



*mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii*

*CZ.1.07/2.2.00/28.0171*

# Obecný metabolismus.

## Obrat proteinů a metabolismus aminokyselin (10).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Osnova.

Odbourávání proteinů na aminokyseliny.

Úloha ubiquitinu a proteasomu.

Degradace proteinů jako regulátor biologické funkce.

První stupeň degradace aminokyselin - odbourání aminoskupiny.

Transport dusíku z periferních tkání do jater.

Močovinový (ornithinový cyklus).

Osud uhlíkaté kostry aminokyselin.

Vrozené metabolické vady aminokyselin.

# Štěpení proteinů z potravy.

Trávení proteinů z potravy v zažívacím traktu a odbourávání proteinů v buňce je zdrojem aminokyselin.

Řada buněčných proteinů je odbourávána v souvislosti s ukončením jejich funkce v metabolické dráze. Další, poškozené proteiny, musí být také odbourány.

Primární funkcí degradací získaných aminokyselin je vytvářet pool pro biosyntézu proteinů a dalších dusíkatých sloučenin jako např. nukleotidů.

**Aminokyseliny nejsou skladovány jako tuky a sacharidy.**

Zdrojem aminokyselin jsou proteiny v potravě. Důležitou roli hrají proteiny obsahující „esenciální aminokyseliny“, to jsou takové, které si nedokáže živočich (člověk) syntetizovat.

**Esenciální aminokyseliny pro člověka jsou: His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val.**

## Štěpení proteinů z potravy.

Odbourávání proteinů z potravy začíná v žaludku, kde je silně kyselé prostředí ve kterém jsou proteiny denaturovány.

Primárním enzymem - proteasou - v žaludku je pepsin.

Degradace proteinů pokračuje v kartáčovém lemu střeva.

Potřebné proteasy vylučuje slinivka břišní (pankreas). Proteiny se štěpí na volné aminokyseliny, dipeptidy a tripeptidy. Štěpení dokončují další proteolytické enzymy jako aminopeptidasa N, která je lokalizovaná v plasmové membráně střeva.

Aminopeptidasy štěpí proteiny od N konce. Volné aminokyseliny a krátké peptidy vstupují přes střevní buňky do krve.

Obrat proteinů, degradace a resynthesa proteinů, probíhá průběžně v buňkách.

## Ubiquitin - polibek smrti.

Čas degradace proteinů hodnotíme výrazem poločas života (existence).

Např. ornithindekarboxylasa má poločas života 11 min, životnost hemoglobinu jako součásti erythrocytů závisí na době existence erythrocytu (20 - 25 dnů), krystalin, protein oční čočky (2/3) existuje po celou dobu života organismu.

Jak se určí, který protein se má odbourat ?

Polibek smrti „UBIQUITIN“ (Ub) je malý protein (8,5 kD).

Na karboxylovém konci Ub je Gly, který se váže na  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Lys proteinu určeného k degradaci. Vzniká isopeptidová vazba na jejíž tvorbu se spotřebuje ATP.

Na navázání Ub na protein se podílí tři enzymy. Ubiquitin aktivační enzym (E<sub>1</sub>), ubiquitin konjugační enzym (E<sub>2</sub>) a ubiquitin-proteinligasa (E<sub>3</sub>).

# The Nobel Prize in Chemistry 2004

## Aaron Ciechanover, Avram Hershko, Irwin Rose

The Nobel Prize in Chemistry 2004 was awarded jointly to Aaron Ciechanover, Avram Hershko and Irwin Rose *"for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation"*.

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2004/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/)

Procesy regulované degradací proteinů:

Transkripce genů.

Průběh buněčného cyklu.

Tvorba orgánů.

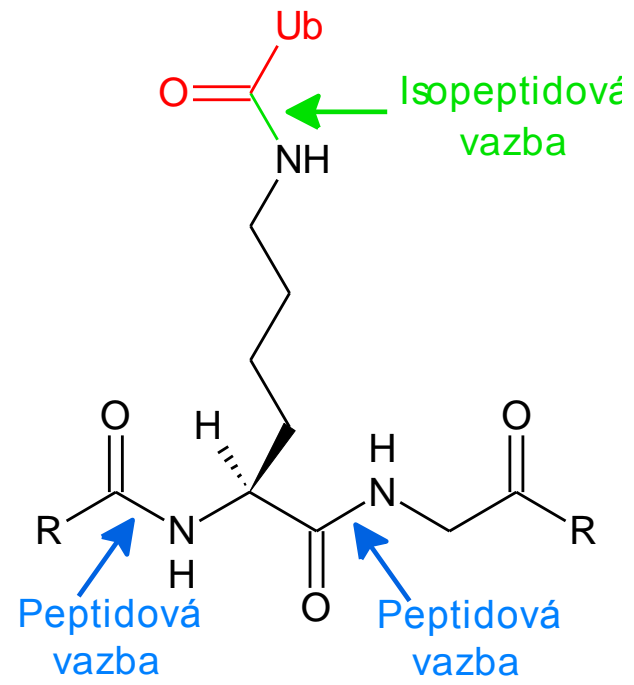
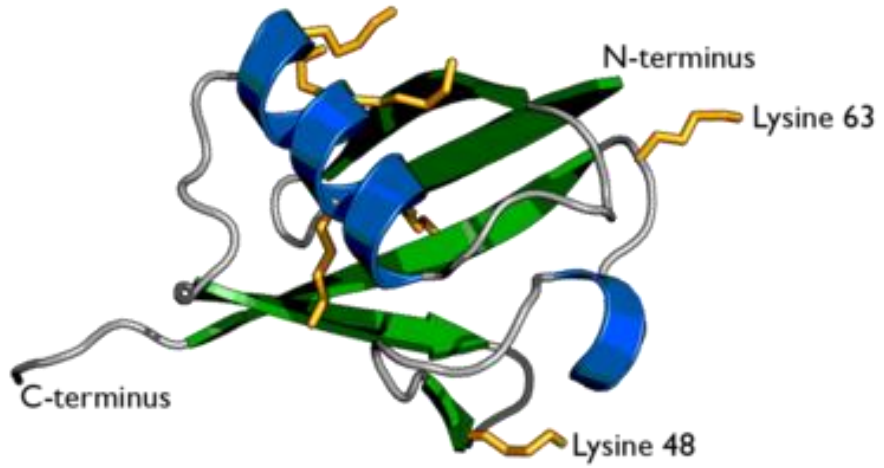
Cirkadiální rytmus.

Potlačení rakovinného bujení.

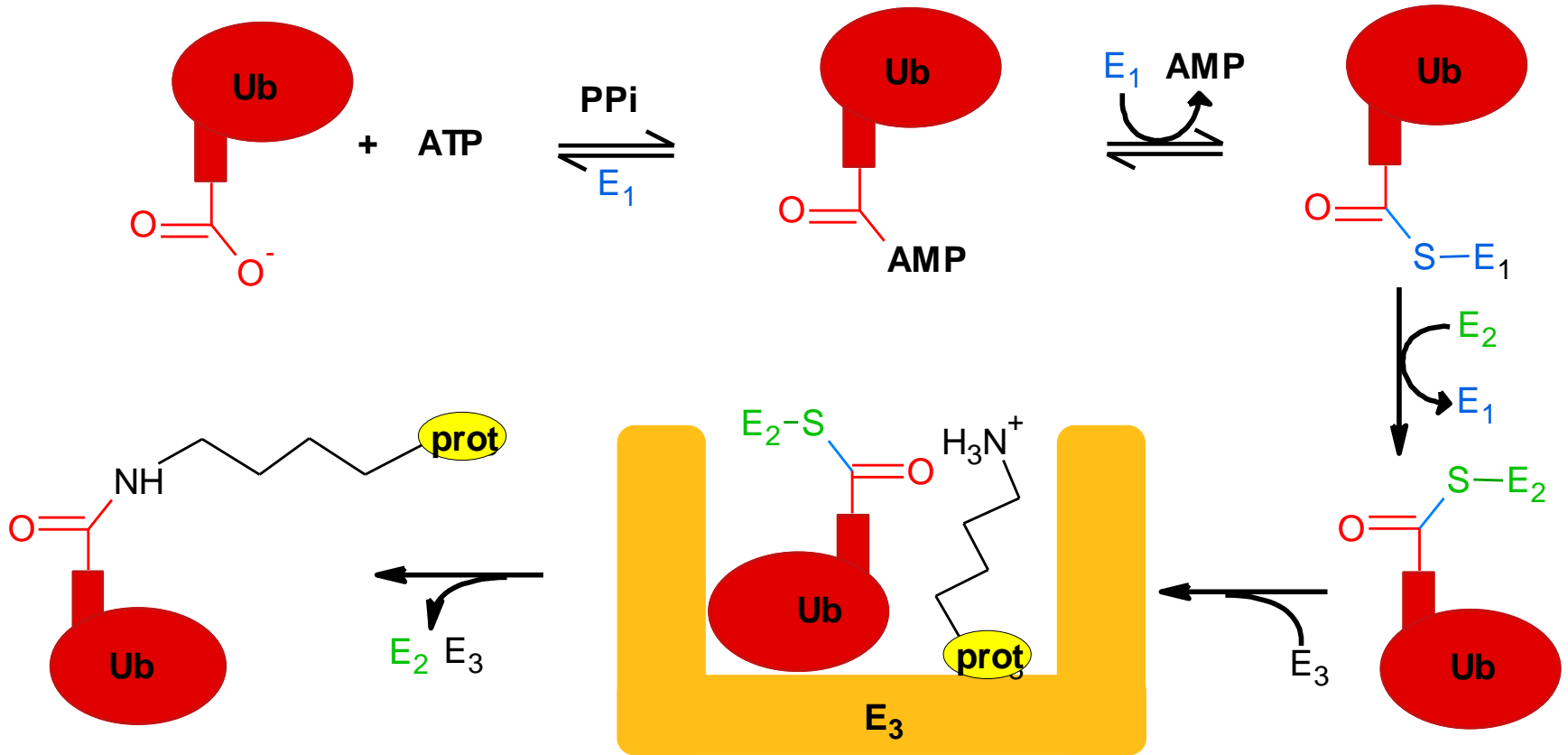
Metabolismus cholesterolu.

Průběh tvorby a funkce antigenů.

Struktura ubiquitinů a schéma isopeptidové vazby.  
 Ub je polypeptid (8,5 kD) ze 76 aminokyselin, 7 vedlejších Lys,  
 C konec je G. Ub tvoří řetězce vazbou Lys 63 a c konce Gly.



# Napojení ubiquitinů na odstraňovaný protein.





## Vykonavatel degradace proteinů - proteasom.

Velký proteasový komplex nazvaný proteasom nebo 26S proteasom štěpí ubiquitinylované proteiny.

Proteasom 26S je komplex dvou komponent: 20S katalytické jednotky a dvou 19S regulačních jednotek.

Katalytická jednotka má tvar sudu na kterém jsou z obou stran 19S čepičky.

Jednotky 19S mají tři funkce:

- a) Váží se specificky jen na ubiquitinylované proteiny.
- b) Štěpí isopeptidovou vazbu Ub a proteinu a uvolňují Ub.
- c) Protein je rozbalen a směřován do dutiny katalytické jednotky 20S.

V aktivním místě jednotky 20S hraje esenciální roli hydroxyl Thr, který působí na peptidovou vazbu jako nukleofil.

Produktem proteasomu jsou peptidy, které se dále mimo proteasom štěpí peptidasami na aminokyseliny.

## Které znaky určují protein určený k ubiquitylaci ?

Specifická sekvence aminokyselin označovaná jako **degron** je indikátorem ubiquitylace.

Poločas života cytoplasmových proteinů je dán charakterem aminokyseliny na N konci.

Vysoký stabilizační efekt aminokyselin na N konci proteinu ( $t_{1/2} > 20$  hod): Ala, Cys, Gly, Met, Pro, Ser, Thr, Val.

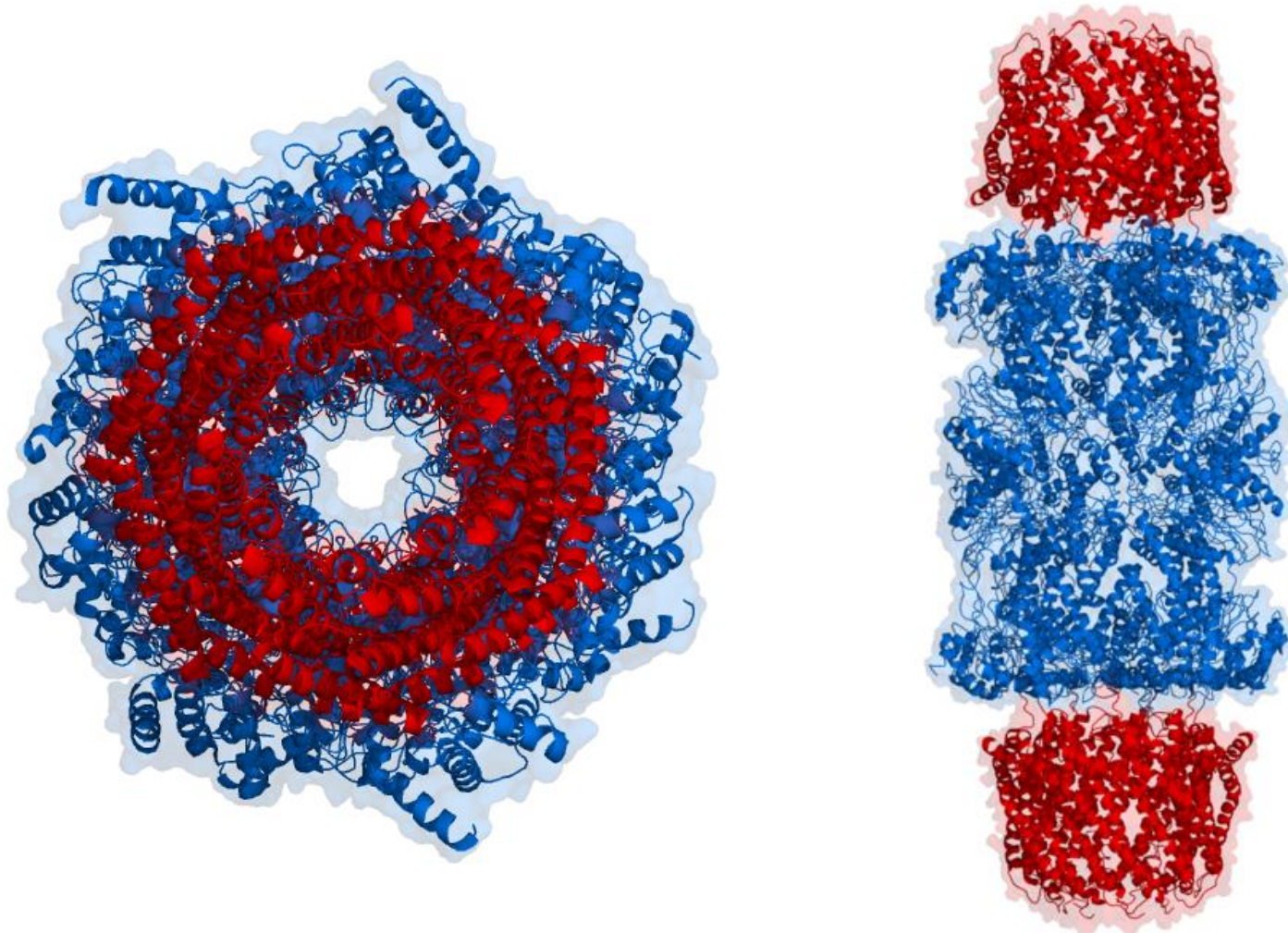
Střední stabilizační efekt ( $t_{1/2} = 2$  až 30 min): Arg, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Trp, Tyr.

Destabilizující aminokyseliny po chemické modifikaci ( $t_{1/2} = 3$  až 30 min): Asp, Asn, Glu, Gln.

Dalšími degrony jsou cyklinové destrukční skvence, které identifikují proteiny buněčného cyklu určené k degradaci.

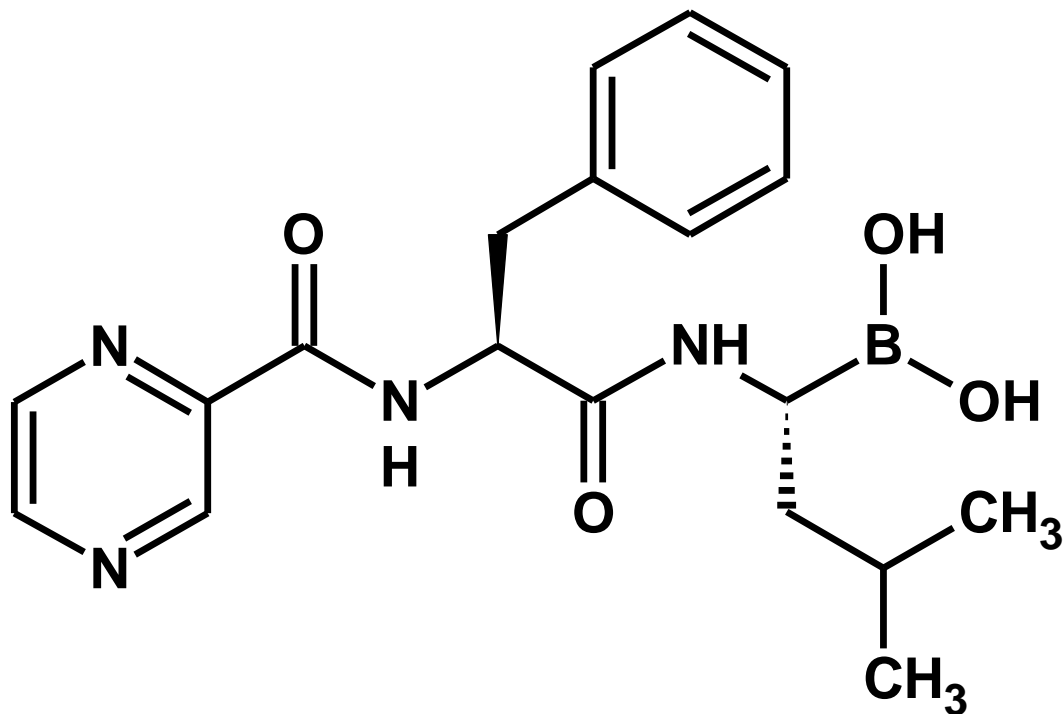
PEST sekvence - aminokyselinová sekvence PEST (jednopísmenné zkratky - Pro, Glu, Ser, Thr).

Proteasom. Pohled shora a boční pohled.  
Červené čepičky 19S, vlastní katalytická jednotka modrá 20S.



# Bortezomib - antitumor chemoterapeutikum, mnohočetný myelom.

**Inhibitor proteasomu**, indukuje apoptosu, zasahuje do proteinového cyklu. Selektivně indukuje apoptosu v rakovinných buňkách.



# Odstranění aminoskupiny z aminokyselin.

Hlavním místem odstraňování  $\alpha$ -aminoskupiny z aminokyselin jsou játra.

Ve svalech jsou odbourávány větvené aminokyseliny (Leu, Val a Ile)

## Oxidativní deaminace glutamátu.

$\alpha$ -Aminoskupina mnoha aminokyselin se převádí na glutamát, který je oxidativně deaminován na  $\alpha$ -oxoglutarát a  $\text{NH}_4^+$ .

Aminotransferasy nebo transaminasy jsou enzymy, které katalyzují přenos  $\alpha$ -aminoskupin z aminokyselin na  $\alpha$ -oxoglutarát.

Aspartátaminotransferasa:



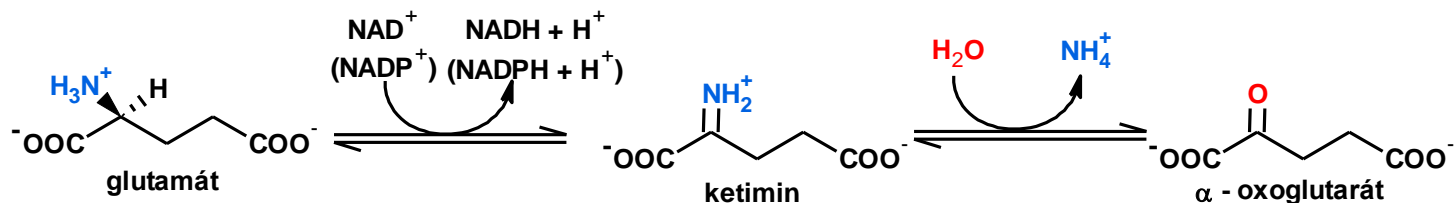
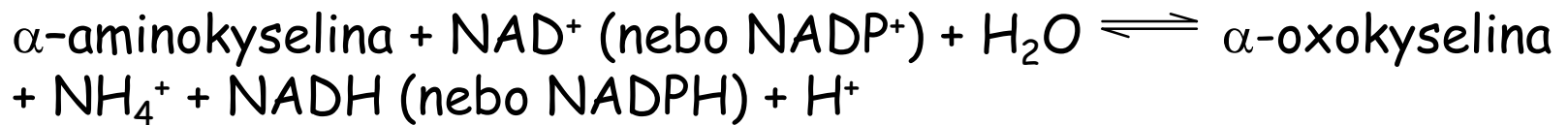
Reakce je reversibilní.

## Glutamátdehydrogenasa (NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>).

Glutamátdehydrogenasa je jaterní enzym (mitochondrie), spolu s ostatními enzymy podílejícími se na tvorbě močoviny.

Glutamátdehydrogenasa je u savců allostericky inhibována GTP a palmitoyl CoA, aktivována ADP a Leu.

Suma reakcí aminotransferas a glutamátdehydrogenasy:

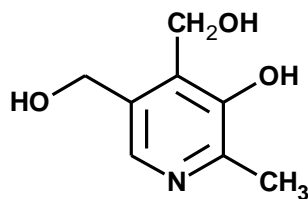


# Úloha pyridoxalfosfátu při transaminaci.

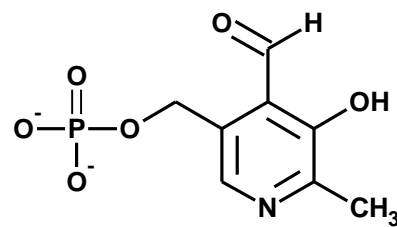
Všechny aminotransferasy obsahují prosthetickou skupinu pyridoxalfosfát (PLP), jehož prekurzorem je vitamin  $B_6$  pyridoxin.

Všechny PLP deriváty tvoří stabilní tautomery ve kterých je pyridinový dusík protonizován (pozitivní) a OH skupina po ztrátě protonu vytváří fenolát s negativním nábojem.

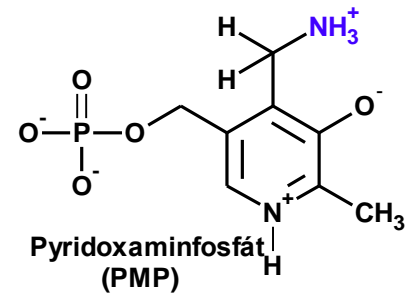
Nejdůležitějším derivátem PLP je aldehyd. Aldehyd vytváří s aminoskupinami aminokyselin Schiffovy báze. Za neřítomnosti substrátu vytváří Schiffovu bázi s  $\epsilon$ -aminoskupinou specifického Lys v aktivním místě enzymu. Za přítomnosti substrátu se vytváří nová Schiffova báze s  $\alpha$ -aminoskupinou aminokyseliny (externí aldimin).



Pyridoxin ( $B_6$ )



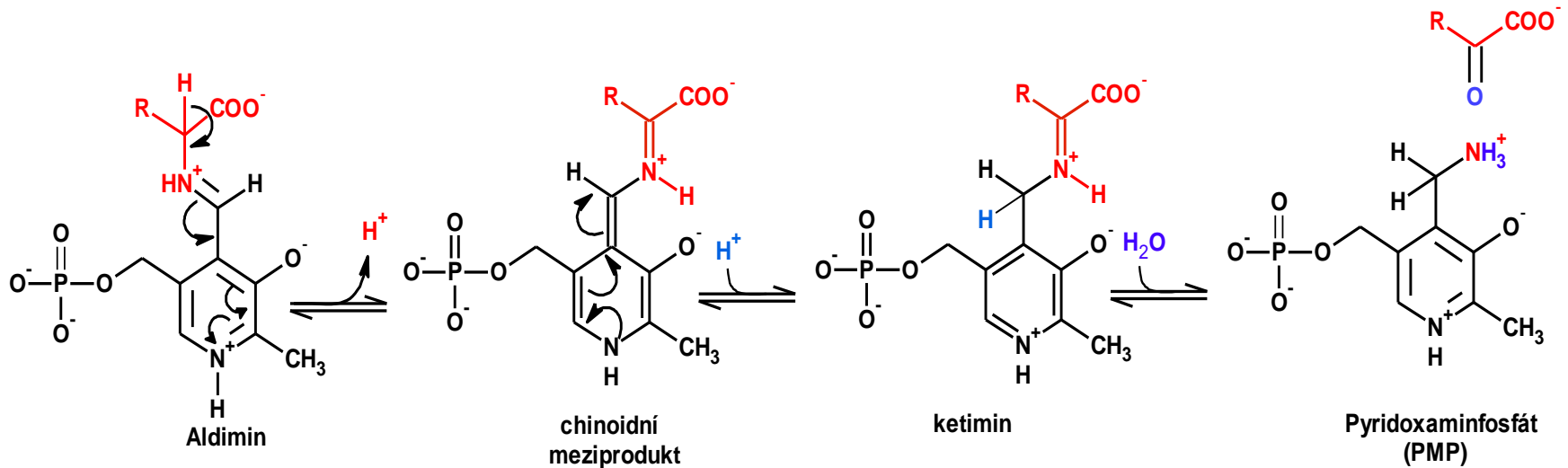
Pyridoxalfosfát (PLP)



Pyridoxaminfosfát (PMP)

# Mechanismus transaminace.

**První část** - tvorba PMP a přechod původní aminokyseliny na  $\alpha$ -oxokyselinu. **Druhá část** je opačná - druhá oxokyselina reaguje s PMP za tvorby  $\alpha$ -aminokyseliny a regenerace PLP.





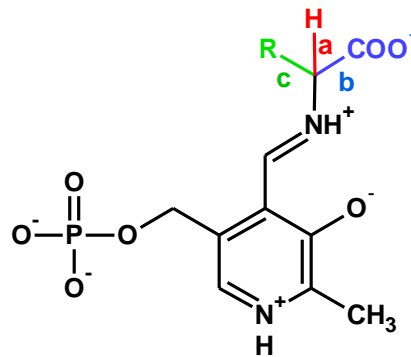
## Další role PLP.

Pyridoxalfosfát je součástí katalýzy dalších reakcí.

Dalšími katalytickými reakcemi za účast PLP jsou dekarboxylace, deaminace, racemizace aldolové štěpení.

PLP enzymy katalyzují také eliminaci a přesmyky na  $\beta$ -uhlíkovém atomu (tryptofansynthetasa) a na  $\gamma$ -uhlíkovém atomu (syntéza Cys) aminokyselinových substrátů.

Vazba **a** je labilní při aminotransferázách, vazba **b** při dekraboxylacích a vazba **c** u aldolas (např. threoninaldolasa).



## Deaminace serinu a threoninu.

Aminokyseliny serin a threonin jsou deaminovány přímo.

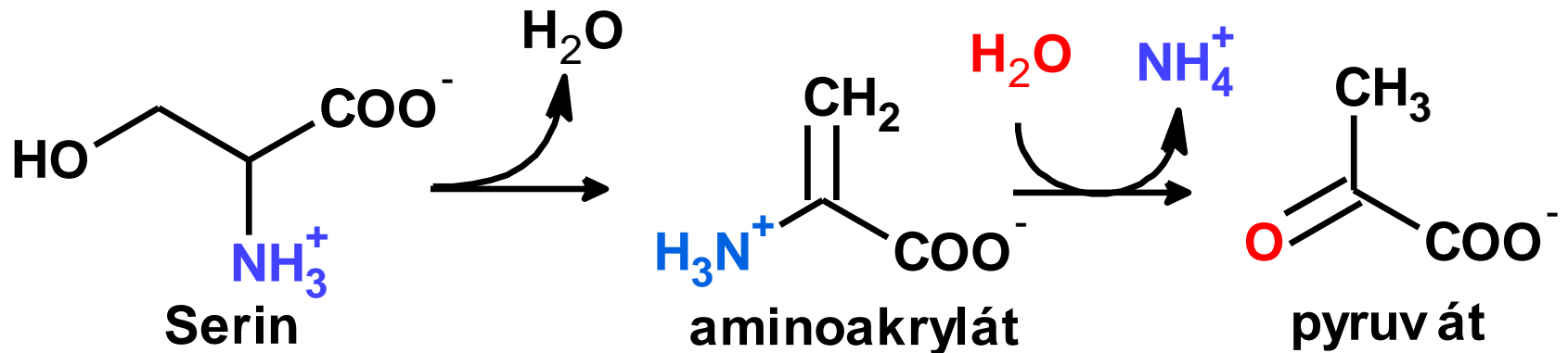
Deaminaci serinu katalyzuje serindeaminasa.

Serin  $\rightarrow$  pyruvát +  $\text{NH}_4^+$

Deaminaci threoninu threonindeaminasa.

Threonin  $\rightarrow$   $\alpha$  - oxobutyrate +  $\text{NH}_4^+$

Enzymy jsou dehydratasy - dehydratace předchází deaminaci.



# Glukosa-alaninový cyklus.

Svaly v době delší svalové práce nebo při hladovění odbourávají větvené aminokyseliny jako zdroj energie.

První je odbourávána aminoskupina, která nemůže být ve svalech jako toxické amonné ionty. Svaly nemají enzymy močovinového cyklu.

Dusík je ze svalů transportován do jater ve dvou transportních formách:

a) Při transaminaci se tvoří glutamát, který předává dusík na pyruvát za tvorby alaninu. Krví vstupuje alanin do jater, kde je transaminací převeden na pyruvát. Pyruvát může být využit ke glukoneogenezi a aminoskupina se vyloučí v močovině.

Dráha probíhá cyklicky a nazývá se glukosa-alaninový cyklus.

Analogie Coriho cyklu, ale pyruvát není redukován na laktát NADH.

Dusík může být také transportován jako glutamin (glutaminsynthetasa = Glu, ATP,  $\text{NH}_4^+$ ).

# Močovinový cyklus.

Močovinový nebo ornithinový cyklus je první objevená cyklická metabolická dráha.

Objevitelé Hans Krebs a Kurt Henseleit (1932).

Určité množství uvolněných  $\text{NH}_4^+$  se uplatní při biosyntézách. Nadbytek se vylučuje v různých formách.

Suchozemští obratlovci vylučují močovinu - ureotelní.

Vodní obratlovci a bezobratlí vylučují nadbytečný dusík ve formě  $\text{NH}_4^+$  - amonotelní.

Ptáci a plazi vylučují dusík ve formě močové kyseliny - urikotelní.

Amonotelní a ureotelní vylučují spolu s močovinou a amonnými ionty velké množství vody.

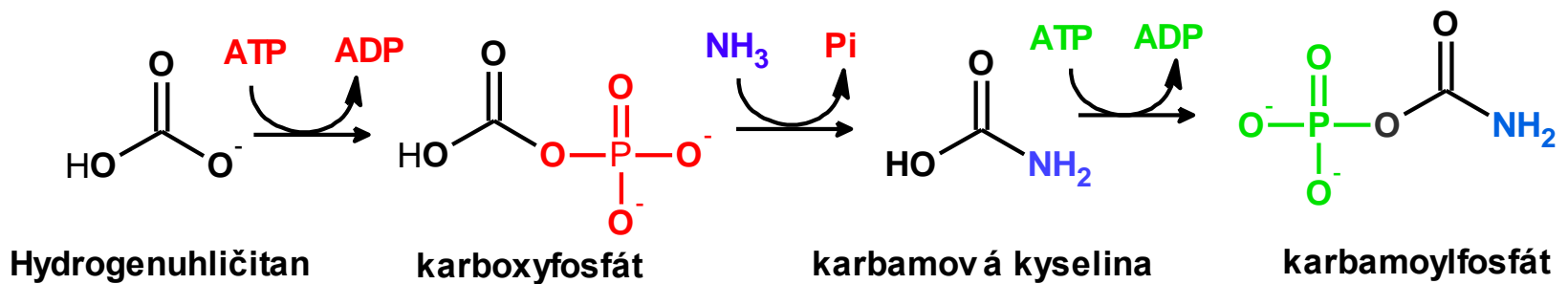
Urikotelní vylučují uráty (soli kys. Močové) a samotnou kys. Močovou v krystalické formě. Šetří vodu a navíc v jedné molekule urátu vylučují 4 atomy dusíku.

# Močovinový cyklus.

Jeden atom dusíku močoviny má původ v aminokyselině aspartátu, druhý je přímo  $\text{NH}_4^+$  a uhlíkový atom z  $\text{HCO}_3^-$  (vzniká hydratací  $\text{CO}_2$ ).

Necyklická část tvorby močoviny v matrix mitochondrie:

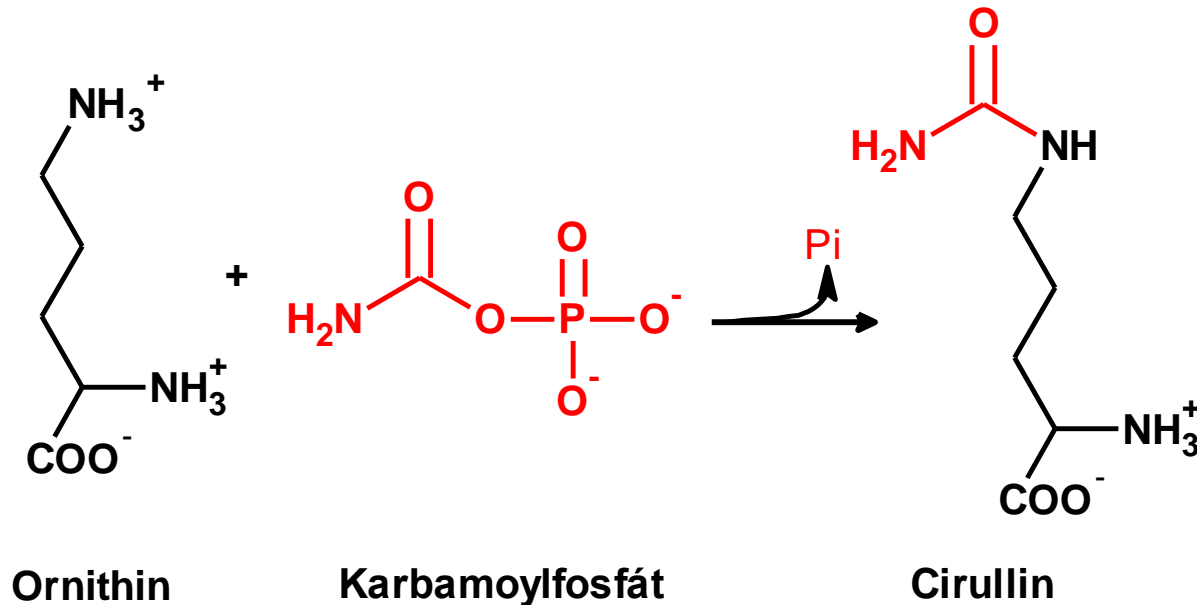
Tvorba karbamoylfosfátu. Enzym karbamoylfosfátsynthetasa má jako substrát amoniak  $\text{NH}_3$  !! Spotřeba energie - endergonický proces. Savčí enzym je aktivován *N*-acetylglutamátem.



# Močovinový cyklus.

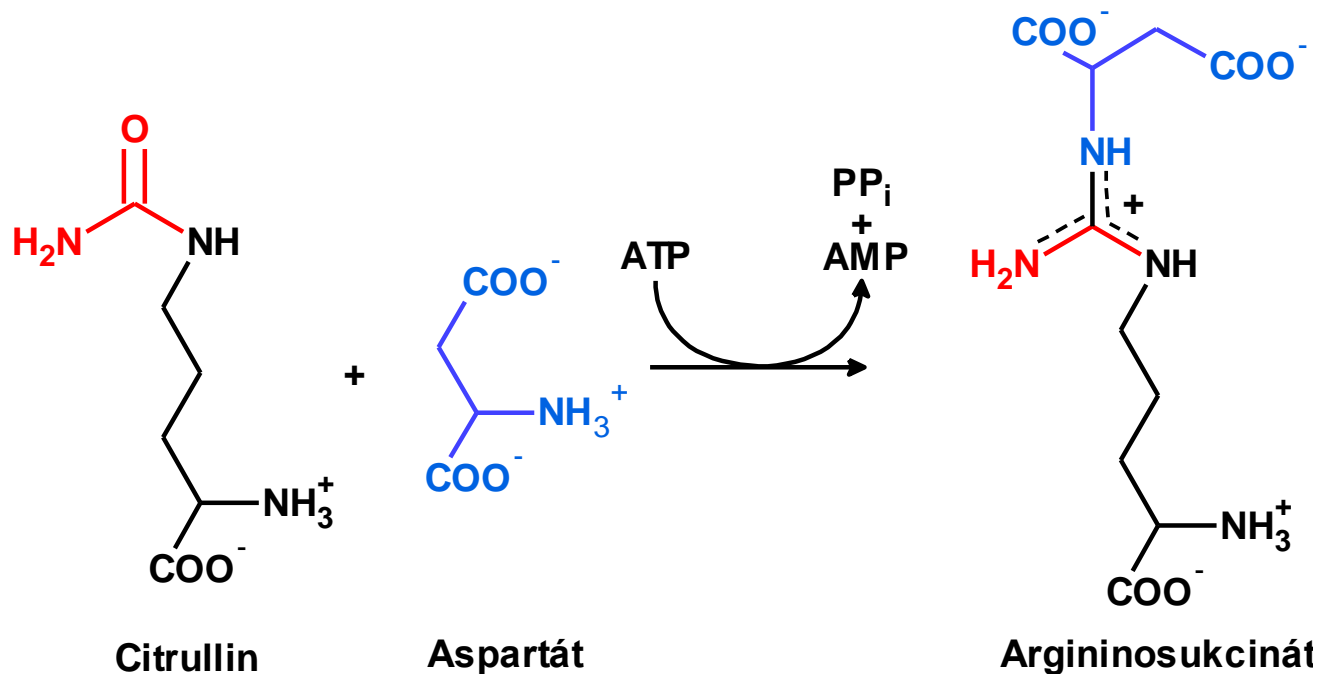
První reakce močovinového cyklu v matrix mitochondrie. Karbamoylfosfát jako anhydrid, který má vysoký potenciál přenosu.

Enzym: ornithintranskarmoylasa katalyzuje vstup karbamoylfosfátu na ornithin za tvorby citrullinu.



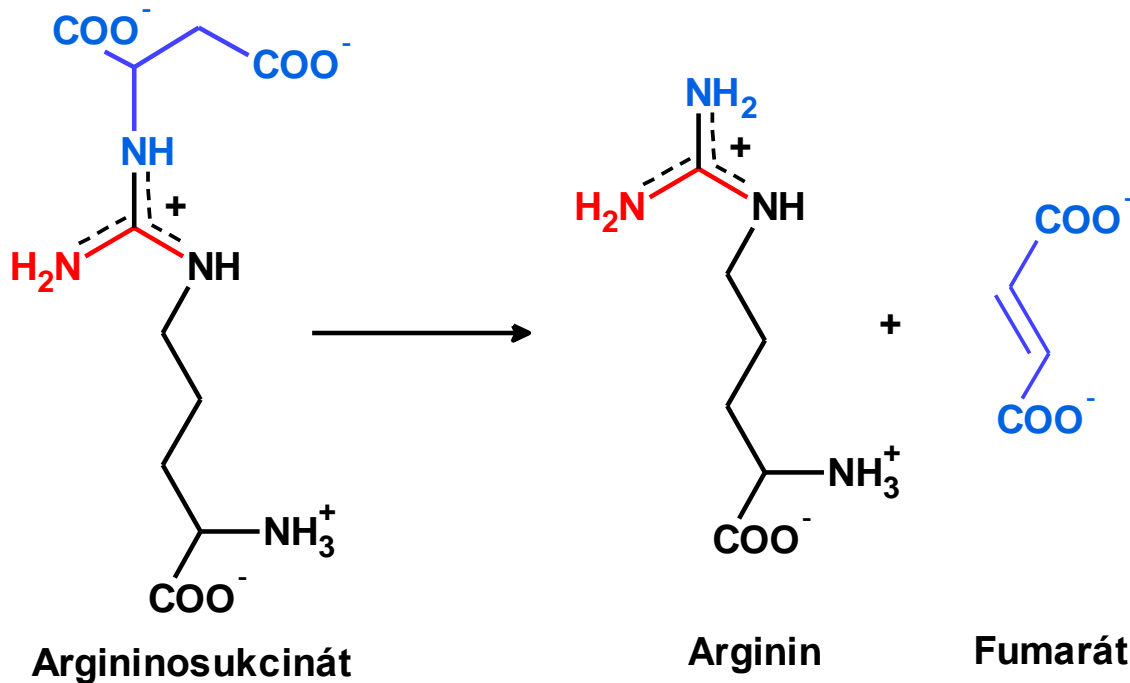
# Močovinový cyklus.

Citrullin je transportován do cytoplasmy, kde se kondenzuje s aspartátem za katalýzy argininosukcinátsynthetasy a tvorby argininosukcinátu. ATP se štěpí na AMP a  $\text{PP}_i$  (difosfát nebo pyrofosfát), který se dále štěpí pyrofosfatasou na dva  $\text{P}_i$ . Aspartát vnáší druhý dusík do molekuly výsledné močoviny.



# Močovinový cyklus.

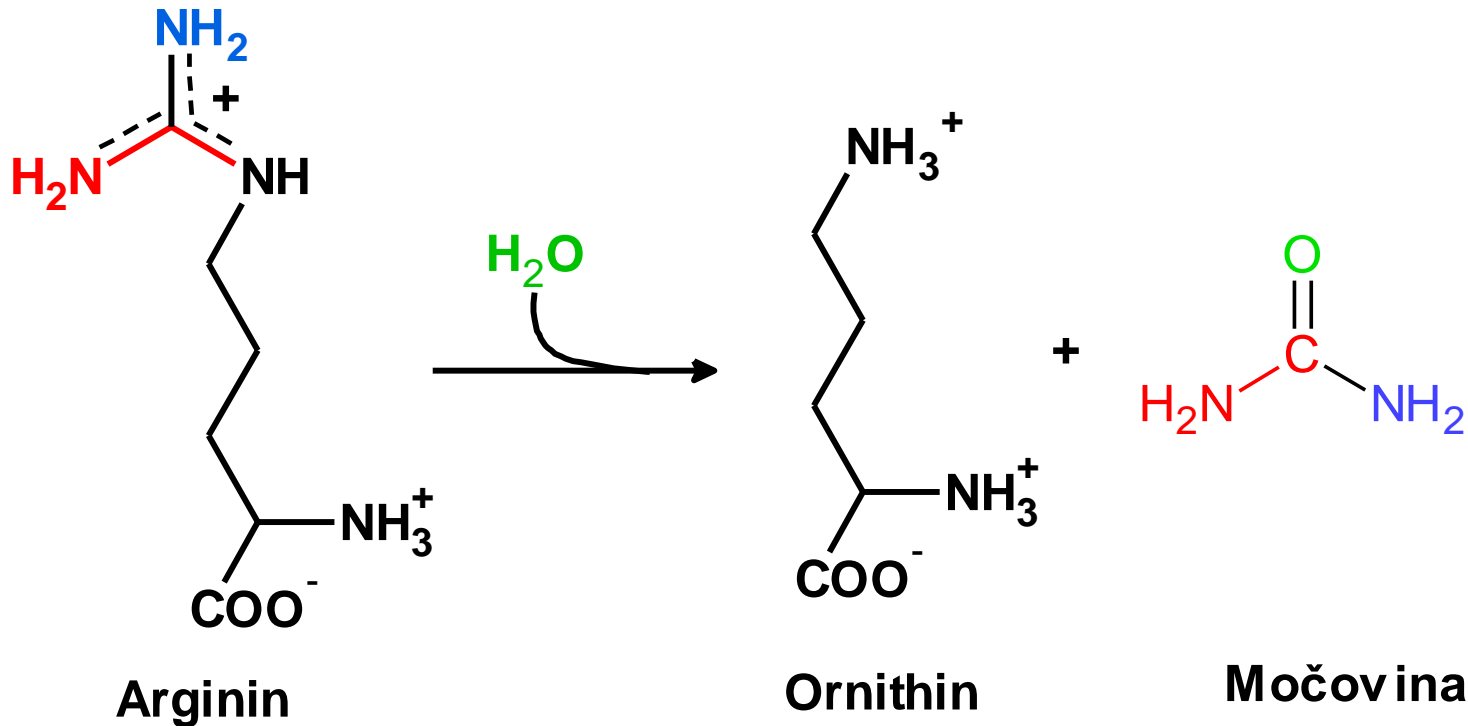
Argininosukcinasa katalyzuje štěpení argininosukcinátu na arginin a fumarát. Uhlíkový skelet aspartátu se uchová ve formě fumarátu.





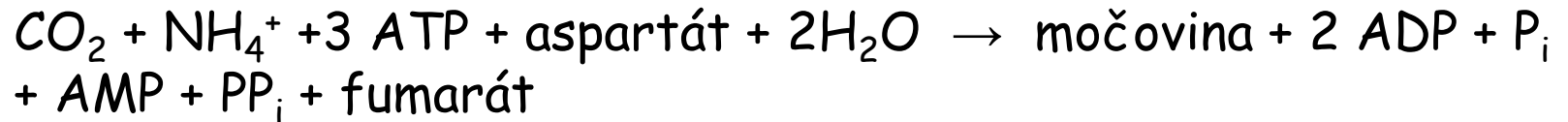
# Močovinový cyklus.

Arginin je hydrolyzován enzymem arginasou na ornithin a močovinu.



# Močovinový cyklus.

Stechiometrie močovinového cyklu:



Difosfát se rychle rozkládá pyrofosfatasou. K syntéze jedné molekuly močoviny se tak spotřebují 4 ATP.

Vzniklý fumarát je hydratován na malát, který je dále oxidován na oxaloacetát.

Oxaloacetát může být převeden glukoneogenezí na glukosu nebo transaminací na aspartát.

## Osud uhlíkaté kostry aminokyselin.

Uhlíkatá kostra aminokyselin je vnášena do hlavních metabolických drah.

Nejdůležitější je citrátový cyklus přes jehož meziprodukty se mohou uhlíkaté kostry aminokyselin převést na glukosu nebo úplně oxidovat.

Uhlíkatá kostra 20 proteinogenních aminokyselin je převáděna na sedm molekul: pyruvát, acetyl CoA, acetoacetyl CoA, 2-oxoglutarát, sukcinyl CoA, fumarát a oxaloacetát.

Aminokyseliny, která poskytují acetyl CoA a acetoacetyl CoA se nazývají **ketogenní**, protože poskytují ketolátky nebo mastné kyseliny.

Aminokyseliny jejichž uhlíkatý skelet je převáděn na pyruvát, 2-oxoglutarát, sukcinyl CoA, fumarát nebo oxaloacetát se nazývají **glukogenní**.

Savci nemají metabolické dráhy syntézy glukosy z acetyl CoA a acetoacetyl CoA.

## Osud uhlíkaté kostry aminokyselin.

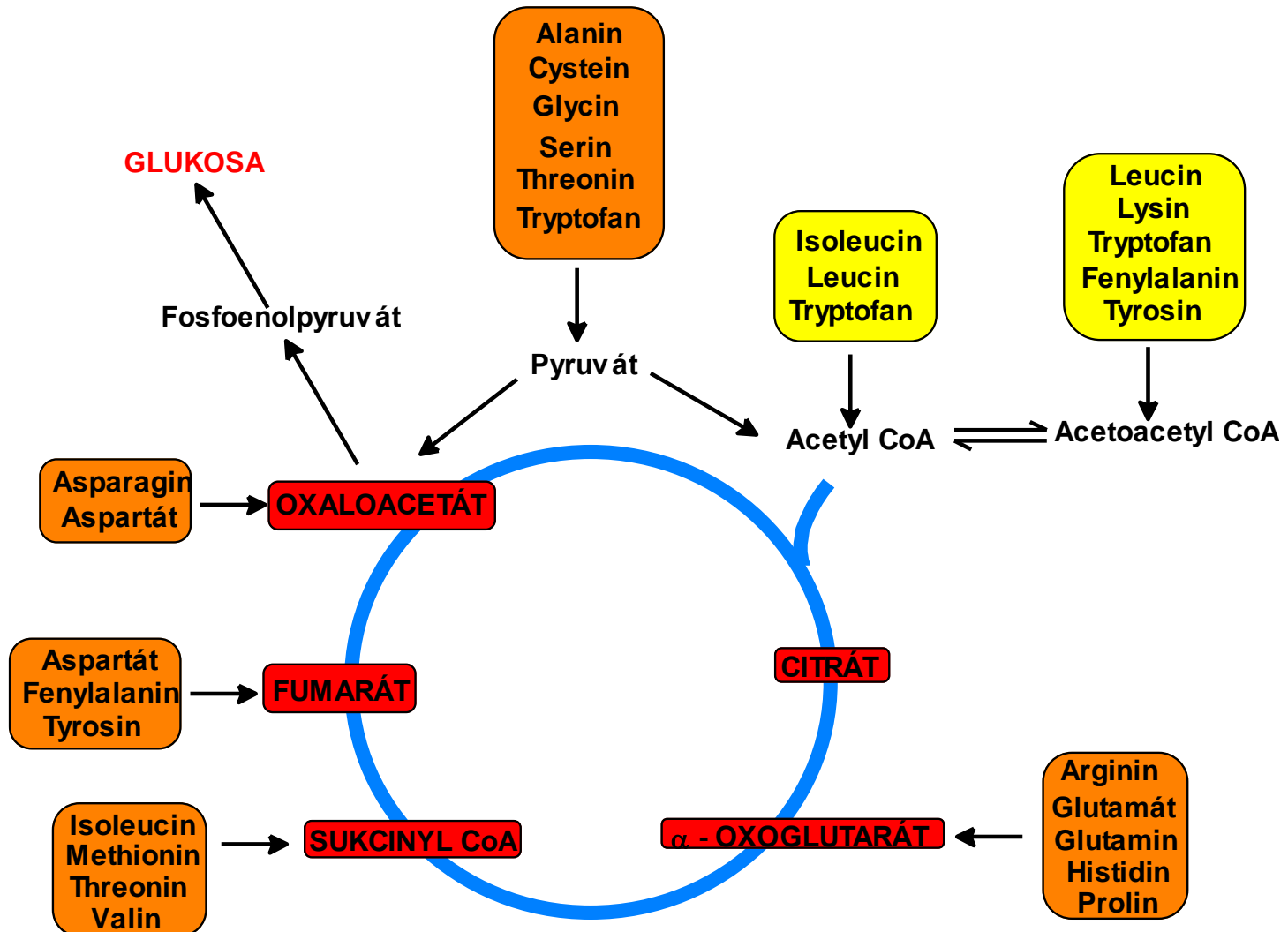
Z dvaceti proteinogenních aminokyselin jsou jen dvě čistě ketogenní - leucin a lysin.

Isoleucin, fenylalanin, tryptofan a tyrosin jsou glukó i ketogenní.

Zbýlých 14 aminokyselin je glukogenních.

# Osud uhlíkového skeletu aminokyselin.

Glukogenní aminokyseliny jsou **oranžové**, ketogenní **žluté**.



# Formy vstupu uhlíkových skeletů aminokyselin do metabolismu.

Tříuhlíkaté aminokyseliny alanin, serin a cystein vstupují do metabolismu jako **pyruvát**.

Glycin může být převeden enzymově na serin nebo štěpen na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  a aktivní jednouhlíkatou jednotku.

Threonin poskytuje pyruvát přes meziprodukt 2-amino-3-oxobutyrate.

Tři uhlíkové atomy tryptofanu se odštěpí jako alanin a ten je převeden na pyruvát.

Jako **oxaloacetát** vstupují do metabolismu asparagin a aspartát. Aspartát může také vstupovat do metabolismu jako fumarát !!

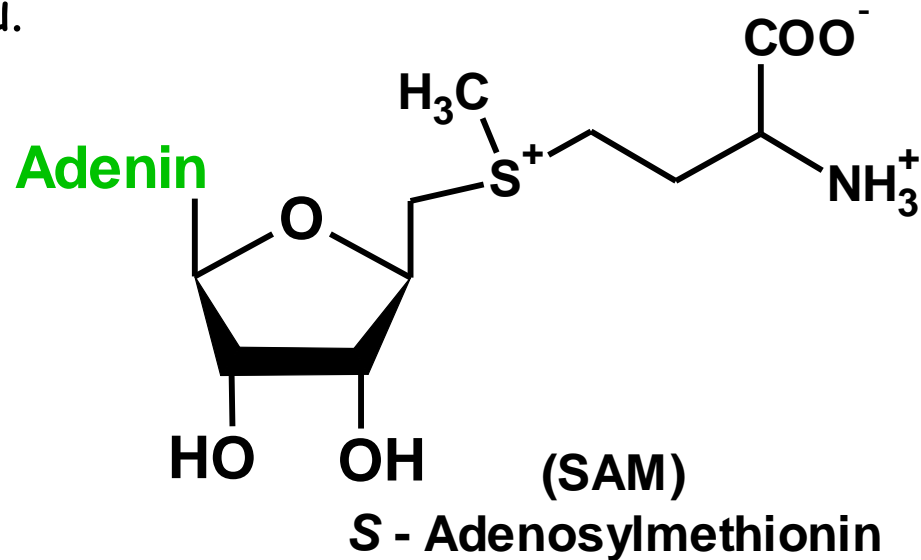
Pětiuhlíkaté aminokyseliny vstupují do metabolismu jako **2-oxoglutarát**. Nejdříve jsou převedeny na glutamát - histidin, glutamin, prolin a arginin.

**Sukcinyl CoA** je vstupní sloučeninou nepolárních aminokyselin jako jsou methionin, isoleucin a valin. .

# Formy vstupu uhlíkových skeletů aminokyselin do metabolismu.

Meziproduktem degradace těchto tří aminokyselin je propionyl CoA, který je převeden po karboxylaci přes methylmalonyl CoA na sukcinyl CoA (viz metabolismus mastných kyselin s lichým počtem uhlíků).

Methionin je převáděn na sukcinyl CoA v devíti krocích. Prvním stupněm je adenylace za tvorby S-adenosylmethioninu (SAM) což je donor methyly.



## Formy vstupu uhlíkových skeletů aminokyselin do metabolismu.

Větvené aminokyseliny jsou odbourávány na deriváty mastných kyselin.

Leucin je transaminován na  $\alpha$ -oxoisokaproát, který je oxidativně dekarboxylován na isovaleryl CoA komplexem dehydrogenasy  $\alpha$ -ketovětvených kyselin.

Ketokyseliny vzniklé z valinu podstupují oxidativní dekarboxylaci (analogie pyruvátdehydrogenay). Dalšími reakcemi vzniká z leucinu acetyl CoA a acetoacetyl CoA (ketogenní aminokyselina).

Obdobně valin a isoleucin. Isoleucin poskytne acetyl CoA a propionyl CoA, zatímco valin  $\text{CO}_2$  a propionyl CoA.



# Formy vstupu uhlíkových skeletů aminokyselin do metabolismu.

Degradací aromatických aminokyselin vzniká acetoacetát, fumarát a pyruvát (gluko i ketogenní aminokyseliny).

Odbourání fenylalaninu začíná hydroxylací enzymem fenylalaninhydroxylasou za tvorby tyrosinu.

Fenylalaninhydroxylasa má jako jeden substrát  $O_2$  a nazývá se také monooxygenasa. Jeden z atomů  $O_2$  se váže na substrát a druhý je ve vodě.

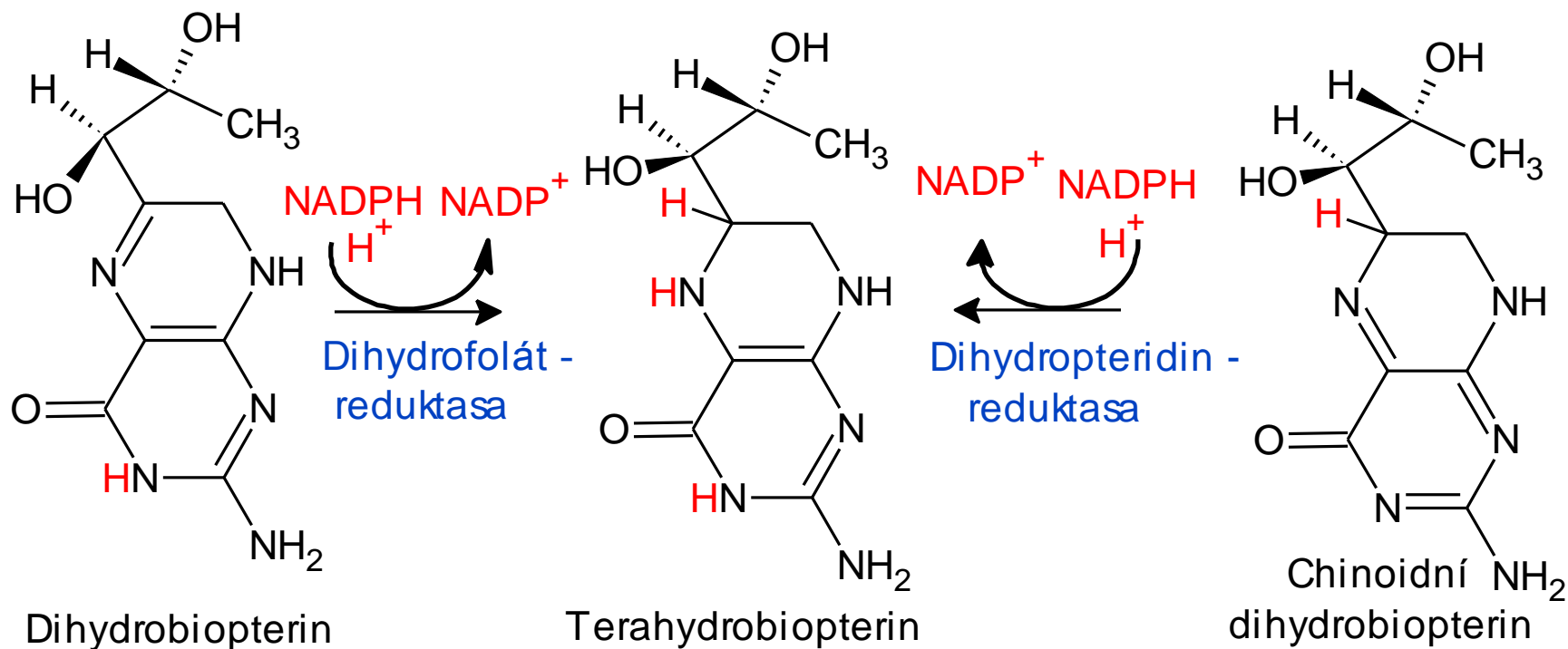
Reduktantem je tetrahydrobiopterin, derivát biopterinu.

Biopterin není vitamin. Na počátku vzniká tetrahydrobiopterin redukcí dihydrobiopterinu NADPH enzymem dihydrofolátreduktasa. Při hydroxylaci fenylalaninu vzniká dihydrobiopterin. Ten je redukován zpět na tetrahydrobiopterin NADPH a enzymem dihydropteridinreduktasa.



# Degradace fenylalaninu a tyrosinu.

Dvojí možnost tvorby a obnovy tetrahydrobiopterinu.



## Degradace fenylalaninu a tyrosinu.

Vzniklý tyrosin je transaminován na *p*-hydroxyfenylpyruvát.

Další posup:

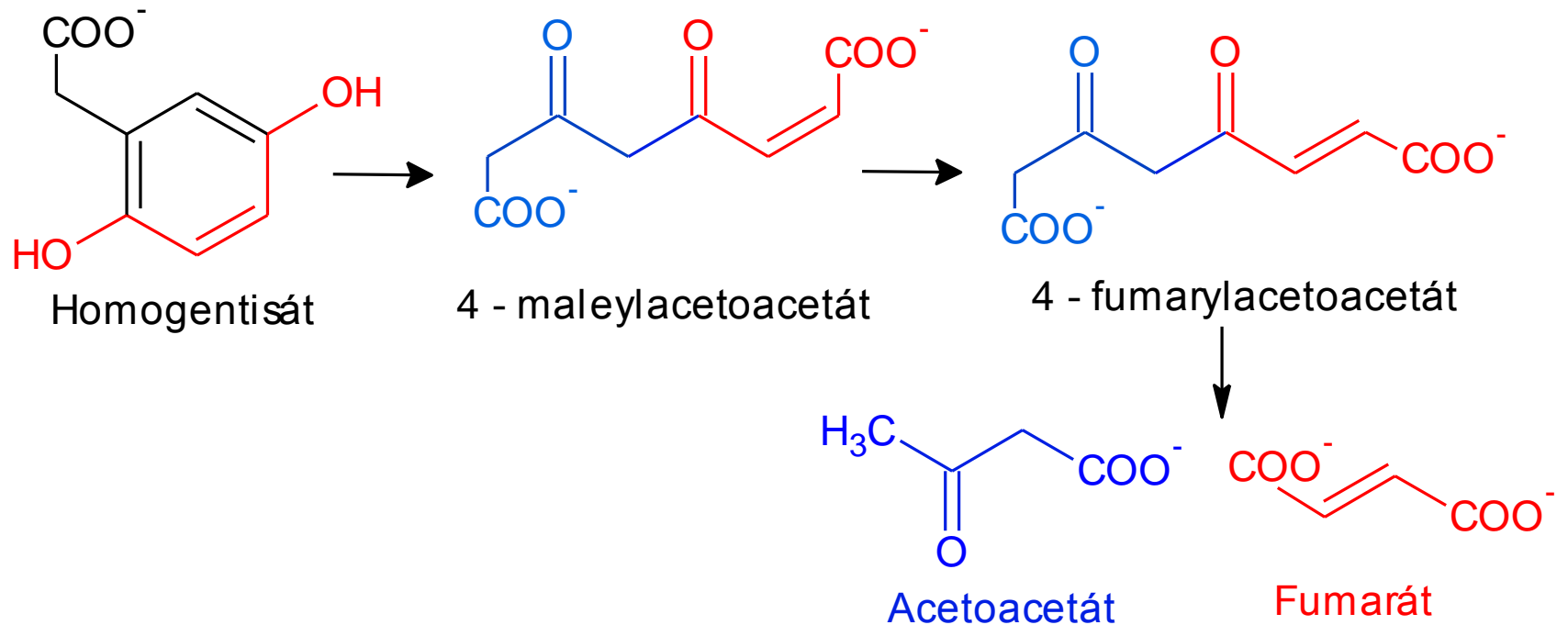
Vzniklá ketokyselina reaguje s kyslíkem za katalýzy enzymem *p*-hydroxyfenylpyruváthydroxylasa (dioxygenasa - oba atomy  $O_2$  jsou inkorporovány do produktu). Produktem je homogentisát.

Aromatický kruh homogentisátu je štěpen  $O_2$  za katalýzy homogentisát oxidasy (další dioxygenasa). Produktem je

4-maleylacetoacetát, který se izomerizuje na

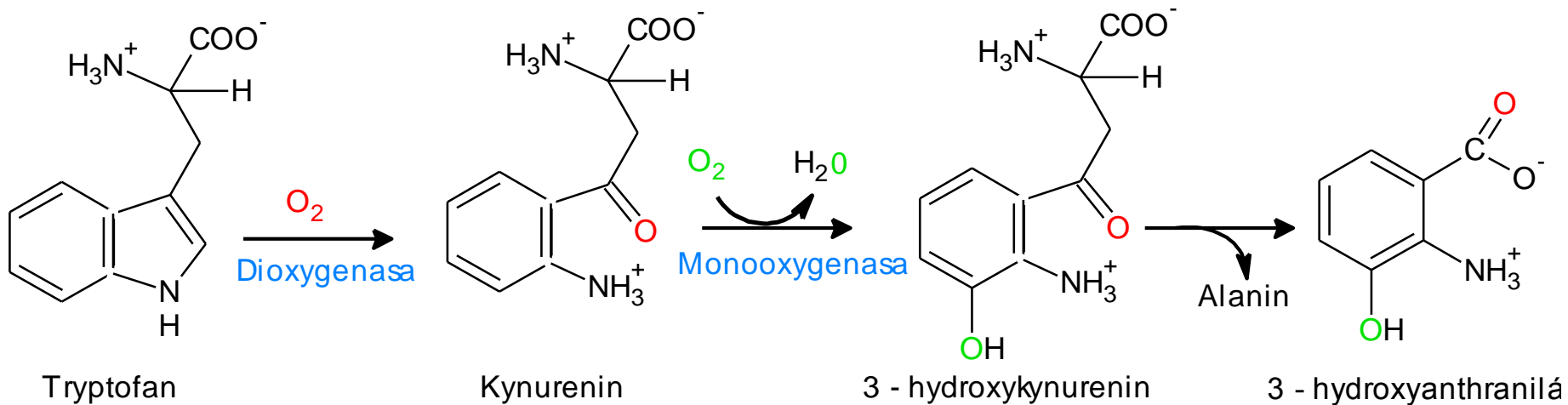
4-fumarylacetoacetát a ten je hydrolyzován na fumarát a acetoacetát.

# Degradace fenylalaninu a tyrosinu.



# Degradace tryptofanu.

Na degradaci tryptofanu, stejně jako na degradaci Phe a Tyr, se podílí několik oxygenas. Tryptofan-2,3-dioxygenasa štěpí pyrrolový kruh a kynurenin-3-monooxygenasa hydroxyluje zbývající benzenový kruh. Je odštěpen alanin a 3-hydroxyanthranilát je štěpen další dioxygenasou a v **dalších jedenácti krocích na acetoacetát**.



## Vrozené vady metabolismu aminokyselin.

**Alkaptonurie** je dědičné metabolické onemocnění způsobené nedostatkem homogentisát oxidasy. Homogentisát se akumuluje a vzduchem se oxiduje na tmavý polymer, který způsobuje tmavou barvu moči.

Onemocnění „**moč javorového sirupu**“ je způsobené nedostatečnou funkcí dehydrogenasy větvených aminokyselin (Val. Leu a Ile). Je blokována oxidativní dekarboxylace a důsledkem je zvýšená hladina  $\alpha$ -ketokyselin z větvených aminokyselin v krvi a moči. Moč je cítit po javorovém sirupu. Léčí se dietou chudou na větvené aminokyseliny. Pokud se neléčí dochází u pacientů k tělesné i mentální retardaci.

Onemocnění se deteguje reakcí moči s 2,4-dinitrofenylhydrazinem - s ketokyselinami vzniká sraženina 2,4-dinitrofenylhydrazonu.

## Vrozené vady metabolismu aminokyselin.

**Fenylketonurie** je nejznámější porucha metabolismu aminokyselin. Je způsobena nedostatečností fenylalaninhydroxylasy, častěji tetrahydrobiopeterinového kofaktoru.

Fenylalanin se hromadí ve všech tělních tekutinách, protože nemůže být převeden na tyrosin.

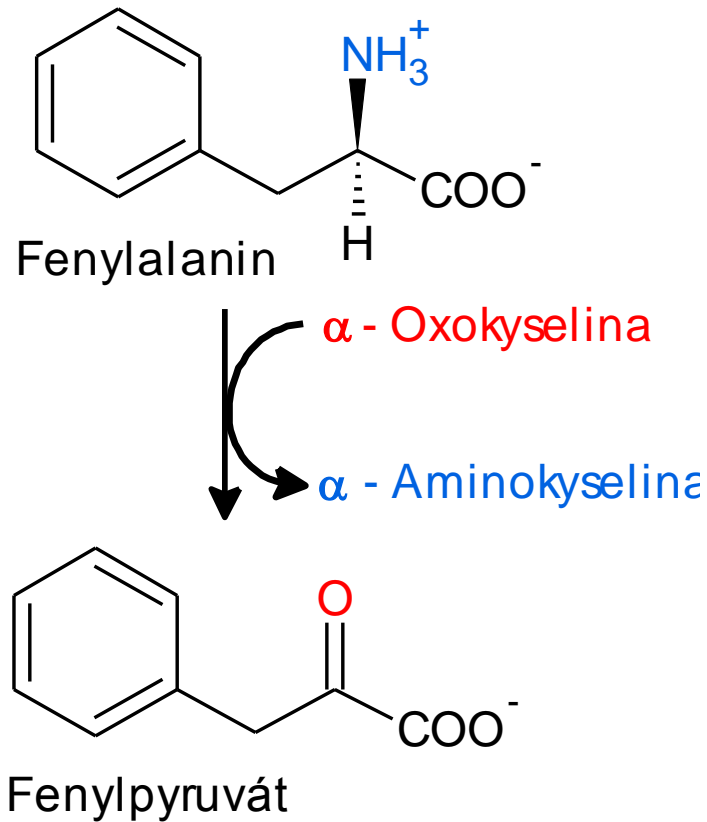
Za normálního stavu jsou  $\frac{3}{4}$  Phe převedeny na Tyr a zbylá čtvrtina zabudována do proteinů. Po transaminaci je Phe převeden na fenylpyruvát a odtud název onemocnění fenylketonurie.

Detekce se provádí reakcí moči s  $\text{FeCl}_3$ , vzniká olivově zelené zbarvení.

Onemocnění se léčí dietou chudou na Phe. Pokud se neléčí dochází u pacientů k mentální retardaci. Polovina umírá kolem 20 let a  $\frac{3}{4}$  kolem 30. roku věku.

Četnost onemocnění je 1 : 20 tis. novorozenců. Dědičné onemocnění autosomálně recesivní.

# Transaminace fenylalaninu - tvorba fenylpyruvátu.





## Vrozené vady metabolismu aminokyselin.

<b>Onemocnění</b>	<b>Enzymový deficit</b>	<b>Symptomy</b>
Citrullinemie	Argininosukcinátlyasa	Letargie
Tyrosinemie	Enzymy degradace Tyr	Slabost, mentální retardace
Albinismus	Tyrosinasa	Absence pigmentace
Homocystinurie	Cystathionin- $\beta$ -synthasa	Svalová slabost, mentální retardace
Hyperlysinemie	Dehydrogenasa $\alpha$ -amino- adipové semialdehydu	Ataxie, ment. retardace



