

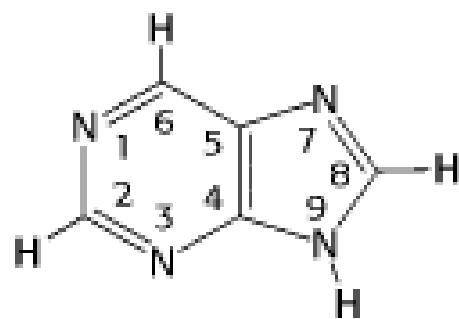
Metabolismo de nucleótidos, purinas y pirimidinas

Repaso

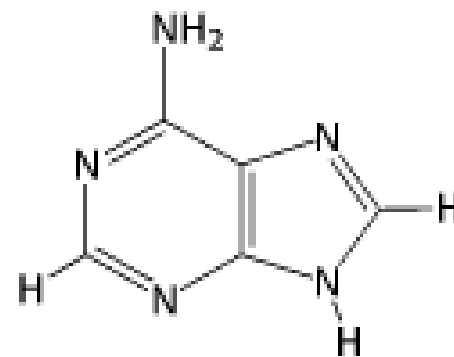
un nucleótido consta de:

1. una base nitrogenada
2. una pentosa
3. un fosfato

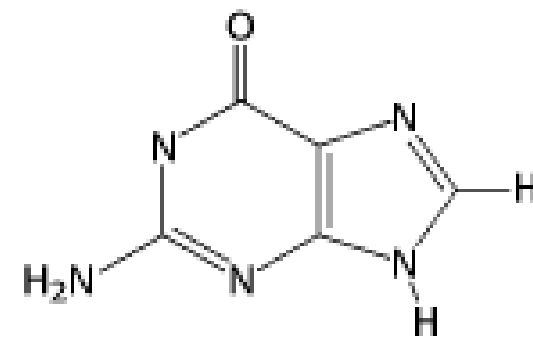
PURINES



Purine

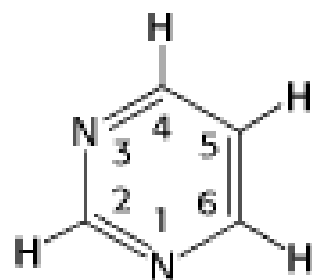


Adenine

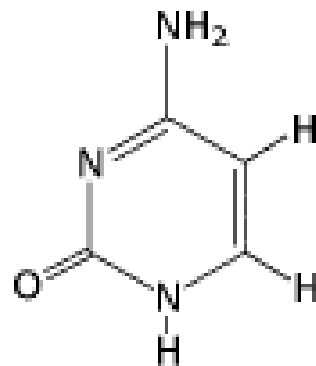


Guanine

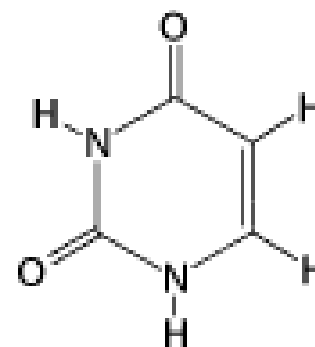
PYRIMIDINES



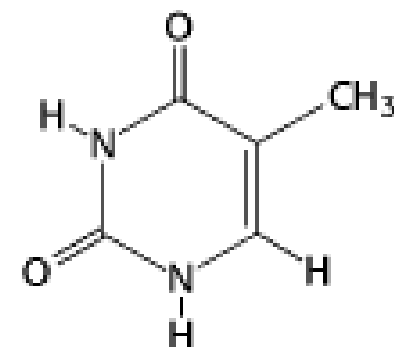
Pyrimidine



Cytosine

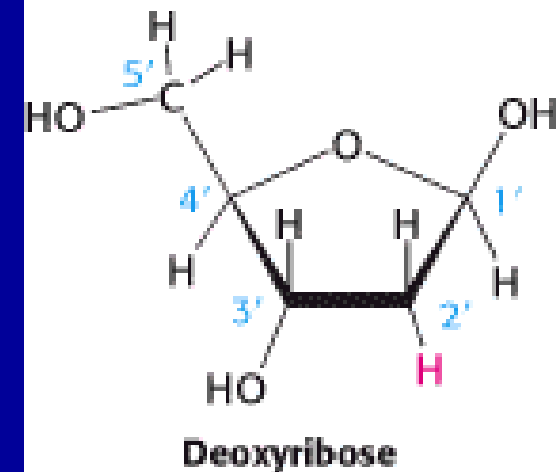
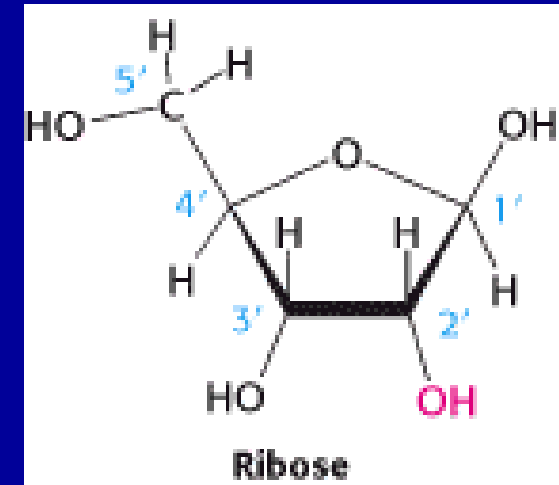
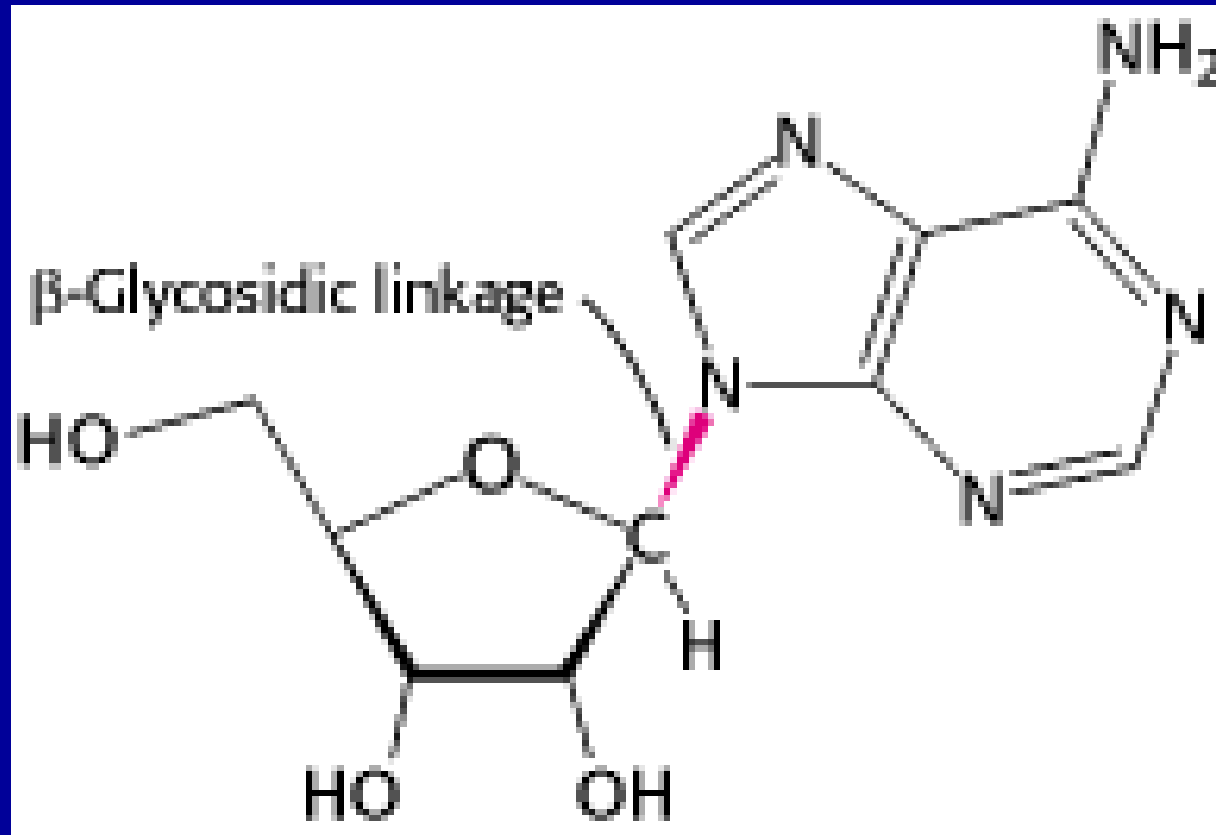


Uracil

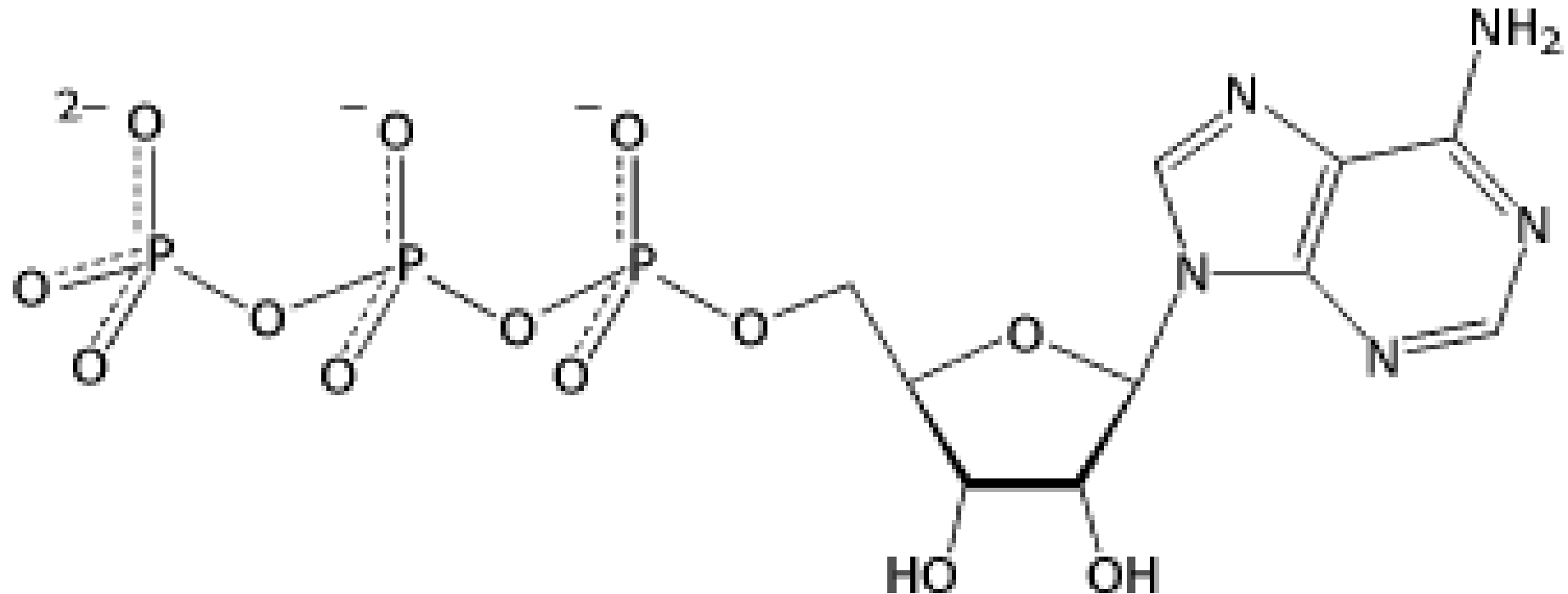


Thymine

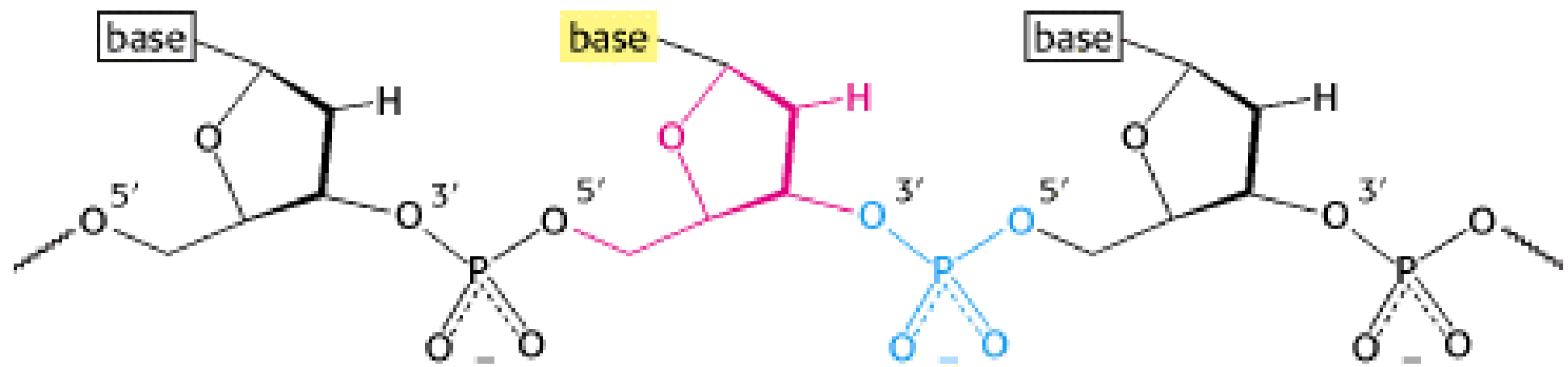
Nucleósido



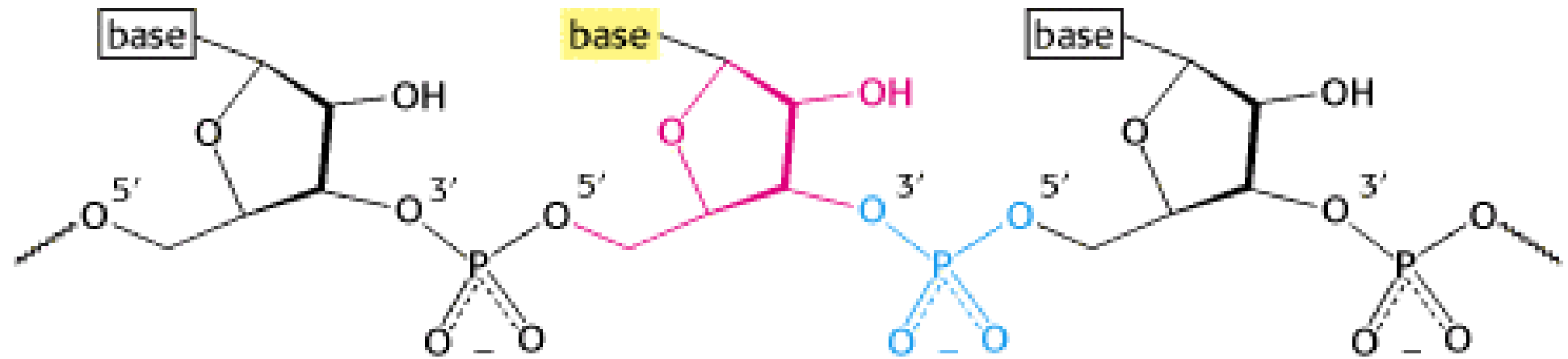
Nucleótido



5'-ATP



DNA



RNA

Nomenclatura

Base	Nucleósido	Nucleótido
Adenina	Adenosina Desoxiadenosina	Adenilato Desoxiadenilato
Guanina	Guanosina Desoxiguanosina	Guanilato Desoxiguanilato
Citosina	Citidina Desoxicitidina	Citidilato Desoxicitidilato
Timina	Timidina Desoxitimidina	Timidilato Desoxitimidilato
Uracilo	Uridina	Uridilato

Funciones de los nucleótidos

- Constituyen los ácidos nucleicos ADN y ARN
- Los nucleósidos trifosfato son la moneda corriente de energía (ATP)
- Mediadores celulares (cAMP, cGMP)
- Componentes de coenzimas (NAD^+ , FAD, CoA)
- Precursores (GTP precursor de tetrahidrobiopterina)
- Portadores de intermediarios activados (UDP-galactosa)
- Efectores alostéricos

Biosíntesis de nucleótidos

Los organismos pueden sintetizar nucleótidos de purina y pirimidina *de novo*

Por esto, las purinas y las pirimidinas no son requeridas en la dieta.

También pueden utilizar nucleótidos de la dieta (muy poquito)

Los ácidos nucleicos ingeridos son digeridos con endonucleasas, fosfodiesterasas y nucleósido fosforilasas. Las bases obtenidas, si no se utilizan, son degradadas.

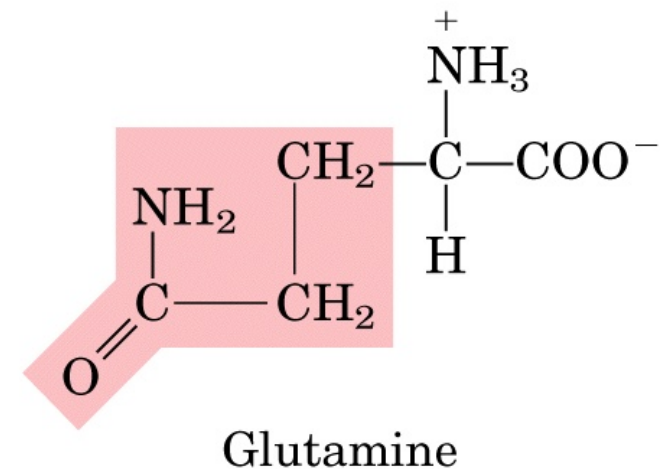
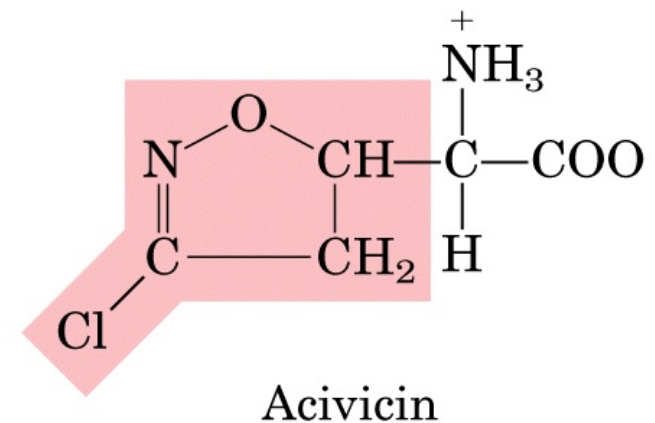
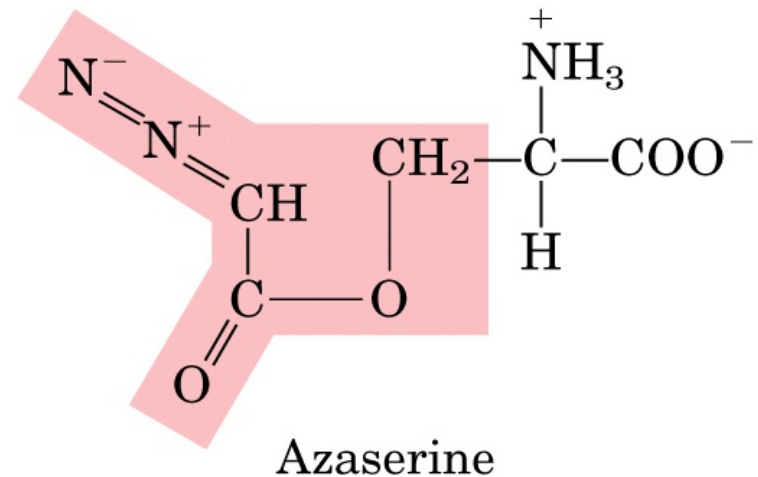
Las células que se dividen rápidamente necesitan grandes cantidades de RNA y DNA.

Estas células tienen grandes requerimientos de nucleótidos.

Las vías de síntesis de nucleótidos son blancos atractivos para el tratamiento del cáncer y las infecciones por microorganismos.

Muchos antibióticos y drogas anticancerígenas son inhibidoras de la síntesis de nucleótidos.

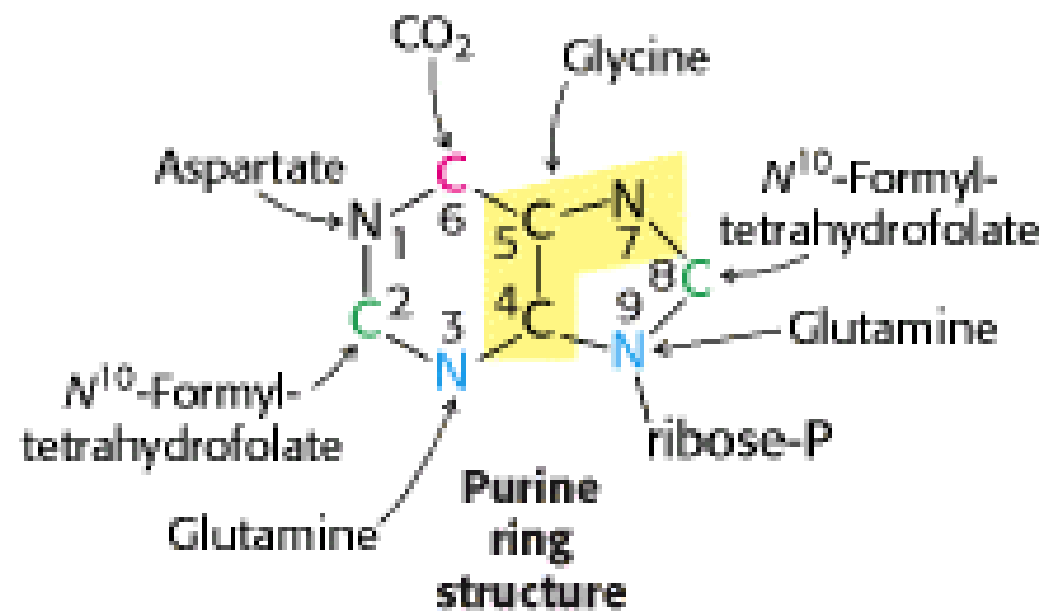
Varias enzimas de la síntesis de nucleótidos utilizan glutamina y son un potente blanco de agentes anticancerígenos



En muchas reacciones se requiere también derivados del ácido fólico.

Los antifolatos tienen utilidad como drogas.

Síntesis de purinas



IMP

ATP

GTP

to RNA

dATP

dGTP

to DNA

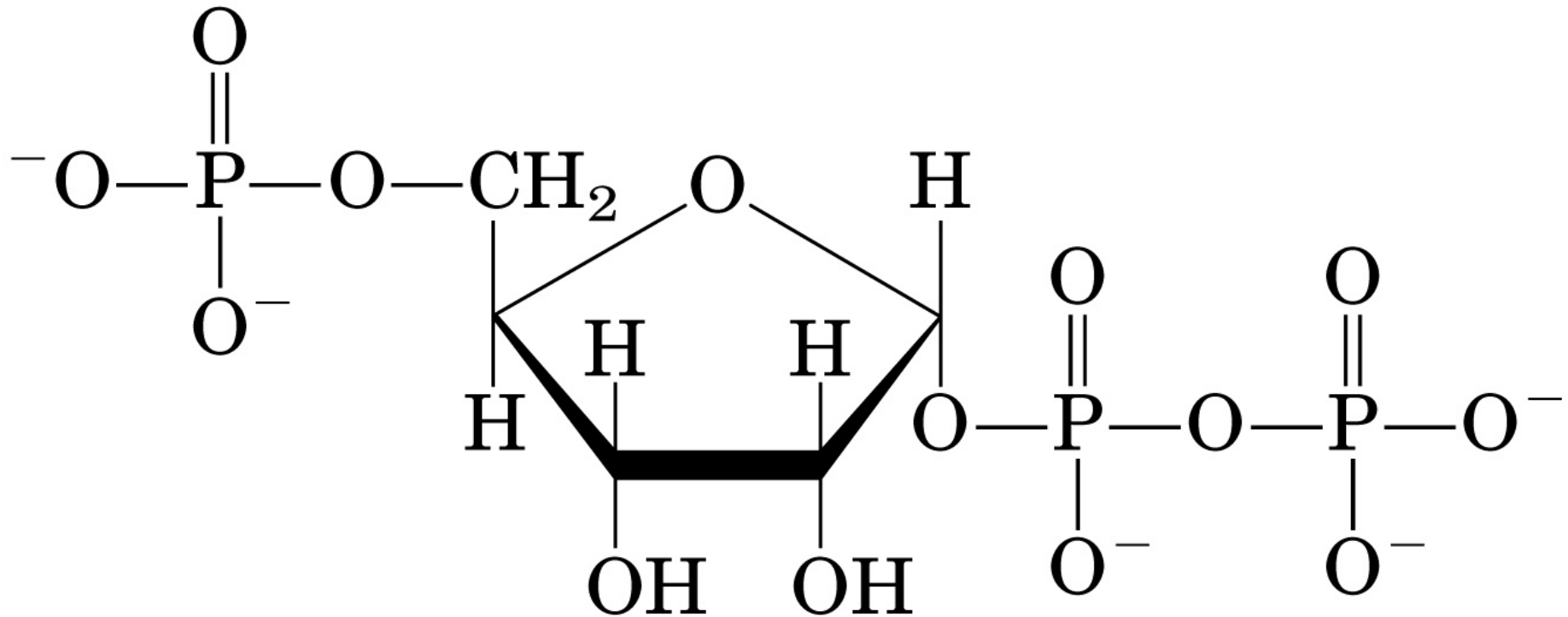
Las vías de síntesis de purinas son similares en organismos tan divergentes como *E. coli* y humanos, lo cual muestra la "unidad bioquímica de la vida".

- El sitio mayoritario de síntesis de purinas es el hígado
- Comienza con fosforribosilpirofosfato (PRPP) y lleva a la formación de inosina 5'-monofosfato (IMP)
- La purina se “construye” sobre la ribosa
- Ocurren varias reacciones de amidotransferencia y transformilación
- La síntesis de IMP requiere 5 ATP, 2 glutamina, 1 glicina, 1 aspartato, 1 CO_2 y 2 formiatos
- Los formiatos son llevados por el tetrahidrofolato en forma de $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metenil-THF y N^{10} -formil-THF
- Del IMP derivan el ATP y el GTP

Síntesis de PRPP



PRPP sintetasa

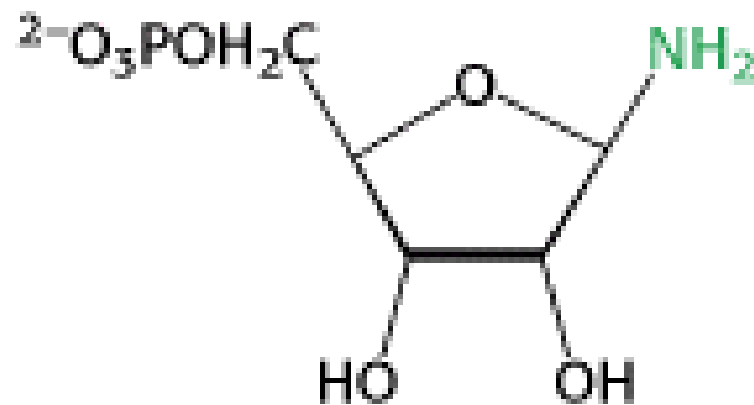
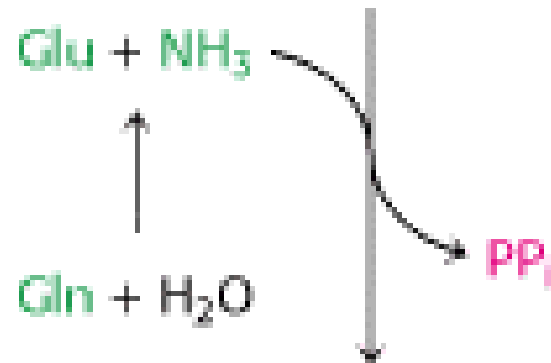
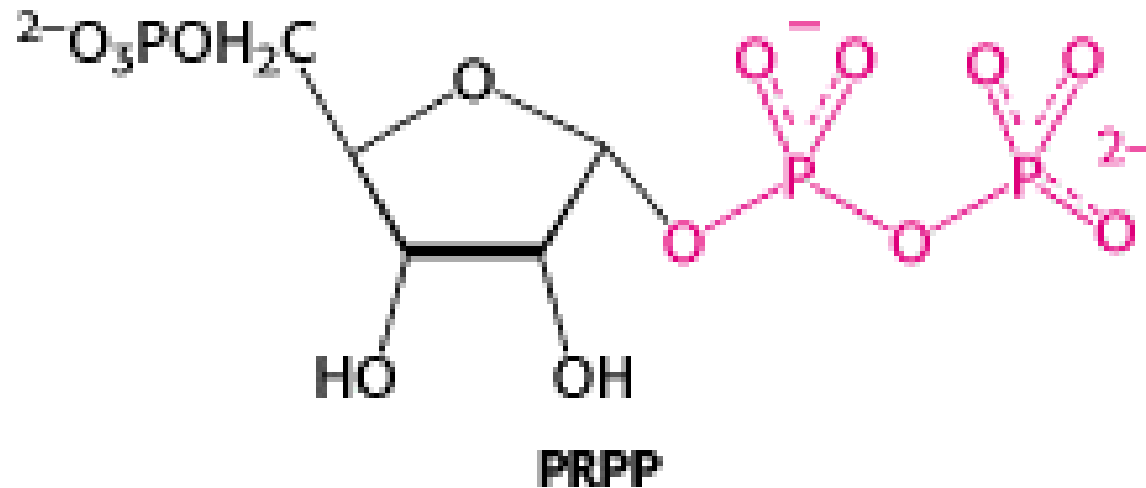


5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate
(PRPP)

La ribosa-5-fosfato sintetizada en la vía de las pentosas es activada por ATP para formar PRPP

PRPP es precursor de purinas, pirimidinas, histidina y triptofano

La síntesis de PRPP es un paso controlado, la actividad de la enzima varía con la concentración de muchos metabolitos

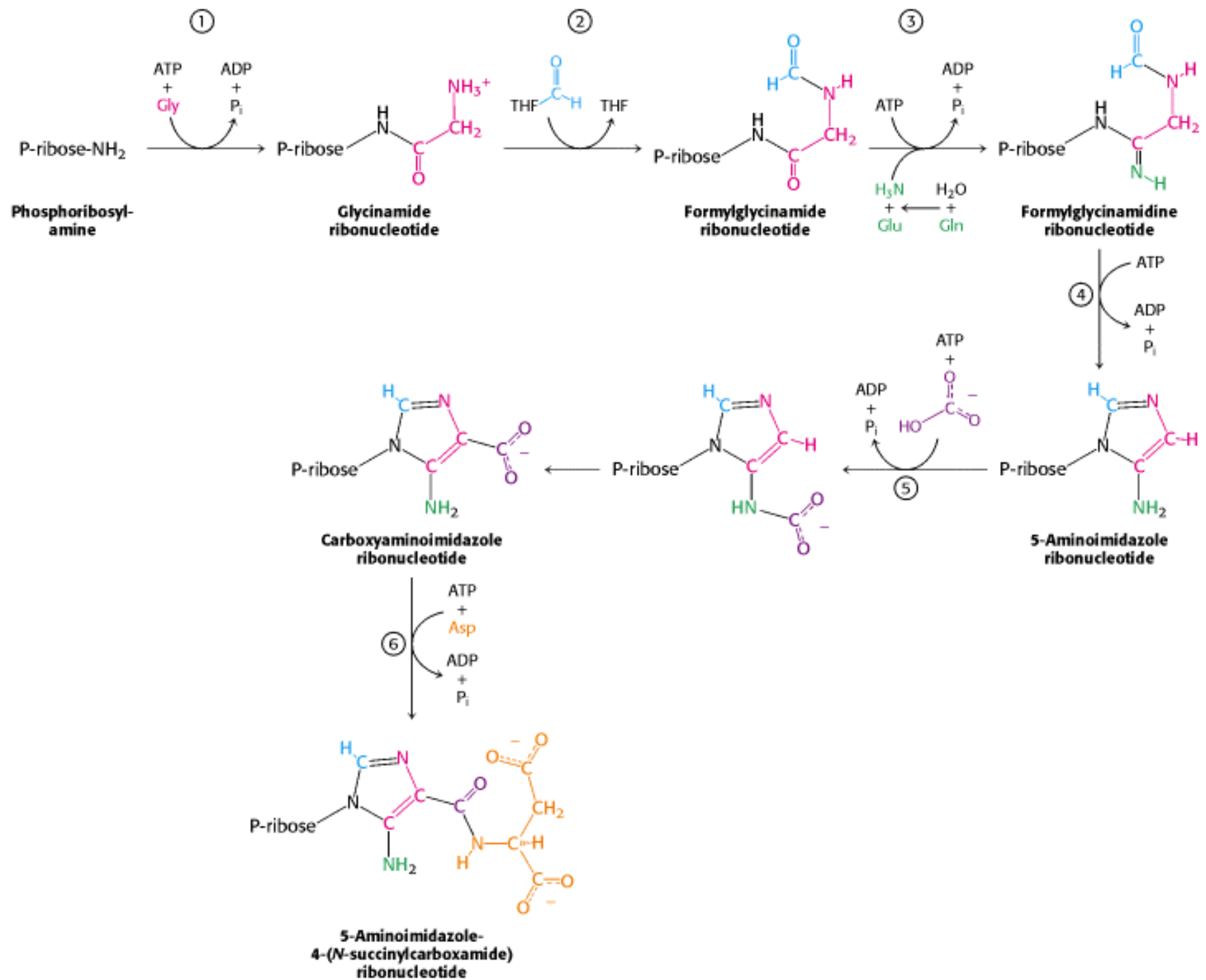


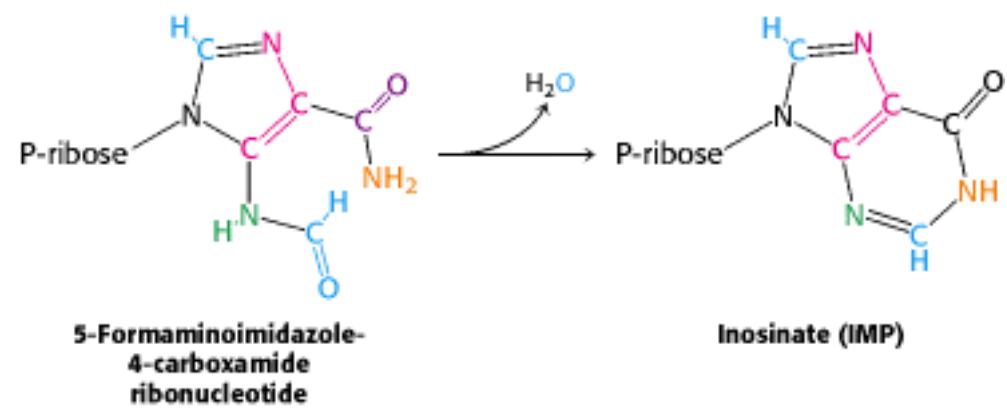
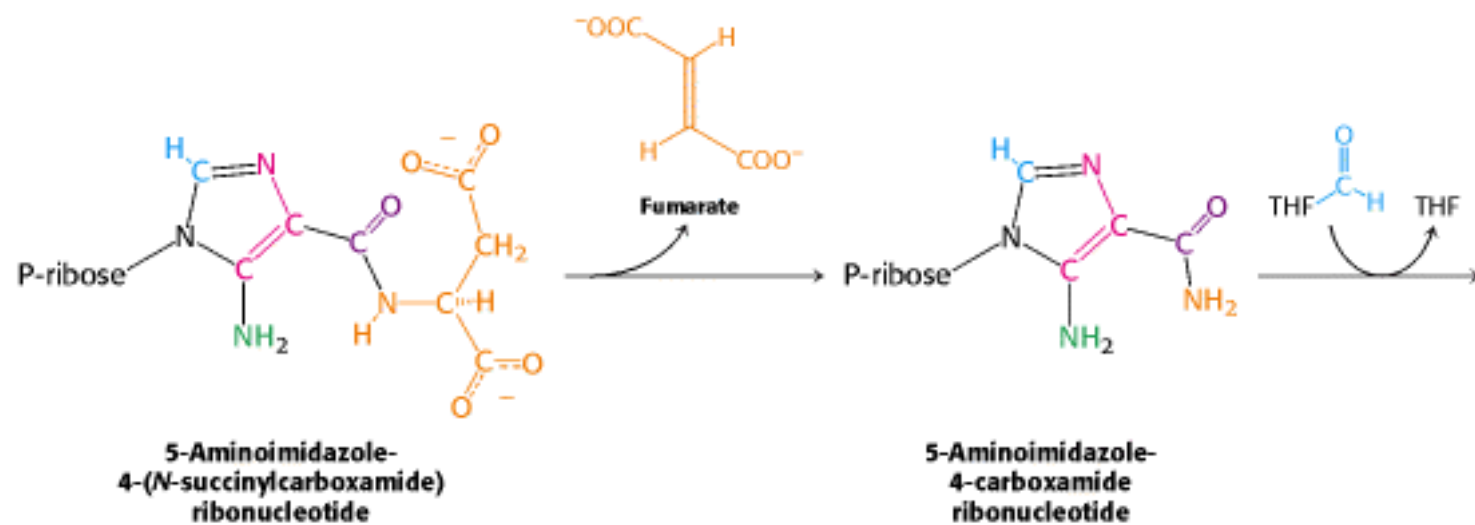
5-Phosphoribosyl-1-amine

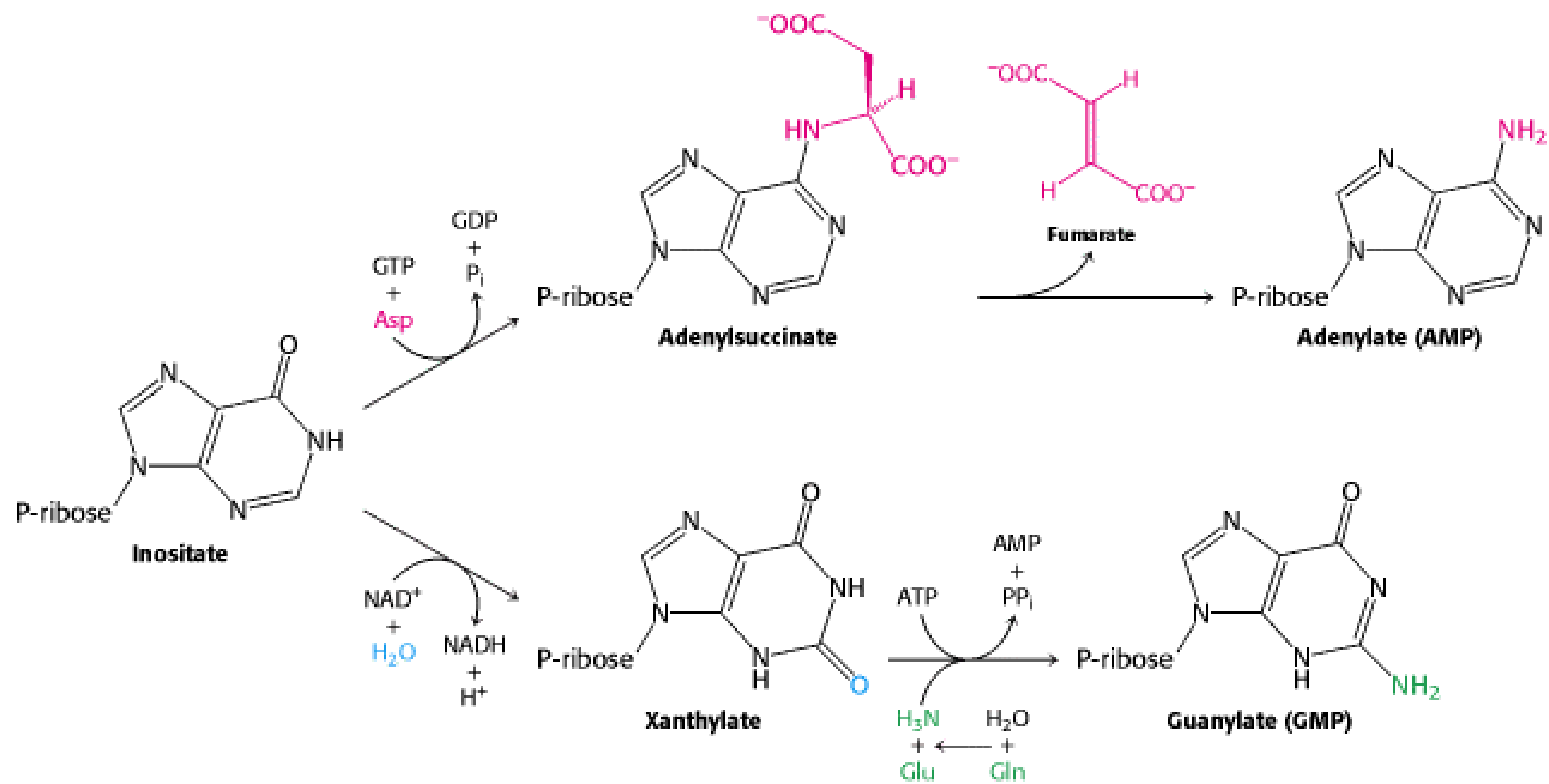
El **paso determinante o comprometido** inicial de la síntesis de purinas es el desplazamiento de pirofosfato por amonio para formar **5-fosforibosil-1-amina**. La reacción es catalizada por la *glutamina fosforibosil amidotransferasa* (ej. de encaje inducido). El PPi se hidroliza.

Luego de la síntesis de la fosforibosilamina, en 9 pasos se ensambla en anillo de purina.

Varios de estos pasos son catalizados por enzimas multifuncionales.







- El IMP sirve de precursor para AMP o GMP.
- La vía que lleva a AMP requiere energía en forma de GTP.
- La vía que lleva a GMP utiliza ATP.
- De esta manera se controla que las proporciones en que se sintetizan el AMP y el GMP sean equivalentes.

Síntesis de nucleósido di y trifosfatos

Para participar en la síntesis de ácidos nucleicos, los nucleósido monofosfatos deben ser convertidos en nucleósidos trifosfatos. Esto es catalizado por nucleósido quinasas.

- Nucleósido monofosfato quinasas (NMP quinasas)



- Nucleósido difosfato quinasas (NDP quinasas)



...pero no olvidemos que el ADP se convierte en ATP a nivel de la vía glicolítica y de la fosforilación oxidativa.

Regulación de la síntesis de purinas

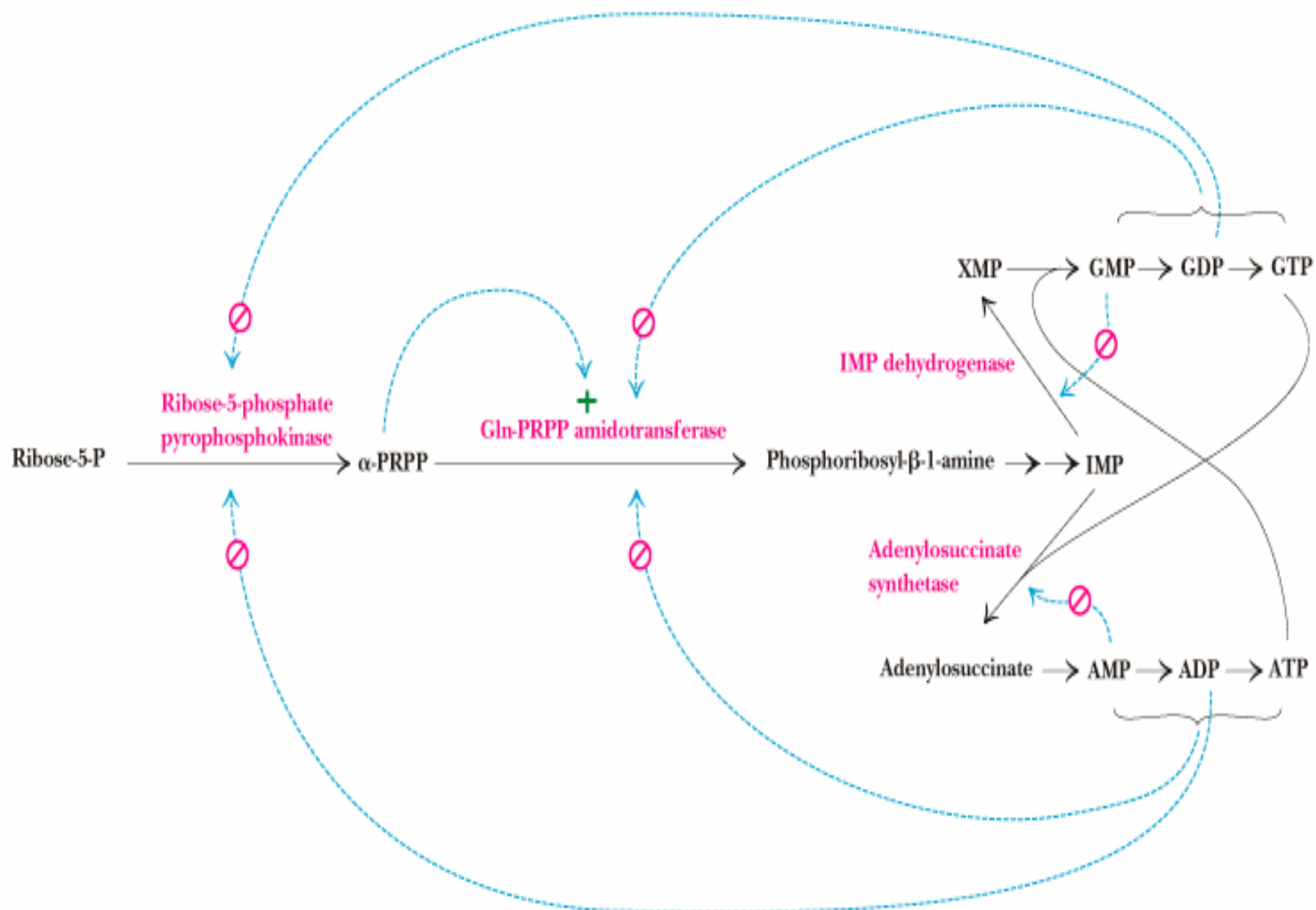
Los pasos limitantes de la velocidad son los dos primeros

La síntesis de PRPP con la PRPP sintetasa es retroinhibida por AMP y GMP

La síntesis de fosforibosilamina con la PRPP amidotransferasa es retroinhibida por ATP, ADP y AMP en un sitio alostérico, y por GTP, GDP y GMP en otro. La actividad es estimulada por PRPP

En la ramificación que conduce de IMP a AMP y GMP, la acumulación de ATP acelera la síntesis de GMP y viceversa

...la idea es controlar la cantidad total de nucleótidos así como las cantidades relativas.



Las purinas libres, que provienen de la dieta o del recambio de nucleótidos, pueden ser utilizadas para resintetizar nucleótidos en las **vías de salvataje o reciclaje**.

En estas reacciones, la purina debe fosforribosilarse a expensas de PRPP.

Se ahorra energía.

Hay dos enzimas de salvataje.

SALVAGE PATHWAY

Activated ribose (PRPP) + base



Nucleotide

DE NOVO PATHWAY

Activated ribose (PRPP) + amino acids
+ ATP + CO₂ + ...



Nucleotide

Primera enzima de salvataje:
adenina fosforribosil transferasa (APRTasa)



AMP inhibidor competitivo

Segunda enzima de salvataje:

hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
(HGPRTasa)

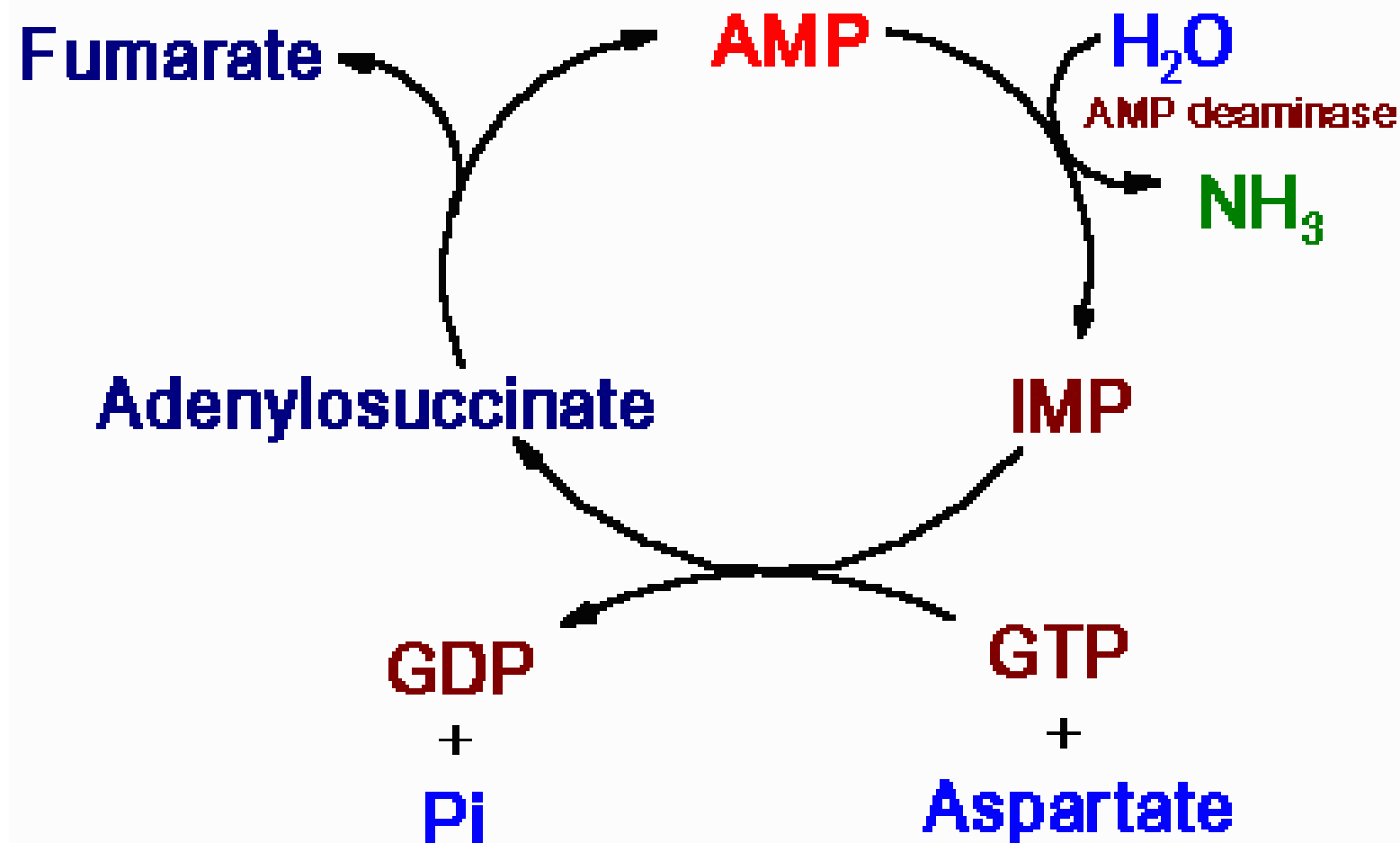
Hipoxantina + PRPP $\longrightarrow$ IMP + PPi

Guanina + PRPP $\longrightarrow$ GMP + PPi

IMP y GMP inhibidores competitivos

enzima alterada en el síndrome de Lesch-Nyhan
(hiperuricemia, retraso mental y automutilación)

Purine Nucleotide Cycle



La síntesis de AMP de IMP y el salvataje de IMP tienen el efecto neto de desaminar aspartato a fumarato.

Este “ciclo de nucleótidos de purina” es importante en el músculo esquelético en actividad, donde la actividad de enzimas anapleróticas del ciclo de Krebs es baja.

Para que el ciclo opere, es necesario que la proteína sea degradada para que se genere aspartato, directamente o por transaminación.

Catabolismo de purinas

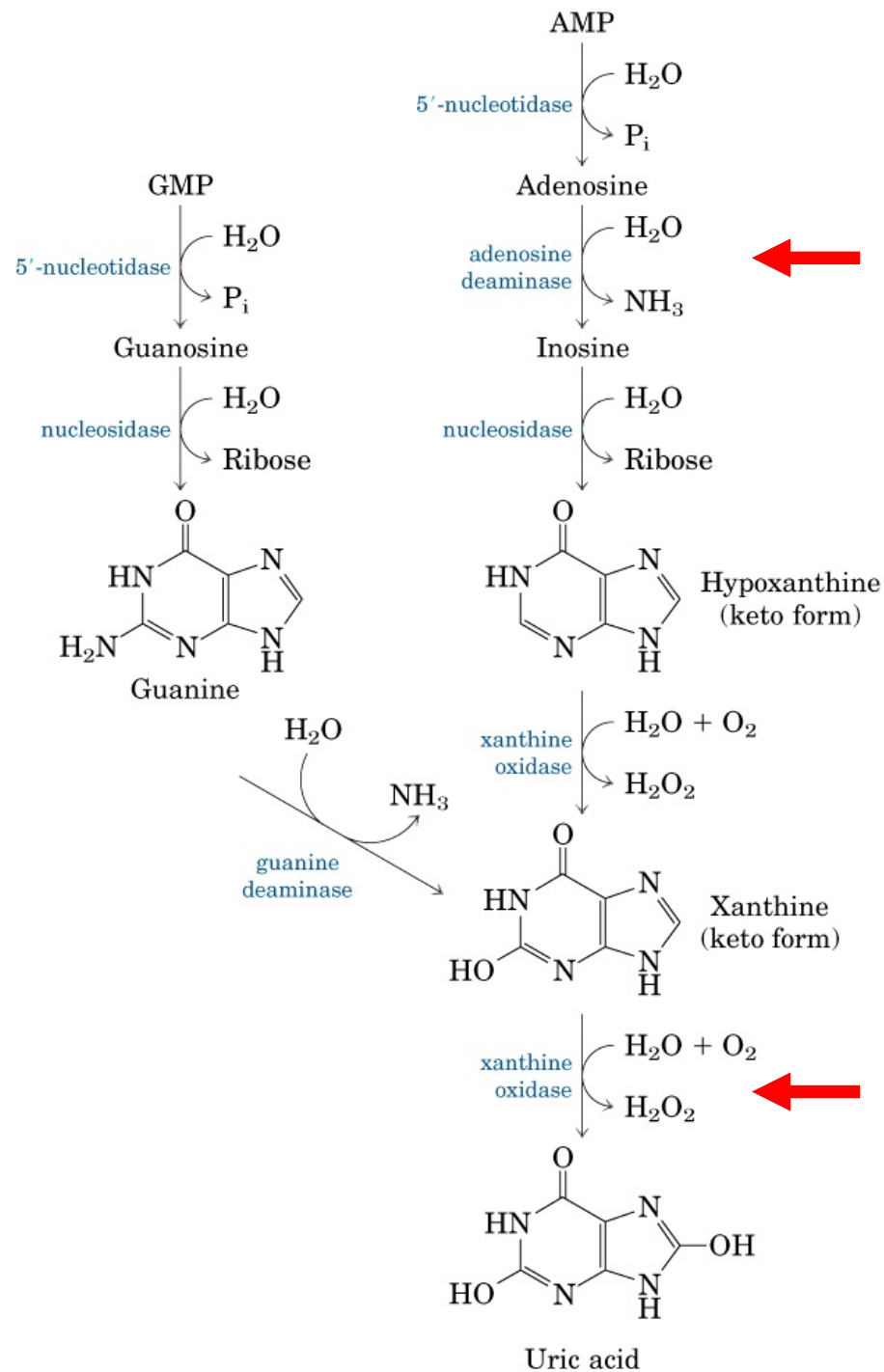
En primer lugar, los ácidos nucleicos son degradados por nucleasas.

Luego, los nucleótidos son desfosforilados a nucleósidos por fosfatasas y nucleotidasas.

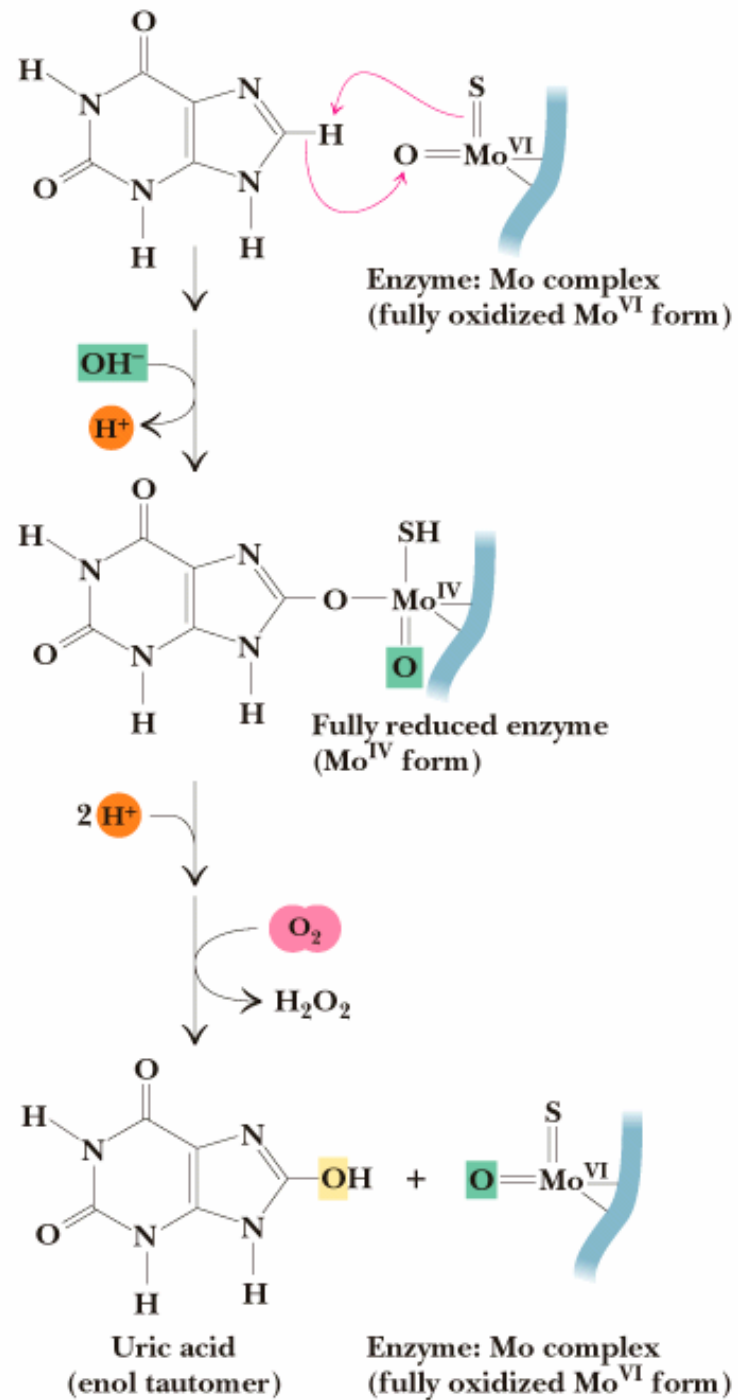
Los nucleósidos son degradados por nucleosidasas o nucleósido fosforilasas:



La ribosa-1-P es isomerizada a ribosa-5-P



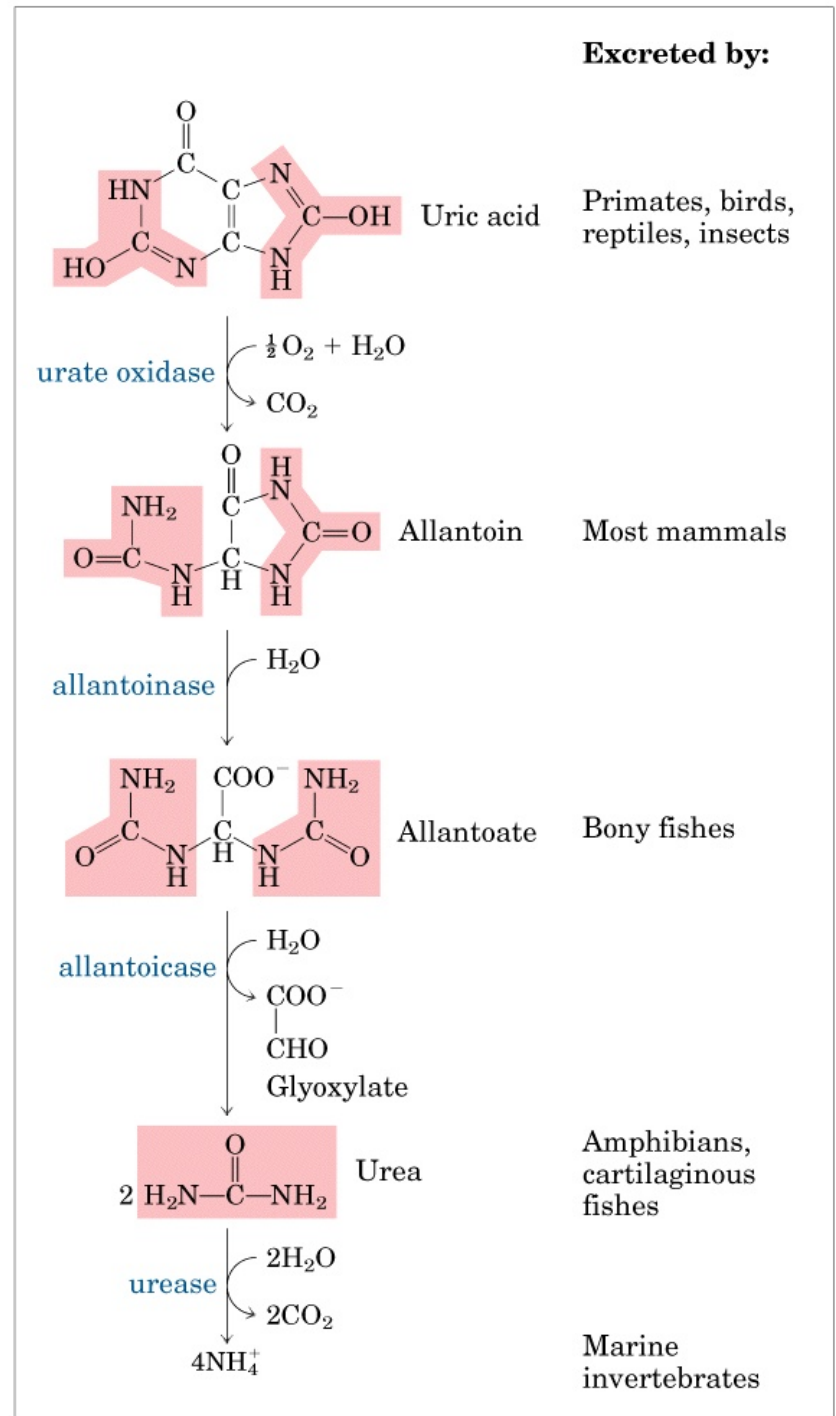
Las purinas son degradadas a hipoxantina y xantina, y ésta a ácido úrico por la enzima xantina oxidasa



xantina
oxidasa

El ácido úrico es el producto de excreción de las purinas en el hombre.

En otros vertebrados, el ácido úrico es degradado a alantoína por la urato oxidasa (única oxidasa que no tiene cofactores!), y éste a alantoato, urea o amonio.

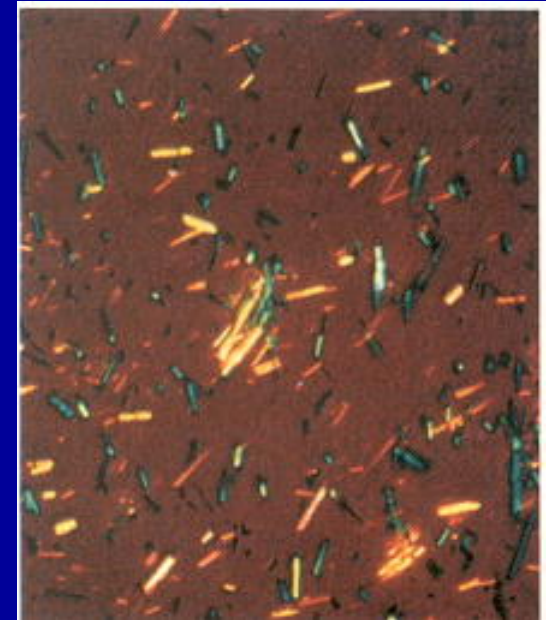


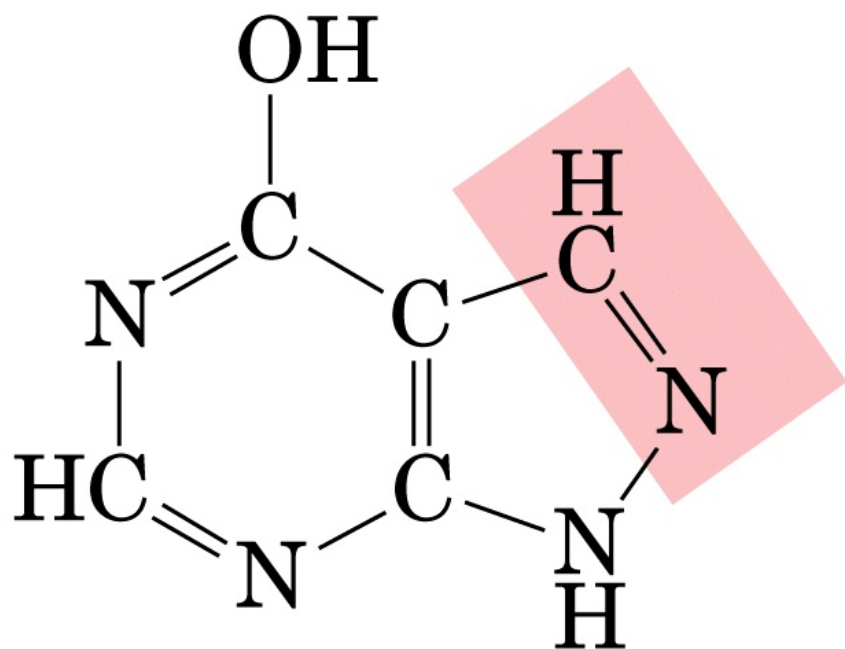
El ácido úrico es relativamente insoluble y puede precipitar en las articulaciones, llevando a inflamación y artritis.

Esto se denomina gota.

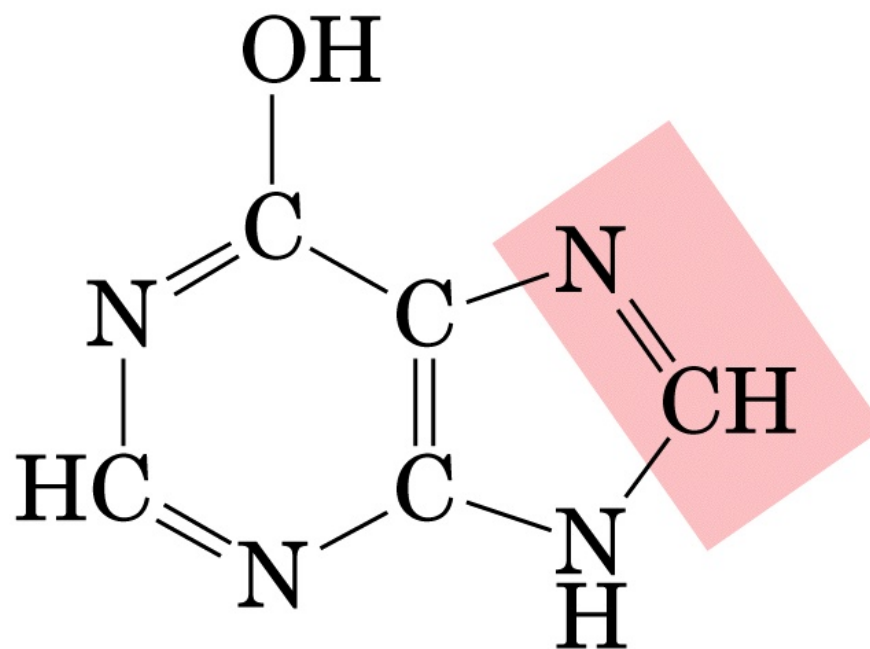
Resulta de exceso de purinas o deficiencia parcial en la enzima de salvataje HGPRT.

Puede tratarse con el inhibidor alopurinol.





Allopurinol



Hypoxanthine
(enol form)

Desórdenes del metabolismo de purinas

Disorder	Defect	Nature of Defect	Comments
<u>Gout</u>	PRPP synthetase	increased enzyme activity due to elevated V _{max}	hyperuricemia
Gout	PRPP synthetase	enzyme is resistant to feed-back inhibition	hyperuricemia
Gout	PRPP synthetase	enzyme has increased affinity for ribose-5-phosphate (lowered K _m)	hyperuricemia
Gout	PRPP amidotransferase	loss of feed-back inhibition of enzyme	hyperuricemia
Gout	HGPRT ^a	partially defective enzyme	hyperuricemia
<u>Lesch-Nyhan syndrome</u>	HGPRT	lack of enzyme	see above
<u>SCID</u>	ADA ^b	lack of enzyme	see above
Immunodeficiency	PNP ^c	lack of enzyme	see above
<u>Renal lithiasis</u>	APRT ^d	lack of enzyme	2,8-dihydroxyadenine renal lithiasis
<u>Xanthinuria</u>	Xanthine oxidase	lack of enzyme	hypouricemia and xanthine renal lithiasis
<u>von Gierke's disease</u>	Glucose-6-phosphatase	enzyme deficiency	see above

Síndrome de Lesch-Nyhan

deficiencia en enzima de salvataje HGPRTasa

herencia ligada al cromosoma X

gota

deficiencias neurológicas

auto mutilación

muerte antes de los 20 años

Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)

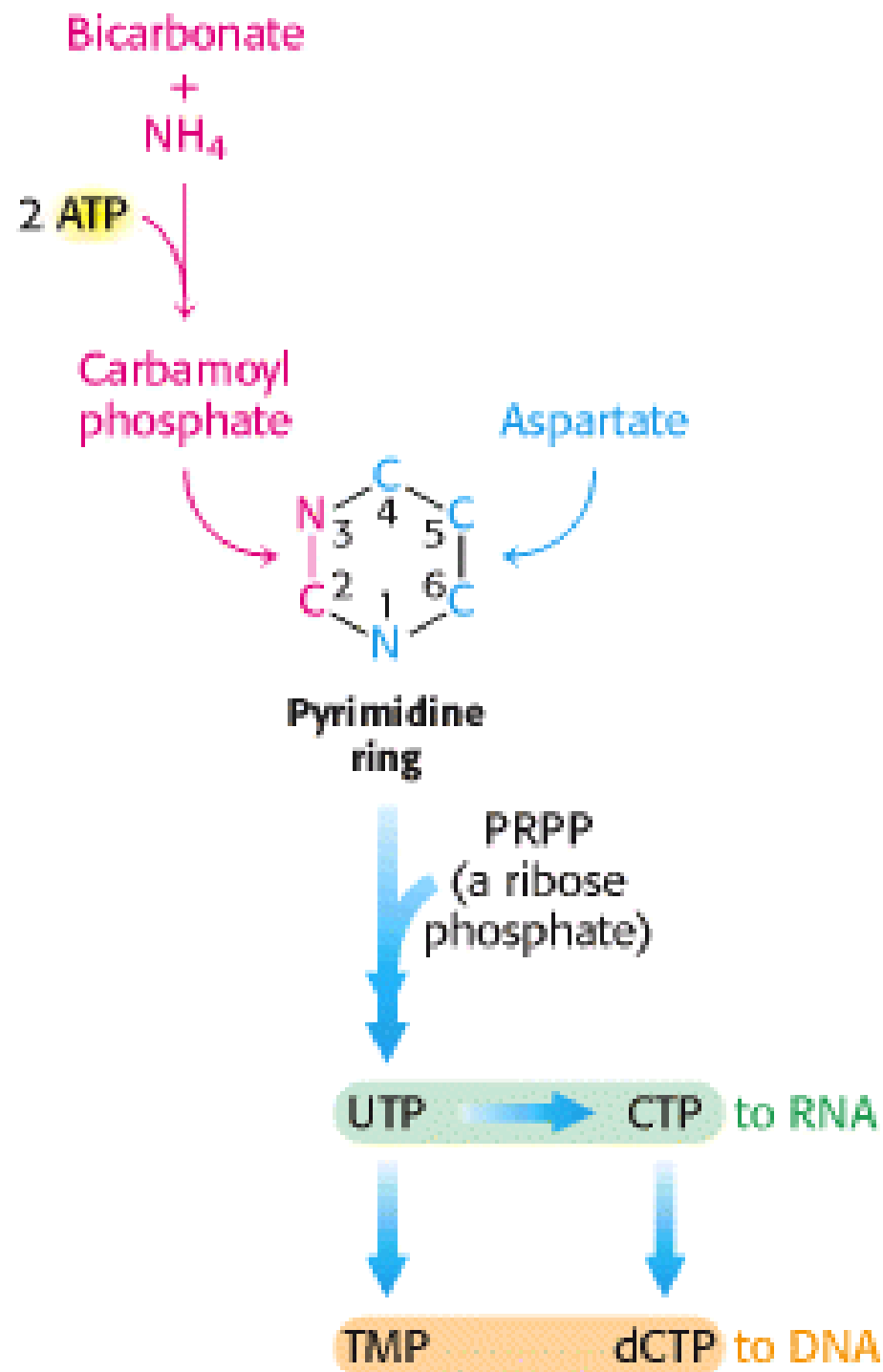
deficiencia en la enzima adenosina desaminasa (ADA, convierte adenosina a inosina en el catabolismo)

se destruyen linfocitos B y T

en ausencia de ADA, se acumula dATP hasta 50 veces

según una teoría, el dATP inhibe la ribonucleótido reductasa, lo cual inhibe la síntesis de otros dNTPs y la síntesis de DNA

Metabolismo de pirimidinas



A diferencia de las purinas, las pirimidinas NO se sintetizan como nucleótidos.

Primero se sintetiza el anillo a partir de bicarbonato, aspartato y amonio.

Luego se une a PRPP.

En primer lugar se sintetiza el UTP, de éste derivan los otros.

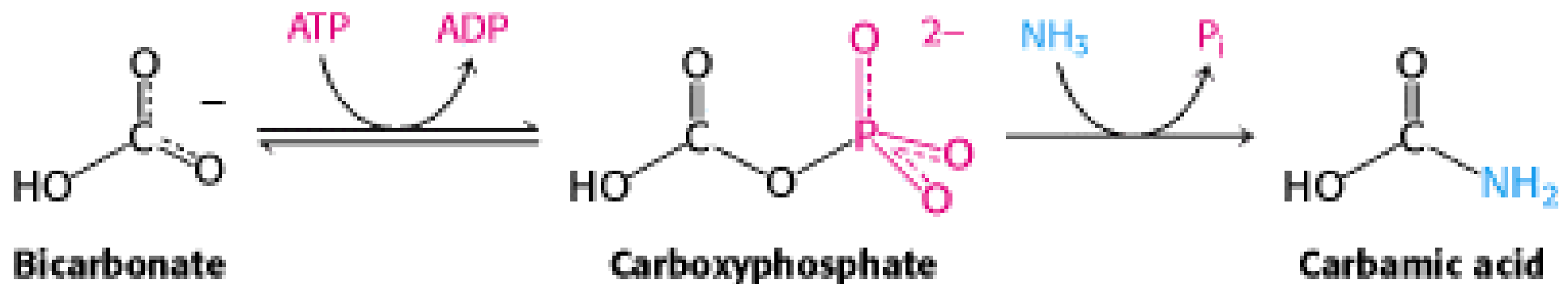
Carbamoil fosfato sintetasa II

El primer paso en la síntesis de pirimidinas es la formación de carbamoil fosfato con la carbamoil fosfato sintetasa II a expensas de amonio, bicarbonato y dos ATP

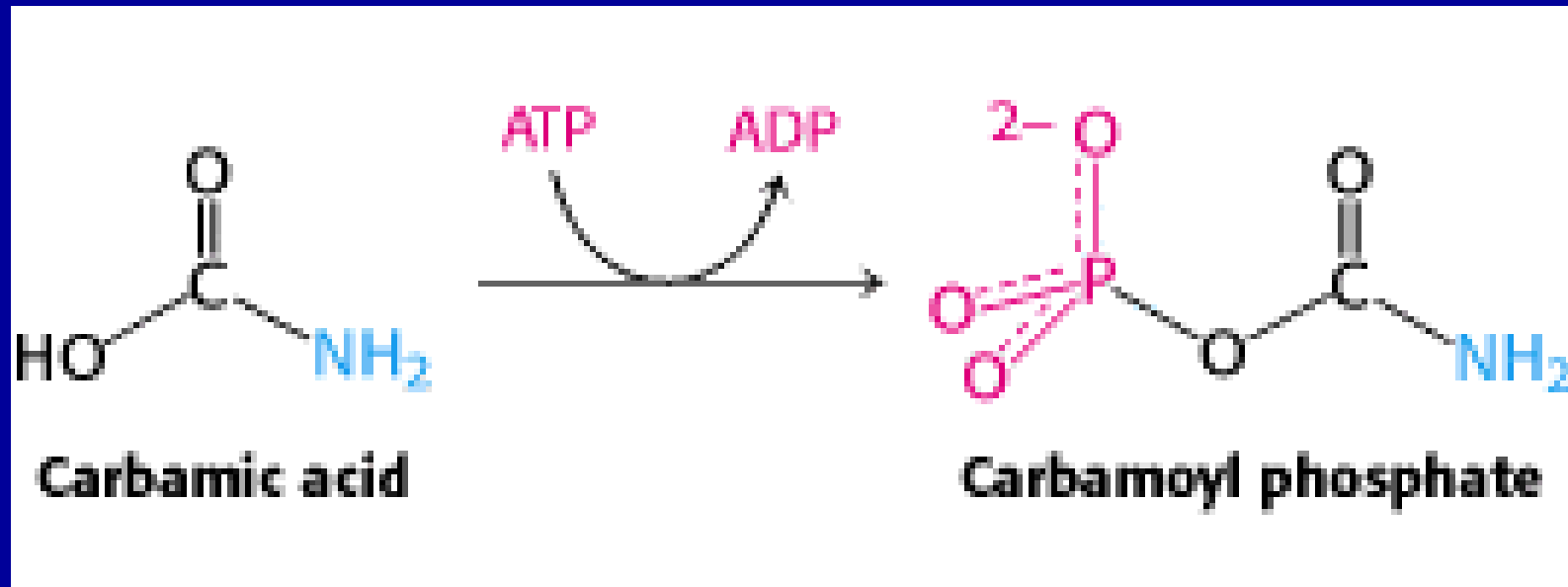
Enzima citosólica, a diferencia de la carbamoil fosfato sintetasa I, enzima mitocondrial del ciclo de la urea

Paso regulado

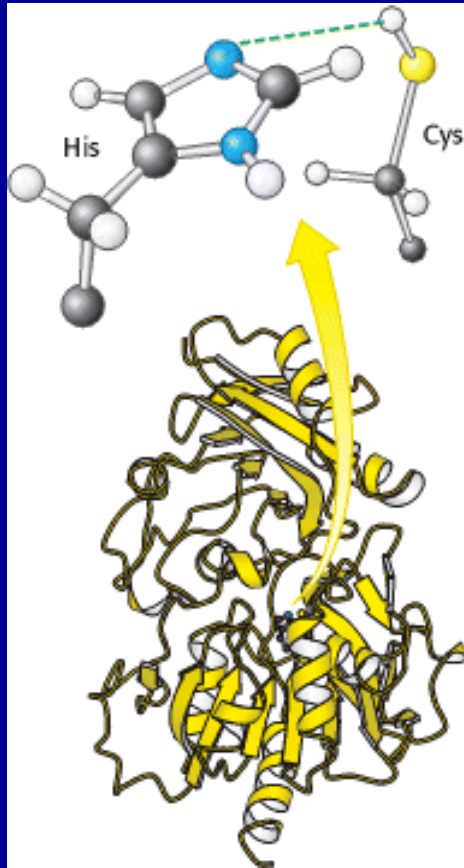
En la primera etapa, el bicarbonato es fosforilado a expensas de ATP. El intermediario entonces reacciona con amonio formando el carbamato.



En la segunda etapa, el carbamato es fosforilado por un segundo ATP para dar el carbamoil fosfato.



Los intermediarios son lábiles pero existe canalización del sustrato

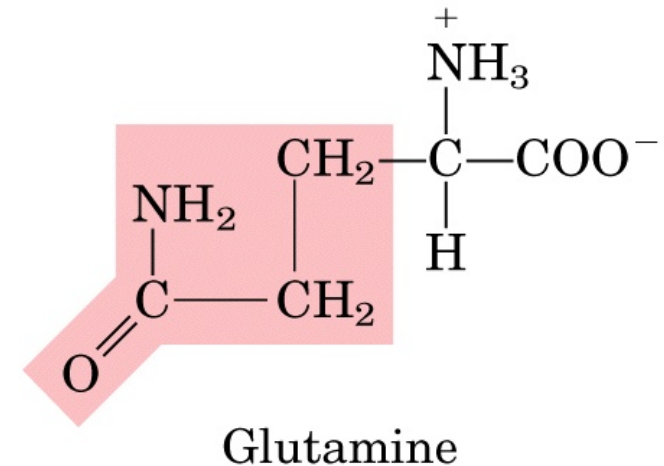
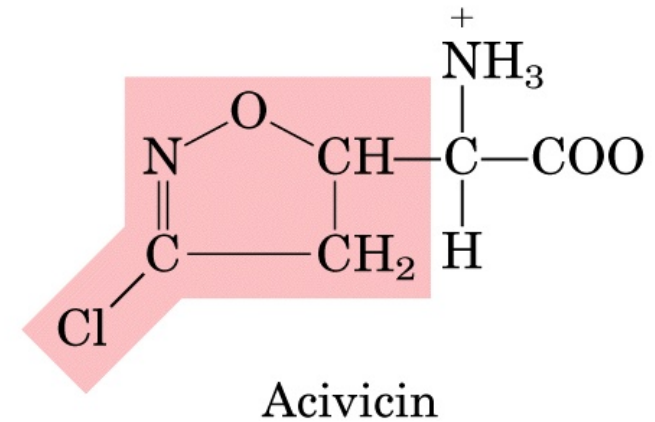
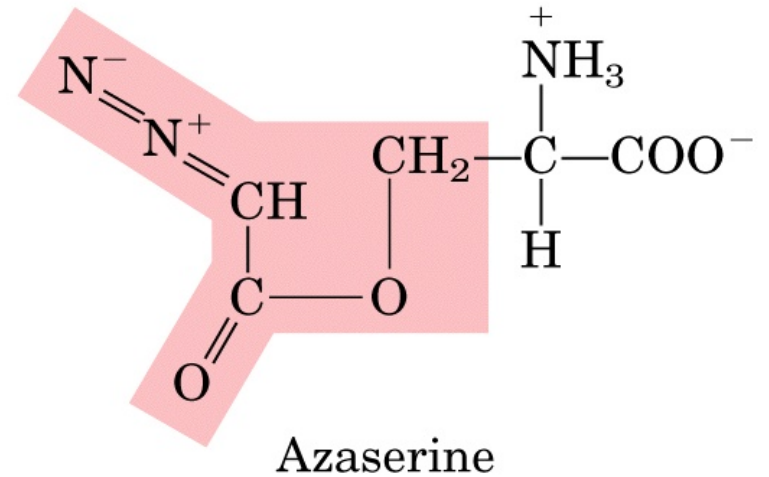


El amonio para la síntesis del carbamoil fosfato proviene de la glutamina

La carbamoil fosfato sintetasa II tiene un dominio con actividad glutaminasa diferente del presente en la fosforribosil amidotransferasa de la síntesis de purinas

Este dominio es conservado en una serie de amidotransferasas de la síntesis de nucleótidos (CTP sintetasa y GMP sintetasa).

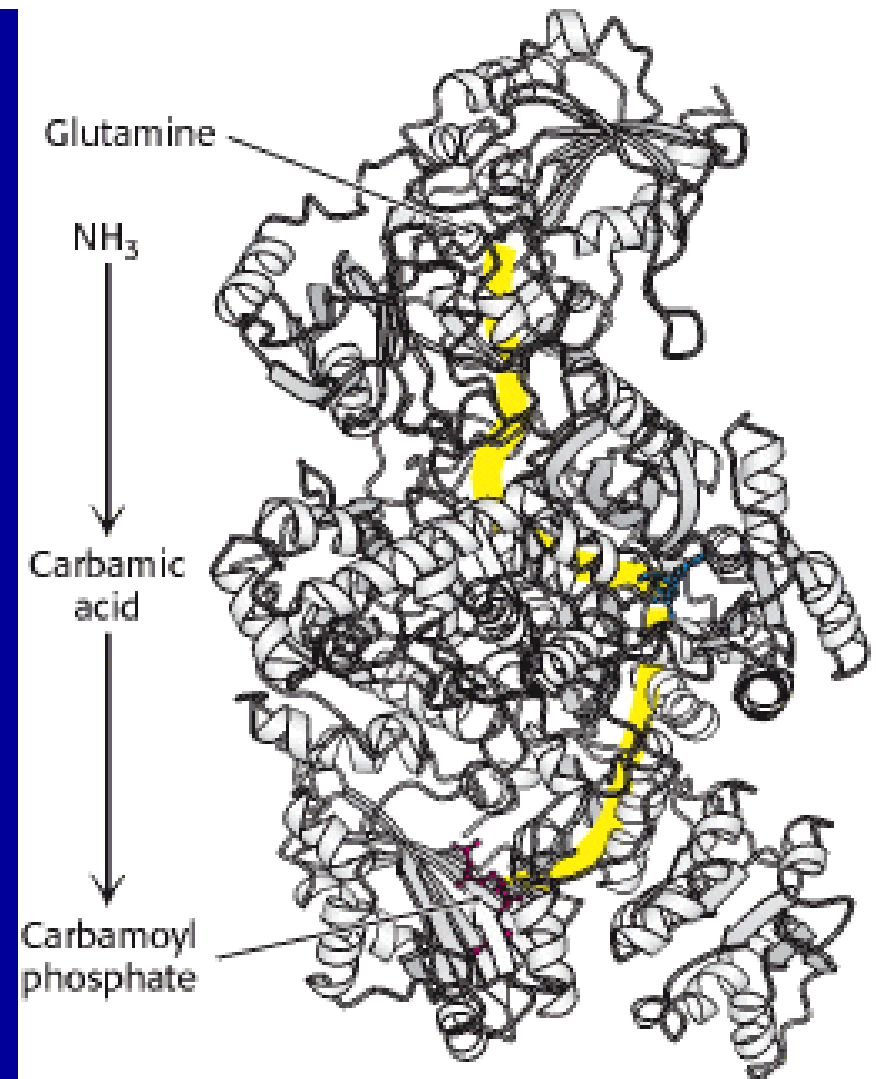
Las enzimas con actividad de glutamina amidotransferasa son un potente blanco de agentes anticancerígenos



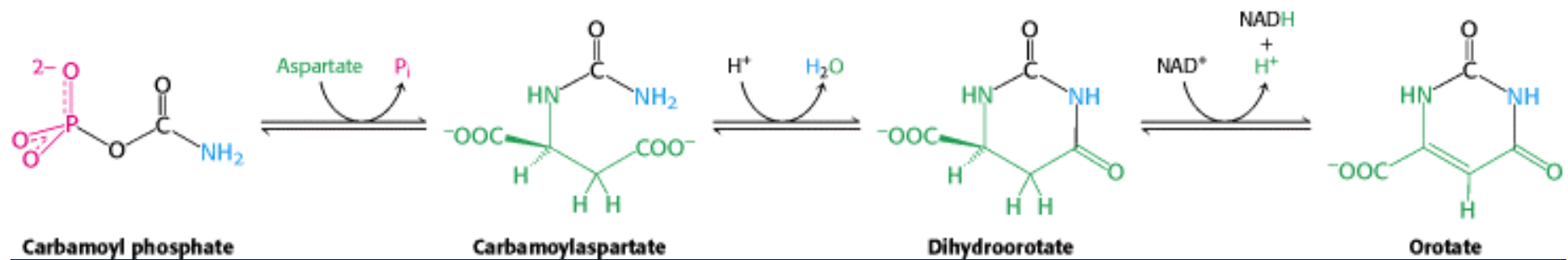
La carbamoil fosfato sintetasa II tiene 3 sitios activos

Ocurre canalización de sustrato:

- los intermediarios generados en un sitio son capturados por otro sitio sin mediar difusión
- los intermediarios reactivos son protegidos de la hidrólisis
- los intermediarios no se acumulan
- ventajas cinéticas



enzima
bacteriana



... siguiendo con la síntesis...

El **carbamoyl fosfato** reacciona con el **aspartato** en una reacción catalizada por la **aspartato transcarbamoylase (ATCasa)**. Este es el paso comprometido de la síntesis y está regulado en bacterias.

El producto **carbamoylaspartato** se convierte en **dihydroorotato** con la **dihydroorotasa**.

La **dihydroorotato deshidrogenasa**, enzima mitocondrial, forma el **orotato**.

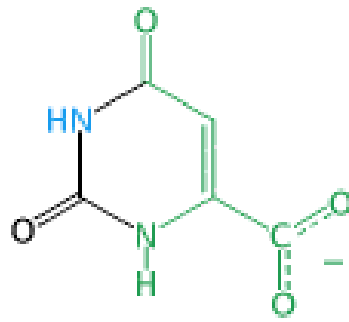
Las actividades las primeras tres enzimas de la síntesis de pirimidinas

carbamoilfosfato sintetasa II

aspartato transcarbamilasa

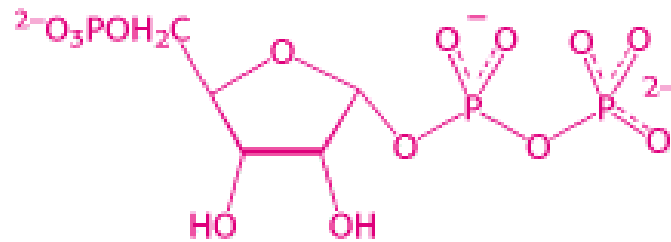
dihidrooorotasa

están en un mismo polipéptido de 243 kDa.

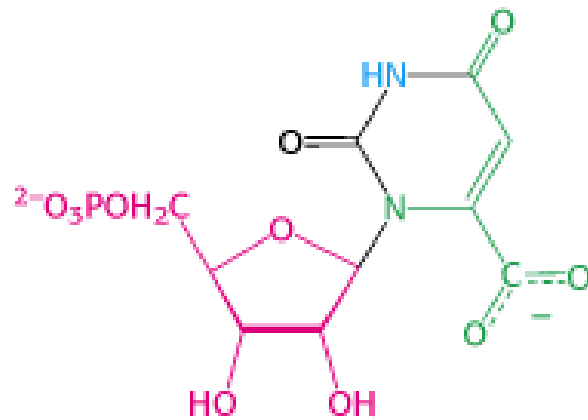


Orotate

+



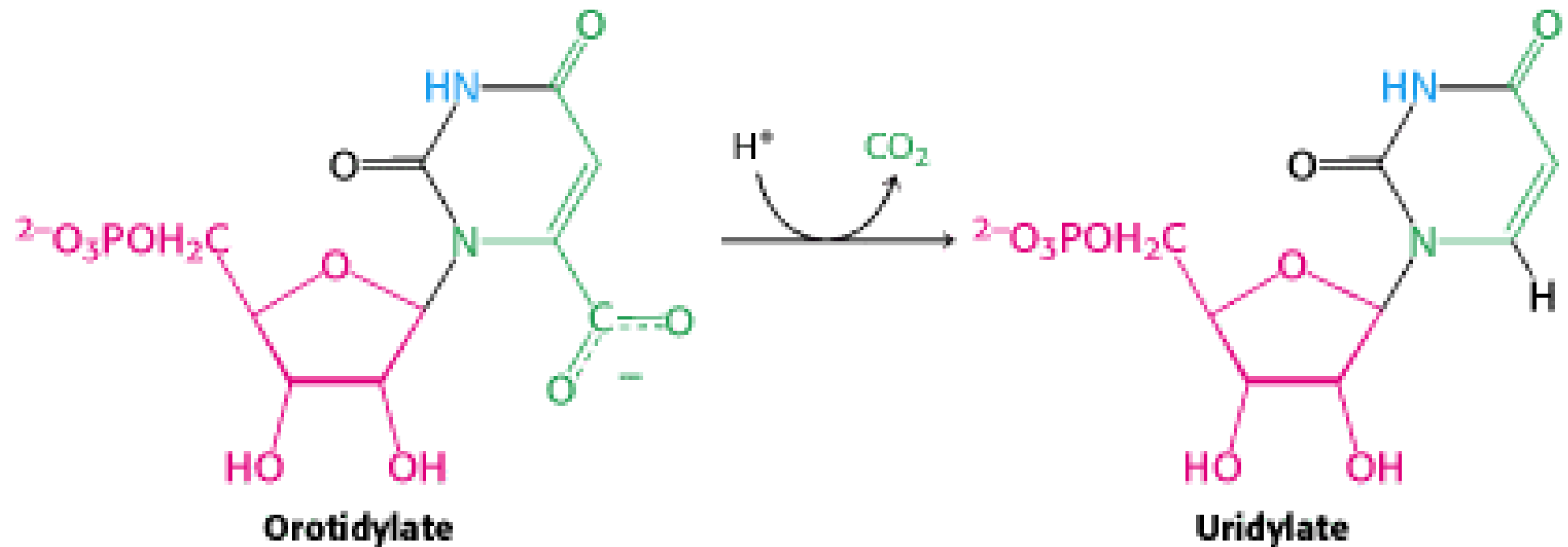
5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate
(PRPP)



Orotidylate

El orotato reacciona
con el PRPP para
formar el orotidilato

El orotidilato se descarboxila para formar uridilato (UMP)

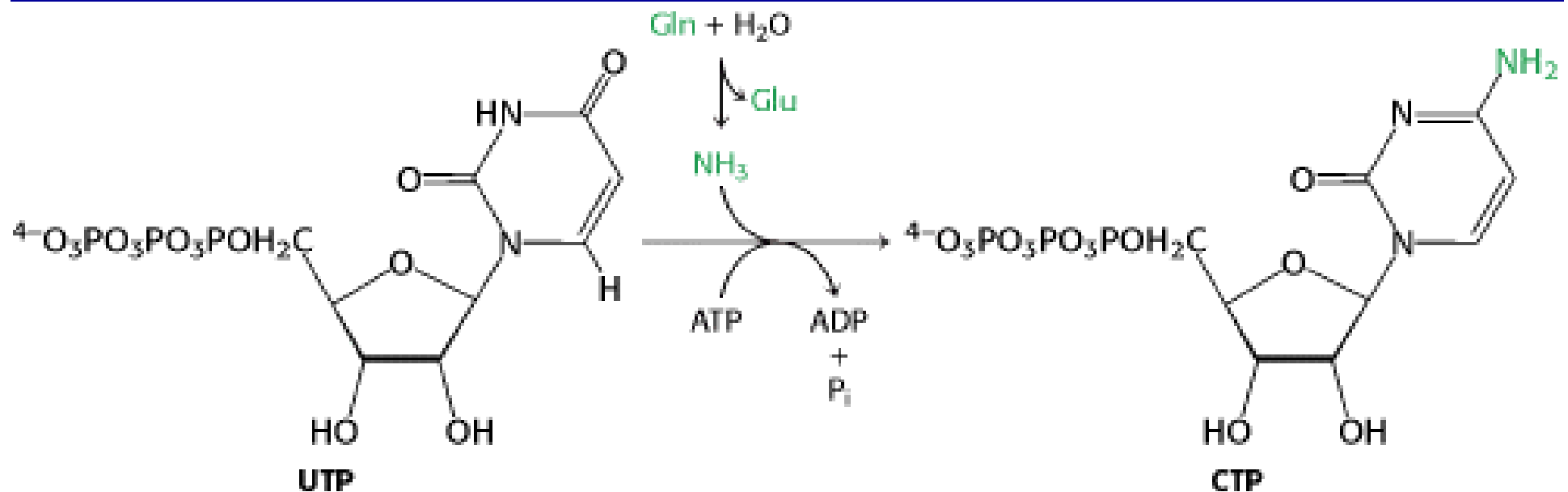


Esta actividad está en el mismo polipéptido que la anterior.

Luego, el UMP se convierte en UDP, y éste en UTP a expensas de ATP (los nucleótidos son interconvertibles)

Síntesis de CTP

CTP se sintetiza a partir de UTP vía la CTP sintetasa, la cual utiliza ATP y amonio originado a partir de glutamina



Regulación de la síntesis de pirimidinas

ocurre a nivel de la carbamoil fosfato sintetasa II
inhibida por UTP

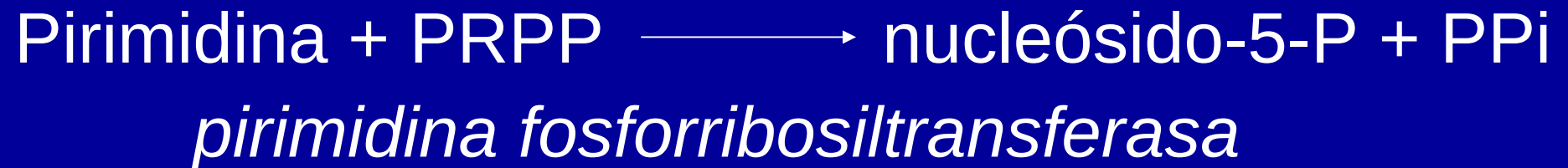
activada por PRPP y ATP

si bien la enzima es citosólica, en condiciones de toxicidad por amonio, el carbamoil fosfato sintetizado en la mitocondria por el ciclo de la urea pasa al citosol y se forma mucho orotato

el UMP inhibe la OMP descarboxilasa

la CTP sintetasa es inhibida por CTP

Salvataje de pirimidinas



Síntesis de desoxirribonucleótidos

Los desoxirribonucleótidos no se sintetizan *de novo* a partir de desoxirribosa, sino que se sintetizan por reducción de los ribonucleósidos difosfato



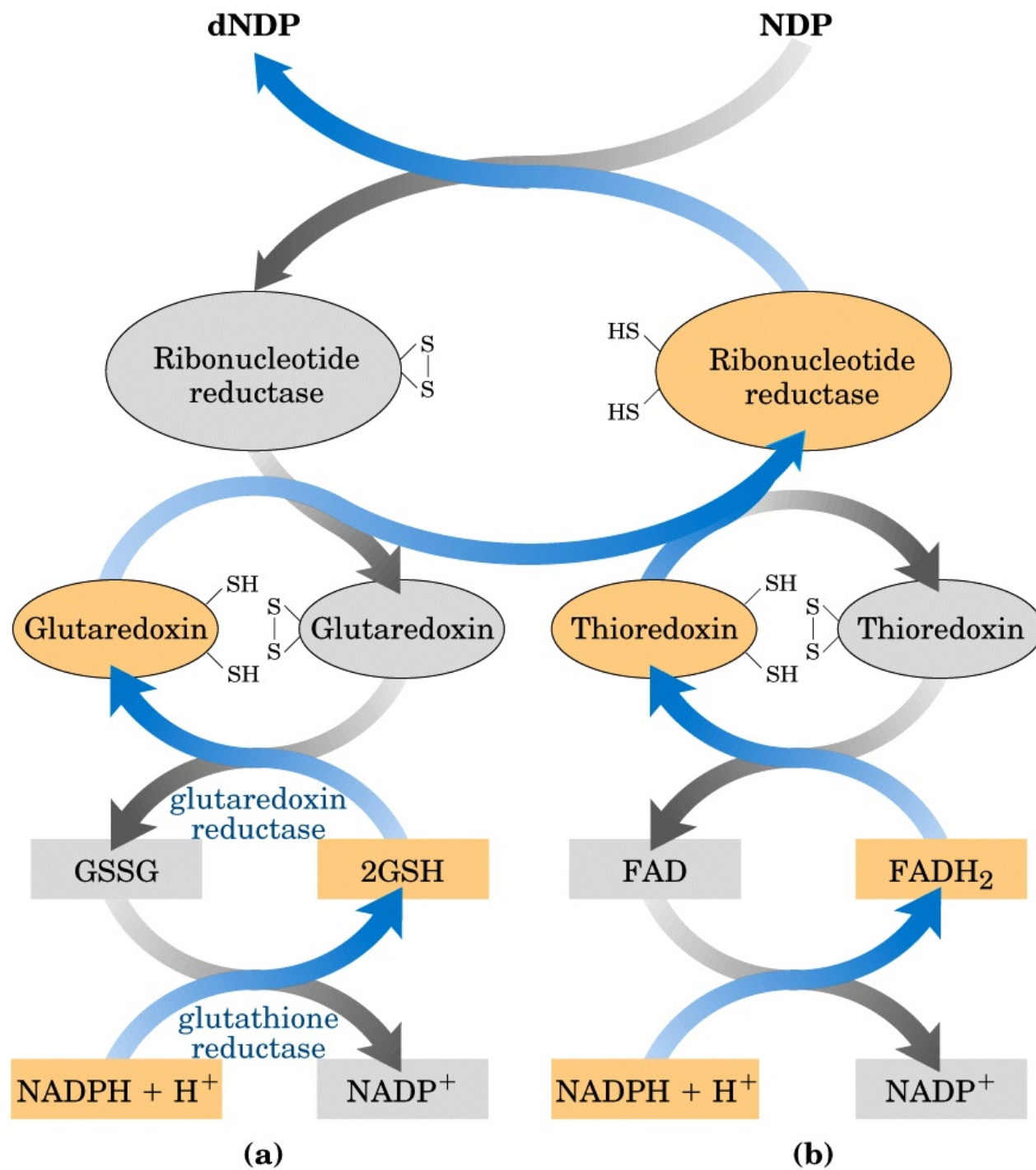
El hidroxilo en 2' de la ribosa es sustituido por un hidrógeno

Cataliza la enzima **ribonucleótido reductasa**

El dador último de los dos electrones es el NADPH

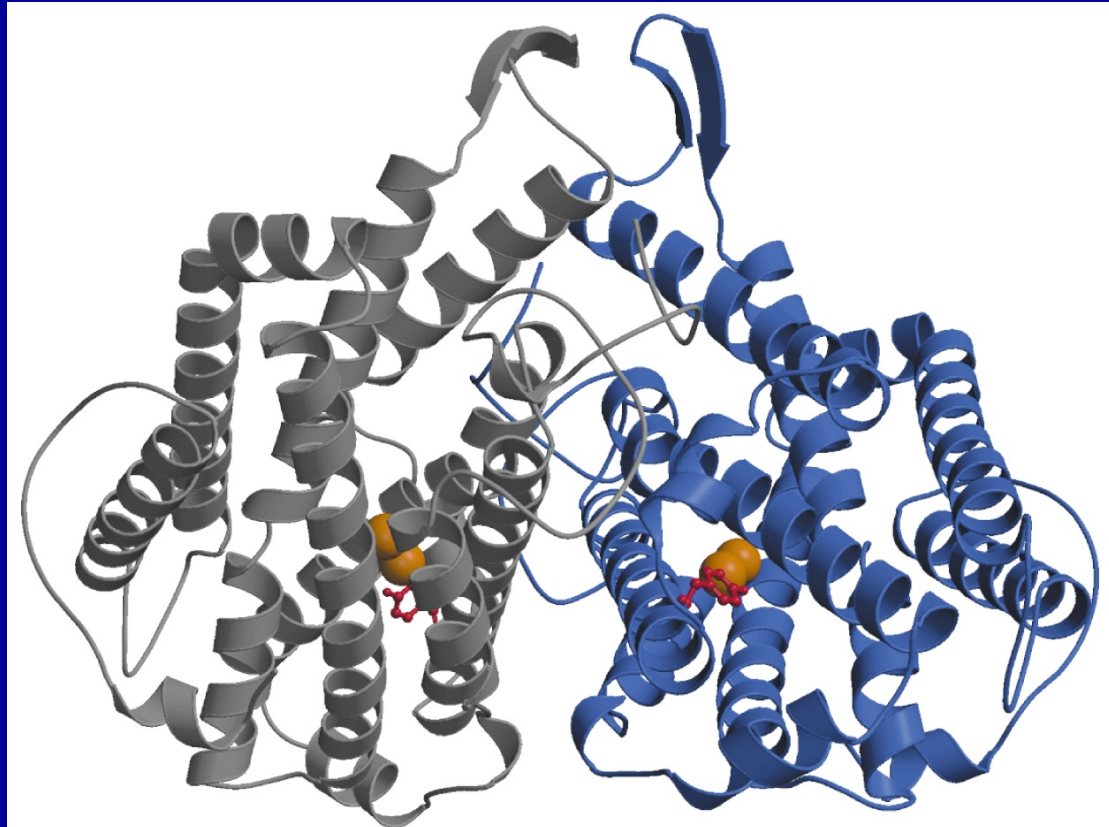
Los electrones son transferidos vía tiorredoxina o glutarredoxina

La síntesis culmina con la fosforilación de los dNDPs a dNTPs

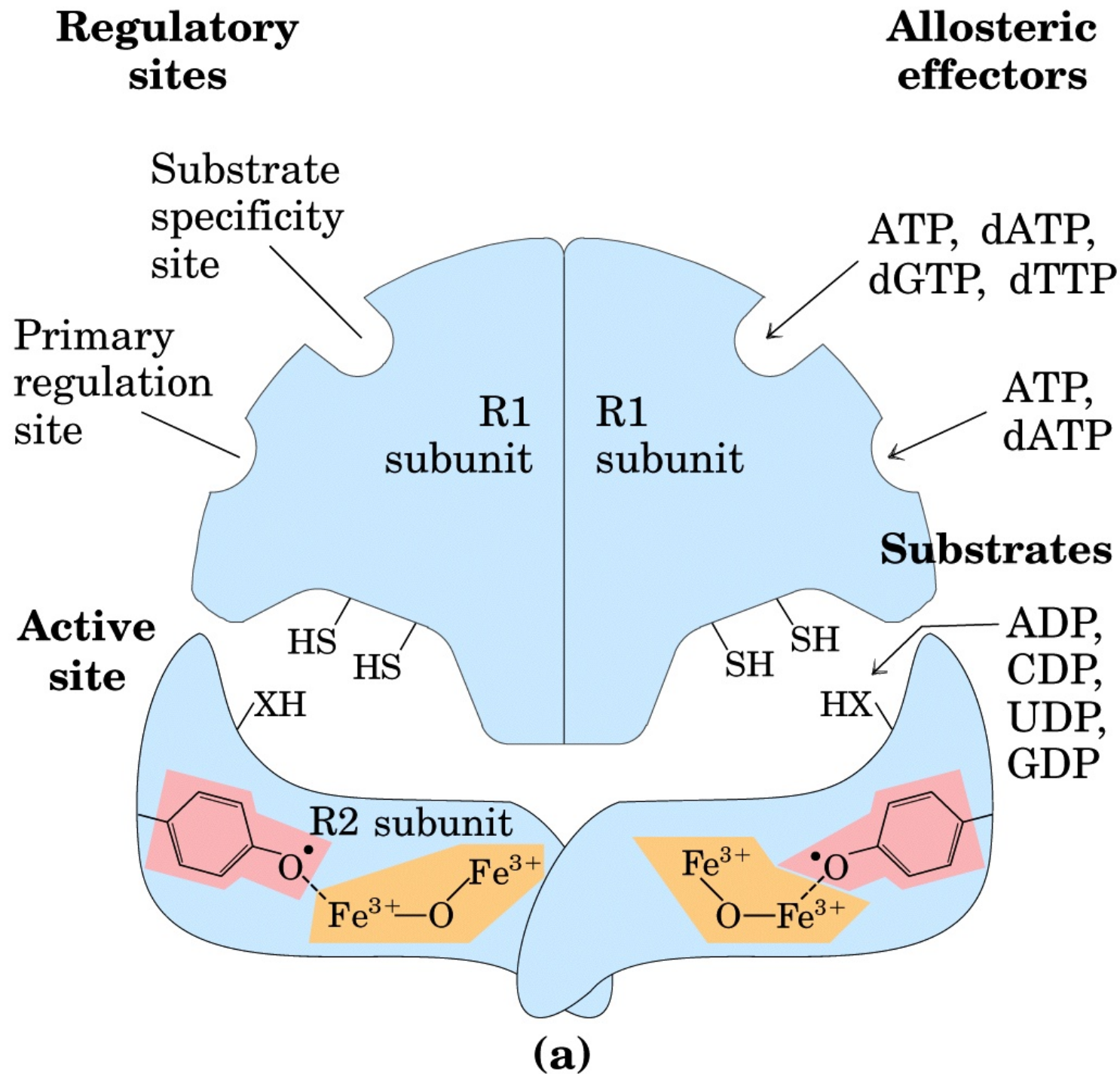


El mecanismo de reacción de la ribonucleótido reductasa involucra radicales libres

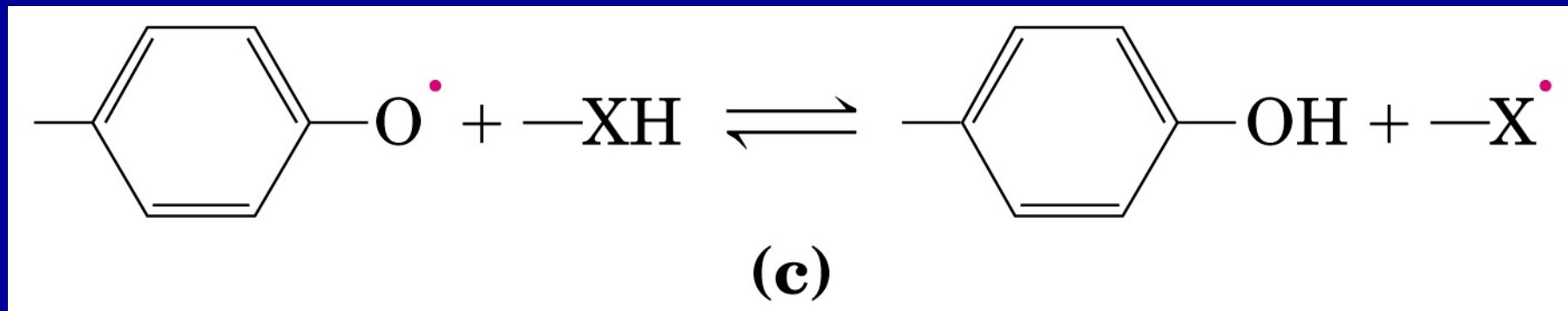
La enzima de *E. coli* y eucariotas tiene un radical tirosilo estabilizado por un centro binucleado con dos iones férricos unidos por un puente oxo



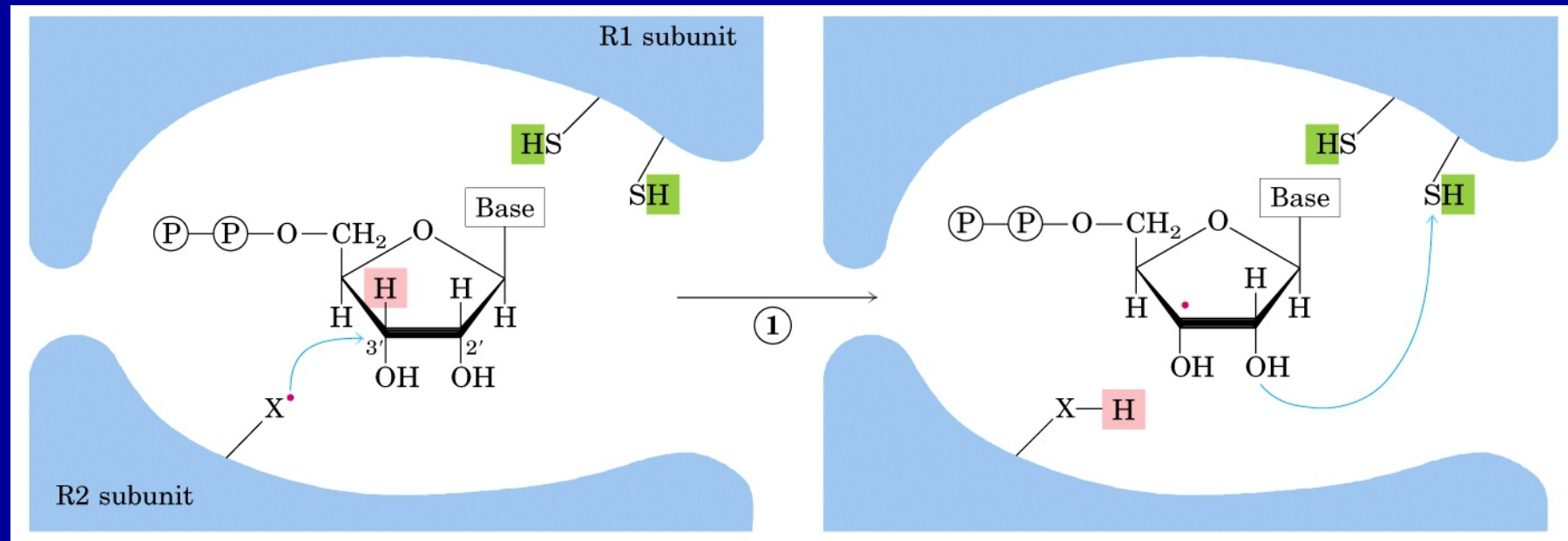
(b)



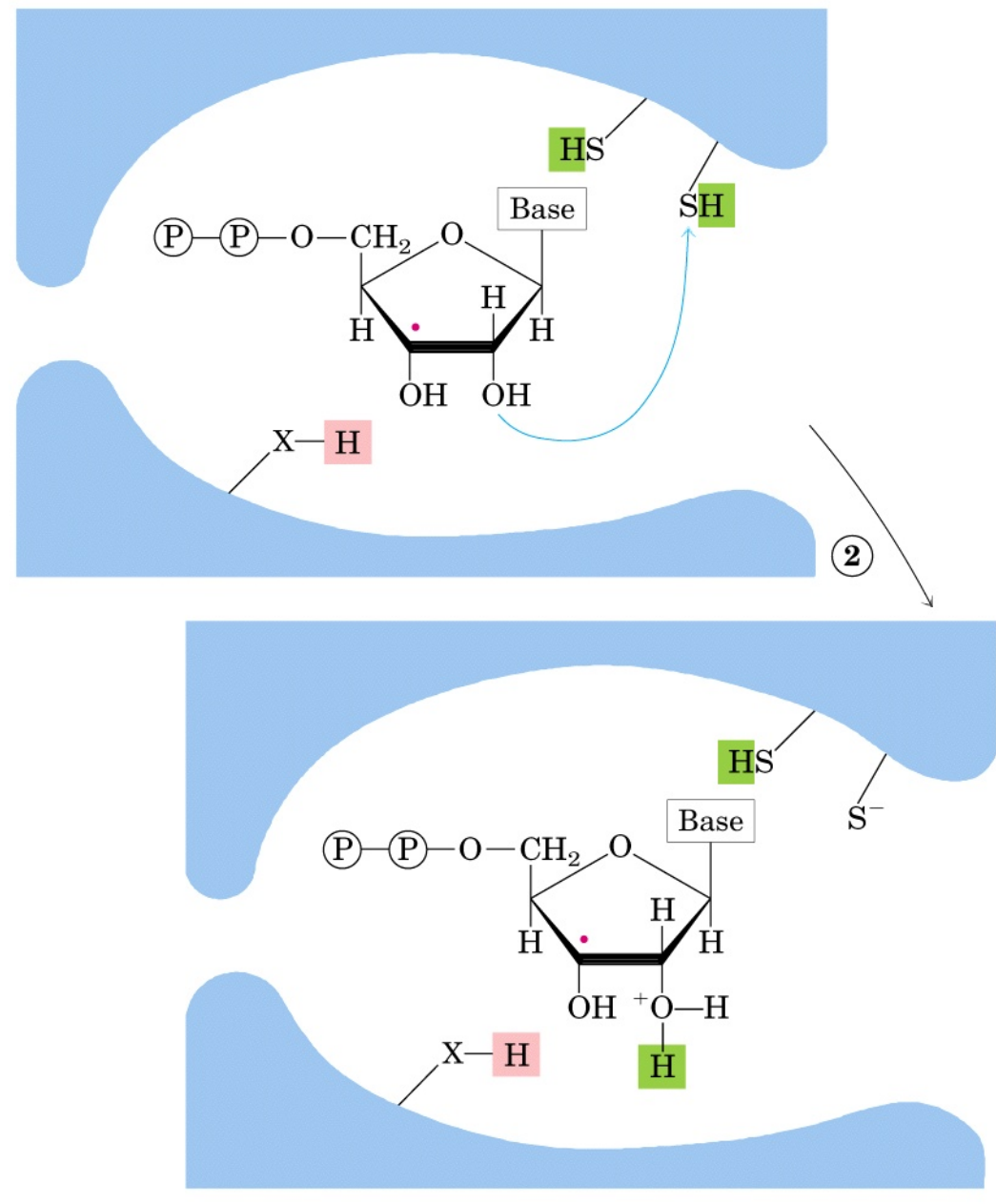
Mecanismo de la ribonucleótido reductasa

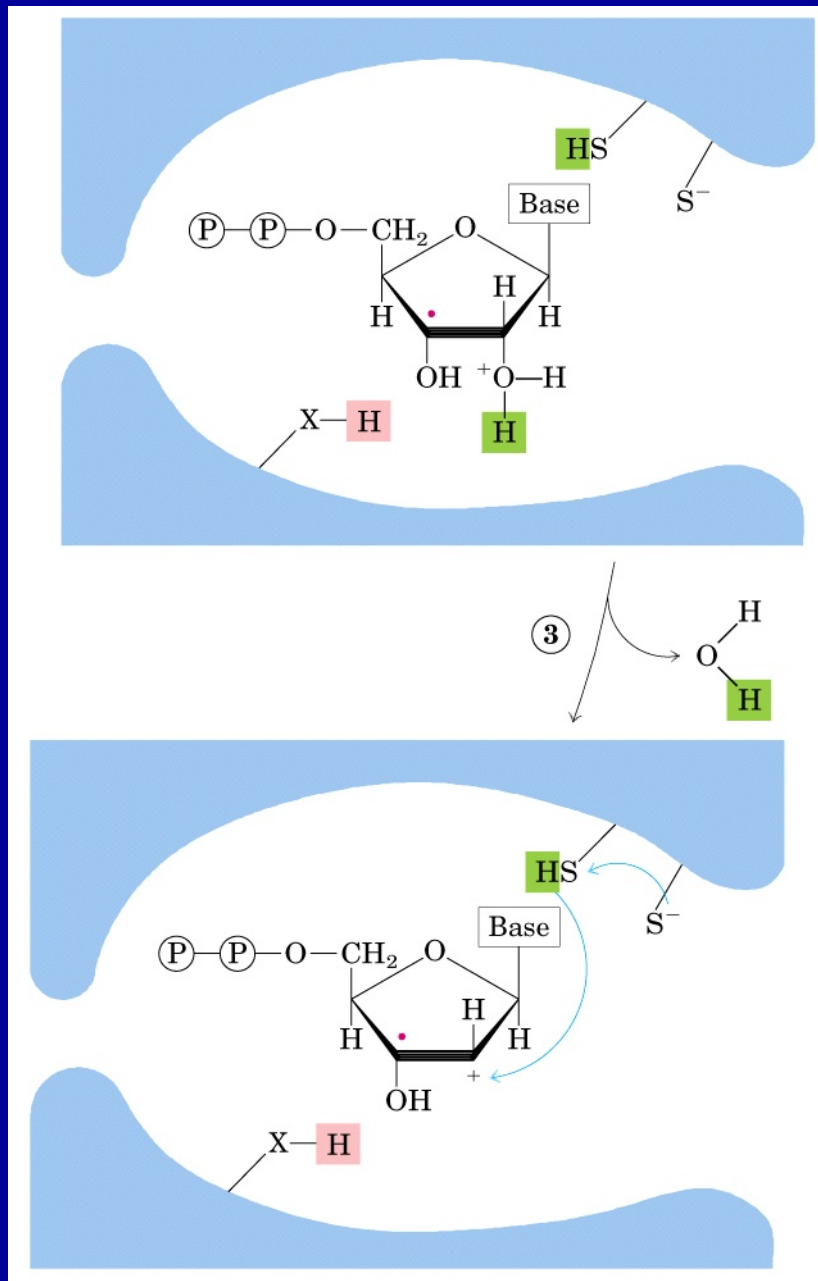


El radical tirosilo genera un radical $\text{—X}\cdot$,
seguramente en una cisteína ($\text{—S}\cdot$)

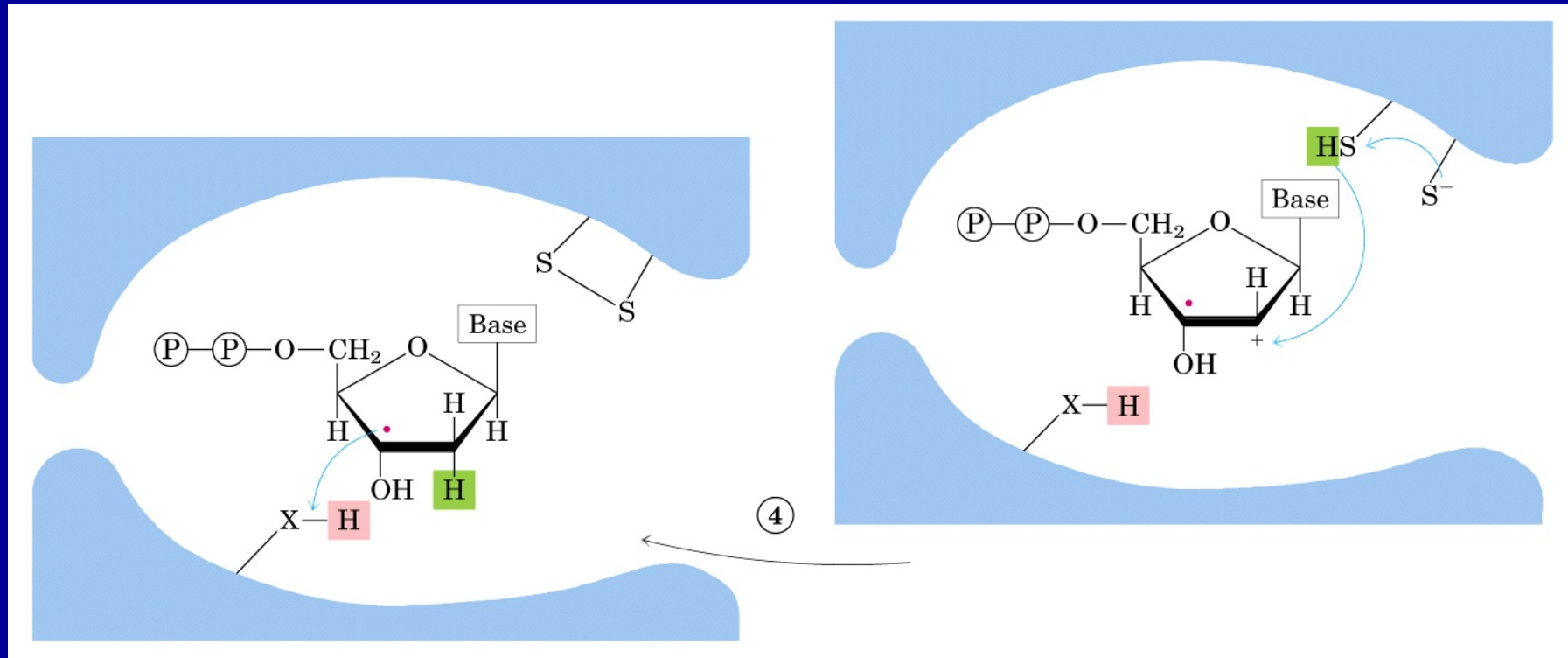


El radical $-X\cdot$ abstrae un átomo de hidrógeno en 3' del ribonucleótido

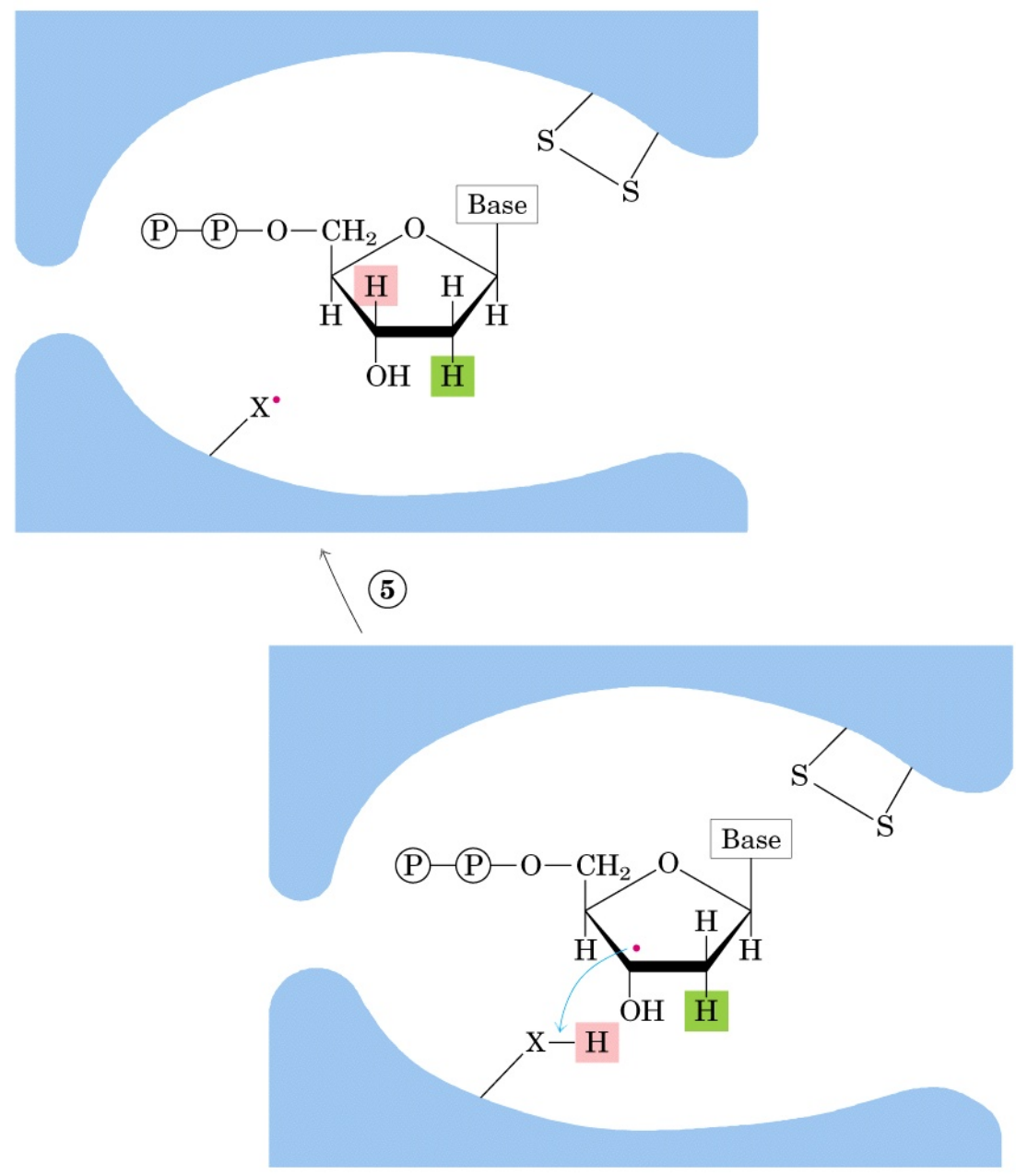




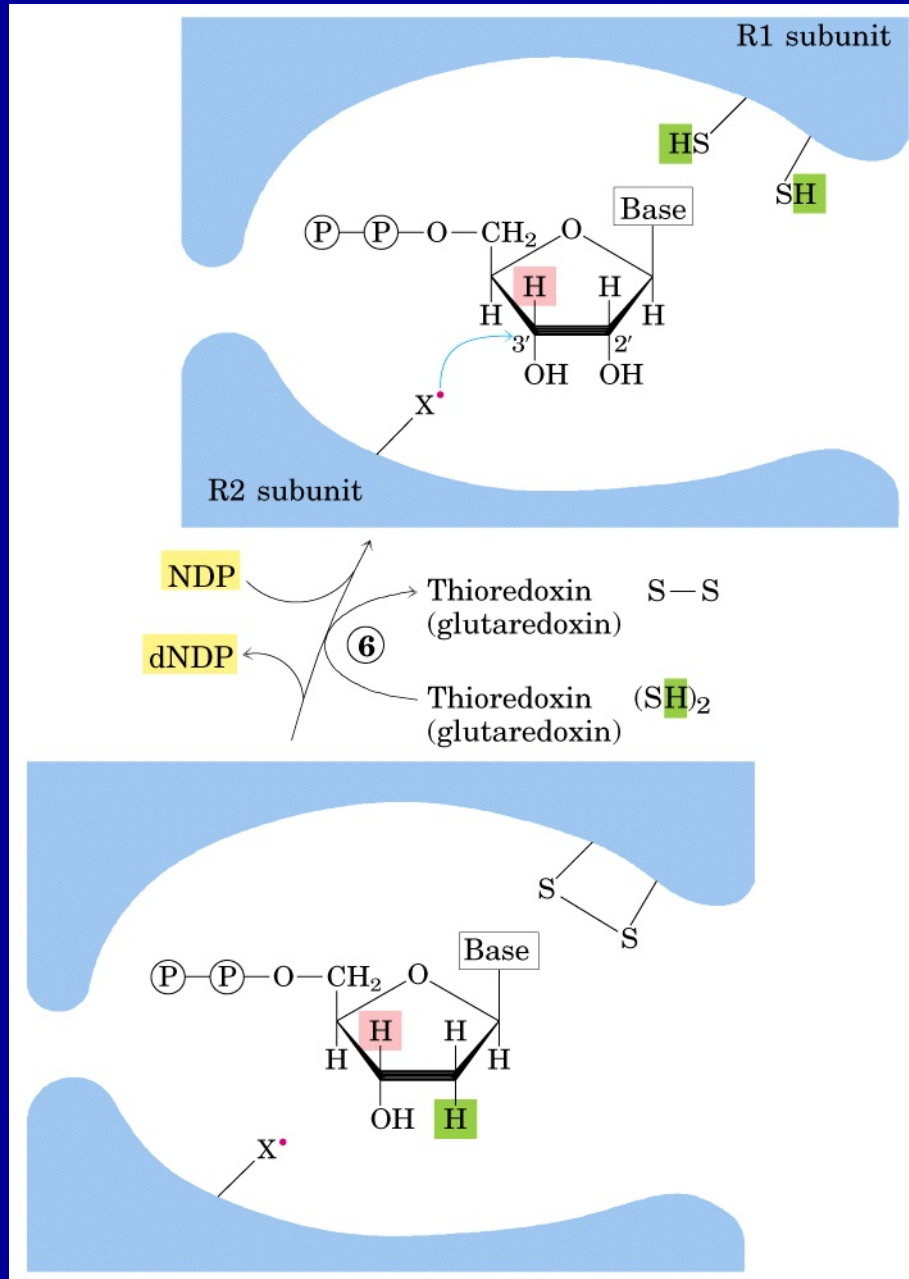
En 2' se pierde agua y se genera un carbocatión estabilizado por el radical



El catión radical es reducido por el par de tioles, generándose un disulfuro



El radical en 3'
regenera el
radical en la
enzima



El disulfuro se reduce para regenerar la enzima reducida

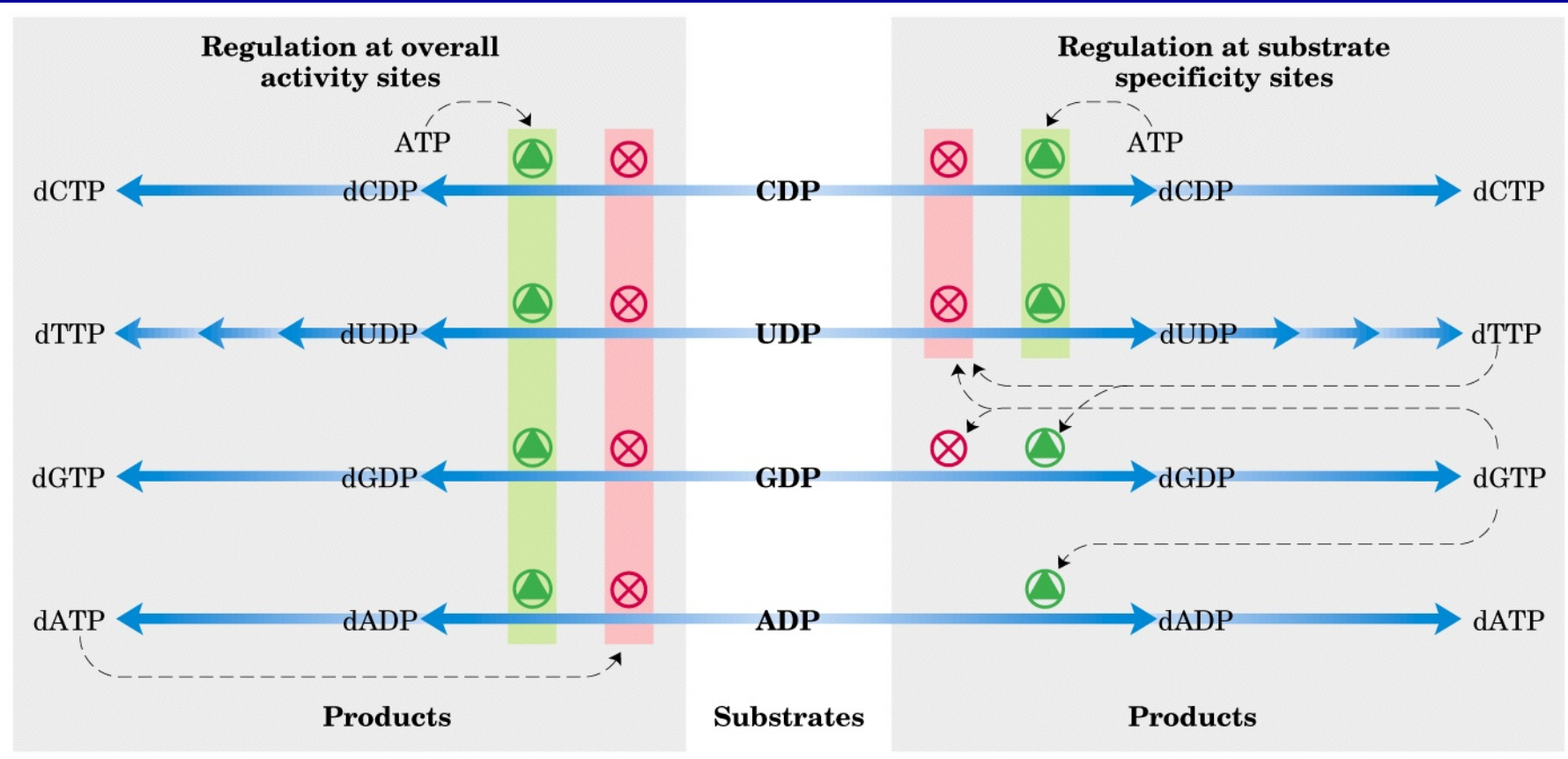
Regulación de la ribonucleótido reductasa

Dos tipos de sitios regulatorios, los efectores pueden alterar la actividad y la especificidad

El sitio que afecta la actividad puede unir ATP (activador) o dATP (inhibidor)

El sitio que afecta la especificidad puede unir ATP o dATP, favoreciendo la reducción de UDP y CDP. Si se une TTP, se reduce GDP y se inhibe la reducción de los otros. dGTP estimula reducción de ATP.

El sistema asegura que la formación de los cuatro desoxirribonucleótidos se dé en forma balanceada



Síntesis de desoxitimidilato

¿Porqué el ADN tiene timina y el ARN uracilo?

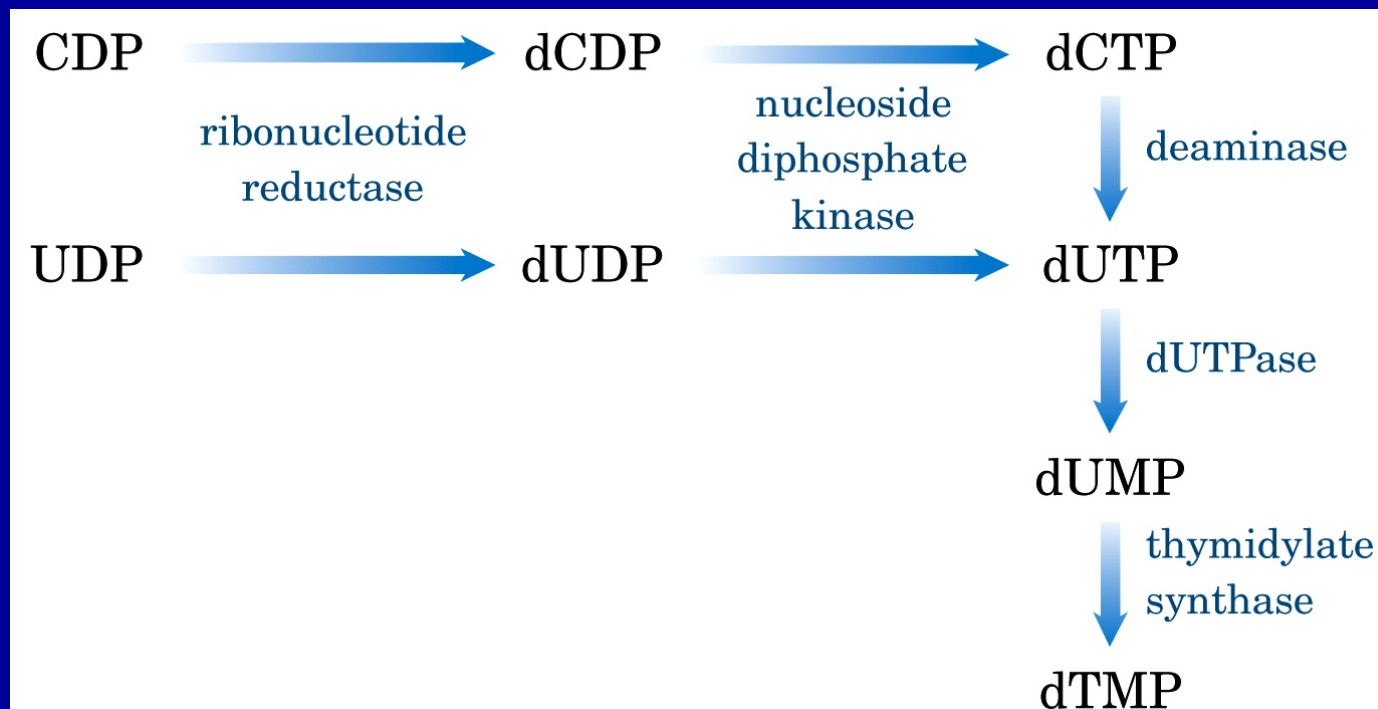
Porque el uracilo en el ADN sería mutagénico.

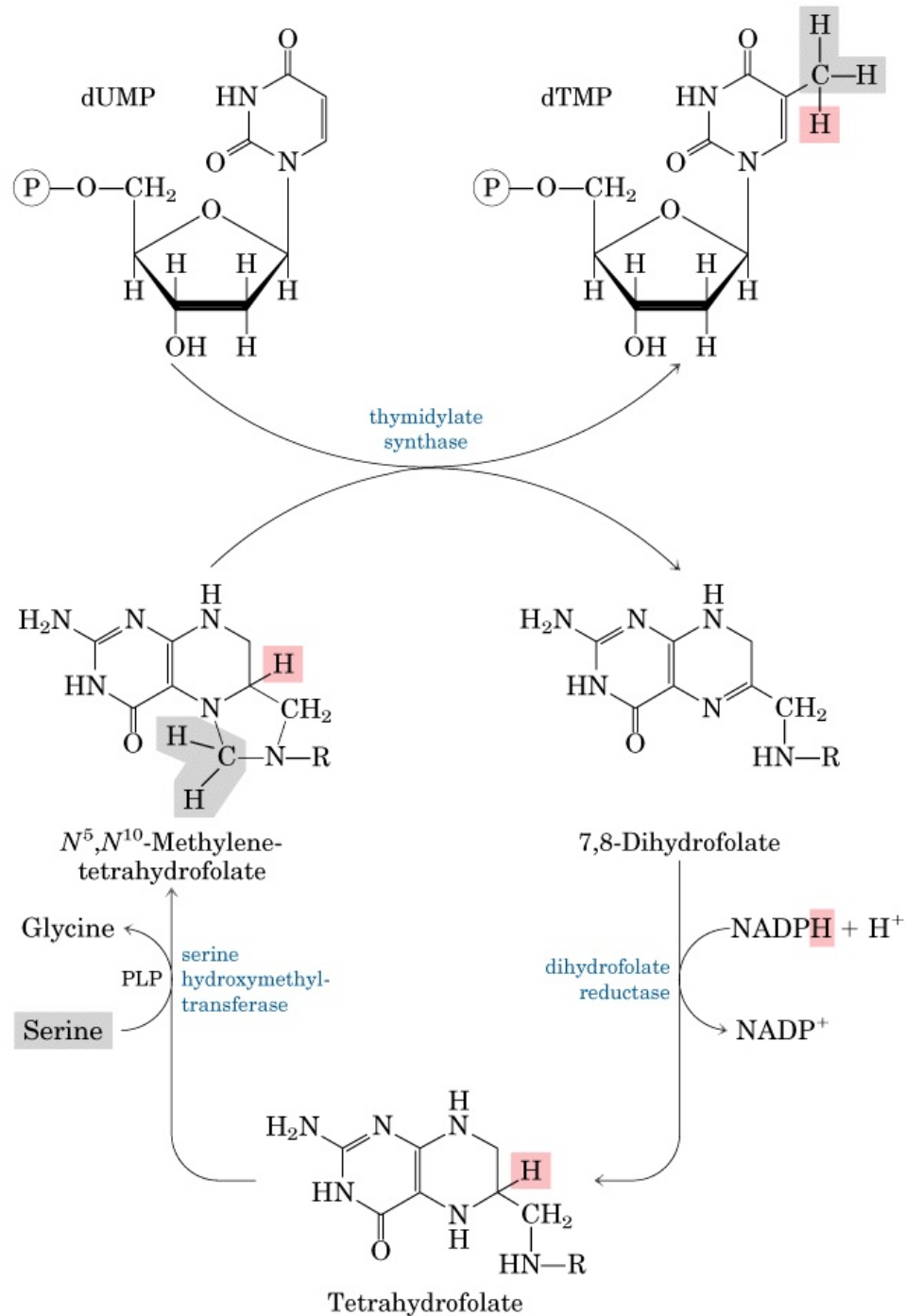
La citosina tiende a desaminarse espontáneamente formando uracilo.

Si el uracilo formara parte del ADN, no se sabría si un par GU venía de GC o de AU. Como T es la base normal en el ADN, cualquier U es eliminada por enzimas de reparación y sustituida por C.

El dTMP se sintetiza por metilación de dUMP con la **timidilato sintasa**

El dUMP se genera a partir de dUTP, con lo cual se mantiene baja la concentración celular de dUTP para que la DNA polimerasa no se confunda





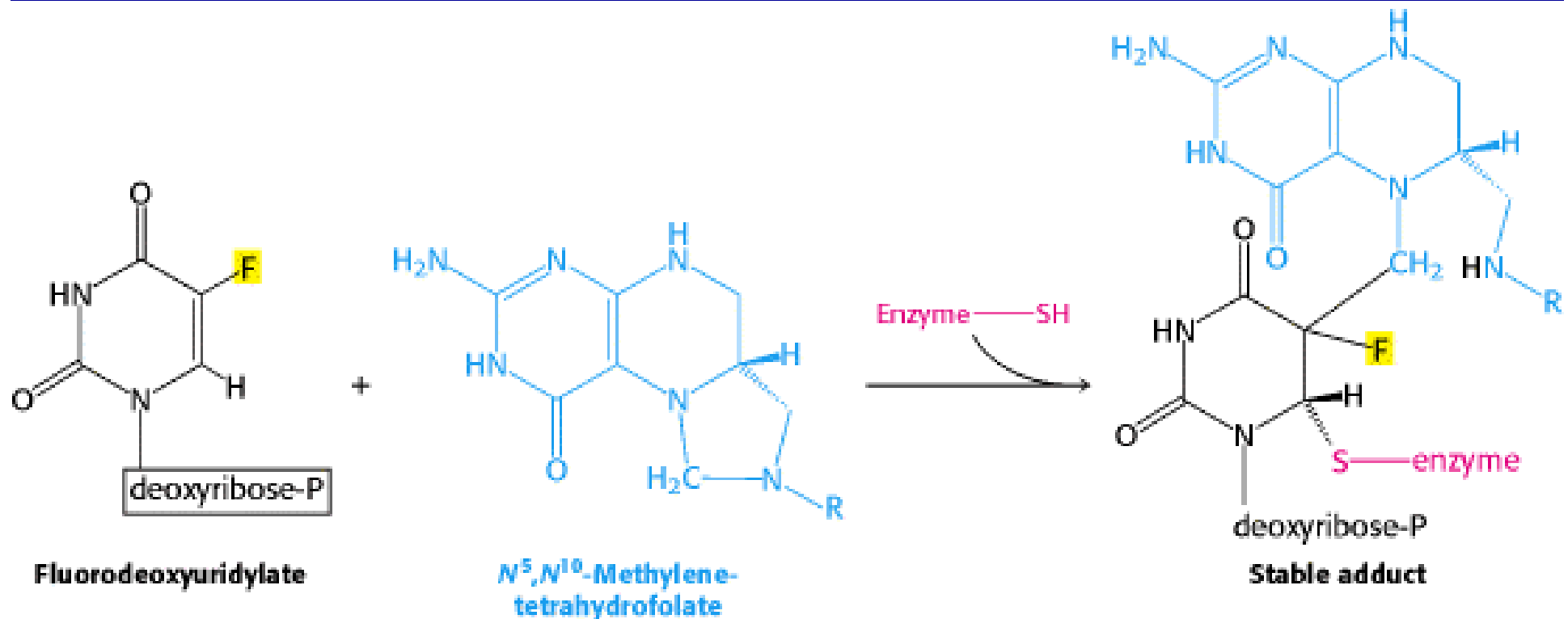
Timidilato sintasa

Se introduce un metilo a expensas de N^5N^{10} -metilen-THF, el cual es oxidado a dihidrofolato.

El N^5N^{10} -metilen-THF se regenera con la *dihidrofolato reductasa* y con la *serina hidroximetil transferasa*

El fluorodesoxiuridilato es un **inhibidor suicida** de la timidilato sintasa

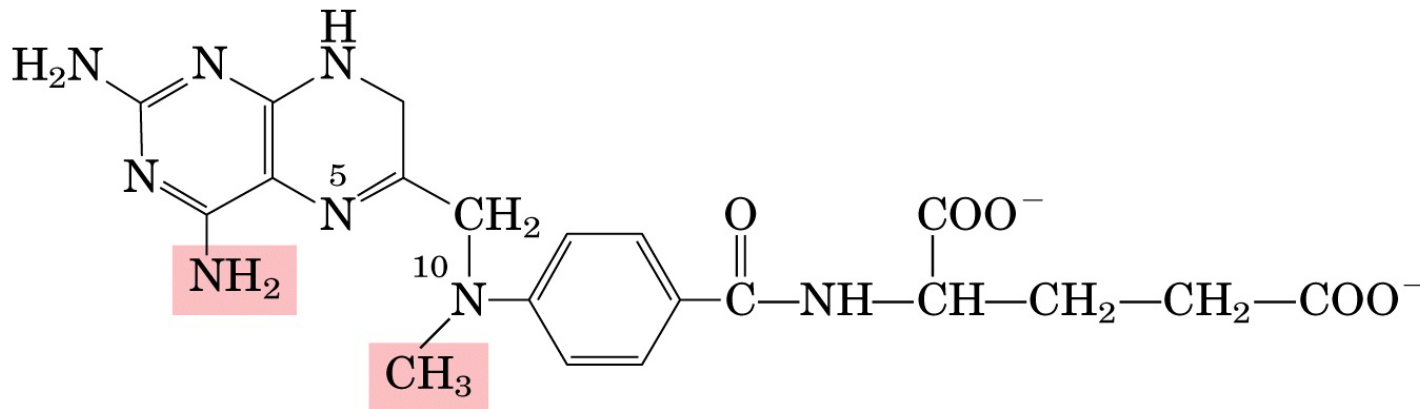
Se utiliza como agente anticancerígeno



Los antifolatos son potentes agentes anticancerígenos

La inhibición de la dihidrofolato reductasa hace que todo el pool de folato esté como DHF y que se inhiba la síntesis de dTMP, y también la síntesis de purinas y de algunos aminoácidos

La dihidrofolato reductasa es un blanco atractivo para la quimioterapia



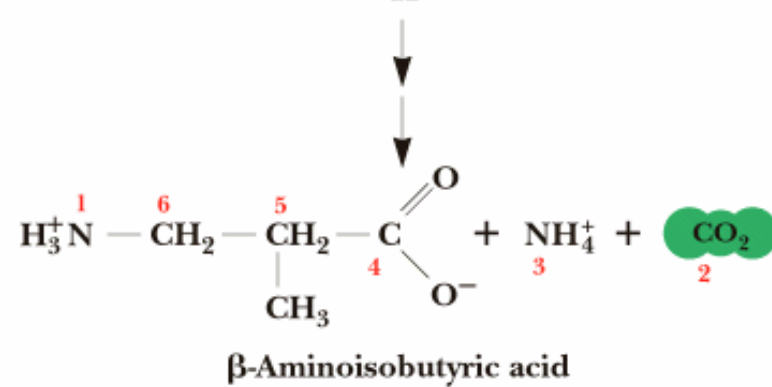
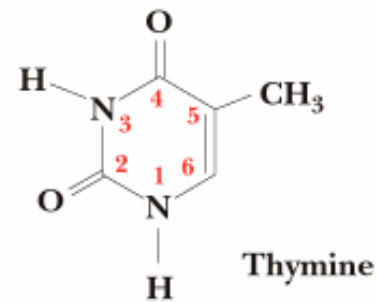
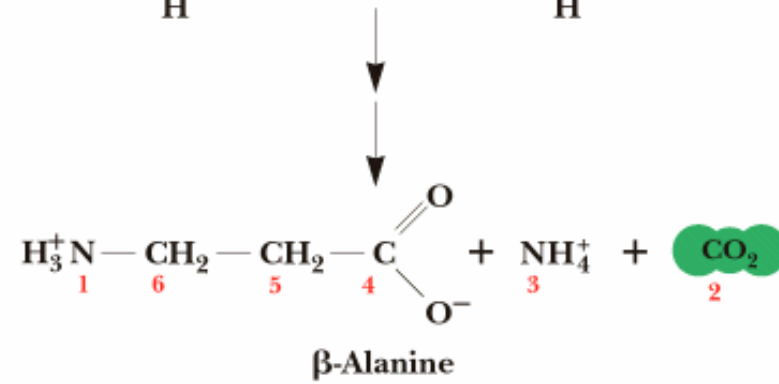
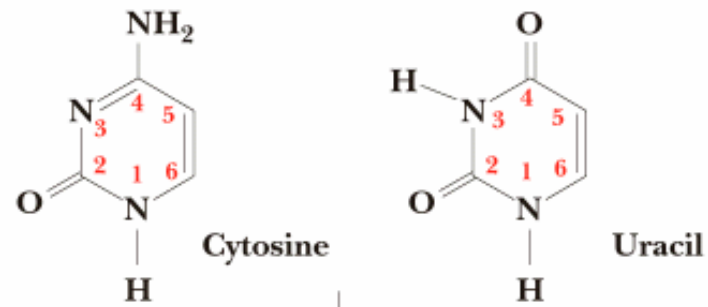
Methotrexate

Catabolismo de las pirimidinas

CMP y UMP se degradan a β -alanina y dTMP a β -aminoisobutirato, CO_2 y NH_3 .

Los beta-aminoácidos pueden servir como dadores de amino en reacciones de transaminación.

Se forma malonil-CoA (síntesis de ácidos grasos) y metilmalonil-CoA (succinil-CoA y TCA).



Desórdenes del metabolismo de pirimidinas

Como los catabolitos son solubles, hay pocas enfermedades asociadas

Las deficiencias en las enzimas de los dos últimos pasos de la síntesis de UMP originan al *aciduria orótica*, que causa retardo en el crecimiento y anemia. Se puede tratar con uridina o citidina, para que se forme UMP y se inhiba la carbamoilfosfato sintetasa II











