

# 4. BIOSINTESIS DE DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS

---

# **ESQUEMA.** Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

---

## **1. Reducción de NDPs a dNDPs**

- Generalidades
- Estructura de la ribonucleótido reductasa en *E. coli*. (clase I)
- Mecanismo de reacción

## **2. Regulación coordinada de la reducción de NDPs → dNDPs**

## **3. Agentes antitumorales**

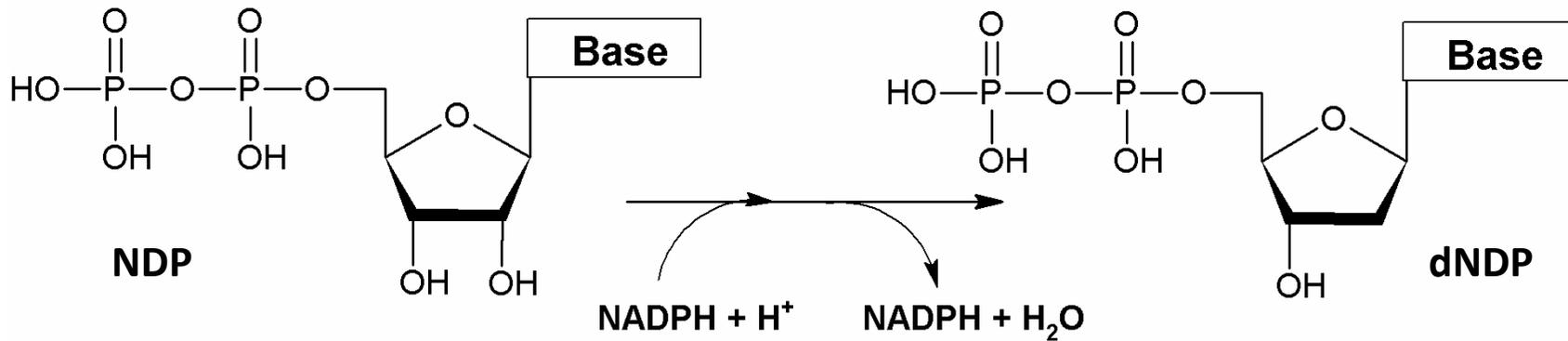
- 5'-FdUMP y antifolatos
- Inhibidores de la ribonucleótido reductasa

## **4. Alteraciones del metabolismo de desoxirribonucleótidos**

# GENERALIDADES (I)

---

Ecuación general  $\text{NDP} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{dNDP} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$



Enzimas: **Ribonucleótido reductasas**

## Generalidades (II)

---

### Características de la reacción de síntesis de dNDPs

Transformación de la ribosa en desoxirribosa

dNDPs imprescindibles para la síntesis de DNA

Precusores: **NDPs**

→ Reducción del C<sub>2</sub> de la ribosa-5difosfato en vez de síntesis *de novo* a partir de precursores con desoxirribosa

**Importancia evolutiva:** los NDPs son anteriores a los dNDPs

→ Una prueba más a favor de la hipótesis del “*mundo del RNA*”

**Mecanismo de reacción** muy parecido para todas las enzimas

**El grupo hidroxilo del C<sub>2</sub> de la ribosa es sustituido por un hidrógeno, utilizando un radical libre**

# Clases de Ribonucleótido reductasas

---

## Clase I

- Radical tirosilo estabilizado por un complejo binuclear de dos  $\text{Fe}^{3+}$  con un puente de oxígeno (grupo prostético)
- Requiere de  $\text{O}_2$  para su activación
- Presente en procariontes y en la mayoría de eucariontes (en la mayoría, excepto en algunos organismos unicelulares)

## Clase II

- Cofactor  $\text{B}_{12}$  (5'-desoxiadenosilcobalamina) – coenzima B12
- Presente en procariontes

## Clase III

- Grupo de coordinación [3Fe-4S] o [4Fe-4S]
- Requieren de S-adenosilmetionina (SAM) y NADPH
- Sensible al  $\text{O}_2$  → solo está presente en procariontes anaeróbicos

(**Clase IV**: complejo binuclear de Mn similar al de las enzimas de clase I)

# Estructura de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* –clase I- (I)

---

## Tetramero $\alpha_2\beta_2$

R1 –  $\alpha_2$  (761  $\alpha\alpha$  y 172 KDa) & R2 –  $\beta_2$  (375  $\alpha\alpha$  y 78 KDa)

2 homodímeros catalíticos inactivos *per se*

→ **Los dos centros activos del tetramero se localizan en la interfaz entre las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$**

## Subunidad $\alpha$ (R1)

**Sitio de unión** al sustrato: ADP, GDP, UDP, CDP

## 5 Cys reactivas

- residuo catalítico: radical tiilo (-S·) de la Cys<sup>439</sup>
- grupos tioles con actividad redox: Cys<sup>225</sup> & Cys<sup>462</sup>, Cys<sup>754</sup> & Cys<sup>759</sup>

## 3 sitios independientes de unión a efectores alostéricos

- Control de la actividad catalítica: ATP, dATP
- Control de la especificidad de sustrato: ATP, dATP, dGTP, dTTP
- Sitio de hexamerización: ATP

## Estructura de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* -clase I- (II)

---

### Subunidad $\beta$ (R2)

**Grupo prostético binuclear con dos átomos de  $\text{Fe}^{3+}$**  (no hemo) unidos entre sí por un anión  $\text{O}^{2-}$  (puente  $\mu$ -oxo)  $\text{Fe}^{3+}\text{-----O}\text{-----Fe}^{3+}$

**Función:** estabilización del radical tirosilo

El grupo prostético Fe presenta una **coordinación octaédrica** con átomos de las siguientes moléculas:

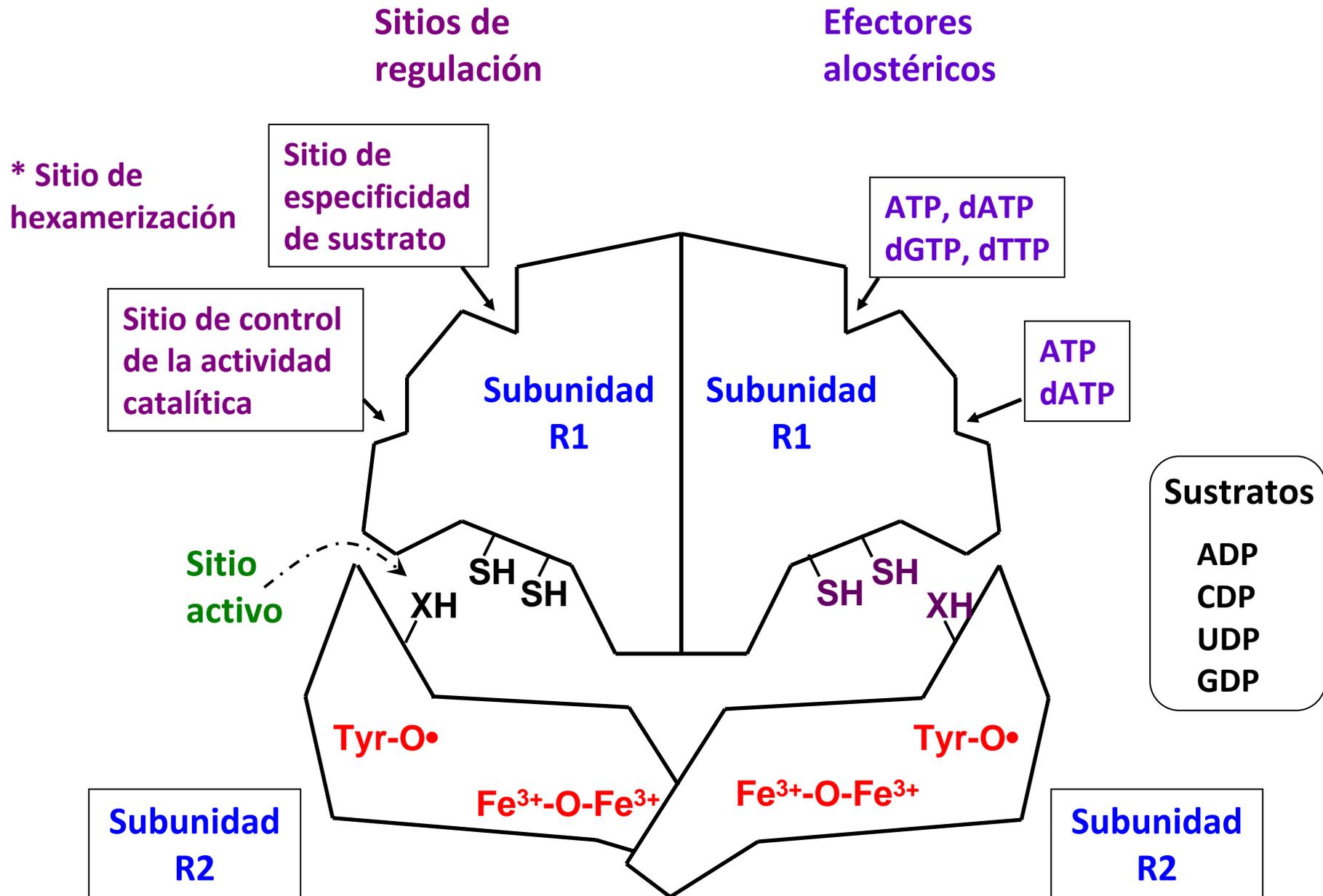
- El grupo binuclear está coordinado con el carboxilo del  $\text{Glu}^{115}$
- Cada uno de los  $\text{Fe}^{3+}$  también está coordinado con un residuo de  $\text{Asp}^{84}$  o  $\text{Glu}^{204}/\text{Glu}^{238}$  (= 2  $\text{Q}^-$ )  
N $\delta$  de  $\text{His}^{118/241}$   
una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$

### **Tyr<sup>122</sup>: radical tirosilo ó fenóxido (-O-)**

Interacciona con uno de los Fe

Se localiza en el interior de la proteína: no interacciona con el solvente ni reacciona con otros grupos laterales susceptibles de ser oxidados

# Estructura de la ribonucleótido reductasa de *E. coli* -clase I- (III)



# Mecanismo de reacción de la ribonucleotido reductasa (I)

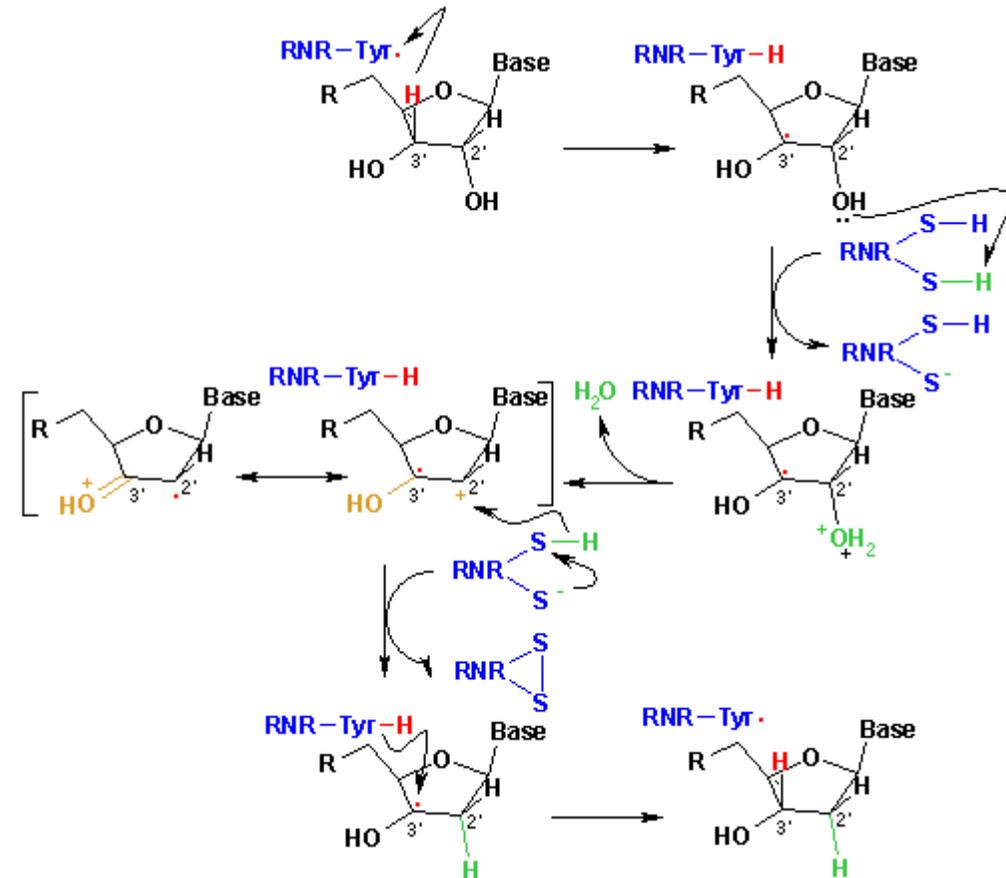
## Reacción global

El grupo hidroxilo (-OH) del C<sub>2</sub>' de la ribosa es sustituido por un hidrógeno, utilizando un radical libre

## Mecanismo

Muy parecido para todas las clases de ribonucleotido reductasas

Transferencia transitoria de las propiedades del radical desde la enzima al sustrato



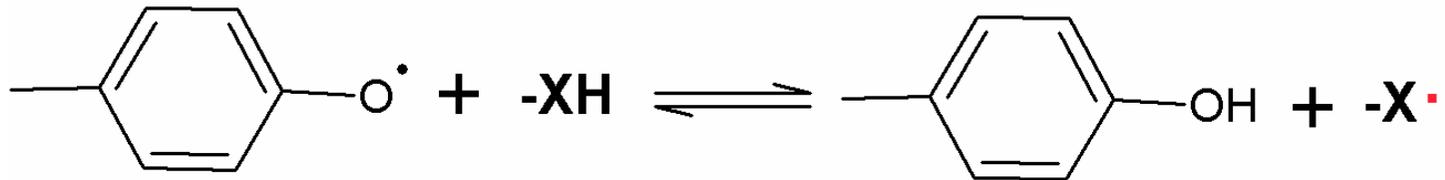
Fuente de la imagen

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

## Mecanismo de reacción de la ribonucleotido reductasa (II)

---

### 1. Generación de un radical libre cercano al sustrato (NDP)



### 2. El radical tirosilo sustrae un H• del carbono C<sub>3'</sub> de la ribosa



### 3. Protonación del -OH de C<sub>2'</sub> de la ribosa a partir de uno de los grupos tiol



## Mecanismo de reacción de la ribonucleotido reductasa (III)

---

3. El grupo  $\text{-OH}_2^+$  del  $\text{C}_2'$ , se libera como  $\text{H}_2\text{O}$ , quedando el  $\text{C}_2'^+$



El intermediario radical-cación está estabilizado por resonancia

4. Reducción del catión ribosa- $\text{C}_2'^+$  por la cesión de un  $\text{H}\cdot$  del grupo sulfhidrilo



5. El radical sustrae el  $\text{H}\cdot$  del grupo tirosilo que previamente había sido sustraído



La enzima recupera su estado inicial con el radical tirosilo libre, pero es necesario reducir el puente disulfuro

→ **Producto final: dNDP**

## Consideraciones (I)

---

### 1. El radical tirosilo no puede extraer directamente el hidrógeno de la ribosa,

ya que está muy alejado

- Es el radical tiilo de la Cys<sup>439</sup> (E-Cys-S·) de la subunidad R1 el que lo hace
- Posteriormente se produce una transferencia de electrones con el radical tirosilo
- Actualmente se considera que existen otros residuos fenólicos de Tyr de R1 que intervienen en la transferencia de e<sup>-</sup> entre el grupo tiilo y el tirosilo

### 2. Cadena de reducciones de grupos tiol de Cys

- Las Cys<sup>225</sup> & Cys<sup>462</sup> son las que reducen el sustrato
- Posteriormente, los grupos sulfhidrilo se regeneran al intercambiar equivalentes redox con las Cys<sup>754</sup> & Cys<sup>759</sup>

**Razón:** dichas Cys están mejor localizadas para aceptar equivalentes redox de agentes reductores externos

### 3. Posteriormente: **Fosforilación dNDPs → dNTPs** **Nucleósido difosfato kinasa**

## Consideraciones (II)

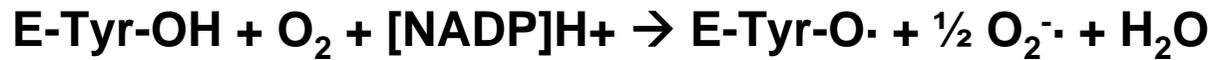
---

### 4. Generación del radical tirosilo de la ribonucleótido reductasa

- Requerimiento de  $O_2$  y de cuatro proteínas

- Reacción en 4 pasos:

I. Generación del radical tirosilo; también se genera  $O_2^{\cdot-}$  (anión superóxido)



**Enzima: NAD(P)H: Flavin-oxidorreductasa**

II.  $2 O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$       **Enzima: Superóxido dismutasa (SOD)**

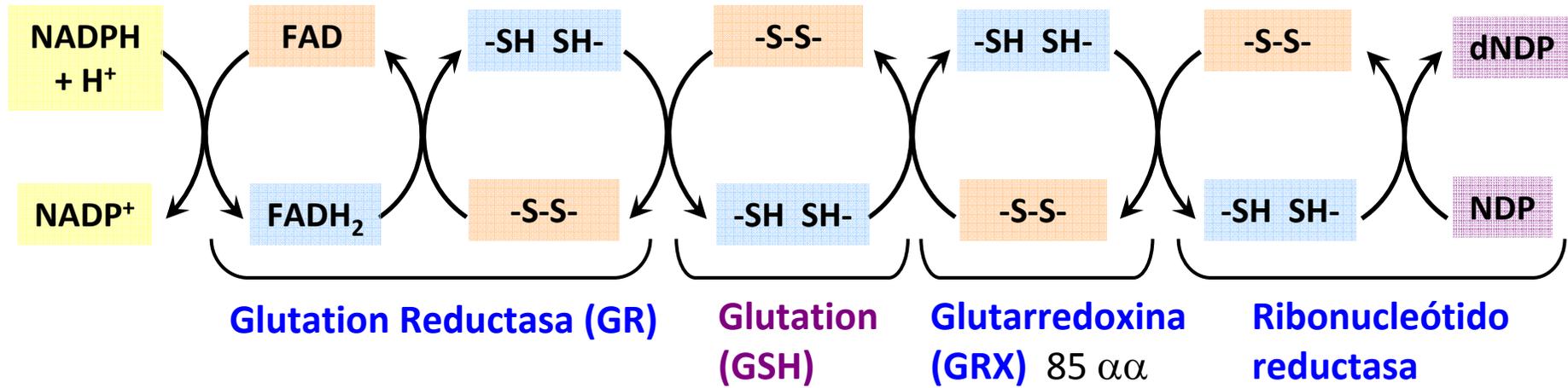
III.  $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$       **Enzima: Catalasa**

IV. Proteína desconocida cuya función puede ser reemplazada por  $Fe^{2+}$  *in vitro*

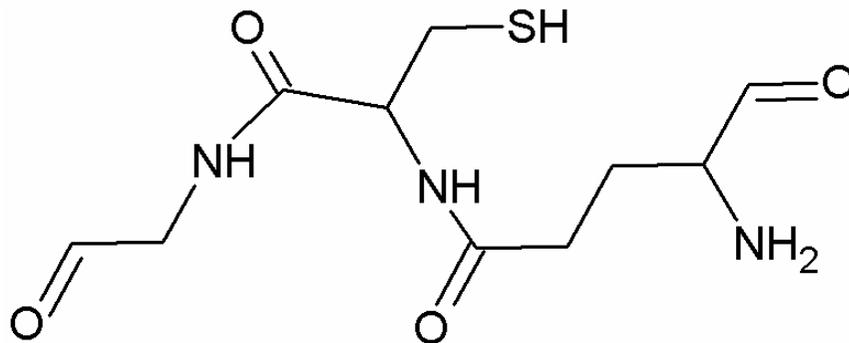


## Reducción de la ribonucleótido reductasa: reacción alternativa (II)

Alternativa a la tiorredoxina: Cadena de cesión de equivalentes redox



Glutation (GSH:  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly)



# REGULACION DE LA RIBONUCLEOTIDO REDUCTASA (I)

---

## Importancia

- Síntesis controlada de dNTPs: sólo cuando sea necesario

Ejemplo: durante la proliferación celular

- **Síntesis coordinada** de los 4 dNTPs

La ausencia de un dNTP es letal

El imbalance entre los distintos dNTPs aumenta la probabilidad de mutaciones

## Retroalimentación negativa

**Regulación** por la unión de efectores alostéricos en el sitio que controla la **actividad global**

1. En **ausencia** de **efectores alostéricos**, la enzima es **inactiva**
2. **+ ATP**: aumento de la actividad RNR hacia el sustrato determinado por el sitio de regulación de la especificidad de sustrato
  - **dATP**: inhibe completamente la actividad enzimática

## Regulación de la ribonucleótido reductasa (II)

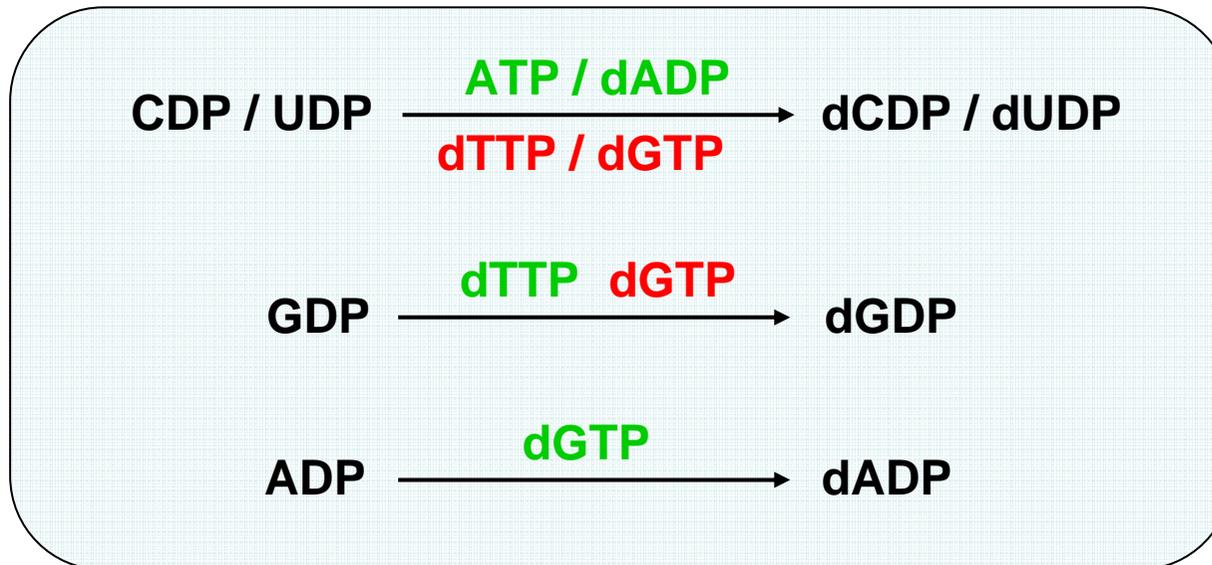
---

**Regulación** por la unión de efectores alostéricos al sitio que controla la **especificidad de sustrato**

Unión de **ATP / dADP**: + reducción de **CDP y UDP (Pir)**

**dTTP**: + **GDP** & - **CDP & UDP**

**dGTP**: + **ADP** & - **CDP, UDP & GDP**



**Balance entre dCTP & dTTP**

$\text{dCMP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{dUMP} + \text{NH}_4^+$  **dCMP desaminasa** (Control + **dCTP** & - **dTTP**)

## Regulación de la ribonucleótido reductasa (III)

---

### Secuencia de reducciones y coordinación

1. **ATP** estimula la producción de **dUDP & dCDP (Pir)**  $dUDP \rightarrow dTTP$
2. **dTTP** inhibe la producción de dUDP & dCDP (Pir)  
estimula la producción de **dGDP**
3. **dGTP** inhibe la producción de dCDP, dUDP (Pir) & dGDP  
estimula la producción de **dADP**
4. **dATP** inhibe toda actividad enzimática  
(hasta que la [ATP] es mayor y lo desplaza del sitio de unión)

**ATP: + Pir**

**GTP: + dADP**  
**- dGDP, Pir**

**dTTP: - Pir**  
**+ dGDP**

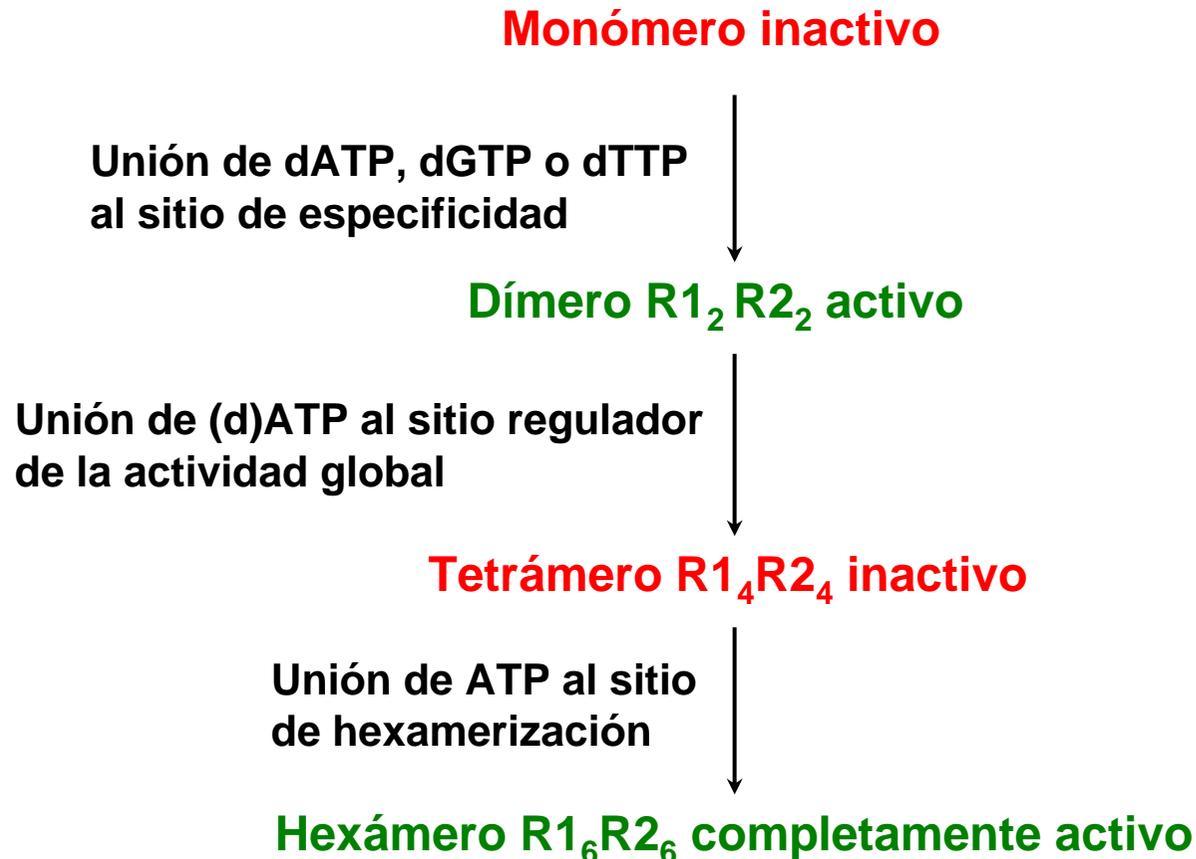
## Regulación de la ribonucleótido reductasa (IV)

---

### Regulación por oligomerización

Cuando el ATP se une al sitio de oligomerización, se forman hexámeros catalíticamente activos

→ La actividad catalítica depende del estado de oligomerización



## Agentes antitumorales: Inhibidores de la ribonucleótido reductasa (I)

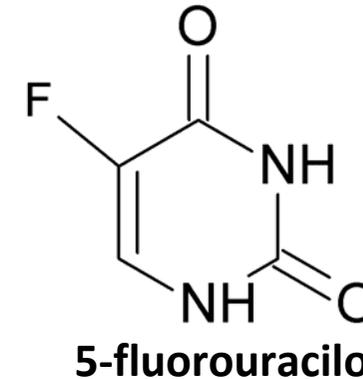
---

### 5'-FdUMP y antifolatos

(ver “Síntesis de nucleótidos pirimidínicos”)

No inhibe la RNR sino la timidilato sintasa

→ bloqueo de la síntesis de dTTP



### La RNR participa en la síntesis de 5'-FdUMP a partir del 5-fluorouracilo

5-FU → FUMP Enzima: Pirimidina fosforribosil transferasa

**FUMP → FUDP → FdUDP → FdUTP → FdUMP**

### Hidroxiurea (hidroxicarbamida)

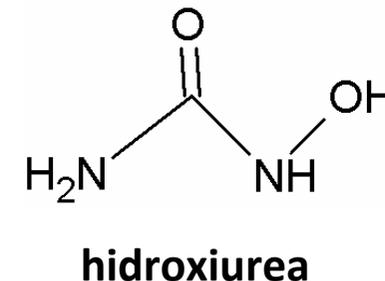
Destruye el radical tirosilo

Utilizado como agente anticanceroso (leucemias y enfermedades mieloproliferativas)

Administración oral

Puede aparecer resistencia por aumento de la enzima

por disminución de su afinidad por el inhibidor



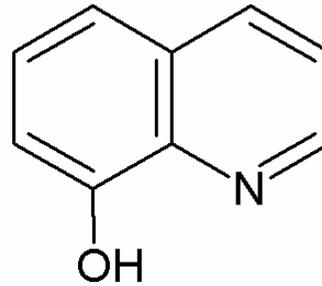
## Agentes antitumorales: Inhibidores de la ribonucleótido reductasa (II)

---

### 8-hidroxiquinolina

Quelante de  $\text{Fe}^{3+}$

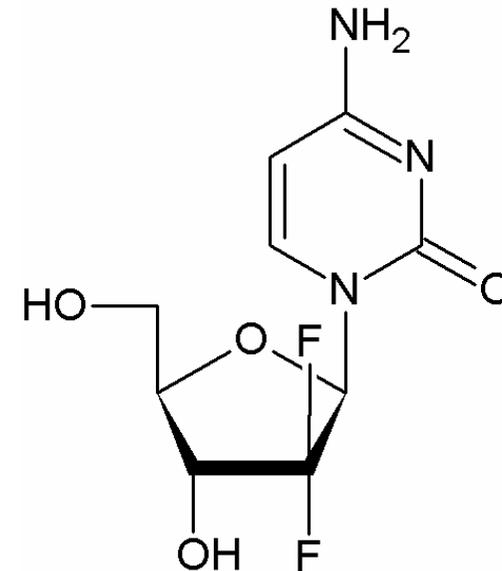
Antiséptico y desinfectante



hidroxiquinolina

### Gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicitidina)

- Análogo de la citidina: los dos hidrógenos del  $\text{C}_{2'}$  de la ribosa han sido sustituidos por flúor
- Utilizado en la quimioterapia de carcinoma pulmonar de células grandes.



gemcitabina

# Alteraciones del metabolismo de desoxinucleótidos

---

## Deficiencia en ADA (Adenosina desaminasa)

### SCID: Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada

Leucemia que puede ser letal en la infancia si no es tratada de manera adecuada (niños burbuja)

→ la muerte suele ser causada por infecciones oportunistas

- Mutaciones que afectan al sitio activo de ADA

- No se produce la transformación **adenosina + H<sub>2</sub>O → inosina + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>**  
(catabolismo de las purinas)

**Mecanismo:** en ausencia de actividad ADA, la adenosina se recapta

**dADP → dATP → Inhibición de la ribonucleótido reductasa**

→ Se inhibe la síntesis de otros dNTPs → ↓ síntesis de DNA → ↓ **proliferación**

El tejido linfoide (linfocitos T y B) es el principal afectado

Causa: altos niveles de proliferación

alta actividad de fosforilación de dADP

# Tratamiento de la deficiencia en ADA

---

## El tratamiento con inyección de ADA no es efectivo

Causa: El ADA se metaboliza rápidamente por vía hepática

## Tratamientos alternativos

1. **PEG-ADA**: se mantiene en sangre durante 1-2 semanas
2. Transplante de médula en niños
3. **Pentostatina**: análogo de purinas y potente inhibidor de la ADA  
Empleada para el tratamiento de algunas leucemias y linfomas

## 4. **Terapia génica**

- Método:
1. Extraer los linfocitos del paciente
  2. Sustituir el gen mutado por el salvaje
  3. Reinyectar los linfocitos transgénicos en el paciente

Los linfocitos transgénicos tienen una vida media de 2-3 meses

***La deficiencia en ADA ha sido una de las primeras enfermedades que ha sido tratada exitosamente con terapia génica***