

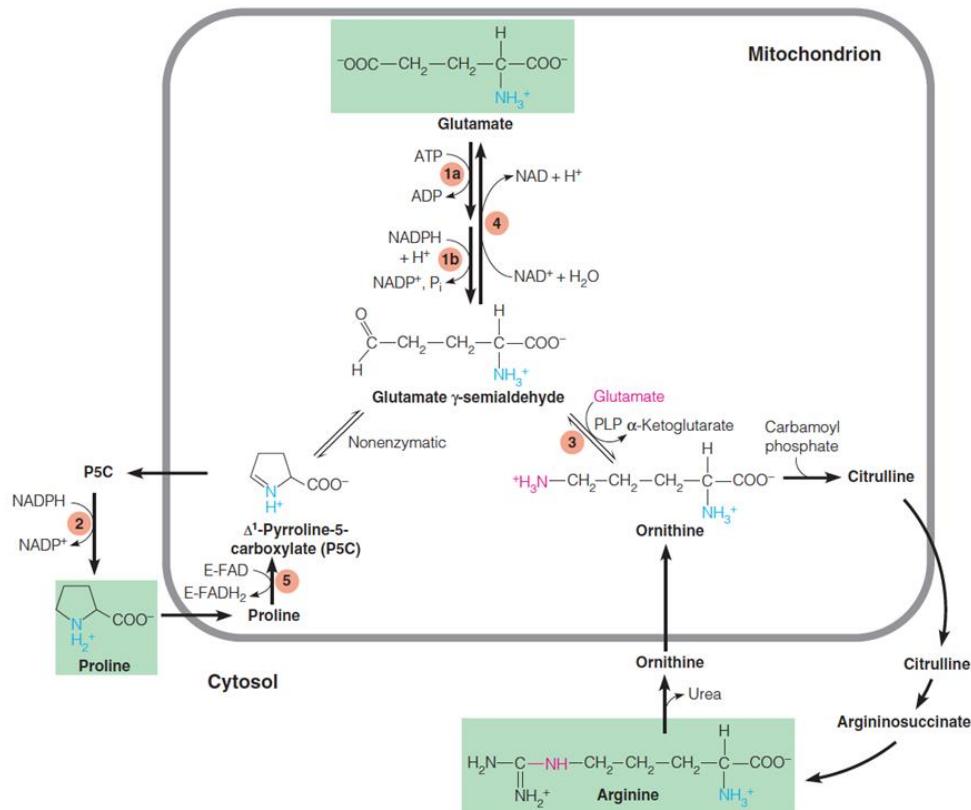
章節：CH21&22

教師：簡昆鎰

日期：2014/5/13

撰稿組：偉柏、俊謙、振宇、家銘
審稿組：浩綱、浩平、孟均、紹衡**CH21 Metabolism of Nitrogenous Compounds II****一、 Proline, Ornithine, Arginine 的合成：(從 Glutamate)**

(1) 人體：



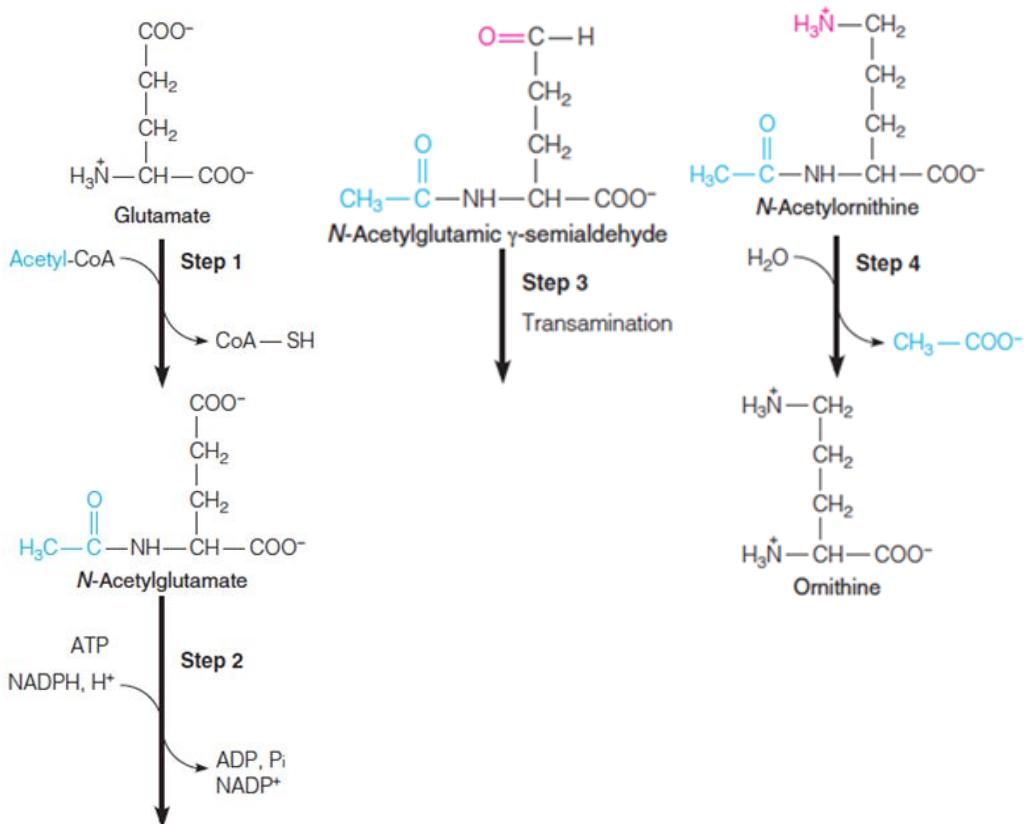
紅色圈圈表示 enzyme

1. Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate (P5C) synthase 由兩個次單元組成：
 - 1a. Glutamate kinase
 - 1b. Glutamyl phosphate reductase
2. Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylate reductase
3. Ornithine δ -aminotransferase
4. Glutamate γ -semialdehyde dehydrogenase
5. Proline oxidase

雖然上述反應的產物可以透過類似的反應合成和分解，卻透過不同的物質來調控，如：Proline 的合成透過 NADPH 而分解則透過 E-FAD，因此細胞才能防止 Proline 在合成的同時會被分解。

(2) 細菌：

細菌把 Glutamate 乙醯化(acetylated)來防止環化(cyclization)的發生。



(3) 植物：

植物可以透過下列方式得到 glutamate γ -semialdehyde。



(4) Glutamate 作為何者的前驅物呢？

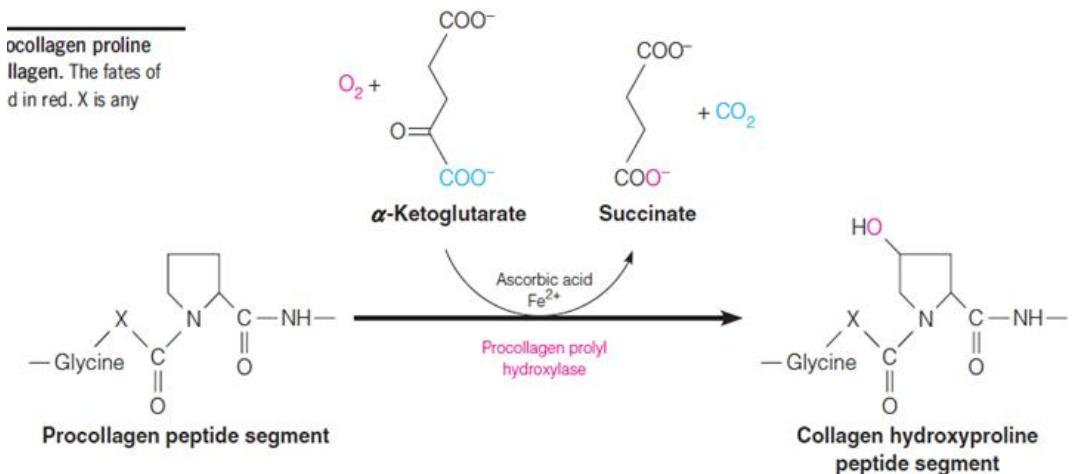
Glutamine	Creatine phosphate
Arginine	Proline
Polyamines	Hydroxyproline
Glutathione	γ -Aminobutyric acid

二、 Hydroxyproline and Collagen

Proline 在形成結締組織蛋白時扮演很重要的角色，作為 hydroxyproline 的前驅物。還沒被羥化(hydroxylated)的膠原蛋白(collagen)前驅物被稱為膠原蛋白原(procollagen)，而這串多肽鏈(polypeptide)上，距離 glycine residue 兩個原子遠的

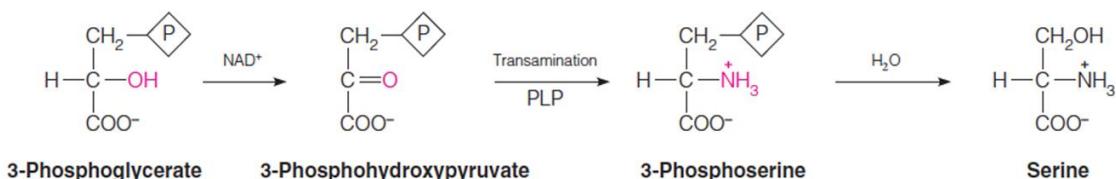
羧基面(carboxyl side)上的 proline residue 是 procollagen prolyl hydroxylase 喜歡作用的位置。

而這種酶反應時，就算缺少抗壞血酸(ascorbate)仍然能繼續反應，但是 procollagen prolyl hydroxylase 有時候只會把 α -ketoglutarate 變成 succinate，而沒把 Proline 給羥化(hydroxylate)，最後 Fe(II)會被氧化且酶會變不活化態。抗壞血酸(ascorbate)的確切角色雖然並不清楚，但是可以使得被氧化的鐵回復到 Fe(II)狀態，而酶也變回活化態，至於抗壞血酸(ascorbate)自己則變成脫氫抗壞血酸(dehydro ascorbate)。這個反應展現了抗壞血酸(ascorbate)和 vitamin C 在人體內的被明確知道的功能之一。

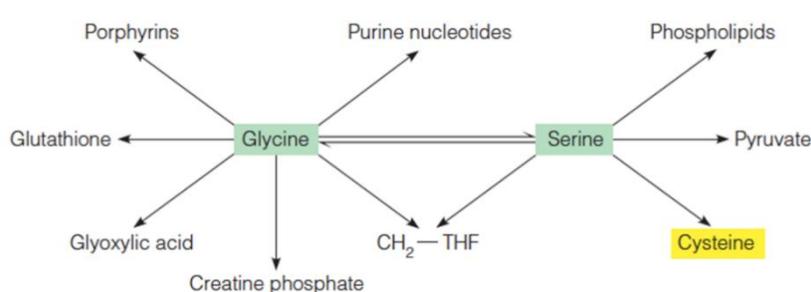


三、 Serine, Glycine 的合成：(從 3-phosphoglycerate)

雖然 serine 可以透過 glycine 來合成，但更多的時候，serine 會反向合成 glycine 和 5, 10-methylenetetrahydrofolate。所以生物體中大多數的 serine 都是從糖酵解的中間產物 3-phosphoglycerate 經下方的三個步驟反應而來的。在細菌和植物中，第一步仰賴 NAD⁺的反應受到 L-serine 的回饋所抑制，而在哺乳類動物組織中，有 phosphoglycerate dehydrogenase 會受到低濃度的 serine 所調控。在肝臟裡有著最後一步反應所需的酶 phosphoserine phosphatase，卻有著高濃度的 L-serine 來回饋所抑制反應，和大部分反應將重要管控的酶放在反應路徑的前端有所不同。

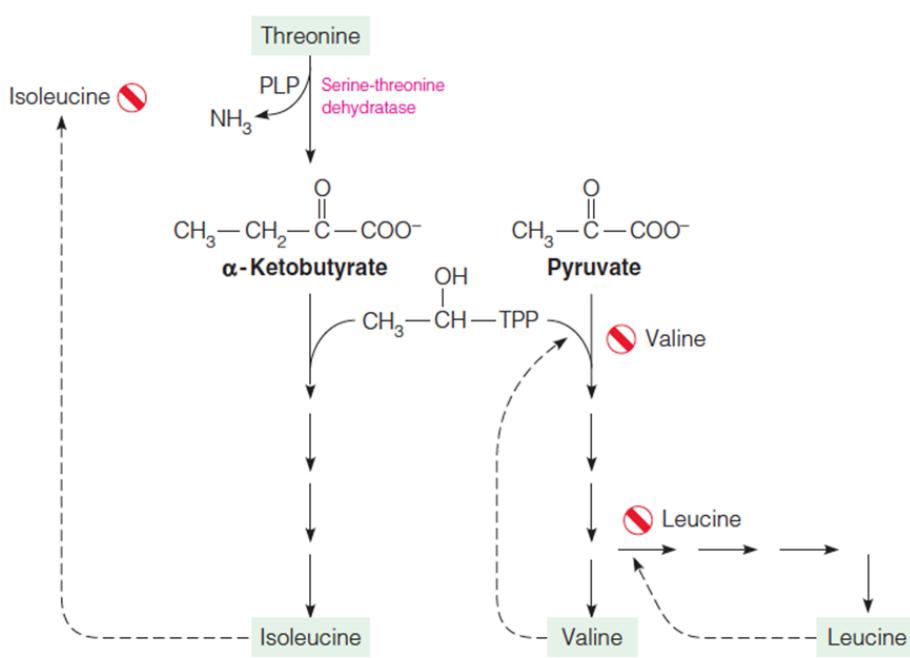


Serine 的角色有用於合成 phospholipids 和 cysteine，而且能夠活化 one-carbon units to the pool of tetrahydrofolate coenzymes；glycine 做為 glutathione, purine nucleotides,

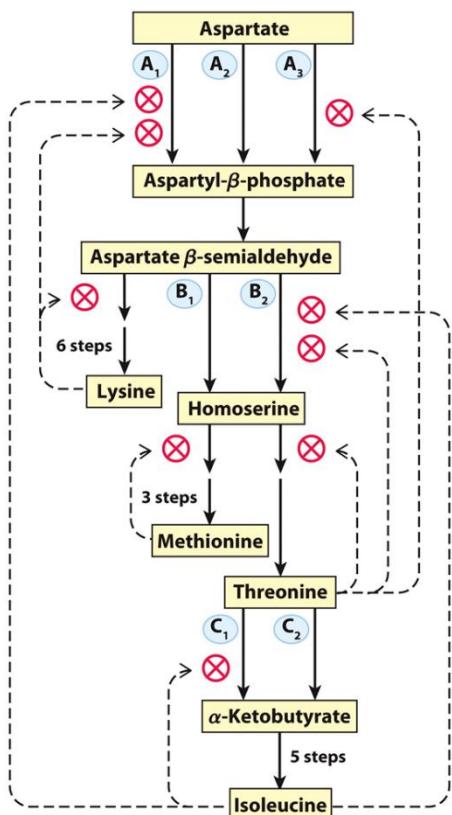


porphyrins 的前驅物，也對於 one-carbon pool 做出貢獻。

四、Valine, Leucine, Isoleucine 的合成：(從 Pyruvate)



右圖為新課本的圖，而右下圖為 Lehninger 課本用來詳述在大腸桿菌從天門冬氨酸合成一些氨基酸過程和其環

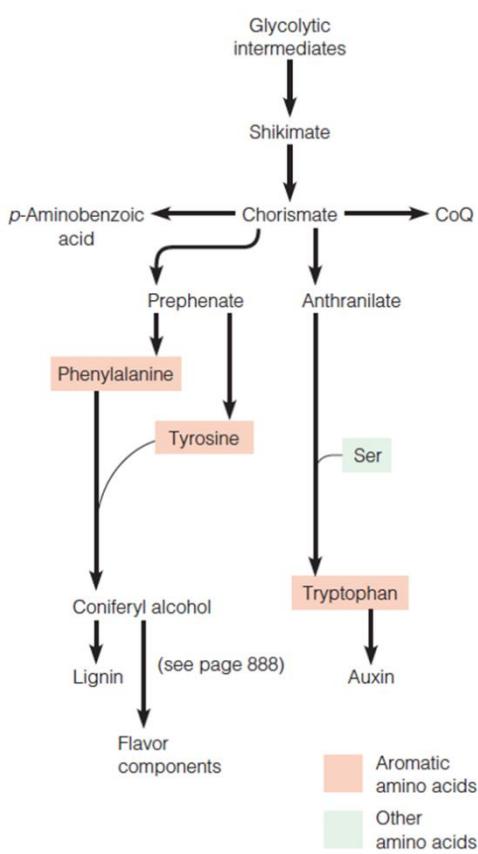


環相扣的監管機制。從右下圖可以發現每個新合成的產物，都只會去抑制一到三個反應，這叫 enzyme multiplicity，功能是讓整個反應不會因為一種產物的生成使整個反應停擺，進而導致其他人體需要的產物無法合成。

Figure 22-24
Lehninger Principles of Biochemistry, Sixth Edition
© 2013 W. H. Freeman and Company

五、 The Shikimic Acid Pathway :

(從糖酵解的中間產物(glycolytic intermediate)合成 aromatic amino acids)

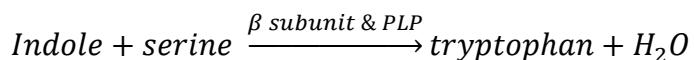
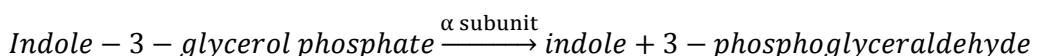


動物在演化的過程中失去了生成大部分環狀物的能力，只有一個例外：the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine，其他都必須經植物及微生物來反應，反應一開始的碳原子都是由 PEP 和 erythrose-4-phosphate(在 pentose phosphate pathway)有談過)而來的。

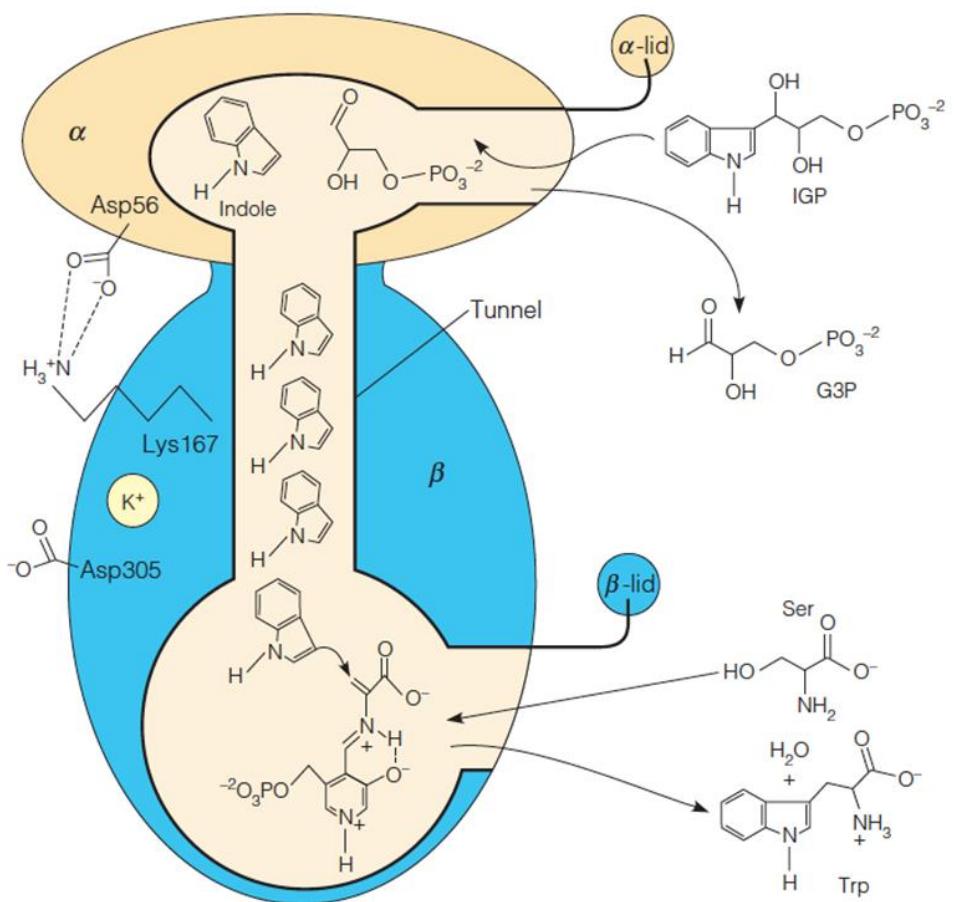
在<圖三>的反應六中在高等植物裡會受到 EPSP synthase(5-enoylpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)來催化，這種酶會被 glyphosate(glycine phosphate)所抑制，從而阻止植物生長，所以 glyphosate 被廣泛運用於除草劑中，而現在農產多做過基因改良對上述物質免疫。

而在 the shikimic acid pathway 中出現的許多酶<圖二>，在細菌中都是由一個叫色氨酸操縱子(tryptophan operon)的基因所轉譯。在形成 tryptophan 的最後一步驟，由一種叫

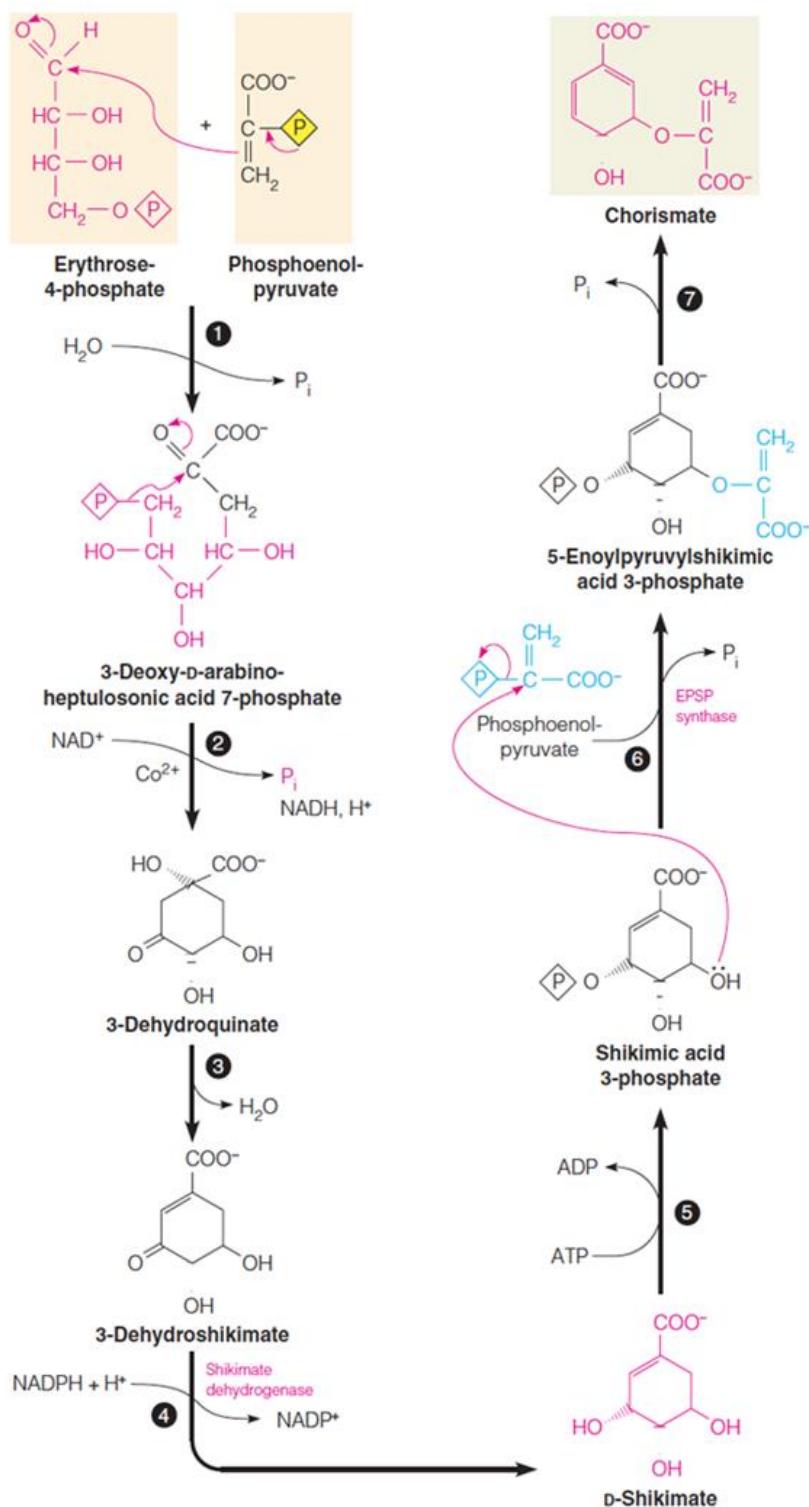
tryptophan synthase 的酶來完成，是一個 $\alpha_2 \beta_2$ dimer，而獨立的 α 與 β 次單元催化了後來的局部反應。



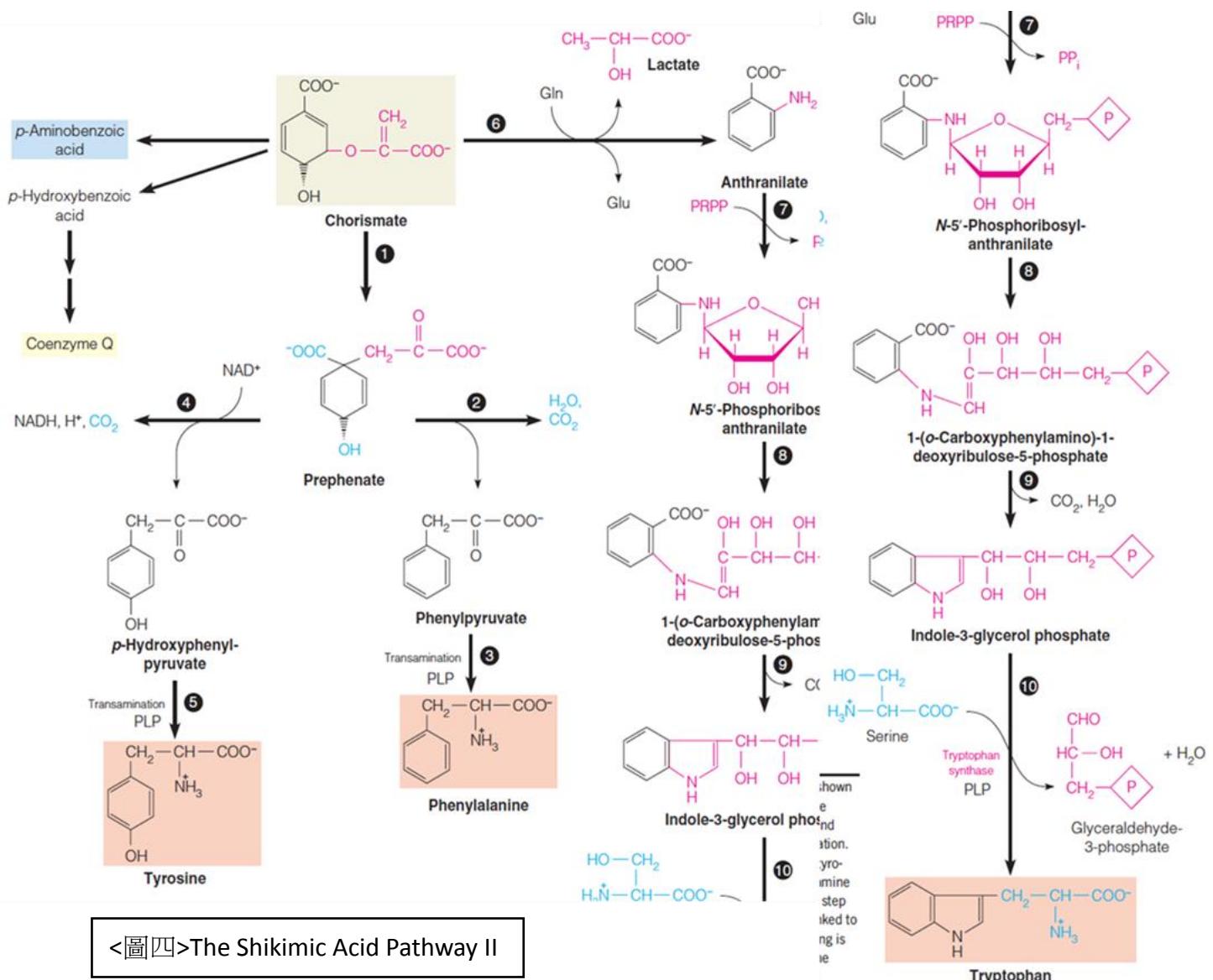
在 α 與 β 次單元間有一條長 25Å 的相連通道 (tunnel)，裏頭充滿了 Indole 粒子，而在通道的兩端都有一個蓋子(lid)會輪流開關來維持 Indole 留在通道內，這樣的構造可以確保受質的濃度夠高，而不是四散於溶液中。而如圖所示有一個K⁺的結合位置和附近的鹽橋，是連接兩個次單元的變構連結(allosteric linkage)。



<圖二>Tryptophan Synthase



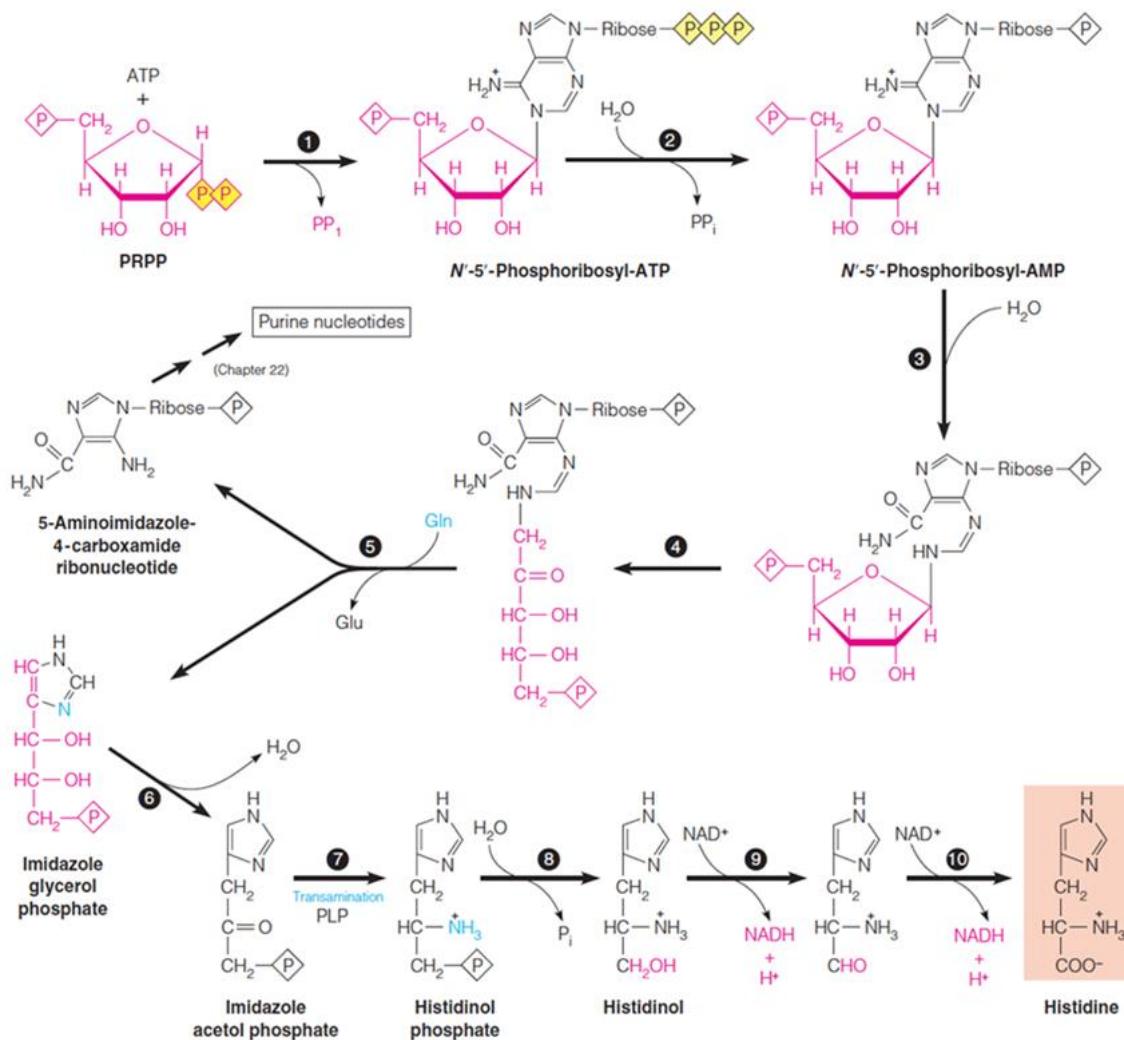
<圖三>The Shikimic Acid Pathway I



<圖四>The Shikimic Acid Pathway II

六、 Histidine 的合成：(從 Glycolytic Intermediate)

在細菌裡，這十個反應所用的酶的基因都按照順序排列在組氨酸操縱子 (histidine operon)。



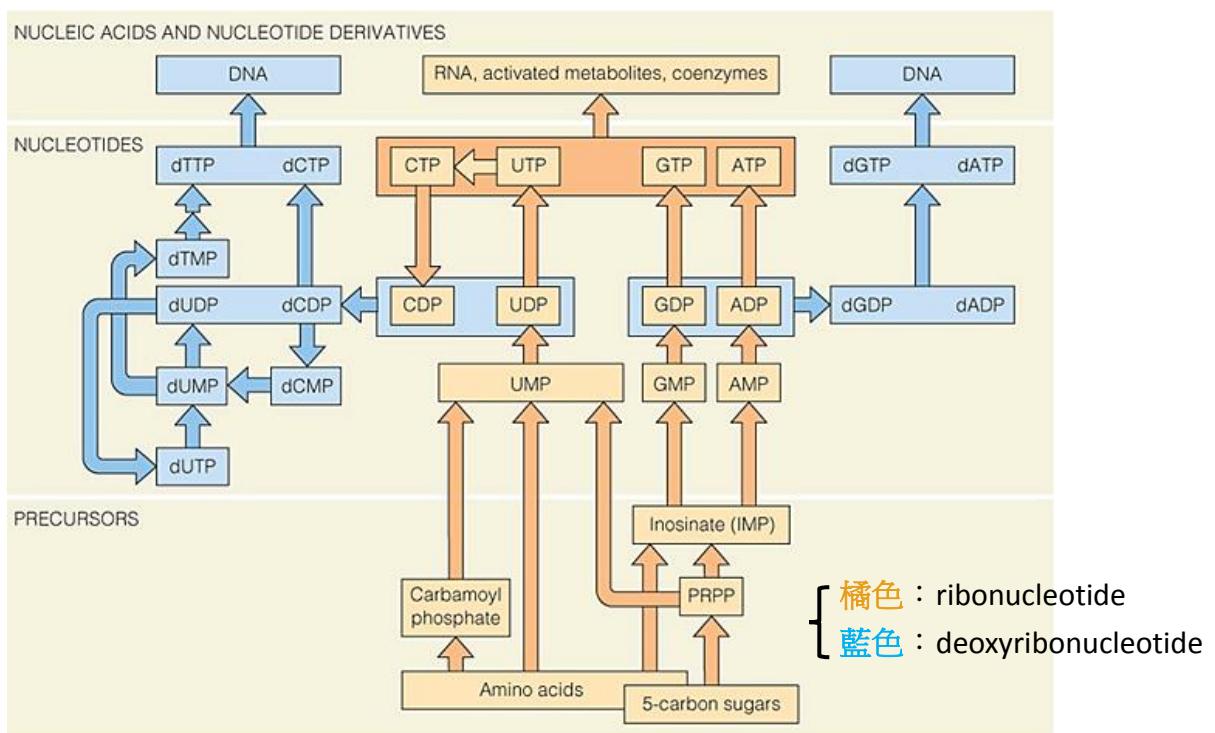
CH22 Nucleotide Metabolism

核酸(nucleic acid)的基本單位是核苷酸(nucleotide)。去氧核糖核酸(deoxyribonucleotide)是組成 DNA 的核苷酸，核糖核苷酸(ribonucleotide)是組成 RNA 的核苷酸。核苷酸可以進一步水解為核苷(nucleoside)和磷酸，核苷又可以水解為五碳糖(pentose)和鹼基(base)。體內核酸濃度的恒定，必須藉由核酸的分解、從頭合成(de novo pathways)及補救合成(salvage pathway)等路徑來調節。

一、核甘酸合成(nucleotide biosynthesis)路徑的分類：

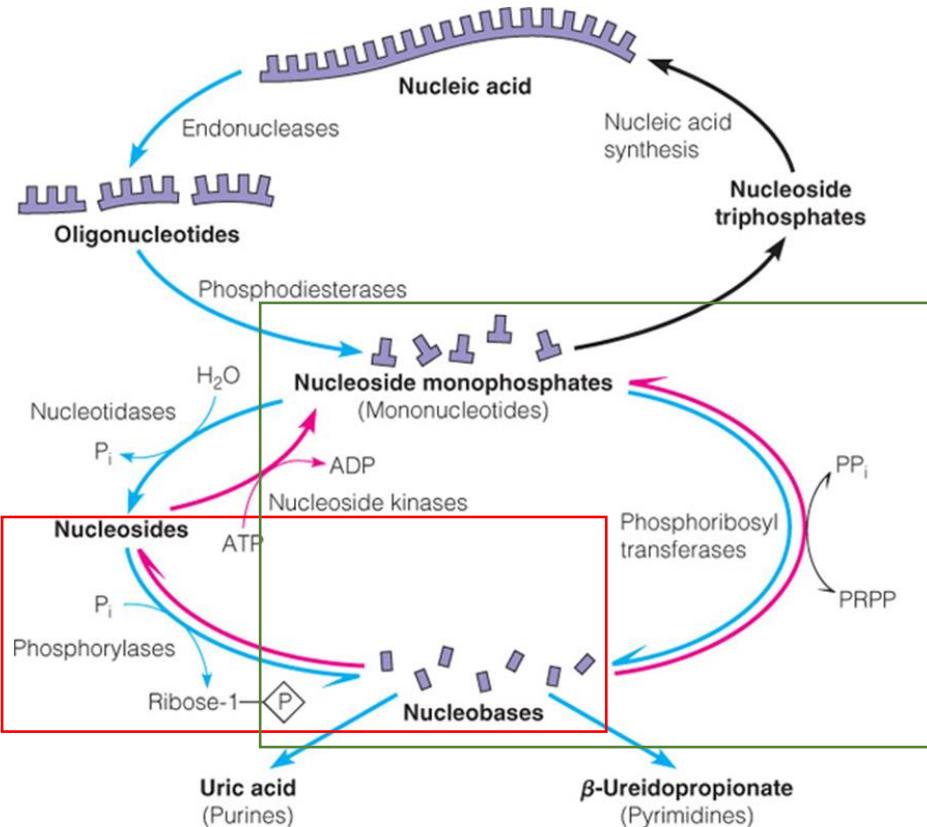
	從頭合成 (de novo pathways)	補救合成 (salvage pathways)
功用	大部分的生物都可以從低分子量前驅物(low-molecular-weight precursor)，如：磷酸核糖、氨基酸、一碳單位(one-carbon units)與 CO ₂ 經酶連續反應來合成所需的核甘酸(nucleotide)。	由於身體有些部位，如：腦、脊髓，缺乏從頭合成的酶，只能直接利用來自飲食或酶的分解來獲得的鹼基(base)或核酸(nucleic acid)為基礎，來進一步合成核甘酸(nucleotide)。
意義	是核苷酸合成主要途徑	一種重新利用的過程

(1) 從頭合成 (de novo pathways)



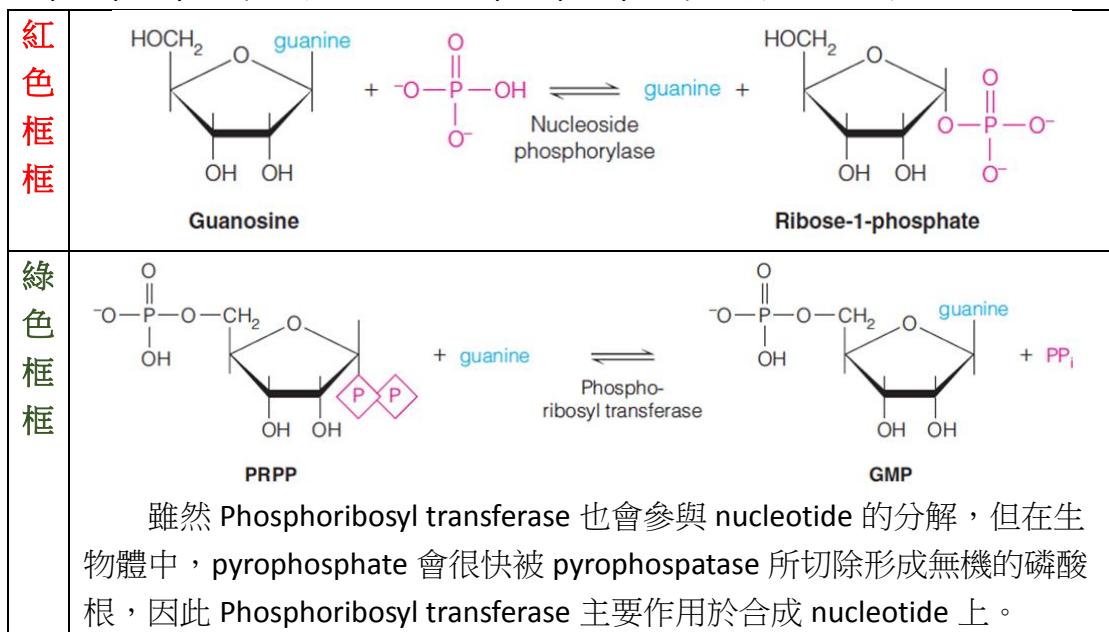
(2) 補救合成 (salvage pathways)

{ 藍色箭頭 : catabolism
洋紅色箭頭 : salvage pathways



nucleic acid 會在細胞死亡後或小腸消化時，由 endonucleases 等酵素來

分解。不過上述的酵素並非都是普遍存在的，例如：在動物體內既沒有 guanosine kinase(專屬於 guanosine 的 nucleoside kinase)也沒有 uridine phosphorylase(專屬於 uridine 的 phosphorylase)，卻存在於其他生物體內。



前言:

我是阿甘，在以下我負責的這個部分主要介紹:

第一部分.Purine(嘌呤)的合成、分解以及代謝疾病

1. De novo Biosynthesis of Purine Nucleotides

(salvage pathway 較簡單，課本也只針對 De novo，所以沒有也不需感到奇怪)

2. Purine Degradation

3. Clinic Disorders of Purine Metabolism

第二部分.Pyrimidine(嘧啶)的合成、分解

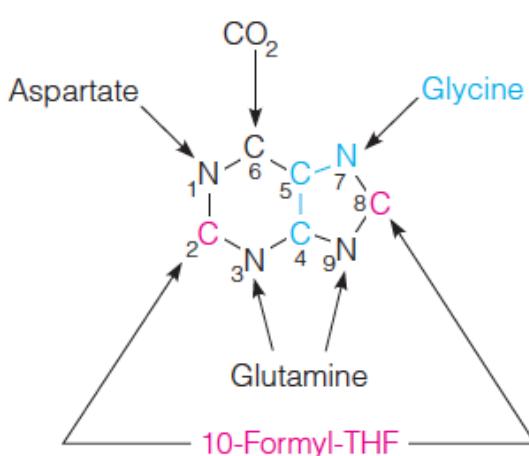
1. De novo Biosynthesis of the Pyrimidine Ring

2. Salvage Synthesis and Pyrimidine Catabolism

主要以上課老師所講的重點為主，一些課本內容還是會補充

二、De Novo Biosynthesis of Purine Nucleotides :

(1) De Novo Purine Biosynthesis 的發現與早期的研究



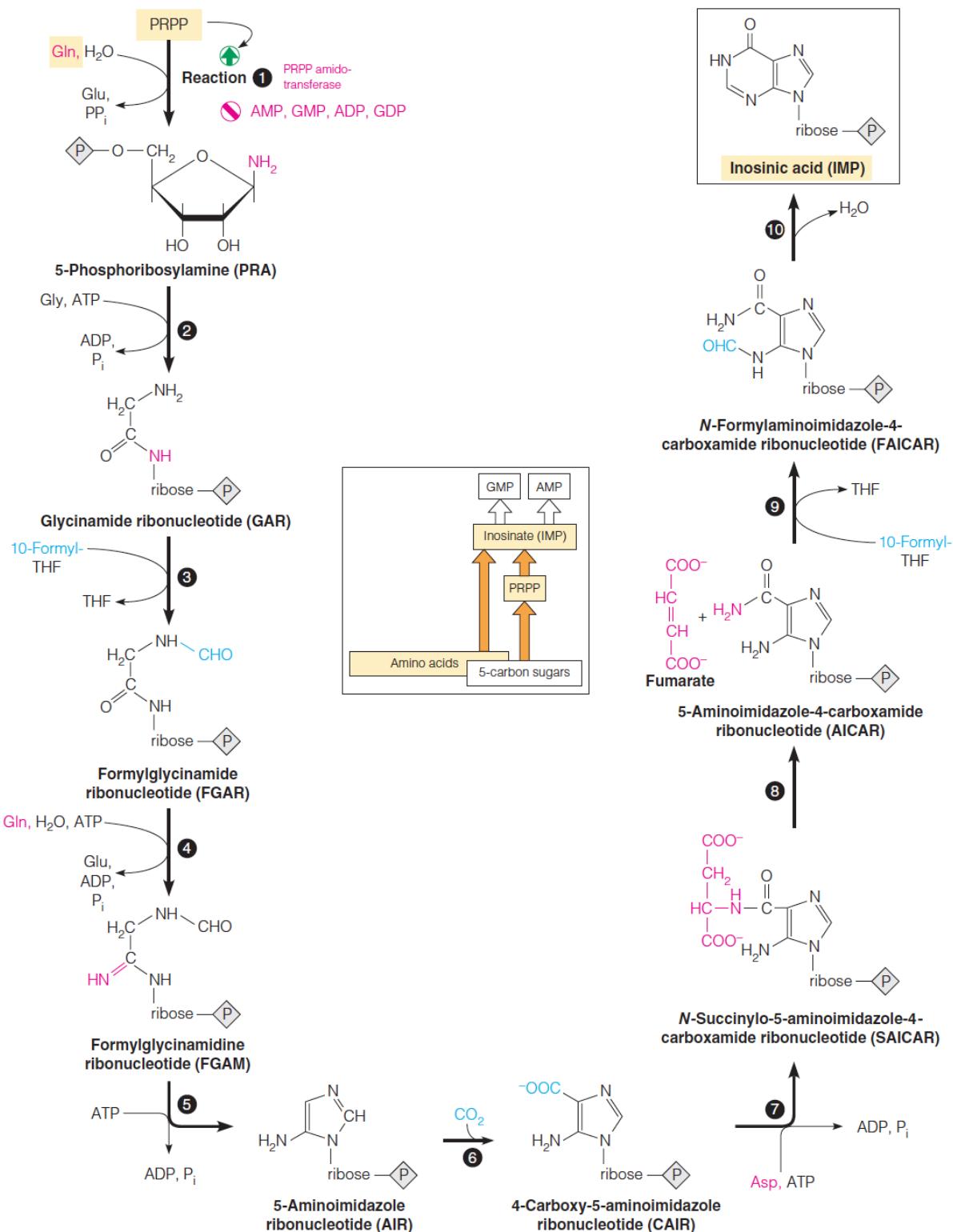
Salvage pathway 的概念像是將我們所分解出的廢物，重新再利用的過程；而 De Novo pathway 則是從小分子來合成，正如同左圖(嘌呤的雙環結構)，每個原子都來自不同的小分子，如:C₅C₄N₇來自 Glycine。

另外，嘌呤的結構其實相當好畫，中間兩個 C，左右再延伸出去 N、C、N 即可。重點在於：了解原子是來自哪個小分子，但可在介紹合成過程

時，再背即可。而 De Novo Purine Biosynthesis 的發現，是因為發現了鳥類會排放含氮廢物 uric acid(尿酸)，而 uric acid 是 Purine 的代謝產物，經由讓鴿子吃下同位素標定的化合物，再分析排出的 uric acid，即可了解關於 De Novo pathway 的合成機制。

(2) Purine Synthesis from PRPP to Inosinic Acid

這個部分說明嘌呤的合成機制，當然，說到嘌呤指的只有 Adenine(腺嘌呤)及 Guanine(鳥糞嘌呤)，所以這個部分只說明了 A、G 的合成過程，至於 C、T、U 的合成或分解會在之後再交代，也可看從頭合成 (de novo pathways)那張圖，再來了解。至於 PRPP 是甚麼，因為我 21 章也還沒看，但我們可以從 salvage pathway 的綠色框框來了解，PRPP 可藉酵素將其焦磷酸根(pyrophosphate)以-NH₂ 來做替換。而老師有說：嘌呤與嘧啶合成的差別主要在於 前者的環已經依附在五碳糖上再做小部分的修飾(nucleotide level)，而後者的環：先將環合成好後，再接到五碳糖上(free base level)。



Reaction1: N₉ 來自 Glutamine , Gln--->Glu , 氨基接上 PRPP , 形成雙環結構的 N₉

在合成為 IMP 的過程，有兩個 glutamine amidotransferase reaction 分別在 1、4，但這兩者還是不太一樣，因為 Reaction1 的 substrate(PRPP)已經是被 ATP 活化過的產物，所以 Reaction1 不須 ATP。大家或許有印象，核苷酸的含氮鹼基都是位在五碳糖的第一個碳而且成 Beta-configuration，因為經過 Reaction1 後，原來 PRPP 的 Alpha-configuration 就轉成 Beta。

Reaction2: Glycine 與 PRA 上的胺基形成肽鍵

ATP 主要的作用在於活化 Glycine 的羧基, 才可以遭到胺基的 nucleophilic attack。

Reaction3: C₈ 來自 10-Formyl-THF

藉 transformylase 的作用, 將 10-Formyl-THF 的 formyl(甲醯基)轉到 Glycinamide 的 N 上。

Reaction4: N₃ 來自 Glutamine , Gln--->Glu , 氨基接上 FGAR

需藉由 ATP-dependent amidotransferase 來催化, 與 Reaction1 不同。

Reaction5:ATP-dependent ring closure

Formyl 的 C 需要藉由 ATP 的 γ-phosphate(最外面的 P)來活化, 才可以遭到胺基的 nucleophilic attack, 而形成環。

Reaction6: C₆ 來自 CO₂ , carboxylation of AIR to form CAIR

Higher organism:不須 ATP, 可直接進行 carboxylation

Bacteria,fungi,plant:需要 ATP, 且分成兩個步驟

(不用很清楚也沒關係, 不重要)

Reaction7、Reaction8: N₁ 來自 asparate

7:Aspartate 整個接上 Reaction6 的 C₆

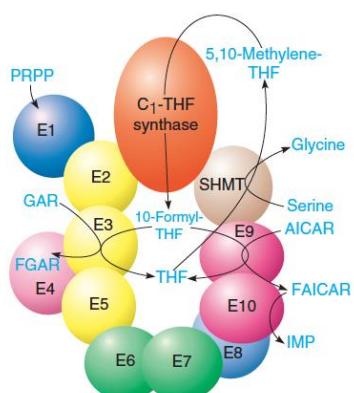
8: α, β-elimination, 只剩胺基留著。

Reaction9: C₂ 來自 10-Formyl-THF

藉 transformylase 的作用, 將 10-Formyl-THF 的 formyl(甲醯基)轉到 AICAR 的 N 上。

Reaction10:internal condensation(縮合)形成環, 第一個 purine 的產物

inosinic(IMP)

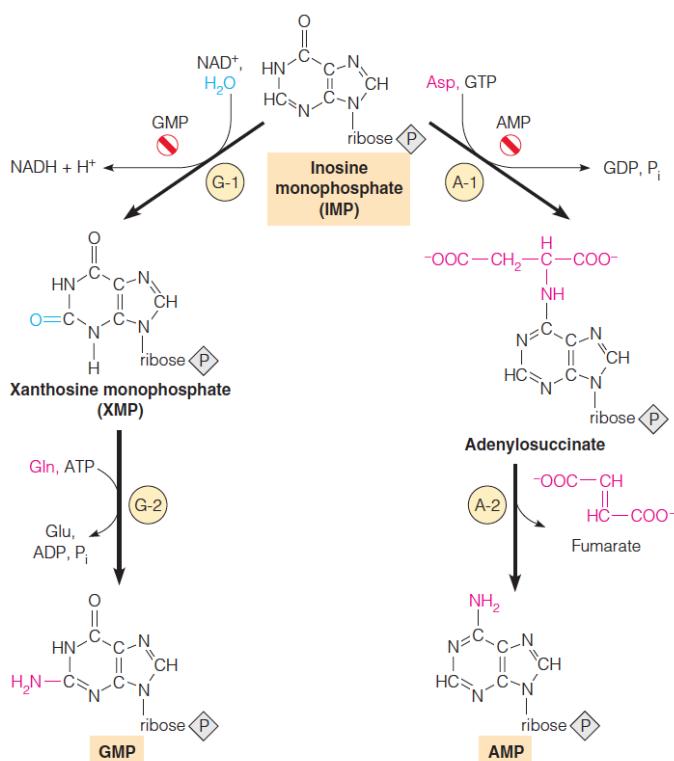


左圖為 purinosome

是在脊椎動物的 cell 中執行這 10 步反應的 multi-enzyme complex that transforms PRPP to IMP

而這 10 步反應是由小於 10 個的 enzyme 來作用的。也就是說, 有多個反應的 multifunctional enzyme 存在。如圖中的, E2、E3、E5 為同一個 Protein(圖上的數字及對應上述的反應)但最重要的還是: complex 形成 channel, 如此一來, intermediate 不易被分解, 儘管濃度低也可以傳遞到另一個作用位。

(3) Synthesis of ATP and GTP from Inosinic acid



IMP 在合成 purine 的過程代表一個分支點，也就是各自開始合成 A 與 G。左圖即是從 IMP 開始到 GMP(or AMP)的過程。

三個不同地方要記住的：

A. 氨基加的位置不同

GMP: 加在 C2 上

AMP: 加在 C6 上

(怎麼數可看上上上頁)

B. 氨基的來源

GMP: Glutamine

AMP: Asparate

C. 能量的來源

GMP: ATP

AMP: GTP

(兩者相互調控，不會有一邊合成比較多，一邊合成比較少的問題)

但是 Nucleotides are active in metabolism primarily as nucleoside triphosphate，所以在 GMP 及 AMP 合成完後，兩個又再經由各自的 specific ATP-dependent kinase 合成為 GDP 及 ADP。



在 GDP 及 ADP 合成完後，

ADP 經由氧化磷酸化、光和磷酸化、受質階層磷酸化或是上述這個的逆反應形成

GDP 則是經由 nucleoside diphosphate kinase 來催化，從 ATP 得到磷酸根，形成 GTP



而 A 及 G 形成 deoxyribonucleotide for DNA synthesis:

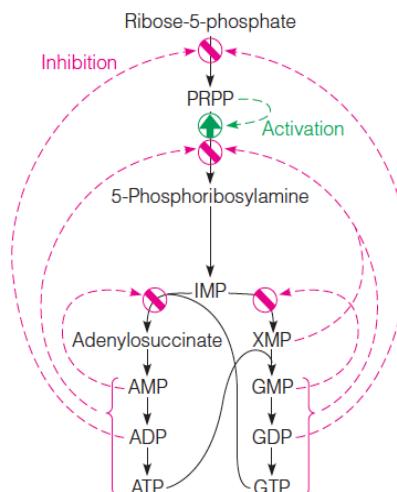
開始於 ribonucleoside diphosphate，經過還原形成 deoxyribonucleoside diphosphate，再經過 nucleoside diphosphate kinase 來催化而形成 dATP、dGTP。

(4) Regulation of De Novo Purine Biosynthesis

介紹完了合成，當然就是如何調控：見下圖

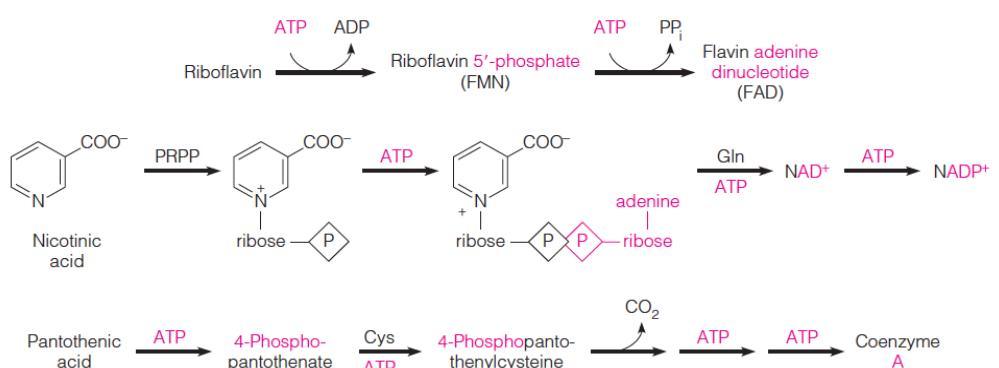
老師沒有特別強調，有個印象即可。

像:PRPP 可以活化 PRPP amidotransferase



(5) Utilization of Adenine Nucleotides in Coenzyme Biosynthesis

而 purine nucleotides 還有一個很重要的功能，就是合成輔酶，尤其是那些含了 adenylate moiety 的輔酶，包括 FMN or FAD、NADP+以及 Coenzyme A，詳見下圖，但老師沒特別強調，我想記住 FMN or FAD、NADP+以及 Coenzyme A 應該就可以了。



三.Purine degradation(嘌呤的分解)

這部分了解架構應該就可以了

第一步 Nucleotidase 催化，將 nucleotide 轉為 nucleoside

第二步 Purine nucleoside phosphorylase(PNP)催化，將 Ribose 移出，nucleoside 轉為 base。但哺乳動物的 PNP 無法對 adenosine 及 deoxyadenosine 作用，所以需藉由 adenosine deaminase 催化轉為 inosine。另外，AMP 也可藉 AMP deaminase 轉為 IMP。

第三步 base 再經由酵素，統一轉為 Xanthine

第四部 Xanthine 再經 Xanthine dehydrogenase 催化形成 uric acid 尿酸(結構類似由兩個尿素組成)

All purine degradation leads to uric acid.

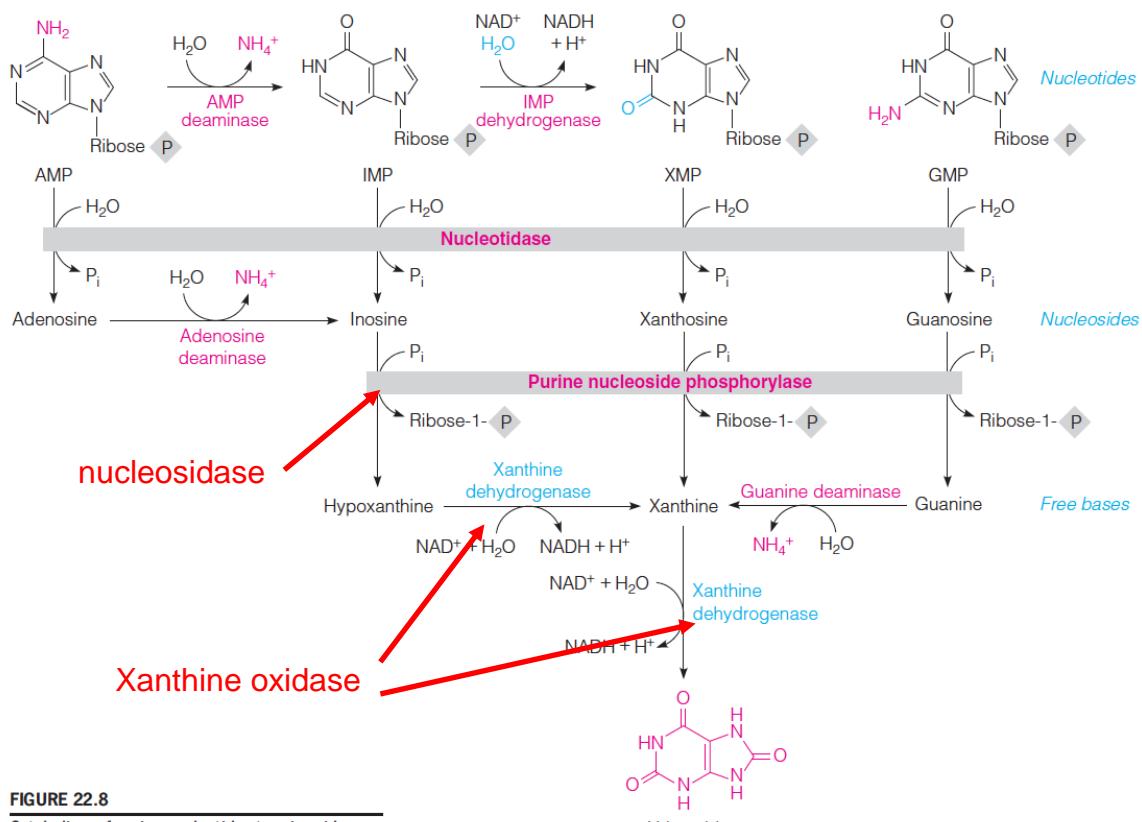
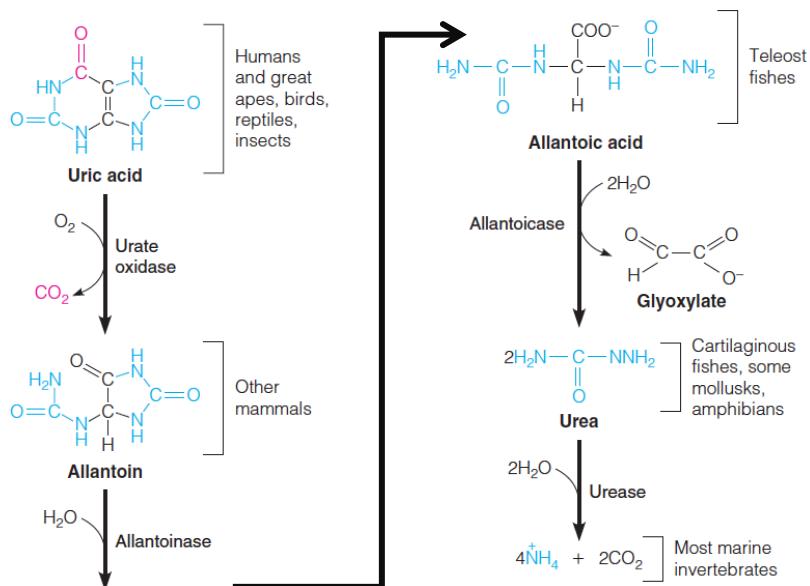


FIGURE 22.8

Catabolism of purine nucleotides to uric acid.

下圖為尿酸之後的代謝，最高等最早停，最低等最晚停



四. Clinic Disorders of Purine Metabolism

(1) 過量的尿酸累積：造成痛風

Uric acid 因為其 **insoluble** 的特性，如果過量，就會在關節處結晶，導致發炎，即是痛風。而造成痛風的原因有兩個：一. 尿酸排不出去 或是 二. 尿酸製造過多。而這裡要介紹的即是尿酸製造過多，有三個可能的造成原因。

第一個:

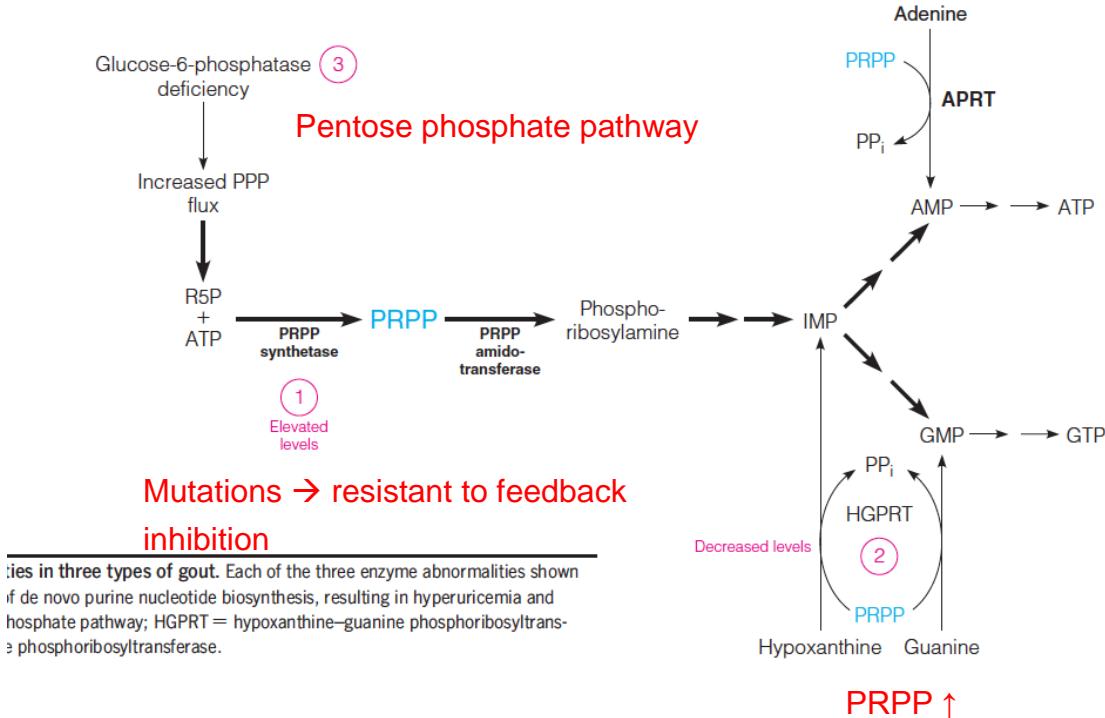
PRPP synthetase become resistant to feedback inhibition , PRPP 過多因而造成尿酸製造過多

第二個:

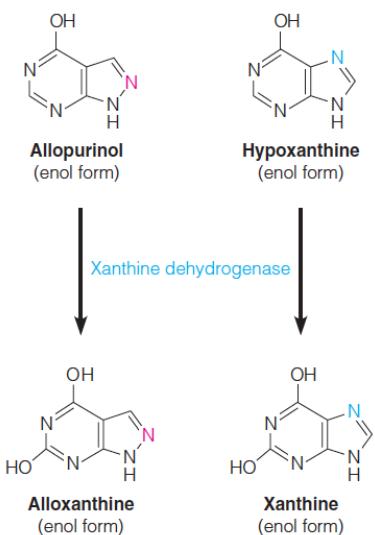
缺乏 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase(HGPRT) , 因而在 salvage pathway 中 , hypoxanthine 及 guanine 無法藉 PRPP 轉為 IMP 及 GMP 。 PRPP 沒被消耗 , PRPP 過多因而造成尿酸製造過多(Adenine 則是經 APRT 的 salvage pathway)

第三個:

Glucose-6-phosphatase deficiency 造成 Glucose-6-phosphate 過多 , 進入 pentose phosphate pathway 增加 , 造成 PRPP 過多 , 而造成尿酸製造過多。



治療藥物(必考)

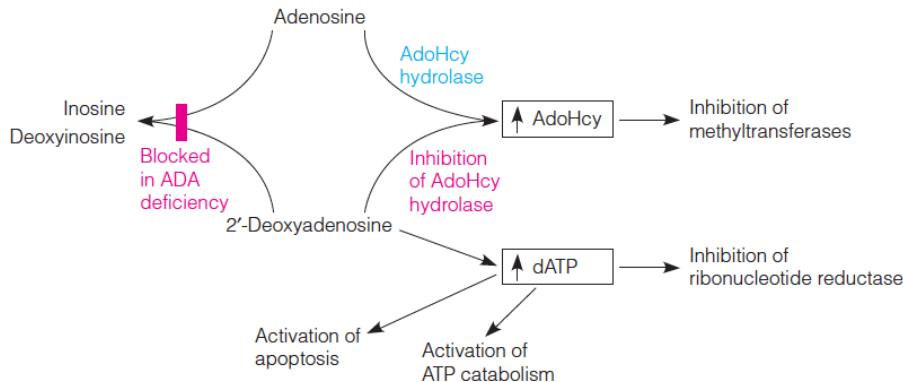


藥物 allopurinol 因為結構與 hypoxanthine 相似 , 當 xanthine dehydrogenase 與 allopurinol 反應 , 產生 alloxanthine , alloxanthine 會與 dehydrogenase 緊緊結合 , 拔不下來 , 抑制了 dehydrogenase 的作用 , xanthine 及 hypoxanthine 累積 , 不會被代謝為尿酸 , 又比尿酸更 soluble , 也較容易排出體外 。

(2) Lesch-nyhan syndrome

剛剛有提過，痛風的其中一個原因是 HGPRT 或是 APRT 的缺乏，但其實大部分這類痛風的病人，其 HGPRT、APRT 只是功能上有所不足，但還不至於完全無效。而 Lesch-nyhan syndrome 是一種 X 染色體的遺傳疾病，無法合成 HGPRT，可想而知，此類病人會具有嚴重的關節炎。有自虐的傾向以及神經系統的發育不全。

(3) SCID(多發性複合性免疫不全症)



許多病人的免疫缺乏的問題會歸結到 Adenosine deaminase(ADA)的缺乏，這是為什麼呢？

因為沒有了 ADA 將 adenosine 及 2'-deoxyadenosine 轉為 inosine, deoxyinosine，造成 adenosine 及 2'-deoxyadenosine 這兩者的增加，再加上 white cell 中，有許多 salvage pathway 的酵素，這兩者會逐漸形成 ATP、dATP。

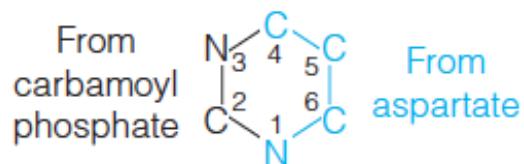
dATP 會阻止 NDP 轉為 dNDP，因而 DNA 無法複製，white cell 無法增生，免疫反應無法執行。另外，dATP 升高還會導致 apoptosis(細胞編成性死亡)。原因在上圖，2'-deoxyadenosine 對 S-adenosylhomocysteine(AdoHcy) hydrolase 是一種不可回復的抑制物(irreversible inhibitor)，AdoHcy 會累積，而 AdoHcy 又抑制 methyltransferase，因而 DNA 及組織蛋白(histone)的甲基化反應無法進行。

五.Pyrimidine Nucleotide Metabolism

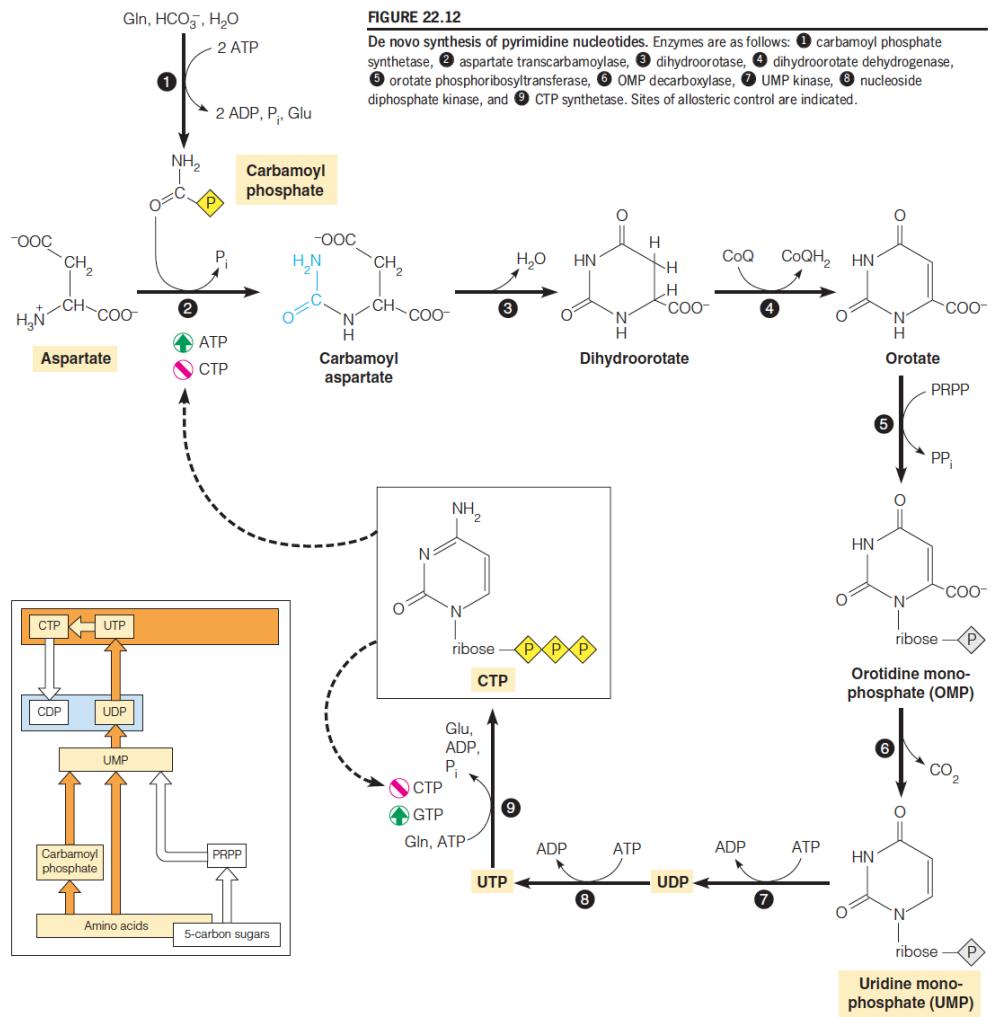
(1) De novo Biosynthesis of the Pyrimidine Ring

嘧啶的合成有三個重點：

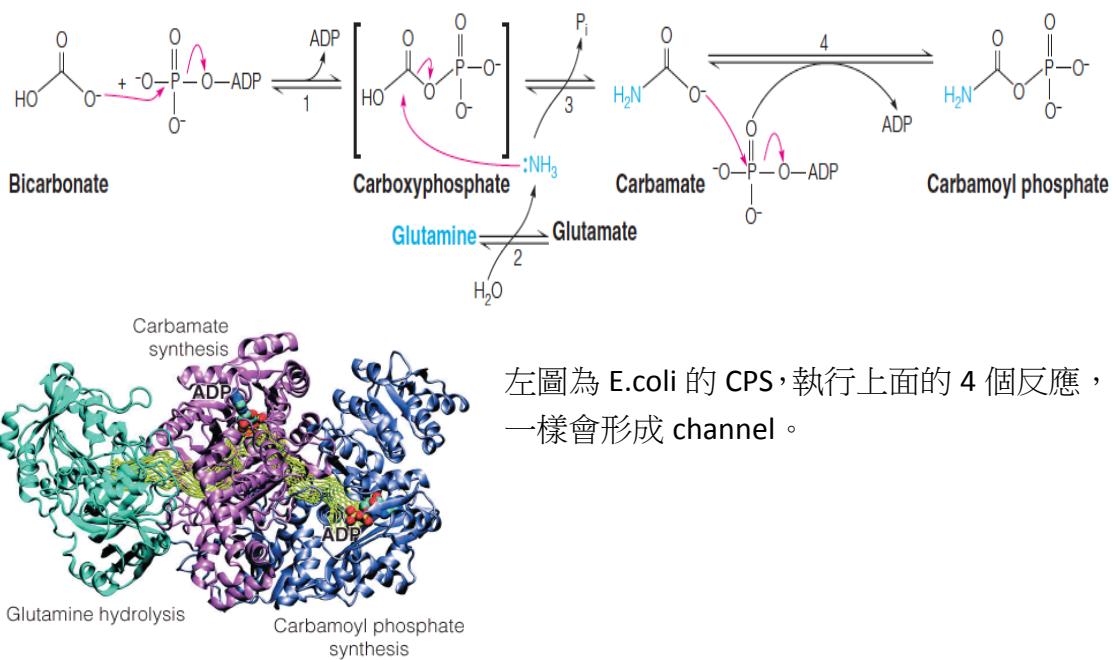
1. 環先合成好後，再接到五碳糖上
(free base level)
2. C(胞嘧啶)、U(尿嘧啶)的合成不像嘌呤的 A、G 有分支，是一路到底的。
3. Precursor 只有兩個:carbamoyl phosphate 以及 aspartate



下圖為 pyrimidine 的合成，看過了解，應該就可以了，酶不用背

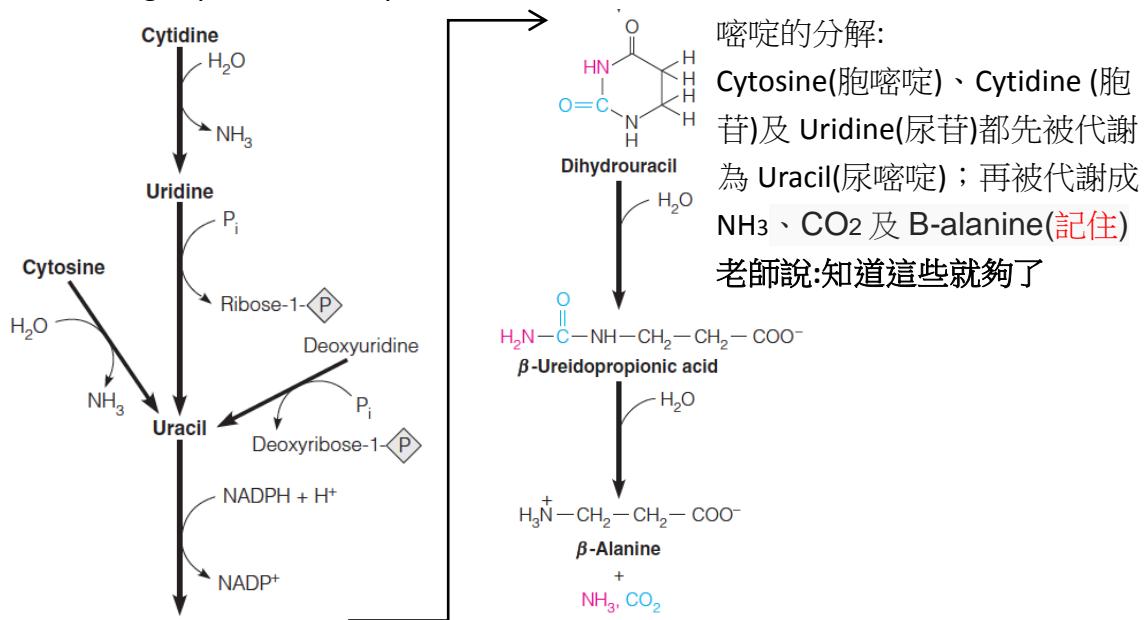


Pyrimidine 的合成開始於 formation of carbamoyl phosphate, 即 reaction 1, catalyzed by carbamoyl phosphate synthetase(CPS).Carbamoyl phosphate is formed from ATP, bicarbonate, and the amide nitrogen from glutamine.Reaction 1 也算是一種 amidotransferase reaction , 此反應包括四個步驟如下圖:



左圖為 E.coli 的 CPS, 執行上面的 4 個反應 , 一樣會形成 channel 。

六. Salvage Synthesis and Pyrimidine Catabolism



嘧啶的分解:

Cytosine(胞嘧啶)、Cytidine(胞昔)及 Uridine(尿昔)都先被代谢為 Uracil(尿嘧啶)；再被代谢成 NH₃、CO₂ 及 B-alanine(記住)

老師說:知道這些就夠了

七.Glutamine-Dependent Amidotransferase(不用背，但要知道概念)

在 purine 和 pyrimidine 的合成中，Glutamine 作為胺的提供者，將 NH_3 轉給 acceptor 時 會利用 ATP 的水解作為驅動力，而合成 purine 和 pyrimidine 的過程中會有五種反應的催化會用到 Glutamine-dependent amidotransferase。

1. PRPP amidotransferase ($\text{PRPP} \rightarrow \text{PRA}$)
2. FGAR amidotransferase
3. GMP synthetase ($\text{XMP} \rightarrow \text{GMP}$)
4. Carbamoyl phosphate synthetase (pyrimidine 的合成中提供 N)
5. CTP synthetase($\text{UTP} \rightarrow \text{CTP}$)

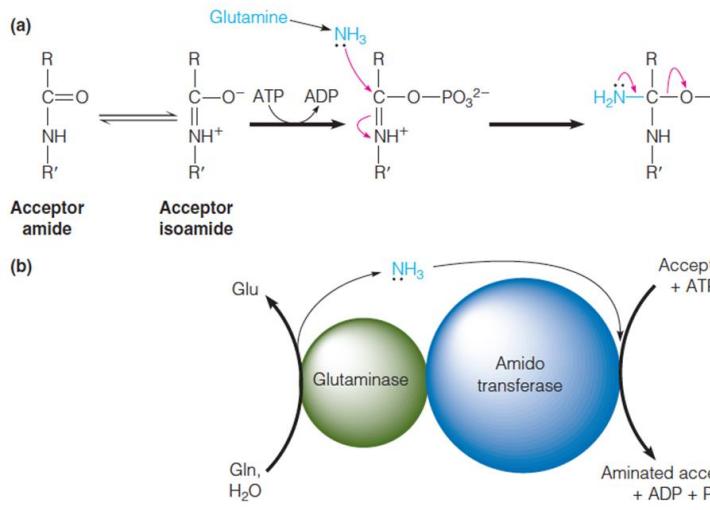


FIGURE 22.15

Proposed mechanism of glutamine-dependent amidotransferases. (a) The acceptor, usually an amide, is in tautomeric equilibrium with the isoamide form and is activated for nucleophilic attack by phosphorylation. Attack by nucleophilic ammonia, generated from glutamine hydrolysis, forms a tetrahedral intermediate, which collapses to give P_i and the aminated product. (b) Schematic of the subunit (or domain) structure of a glutamine-dependent amidotransferase. The glutaminase subunit (or domain) delivers nucleophilic ammonia to the amidotransferase subunit (or domain), which catalyzes the ATP-dependent amination of the acceptor.

圖 A 是 acceptor 利用 ATP 將其活化，接著在 carbonyl group 上通過一連串反應後將 NH_3 接到 acceptor 上。但由於 NH_3 容易直接擴散到水裡面變成低濃度，反應不易進行。

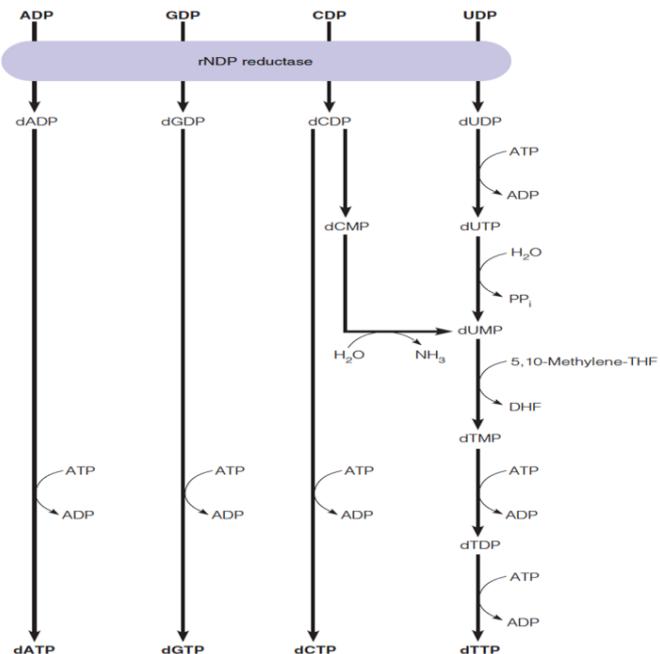
圖 B 的酵素，使 NH_3 有局部的高濃度，促使反應進行。其酵素有兩部分，一部分產生 nucleophilic，另一部分負責將 NH_3 接到 acceptor 上

八. Deoxyribonucleotides 的合成與代謝

1. 與 RNA 不同的是，DNA 需要 rNDP reductase 進行去氧的步驟(五碳糖的 2 號碳要把氧拿掉)

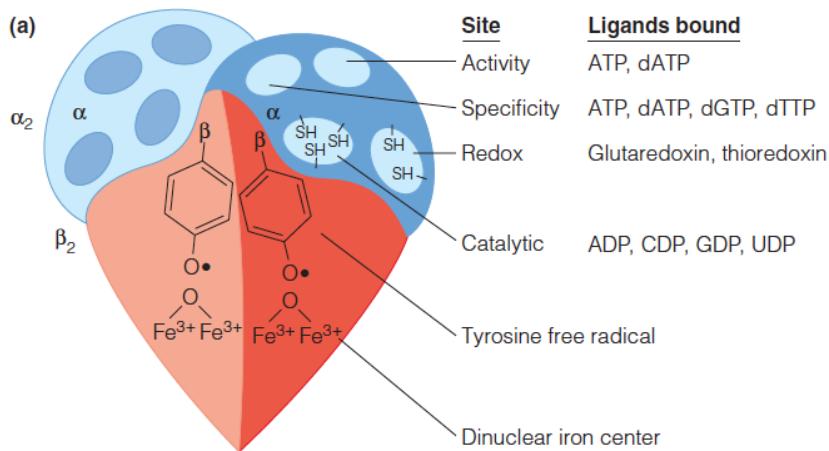
2. dUMP+CH₃ 藉由酵素作用形成 dTMP，另外，dUMP 除了從 dUTP 轉變而來，也可以藉由 dCMP 脫胺變成 dUMP。

3. 兩個酵素(rNDP reductase 和將 dUMP→dTMP 的酵素)為未來化療標的的重要酵素。以上兩點為接下來討論的重點。



(1) Ribonucleotide還原成 Deoxyribonucleotides

RNA 還原成 DNA 需要將 C2 上的 OH 用 O 取代。而這過程所需的酵素為 ribonucleotide reductase(分三種，class I 比較重要，為 rNDP reductase)



1. rNDP reductase 主要靠自由基進行催化，而結構上分為兩部分，分別為 α_2 和 β_2 ，兩者必須結合正確才能有活性。

2. 催化機制是利用 β_2 上的 tyrosine 上的自由基提供給 α_2 反應。(本身 β_2 會利用 iron-oxygen complex 穩定 tyrosyl radical)

3. α_2 為催化反應的主要作用處，調節方式分兩種-activity 和 specificity，前者影響酵素有沒有活性，後者則調控酵素合成哪種產物

A. Ribonucleotide reduction 的作用機制(酵素為 rNDP reductase)

Step1.

自由基從 β_2 上的 tyrosine 轉移到 α_2 的其中一個 SH

Step2.

S 與 nucleotide 作用，在 C3 形成 free radical

Step3.

鹼基把 C3 的 H 拿掉形成 double bond

intermediate , free radical 跑到 C2 上，OH 被 SH 拿走完成脫氧，變成半穩定的中間產物。

Step 4and 5.

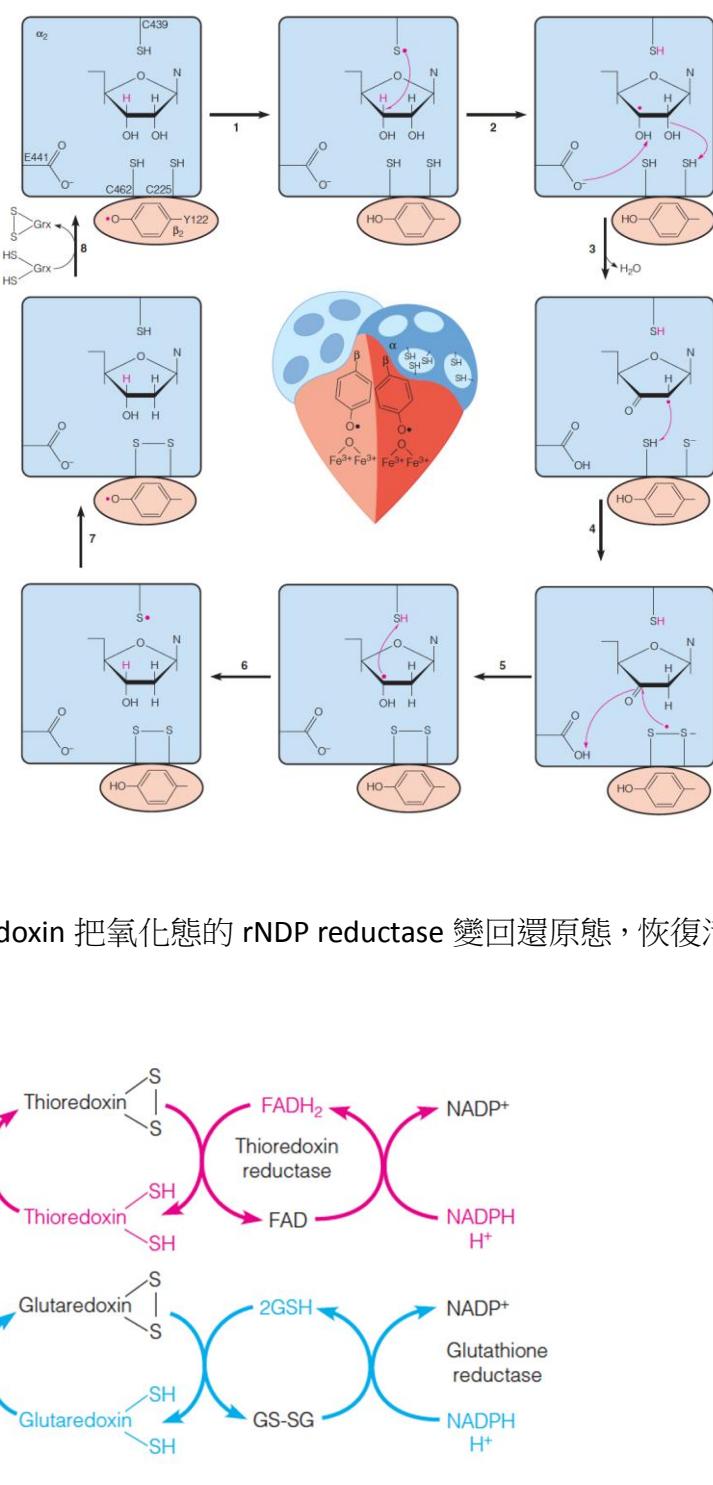
用自由基將 C3 上的 double bond 還原為 OH

Step 6 and 7

原路徑將自由基送回 β_2

Step8.

藉由 thioredoxin 和 glutaredoxin 把氧化態的 rNDP reductase 變回還原態，恢復活性。



透過 thioredoxin 和 glutaredoxin 將氧化態的 rNDP reductase 變回還原態。而因此 thioredoxin 和 glutaredoxin 會被氧化，此時需要 thioredoxin reductase 和 glutathione reductase 進行 thioredoxin 和 glutaredoxin 的再生。而這一串反應最終的電子提供者為 NADPH。

B. rNDP reductase 活性的調控

前面有提過在 α_2 上有兩種調控位，分別為 activity site 和 specificity site

activity site:看左圖，ATP 和 dNTP 存在時能使 α_2 和 β_2 結合成 active form

當 dATP 過多的時候，結合在 active site，會使 ribonucleotide reductase 改變為 $\alpha_4\beta_4$ ，活性界面沒有對到正確的位置，自由基無法傳遞，ribonucleotide reductase 失去活性。

specificity site:看下表，當不同的 nucleotide 結合到 specificity site，會改變對受質的選擇性。主要目的為讓 DNA 合成的 precursor 達到平衡。

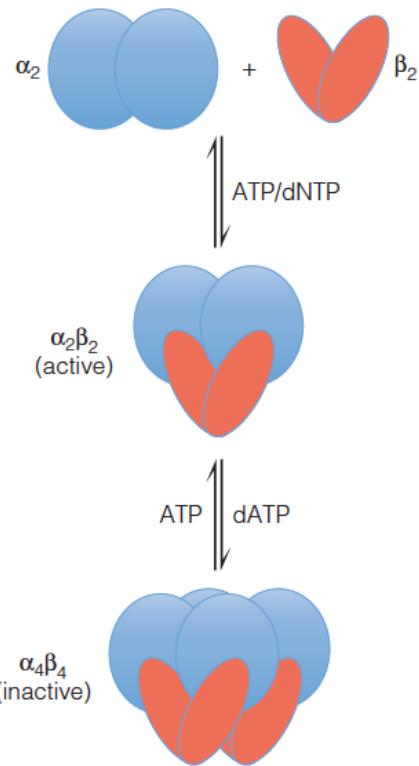


TABLE 22.2 Regulation of the activities of mammalian ribonucleotide reductase

Nucleotide Bound in				
Activity Site	Specificity Site	Activates Reduction of	Inhibits Reduction of	
ATP	ATP or dATP	CDP, UDP		
ATP	dTTP	GDP	CDP, UDP	
ATP	dGTP	ADP	CDP, UDP ^a	
dATP	Any effector		ADP, GDP, CDP, UDP	

(二).Thymine Deoxyribonucleotide 的合成

此圖的會先著重在 dUMP 以上的合成作用(dCDP→dCTP →dUTP 的作用只有細菌有，不用理他)

dUMP 的來源有兩種，分別是 UDP 和 CDP

UDP:

$\text{UDP} \rightarrow \text{dUDP} \rightarrow \text{dUTP}$ ，然後在 $\text{dUTP} \rightarrow \text{dUMP}$ 時會需要酵素 dUTPase，dUTPase 的活性非常高，將 dUTP 快速轉變為 dUMP，避免 dUTP 影響 DNA 合成。

CDP:

dCMP 藉由脫氨基作用轉變為 dUMP

除了從 UDP 和 CDP 進行 de novo 作用合成 dTTP 外也能 salvage 作用合成 dTTP

deoxuridine 和 deoxythymidine 藉由 thymidine kinase 合成 dUMP 和 dTMP 在轉變為 dTTP。

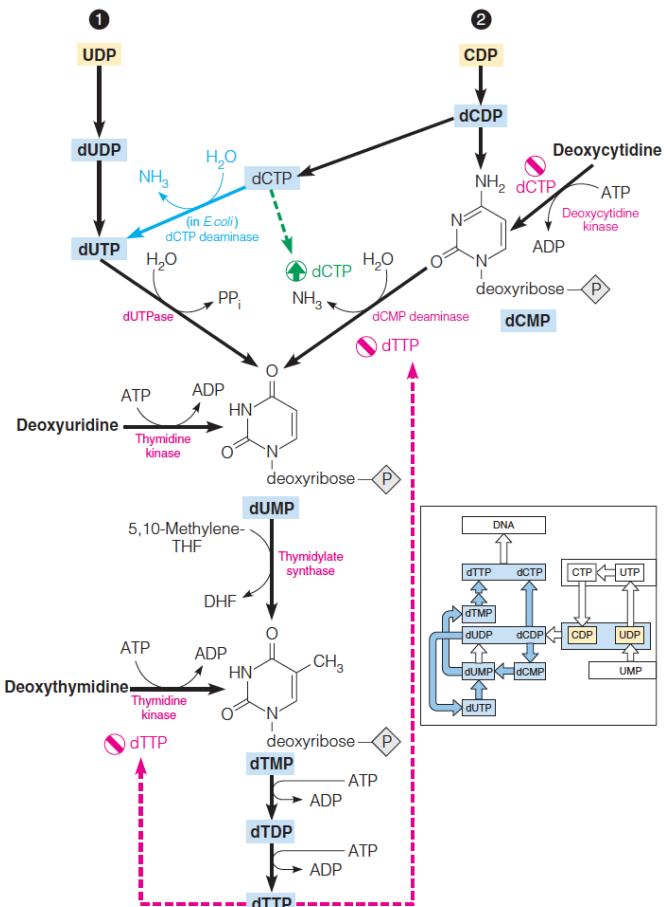
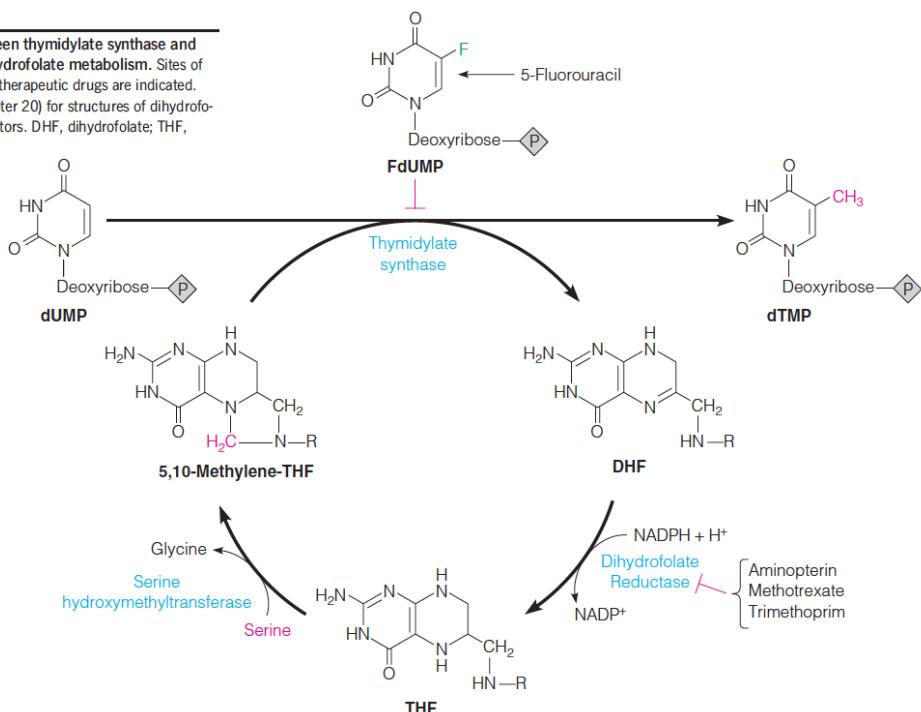


FIGURE 22.24

Relationship between thymidylate synthase and enzymes of tetrahydrofolate metabolism. Sites of action of the chemotherapeutic drugs are indicated. See page 850 (Chapter 20) for structures of dihydrofolate reductase inhibitors. DHF, dihydrofolate; THF, tetrahydrofolate.



dUMP 和 dTMP 最大的差別在於 C 是否接甲基。5,10-Methylene-THF 提供 single-carbon methylene group 和 electron pair 將 dUMP 接上甲基(以 thymidylate synthase 為酵素)，5,10-Methylene-THF 作用後會變成 DHF，而要使反應繼續進行的話，須將 DHF 還原成 THF(以 Dihydrofolate reductase 為酵素)。其中 dihydrofolate reductase 為開發抗癌藥物的重要酵素。另外當日常攝取的 folate 不足時會影響到 dUMP 轉變為 dTMP。

(三)

Salvage routes to deoxyribonucleotide synthesis

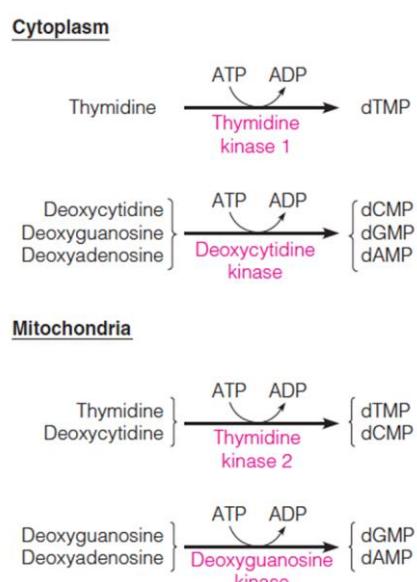
人類中細胞含有四種不同的 deoxyribonucleoside kinases 去進行 salvage pathway

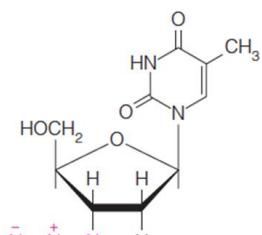
1. thymidine kinase 1: 存在於 cytoplasm
2. deoxycytidine kinase: 同樣存在於 cytoplasm，在高濃度下才會作用
3. deoxyguanosine kinase: 存在於 mitochondria
4. thymidine kinase 2: 有很廣的受質專一性

一些的藥物治療是利用沒有磷酸根的 prodrug

讓細胞當作 base 吸收進細胞後以上面四種酵素進行磷酸化。

如下圖的 AZT，是利用 TK2 在細胞內進行磷酸化。AZT 為治療愛滋病的藥，但是會使心肌損壞。

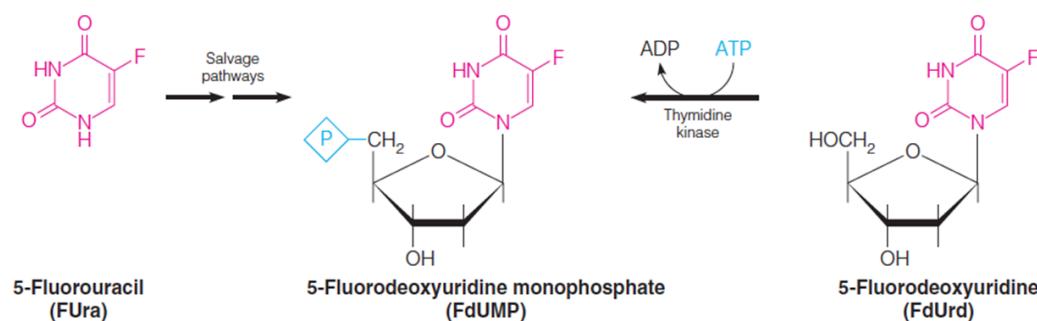




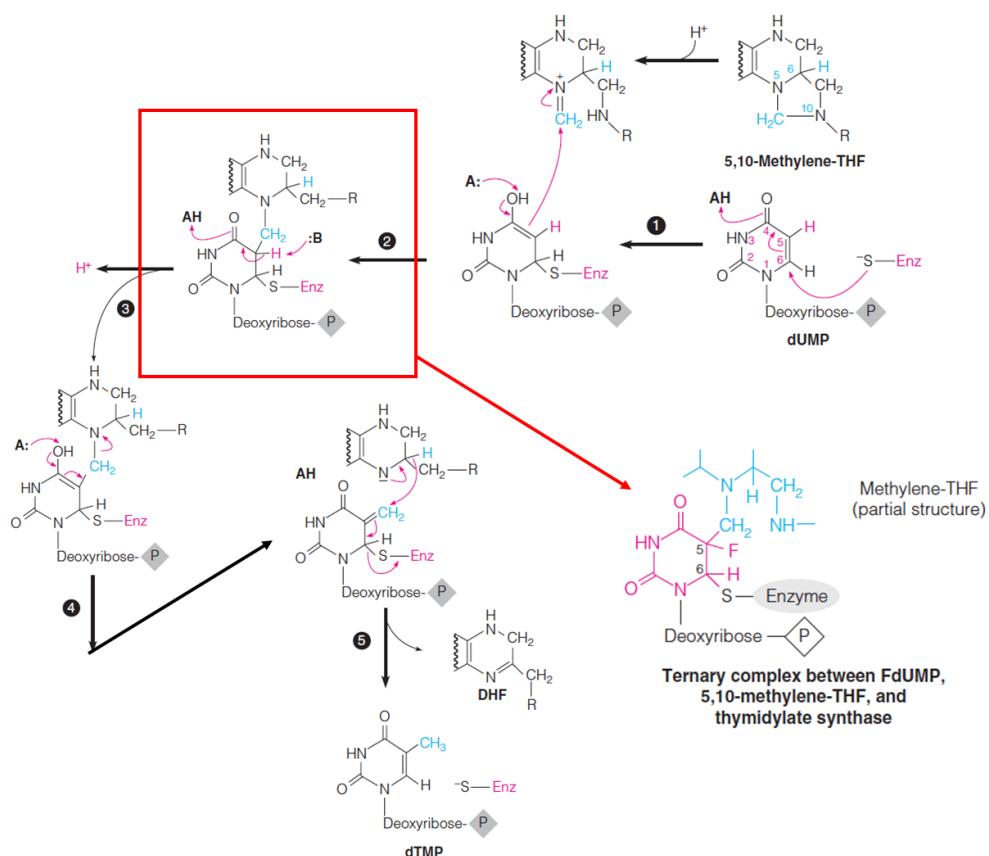
3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine
(AZT or Zidovudine)

九.Thymidylate 的合成:化療的目標酵素

因為 thymidylate synthase(TS)參與了 deoxyribonucleotide 的合成，所以任何有關無法控細胞增長的疾病(癌症或感染性疾病)往往會以 TS 的 inhibitors 為治療方法。



由於癌細胞新陳代謝 uracil 比正常的細胞快，因此想選擇性地殺掉癌細胞就必須阻斷它的 uracil metabolism。FUra 和 FdUrd 可做為 prodrug，他們可在細胞內進行 salvage pathway 轉換成 dUMP 的類似物-FdUMP，會去抑制 thymidylate synthase，因此可作為 TS 的抑制物。



此圖為 dUMP 作用變成 dTMP 的完整機制圖

Step1 酵素上的 cysteine thiolate ion 開始對 dUMP 的 C6 做親核性攻擊，產生 active site

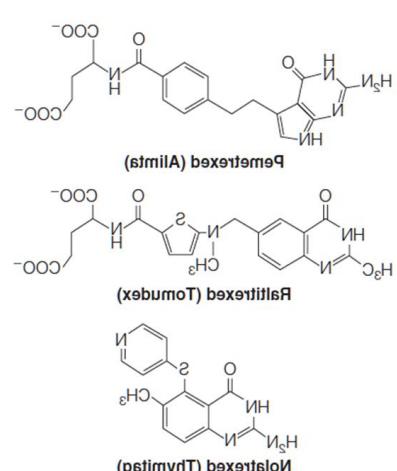
Step2 C5 變成了親核性，因此攻擊了 5,10-methylene-THF 上的 methylene carbon 形成共價酵素 dUMP-THF ternary complex

Step3 藉著有活性位的鹼基去掉 C5 上的 proton(關鍵步驟:FdUMP 酵素變為 C-F bond 使得鹼基無法把氫拿走，使得酵素的活性被抑制)

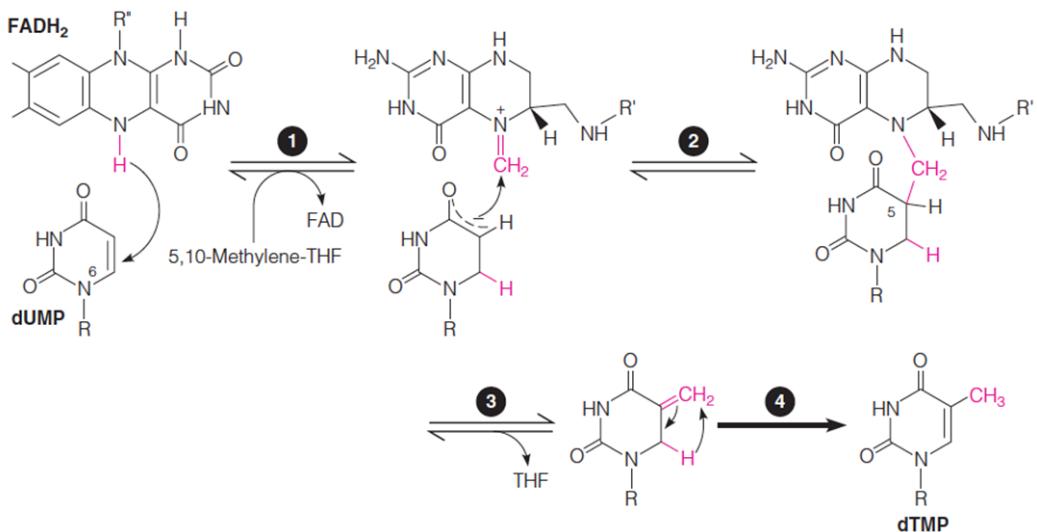
Step4 電子開始轉移

Step5 THF 提供電子和甲基，轉移到 dUMP 上形成 dTMP

Folate cofactor 為 thymidylate synthase 合成 dTMP 的重要物質。而左圖的三種物質是 folate cofactor analogs(antifolates)與 Thymidylate synthase 的結合力很強，使 Thymidylate synthase 失去活性。能夠抑制 DNA 的合成。Pemetrexed 和 raltitrexed 都是用於治療某些癌症，



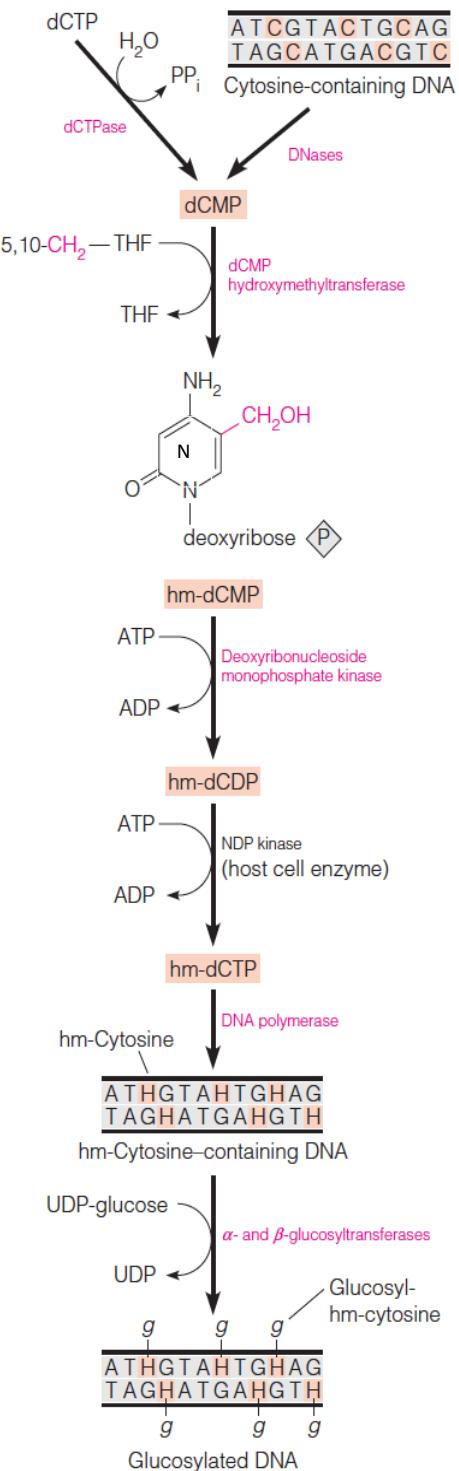
Flavin-Dependent Thymidylate Synthase :不同的路徑製造 dTMP



製造 thymidylate 除了可以由 de novo pathway 透過 thymidylate synthase 或者 salvage 透過 thymidine kinase 外，還有一種方法是 flavin-dependent thymidylate synthase(FDTs)。5,10-methylene-THF 僅提供 CH₂，但不參與還原。是藉由 FADH₂ 進行還原。(高等生物無此酵素，故不是重點)

十.Virus-Directed Alterations of Nucleotide Metabolism

1957 年科學家在 T-even 噬菌體感染 E. coli 的實驗中發現噬菌體會將宿主細胞 DNA 上的 cytosine(C)和 dCTP 用糖甘鍵接上 glucose 來形成 Glucosyl-hm-cytosine，因為該噬菌體 DNA 不使用 cytosine(C)來合成 DNA，藉由此法，病毒可再利用病毒本身特有的 DNA 分解酶分解被修飾的宿主 DNA，提供病毒合成 DNA 的原料。
*因為宿主本身 DNA 被修飾 --> 宿主本身基因表現被破壞!!(無法轉錄轉譯)



Step1.細胞中的 dCTP 和 DNA 上的 C 分別被 aCTPase 和 DNases 分解為 dCMP。

Step2.dCMP hydroxymethyltransferase 將 5,10-methylene-THF 上的-CH₂OH transferase 到 dCMP 上形成 hm-dCMP。

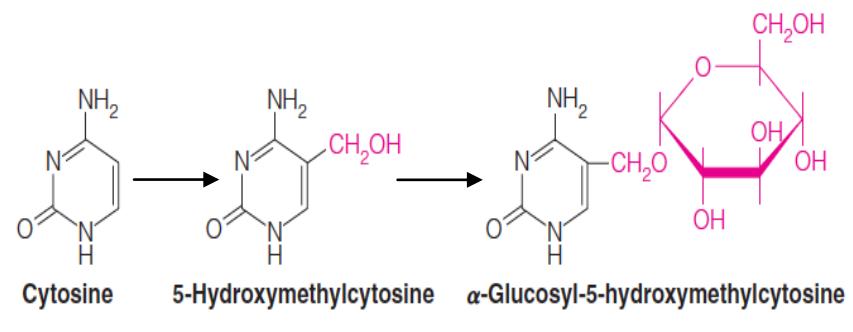
Step3&4. hm-dCMP 磷酸化成 hm-dCTP

Step5. hm-dCTP 被用於合成 DNA(hm-Cytosine-containing DNA)

Step6.藉由 glucosyltransferase 將 UDP-glucose 上的 glucose 用糖甘鍵接到(H)上。(在 T4 噬菌體中有 α 和 β 兩種 glucosyltransferase)

*左圖紅字的酵素代表為病毒合成的酵素

*此作用機轉只在細菌中，在動物和植物病毒中沒有，因大多數的動植物的 DNA 被甲基化!



代謝路徑簡圖

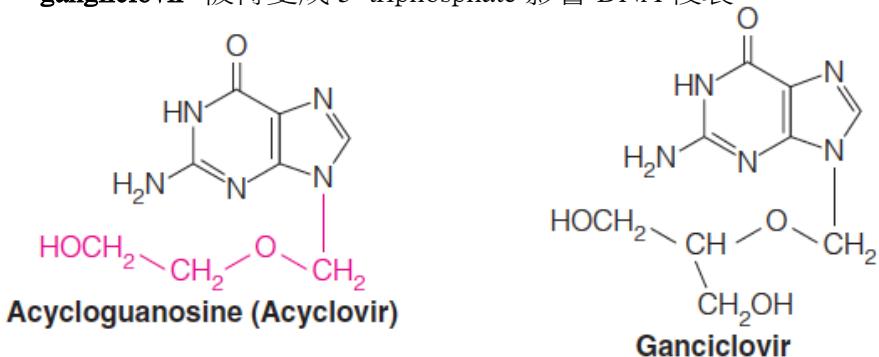
**藥物部分老師簡單帶過，簡單記紅字部分即可。

十一.Biological and Medical Importance of Other Nucleotide Analogs

(1)抗病毒藥物-- Nucleoside 類似物

病毒DNA所合成的enzyme經常是用於增強被感染的細胞合成核酸的前驅物，因此若病毒合成的enzyme和宿主的counterpart有足夠的差異性，科學家就可以藉由選擇性的酵素抑制物來對抗病毒。

A. acyvlovir(又叫 acycloguanosine)和其衍生物 ganciclovir 被用於治療**疱疹病毒**(herpes virus)，因 herpes virus 是一種含大量 DNA 的 virus，它可以合成出一種含有極大受質專一性的 enzyme : thymidine kinase，這種酵素可用來磷酸化 pyrimidine and purine nucleoside，在這種酵素存在下 acyvlovir 和 ganciclovir 被轉變成 5'-triphosphate 影響 DNA 複製

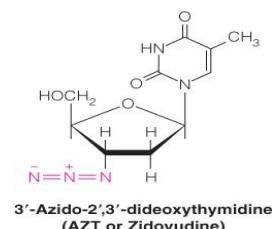


B. arabinosyladenine(araA or Vidarabine):被用於治療病毒性腦炎(由其中一種泡疹病毒引起的神經性疾病)，araA 被 cellular kinase 轉變為 araATP，araATP 為一種 DNA polymerases 選擇性抑制物，此外，因 araATP 會被 adenosine deaminase 分解，所以藉由增加 adenosine deaminase 的限制物可增加 araA 的效果。

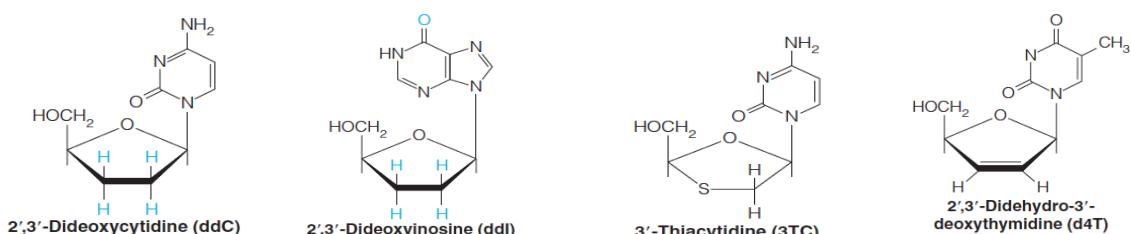
同理，arabinosylcytosine(araC or Cytarabine)在被轉為 araCTP 後亦可抑制 DNA 複製。

C. 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT):

用來對抗 AIDS，可被合成代謝為 5'triphosphate 用來抑制**病毒的反轉錄合成!**



D. 2',3'-dideoxycytidine (ddC), 2',3'-dideoxyinosine (ddI), 3'-thiacytidine (3TC), and 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T):被代謝為 triphosphate 用於合成 DNA，但是因為其 3'端沒有 O，所以 DNA 合成時無法延長。



(2) Purine salvage as target

A. allopurinol 和 formycin B:

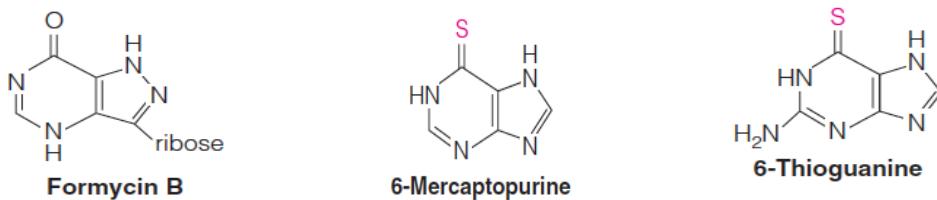
在寄生性原生生物中(ex: Plasmodium 瘧原蟲)，沒有合成 purine 的機制，因此其必須依賴宿主來補充合成 DNA 所需的 Purine，因此 allopurinol 和 formycin B 可用來當作對抗這些寄生蟲疾病的用藥，除了可用來限制 salvage enzyme，其被 salvage enzyme 代謝產生的衍生物亦可用於抑制蛋白質合成。

以 allopurinol 為例，allopurinol 會先被轉變為 inosinic acid 的類似物，再轉變為一種 AMP 的類似物(可插入 RNA 中干擾蛋白質合成所需的 mRNA 編碼)

B. Thiopurine 類藥物:用來做為抗癌和免疫抑制

6-mercaptopurine and 6-thioguanine :需要被生理代謝才能產生其 cytotoxic 的作用，這兩種藥物先會被 HGPRT 轉變為 nucleoside monophosphate，然後再被轉變成 triphosphate 並用於 DNA 和 RNA 合成的原料，而這些 thio 衍生物進入 DNA 會**停止細胞週期引起細胞凋亡**。(此藥物亦用於 childhood leukemia 的治療)

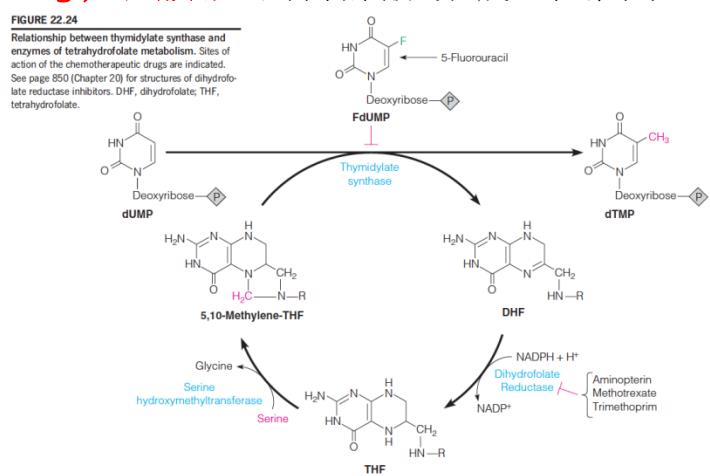
****Importance on the pharmacogenetics(藥理學):**藉由 thiopurines 的藥物使用，科學家了解到藥物如何在基因層次上影響人體內不同的反應，以 **6-mercaptopurine and 6-thioguanine** 為例，這兩種藥物上的 thio group 在正常人體中可被 thiopurine S-methyltransferase (TPMT) 催化 methylation 而不活化，而在 TPMT-deficient 的病人中，其細胞內 thiopurines 濃度會是正常人的數十倍，造成死亡!



(3) Folate Antagonists(葉酸結抗劑):

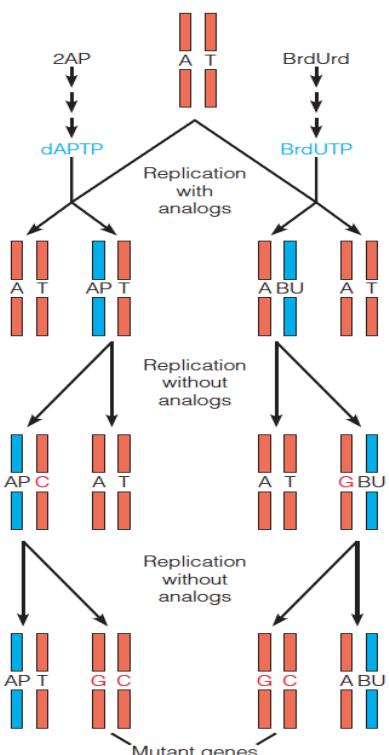
葉酸在合成 DNA、RNA、蛋白質及磷脂質前驅物扮演重要的角色，因此葉酸結抗劑造成體內四氫葉酸合成的抑制會對增生中的細胞產生毒性。

trimethoprim 是一種二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase)的抑制劑，專門用於抑制原核生物的二氫葉酸還原酶，因其對脊椎動物的二氫葉酸還原酶極微弱，所以可以被用於**治療細菌感染&某些形式的瘧疾**。同時，**trimethoprim 常與磺胺類藥物(sulfonamide drugs)一起服用**，以抑制葉酸的合成，中斷課本(圖 22-24)的整個反應路徑。



十二. Mechanisms of mutagenesis by nucleotide analogs:

部分核苷酸類似物可做為誘變劑，用於分離突變株與研究突變機制。



Step1.

(2-aminopurine, 2AP) & (5-bromodeoxyuridine, BrdUrd) 分別在人體中會代謝為 dATP & BrdUTP(如圖左)，因其分別為 A 和 T 的類似物，在合成 DNA 時會參入 DNA 中。

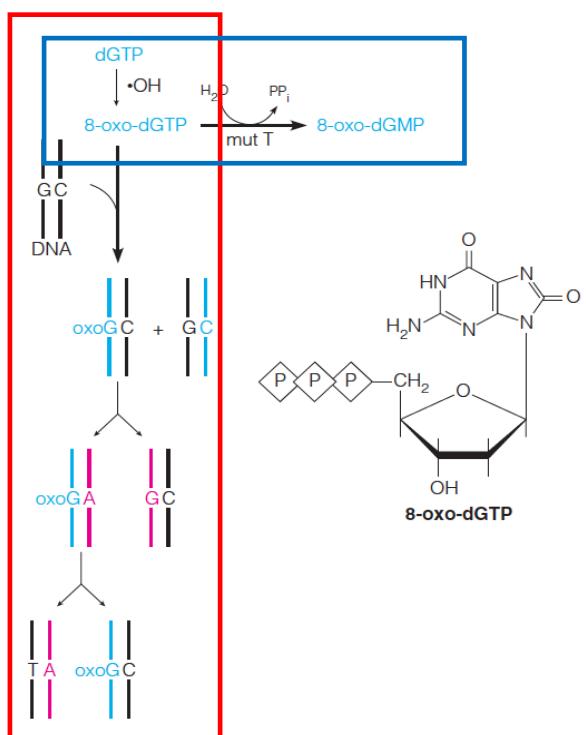
Step2.

DNA 複製過程中，AP 會和 C 配對而非 T；同理 BU 會和 G 配對，因此經過兩次複製後使原本 A-T 會變成 G-C(DNA 序列改變!!)

**2AP 和 BrdUrd 的差異：

1. BrdUrd 因為其分子量較重，併入 DNA 後可以用物理方法和其他正常 DNA 分離。
2. BrdUrd 接收 UV 光後會將溴離子解離產生自由基，造成 DNA 損壞-->科學家用來做為輻射靈敏藥劑。

十三. 氧化逆境(oxidative stress)使 DNA 突變



- **紅色框框**: 過氧化氫的出現會造成氧化逆境(oxidative stress)，使 dGTP 被 OH 自由基氧化成 8-oxo-dGTP，8-oxo-dGTP 會進入 DNA 中使原本 G-C 鹼基對被轉為 T-A(所以 OH 自由基會造成基因突變!!)
- **藍色框框**: 近期科學家發現人體中有一種 mutT 基因，會產生一種酵素專門分解 8-oxo-dGTP 成 8-oxo-dGMP，使氧化突變的機率降低。