

Biosinteza nukleotida i deoksinukleotida

Boris Mildner

Pregled nomenklature nukleotida

Table 32.1 Nomenclature of bases, nucleosides, and nucleotides

RNA			DNA		
Base	Ribonucleoside	Ribonucleotide (5'-monophosphate)	Base	Deoxyribonucleoside	Deoxyribonucleotide (5'-monophosphate)
Adenine (A)	Adenosine	Adenylate (AMP)	Adenine (A)	Deoxyadenosine	Deoxyadenylate (dAMP)
Guanine (G)	Guanosine	Guanylate (GMP)	Guanine (G)	Deoxyguanosine	Deoxyguanylate (dGMP)
Uracil (U)	Uridine	Uridylate (UMP)	Thymine (T)	Thymidine	Thymidylate (TMP)*
Cytosine (C)	Cytidine	Cytidylate (CMP)	Cytosine (C)	Deoxycytidine	Deoxycytidylate (dCMP)

*Thymidylate rarely exists in the ribose form, and so, by convention, the lowercase "d" is omitted in the abbreviation for thymidylate.

Table 32.1
Biochemistry: A Short Course, Second Edition
 © 2013 W. H. Freeman and Company

Nukleozid je baza na koju je vezan šećer, a nukleotid je nukleozid s jednom ili više fosforiliranih skupina.

Nukleotidi imaju različite važne funkcije u stanici. Oni su preteče DNA i RNA, važni su prenositelji kemijske energije, uglavnom kao ATP a ponekad i kao GTP. Sastavni su dijelovi kofaktora, NAD⁺, FAD, S-adenozilmetionina, koenzima-A kao i aktiviranih biosintetskih međuprodukata kao što su UDP-glukoza i CDP-diacilglicerol. cAMP i cGMP su sekundarni glasnici u stanicama.

Dva su puta na koji nukleotidi mogu nastati. **De novo** metaboličkim putem nukleotidi nastaju u stanici iz aminokiselina, riboza-5-fosfata, CO₂ i NH₃. U **spasonosnom** (salvage) metaboličkom putu recikliraju se slobodne baze i nukleozidi oslobođeni tijekom razgradnje nukleinskih kiselina. Oba puta su važna za metabolizam stanice.

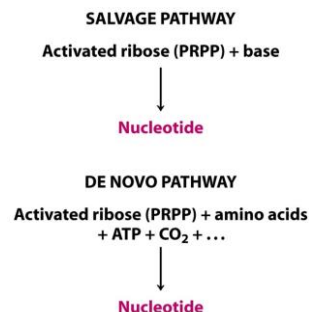


Figure 25-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Spasonosni putovi i de novo biosintetski putovi nukleotida

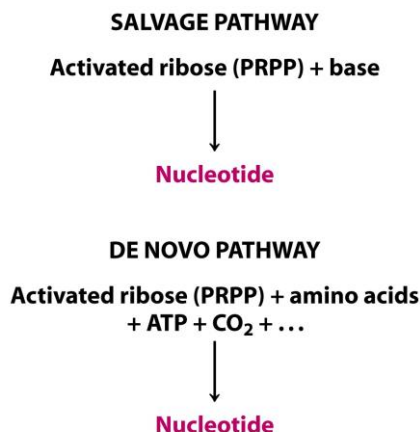


Figure 25-1
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

U spasonosnom putu baze se recikliraju i vežu na aktiviranu riboza-5-fosforibozil-1-pirofosfat (PRPP).

U *de novo* biosintezi baze se sintetiziraju iz jednostavnih preteča. Za *de novo* sintezu potrebna je energija koja se dobiva hidrolizom ATP.

De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

C-2 i N-3 atomi piridinskog prstena potječu od karbamoil fosfata, dok drugi atomi potječu od aspartata.

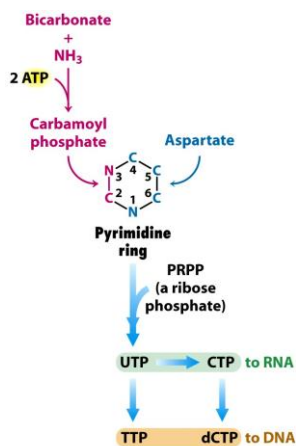


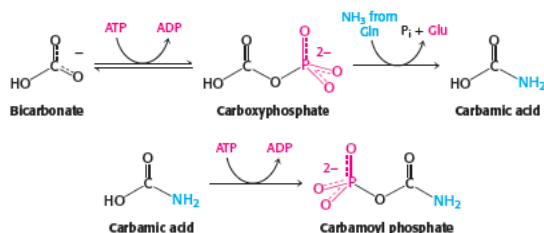
Figure 25-2
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Pirimidini se sintetiziraju iz bikarbonata, aspartata i amonijaka. Glutamin je glavni izvor dušikovih atoma.

Prvi korak u sintezi pirimidina je sinteza karbamoilfosfata. Sinteza se provodi u 3. koraka, a katalizira je karbamoilfosfat sintaza II (CPS II).



De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Reakcije koje katalizira karbamoil fosfat sintetaza II

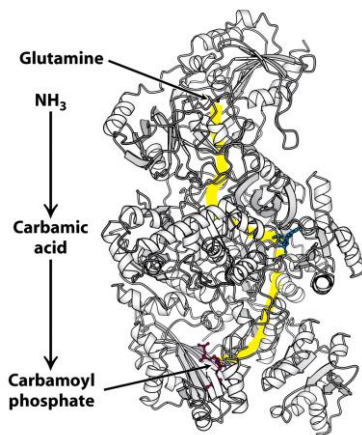


Figure 25-4
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

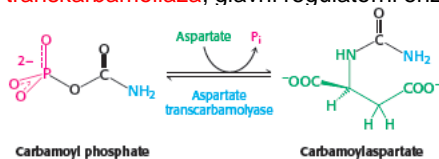
Put supstrata kroz tunel karbamoil fosfat sintetaze II.

Tri aktivna mjesta enzima povezana su tunelom (kanalom) koji je označen žuto. Glutamin se veže na prvo aktivno mjesto, a karbamoil fosfat, produkt, izlazi s trećeg aktivnog mjesta koje je od prvog udaljeno 80 Å.

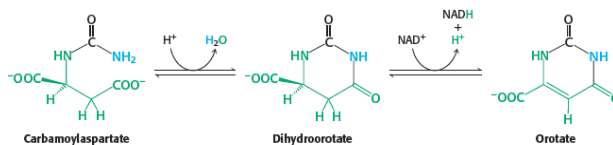
De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Karbamoilfosfat reagira s aspartatom te nastaje karbamoilaspartat. Ovu reakciju katalizira **aspartat-transkarbamoilaza**, glavni regulatorni enzim u sintezi pirimidina.



Karbamoilaspartat se metabolizira u orotat.

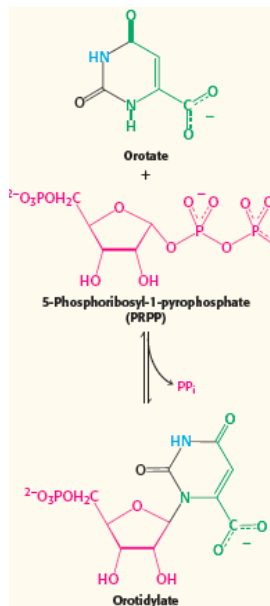
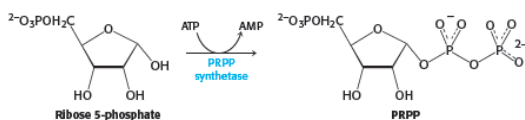


De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Orotat reagira s aktiviranom ribozom, tj. s 5-fosforibozil-1-pirofosfatom (PRPP) te nastaje orotidilat (OMP).

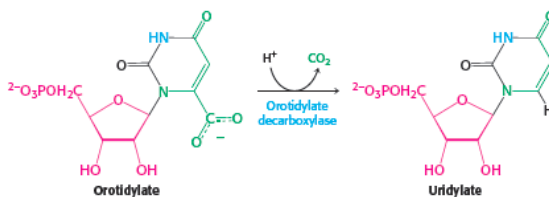
PRPP se sintetizira iz riboza-5-fosfata i ATP pomoću PRPP sintetaze.



De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Uridin monofosfat (UMP tj. uridilat) nastaje dekarboksilacijom orotidilata a reakciju katalizira orotidilat dekarboksilaza.



UMP je jedan od (ukupno dva) pirimidina koji izgrađuju RNA.

De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

CTP nastaje aminacijom UTP

CTP nastaje iz UTP prema sljedećem slijedu reakcija:



De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Kinaze pretvaraju nukleozid monofosfate u nukleozid trifosfate
Nukleozid monofosfati se pretvaraju u difosfate pomoću **specifičnih nukleozid monosofat kinaza**. Npr, UMP kinaza sintetizira UDP iz UMP prema reakciji:



Nukleozid difosfat kinaze su **nespecifični** enzimi i kataliziraju prevorbu različitih di- i trifosfata.



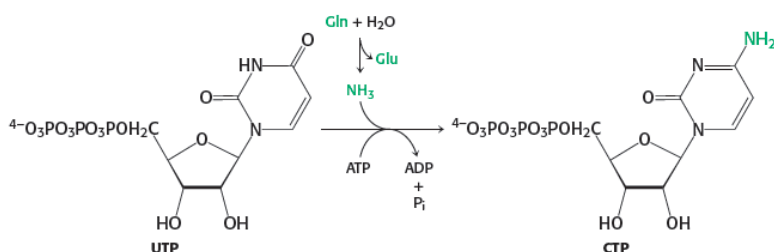
X i Y predstavljaju bilo koji nukleotid u gornjoj reakciji

De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Pirimidinski prsten se prvo sintetizira a zatim veže na ribozu

Kinaze pretvaraju nukleozid monofosfate u nukleozid trifosfate

CTP nastaje iz UTP, a pri tome se karbonilna skupina zamjenjuje za amino skupinu. Amino skupinu donira glutamin. **Reakciju katalizira CTP sintaza.**

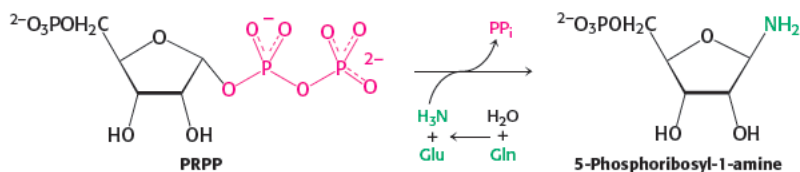


De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

Purinski se prsten sintetizira na ribozu fosfatu

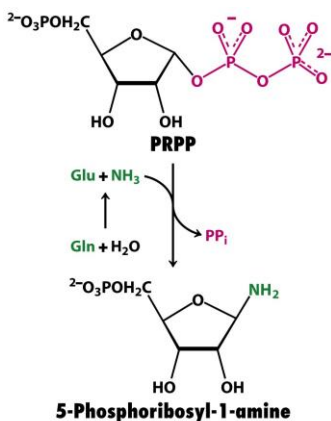
U *de novo* putu, purini se sintetiziraju na molekuli riboze. Početni odlučujući korak je sinteza 5-fosforibozil-1-amina iz PRPP. Amino skupinu donira glutamin. Amino skupina se veže na ribozu u β-konfiguraciji.

Reakciju katalizira **glutamin-fosforibozil amidotransferaza**:



De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

Purinski prsten se sintetizira na riboza fosfatu



Unnumbered figure pg 715a
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

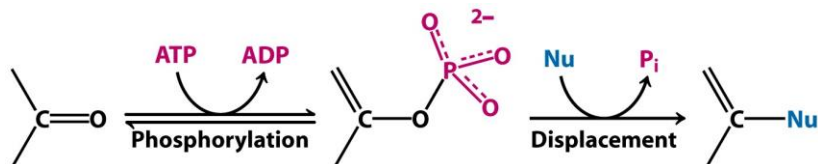
Prvi "odlučujući korak" u biosintezi purina je supstitucija pirofosfata s aminom. Ovom reakcijom nastaje 5-fosforibozil-1-amin, a amin je u β -položaju. Ovaj spoj je vrlo nestabilan pri $\text{pH} = 7,5$ ($t_{1/2} = 30$ s).

Reakciju katalizira **glutamin fosforibozil amidotransferaza**. Enzim se sastoji od dvije domene. Jedna domena je homologna fosforiboziltransferazama spasonosnog puta, dok druga domena katalizira hidrolizu glutamina te nastaje amonijak. Kako bi se izbjegla bespotrebna hidroliza supstrata (glutamina i PRPP), amidotransferaza je u aktivnom obliku samo kada su oba supstrata, PRPP i glutamin, vezana za enzim.

Amonijak koji nastaje u aktivnom središtu enzima ne otpušta se u otopinu, već kanalom (tunelom) u samom enzimu dolazi do PRPP.

De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

Većina koraka u biosintezi purina je reakcija koju kataliziraju enzimi koji vežu ATP u jednoj domeni. U svakom ovom koraku kisik koji je vezan za ugljik (obično kisik keto skupine) aktivira se fosforilacijom, te se zamjenjuje s nukleofilnom amino skupinom.



Unnumbered figure pg 715b
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

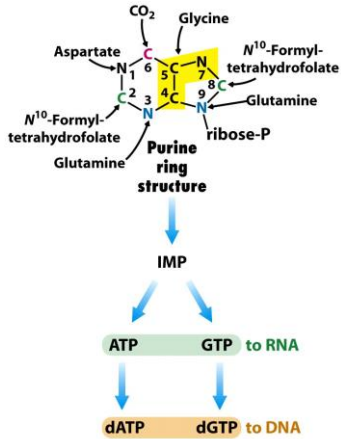


Figure 25-5
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Porijeklo atoma u purinskom prstenu. Porijeklo pojedinih atoma zaključeno je iz pokusa provedenih s pretečama koji su bili obilježeni s ¹⁴C- ili ¹⁵N- izotopima. Formijat se dobiva od N¹⁰-formiltetrahidrofolata.

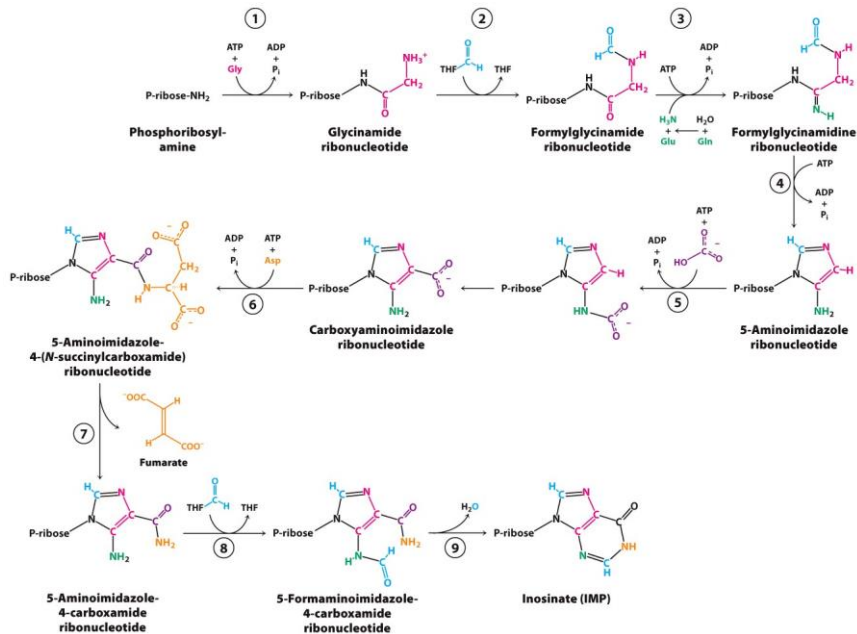


Figure 32.5
Biochemistry: A Short Course, Second Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

Opis prethodnog dijapozitiva: **De novo biosinteza purina.**

- 1) Glicin se povezuje na amino skupinu fosforibozilamina.
- 2) N¹⁰-formiltetrahidrofolat (THF) prenosi formilnu skupinu na amino skupinu glicina.
- 3) Keto skupina se fosforilira te pretvara u amidin adicijom amonijaka koji potječe od glutamina.
- 4) Zatvaranjem prstena nastaje peteročlani imidazolni prsten.
- 5) Bikarbonat se prvo veže na amino skupinu koja je izvan prstena, a zatim se premješta na ugljikov atom imidazolnog prstena.
- 6) Imidazol karboksilat se fosforilira a fosforilna skupina se zamjenjuje s amino skupinom aspartata.
- 7) Izlučuje se fumarat, a (8) adira se druga formilna skupina koja potječe od N¹⁰-formiltetrahidrofolata.
- 9) Ciklizacijom završava sinteza inozinata.

De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

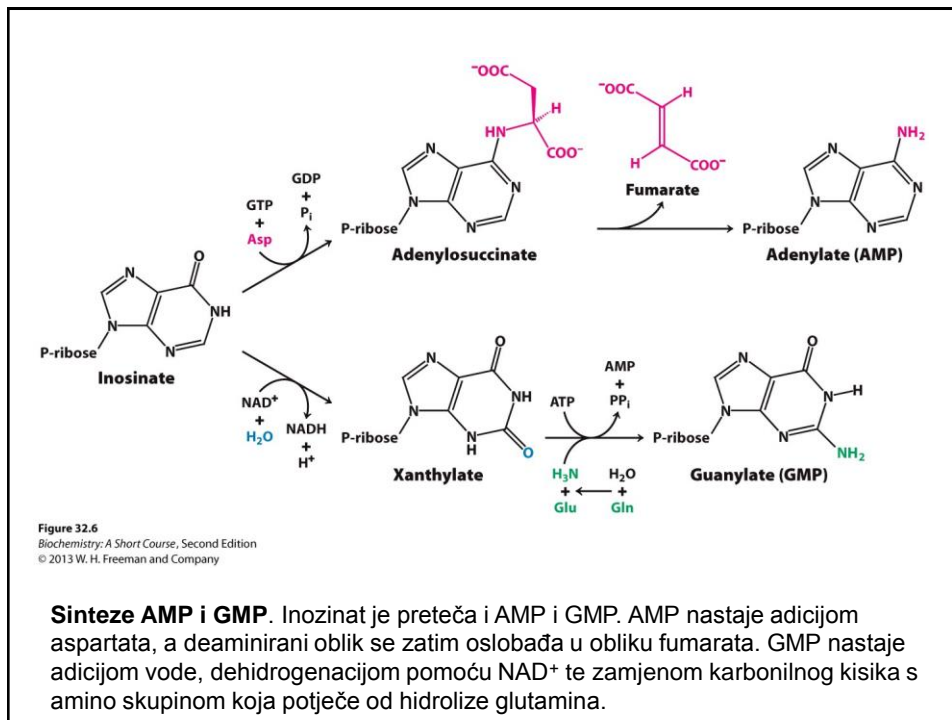
Purinski se prsten sintetizira na riboza fosfatu

AMP i GMP nastaju iz IMP

Devet koraka je potrebno za sintezu inozin monofosfata (IMP ili inozinat) iz 5-fosforibozil-1-amina.

IMP se pretvara u adenilat (AMP) u putu kojem je potreban GTP.

IMP se također pretvara u gvanozin monofosfat (GMP ili gvanilat) i to reakcijama u kojima sudjeluje ATP.



De novo metabolički put sinteze purinskih nukleotida

Purinski se prsten sintetizira na riboza fosfatu

Enzimi koji povode *de novo* sintezu purinskih nukleotida, *in vivo*, međusobno su povezani

Kada stanice rastu u mediju u kojem su purini, ne dolazi do *de novo* sinteze purina.

Kada u mediju nema purina, enzimi koji sudjeluju u *de novo* sintezi međusobno se povezuju u kompleks koji se naziva **purinosom**. U purinosomu, aktivno se odvija *de novo* sinteza purina.

Spasonosni put

Baze se recikliraju spasonosnim putovima

Dva enzima su odgovorna za iskorištenje purinskih baza:
Adenin-fosforibozil transferaza katalizira sintezu adenilata (AMP), a hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaza (HGPRT) katalizira sintezu inozinata (IMP) i gvanilata (GMP).



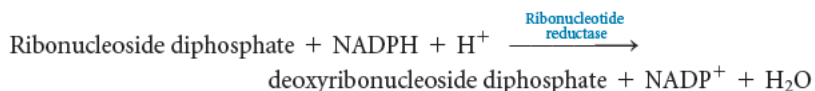
Sličan spasonosni put postoji i za pirimidinske baze. Pirimidin fosforibozil transferaza katalizira vezanje uracila na PRPP, ali ne i citozina na PRPP.

Ribonukleotidi se reduciraju u deoksiribonukleotide

Iz ribonukleozid difosfata nastaju deoksiribonukleotidi.

2'-hidroksilnu skupinu u ribozi supstituira atom vodika u reakciji koju katalizira ribonukleotid reduktaza.

Ribonukleotid reduktaza katalizira ovu izmjenu za sva četiri ribonukleotida.



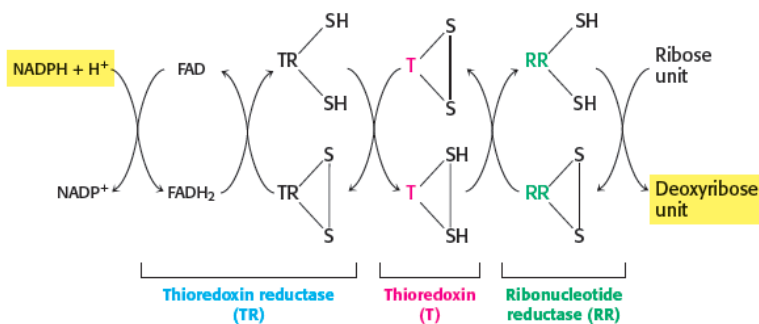
Ribonukleotidi se reduciraju u deoksiribonukleotide

Tijekom katalize, sulfhidrilne skupine reduktaze se oksidiraju. Kako bi se kataliza nastavila i u idućem ciklusu, oksidirane sulfhidrilne skupine moraju se ponovno reducirati.

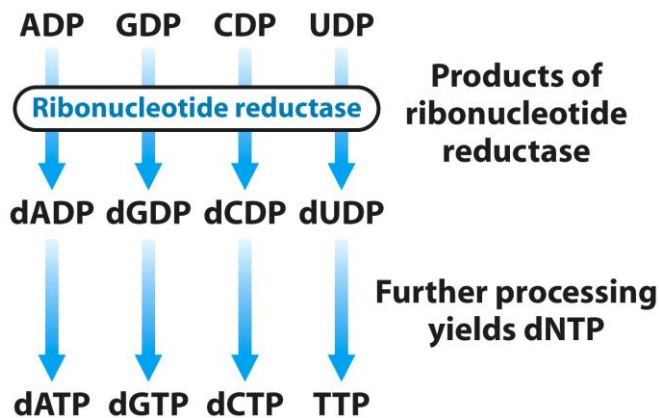


Ribonukleotidi se reduciraju u deoksiribonukleotide

Elektroni koji su potrebni za redukciju reduktaze potječu od tioredoksina. Tioredoksin reduktaza katalizira tok elektrona od NADPH na tioredoksin te na ribonukleotid reduktazu. Primitkom elektrona ribonukleotid reduktaza ponovno prelazi u aktivni oblik.



Ribonukleotidi su preteče deoksiribonukleotida



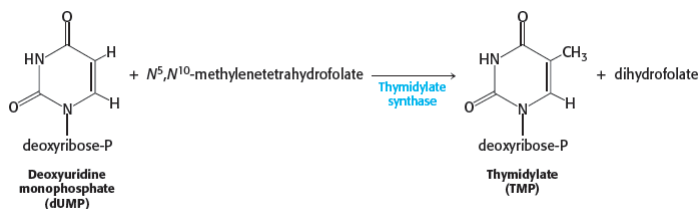
Unnumbered figure pg 718
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

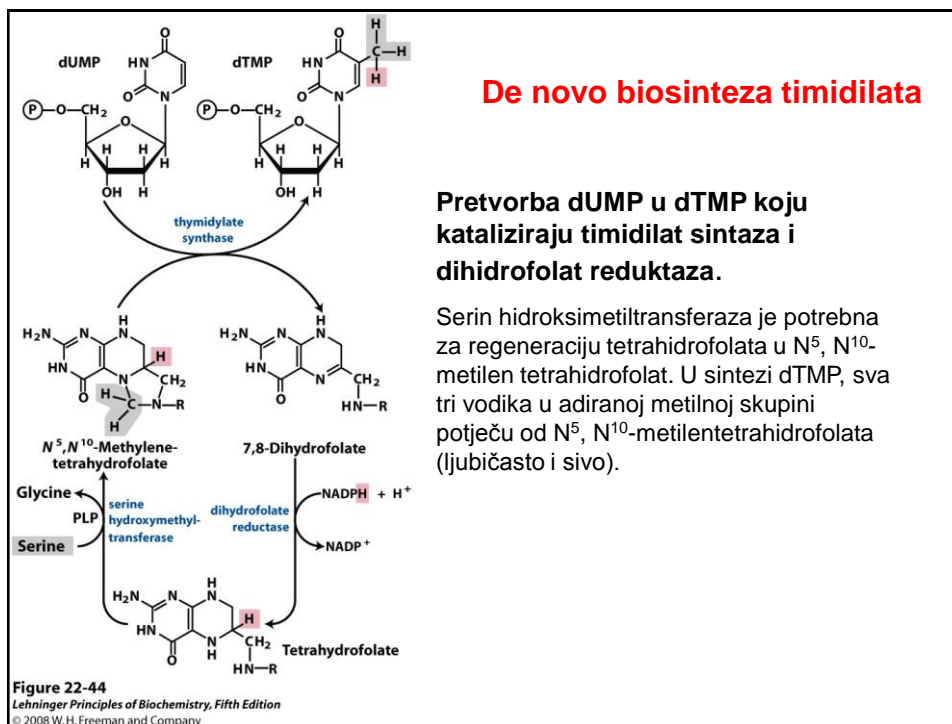
Ribonukleotid reduktaza katalizira sintezu deoksiribonukleotida iz ribonukleotida.

Ribonukleotidi su preteče deoksiribonukleotida

Timidilat nastaje metilacijom deoksiuridilata

Deoksiuridin-difosfat (dUDP) se pretvara u dUMP. Timidilat sintaza ugrađuje metilnu skupinu na dUMP te nastaje timidilat (TMP). Za ovu reakciju potreban je N^5, N^{10} -metilentetrahidrofolat.





Ribonukleotidi su preteče deoksiribonukleotida

Nekoliko važnih antitumorskih lijekova inhibira sintezu timidilata

Timidilat sintaza i dihidrofolat reduktaza mete su kemoterapeutika.

Timidilat sintaza i dihidrofolat reduktaza su mete u terapiji tumora. Inhibicijom ovih enzima sprječava se sinteza timidilata, preteče koja je potrebna za sintezu DNA u brzo rastućim tumorskim stanicama.

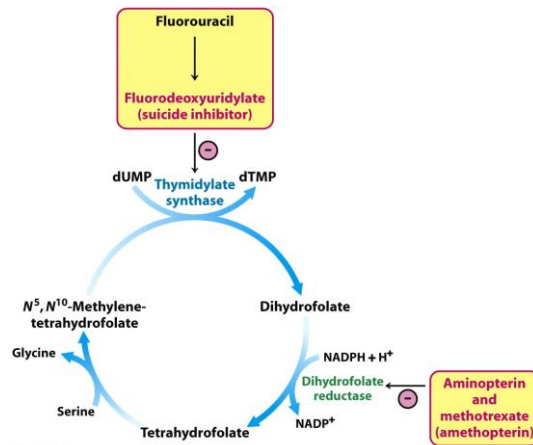


Figure 25-13
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Fluorouracil se metabolizira u fluorodeoksiuridilat koji je suicidni inhibitor timidilat sintaze

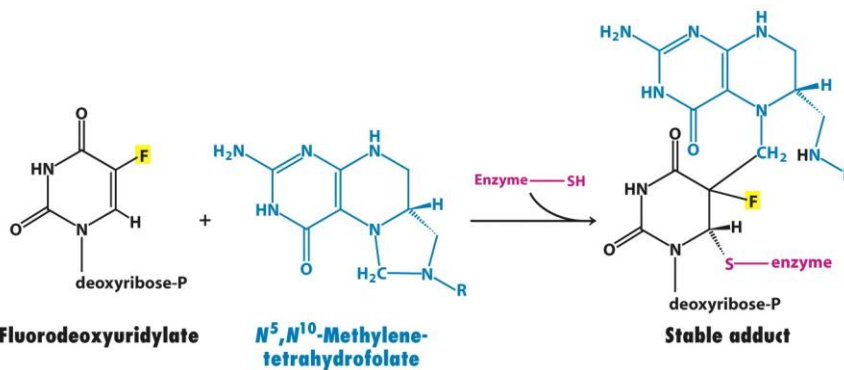


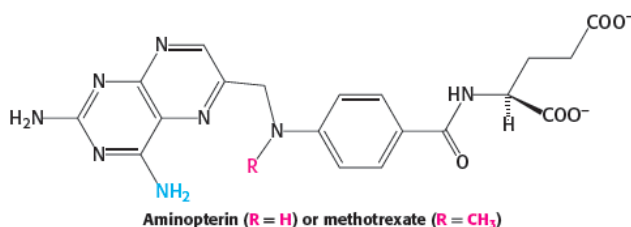
Figure 25-14
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W.H. Freeman and Company

Ribonukleotidi su preteče deoksiribonukleotida

Nekoliko važnih antitumorskih lijekova inhibira sintezu timidilata

Aminopterin i metotraksat sprječavaju sintezu timidilata tako što inhibiraju dihidrofolat reduktazu – enzim koji obnavlja kofaktor koji je potreban za sintezu timidilata.

Aminopterin i metotraksat kompetitivni su inhibitori dihidrofolat reduktaze.

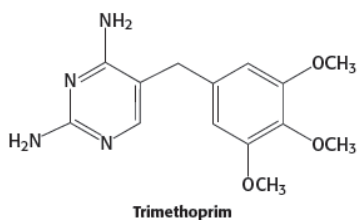


Ribonukleotidi su preteče deoksiribonukleotida

Nekoliko važnih antitumorskih lijekova inhibiraju sintezu timidilata

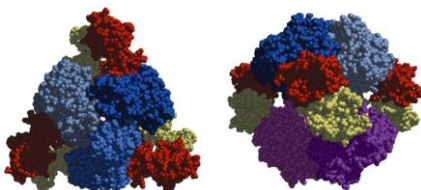
Trimetoprim, analogon folata, koristi se u liječenju bakterijskih infekcija i za liječenje infekcija koje izazivaju protozoe.

Trimetoprim ne inhibira dihidrofolat reduktazu sisavaca, a inhibira dihidrofolat reduktazu bakterija.



Mehanizam povratne sprege kontrolira se biosinteza nukleotida

Biosintezu **pirimidinskih** nukleotida regulira aspartat transkarbamoilaza



Aspartat transkarbamoilaza (ATCaza) regulira sintezu pirimidinskih nukleotida.

CTP inhibira povratnom spregom ATCazu.



Unnumbered figure pg 723c
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Mehanizam povratne sprege kontrolira se biosinteza nukleotida

Biosintezu pirimidinskih nukleotida regulira aspartat transkarbamoilaza

Alosterička regulacija aspartat transkarbamoilaze (ATCaza).

CTP je inhibitor, a ATP stimulira ATCazu.

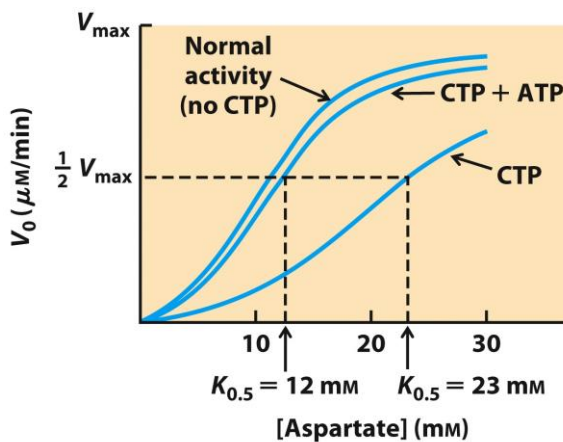


Figure 22-38
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Mehanizamom povratne sprege kontrolira se biosinteza nukleotida

Inhibicijom povratne sprege, sinteza **purinskih** nukleotida je regulirana na nekoliko mjesta:

1. "Odlučujući korak", sintezu PRPP, koji katalizira glutamin fosforibozil transferaza, kontroliraju povratnom spregom mnogi purinski ribonukleotidi. AMP i GMP, krajnji produkti, sinergistički inhibiraju enzim.
2. IMP je točka grananja. AMP povratnom spregom inhibira pretvorbu IMP u adenilosukcinat, a GMP inhibira pretvorbu IMP u ksantilat.
3. GTP je supstrat u sintezi AMP, a ATP u sintezi GMP. Ovaj recipročni odnos supstrata dodatno kontrolira sintezu adeninskih i gvaninskih ribonukleotida.

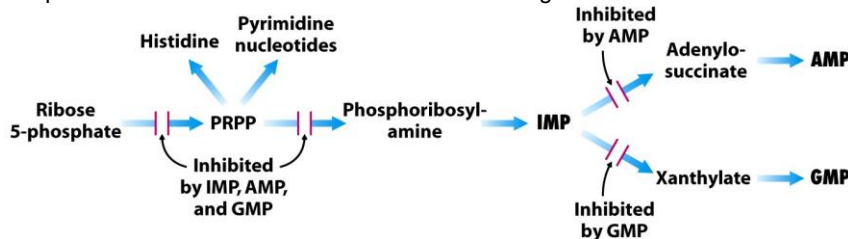


Figure 25-15
Biochemistry, Sixth Edition
© 2007 W. H. Freeman and Company

Mehanizamom povratne sprege kontrolira se biosinteza nukleotida

Sinteza deoksiribonukleotida kontrolira se regulacijom aktivnosti ribonukleotid reduktaze

Ribonukleotid reduktaza iz *E. coli* je dimer. Svaka podjedinica ima dva alosterička mjesta: jedno koje regulira aktivnost enzima i drugo, koje regulira specifičnost supstrata.

Vežanjem **dATP** za aktivno mjesto inhibira se enzimski aktivnost. **ATP** može ponovno aktivirati enzim.

Vežanjem ATP ili dATP na mjesto kojim se regulira specifičnost dolazi do povećanja redukcije UDP i CDP.

Vežanjem timidin-trifosfata (TTP) za mjesto koje određuje specifičnost, dolazi do povećane redukcije GDP, a ujedno se inhibiraju redukcije svih ostalih nukleotida.

Povećanje koncentracije dGDP stimulira redukciju ADP u dADP.

Shematski prikaz načina regulacije ribonukleotid reduktaze

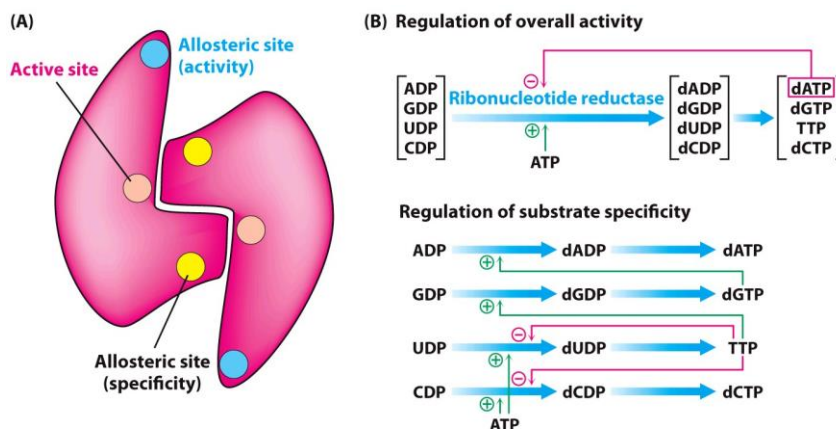


Figure 32-11
Biochemistry: A Short Course, Second Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

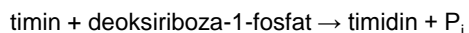
(A) Svaka podjedinica reduktaze ima dva alosterička mjesta i svaka ima po jedno aktivno mjesto. Jedno alosteričko mjesto regulira aktivnost, a drugo specifičnost supstrata. (B) Shema regulacije ribonukleotid reduktaze pomoću nukleozid difosfata.

Metabolički putovi sinteze pirimidinskih nukleotida

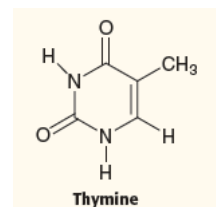
Spasonosnim putovima recikliraju se pirimidinske baze

U spasonosnim putovima ponovno se koriste sintetizirane pirimidinske baze, baze koje su nastale razgradnjom nukleinskih kiselina.

Timin, produkt razgradnje DNA, prvi se iskorištava te se ugrađuje u nukleozid pomoću timidin fosforilaze:



Nukleotid nastaje djelovanjem timidin kinaze:



Deficijentnost enzima u metabolizmu nukleotida dovodi do patoloških promjena

Razgradnja nukleotida započinje hidrolitičkim cijepanjem fosfata u nukleotidu te time nastaju nukleozidi. Reakciju hidrolize fosfatnih skupina na ribozi provode nukleotidaze.

Slobodne baze nastaju razgradnjom nukleozida, a ovu reakciju kataliziraju nukleozid fosforilaze. Krajnji produkt ove reakcije su baze i riboza-1-fosfat ili deoksiriboza-1-fosfat.

Katabolizam purina. Purinske baze pretvaraju se prvo u ksantin, a tada u urat koji se izlučuje. Ksantin oksidaza katalizira dva koraka u ovom putu.

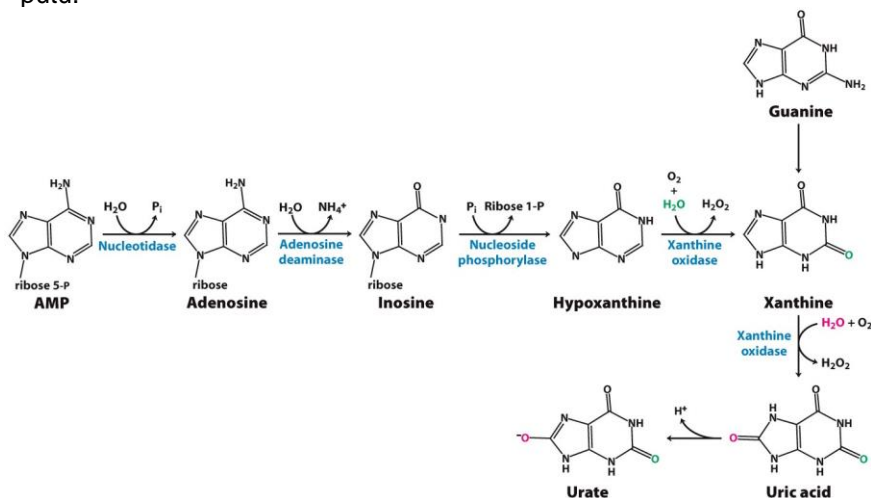
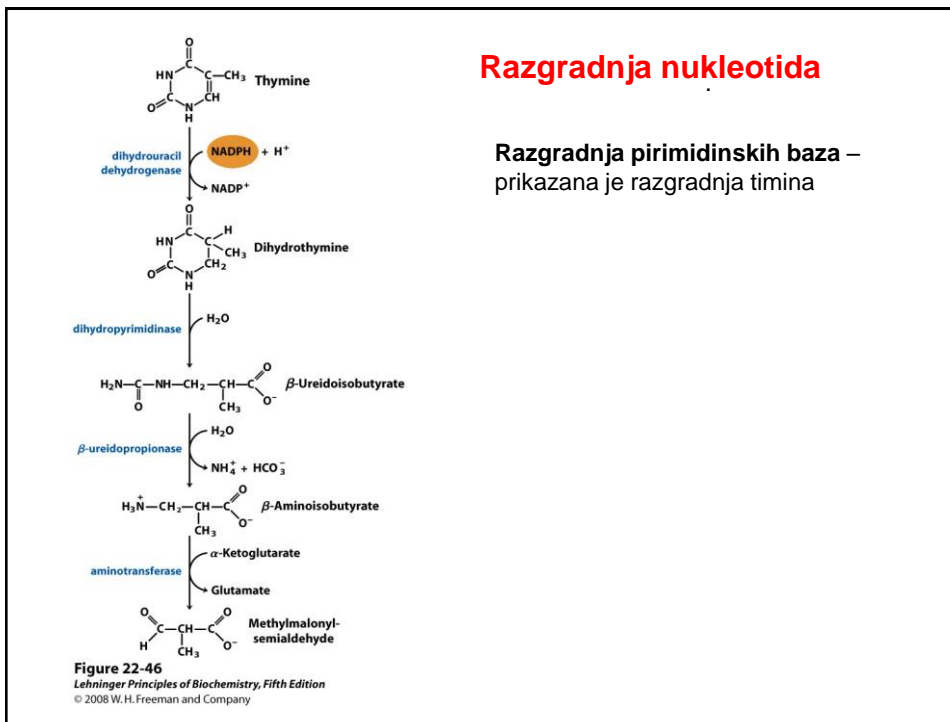
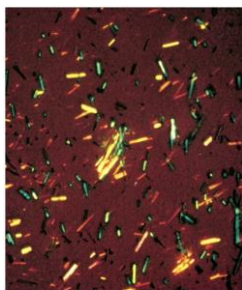


Figure 32.12
Biochemistry: A Short Course, Second Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company



Pogreške u metabolizmu nukleotida izazivaju bolesti

- Gubitak adenzin deaminaze (razgradnja adenzina u inozin) dovodi do imunodeficijencije (SCID).
- Giht se dobiva zbog povećane koncentracije urata u serumu. Na-kristali urata nastaju u slabo prokrvavljenim zglobovima.



Kristali urata

- Lesch – Nyhanov sindrom je posljedica mutacije hipoksantin-gvanin fosforiboziltransferaze (HGPRT, enzim spasonosnog puta)
- nedostatak folne kiseline uzrokuje greške u embrionalnom razvoju (Spina Bifida)

Pogreške u metabolizmu nukleotida izazivaju bolesti

Giht induciraju visoke koncentracije urata u serumu

Ksantin oksidaza katalizira pretvorbu ksantina u mokraćnu kiselinu (urat), završni (zajednički) produkt razgradnje purinskih nukleotida.

Visoke koncentracije urata u krvi induciraju giht, bolest koja je vrlo bolna jer dolazi do nakupljanja kristala urata u zglobovima.

Uzimanjem alopurinola, suicidalnog inhibitora ksantin oksidaze, mogu se poboljšati simptomi gihta. Kad se uzima alopurinol, purini se izlučuju kao ksantin ili hipoksantin.

Urična kiselina je jaki antioksidans, te urati u krvi mogu spriječiti oksidativna oštećenja.

Pogreške u metabolizmu nukleotida izazivaju bolesti

Mnogim kemoterapeutičima mete su enzimi sinteze nukleotida

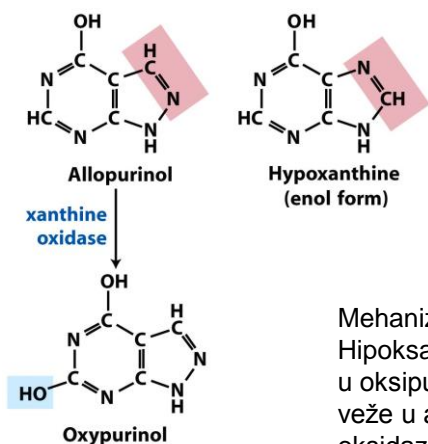


Figure 22-47
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Giht se liječi prehranom i/ili terapijom s alopurinolom, inhibitorom ksantin oksidaze.

Mehanizam djelovanja alopurinola: Hipoksantin oksidaza prvo oksidira alopurinol u oksipurinol (aloksantin) koji se onda čvrsto veže u aktivno mjesto enzima, te se ksantin oksidaza trajno inhibira.