



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus. Biosyntéza aminokyselin (11).

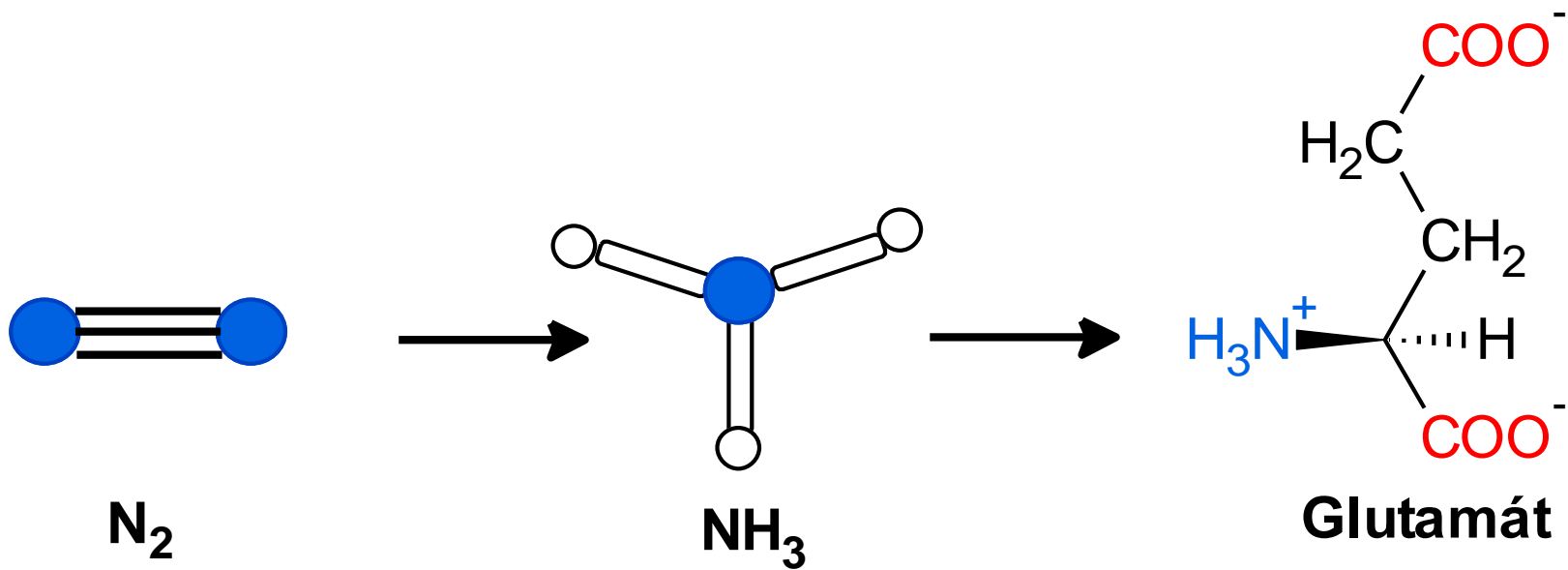
Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Základní schéma vstupu dusíku do metabolismu.



Fixace dusíku.

Dusík aminokyselin, purinů, pyrimidinů a všech dalších biomolekul má původ ve vzdušném dusíku.

Fixace dusíku spočívá v redukci N_2 na HH_3 - fixace dusíku.

Vazba mezi atomy dusíku je extrémně silná, vazebná energie je 940 kJ/mol.

Vyšší organismy nejsou schopné fixovat dusík. Schopnost fixace mají některé bakterie a archaea.

Symbiotická *Rhizobia* na kořenech bobovitých rostlin fixují dusík a zásobují NH_3 bakterie i rostliny.

Podstatné pro všechny vyšší eukaryotní organismy jsou diazotrofní (dusík vážící) mikroorganismy, které ročně váží 10^{11} kg, což je 60% nově fixovaného dusíku na Zemi.

Blesky a UV světlo poskytují dalších 15% a zbylých 25% je průmyslová výroba (Haberova metoda, směs N_2 a H_2 za katalýzy Fe, při teplotě $500^\circ C$ a tlaku 300 atm).).

Fixace dusíku.

Tvorba NH_3 z N_2 u mikroorganismů probíhá na nitrogenasovém komplexu.

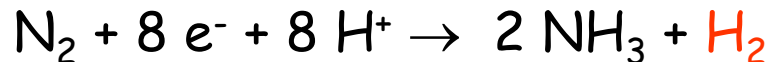
Nitrogenasový komplex je složen ze dvou částí.

Reduktasa - zdroj elektronů s vysokým redukčním potenciálem.

Nitrogenasa - využívá tyto elektrony k redukci N_2 na NH_3 .

Nitrogenasový komplex musí být chráněn před O_2 . Bobovité rostliny mají velmi nízkou koncentraci kyslíku v nodulech, protože kyslík váží na leghemoglobin, analog hemoglobinu. Redukce N_2 na NH_3 je šestielektronový proces.

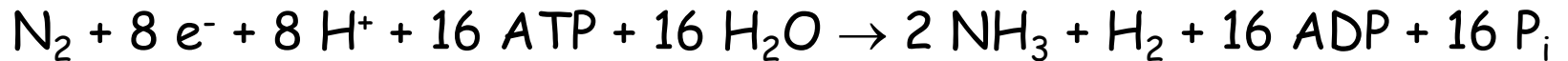
Biologická redukce produkuje 1 mol H_2 vedle dvou molů NH_3 z jednoho molu N_2 a proto spotřebuje 8 elektronů:



Osm potřebných elektronů má původ z redukováného ferredoxinu (fotosyntéza) nebo z oxidativní fosforylace.

Fixace dusíku.

Pro přenos každého elektronu jsou nutné 2 molekuly ATP:

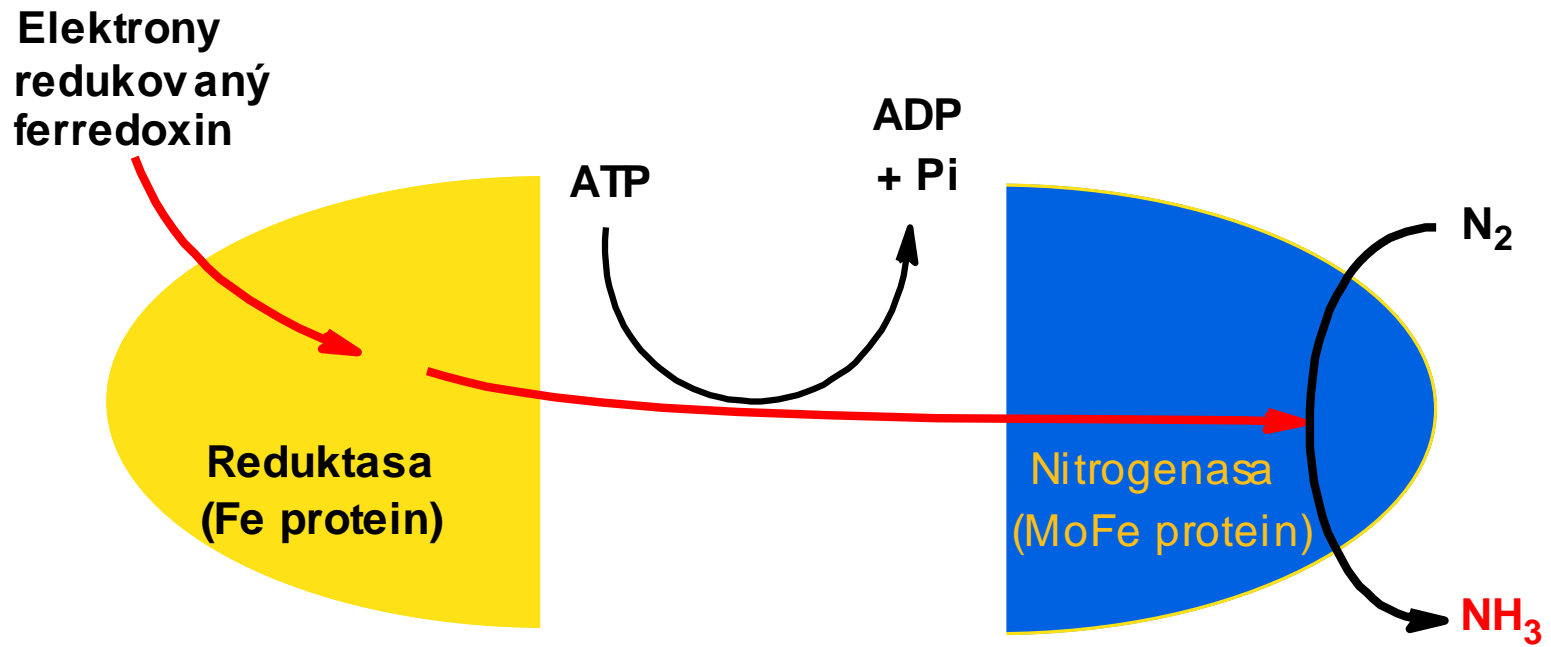


Hydrolýza ATP je využita k překonání aktivačních bariér (kinetická průchodnost) spíše než k termodynamické schůdnosti reakce. Obě komponenty - reduktasa i nitrogenasa jsou proteiny železo-síra (klastry - transfer elektronů).

Reduktasa je homo dimer dvou identických jednotek (30 kD) vázaných 4Fe - 4S klastrem.

Nitrogenasa je $\alpha_2\beta_2$ tetramer (240 kD), obsahuje Mo a proto MoFe protein + 3Fe - 3S klastr.

Fixace dusíku.



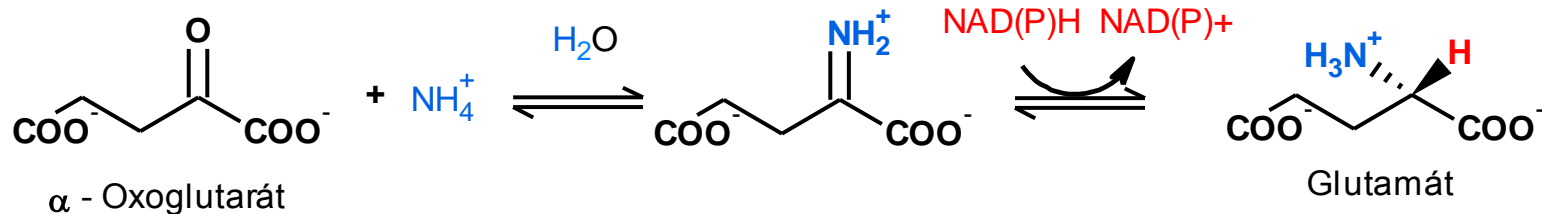
Asimilace amoniaku do aminokyselin.

Aminokyseliny glutamát a glutamin hrají hlavní roli v přenosu dusíku na další aminokyseliny.

Biosyntéza glutamátu - katalýza glutamátdehydrogenasa:

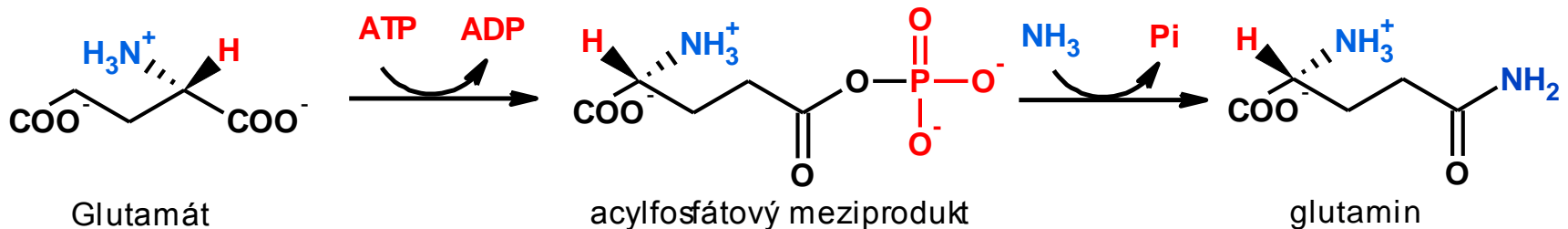


Reakce probíhá ve dvou stupních. Nejdříve se vytváří Schiffova báze mezi aminem a karbonylem, která je posléze redukována hydridovým iontem z NADPH:



Asimilace amoniaku do aminokyselin.

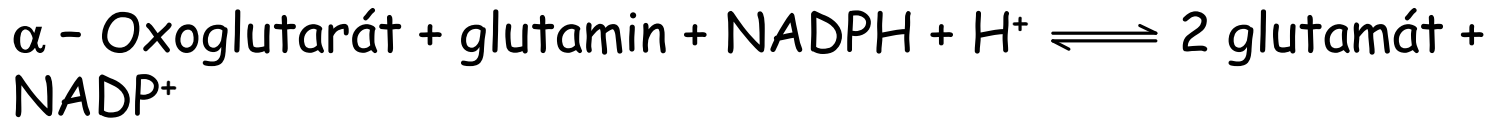
Redukce Schiffovy báze NADPH vede k stereochemické konfiguraci na α uhlíku S (absolutní konfigurace) a L isomer !!
Glutamát může přijímat další amoniak za katalýzy glutaminsynthetasou a tvorby glutaminu.



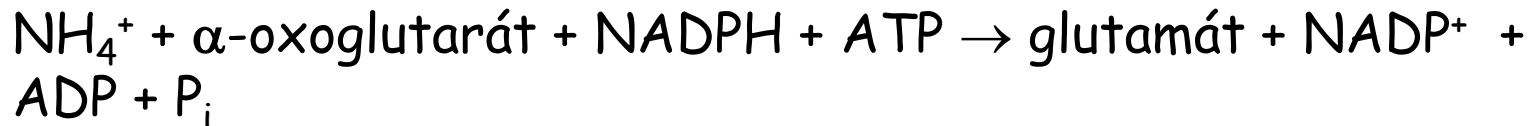
Glutamátdehydrogenasa a glutaminsynthtasa jsou enzymy přítomné ve všech organismech.

Asimilace amoniaku do aminokyselin.

Většina prokaryot má enzym glutamátsynthasu, který katalyzuje redukční aminaci oxoglutarátu na glutamát:



Za nedostatku NH_4^+ je většina glutamátu syntetizována za katalýzy glutaminsynthasy a glutamátsynthasy:



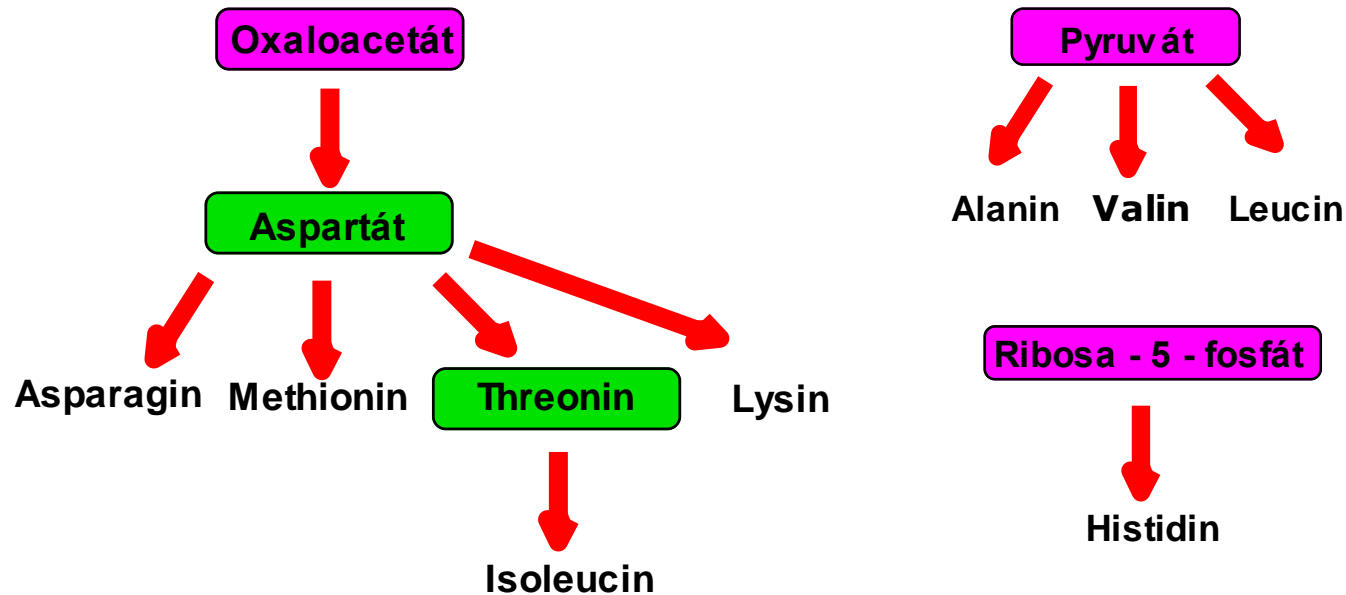
Tato cesta je náročnější na energii, ale prokaryota ji využívají, protože K_m glutamátdehydrogenasy pro NH_4^+ je vysoké (1 mM) a enzym není při nízkých hladinách NH_4^+ saturován.

Glutaminsynthasa má naopak vysokou afinitu k NH_4^+ . Potřebná je však hydrolýza ATP.

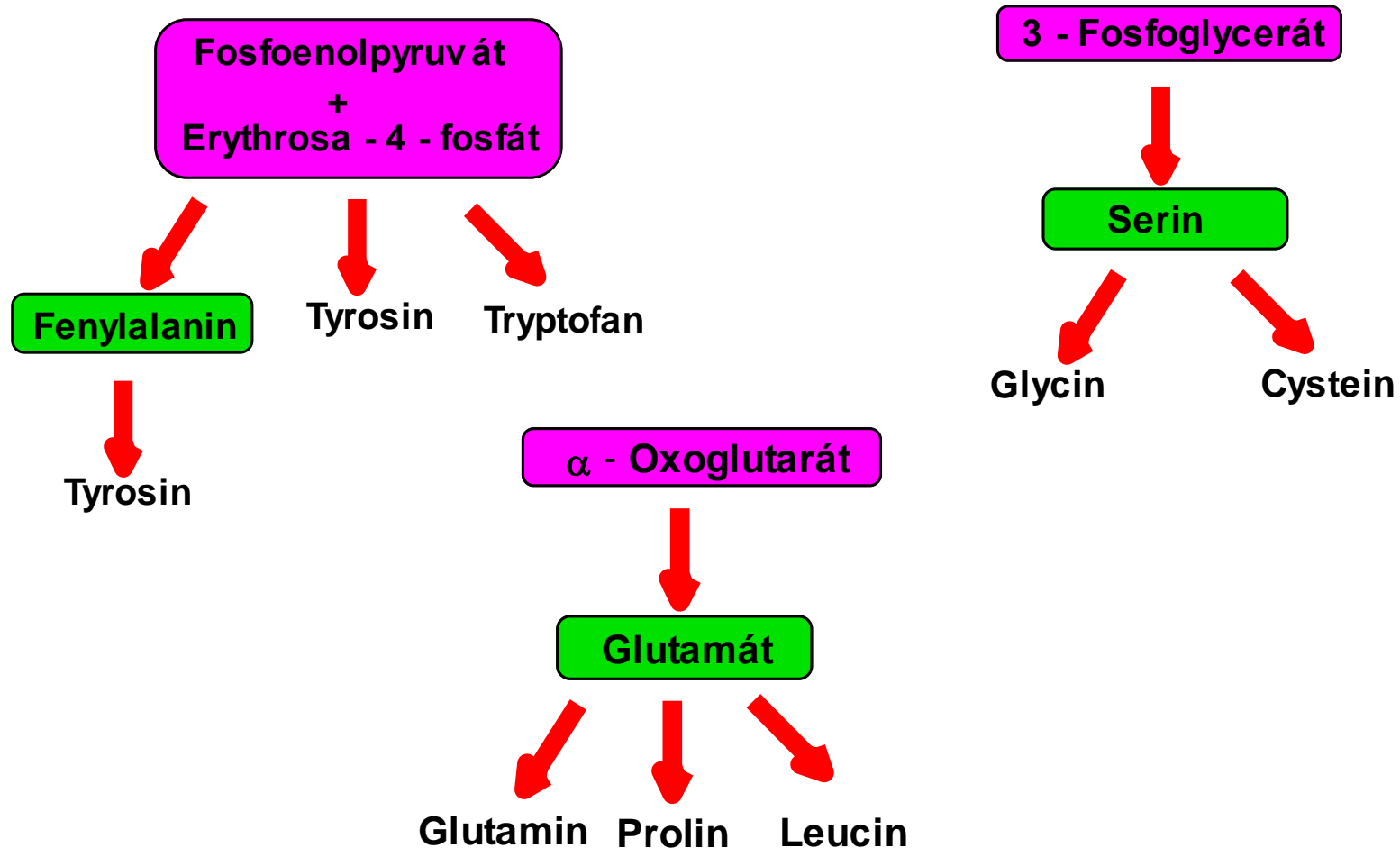
Uhlíkatý skelet aminokyselin.

Biosyntéza uhlíkaté kostry aminokyselin má šest společných metabolických drah:

Uhlíkatý skelet má původ v meziproduktech glykolýzy, pentosafosfátové dráhy nebo citrátového cyklu.



Uhlíkatý skelet aminokyselin.



Esenciální a neesenciální aminokyseliny.

Většina mikroorganismů syntetizuje všech 20 proteinogéních aminokyselin. Člověk jen 9.

Aminokyseliny, které musí být přijímány v potravě se nazývají esenciální. Ostatní neesenciální.

Arginin syntetizovaný v močovinovém cyklu je dostatečný pro dospělého člověka, ale ne pro dítě.

Deficit, dokonce jen jedné aminokyseliny, má za výsledek negativní dusíkovou bilanci.

Syntéza neesenciálních aminokyselin je jednoduchá, kdežto biosyntéza esenciálních je složitá. V průměru je třeba deseti stupňů.

Aminokyseliny esenciální a neesenciální.

Neesenciální

AMINOKYSELINY

Esenciální

Alanin

Arginin

Asparagin

Aspartát

Cystein

Glutamát

Glutamin

Glycin

Prolin

Serin

Tyrosin

Histidin

Isoleucin

Leucin

Lysin

Methionin

Fenylalanin

Threonin

Tryptofan

Valin

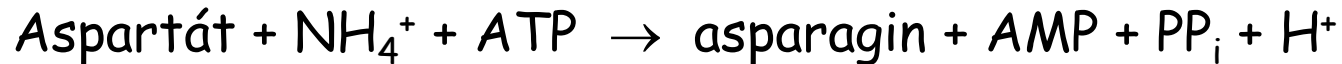
Biosyntéza aminokyselin transaminací.

Tři oxokyseliny - α -oxoglutarát (glutamát), oxaloacetát (aspartát) a pyruvát (alanin) lze převést na aminokyseliny transaminací.

Donorem aminoskupiny je glutamát.

Prostheticou skupinou aminotransferas je pyridoxalfosfát (PLP).

Asparagin:

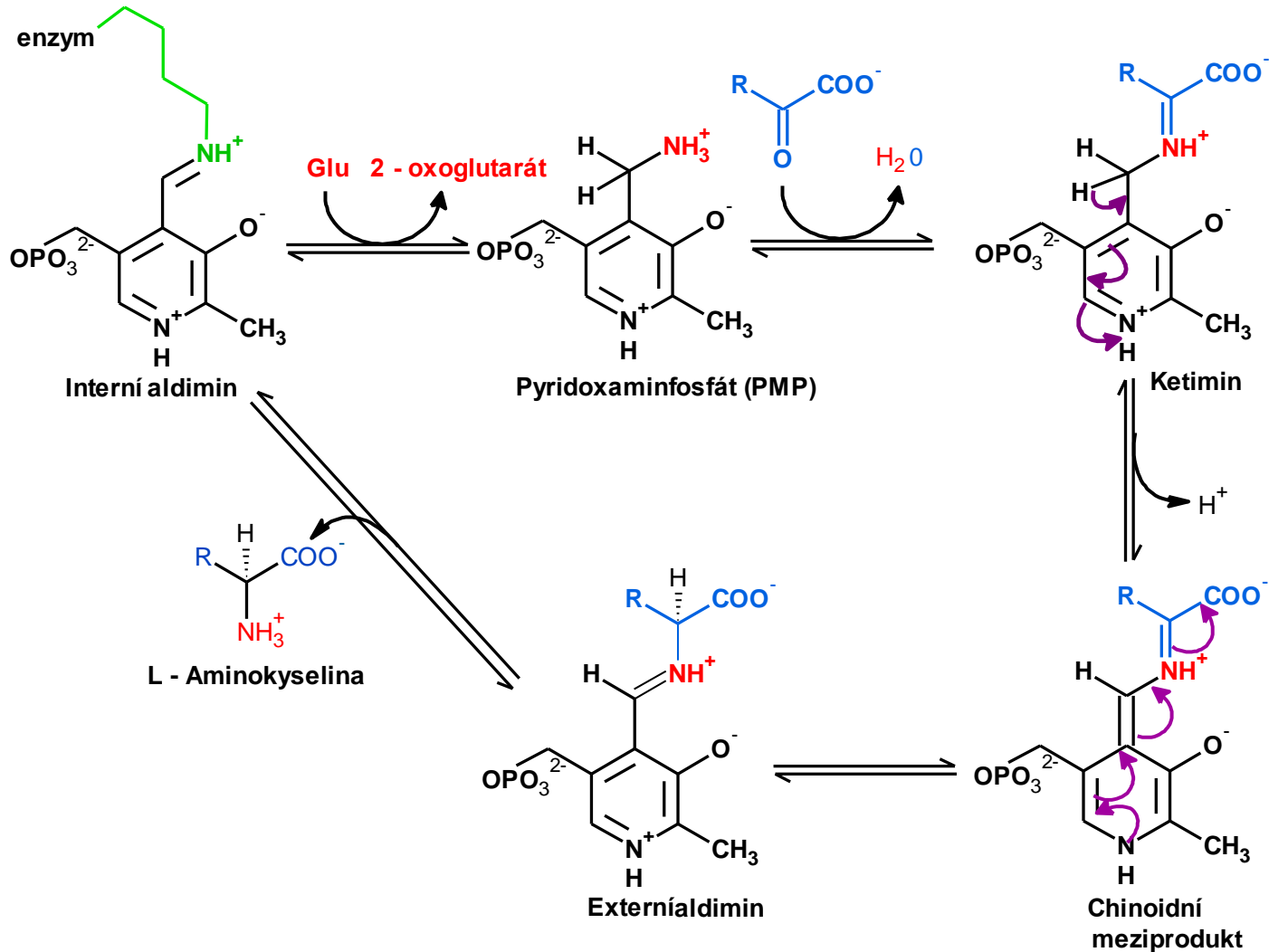


U savců je donorem aminoskupiny asparaginu spíše glutamin než NH_4^+ , což je typické pro bakterie.

Motiv hydrolýzy glutaminu má obecnější platnost při biosyntézách.

Glutamát je prekurzorem glutaminu, prolinu a argininu.

Mechanismus transaminace při biosyntéze.



Chiralita všech aminokyselin.

Nejdůležitějším krokem při transaminaci je protonizace chinoidního meziprojektu za vzniku externího aldiminu.

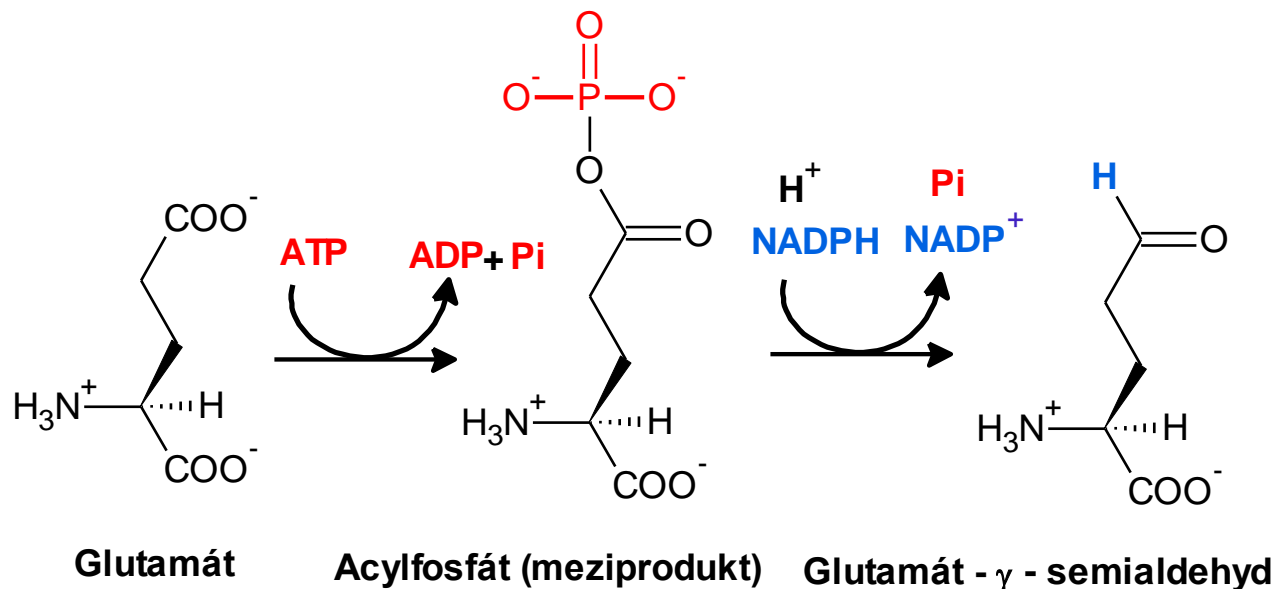
U všech aminotransferas jsou zakonzervována dvě rezidua. Lys tvořící Schiffovu bázi s PLP a arginin, který vstupuje do interakce s α -karboxylátovou skupinou ketokyseliny.

Chiralita tvořených aminokyselin je dána směrem odkud je tento proton přidán na chinoidní formu.

Interakce mezi stabilním (konzervovaným) Arg a α -karboxylátovou skupinou napomáhá orientaci substrátu tak, že proton z lysinového zbytku vstupuje na chinoidní meziprojekt ze spodní strany za tvorby aldiminu s L-konfigurací na C_{α} místě.

Glutamát - prekurzor prolinu a argininu.

γ -Karbonyl Glu reaguje s ATP za tvorby acylfosfátu (směsný anhydrid), který je redukován NADPH na semialdehyd. Semialdehyd se cyklizuje (ztráta H_2O) na Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát, který poskytne po redukcii prolin. Semialdehyd může být podroben transaminaci za tvorby ornithinu a ten v několika stupních převeden na arginin.

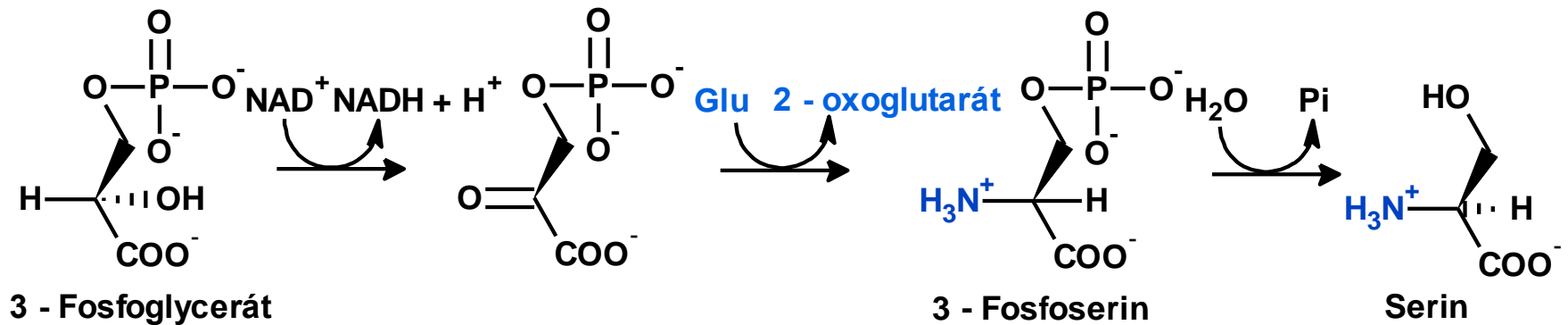


3-Fosfoglycerát - prekurzor serinu, cysteinu a glycinu.

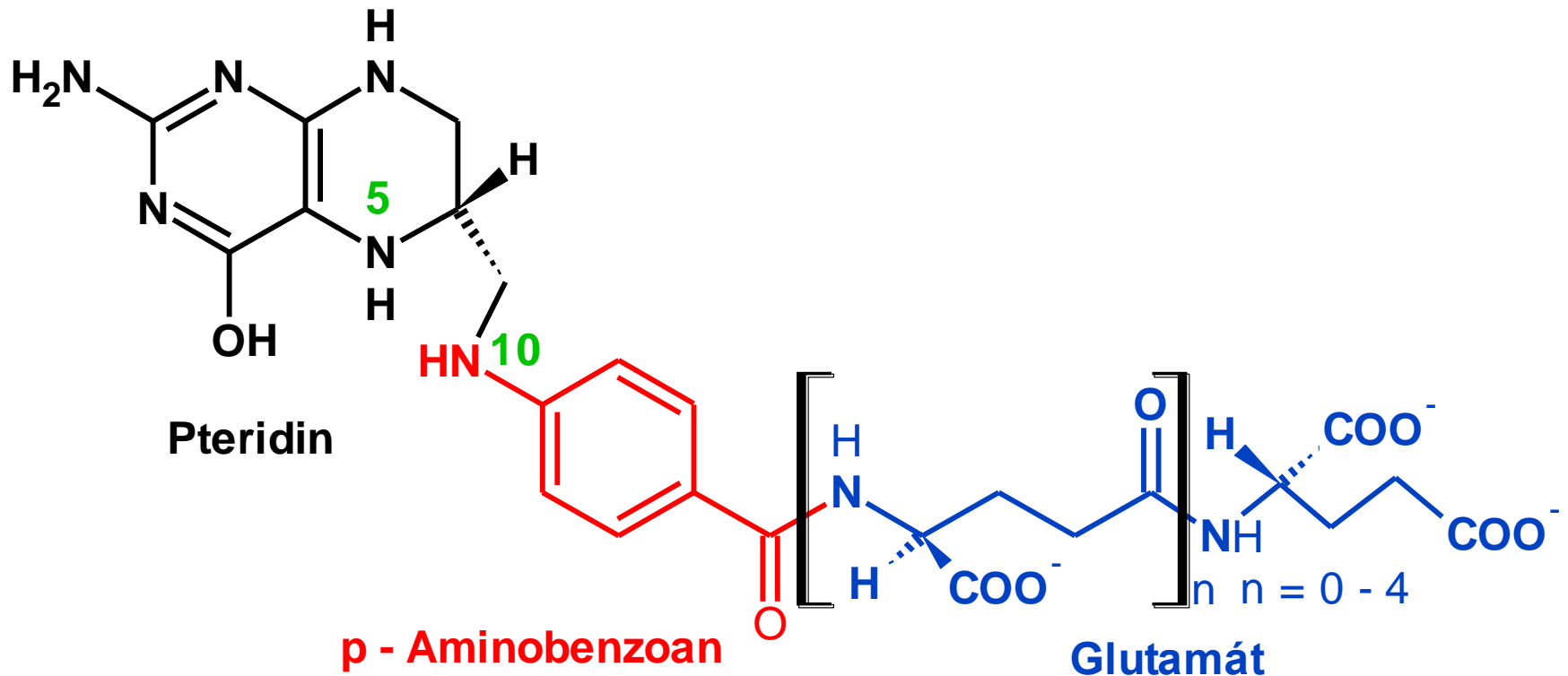
3- Fosfoglycerát, meziprodukt glykolýzy, je prekurzorem serinu, cysteinu a glycinu. Serin je prekurzorem cysteinu a glycinu. Konverze serinu na cystein vyžaduje substituci atomu kyslíku za atom síry. Donorem je methionin. Při tvorbě glycinu je methylenová skupina serinu přenesena na tetrahydrofolát.

Serin + tetrahydrofolát →

glycin + N^5, N^{10} -methylentetrahydrofolát + H_2O



Tetrahydrofolát (THF).



Jednouhlíkaté skupiny.

Tetrahydrofolát (THF), také tetrahydropteroylglutamát, je nositelem aktivovaných jednouhlíkatých skupin.

Savci syntetizují pteridinový kruh, ale nespojí ho s ostatními dvěma v THF. Získávání THF z potravy nebo ho produkují střevní mikroorganismy.

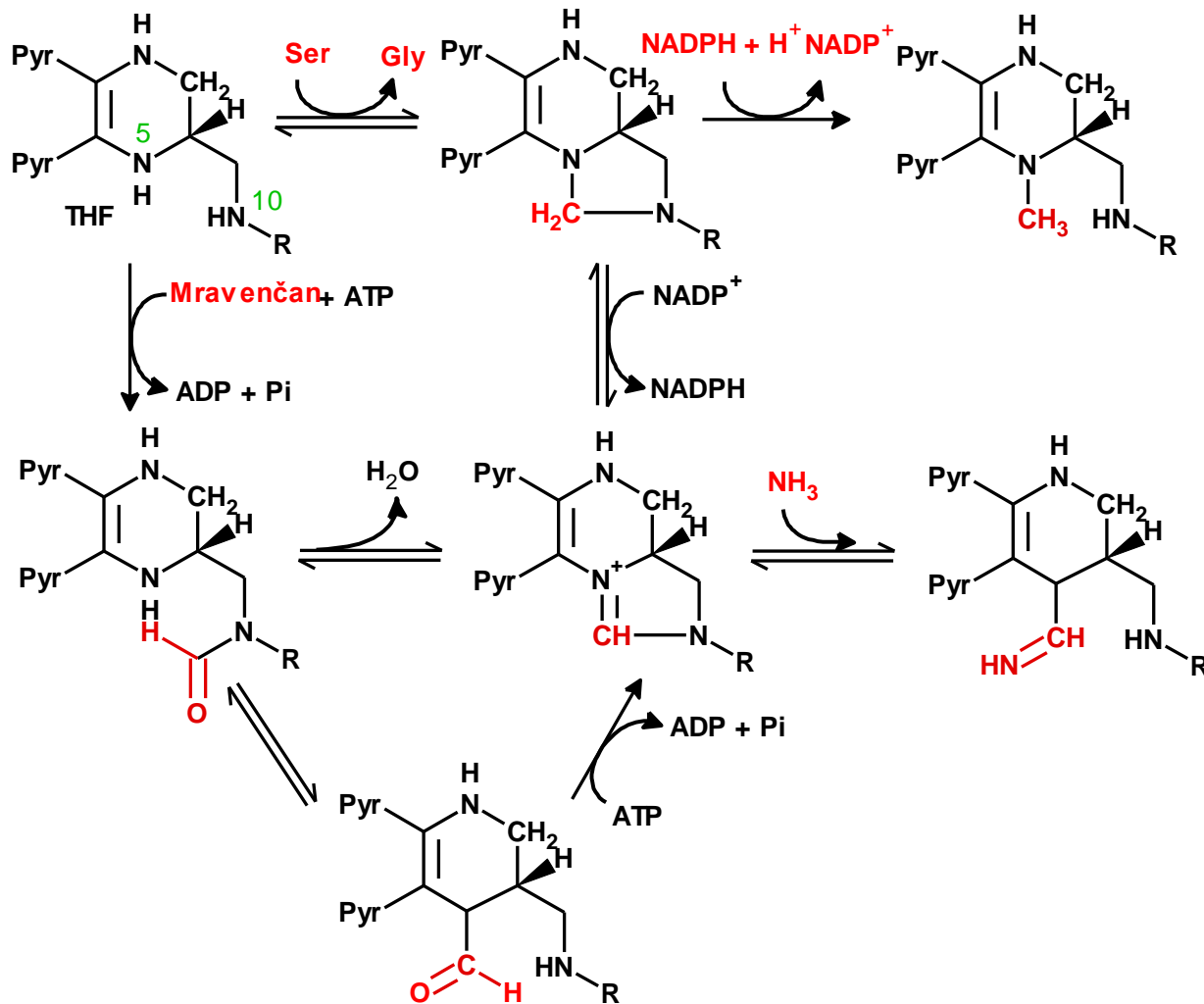
Jednouhlíkatá jednotka je vázána v poloze N-5 nebo N-10 (označeno N^5 a N^{10}) nebo na obě.

Nejvíce redukovanou jednouhlíkatou skupinou je methyl. Vyšší oxidační stav mají formyl, formimino nebo methenyl.

Plně oxidovaná jednouhlíkatá skupina je karboxyl, který je přenášen biotinem.

Jednouhlíkaté skupiny přenášené THF jsou mezi sebou vzájemně převoditelné.

Přeměny jednovuhlíkaté skupiny navázané na tetrahydrofolát (THF).



Jednouhlíkaté skupiny.

Alternativní syntéza glycinu z CO_2 a NH_4^+ za katalýzy glycinsynthasy (v opačném směru glycin štěpící enzym):



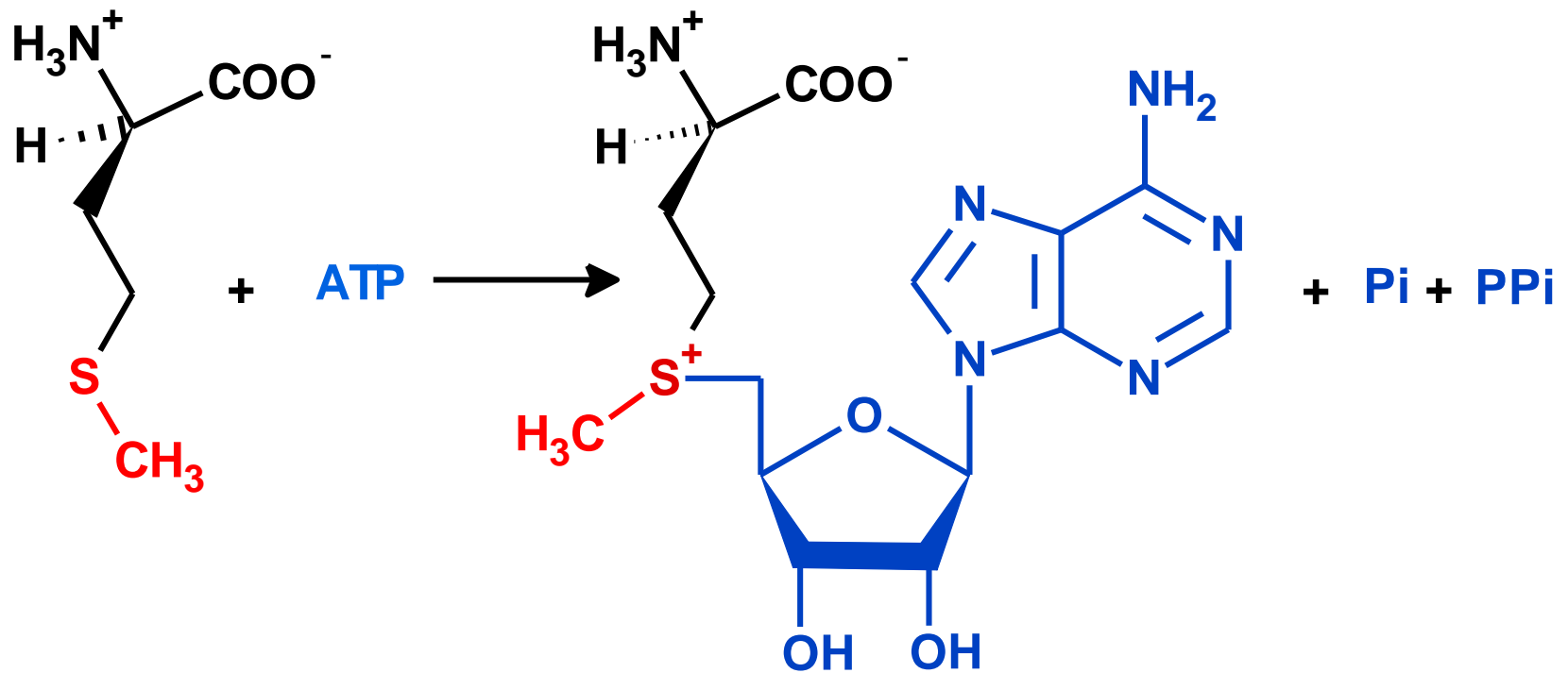
Hlavním zdrojem jednouhlíkatých jednotek je přeměna serinu na glycin. Produktem je $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -methylenTHF.

Prekurzorem serinu je 3-fosfoglycerát (meziprodukt glykolýzy). Jednouhlíkaté skupiny jsou tak produkty sacharidů.

S-Adenosylmethionin (SAM).

THF má methylskupinu navázanou v poloze N-5 její potenciál přenosu není dosti vysoký pro většinu biosyntéz.

Funkci aktivovaného methylu plní S-adenosylmethionin (SAM).



Methionin

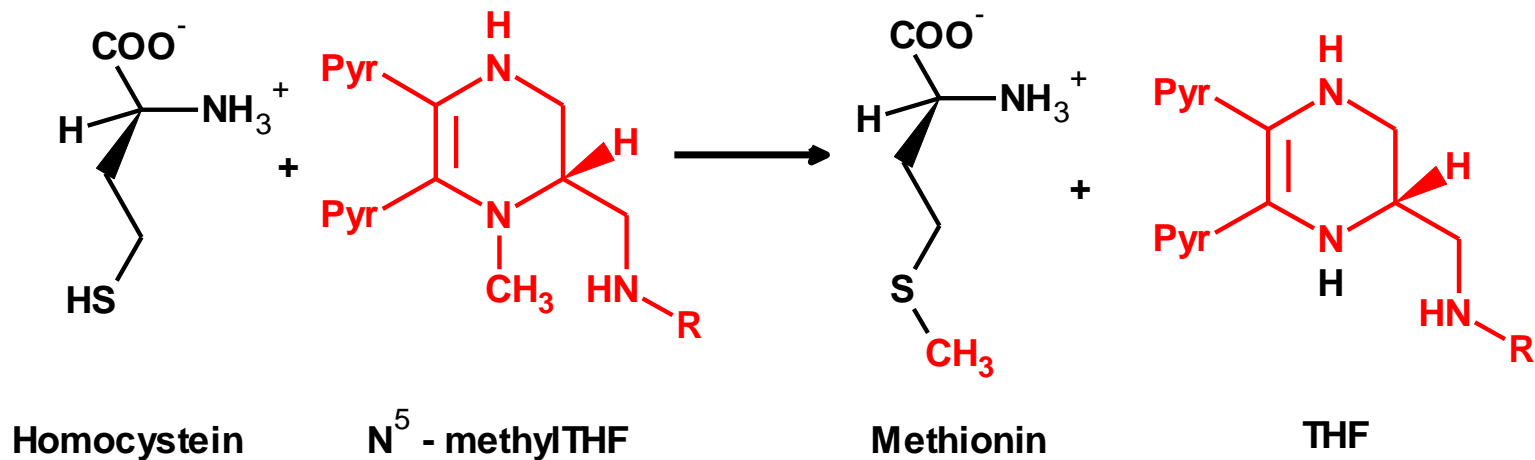
S - Adenosylmethionin (SAM)

S-Adenosylmethionin (SAM).

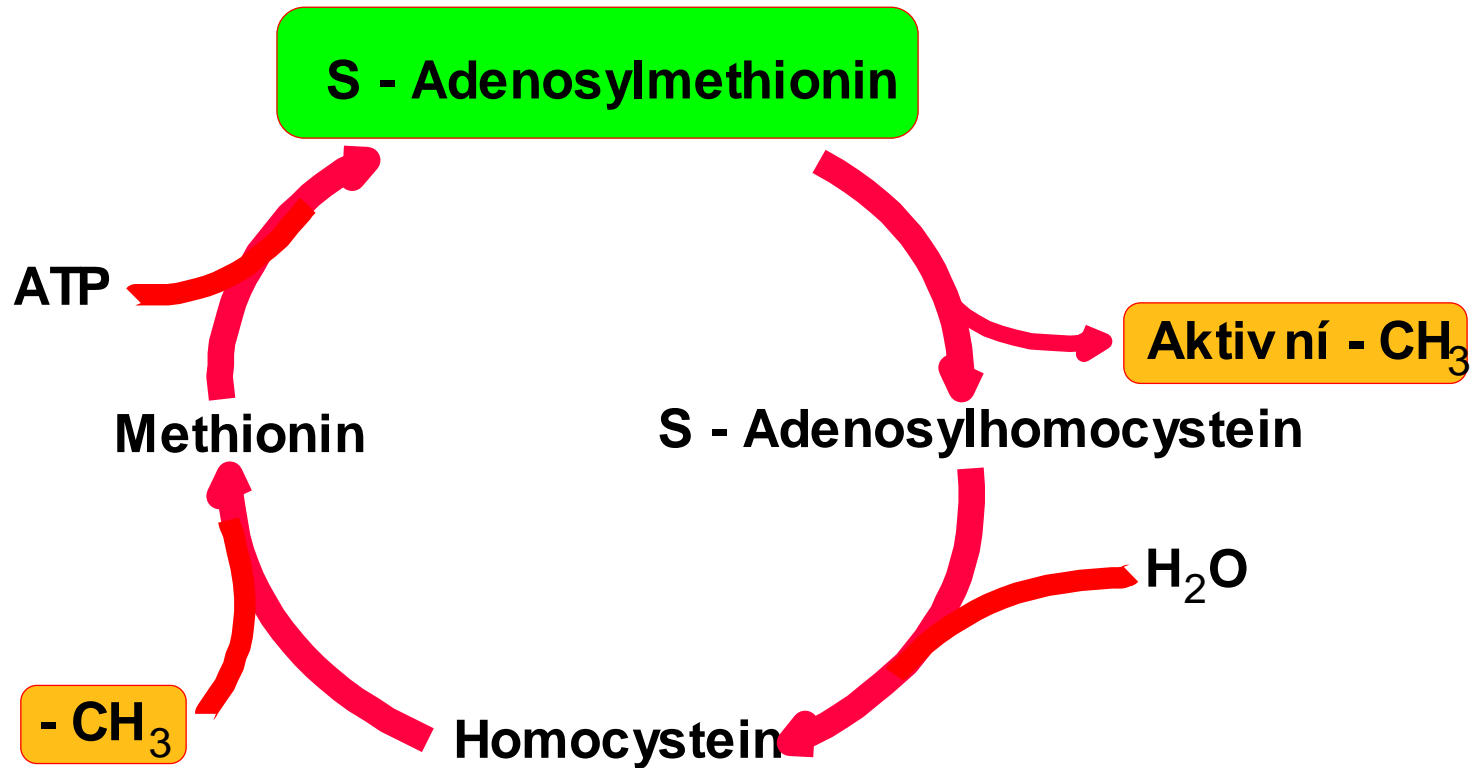
Po transferu methyly na substrát přejde SAM na S-adenosylhomocystein, který je hydrolyzován na homocystein a adenosin.

Regenerace methioninu je realizována transferem methyly z N^5 -methylTHF na homocystein.

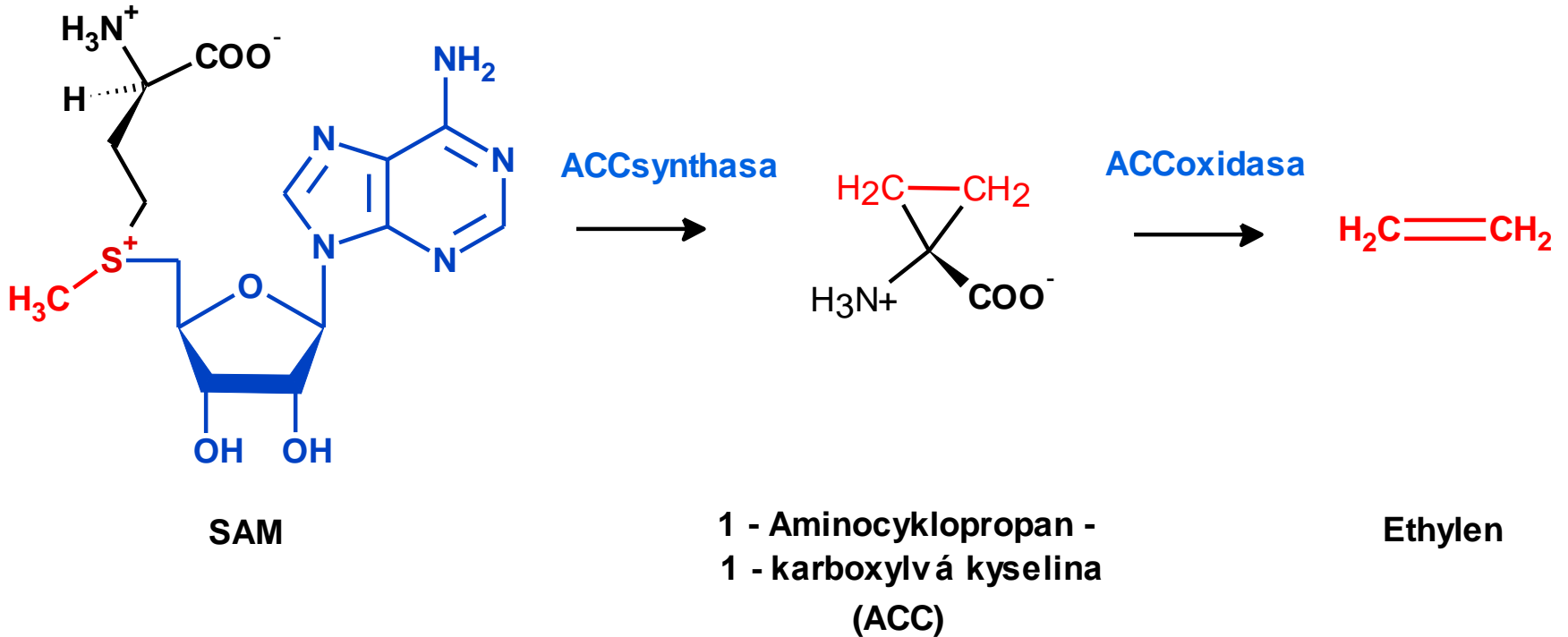
Enzym homocysteinmethyltransferasa má jako koenzym methylkobalamin (derivát vitamínu B_{12}).



Cyklus aktivovaného methyly.



Biosyntéza ethylenu.



SAM je prekurzorem ethylenu, který má funkci plynného rostlinného hormonu. Ethylen indukuje zrání.

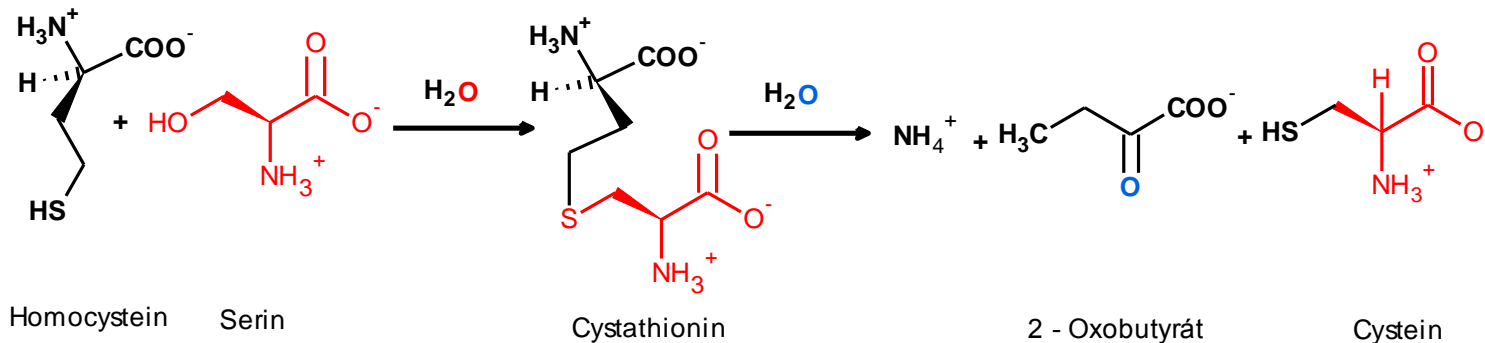
Biosyntéza cysteinu.

Cystein je syntetizován ze serinu a homocysteinu. Serin se kondenzuje s homocysteinem za tvorby cystathioninu.

Enzym cystathionin- β -synthasa.

Cystathionin je deaminován a štěpen na cystein a 2-oxobutyrát.

Enzym cystathionin- γ -lyasa. Oba enzymy mají prosthetickou skupinu PLP.



Homocystein a srdeční onemocnění.

Lidé se zvýšenou hladinou homocysteinu nebo jeho disulfidového dimeru homocystinu mají vysoké riziko arteriosklerosy a srdečních onemocnění. Důvod je v mutovaném genu pro cystathionin- β -synthasu.

U některých pacientů se daří onemocnění zmírnit podáváním vitaminů.

Podáváním vitaminů se sleduje rychlejší degradace homocysteinu.

Vitamin B₆ a jeho deriváty (PLP) zvyšuje aktivitu cystathionin- β -synthasy (přeměna homocysteinu na cystathionin) a vitamin B₁₂, který podporuje metylaci homocysteinu na methionin.

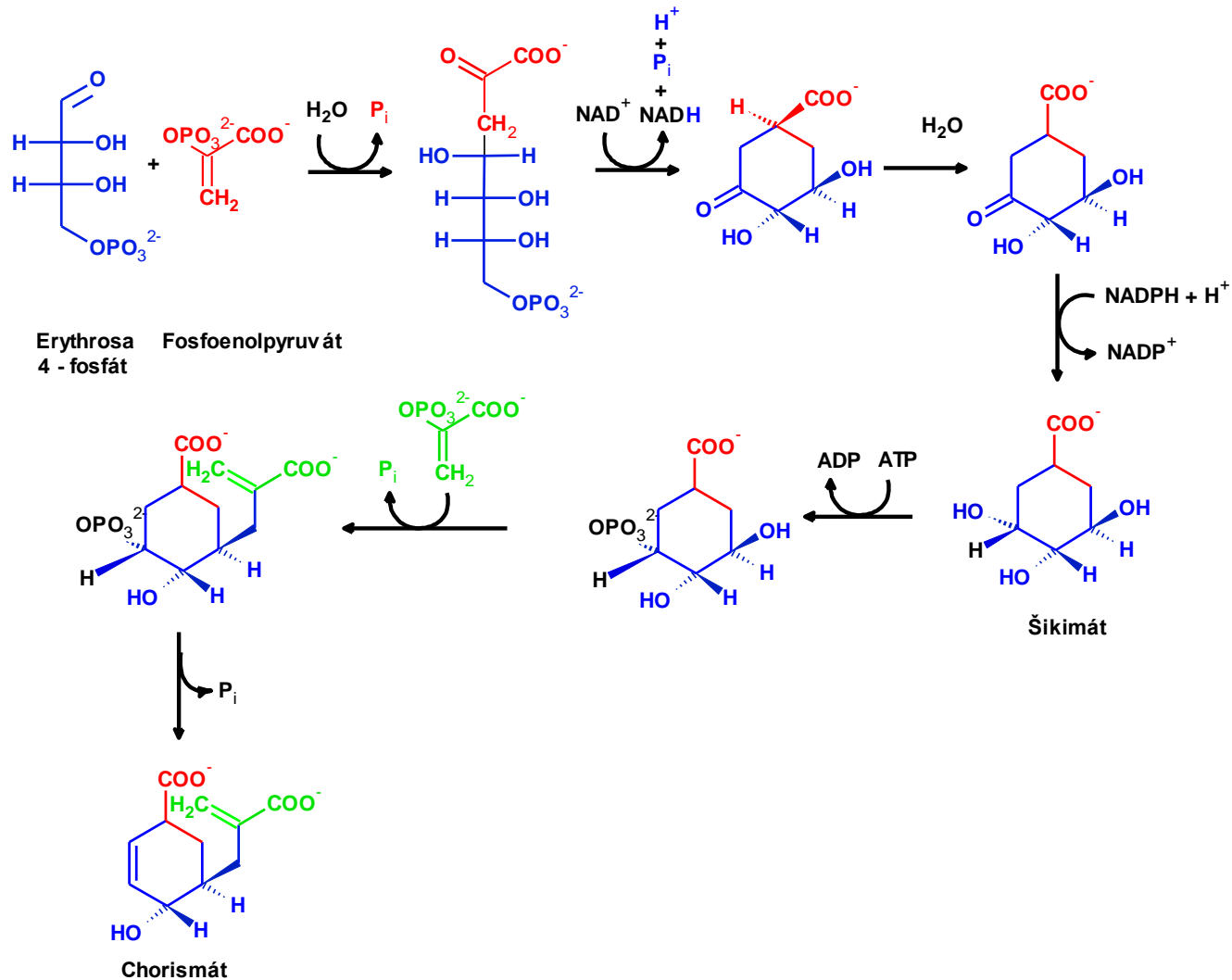
Biosyntéza aromatických aminokyselin.

Fenylalanin, tyrosin a tryptofan jsou esenciální aminokyseliny syntetizované společnou drahou u *E. coli*. Člověk získává většinu esenciálních aminokyselin z rostlinné potravy. Biosyntéza esenciálních aminokyselin je složitější a komplexnější než biosyntéza neesenciálních.

Prekurzory jsou fosfoenolpyruvát (meziprodukt glykolýzy) a erythrosa-4-fosfát (meziprodukt pentosafosfátové dráhy).

Chorismát je klíčovým produktem na kterém se další dráhy dělí na prephenátovou (produkty fenylalanin a tyrosin) a anthranilátovou (tryptofan).

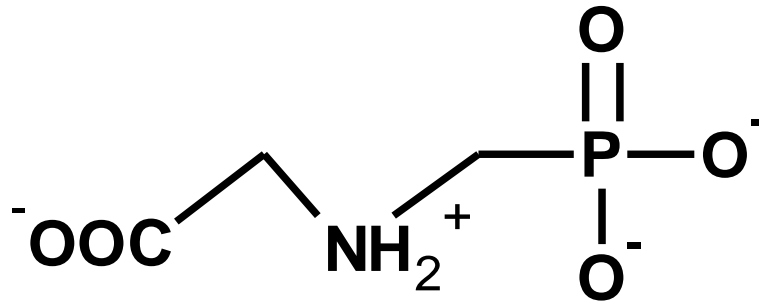
Chorismátová biosyntetická dráha.



Herbicid glyfosát -inhibice biosyntézy aromatických aminokyselin.

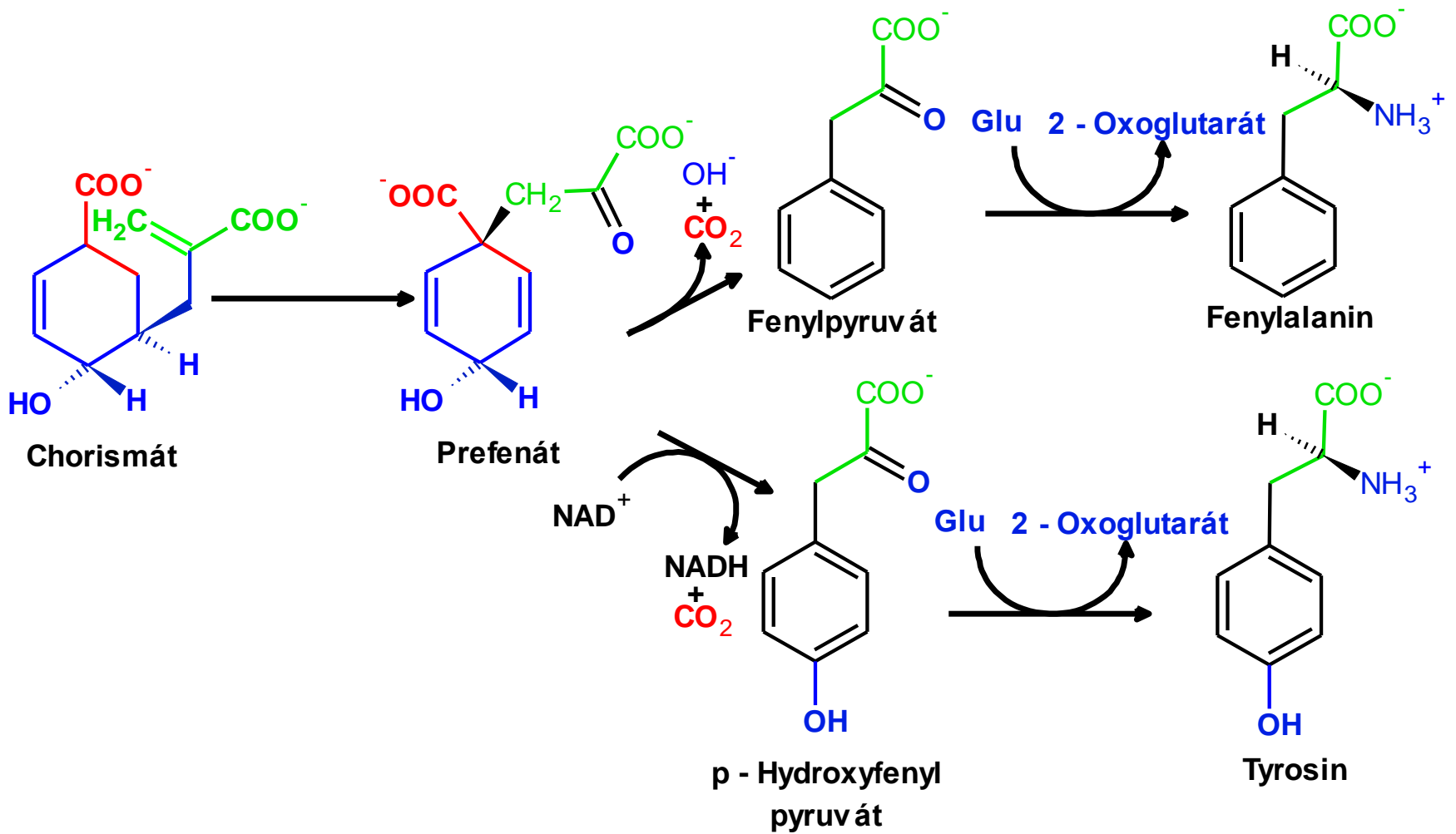
Biosyntéza aromatických aminokyselin je inhibována širokospetrálním herbicidem glyfosátem (Roundup). Pro zvířata a hmyz netoxický.

Glyfosát je akompetitivním inhibitorem enzym, který katalyzuje tvorbu 5-enoylpyruvylšikimát-3-fosfátu. Preferenátová dráha: Mutasa převádí chorismát na preferenát, prekurzor aromatického kruhu fenylalaninu a tyrosinu. Reakce analogická v organické chemii známé Diels-Alderově kondenzaci.



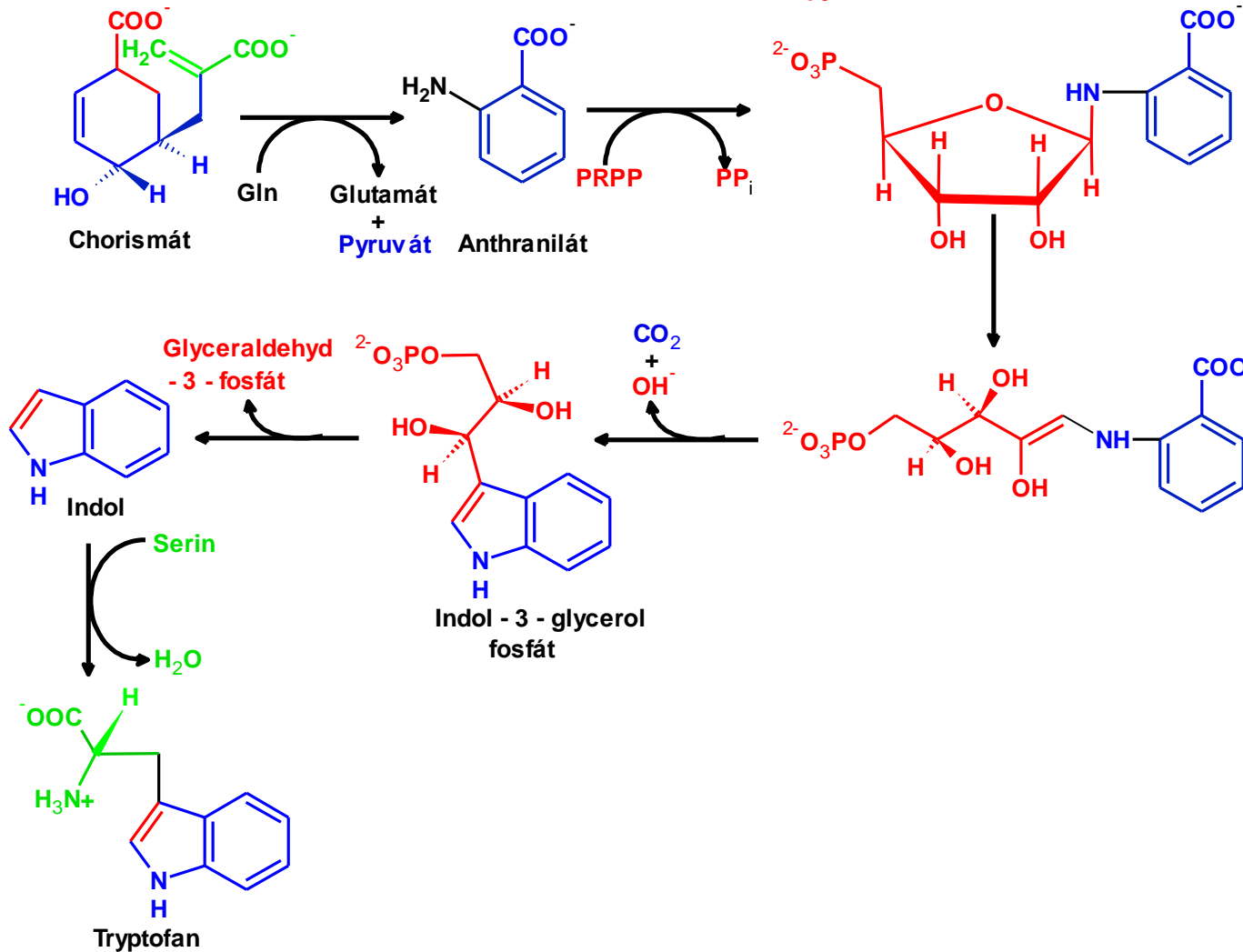
Glyfosát (Roundup)

Prefenátová dráha biosyntézy Phe a Tyr.



Biosyntéza tryptofanu chorismátovou drahou přes anthranilát.

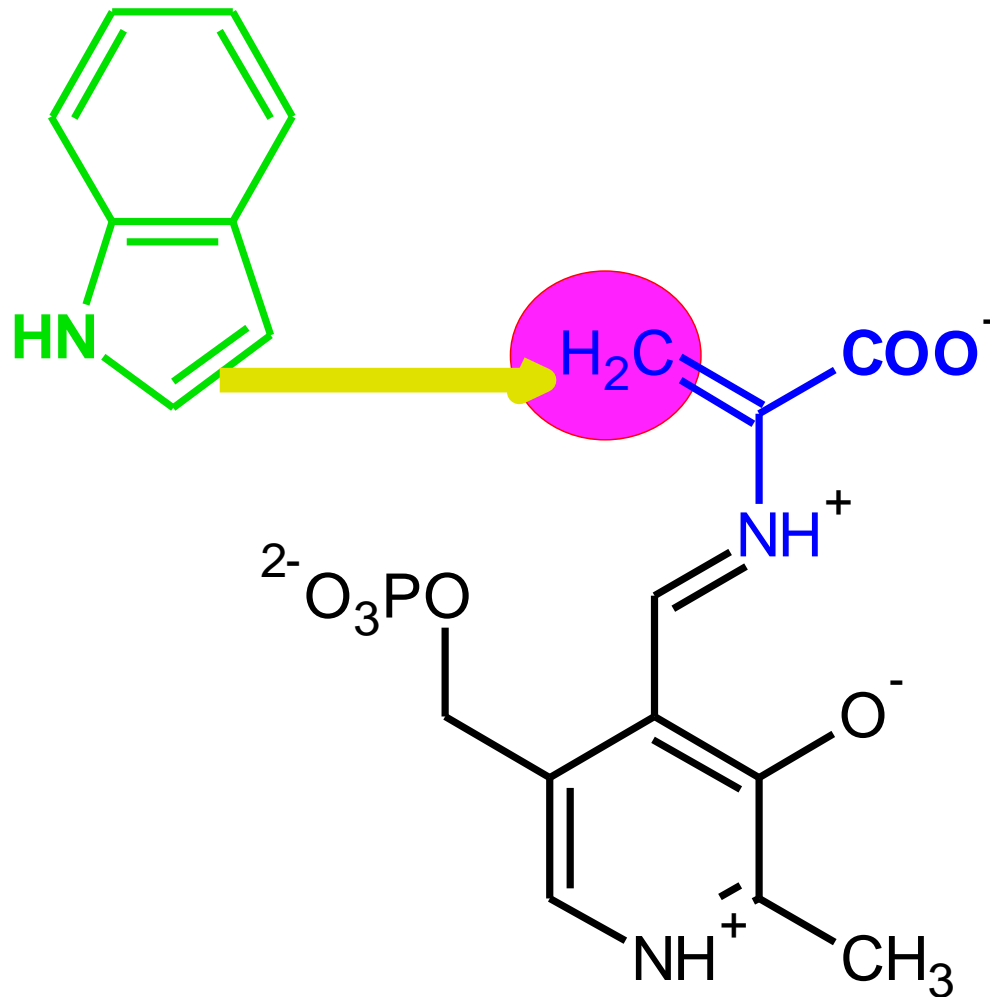
PRPP = 5 - Fosforibosyl -1 - pyrofosfát



Biosyntéza tryptofanu.

Tryptofansynthasa v *E. coli* je $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer. Podjednotka α katalyzuje tvorbu indol-3-glycerolfosfátu. Každá β podjednotka má PLP v aktivním místě. Katalyzuje kondenzaci idolu se serinem za vzniku tryptofanu. Indol difunduje od jednoho aktivního místa ke druhému. Prochází specifickým kanálkem a nemůže difundovat mimo dráhu kondenzace se serinem. Obě reakce jsou koordinovány. Indol čeká na serin. Serin vytváří s PLP Schiffovu bázi, která je dehydratována za tvorby Schiffovy báze aminoakrylátu což je reaktivní intermediát reagující s indolem. Enzym je odlišný od známých aminotransferas.

Schiffova báze aminoakrylátu ze serinu.
Nukleofilní reakce s aminoakrylátem.



Regulace biosyntézy aminokyselin.

Rychlost biosyntézy aminokyselin závisí první řadě na množství a aktivitě biosyntetických enzymů.

Regulace aktivity enzymů.

V biosyntetické dráze se vyskytuje tak zvaný klíčový krok, prakticky ireverzibilní reakce.

Takový krok obvykle inhibuje výsledný produkt dráhy - inhibice konečným produktem.

Zůstávají zachovány všechny meziprodukty.

Tak např. serin (produkt dráhy) při jehož biosyntéza je klíčovým krokem oxidace 3-fosfoglycerátu katalyzovaná 3-fosfoglycerátdehydrogenasou.

Enzym je homotetramer, kde každá podjednotka má aktivní a regulační místo. Vazba serinu vede k jeho inaktivaci.

Regulace biosyntézy aminokyselin.

Při regulaci biosyntézy větvených aminokyselin hraje významnou roli společný meziproduct hydroxyethylthiaminpyrofosfát (hydroxyethyl - TPP).

Při syntéze isoleucinu reaguje s α -oxobutyrátem, při syntéze valinu a leucinu reaguje s pyruvátém. Koncentrace α -oxobutyrátu a pyruvátu určují množství isoleucinu na jedné straně a leucinu a valinu na straně druhé.

Threonindeaminasa (PLP) katalyzující tvorbu α -oxobutyrátu je allostericky inhibována valinem ! Valin je produkt kompetující dráhy.

Regulace vede k vyrovnanému množství větvených aminokyselin.

Mnohočetnost enzymů. Klíčová reakce dráhy může být katalyzována více enzymy. Enzymy reagují různou aktivitou na substráty a produkty.

Regulace biosyntézy aminokyselin.

Kumulativní zpětnovazebná inhibice.

Společný stupeň dráhy je inhibován každým finálním produktem nezávisle.

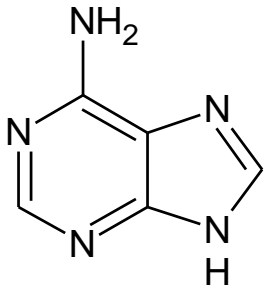
Bakteriální glutaminsynthetasa katalyzuje syntézu Gln z Glu, NH_4^+ a ATP. Amidoskupina Gln je zdrojem dusíku pro mnoho sloučenin jako např. karbamoylfosfát, Trp, CT, AMP atd.

Glutaminsynthetasa je kumulativně inhibována všemi těmito konečnými produkty. Enzym je úplně inhibován, když se na něj naváží všechny konečné produkty.

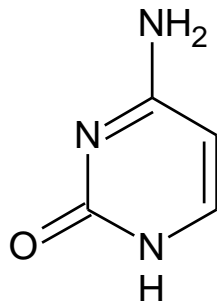
Glutaminsynthetasa je také regulována reversibilní kovalentní modifikací. AMP se váže na specifický Tyr každé podjednotky (fosfodiesterová vazba).

Adenylovaný enzym je méně aktivní a více citlivý na inhibitory. Kovalentně navázaný AMP se odštěpuje fosfátolytickou reakcí.

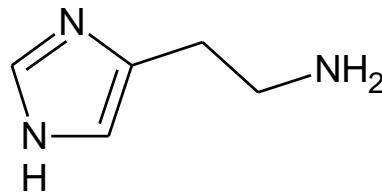
Některé biomolekuly odvozené od aminokyselin.



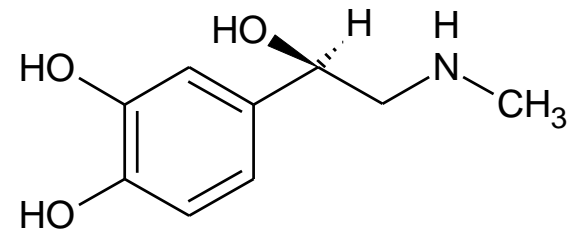
Adenin



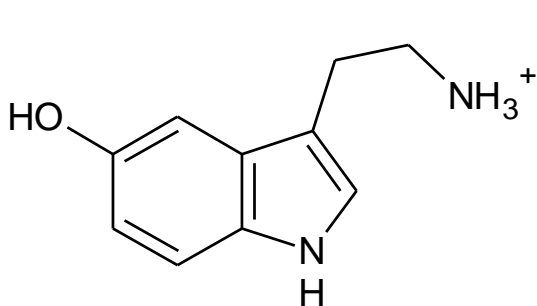
Cytosin



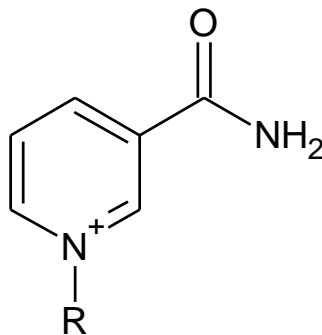
Histamin



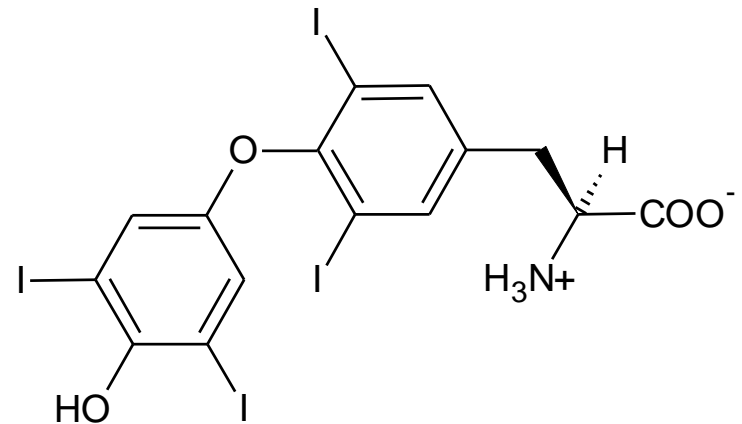
Adrenalin



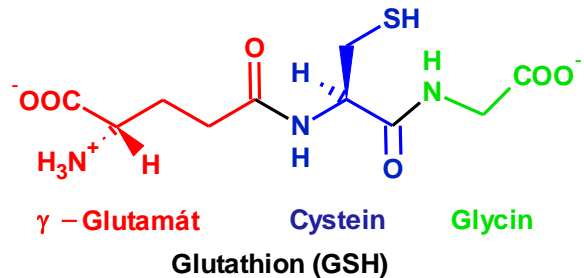
Serotonin



Nikotinamid

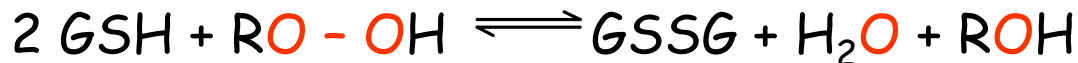


**Thyroxin
(tetraiodthyronin)**



Glutathion je tripeptid obsahující sulfhydrylovou skupinu (γ -Glutamylcysteinylglycin). Redukovaná forma se označuje *GSH*, oxidovaní *GSSG*.

Glutathion o buněčné koncentraci v živočišných buňkách, asi 5 mM, chrání erythrocyty před oxidativní destrukcí a chová se tak jako sulfhydrylový pufr.



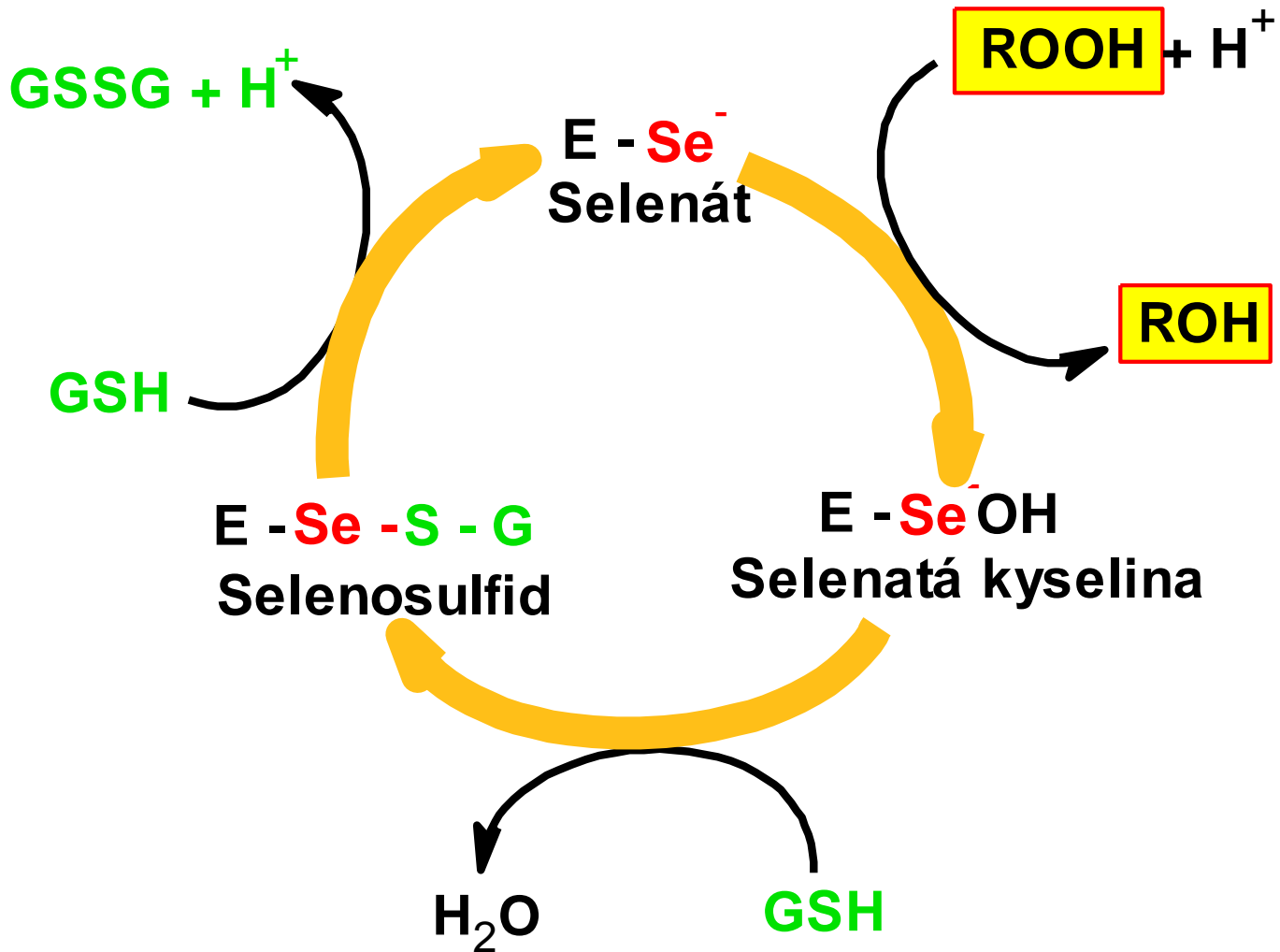
GSSG je redukován na *GSH* glutathionreduktasou (flavoprotein s koenzymem NADPH).

Poměr *GSH* / *GSSG* je ve většině buněk 500.

Glutathion hraje významnou roli při detoxifikaci reakcí s H_2O_2 nebo organickými peroxidy.

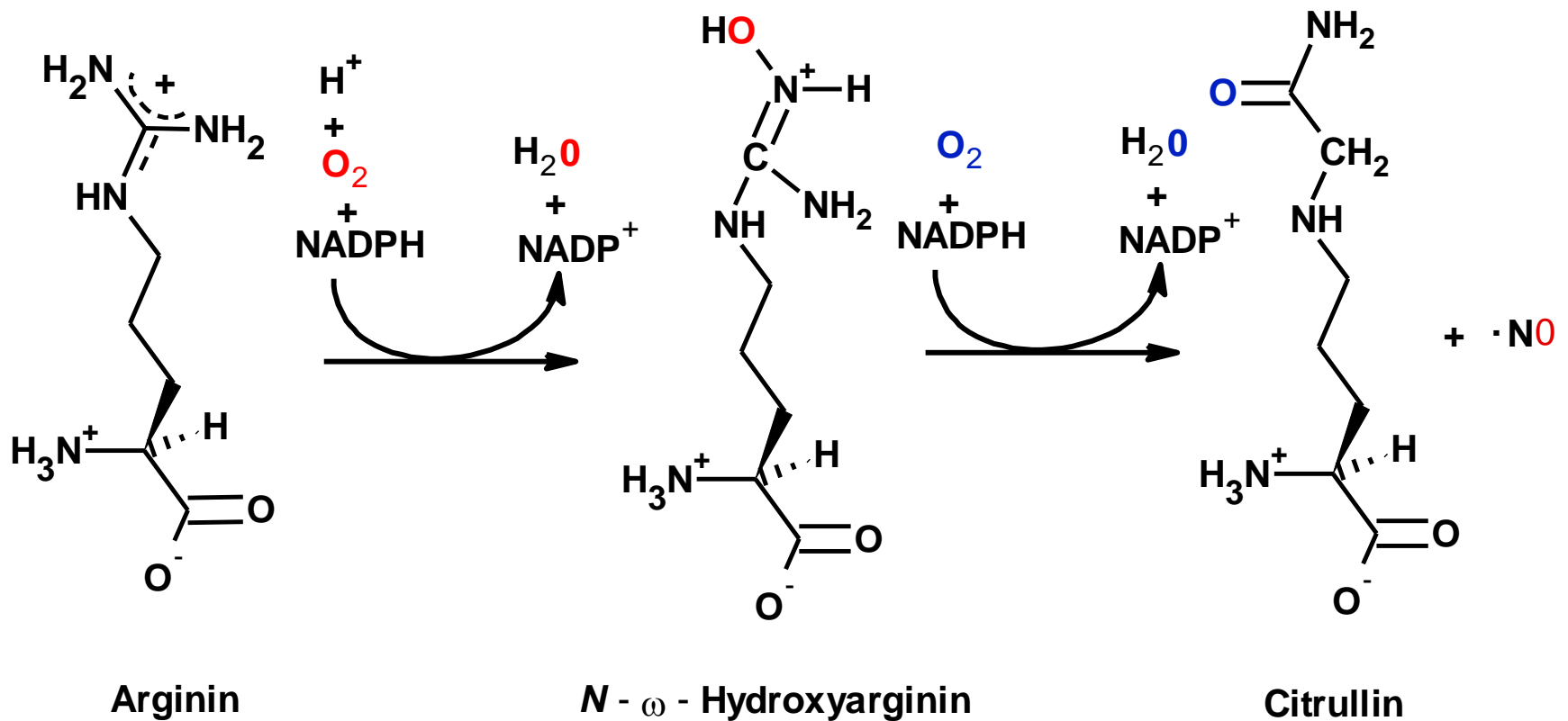
Glutathionperoxidasa katalyzující tuto reakci obsahuje v aktivním místě aminokyselinu se selenem (selenový analog Cys).

Katalytický cyklus glutathionperoxidasy.



Tvorba NO oxidací argininu.

NOsynthasa, NADPH a O₂. NO se váže na guanylátcyklastu (analog adenylátcyklasty) - aktivace přenosu signálu.

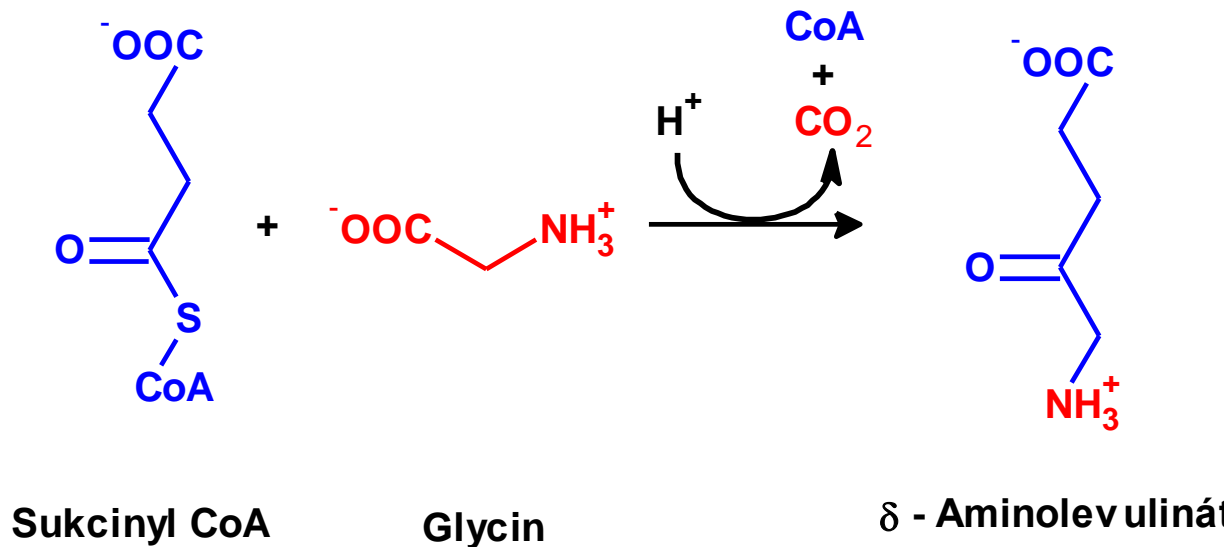


Porfyriny.

Porfyrinový skelet je základem hemů a chlorofylů.

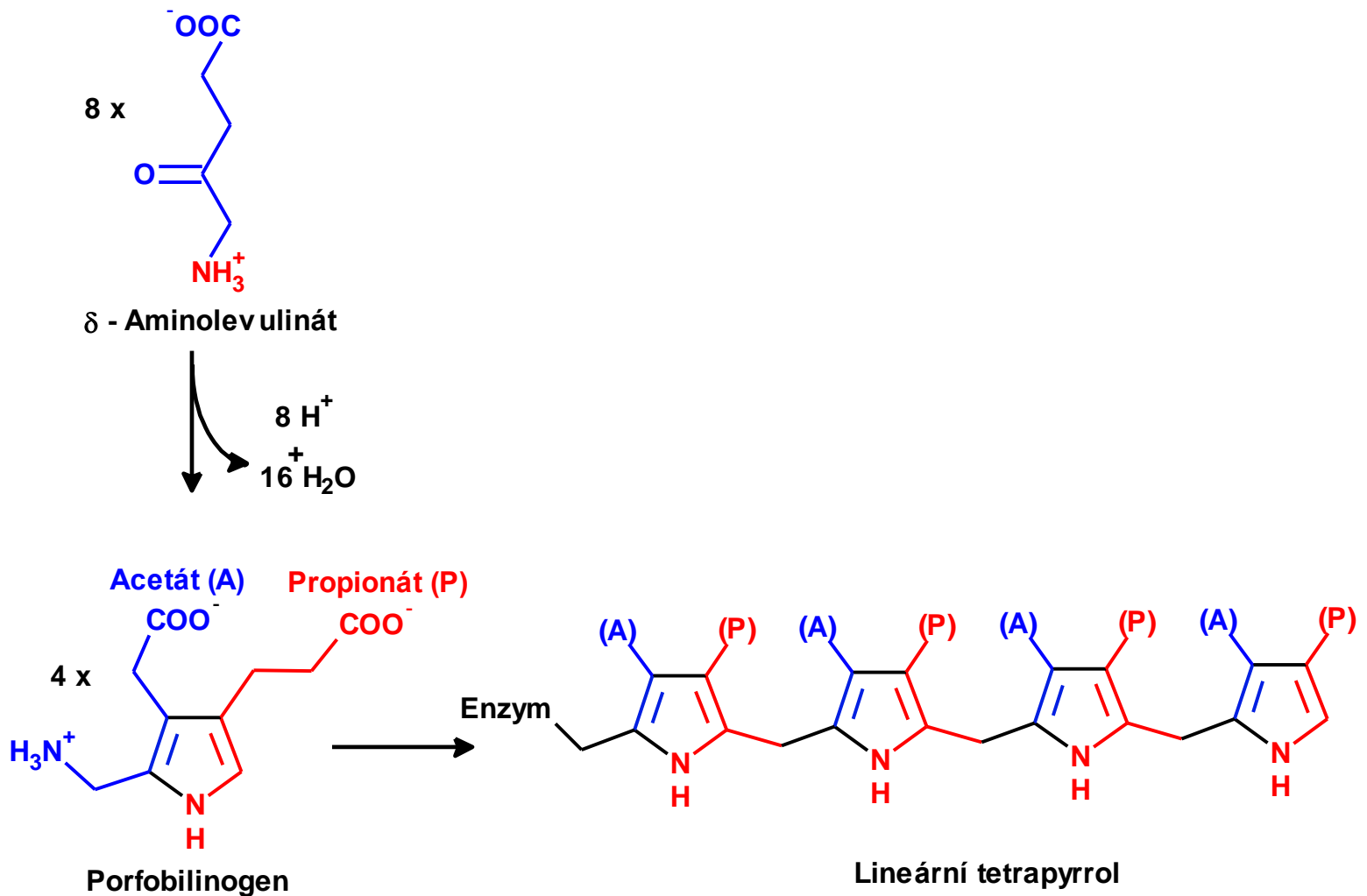
Prvním krokem biosyntézy porfyrinů u savců je kondenzace glycinu se sukcinyl CoA za vzniku δ -aminolevulinátu katalyzovaná δ -aminolevulinátsynthasou.

Základem tvorby porfyrinů je aminokyselina glycin a meziprodukt citrátového cyklu sukcinyl CoA (kataplerotická reakce).

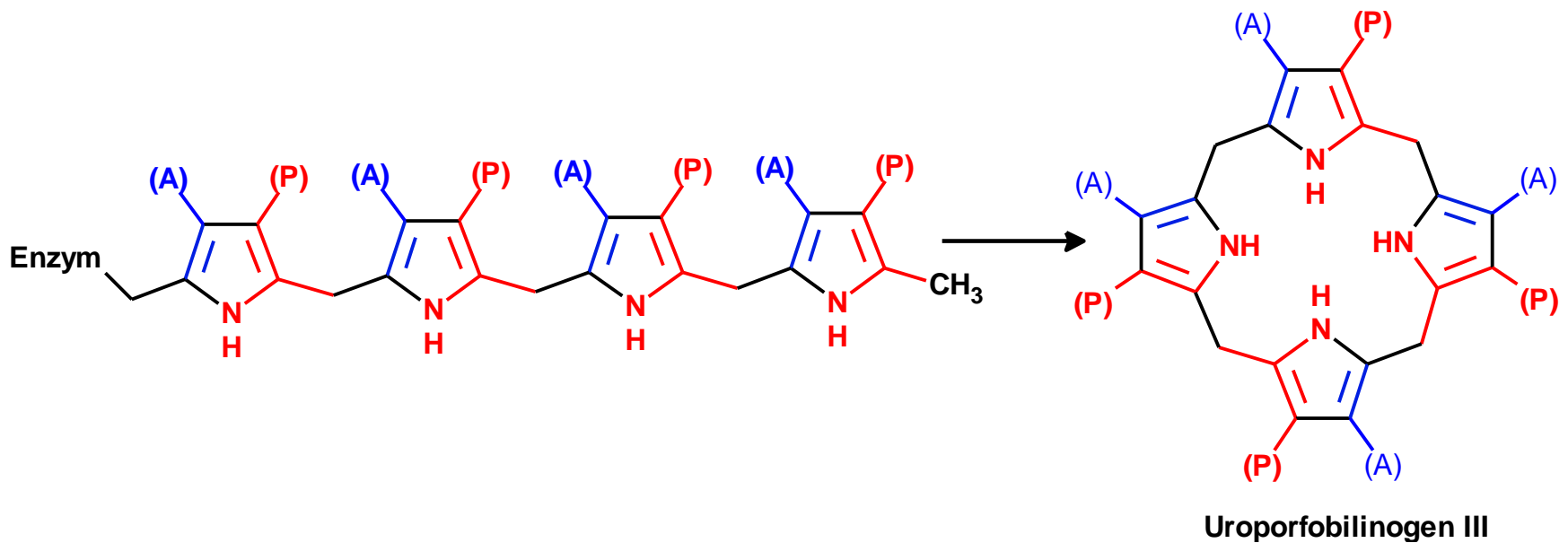


Biosyntéza porfyrinů.

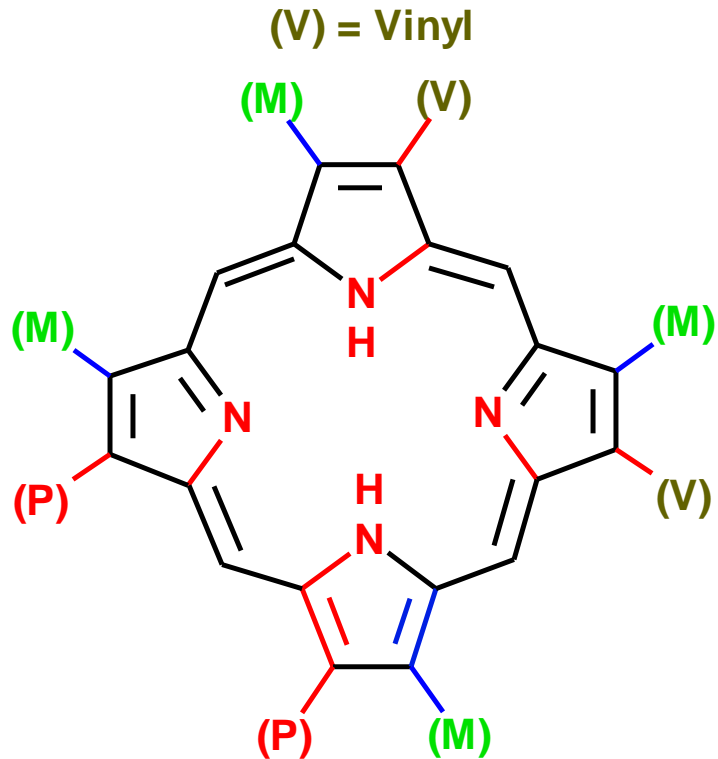
Tvorba porfobilinogenu (2 molekuly δ -aminolevulinátu kondenzují na porfobilinogen). Čtyři molekuly porfobilinogenu kondenzují na lineární tetrapyrrol (katalyzuje porfobilinogendeaminasa)



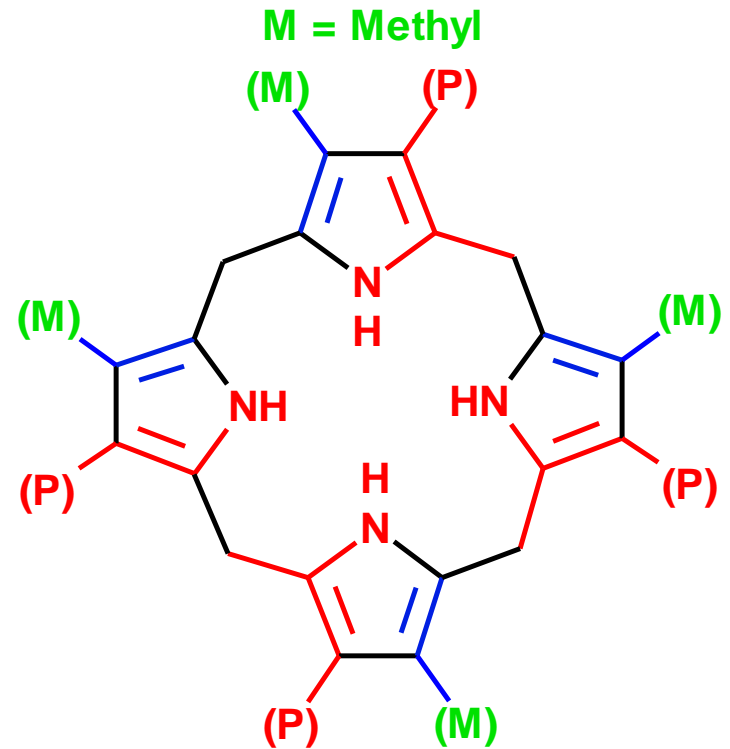
Uroporfobilinogen III je klíčovým meziproduktem při syntéze vitamínu B₁₂ v bakteriích a chlorofyllu, tak v bakteriích a rostlinách (porfyrinový skelet).



Další reakce modifikují vedlejší řetězce a stupeň saturace porfyrinového kruhu. Koproporfyryinogen III (KoIII) je tvořen dekarboxylací acetátů uroporfirinogenu III. Protoporfyryin IX je tvořen desaturací a převodem dvou propionátů KoIII na vinyly.



Protoporfyryin IX



Koproporfyryinogen III

Degradace hemu.

- Vstupem Fe^{2+} (chelatací, enzym ferrochelatas) se vytvoří hem, což je prosthetická skupina proteinů jako jsou myoglobin, hemoglobin, katalasa, peroxidasa a cytochrom *c*.
Železo je transportováno plasmou navázáno na transferrin, který váže 2 Fe^{3+} a je skladováno v tkáních ve ferritinu.

Degradace hemu. Normální lidský erythrocyt má životnost asi 120 dnů.

Prvním krokem degradace hemu je štěpení α -methinového můstku za tvorby zeleného lineárního tetrapyrrolu biliverdinu.

Prostřední methinový můstek biliverdinu je poté redukován biliverdinreduktasou za tvorby červeného pigmentu bilirubinu

Degradace hemu.

HEM

