

# Metabolizam nukleotida kao meta lijekova

---

**Peranić, Nikolina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:773670>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**Kemijski odsjek**

Nikolina Peranić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Metabolizam nukleotida kao meta lijekova**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Zagreb, 2018. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Morana Dulić

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>II</b>
<b>2.1. Sinteza nukleotida <i>de novo</i> .....</b>	<b>ii</b>
2.1.1. Sinteza purina .....	ii
2.1.2. Sinteza pirimidina .....	ix
2.1.3. Regulacija sinteze nukleotida.....	xii
<b>2.2. Sinteza putevima „spasavanja“ .....</b>	<b>xiv</b>
<b>2.3. Sinteza deoksiribonukleotida .....</b>	<b>xv</b>
2.3.1. Nastajanje timina .....	xvii
<b>2.4. Razgradnja nukleotida .....</b>	<b>xviii</b>
2.4.1. Razgradnja purina .....	xviii
2.4.2. Razgradnja pirimidina .....	xx
<b>2.5. Lijekovi koji ciljaju metabolizam nukleotida.....</b>	<b>xxii</b>
2.5.1. Alopurinol .....	xxii
2.5.2. Metotreksat.....	xxiii
2.5.3. 5-Fluorouracil.....	xxv
2.5.4. 6-Merkaptopurin .....	xxvii
2.5.5. Aminopterin.....	xxviii
2.5.6. Dideoksiadenozin.....	xxix
2.5.7. Aciklovir.....	xxx
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXXI</b>



## § Sažetak

Nukleotidi su molekule koje u metabolizmu stanice imaju mnogo različitih uloga: energetska valuta stanice, sekundarni glasnici u staničnoj komunikaciji, građevne jedinice deoksiribonukleinske (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA) te mnogih enzimskih kofaktora, itd. Sinteza nukleotida se odvija u svim tkivima i može u potpunosti zadovoljiti sve potrebe organizma, odnosno ne trebamo dodatno nukleotide unositi prehranom. Nukleinske kiseline unesene prehranom, visokom se efikasnošću razgrađuju na nukleotide. Putevi razgradnje staničnih nukleotida preklapaju se s putevima razgradnje nukleotida unesenih prehranom. Intermedijeri razgradnje nukleotida i nukleinskih kiselina mogu ući u puteve „spašavanja“ odnosno mogu se sintetizirati u nove nukleotide. Spomenuti način jedan je od načina na koji nastaju nukleotidi, a drugi je sinteza *de novo* kojom iz nekoliko važnih prekursora nastaju purinske i pirimidinske baze. Razgradnja spomenutih baza odvija se na nekoliko načina te završava s različitim produktima ovisno o organizmu. Budući da dostupnost nukleotida u stanici utječe na sintezu nukleinskih kiselina, biosintetski i biorazgradni putevi nukleotida česta su meta mnogih lijekova koji se koriste kao kemoterapeutici. Koraci u sintezi i razgradnji nukleotida meta su i mnogih antivirusnih lijekova.



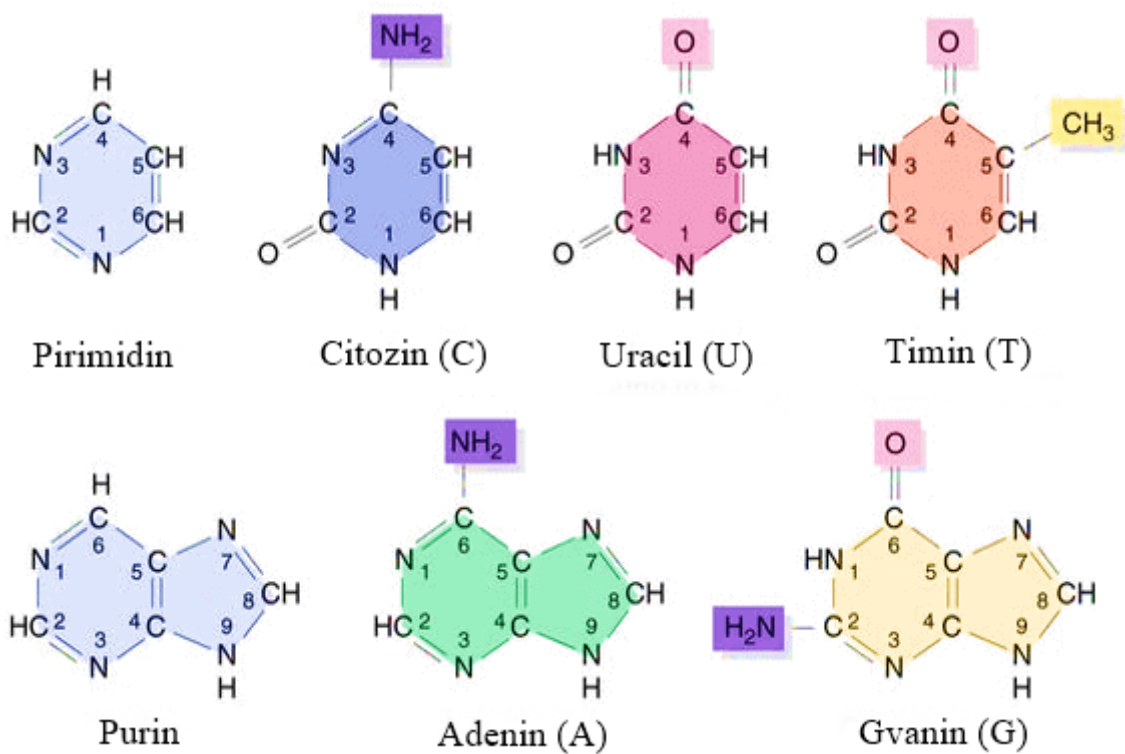


## § 1. UVOD

Nukleotidi su molekule sastavljene od dušične baze, šećera pentoze i fosfatne skupine. Dušična baza koja čini nukleotide može biti izvedena od purina ili pirimidina, prema čemu su nukleotidi podijeljeni. Nukleinske kiseline DNA i RNA obje sadrže purine adenin i gvanin, te pirimidin citozin, ali DNA sadrži pirimidin timin dok RNA sadrži uracil. U prstenima pirimidina i purina zastupljene su konjugirane dvostruke veze i delokalizirani  $\pi$  elektroni. Kao rezultat rezonancije, baze apsorbiraju UV zračenje te imaju maksimum apsorpcije pri 260 nm.<sup>1</sup> Dušične baze nukleotida relativno su hidrofobne i netopljive u vodi pri staničnim uvjetima stoga se baze u nukleinskim kiselinama slažu jedna iznad druge kako bi minimizirale kontakt sa vodom. Za razliku od atoma u prstenu, čiji se položaj označava samo brojem, položaji atoma kod riboze označavaju se crticom iznad broja. Nukleotidi u DNA i RNA kovalentno su povezani fosfodieterskom vezom između hidroksilne skupine na 5' položaju riboze jednog nukleotida s hidroksilnom skupinom na 3' položaju drugog nukleotida.

Biosinteza nukleotida odvija se na dva načina: sinteza *de novo*, koja je slična u svim živim organizmima i sinteza recikliranjem iz metaboličkih puteva (put spasa) odnosno iz razgradnje nukleinskih kiselina. U sintezi *de novo* sudjeluju aminokiseline, riboza 5-fosfat, CO<sub>2</sub> i amonijak, a glutamat je najvažniji izvor amino skupine. Purini i pirimidini dijele nekoliko važnih prekursora za sintezu *de novo*. Najvažniji od njih je fosforibozil pirofosfat (PRPP). Slobodne baze nisu intermedijeri u putevima sinteze *de novo*.

Mehanizam djelovanja antitumorskih i antivirusnih lijekova koji ciljaju metabolizam nukleotida uglavnom se temelji sličnosti molekule lijeka sa supstratom nekog enzima u metaboličkom putu. Umjesto s molekulom supstrata dolazi do reakcije enzima s molekulom lijeka što dovodi do inhibicije enzimske aktivnosti.



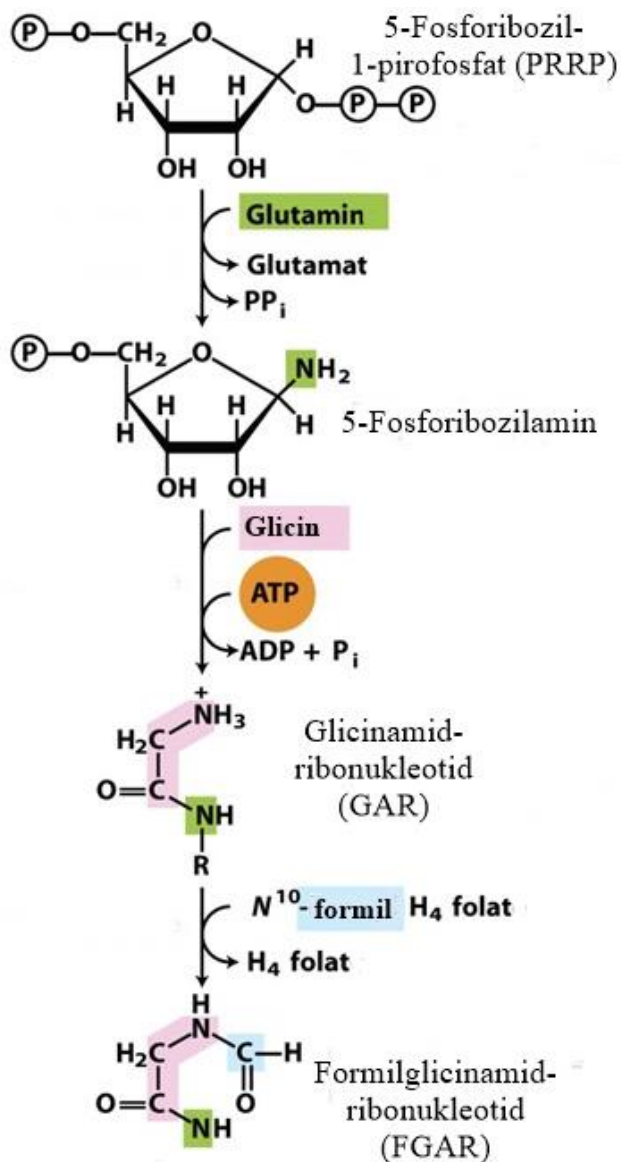
Slika 1. Purinske i pirimidinske baze (preuzeto i prilagođeno iz ref. 2)

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Sinteza nukleotida *de novo*

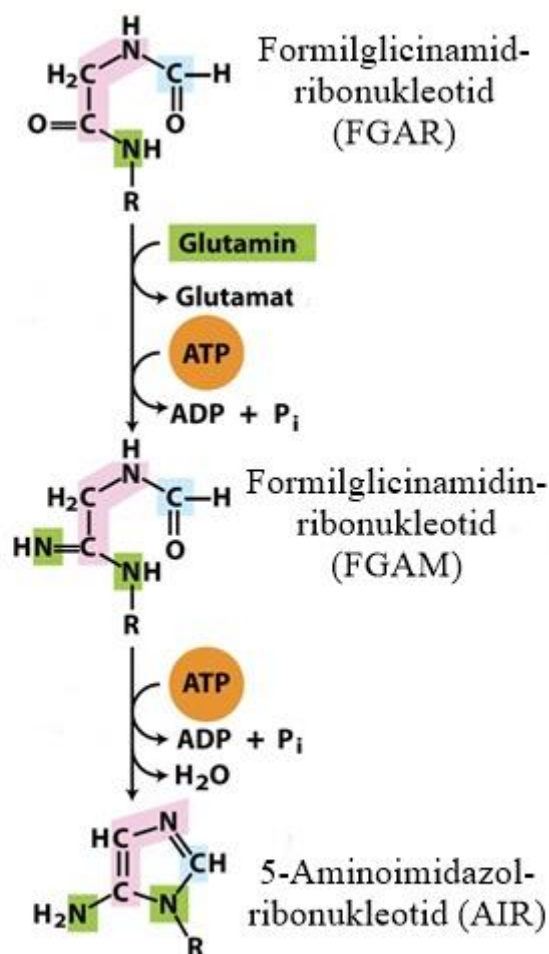
#### 2.1.1. Sinteza purina

Sinteza purinskih nukleotida ista je u svim organizmima, osim jednog koraka koji se razlikuje kod viših eukariota. U prvom koraku sinteze purinskih nukleotida, amino skupina koju donira glutamin veže se na C-1 atom fosforibozil-pirofosfata (PRPP) i daje nestabilan međuprodukt 5-fosforibozilamin na kojem se postepeno izgrađuje purinski prsten. Reakciju katalizira glutamin-fosforibozilpirofosfat-amidottransferaza koja ima amidotrasferaznu domenu i glutaminaznu domenu na kojoj se odvija hidroliza glutamina te nastaje amonijak. Kako bi se izbjegla nepotrebna hidroliza glutamina i PRPP-a, amidottransferaza je u aktivnom obliku samo kada su oba supstrata (PRPP i glutamin) vezana za enzim. Amonijak koji nastaje u aktivnom središtu enzima, kanalom odnosno tunelom unutar enzima dolazi do fosforibozil-pirofosfata. Nakon reakcije glutamin-fosforibozil-amidottransferaze, slijedi kondenzacija prethodno dobivenog 5-fosforibozilamina s glicinom. Za reakciju kataliziranu glicinamid-ribonukleotid-sintetazom (GAR-sintetazom), potreban je ATP koji aktivira karboksilnu skupinu glicina. Glicinamid-ribonukleotid-sintetaza je enzim koji ima tri supstrata: ATP, glicin i 5-fosforibozilamin. Mehanizam djelovanja tog enzima je uređen, sekvencijski. Prvo se veže 5-fosforibozilamin, zatim ATP, i konačno glicin. Produkti reakcije po redu disocijacije s enzima su: fosfat, ADP i na kraju glicinamid-ribonukleotid. Na dobiveni produkt reakcije, glicinamid-ribonukleotid, u reakciji kataliziranoj glicinamid-ribonukleotid-transformilazom prenosi se aktivirana C-1 jedinica pomoću formiltetrahidrofolata. Produkt reakcije je formilglicinamid-ribonukleotid (FGAR).



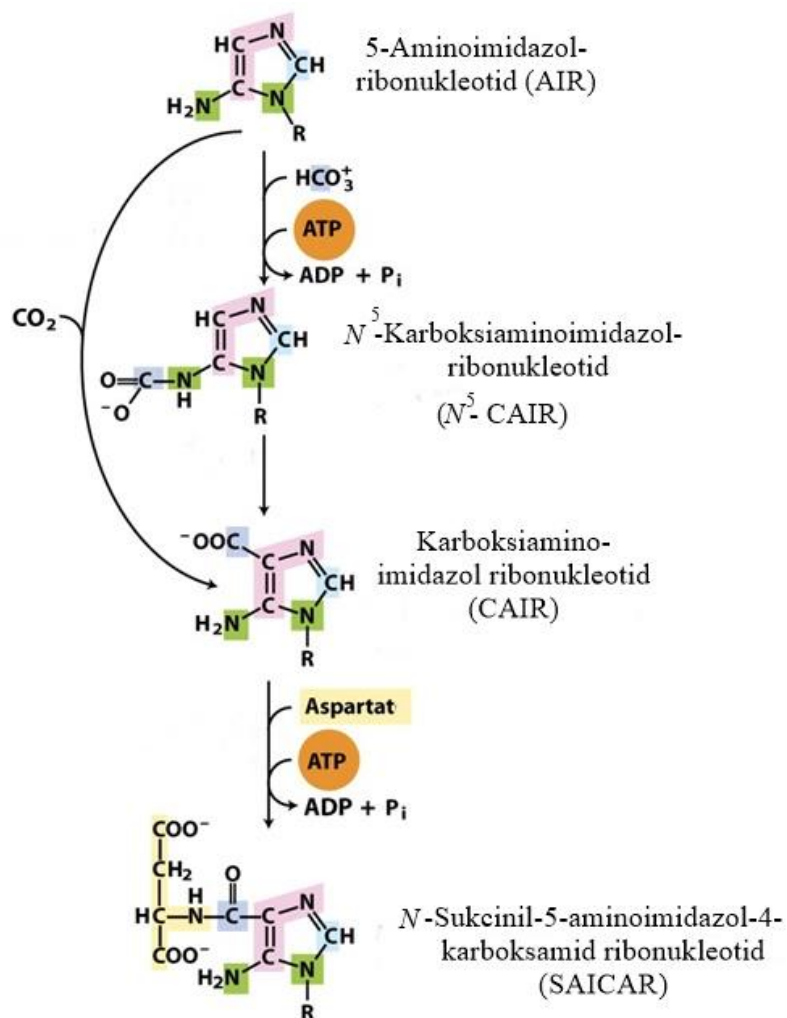
Slika 2. Nastajanje formilglicinamid-ribonukleotida (FGAR) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

Pomoću glutamina kao donora dušika, te ATP-a, iz formilglicinamid-ribonukleotida nastaje formilglicinamidin-ribonukleotid (FGAM). Reakcija je katalizirana formilglicinamid-ribonukleotid-amidotransferazom. Kao zadnji korak u sintezi imidazolnog prstena purinske jezgre slijedi dehidratacija i zatvaranje prstena enzimom formilglicinamidin-ribonukleotid-ciklazom ili aminoimidazol-ribonukleotid-sintetazom (AIR-sintetaza). AIR-sintetaza katalizira prijenos kisika sa formilne skupine na fosfat. Mehanizam djelovanja je sekvencijski, ATP se prvo veže za enzim, a ADP na kraju disocira. Hidrolizom ATP-a aktivira se amidni kisik kako bi se izvršio nukleofilni napad dušika.



Slika 3. Nastajanje 5-Aminoimidazol ribonukleotida (AIR) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

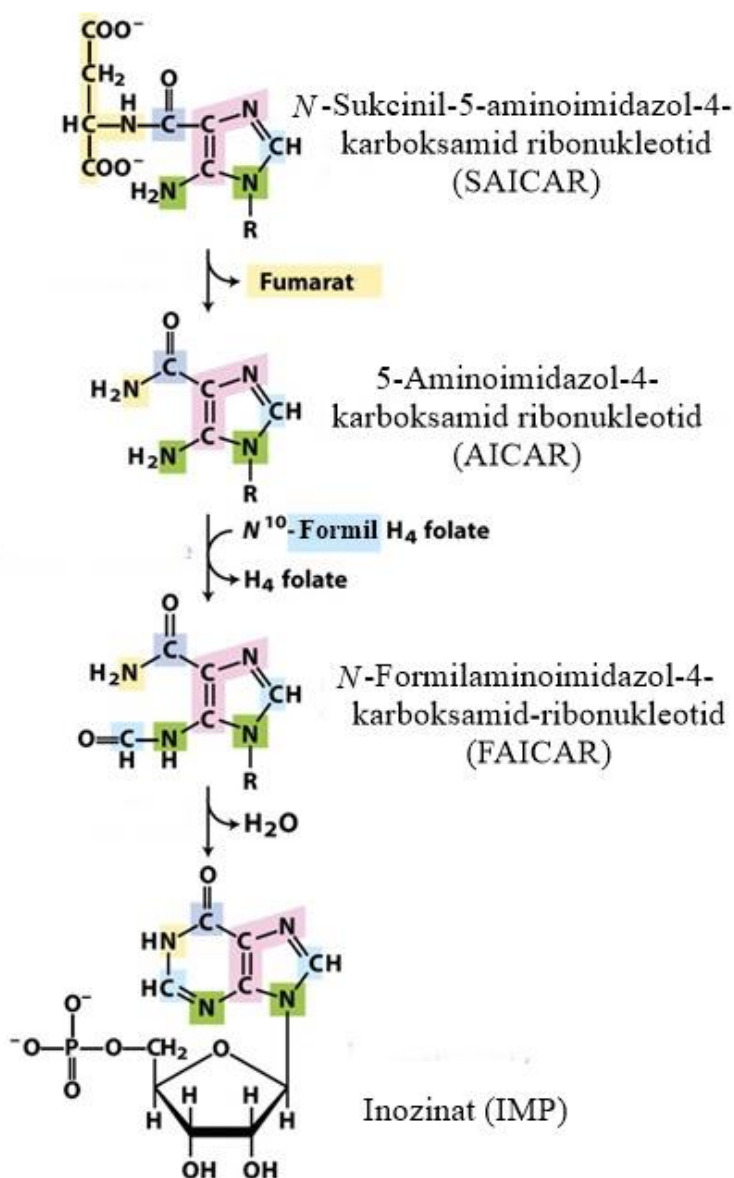
Dobiveni produkt je 5-aminoimidazol-ribonukleotid (AIR) na kojeg se nastavlja daljnja sinteza purinske jezgre. Karboksiliranjem AIR-a pomoću  $N^5$ -karboksiaminoimidazol-ribonukleotid-sintetaze koja koristi ATP nastaje  $N^5$ - karboksiaminoimidazol-ribonukleotid. Za karboksilaciju se ne koristi biotin već hidrogenkarbonat iz otopine. Kod viših eukariota AIR se karboksilira direktno u karboksiaminoimidazol-ribonukleotid (CAIR) pomoću AIR-karboksilaze, dok se kod bakterija i gljiva do CAIR-a dolazi pomoću 2 koraka. Prvo, iz AIR-a karboksiliranjem nastane  $N^5$ -CAIR, a onda pomoću enzima  $N^5$ - CAIR-mutaze dobiva se CAIR. U sljedećem koraku aspartat se veže na CAIR, formira se amidna veza i nastaje *N*-sukcinil-5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleotid (SAICAR). Tu reakciju katalizira SAICAR-sintetaza uz utrošak jedne molekule ATP-a. SAICAR-sintetaza i AIR-karboksilaza dio su bifunkcionalnog enzima i karboksilirani produkt (CAIR) se direktno kanalizira u aktivno mjesto SAICAR-sintetaze. Dva aktivna mjesta locirana su vrlo blizu .



Slika 4. Nastajanje *N*-Sukcinil-5-aminoimidazol-4-karbonsamid ribonukleotida (SAICAR-a) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

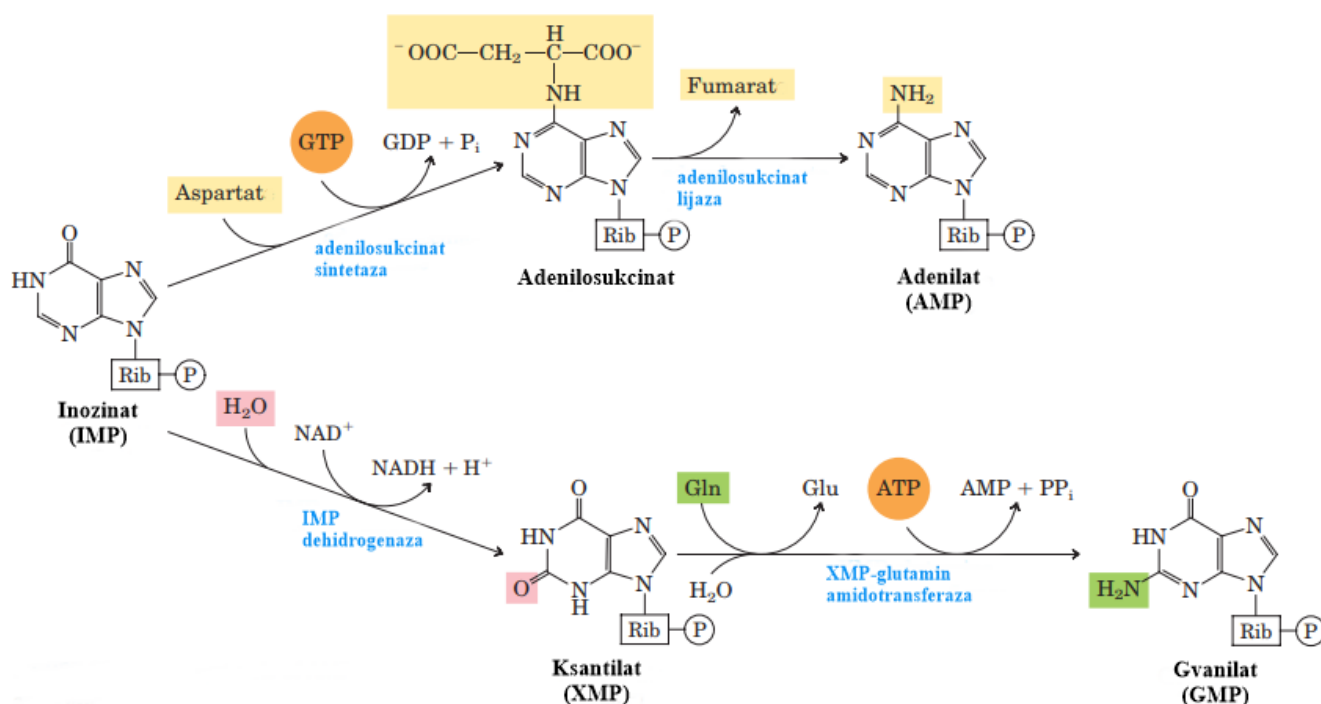


Iz SAICAR-a se u reakciji kataliziranoj SAICAR-lijazom eliminira ugljični kostur aspartata u obliku fumarata i nastaje 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonukleotid (AICAR). Na dobiveni produkt prenosi se formilna skupina s  $N^{10}$ -formil tetrahidrofolata te dehidratacijom u zadnjem koraku dolazi do ciklizacije i nastajanja drugog prstena purinske jezgre odnosno inozinata. Enzimi koji kataliziraju navedene reakcije su AICAR-transformilaza i inozinat-sintaza (IMP-sintaza). AICAR-transformilaza bifunkcionalni je enzim koji se nalazi u ravnotežnom stanju monomer/dimer. Dimer je aktivni oblik, dok monomerna forma enzima ima jako malo ili nimalo katalitičke aktivnosti. Inozinat je mjesto grananja purinskih nukleotida, odnosno zadnji zajednički intermedijer u nastajanju purina.



Slika 5. Nastajanje inozinata (IMP-a) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

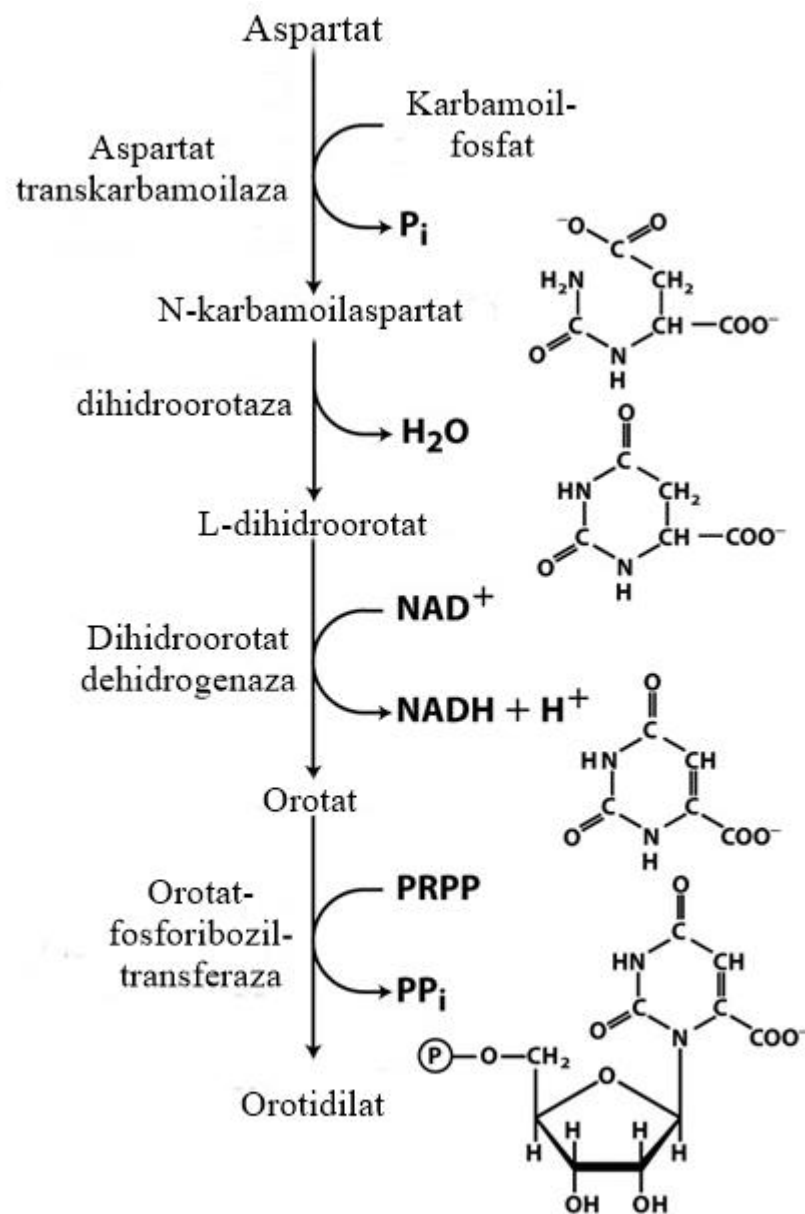
Iz inozinata ulaskom aspartata u reakciji kataliziranoj adenilosukcinat-sintetazom nastaje adenilosukcinat, iz kojeg se eliminacijom fumarata u sljedećem koraku dobiva adenilat (AMP). U kralježnjaka postoje dva izozima adenilosukcinat-sintetaze: jedan uključen u biosintezu purina, a drugi u ciklus purinskih nukleotida. Ako količine AMP-a u stanici premašuju potrebe, on se može pretvoriti natrag u IMP pomoću AMP-deaminaze, razgraditi se ili pretvoriti u GMP. Te tri reakcije zajedno čine ciklus purinskih nukleotida koji se može aktivirati u mišićnim tkivima gdje služi za povišenje koncentracije intermedijera ciklusa limunske kiseline kada su povećane potrebe za energijom. Eliminaciju fumarata katalizira adenilosukcinat-lijaza koja to čini mehanizmom eliminacije konjugirane baze (E1cb). Adenilosukcinat-lijaza je homotetramer s tri domene na svakom monomeru i četiri aktivna mjesta po tetrameru. U reakciji oksidacije inozinat-dehidrogenaze koja koristi  $\text{NAD}^+$  kao kofaktor, ulaskom vode nastaje ksantilat. Adicijom amidne skupine, koju donira glutamin, uz korištenje ATP-a, nastaje purinska baza gvanilat (GMP). Inozinat-dehidrogenaza vrlo je usko povezana s razvojem stanice te je zbog toga moguća meta lijekova kemoterapije.



Slika 6. Nastajanje adenilata (AMP) i gvanilata (GMP) iz inozinata (IMP) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

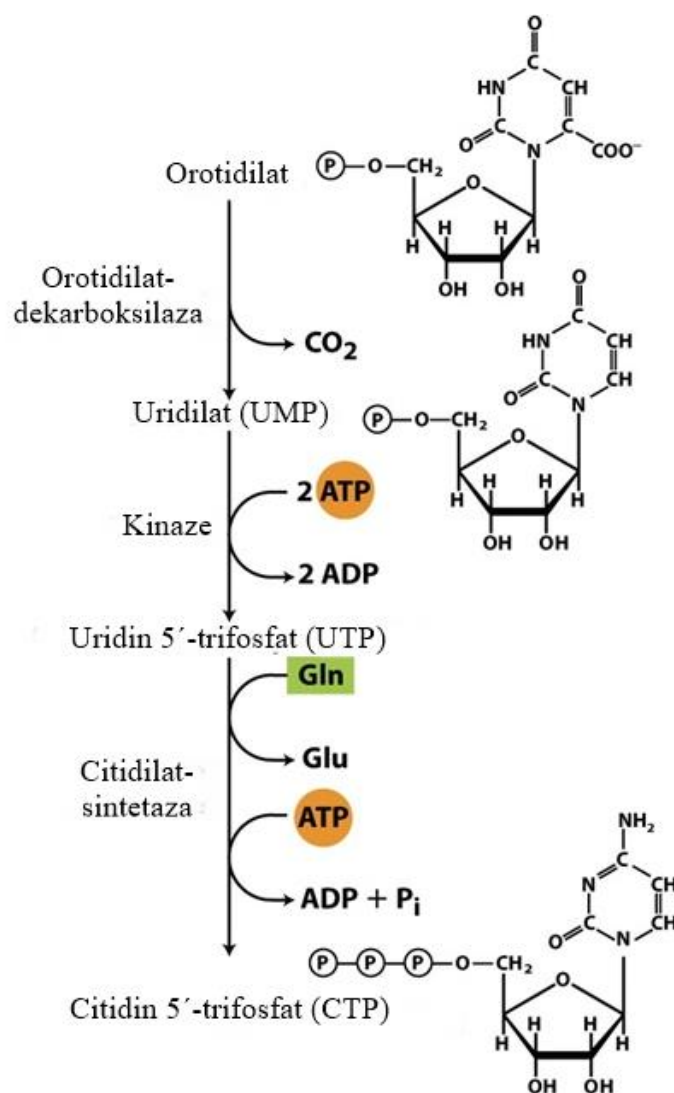
## 2.1.2. Sinteza pirimidina

Za razliku od sinteze purina čiji se prsten sintetizira na fosforibozil pirofosfatu, u sintezi pirimidina se prvo sintetizira prsten i zatim veže na ribozu 5-fosfat. Spojevi od kojih kreće sinteza uracila i citozina su aspartat i karbamoil-fosfat. Karbamoil-fosfat potreban za sintezu pirimidina nastaje u citosolu pomoću enzima karbamoil-fosfat-sintetaze II koji se od svojeg mitohondrijskog izozima razlikuje po donoru  $\text{NH}_4^+$ ; za njega je to glutamat dok je za mitohondrijski izozim  $\text{NH}_4^+$  supstrat. Ono po čemu je karbamoil-fosfat-sintetaza II posebna je kanaliziranje međuprodukata što doprinosi samoj efikasnosti enzima. Reakcijom aspartata i karbamoil-fosfata započinje sinteza pirimidinskog prstena i njome nastaje *N*-karbamoilaspartat. Reakcija je katalizirana aspartat-transkarbamoilazom koja je alosterički enzim sa 6 regulatornih i 6 katalitičkih podjedinica. Uklanjanjem vode s *N*-karbamoilaspartata, dolazi do zatvaranja pirimidinskog prstena te preko intramolekulske Schiffove baze nastaje *L*-dihidroorotat. Reakciju ciklizacije odnosno zatvaranja katalizira dihidroorotaza koja zajedno sa karbamoil-fosfat-sintetazom II i aspartat-trankarbamoilazom čini multienzimski kompleks.<sup>3</sup> U reakciji u kojoj je  $\text{NAD}^+$  akceptor elektrona, *L*-dihidroorotat se oksidira pomoću dihidroorotat-dehidrogenaze i daje orotat. U sljedećoj reakciji susprtat je fosforibozil-pirofosfat, a produkt anorganski pirofosfat odnosno na dobiveni orotat se veže riboza 5-fosfat. U toj reakciji kataliziranoj orotat-fosforibozil-transferazom nastaje orotidilat.



Slika 7. Nastajanje orotidilata (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

U ljudi je orotat-fosforibozil-transferaza dio bifunkcionalnog kompleksa UMP-sintaza i dimer je dvije podjedinice. Iz dobivenog orotidilata dekarboksilacijom enzimom orotidilat-dekarboksilazom izlazi  $\text{CO}_2$  i nastaje uridilat (UMP). Orotidilat-dekarboksilaza vrlo je efikasan enzim koji za katalitičku aktivnost ne koristi kofaktore, metalne ione ili prostetičke skupine. Katalitička efikasnost dolazi od nabijenih aminokiselinskih ogranaka pozicioniranih blizu aktivnog mjesta enzima. Pomoću kinaza i utroška 2 ATP-a, dobiveni se uridilat fosforilira i daje uridin 5'-trifosfat (UTP). Kako bi nastao citidin 5'-trifosfat (CTP) dobiveni se UTP aminira pomoću citidilat-sintetaze koja treba ATP. Donor dušika u ovoj reakciji je glutamin.



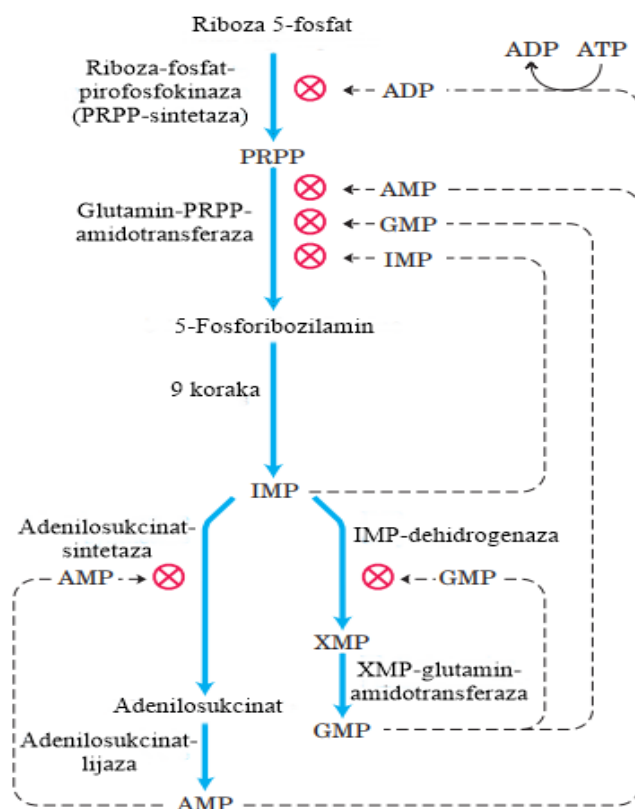
Slika 8. Nastajanje citidin 5'-trifosfata (CTP-a) (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

### 2.1.3. Regulacija sinteze nukleotida

Biosinteza purinskih nukleotida regulira se inhibicijom povratnom spregom, alosteričkim interakcijama i sinergističnim efektima. Prvi mehanizam regulacije temelji se na prvoj reakciji sinteze purina, prijenosu amino skupine na fosforibozil-pirofosfat odnosno nastajanju 5-fosforibozilamina. Reakciju katalizira alosterički enzim glutamin-PRPP amidotransferaza koju inhibiraju konačni produkti sinteze: IMP, AMP, i GMP.<sup>1</sup> U sinergističkom efektu inhibiranja amidotransferaze sudjeluju AMP i GMP. Sinergija se zasniva na činjenici jače inhibicije amidotransferaze zajedničkim efektom AMP-a i GMP-a nego njih pojedinačno. Kada dolazi do akumulacije bilo GMP-a ili AMP-a, početni korak biosinteze purina je inhibiran.

Drugi mehanizam inhibicije također se sastoji u akumuliranju suviška GMP-a odnosno suvišak inhibira nastajanje ksantilata iz inozinata. Možemo reći da suvišak GMP-a inhibira enzim IMP-dehidrogenazu koja katalizira nastajanje ksantilata iz inozinata, bez da utječe na sintezu AMP-a. Isto tako suvišak AMP inhibira nastajanje adenilosukcinata pomoću adenilosukcinat-sintetaze bez da utječe na sintezu GMP-a.

U trećem mehanizmu regulacije recipročno su regulirane pretvorbe IMP-a u AMP i IMP-a u GMP kako bi se izjednačile potrebe za sintezom dvaju nukleotida. Također jedan od načina regulacije je inhibicija sinteze PRPP-a na kojem se odvija sinteza purinske jezgre. Inhibicija se temelji na alosteričkoj regulaciji enzima koji katalizira reakciju sinteze, riboze-fosfat-pirofosfokinaze. Enzim inhibiraju ADP i GDP kao i ostali metaboliti iz puteva u kojima je PRPP početni spoj.



Slika 9. Regulacija biosinteze adenina i gvanina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

Regulacija sinteze pirimidinskih nukleotida je jednostavnija i uglavnom temeljena na enzimu aspartat-transkarbamoilaza kojeg inhibira krajnji produkt puta, CTP. Bakterijska se aspartat-transkarbamoilaza sastoji od 6 katalitičkih podjedinica, koje vežu supstrat, te 6 regulatornih podjedinica koje vežu alosterički inhibitor, CTP, budući da je on strukturno različit od supstrata pa se ne veže u aktivno mjesto. Također enzim ima dvije konformacije, aktivnu i inaktivnu, koje se izmjenjuju ovisno o vezanju CTP-a. Aktivnost aspartat-transkarbamoilaze povećava se povećanjem koncentracije ATP-a, odnosno ATP je alosterički aktivator aspartat-transkarbamoilaze. Objašnjenje za povećanu aktivnost aspartat-transkarbamoilaze povećanom koncentracijom ATP-a može biti to da povećana koncentracija ATP-a signalizira visoku koncentraciju purina, pa aspartat-transkarbamoilaza želi izjednačiti koncentracije purina i pirimidina tako da pojača sintezu pirimidina. Također visoka koncentracija ATP-a znači da stanica ima energije i potiče se sinteza mRNA i replikacija DNA.<sup>4</sup>

## 2.2. Sinteza putevima „spašavanja“

Slobodni purini i pirimidini se neprestano otpuštaju u stanicama tijekom metaboličke razgradnje nukleotida. Takvi se slobodni purini i pirimidini ponovno koriste za izgradnju nukleotida u putevima jednostavnijim od njihove sinteze *de novo*.<sup>1</sup> Pirimidinska baza UMP nastaje tako da enzim uridin fosforilaza dodaje ribozu 1-fosfat na slobodni uracil i tako nastaje uridin kojeg onda uridin kinaza fosforilira u uridin monofosfat (UMP). Vežanjem 2-deoksi- $\alpha$ -D-riboze-1-fosfat na slobodni timin nastaje timidin pomoću enzima timidin-fosforilaze. Fosforiliranjem timidina timidin-kinazom nastaje timidin-monofosfat (TMP).

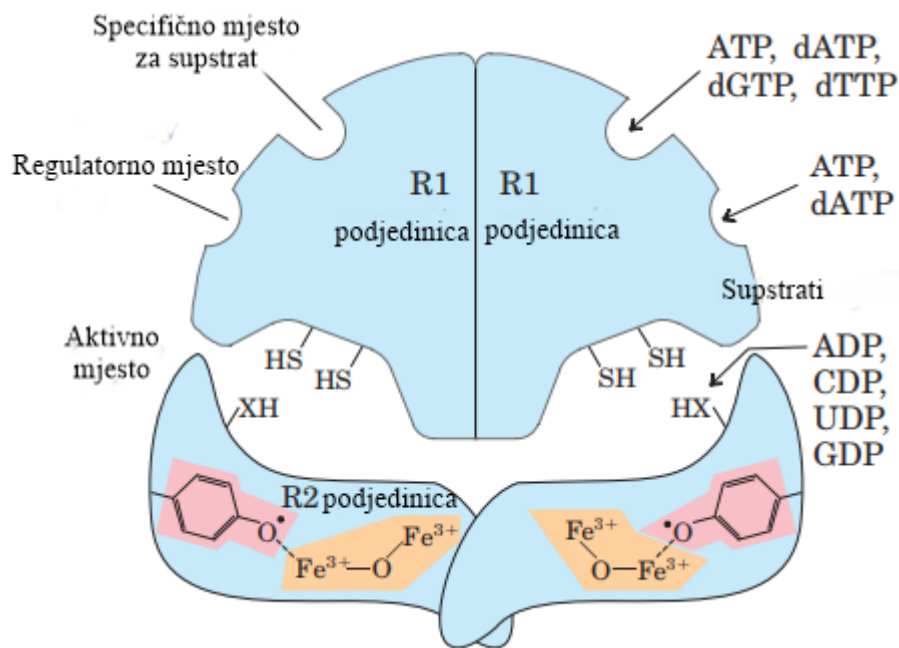
Citidin se može reciklirati pomoću citidin-deaminaze koja ga pretvara u uridin nakon čega ga uridin-citidin-kinaza fosforilira u citidin-monofosfat (CMP). U nastajanju purinskih nukleotida sudjeluju fosforiboziltransferaze koje vežu aktiviranu ribozu-5-fosfat odnosno fosforibozil-pirofosfat na baze.<sup>5</sup> Slobodni adenin u reakciji s fosforibozil-pirofosfatom daje adenine-monofosfat (AMP) i anorganski pirofosfat. Reakciju katalizira adenzin-fosforiboziltransferaza. Adenzin-fosforiboziltransferaza djeluje uređenim sekvencijskim mehanizmom. Enzim prvo veže fosforibozil-pirofosfat a zatim adenin. Nakon što se prenese fosforibozil, pirofosfat disocira prvo, a zatim adenzin-monofosfat. Adenzin-fosforiboziltransferaza za katalitičku efikasnost treba ion magnezija. Slobodni gvanin i hipoksantin, koji je produkt njegove deaminacije, se recikliraju pomoću enzima hipoksantin-gvanin-fosforiboziltransferaze.



## 2.3. Sinteza deoksiribonukleotida

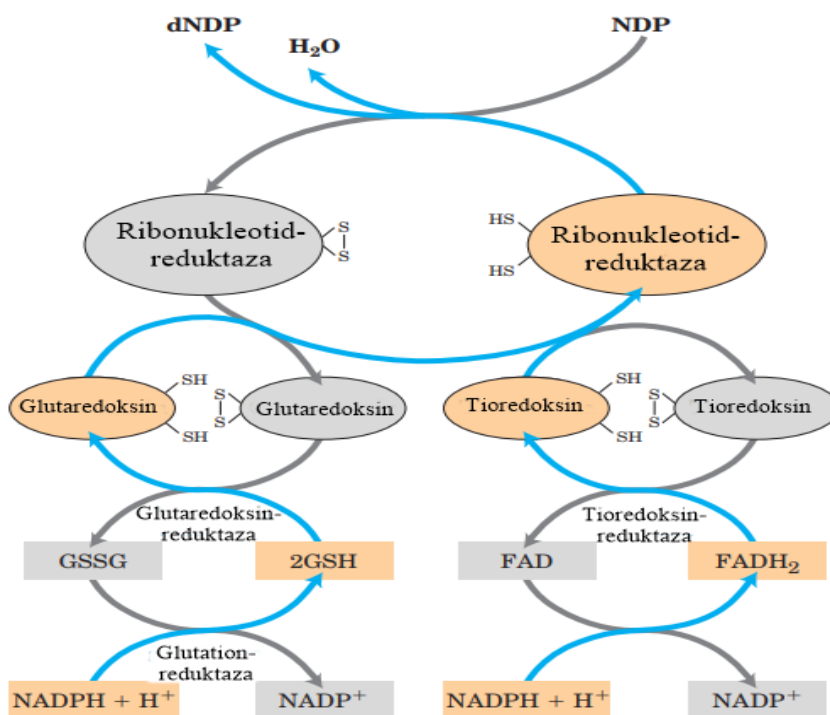
Deoksiribonukleotidi su građevne jedinice DNA i derivati ribonukleotida koji nastaju direktnom redukcijom na 2' C atomu D-riboze. Tom redukcijom nastaje 2'- deoksi derivat. Tu i slične reakcije katalizira enzim ribonukleotid-reduktaza čiji su supstrati ribonukleozid-difosfati. Ta redukcija zahtijeva par atoma vodika i elektrona koje donira NADPH preko proteina tioredoksina koji je prenositelj vodika. Njegov oksidirani ili disulfidni oblik se reducira pomoću NADPH u reakciji koju katalizira tioredoksin-reduktaza. Tako reducirani tioredoksin koristi ribonukleotid-reduktaza kako bi reducirala nukleozid-difosfate u deoksiribonukleotid-difosfate. Enzim ribonukleotid-reduktaza ima važnu ulogu u sintezi DNA, budući da njegova reakcija ograničava brzinu sinteze DNA. Supstrati ribonukleotid-reduktaze su adenzin-difosfat, gvanozin-difosfat, citidin-difosfat i uridin-difosfat, dok se deoksitimidin-difosfat sintetizira pomoću drugog enzima. Enzim za djelovanje treba atome željeza a mehanizam se odvija preko slobodnih radikala. U većini eukariota enzim je dimer s podjedinicama R1 i R2, a 2 aktivna mjesta su formirana u području između R1 i R2 podjedinica. U svakom aktivnom mjestu R1 sadrži dvije sulfhidrilne skupine, potrebne za aktivnost, dok R2 sadrži stabilne tirozilne radikale. Također, R2 sadrži i binuklearni kofaktor željezo koji generira i stabilizira tirozilne radikale. Neobično kod ribonukleotid-reduktaze u *E.coli* jest regulacija. Zanimljivost ovog enzima je da vezanje molekula efektor regulatora ne samo aktivnost enzima već i specifičnost prema supstratu. Svaka R1 podjedinica ima 2 tipa regulatornih mjesta. Jedan tip utječe na aktivnost enzima i veže ili ATP, koji aktivira enzim, ili dATP, koji ga inaktivira. Drugi tip utječe na specifičnost prema supstratu kao odgovor na molekulu efektor regulatora koja može biti ATP, dATP, dTTP, ili dGTP. Kada su vezani ATP ili dATP, to pogoduje redukciji UDP-a ili CDP-a, a dok su vezani dTTP ili dGTP, stimulira se redukcija GDP-a ili ADP-a. Na taj način se omogućuje dobar balans prekursora za sintezu DNA. Generalni aktivator biosinteze i redukcije ribonukleotida je ATP. Prisutnost dATP-a u malim količinama povećava redukciju pirimidinskih nukleotida.

Drugi izvor reducirajućih ekvivalenata za ribonukleotid-reduktazu je glutation (GSH). Glutation služi kao reducens za protein sličan tioredoksinu, glutaredoksin, koji također prenosi reducirajuće ekvivalente na ribonukleotid-reduktazu.



Slika 10. Struktura podjedinica ribonukleotid reduktaze (preuzeto i prilagođeno iz ref.

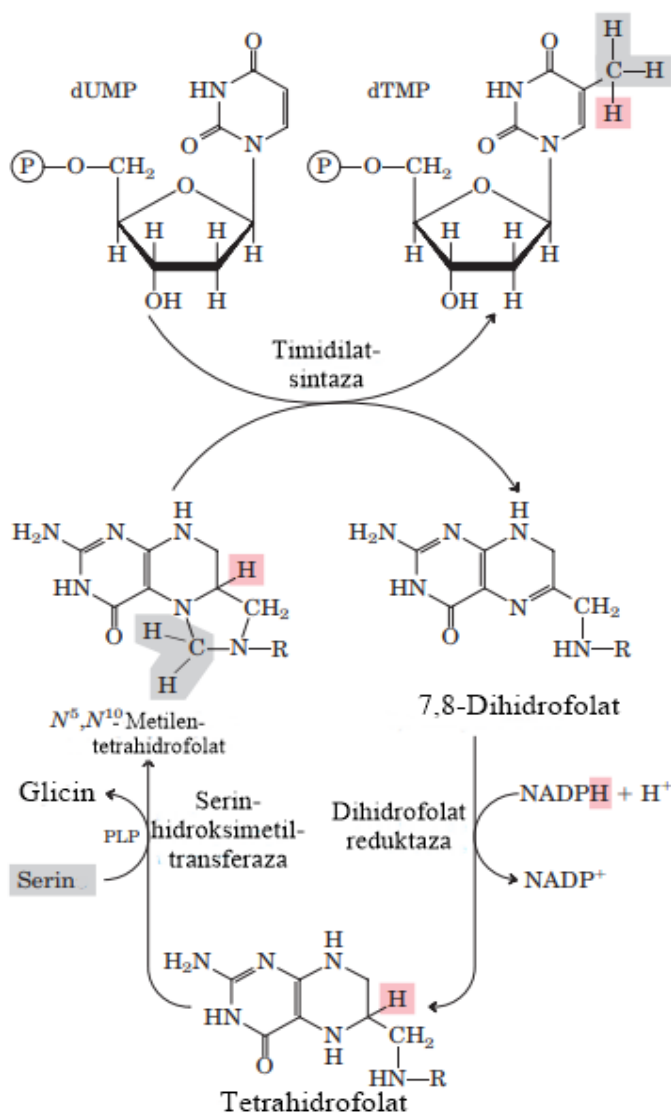
1)



Slika 11. Redukcija ribonukleotida u deoksiribonukleotide (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

## 2.3.1. Nastajanje timina

Prekursor timidilata (dTMP) je dUMP koji nastaje formiranjem dUTP-a deaminacijom dCTP-a ili fosforiliranjem dUDP. Deoksiuridin-trifosfat se pretvara u deoksiuridin-monofosfat pomoću enzima deoksiuridin-trifosfat-nukleotidhidrolaze. Pretvorbu dUMP-a u dTMP katalizira enzim timidilat-sintaza. U prijenosu aktivirane C-1 jedinice sudjeluje  $N^5,N^{10}$ -metilentetrahidrofolat odnosno aktivirana se jedinica prenosi s metilentetrahidrofolata na dUMP i reducira iz hidrosimetilne u metilnu skupinu. Kako bi se izvršila ta redukcija, tetrahidrofolat se mora oksidirati u dihidrofolat. Kako bi se tetrahidrofolat regenerirao, dihidrofolat se reducira pomoću dihidrofolat-reduktaze.

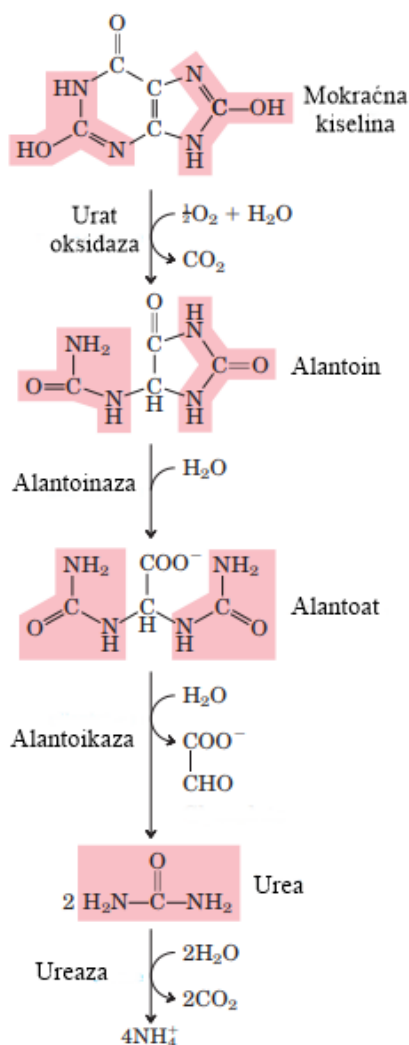


Slika 12. Sinteza timina (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

## 2.4. Razgradnja nukleotida

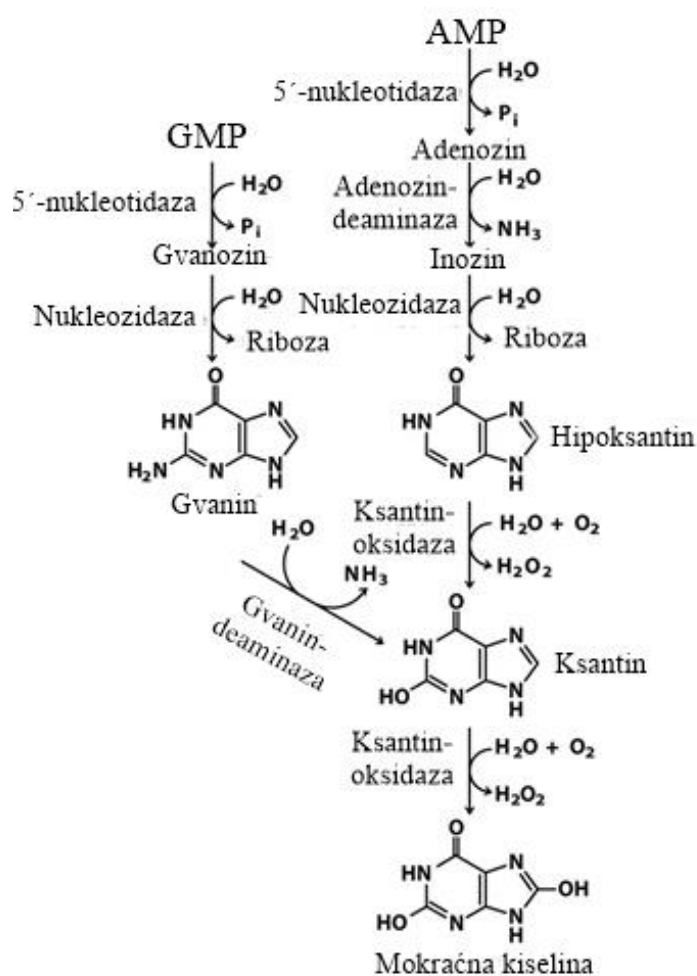
### 2.4.1. Razgradnja purina

Razgradnja purinskih nukleotida završava različitim produktima ovisno o organizmu u kojem se ona odvija kao što je prikazano na slici. Kod primata, ptica, reptila i insekata konačni produkt razgradnje je mokraćna kiselina, dok se kod većine sisavaca ona dalje razgrađuje do alantoina pomoću urat-oksidadze. Kod koštunjača razgradnja dolazi do alantoata koji nastaje hidrolizom alantoina djelovanjem enzima alantoinaze. Daljnjom hidrolizom alantoata uz disocijaciju glioksilata, nastaje urea. Reakcija je katalizirana enzimom alantoikaza ili alantoat amidinohidrolaza, a urea je konačni produkt razgradnje purinskih nukleotida kod vodozemaca i hrskavičnjača. Kod morskih beskralježnjaka, urea se pomoću enzima ureaze hidrolizira na  $\text{NH}_4^+$ .



Slika 13. Produkti razgradnje purinskih nukleotida (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

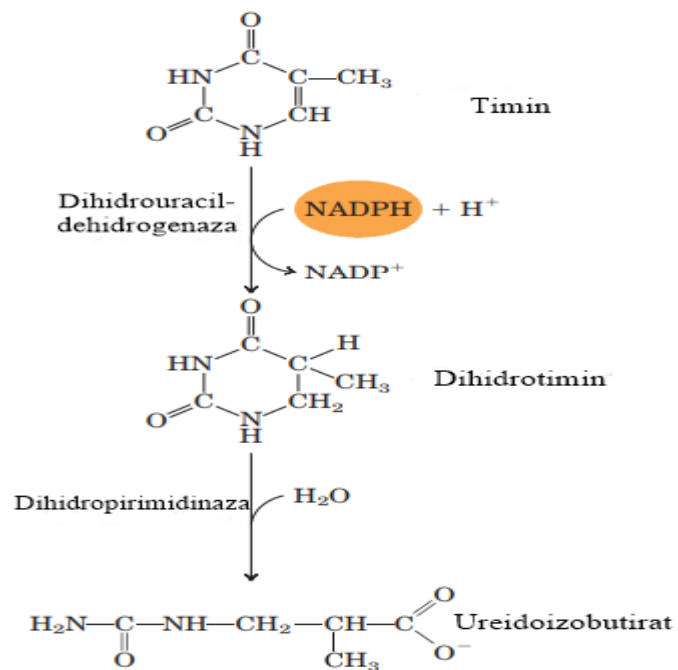
Put razgradnje purinskih nukleotida započinje djelovanjem enzima 5'-nukleotidaze koja skida fosfatnu skupinu s purina. Monofosfati AMP, GMP i IMP se pretvaraju u svoje nukleozidne oblike odnosno adenozin, gvanozin i inozin. Adenozin deaminacijom pomoću adenozin-deaminaze daje inozin koji se hidrolizira na hipoksantin i D-ribozu. Hipoksantin se oksidira u ksantin a on u mokraćnu kiselinu enzimom ksantin-oksidadza dok je akceptor elektrona u reakciji molekularni kisik. Enzim ksantin-oksidadza generira reaktivne kisikove vrste, a u svojoj prostetičkoj skupini sadrži atom molibdena i četiri željezo-sumpor centra.<sup>1</sup> Kao i AMP, i GMP na kraju razgradnje daje mokraćnu kiselinu. Razgradnja počinje hidrolizom do gvanozina koji daljnjom hidrolizom daje slobodni gvanin. Deaminacijom gvanina odnosno hidrolitičkim uklanjanjem amino skupine dobiva se ksantin koji se oksidira u mokraćnu kiselinu ksantin-oksidadzom.



Slika 14. Razgradnja purinskih nukleotida (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

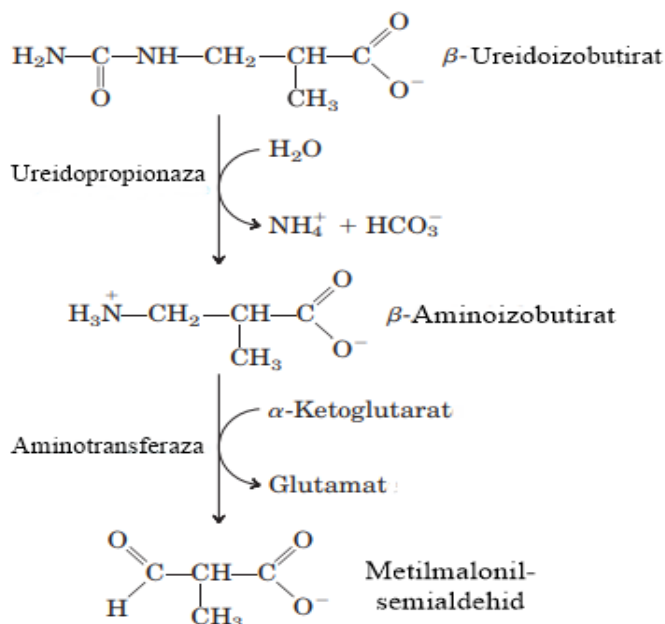
## 2.4.2. Razgradnja pirimidina

Putevi razgradnje pirimidina vode uglavnom do nastajanja uree i  $\text{NH}_4^+$ . Timin se prevodi u intermedijer ciklusa limunske kiseline, sukcinil-CoA. Reakcijom dihidrouracil-dehidrogenaze iz timina nastaje dihidrotimin koji se ulaskom vode i djelovanjem enzima dihidropirimidinaze pretvara u  $\beta$ -ureidoizobutirat.



Slika 15. Razgradnja timina do  $\beta$ -ureidoizobutirata (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

U idućoj reakciji kataliziranoj enzimom  $\beta$ -ureidopropionaza ulazi voda i izlaze  $\text{NH}_4^+$  i hidrogenkarbonatni ion. Produkt reakcije je  $\beta$ -aminoizobutirat koji nakon uklanjanja aminoskupine pomoću aminotransferaze postaje metilmalonilsemialdehid. Metilmalonilsemialdehid se dalje razgrađuje do sukcinila-CoA. Katabolizam pirimidina se sastoji od razgradnje pirimidinskog prstena do spojeva sličnih supstratima za sintezu: amonijev ion, ugljikov dioksid i aspartat.<sup>6</sup>

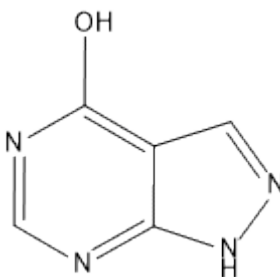


Slika 16. Razgradnja  $\beta$ -ureidoizobutirata do metilmalonilsemialdehida (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

## 2.5. Lijekovi koji ciljaju metabolizam nukleotida

### 2.5.1. Alopurinol

Alopurinol ili 1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-on je spoj koji se koristi za smanjenje koncentracije mokraćne kiseline u krvi i tkivima, analog je purina i strukturni izomer hipoksantina.

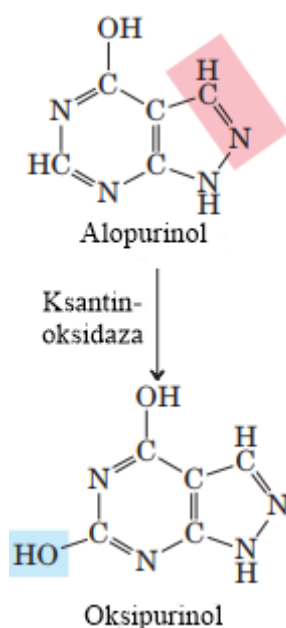


Slika 17. Struktura alopurinola

Mokraćna kiselina nusprodukt je razgradnje purina ili otpadnih produkata tijela te se razgrađuje u krvi i eliminira urinom. Kada tijelo povećava proizvodnju mokraćne kiseline ili ako bubrezi ne eliminiraju dovoljno mokraćne kiseline iz tijela, njena koncentracija u krvi se povećava. To stanje se zove hiperuricemija. Hiperuricemija nije bolest, i može postojati bez simptoma ali ako se stvore kristali mokraćne kiseline kao rezultat hiperuricemije može se razviti giht. Giht se liječi kombinacijom dijete i lijekova poput alopurinola. Alopurinol djeluje tako da inhibira ksantin-oksidadu koja katalizira pretvorbu purina u mokraćnu kiselinu. Ksantin-oksidaza brzo oksidira alopurinol u oksipurinol koji je također njen inhibitor. Pri niskim koncentracijama, alopurinol je supstrat i kompetitivni inhibitor enzima, dok pri višim koncentracijama postaje nekompetitivni inhibitor.<sup>7</sup> Oksipurinol, aktivni metabolit alopurinola, nekompetitivni je inhibitor enzima, duže se zadržava u tkivima i zaslužan je za djelovanje lijeka. Mehanizam kojim djeluje alopurinol temelji se na strukturnoj sličnosti hipoksantinu koji je supstrat ksantin-oksidaze. Alopurinol odnosno oksidirana forma, oksipurinol, inaktivira reducirani oblik enzima tako što ostane čvrsto vezan u njegovo aktivno mjesto. Inhibicija ksantin-oksidaze uzrokuje povišenje koncentracije hipoksantina i ksantina. Dok se ksantin ne može pretvoriti u purine, hipoksantin se može koristiti za sintezu purina adenozin i gvanozin-monofosfata. Povišena razina tih monofosfata može uzrokovati inhibiciju amidofosforibozil-transferaze povratnom spregom te tako inhibirati samu sintezu purina.



U preventivne svrhe, može se izbjegavati prehrana obogaćena purinima, višak fruktoze ili saharoze, neka alkoholna pića poput piva, lijekovi koji sadrže purine poput dideoksiadenozina i drugo. Postoji poveznica između konzumiranja alkohola i gihta. Razgradnja alkohola pomoću alkohol-dehidrogenaze i zatim aldehyd-dehidrogenaze proizvodi NADH, koji pomiče ravnotežu reakcije laktat-dehidrogenaze od piruvata prema laktatu. Laktat može pospješiti zadržavanje mokraćne kiseline u bubrezima i tako povećati šanse za nakupljanjem mokraćnih kristala.



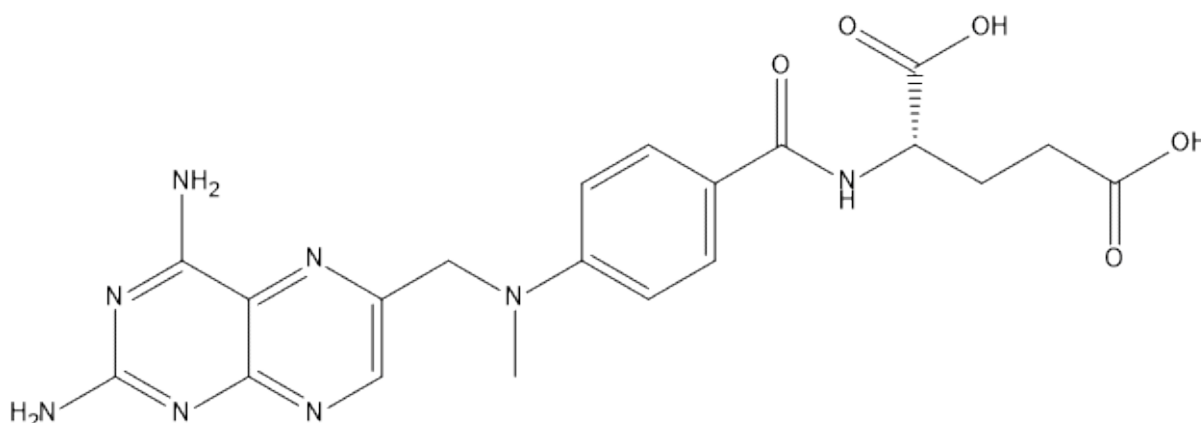
Slika 18. Reakcija ksantin oksidaze (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

### 2.5.2. Metotreksat

Metotreksat ili ametopterin je kemoterapeutik i sredstvo za suzbijanje aktivnosti imunološkog sustava ili imunosupresor. Bolesti za koje se koristi su rakovi pluća i grudi, leukemija, osteosarkom, limfom. Od autoimunih bolesti koristi se za psorijazu, reumatski artritis i Kronovu bolest.<sup>8</sup> Metotreksat djeluje na rak i na reumatski artritis dvama različitim putevima. Terapija se sastoji u tome da se pacijentu daje letalna doza metotreksata te se nakon nekoliko sati spašava dodatkom velikih doza timidina i/ili N<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolata. Time se postiže da se u razdoblju između davanja metotreksata i timidina unište stanice raka koje se najbrže dijele dok je za uništenje ostalih stanica vrijeme djelovanja prekratko. Kako bi liječio rak, metotreksat inhibira dihidrofolat-reduktazu koja katalizira pretvorbu dihidrofolata u tetrahidrofolat. Folat

se koristi u sintezi timidina potrebnog za sintezu DNA. Budući da je folat nužan za sintezu purina i pirimidina, sinteza će se djelovanjem metotreksata inhibirati. Inhibicijom sinteze nukleotida, inhibirane su sinteze DNA i RNA odnosno spriječen je rast stanica bolesti. Budući da je metotreksat analog folata, ponaša se kao kompetitivni inhibitor i veže se na enzim dihidrofolat-reduktazu sa čak 100 puta<sup>1</sup> većim afinitetom od dihidrofolata.

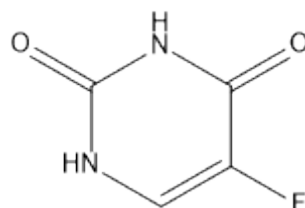
Za liječenje reumatskog artritisa koristi se više mehanizama uključujući inhibiciju enzima uključenih u metabolizam purina koji vode do akumulacije adenzina. Metotreksat inhibira metiltransferaznu aktivnost enzima što vodi do inhibicije enzima važnih za funkcioniranje imunološkog sustava. Osim dihidrofolat-reduktaze, metotreksat i/ili metotreksat-poliglutamati direktno inhibira timidilat-sintazu i 5-aminoimidazol-4-karboksamid-ribonukleotid-transformilazu (AICAR-transformilazu).



Slika 19. Struktura metotreksata

## 2.5.3. 5-Fluorouracil

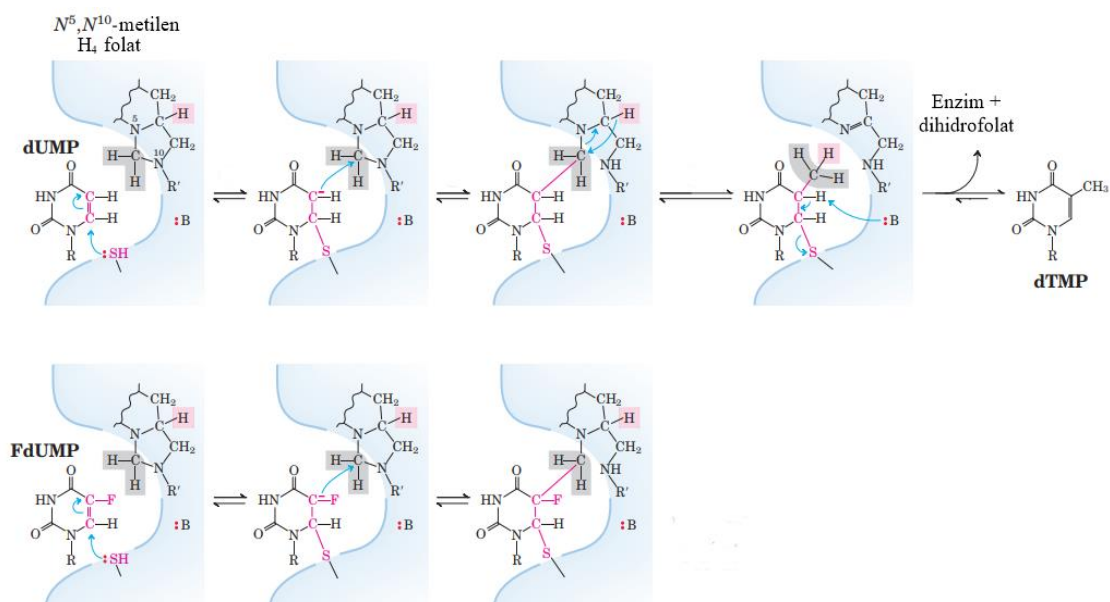
5- Fluorouracil kemijski je spoj koji se koristi u liječenju malignih bolesti, najčešće probavnog sustava, ali i tumora vrata i glave te jajnika i dojki. Djeluje kao antimetabolit, analog je timina i ireverzibilni inhibitor timidilat-sintaze a njegova je struktura prikazana na Slici 21.



Slika 20. Struktura 5-Fluorouracila

*In vivo* se pretvara u 5-fluorouridilat pomoću fosforibozil-pirofosfat-ovisne fosforibozil-transferaze, prolazi kroz reakcije sinteze dNTP-a te završava kao 2'-deoksi-5-fluorouridilična kiselina koja je moćni inhibitor dTMP-sintaze.<sup>9</sup> Fluor ima nekoliko prednosti u dizajnu lijekova: najmanja je zamjena za vodik u organskoj sintezi, najelektronegativniji element je, te je veza fluor – ugljik relativno slabo reaktivna. Navedene ga prednosti čine čestim supstituentom u proizvodnji analoga supstrata odnosno inhibitora. Za razliku od vodika, koji se često uklanja sa supstrata u obliku  $H^+$ , elektronegativni se fluor ne može eliminirati kao  $F^+$ . Radi te činjenice inhibitori enzima dizajniraju se tako da fluor zamjenjuje vodik na mjestima gdje kataliza uključuje eliminaciju vodika. Timidilat-sintaza katalizira uklanjanje vodika s dUMP-a mehanizmom kovalentne katalize. Tiolna skupina enzima napada 6-kraj 2'-deoksiuridilične kiseline tako da C-5 može reagirati kao karbanion u napadu na metilenski C atom  $N^5, N^{10}$ -metilen tetrahidrofolata. Regeneracija slobodnog enzima dešava se eliminacijom vodika na C-5 atomu te disocira produkt dTMP. Ako fluor zamijeni vodik na C-5 atomu kao u 2'- deoksi- 5- fluorouridilatu (FdUMP), enzim je imobiliziran u vrlo stabilnom kompleksu enzim – FdUMP – metilen-THF. Takve vrste inhibitora zovu se inhibitori na bazi mehanizma reakcije ili inhibitori samoubojice. Mehanizam djelovanja prikazan je na Slici 22. 5-fluorouracil djeluje tako da blokira sintezu pirimidina timidina potrebnog za replikaciju DNA,

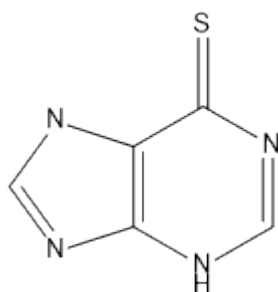
ali djeluje i tako da se inkorporira umjesto uracila u DNA i RNA. Timidilat-sintaza metilira deoksiuridin monofosfat (dUMP) u timidin-monofosfat (dTMP), tako da inhibicija tog enzima uzrokuje smrt svih stanica koje se ubrzano dijele kao što su tumorske stanice. Kada djeluje ugrađujući se umjesto uracila u RNA i DNA, onda prekida transkripciju RNA i stanice se ne dijele. Zbog njegove toksičnosti, može doći do raznih nuspojava pri uzimanju te se vrlo oprezno mora kombinirati s ostalim lijekovima zato što mnogi nukleozidi povećavaju njegovu toksičnost.<sup>10</sup> U kombinaciji s radioterapijom, liječenje 5-fluorouracilom pokazalo se uspješnim za neke tipove metastaza pluća kao i kod olakšanja bolova uzrokovanih stalnim rastom neoperabilnih tumora.



Slika 21. Mehanizam djelovanja 5-Fluorouracila (preuzeto i prilagođeno iz ref. 1)

## 2.5.4. 6-Merkaptopurin

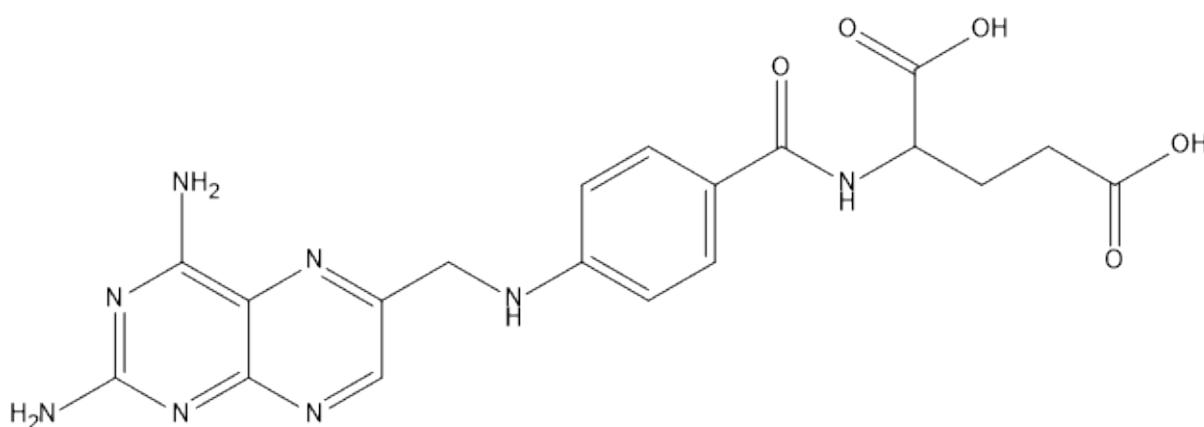
6-Merkaptopurin koristi se za liječenje tumora i autoimunih bolesti, posebice za akutnu leukemiju limfocita, kroničnu leukemiju mijeloida, Kronovu bolest i ulcerativni kolitis.<sup>11</sup> Kompetira s hipoksantinom i gvaninom za enzim hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaza (HGPRT) koji katalizira pretvorbu hipoksantina u inozin-monofosfat te gvanina u gvanozin-monofosfat. Nakon metaboličke pretvorbe u tioinozin-monofosfat (TIMP), snažan je inhibitor sinteze IMP-a na putu sinteze AMP-a i GMP-a te se zato koristi u kemoterapiji. TIMP inhibira nekoliko reakcija koje uključuju IMP, kao što je pretvorba IMP-a u ksantilat (XMP) pomoću IMP-dehidrogenaze te pretvorba IMP-a u AMP preko adenilosukcinata. Metiliranjem TIMP-a nastaje 6-metiltioinozinat (MTIMP) koji kao i TIMP inhibira glutamin-5-fosforibozilpirofosfat-amidotransferazu, prvi korak u sintezi purina *de novo*. Budući da je ta reakcija ona koja određuje brzinu sinteze purina, to utječe na sintezu DNA i RNA. Učinak 6-merkaptopurina pojačava se ako se daje u kombinaciji s alopurinolom. Ksantin-oksidadza oksidira 6-merkaptopurin do 2-okso-6-merkaptopurina i tako se on efektivno gubi odnosno ne inhibira sintezu IMP-a. Budući da je učinak alopurinola takav da inhibira ksantin-oksidadzu, u kombinaciji s alopurinolom poboljšava se djelovanje jer više 6-merkaptopurina ostaje intaktno.



Slika 22. Struktura 6-Merkaptopurina

## 2.5.5. Aminopterin

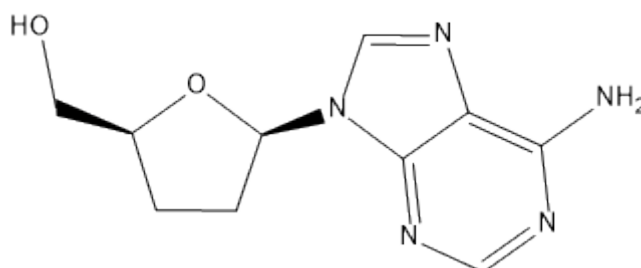
Aminopterin, amino derivat folne kiseline, je citostatik sa imunosupresorskim svojstvima koji se često koristi u kemoterapiji. Djeluje tako da kompetira s folatom za vezanje na enzim dihidrofolat-reduktazu. Vezanje aminopterina na dihidrofolat-reduktazu blokira sintezu tetrahidrofolata. Na taj se način troše prekursori za sintezu nukleotida, inhibira sinteza DNA i RNA te sinteza proteina. Aminopterin vrlo je nestabilna supstanca koja se raspada na svjetlu i toplini te je vrlo štetna za okoliš.<sup>12</sup>



Slika 23. Struktura aminopterina

## 2.5.6. Dideoksiadenozin

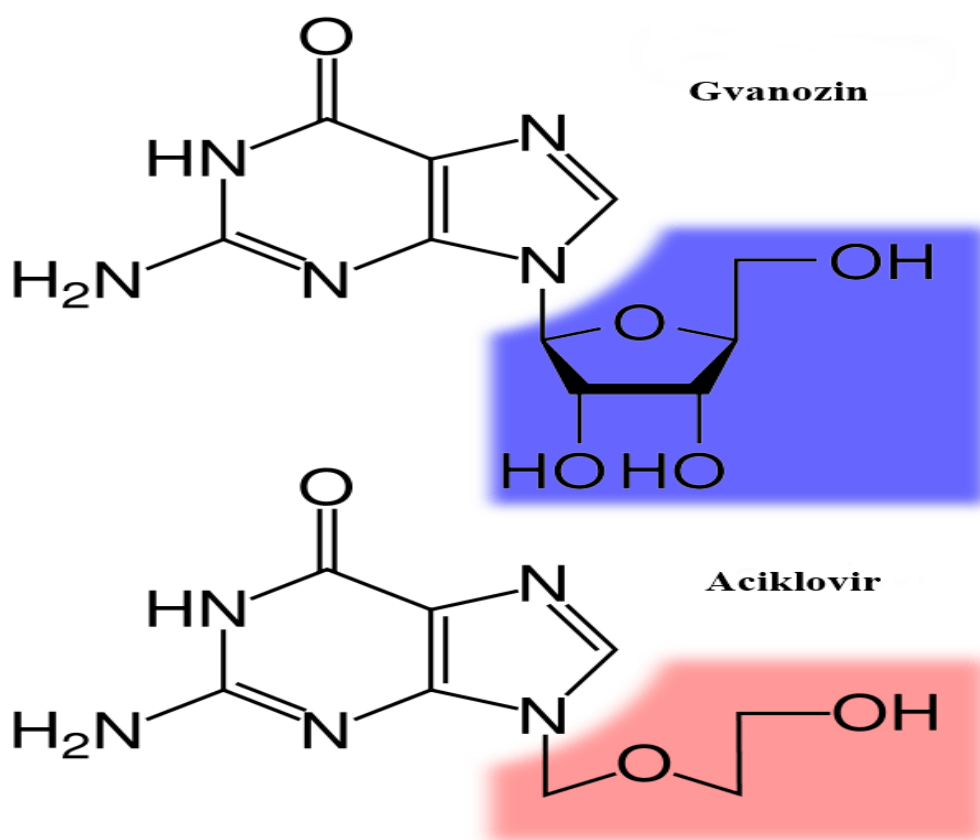
Baze i analozi nukleotida su korisni također i za liječenje virusnih bolesti. Jedan od primjera je dideoksiadenozin koji nema 3-OH skupinu na deoksiribozi.<sup>13</sup> Budući da 3- i 5-OH skupine formiraju vezu duž lanca DNA, inkorporiranje dideoksiadenozina u DNA koja se replicira, uzrokuje kraj sinteze. Stanične DNA-polimeraze ne inkorporiraju efikasno dideoksiadenozin, tako da ima ograničenu citotoksičnost. Reverzne transkriptaze u retrovirusima poput HIV-a koriste efikasno dideoksiadenozin koji vodi do prekida sinteze virusne DNA. Inhibitori reverznih transkriptaza poput dideoksiadenozina su standardne komponente terapije za HIV.



Slika 24. Struktura dideoksiadenozina

## 2.5.7. Aciklovir

Aciklovir je antivirusni lijek i analog gvanozina kojeg mnogi enzimi prihvaćaju kao supstrat. Uglavnom su to enzimi virusa iz skupine Herpes virusa, poput herpes simplex virusa, citomegalovirusa, varicella zoster virusa i mnogih drugih. To su relativno veliki i složeni virusi koji ne sadrže samo osnovni minimum enzima poput polimeraza nukleinskih kiselina, već sadrže i svoje nukleotid-kinaze. Toksičnost aciklovira za stanice virusa, a ne za normalne stanice, temelji se na dvjema činjenicama. Prvo, aciklovir se fosforilira pomoću timidin-kinaze u monofosfat samo virusnim nukleozid-kinazama, a ne staničnim enzimima. Drugo, trifosfat koji nastaje iz monofosfata pomoću staničnih kinaza, prihvaćaju samo virusne DNA polimeraze kao supstrat. Taj dvojni mehanizam čini aciklovir vrlo efikasnim u borbi protiv raznih virusnih bolesti.<sup>14</sup>

Slika 25. Usporedba struktura gvanozina i aciklovira<sup>15</sup>



## § 3. LITERATURNI IZVORI

---

- 1 D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth edition, USA: W. H. Freeman and Company, 2005, str. 862-878.
- 2 P. J. Russell, *iGenetics A Molecular Approach*, Third edition, USA: Pearson, 2010.
- 3 I. Lieberman, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **207** (1954) 911-924.
- 4 J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Fifth edition, USA: W. H. Freeman and Company, 2002.
- 5 I. M. Kompis, K. Islam, R. L. Then *Chem. Rev.* **105** (2005) 593–620.
- 6 R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochemistry*, Fourth edition, USA: Brooks/Cole, 2010, str. 830
- 7 P. Pacher, A. Nivorozhkin, C. Szabo, *Pharmacol Rev.* **581** (2006) 87-114.
- 8 <https://www.drugs.com/monograph/methotrexate.html> (datum pristupa 9. Kolovoza 2018.)
- 9 D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer* **35** (2003) 330-338.
- 10 <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/PIL/381-05-L-2296.pdf> (datum pristupa 11. Kolovoza 2018.)
- 11 S. Sahasranaman, D. Howard, S. Roy, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **648** (2008) 753-767.
- 12 C. A. Nichol, A. D. Welch, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **742** (1950) 403-411.
- 13 [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_\\_3\\_-Dideoxyadenosine#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2__3_-Dideoxyadenosine#section=Top) (datum pristupa 11. Kolovoza 2018.)
- 14 E. de Clercq, H. J. Field, *Br. J. Pharmacol.* **1471** (2006) 1-11.
- 15 <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Guanosine-acyclovir-comparison.png> (datum pristupa 16. Kolovoza 2018.)