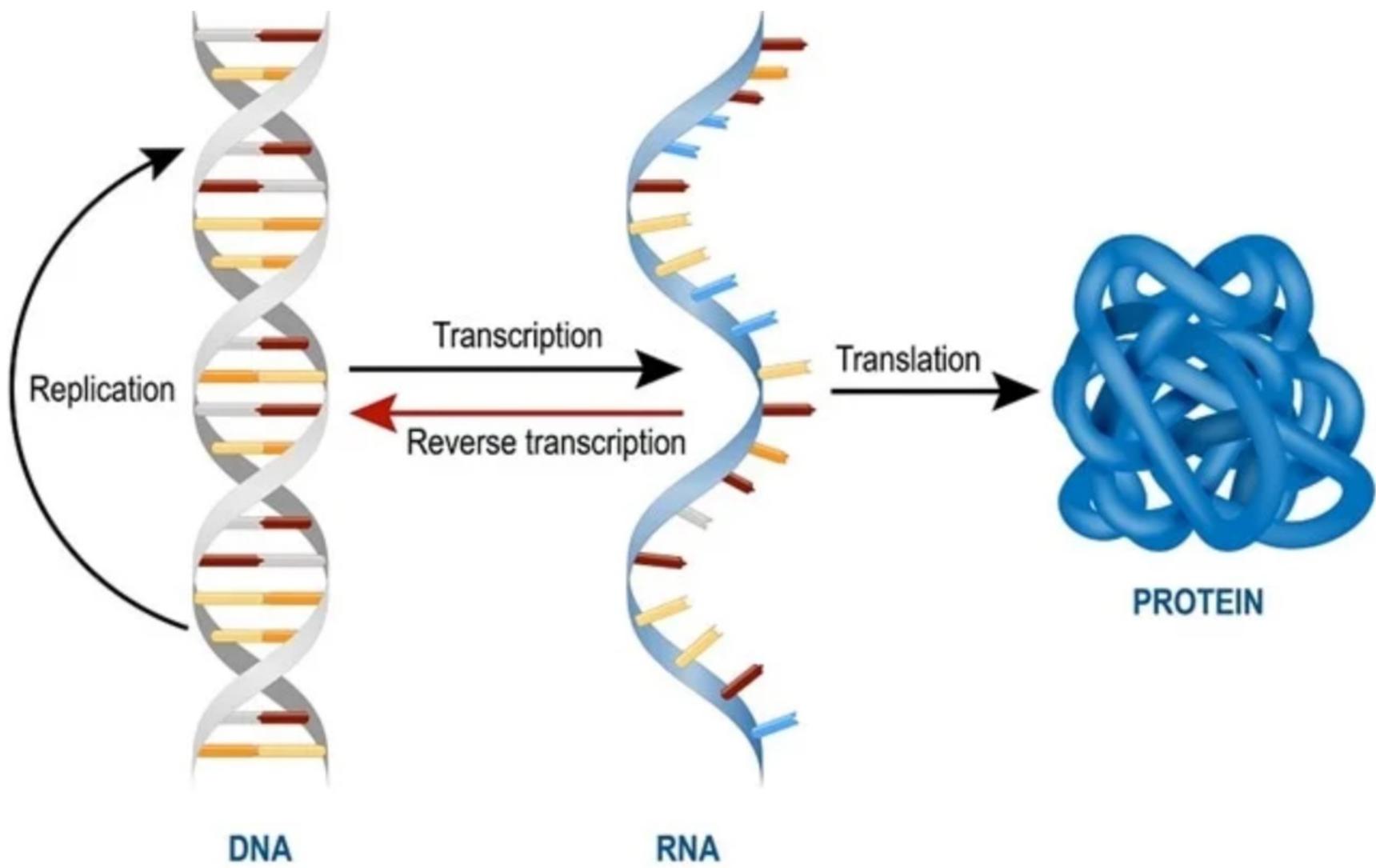


**I NUCLEOTIDI QUALI
COFATTORI ENZIMATICI ED
INTERMEDI METSBOICI**



Nucleotidi e acidi nucleici

I **nucleotidi** svolgono ruoli fondamentali nella cellula:

- **monomeri degli acidi nucleici (DNA e RNA)**
- **trasportatori dell'energia chimica nella cellula (ATP, GTP)**
- **messaggeri chimici (AMP ciclico)**
- **componenti di alcuni cofattori enzimatici (NAD, FAD etc.)**

Struttura dei Nucleotidi

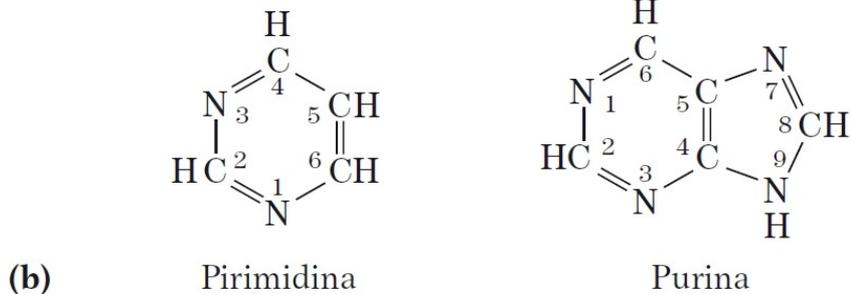
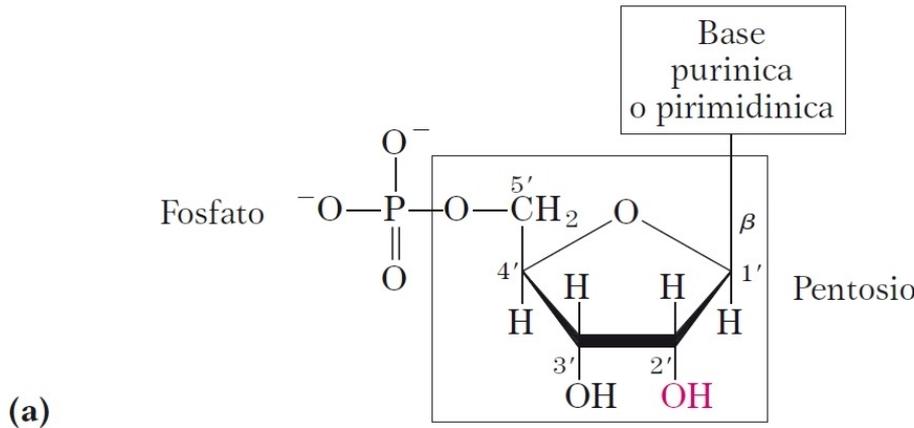
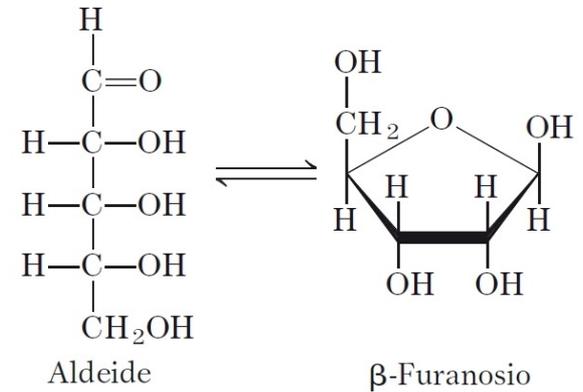


Figura 8.1 Struttura dei nucleotidi. (a) Struttura generale dei nucleotidi, con la numerazione convenzionale degli atomi dell'anello del pentosio. Questa struttura è un ribonucleotide. Nei deossiribonucleotidi il gruppo ossidrilico —OH nella posizione 2' (in rosso) viene sostituito da un atomo di idrogeno (—H). (b) I composti da cui derivano le basi puriniche e pirimidiniche dei nucleotidi e degli acidi nucleici; anche in questo caso è indicata la numerazione convenzionale.

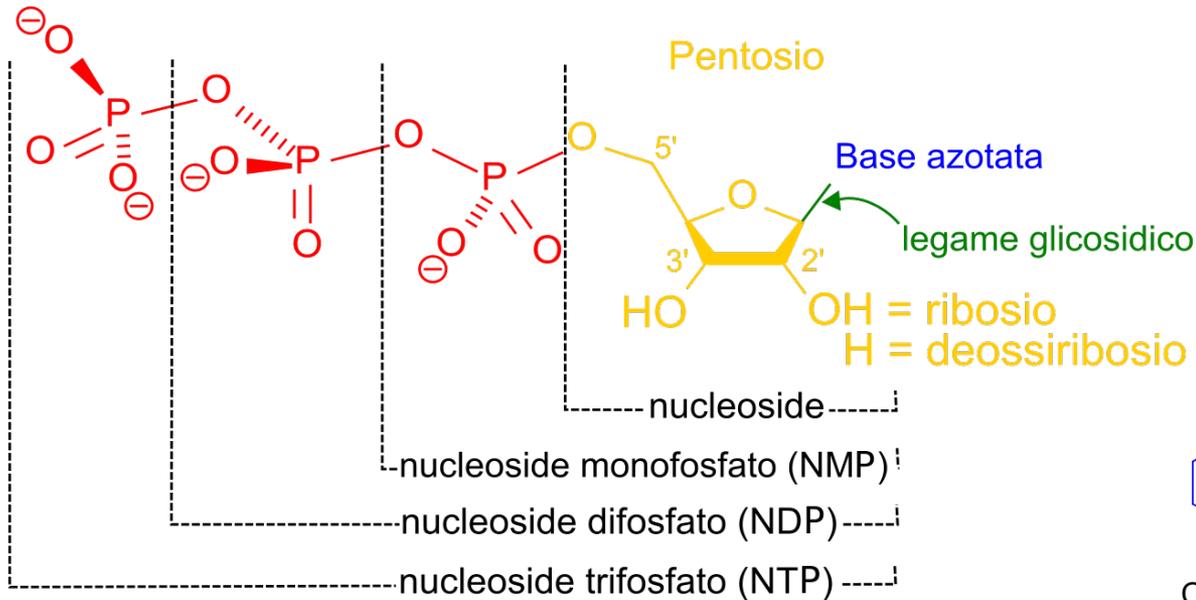
RNA



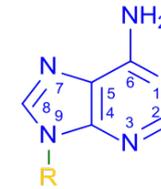
DNA



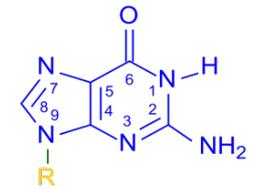
Nucleotidi mono-, di-, tri-fosfato



Basi puriniche

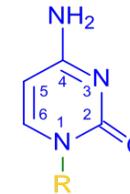


Adenina

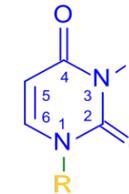


Guanina

Basi pirimidiniche

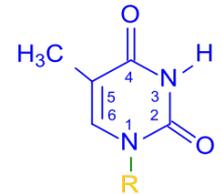


Citosina



Uracile

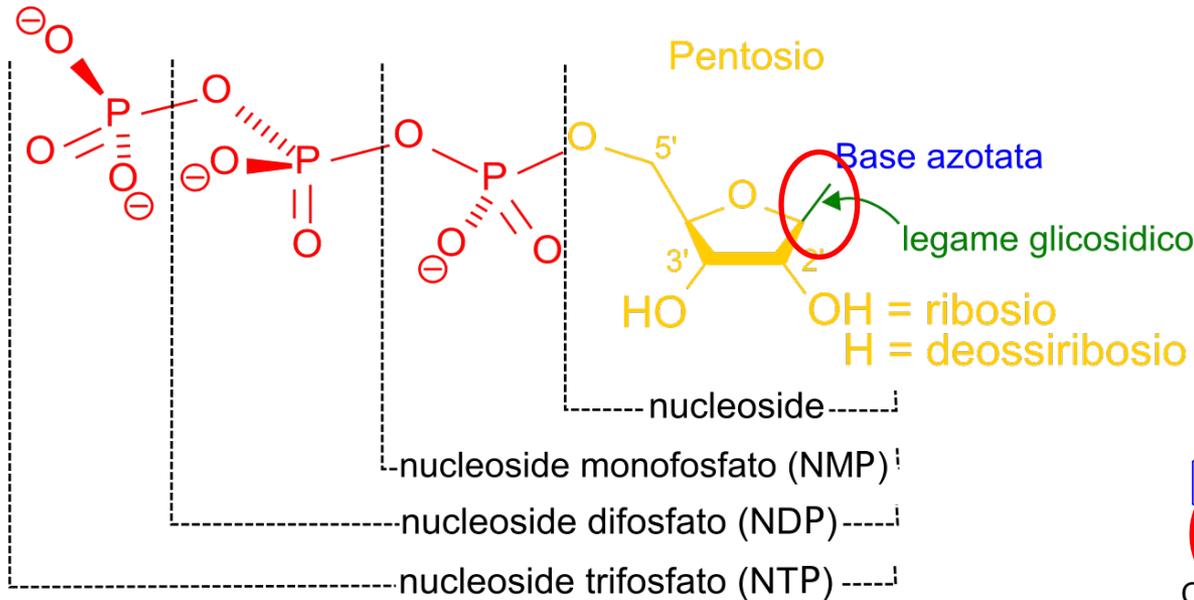
RNA



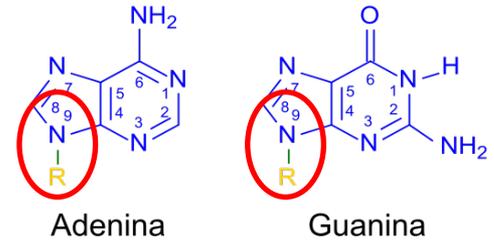
Timina

DNA

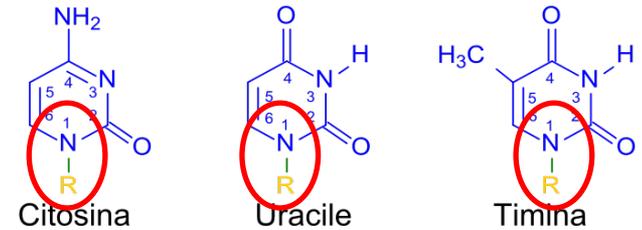
Nucleotidi mono-, di-, tri-fosfato

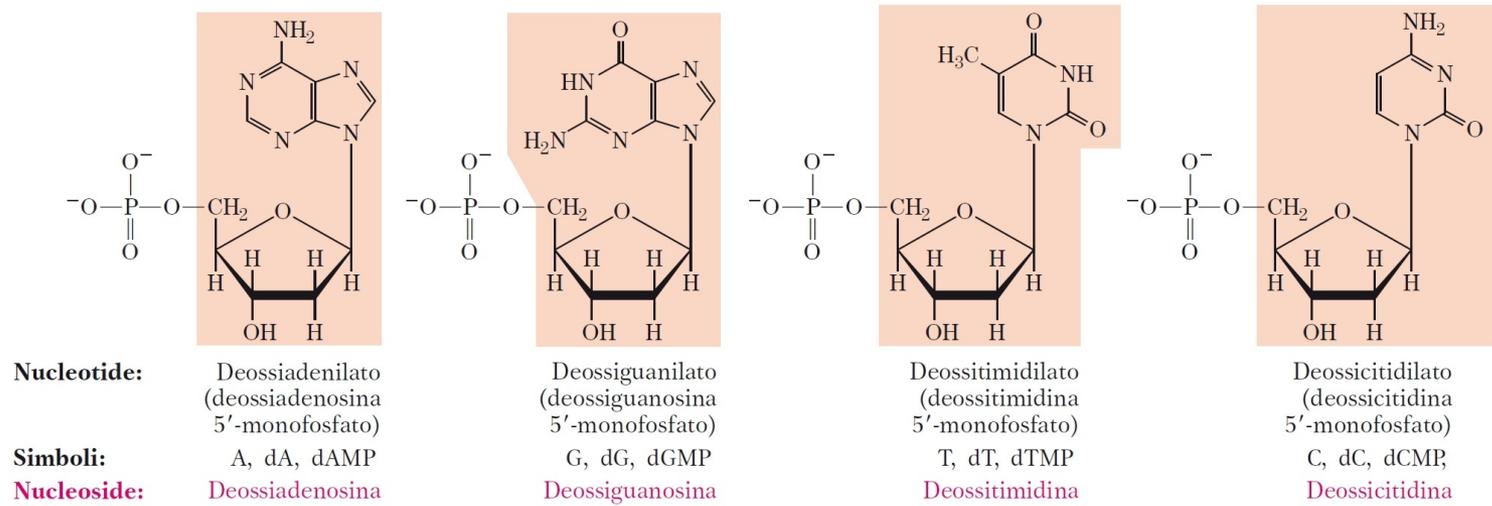


Basi puriniche

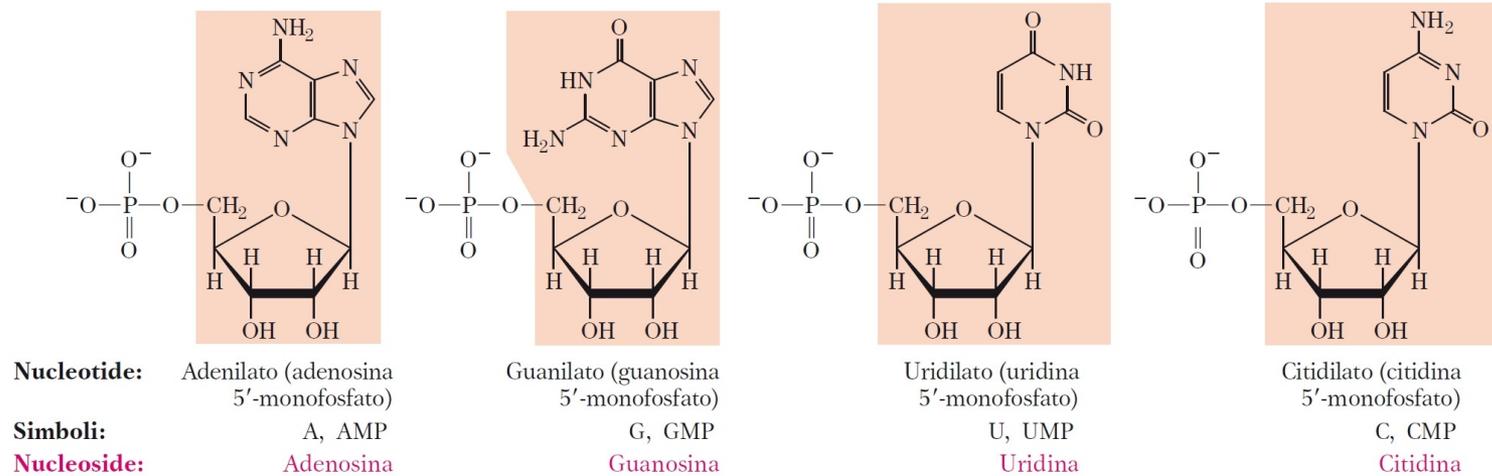


Basi pirimidiniche





(a) Deossiribonucleotidi



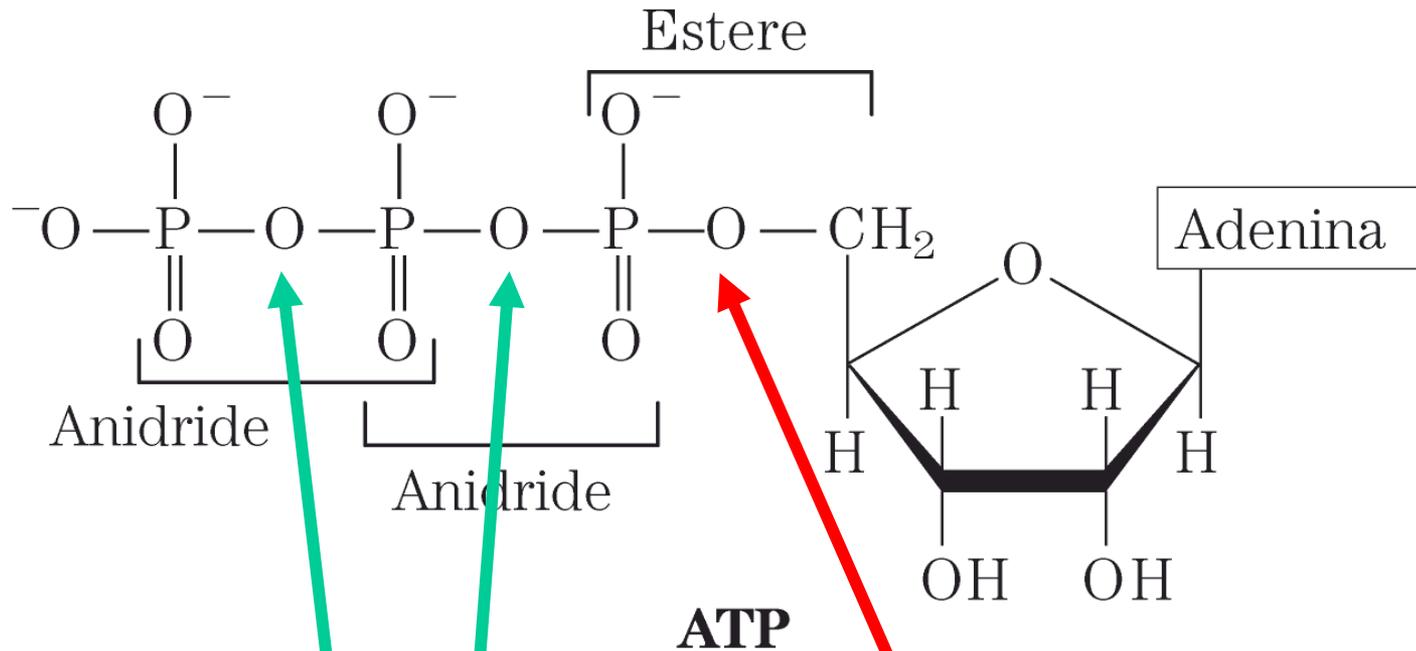
(b) Ribonucleotidi

Figura 8.4 Deossiribonucleotidi e ribonucleotidi degli acidi nucleici. Tutti i nucleotidi sono mostrati nella forma libera a pH 7,0. Le unità nucleotidiche del DNA (a) sono indicate con i simboli A, G, T, C e in qualche caso con dA, dG, dT, dC; quelle dell'RNA (b) sono abbreviate con A, G, U e C. Nella loro forma libera i deossiribonucleotidi sono abbreviati in dAMP, dGMP,

dTMP e dCMP; i ribonucleotidi in AMP, GMP, UMP e CMP. Per ogni nucleotide il nome più comune è seguito dal nome completo (tra parentesi). In tutte le abbreviazioni si considera che il gruppo fosforico sia nella posizione 5'. La porzione nucleosidica di ogni molecola è ombreggiata in rosa. In questa e nelle figure seguenti non sono indicati gli atomi di carbonio delle strutture ad anello.

Nucleotidi come trasportatori di energia

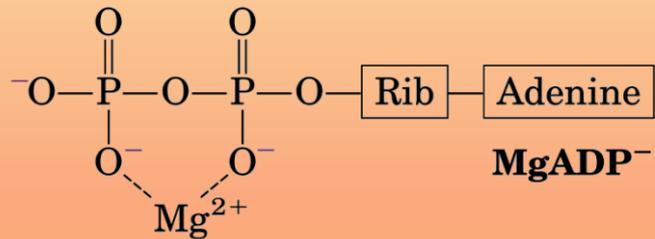
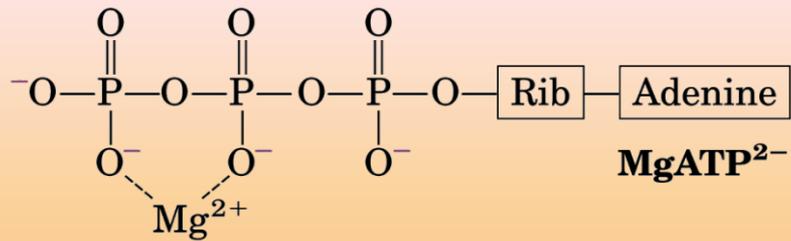
La molecola di **ATP** è il più importante veicolo energetico cellulare, ma usati anche GTP, UTP e CTP



ATP

Idrolisi legame **estereo**: **14 kJ/mole**

Idrolisi legame **anidridico**: **30 kJ/mole**

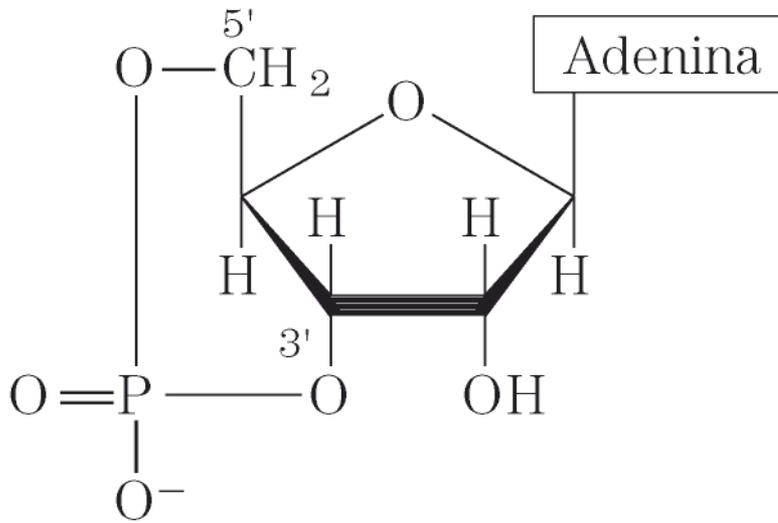


**Forme attive dell'*ATP* e dell'*ADP*
(Mg^{2+} / Mn^{2+})**

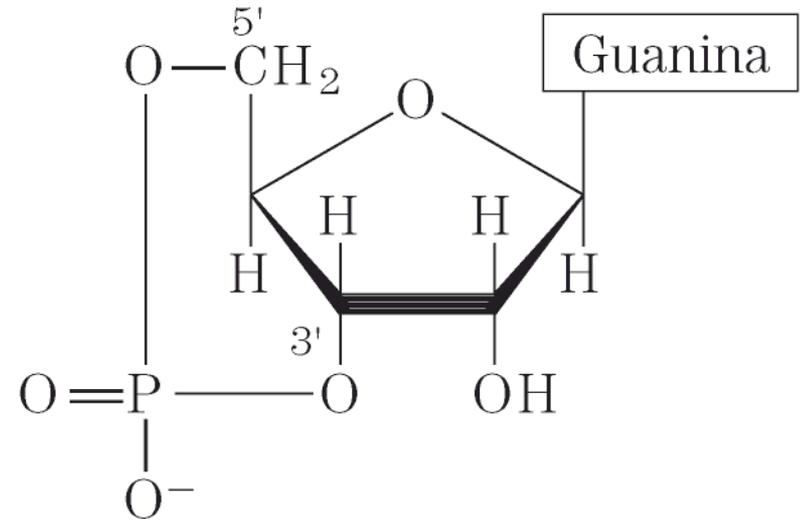
Nucleotidi come messaggeri chimici (mediatori della trasduzione del segnale)

La comunicazione di un segnale extracellulare viene trasmessa all'interno della cellula mediante l'utilizzo di **secondi messaggeri**, alcuni dei quali sono **derivati ciclici dei nucleotidi**

Es. cAMP da ATP tramite adenilato ciclasi



Adenosina 3',5'-monofosfato ciclico
(AMP ciclico, cAMP)

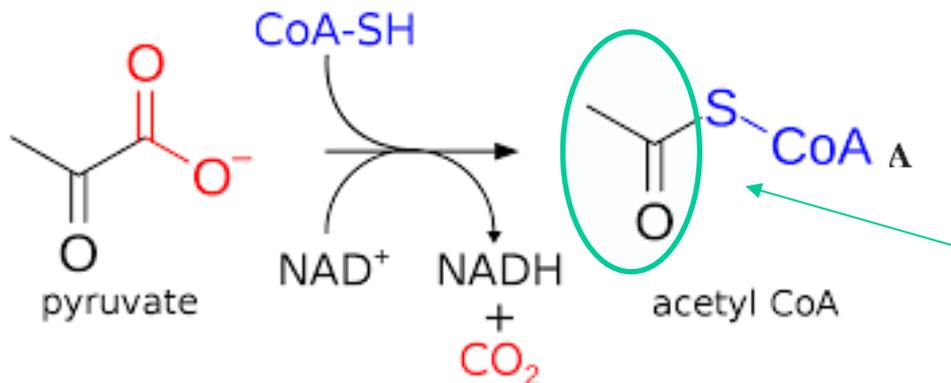
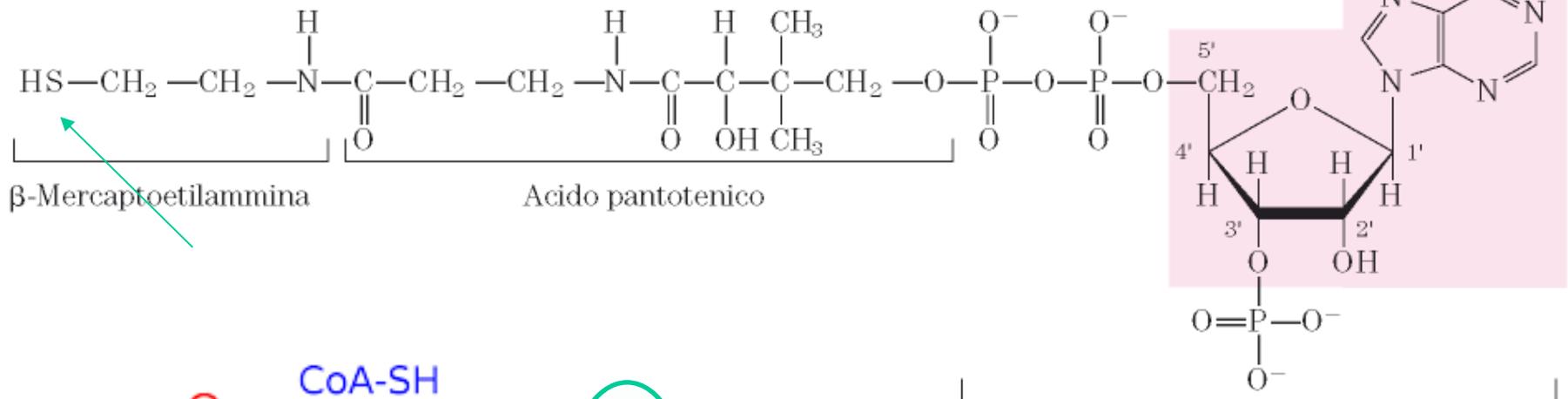


Guanosina 3',5'-monofosfato ciclico
(GMP ciclico, cGMP)

Nucleotidi come componenti di cofattori enzimatici

Il **Coenzima A**, che contiene il nucleotide 3'-P-ADP, agisce nelle reazioni di *trasferimento di gruppi chimici* (e.g. acetile): tali gruppi vengono legati covalentemente al CoA mediante un legame **tioestereo**

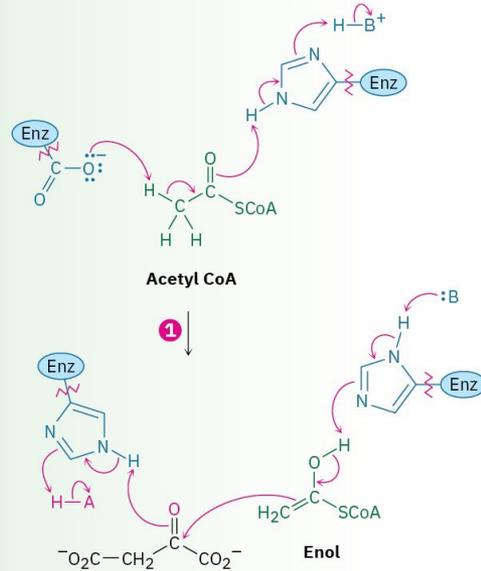
Coenzima A



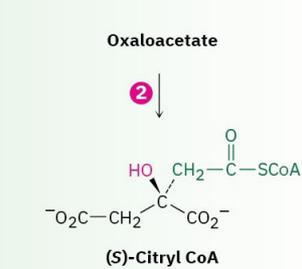
3'-Fosfoadenosina difosfato (3'-P-ADP)

citrato sintasi: catalizza la biosintesi del citrato a partire da Acetyl CoA e ossalacetato

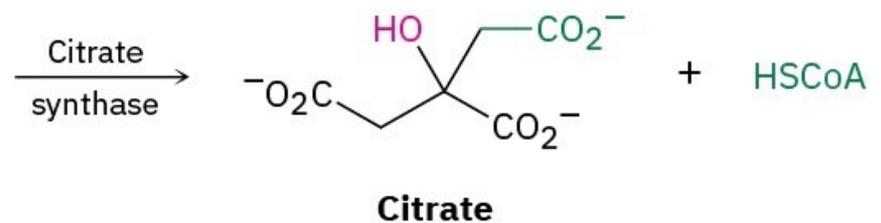
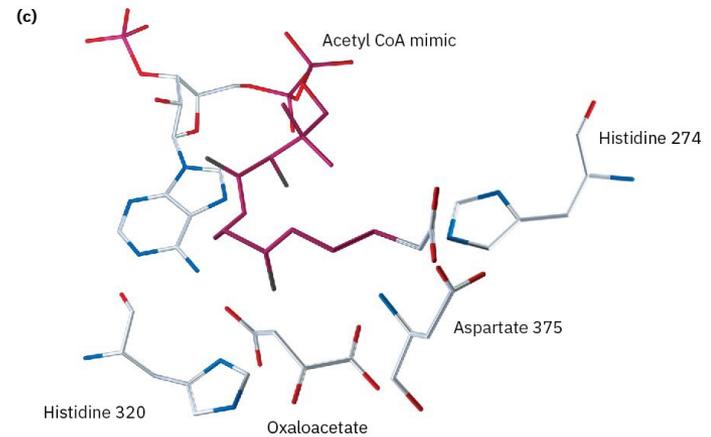
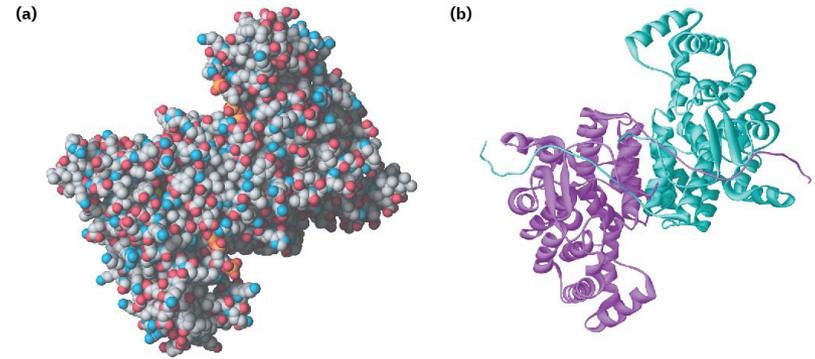
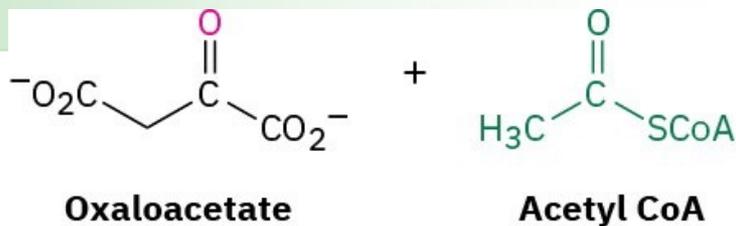
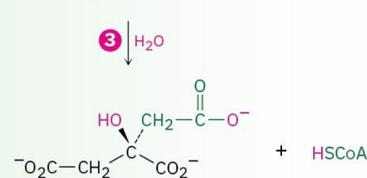
1 The side-chain carboxylate group of an aspartic acid acts as a base and removes an acidic α proton from acetyl CoA, while the N-H group on the side chain of a histidine acts as an acid and donates a proton to the carbonyl oxygen, giving an enol.



2 A histidine deprotonates the acetyl-CoA enol, which adds to the ketone carbonyl group of oxaloacetate in an aldol-like reaction. Simultaneously, an acid N-H proton of another histidine protonates the carbonyl oxygen, producing (S)-citryl CoA.



3 The thioester group of citryl CoA is hydrolyzed by a typical nucleophilic acyl substitution reaction to produce citrate plus coenzyme A.



Attivare corrisponde ad esempio ad accoppiare ad un evento di fosforilazione...
Perché?

Gli ortofosfati (Pi) ed i pirofosfati (PPi) inorganici sono tra i migliori gruppi uscenti in reazioni di sostituzione nucleofila.

Quali sono i legami che si formano quando si ha attivazione di un intermedio metabolico mediante gruppi fosfato?

Le forme attivate che si producono per attacco di questi gruppi uscenti sono esteri ed anidridi dell'acido fosforico. Il gruppo fosforico è utilizzato come gruppo uscente in centinaia di reazioni di sostituzione nucleofila.

Le molecole in grado di funzionare da accumulatori di energia contengono almeno un gruppo fosfato facilmente ionizzabile

P può formare cinque legami covalenti

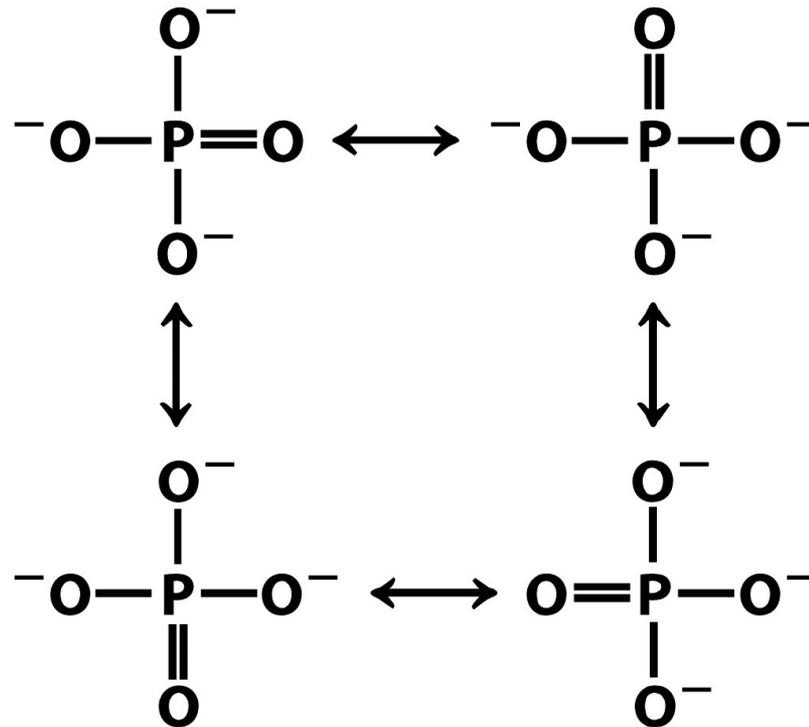


Figure 13-8a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

La rappresentazione convenzionale del Pi con tre legami P-O e un legame P=O non è precisa.....

.....i quattro legami P-O sono equivalenti e presentano parziale carattere di doppio legame.

L'anione ha una struttura tetraedrica

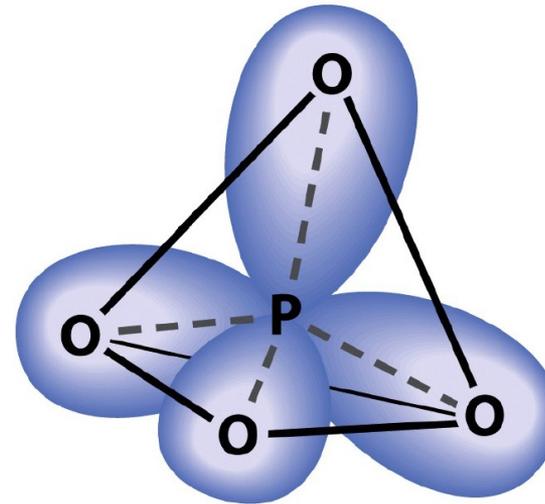
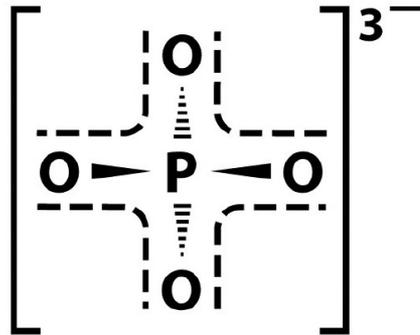
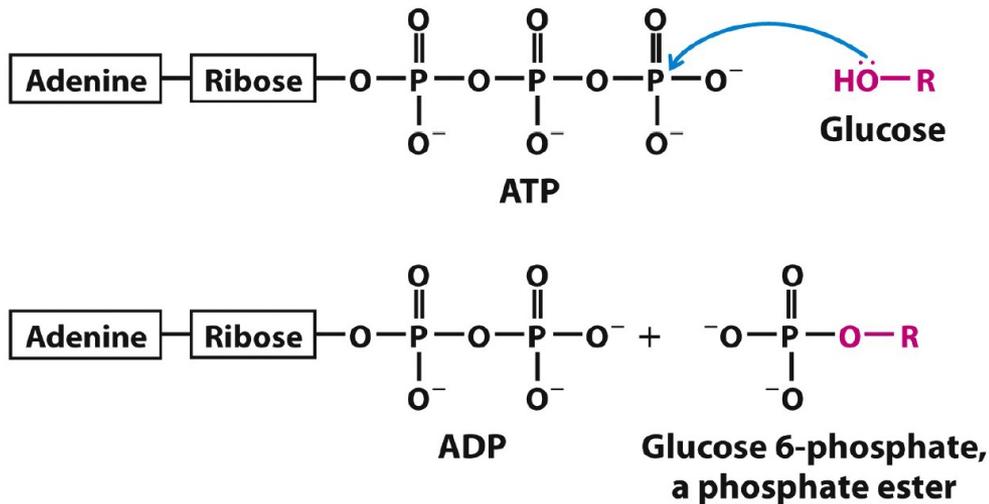


Figure 13-8b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Poiché O è più elettronegativo di P, gli elettroni non sono distribuiti in modo omogeneo: P presenta una parziale carica positiva e si comporta da elettrofilo

In molte reazioni metaboliche un gruppo fosforico viene trasferito da ATP ad un alcol con formazione di un estere fosfato o da ATP ad un acido carbossilico con formazione di un'anidride mista

Es.: formazione di glucosio 6-fosfato
Il nucleofilo è il gruppo -OH legato al C6 del glucosio



E' una reazione di sostituzione nucleofila in cui il nucleofilo attacca P elettrofilo di ATP e si forma un intermedio pentacovalente



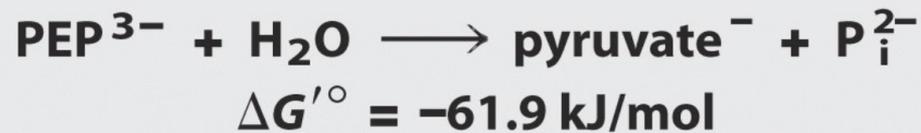
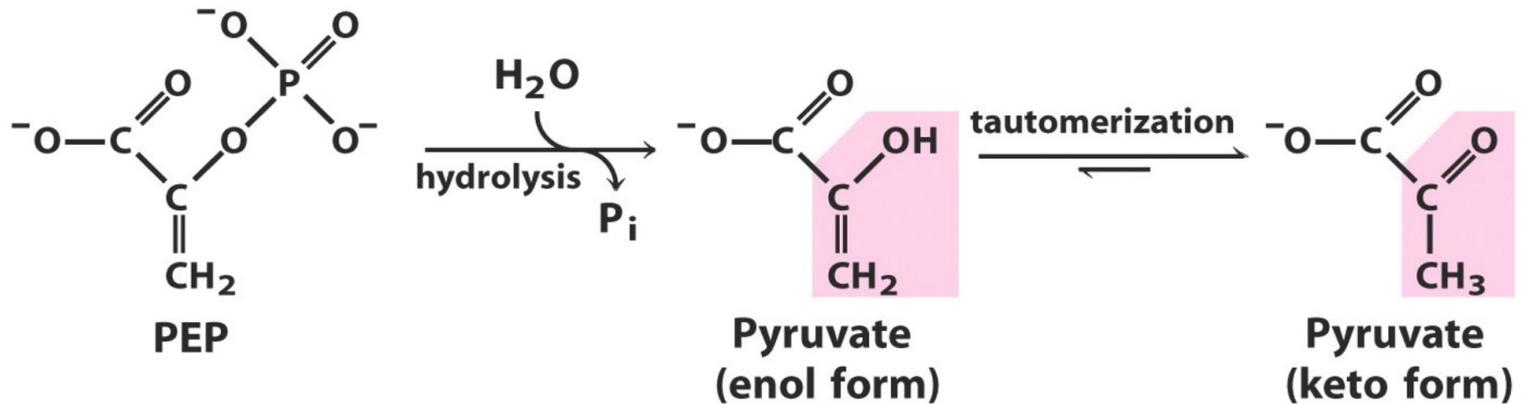
Figure 13-8c
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Figure 13-8d
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Il trasferimento del gruppo fosforico si completa con il rilascio del gruppo uscente (ADP)
Il trasferimento del gruppo fosforico fornito da ATP è catalizzato dalle CHINASI

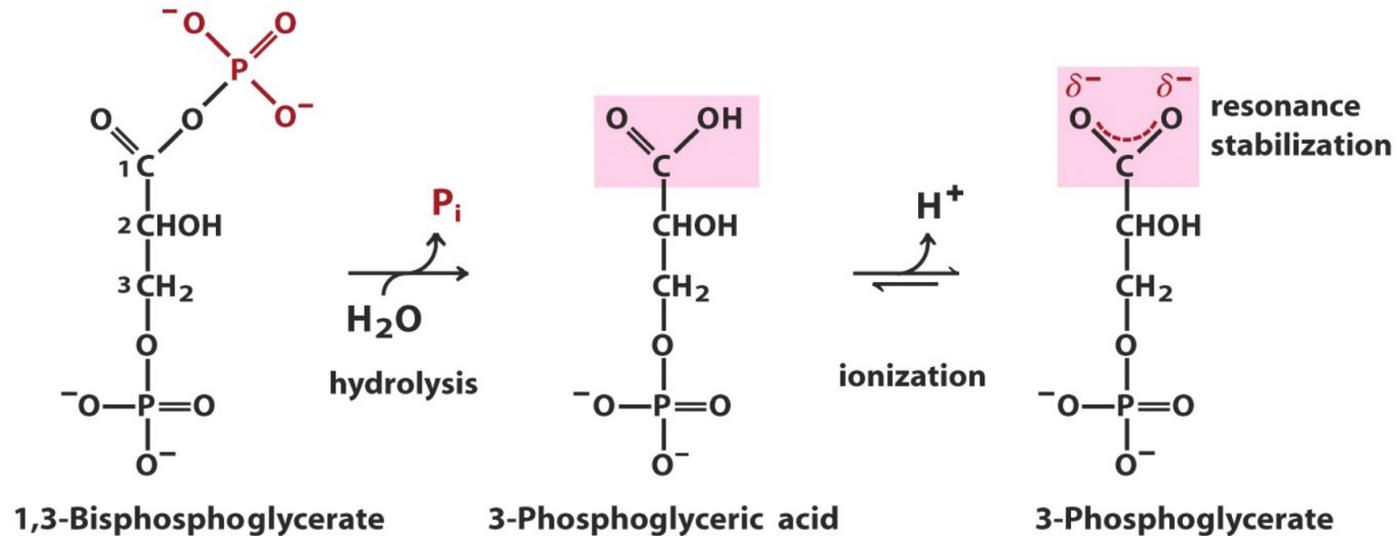
Composti fosforilati con energia libera di idrolisi molto elevata:

✓ Fosfoenolpiruvato



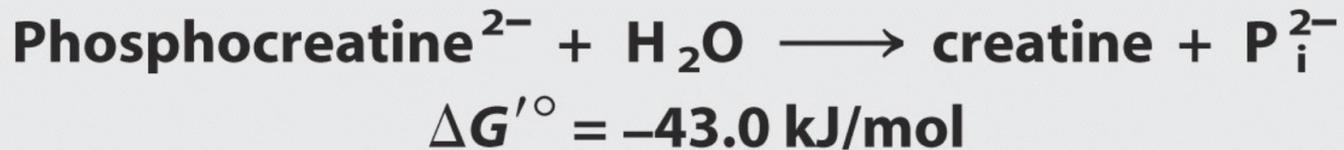
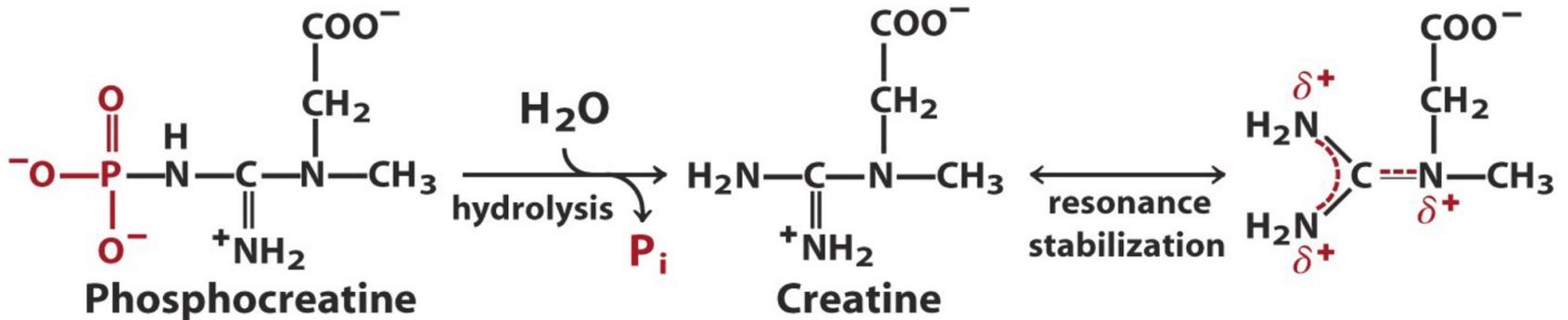
Idrolisi del fosfoenolpiruvato
favorita dalla tautomeria cheto-enolica

✓ 1,3-bifosfoglicerato

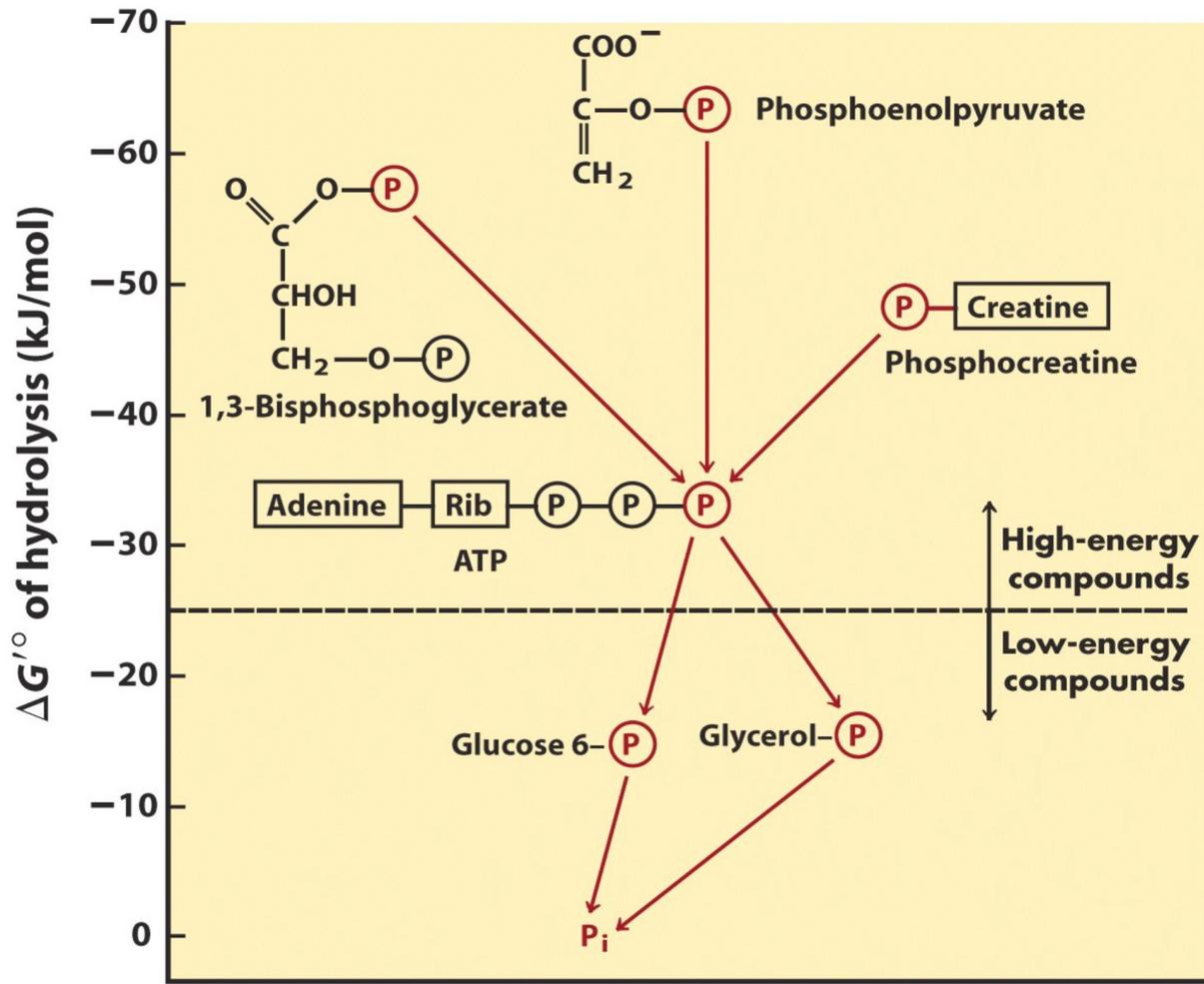


**Idrolisi dell' 1,3-bifosfoglicerato
favorita dalla stabilizzazione per risonanza**

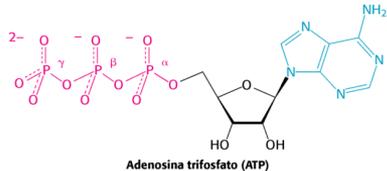
✓ Fosfocreatina

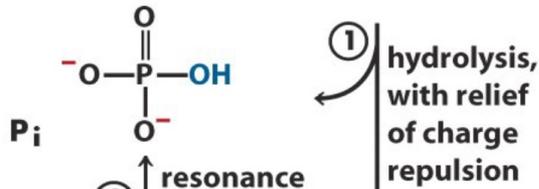
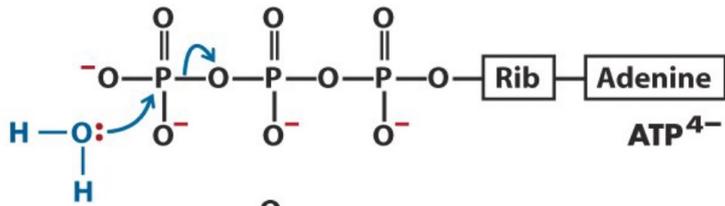


Idrolisi della fosfocreatina
favorita dalla stabilizzazione per risonanza

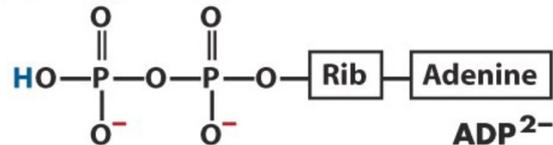
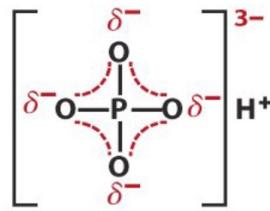


ATP è la molecola più abbondantemente distribuita in ogni forma di vita

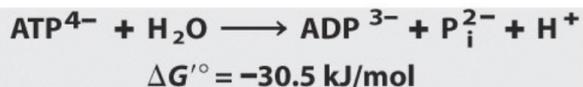
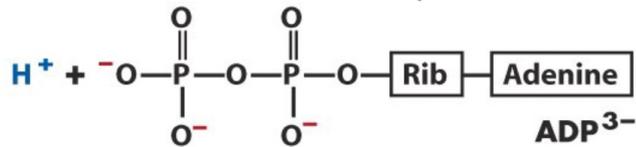




② resonance stabilization



③ ionization



BASI CHIMICHE DELL'ELEVATO VALORE DI ΔG ASSOCIATO ALL'IDROLISI DI ATP

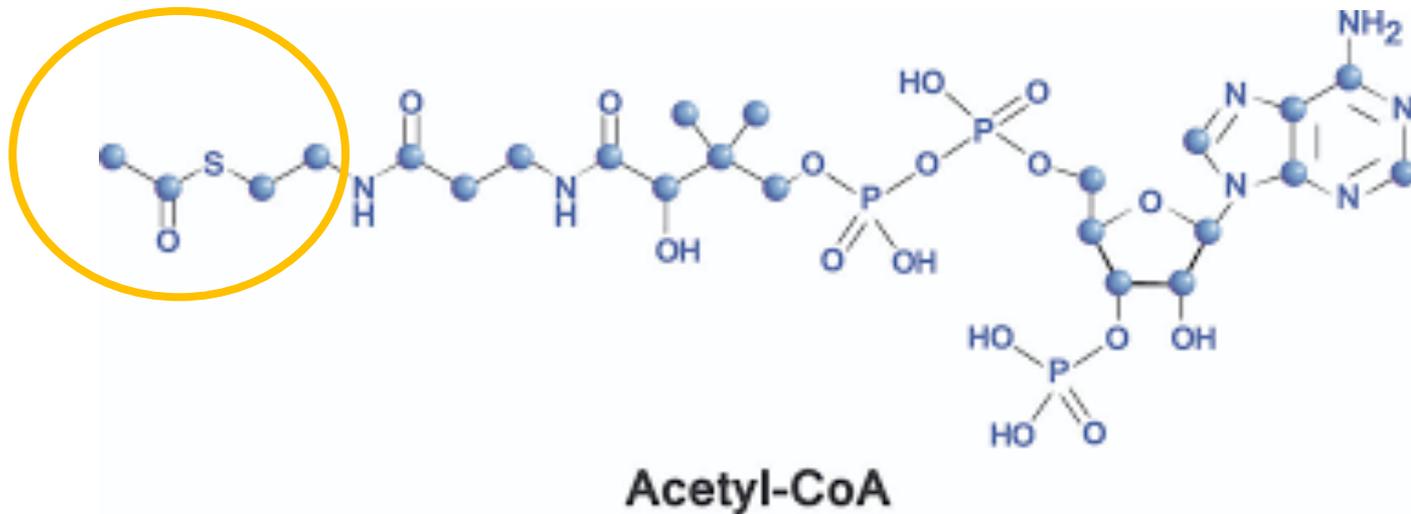
1) La repulsione elettrostatica tra le quattro cariche negative viene rimossa dalla separazione delle cariche conseguente all'idrolisi

2) P_i rilasciato viene stabilizzato dalla formazione di un ibrido di risonanza in cui ciascuno dei quattro legami P-O ha lo stesso grado di doppio legame e H⁺ non è sempre legato allo stesso O

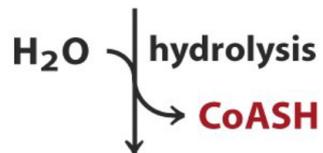
3) ADP²⁻ si ionizza immediatamente liberando H⁺

4) I prodotti hanno un maggior grado di solvatazione rispetto a ATP

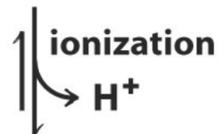
Altri composti utilizzati nel metabolismo come gruppi uscenti per attivare gli intermedi di reazione sono i **TIOALCOLI**, che attivano gli acidi carbossilici formando **TIOESTERI**.
Ne ricordi uno in particolare?



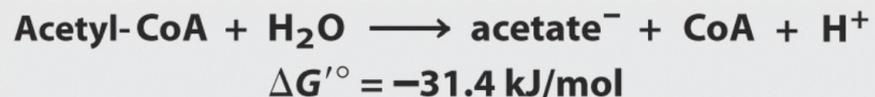
Alcuni tiesteri hanno energia libera di idrolisi molto elevata

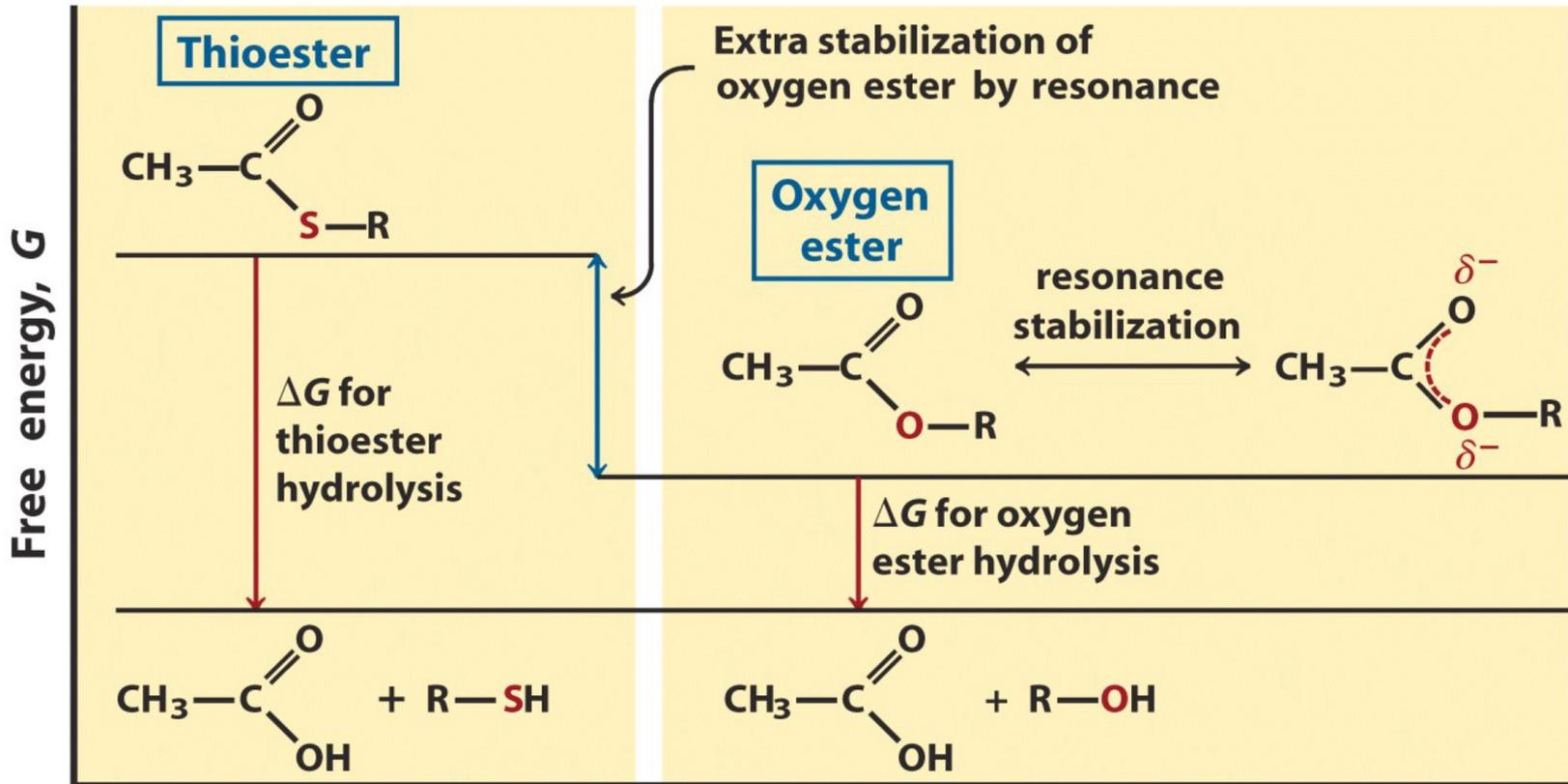


Idrolisi dell' acetil-CoA



resonance
stabilization





Nei tioesteri non vi sono stabilizzazioni per risonanza comparabili a quelle degli esteri normali

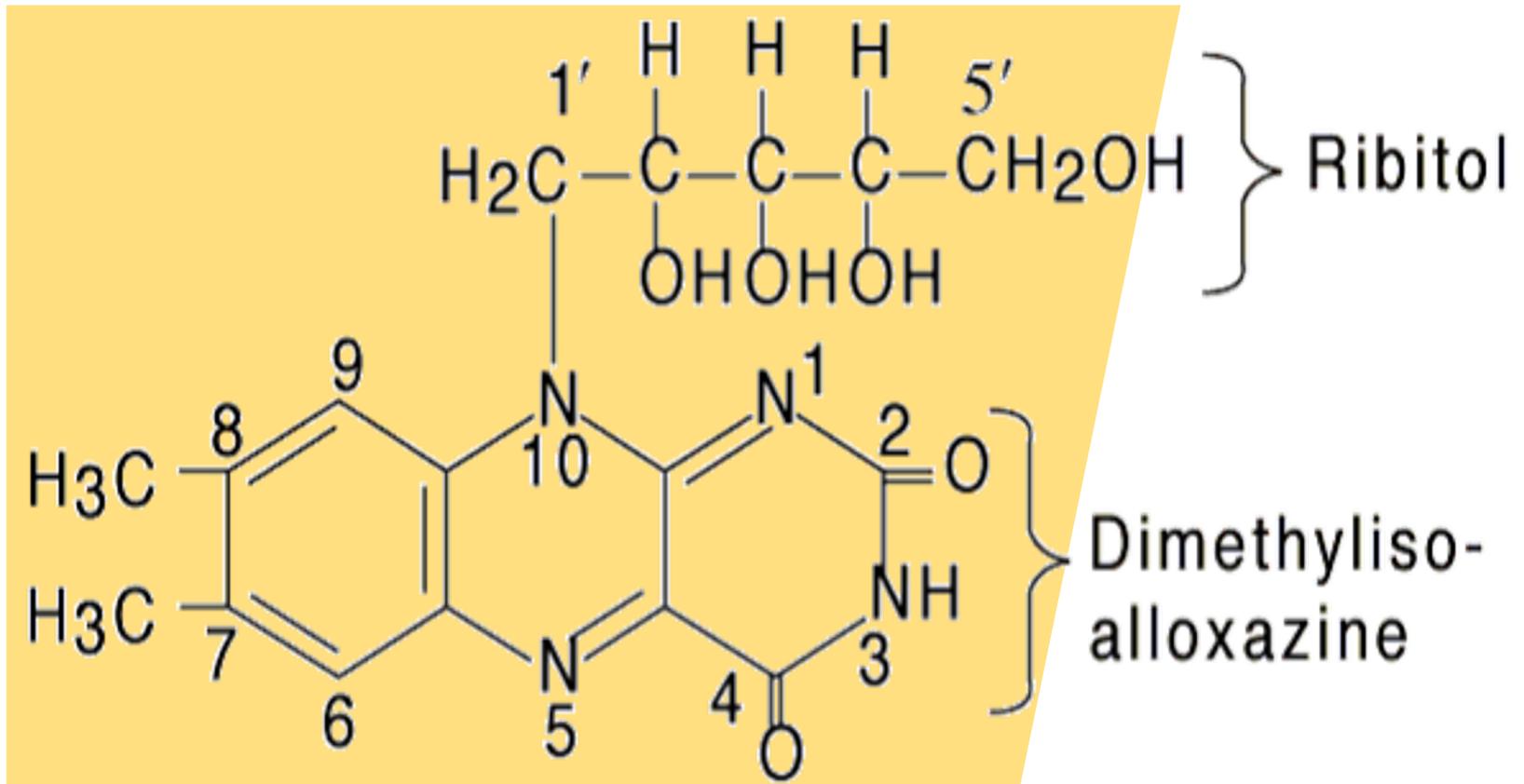
Nucleotidi come componenti di cofattori enzimatici

Così come esistono molecole ad alto potenziale di trasferimento del gruppo fosforico (ATP), ci sono molecole (coenzimi) **ad alto potenziale di trasferimento elettronico:**

FMN, FAD e NAD(P)

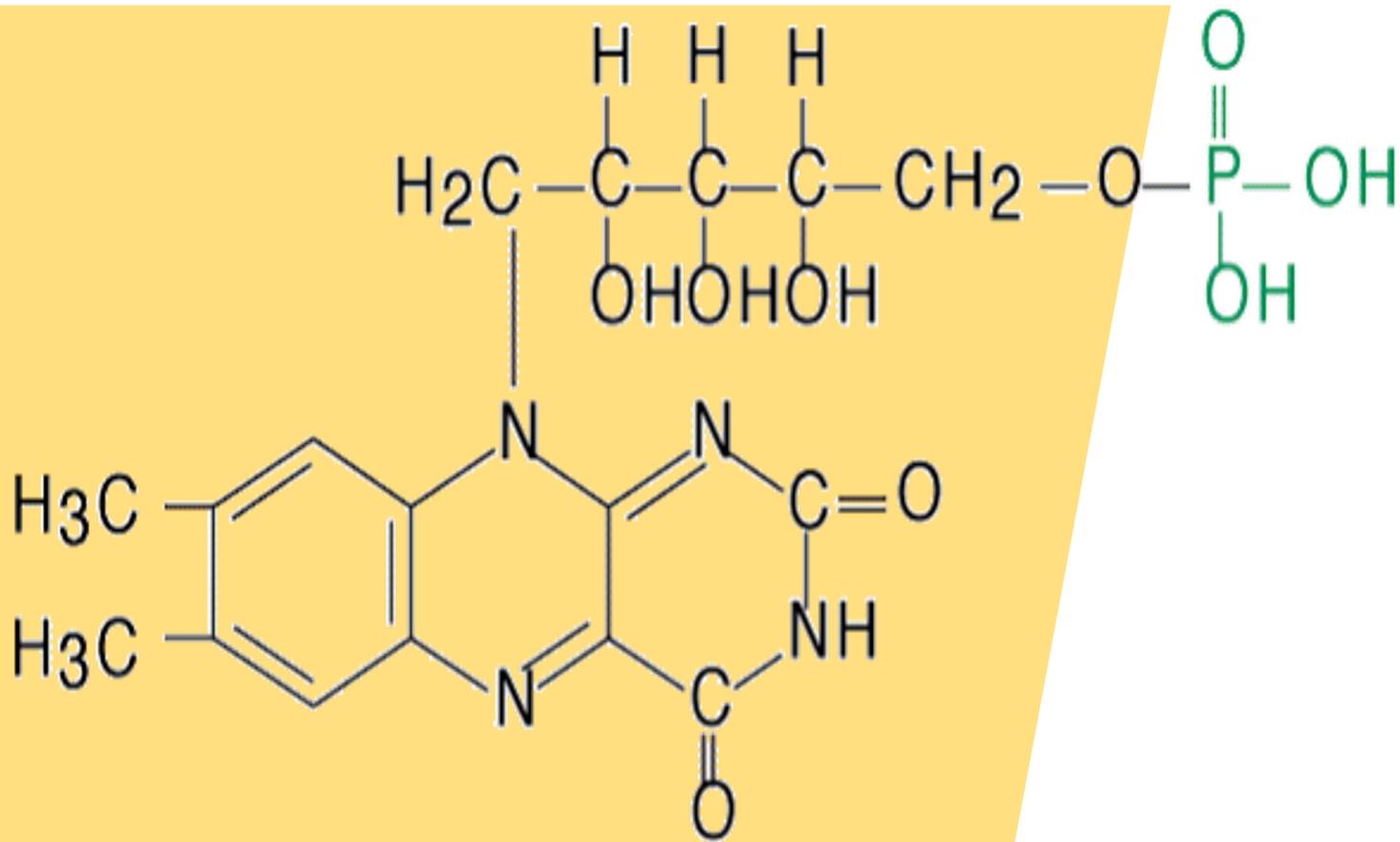
che hanno il ruolo di accettare e (ri)donare elettroni

Nucleotidi come componenti di cofattori enzimatici

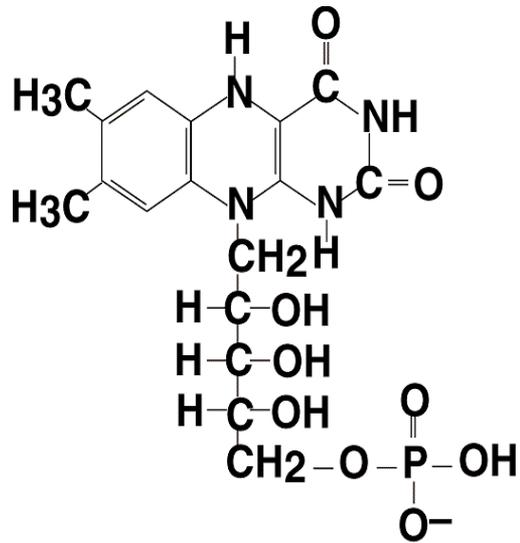


Riboflavin

Vitamina B2



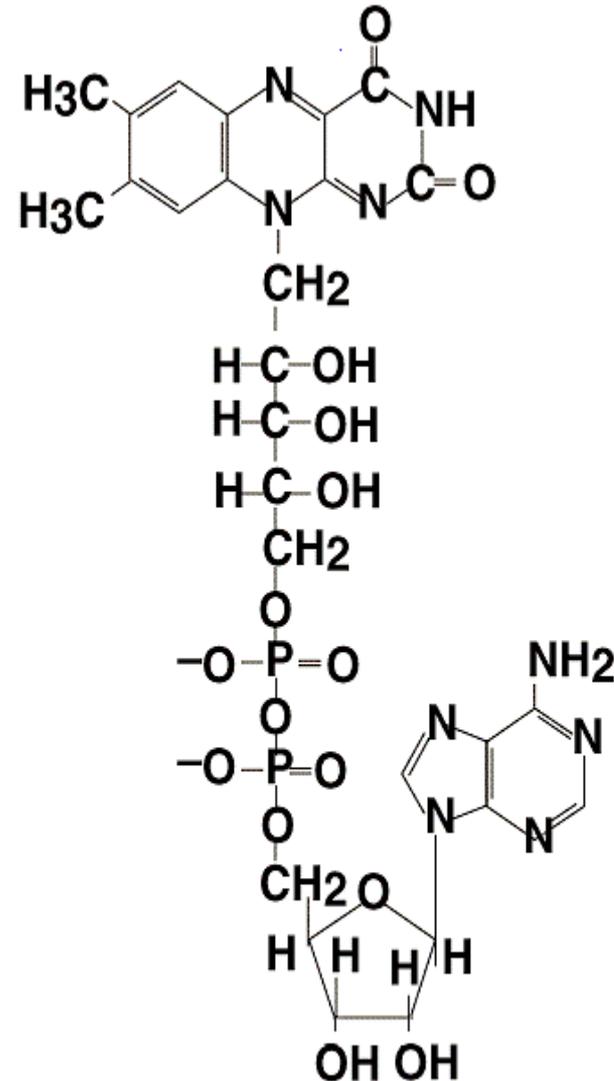
Flavin mononucleotide (FMN)



FMN

Flavinmononucleotide

Coenzimi fondamentali

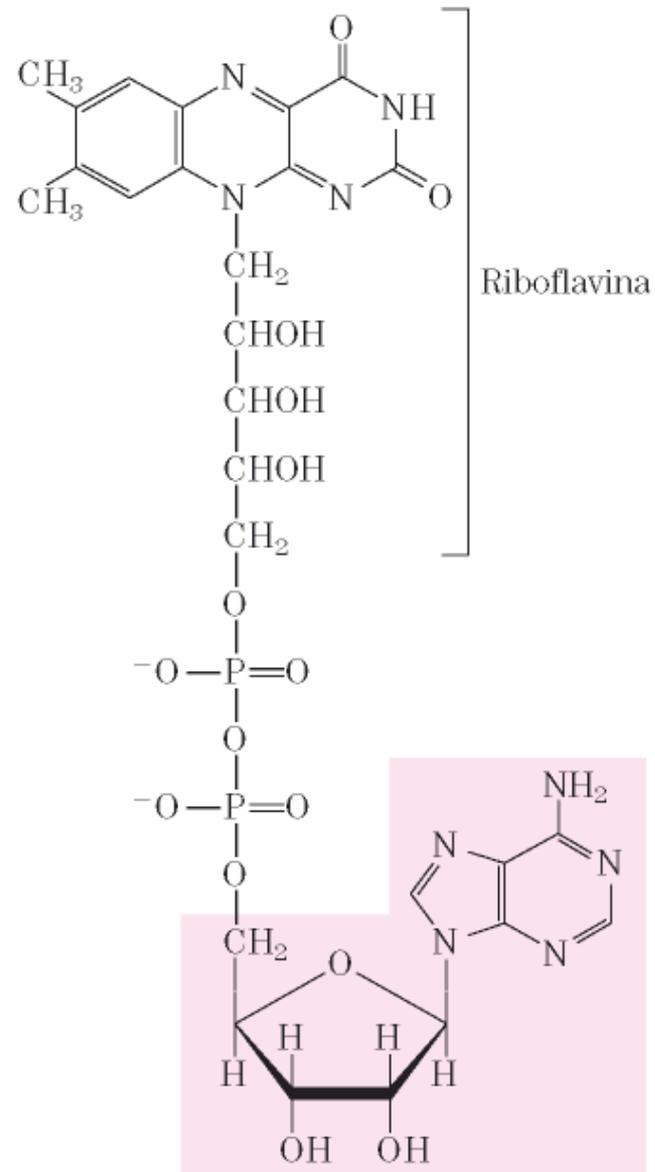


FAD

Flavindinucleotide

Nucleotidi come componenti di cofattori enzimatici

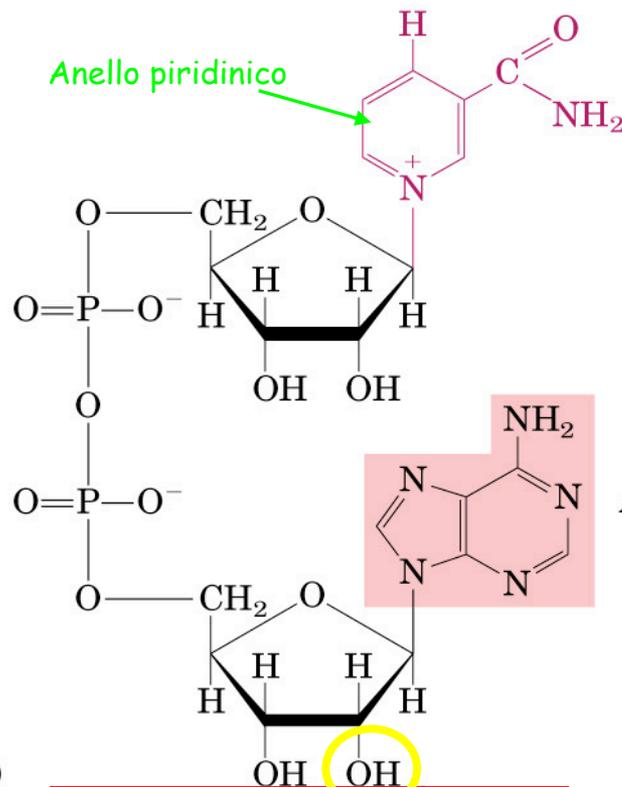
Il **FAD (Flavin Adenin Dinucleotide)** contiene il nucleotide ADP ed interviene nelle reazioni di ossidoriduzione per la sua capacità di trasferire elettroni



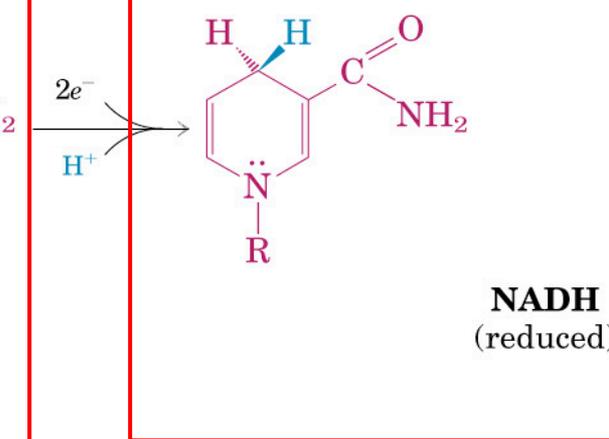
Flavin adenin dinucleotide (FAD)

NAD(P)

NAD e NADP sono **coenzimi che derivano dall'acido nicotinico** (Vit. B3 o PP)



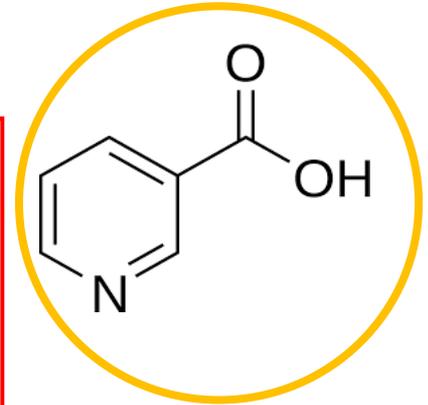
In NADP⁺ this hydroxyl group is esterified with phosphate.



Adenine

NAD(H):
Nicotinamide-Adenin-Dinucleotide

NADP(H):
Nicotinamide-Adenin-Dinucleotide Phosphate

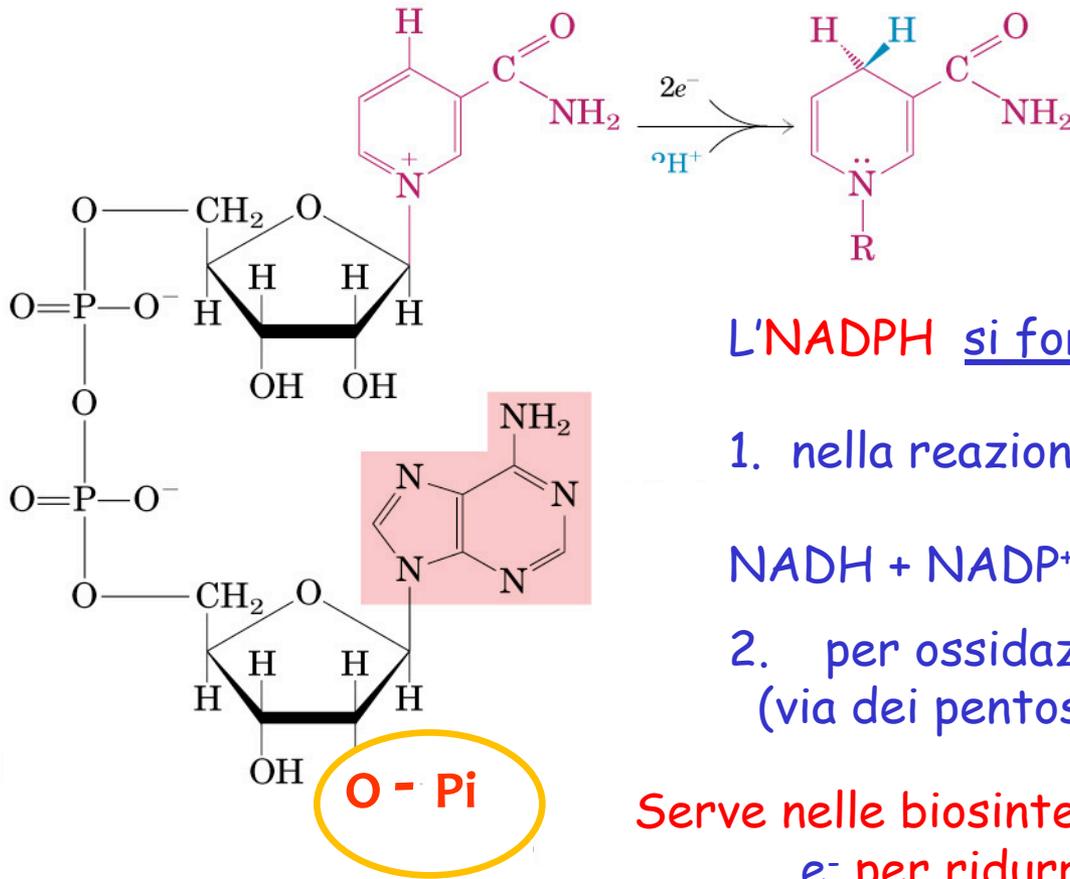


- Seppure con struttura molto simile ed eguale capacità di ossidarsi/ridursi,
il significato fisiologico dell' NAD(H) e dell' NADP(H) è diverso

NADH cede alla catena respiratoria mitocondriale gli elettroni acquistati nelle reazioni cataboliche ossidative,

NADPH serve principalmente nella biosintesi,
i.e. per ridurre i precursori delle macromolecole

- E' chiaro che gli enzimi che sfruttano l'una o l'altra molecola hanno siti di legame specifici tali per cui quelli ossidativi legano solo l' NAD(H) , quelli riduttivi solo l' NADP(H)



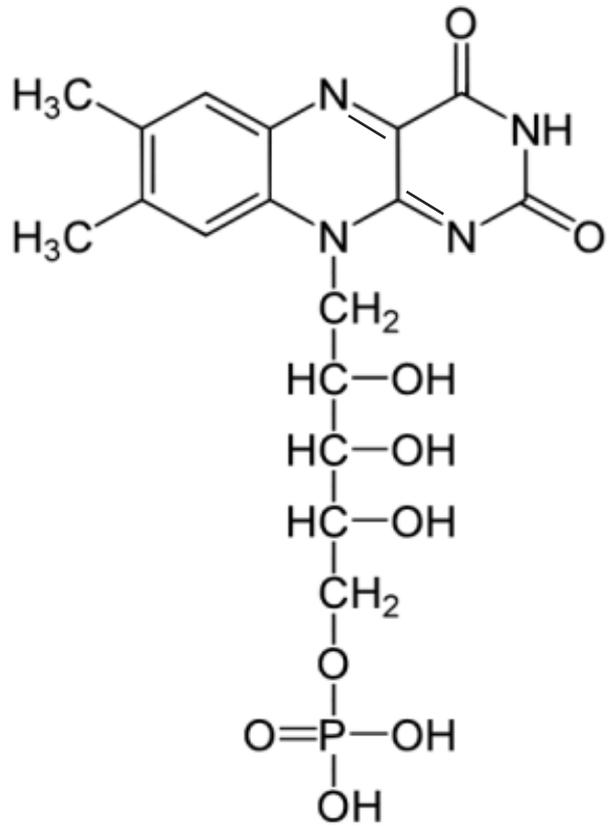
L'**NADPH** si forma:

1. nella reazione di transdeidrogenazione



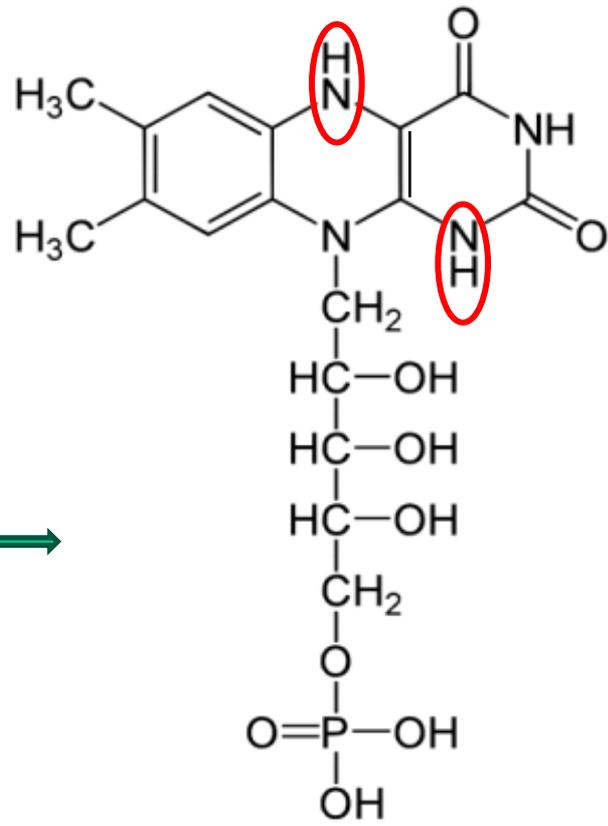
2. per ossidazione di un substrato
(via dei pentoso fosfati)

Serve nelle biosintesi dove, oltre all'ATP, servono e^- per ridurre i precursori ossidati



FMN

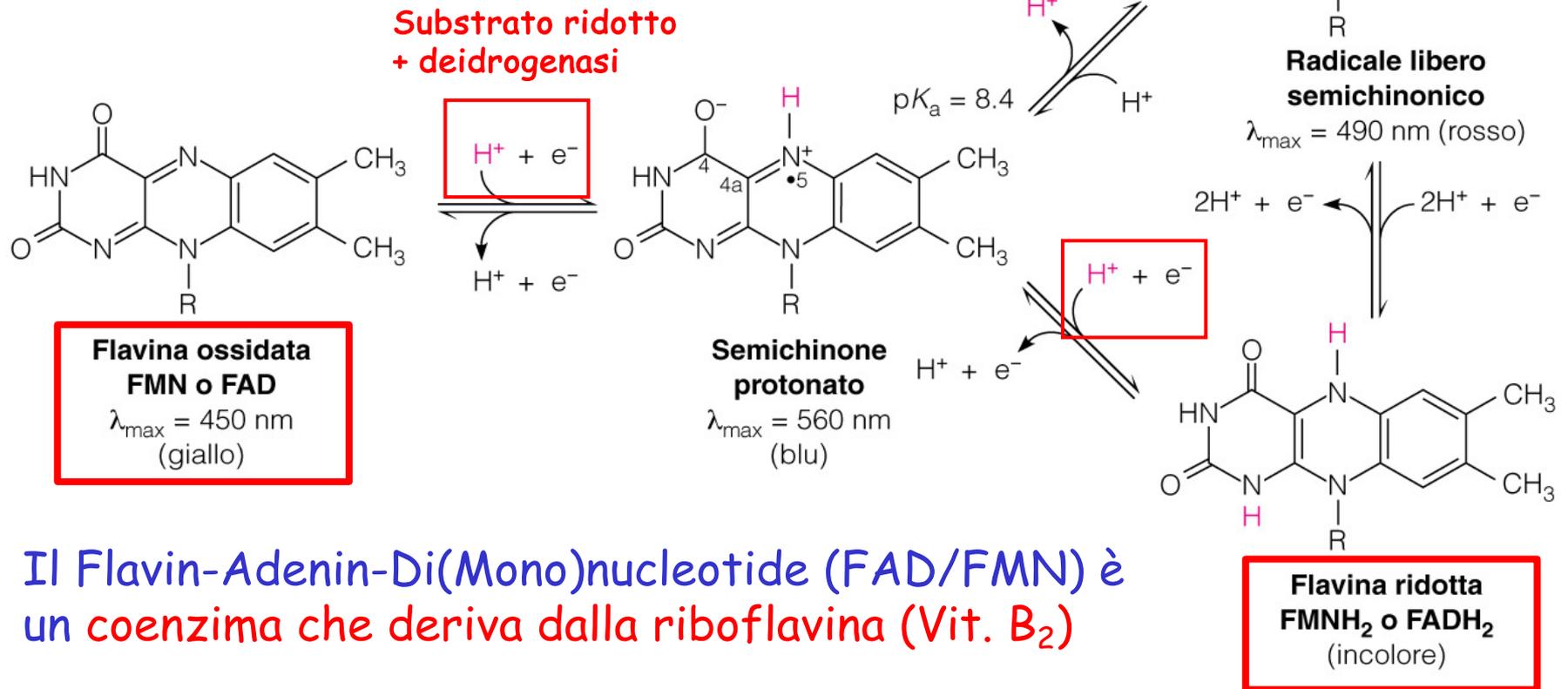
forma ossidata



FMN

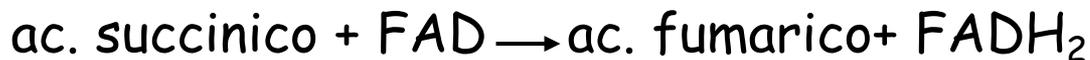
forma ridotta

FMN/FMNH₂ e FAD/FADH₂



Il Flavin-Adenin-Di(Mono)nucleotide (FAD/FMN) è un coenzima che deriva dalla riboflavina (Vit. B₂)

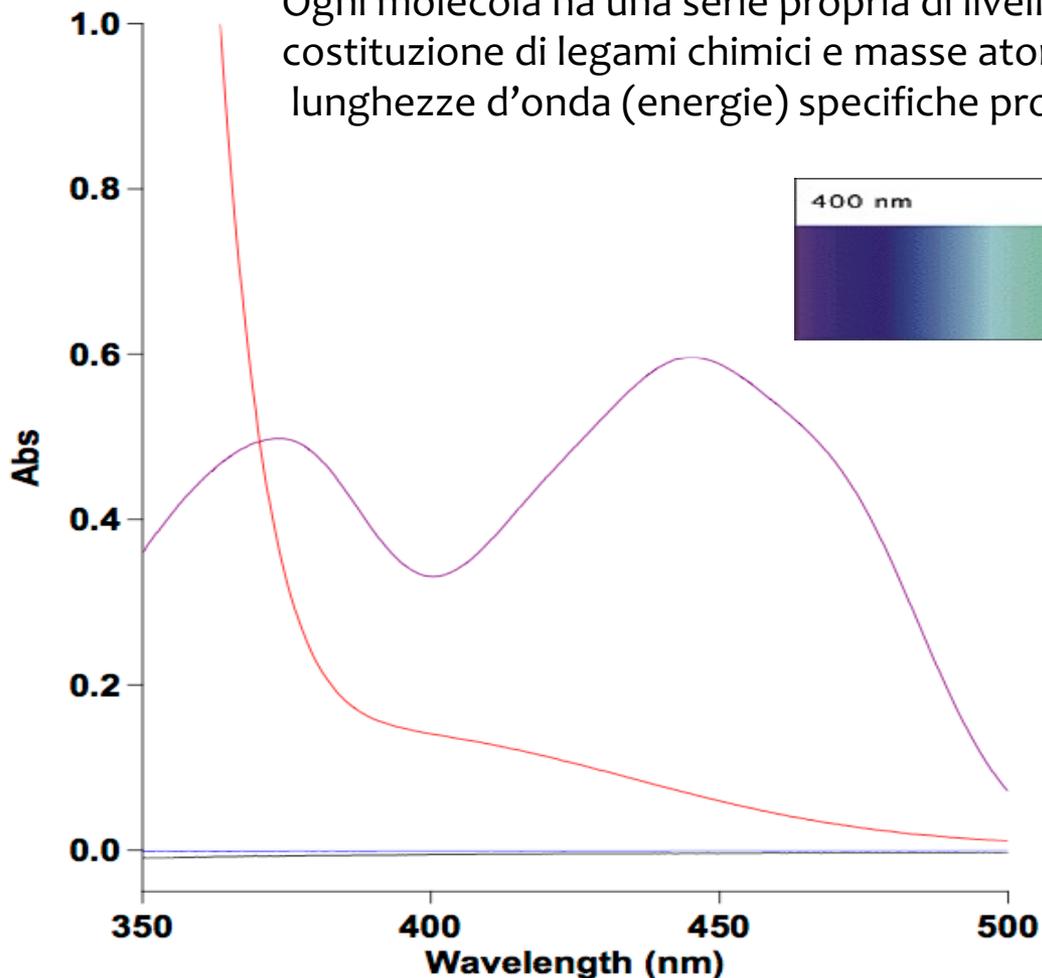
Il suo ruolo è:
accettare e⁻ dai substrati ridotti e cederli alla catena respiratoria



Spettrofotometria:

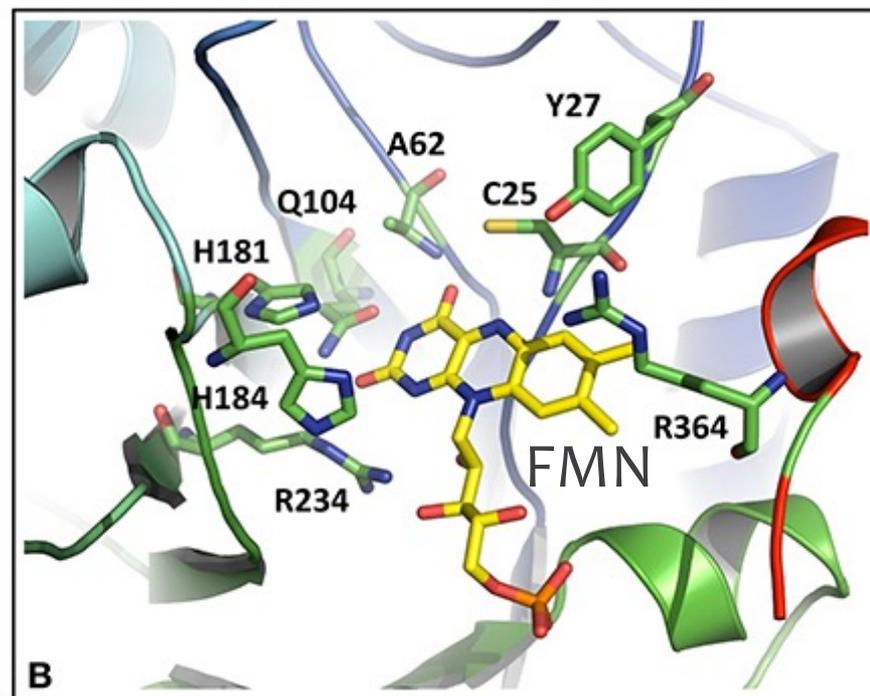
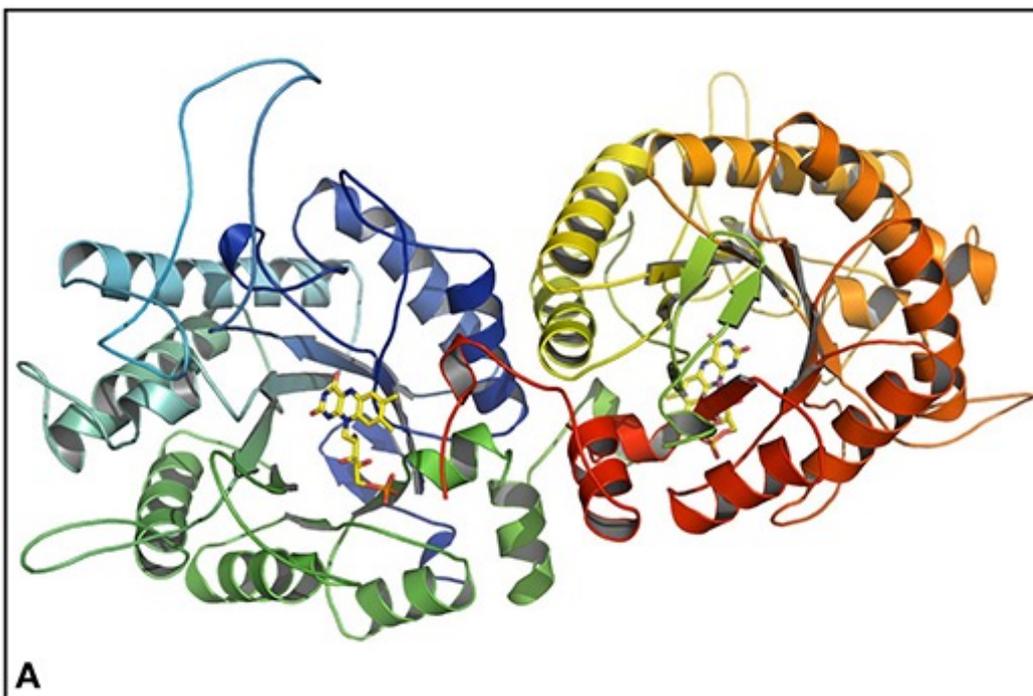
processo che determina la quantità di luce assorbita da composti colorati

Ogni molecola ha una serie propria di livelli di energia associati alla sua costituzione di legami chimici e masse atomiche, quindi assorbirà luce di lunghezze d'onda (energie) specifiche producendo qualità spettrali uniche

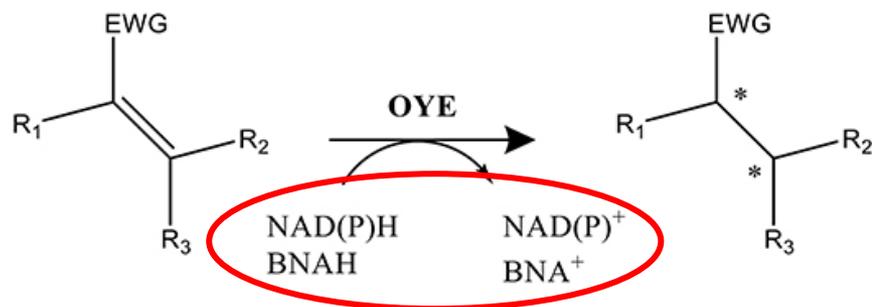


Spettro visibile FMN.

Fig: In viola la forma ossidata,
in rosso la forma ridotta



Gli enzimi OYE (chiamati proprio old yellow enzymes a causa del cofattore FMN che legano) catalizzano al riduzione stereoselettiva di alcheni α,β -insaturi generando idrocarburi con uno o due centri chirali (i prodotti sono utili come intermedi di sintesi):



Le cellule ossidano i composti ricchi di carbonio ridotto in diverse tappe che comprendono trasportatori specializzati di elettroni

FAD (flavina adenin dinucleotide)

NAD (nicotinammide adenin dinucleotide)

Gli elettroni passano dai diversi intermedi metabolici a trasportatori di elettroni specializzati (NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD) in reazioni catalizzate da enzimi. Questi trasportatori donano a loro volta gli elettroni ad accettori con un'alta affinità per gli elettroni.

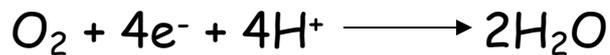
Nelle reazioni di ossido-riduzione (reazioni redox) insieme agli elettroni vengono trasferiti da una molecola all'altra anche uno o due protoni.



EQUIVALENTI RIDUCENTI

L' NAD^+ e l' FAD "raccolgono" gli elettroni in punti diversi del catabolismo e li "portano" alla catena respiratoria della membrana mitocondriale interna,

la cui attività, oltre a ridurre l'ossigeno,



permette il processo di fosforilazione ossidativa che porta alla sintesi di ATP

