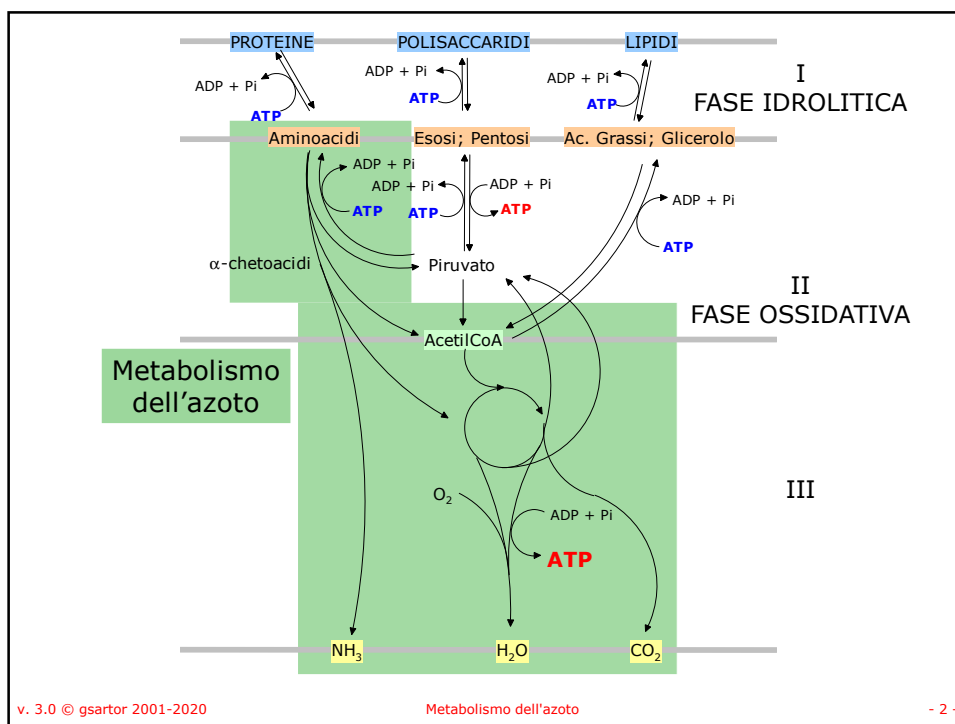
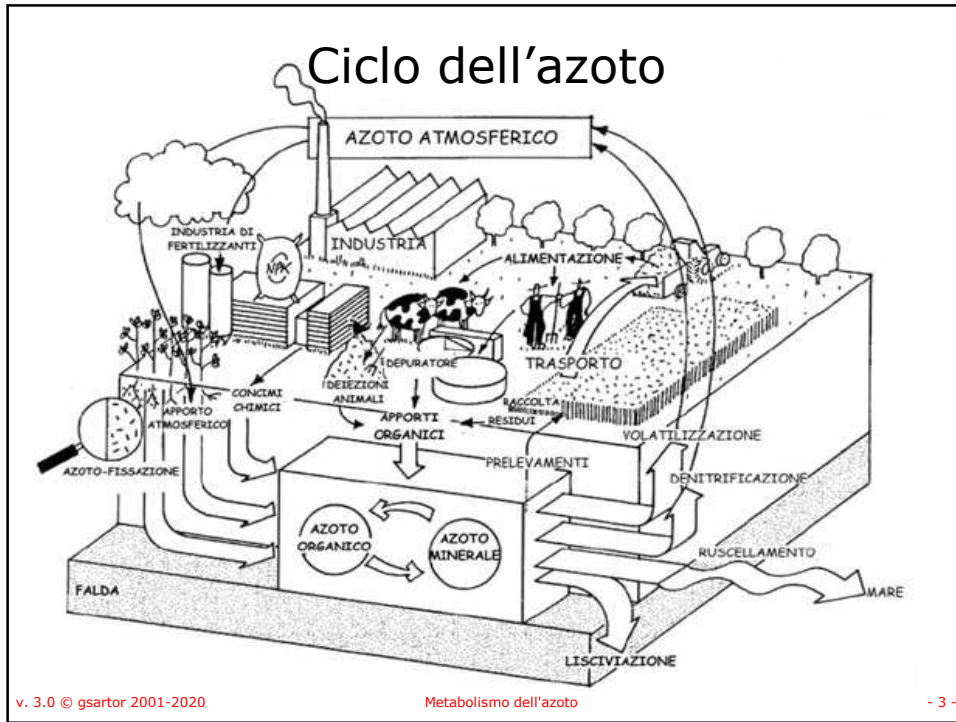




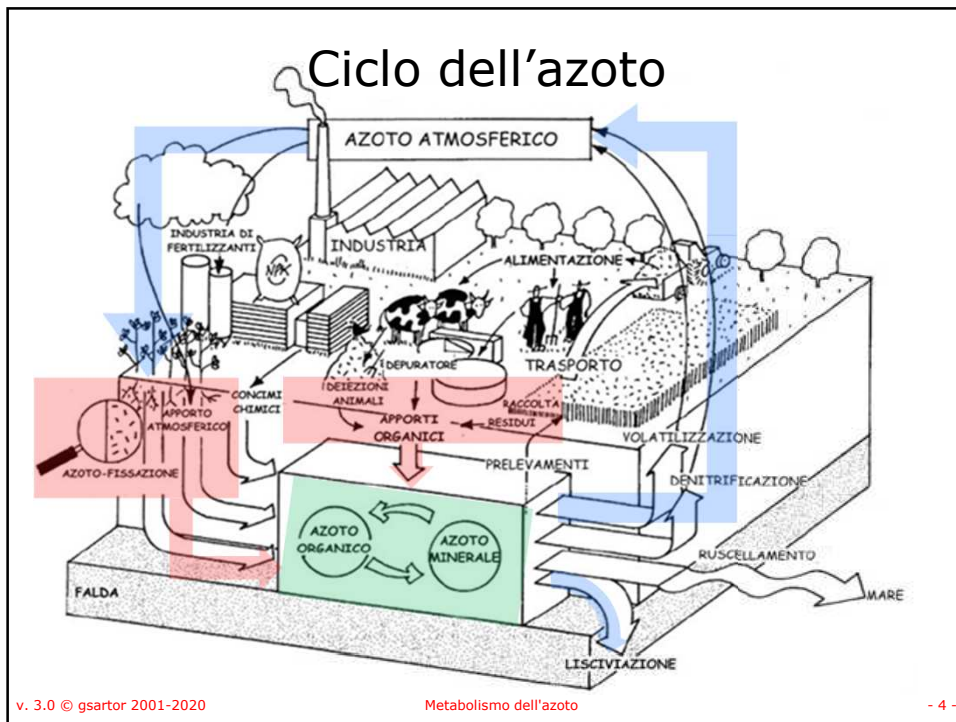
1



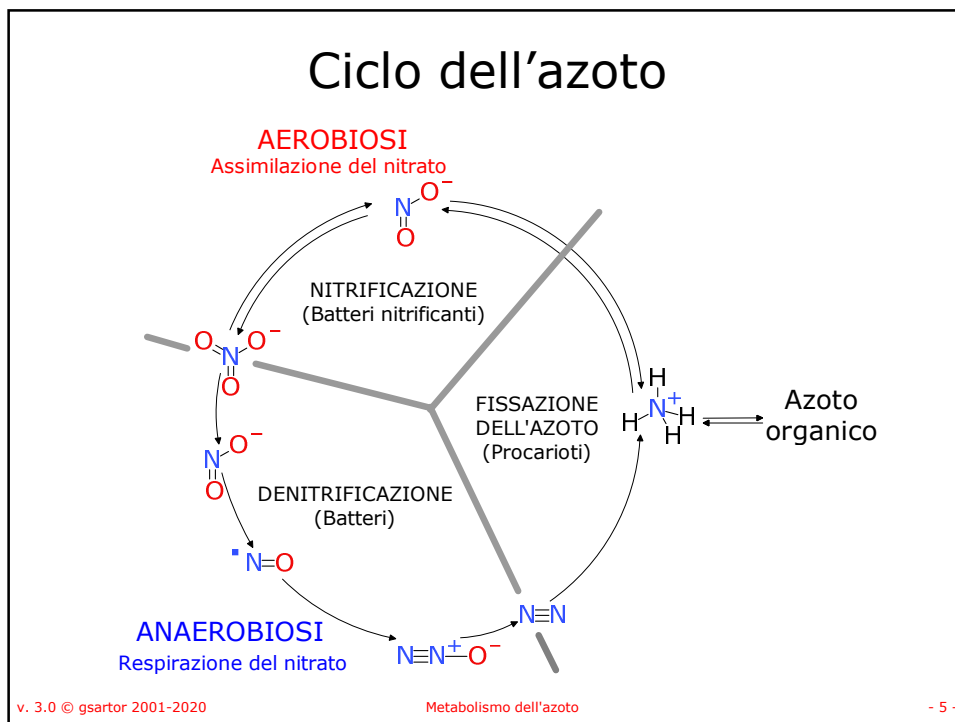
2



3



4



5

Metabolismo dell'azoto

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

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

$$\text{N}\equiv\text{N} \quad \text{O}=\text{N}^+\text{O}^-$$

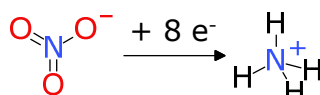
v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 6 -

6

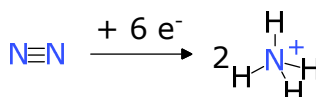
Metabolismo dell'azoto

- 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

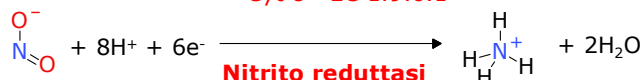
NADH - EC 1.7.1.1

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

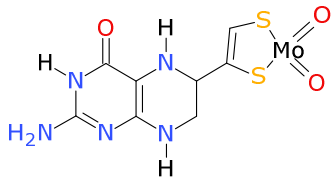
Metabolismo dell'azoto

- 8 -

8

Nitrato reduttasi

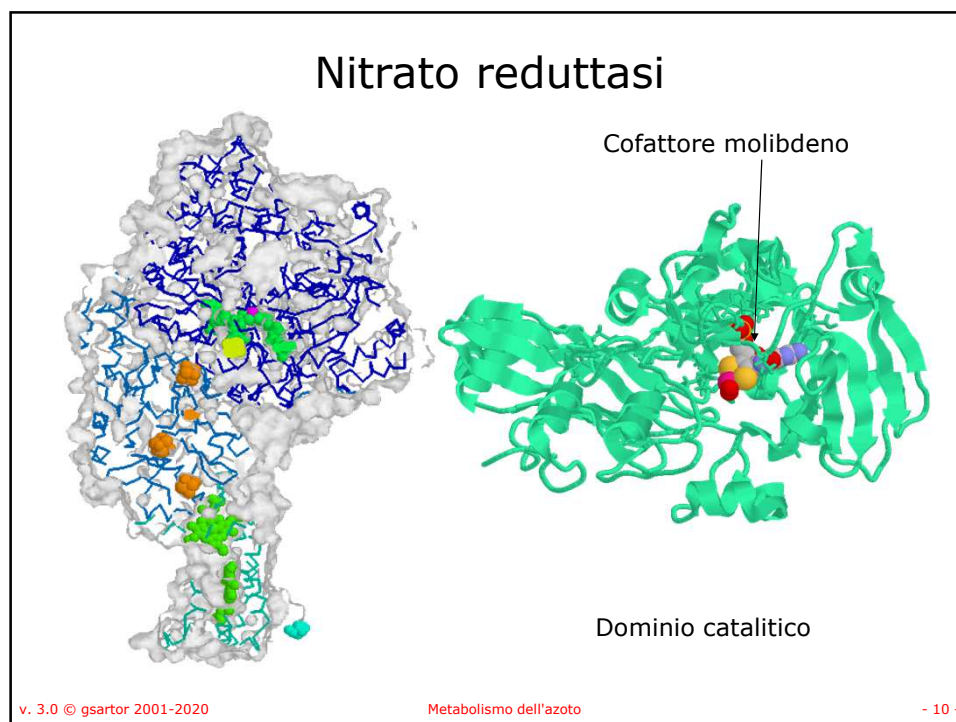
- La nitrato reduttasi citosolica trasferisce due elettroni dal NADH al nitrato.
- Contiene come cofattori:
 - FAD
 - Cofattore molibdeno →
 - Citocromo b₅₇₇



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

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

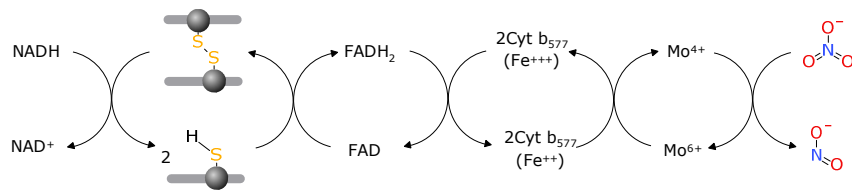
9



10

Nitrato reduttasi

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



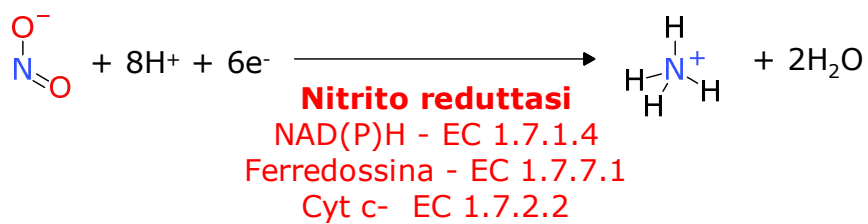
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 11 -

11

Nitrito reduttasi



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

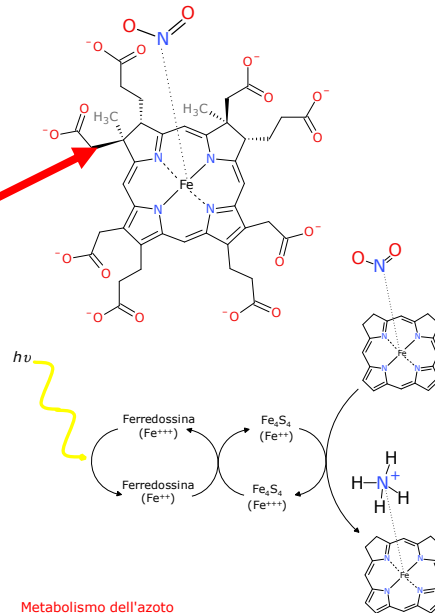
Metabolismo dell'azoto

- 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 simbionti 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

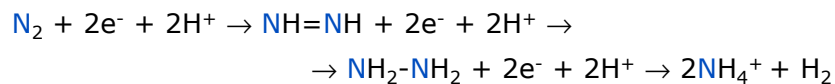
- 15 -

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

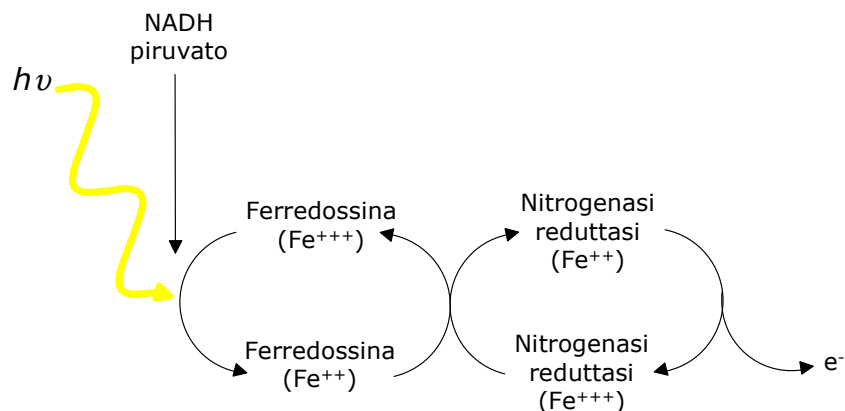
Metabolismo dell'azoto

- 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 .

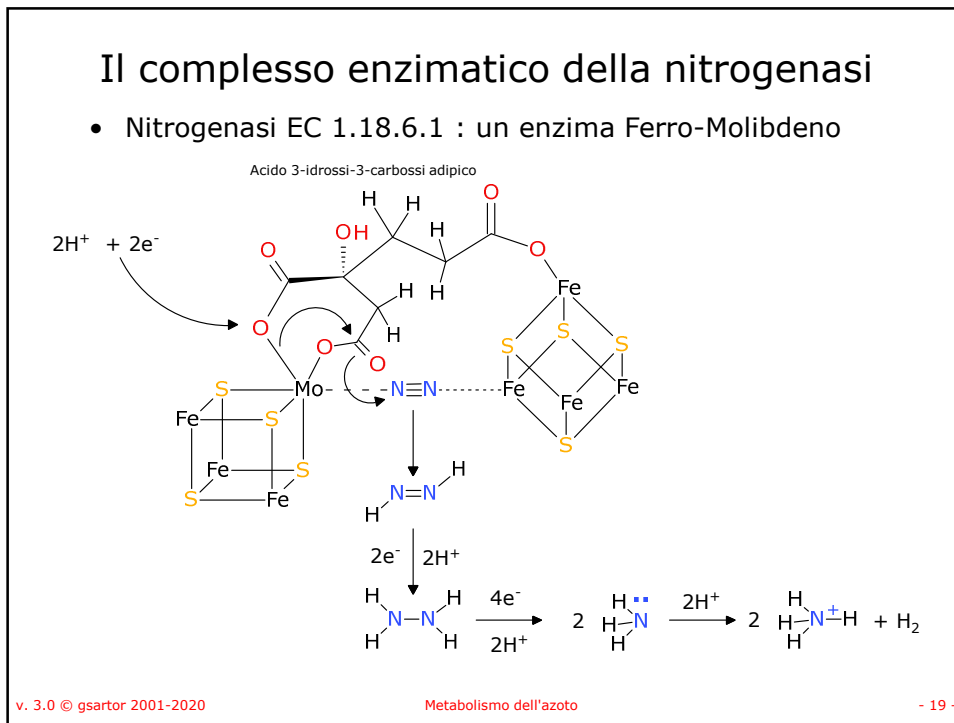


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

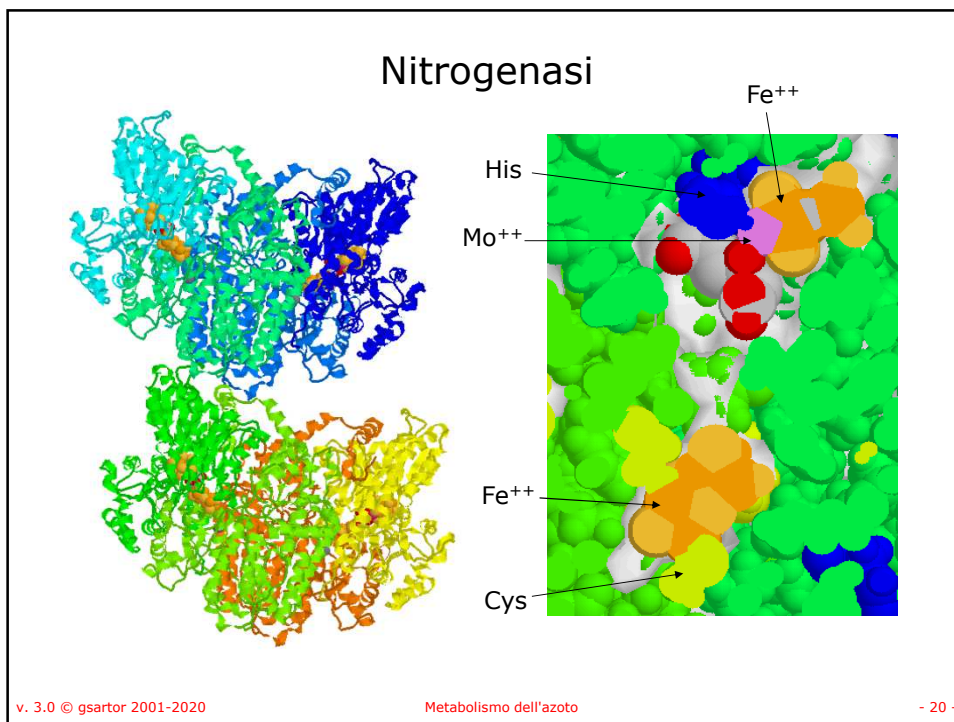
Metabolismo dell'azoto

- 18 -

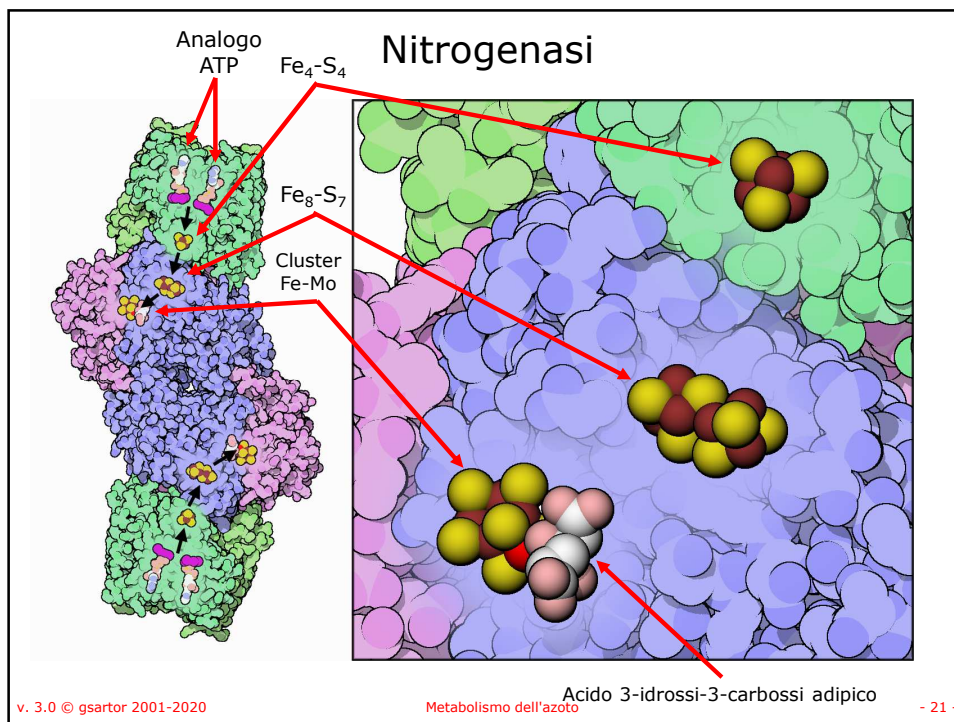
18



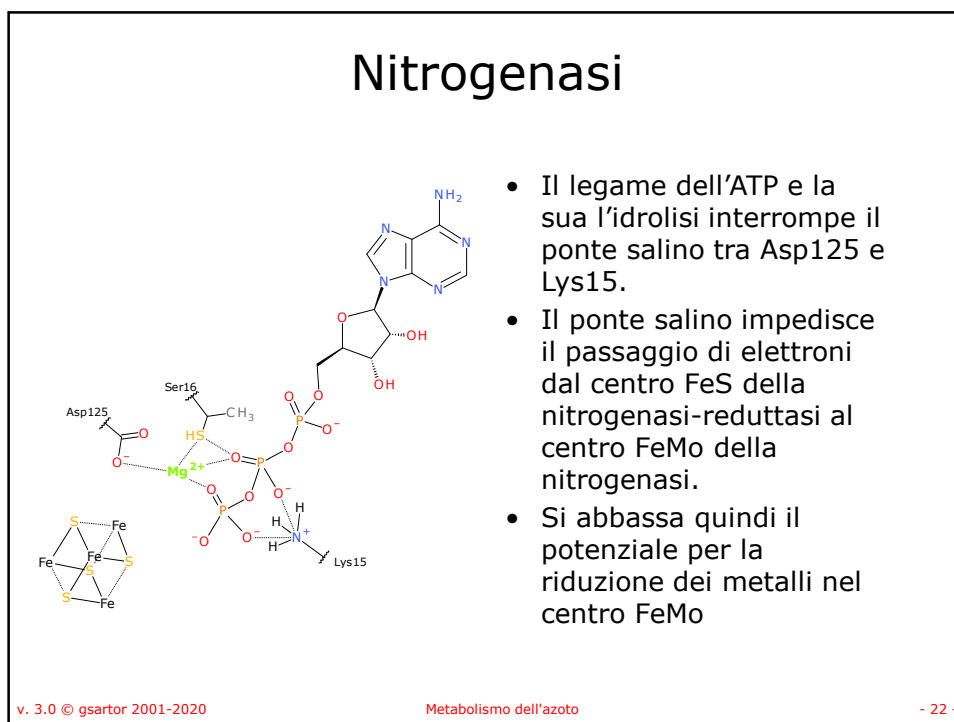
19



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:

$$\text{N}\equiv\text{N} + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \xrightarrow{\text{Nitrogenasi}} \text{H}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{N}}}-\text{H} + \text{H}_2$$

$$16 \text{ ATP} \rightarrow 16 \text{ Pi} + 16 \text{ ADP}$$

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 25 -

25

Nitrogenasi reductasi

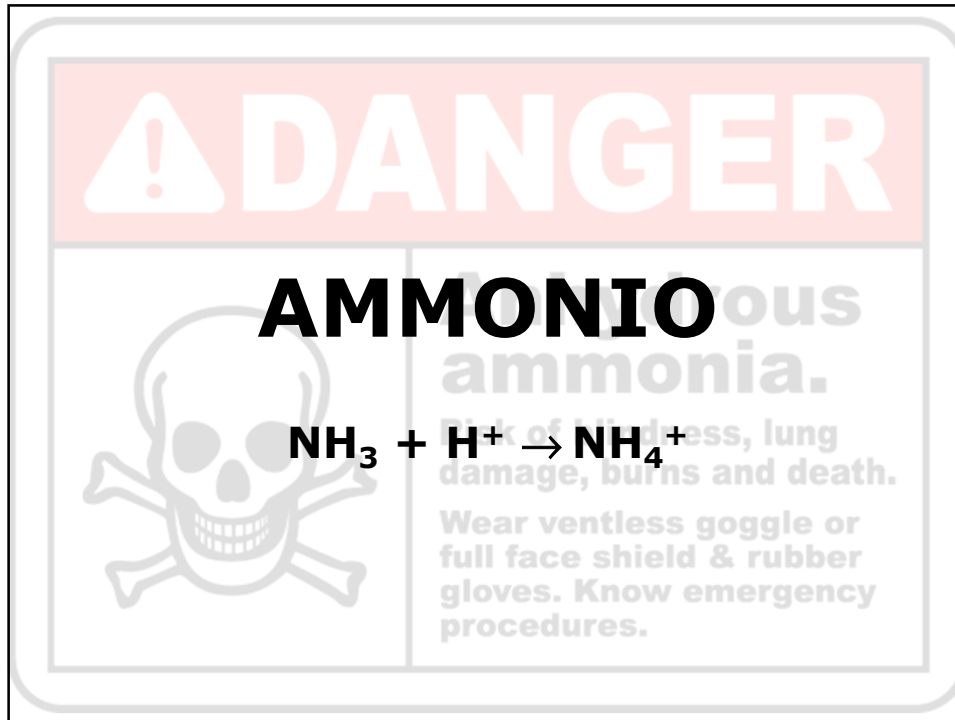
- Il sistema della nitrogenasi è regolato anche a livello della reductasi attraverso la formazione di un derivato ADP-ribosilato:

$$\text{NAD}^+ + \text{Nitrogenasi reductasi ATTIVA} \xrightarrow{\text{NAD}^+\text{-dinitrogen-reductasi ADP-D-ribosil transferasi EC 2.4.2.37}} \text{Nicotinamide} + \text{Nitrogenasi reductasi INATTIVA}$$

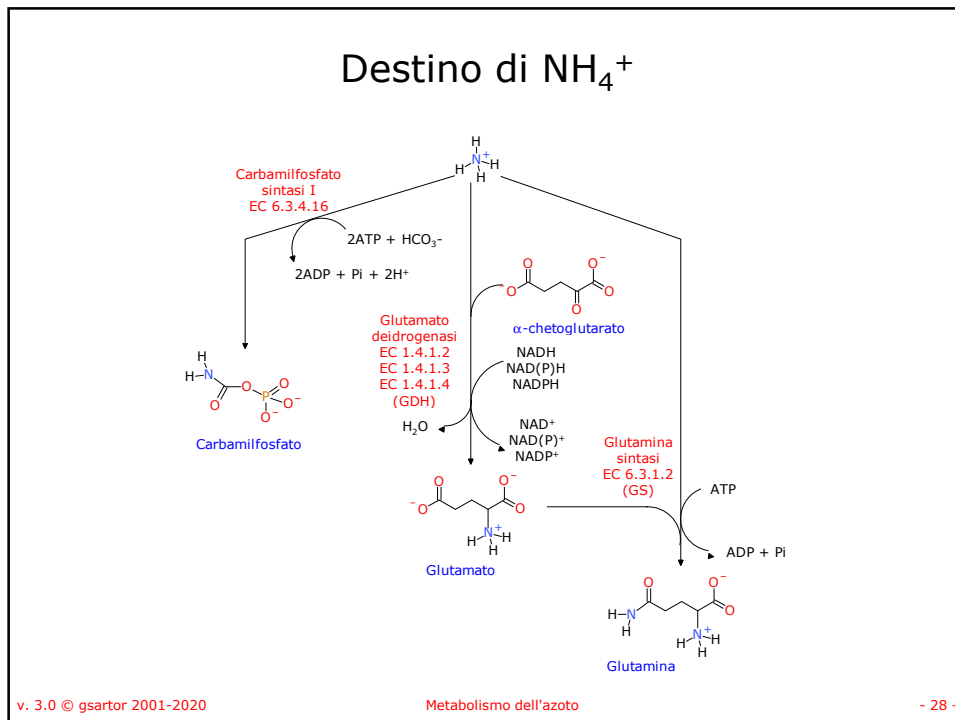
$$\text{ADP-ribosil-[dinitrogen reductasi] idrolasi EC 3.2.2.24} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP-ribosio} + \text{Nitrogenasi reductasi ATTIVA}$$

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 26 -

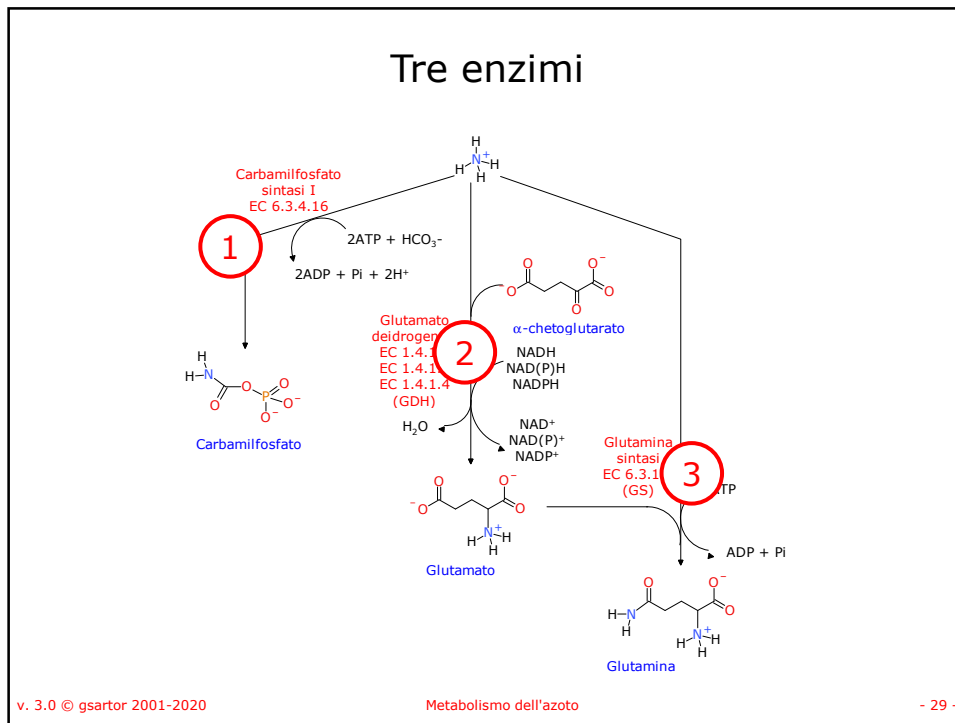
26



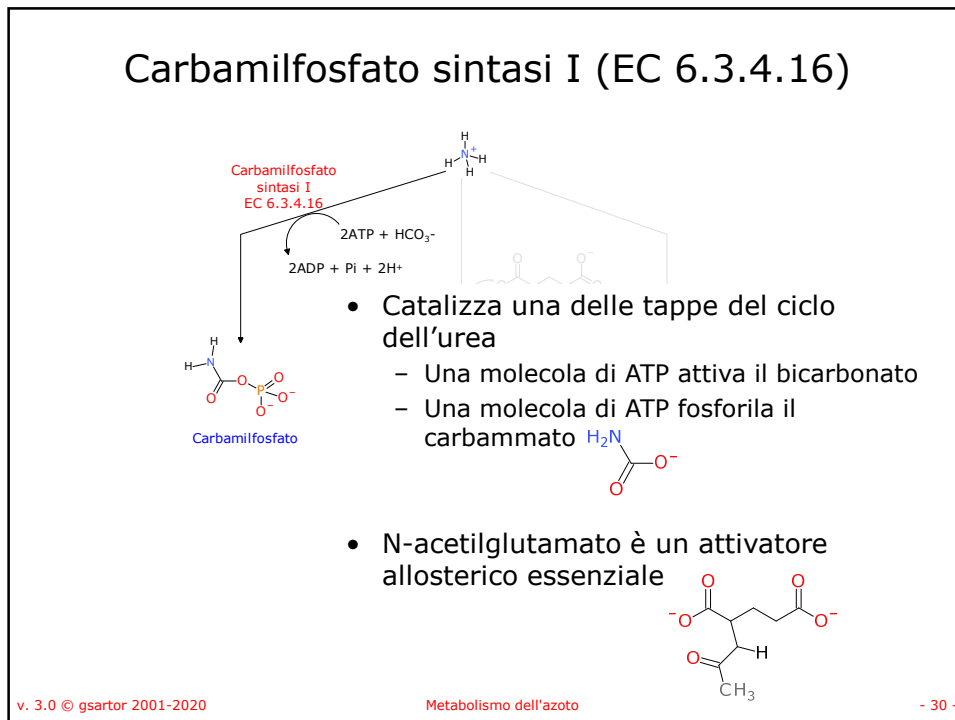
27



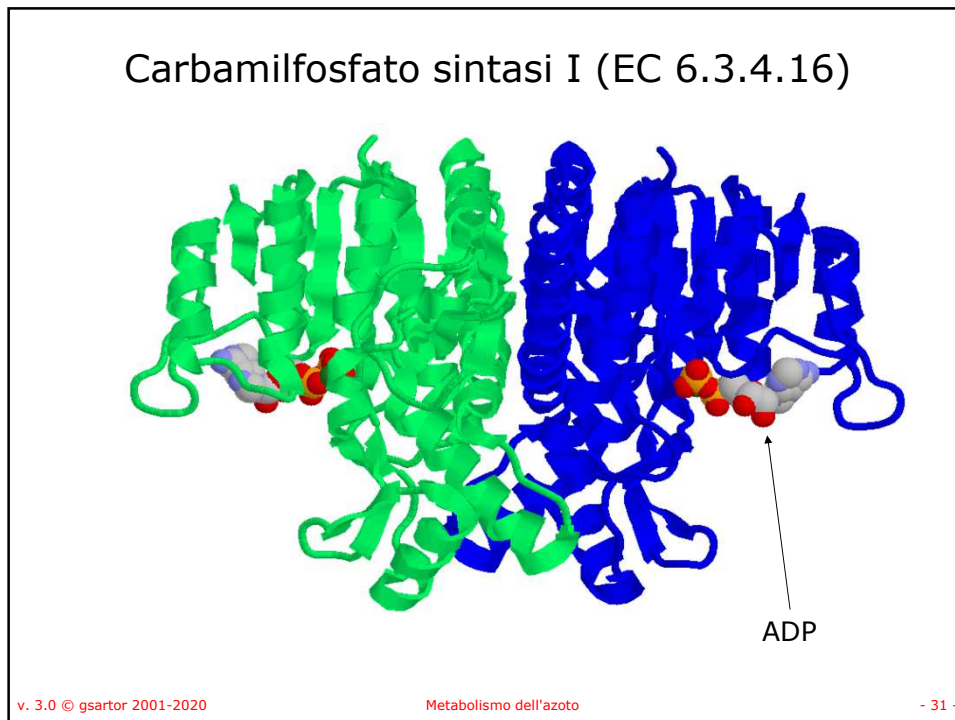
28



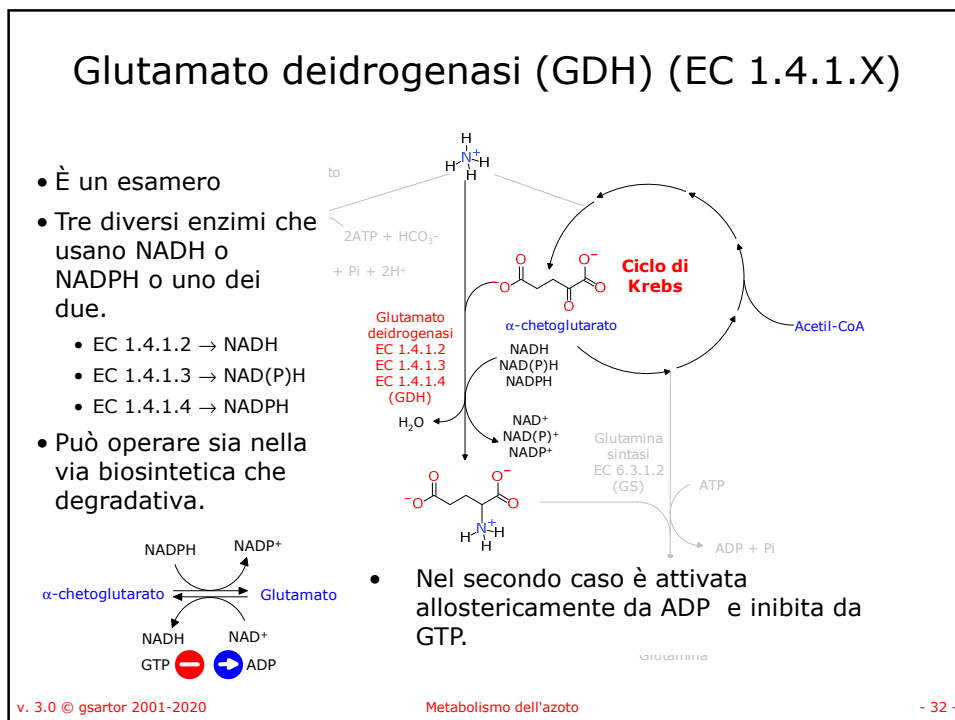
29



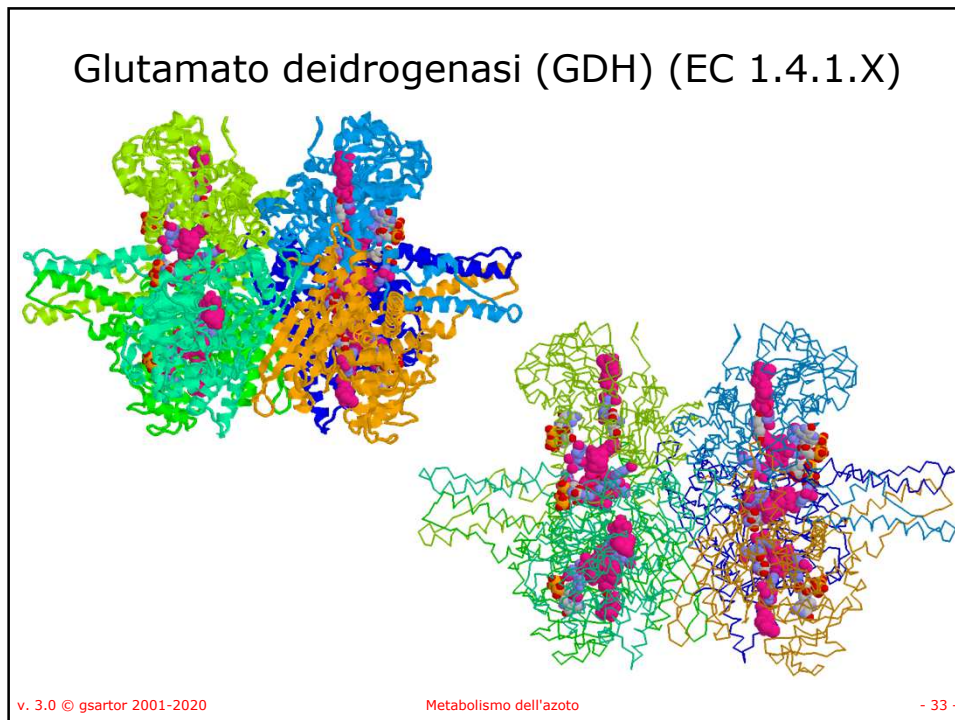
30



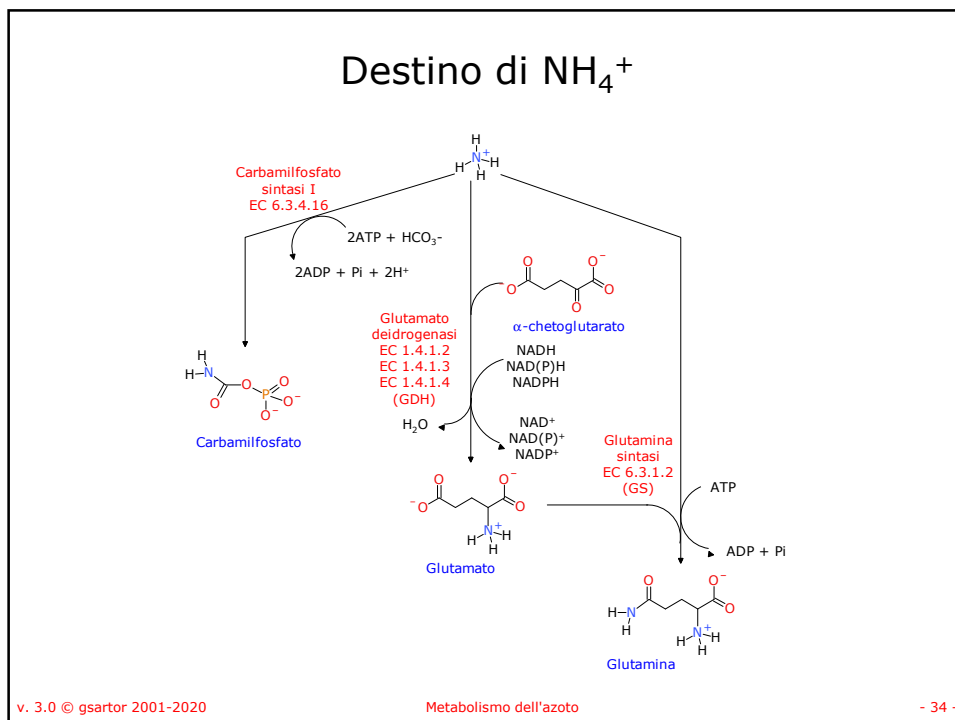
31



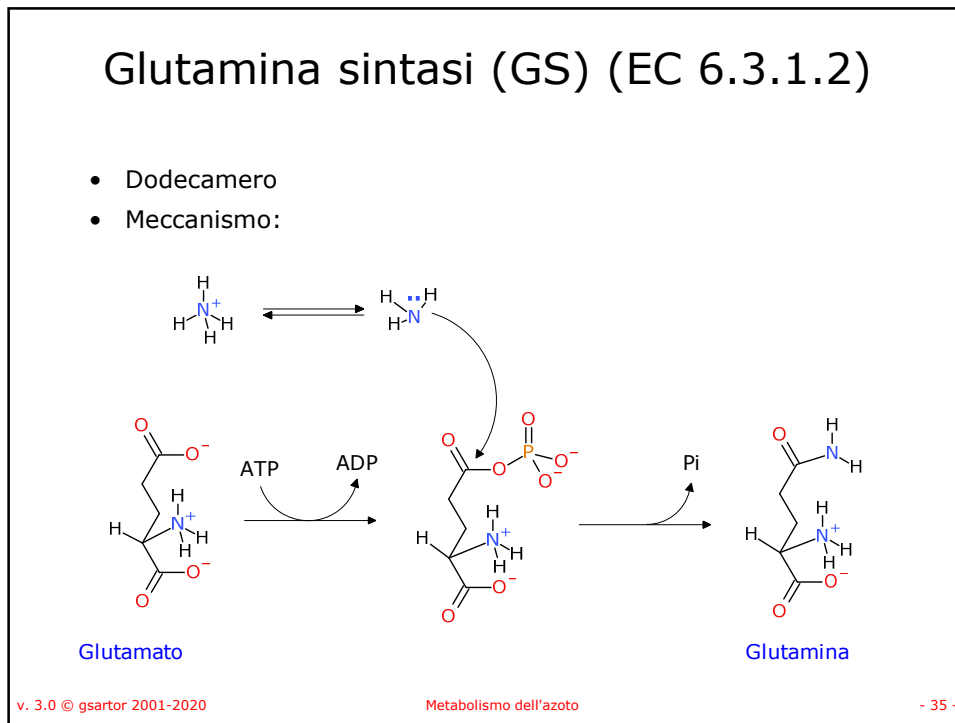
32



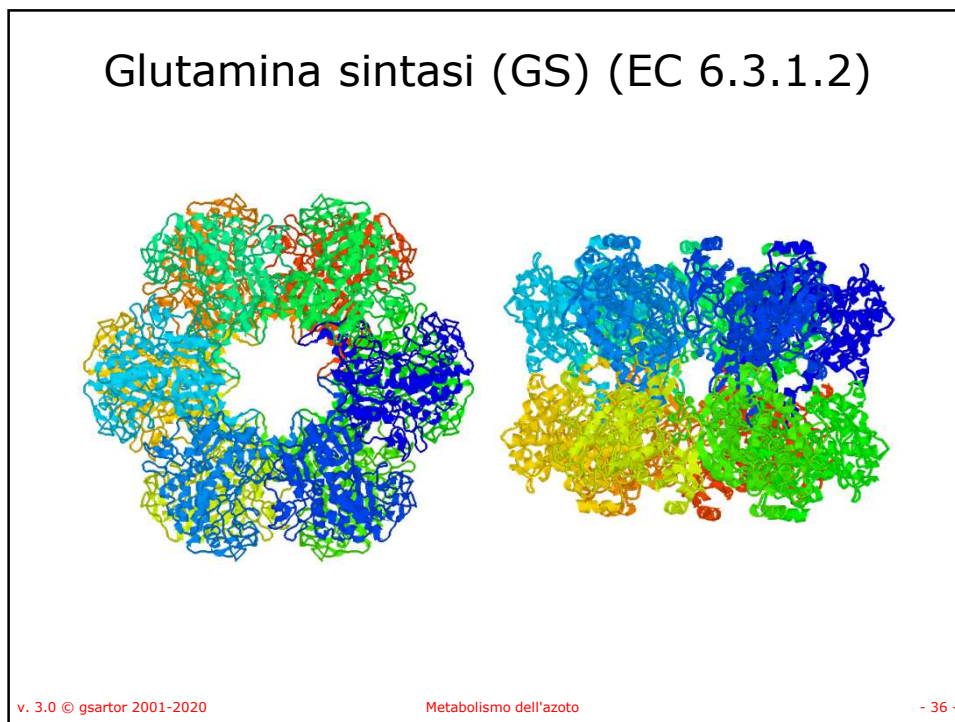
33



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 -

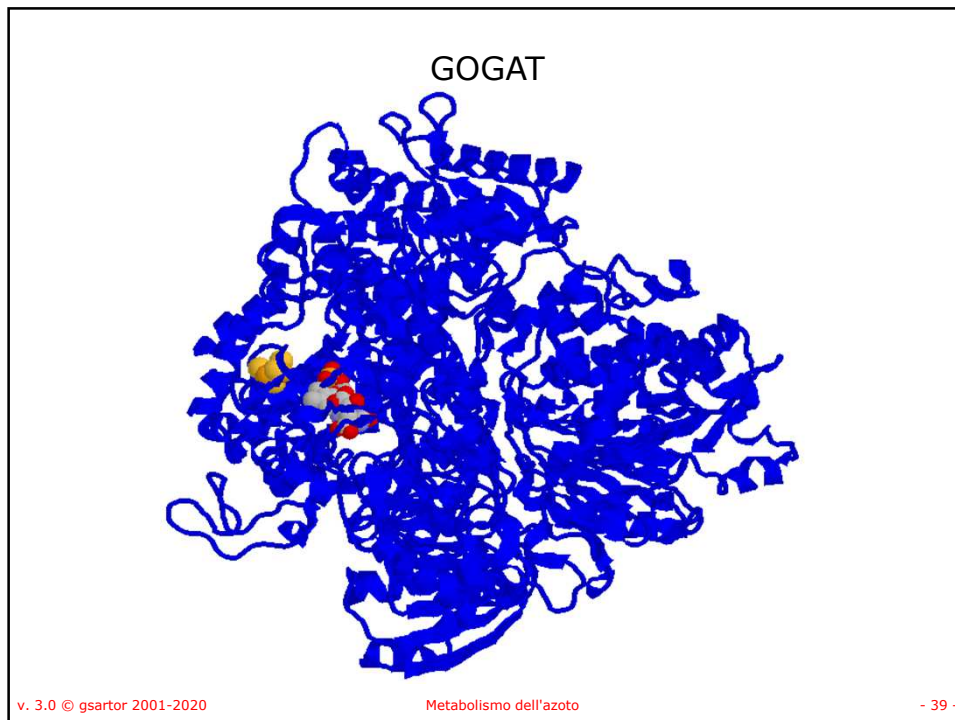
37

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

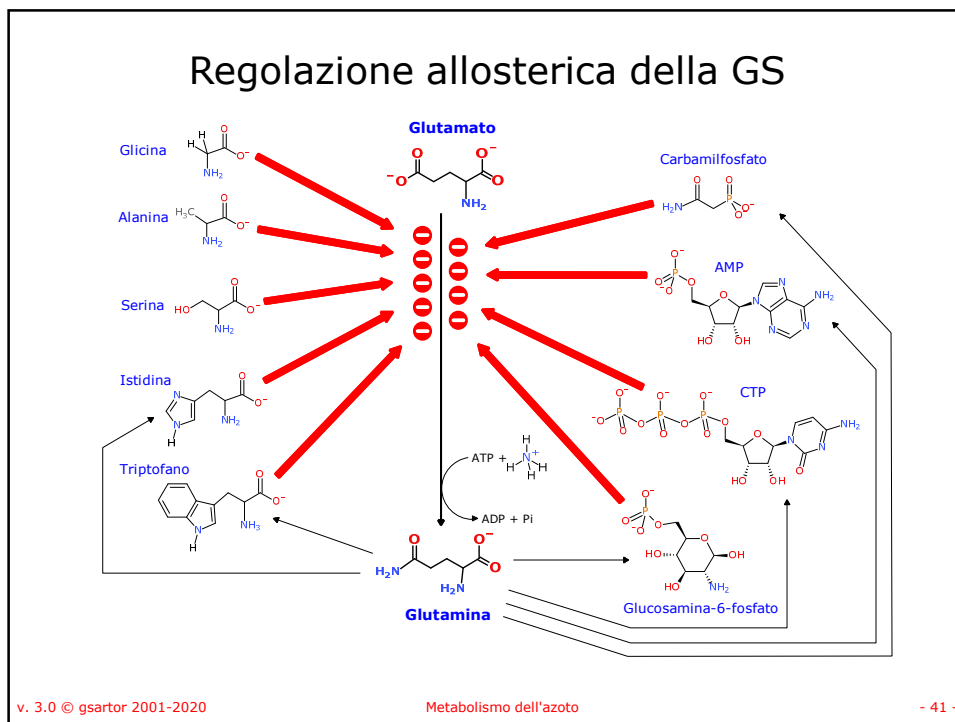
- La glutamina è un componente centrale nella biosintesi degli aminoacidi e dei nucleotidi,
- La sua sintesi è estremamente regolata:
 - In modo allosterico, da prodotti che provengono dalla glutamina,
 - In modo covalente,
 - Attraverso la regolazione genica.
- L'inibizione allosterica, da prodotti,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

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

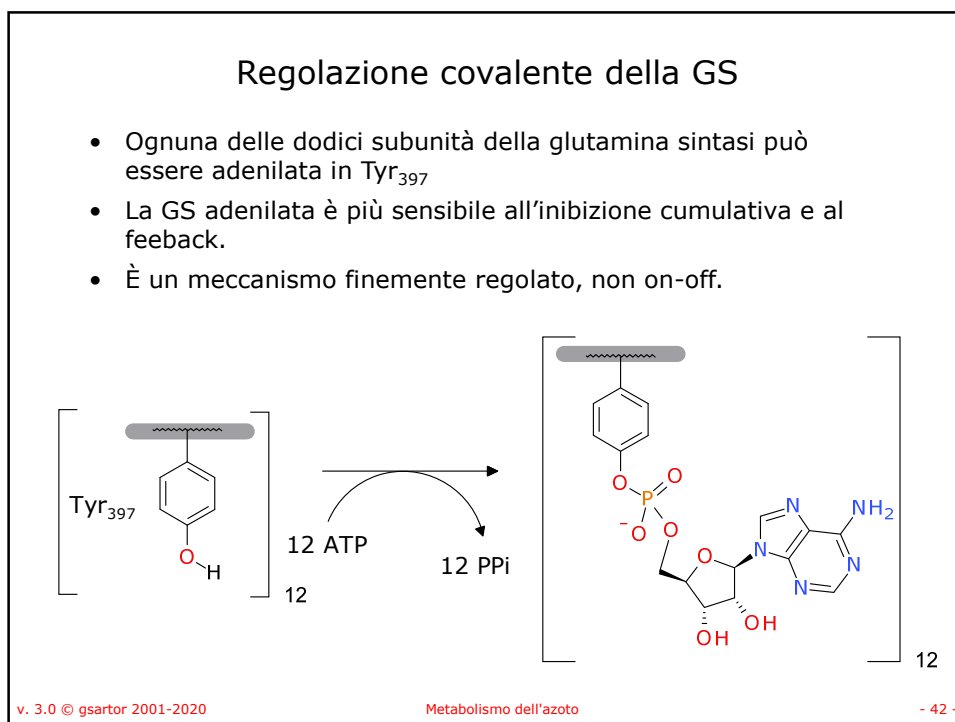
Metabolismo dell'azoto

- 40 -

40



41

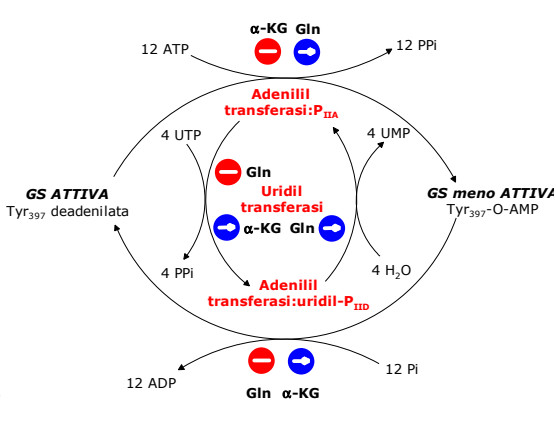


42

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.

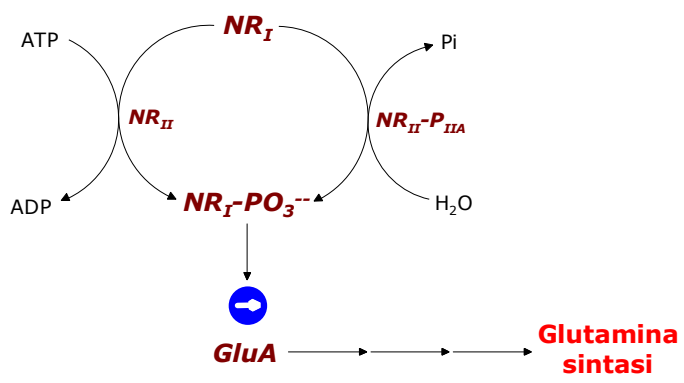


v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 43 -

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

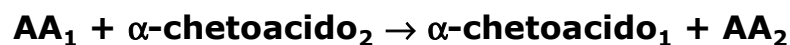
Metabolismo dell'azoto

- 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

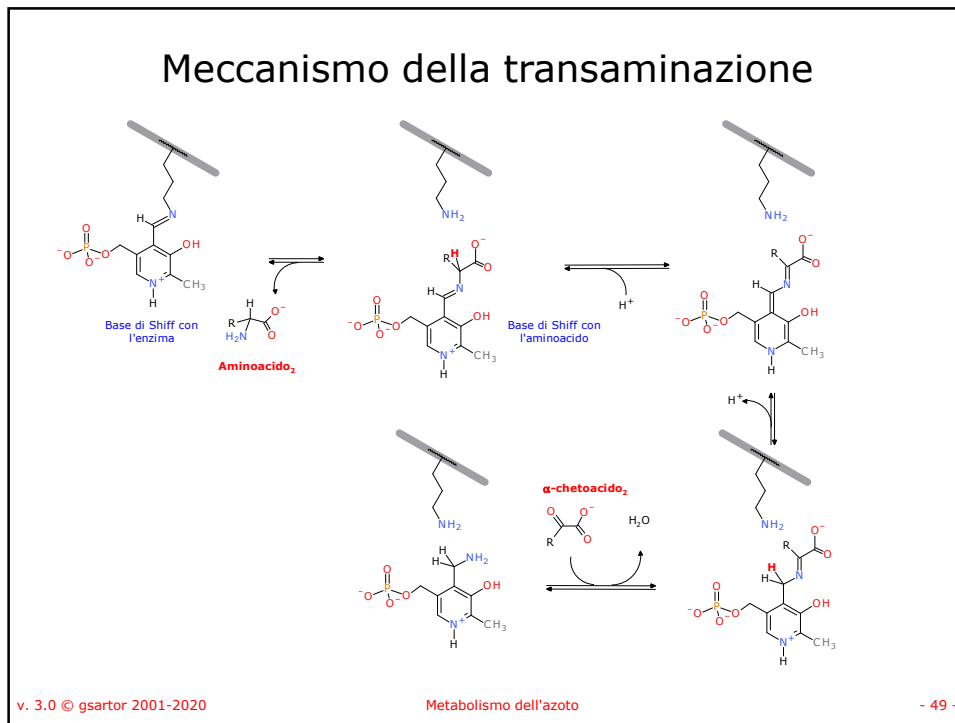
v. 3.0 © gsartor 2001-2020
Metabolismo dell'azoto
- 47 -

47

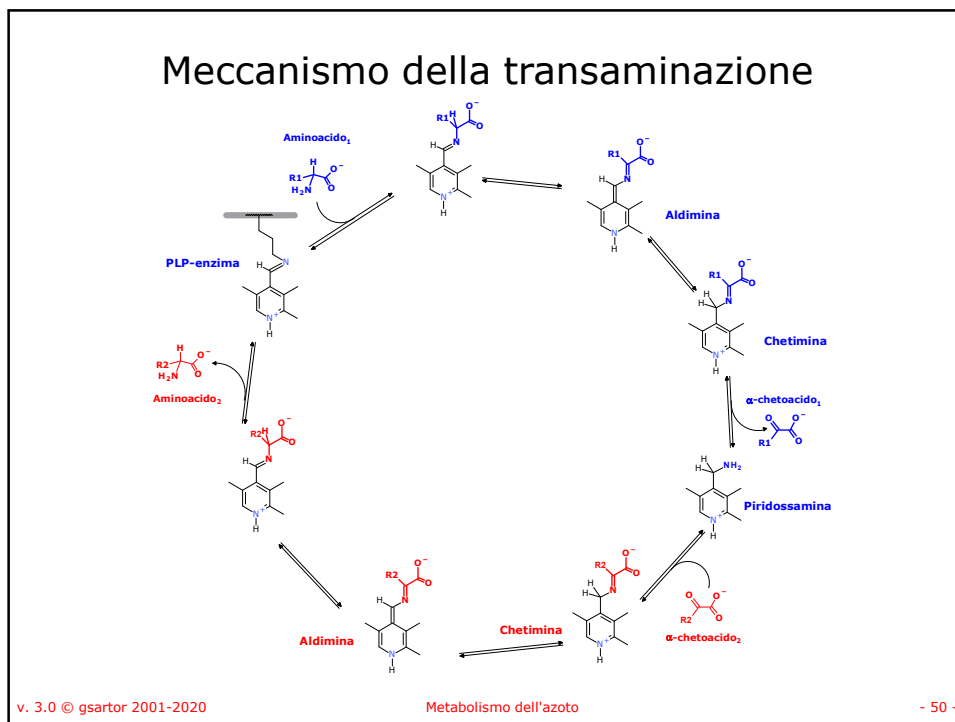
Meccanismo della transaminazione

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

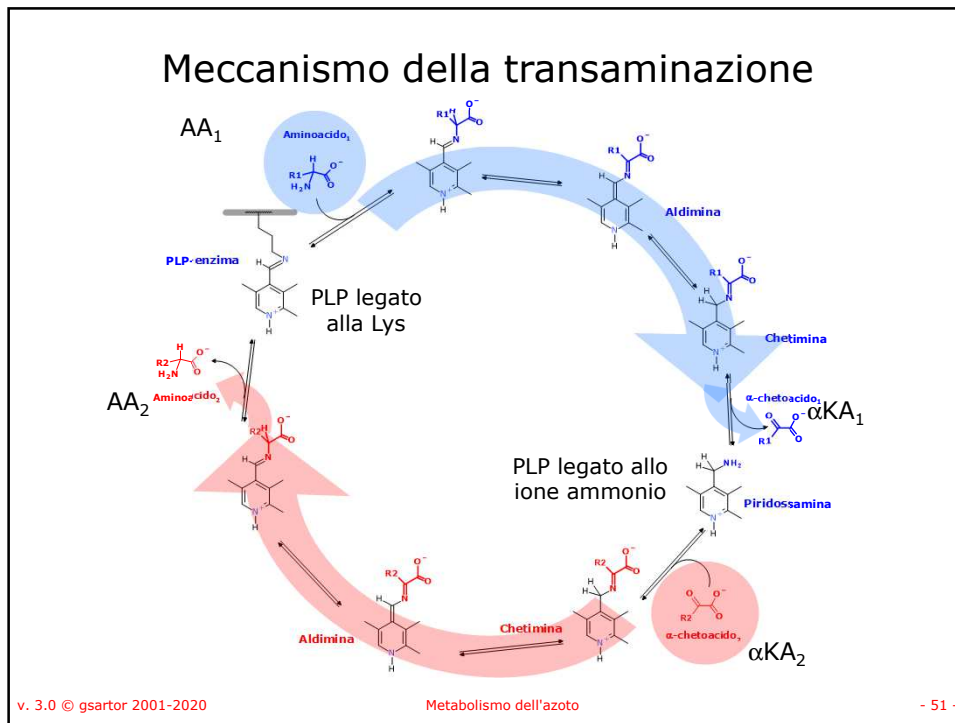
48



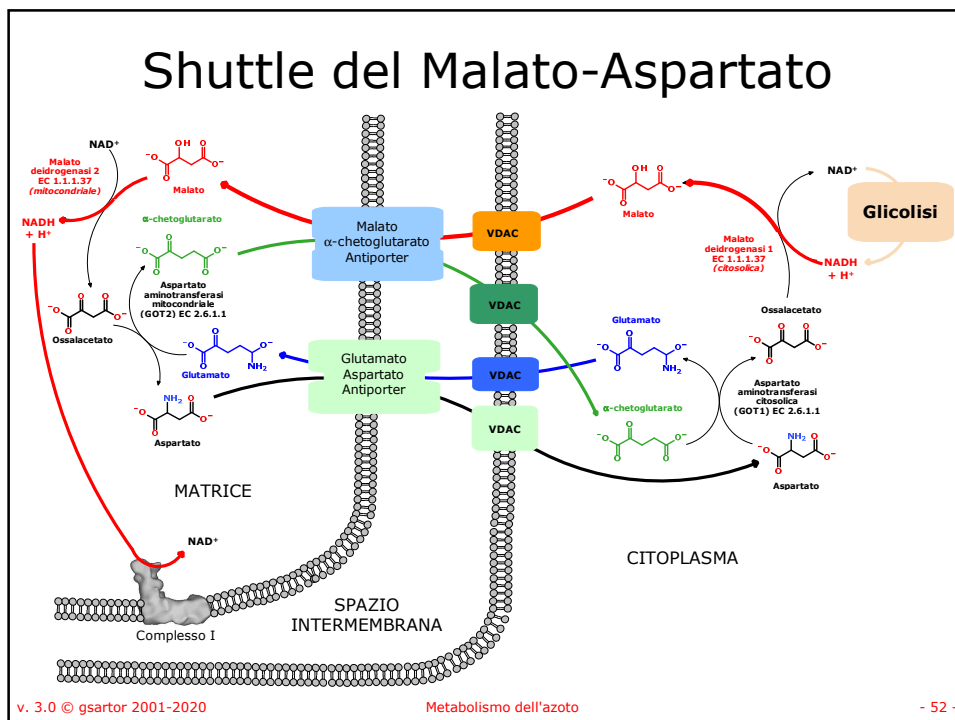
49



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

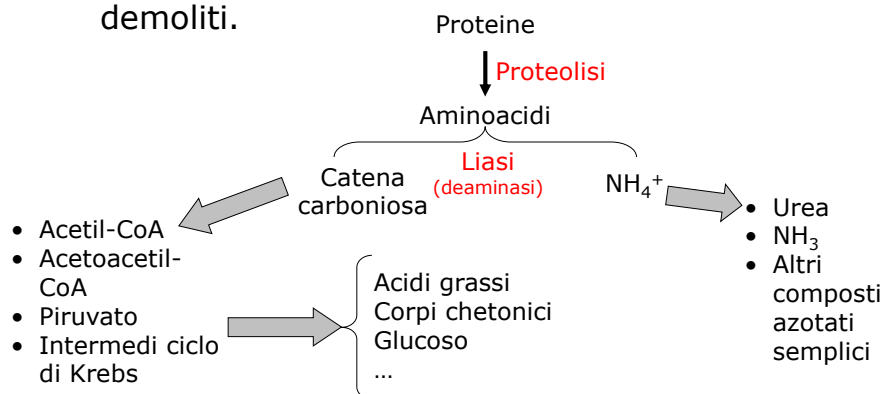
Metabolismo dell'azoto

- 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 -

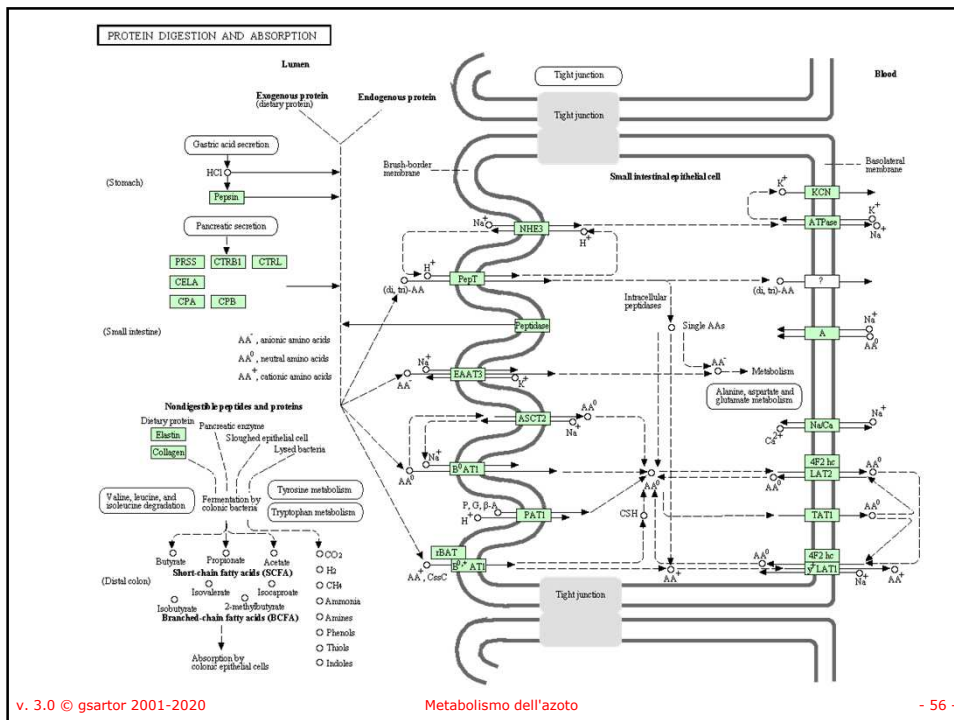
54

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

↓

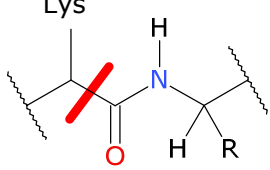
Chimotripsina + 2 peptidi

Tripsinogeno

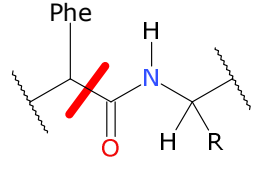
↓

Tripsina + peptide 6 AA N-terminale

Arg
Lys

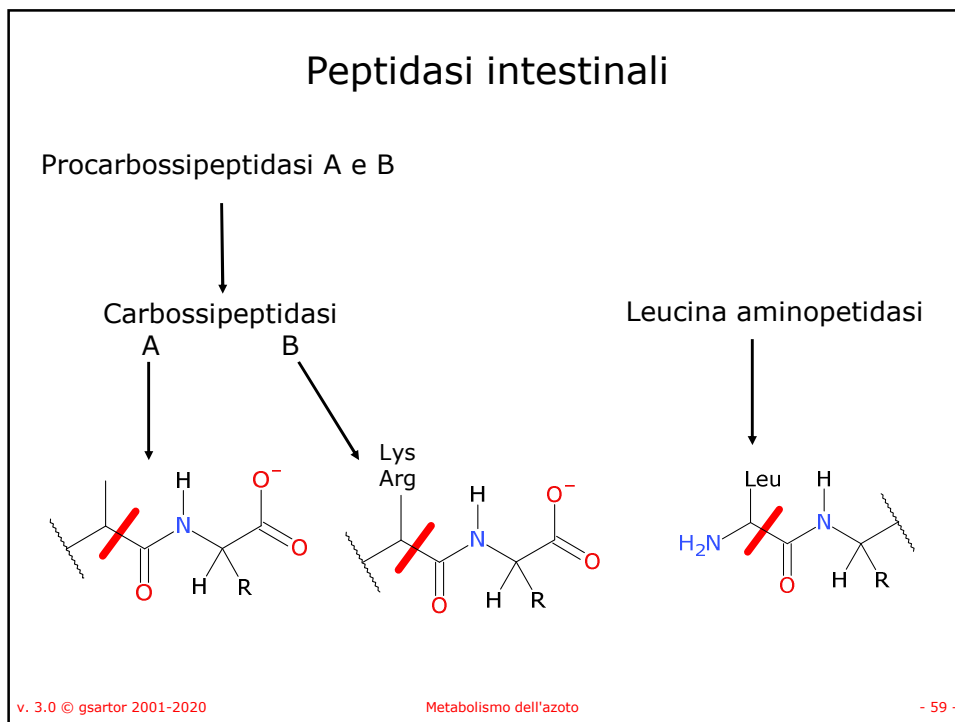


Trp
Tyr
Phe

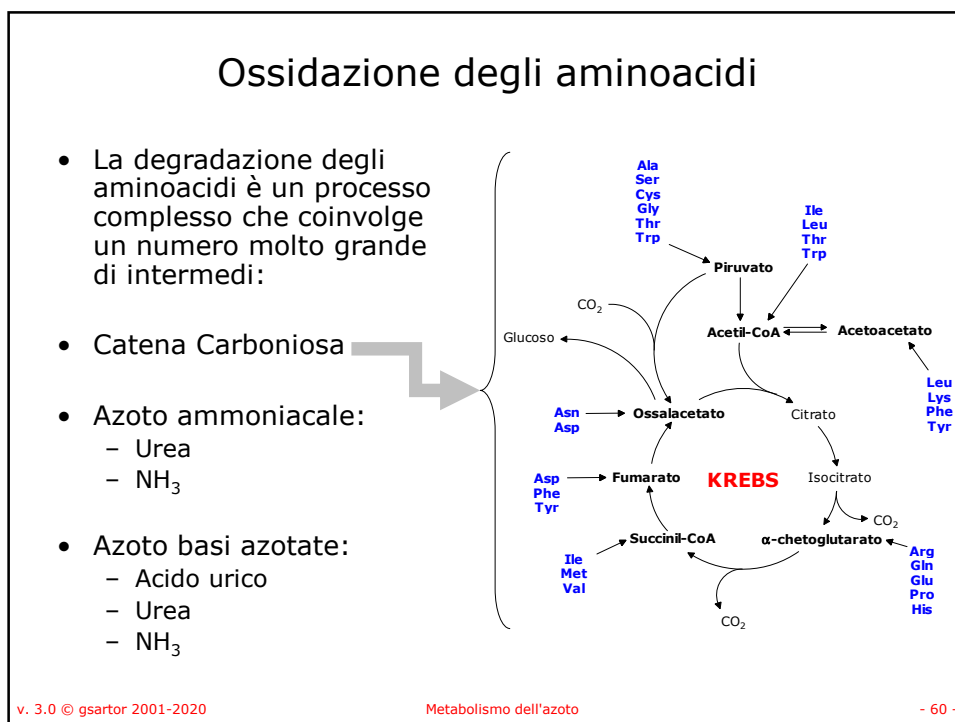


v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 58 -

58



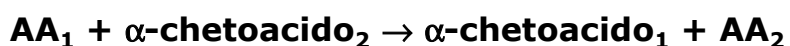
59



60

Azoto

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



- Oppure attraverso le deaminasi:



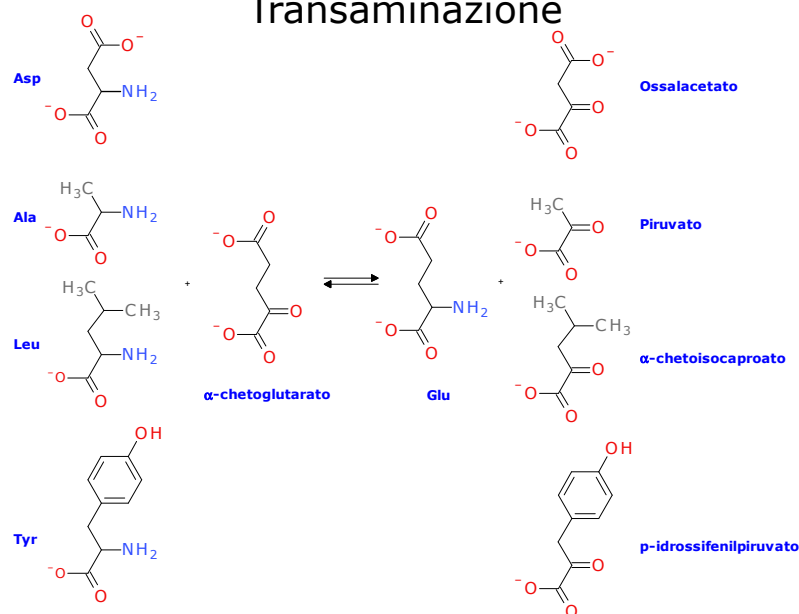
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 61 -

61

Transaminazione

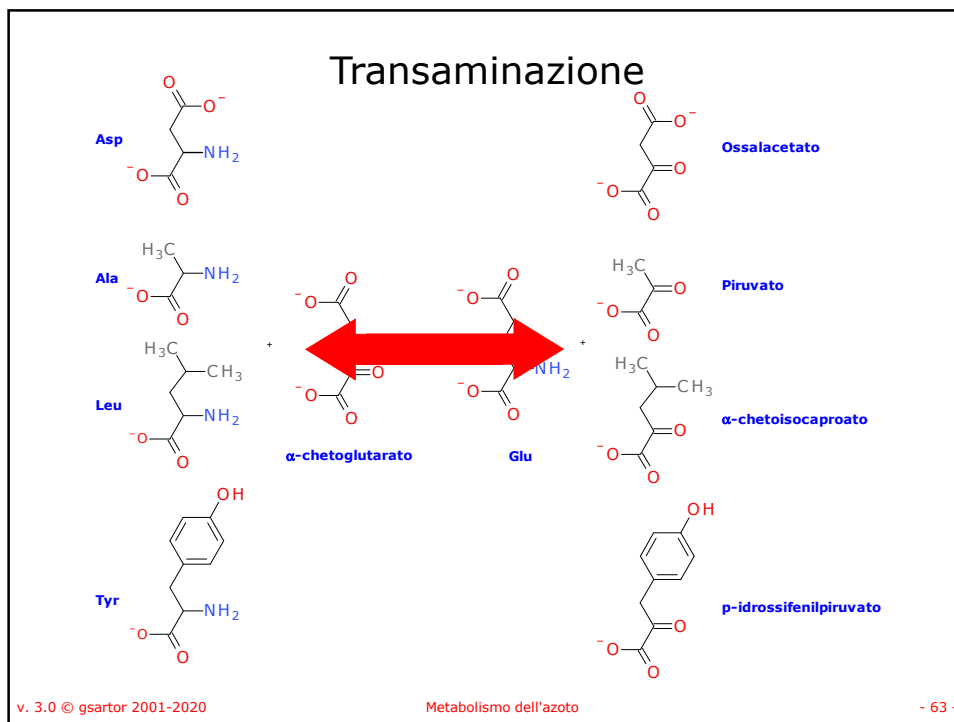


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

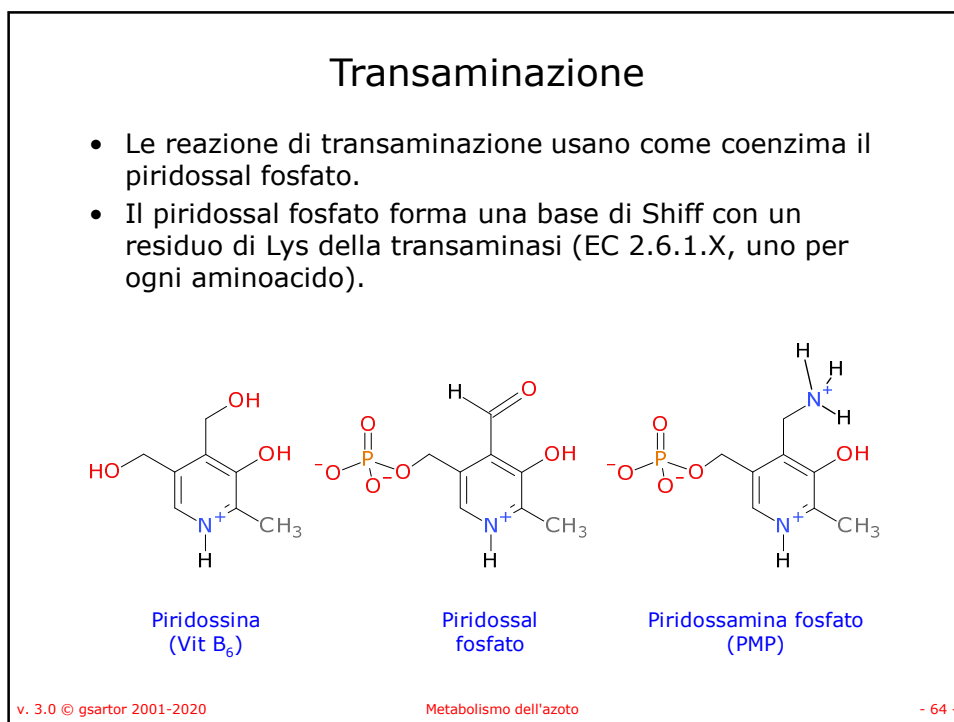
Metabolismo dell'azoto

- 62 -

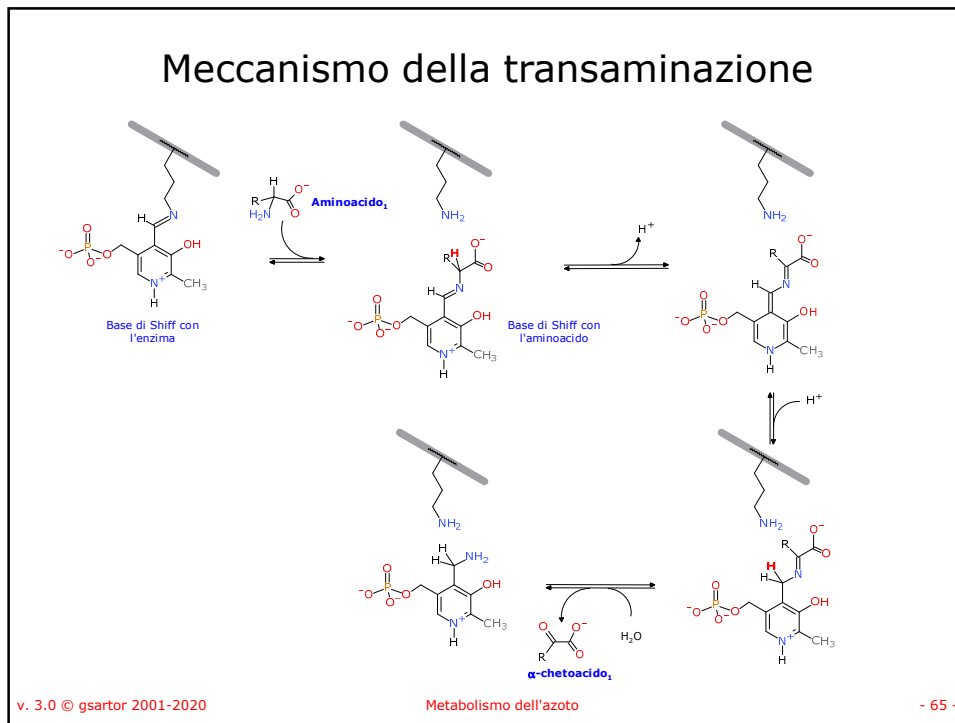
62



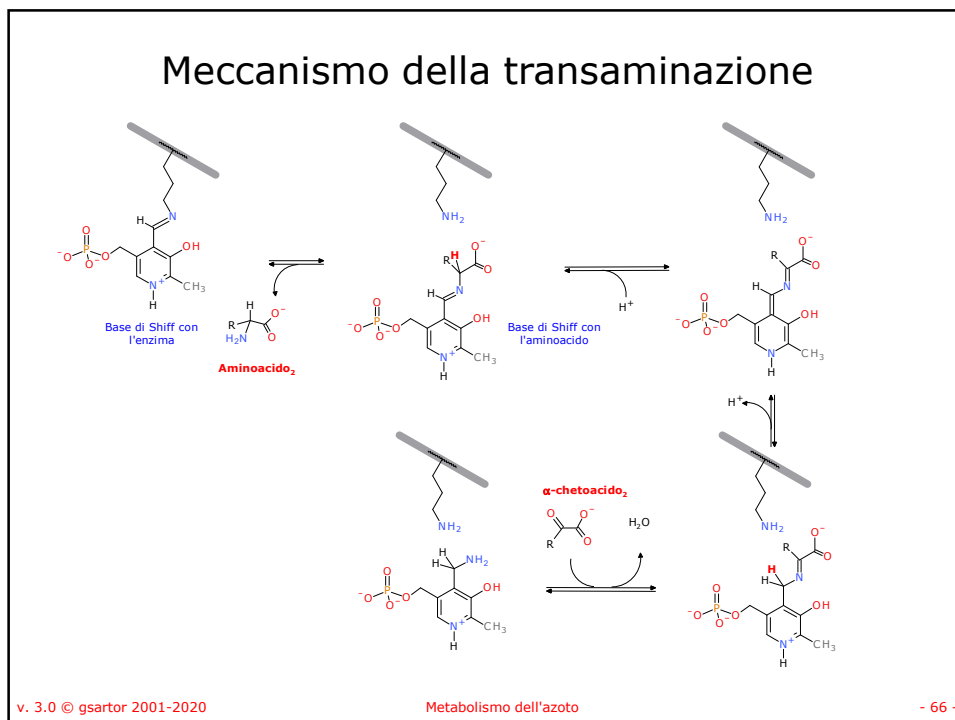
63



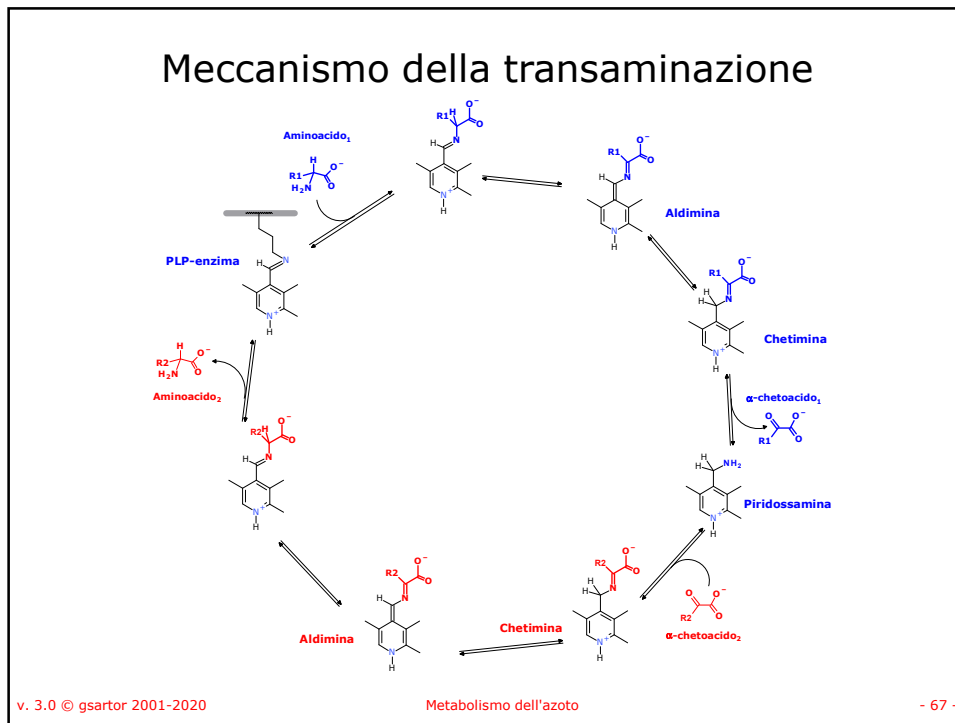
64



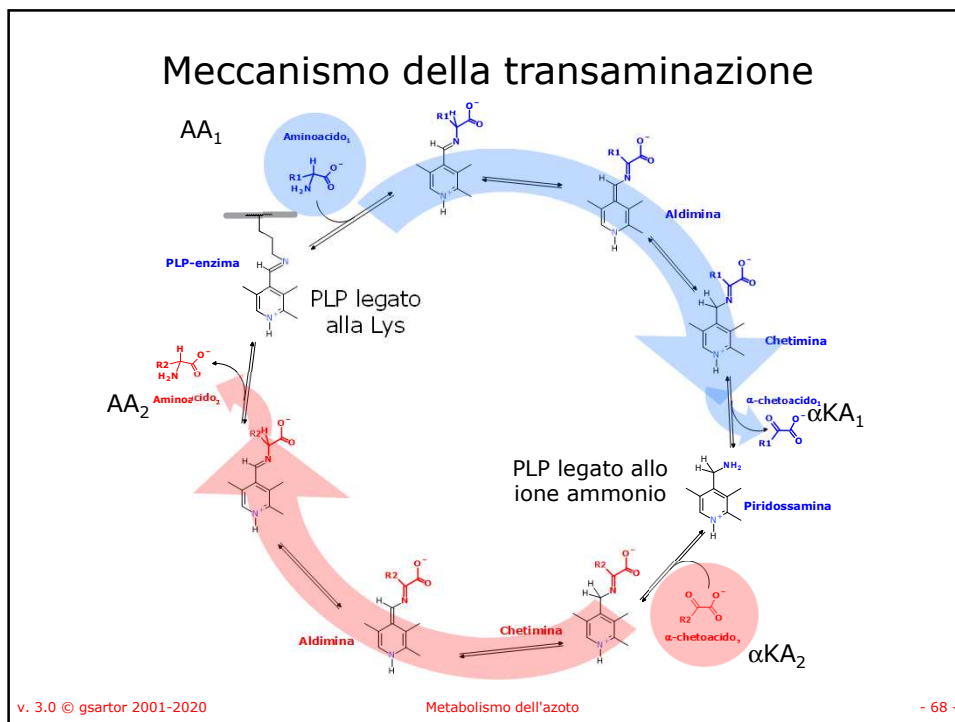
65



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 -

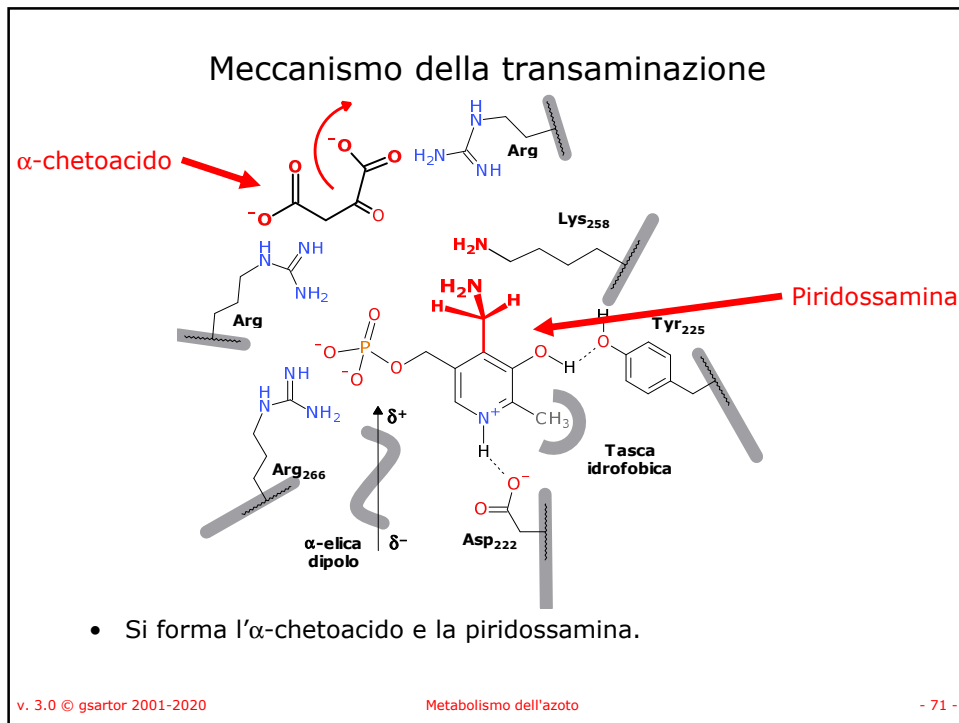
69

Meccanismo della transaminazione

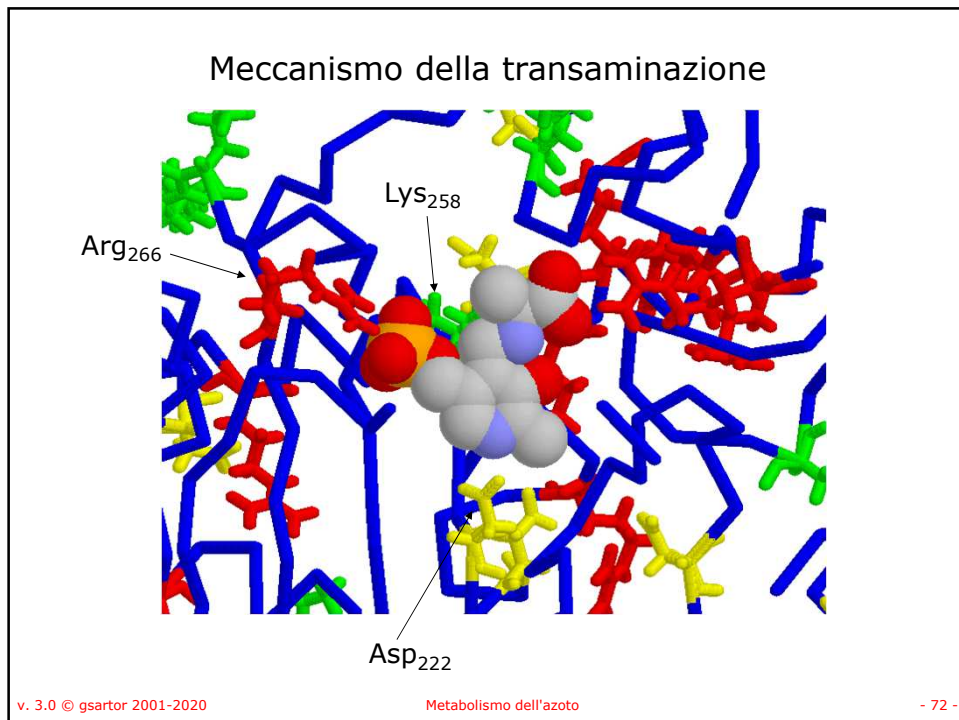
- Si lega l'AA, la molecola è tenuta in sede da due Arg che danno la specificità

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

70



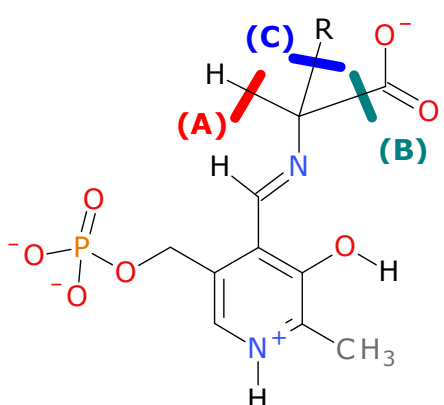
71



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

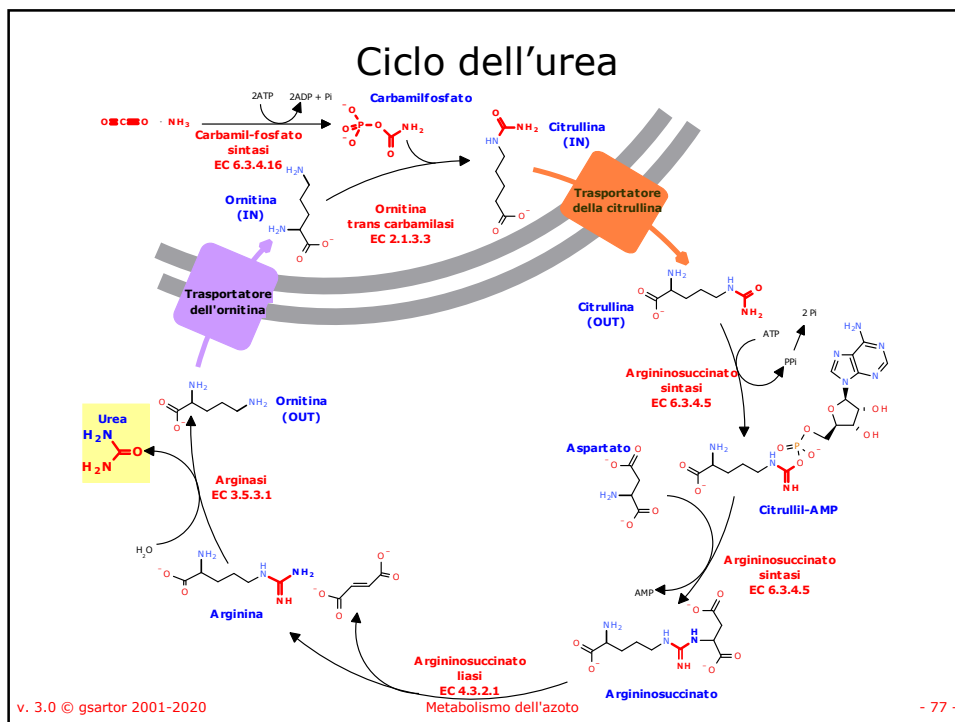
v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 75 -

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

[O-]C(=O)O $\xrightarrow[\text{ADP}]{\text{ATP}}$ [O-]C(=O)OP(=O)([O-])[O-] $\xrightarrow[\text{Pi}]{\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}}$ [O-]C(=O)N $\xrightarrow[\text{ADP}]{\text{ATP}}$ [O-]C(=O)NP(=O)([O-])[O-]

Bicarbonato **Carbonil-fosfato** **Carbammato** **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

[O-]C(=O)O + N $\xrightarrow[\text{2ADP + Pi}]{\text{2ATP}}$ [O-]C(=O)OP(=O)([O-])[O-] + N

[O-]C(=O)OP(=O)([O-])[O-] + N + NC(CCC(=O)[O-])N $\xrightarrow[\text{EC 2.1.3.3}]{\text{Ornithine trans carbamylasi}}$ NC(CCC(=O)[O-])N + [O-]C(=O)N

Ornitina (IN) **Carbamilfosfato** **Citrullina (IN)**

Carbamil-fosfato sintasi EC 6.3.4.16 **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 della 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 -

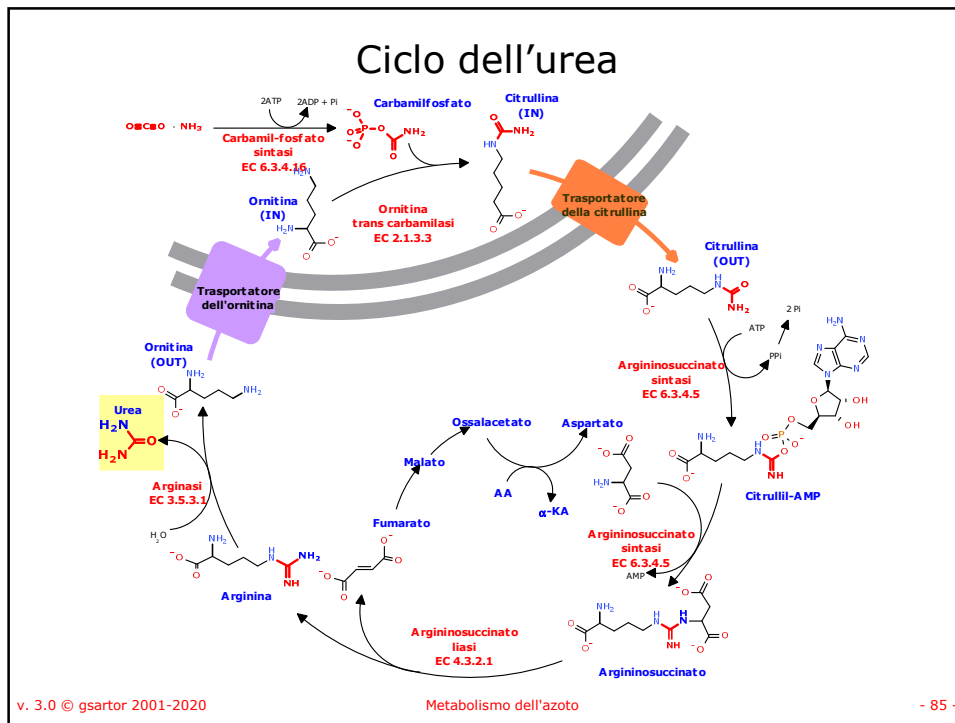
83

Ciclo dell'urea e NO

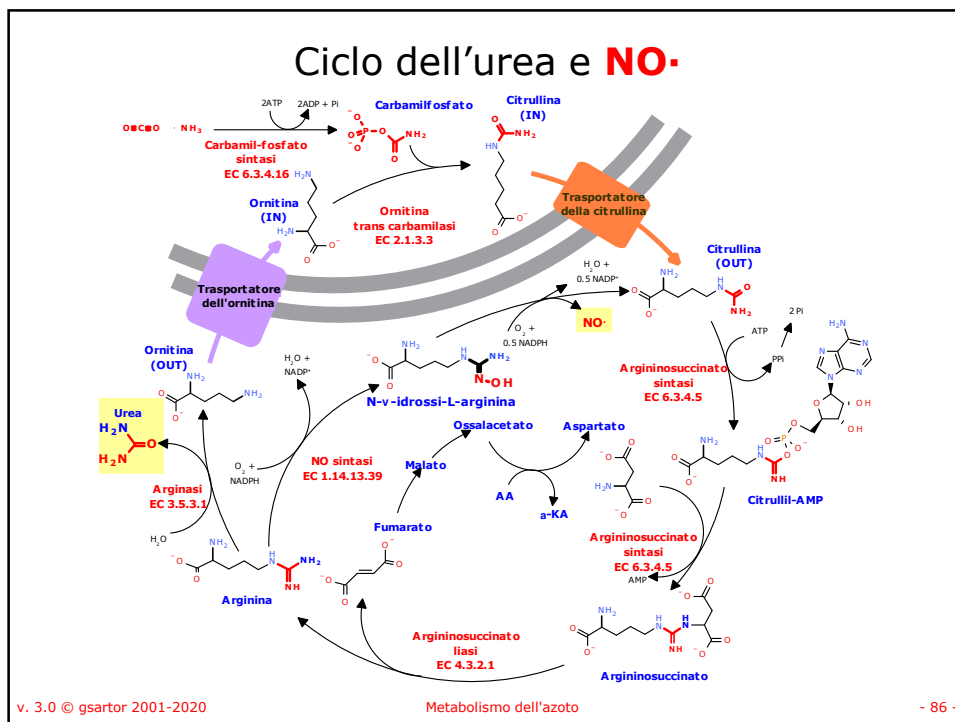
- L'arginina viene infine convertita in ornitina (OUT) e Urea da una arginasi.

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 - 84 -

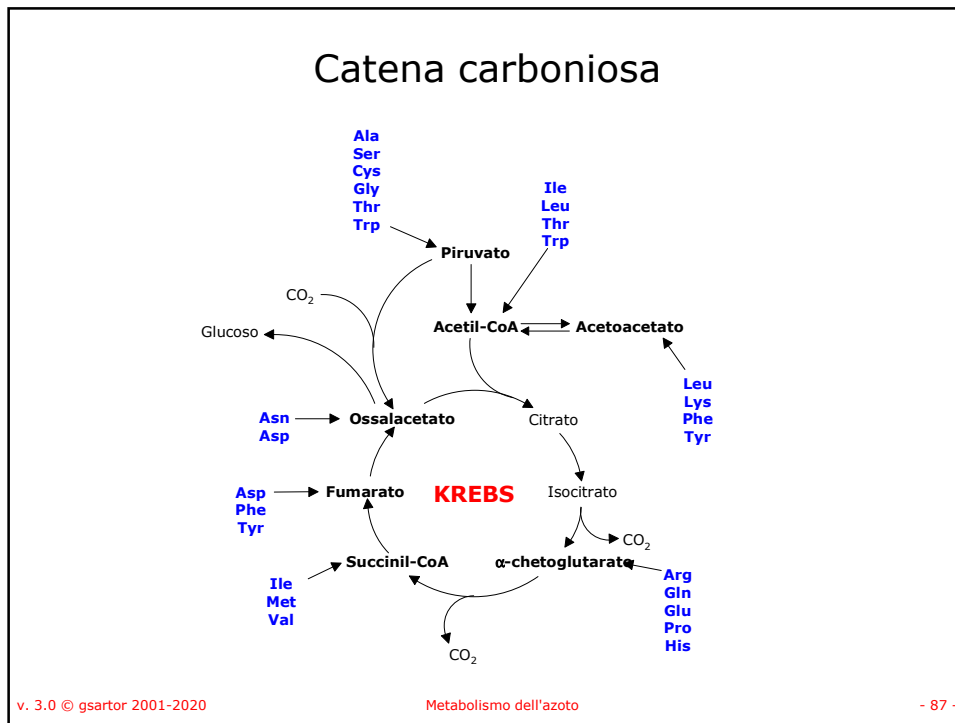
84



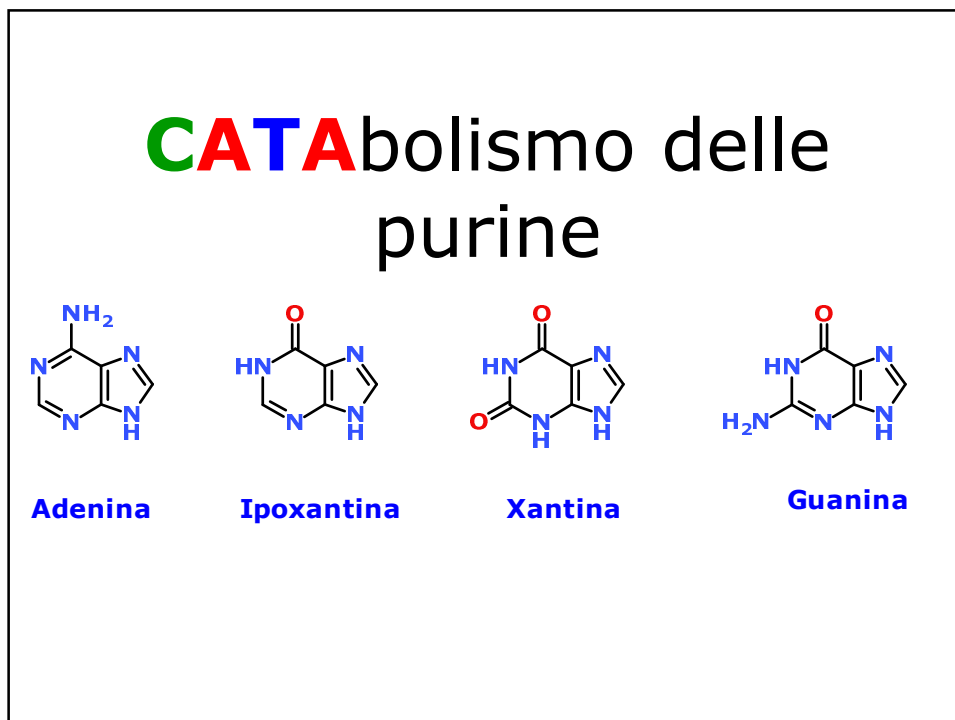
85



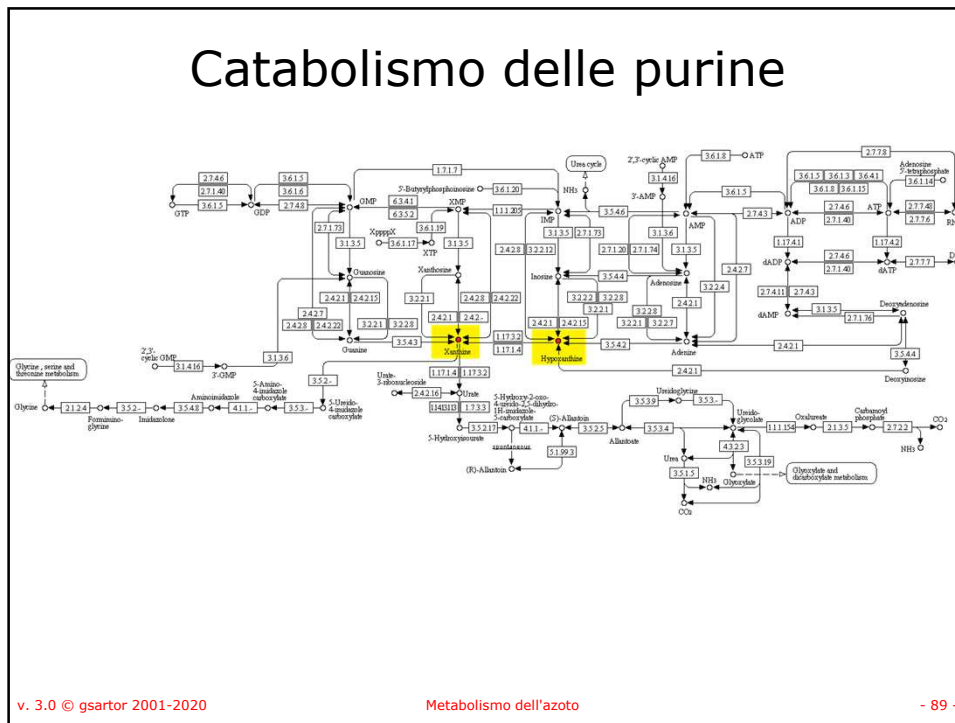
86



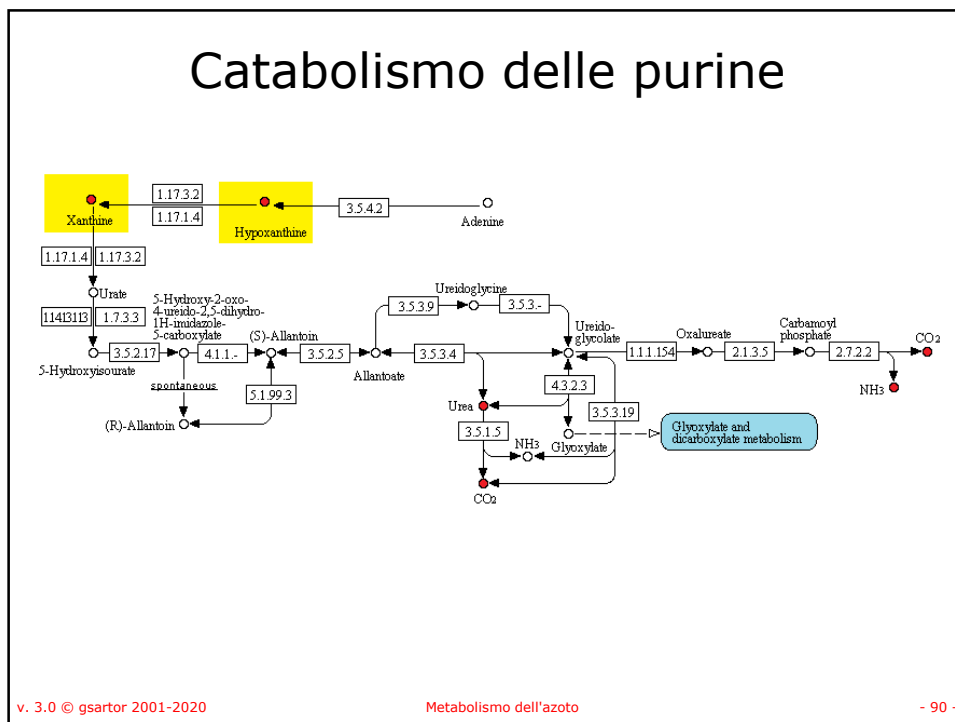
87



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.

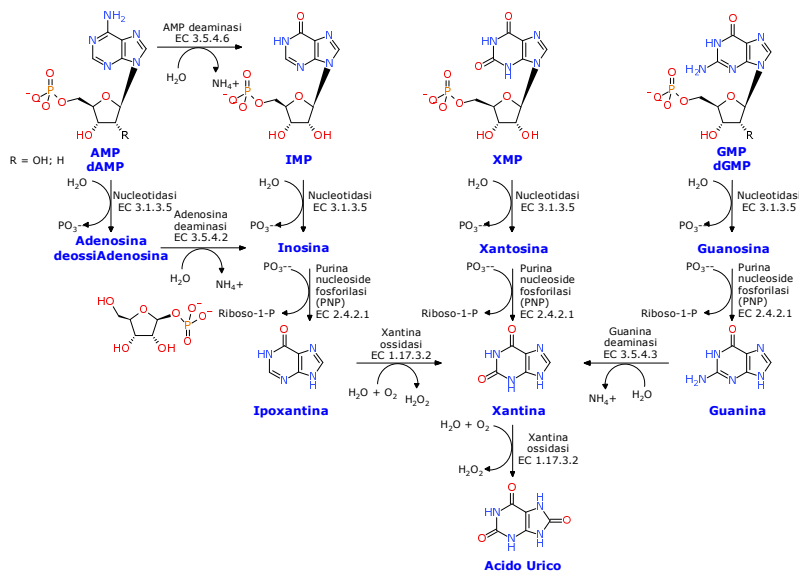
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 91 -

91

Catabolismo delle purine

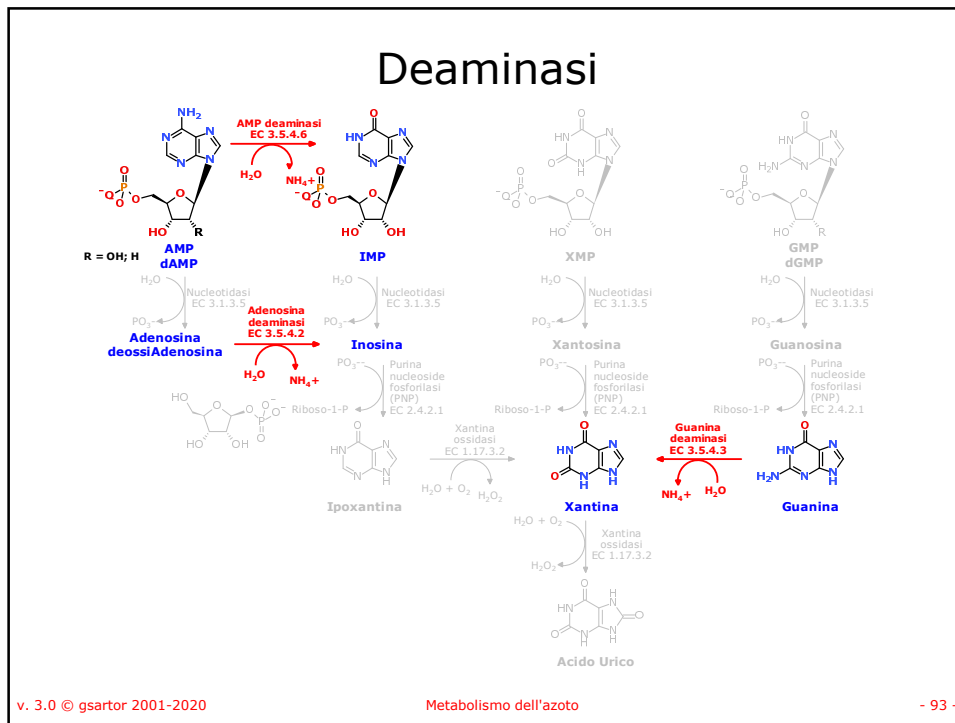


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 92 -

92



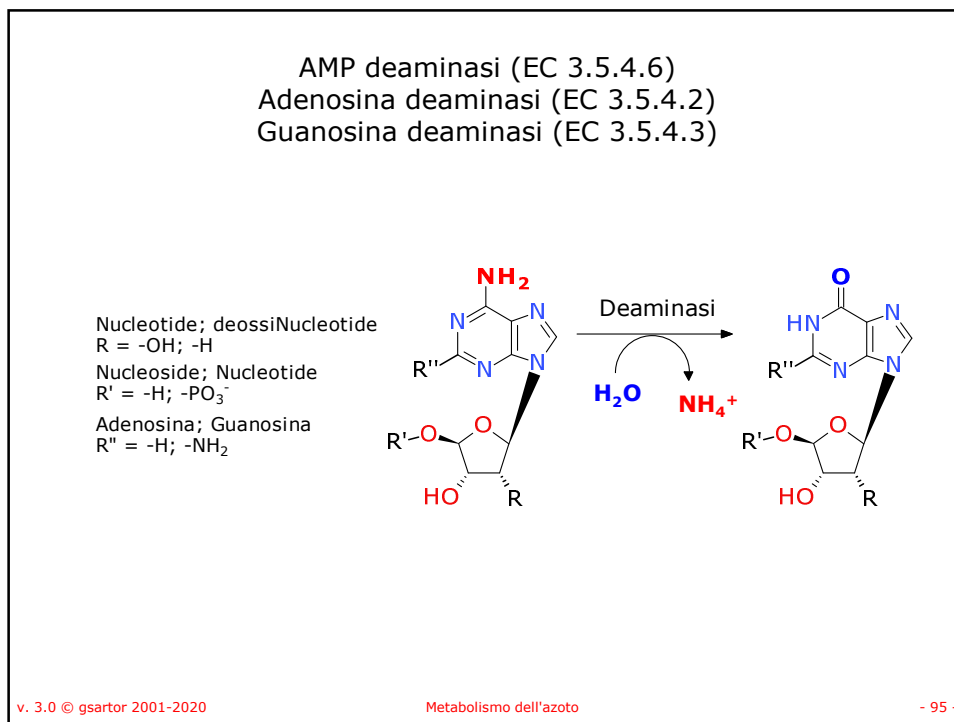
93

Deaminasi

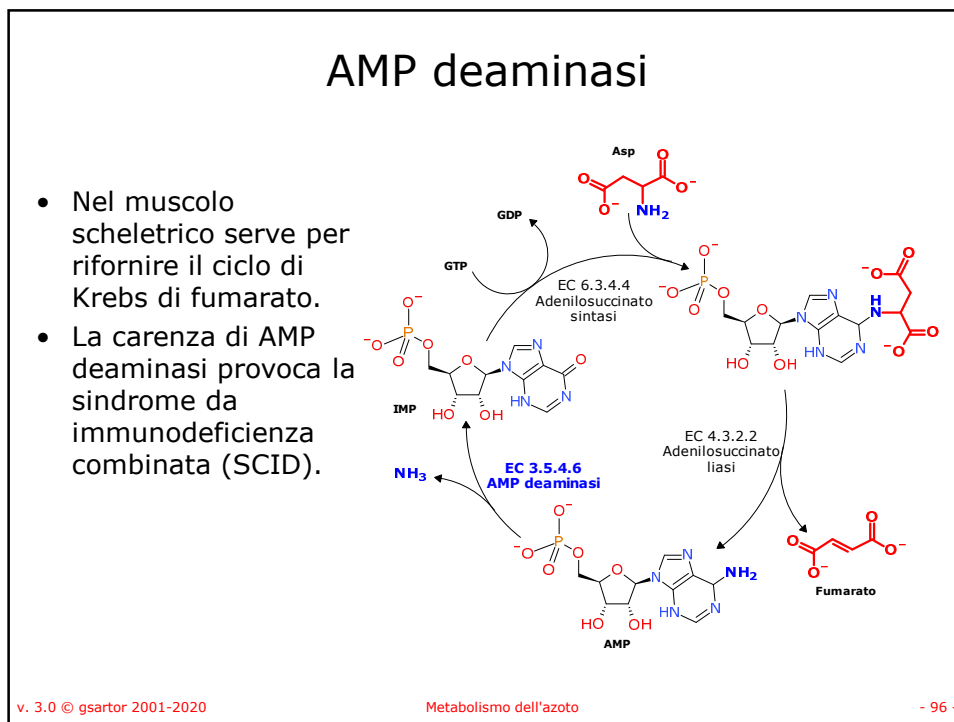
- Tre deaminasi:
 - AMP deaminasi (EC 3.5.4.6),
 - Adenosina deaminasi (EC 3.5.4.2) e
 - Guanina deaminasi (EC 3.5.4.3).
- Intervengono, a diverso livello, per produrre xantina.

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 -

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:

NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@@H]3O[C@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@@H](O)[C@H]3O + H2O >> NC1=NC=NC2=C1N=CN2[C@@H]3O[C@H](COP(=O)([O-])[O-])[C@@H](O)[C@H]3O + NH3
 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.

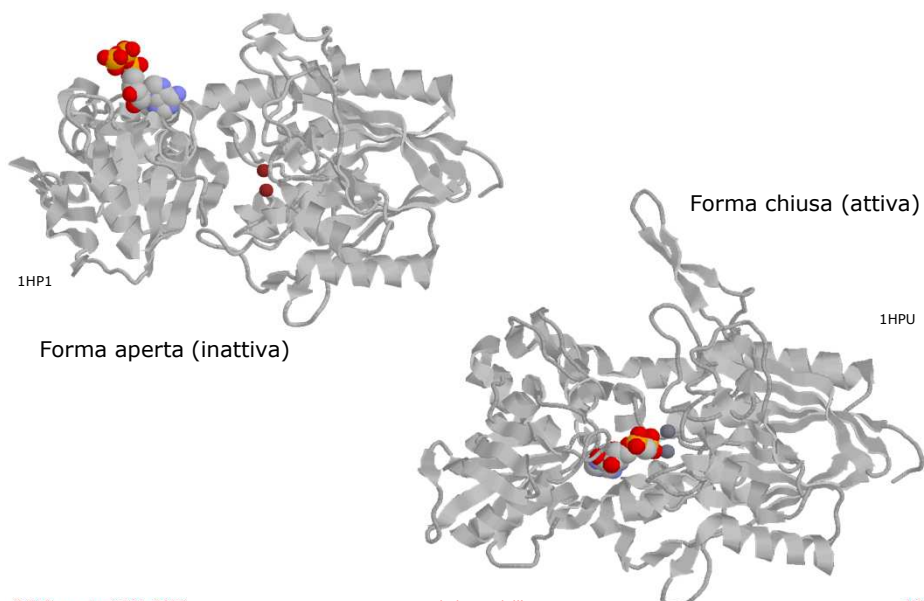
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 101 -

101

5'-nucleotidasi (EC 3.1.3.5)

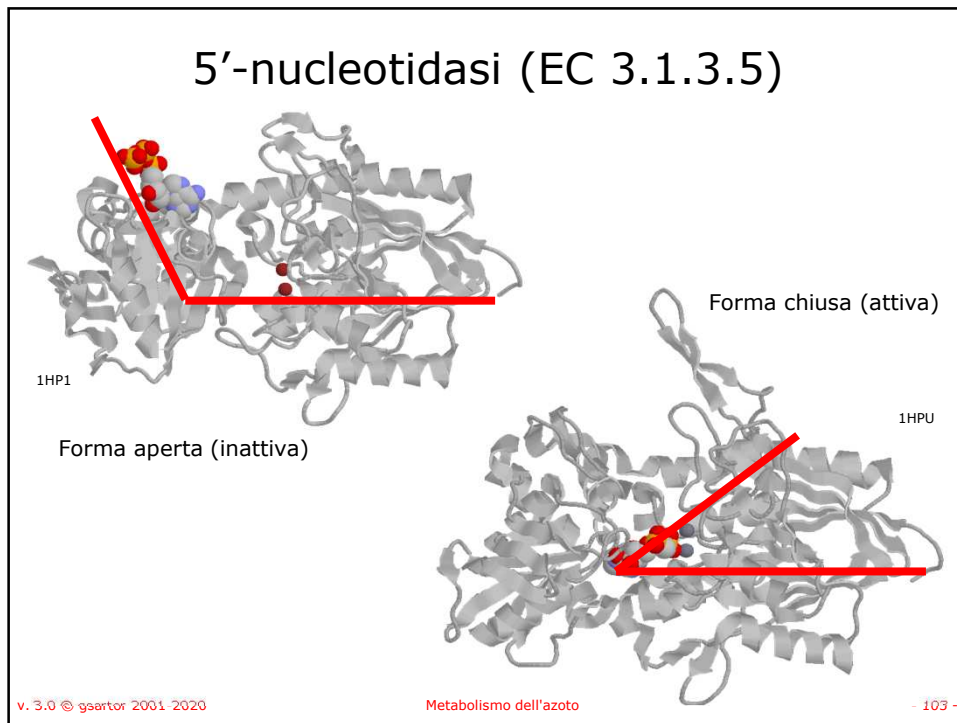


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

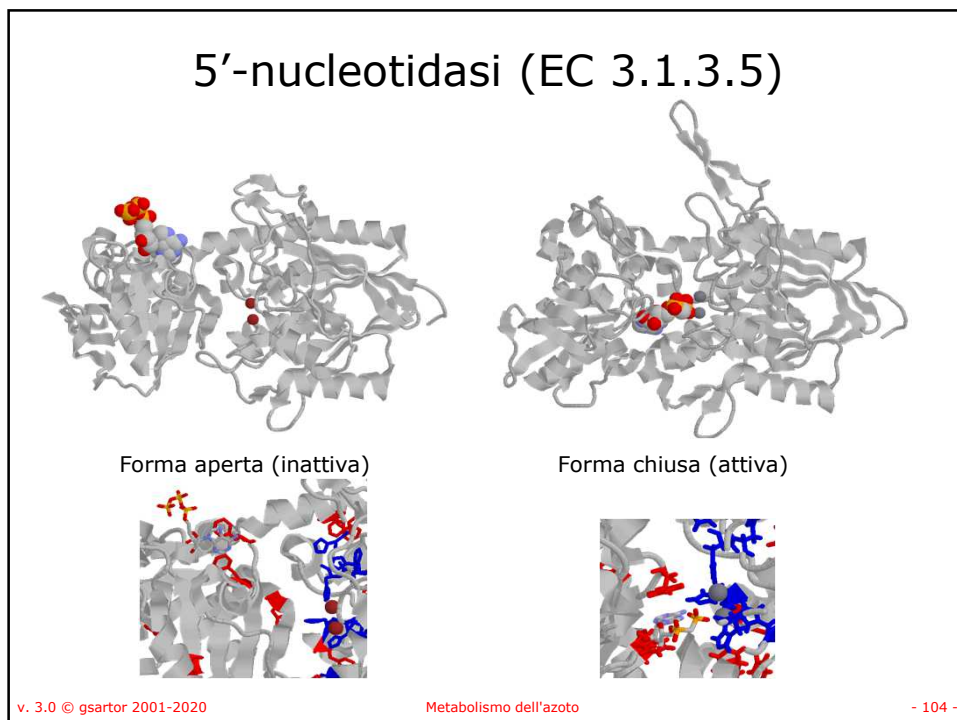
Metabolismo dell'azoto

- 102 -

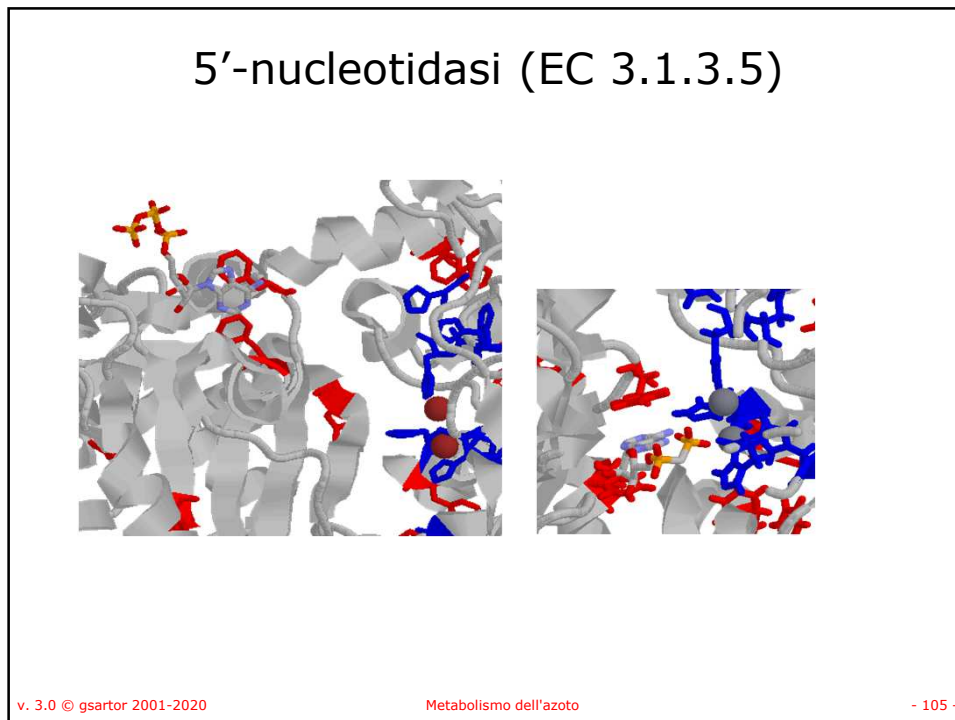
102



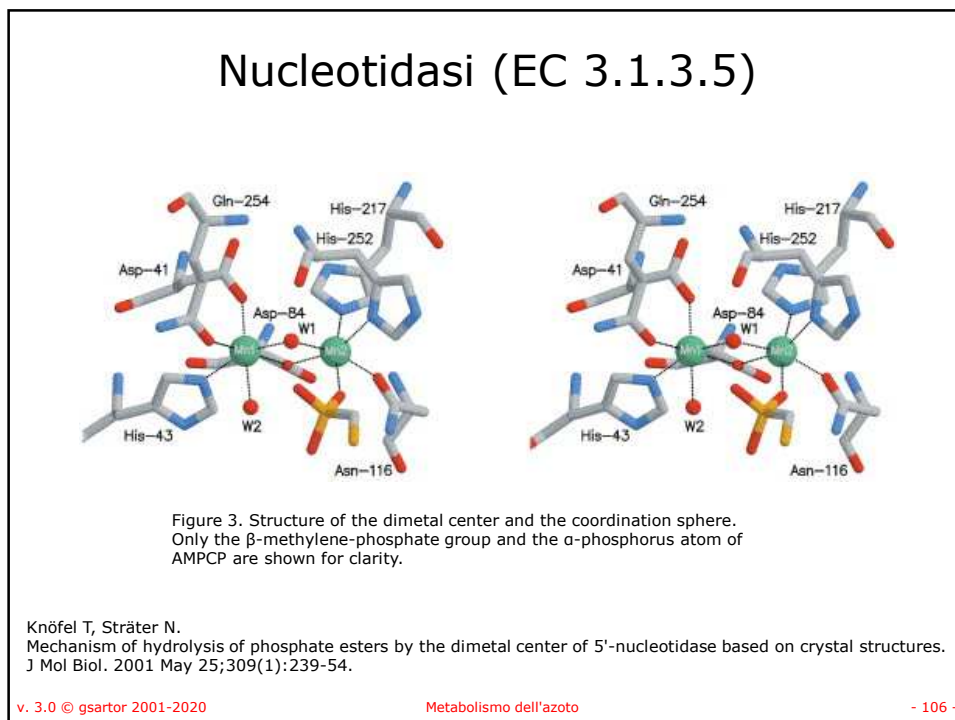
103



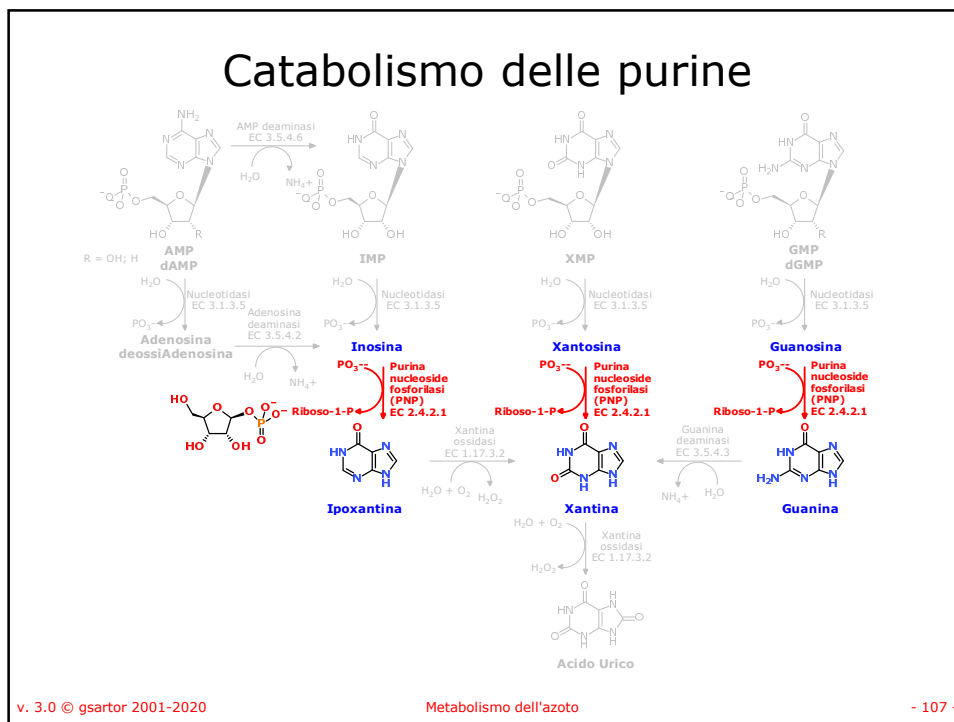
104



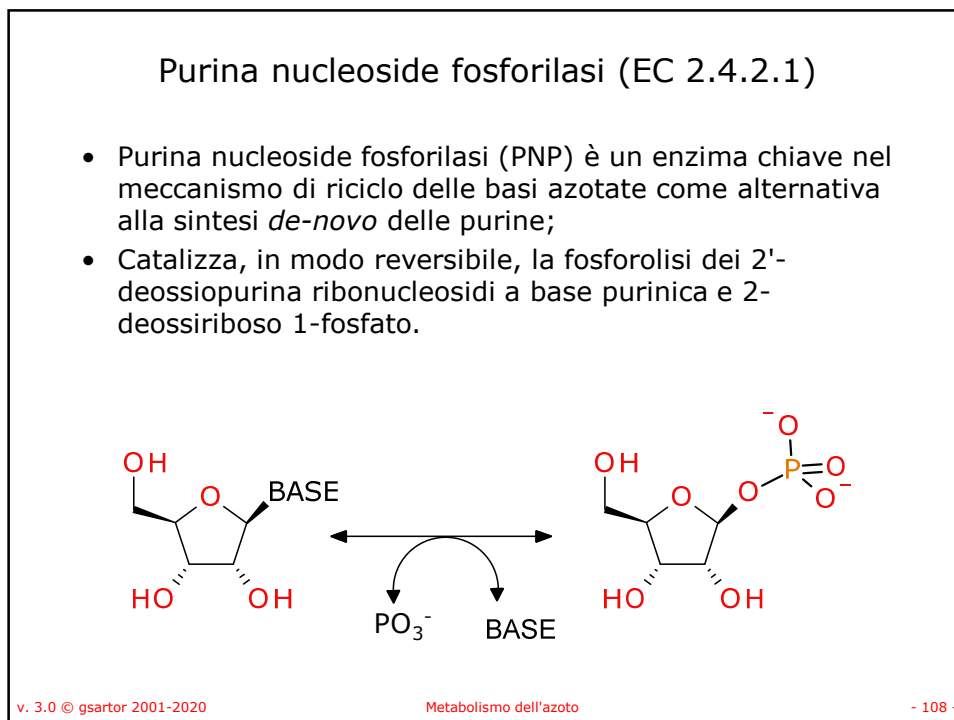
105



106

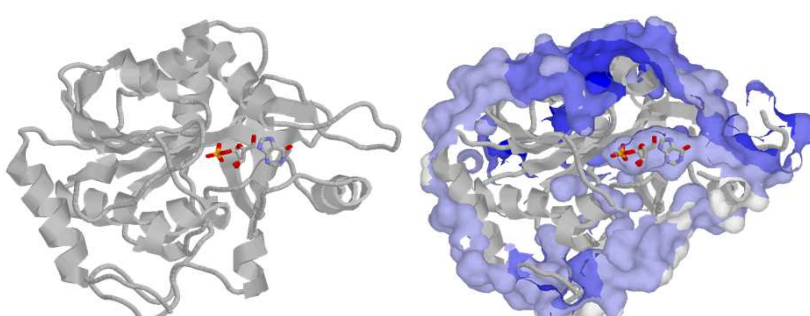


107



108

Purina nucleoside fosforilasi (EC 2.4.2.1)

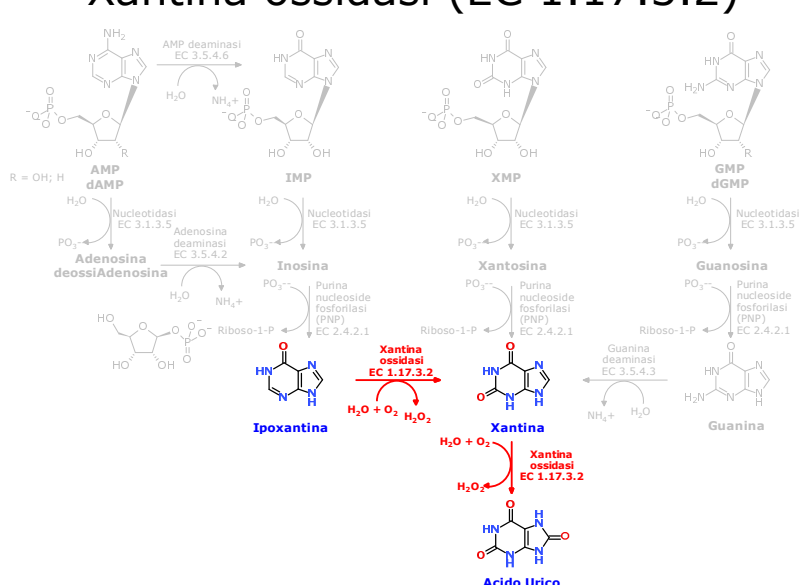


1A9T

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 109 -

109

Xantina ossidasi (EC 1.17.3.2)



v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 110 -

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.

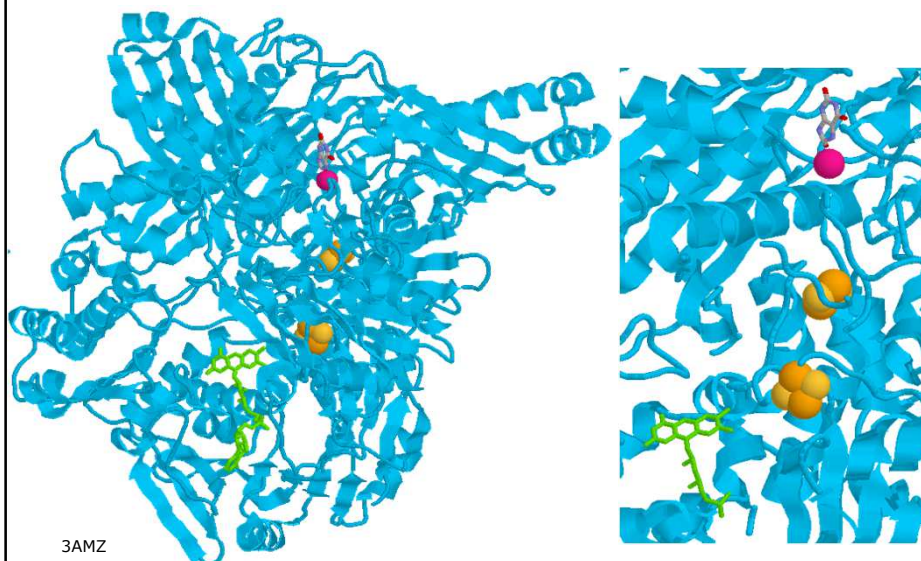
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 111 -

111

Xantina ossidasi (EC 1.17.3.2)



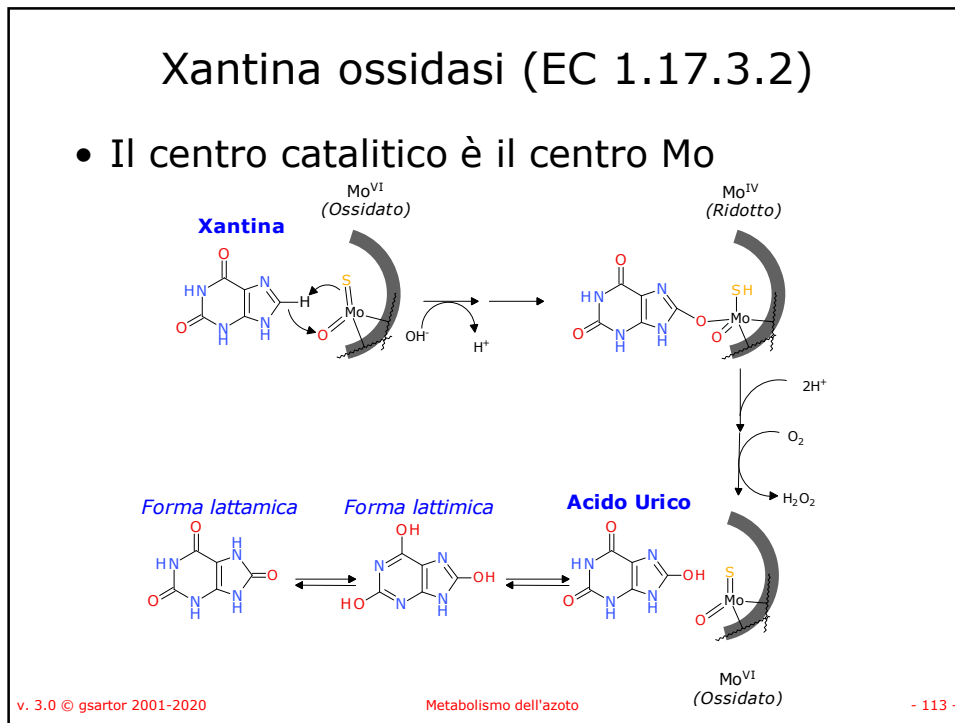
3AMZ

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

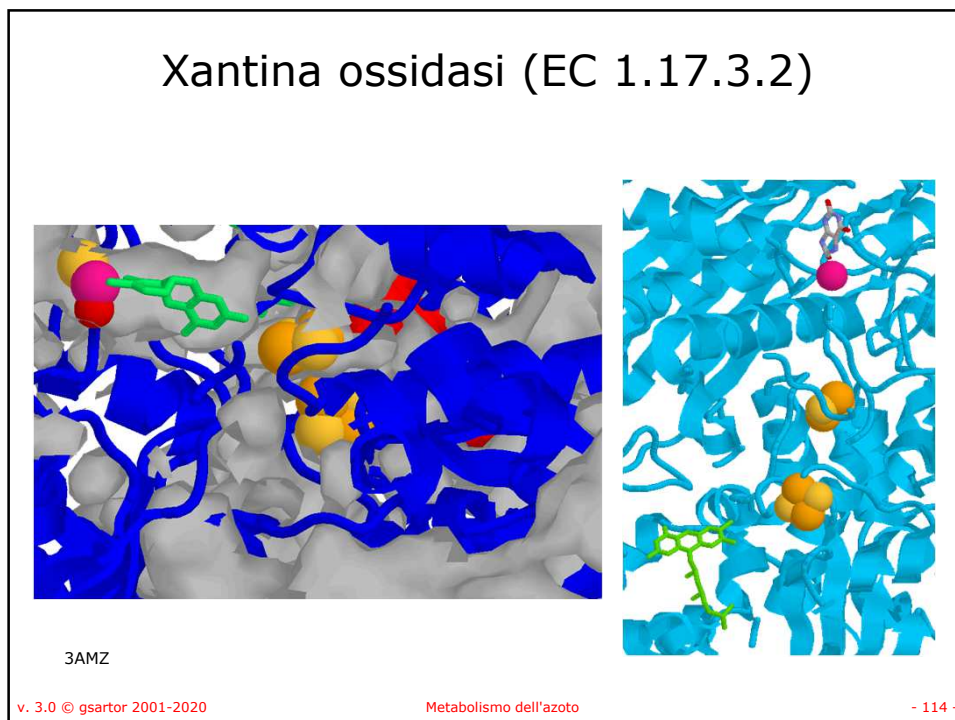
Metabolismo dell'azoto

- 112 -

112



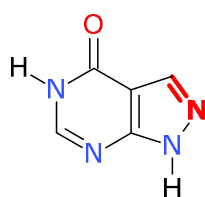
113



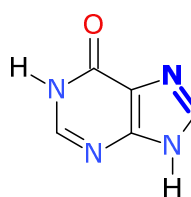
114

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

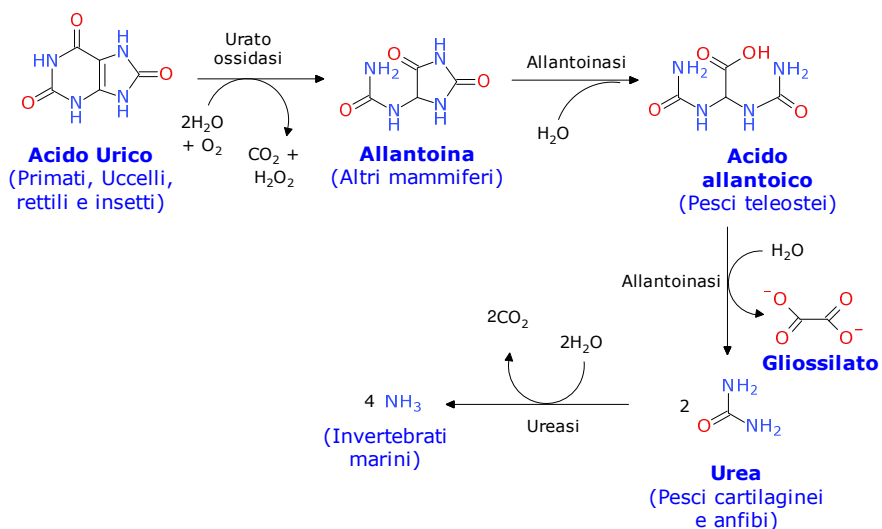
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 115 -

115

Destino acido urico



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 116 -

116

Destino acido urico

- Negli umani e negli altri primati:
 - L'acido urico è il prodotto finale del metabolismo delle basi puriniche e viene escreto con le urine;
 - L'azoto amminico proveniente dal metabolismo aminoacidico viene eliminato come urea.
- Negli uccelli, nei rettili terrestri e in molti insetti l'acido urico è l'unica via di escrezione dell'azoto anche quello proveniente dagli aminoacidi e l'acido urico viene escreto come solido per mantenere l'acqua;
- La conversione dell'acido urico nei suoi derivati è funzione della disponibilità di acqua per l'organismo.

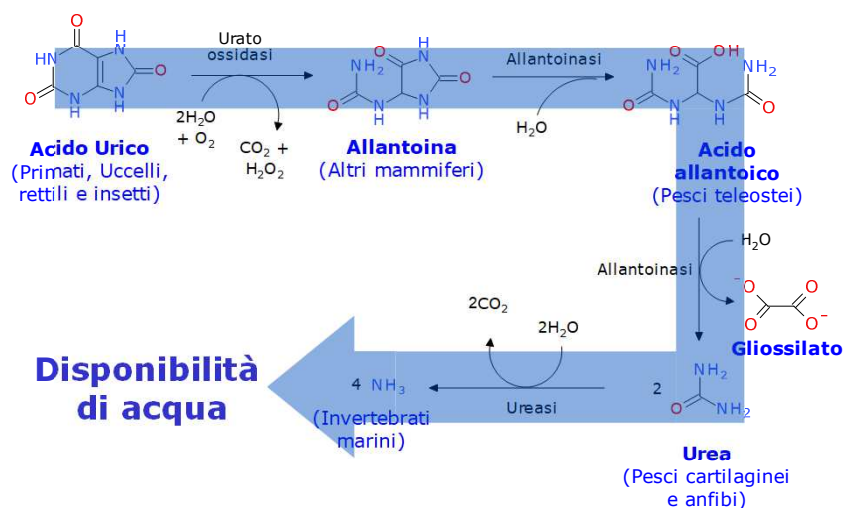
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 117 -

117

Destino acido urico

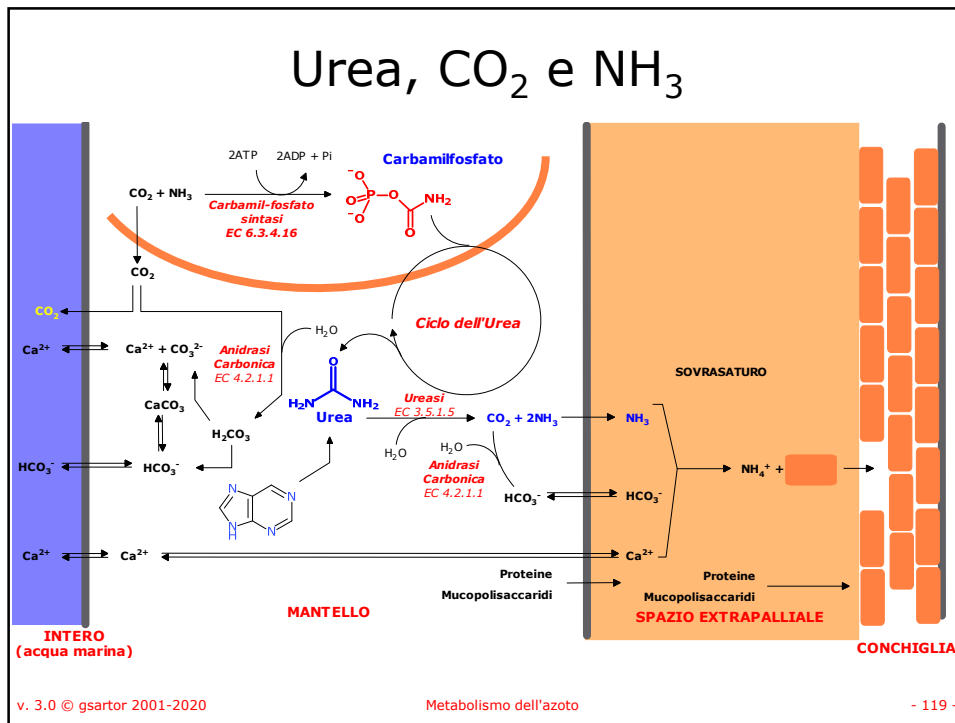


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

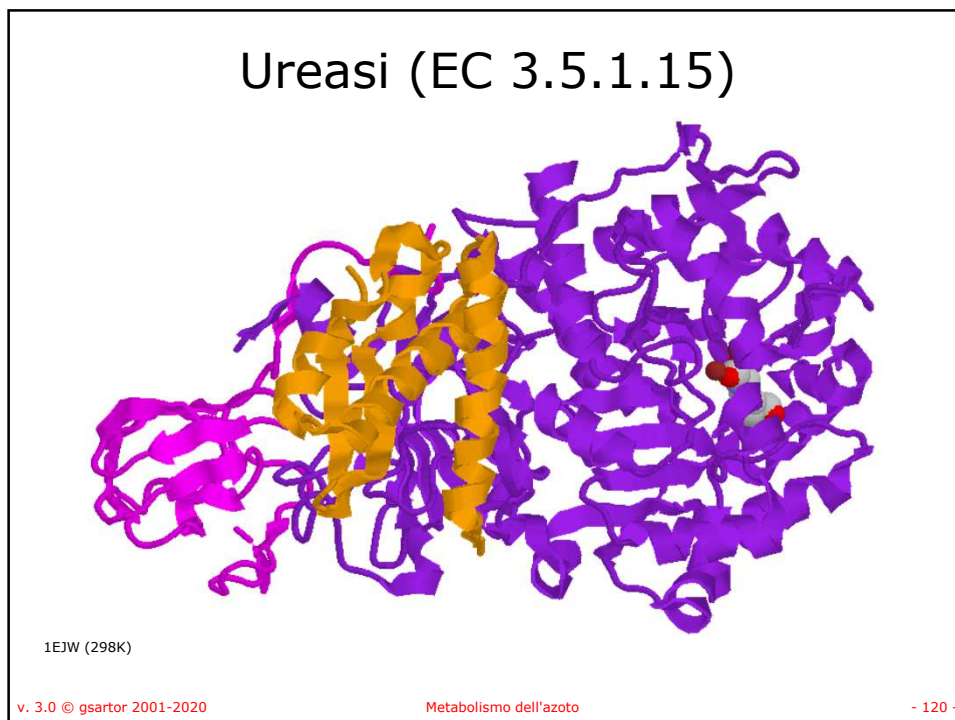
Metabolismo dell'azoto

- 118 -

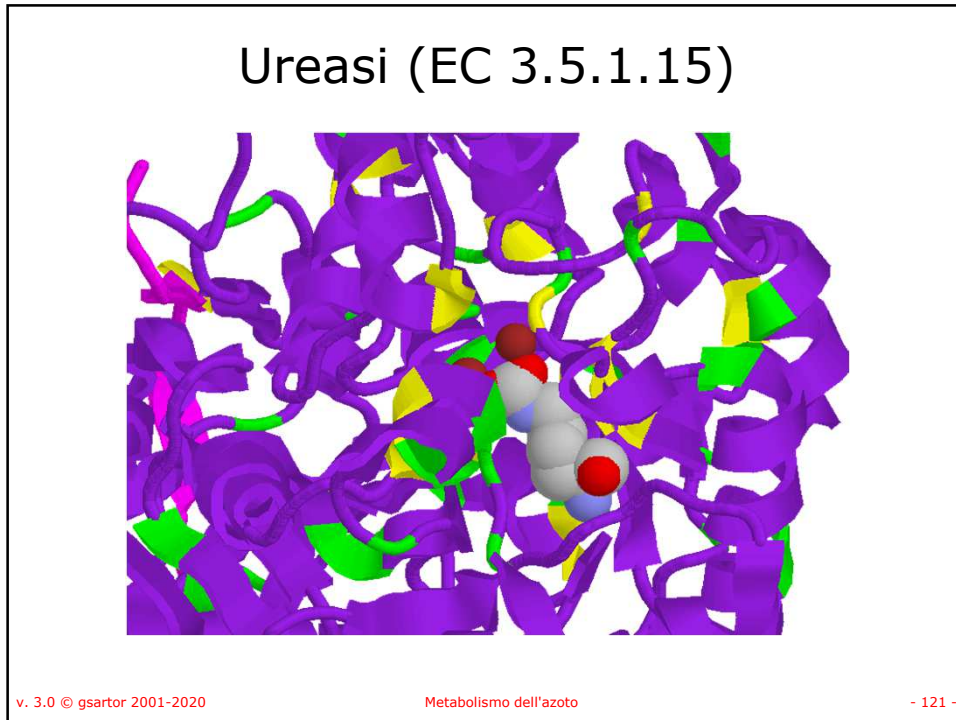
118



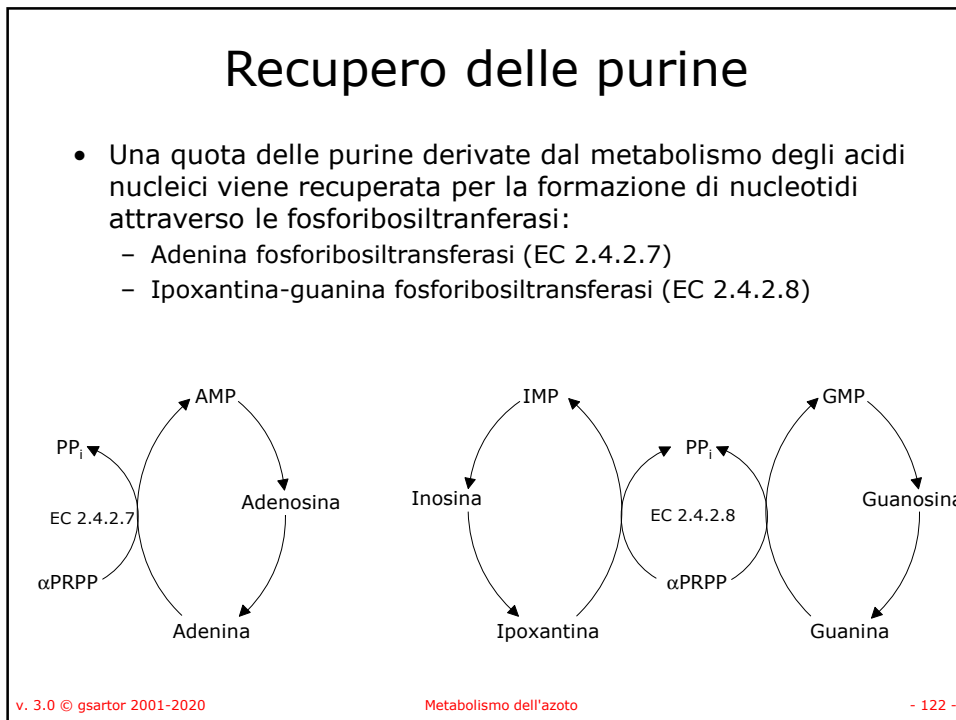
119



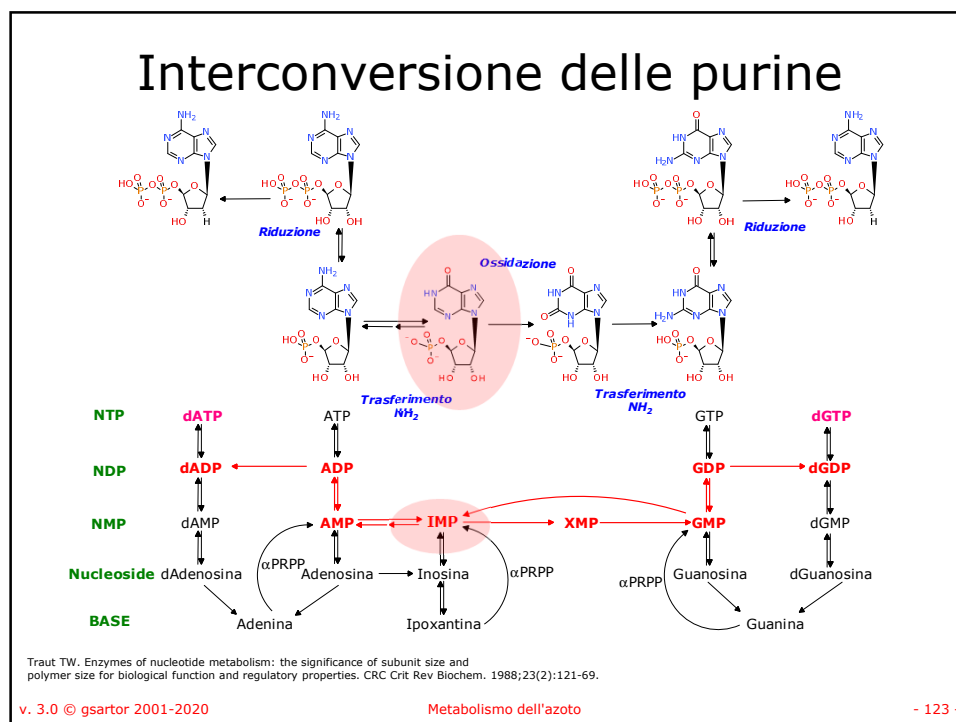
120



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

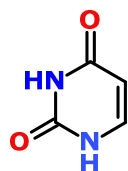
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

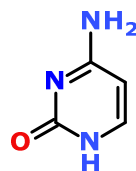
- 125 -

125

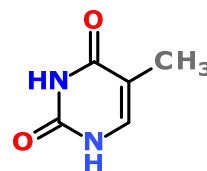
CATABolismo delle pirimidine



Uracile



Citosina



Timina

126

Catabolismo delle pirimidine

- Catabolismo riduttivo
 - $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$
 - Animali, piante e alcuni batteri.
- Catabolismo ossidativo
 - Accettore ossidato \rightarrow Accettore ridotto
 - Esclusivamente batterico.
- Rut (Pyrimidine **u**tilization) pathway
 - in *Escherichia coli K-12*
 - usa le pirimidine come unica sorgente di azoto (NH_3).

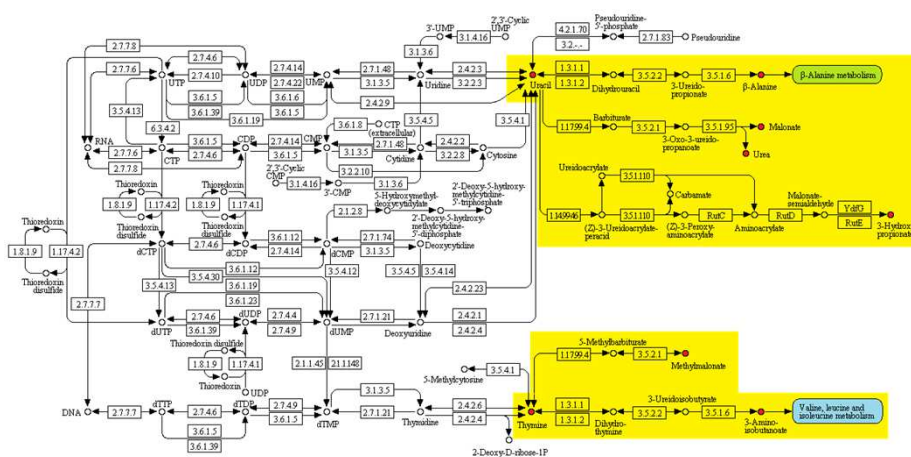
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 127 -

127

Catabolismo delle pirimidine

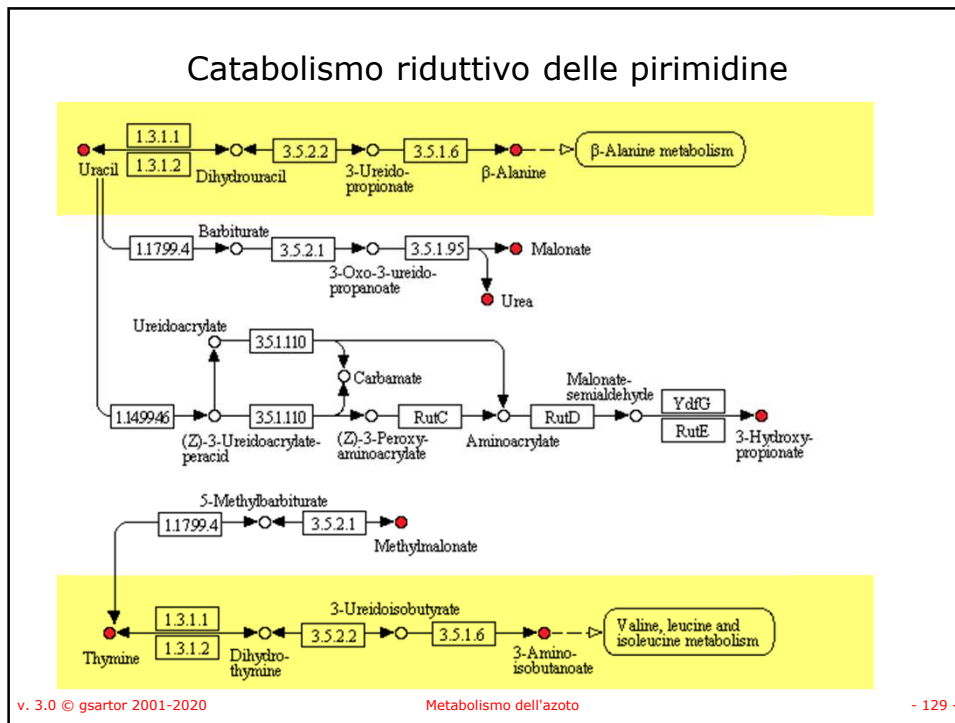


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

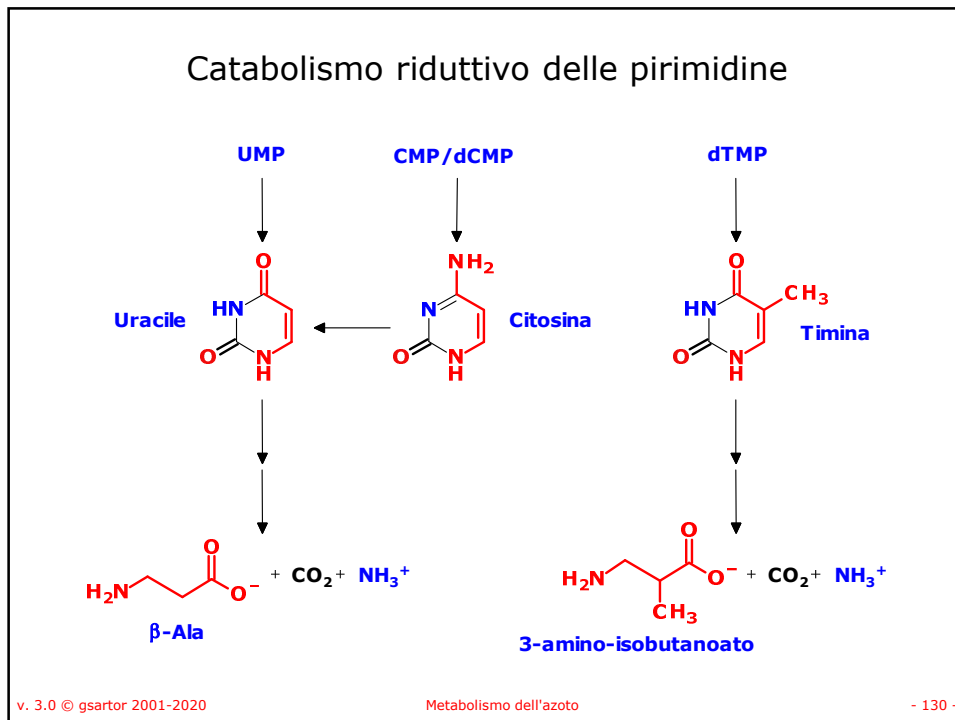
Metabolismo dell'azoto

- 128 -

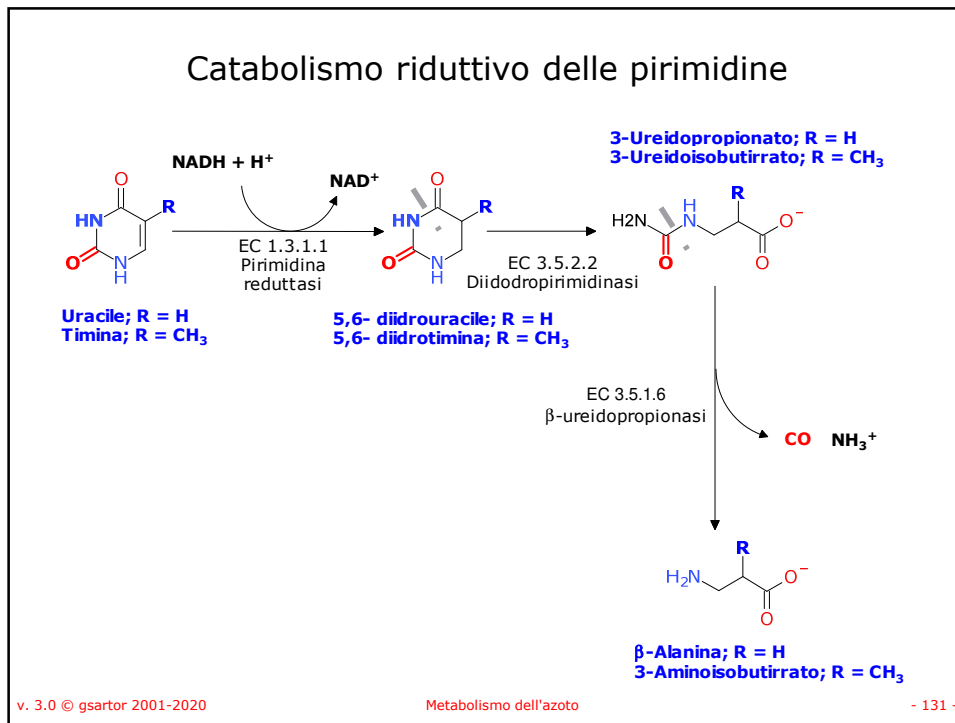
128



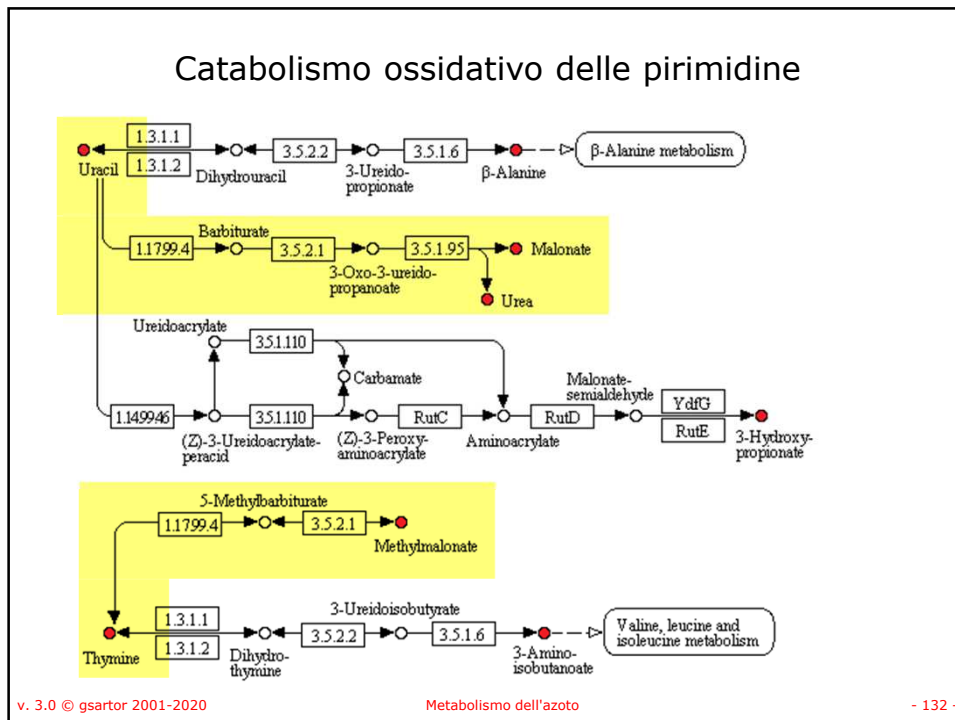
129



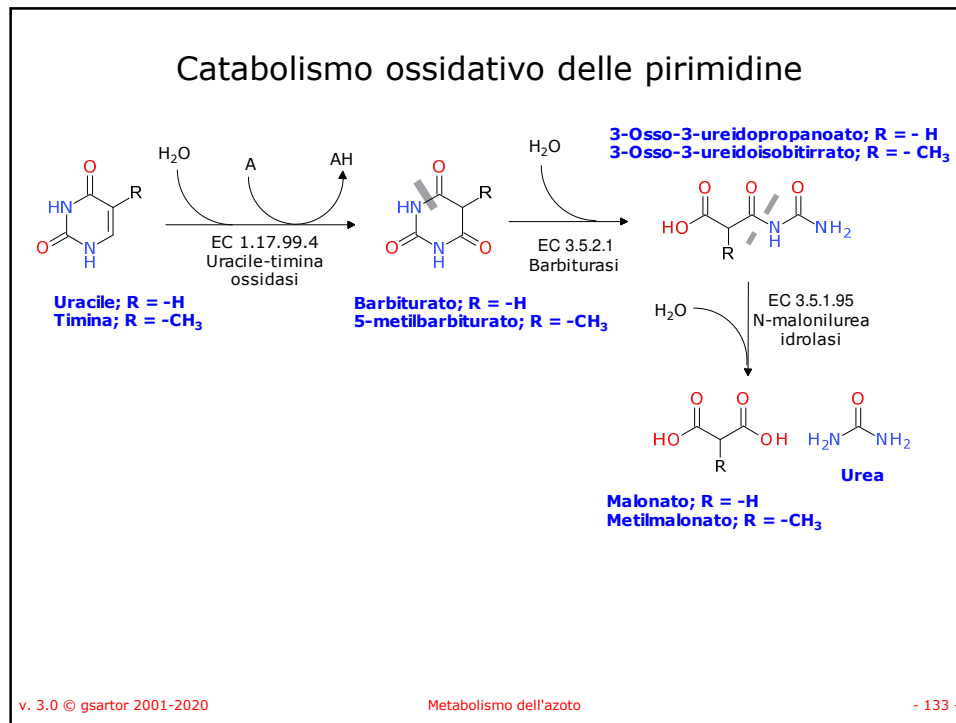
130



131



132



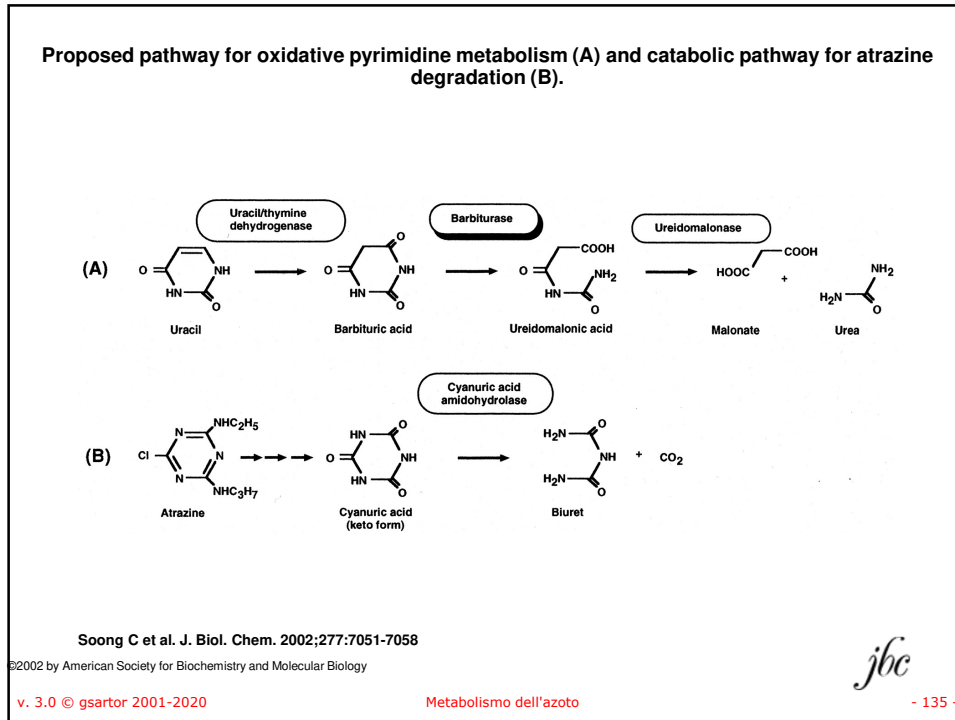
133

Barbiturasi (EC 3.5.2.1)

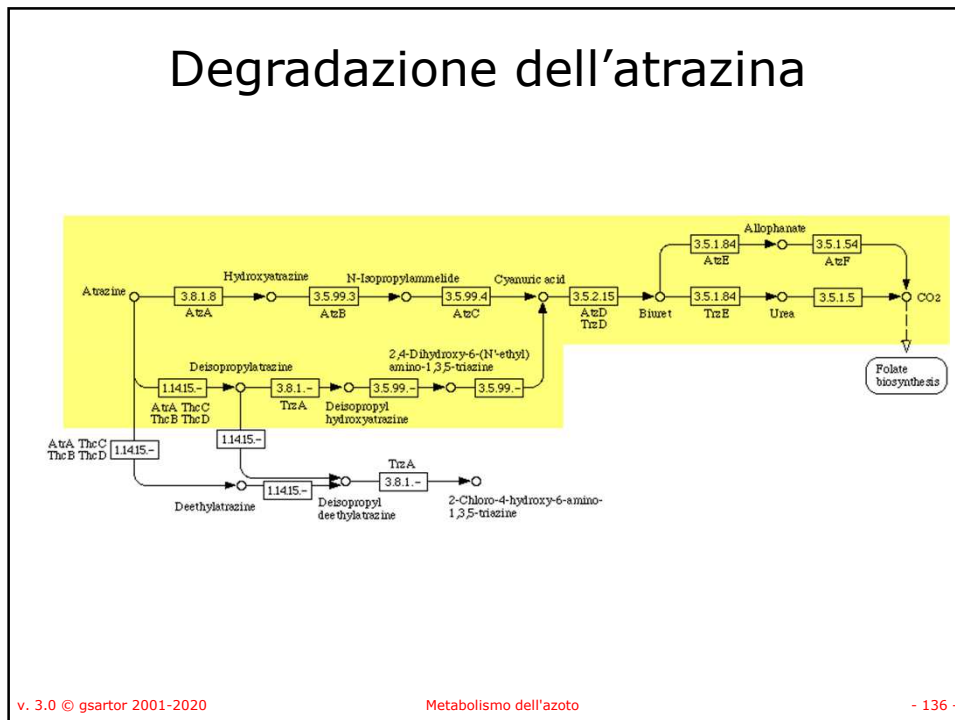
- Omotetramero;
- Contiene uno ione zinco;
- Ha come substrato specifico il barbiturato;
- Catalizza la reazione di apertura dell'anello ma non la formazione di malonato (metilmalonato) e urea;
- Sembra coinvolto nella regolazione del metabolismo delle pirimidine con uracile fosforibosiltransferasi (EC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

v. 3.0 © gsartor 2001-2020 Metabolismo dell'azoto - 134 -

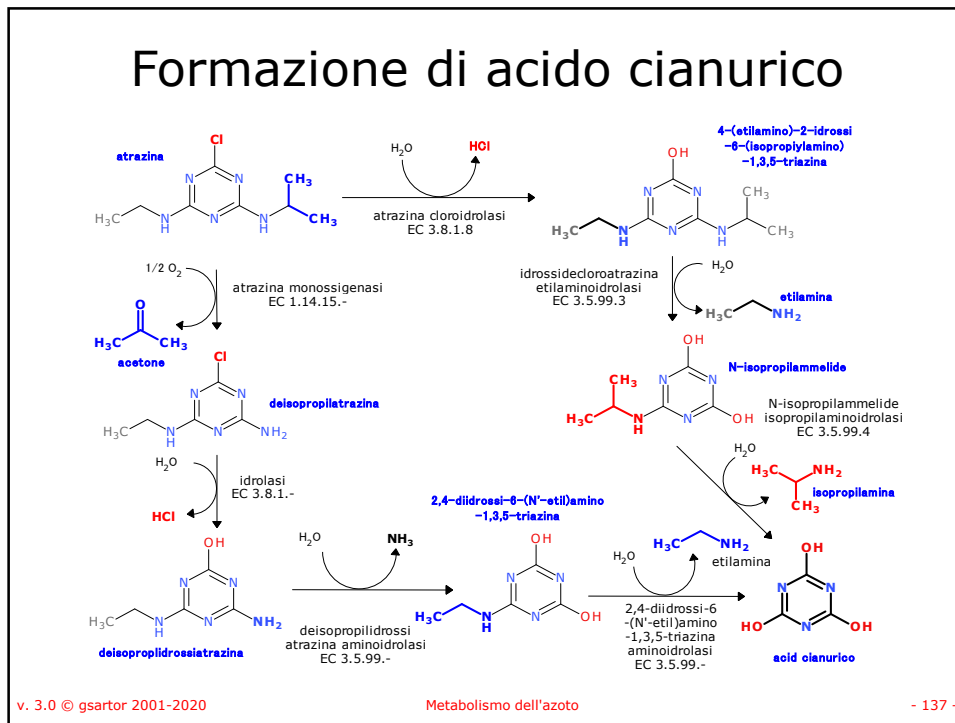
134



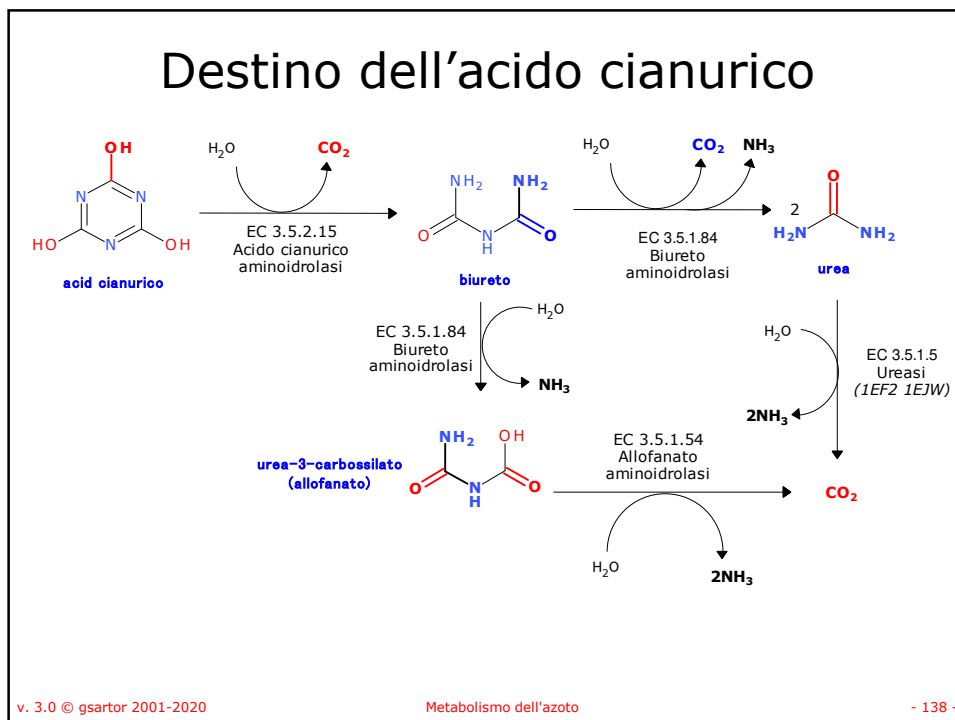
135



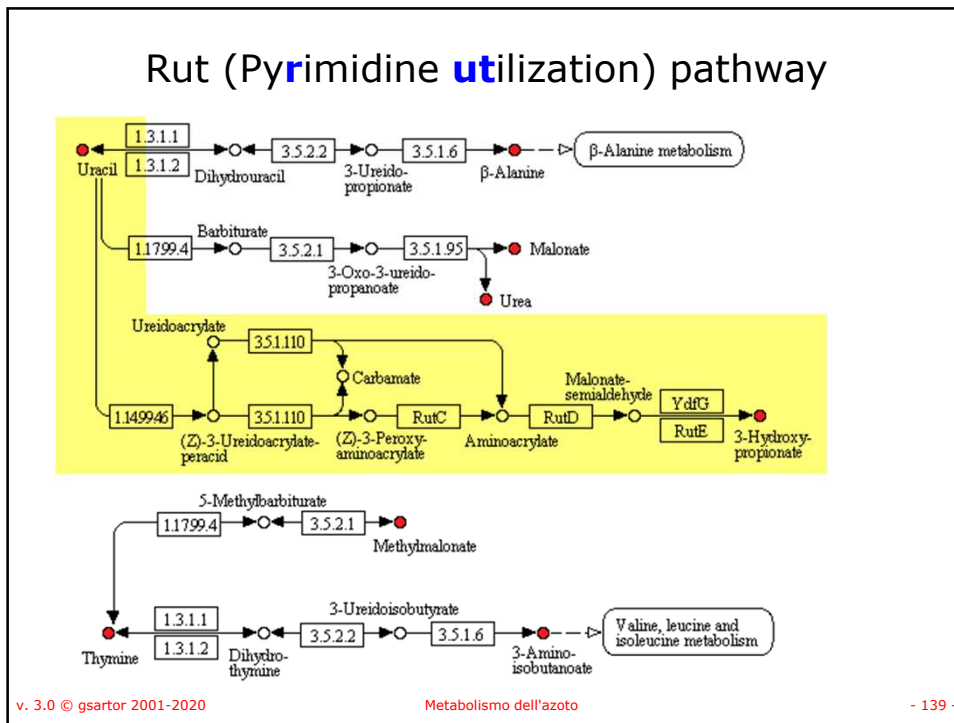
136



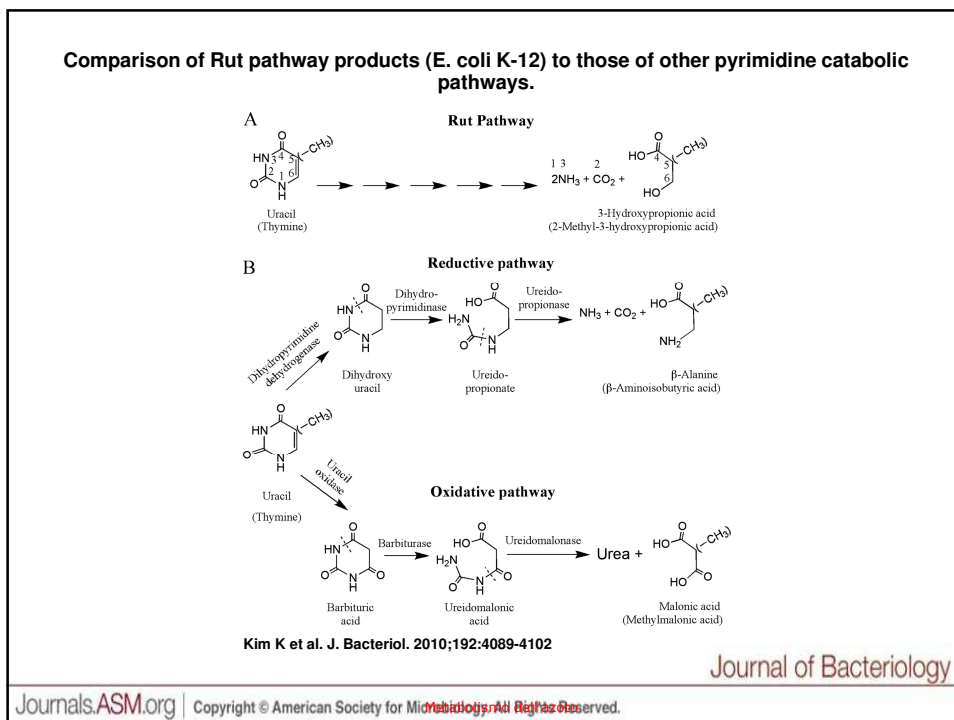
137



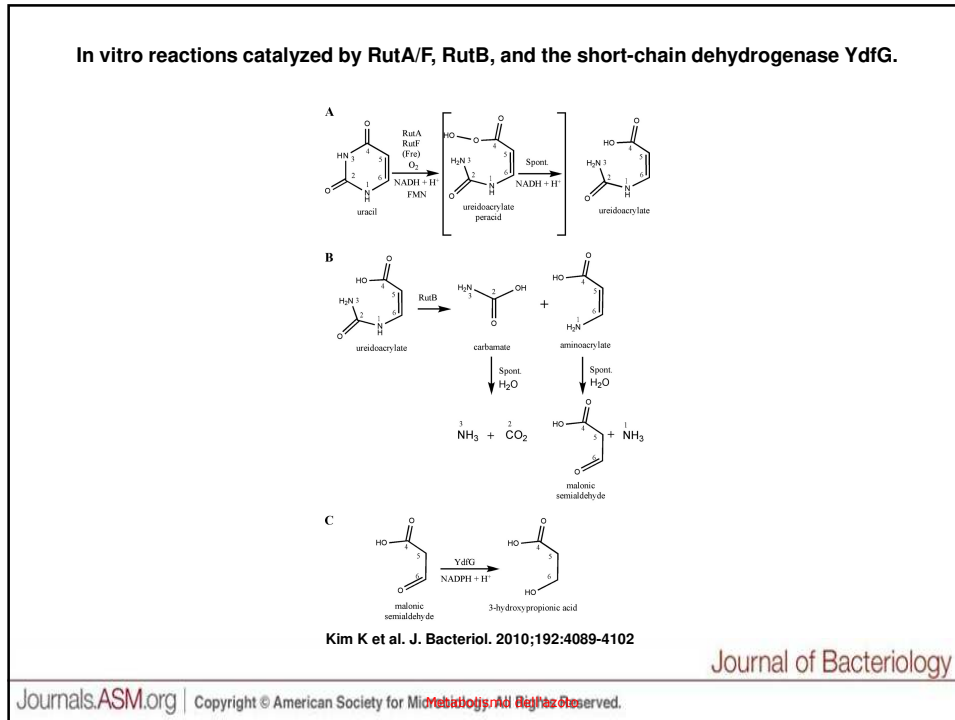
138



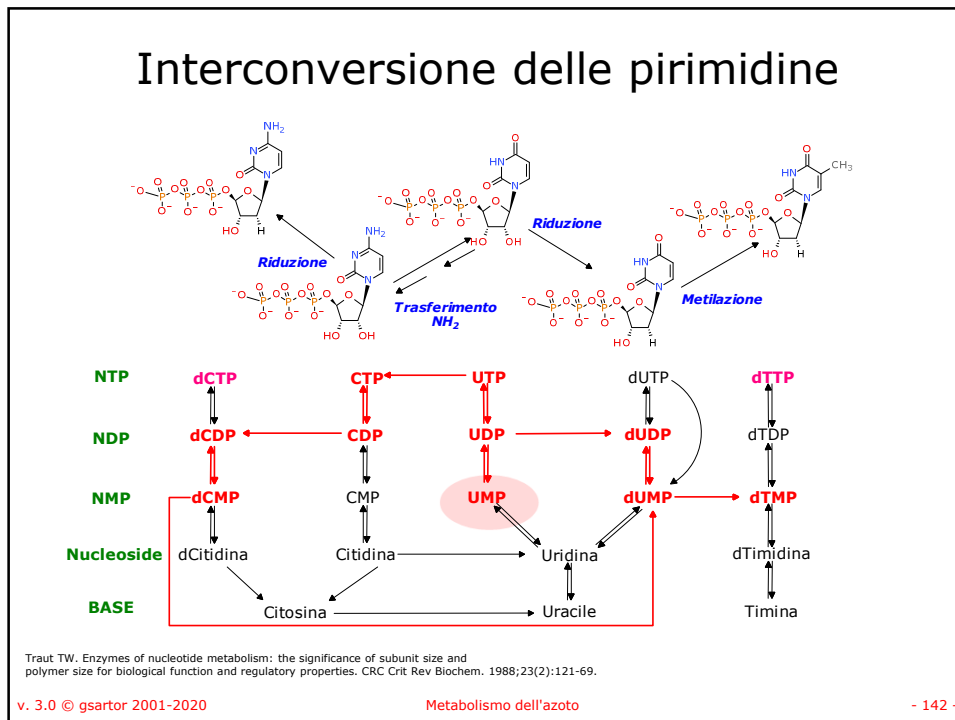
139



140

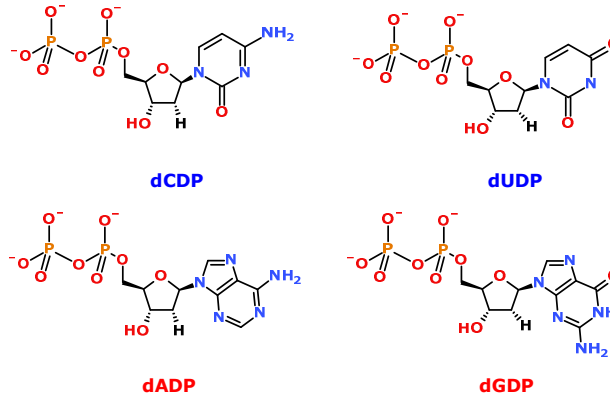


141



142

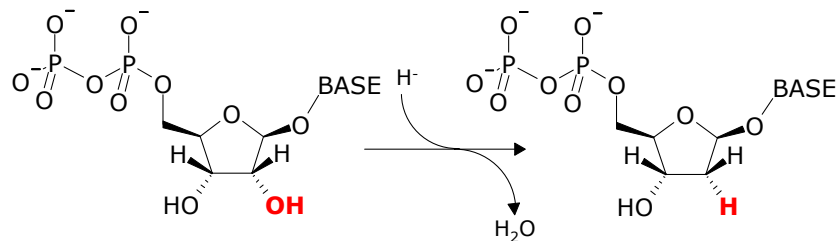
Biosintesi dei deossiribonucleotidi



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

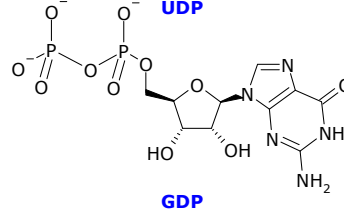
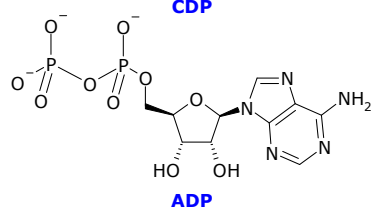
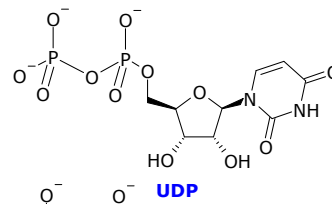
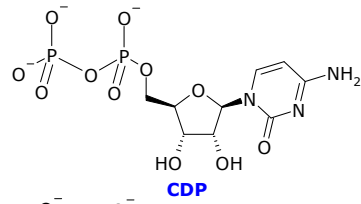
Metabolismo dell'azoto

- 144 -

144

Deossiribonucleotidi

- I substrati sono:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

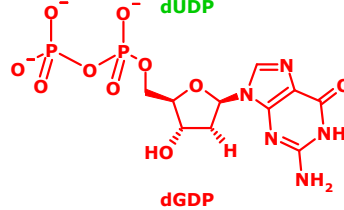
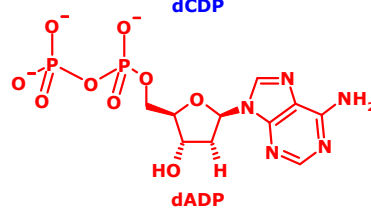
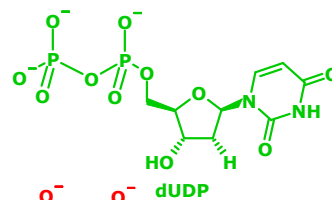
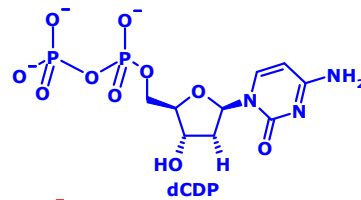
Metabolismo dell'azoto

- 145 -

145

Deossiribonucleotidi

- I prodotti sono:



v. 3.0 © gsartor 2001-2020

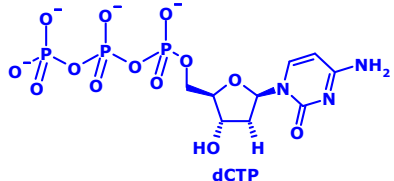
Metabolismo dell'azoto

- 146 -

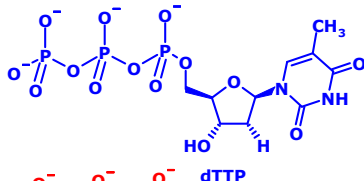
146

Deossiribonucleotidi

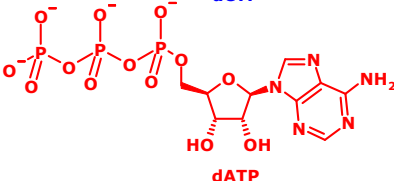
- Per la sintesi del DNA vengono usati i nucleotidi trifosfati:



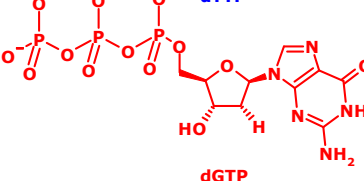
dCTP



dTTP



dATP



dGTP

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

147

Deossiribonucleotidi

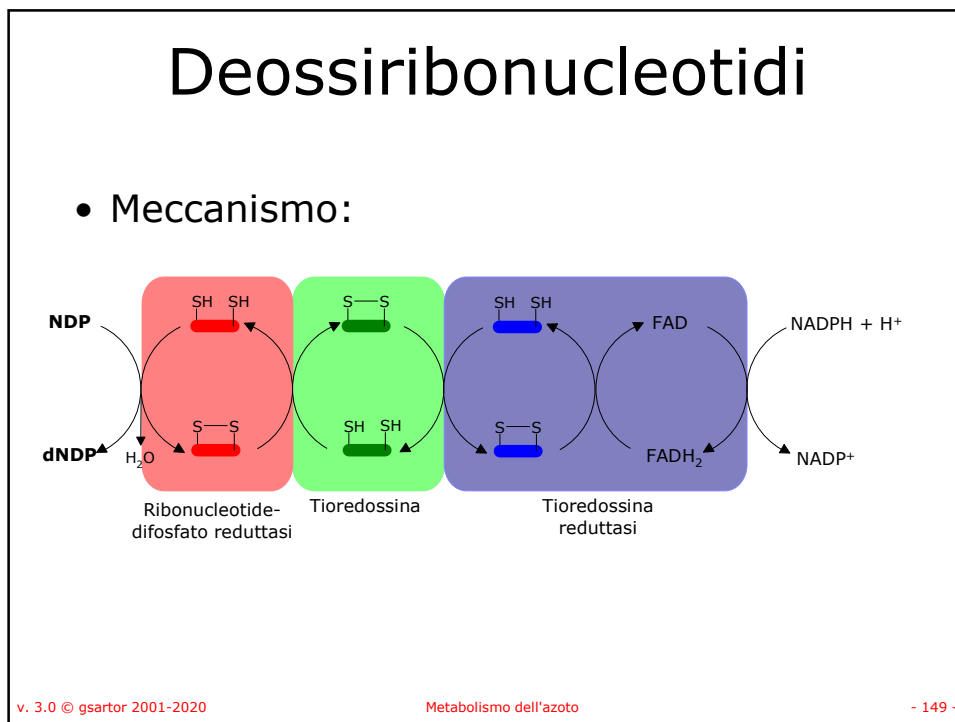
- dUTP non è un nucleotide del DNA ma è il precursore di dTTP

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

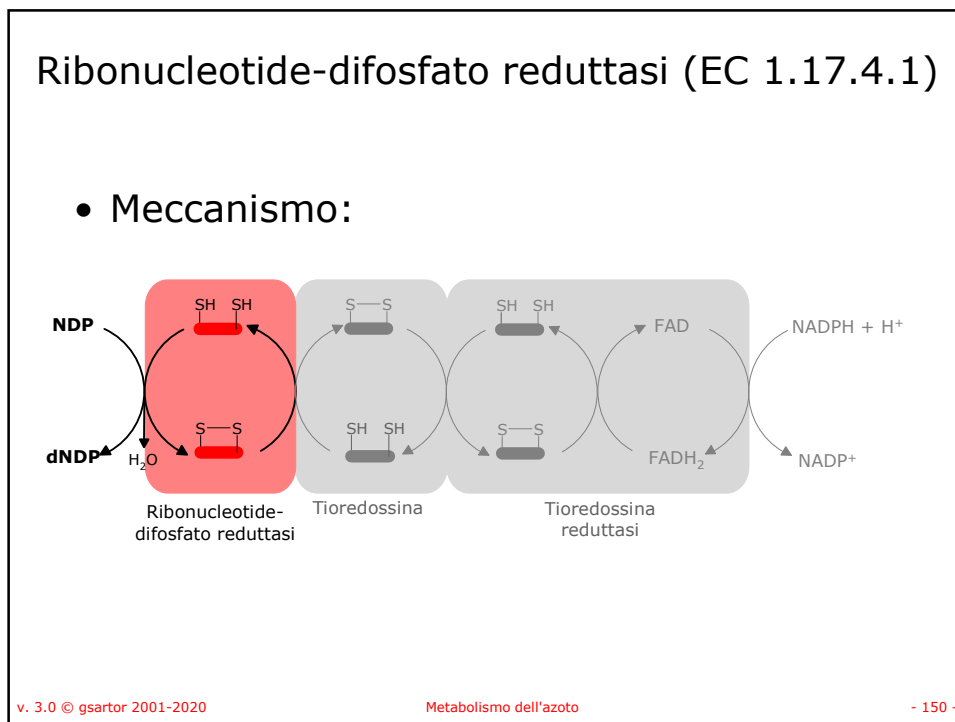
			→	dUMP	→	dTMP	→	dTTP

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

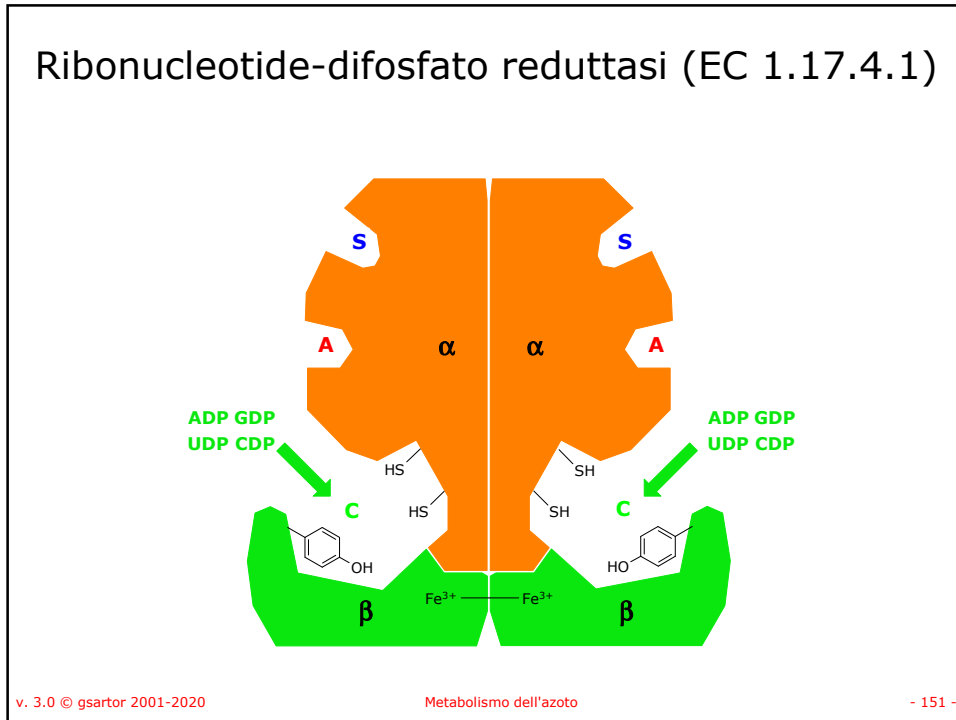
148



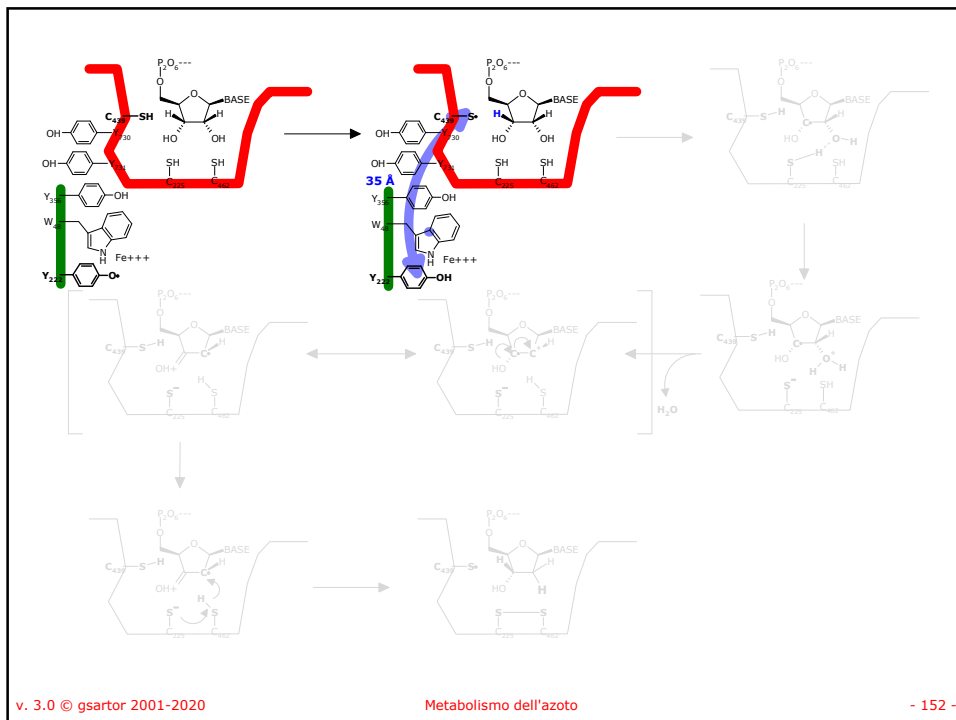
149



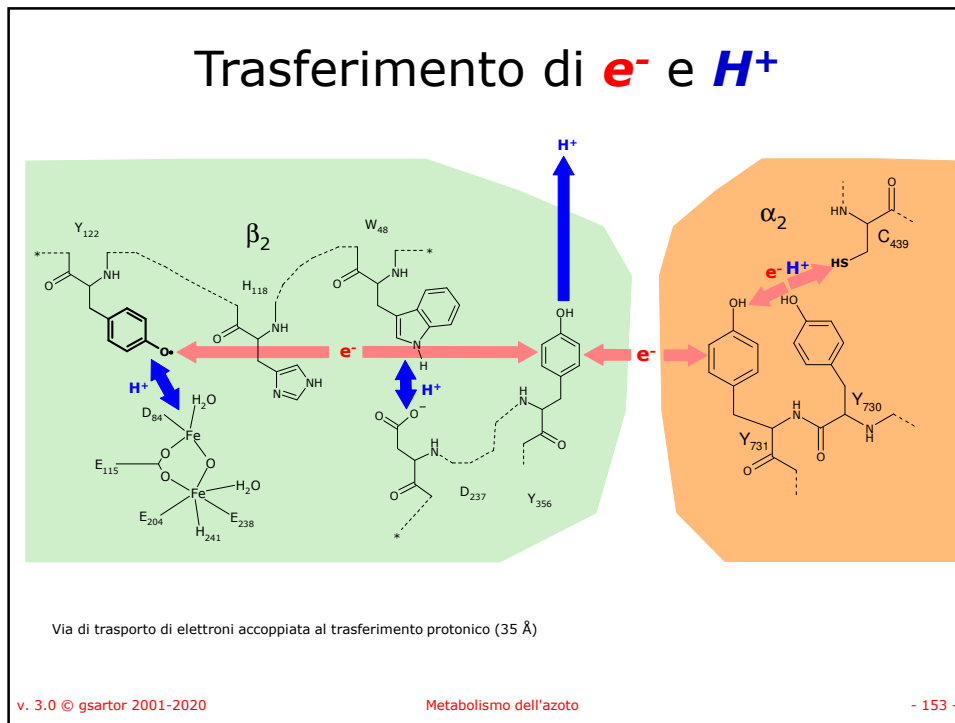
150



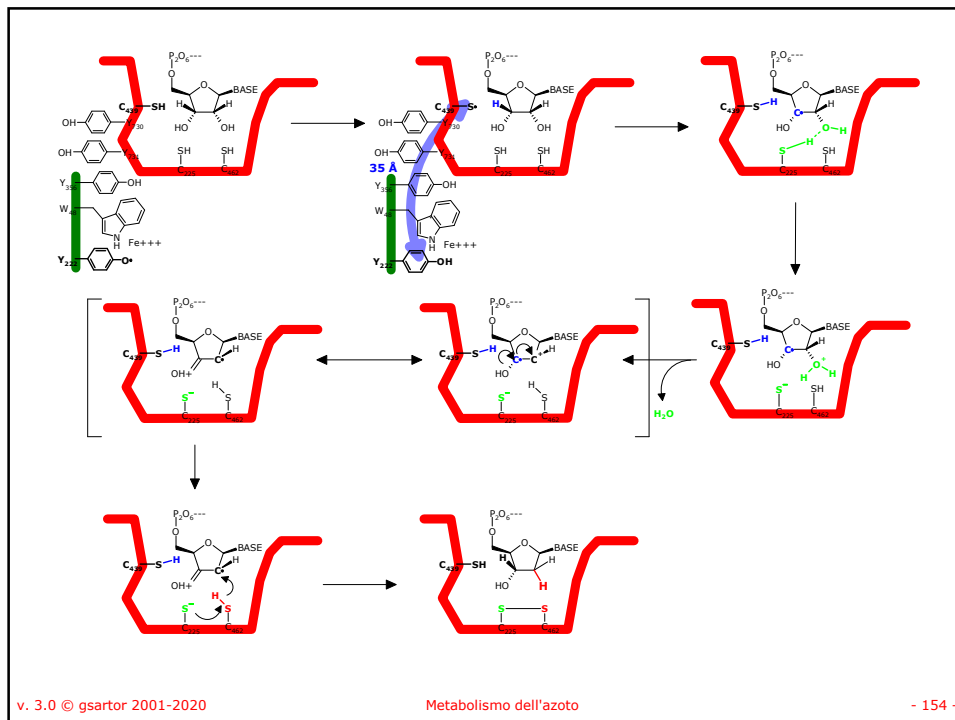
151



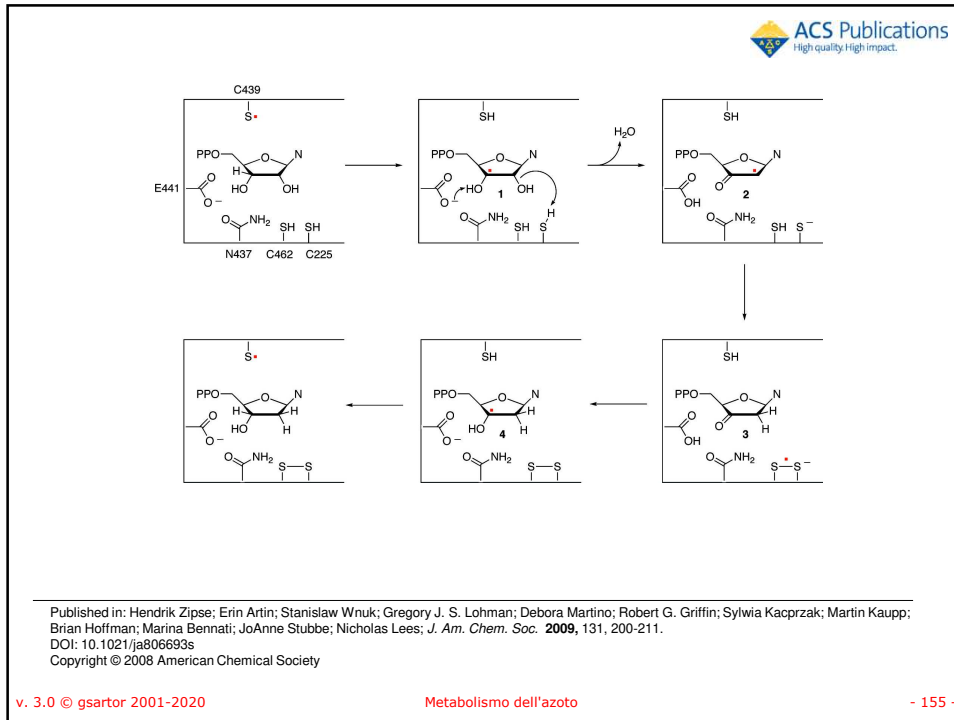
152



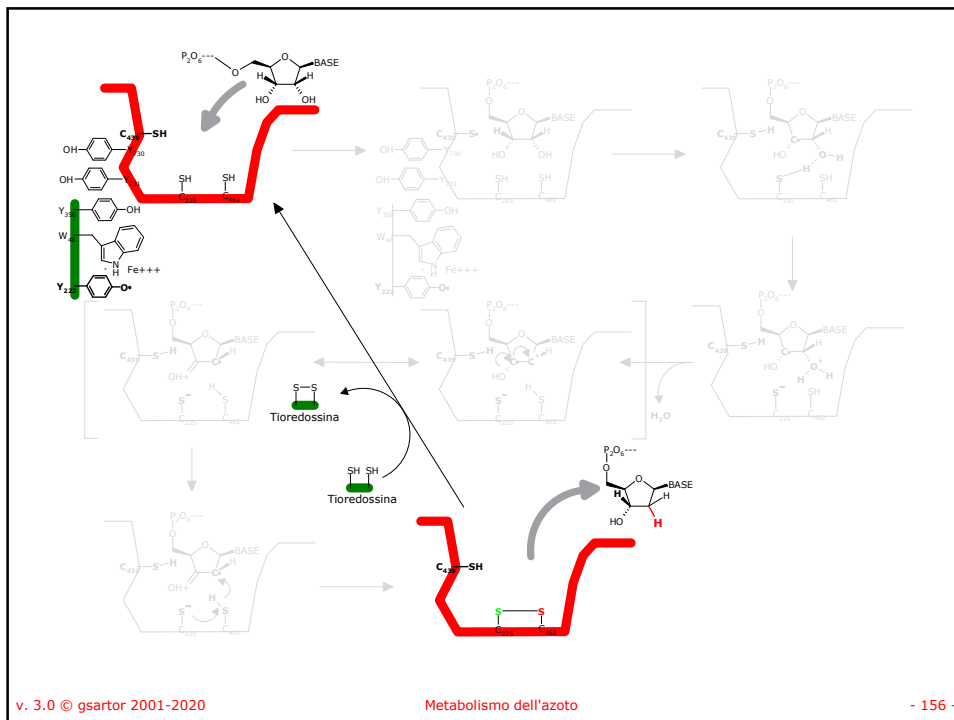
153



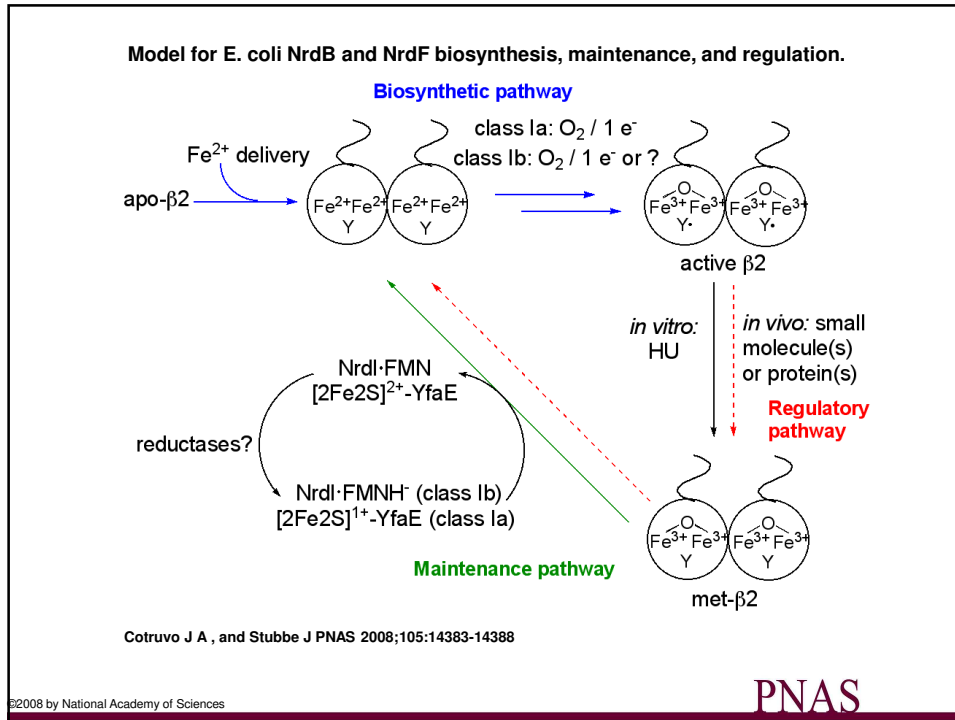
154



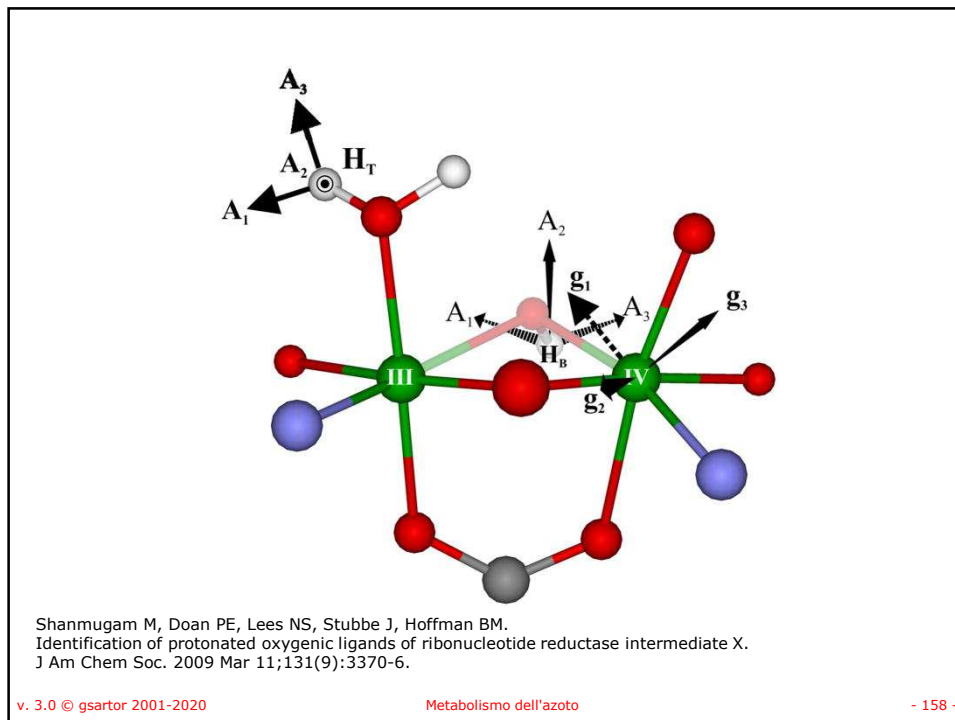
155



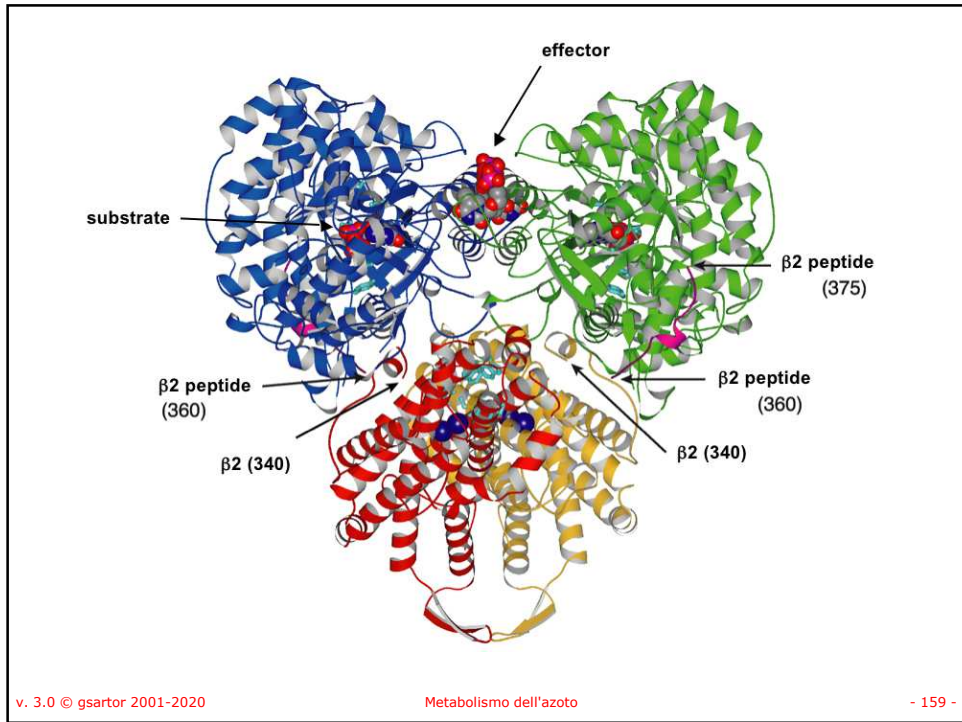
156



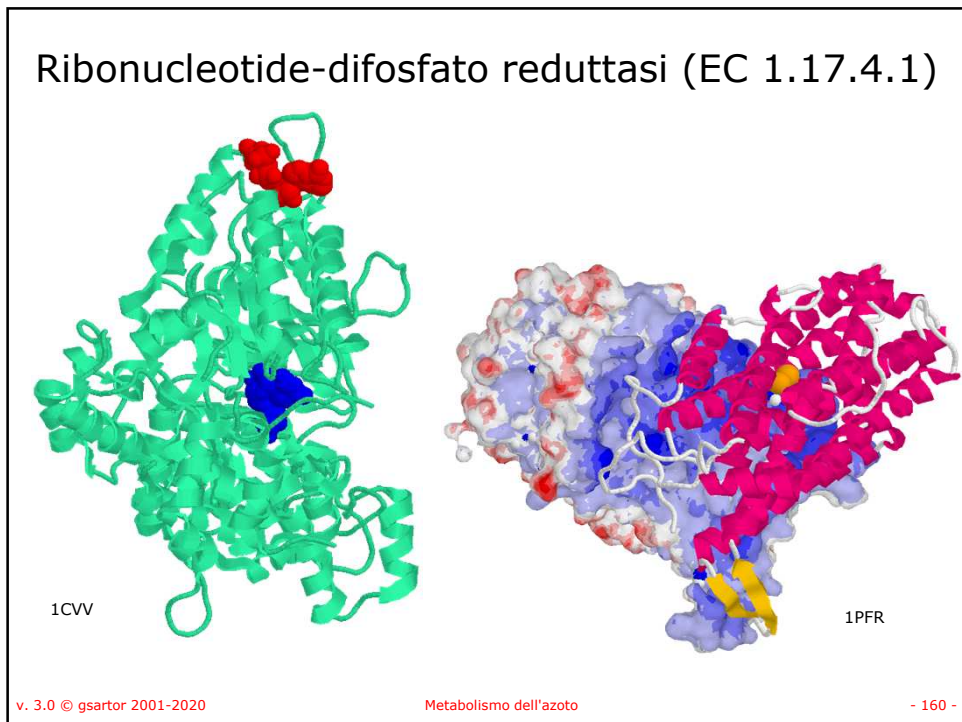
157



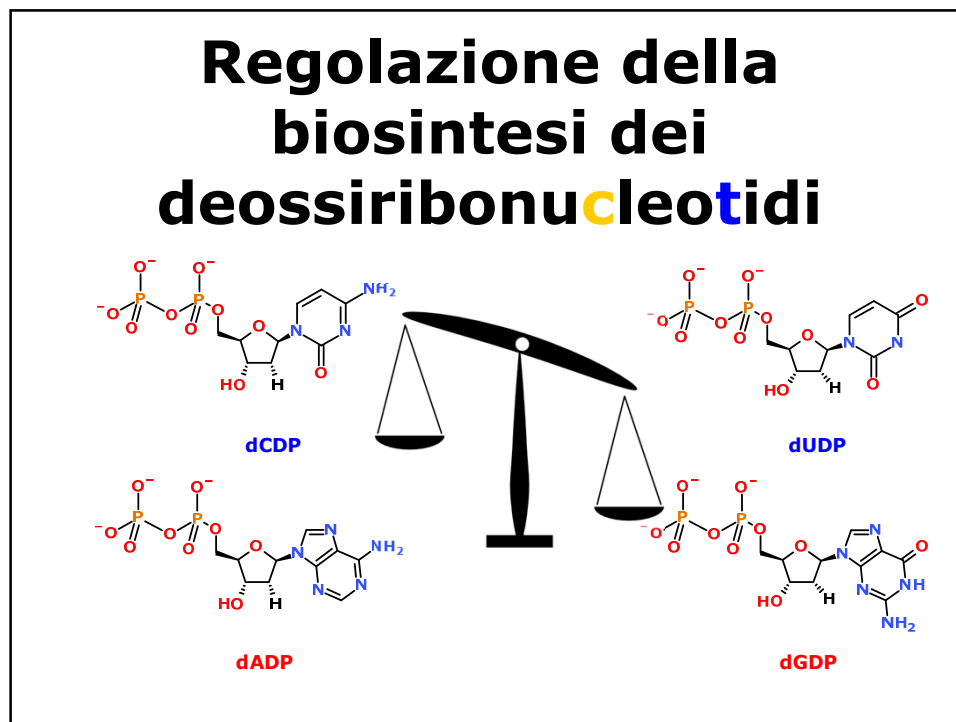
158



159



160



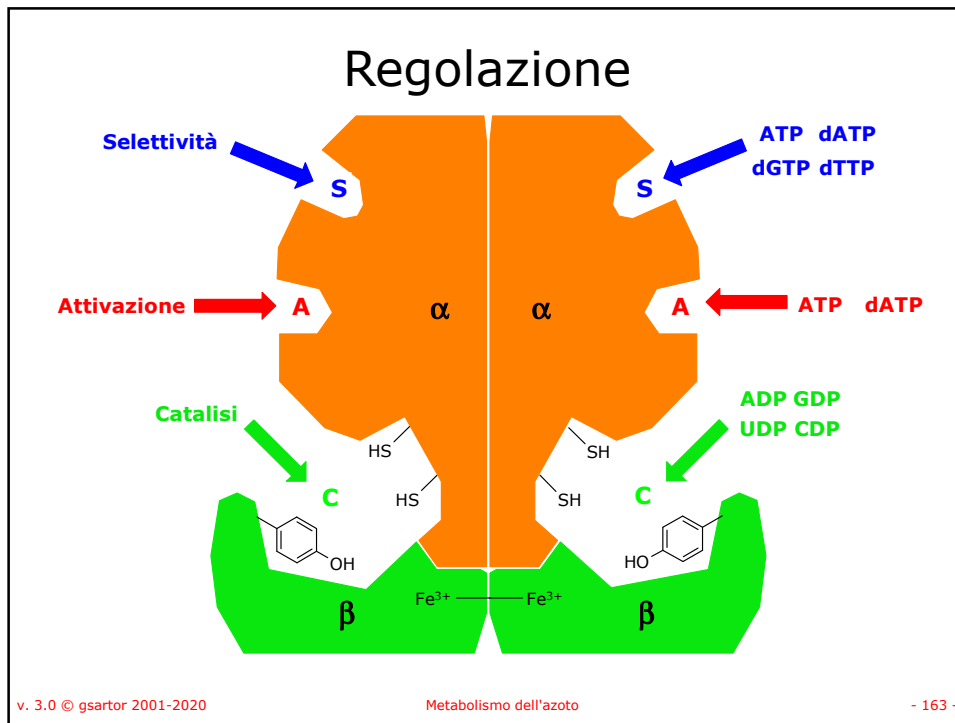
161

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.

The diagram illustrates the biochemical pathway for the synthesis of deoxythymine triphosphate (dTTP) and its inhibitory effect on DNA synthesis. It shows the conversion of AMP to dAMP by EC 3.5.4.6 AMP deaminasi, which is inhibited (indicated by a red circle with a slash). dAMP is then phosphorylated by nucleoside kinases to dATP. The resulting dATP pool is shown to be significantly larger than the ATP pool, leading to the inhibition of the synthesis of other deoxyribonucleotides (dGTP, dCTP, dTTP) by competing for the same nucleoside kinases.

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

175

Tioredossina

- **Meccanismo:**

The diagram depicts the thioredoxin cycle. Thioredoxin (SH-SH) is reduced to thioredoxin diphosphate (dNDP) by ribonucleotide diphosphate reductase (RNR), a reaction that consumes NADPH + H⁺ and produces NADP⁺. The oxidized form of thioredoxin (S-S) is then regenerated to its active form (SH-SH) by thioredoxin reductase (TrxR), which uses FADH₂ as a cofactor and produces FAD. The cycle is shown as a continuous loop where thioredoxin acts as a reducing agent for various cellular processes.

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
Tioredoxina reductasi

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

177

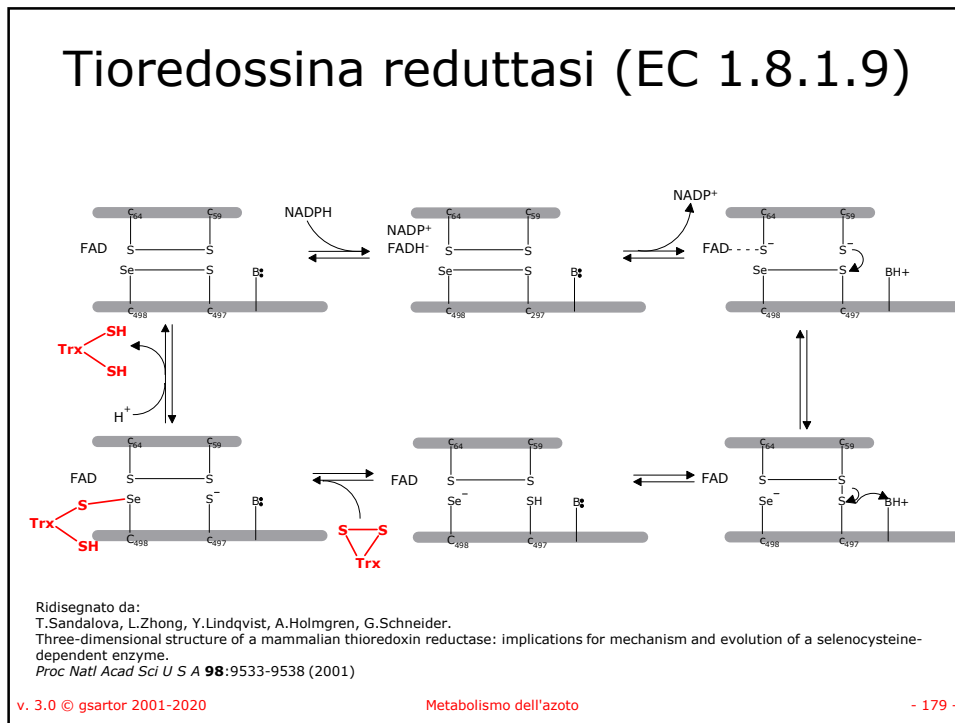
Tioredoxina reductasi (EC 1.8.1.9)

- Meccanismo:

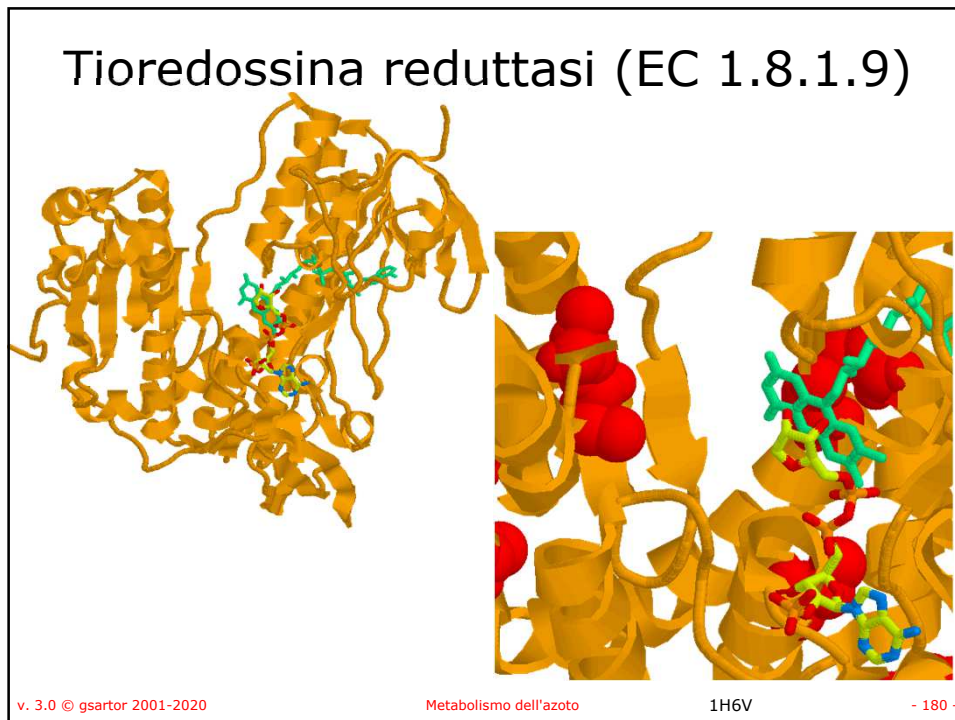
Ribonucleotide-difosfato reductasi Tioredoxina Tioredoxina reductasi

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

178

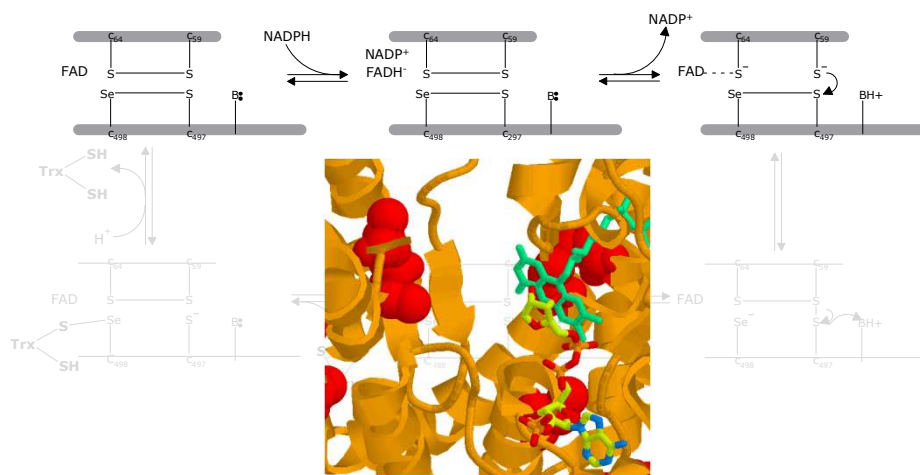


179



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

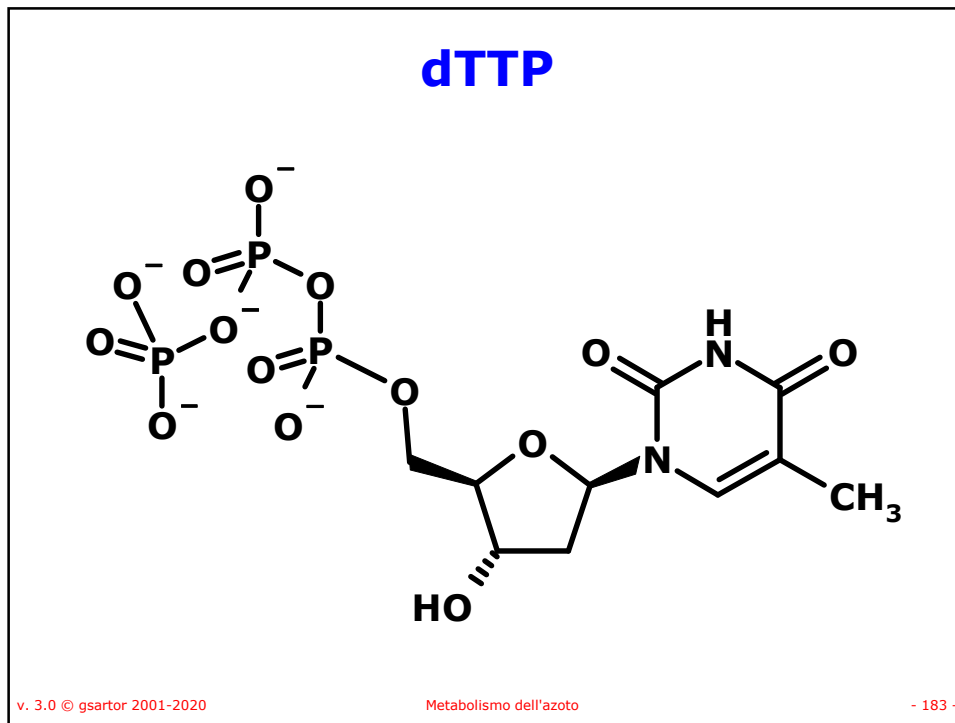
- I deossinucleotidi difosfati
 - Purinici: **dADP**, **dGDP**
 - Pirimidinici: **dUDP**, **dCDP**
- vengono convertiti nei rispettivi deossinucleotidi trifosfati usati per la replicazione del DNA:
 - Purinici: **dATP**, **dGTP**
 - Pirimidinici: **dUTP**, **dCTP**
- Il **dTTP** viene prodotto da **dTMP**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

v. 3.0 © gsartor 2001-2020

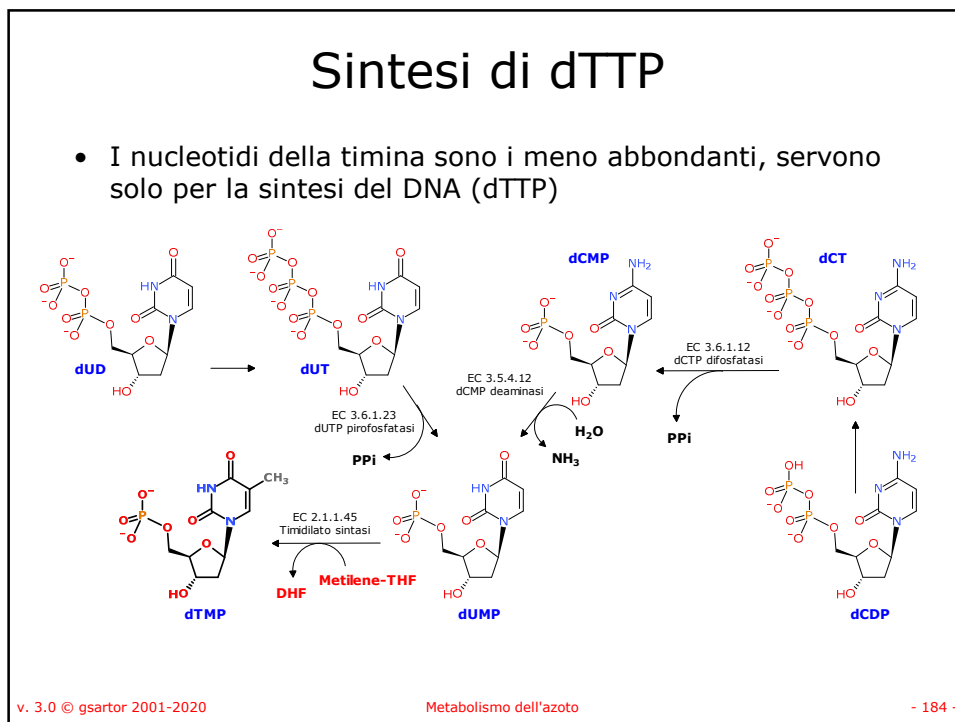
Metabolismo dell'azoto

- 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).

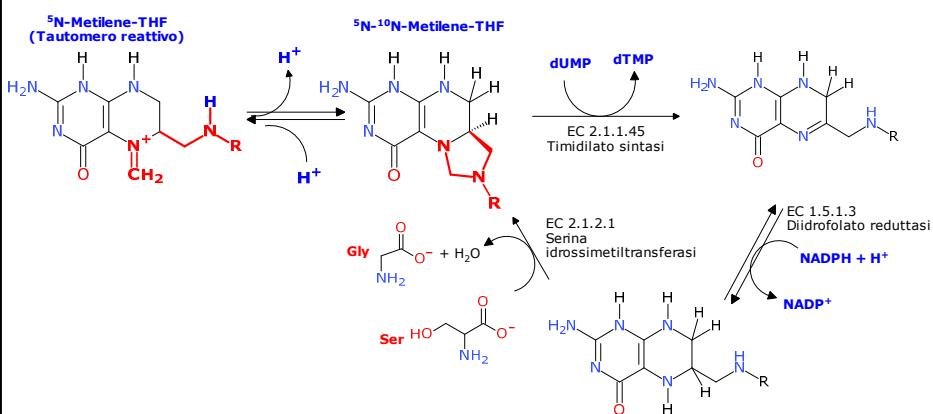
v. 3.0 © gsartor 2001-2020

Metabolismo dell'azoto

- 185 -

185

⁵N-¹⁰N-metilene-THF

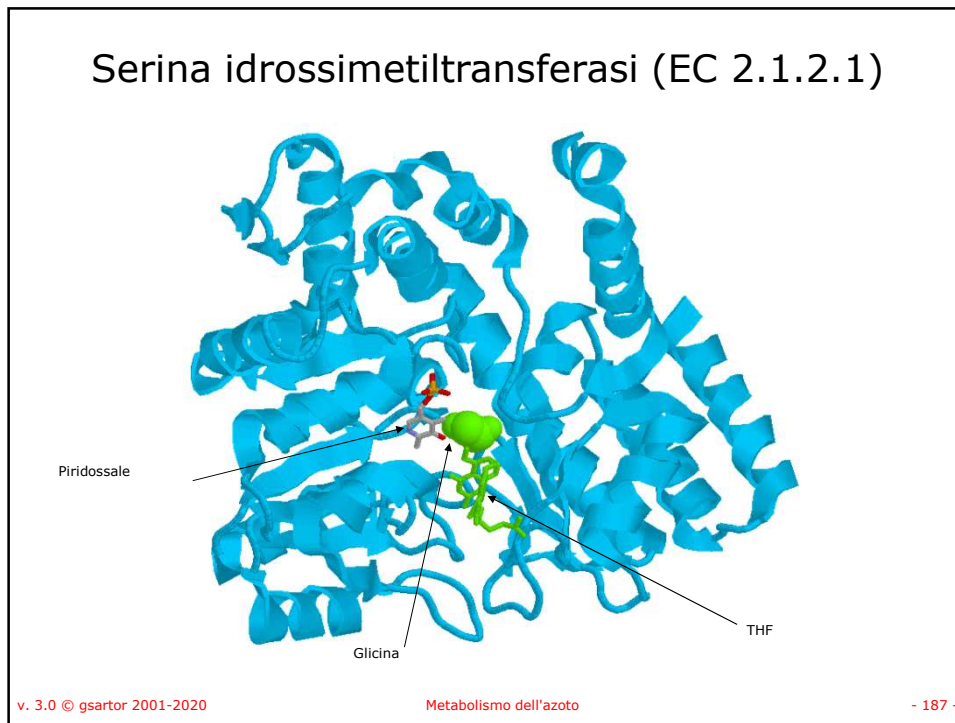


v. 3.0 © gsartor 2001-2020

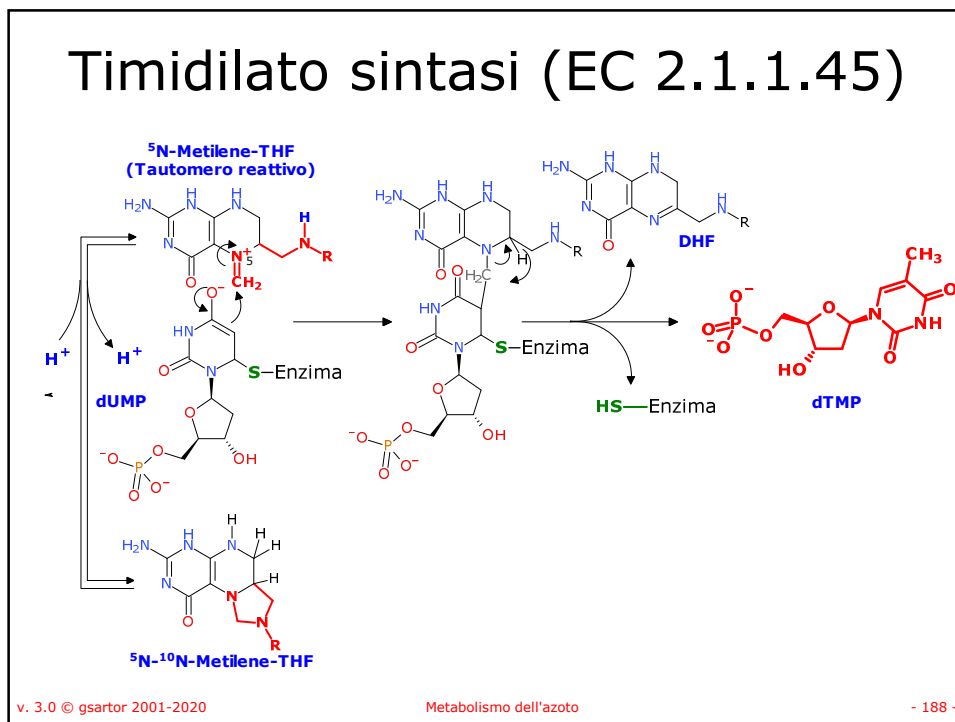
Metabolismo dell'azoto

- 186 -

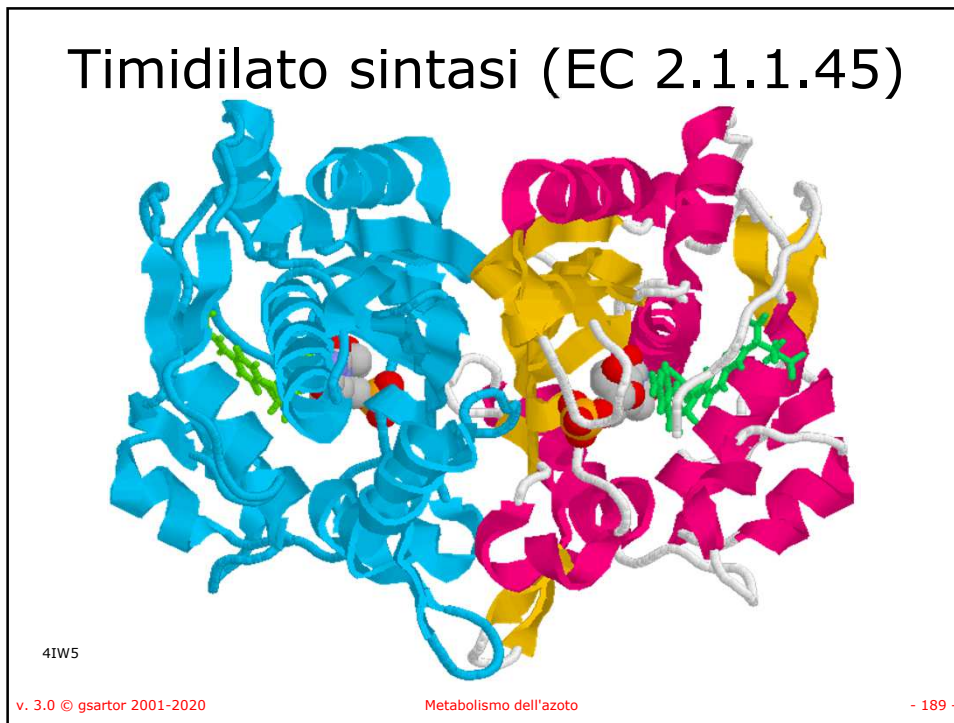
186



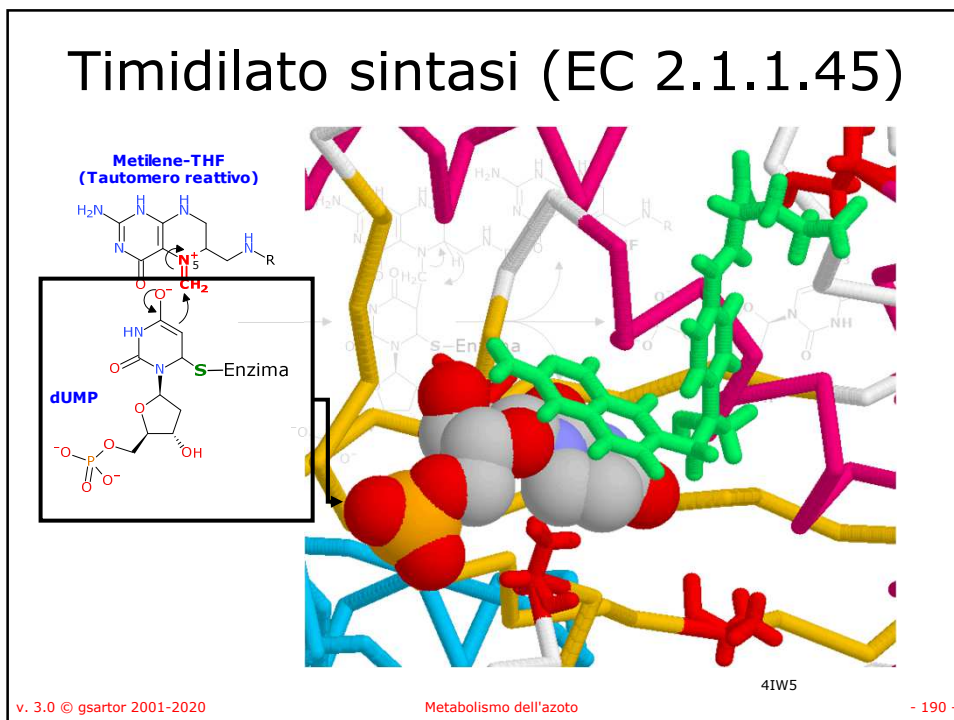
187



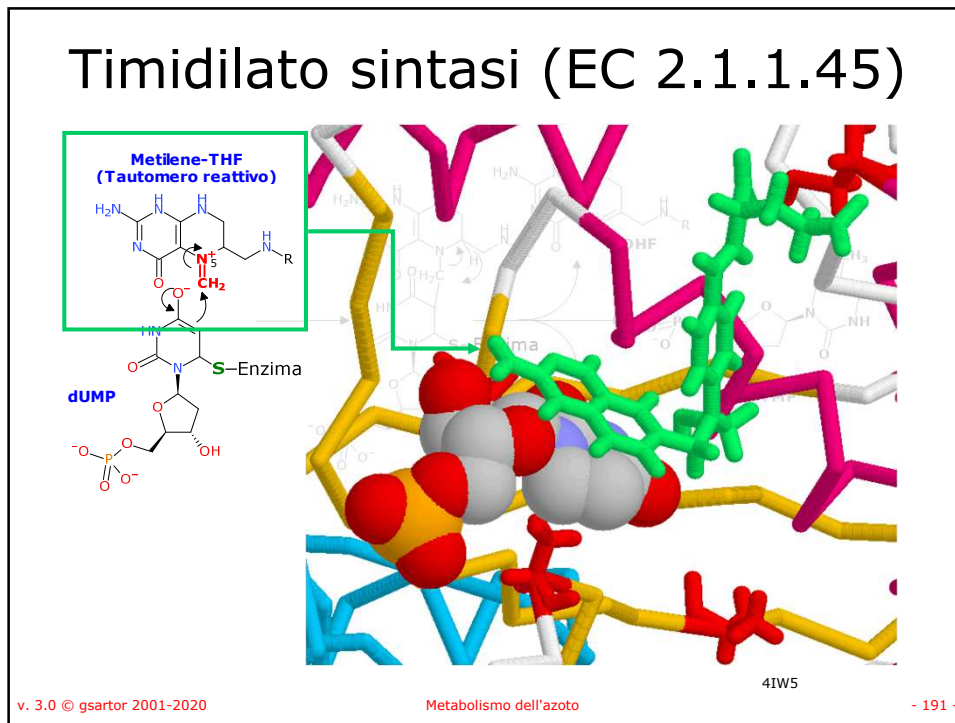
188



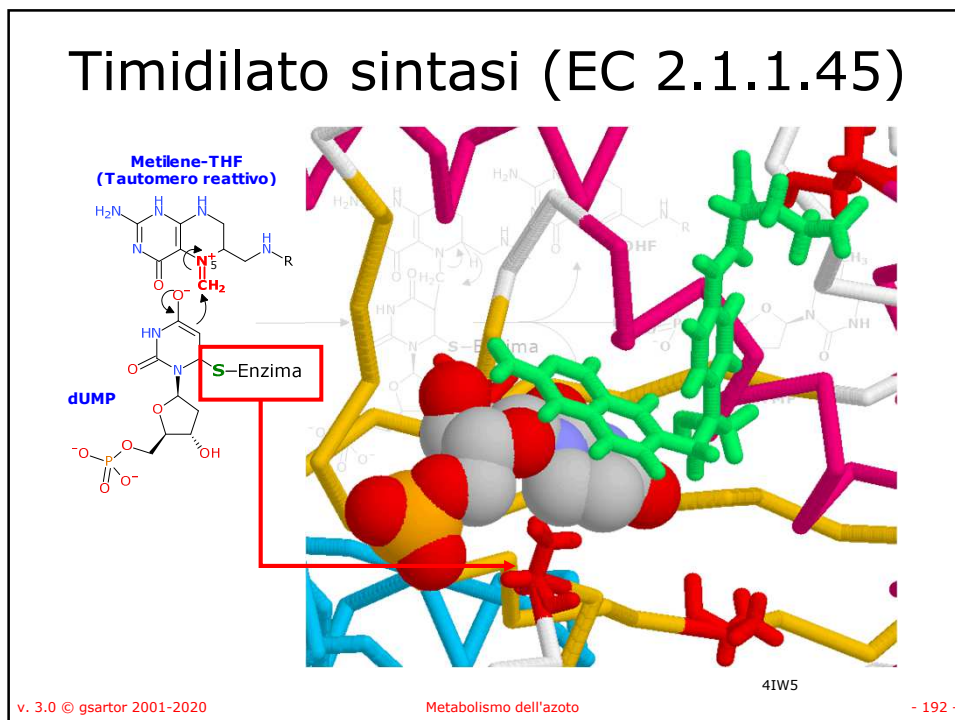
189



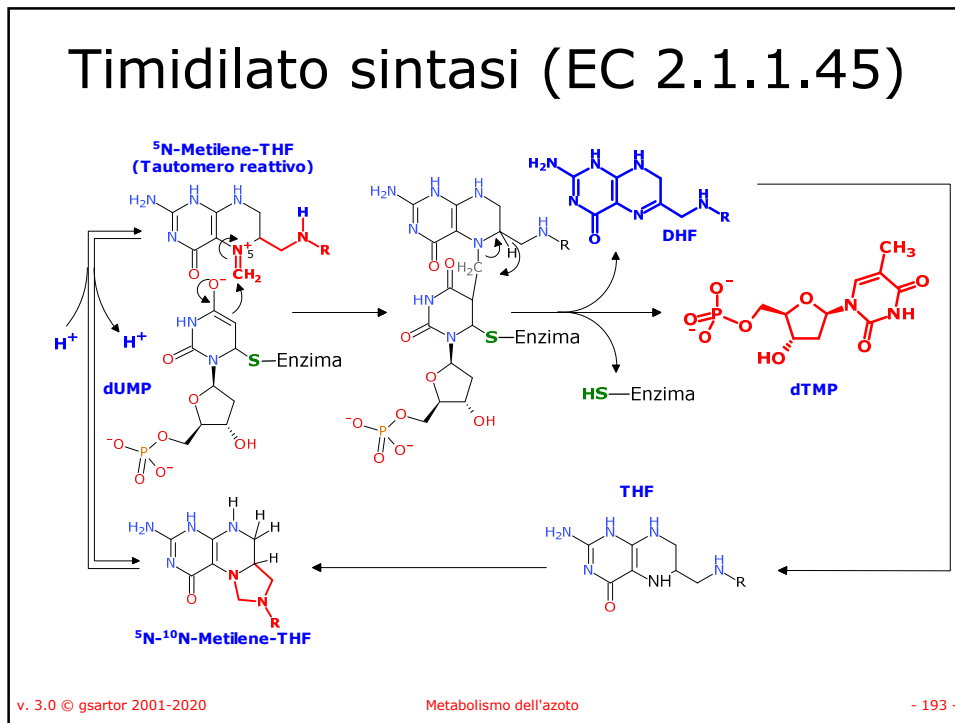
190



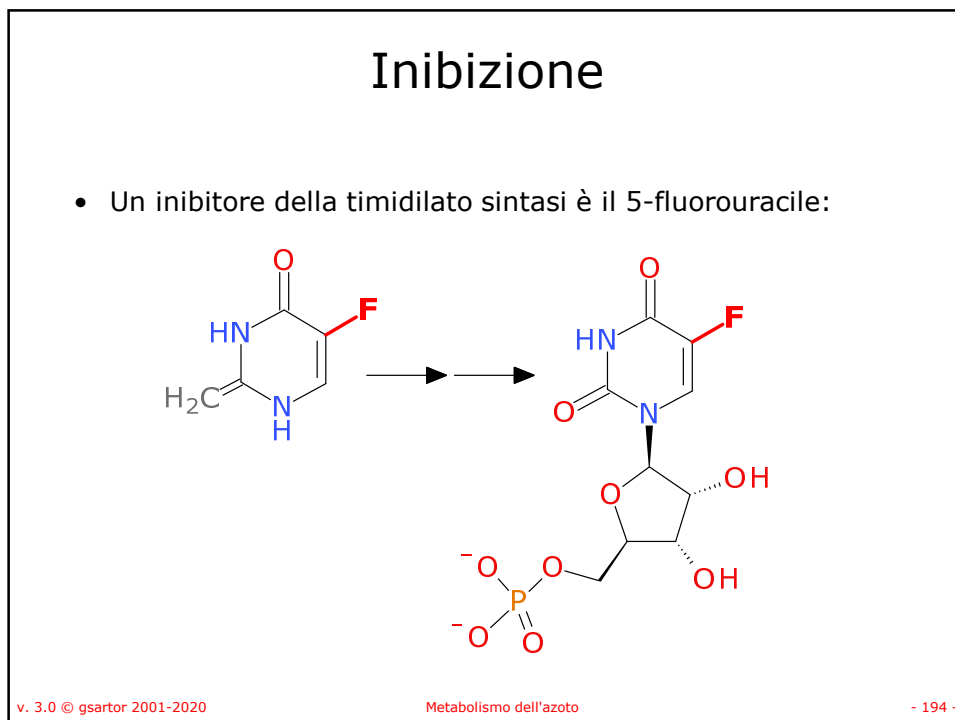
191



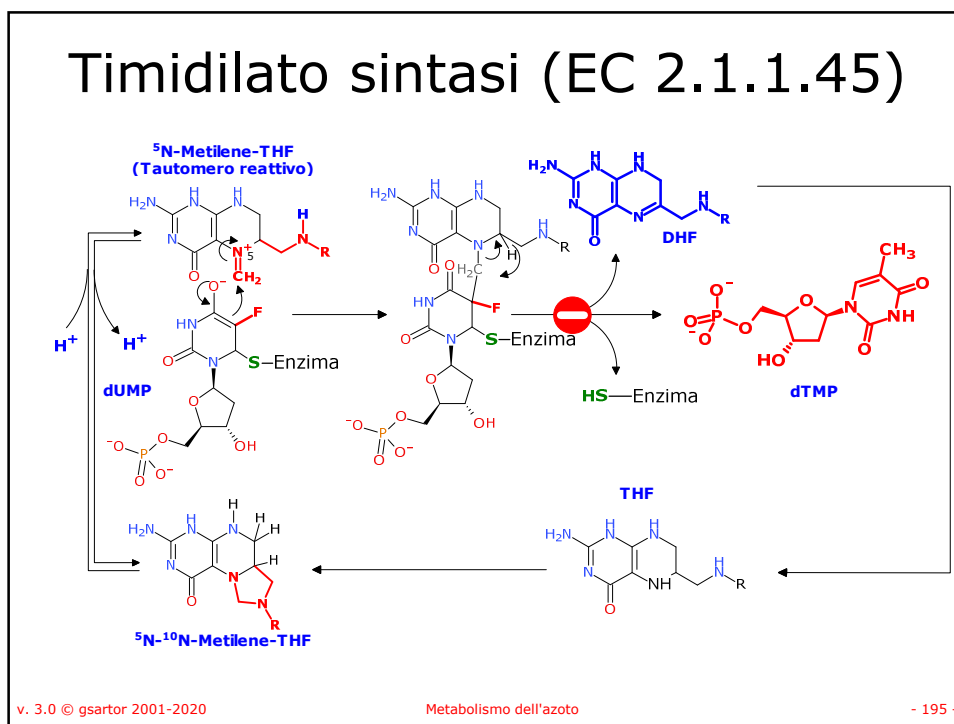
192



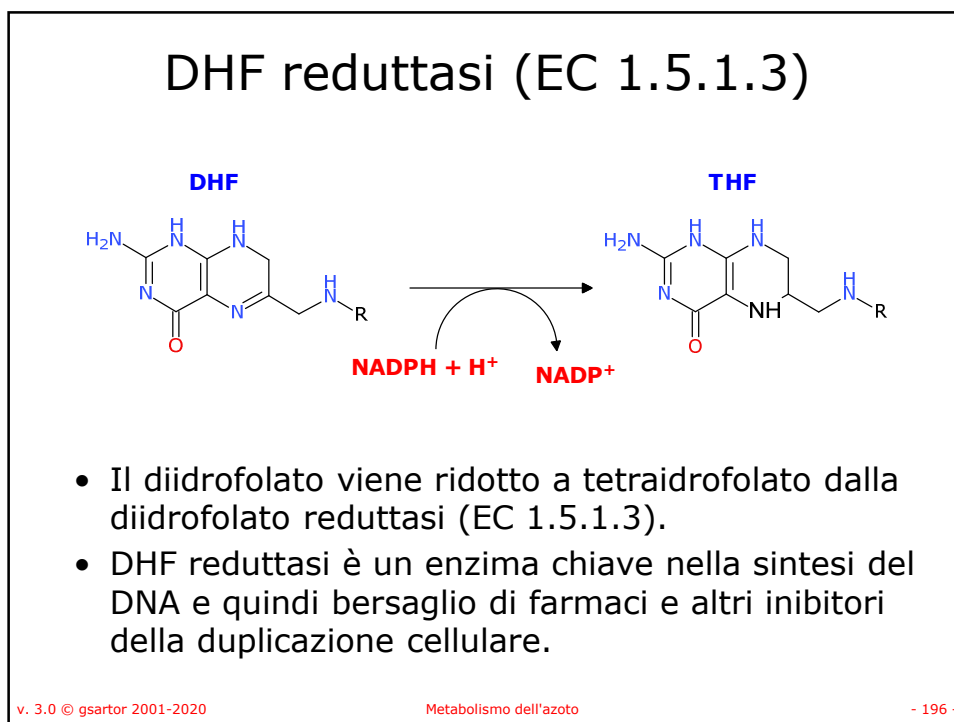
193



194



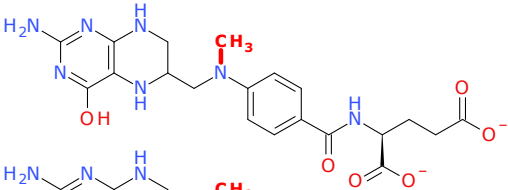
195



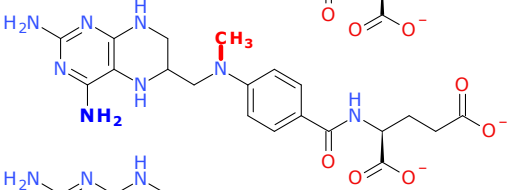
196

Inibizione DHFR

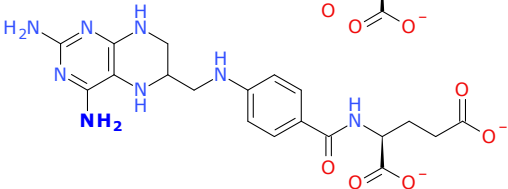
- Antagonisti dell'acido folico



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