



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus.

Metabolismus nukleotidů (13).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

Funkce a struktura nukleotidů. CZIF/07/2.2.00/28.0171

Biosyntéza pyrimidinových nukleotidů.

Katabolismus pyrimidinových nukleotidů.

Recyklace bází.

Biosyntéza a recyklace purinových nukleotidů.

Biosyntéza deoxyribonukleotidů.

Tvorba thymidylátu.

Regulace biosyntézy nukleotidů.

Katabolismus purinových nukleotidů.

Xanthinoxidasa.

Biosyntéza NAD⁺, FAD a CoA z ATP.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Funkce a význam nukleotidů.

Nukleotidy jsou klíčové molekuly vstupující do řady životních procesů.

Nukleotidy jsou aktivované prekurzory nukleových kyselin.

Adeninový nukleotid, adenosintrifosfát (ATP) je univerzální energetické platidlo.

Guaninový nukleotid, GTP, je také nositelem energie a součástí regulačních G proteinů.

Deriváty nukleotidů jako je UDP-glukosa se podílí na biosyntéze, např. glykogenu.

Nukleotidy jsou součástí přenosu signálů v signálních drahách.

Nomenklatura bází, nukleosidů a nukleotidů.

RNA (ribonukleové kyseliny)

Báze	Ribonukleosid	Ribonukleotid (5' -monofosfát)
Adenin (A)	Adenosin	Adenylát (AMP)
Guanin (G)	Guanosin	Guanylát (GMP)
Uracil (U)	Uridin	Uridylát (UMP)
Cytosin (C)	Cytidin	Cytidylát (CMP)

DNA (deoxyribonukleové kyseliny)

Báze	Deoxyribonukleosid	Deoxyribonukleotid (5' -monofosfát)
Adenin (A)	Deoxyadenosin	Deoxyadenylát(dAMP)
Guanin (G)	Deoxyguanosin	Deoxyguanylát (dGMP)
Thymin (T)	Thyminidin	Thymidylát (TMP)
Cytosin (C)	Deoxycytidin	Deoxycytidylát(dCMP)

Metabolické dráhy vedoucí k biosyntéze nukleotidů.

Metabolické dráhy biosyntézy nukleotidů dělíme do dvou skupin:

De novo dráhy - biosyntéza z jednoduchých prekurzorů.

Záchranné (salvage) dráhy - recyklovaná báze se znovu spojuje s ribosou. PRPP = 5-fosforibosyl-1-difosfát (pyrofosfát).

Záchranná dráha

Aktivovaná ribosa (PRPP) + báze



NUKLEOTID

De novo biosyntéza

Aktivovaná ribosa (PRPP)
+ aminokyseliny + ATP + CO₂ +



NUKLEOTID

Biosyntéza pyrimidinových nukleotidů.

Princip: První je syntetizován pyrimidinový kruh a poté je připojena ribosafosfát za tvorby pyrimidinového nukleotidu.

Pyrimidinový kruh je syntetizován z hydrogenuhličitanu, aspartátu a amoniaku.

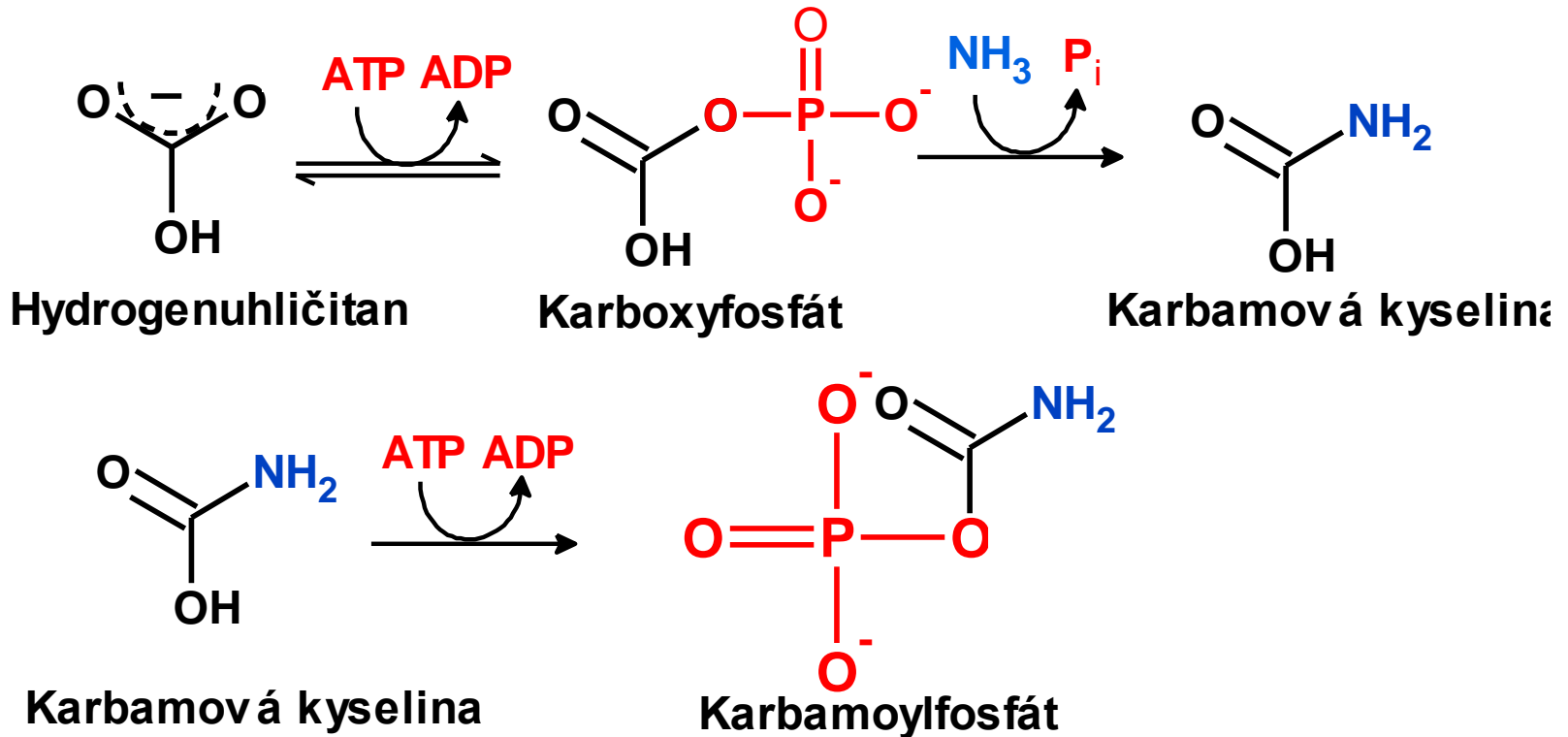
Amoniak je produkován hydrolýzou glutaminu.

První stupeň: Syntéza karbamoylfosfátu - z hydrogenuhličitanu a amoniaku za současného štěpení dvou molekul ATP.

Enzym: **karbamoylfosfátsynthetasa (CPS)**. Reakce je dvoustupňová. V první stupni je fosforylovaný hydrogenuhličitan ATP za tvorby karboxyfosfátu a ADP. Amoniak poté reaguje s karboxyfosfátem za tvorby kyseliny karbamové a anorganického fosfátu.

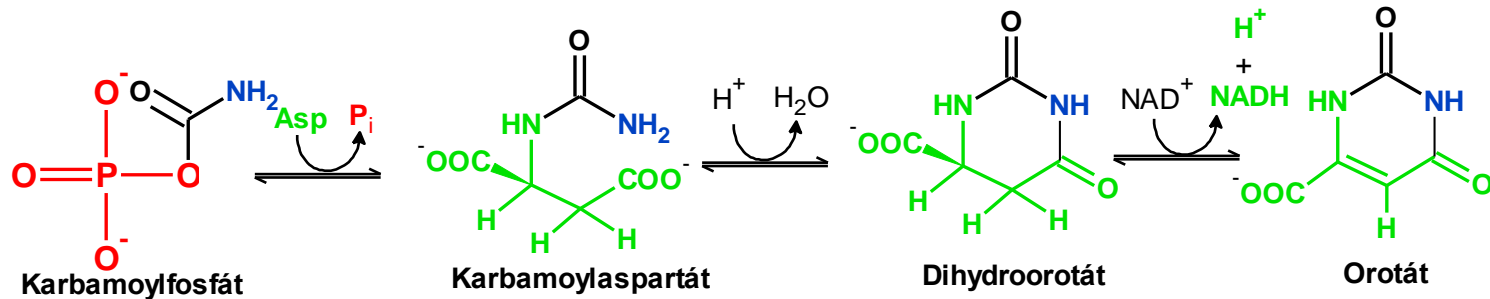
Druhý stupeň: katalýza **karbamoylfosfátsynthetasa**, vstupuje druhá molekula ATP za tvorby karbamoylfosfátu.

Tvorba karbamoylfosfátu. Enzym: Karbamoylfosfátsynthetasa



Tvorba orotátu a uridylátu.

Karbamoylfosfát reaguje s aspartátem za tvorby karbamoylaspartátu v reakci katalyzované **aspartáttrankarbamoylasou**. Karbamoylfosfát se poté cyklizuje za tvorby dihydroorotátu, který je oxidován NAD^+ na orotát.



Tvorba orotátu a uridylátu.

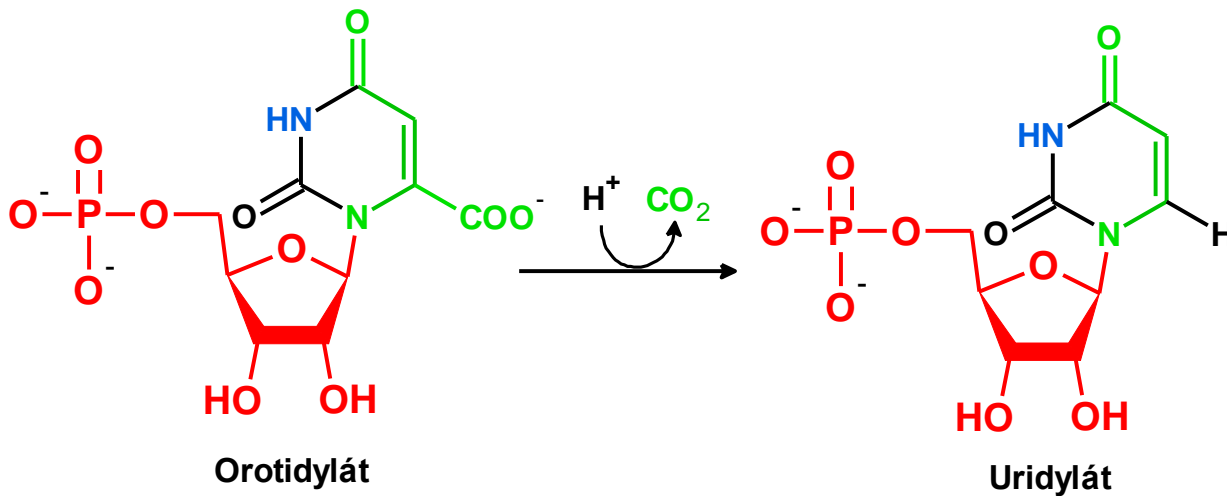
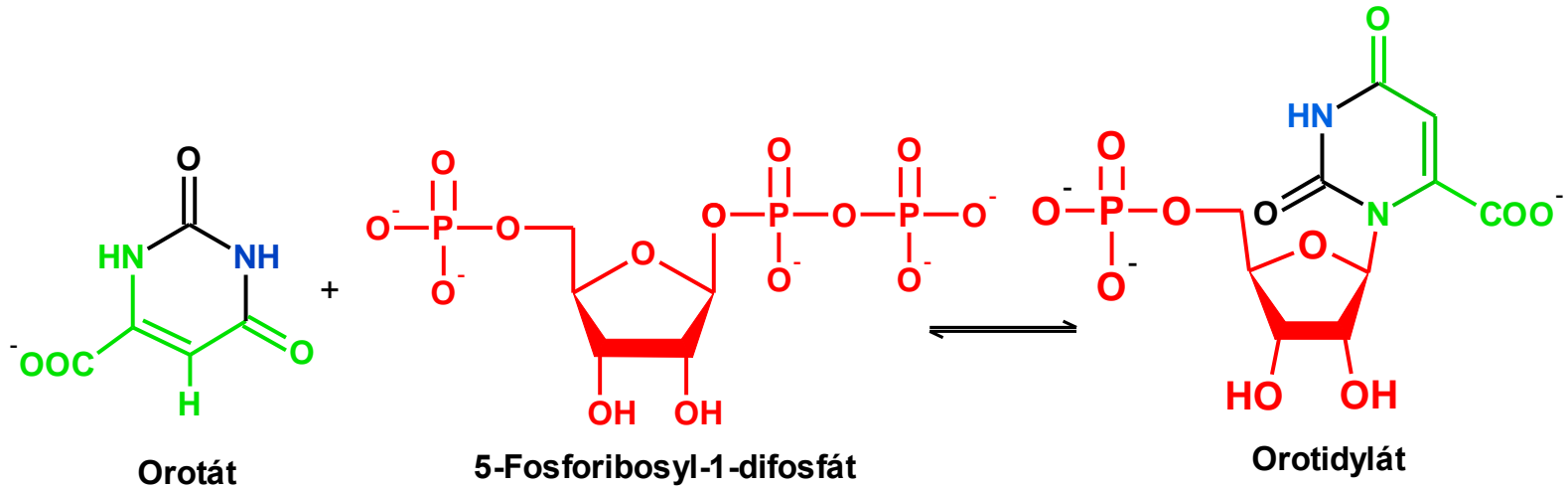
Na tomto stupni se na orotát váže ribosa ve formě 5-fosforibosyl-1-difosfát (PRPP). Aktivní forma ribosy pro tvorbu nukleotidů.

Ribosa-5-fosfát má původ v pentosafosfátové dráze - PRPP je syntetisován za účasti synthetasy a ATP.

Orotát reaguje s PRPP za tvorby orotidylátu, pyrimidinového nukleotidu. Reakce je poháněna hydrolýzou difosfátu.

Posledním stupněm je dekarboxylace orotidylátu za tvorby uridylátu - enzymem **orotidylátdekarboxylasou**.

Tvorba orotátu a uridylátu.



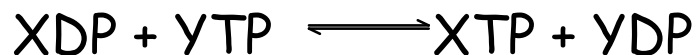
Nukleotid mono-, di- a trifosfáty jsou vzájemně převoditelné.

Uridylát (UMP) je základním nukleotidem pro syntézy ostatních pyrimidinových nukleotidů.

V první řadě musí být převeden na uridintrifosfát (UTP). Děje se tak postupně. Enzym: UMPkinasa.



Dále enzym: nukleosiddifosfátkinasa.



Uridintrifosfát (UTP) je prekurzorem tvorby cytidintrifosfátu (CTP).

Dochází k záměně oxoskupiny za aminoskupinu. Enzym: [cytidintrifosfátsynthetasa](#).

Reaktanty jsou ATP a glutamin jako zdroj aminoskupiny (obdoba syntézy karbamoylfosfátu).

Záchranná dráha recyklace bází.

Důležitá je např. záchrana pyrimidinové báze thyminu, který je součástí nukleotidu v DNA.

Thymin uvolněný z DNA je recyklován ve dvou stupních:

Enzym: **thymidinfosforylasa**

Thymin + deoxyribosa-1-fosfát \rightleftharpoons thymidin + P_i

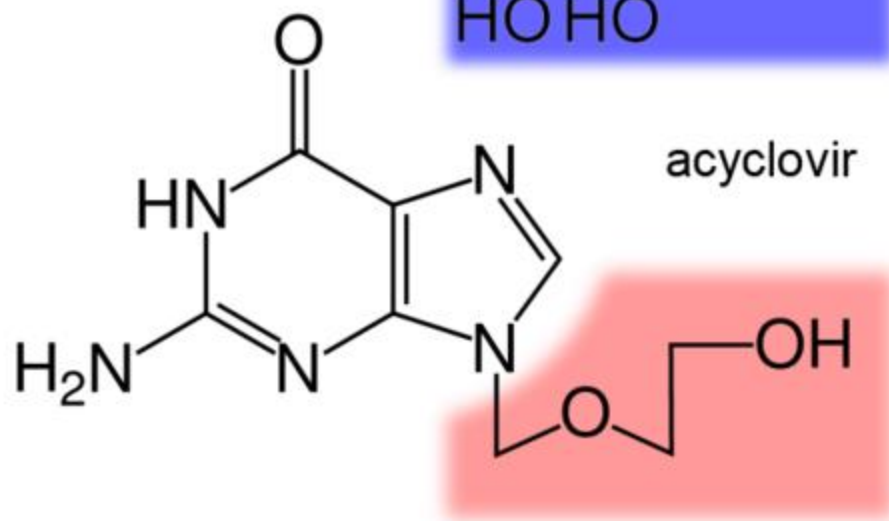
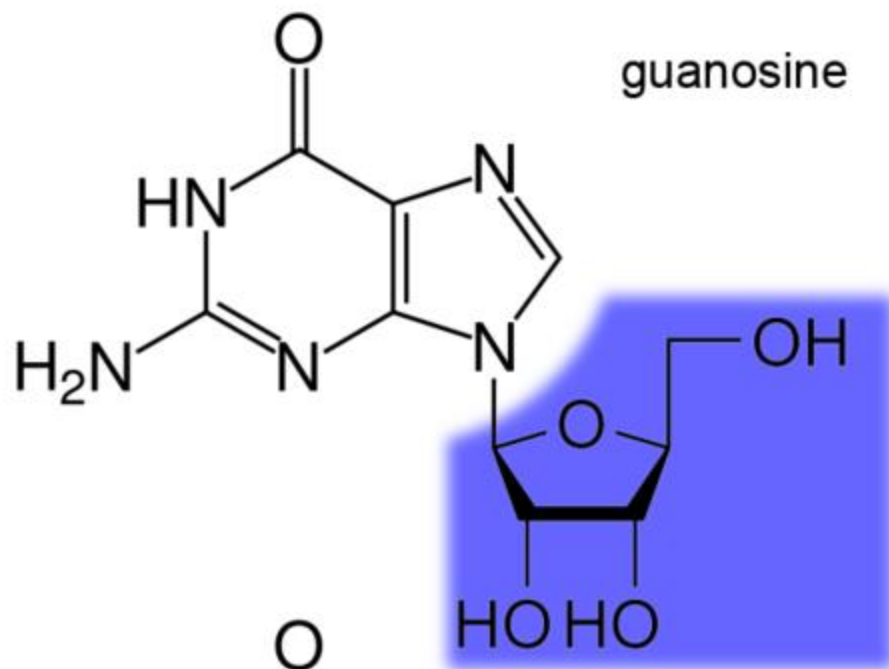
Enzym: **thymidinkinasa**

Thymidin + ATP \rightleftharpoons TMP + ADP

Aktivita thymidinkinasy se mění s buněčným cyklem. Využívá se terapeuticky.

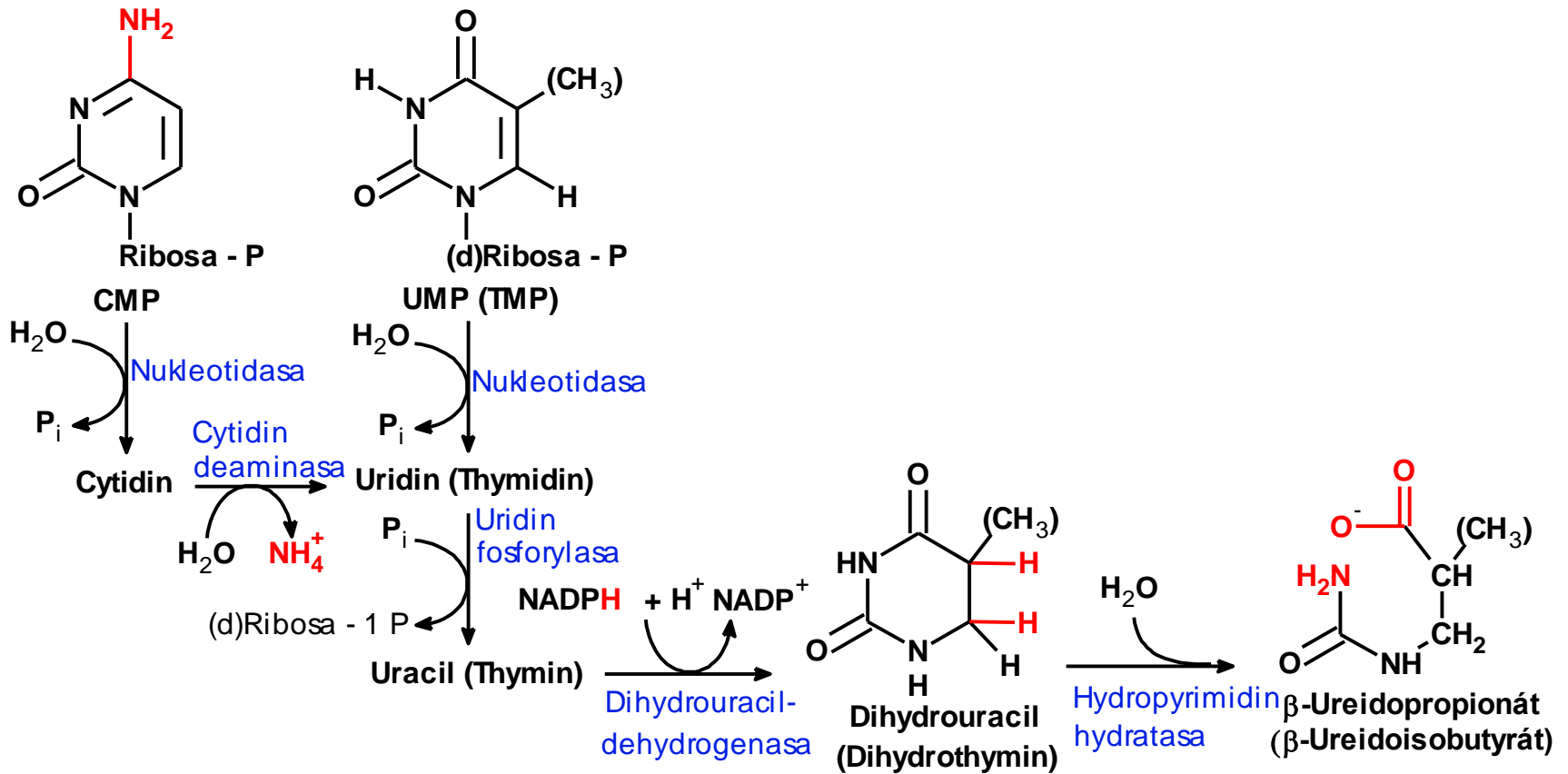
Např. virální infekce herpes simplex se léčí acyclovirem, který převádí thymidinkinasu na sebevražedný inhibitor, který ukončuje DNA syntézu.

Acyclovir. Nevytváří vazbu A - T.



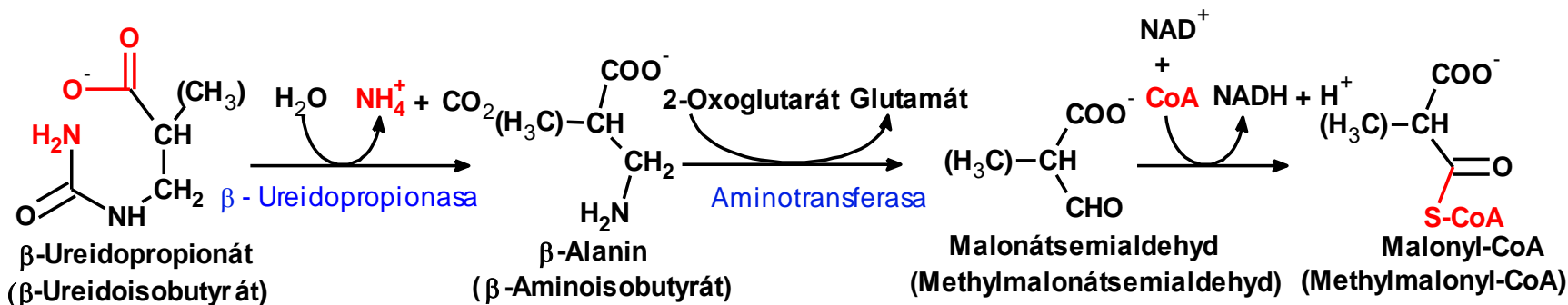
Hlavní dráhy katabolismu pyrimidinových nukleotidů u živočichů.

(Odbourávání TMP je v závorkách).



Hlavní dráhy katabolismu pyrimidinů u živočichů.

Malonyl-CoA je prekurzorem syntézy mastných kyselin a methylmalonyl-CoA je převeden na sukcinyl-CoA, viz CC.



Biosyntéza a záchrana purinových nukleotidů.

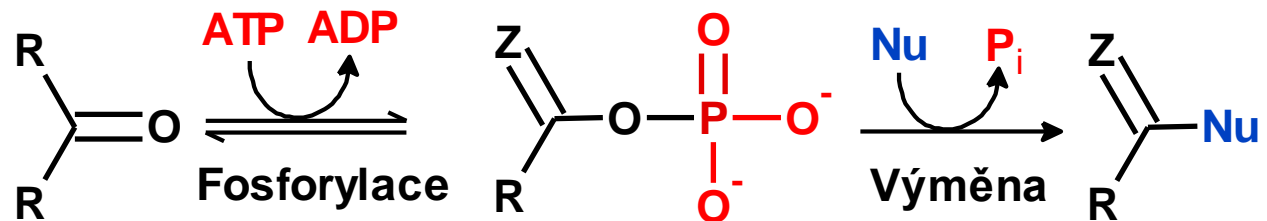
Purinové nukleotidy mohou být syntetizovány de novo nebo recyklací zachráněny.

Syntéza de novo.

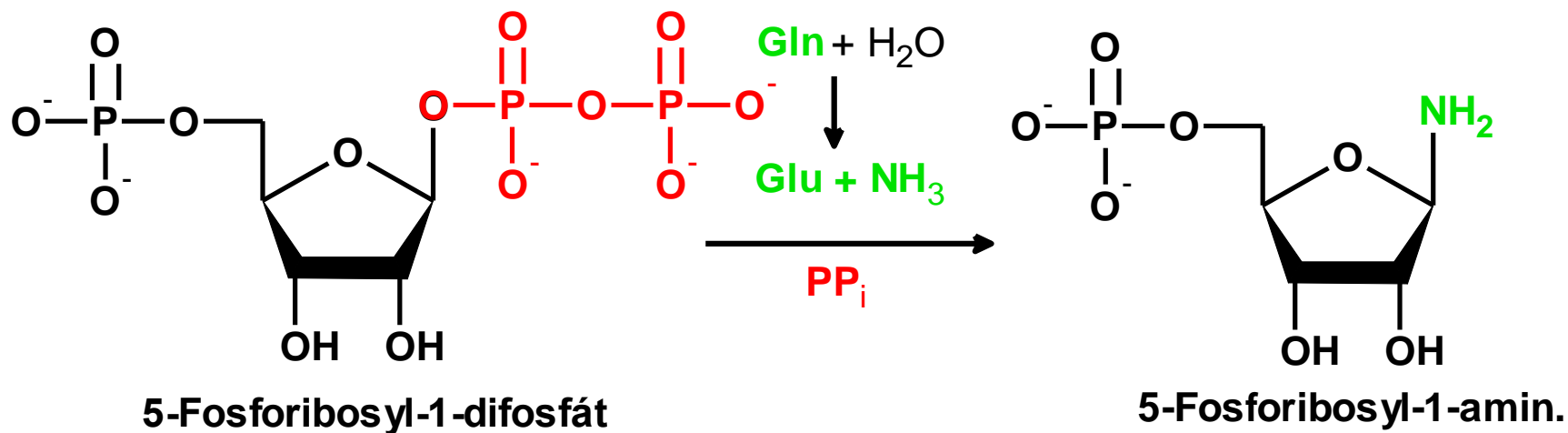
Princip: Purinový skelet je budován na ribose = PRPP postupně po malých molekulárních částech. Biosyntéza probíhá v devíti stupních.

Většina těchto stupňů je katalyzována enzymy se záchytnou doménou pro ATP.

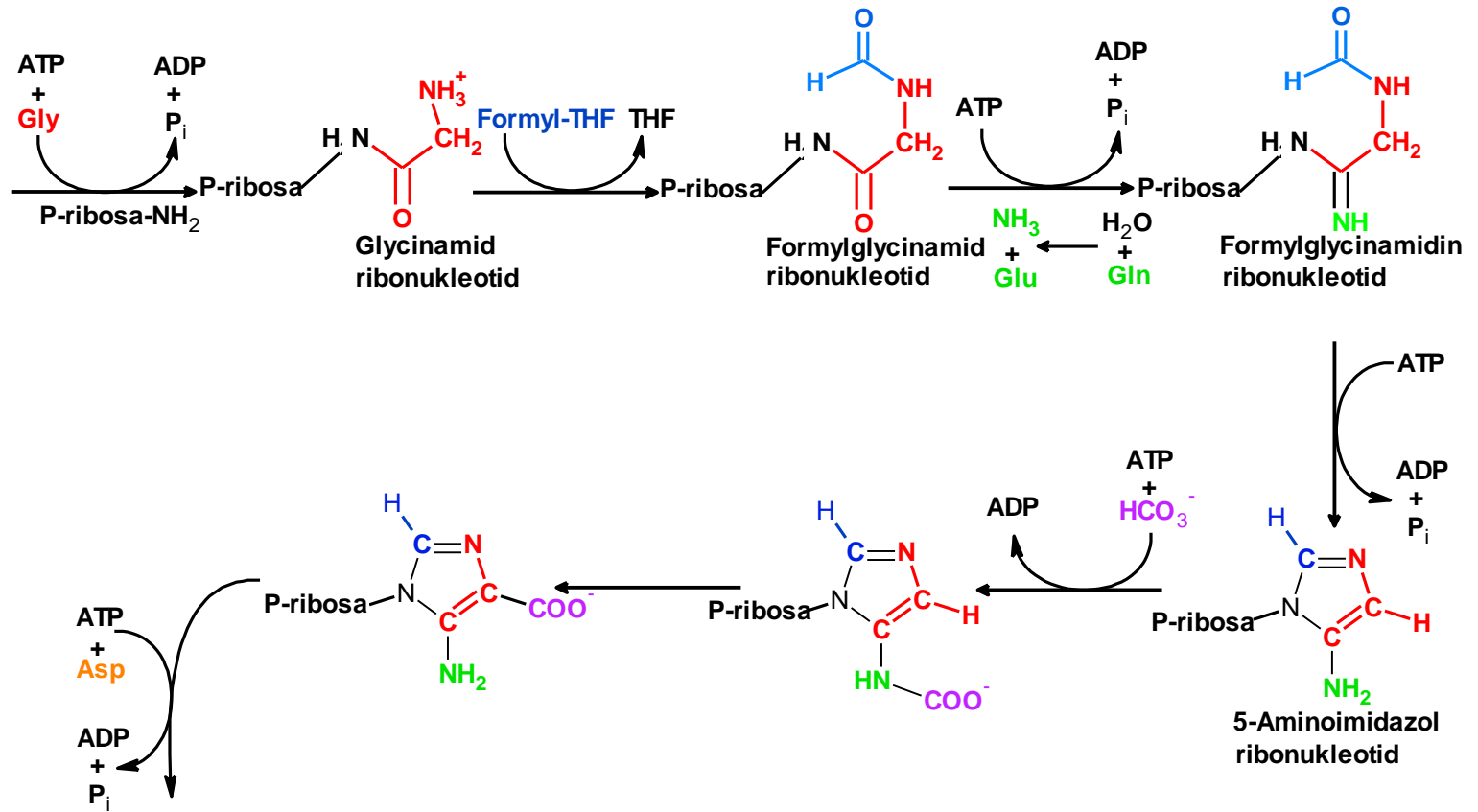
Nejdříve dochází k aktivaci na vazbě uhlík - kyslík (typicky karbonyový kyslík) fosforylací a poté následuje náhrada fosforylové skupiny amoniakem nebo aminoskupinou, které působí jako nukleofil.



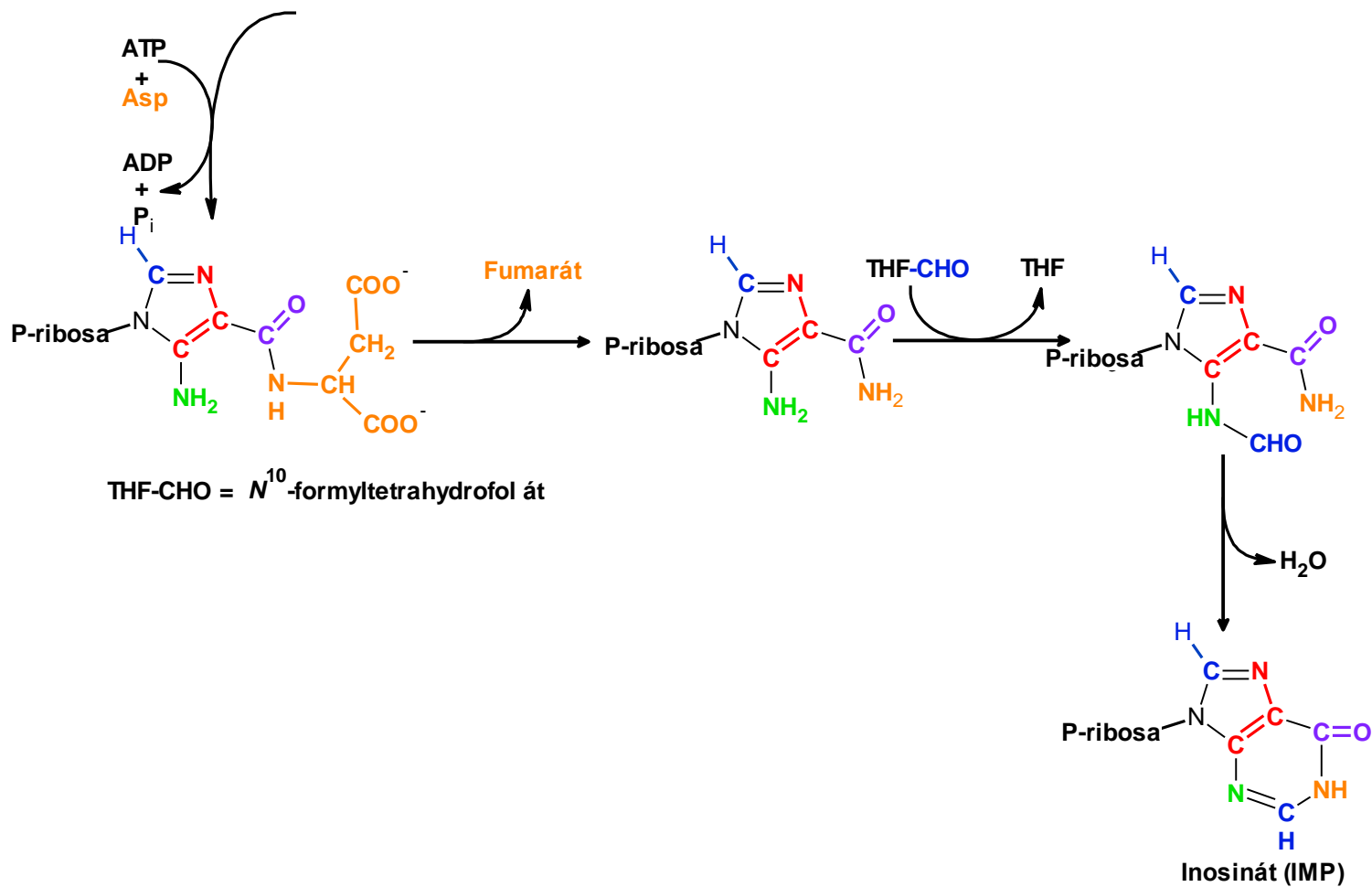
Biosyntéza purinových nukleotidů.



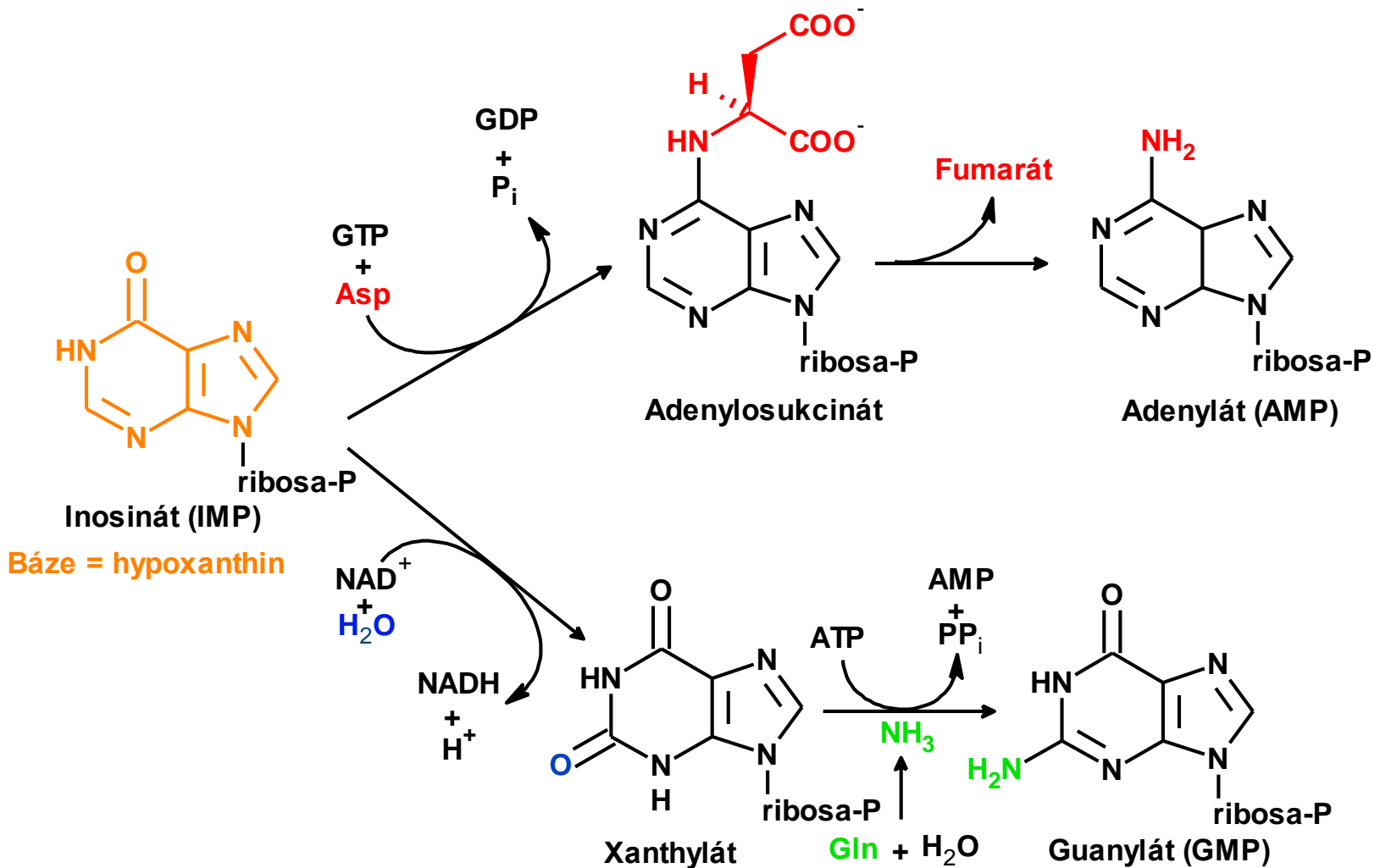
Biosyntéza purinových nukleotidů.



Biosyntéza purinových nukleotidů.



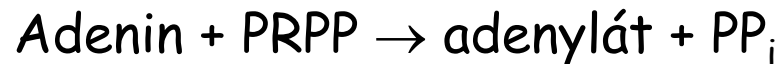
Biosyntéza AMP a GMP z inosinátu (IMP).



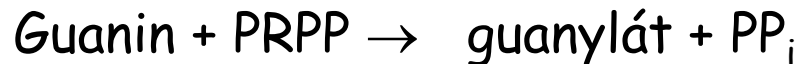
Záchranná recyklace purinů.

Do syntézy purinoviných nukleotidů de novo je třeba investovat mnoho energie ve formě ATP. Proto je velmi výhodné pro organismus recyklovat purinové báze z odbouraných nukleových kyselina z diety.

Dva významné enzymy recyklace: **Adeninfosforibosyltransferasa** katalyzující tvorbu AMP:



Druhý enzym: **Hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasa** (HGPRT) katalyzuje tvorbu guanylátu (GMP) a inosinátu (IMP). Prekurzory jsou guanylát a adenylát.



Biosyntéza deoxyribonukleotidů redukcí ribonukleotidů (radikálový mechanismus).

Jedná se specifickou redukcí ribonukleotidu v poloze 2' - hydroxyly na ribose.

Substráty jsou ribonukleosiddifosfáty !! Enzym je [ribonukleotidreduktasa](#).

Ribonukleotidreduktasa E. coli je složena ze dvou podjednotek - oba jsou dimery.

Podjednotka R1 obsahuje aktivní místo a dvě allosterická kontrolní místa. Podjednotka obsahuje tři Cys a jeden Glu - všechny čtyři participují na redukcí ribosy na deoxyribosu.

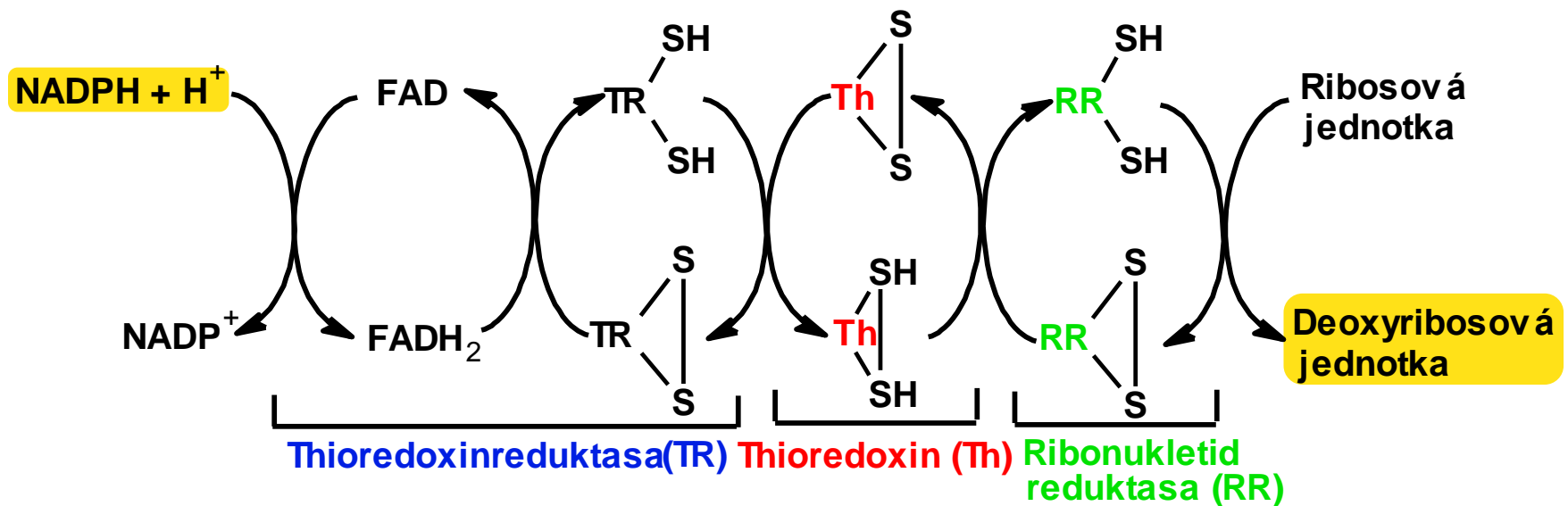
Rolí podjednotky R2 je produkce volných radikálů v obou svých řetězcích.

Každý z řetězců R2 obsahuje stabilní tyrosylový radikál s nepárovým elektronem delokalizovaným na aromatickém kruhu. Radikál je produkován v blízkém centru obsahujícím Fe^{3+} v můstku s iontem O^{2-} .

Přenos elektronů z NADPH na ribosu. (Ribonukletidreduktasa)

Elektrony nutné k redukci pocházejí z NADPH !!

Přestup není přímý, ale přes thioredoxin (12 kD protein se dvěma Cys).



Tvorba thymidylátu methylací deoxyuridylátu.

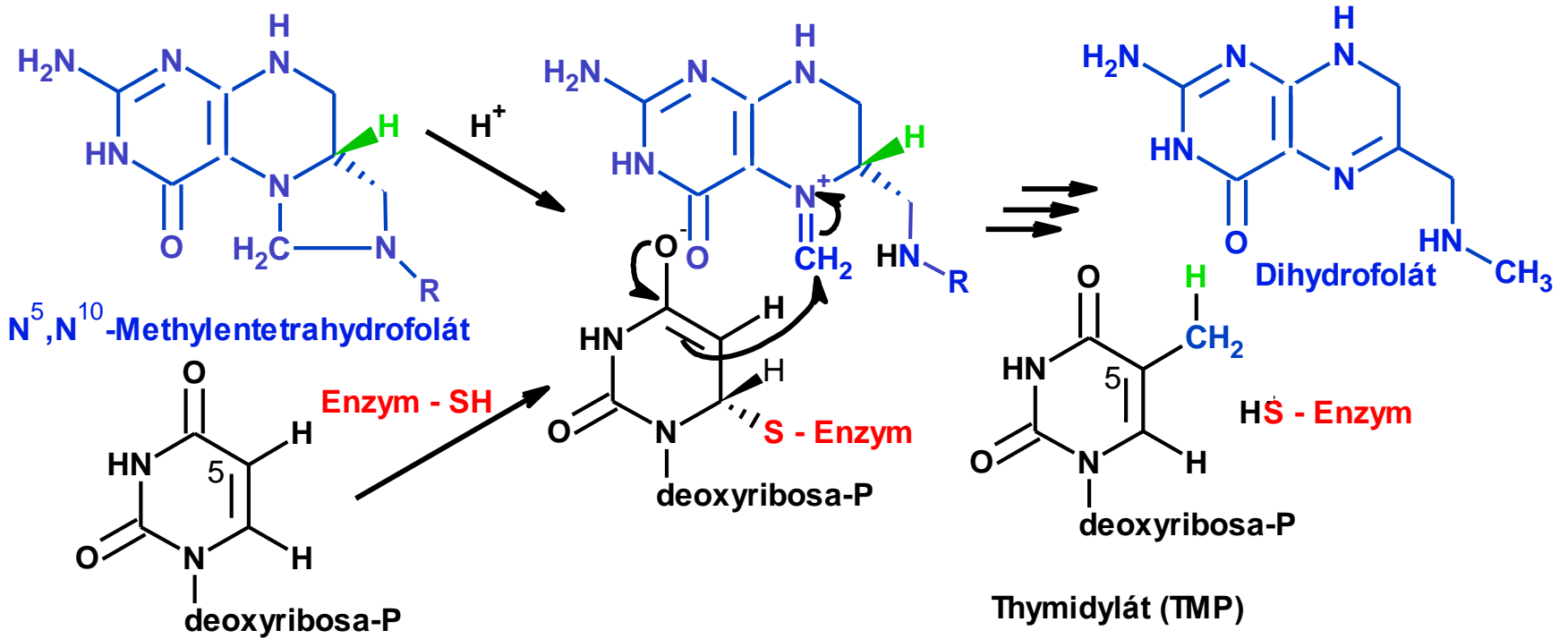
Deoxyribonukleové kyseliny neobsahují uracil, ale thymin.

Thymidylát je syntetizován za katalýzy thymidylátsynthasy :
deoxyuridylát (dUMP) + methyl = thymidylát (TMP).

Donorem methylu je N^5, N^{10} -methylentetrahydrofolát.

dUMP je aktivován vazbou thiolátu enzymu.

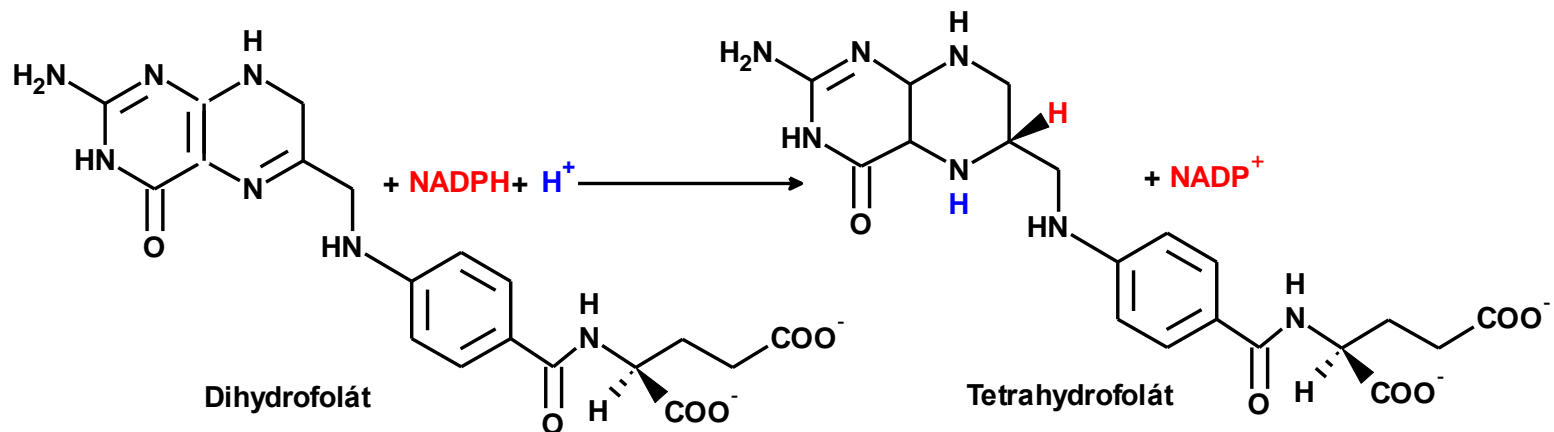
Syntéza thymidylátu (TMP).



Regenerace tetrahydrofolátu za katalýzy dihydrofolátreduktasy.

Při syntéze thymidylátu se uvolňuje dihydrofolát, který je nutné regenerovat.

Regeneraci katalyzuje **dihydrofolátreduktasa** a zdrojem elektronů je NADPH.



Thymidykát syntáza a dihydrofolát reduktáza jako místa působení chemoterapie rakoviny.

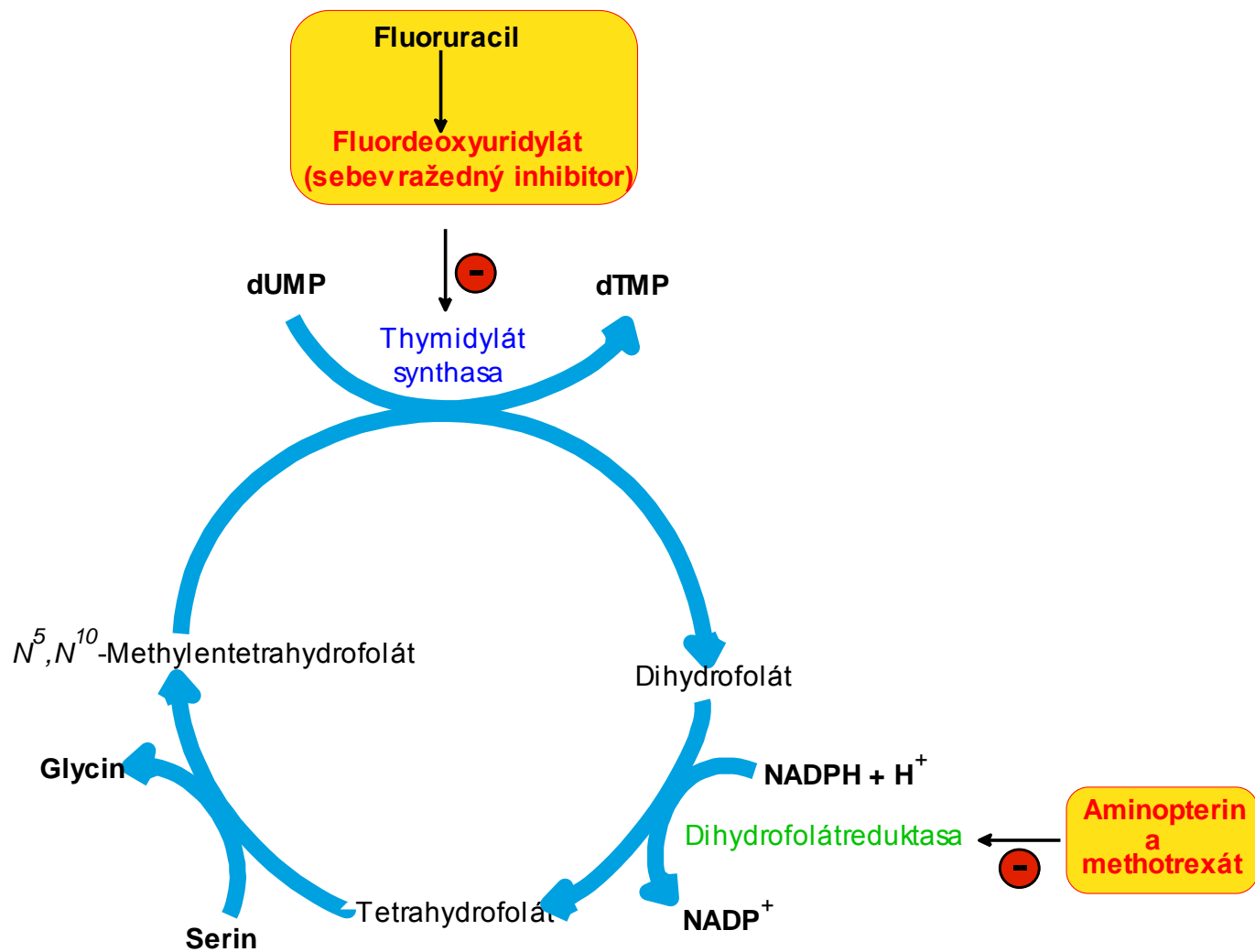
Fluoruracil je převáděn in vivo na fluordeoxyuridylát (F-dUMP). F-dUMP je analog dUMP ireversibilně inhibující thymidylát syntázu. Působí jako normální substrát a prochází celým katalytickým cyklem.

Při tvorbě TMP je nutné odstranit proton z místa C-5 nukleotidu. Enzym nemůže odstranit F^+ a proto je katalýza na tomto místě blokována.

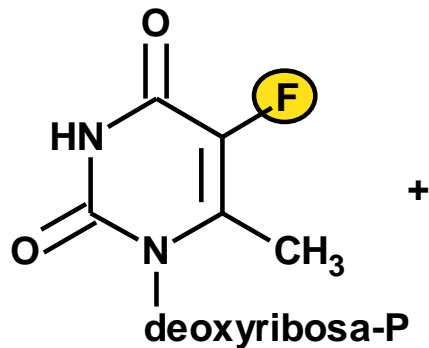
Příklad suicide inhibition (sebevražedné inhibice), na mechanismu enzymové reakce závislý inhibitor.

Syntéza TMP je také blokována inhibicí regenerace tetrahydrofolátu. Analoga dihydrofolátu jako např. aminopterin a methotrexát (amethopterin) jsou silnými kompetitivními inhibitory ($K_i < 1 \text{ nM}$) dihydrofolát reduktasy.

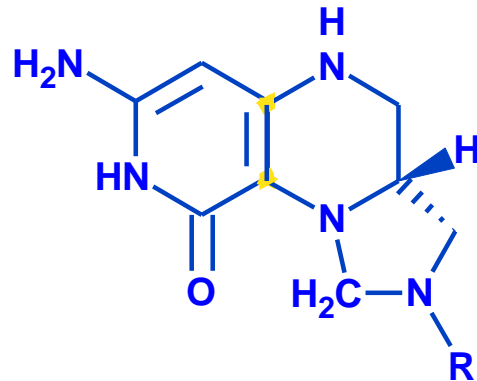
Místa působení protirakovinných léků.



Suicide inhibition (sebevražedná inhibice) thymidylátsynthasy 5-fluorUMP.

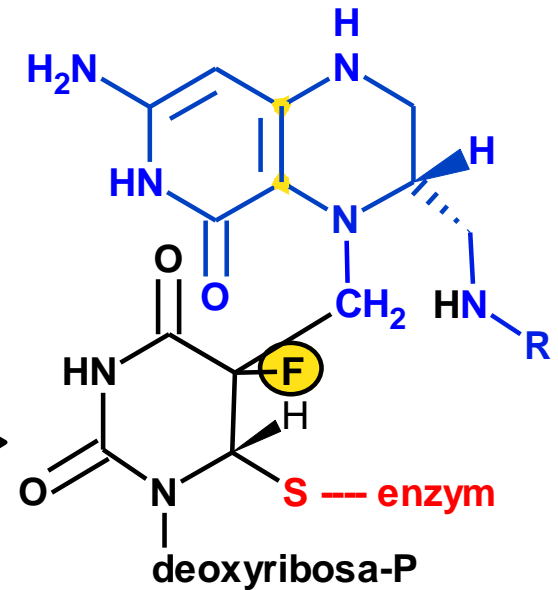


+



N⁵,N¹⁰-Methylenetetrahydrofolát

Enzym --- SH



Stabilní
adukt

Regulace biosyntézy nukleotidů.

Biosyntéza nukleotidů je regulována zpětnovazebnou inhibicí.
Obdoba regulace biosyntézy aminokyselin.

Regulace biosyntézy pyrimidinových nukleotidů.

Klíčový enzym je aspartáttranskarbamoylasa (ATCasa).

ATCasa je inhibována CTP - konečným produktem biosyntézy.
Stimulována je ATP.



Regulace biosyntézy purinových nukleotidů.

Regulace biosyntézy purinových nukleotidů je komplexnější.

Klíčovým krokem je konverze PRPP na fosforibosylamin. Reakci katalyzuje glutamínfosforibosylamidotransferasa.

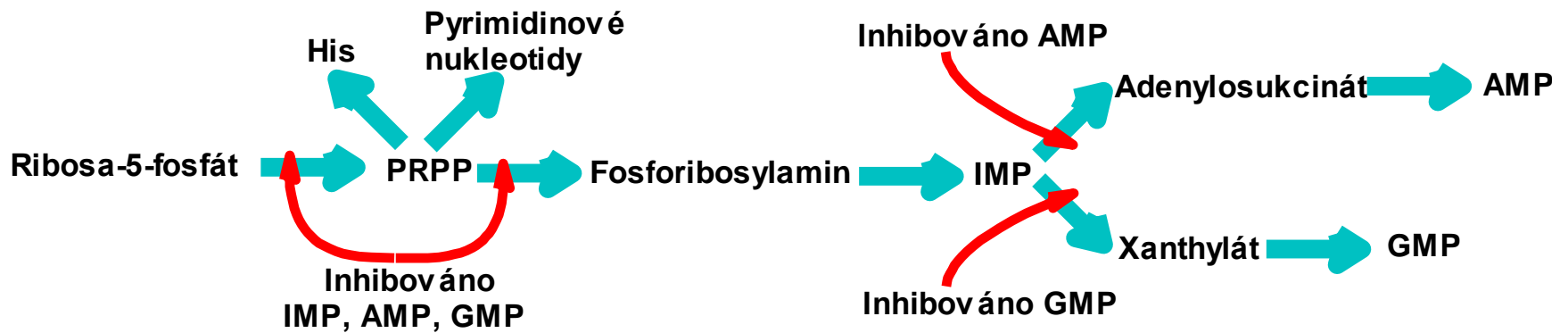
Reakce je zpětnovazebně inhibována mnoha purinovými ribonukleotidy. Inhibují GMP, AMP a IMP.

Inosinát - větvicí bod syntézy AMP a GMP. AMP inhibuje konverzi inosinátu na adenylosukcinát - vlastní prekurzor.

Obdobně, GMP inhibuje konverzi inosinátu na xanthylát - bezprostřední prekurzor.

GTP je substrátem při syntéze AMP a ATP je substrátem při syntéze GMP. Jedná se o reciprokou substrátovou závislost vedoucí k rovnováze syntézy adeninových a guaninových nukleotidů.

Kontrola a regulace biosyntézy purinových nukleotidů.



Syntéza deoxyribonukleotidů je regulována na úrovni ribonukleotidreduktasy.

Allosterická kontrola.

Každý z polypeptidů R1 podjednotky reduktasy obsahuje dvě allosterická místa. Jedno reguluje celkovou aktivitu enzymu a druhé substrátovou specifitu.

Celková aktivita reduktasy se snižuje po vazbě dATP. Vazba ATP potlačuje tento efekt.

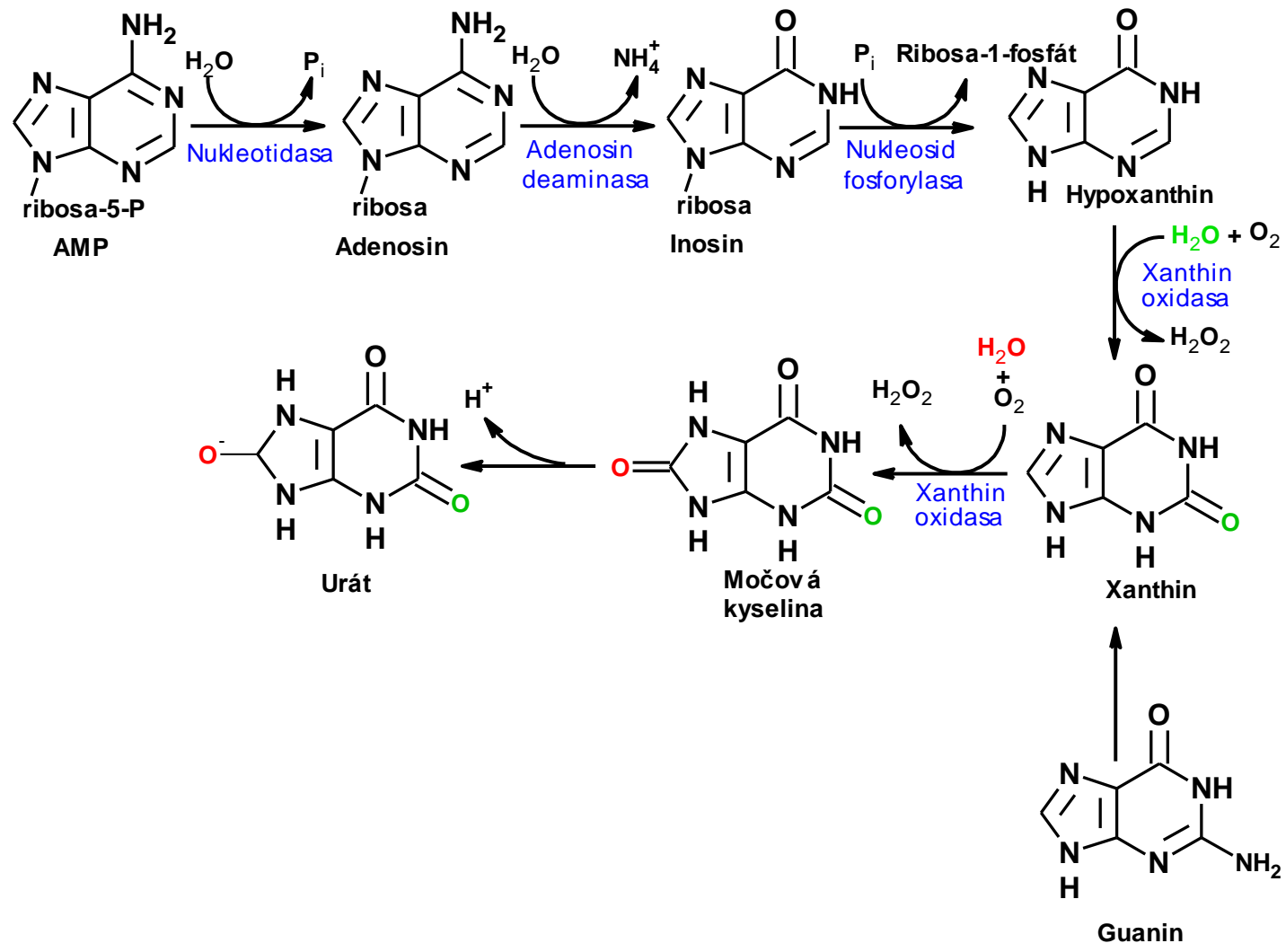
Vazba dATP nebo ATP do místa regulujícího substrátovou specifitu snižuje redukci UDP a CDP - pyrimidiny.

Vazba TTP (thymidintrifosfát) zvyšuje redukci GDP a inhibuje dále redukci pyrimidinových nukleotidů.

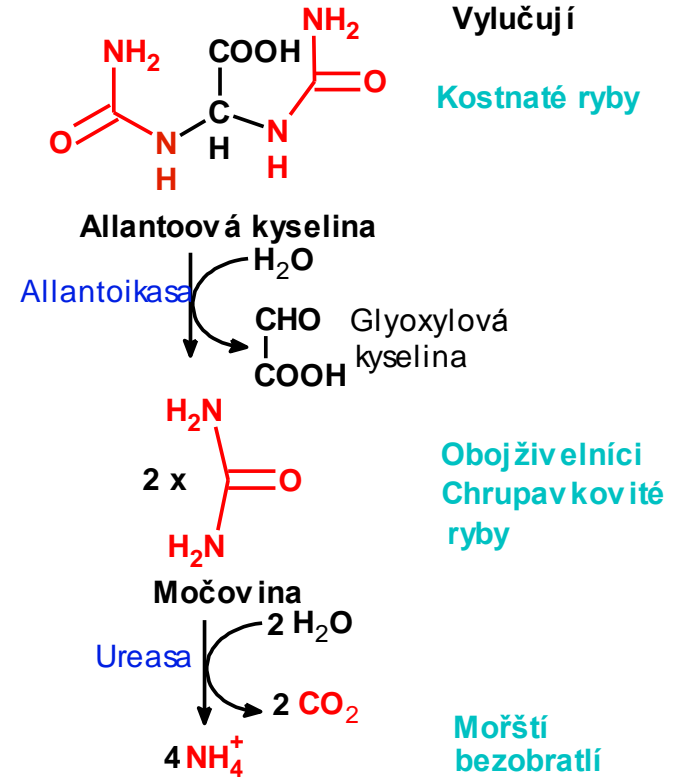
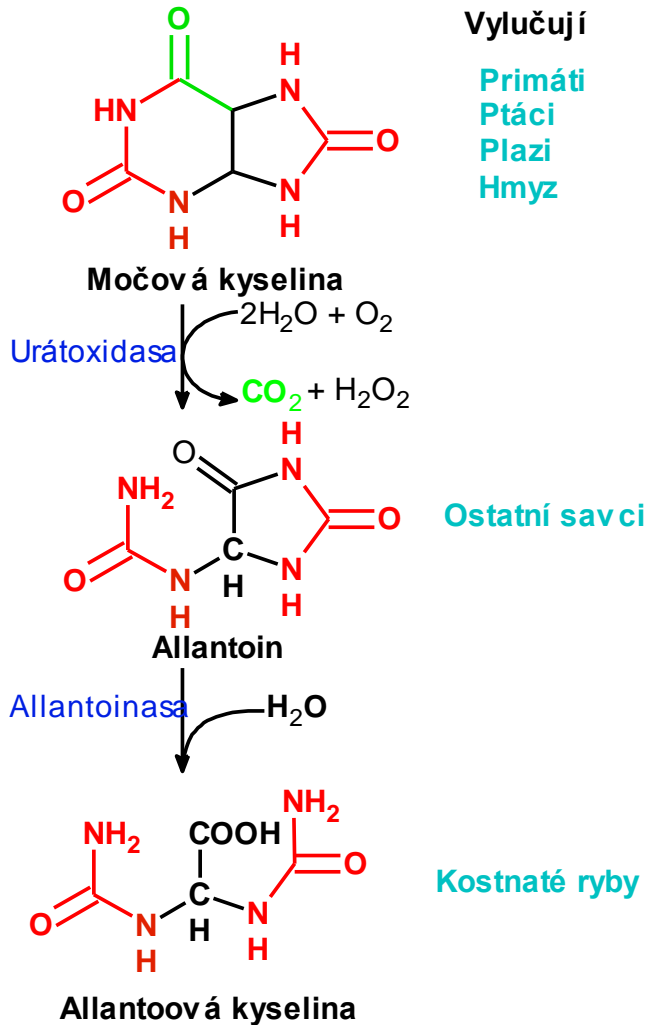
Současné zvýšení hladiny dGTP stimuluje redukci ATP na dATP.

Regulace pyrimidiny a puriny vede k rovnováze obou typů nukleotidů pro syntézu DNA.

Katabolismus purinových nukleotidů.



Osud močové kyseliny u ostatních organismů.



Adenosindeaminasa a důsledky její snížené aktivity.

Odbourání AMP zahrnuje jeden zvláštní stupeň. Adenosin není substrátem **nukleosidfosforylasy**. Fosfát je oddělen **nukleotidasou** za tvorby nukleosidu - adenosinu.

Zvláštní stupeň zahrnuje **adenosindeaminasou** katalyzovanou reakci za tvorby inosinu !!!

Deficit adenosindeaminasové aktivity je spojen s řadou kombinovaných imunodeficitních (SCID = severe combined immunodeficiency) a imunologických onemocnění. Např. ztráta T buněk imunitního systému.

Biochemickým důsledkem deficitu adenosindeaminasové aktivity je až 100násobné zvýšení hladiny dATP, které inhibuje ribonukleotidreduktasu a tím i syntézu DNA.

Dna je důsledkem zvýšené hladiny urátu v séru.

Inosin tvořený adenosindeaminasou je metabolizován na hypoxanthin.

Xanthinoxidasa za účasti flavoproteinu obsahujícího Mo a Fe oxiduje hypoxanthin na močovou kyselinu. Molekulární kyslík je přitom redukován na peroxid vodíku, který je rozkládán **katalasou** na kyslík a vodu.

Močová kyselina uvolňuje při fyziologickém pH proton za tvorby urátu.

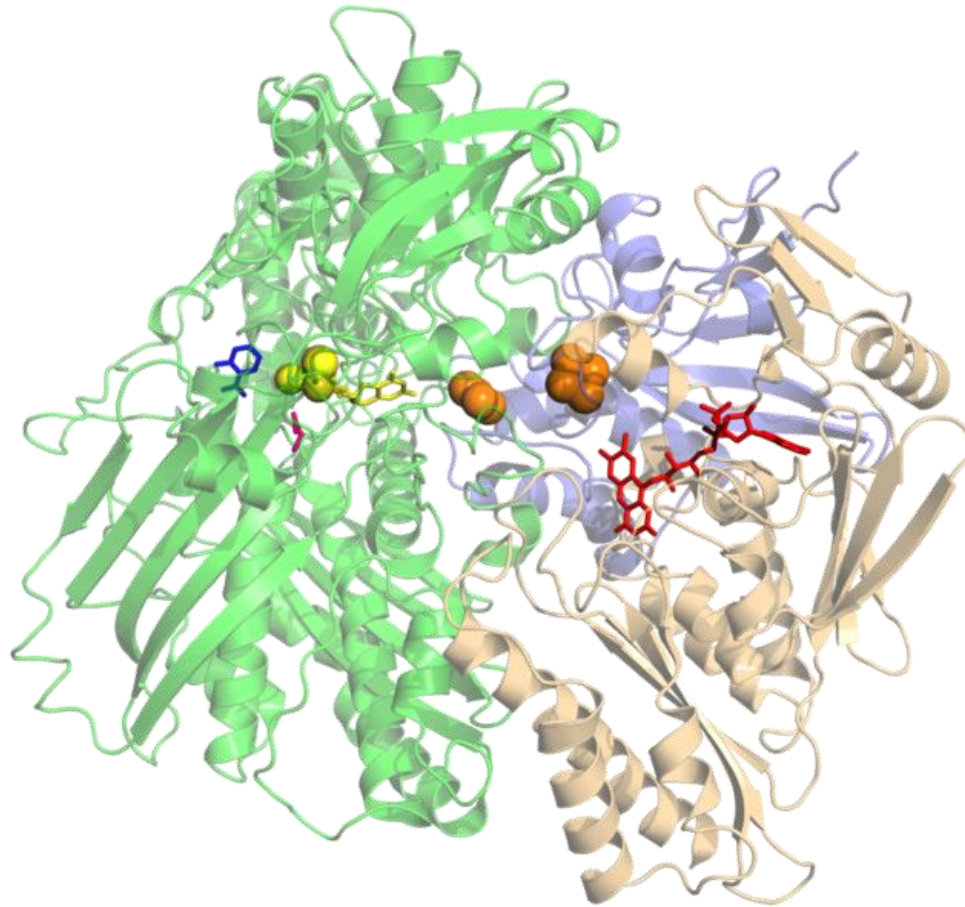
U lidí je urát konečným produktem degradace purinů.

Vysoká hladina urátu v séru vede k onemocnění nazvaném dna (gout). Sodné soli urátu krystalují v kapalinách kloubů což vede k bolestivým zánětům. Také ledviny jsou uráty poškozovány.

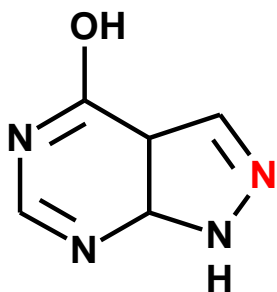
Jako terapie je podáván allopurinol, analog hypoxanthinu, který se chová nejdříve jako substrát a posléze jako inhibitor xanthinoxidasy. Suicide inhibitor !!

Krystalografická struktura (monomer) hovězí xanthinoxidasy
(EC 1.17.3.2).

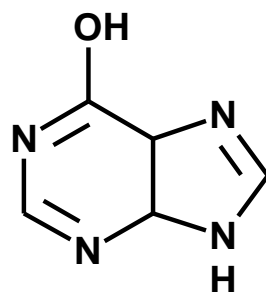
Vázany FAD (červeně), FeS klastr (oranžově), molobdenopterinový kofaktor s atomy Mo (žlutě) a salicylát (modře).



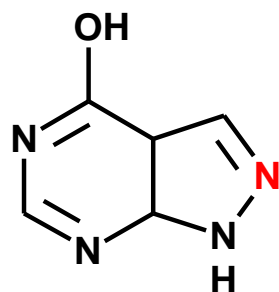
Allopurinol jako „suicide inhibitor“ xanthinoxidasy.



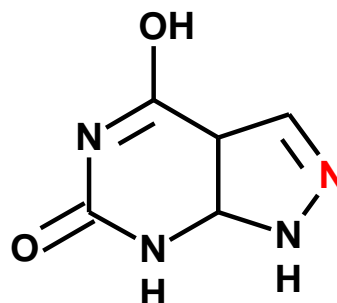
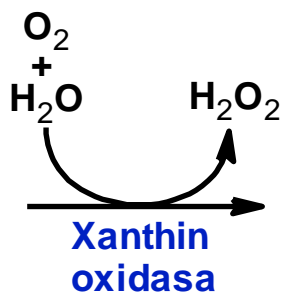
Allopurinol



Hypoxanthin



Allopurinol



Alloxanthin
(Oxipurinol)

Vazba do aktivního
místa(XO)



Nedovoluje
převod Mo^{4+} na Mo^{6+}

Hladina urátů v evoluci.

Hladina urátů v séru u lidí je blízko limitu rozpustnosti. Na rozdíl u poloopic jako např. lemuři, kteří mají 10x nižší hladinu.

Jaká je selektivní výhoda vyšších hladin urátů u člověka ?

Uráty jsou efektivní zhášedce reakcí kyslíkatých radikálů

Uráty jsou stejně efektivní jako askorbát ve funkci antioxidantů.

Důsledkem je delší doba života člověka oproti nižším primátům a snížení rizika rakoviny.

Další defekt purinového metabolismu spočívá v totální absenci hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasy.

Vrozená vada - Lesch-Nyhamův syndrom.

NAD⁺, FAD a koenzym A se tvoří z ATP.

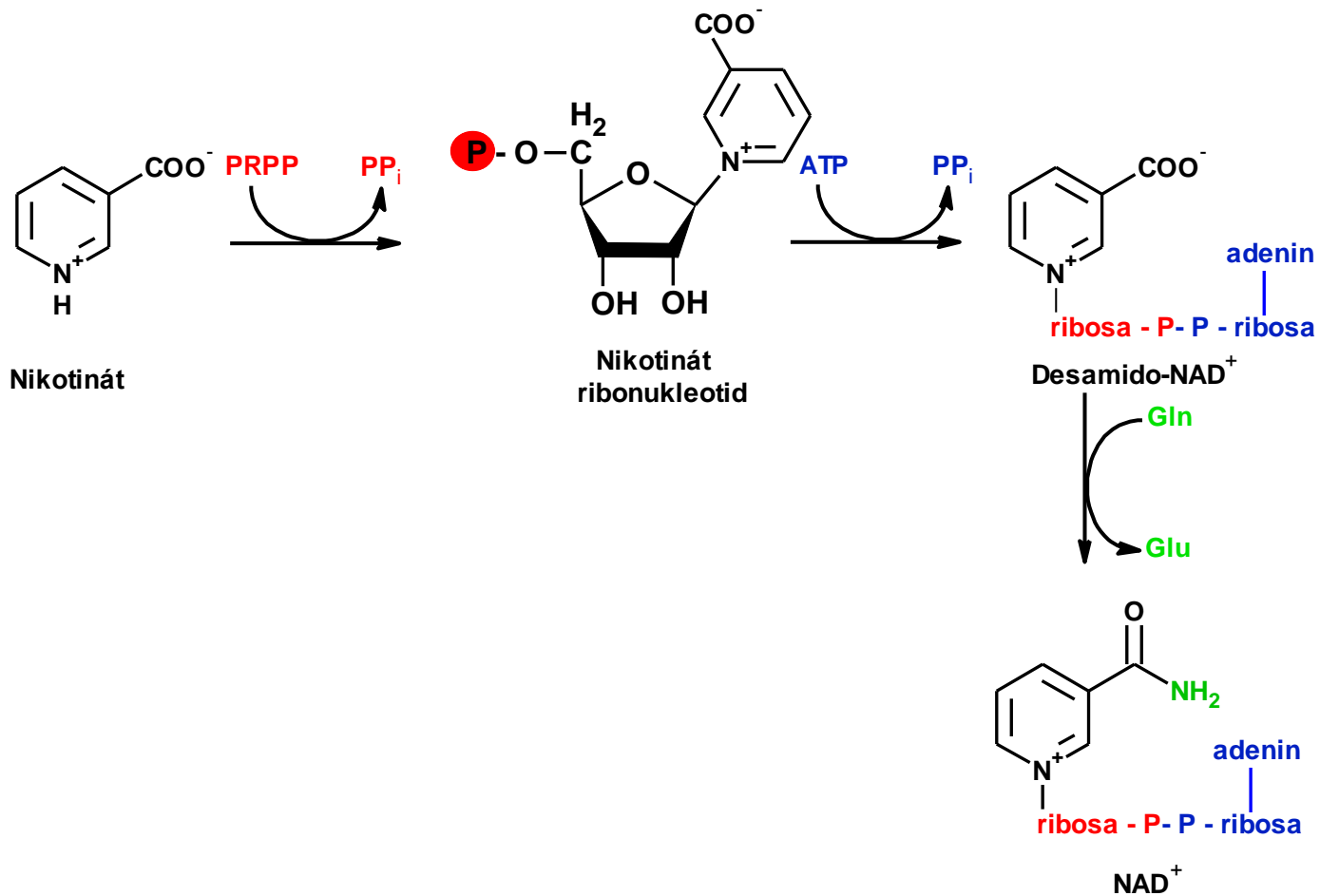
Nukleotidy nejsou jen součástí nukleových kyselin. Tvoří početnou skupinu biomolekul.

NAD⁺ a NADP⁺ jsou koenzymy oxidoreduktas. Jejich prekurzorem je ATP.

Prvím stupněm jejich biosyntézy je tvorba nikotinátribonukleotidu z nikotinátu a PRPP. Nikotinát, také niacin vitamin B₆, je produktem degradace aminokyseliny Trp. Nedostatek Trp v potravě vede k onemocnění zvané pellagra. Obdobně endokrinní tumor spotřebovávající Trp vede také k nedostatku neurotransmiteru serotoninu a ve svém důsledku k podobným symptomům jaké vykazuje pellagra.

V dalším stupni syntéze je AMP přenesen z ATP na nikotinátribonukleotid za tvorby desamido-NAD⁺. Konečným stupněm je transfer amoniaku z amidoskupiny Gln na nikotinátový karboxyl za tvorby NAD⁺. NADP⁺ vzniká fosforylací NAD⁺ ATP enzymem **NAD⁺kinasa**.

Biosyntéza NAD⁺ z PRPP, ATP a nikotinátu.

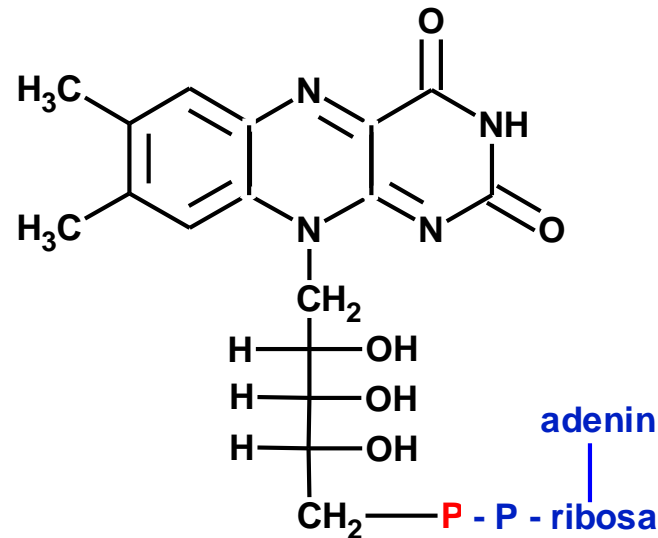


Biosyntéza FAD.

Flavinadenindinukleotid je syntetizován z riboflavinu a dvou molekul ATP.

Riboflavin + ATP → riboflavin-5'-fosfát + ADP

Riboflavin-5'-fosfát + ATP → flavinadenindinukleotid (FAD) + PP_i



Flavinadenindinukleotid (FAD)

Úloha difosfátu při biosyntézách.

AMP, součást koenzymu A, má původ v ATP.

Společným znakem biosyntéz NAD^+ , FAD a CoA je transfer AMP z ATP na fosforylovaný meziprodukt.

Současně tvořený difosfát je bezprostředně hydrolyzován na dva orthofosfáty.

Poznámka:

Při mnoha biosyntézách se získává značná část potřebné termodynamické energie hydrolýzou uvolněného difosfátu!

Hlavní rozdíly v metabolismu purinových a pyrimidinových nukleotidů.

Nukleotidy	Puriny	Pyrimidiny
Tvorba <i>N</i> -glykosidové vazby	V prvním kroku syntézy - start na PRPP	Nejdříve syntéza pyrimidinového kruhu a poté napojení PRPP
Lokalizace syntézy	Cytoplasma	Cytoplasma + mitochondrie - karbamoylfosfát-synthetasa
Produkty degradace	Močová kyselina (málo rozpustná ve vodě), NH ₃	CO ₂ , NH ₃ , Malonyl-CoA, sukcinyl-CoA