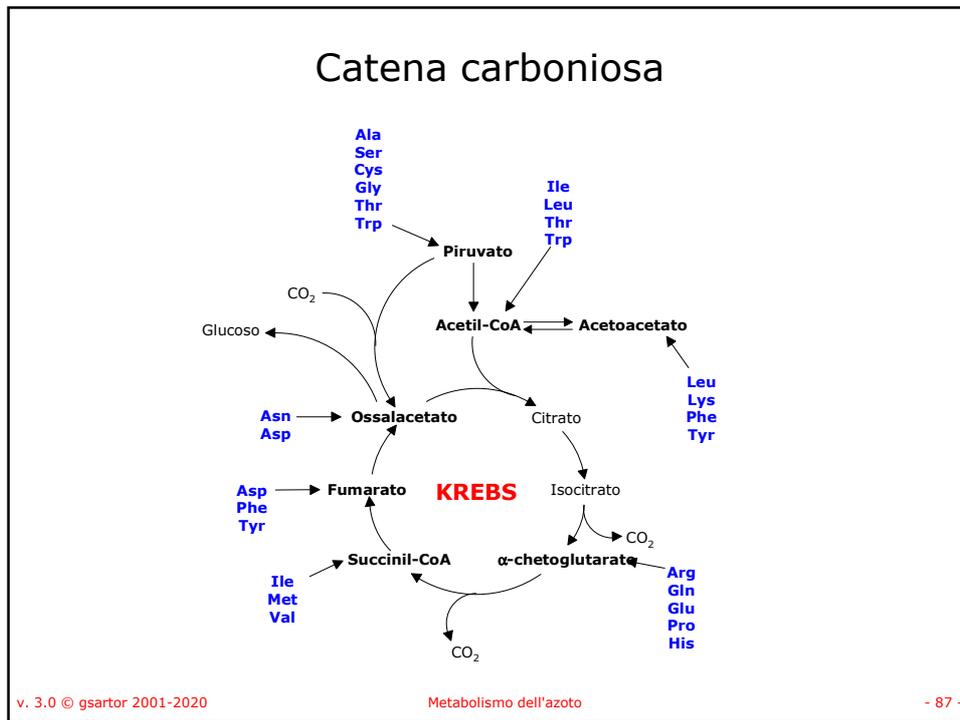
84



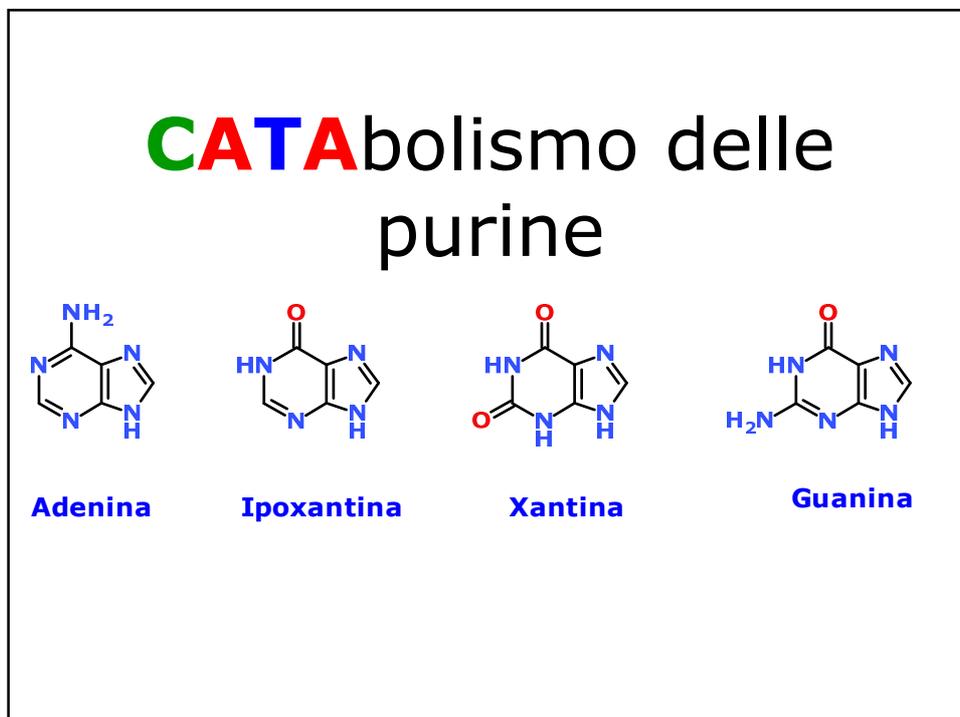
85



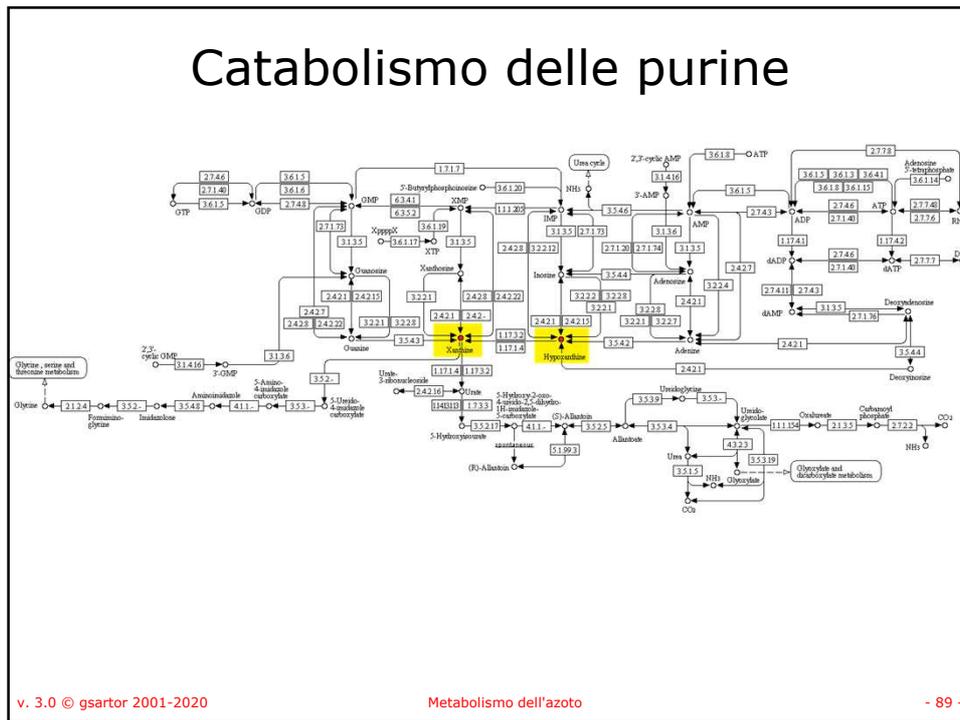
86



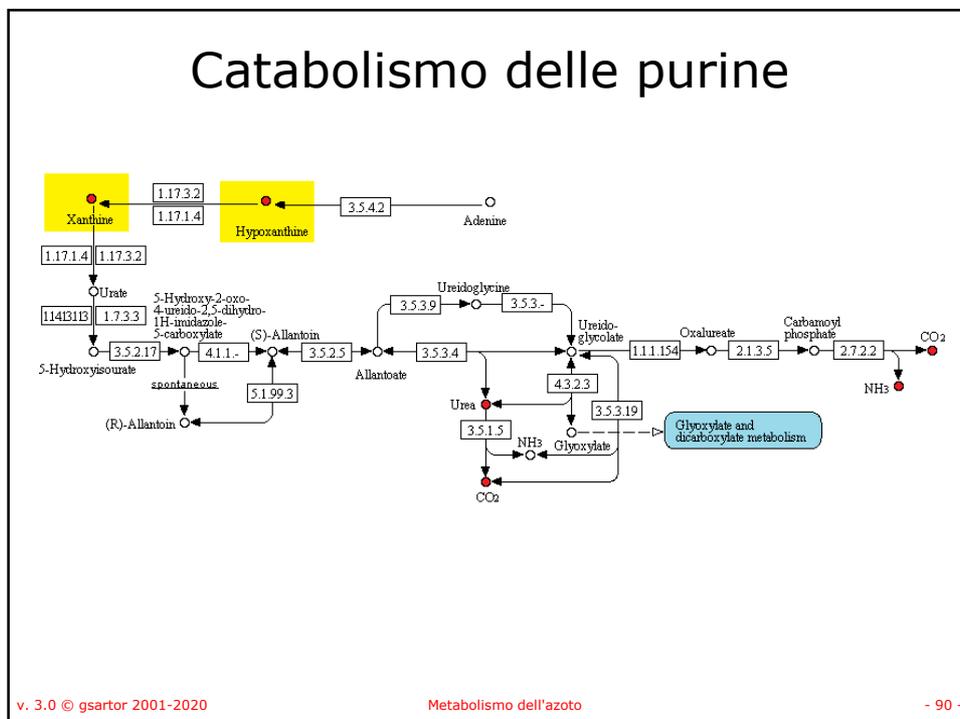
87



88



89



90

Catabolismo dei nucleotidi purinici

Nucleotidasi



- I nucleotidi provenienti dalla degradazione del mRNA sono convertiti in nucleosidi da **nucleotidasi intracellulari** che sono sotto stretto controllo metabolico per evitare la deplezione di nucleotidi;
- I nucleosidi sono scissi in base purinica e ribosio-1-P da **purina nucleoside fosforilasi (PNP)** ma né l'Adenosina né la Deossiadenosina sono substrati di PNP, questi due nucleosidi sono convertiti in Inosina da **Adenosina deaminasi**, l'Inosina viene processata;
- I prodotti di PNP vengono convertiti in Xantina da **Guanina deaminasi** e **Xantina ossidasi** la quale converte anche la Xantina in Acido Urico.

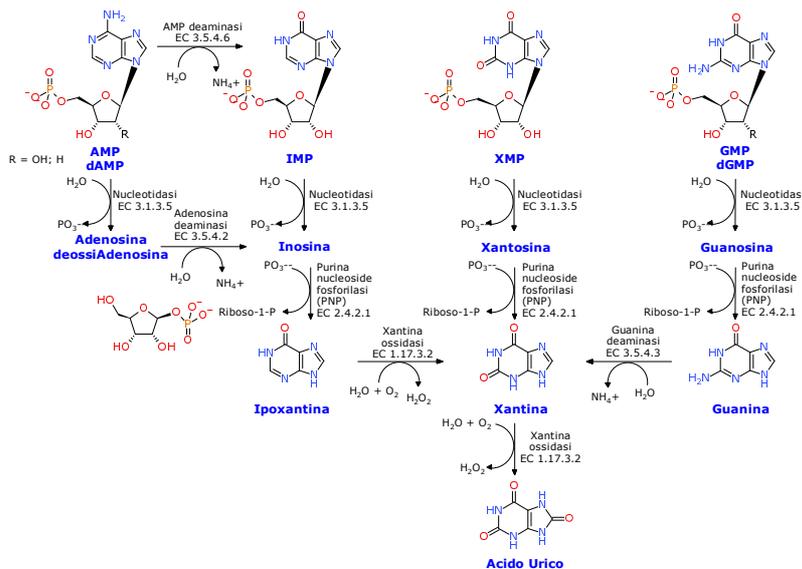
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 91 -

91

Catabolismo delle purine

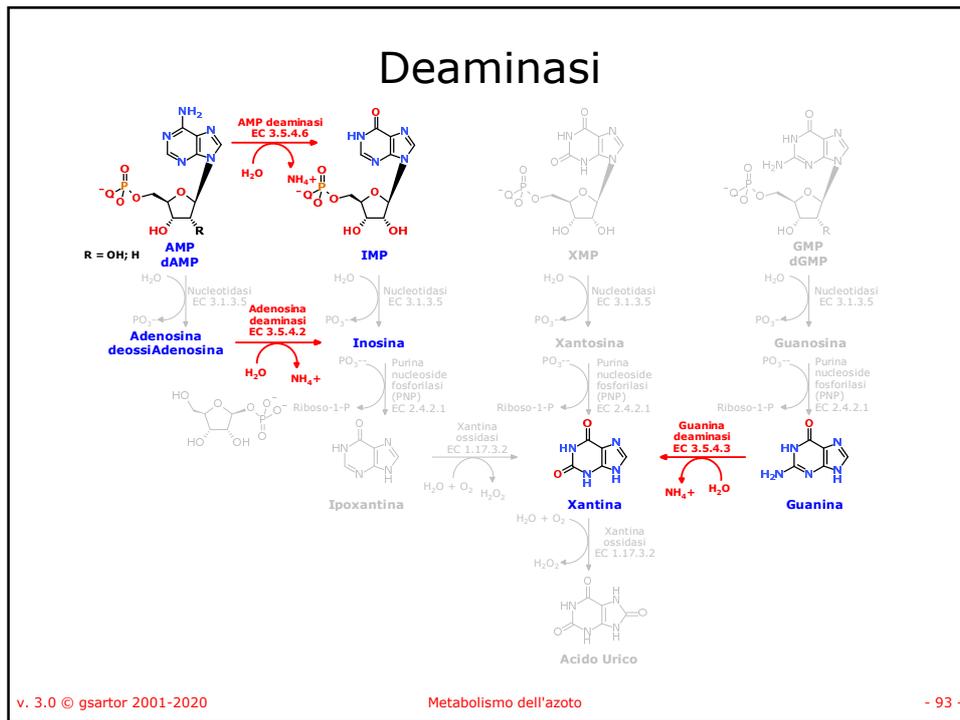


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 92 -

92



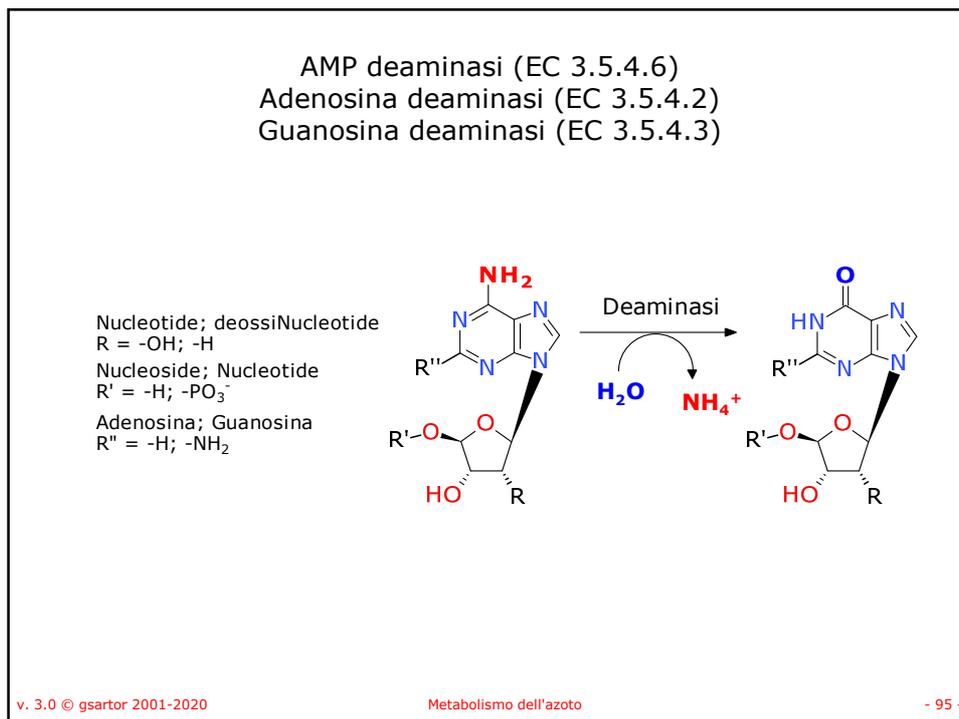
93

Deaminasi

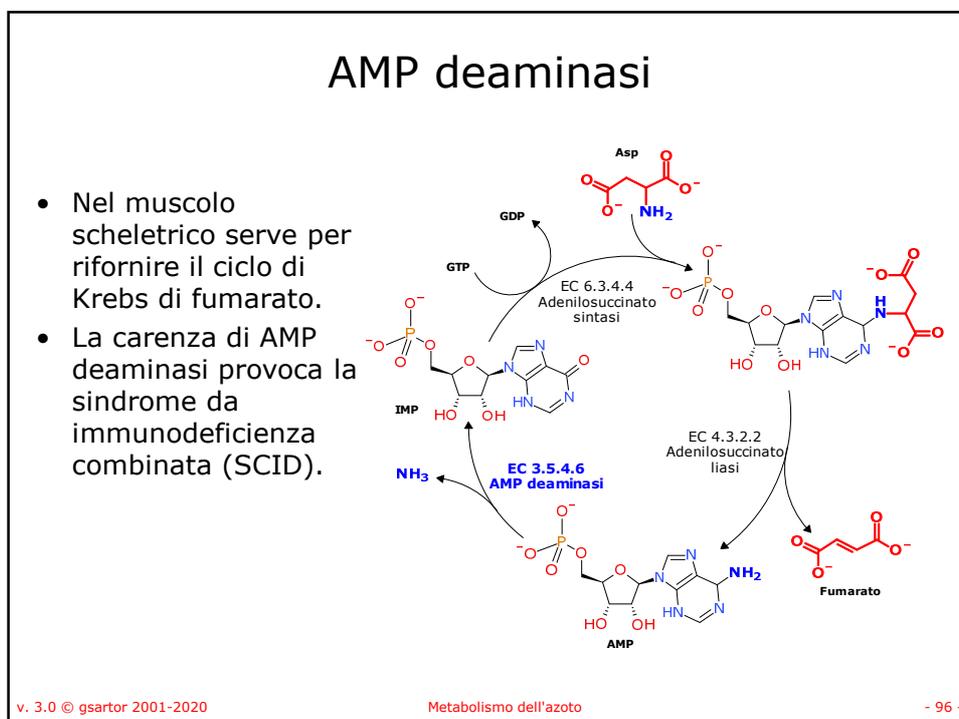
- Tre deaminasi:
 - AMP deaminasi (EC 3.5.4.6),
 - Adenosina deaminasi (EC 3.5.4.2) e
 - Guanina deaminasi (EC 3.5.4.3).
- Intervengono, a diverso livello, per produrre xantina.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 94 -

94



95



96

SCID

- **Sindrome da ImmunoDeficienza Combinata**
 - Mancata capacità proliferativa di linfociti B e T a causa della aumentata sintesi di dATP che inibisce la sintesi dei deossinucleotidi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 97 -
Metabolismo dell'azoto

97

Fermentazione e acidosi

- Il passaggio attraverso la via anaerobica genera un'acidosi dalla quale gli organismi acquatici che vivono nella zona intertidale si difendono utilizzando diversi meccanismi:
 - Eliminazione durante l'alta marea
 - Effetto tampone dei pigmenti respiratori
 - Conversione in specie meno pericolose (etanolo)
 - Utilizzo della conchiglia per tamponare
 - Trasporto in un altro distretto
 - **Conversione di AMP in IMP e NH₃ che viene usata per tamponare il pH acido.**

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 98 -

98

Acidosi

- Minimizzare l'acidificazione utilizzando vie di consumo di H⁺
- A basso O₂ nel muscolo:

AMP deaminasi
EC 3.5.4.6

- AMP è convertito in IMP e NH₃ il quale è protonato a NH₄⁺
- La concentrazione di IMP può crescere fino a 5 mM a pH 7
 - Aspetto positivo: buon sistema di protezione
 - Aspetto negativo: deplezione del pool dell'adenilato

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 99 -

99

5'-nucleotidasi (EC 3.1.3.5)

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 100 -

100

5'-nucleotidasi (EC 3.1.3.5)

- Le 5'-Nucleotidasi appartengono ad una famiglia di metallo (Zn^{++}) proteine dinucleari;
- Il passaggio tra la forma aperta (inattiva) e la forma chiusa (attiva) dell'enzima è dovuto ad una rotazione del dominio catalitico di 96° ;
- L'adenosina lega una specifica tasca nel dominio C-terminale formando una struttura "stacked" tra la Phe429 e Phe498;
- Il dominio N-terminale contiene il centro bimetallico e un residuo conservato (His117) i quali formano il centro catalitico;
- Anche tre residui di Ala (375, 379 e 410) sono coinvolti nel legame del substrato e probabilmente stabilizzano lo stato di transizione;
- Uno ione metallico coordina anche una molecola d'acqua posizionata opportunamente per effettuare l'attacco nucleofilo sull'atomo di fosforo.

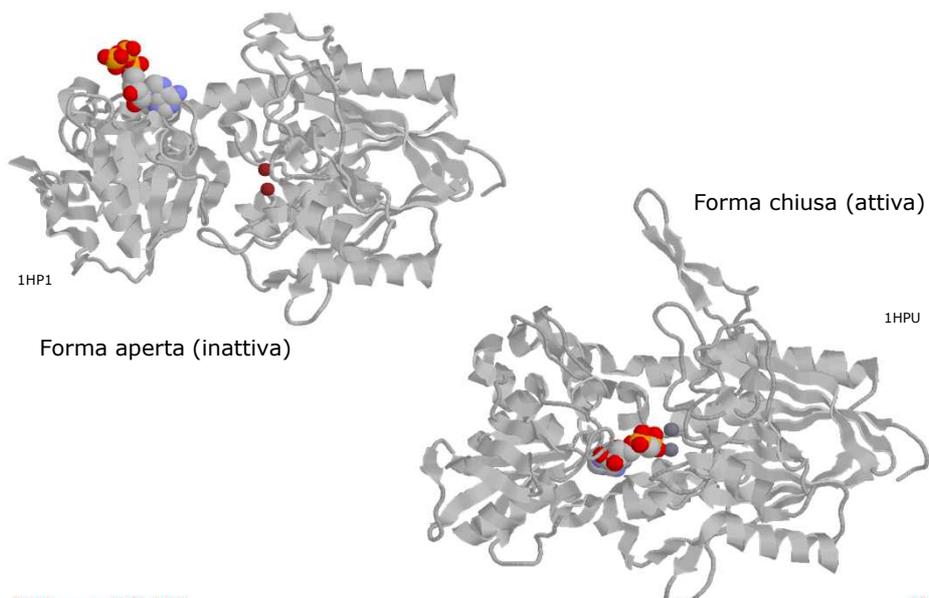
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 101 -

101

5'-nucleotidasi (EC 3.1.3.5)

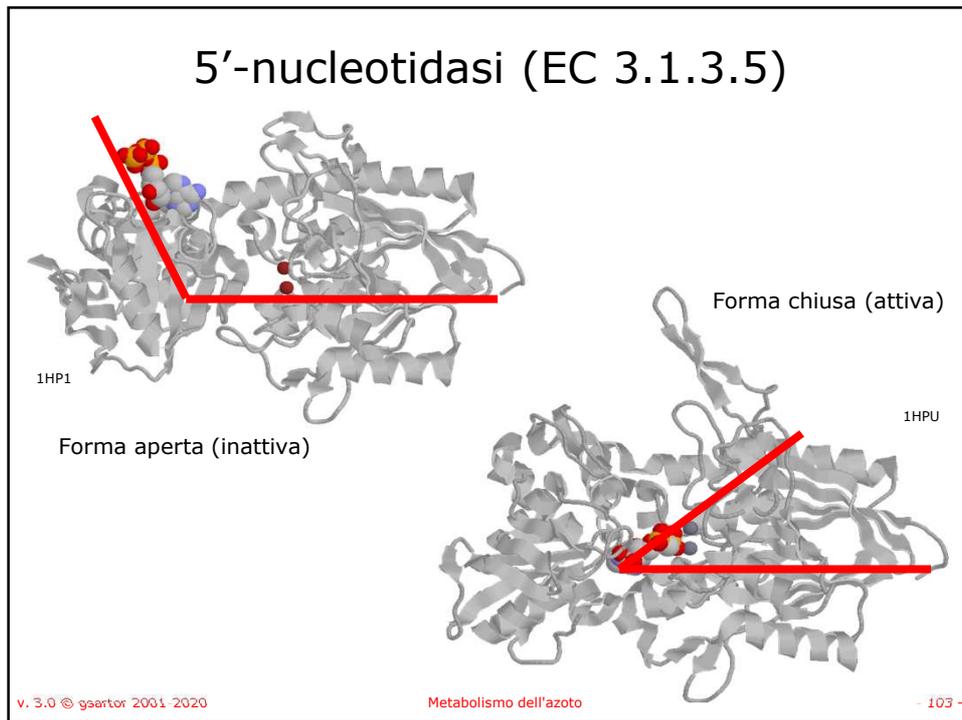


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

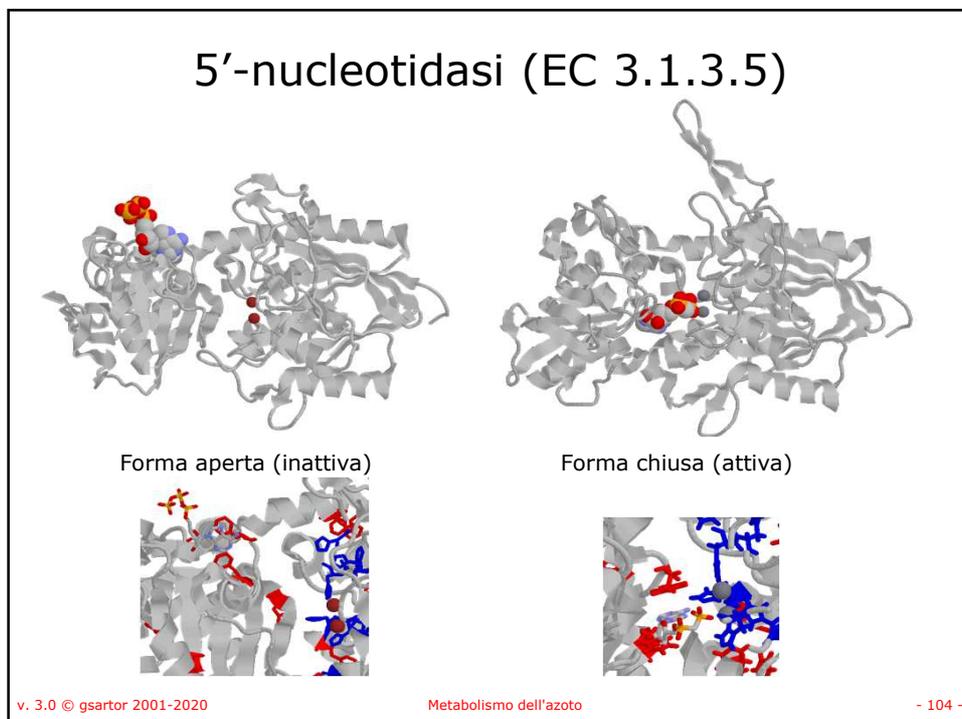
Metabolismo dell'azoto

- 102 -

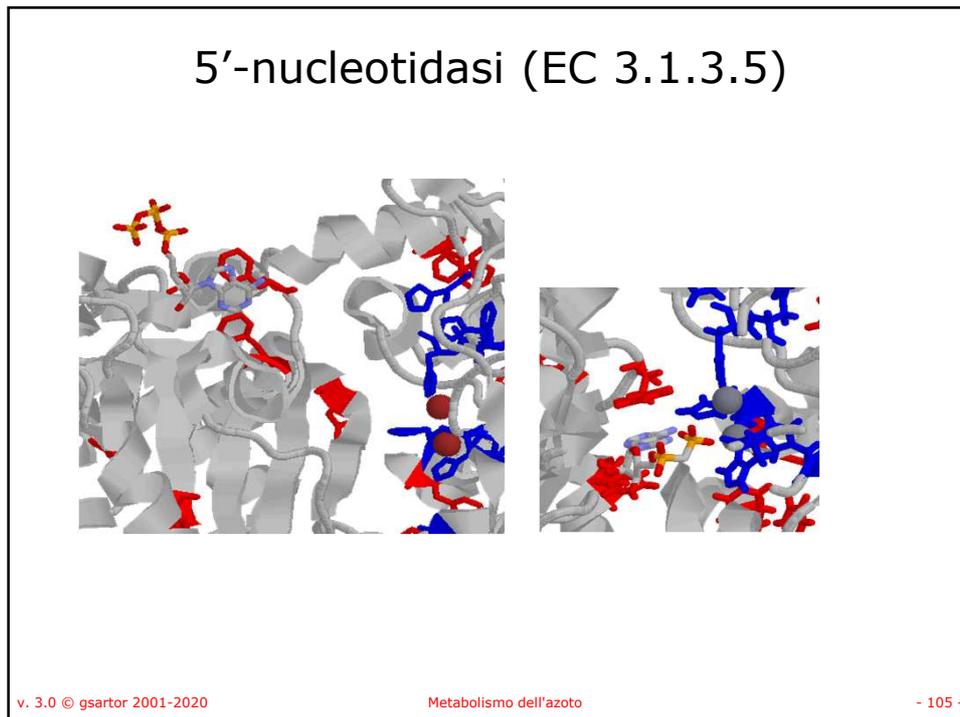
102



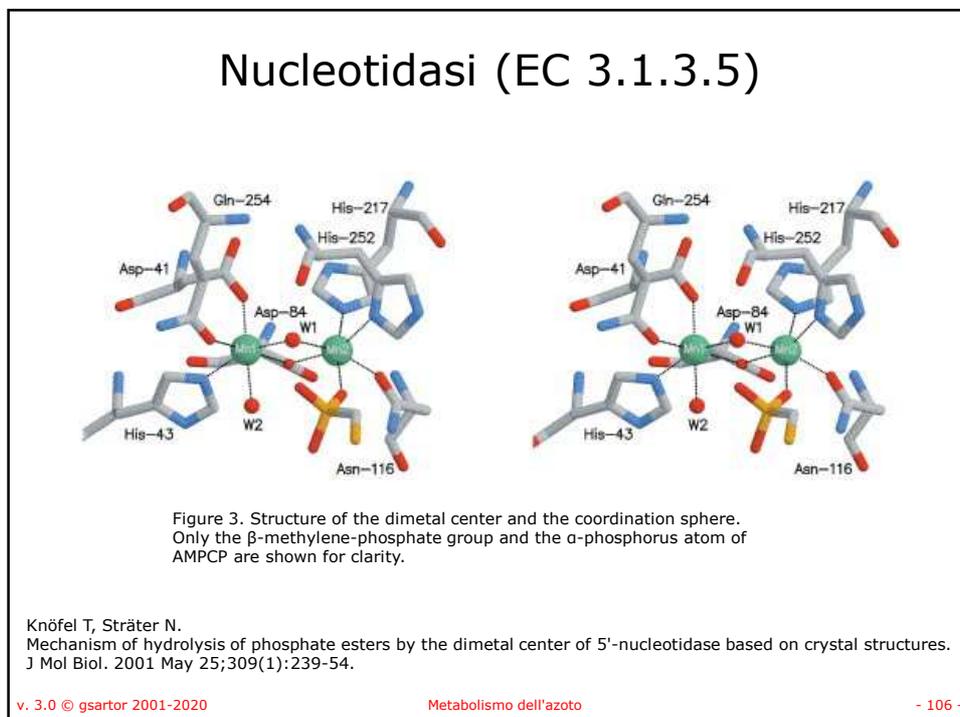
103



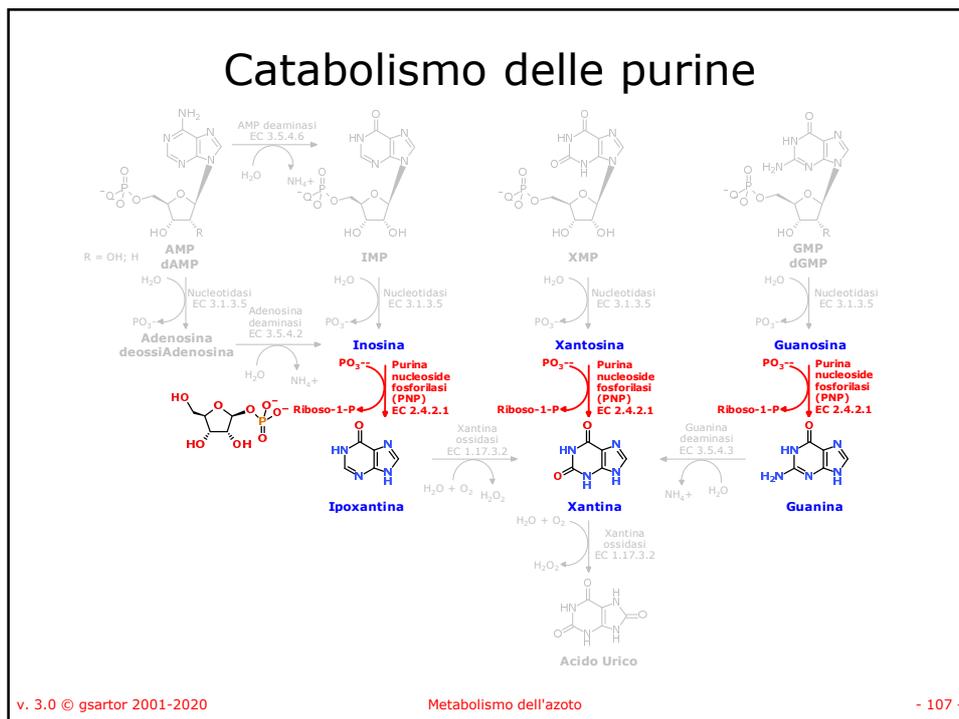
104



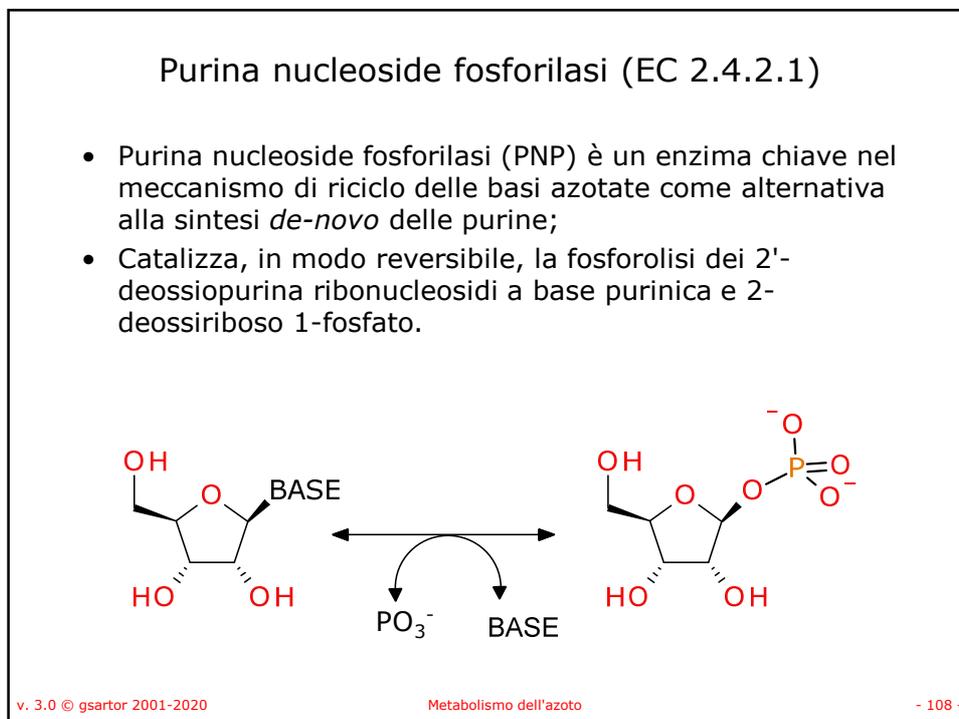
105



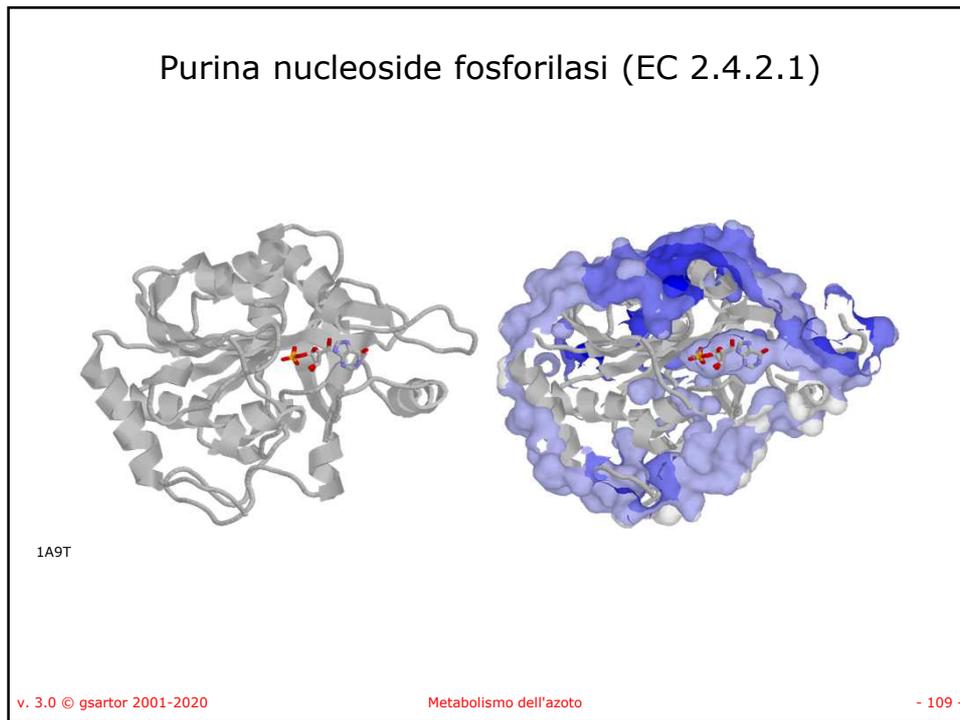
106



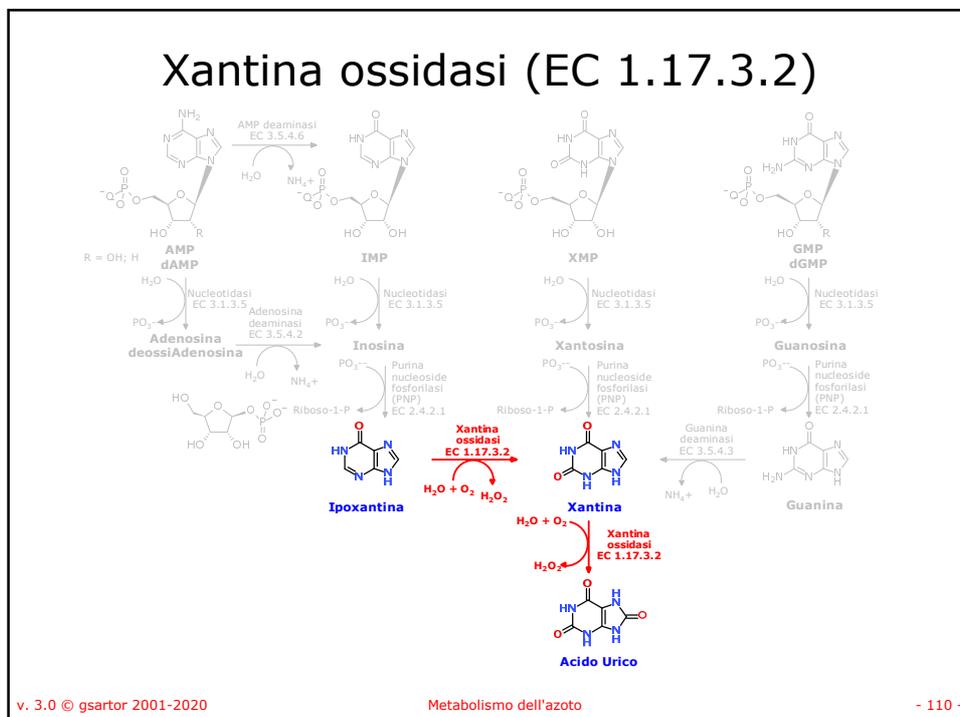
107



108



109



110

Xantina ossidasi (EC 1.17.3.2 - EC 1.17.1.4)

- L'enzima agisce su diversi substrati purini e aldeidici
- Nei mammiferi converte anche il retinolo (all-trans) in acido retinoico (all-trans) con il substrato legato alla retinoid-binding protein (RBP);
- Negli eucarioti contiene due centri Ferro Zolfo [2Fe-2S], FAD e un centro molibdeno;
- Nei mammiferi è predominante la forma deidrogenasi NAD-dipendente (EC 1.17.1.4)
- Nella purificazione viene convertito nella forma O₂-dipendente, xantina ossidasi (EC 1.17.3.2).
- La conversione può essere innescata dalla ossidazione di gruppi tiolici di Cys per formare ponte disolfuro, questa reazione può essere catalizzata da una tiolo-enzima transidrogenasi (EC 1.8.4.7) che usa glutatione ossidato oppure attraverso una parziale proteolisi enzimatica che rende irreversibile la conversione;
- La conversione avviene anche in vivo.

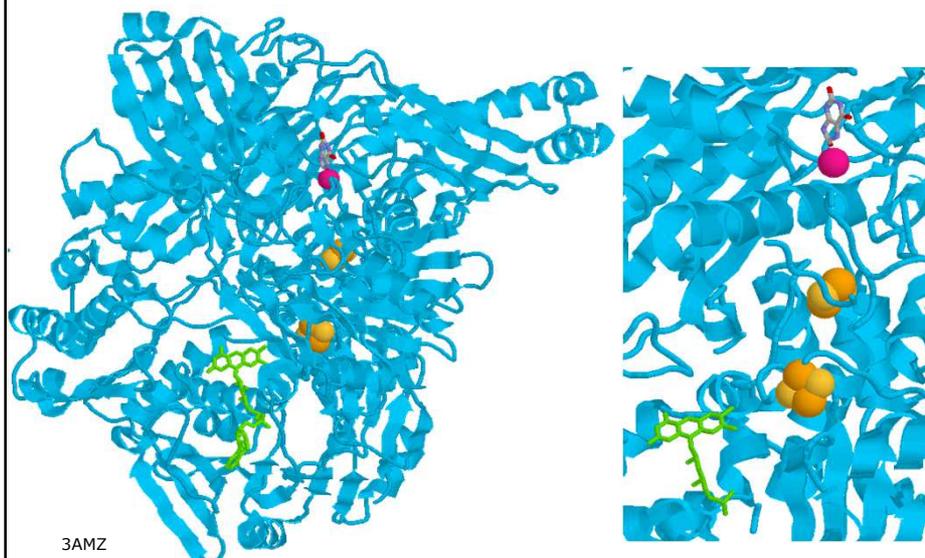
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 111 -

111

Xantina ossidasi (EC 1.17.3.2)



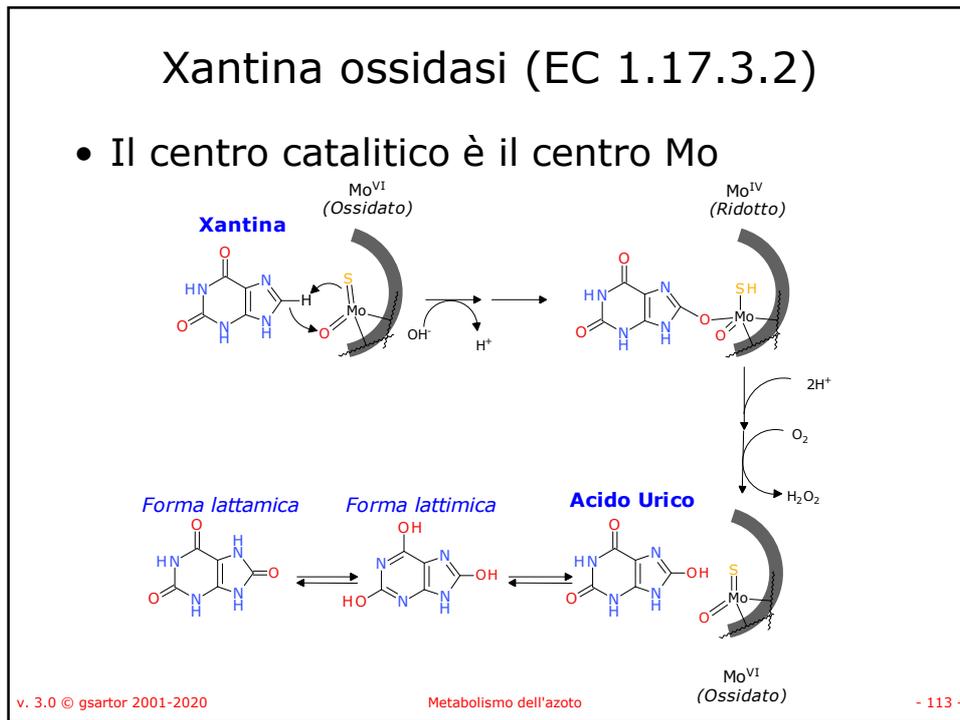
3AMZ

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

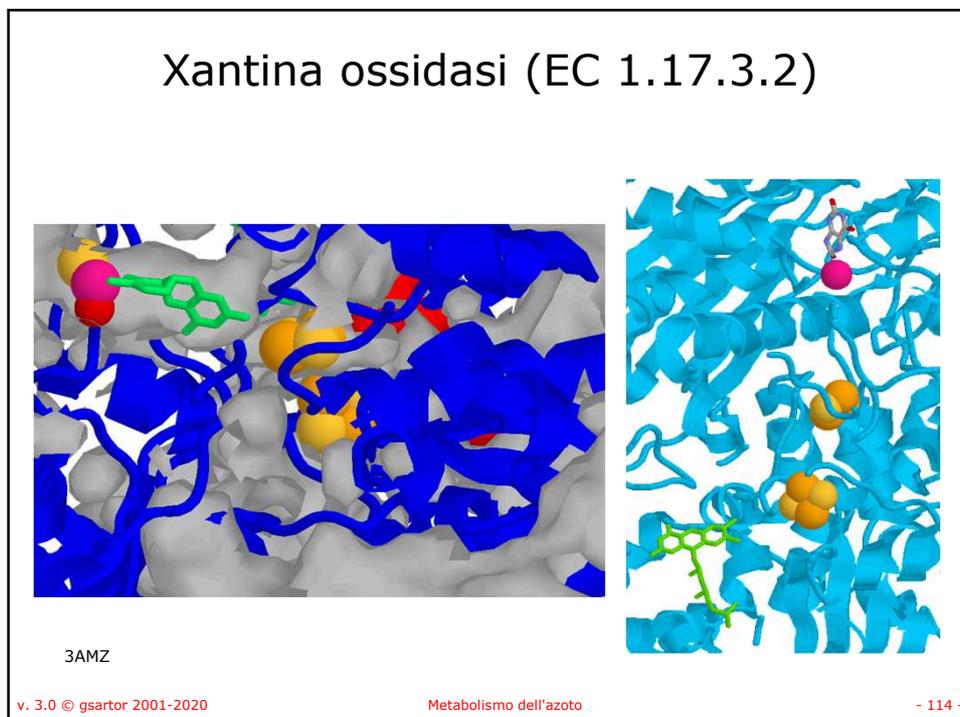
Metabolismo dell'azoto

- 112 -

112



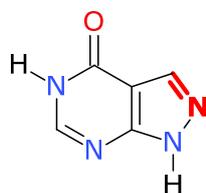
113



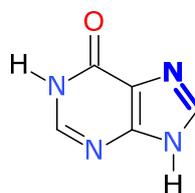
114

Xantina ossidasi e gotta

- Gli umani e gli altri primati eliminano acido urico con le urine ma la maggior parte dell'azoto viene eliminato come urea;
- Uccelli, rettili e insetti usano l'acido urico come mezzo principale per l'eliminazione dell'azoto;
- La gotta è una patologia provocata dall'accumulo di urati nelle articolazioni delle estremità;
- L'**allopurinolo**, un inibitore della xantina ossidasi, è utilizzato nel trattamento della gotta.



Allopurinolo



Xantina

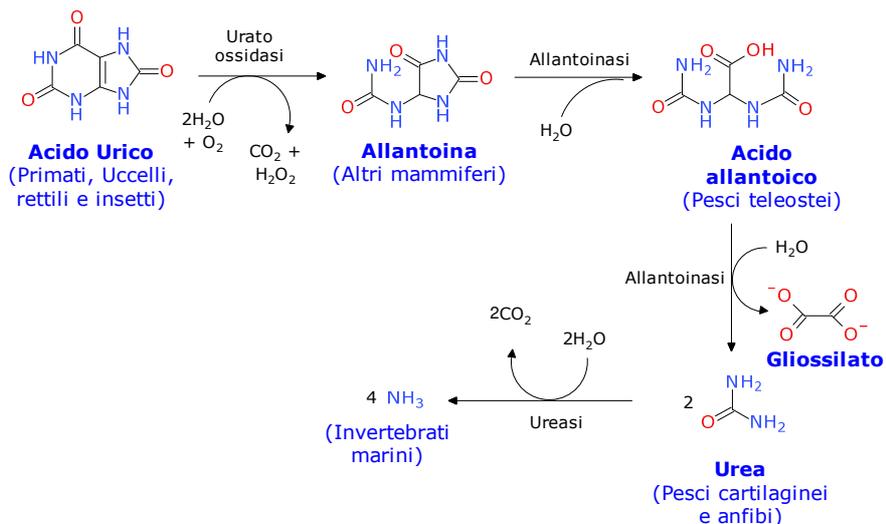
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 115 -

115

Destino acido urico

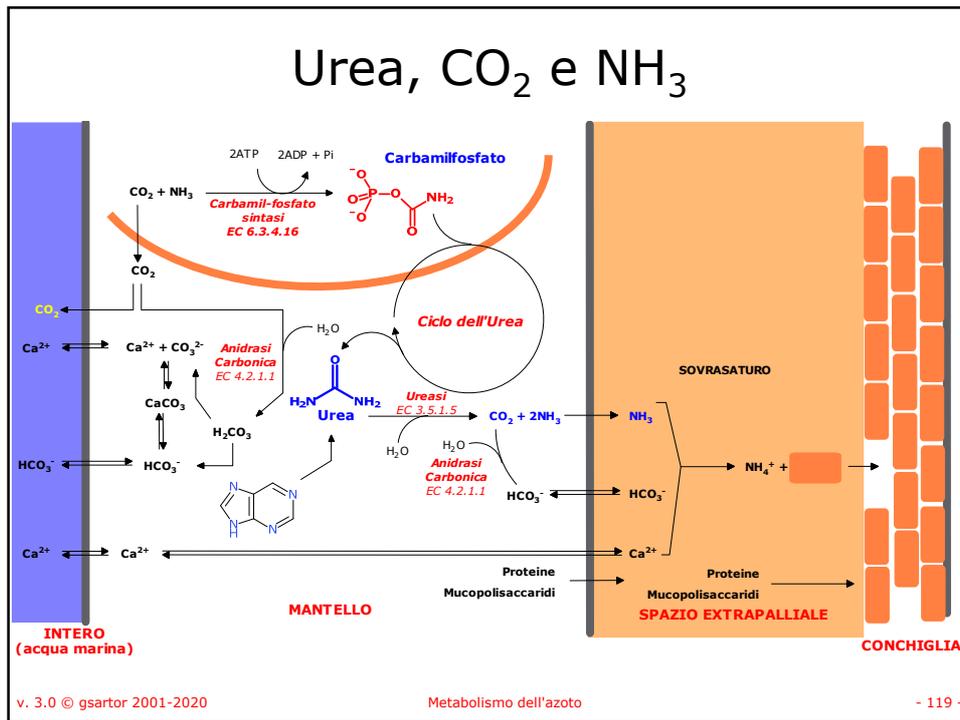


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

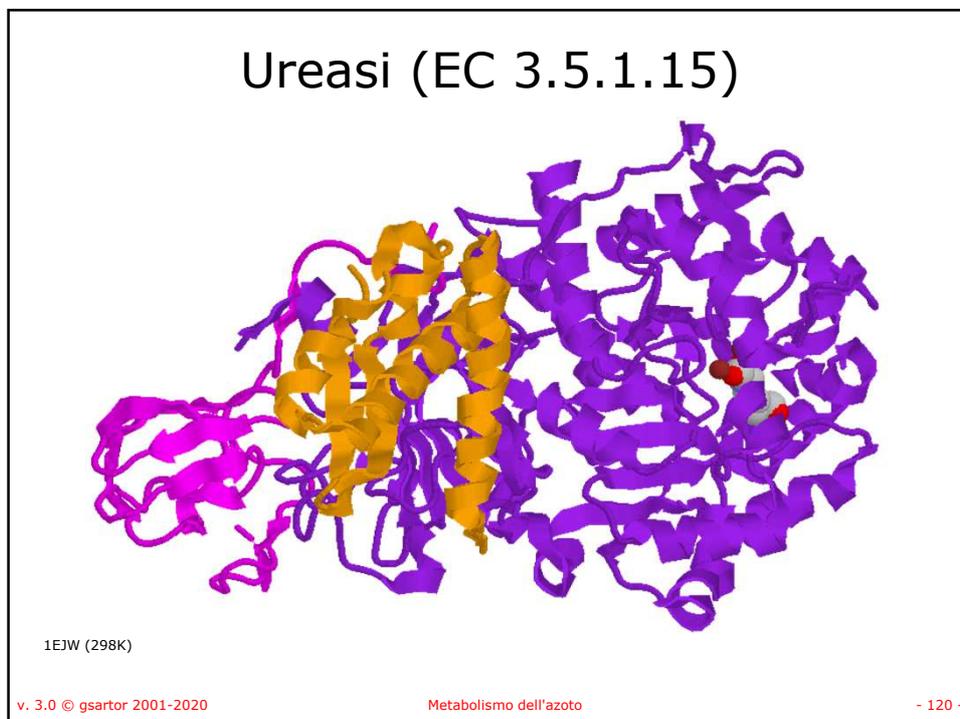
Metabolismo dell'azoto

- 116 -

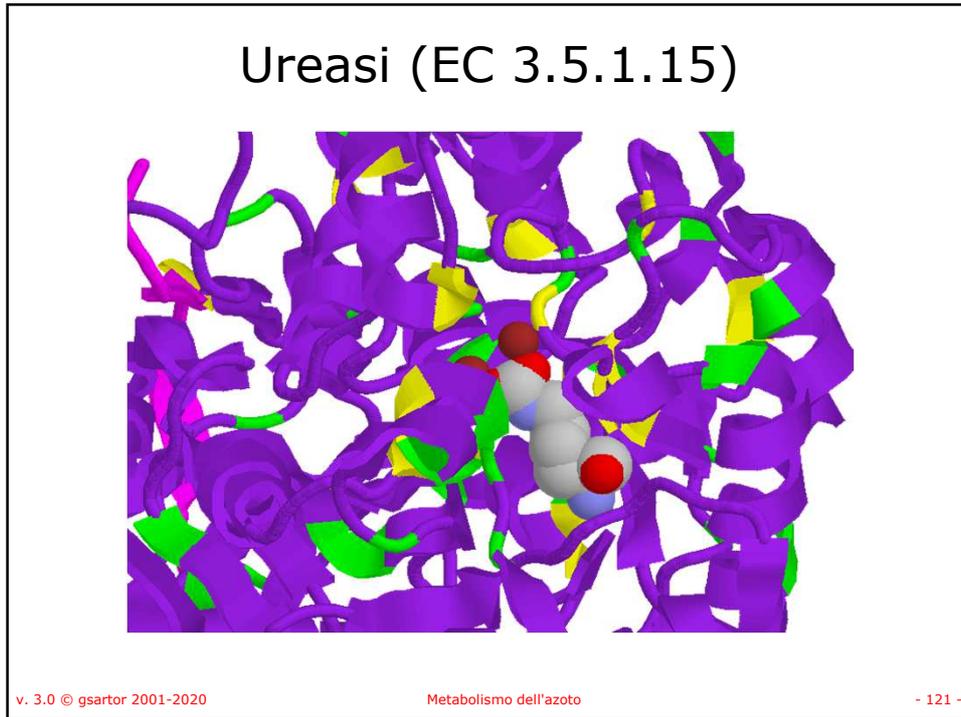
116



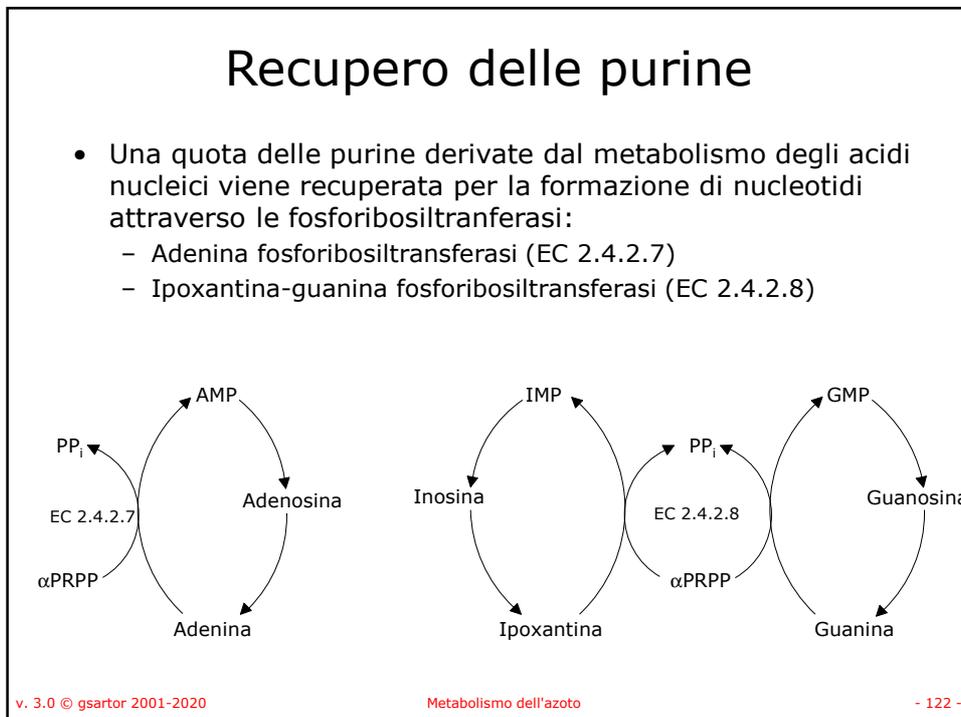
119



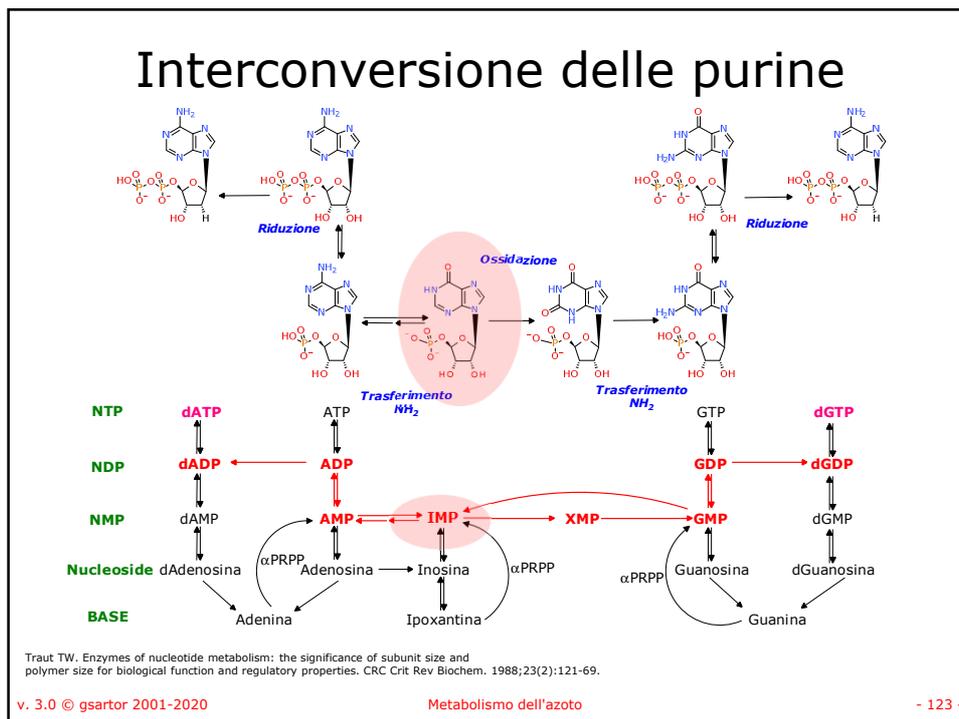
120



121



122



123

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 αPRPP della biosintesi *de-novo* delle purine.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 124 -

124

Patologie legate al metabolismo purinico

- Xantinuria
- Sindrome di Lesch-Nyhan
- Adenina fosforibosiltransferasi deficienza
- Superattività Fosforibosilpirofosfato sintetasi I
- Adenilosuccinato liasi deficienza
- Sindrome da deplezione di DNA Mitochondriale (MDS)
- Distrofia dei Coni e dei Bastoncelli
- Sindrome di Desbuquois
- Anemia
- Calcificazione delle articolazioni e delle arterie
- Sindrome di Arts
- AICA-ribosiduria
- Calcificazione arteriale infantile generalizzata
- Piruvato chinasi (PK) deficienza
- Oftalmoplegia progressiva estrena

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

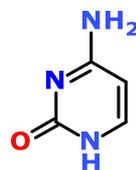
- 125 -

125

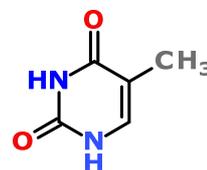
CATABolismo delle pirimidine



Uracile

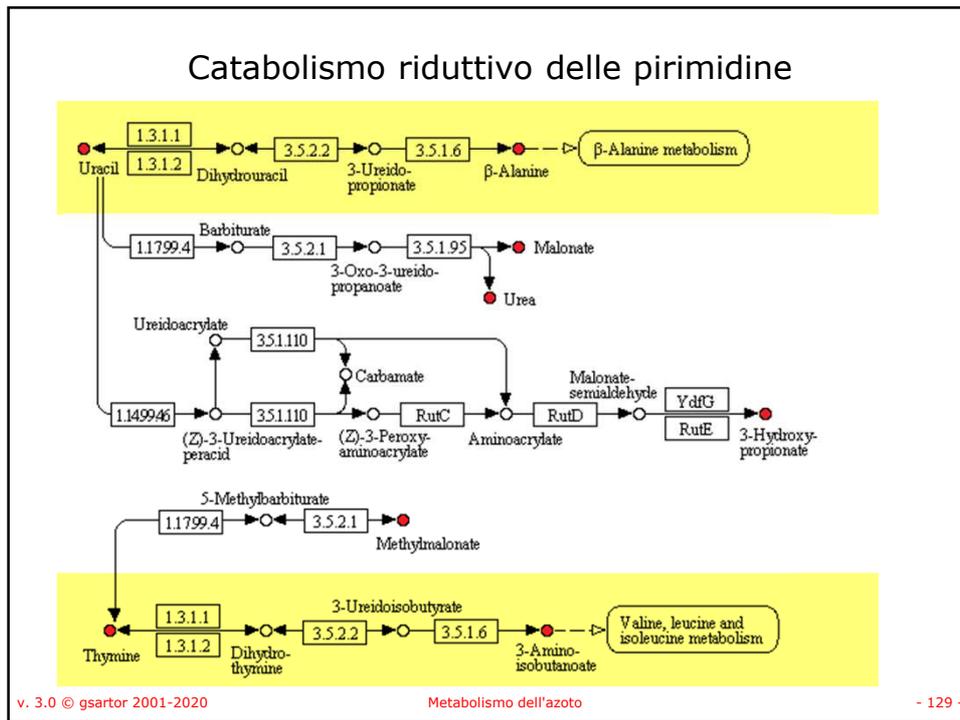


Citosina

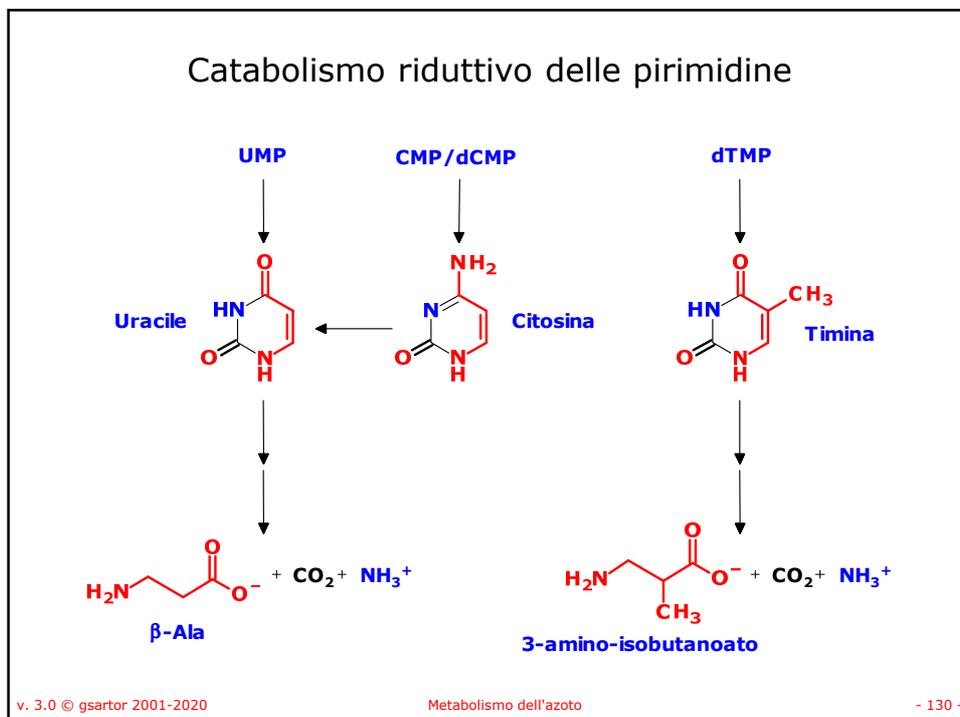


Timina

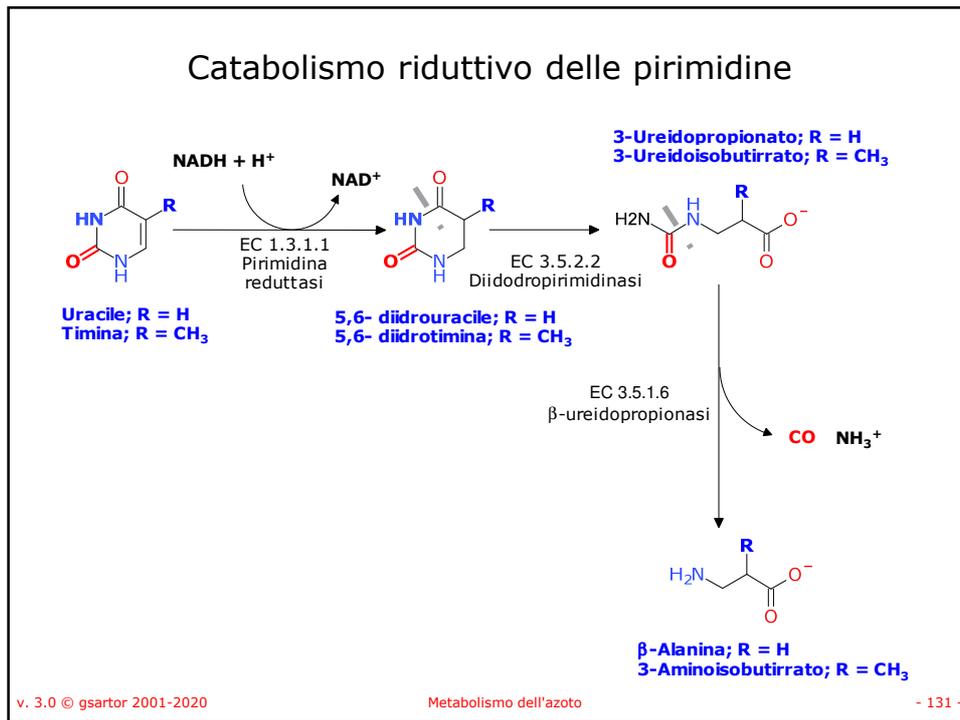
126



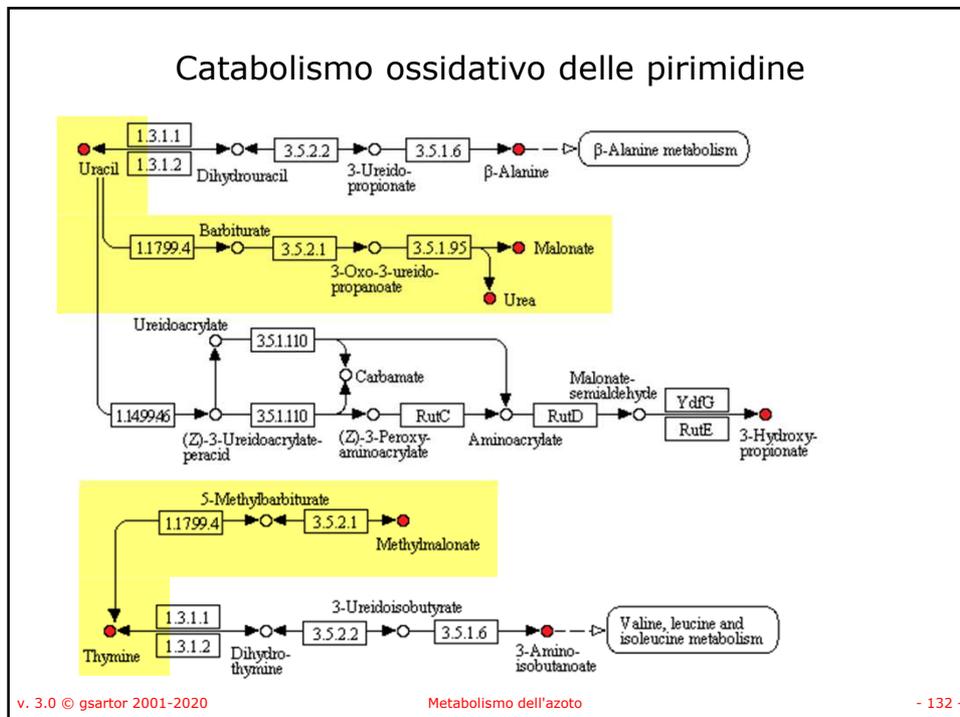
129



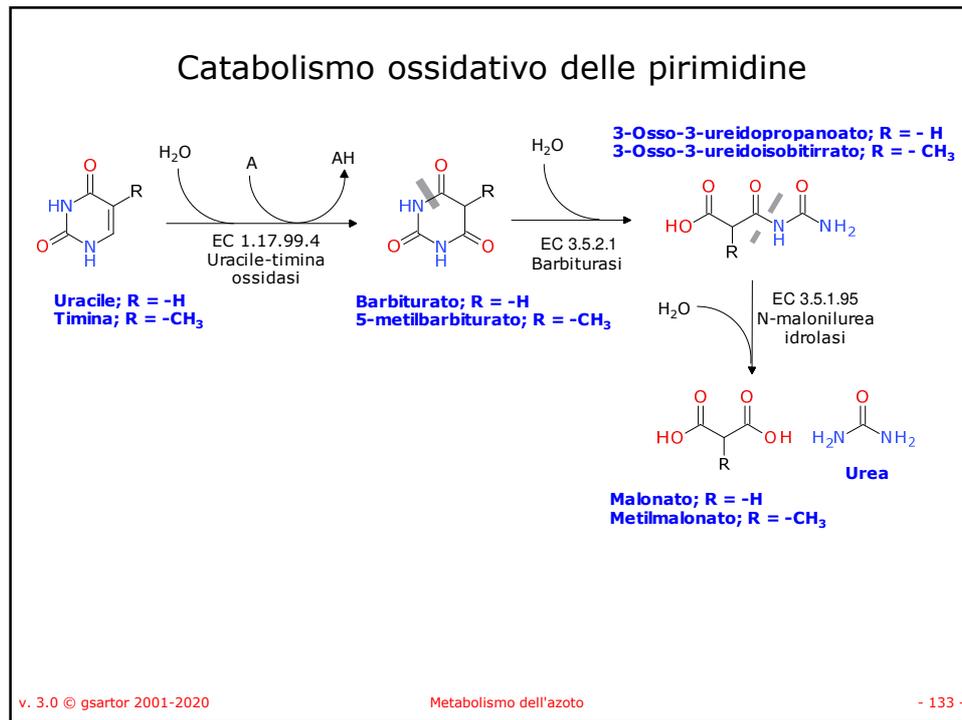
130



131



132



133

Barbiturasi (EC 3.5.2.1)

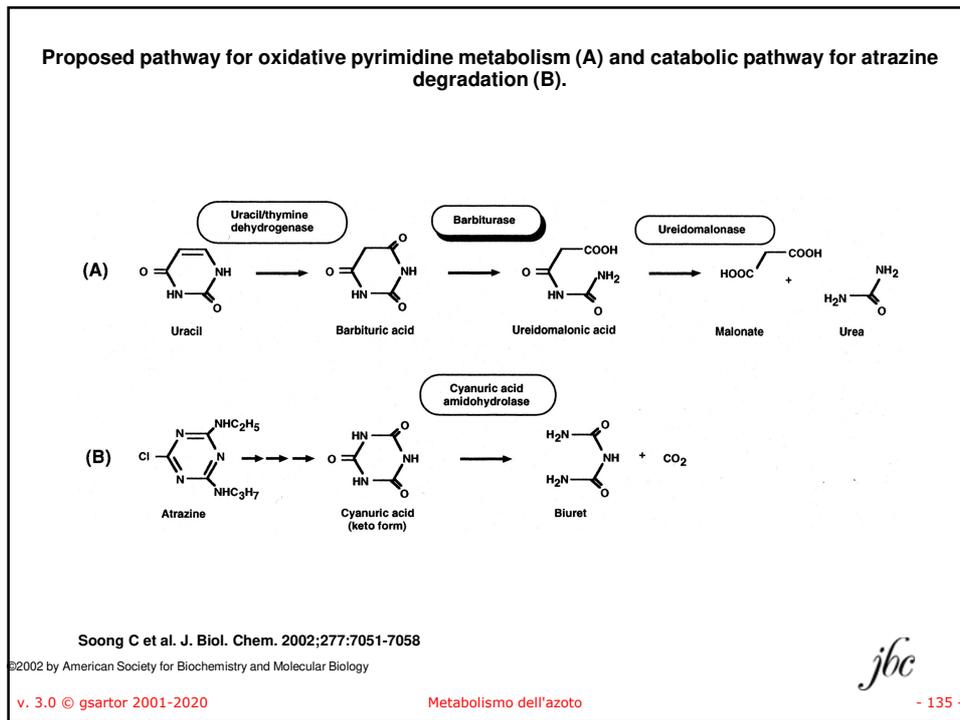
- Omotetramero;
- Contiene uno ione zinco;
- Ha come substrato specifico il barbiturato;
- Catalizza la reazione di apertura dell'anello ma non la formazione di malonato (metilmalonato) e urea;
- Sembra coinvolto nella regolazione del metabolismo delle pirimidine con uracile fosforibosiltransferasi (EC 2.4.2.9);
- Coinvolto anche nella degradazione dell'atrazina.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

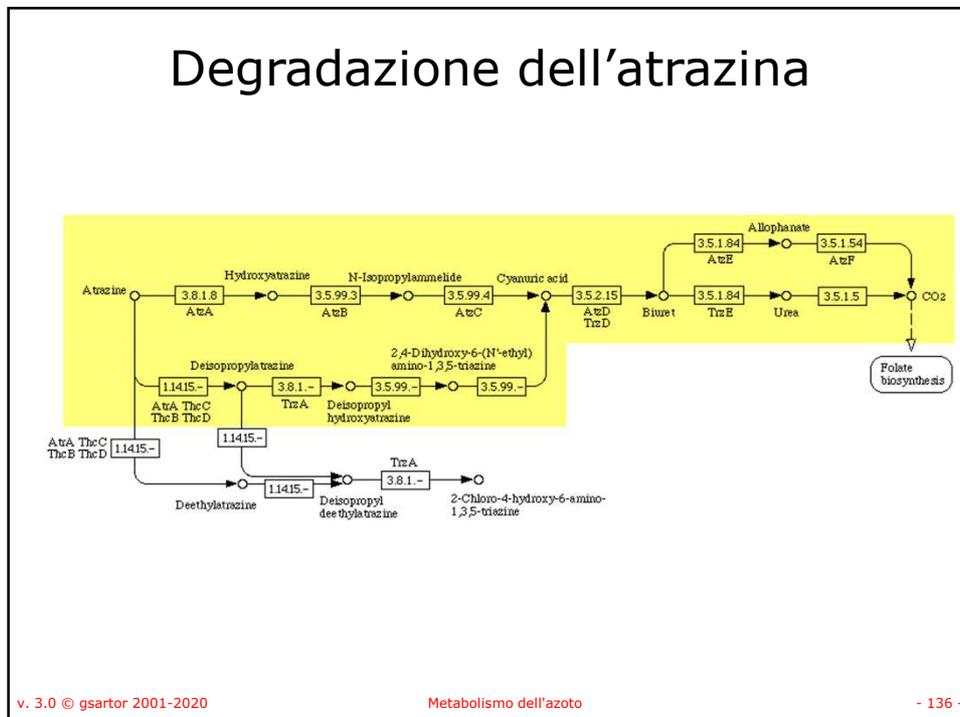
Metabolismo dell'azoto

- 134 -

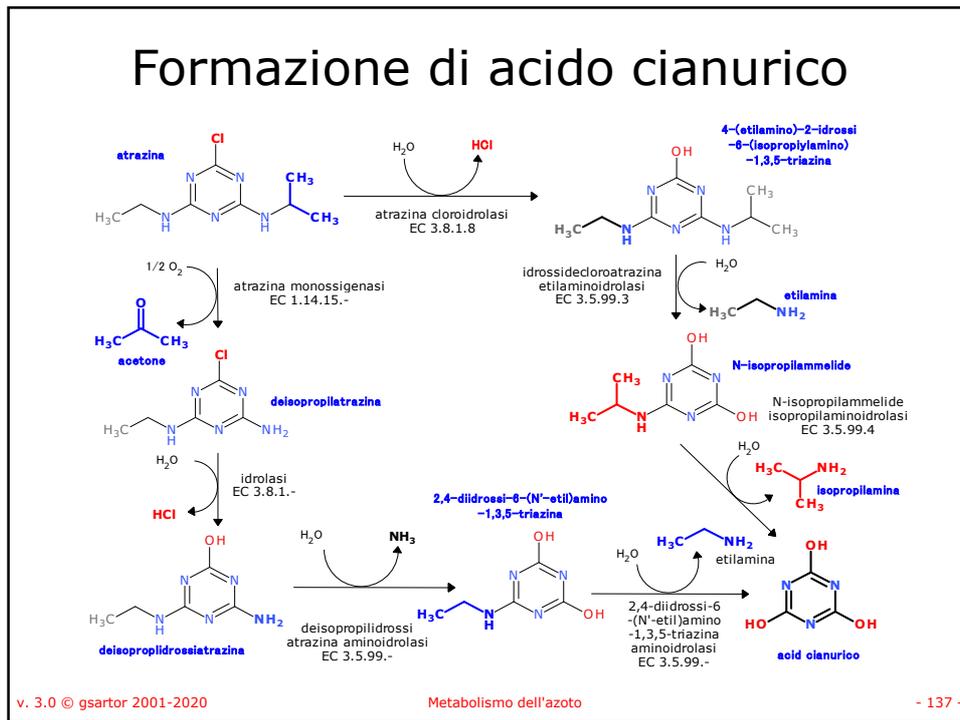
134



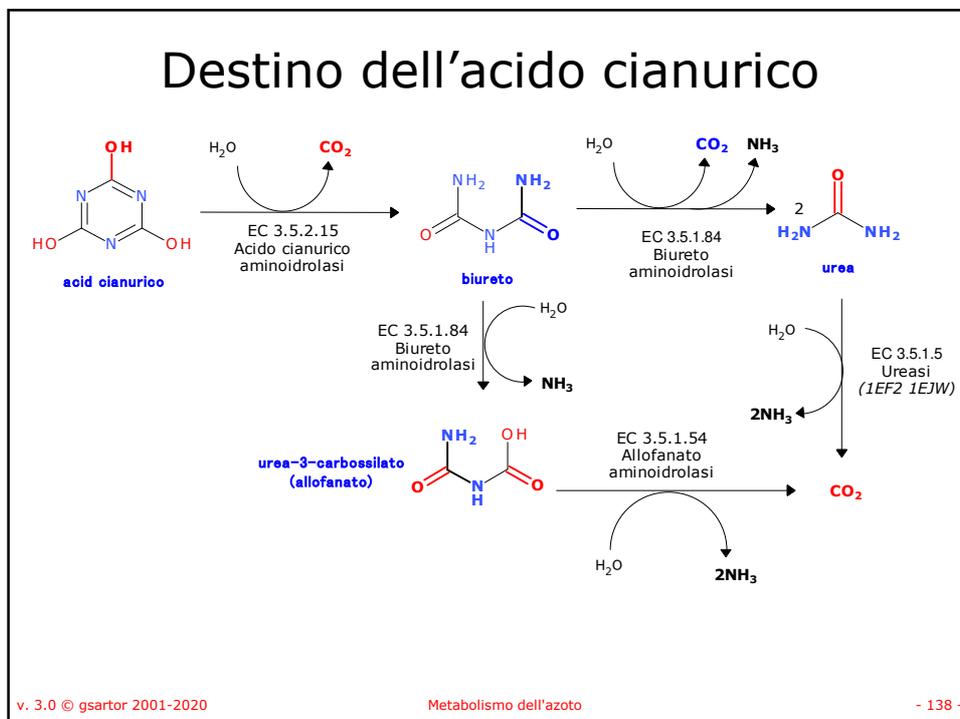
135



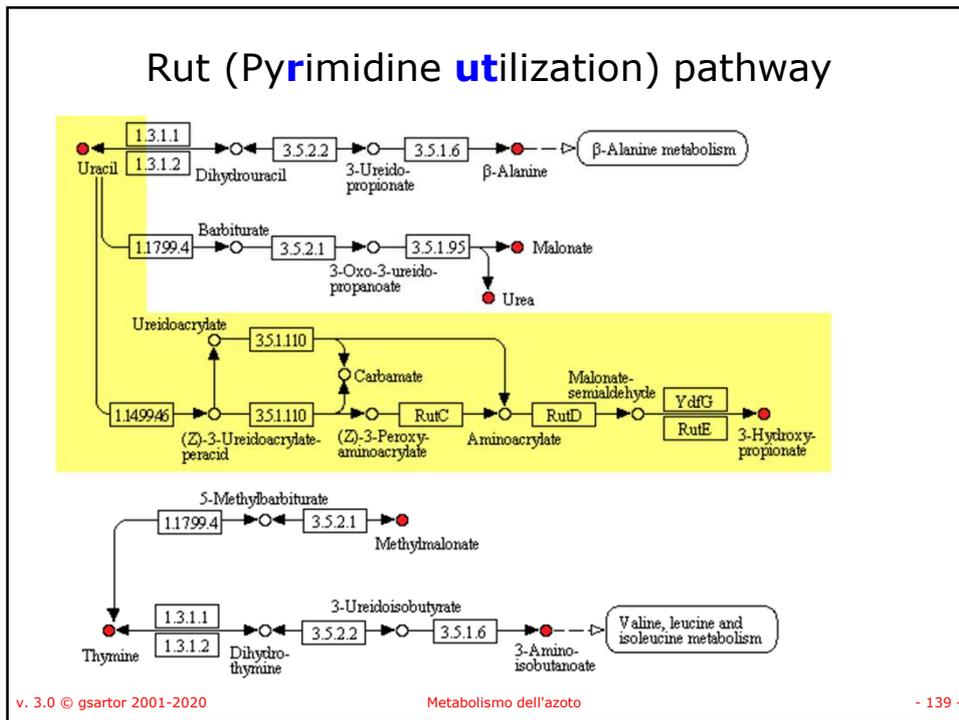
136



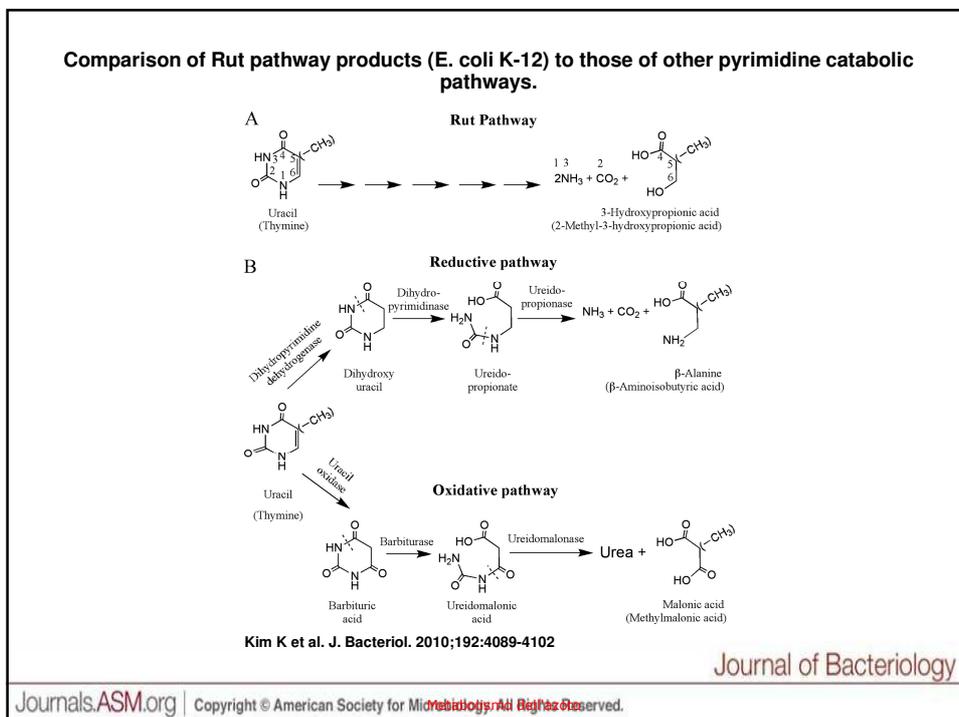
137



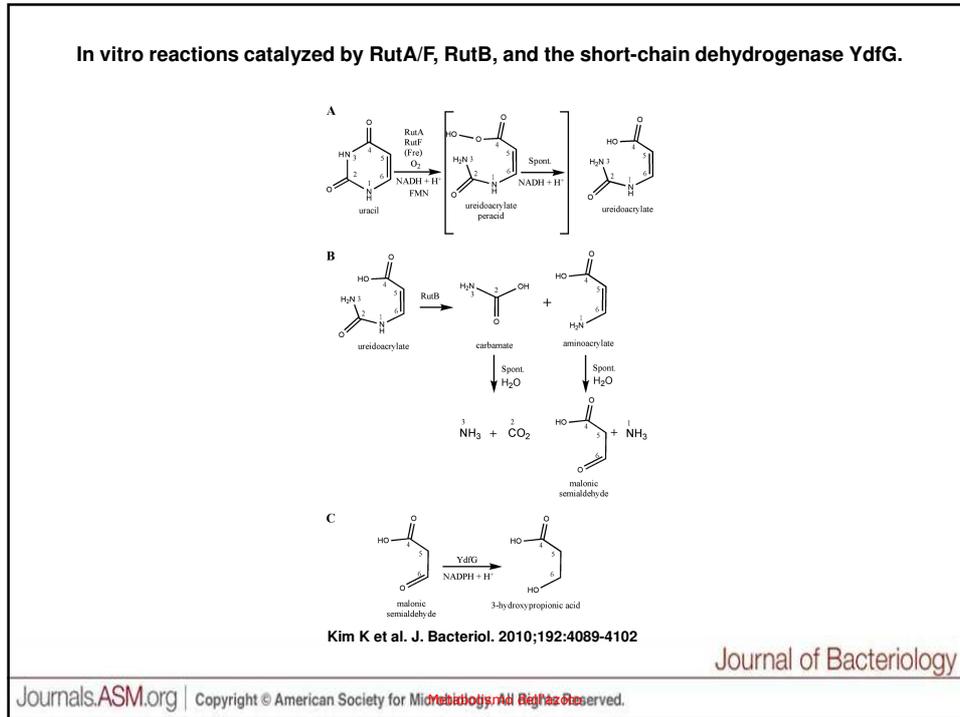
138



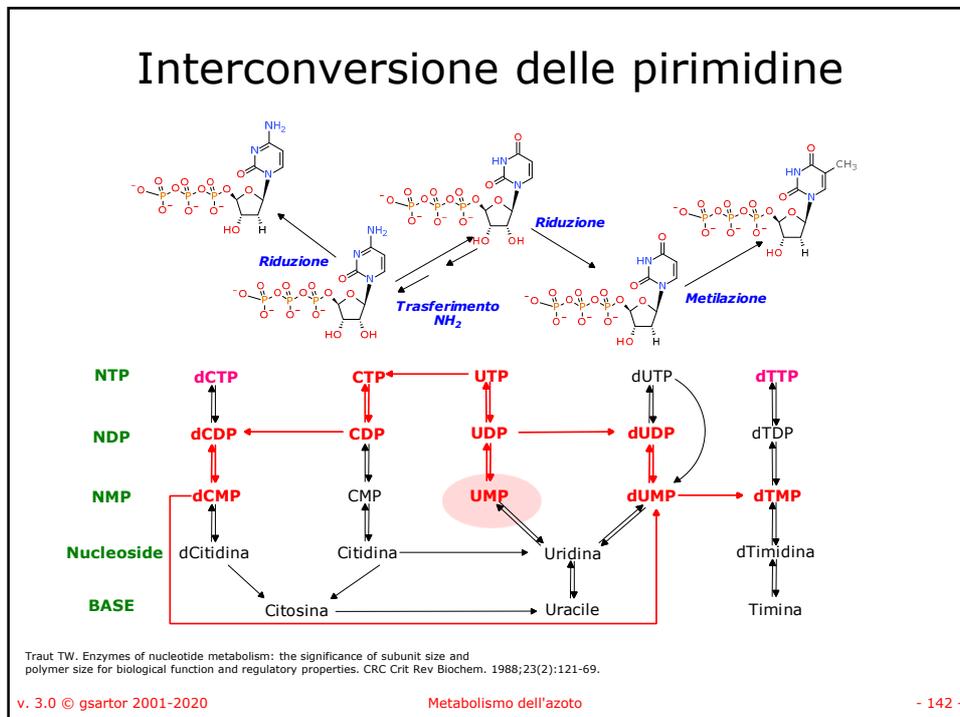
139



140

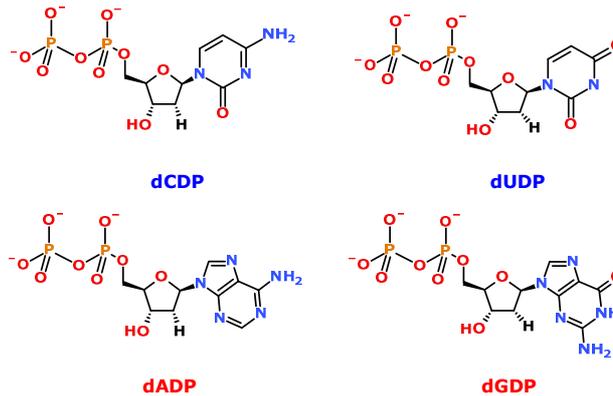


141



142

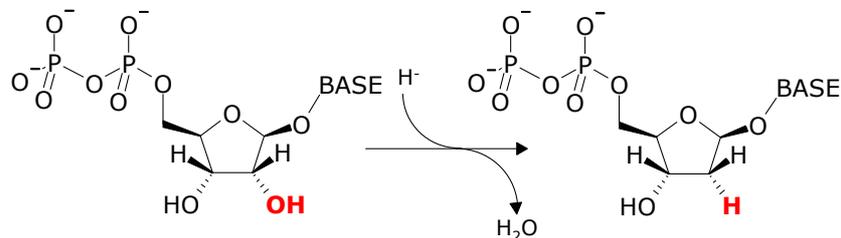
Biosintesi dei deossiribonucleotidi



143

Deossiribonucleotidi

- Per mantenere costante il pool di deossinucleotidi trifosfati, necessari per la formazione del DNA, l'enzima di riferimento è **Ribonucleotide-difosfato reduttasi (EC 1.17.4.1)** che catalizza la reazione redox:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

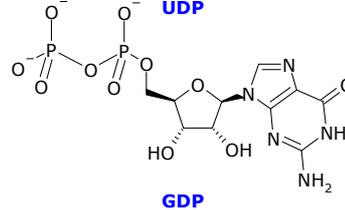
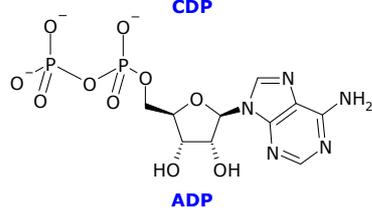
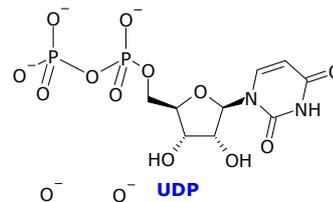
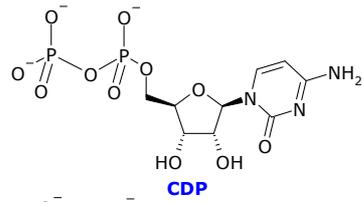
Metabolismo dell'azoto

- 144 -

144

Deossiribonucleotidi

- I substrati sono:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

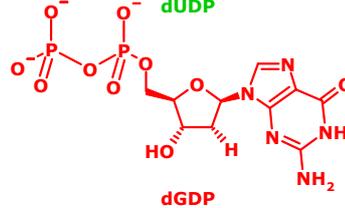
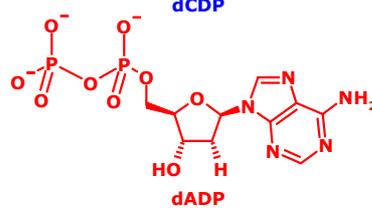
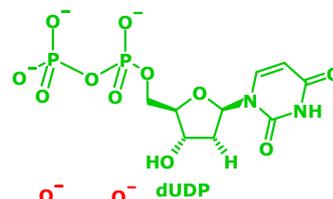
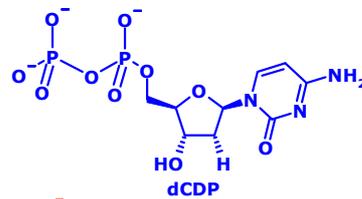
Metabolismo dell'azoto

- 145 -

145

Deossiribonucleotidi

- I prodotti sono:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

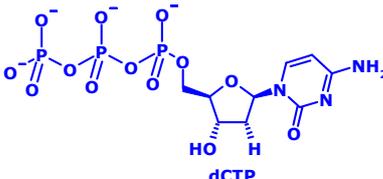
Metabolismo dell'azoto

- 146 -

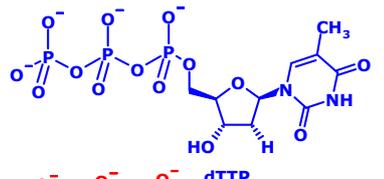
146

Deossiribonucleotidi

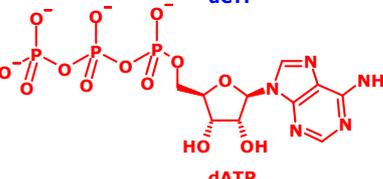
- Per la sintesi del DNA vengono usati i nucleotidi trifosfati:



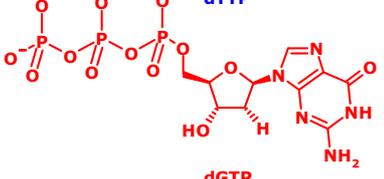
dCTP



dTTP



dATP



dGTP

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 147 -

147

Deossiribonucleotidi

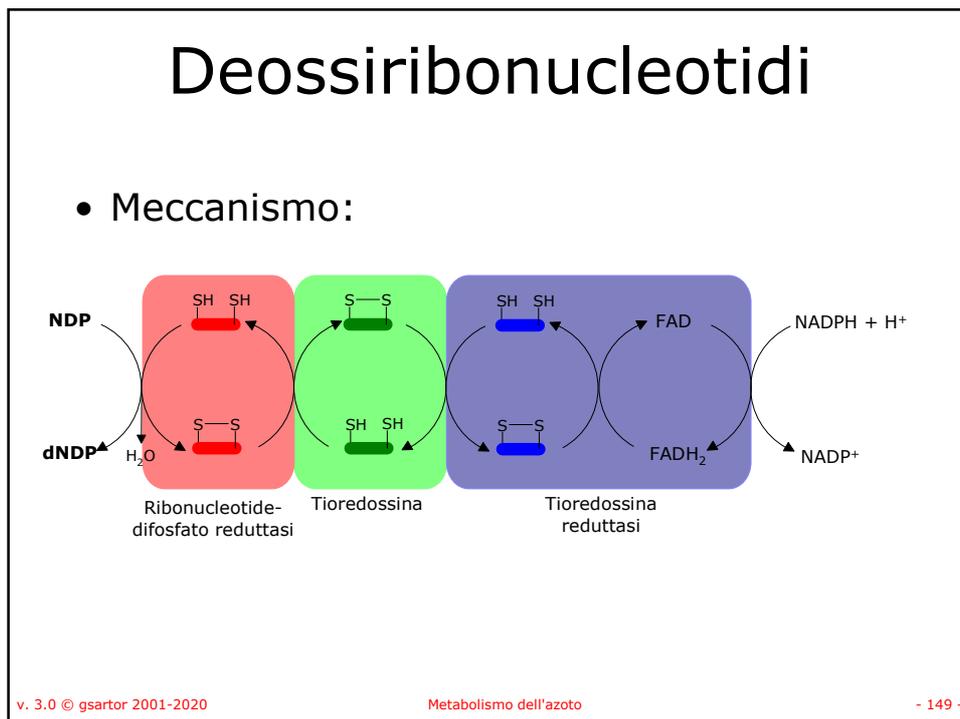
- dUTP non è un nucleotide del DNA ma è il precursore di dTTP

CDP	→	dCDP	→	dCTP
UDP	→	dUDP	→	dUTP
ADP	→	dADP	→	dATP
GDP	→	dGDP	→	dGTP

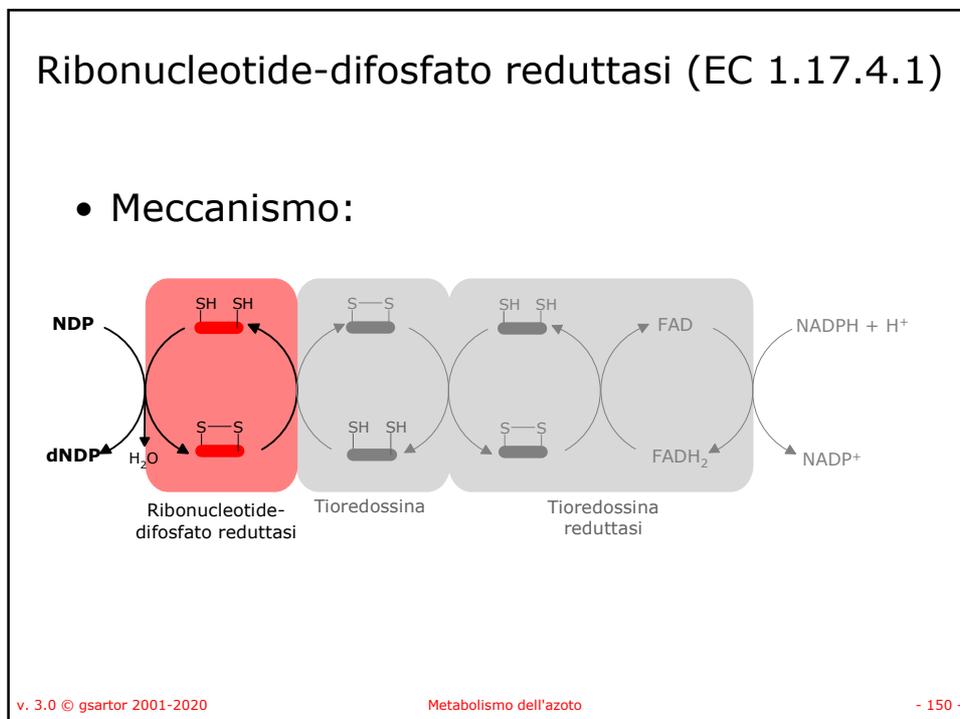
			dUMP	→	dTMP	→	dTTP
--	--	--	-------------	----------	-------------	----------	-------------

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 148 -

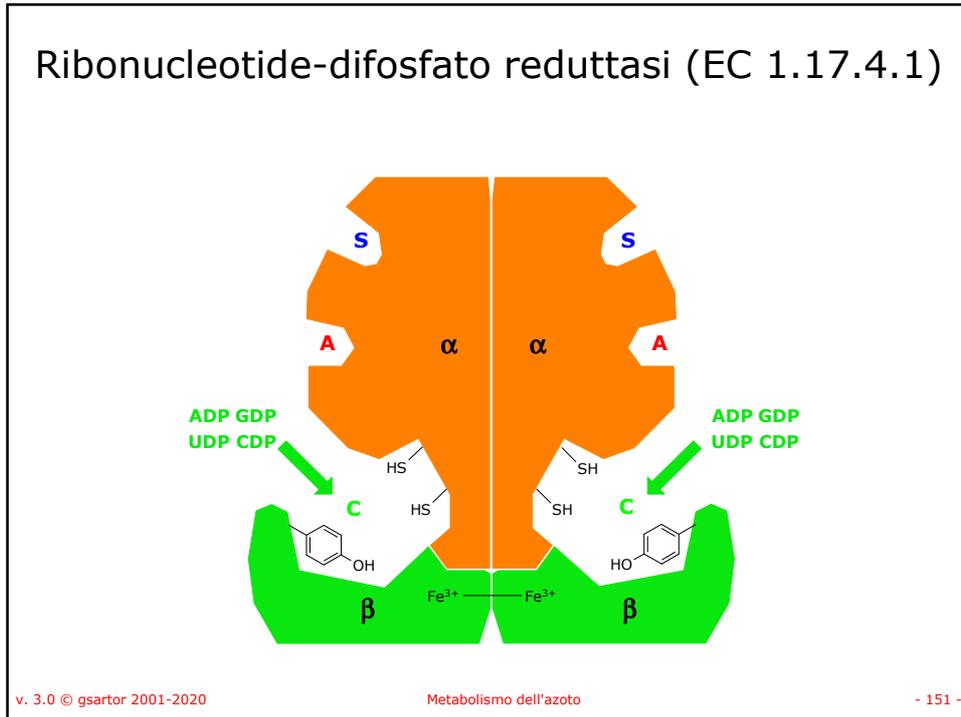
148



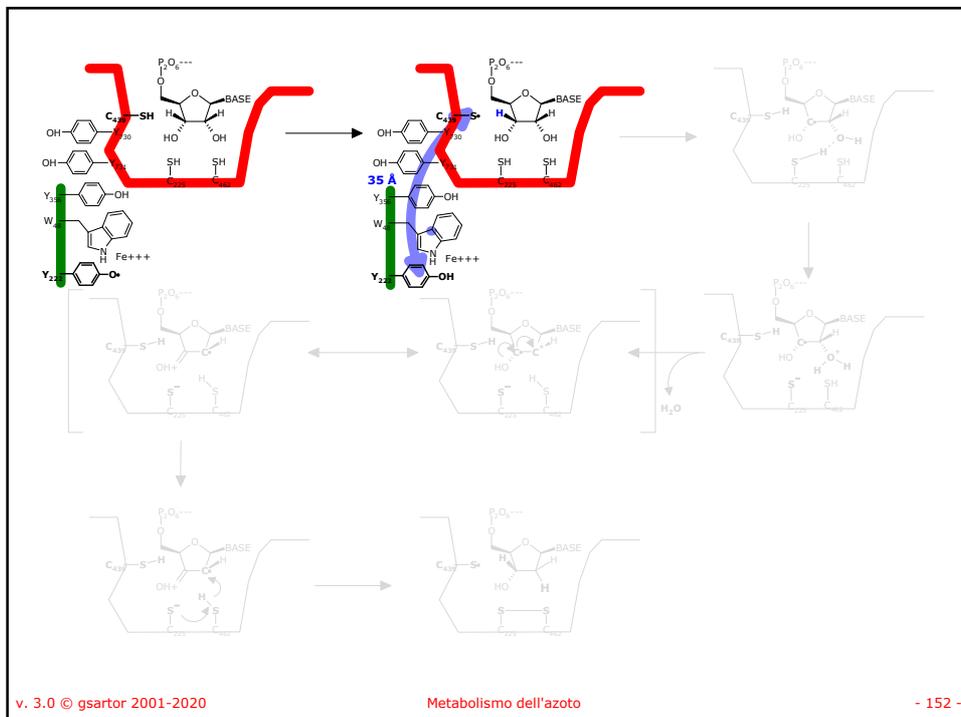
149



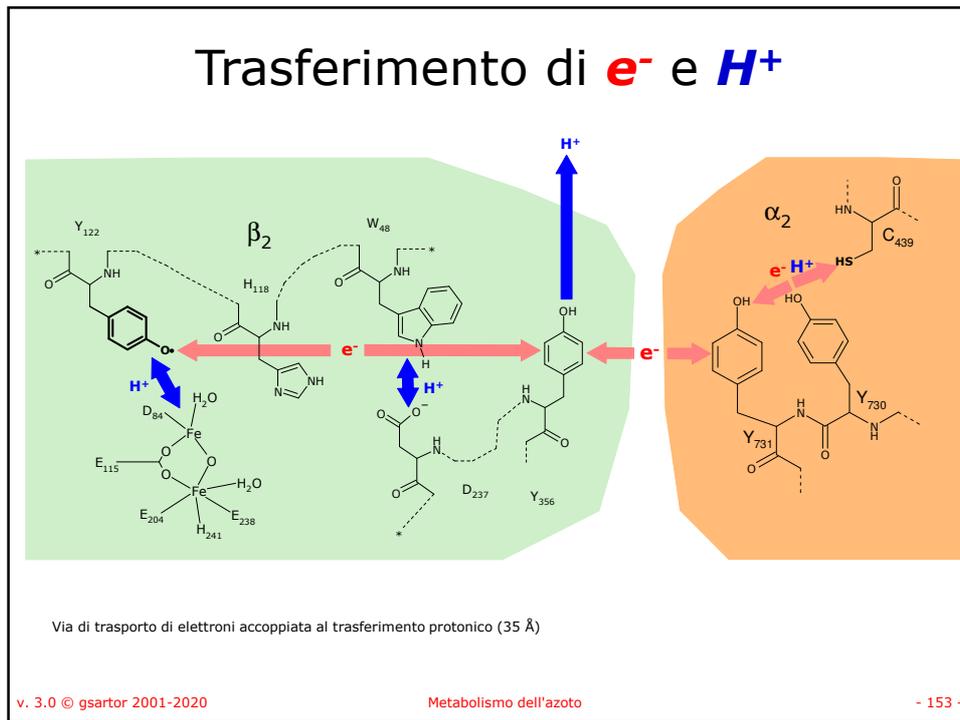
150



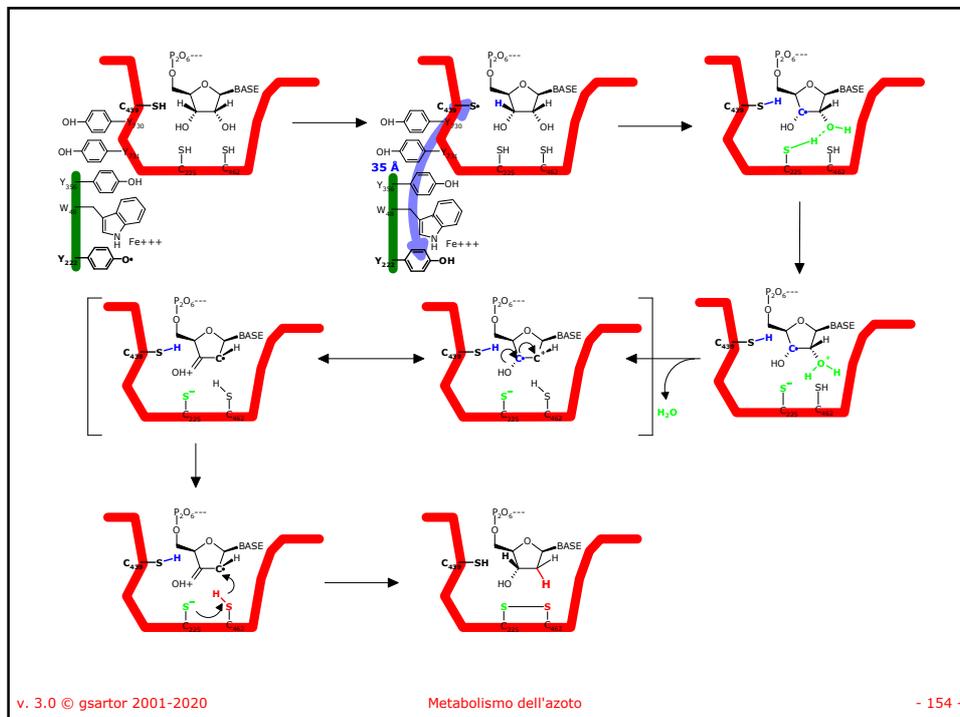
151



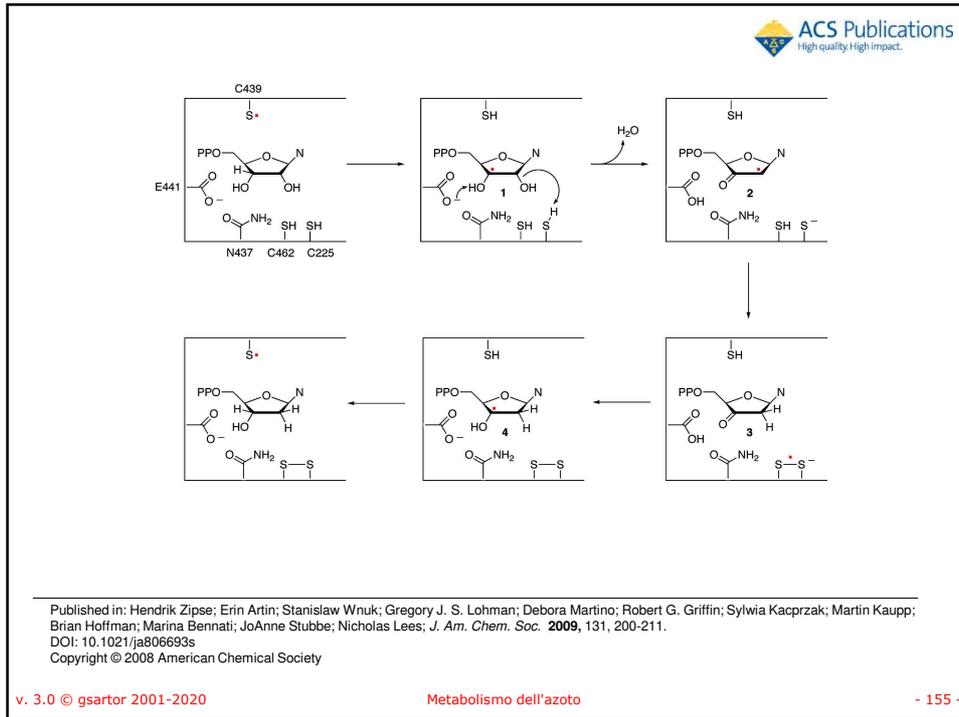
152



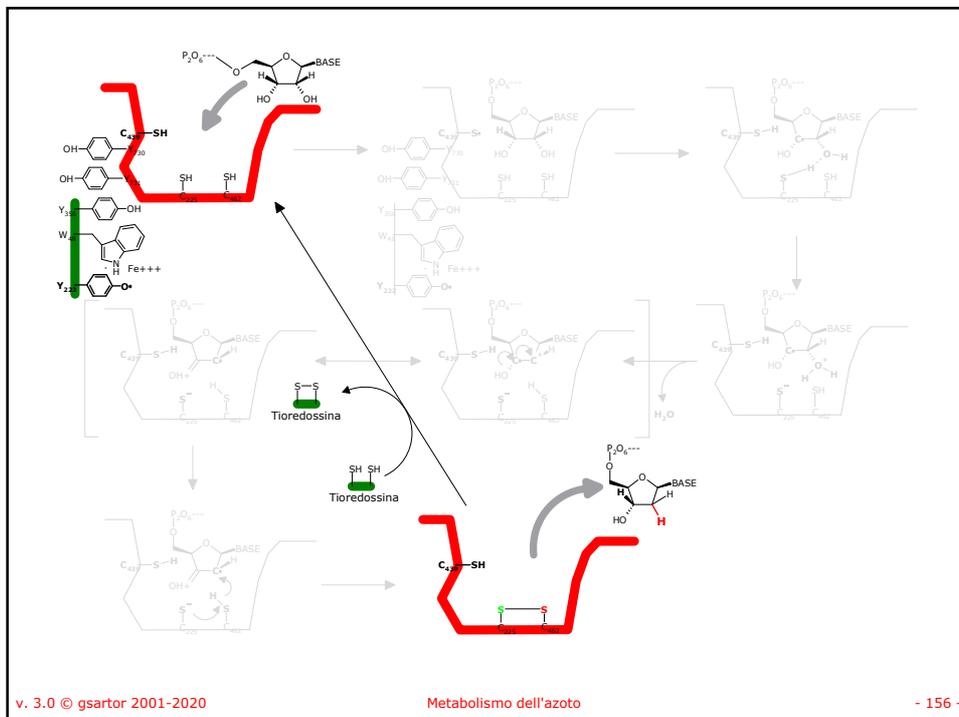
153



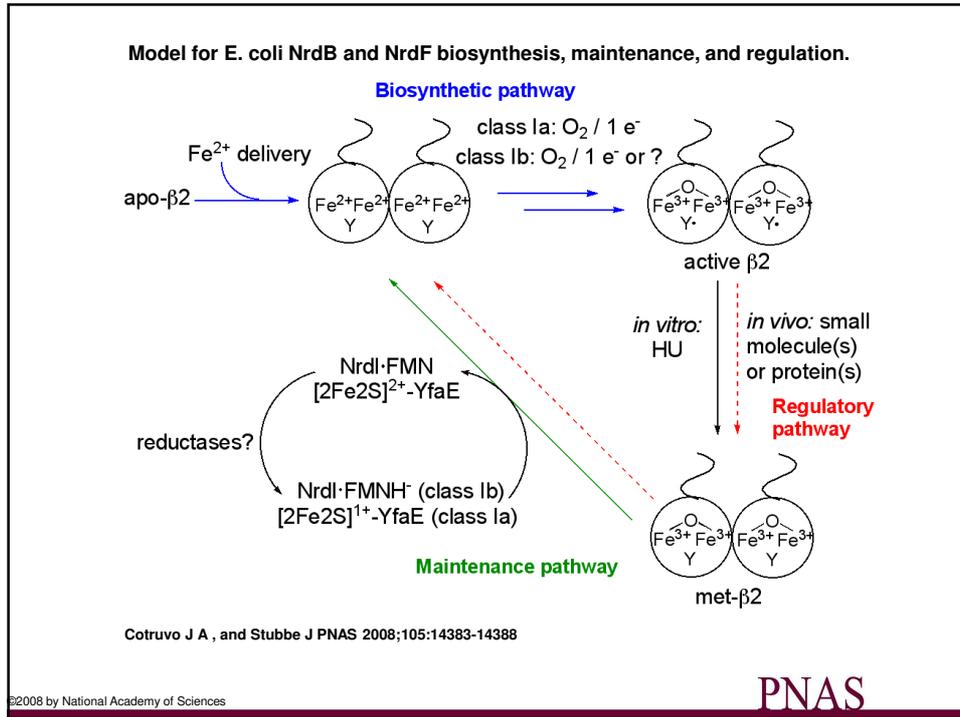
154



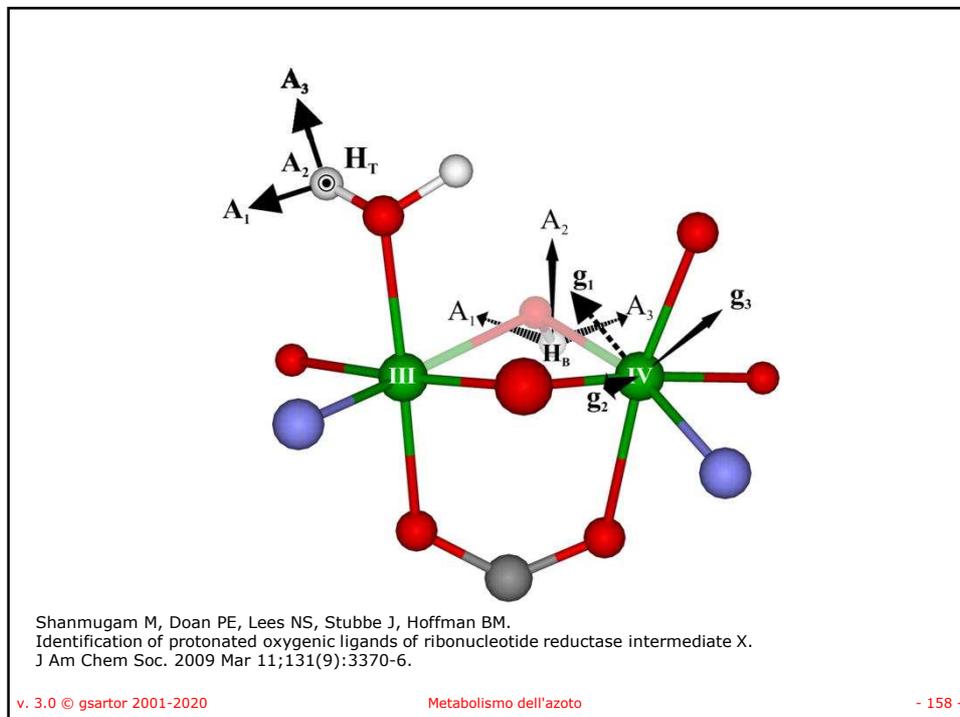
155



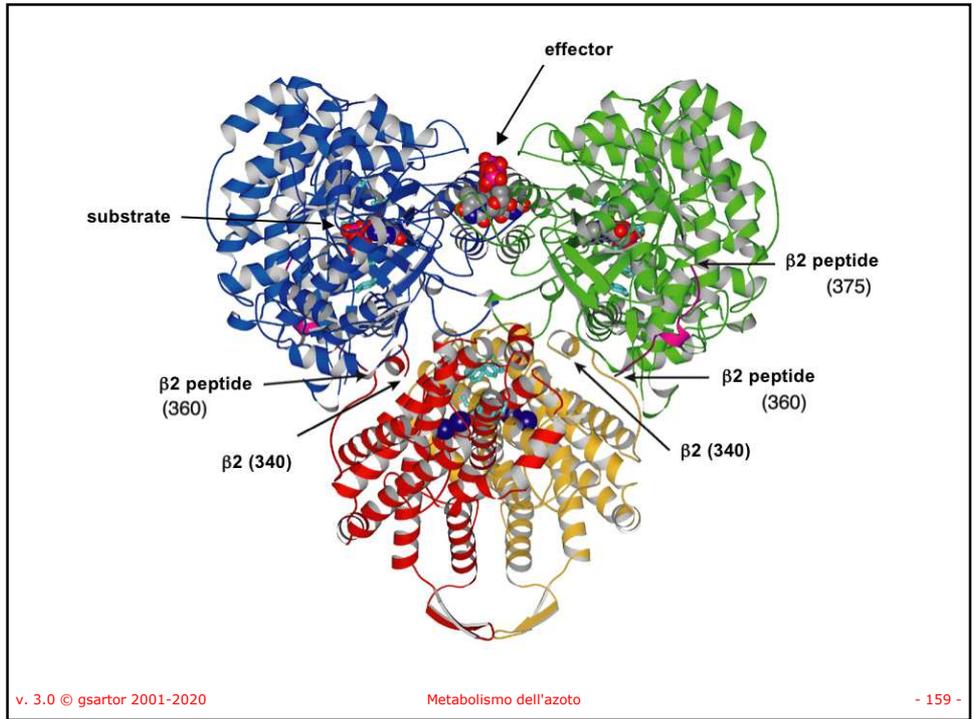
156



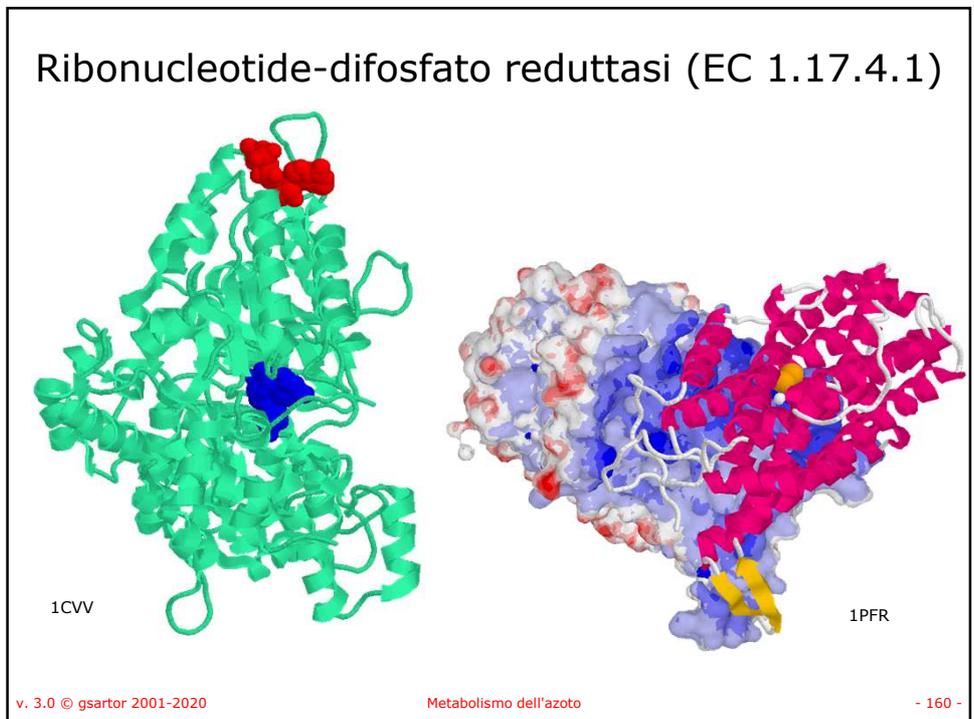
157



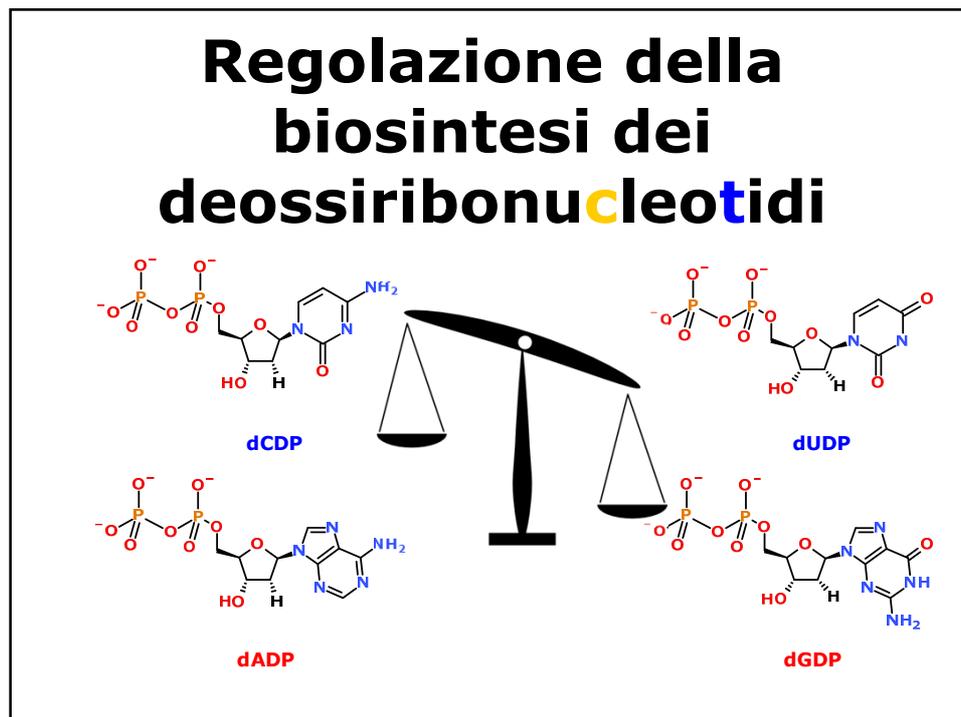
158



159



160



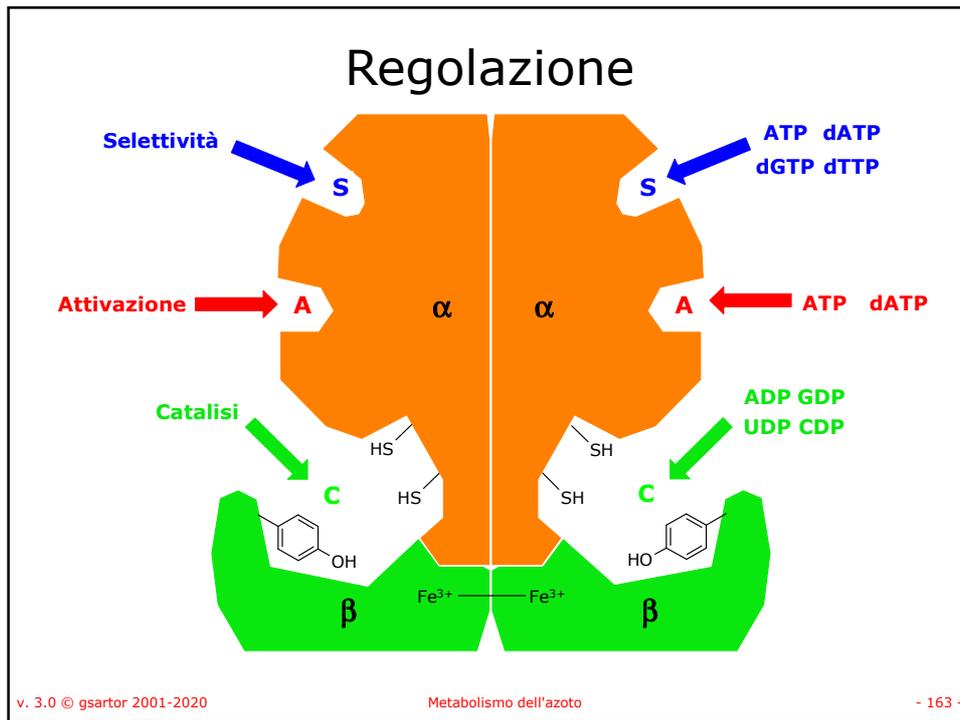
161

Regolazione

- Per mantenere costante il pool di deossinucleotidi necessari per la formazione del DNA l'enzima è estremamente regolato;
- Il meccanismo è allosterico e coinvolge:
 - **ATP** e **dATP** come segnali di attivazione e disattivazione dell'enzima;
 - ATP, dATP, dTTP e dGTP come segnali per la selezione dei substrati.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 162 -

162



163

ON/OFF

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide riduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	CDP/UDP → dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

164

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	CDP/UDP → dCDP/dUDP → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

165

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

166

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

167

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

168

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

169

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

170

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

171

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

172

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	CDP/UDP → dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

173

Regolazione

Stato dell'enzima	Siti su ribonucleotide reduttasi			Eventi e prodotti
	A ttivazione	S elezione	C atalisi	
ON	ATP	-	-	
ON	ATP	ATP	CDP/UDP	→ dCDP/dUDP → → dUMP → dTMP → dTTP
ON	ATP	dTTP	GDP/ADP	→ dGDP → dGTP
ON	ATP	dGTP	ADP	→ dADP → dATP
OFF	dATP	-	-	-

174

SCID

- **Sindrome da ImmunoDeficienza Combinata**
 - Mancata capacità proliferativa di linfociti B e T a causa della aumentata sintesi di dATP che inibisce la sintesi dei deossinucleotidi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 175 -

175

Tioredossina

- **Meccanismo:**

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 176 -

176

Tioredossina

- Proteina redox che contiene il motivo **CXXC**

EC 1.17.4.1
Ribonucleotide-difosfato reductasi

EC 1.8.1.9
Tioredossina reductasi

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 177 -

177

Tioredossina reductasi (EC 1.8.1.9)

- Meccanismo:

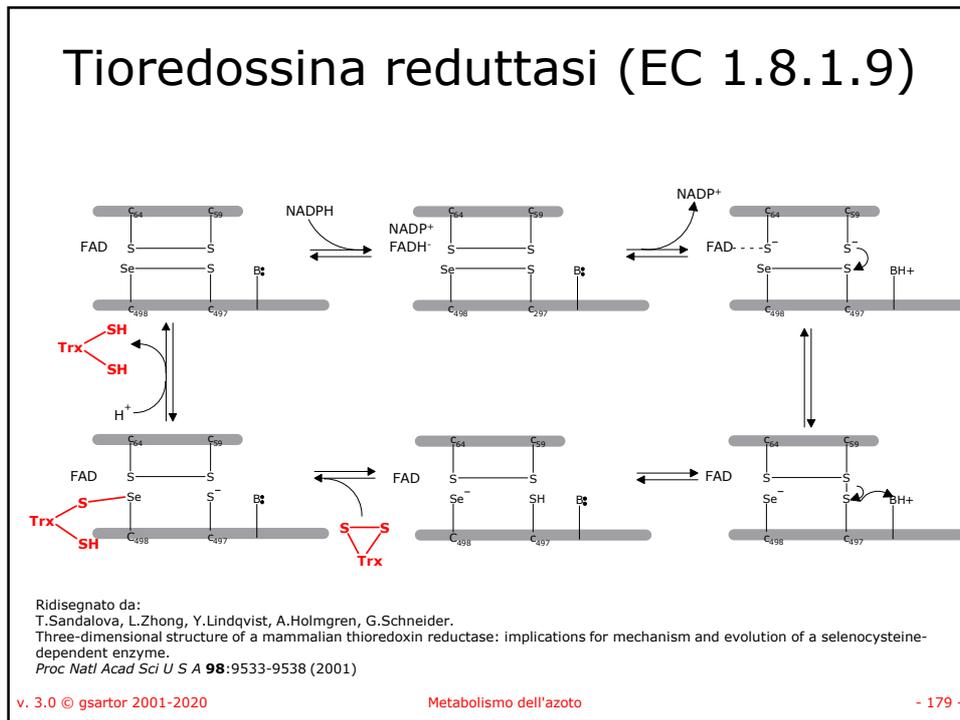
Ribonucleotide-difosfato reductasi

Tioredossina

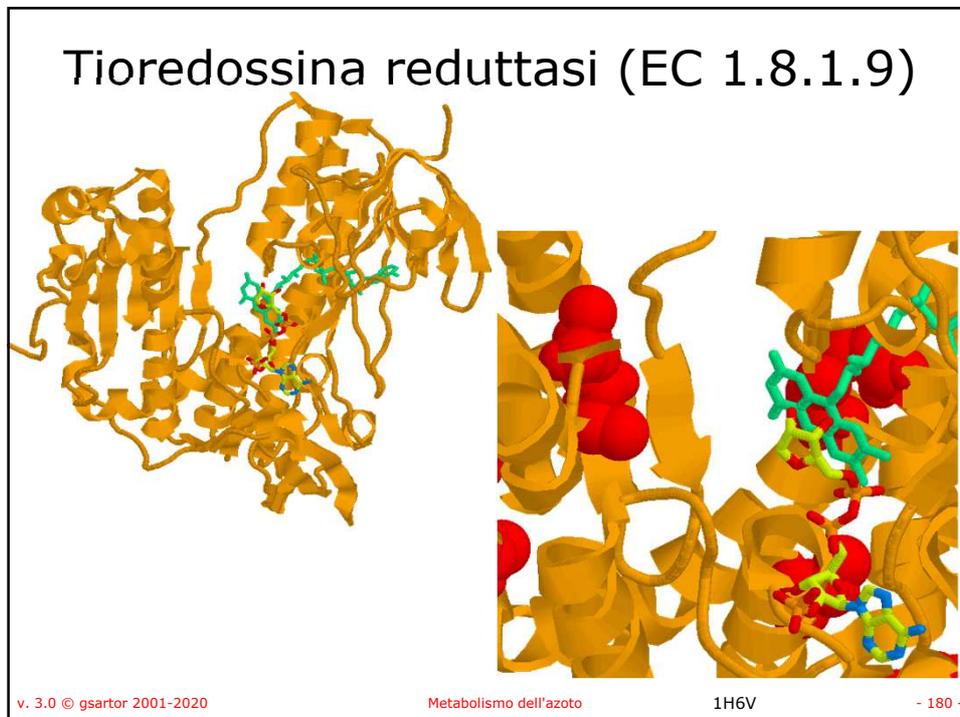
Tioredossina reductasi

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 178 -

178

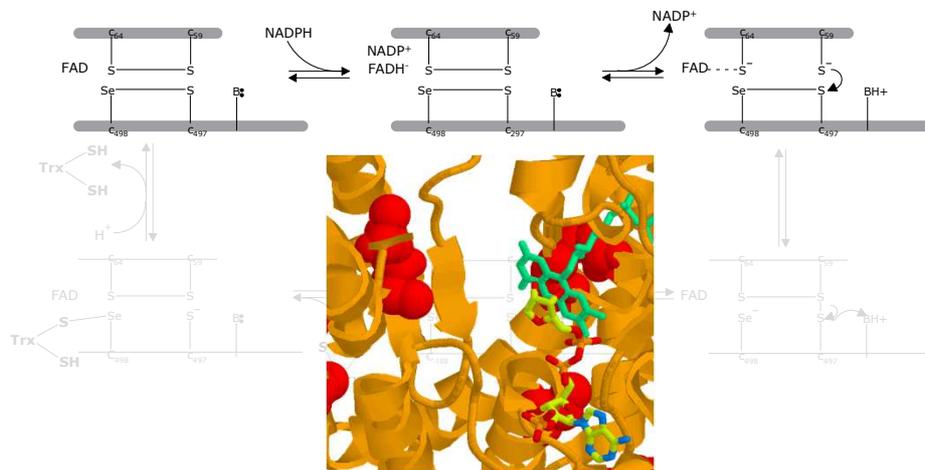


179



180

Tioredoxina riduttasi (EC 1.8.1.9)



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 181 -

181

dNTP per la replicazione del DNA

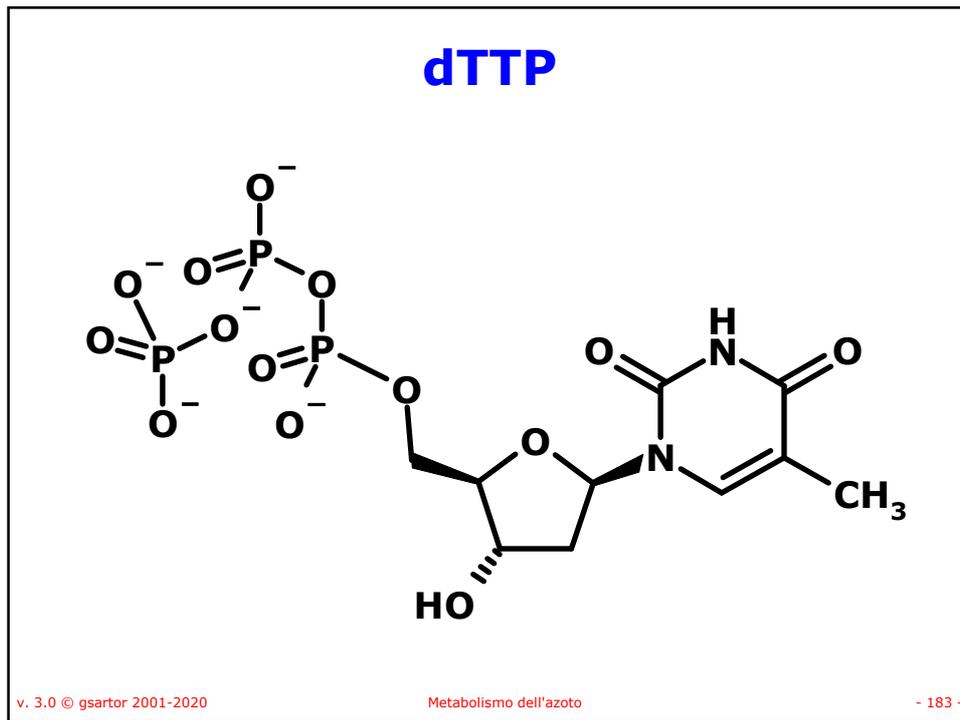
- I deossinucleotidi difosfati
 - Purinici: **dADP**, **dGDP**
 - Pirimidinici: **dUDP**, **dCDP**
- vengono convertiti nei rispettivi deossinucleotidi trifosfati usati per la replicazione del DNA:
 - Purinici: **dATP**, **dGTP**
 - Pirimidinici: **dUTP**, **dCTP**
- Il **dTTP** viene prodotto da **dTMP** a sua volta proveniente da **dUTP** (**dCTP**).

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

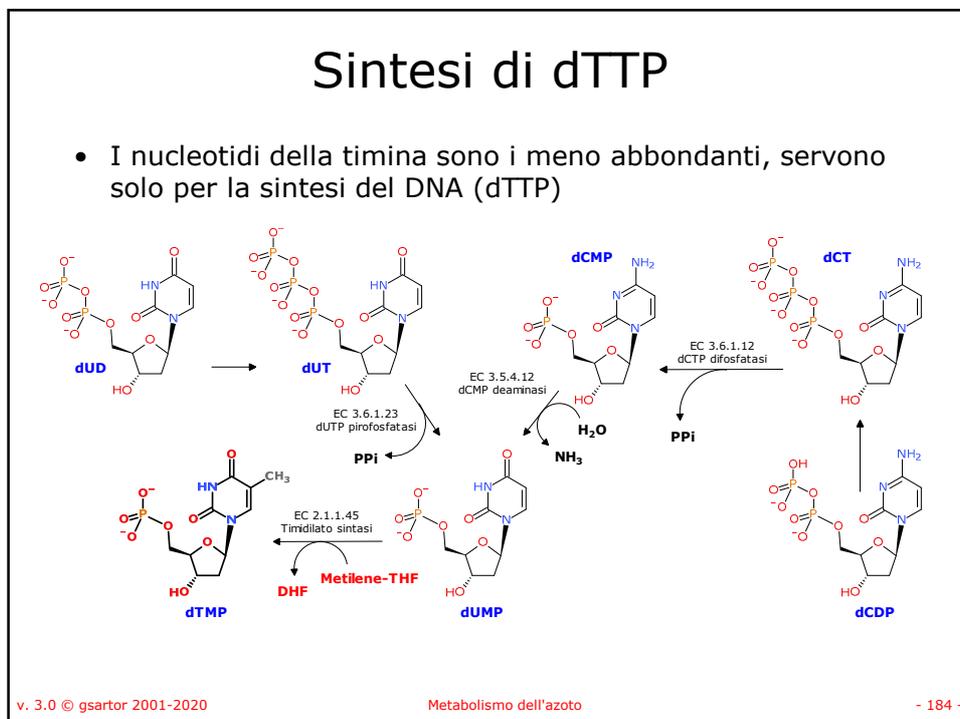
Metabolismo dell'azoto

- 182 -

182



183



184

Sintesi di dTTP

- La formazione di dTMP da dUMP avviene attraverso la metilazione assistita da ⁵N-¹⁰N-metilene-THF
- La sintesi di ⁵N-¹⁰N-metilene-THF è un bersaglio degli inibitori della duplicazione del DNA attraverso analoghi del folato (metotrexato) che analoghi inattivi dei nucleotidi (5-fluoro-uracile).

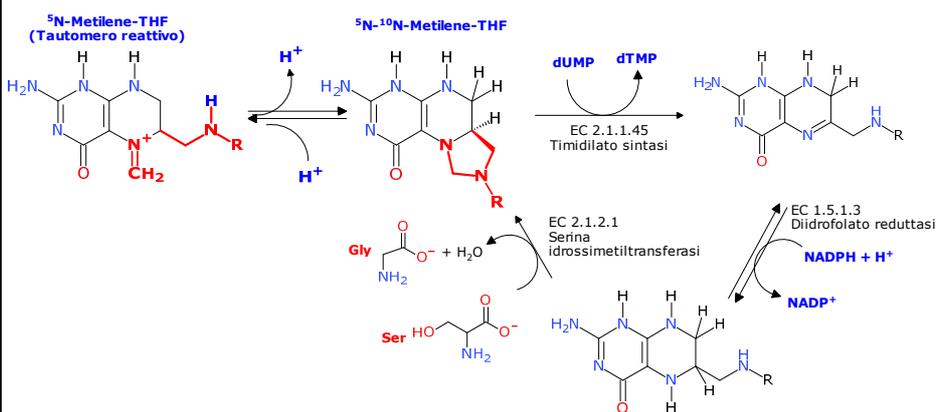
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 185 -

185

⁵N-¹⁰N-metilene-THF

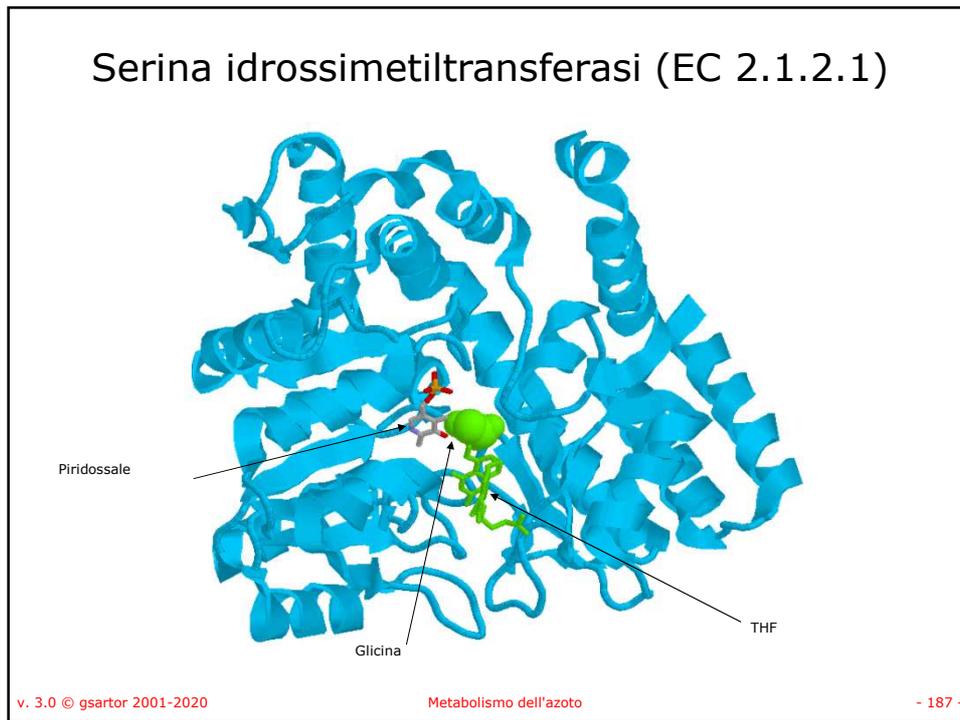


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

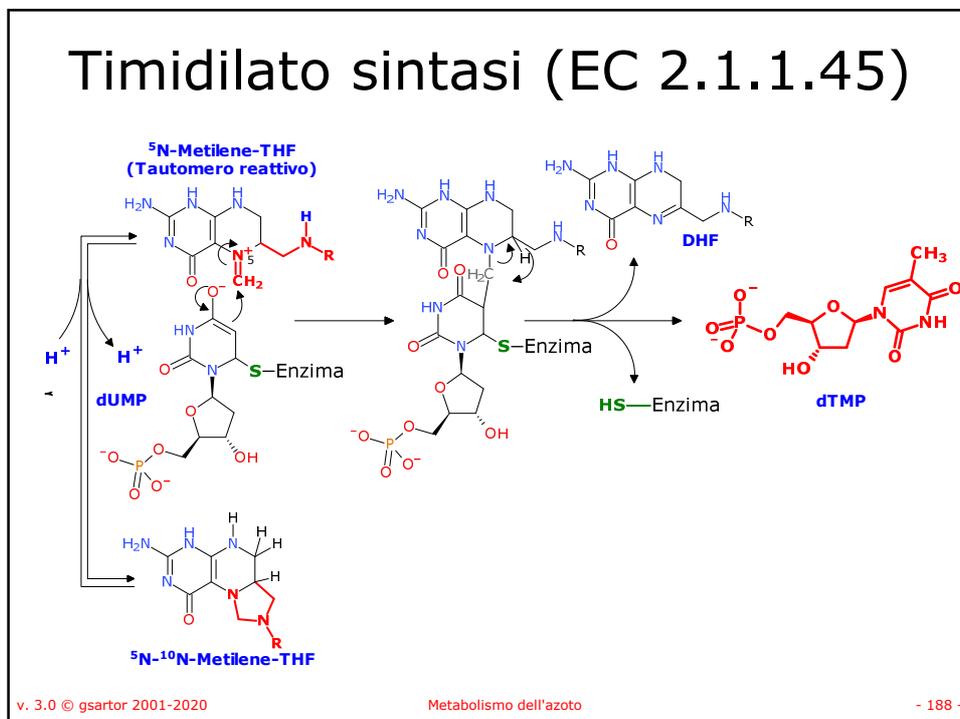
Metabolismo dell'azoto

- 186 -

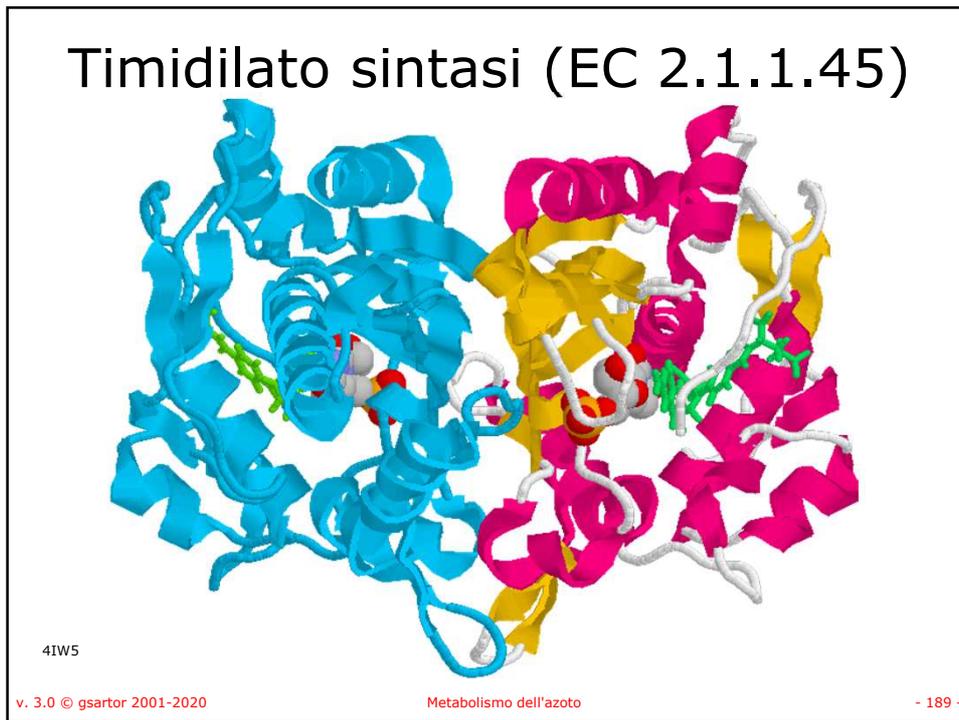
186



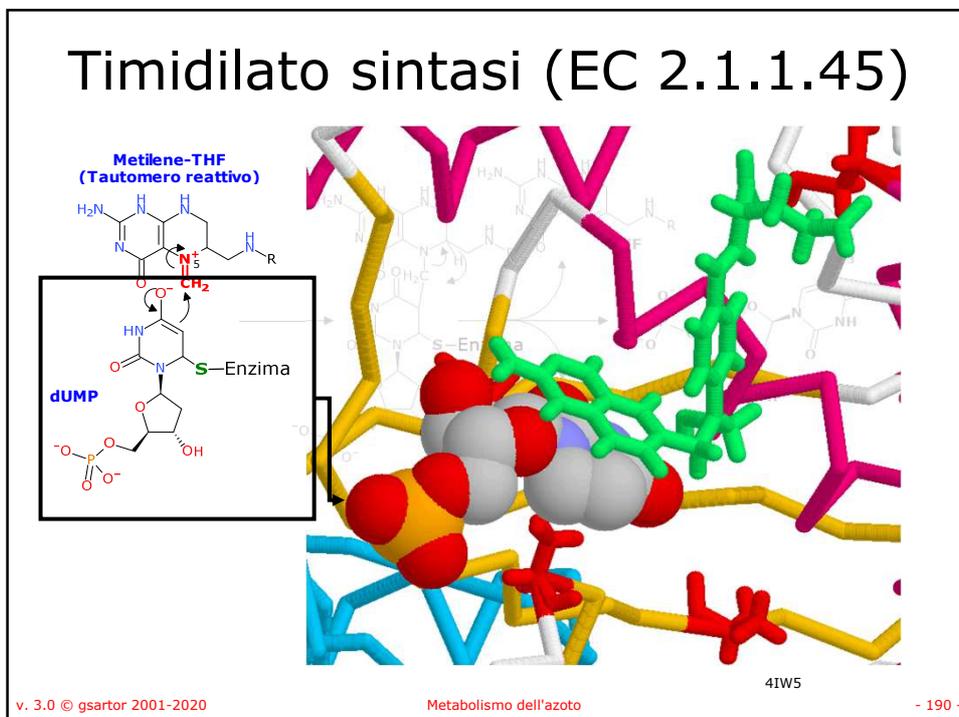
187



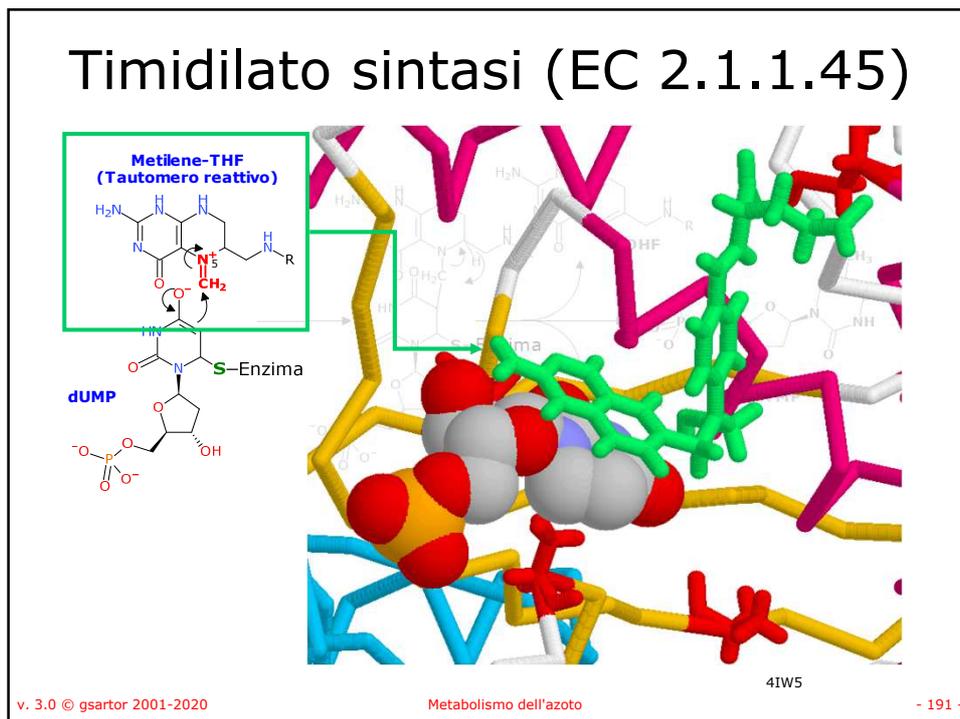
188



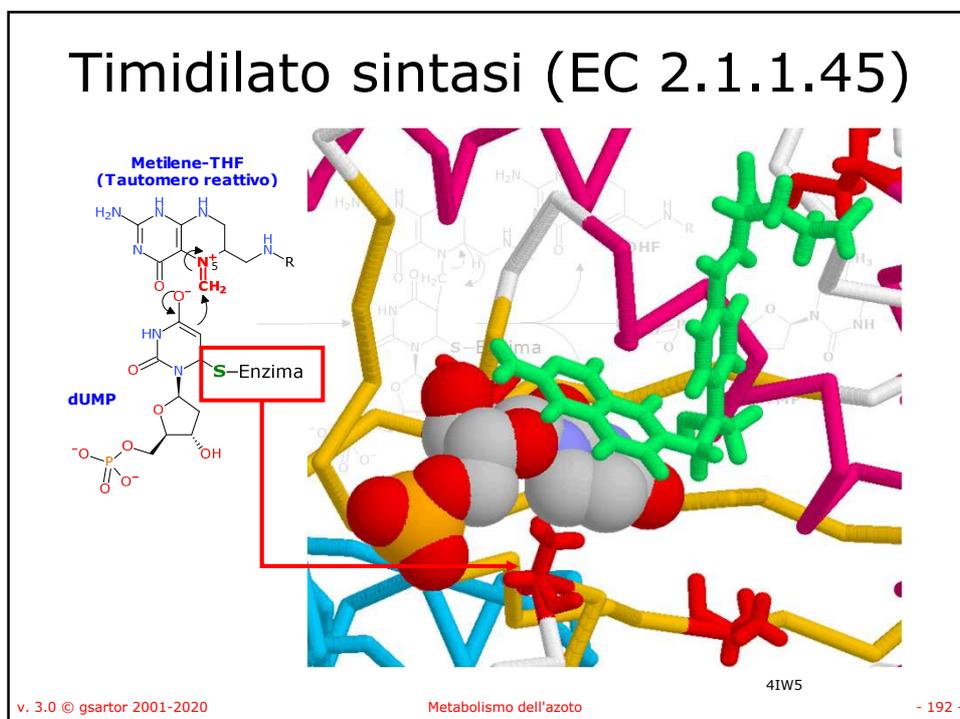
189



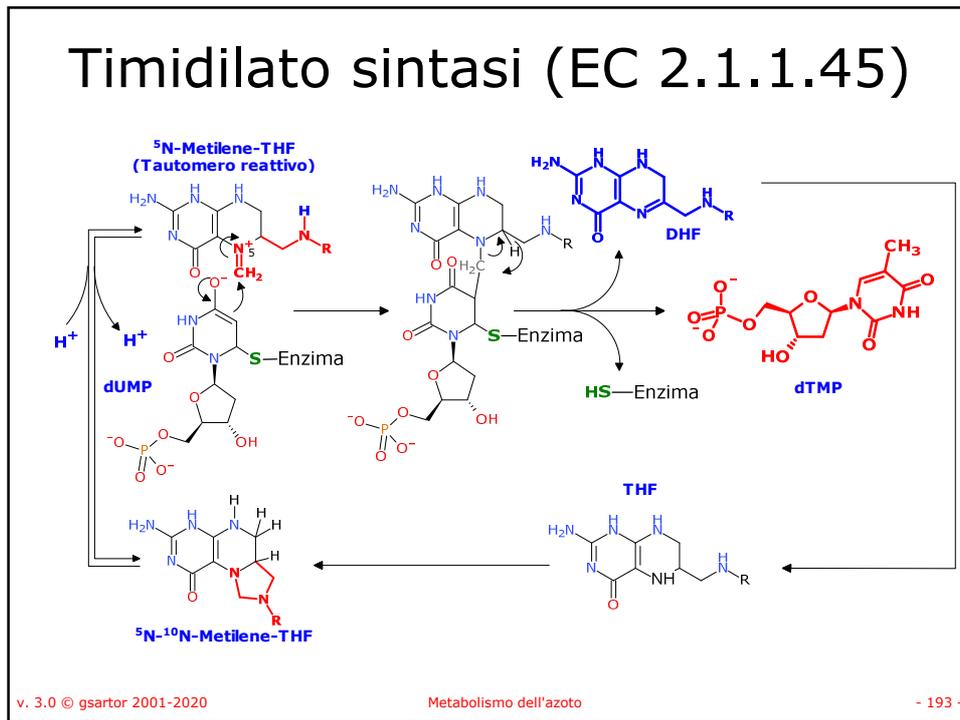
190



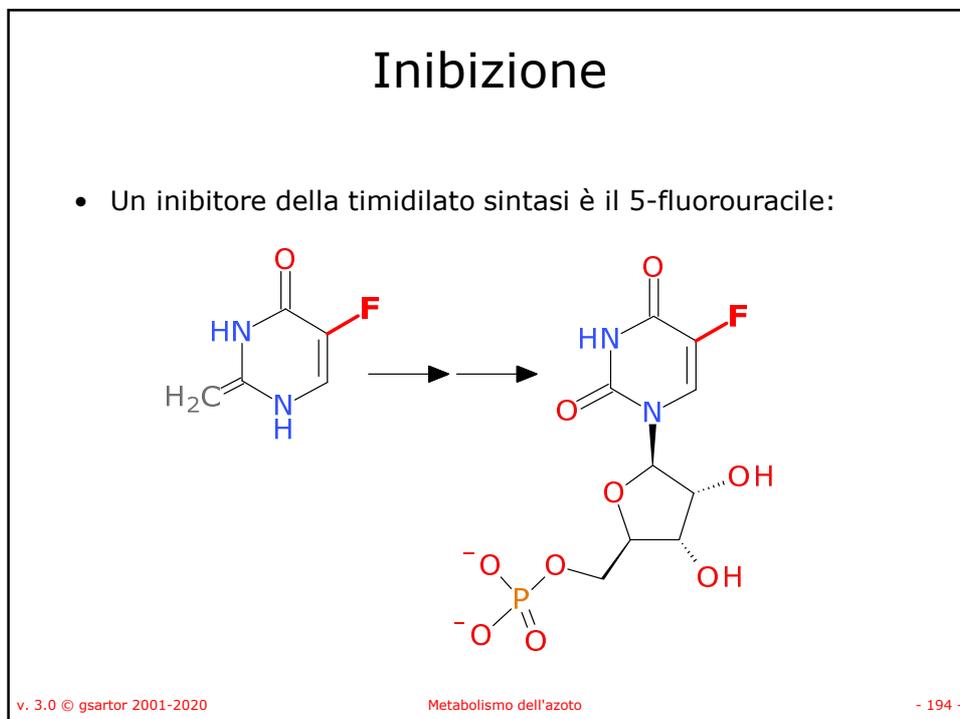
191



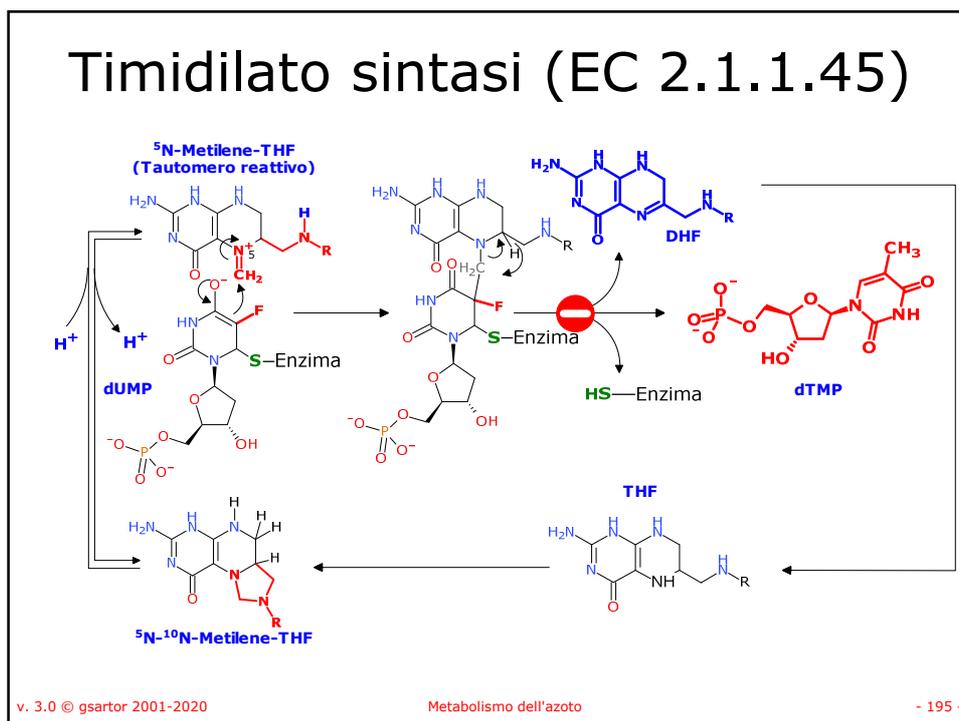
192



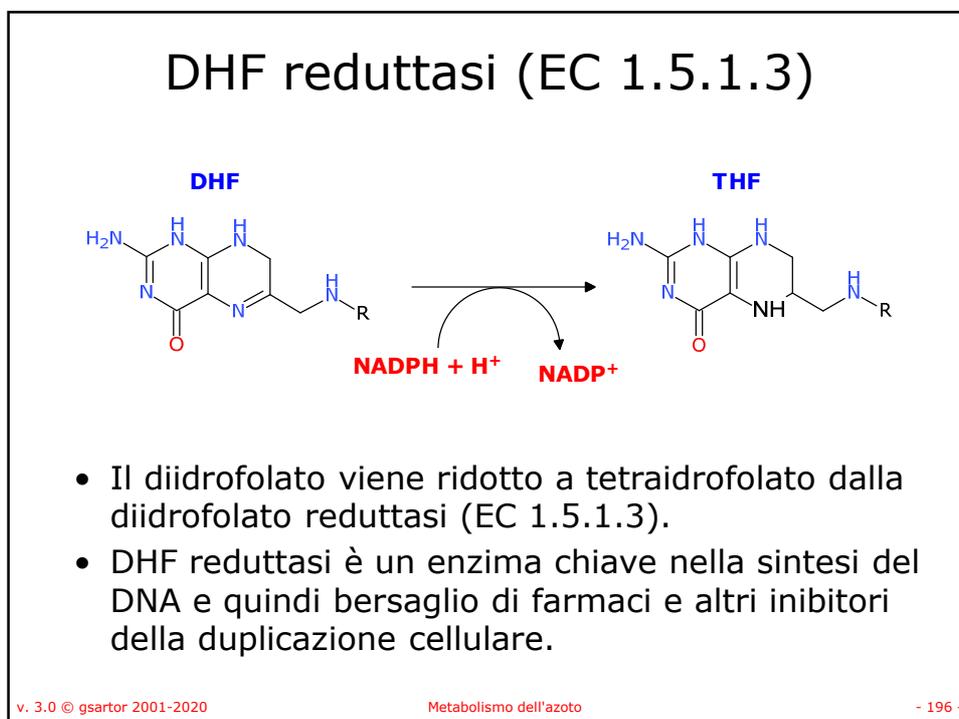
193



194



195

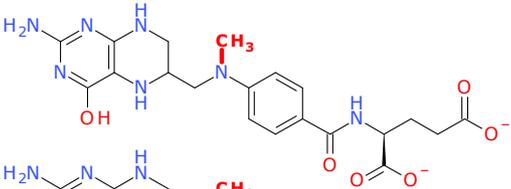


196

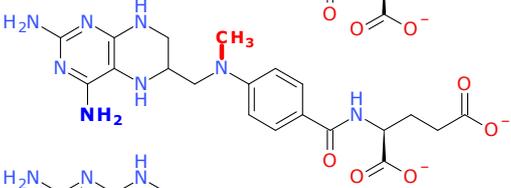
- Il diidrofolato viene ridotto a tetraidrofolato dalla diidrofolato reduttasi (EC 1.5.1.3).
- DHF reduttasi è un enzima chiave nella sintesi del DNA e quindi bersaglio di farmaci e altri inibitori della duplicazione cellulare.

Inibizione DHFR

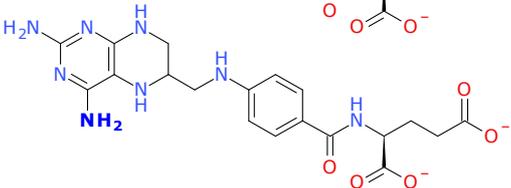
- Antagonisti dell'acido folico



Metopteridina



Metotrexato



Amminopteridina

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 197 -

197

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 - Zanichelli
 - 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>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- 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

Giorgio Sartor
 Ufficiale: giorgio.sartor@unibo.it
 Personale: giorgio.sartor@gmail.com

Aggiornato il 26/05/2020 16:17:25

198