

BIOSINTESI DI AMMINOACIDI E NUCLEOTIDI

La biosintesi degli amminoacidi ha molto in comune con quella dei nucleotidi, perché entrambe le classi di composti contengono azoto, ma anche perché le due vie di biosintesi sono strettamente interconnesse e hanno molti intermedi in comune. Infatti, alcuni amminoacidi vengono incorporati nelle strutture puriniche e pirimidiniche.

METABOLISMO DELL'AZOTO

L'azoto è l'elemento più abbondante dell'atmosfera terrestre e gli unici organismi a poterlo fissare sono le piante e i batteri, quindi non l'uomo.

Ciclo dell'azoto

I processi metabolici di organismi diversi agiscono in modo indipendente per recuperare e riutilizzare l'azoto disponibile per i processi biologici, creando il **ciclo dell'azoto**.

Il ciclo dell'azoto si suddivide in tre tappe:

- 1) **Fissazione**: fase in cui i batteri fissano l'azoto per formare ammoniaca, la quale potrebbe essere utilizzata da moltissimi organismi, ma viene ulteriormente modificata dagli stessi batteri.
- 2) **Nitrificazione**: fase in cui i batteri ossidano l'ammoniaca prima a nitrito e successivamente a nitrato. Il nitrato formato può essere utilizzato dalle piante e da batteri grazie all'azione della nitrato reductasi. In questo modo, l'ammoniaca formata può essere inserita nella molecola degli amminoacidi nelle piante.
- 3) **Denitrificazione**: fase in cui un batterio o una pianta muoiono, le proteine si degradano, viene liberata ammoniaca, che si trasforma in nitriti e nitrati.

Glutammato e glutammina

L'azoto ridotto è assimilato e incorporato sotto forma di ione ammonio, dapprima nelle molecole di amminoacidi, e in seguito in altri composti azotati (es. basi azotate). Il punto di ingresso dell'azoto in questo processo è rappresentato da due amminoacidi: il **glutammato** e la **glutammina**. I gruppi amminici della maggior parte degli amminoacidi derivano dal glutammato attraverso reazioni di transaminazione.

Le vie biosintetiche che producono glutammato e glutammina sono simili in tutti gli organismi viventi. La via principale per il legame dell'ammoniaca al glutammato richiede due reazioni e la prima reazione è catalizzata dalla **glutammina sintetasi**, la quale fa reagire lo ione ammonio con il glutammato, generando glutammina.

Regolazione del metabolismo dell'azoto

L'attività della glutammina sintetasi è altamente regolata in tutti gli organismi ed è regolata allostericamente e covalentemente. Gli inibitori sono otto (es. AMP, CTP, alanina, carbamil fosfato), ma ogni inibitore promuove solo un'inibizione parziale e non completa dell'enzima. Per avere un'inibizione completa dell'enzima c'è bisogno che ci sia una combinazione di inibitori.

BIOSINTESI DEGLI AMMINOACIDI

Tutti gli amminoacidi derivano da intermedi della glicolisi, del ciclo dell'acido citrico o della via del pentosio fosfato. L'azoto entra nelle vie di biosintesi degli amminoacidi come glutammato o glutammina.

Esistono due classi di amminoacidi:

- **Amminoacidi essenziali:** devono essere necessariamente introdotti con la dieta, perché l'organismo non è in grado di sintetizzarli da zero.
 - **Amminoacidi non essenziali:** possono essere assunti con la dieta oppure possono essere sintetizzati dall'organismo.
- Gli amminoacidi si possono raggruppare in sei famiglie, ognuna delle quali è in grado di produrre un certo tipo di amminoacidi:
- **α -chetoglutarato** (intermedio del ciclo dell'acido citrico)
 - Glutammato
 - Glutamina
 - Prolina
 - Arginina
 - **Ossalacetato** (intermedio del ciclo dell'acido citrico e della gluconeogenesi)
 - Aspartato
 - Asparagina
 - Metionina
 - Treonina
 - Lisina
 - **Piruvato** (intermedio della glicolisi e della gluconeogenesi)
 - Alanina
 - Valina
 - Leucina
 - Isoleucina
 - **3-fosfoglicerato** (intermedio della glicolisi e della gluconeogenesi)
 - Serina
 - Glicina
 - Cisteina
 - **Fosfoenolpiruvato ed eritrosio 4-fosfato** (PEP: intermedio della glicolisi e della gluconeogenesi; E-4-P: intermedio della via del pentosio fosfato, che si origina dal 3-fosfoglicerato)
 - Triptofano
 - Fenilalanina
 - Tirosina
 - **Ribosio 5-fosfato** (intermedio della via del pentosio fosfato)
 - Istidina

METABOLISMO DEI NUCLEOTIDI

Il meccanismo di sintesi delle basi puriniche è un esempio di collaborazione tra vari enzimi, senza che essi si trovino all'interno di un complesso. Infatti la sintesi di basi puriniche è resa possibile tramite l'intervento successivo di una serie di meccanismi differenti tra loro, ma fortemente correlati. In questi casi, il primo meccanismo trasforma il primo substrato della reazione in modo tale da renderlo adatto per essere attaccato dal secondo meccanismo, il quale trasforma il substrato precedentemente trasformato in modo tale da renderlo adatto per essere attaccato dal terzo meccanismo e così via.

I nucleotidi hanno diverse funzioni nella cellula. Essi sono, per prima cosa, i precursori del DNA e dell'RNA. In secondo luogo, l'ATP e il GTP sono trasportatori essenziali dell'energia chimica. Infine, i nucleotidi sono componenti di cofattori come il NAD, il FAD e il CoA, e di alcuni intermedi biosintetici attivati come l'UDP e il CDP. Altri sono anche secondi messaggeri cellulare (es. cACP e cGMP).

I nucleotidi sono costituiti, fundamentalmente, fosfato, zucchero pentoso e base (purinica o pirimidinica). Esistono due meccanismi per la sintesi delle basi:

- Basi puriniche: meccanismo raffinato.

- Basi pirimidiniche: meccanismo semplice.

Le vie di sintesi delle purine e delle pirimidine hanno in comune diversi precursori importanti. Il fosforibosil pirofosfato (PRPP) partecipa a entrambe le vie, e in questo caso la struttura del ribosio compare per intero nel prodotto finale. Un amminoacido è un precursore importante in ciascuna via: la **glicina** nel caso delle purine e l'**aspartato** nel caso delle pirimidine. La **glutammina** è sempre la principale fonte di gruppi amminici e viene utilizzata in cinque tappe delle vie biosintetiche. L'aspartato ha anche una seconda funzione nella sintesi delle purine, quella di donatore del gruppo amminico.

Biosintesi e regolazione della biosintesi delle basi puriniche

I due nucleotidi purinici presenti negli acidi nucleici sono l'**AMP** e il **GMP**. Questi nucleotidi contengono rispettivamente le basi puriniche **adenina** e **guanina**.

Questa serie di reazione è lineare fino alla formazione dell'inosinato, ma si biforca immediatamente dopo per dare origine al GMP o all'AMP.

- 1) Il gruppo amminico di una glutammina si lega al C-1 del PRPP, liberando glutammato e un pirofosfato.
- 2) Un'intera molecola di glicina si lega col carbossile al gruppo amminico aggiunto dalla glutammina in precedenza, mediante l'utilizzo di ATP, liberando ADP + P.
- 3) Il gruppo formilico del formiltetraidrofolato viene legato al gruppo amminico della glicina aggiunta in precedenza, liberando tetraidrofolato.
- 4) Il gruppo amminico di una glutammina si lega al carbossile della glicina aggiunta in precedenza, mediante l'utilizzo di ATP, liberando glutammato, ADP + P. Questo passaggio descrive il fatto che, prima di chiudere l'anello a 5, comincia la formazione dell'anello a 6.
- 5) Una molecola di ATP fa in modo che si chiuda l'anello a 5 tra il formile, aggiunto dal formiltetraidrofolato, e il primo gruppo amminico, aggiunto dalla glutammina, liberando acqua, ADP + P.
- 6) Una molecola di bicarbonato si lega al secondo gruppo amminico aggiunto dalla glutammina e legato al carbossile della glicina, mediante l'utilizzo di ATP, liberando ADP + P.
- 7) Il bicarbonato, legato in precedenza al gruppo amminico, si sposta, legandosi al carbonio legato al carbossile della glicina.
- 8) Un'intera molecola di aspartato si lega al carbonio del bicarbonato con il gruppo amminico, mediante l'utilizzo di ATP, liberando ADP + P.
- 9) Si libera fumarato dall'aspartato aggiunto in precedenza, lasciando legato al carbonio del bicarbonato solo il gruppo amminico.
- 10) Il gruppo formilico del formiltetraidrofolato viene legato al secondo gruppo amminico aggiunto in precedenza dalla glutammina, liberando tetraidrofolato.
- 11) Una molecola d'acqua fa in modo che si chiuda l'anello a 6 tra il formile, aggiunto dal formiltetraidrofolato, e il gruppo amminico, aggiunto dall'aspartato.

Si ha la formazione dell'**inosinato (IMP)**, un nucleotide precursore dell'AMP e del GMP. La conversione dell'IMP in AMP richiede l'inserimento nella molecola di un gruppo amminico fornito dall'aspartato, come avviene per la formazione dell'anello a 6, con una successiva liberazione di una molecola di fumarato; la conversione dell'IMP in GMP richiede comunque due reazioni: la prima reazione consiste nell'utilizzo di acqua e NAD^+ per ossidare il C-2, mentre la seconda reazione consiste nell'utilizzo di ATP e di glutammina, la quale lega un gruppo amminico lì dove era stato ossidato il C-2.

Dei meccanismi di controllo retroattivi cooperano per regolare la velocità complessiva della sintesi dei nucleotidi purinici e le velocità di formazione dei due prodotti finali (AMP e GMP). Un primo meccanismo viene esercitato sulla prima reazione, che è peculiare della sintesi delle purine, cioè il trasferimento di un gruppo amminico al PRPP. Questa reazione è catalizzata da un enzima che è inibito allostericamente da IMP, AMP e GMP. Di conseguenza, se questi tre prodotti vengono ad accumularsi, la sintesi di questi prodotti viene parzialmente inibita, non completamente (non

succederà mai che sia completamente inibito). Un secondo meccanismo viene esercitato da un eccesso di GMP, che inibisce l'enzima che porta alla formazione dell'intermedio che porterà alla formazione di GMP, senza alterare la velocità della produzione di AMP (viene inibita la produzione di GMP, ma viene comunque consentita la produzione di AMP); viceversa, un eccesso di AMP inibisce l'enzima che porta alla formazione dell'intermedio che porterà alla formazione di AMP, senza alterare la velocità della produzione di GMP (viene inibita la produzione di AMP, ma viene comunque consentita la produzione di GMP). Per la formazione di AMP viene utilizzato GTP, mentre per la formazione di GMP viene utilizzato ATP: un controllo reciproco che tende a bilanciare la sintesi dei due ribonucleotidi.

Biosintesi e regolazione della biosintesi delle basi pirimidiniche

I ribonucleotidi pirimidinici comuni sono la **CMP** e l'**UMP**, che contengono rispettivamente le basi pirimidiniche **citosina** e **uracile**.

La biosintesi dei nucleotidi pirimidinici procede in maniera diversa rispetto a quella dei nucleotidi purinici; in questo caso viene costruito prima l'anello pirimidinico a 6, che viene poi legato al ribosio 5-fosfato. Questo processo inizia dal **carbamil fosfato**, composto che partecipa anche alla sintesi dell'urea. Negli animali il carbamil fosfato necessario alla sintesi dell'urea viene prodotto nei mitocondri da un enzima mitocondriale, la **carbamil fosfato sintetasi I**, mentre il carbamil fosfato che entra nella sintesi dei nucleotidi pirimidinici è formato nel citosol da un altro enzima, la **carbamil fosfato sintetasi II**.

Questa serie di reazioni è sempre lineare.

- 1) Il carbamil fosfato reagisce con l'aspartato, originando carbamilaspartato.
- 2) Viene eliminata una molecola d'acqua e l'anello si chiude, originando diidrorotato.
- 3) NAD^+ viene ridotto a NADH , originando orotato.
- 4) Una molecola di PRPP si lega a un gruppo amminico dell'orotato, originando orotidilato.
- 5) Avviene una decarbossilazione, originando UMP.
- 6) L'intervento di 2ATP trasforma l'UMP, originando UTP, liberando 2ADP.
- 7) La glutammina e l'ATP trasformano l'UTP, originando CTP.

La regolazione della velocità di sintesi dei nucleotidi pirimidinici è in gran parte dovuta alla modulazione dell'aspartato transcarbamilasi, cioè il primo enzima che agisce nel processo, quello che fa reagire l'aspartato con il carbamil fosfato. Questo enzima è inibito da un'alta concentrazione di CTP, il prodotto finale della sequenza di reazioni.

Ribonucleotide reduttasi

I desossiribonucleotidi, le unità costitutive del DNA, derivano dai corrispondenti ribonucleotidi per diretta riduzione del C-2 del ribosio, che forma un desossiderivato. La reazione è catalizzata dalla **ribonucleotide reduttasi**, un enzima che ha come substrati i ribonucleosidi difosfato e l'unico enzima ad avere una multispecificità.

L'enzima esiste in due forme, in base a un particolarità del substrato:

- SH liberi di due cisteine del substrato
- SH occupati da un ponte disolfuro di due cisteine del substrato

L'enzima forma un ponte disolfuro e i due SH sono utilizzati per catturare l'ossigeno legato al C-2 del ribosio per produrre acqua. Il problema è rappresentato dal fatto che poi è necessario riportare l'enzima nella forma attiva, cioè con i due SH liberi. La riduzione del ribonucleotide reduttasi può avvenire in due modi:

- 1) Meccanismo con **tioredossina**: due protoni vengono trasferiti dal $\text{NADPH} + \text{H}^+$ al FAD, formando NADP^+ e FADH_2 . I due protoni del FADH_2 vengono trasferiti alla tioredossina ossidata (con ponte disolfuro), che diventa ridotta (con due SH liberi). I due protoni della tioredossina ridotta sono trasferiti alla ribonucleotide reduttasi ossidata (con ponte disolfuro), che diventa ridotta (con due SH liberi). Il substrato finale per i protoni è il nucleotide difosfato (NDP); NMP e NTP non funzionerebbero come substrato.

2) Meccanismo con **glutaredossina** (alcuni organismi non possiedono tioredossina): due protoni vengono trasferiti dal $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a due molecole di glutatione ossidato (con ponte disolfuro; due molecole perché nel sito attivo hanno un solo SH e per formare un ponte S-S hanno bisogno di due molecole), formando NADP^+ e due molecole di glutatione ridotto (con due SH liberi). I due protoni delle due molecole di glutatione ridotto vengono trasferiti alla glutaredossina ossidata (con ponte disolfuro), che diventa ridotta (con due SH liberi). I due protoni della glutaredossina ridotta sono trasferiti alla ribonucleotide reduttasi ossidata (con ponte disolfuro), che diventa ridotta (con due SH liberi). Il substrato finale per i protoni è il nucleotide difosfato (NDP); NMP e NTP non funzionerebbero come substrato.

La ribonucleotide reduttasi è composta da un dimero R1-R2, in cui ciascun monomero è costituito da due unità: 2 subunità R1, uguali tra loro, e 2 subunità R2, uguali tra loro. La regolazione della ribonucleotide reduttasi è peculiare, perché i suoi effettori regolano non solo l'attività, ma anche la **specificità di substrato** dell'enzima. Questo problema è risolto facendo variare, a seconda della condizione in cui si trova la cellula, la specificità dell'enzima: se servono molti desossiribonucleotidi (es. sintesi del DNA), allora in questo caso l'enzima funzionerà privilegiando come substrati ribonucleotidi; se invece è necessario utilizzare i ribonucleotidi, questa attivazione verso la sintesi di desossiribonucleotidi diminuirà. Ciascuna subunità R1 possiede due tipi di diti regolatori: un sito regola l'attività enzimatica complessiva e lega sia l'ATP, che attiva l'enzima, sia il dATP, che lo inattiva; un altro sito modifica la specificità di substrato in risposta all'effettore (ATP, dATP, dTTP o dGTP), che si lega. Quando si legano l'ATP o il dATP, viene stimolata la riduzione dell'UDP e del CDP; quando si legano il dTTP o il dGTP, viene stimolata la riduzione del GDP o dell'ADP. Questo tipo di regolazione mantiene ben bilanciato il pool di precursori della sintesi del DNA (concentrazione di ribonucleotidi e desossiribonucleotidi deve essere mantenuto bilanciato e costante).

Nel DNA non è presente UMP (con uracile), ma dTMP (con timina). Per passare da UMP a dTMP si effettua una metilazione, cioè si lega un metile alla base pirimidinica, tramite l'enzima **timidilato sintetasi**.

Patologie

- **Gotta**: è una malattia che colpisce le giunture ed è causata da un'elevata concentrazione di acido urico nel sangue e nei tessuti. Viene trattata con un farmaco chiamato **allopurinolo** (forma enolica: **ipoxantina**), che rallenta la produzione di acido urico.

- **Cancro**: le cellule cancerose crescono più rapidamente rispetto alle cellule dei tessuti normali e di conseguenza le loro richieste di nucleotidi, come precursori per la sintesi di DNA e di RNA, sono notevolmente superiori. Le cellule cancerose sono in genere più sensibili agli inibitori della biosintesi dei nucleotidi rispetto alle cellule normali. Sono ora noti molti agenti chemioterapici per il cancro e per altre malattie, capaci di inibire uno o più enzimi di queste vie. Questi farmaci hanno l'effetto collaterale di colpire, anche se in percentuale minore, le cellule sane, dato che anche queste, seppur avendo una velocità di crescita minore, necessitano gli enzimi per produrre DNA e RNA.