

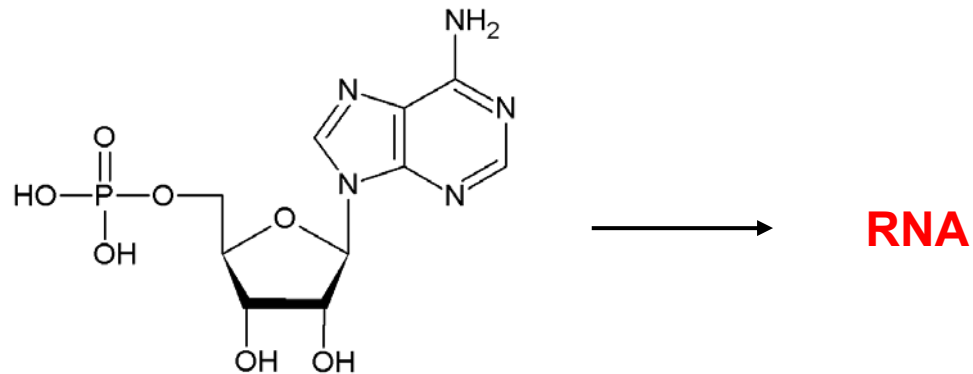
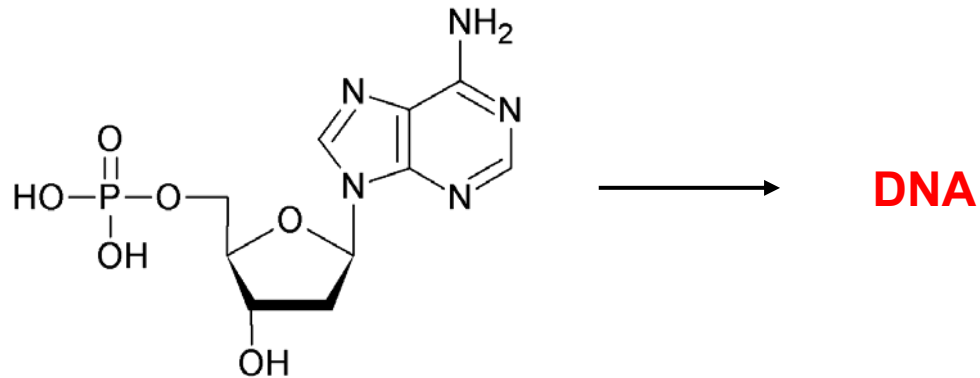
2. BIOSINTESIS DE NUCLEOTIDOS PIRIMIDINICOS

ESQUEMA: Biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos

- 1. Introducción. Importancia de la biosíntesis de nucleótidos**
- 2. Localización**
- 3. Biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina**
 - Generalidades
 - Precursores de la vía *de novo*
 - Reacciones de la vía. Síntesis de UMP
 - Síntesis de UTP y CTP
- 4. Regulación de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos**
- 5. Vías de recaptación de nucleótidos pirimidínicos**
- 6. Biosíntesis de timidín-nucleótidos**
 - Mecanismo catalítico de la timidilato sintasa
 - Fármacos antiproliferativos

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS NUCLEOTIDOS (I)

✓ Síntesis de ácidos nucleicos

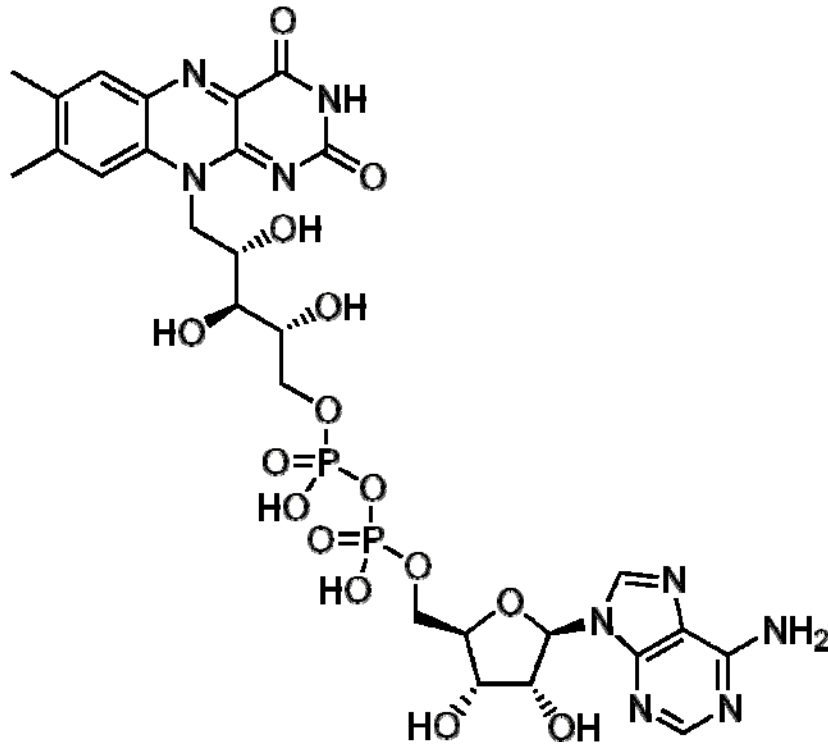


La ϵ necesaria para la síntesis de los ácidos nucleicos proviene de la hidrólisis del enlace fosfoéster

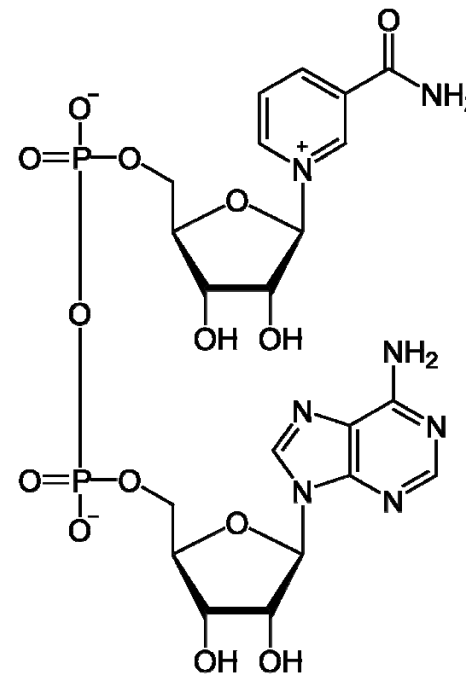
Importancia biológica de los nucleótidos (II)

✓ Cofactores y coenzimas

NAD, NADP, FAD, FMN, CoA, S-adenosilmetionina



FAD



NAD⁺

Fuente de las imágenes

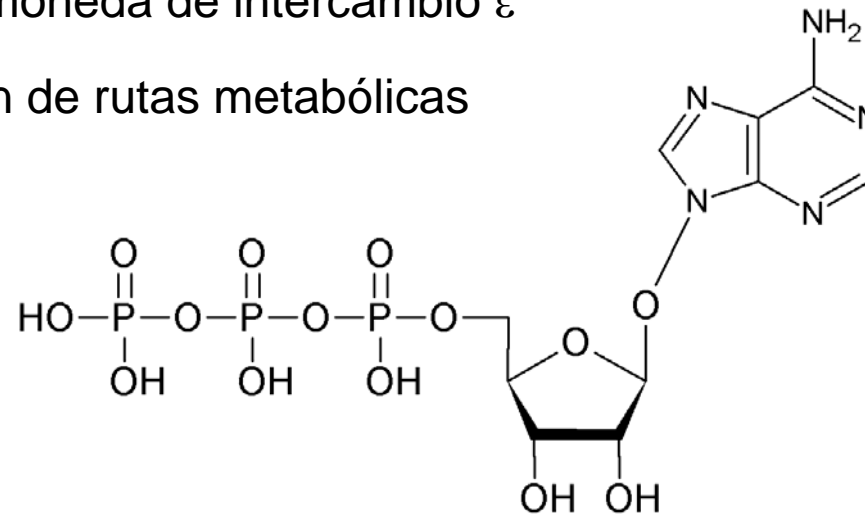
<http://en.wikipedia.org/wiki/Category:Biochemistry>

Creative Commons Attribution-Share Alike license

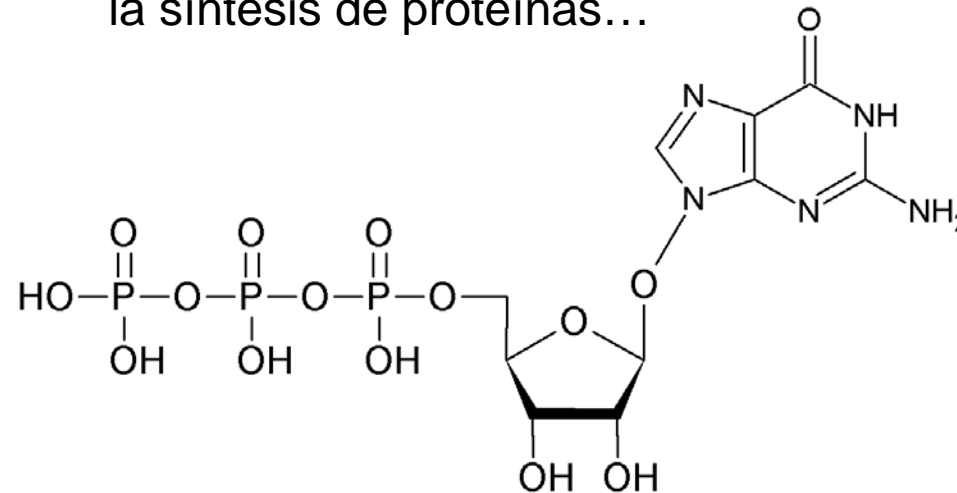
Importancia biológica de los nucleotidos (III)

✓ **ATP**: compuesto rico en ε = moneda de intercambio ε

Estado ε de la célula: regulación de rutas metabólicas

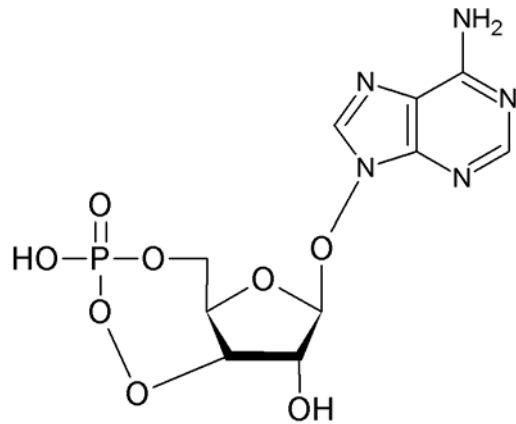


✓ **GTP**: moneda de intercambio ε en el movimiento de macromoléculas
la síntesis de proteínas...

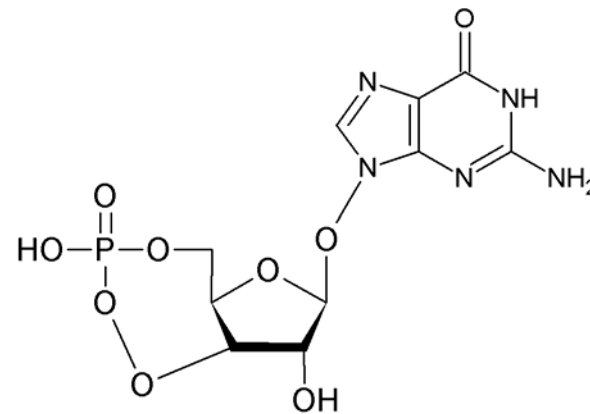


Importancia biológica de los nucleótidos (IV)

✓ Mensajeros químicos intracelulares



cAMP



cGMP

✓ Intermediarios metabólicos

UDP-Glc: síntesis de glicoproteínas, metabolismo del glucógeno

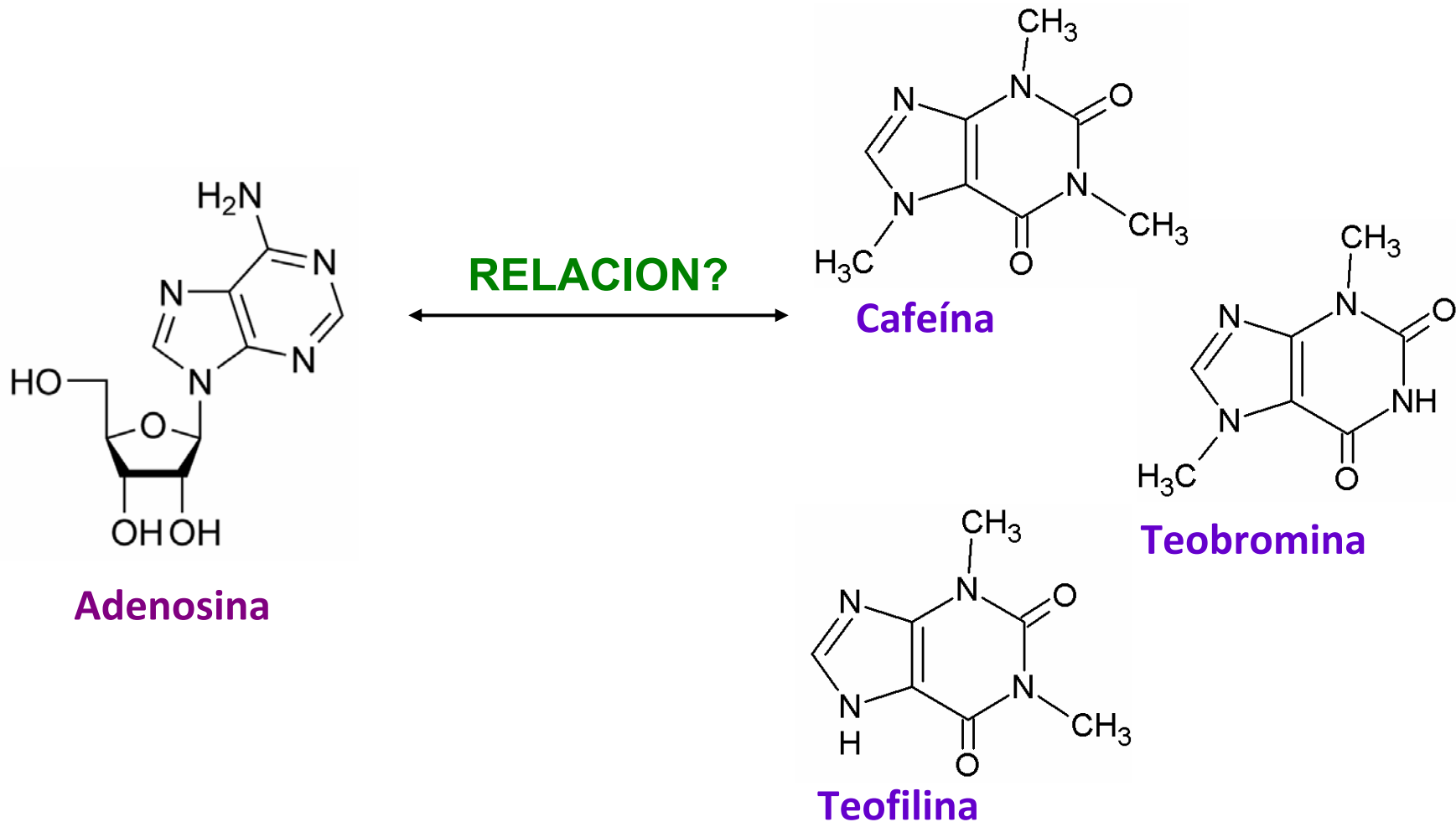
UDP-Gal: síntesis de glicoproteínas

CDP-colina: síntesis de lípidos

Importancia biológica de los nucleótidos (V)

ATP, nucleótidos púricos y adenosina

Acciones como neurotransmisores y neuromoduladores



IMPORTANCIA BIOMEDICA DE LOS NUCLEOTIDOS

Inhibidores de la síntesis de nucleótidos

Se emplean actualmente como:

- ✓ drogas anticancerosas
- ✓ antivirales (p. ej. zidovudina)

Clases de inhibidores de la síntesis de nucleótidos

✓ Análogos nucleotídicos

ej. 5-fluorouracilo: analogo de la timina. El 5-FdUMP actúa como inhibidor suicida de la timidilato sintasa

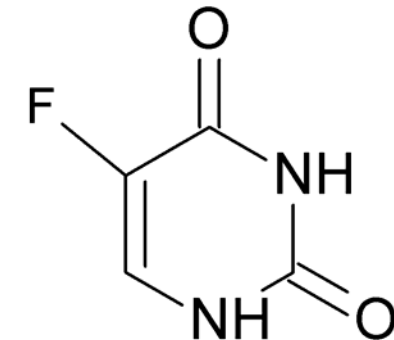
✓ Análogos de la Gln (donador de grupos $-NH_2$)

Impiden la donación de grupos amonio

ej. **azaserina**

✓ Antifolatos: inhibidores de la dihidrofolato reductasa

ej. **metotrexato**



5-fluorouracilo

VIAS DE BIOSINTESIS DE NUCLEOTIDOS

De novo



De recaptación



Localización: en el citosol

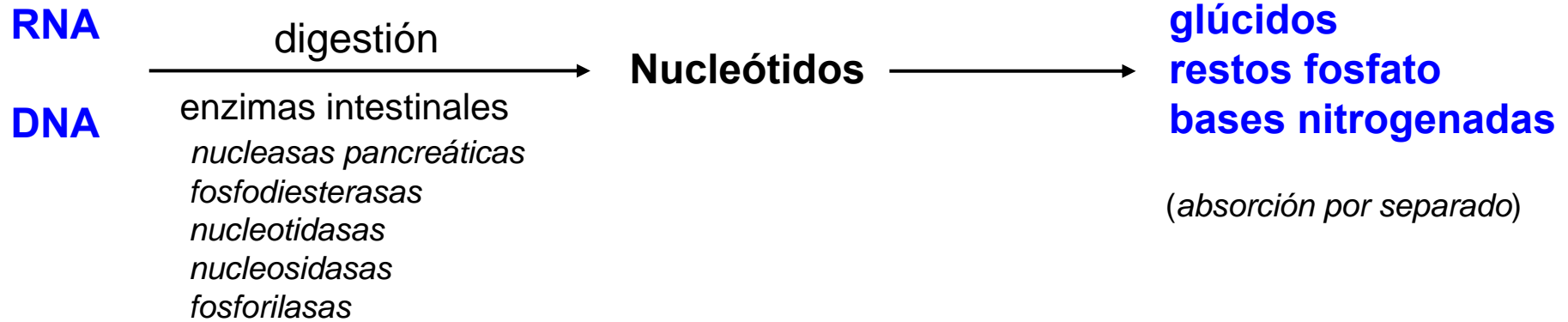
- células en proliferación: alta demanda
- hígado: órgano con el mayor índice de síntesis de nucleótidos
- cerebro: no sintetiza las bases nitrogenadas

No todas las células expresan las enzimas implicadas en la vía *de novo*

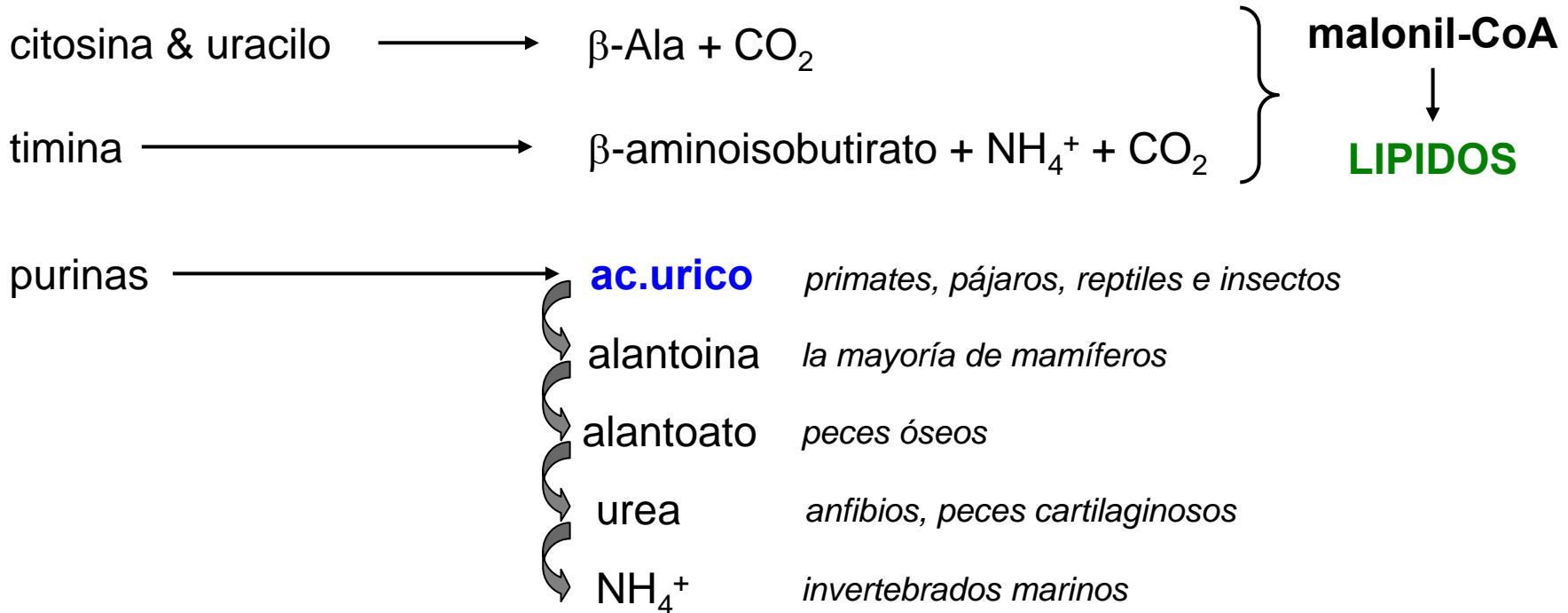
Todos los organismos sintetizan nucleotidos *de novo*

Rutas metabólicas muy conservadas a lo largo de la evolución

NUCLEOTIDOS DE LA DIETA



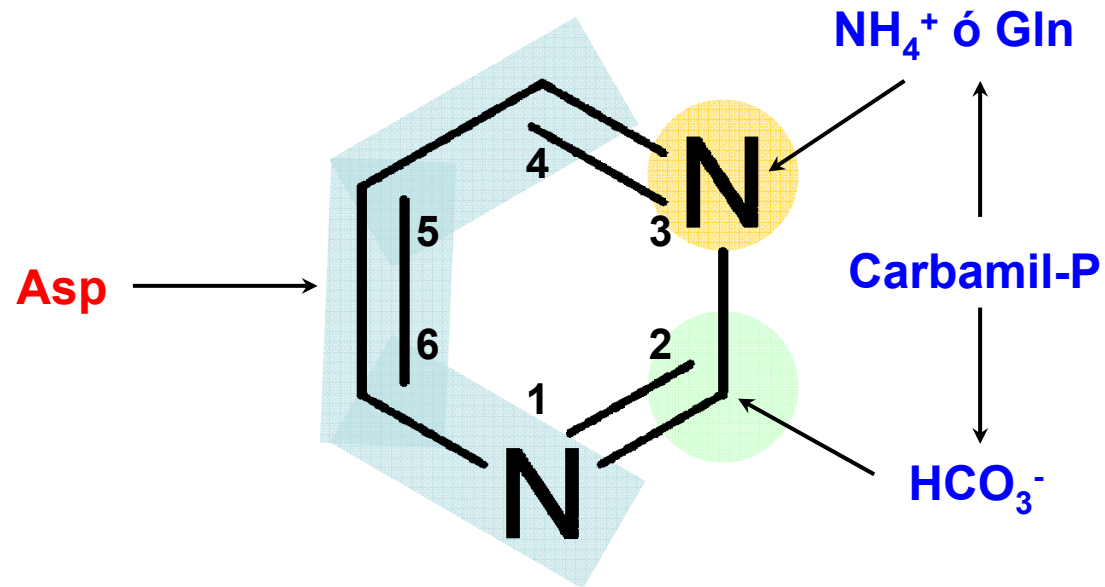
Bases nitrogenadas → **Degradación**



SINTESIS *DE NOVO* DE NUCLEOTIDOS PIRIMIDINICOS

GENERALIDADES

Precusores del
anillo pirimidínico



Proceso más simple que la biosíntesis de purinas

1. Síntesis de UMP: 6 reacciones enzimáticas

- Síntesis del anillo pirimidínico (orotato)
- Unión del orotato a la ribosa-5P

2. Síntesis de UTP y CTP

SINTESIS DEL OROTATO (I)

Procariontes

- 6 enzimas independientes

Eucariontes

- 2 enzimas citosólicas

Reacciones 1, 2 & 3: catalizadas por el mismo polipéptido **CAD**

Enzima multifuncional Carbamil-fosfato sintetasa

Asp-transcarbamilasa

Dihidrorotasa

Reacciones 5 & 6: catalizadas por la **UMP sintasa**

- 1 enzima unida a la cara externa de la membrana mitocondrial interna:

dihidrorotato DH

Investigación de la ruta con mutantes del hongo *Neurospora crassa*

Síntesis del orotato (II)

“*Channeling*” o canalización de sustratos

Existencia de complejos multienzimáticos

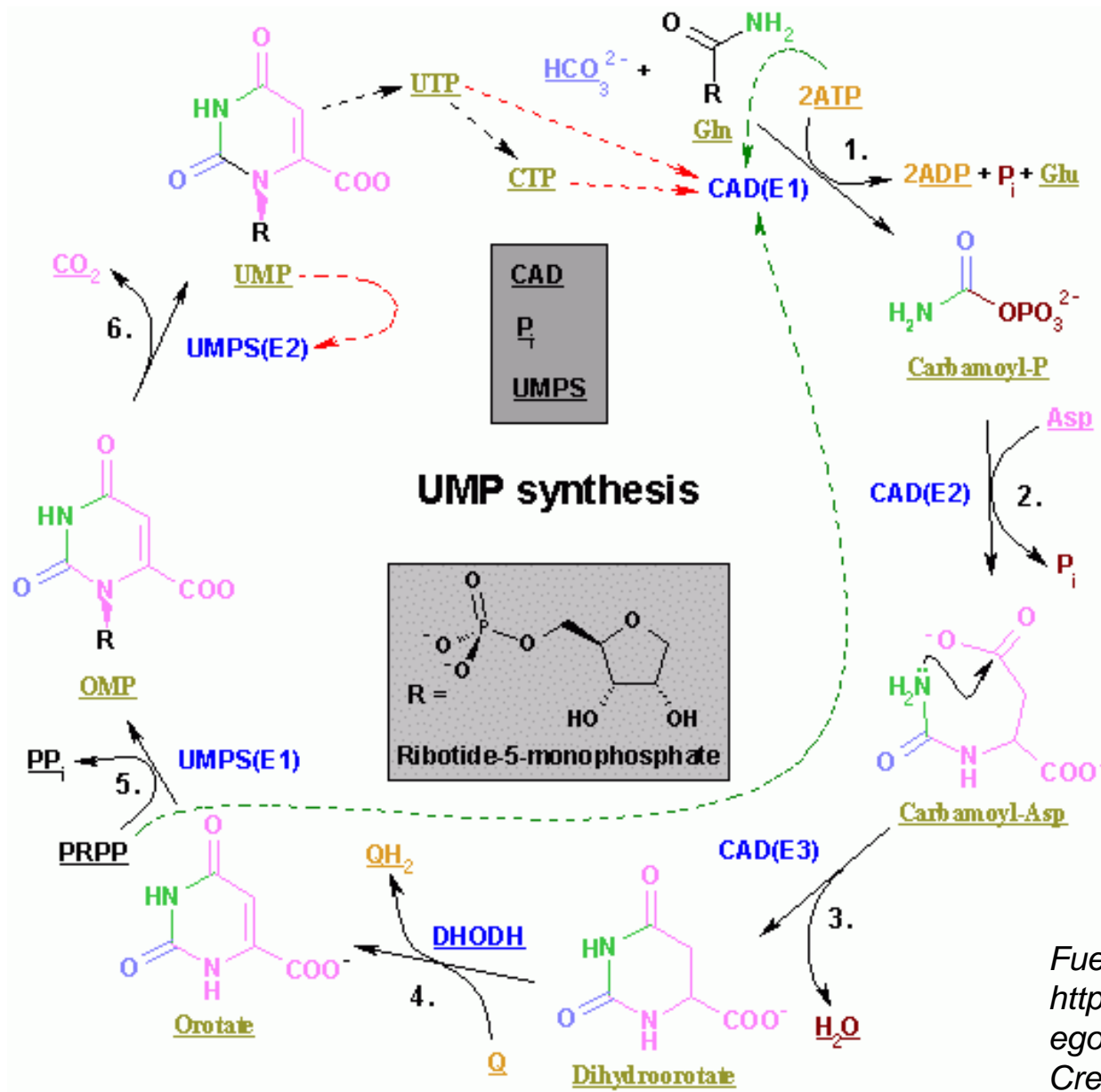
Los productos intermediarios no se liberan al medio, sino que se dirigen directamente al centro activo que cataliza la siguiente reacción

- los sustratos no se diluyen en el medio
- los intermediarios no se acumulan

Ventajas

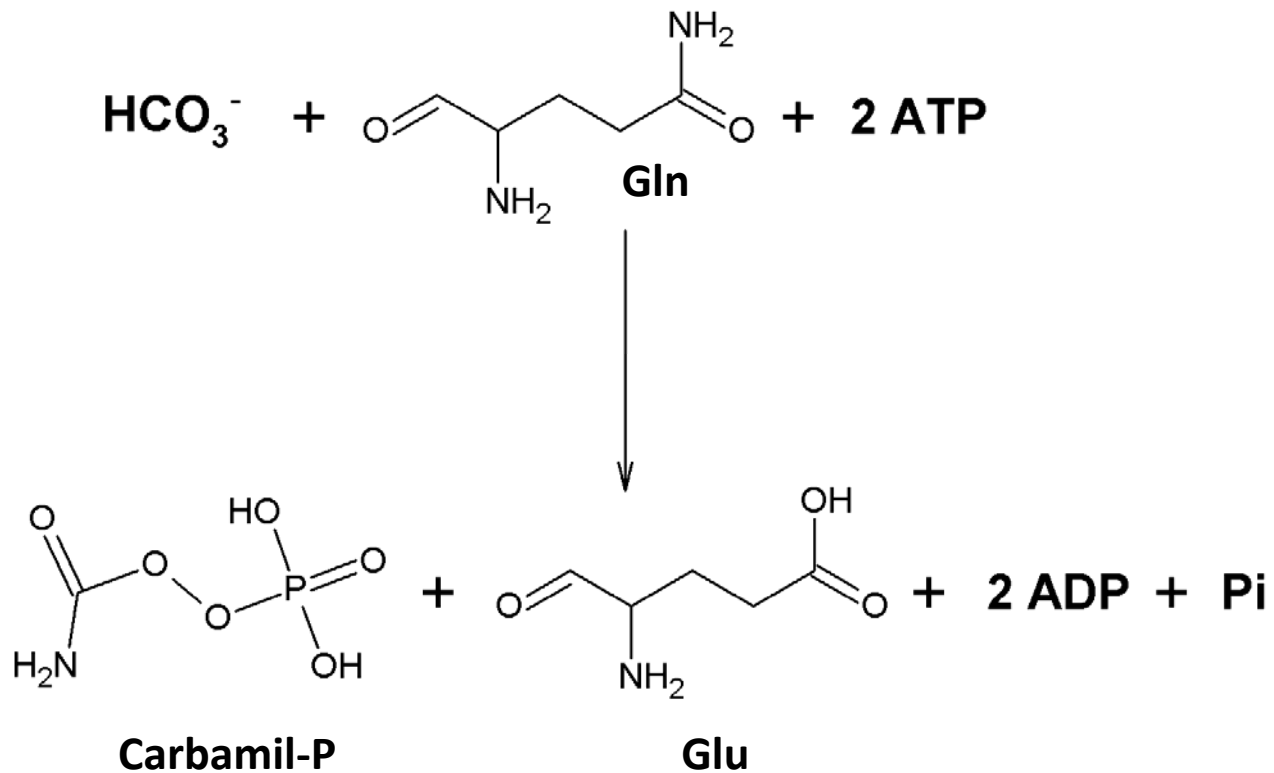
- mayor rapidez y eficacia
- se evita la degradación de los productos intermediarios
- regulación génica coordinada → más sencilla

Síntesis del orotato (III)



Fuente de la imagen
<http://en.wikipedia.org/wiki/Category:Biochemistry>
 Creative Commons Attribution-Share Alike license

1. Síntesis del carbamil-P (I)



Enzima: **Carbamil-P sintetasa**

1. Síntesis del carbamil-P (II)



Empleo de **2 ATP**: $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{transferencia del grupo } \text{PO}_4^{2-}$
 $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + \varepsilon$

Enzima: **Carbamil-P sintetasa** No requiere biotina
Punto clave en la regulación
(CAD en eucariontes)

2 Isoenzimas

clase I: mitocondrial, forma parte del ciclo de la urea. NH_2^- del NH_4^+

clase II: citosólica, participa en la síntesis de pirimidinas. NH_2 de la Gln

En procariontes: una sola carbamil-P sintetasa. El NH_2 proviene de la Gln

1. Síntesis del carbamil-P (III)

Mecanismo de acción propuesto para la síntesis del carbamil-P (3 pasos)

Formación de un carbanión activado = carboxi-P

Intermediarios lábiles, pero el sustrato se “canaliza” a través de la enzima

1. Fosforilación del HCO_3^- con ATP en el dominio del carboxi-P para formar un carbanión activado



Hidrólisis del NH_4^+ de la Gln en la subunidad pequeña (Gln amidotransferasa)

El ion NH_4^+ es canalizado hacia el tercer sitio activo

2. El carboxi-P reacciona con el ion NH_4^+ para formar el ácido carbámico, liberando Pi



3. Hidrólisis de una segunda molécula de ATP para fosforilar el ácido carbámico, produciendo carbamil-P



1. Síntesis del carbamil-P: la Carbamil-P sintetasa

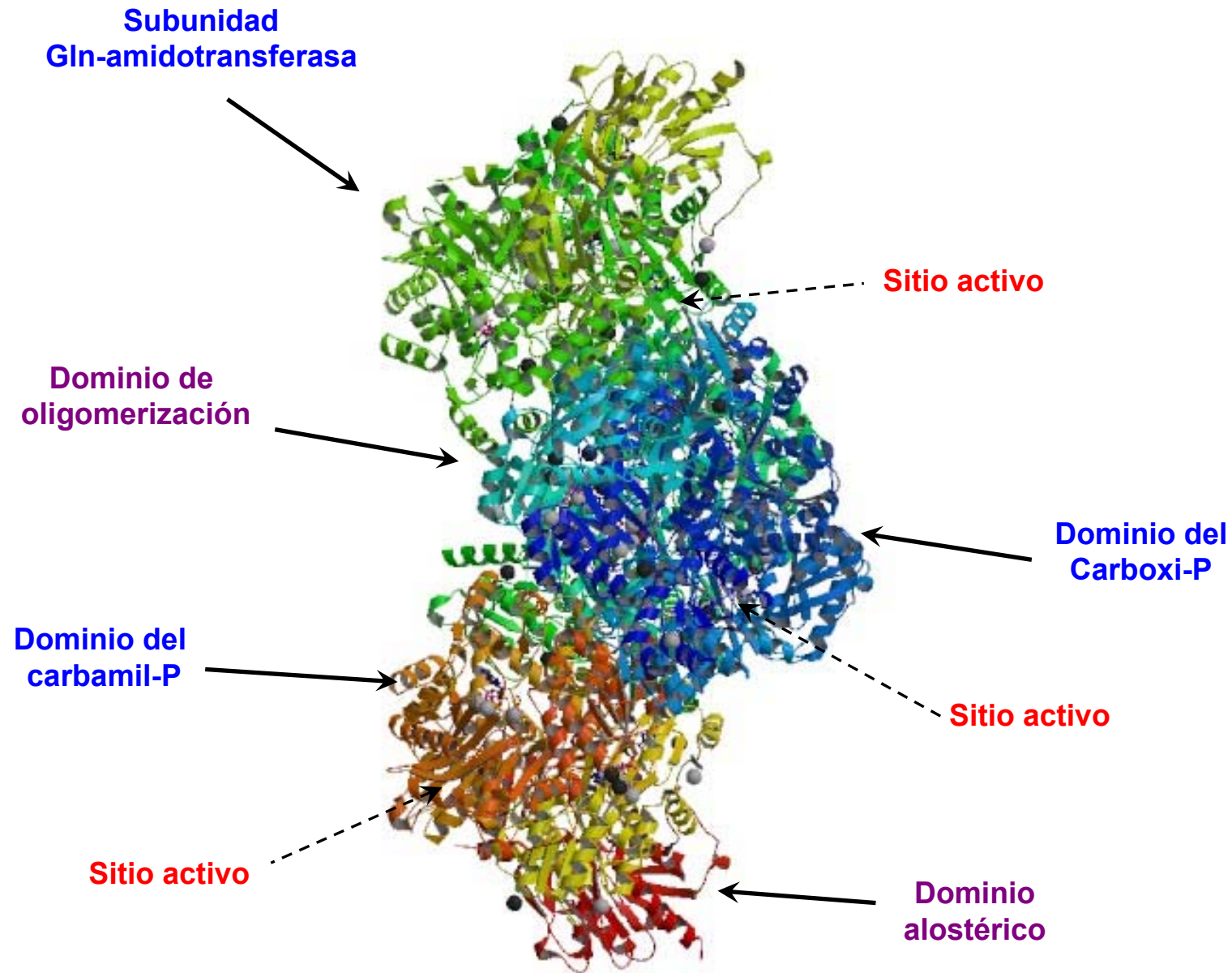
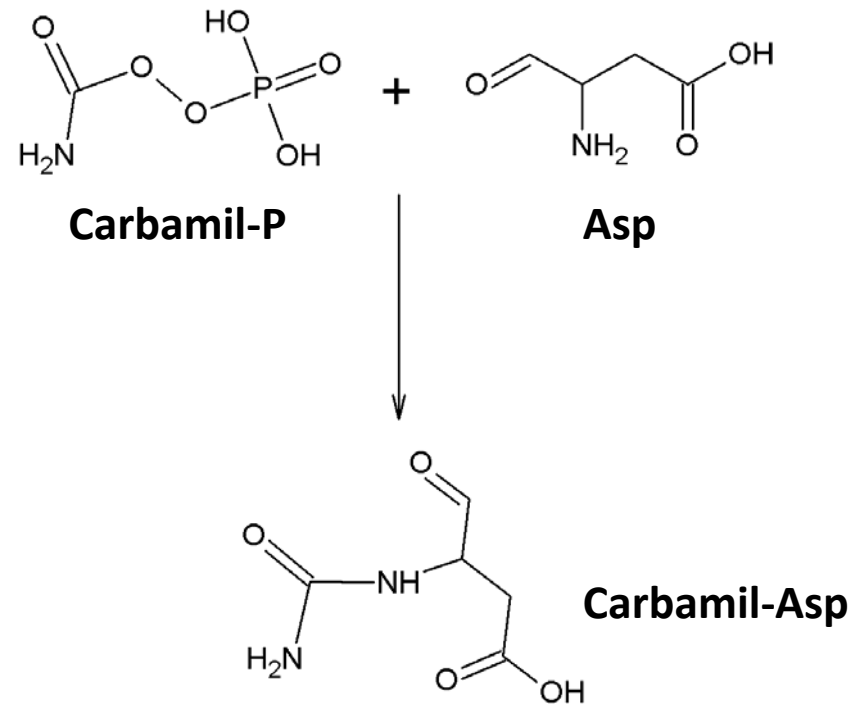


Imagen modificada a partir de RCSB PDB. N. acceso: 1CS0

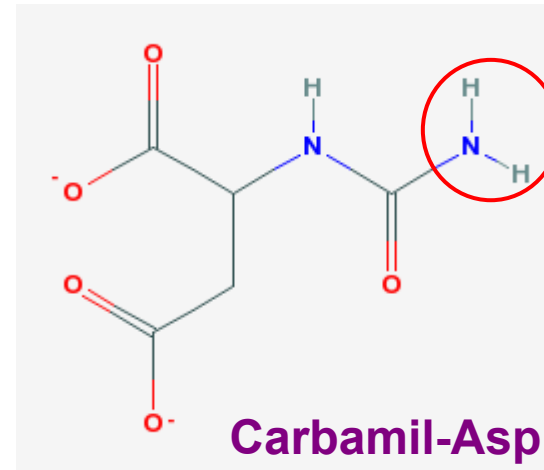
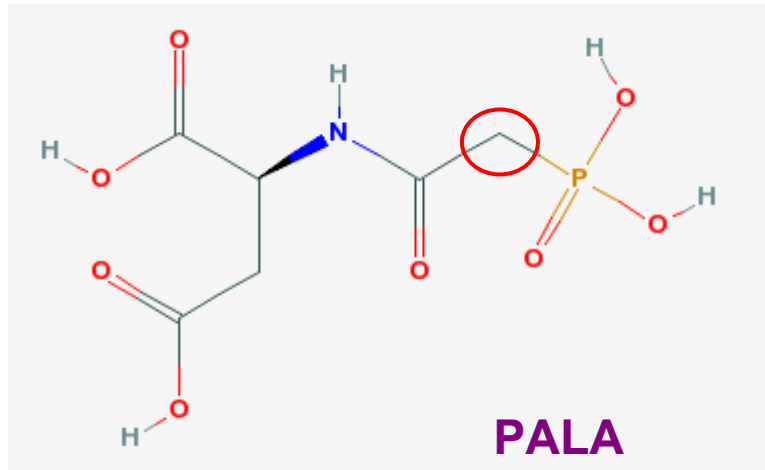
2. Síntesis del carbamil-Asp



Enzima: **ATCasa: Asp transcarbamilasa** (**CAD** en eucariontes)

- No necesita ATP, ya que el carbamil-P es una molécula activada
- Punto de regulación en procariontes: **ATP** vs. **CTP**

PALA & ATCasa

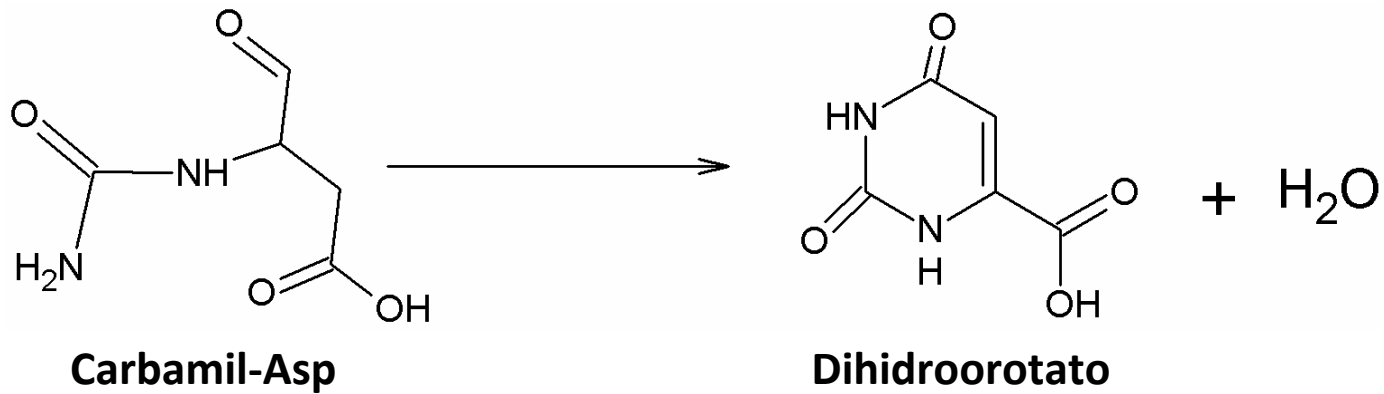


PALA: N-fosfonoacetil-L-Asp

- Análogo bisustrato de la ATCasa
- Estructura similar al producto intermediario de la reacción
- Inhibidor muy potente de la síntesis de pirimidinas

Imagen modificada a partir de la obtenida en NCBI PubChem

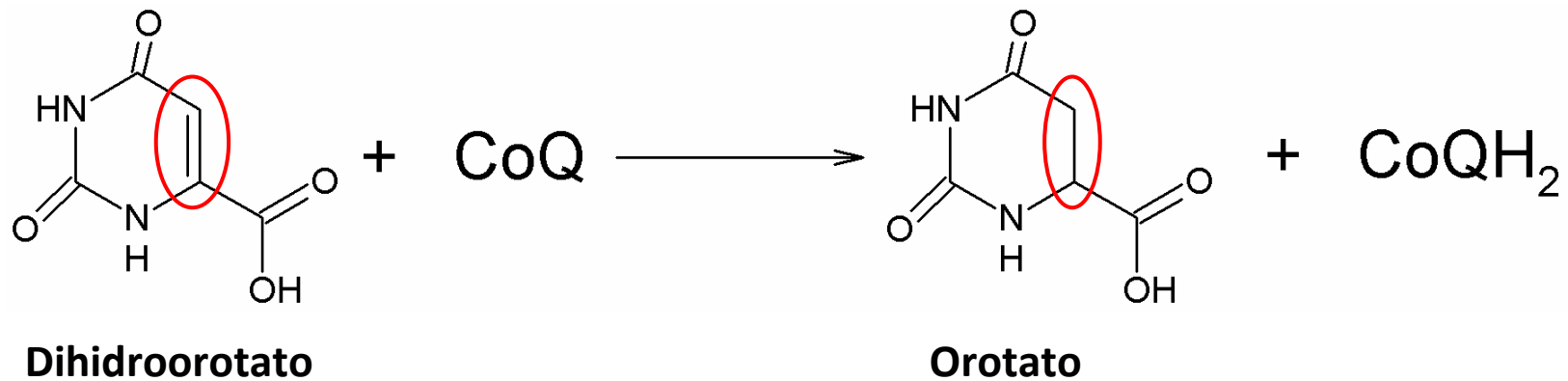
3. Síntesis del dihidroorotato



Enzima: **Dihydroorotasa**
(**CAD** en eucariontes)

- Condensación intramolecular y cierre del anillo
- Se libera una molécula de H₂O

4. Oxidación del dihidroorotato (I)



Enzima: **Dihidroorotato DH**

4. Oxidación del dihidroorotato (II)



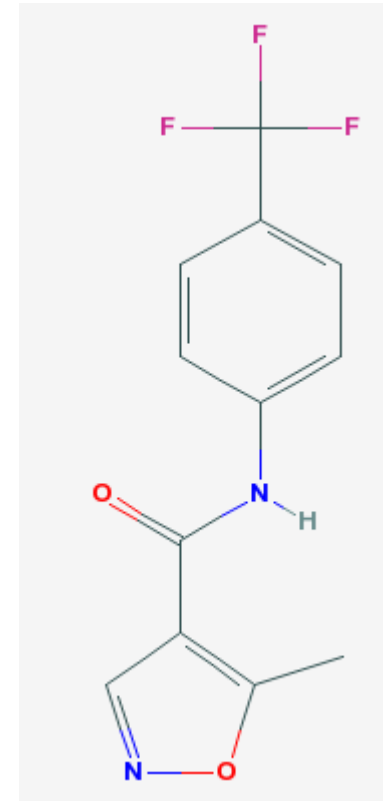
Enzima: **Dihidroorotato DH**

- El orotato ya es una pirimidina
- Reacción irreversible
- Enzima localizada en la cara externa de la membrana mitocondrial interna (m.m.i.)
- Poder reductor proveniente de las quinonas
- Las bacterias emplean NAD, FMN, FAD y grupos Fe no-hemo, principalmente en la ruta de degradación del orotato (orotato \rightarrow dihidroorotato)

Leflunomida y la dihidroorotato DH

Leflunomida (Arava)

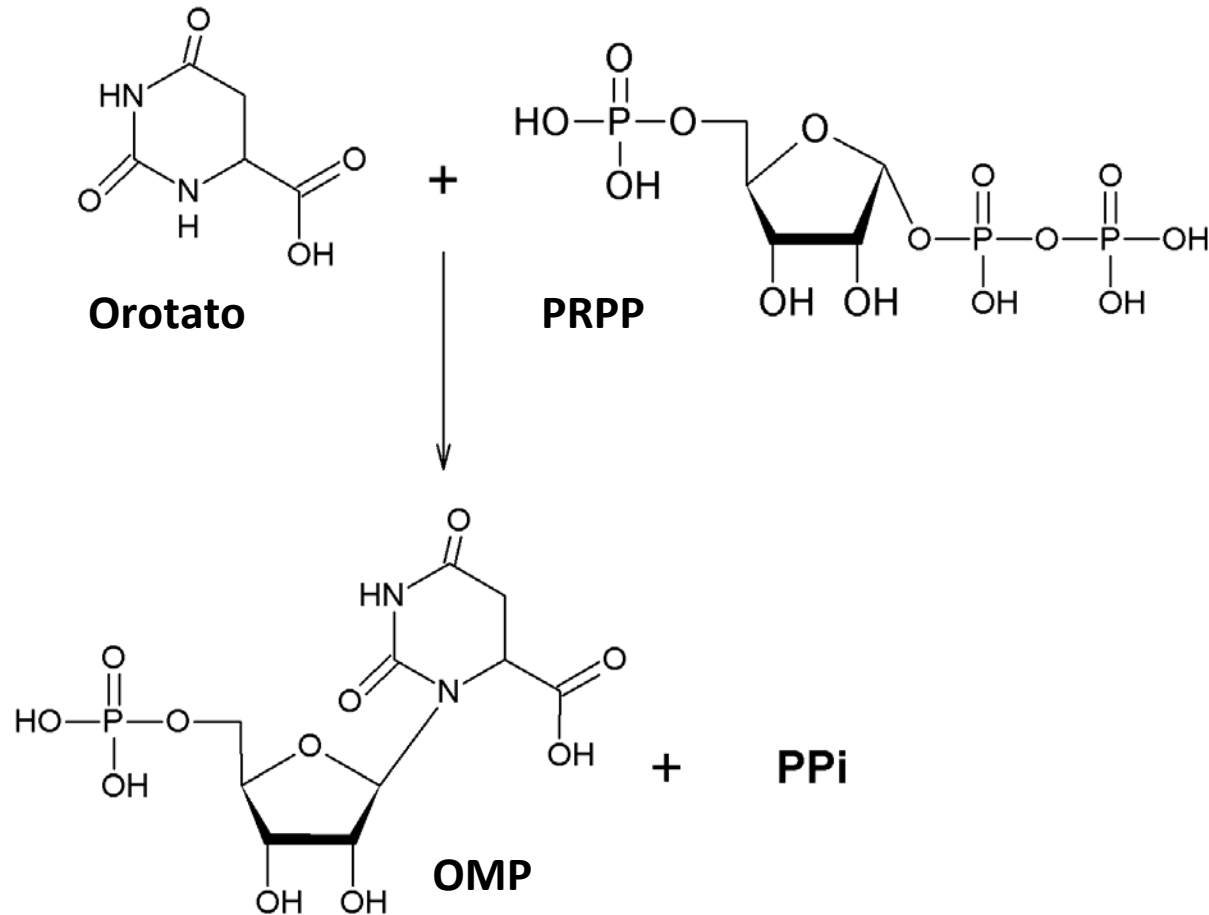
- Inhibidor de la dihidroorotato DH
- Al abrirse el anillo isoxazol, se produce un compuesto que inhibe la catálisis
- Actividad antiproliferativa y antiinflamatoria
- Tratamiento de la artritis reumatoide



*Rotura de este enlace y
apertura del anillo isoxazol*

Fuente de la imagen: NCBI PubChem

5. Unión de la ribosa al dihidroorotato (I)



Enzima: **Orotato fosforribosil transferasa**

5. Unión de la ribosa al dihidroorotato (II)

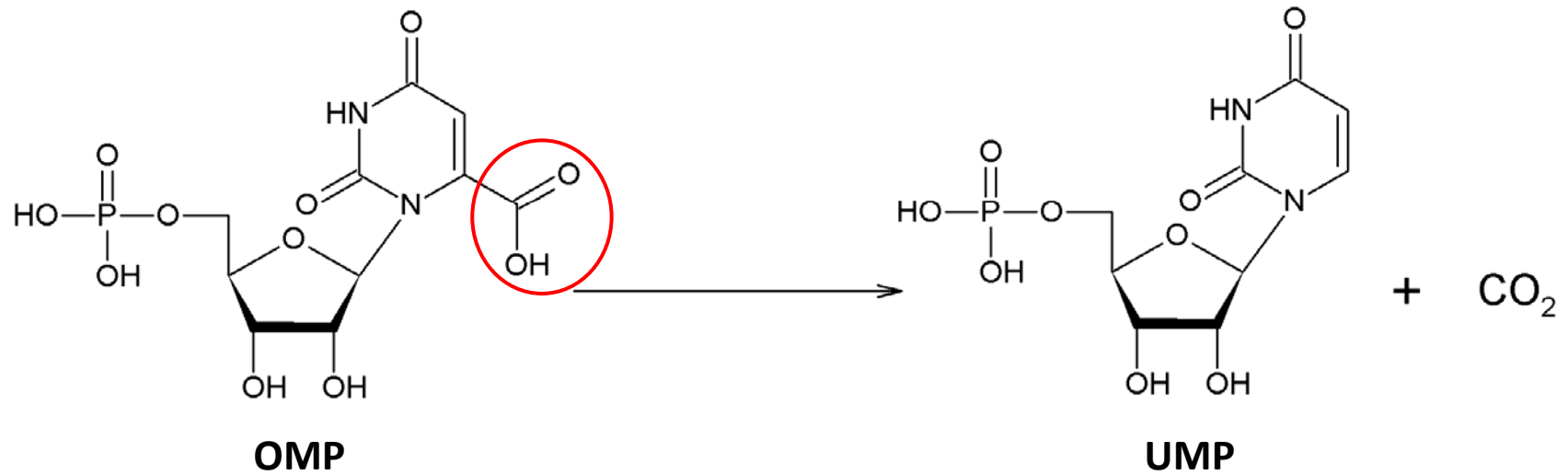


Enzima: **Orotato fosforribosil transferasa**

(+ **pirofosforilasa**)

- OMP: orotidina monofosfato
- Reacción irreversible
- unión en β de la base nitrogenada
- enzima utilizada en la ruta de **recaptación** \rightarrow **(CMP &) UMP**

6. Descarboxilación del dihidroorotato (I)



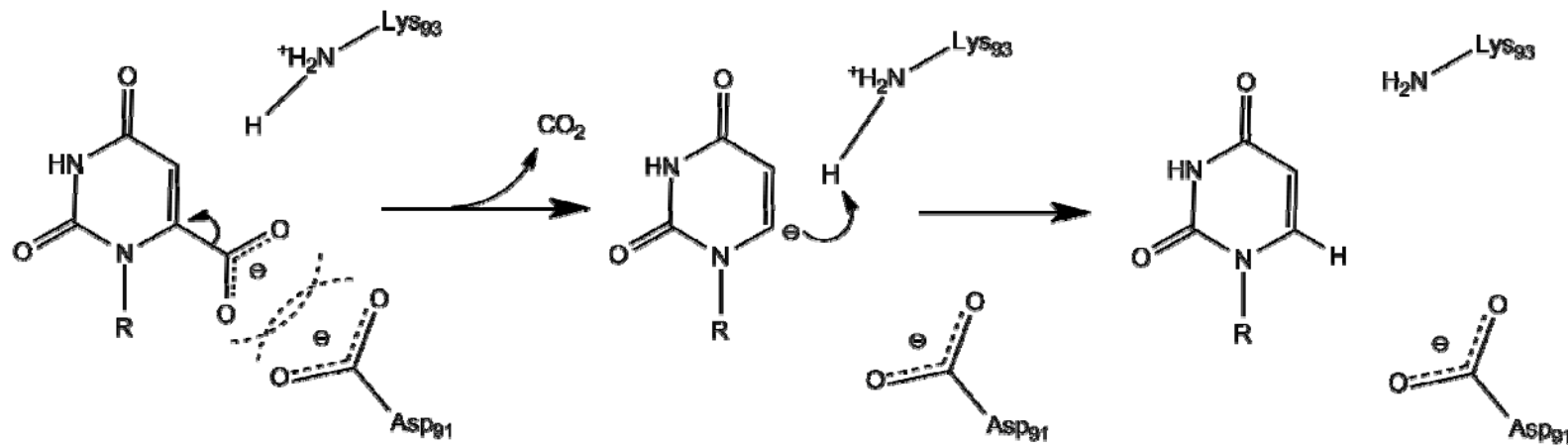
Enzima: **OMP descarboxilasa**

- Ausencia de cofactores
- No necesita de un carbanión activado

6. Descarboxilación del dihidroorotato (II)

Mecanismo de acción de la OMP descarboxilasa

Unión transitoria entre el OMP y el centro activo que estabiliza el estado de transición



Fuente de la imagen
<http://en.wikipedia.org/wiki/Category:Biochemistry>
Creative Commons Attribution-Share Alike license

SINTESIS DE UTP



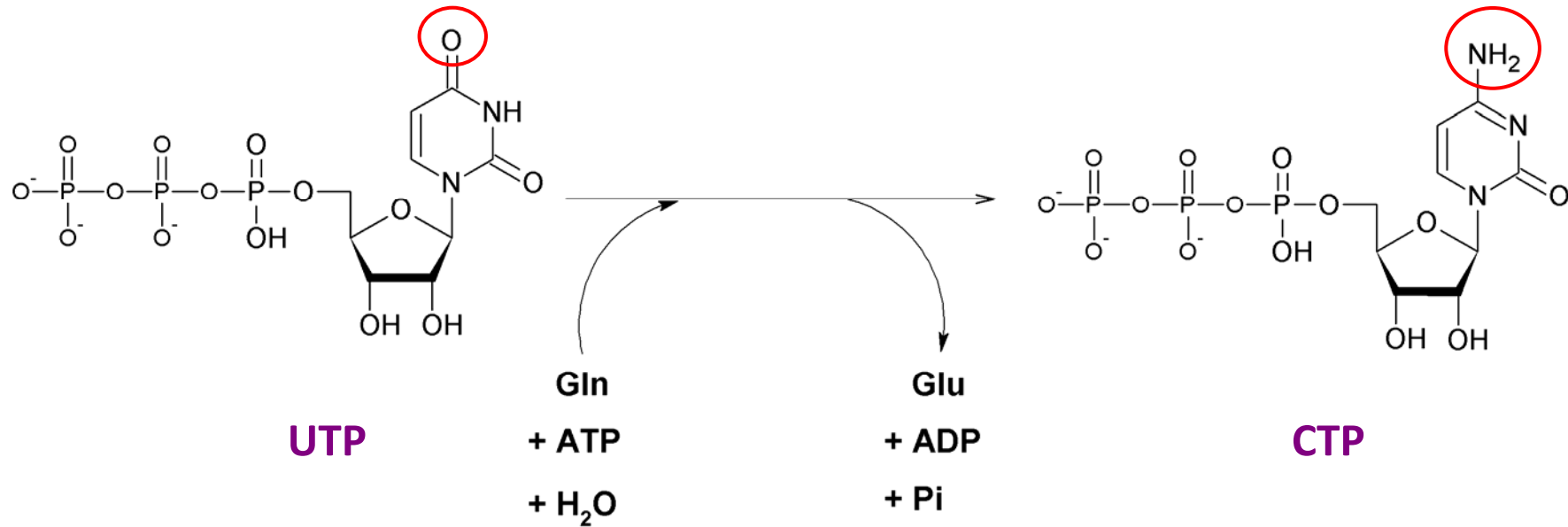
enzimas específicas (UMP kinasa)



enzimas inespecíficas



SINTESIS DE CTP



Enzima: **CTP sintetasa**

Mecanismo catalítico en 2 pasos

1. Formación de un intermediario acil-P activado (gasto de ATP)
2. Ataque nucleofílico del N del NH_4^+

En bacterias, el grupo $-\text{NH}_2$ es donado por NH_4^+

REGULACION DE LA SINTESIS DE PIRIMIDINAS

- Regulación en la primera enzima específica de la ruta → **ahorro** ε
- Síntesis coordinada de purinas y pirimidinas

Bacterias

ATCasa (síntesis del carbamil-Asp) **+ ATP**
- CTP & UTP (feedback)

Animales

Carbamil-P sintetasa II: + ATP & PRPP
- UTP & CTP (feedback)

Orotato fosforribosil transferasa: disponibilidad de **PRPP**
(**ADP & GDP** para la ribosa-P piro-fosfo-kinasa)

OMP descarboxilasa: - UMP & CMP

Aciduria orótica

- Enfermedad genética muy rara: **deficiencia en la UMP sintasa**
(bloqueo de las reacciones 5 & 6)
No hay síntesis *de novo* de pirimidinas
- Excreción de grandes cantidades de ácido orótico en orina, retardo en el crecimiento y anemia severa
- Al no producirse UMP, no se inhibe la carbamil-P sintetasa
→ **mayor acumulación de ácido orótico**
- No existen otros defectos genéticos conocidos de la síntesis de pirimidinas
- Tratamiento: administración de uridina y citidina para la síntesis de UMP y CTP

VIA DE RECAPTACION DE NUCLEOTIDOS PIRIMIDINICOS

1. Formación de los PirMPs

Enzima: **Pirimidina fosforribosil transferasa**



No se recapta la citosina

Enzima muy activa en tejidos adultos con baja tasa proliferativa



2. Fosforilaciones sucesivas

Transformación de los nucleótidos monofosfato de pirimidina en nucleótidos trifosfato (gasto de ATP)



GASTO ENERGETICO

Síntesis *de novo* de UMP

2 ATP en la síntesis del PRPP

2 ATP en la síntesis del carbamil-P

4 ATP

Recaptación de UMP

2 ATP en la síntesis del PRPP

2 ATP

BIOSINTESIS DE NUCLEOTIDOS DE TIMIDINA (I)

dTMP: componente del DNA

síntesis a partir de dUMP por metilación del C₅

necesidad de la presencia de *N*⁵,*N*¹⁰metilen-THF

Pasos previos

- Transformación de UDP en dUTP

UDP → dUDP Enzima: **Ribonucleótido reductasa**

dUDP → dUTP Enzima: **Nucleótido difosfato kinasa**

- Hidrólisis del dUTP

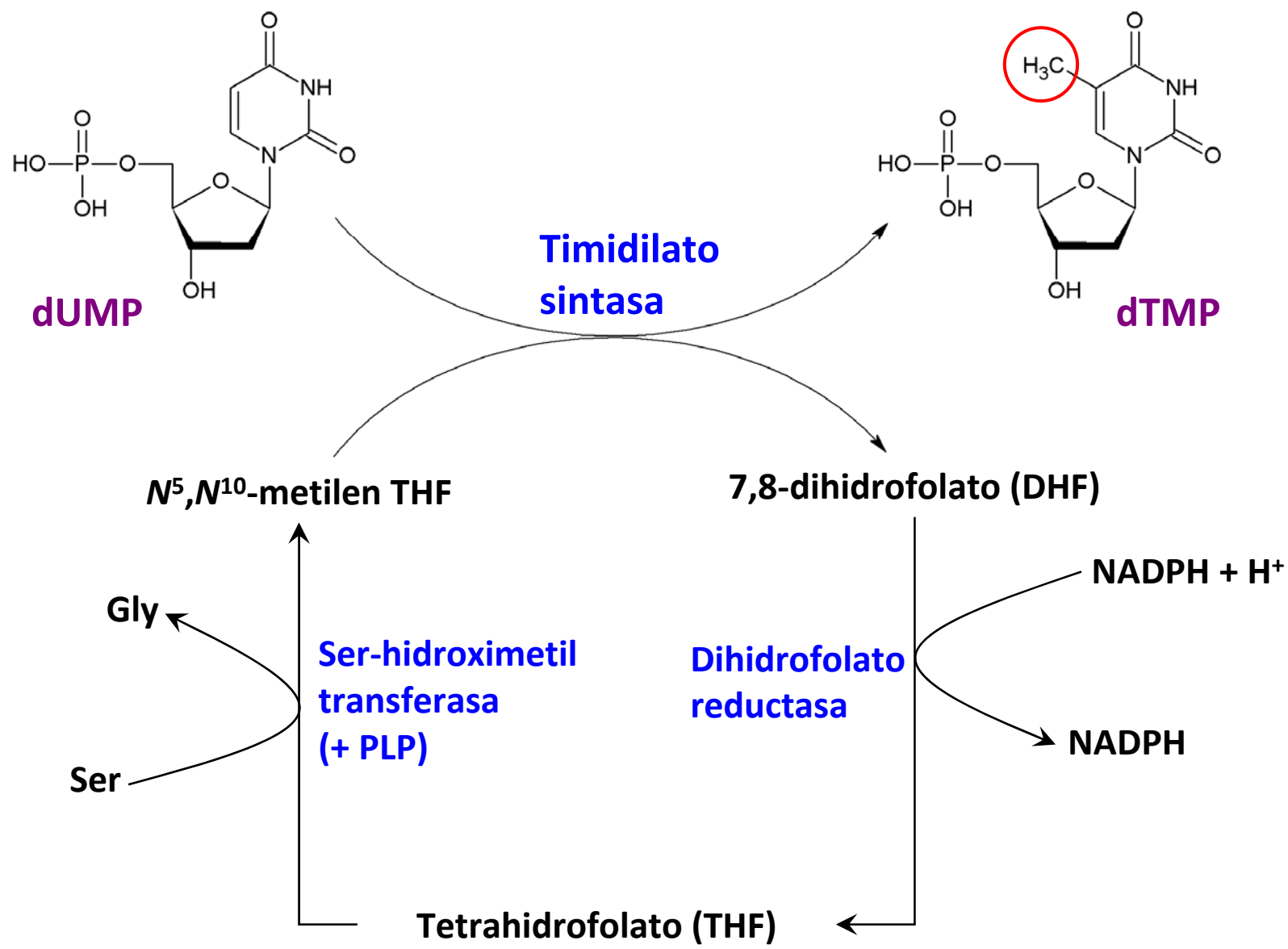
dUTP + H₂O → dUMP + PPI Enzima: **dUTP difosfohidrolasa**

Importancia

Evitar que se acumule dUTP en el interior celular y se incorpore al DNA

Causa: La DNA polimerasa no discrimina eficientemente el dUTP de la dTTP

Biosíntesis de nucleótidos de timidina (II)



Biosíntesis de nucleótidos de timidina (III)



Enzima: **Timidilato sintasa**

- Transferencia de un grupo metilo del N^5, N^{10} -metilen THF al dUMP
- El grupo metileno se reduce a metilo
- El cofactor tetrahidrofolato (THF) se oxida a dihidrofolato (DHF)
- El THF es el donador de e^- y de grupos metilo
- Mecanismo catalítico basado en que el C_6 del uracilo puede sufrir un ataque nucleofílico
- **Importancia evolutiva**

El uracilo ha de ser evolutivamente anterior a la timina

Mecanismo catalítico de la timidilato sintasa

1. Ataque nucleofílico del grupo –SH al C₆ del dUMP

Formación de un aducto covalente

2. C₅ ataca al grupo metileno del THF

Formación del complejo ternario covalente

enzima -- Cys¹⁴⁶ -- S – dUMP -- CH₂ – THF

3. Otro grupo nucleófilo de la enzima atrae un protón del C₅ del dUMP

Se forma el grupo metileno & separación del THF

4. Migración de un protón del C₆ del THF al grupo metileno

Aparición de un grupo metilo en C₅ + liberación del DHF

Desplazamiento del tiolato de la enzima

Regeneración del THF



Enzima: **Dihidrofolato reductasa** (DHFR)

Transferencia directa de un ión H^- del anillo del NADPH al DHF



Enzima: **Ser-hidroximetil-transferasa**

Reacción dependiente de **PLP** (= piridoxal-fosfato)

Estructura del tetrahidrofolato (THF)

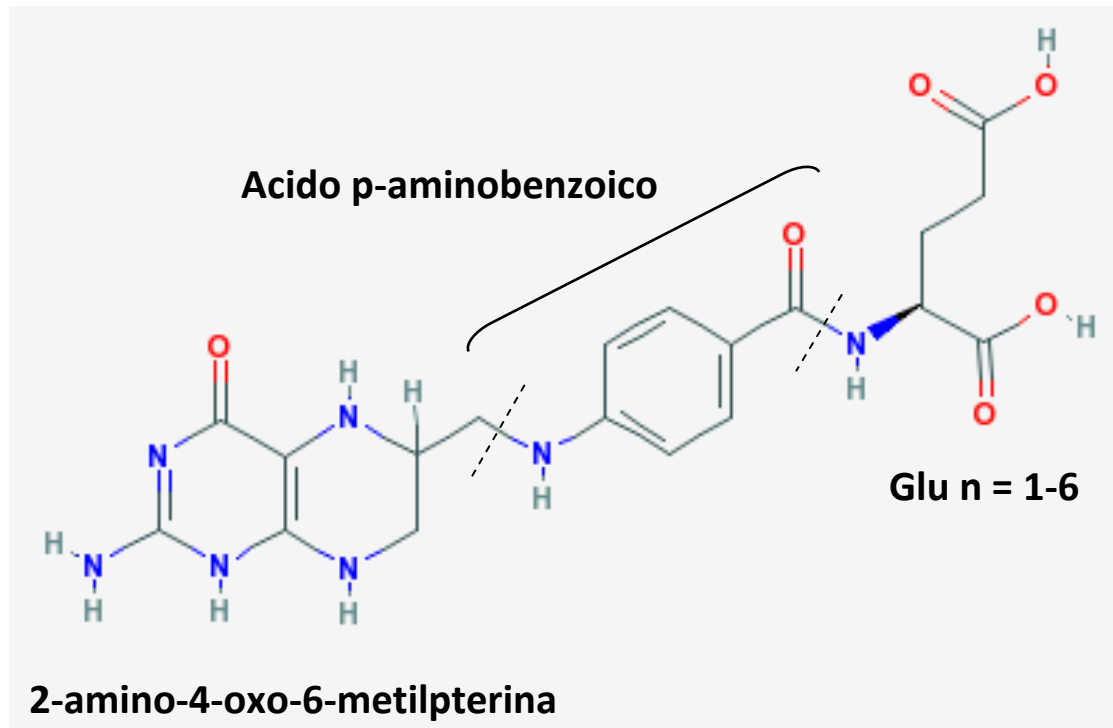
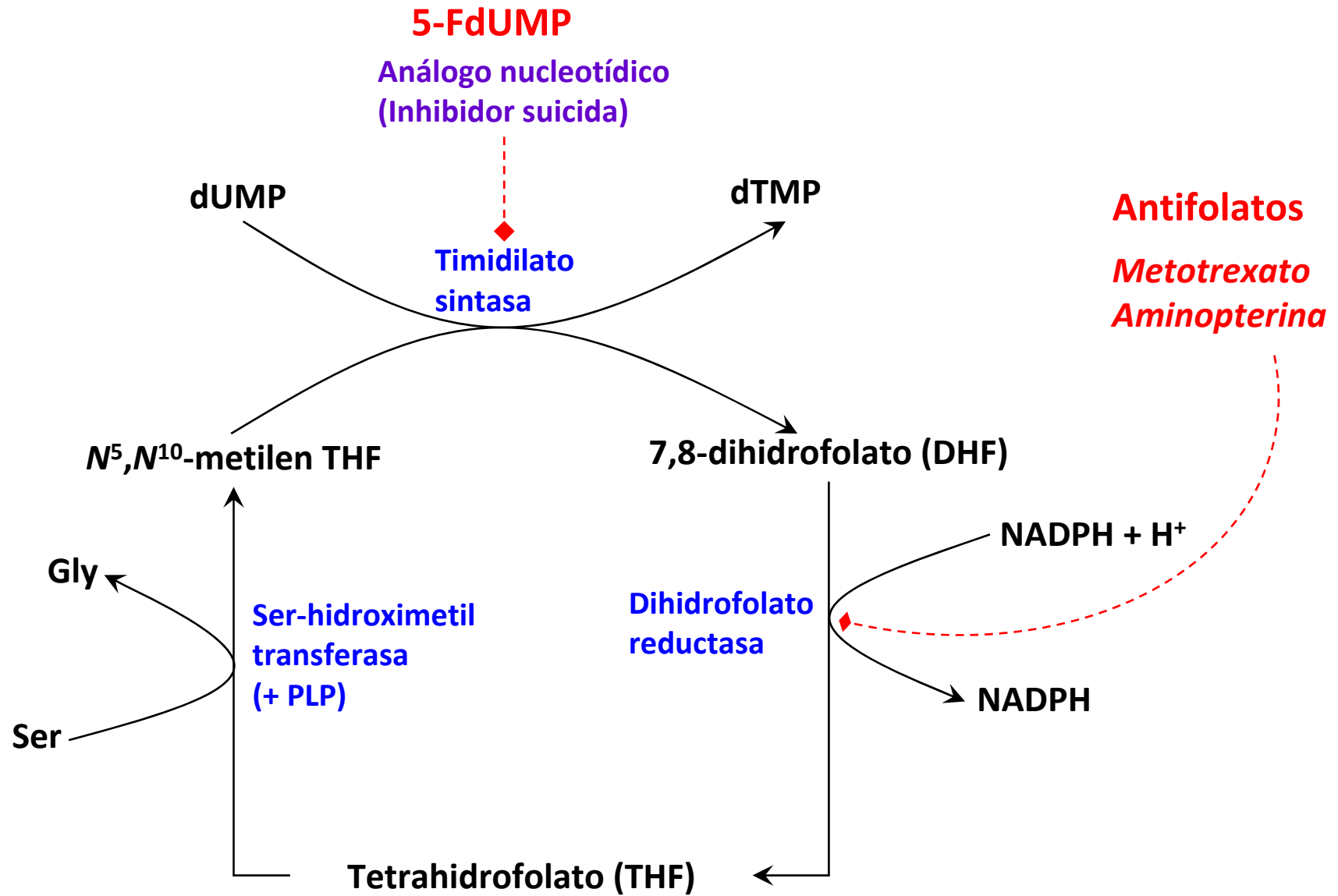
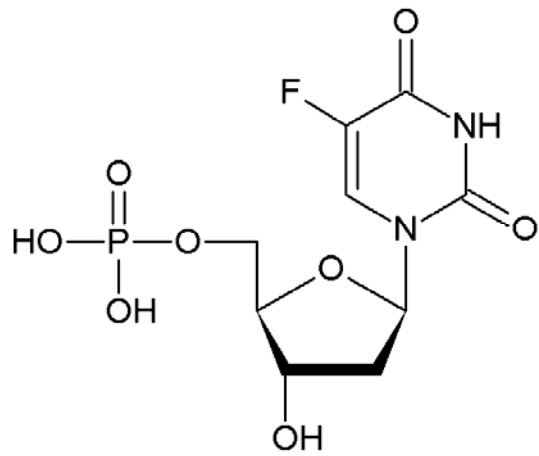


Imagen modificada a partir de la obtenida en NCBI PubChem

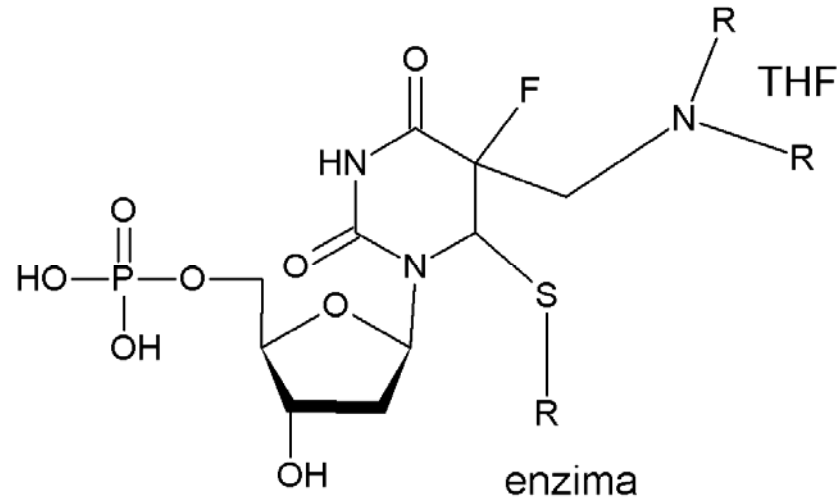
FARMACOS ANTIPROLIFERATIVOS



5-fluorouracilo & FdUMP



5-FdUMP

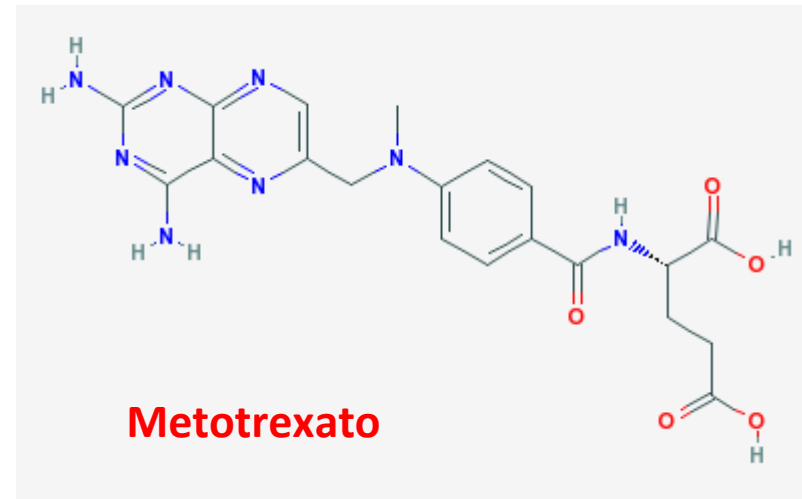
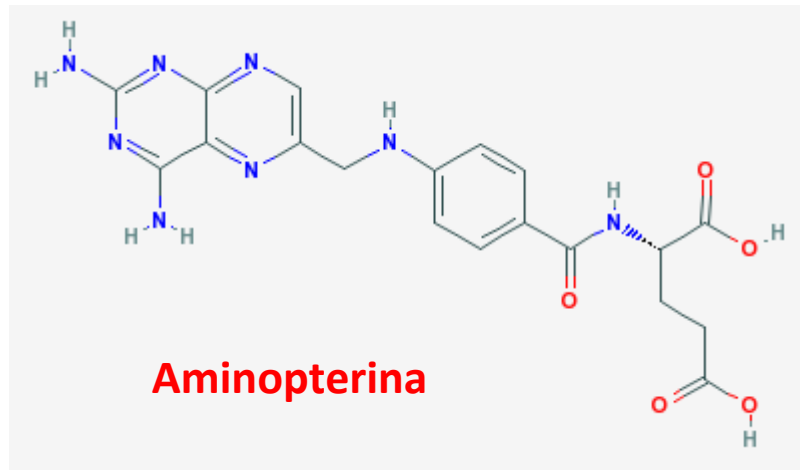
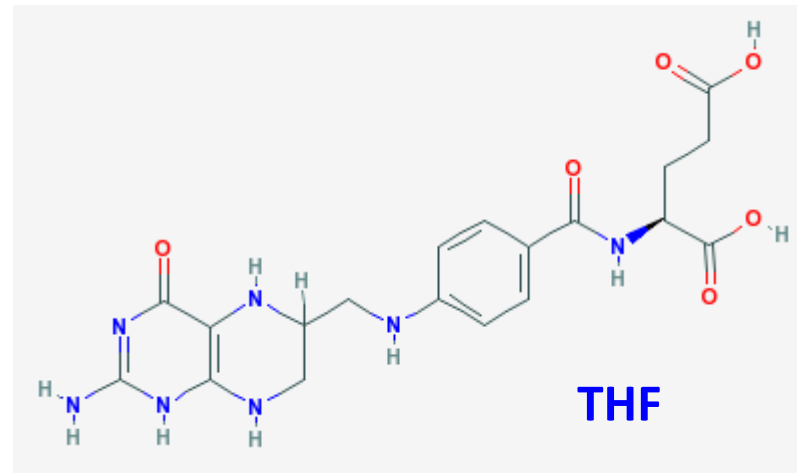


5-FdUMP unido al centro activo de la enzima timidilato sintasa

- Inhibidor suicida de la timidilato sintasa
- 5-fluorouracilo = análogo de la timina
- Inmovilización del complejo ternario

enzima -- Cys¹⁴⁶ -- S – dUMP -- F – THF

Antifolatos (I)



Antifolatos (II)

Inhiben la regeneración del THF

→ bloqueo de la síntesis de dTMP, de purinas, His / Met

Aminopterina, metotrexato (ametopterina)

Drogas anticancerosas, utilizadas especialmente en el tratamiento de leucemias infantiles y tumores de crecimiento rápido

Actúan como inhibidores competitivos de la DHF reductasa

Presentan 10^3 veces más afinidad que el DHF

Nota: Idealmente conviene utilizar una dosis letal de antifolatos y posteriormente “rescatar” al paciente administrando dosis masivas de THF o timidina

De esta forma se evita la aparición de resistencias a estas drogas

Antifolatos (III)

Problema: resistencia al metotrexato

Mecanismos de resistencia

1. Alteración de los sistemas de transporte
(el metotrexato no se capta del medio)
2. Cambios en el centro activo de la DHFR
3. Amplificación génica de la DHFR