

Základy biochemie KBC / BCH

Metabolismus aminokyselin

Inovace studia biochemie prostřednictvím e-learningu

CZ.04.1.03/3.2.15.3/0407



Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky.



Metabolismus aminokyselin

- Odbourávání proteinů.
 - Deaminace aminokyselin.
 - Ornithinový (močovinový) cyklus.
- Osud uhlíkaté kostry aminokyselin.
Biosyntéza aminokyselin.
Další produkty metabolismu aminokyselin.
Fixace dusíku.

Odbourávání proteinů

- Délka existence proteinů se pohybuje od několika minut k týdnům a déle.
- Buňky kontinuálně odbourávají proteiny na aminokyseliny a syntetizují proteiny.
- Důvodem obměny proteinů je:
 - 1. Proteiny jako skladovatelná energie (?!). V čase metabolické potřeby se odbourávají a uhlíkatá kostra se využívá např. k syntéze glukosy (svalové proteiny).
 - 2. Odstranění abnormálních proteinů jejichž přítomnost v buňce by buňku vyřadila z činnosti.
 - 3. Realizace regulačních mechanismů v buňce odstraněním některých enzymů nebo jejich regulátorů.

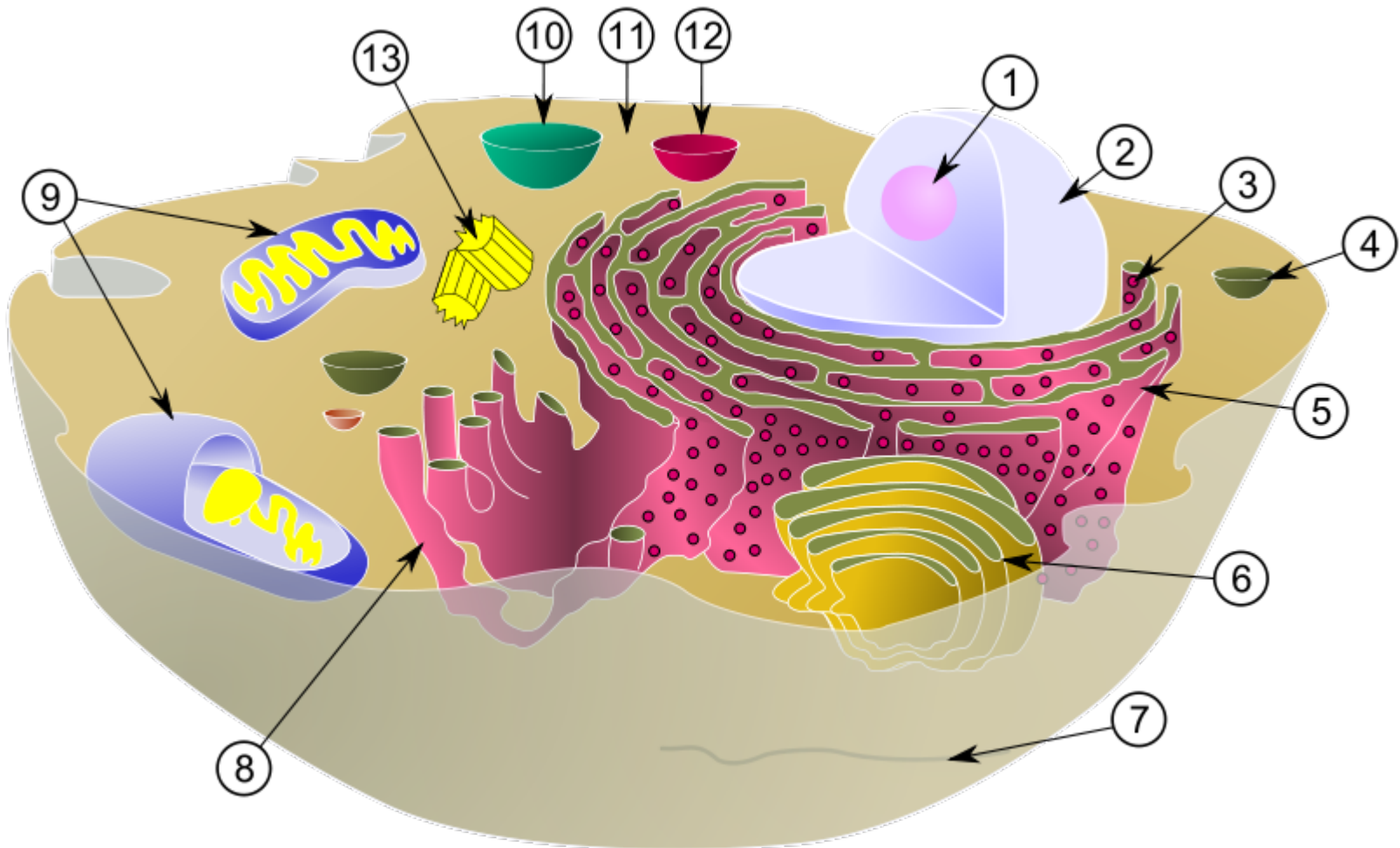
Poločasy existence některých proteinů krysích jater:

Enzymy s krátkou dobou existence	Poločas (h)
• Ornithindekarboxylasa	0, 2
• RNA polymerasa I	1, 3
• Tyrosinaminotransferasa	2, 0
• Serindehydratasa	4, 0
• Fosfoenolpyruvátkarboxylasa	5, 0
Enzymy s dlouhou dobou existence	
• Aldolasa	118
• Glyceraldehydfosfátdehydrogenasa	130
• Cytochrom <i>b</i>	130
• Laktátdehydrogenasa	130
• Cytochrom <i>c</i>	150

LYSOSOMY-lysosomální degradace.

- **LYSOSOMY** jsou kulovité organely nacházející se v **cytosolu eukaryotních buněk**, od něhož jsou odděleny jednou (dvojvrstevnou) membránou. Jsou místem **intracelulárního štěpení** (trávení) biologických makromolekul a lipidů; obsahují hydrolytické enzymy (kathepsiny) schopné rozložit pohlcený obsah (např. při **fagocytose**), eventuálně i vlastní makromolekuly buňky (**autolysa**, např. za anaerobních podmínek v odumřelém organismu).
- Asi 40 různých lysosomálních hydrolas zajišťuje tuto degradační aktivitu; jejich pH-optimum je v kyselé oblasti (v cytosolu jsou inaktivní). Tzv. primární lysosomy, obsahující lysosomální hydrolasy, vznikají odškrcením od Golgiho aparátu. Fúzí s váčky, vzniklými endocytosou (endosomy), vytvářejí posléze tzv. **sekundární lysosomy**, v nichž probíhá vlastní intracelulární trávení.
- U dobře živených buněk je lysosomální degradace neselektivní. U hladovějících je degradace selektivní - zachovávají se důležité enzymy a regulační proteiny. Odbourávají se proteiny obsahující pentapeptidovou sekvenci **Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ)**. S lysosomální degradací je spojena např. **rheumatoidní arthritida**.

1. Jadérko, 2. Jádru, 3. Ribosomy, 4. Váčky(měchýřky), 5. Drsné ER, 6. Golgiho aparát, 7. Cytoskelet, 8. Hladké ER, 9. Mitochondrie, 10. Vakuola, 11. Cytosol, 12. **Lysosom**, 13. centriola.

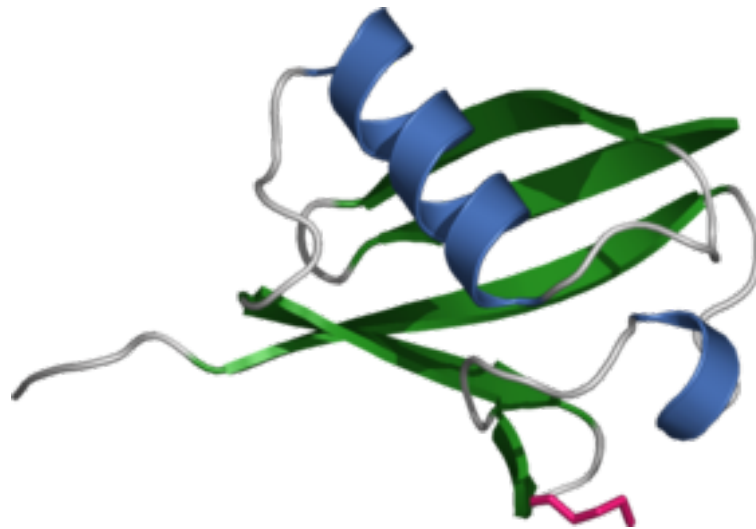


Ubiquitin

- U eukaryotních buněk působí při degradaci také proces spotřebovávající ATP a zahrnující ubiquitin.
- Ubiquitin je monomerní protein obsahující 76 aminokyselin.
Z jeho názvu plyne jeho všudypřítomnost.
- Proteiny určené k degradaci jsou označeny kovalentní vazbou s ubiquitem. Proces probíhá ve třech stupních za účasti tří enzymů.
- A) Ubiquitin aktivační enzym E_1 - ubiquitin se za účasti ATP připojí na E_1
- B) Ubiquitin konjugační enzym E_2 - přenos ubiquitinu na E_2 přes terminální karboxyl ubiquitinu a Cys E_2
- C) Ubiquitin-protein ligasa E_3 - přenos aktivovaného ubiquitinu na ϵ -aminoskupinu Lys odstraňovaného proteinu (isopeptidová vazba)
- Aby byl protein odbourán musí být označen řetězcem minimálně čtyř ubiquitinů, ale až padesát - polyubiquitinový řetězec.

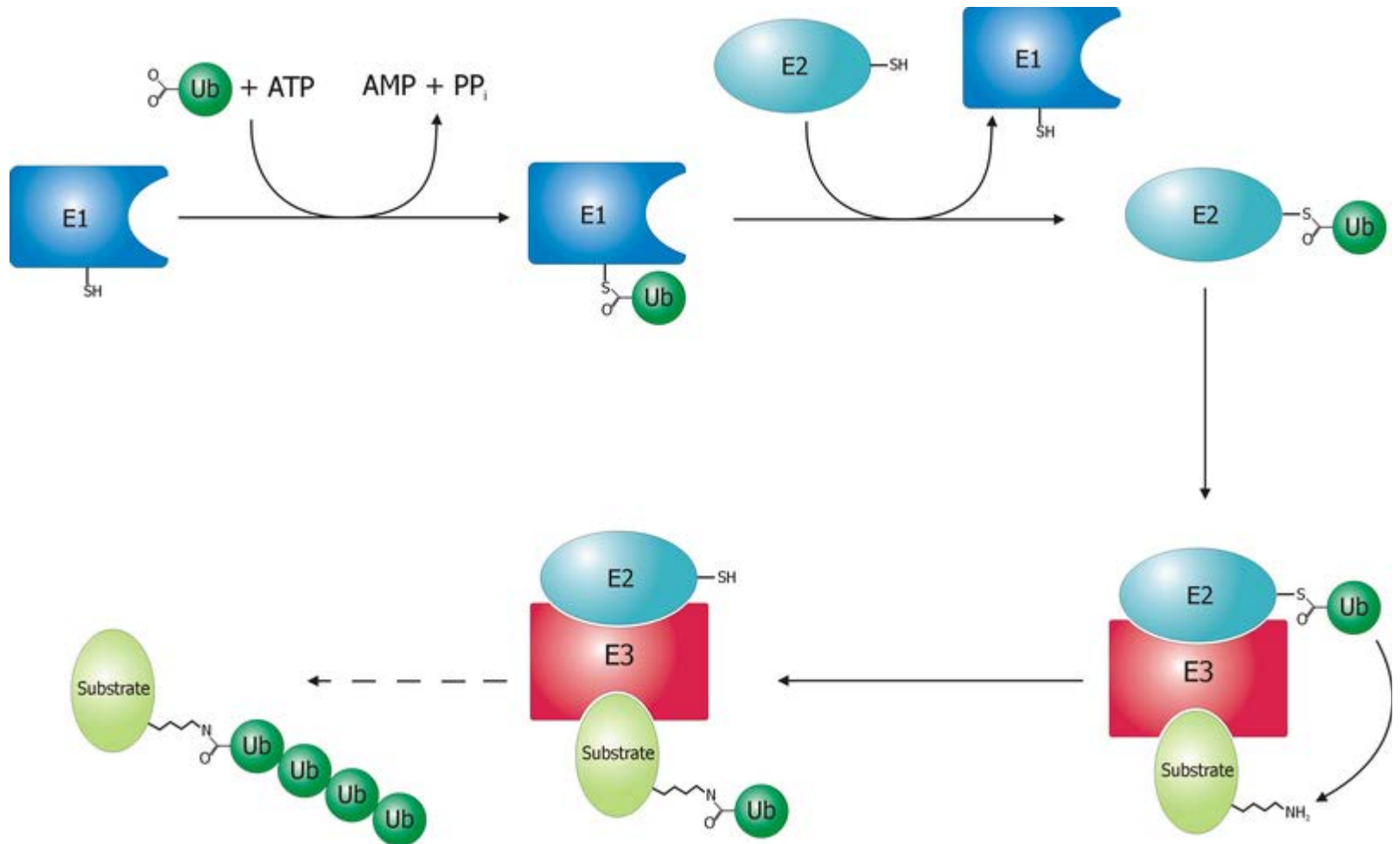
Ubiquitynylace proteinů

- Struktura ubiquitinu - stužkový model.



- Nobelova cena za chemii 2004 „for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation”
 - **Aaron Ciechanover**
Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel,
 - **Avram Hershko**
Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel and
 - **Irwin Rose**
University of California, Irvine, USA

Proces ubiquitylace. E1-aktivační enzym, E2-konjugační enzym,
E3- ubiquitin-protein ligasa

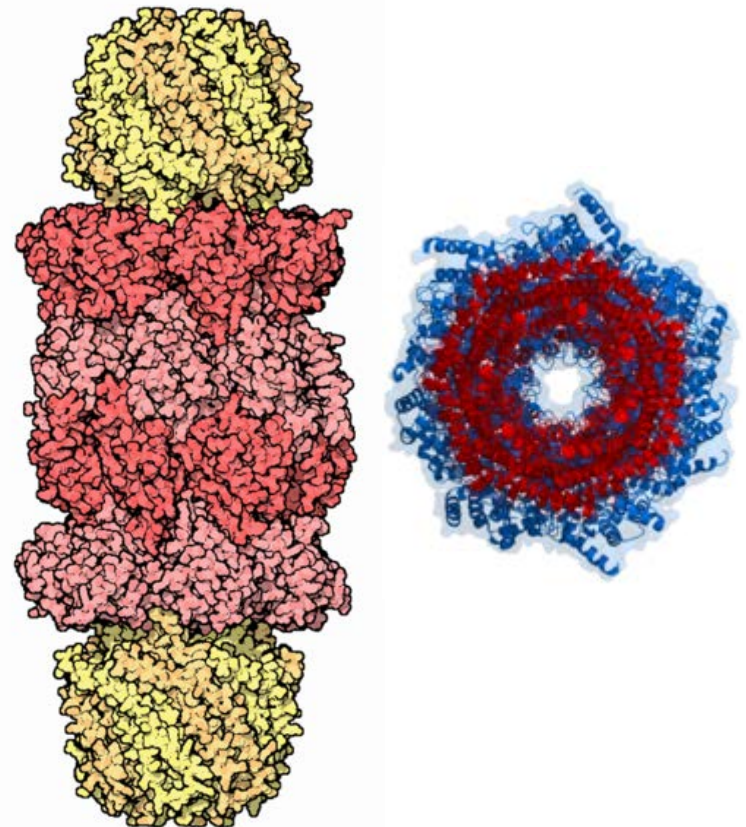
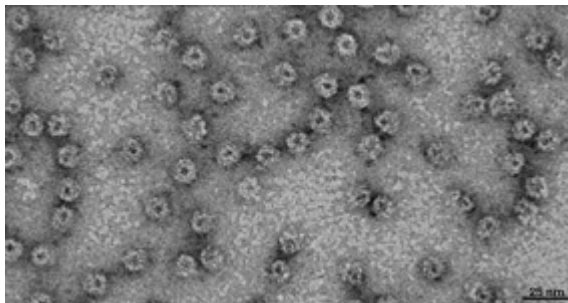


Proteasom

- Ubiquitinem (ubiquitynylace) označené proteiny se proteolyticky odbourávají v procesu zahrnujícím velký (2100 kD, 26S) multiproteinový komplex zvaný **26S proteasom**, který má na obou koncích čepičku označenou **19S cap**. Čepičky rozpoznávají ubiquitynylovaný protein.
- Ubiquitynylovaný protein vstoupí do dutiny proteasomu bez odštěpeného řetězce ubiquitinů, které se recyklují. Protein uvnitř dutiny proteasomu je hydrolyticky štěpen na aminokyseliny.

Proteasom

- Elektronoptický snímek proteasomů z *Xenopus laevis*
- Vlevo: červená střední část 26S, žluté čepičky 19S. Vpravo - pohled shora.



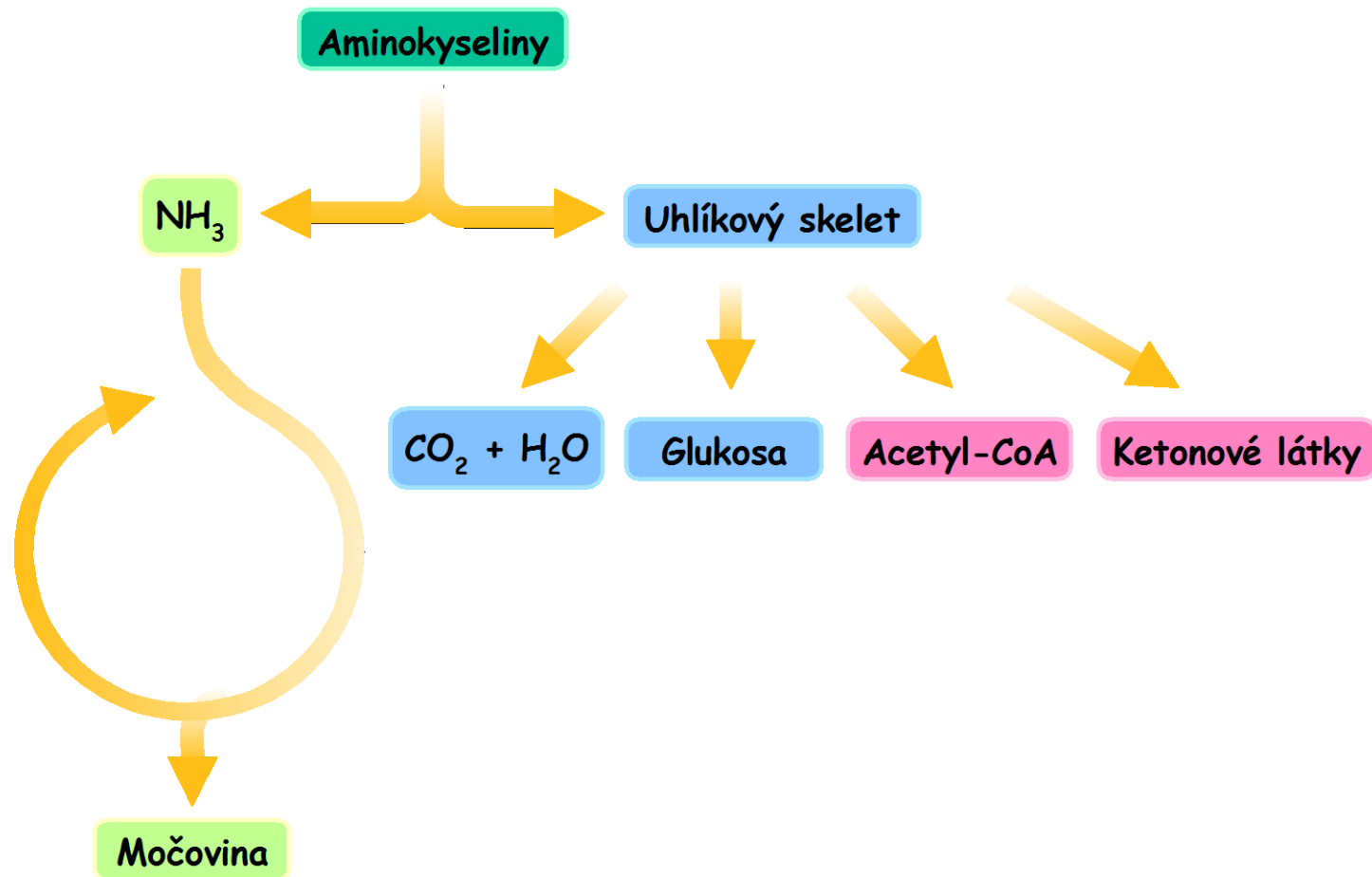
Kiss of Death

- http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/animation.html

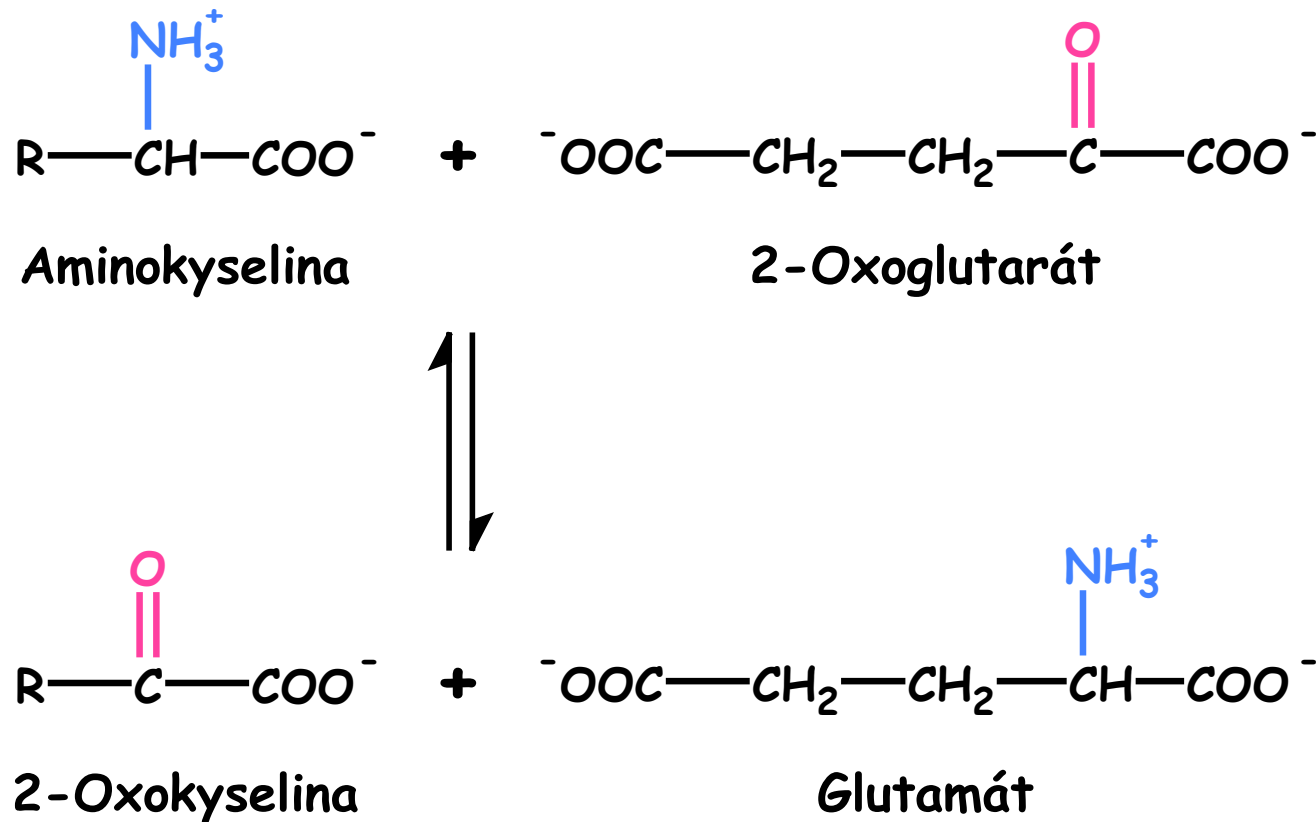
Deaminace aminokyselin

- Volné aminokyseliny mají původ, buď z degradace buněčných proteinů, nebo z potravy. Žaludeční proteasa pepsin a pankreatické proteasy trypsin, chymotrypsin a elastasa a řada další endo- a exopeptidas hydrolyzují polypeptidy na oligopeptidy a posléze až na aminokyseliny. Aminokyseliny jsou absorbovány střevní sliznicí a transportovány krevním řečištěm do dalších tkání.
- Odbourávání aminokyselin probíhá intracelulárně. Prvním krokem je odstranění α -aminoskupiny. Většinou ve formě amoniaku, který je vylučován, buď přímo, nebo přes další sloučeniny z organismu.
- Uhlíkatý skelet aminokyselin (α -oxokyseliny) je odbouráván na CO_2 a H_2O nebo převeden na glukosu, acetyl CoA nebo ketolátky.
- Odstranění α -aminoskupiny:
 - A) Transaminace
 - B) Oxidativní deaminace

Přehled odbourávání (katabolismu) aminokyselin

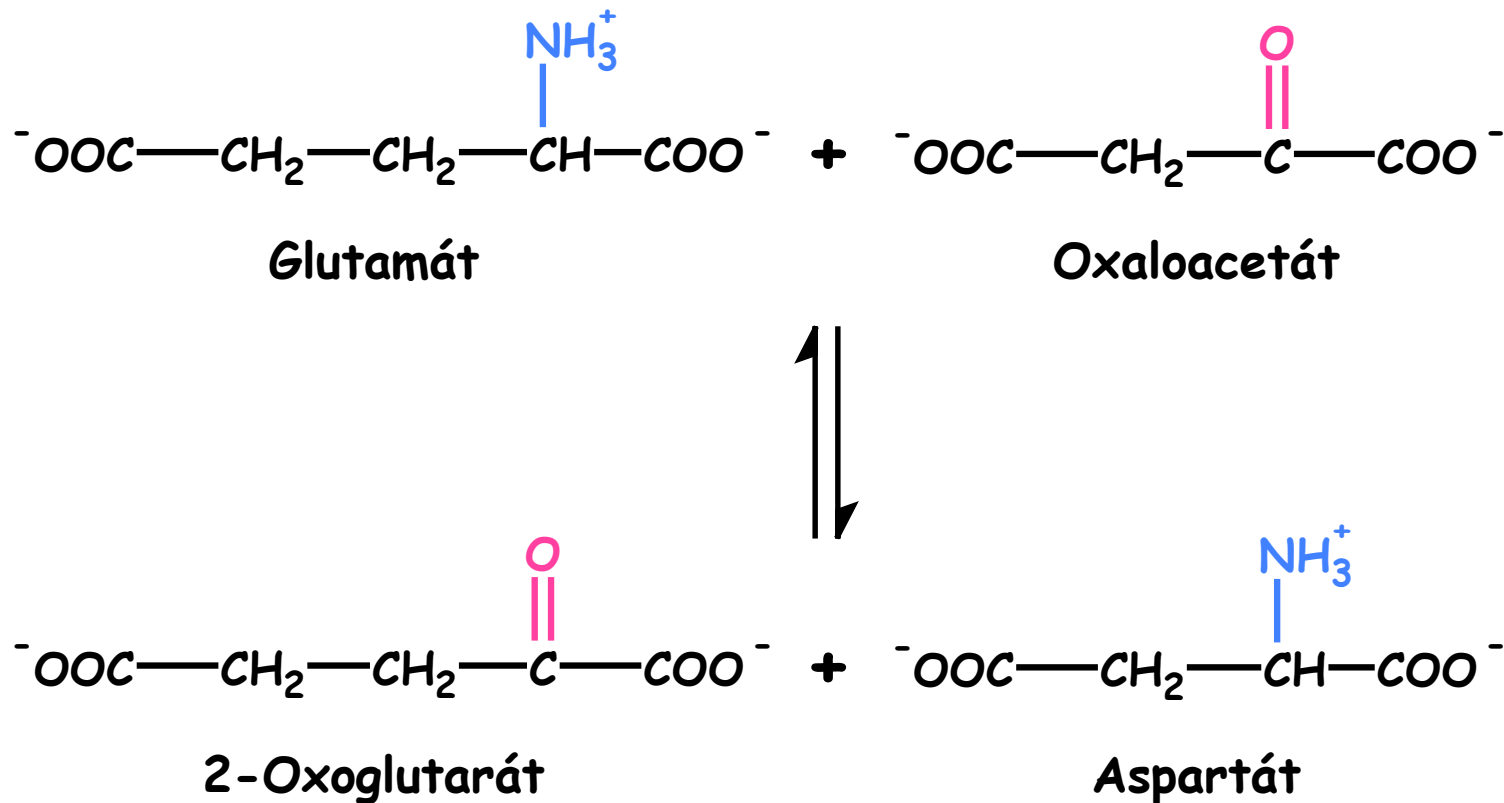


Transaminace (aminotransferasy EC 2.6.1 -).
Přenos aminoskupiny na oxokyselinu.

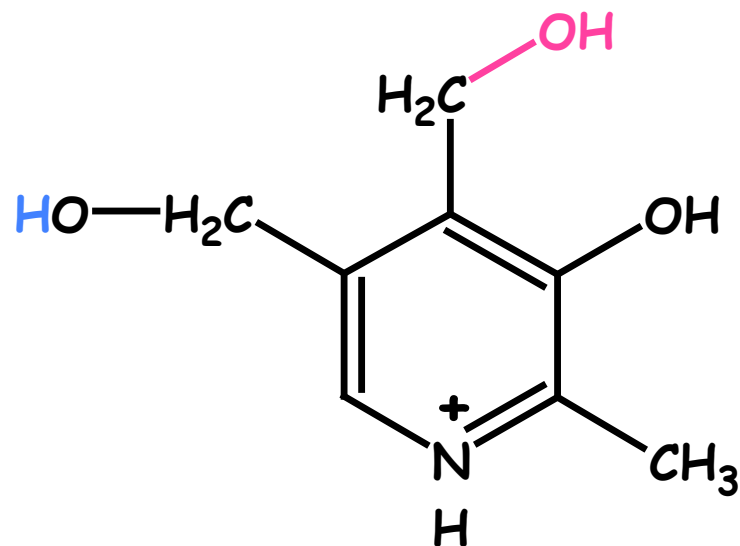


Transaminace. Enzymy aminotransferasy (transaminasy)
s koenzymem pyridoxal-5'-fosfátem (PLP).

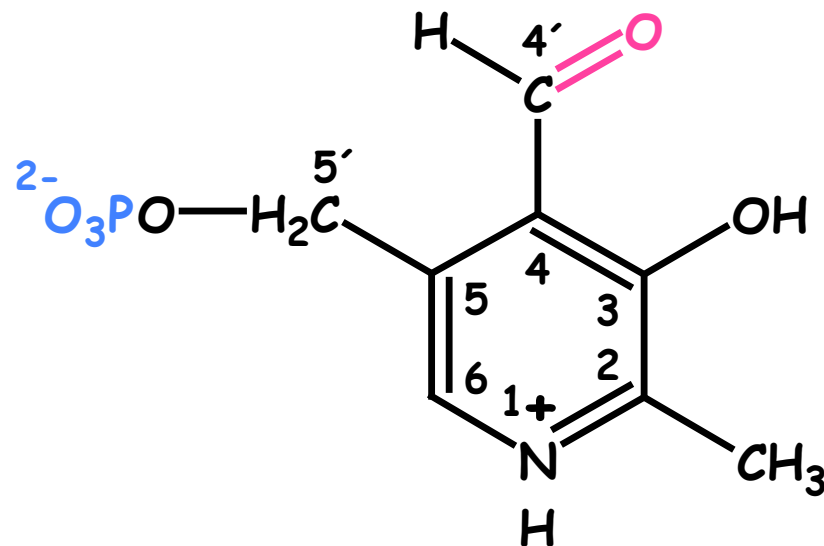
EC [2.6.1.1](#) Aspartáttransaminasa; Glutamát-oxaloacetáttransaminasa;
Glutamátaspartáttransaminasa; Transaminasa A



Prekurzorem PLP je pyridoxin, vitamin B₆.

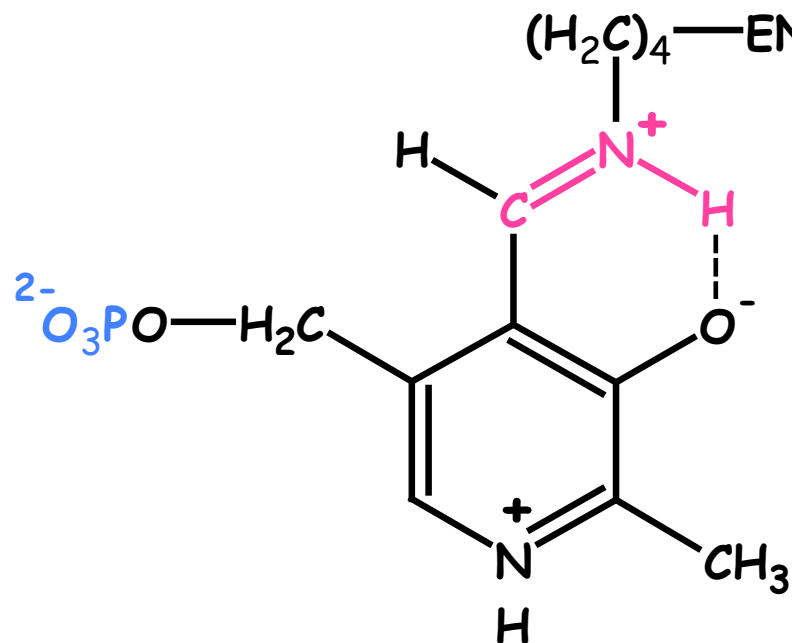


Pyridoxin
(vitamin B₆)

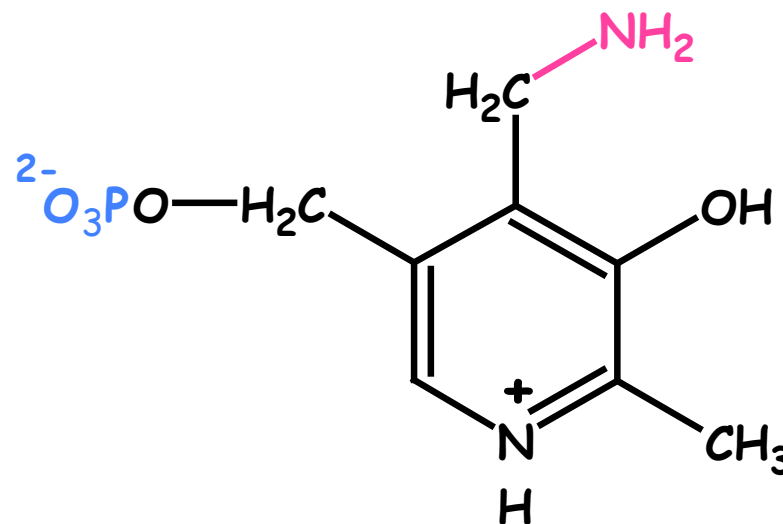


Pyridoxal-5'-fosfát
(PLP)

PLP je pevně vázán na enzym přes imino vazbu (Schiffova báze) na ϵ -aminoskupinu Lys. Pyridoxamin-5'-fosfát (PMP).



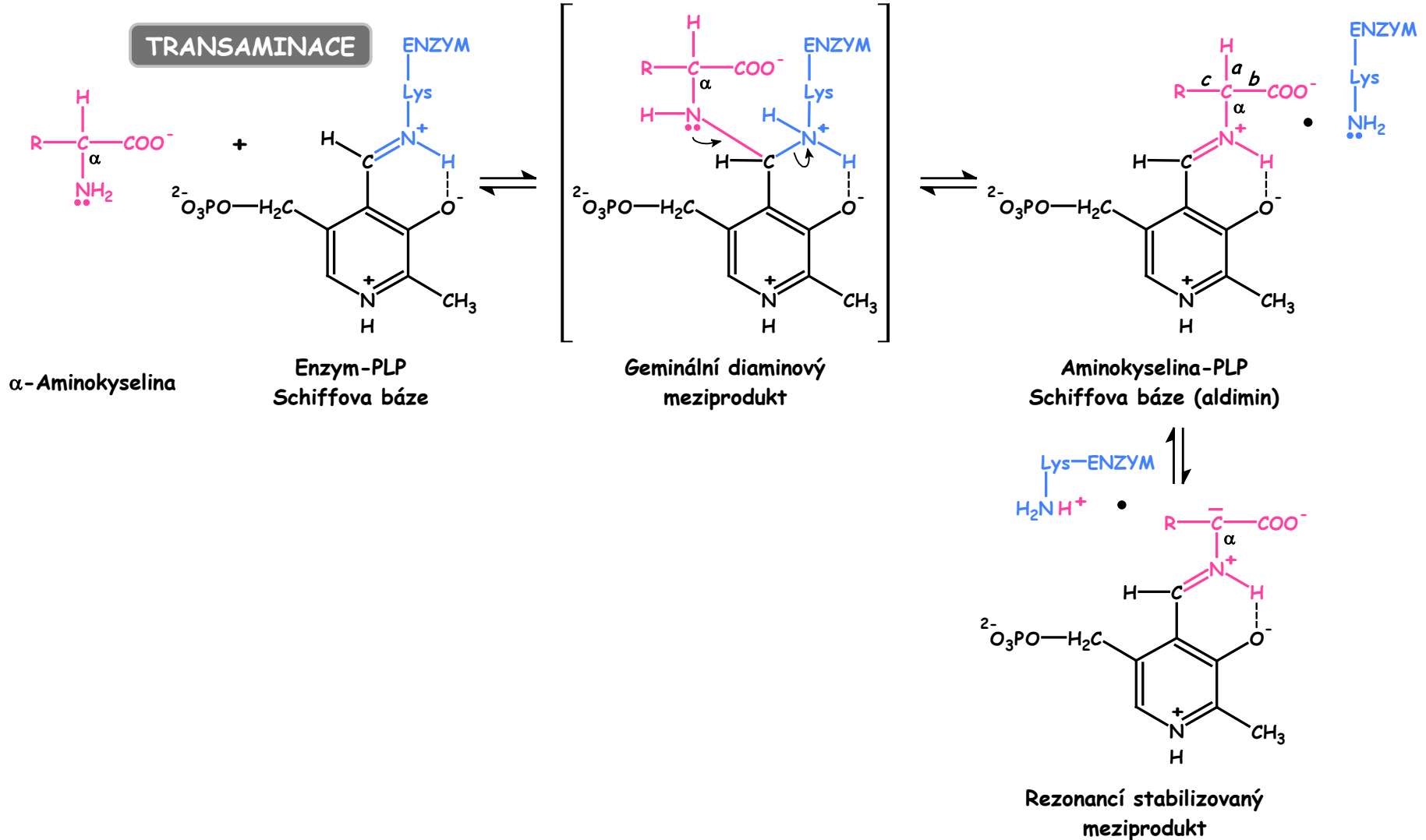
Pyridoxal-5'-fosfát
navázaný na apoenzym



Pyridoxamin-5'-fosfát
(PMP)

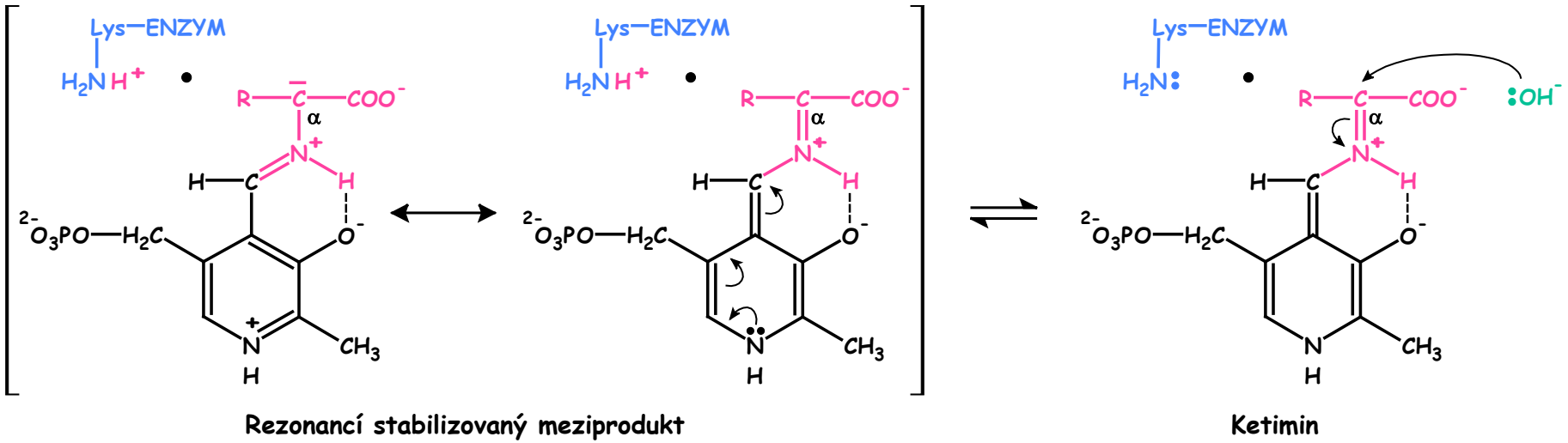
Převedení aminokyseliny na 2-oxokyselinu. Transaminace.

Aminoskupina aminokyseliny působí jako nukleofil za tvorby aldiminu.



Tautomerizace. Aminokyselina-PLP Schiffova báze tautomerizuje na 2-oxokyselinu-PMP Schiffovu bázi - ketimin.

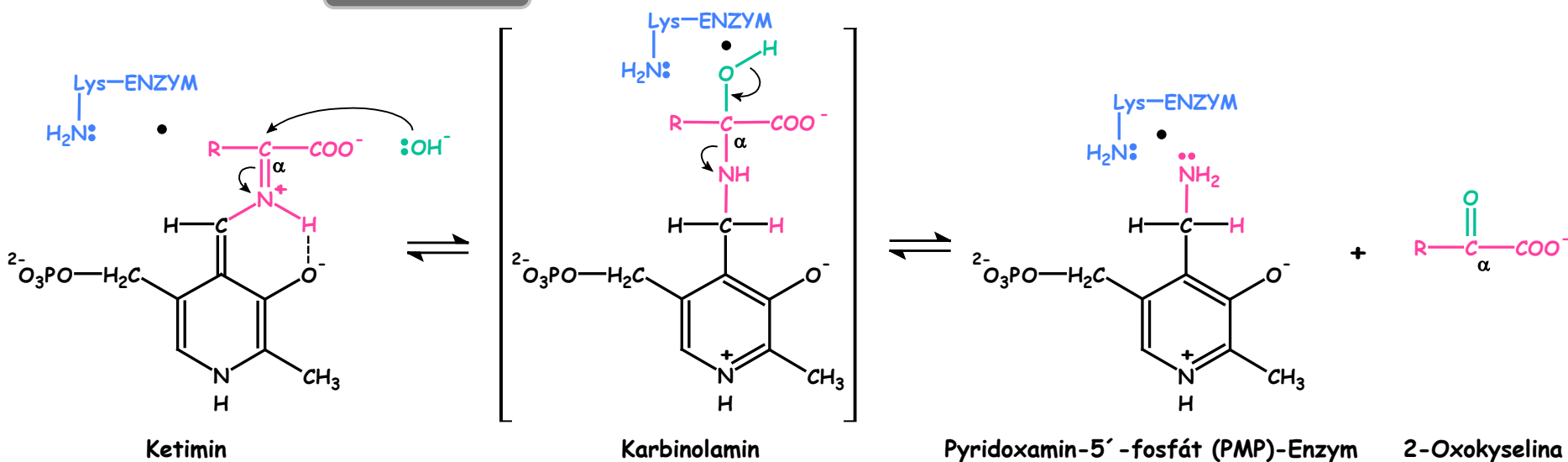
TAUTOMERIZACE



Hydrolýza.

2-Oxokyselina-PMP-Schiffova báze je hydrolyzována na PMP a 2-oxokyselinu.

HYDROLÝZA



Transaminace. Převod α -oxokyseliny na aminokyselinu.

- Převod zahrnuje stejné tři kroky, ale v opačném pořadí:
 - A) PMP reaguje s α -oxokyselinou za tvorby Schiffovy báze.
 - B) α -Oxokyselina-PMP Schiffova báze tautomerizuje za tvorby aminokyselina-PLP Schiffova báze.
 - C) ϵ -Aminoskupina Lys v aktivním místě atakuje aminokyselinu-PLP Schiffova báze v transiminační reakci za tvorby aktivní enzym-PLP Schiffova báze a současného uvolnění nově vzniklé aminokyseliny.
- V reakci vzniká rezonančně stabilní C_{α} karbanion stabilizovaný protonizovaným dusíkem pyridinia. Při transaminaci se uvolňuje α proton. Při jiných enzymových reakcích se mohou odštěpovat vazby b a c. Např. odštěpení b vede k dekarboxylaci aminokyseliny za vzniku aminu.

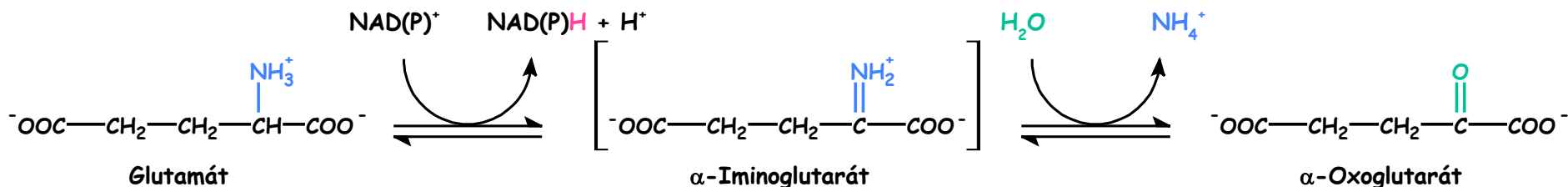
Aminotransferasy

- Substráty většiny aminotransferas jsou 2-oxoglutarát a oxaloacetát a pyruvát. Aminotransferasové reakce jsou reversibilní a podílí se tak i na syntéze aminokyselin.
- Přítomnosti aminotransferas ve svalových a jaterních buňkách se využívá k diagnostickým účelům. Klinické měření se nazývá **SGOT** (serum glutamátoxaloacetáttransaminasa), také aspartáttransaminasa, **AST**, a **SGPT** (serum glutamátpyruváttransaminasa, nebo alanintransaminasa, **ALT**). Vysoké aktivity těchto enzymů v krevním séru indikují porušení svalové nebo jaterní tkáně (infarkt myokardu, zánět jater).
- Jediná aminokyselina, která nepodléhá transaminaci je Lys.

Oxidativní deaminace-glutamátdehydrogenasa EC 1.4.1.1-4 (GDH).

Allosterická inhibice ATP a GTP, aktivace ADP a GDP. Proč ??

- GDH je mitochondriální enzym, jediný enzym, který využívá jak NAD^+ , tak NADP^+ jako redoxní koenzym. Oxidace probíhá přenosem hydridového aniontu z α -uhlíku Glu na NAD(P)^+ . Meziproduktem je α -iminoglutarát, který je hydrolyzován na amoniak a α -oxoglutarát. Anaplerotická reakce. GDH je allostericky inhibována GTP a NADH, aktivována ADP a NAD^+ .



Ornithinový (močovinový) cyklus.

- Živé organismy uvolňují nadbytečný dusík třemi způsoby:

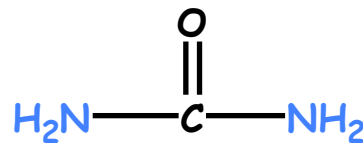
A) Vodní živočichové do vody jako amoniak - amonotelní.

B) Suchozemští živočichové jako močovinu- ureotelní.

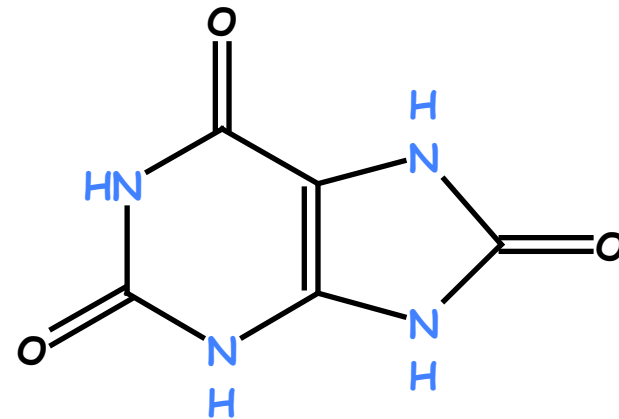
C) Ptáci a suchozemští plazi jako močovou kyselinu a její soli - urikotelní.



AMONIAK

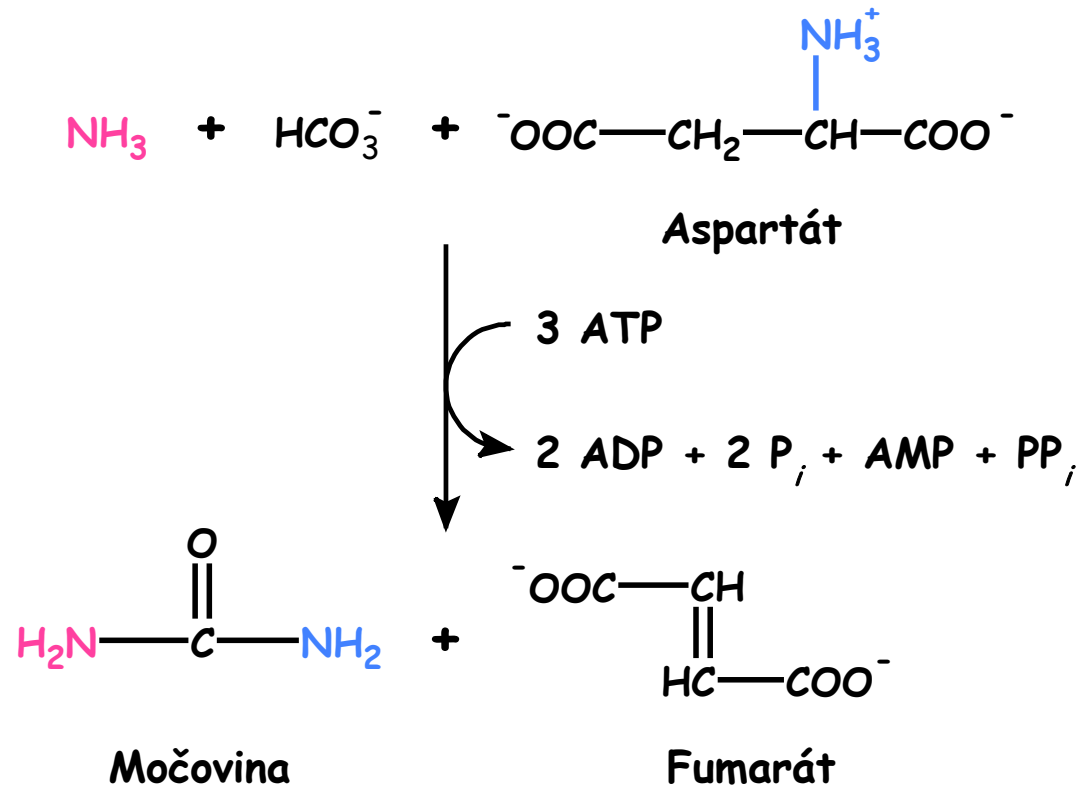


MOČOVINA



MOČOVÁ KYSELINA

Ornithinový (močovinový) cyklus publikován v roce 1932
 (první známý metabolický cyklus) H. Krebs a K. Henseleit.
 Syntéza močoviny probíhá v jaterních buňkách, částečně v matrix,
 částečně v cytosolu. Jeden dusík z NH_3 , druhý z Asp a uhlík z CO_2 .

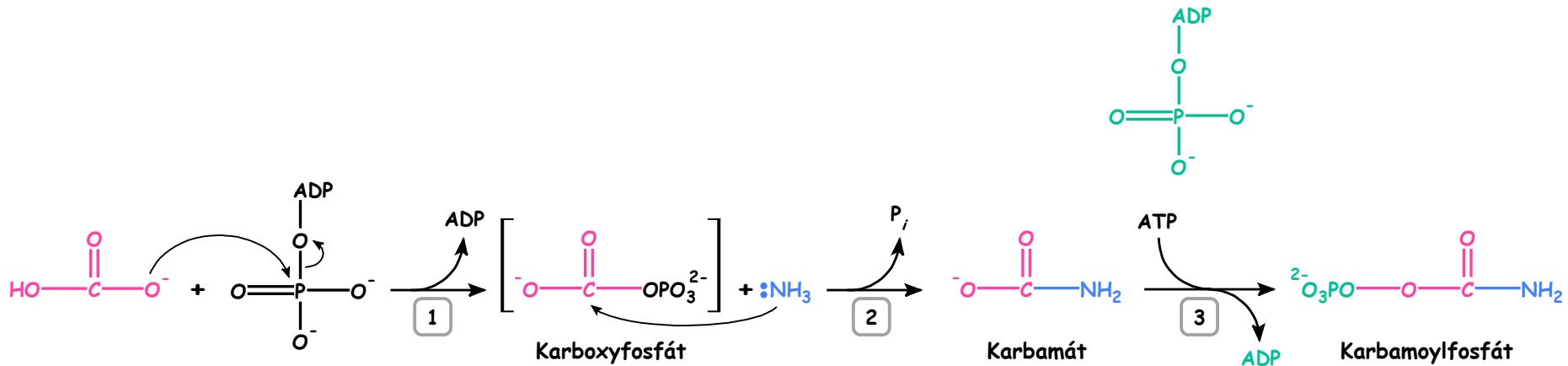


Reakce močovinového cyklu - pět enzymů (dva mitochondriální, tři cytosolové).

- Karbamoylfosfátsynthetasa (CPS) není součástí cyklu. Katalyzuje kondenzaci a aktivaci NH_3 a HCO_3^- za tvorby karbamoylfosfátu při spotřebě dvou ATP.
- U eukaryot existují dvě CPS - CPS I a CPS II.
- **Mitochondriální CPS I** má jako zdroj dusíku amoniak a podílí se tak na syntéze močoviny. Reakce je prakticky ireversibilní a rychlost cyklu limitující.
- **Cytosolová CPS II** má jako zdroj dusíku Gln a účastní se biosyntézy pyrimidinových nukleotidů.

Mechanismus působení CPS I

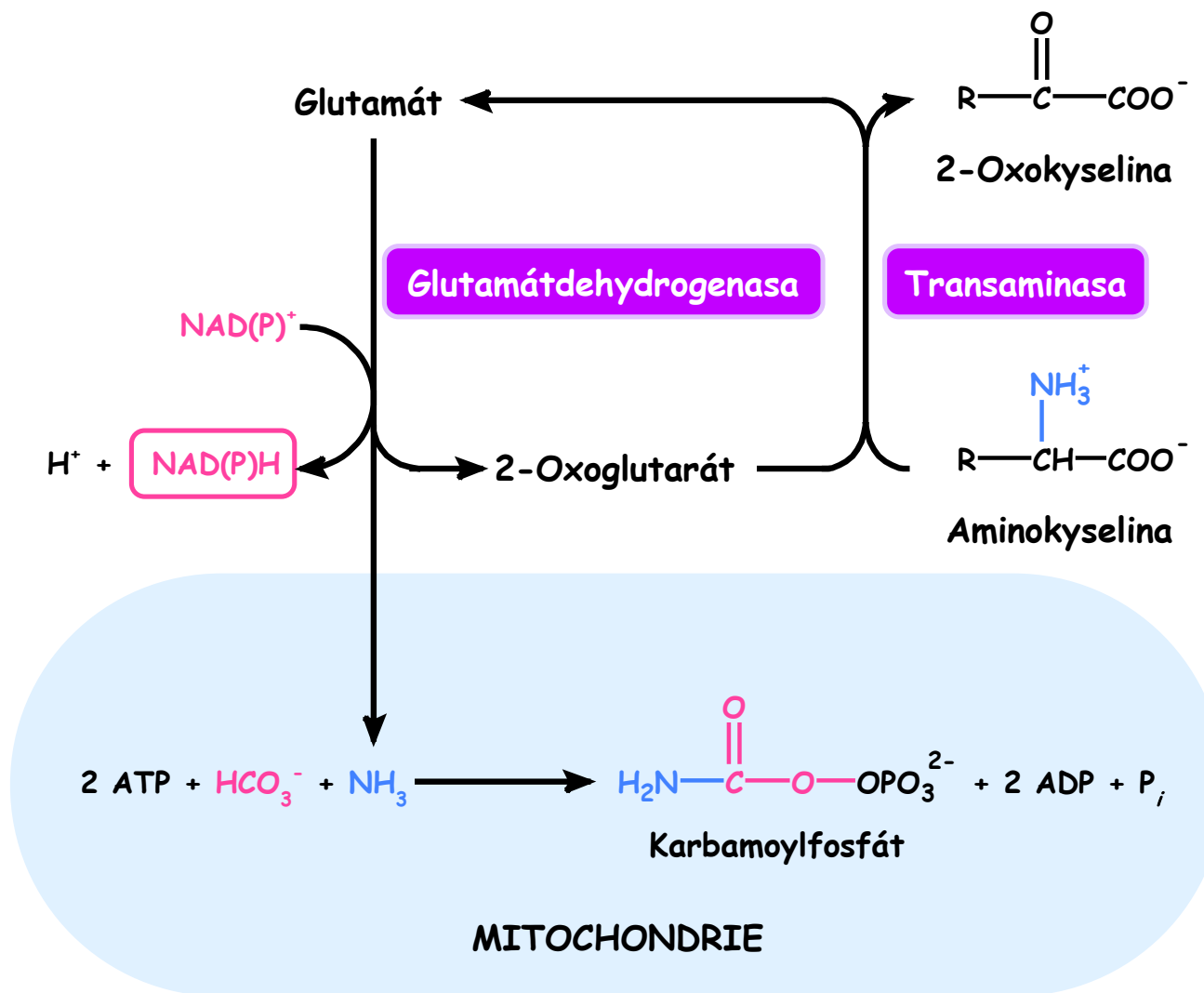
- 1. ATP aktivuje $\text{HCO}_3^- \rightarrow$ karboxyfosfát + ADP.
- 2. Amoniak atakuje karboxyfosfát, uvolňuje fosfát za tvorby karbamátu a P_i .
- 3. Druhé ATP fosforyluje karbamát za tvorby karbamoylfosfátu.



Další enzymy močovinového cyklu:

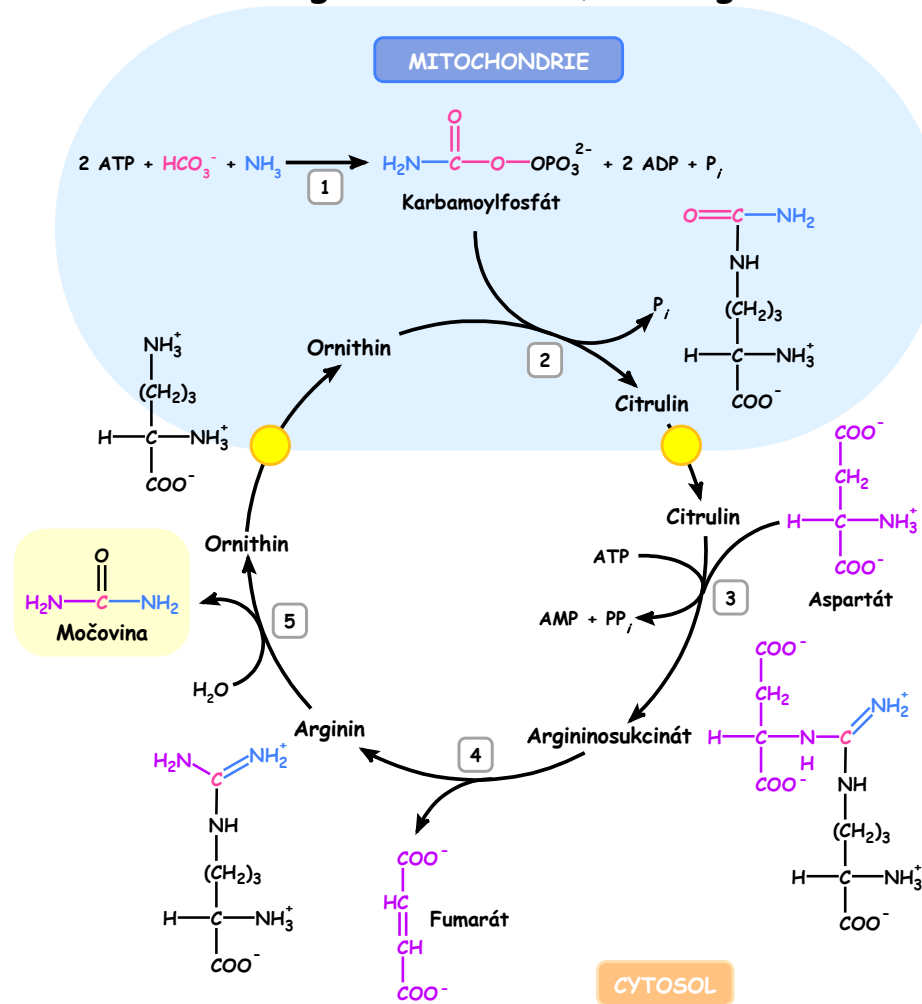
- **Ornithintranskarbamoylasa.** Přenáší karbamoylovou skupinu na ornithin → citrullin.
- Reakce probíhá v mitochondrii - ornithin je transportován dovnitř a citrullin do cytosolu.
- **Argininosukcinátsynthetasa.** Vstup druhého dusíku do cyklu. Ureido kyslík citrullinu je aktivován ATP za tvorby citrullyl-AMP. Poté vstupuje Asp. Difosfát je difosfatasou rozkládán na dva P_i .
- **Argininosukcinasa.** Enzym katalyzuje eliminaci fumarátu a oddělení Arg. Fumarát analogickou reakcí jako v citrátovém cyklu přechází na malát a poté na oxaloacetát-reakce probíhají v cytosolu a výsledný oxaloacetát vstupuje do glukoneogeneze.
- **Arginasa.** Enzym katalyzuje hydrolýzu Arg na močovinu a ornithin, který je transportován zpět do mitochondrie. Močovina je odváděna do ledvin a močí ven z těla.

Karbamoylfosfátsynthetická reakce

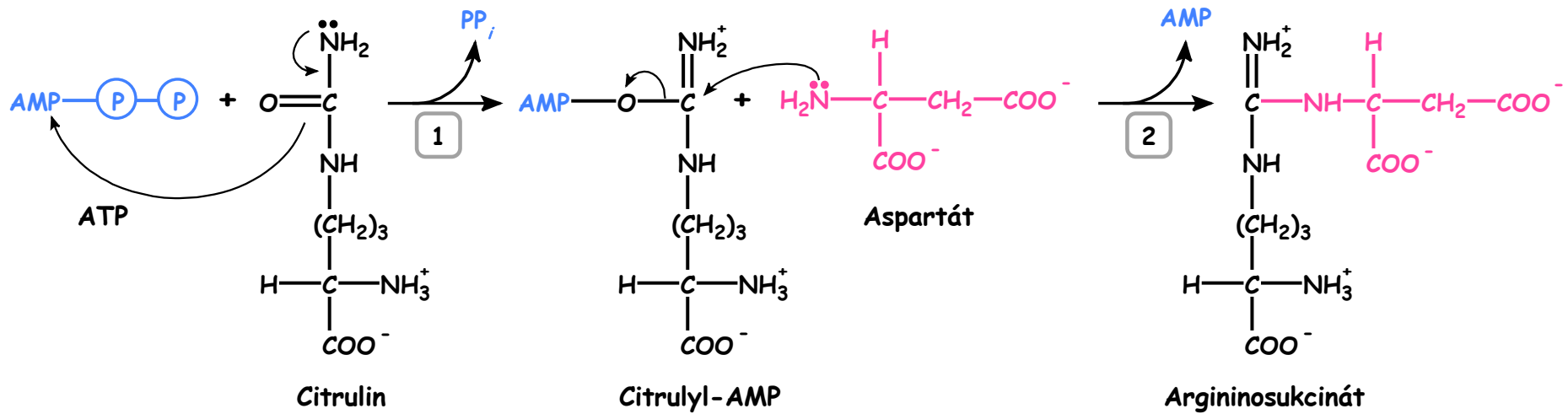


Lokalizace a enzymy ornithinového cyklu.

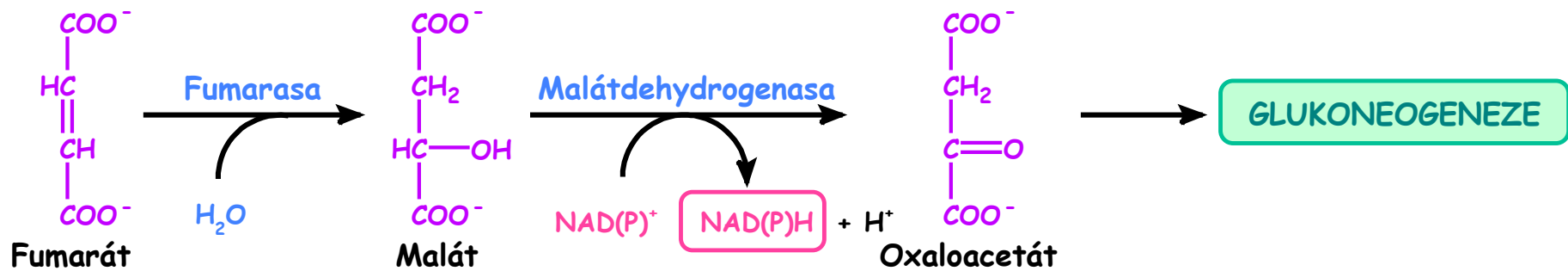
- 2- Ornithintranskarbamoylasa, 3- Argininosukcinátsynthetasa,
4- Argininosukcinasa, 5- Arginasa



Mechanismus argininosukcinátsynthetasy

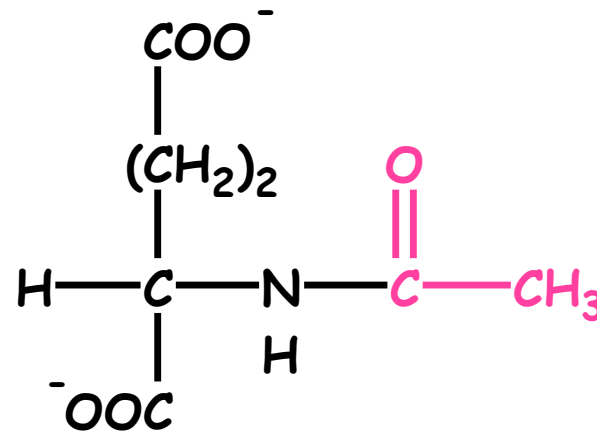


Další osud fumarátu v cytosolu



Regulace močovinového cyklu

- **Karbamoylfosfátsynthetasa** je allostericky aktivována **N-acetylGlu**. Se vzrůstajícím odbouráváním aminokyselin roste koncentrace Glu a syntéza N-acetylGlu - močovinový cyklus se urychluje.
- Močovinový cyklus stejně jako glukoneogeneze a ketogeneze je lokalizován v játrech, ale slouží pro celý organismus.
- Ostatní enzymy cyklu jsou pod kontrolou koncentrace svých substrátů.



N-Acetylglutamát

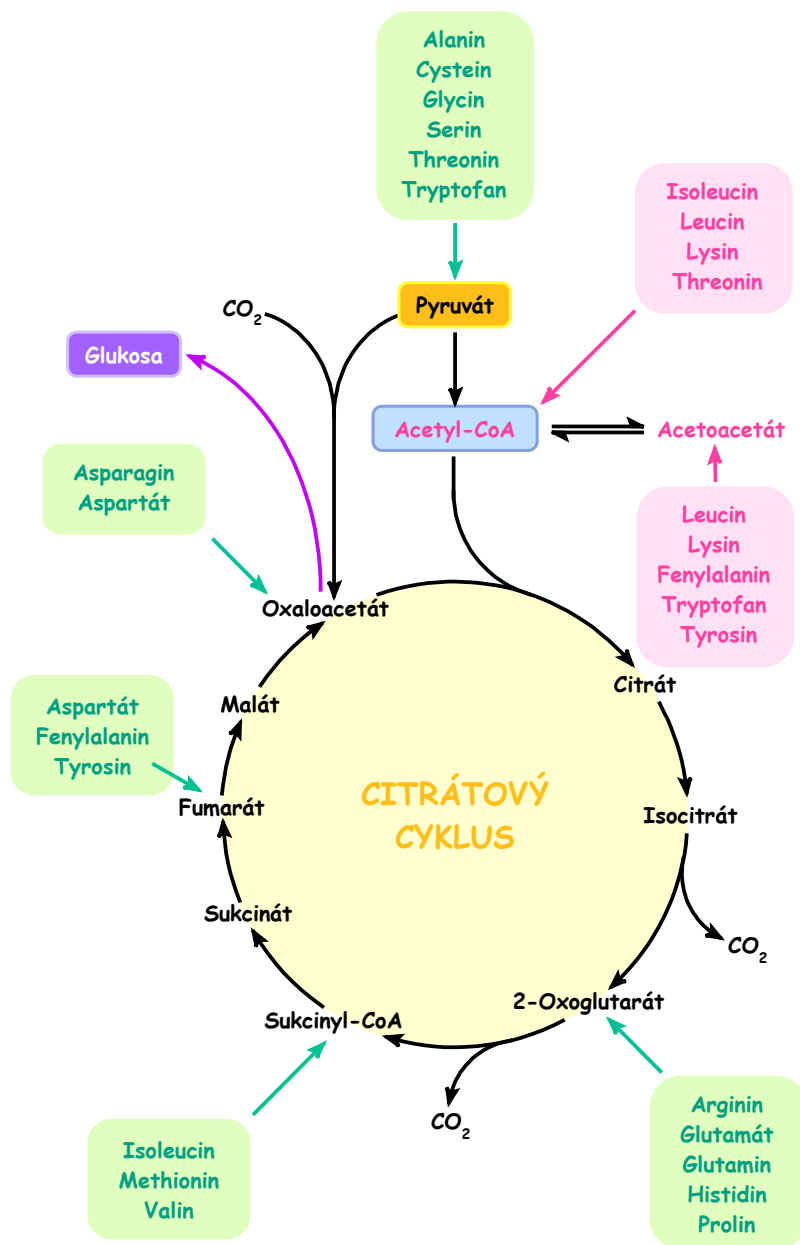
Odbourávání uhlíkaté kostry aminokyselin - přehled

- Aminokyseliny jsou odbourávány na sloučeniny, které mohou být metabolizovány na CO_2 a H_2O nebo využity při glukoneogenezi.
- Odbouráváním aminokyselin u živočichů se obvykle získává 10 až 15 % metabolické energie.
- Dvacet „standardních aminokyselin“ je odbouráváno na sedm metabolických meziproduktů:
- **Pyruvát, α -oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát, oxaloacetát, acetyl-CoA nebo acetoacetát.**
- Na tomto základě dělíme aminokyseliny do tří skupin: **glukogenní, ketogenní a gluco i ketogenní.**
- **Glukogenní aminokyseliny** se odbourávají na pyruvát,
- 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát a oxaloacetát - jsou prekurzory glukosy.
- **Ketogenní aminokyseliny** se odbourávají na acetyl-CoA a acetoacetát a mohou být převedeny na mastné kyseliny a ketolátky. Čistě ketogenní jsou Lys a Leu.

Zařazení aminokyselin podle produktů odbourávání jejich uhlíkaté kostry.

- **Aminokyseliny glukogenní:**
- Gly, Ala, Cys, Ser, Thr (odbourávají se na pyruvát);
- Arg, Glu, Gln, Pro, His (odbourávají se na α -oxoglutarát);
Ile, Met, Val (odbourávají se na sukcinyl-CoA);
- Asp, Asn (odbourávají se na oxaloacetát, Asp také na fumarát močovinovým cyklem)
- **Aminokyseliny ketogenní:**
- Leu, Lys (odbourávají se na acetyl-CoA a acetoacetát);
- **Aminokyseliny gluko i ketogenní:**
- Trp (odbourává se na acetoacetát a Ala); Phe, Tyr (odbourávají se na fumarát a acetoacetát)

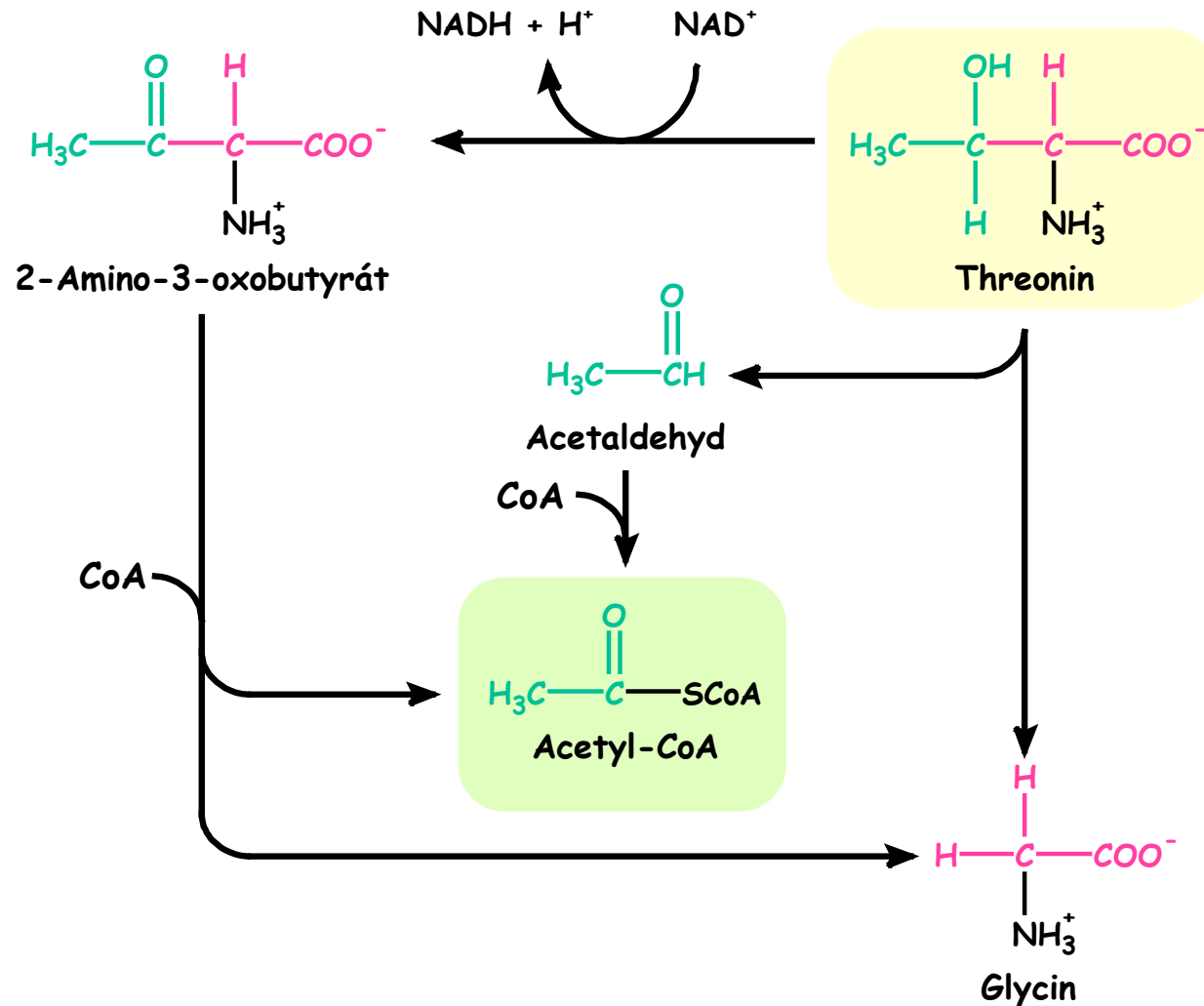
Odbourávání
aminokyselin
na jeden ze
sedmi
metabolických
meziproduktů
citrátového
cyklu.



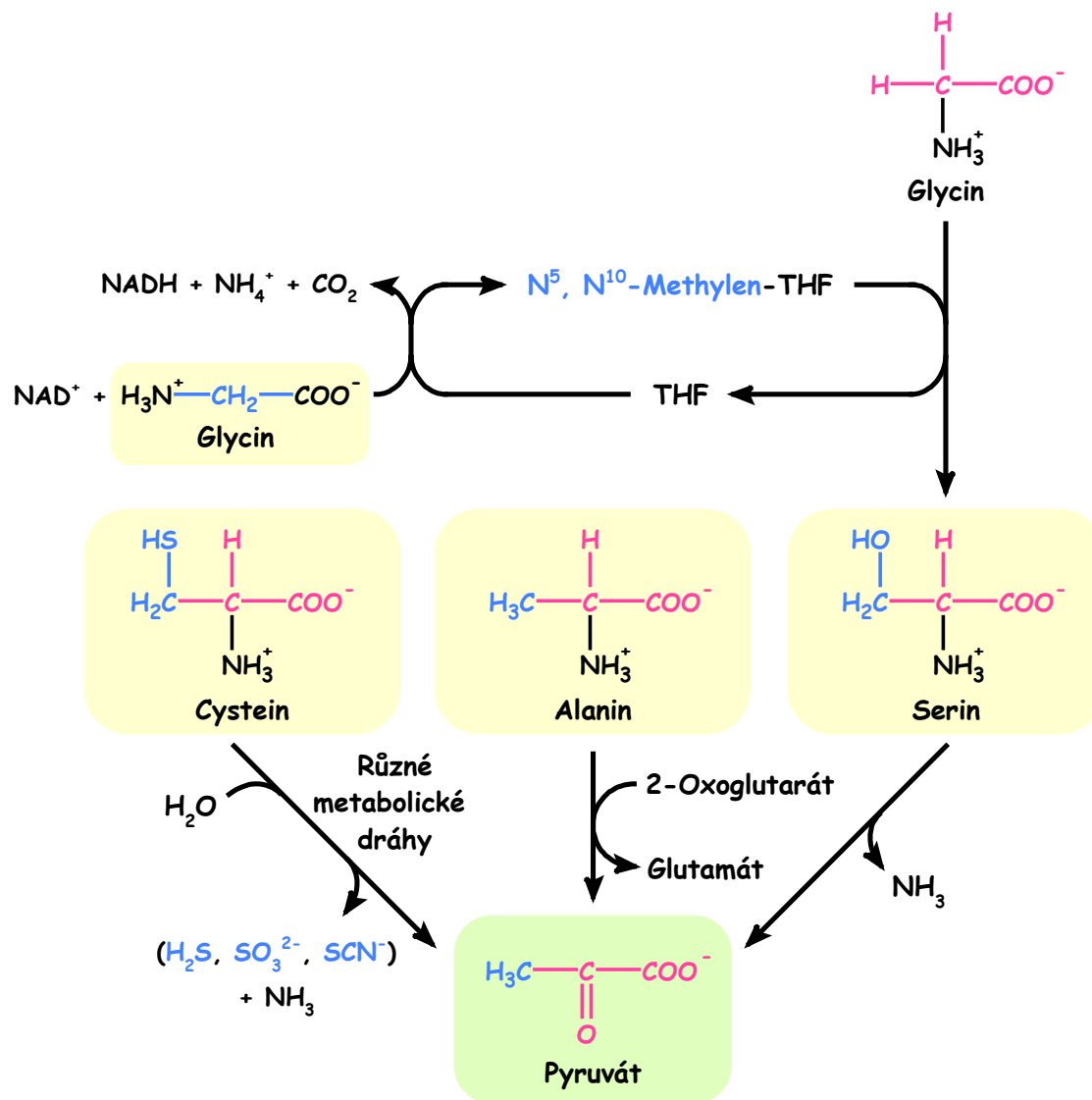
Ala, Cys, Gly, Ser a Thr se odbourávají na pyruvát.

- Ala je transaminován na pyruvát.
- Ser je dehydratován serindehydratasou (prosthetická skupina PLP) na aminoakrylát a ten spontánně neenzymově tautomerizuje na iminoderivát, který hydrolyzuje na pyruvát a NH_3 .
- Cys je převáděn na pyruvát různými cestami za odštěpení H_2S , SO_3^{2-} nebo SCN^- .
- Gly je převáděn na pyruvát přes Ser enzymem serinhydroxymethyltransferasou. Enzym má jako koenzym N',N' -metylen-THF.
- Thr je jak glukogenní, tak ketogenní, protože poskytuje pyruvát i acetyl-CoA.

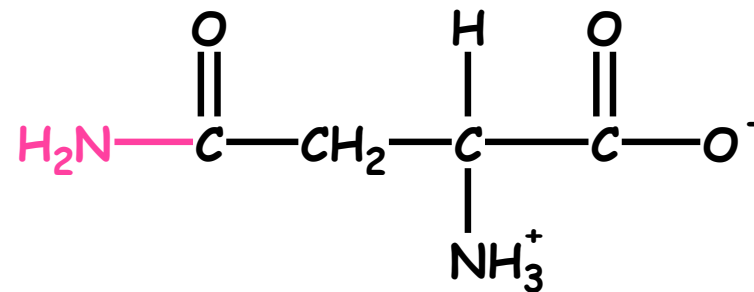
Ala, Cys, Gly, Ser a Thr se odbourávají na pyruvát.



Ala, Cys, Gly, Ser a Thr se odbourávají na pyruvát.



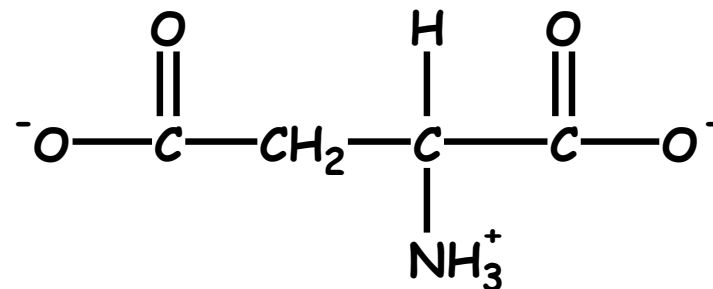
Asp a Asn se odbourávají na oxaloacetát.



Asparagin

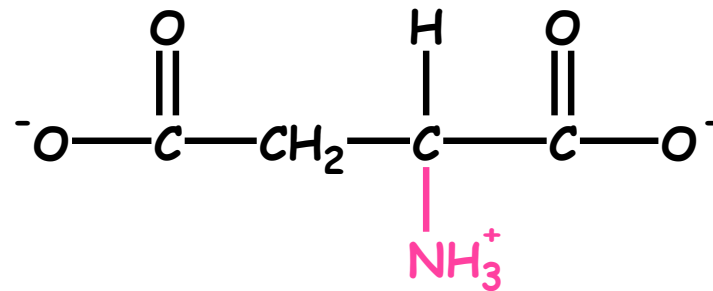


L-Asparaginasa



Aspartát

Asp a Asn se odbourávají na oxaloacetát.

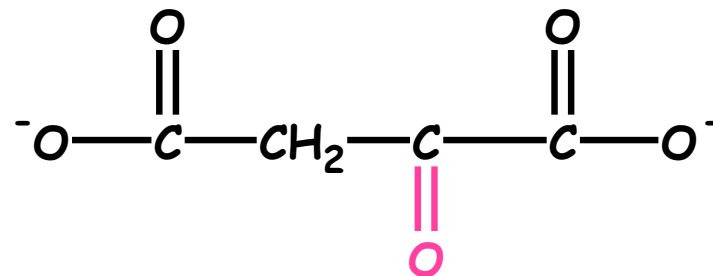


Aspartát

2-Oxoglutarát

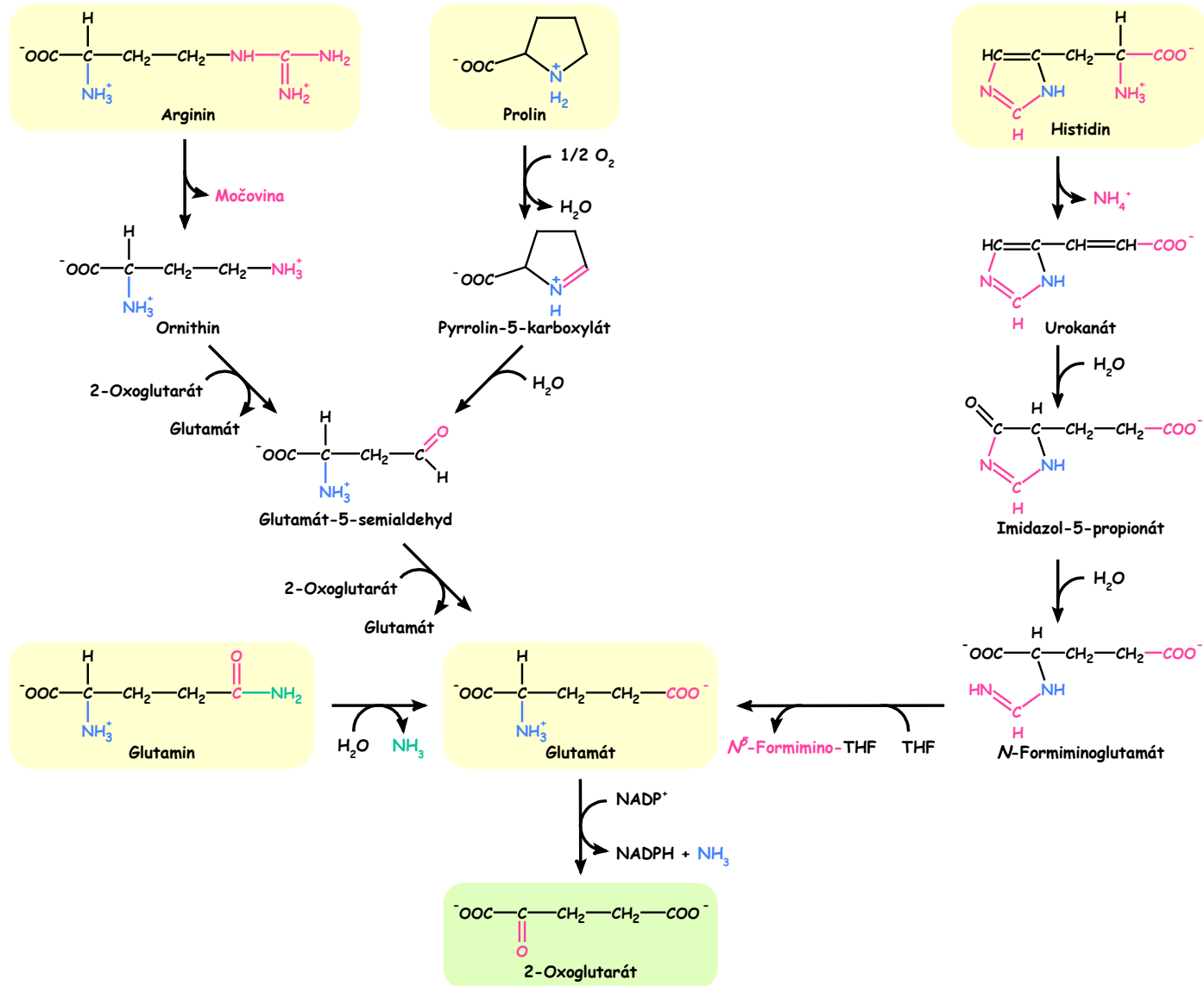
Aminotransferasa

Glutamát

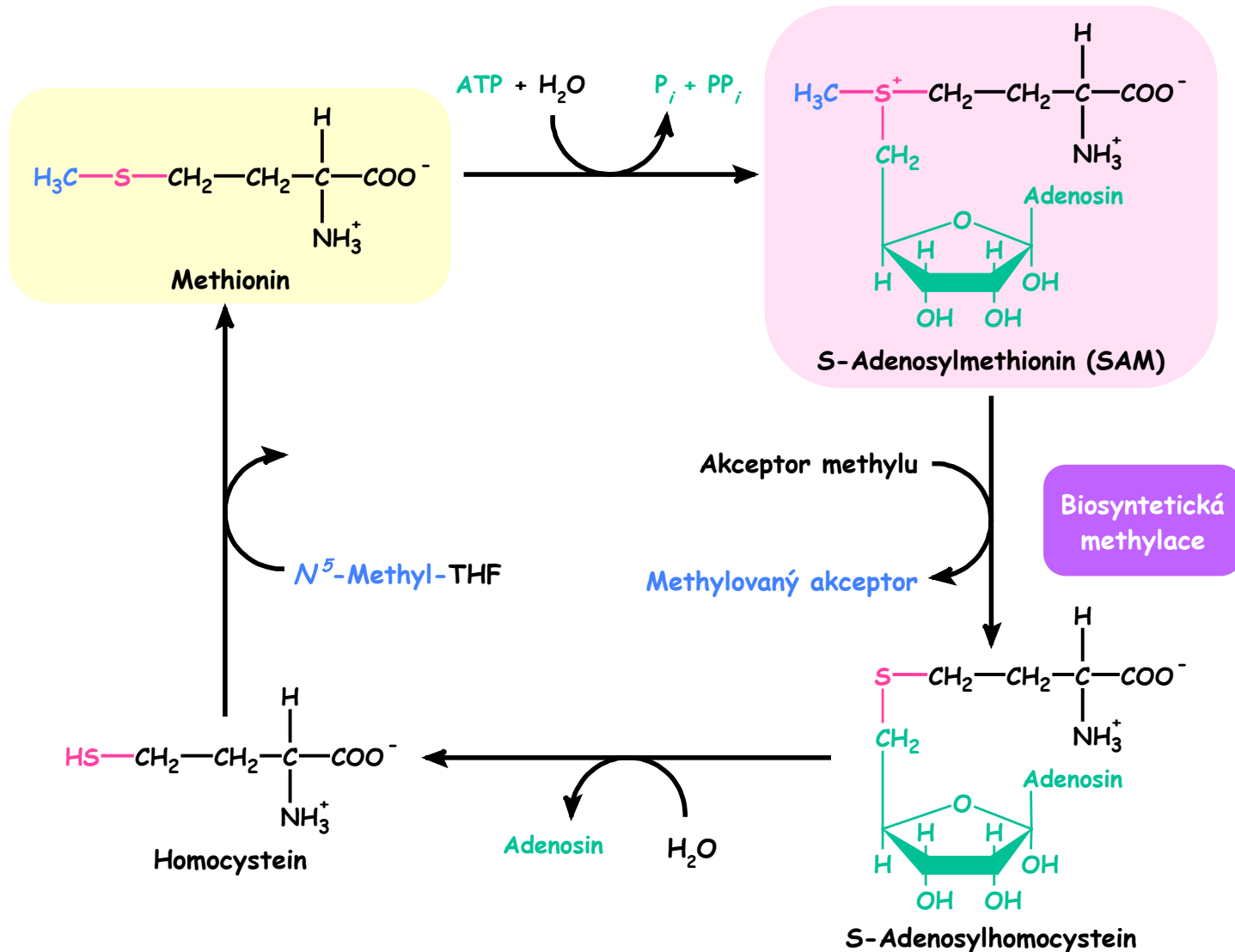


Oxaloacetát

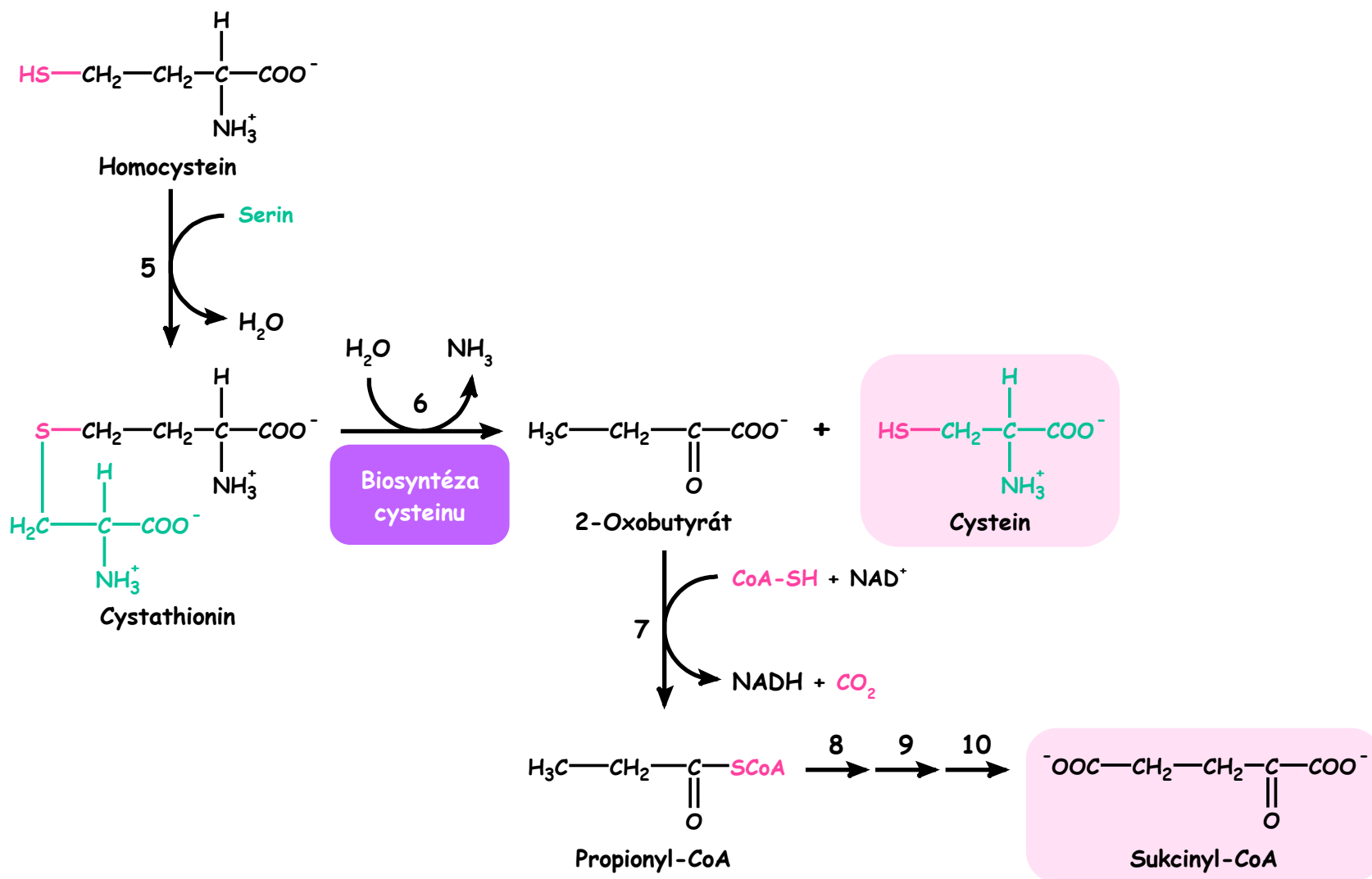
Arg, Glu, Gln, His a Pro se odbourávají na Glu a poté na 2-oxoglutarát



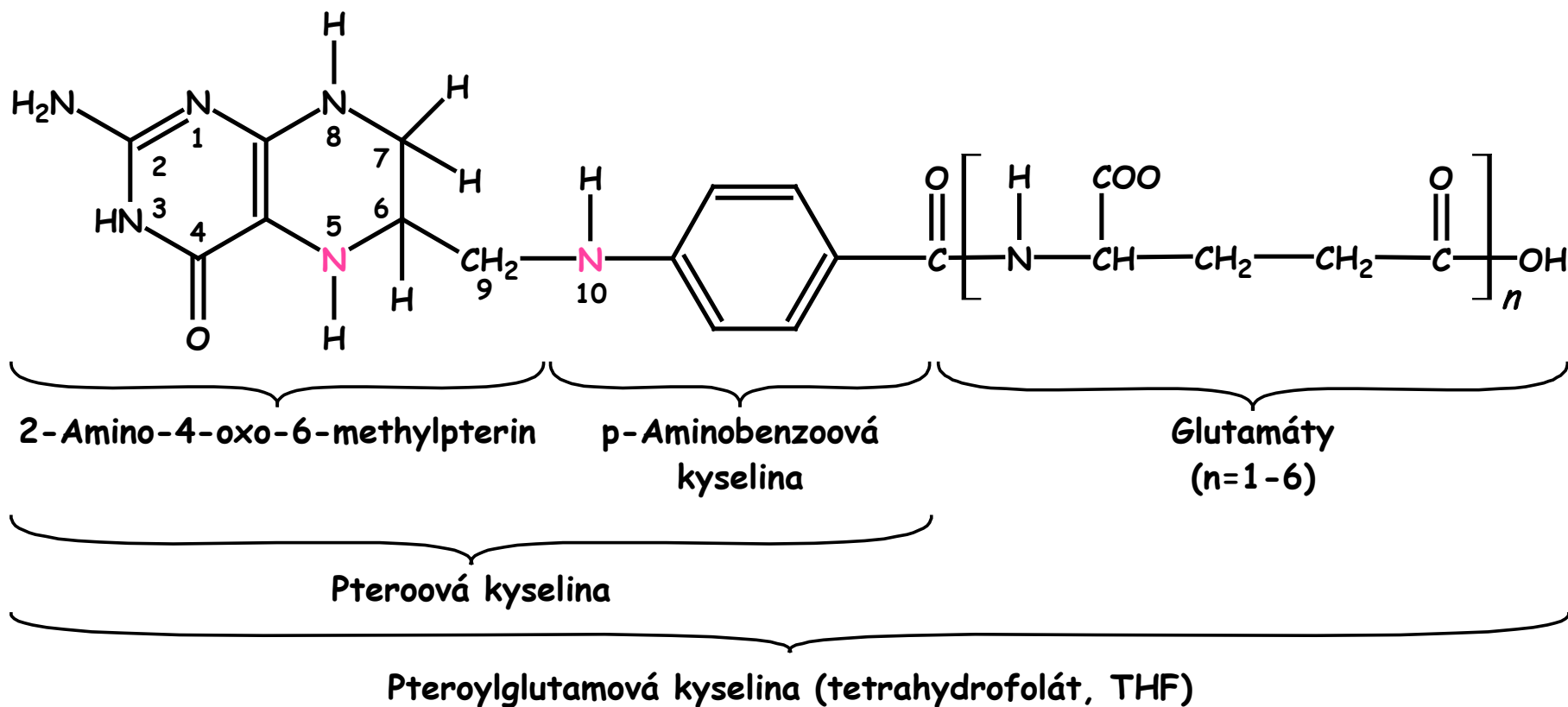
Ile, Met a Val se odbourávají na sukcinyl-CoA



Ile, Met a Val se odbourávají na sukcinyl-CoA.



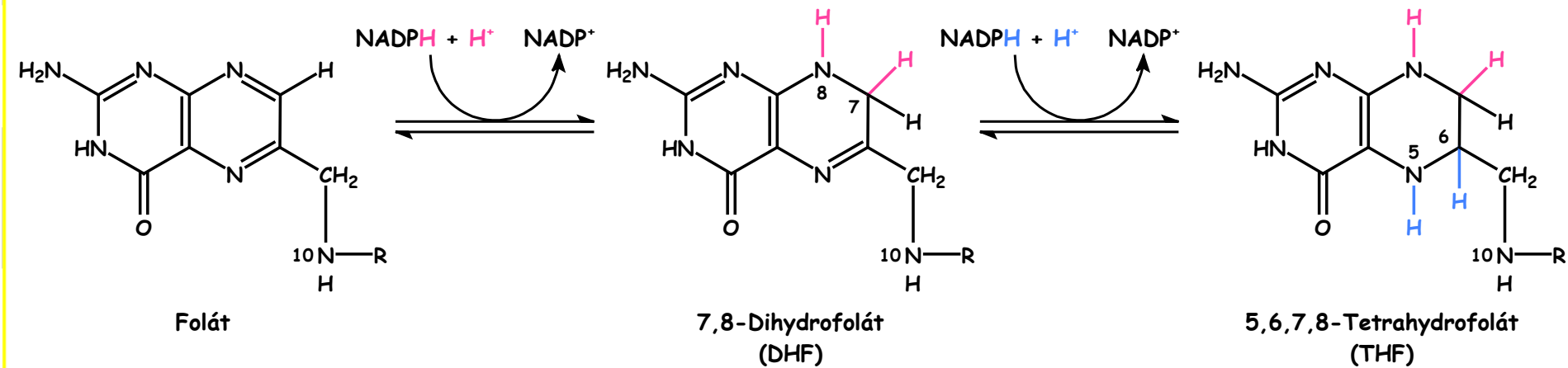
Tetrahydrofolát jako transfer jednouhlíkatých štěpů.



Oxidační stupně jednouhlíkatých skupin přenášených THF.

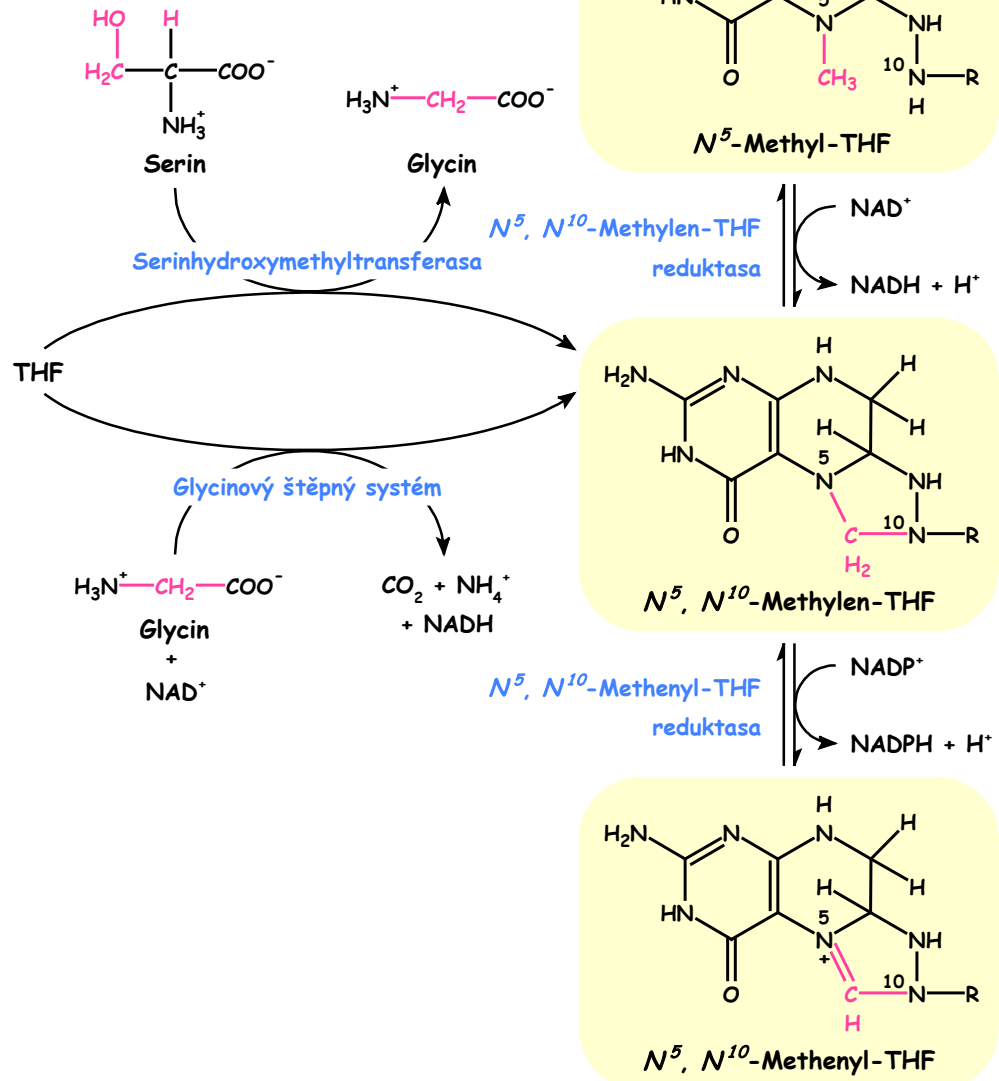
Oxidační stupeň	Přenášená skupina	THF derivát
• Methanol	Methyl (-CH ₃)	N ⁵ -methyl-THF
• Formaldehyd	Methylen (-CH ₂ -)	N ⁵ , N ¹⁰ -methylen-THF
• Mravenčany	Formyl (-CH=O)	N ⁵ (N ¹⁰)-formyl-THF
•	Formimino (-CH=NH)	N ⁵ -formimino-THF
•	Methenyl -CH=)	N ⁵ , N ¹⁰ -methenyl-THF

Dva stupně redukce folátu na THF.

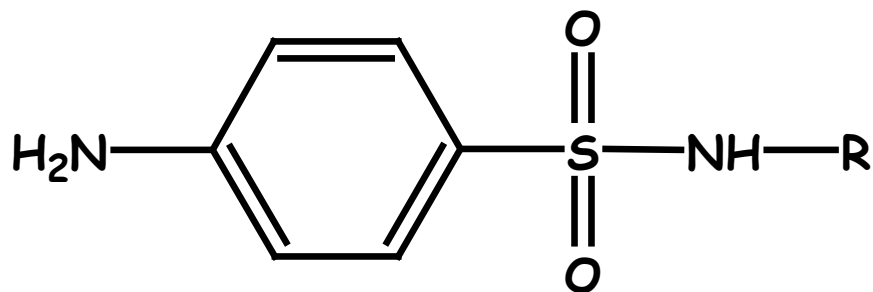


Tvorba tetrahydrofolátů -

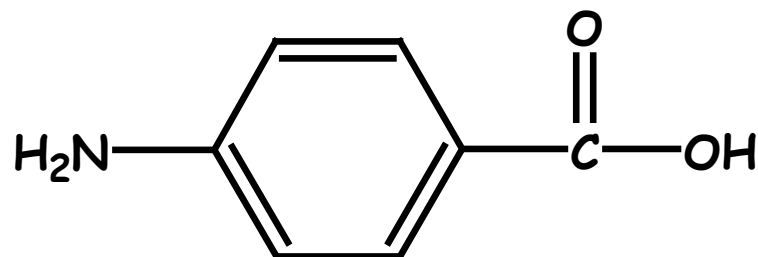
jednouhlíkatý štěp.



Sulfonamidy kompetují s *p*-aminobenzoovou kyselinou při bakteriální syntéze THF. Antibakteriální chemoterapeutika.



Sulfonamidy
(R=H, sulfanilamid)

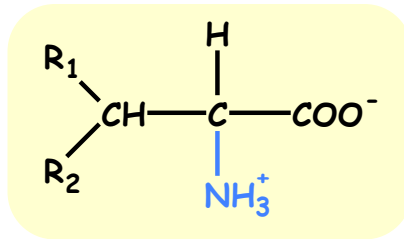


p-Aminobenzoová kyselina

Odbourávání větvených aminokyselin

- Větvené aminokyseliny jako Ile, Leu a Val jsou v prvních třech krocích odbourávány společnými enzymy.
- Transaminace na odpovídající α -oxokyseliny.
- Oxidativní dekarboxylace na odpovídající acyl-CoA.
- Dehydrogenace FAD za tvorby dvojně vazby.
- Ostatní reakce jsou analogií oxidace mastných kyselin.
- Dehydrogenasa větvených α -ketokyselin katalyzující druhou reakci je homologem pyruvátdehydrogenasy a α -oxoglutarátdehydrogenasy.
- Genetický nedostatek tohoto enzymu vede k onemocnění zvaném **moč javorového sirupu**. Moč obsahuje větvené α -ketokyseliny a zapáchá nebo voní jako javorový sirup.

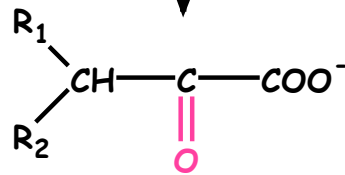
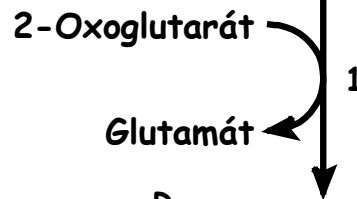
Odbourávání Ile, Val a Leu



(A) Isoleucin: $\text{R}_1 = \text{CH}_3\text{-}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$

(B) Valin: $\text{R}_1 = \text{CH}_3\text{-}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{-}$

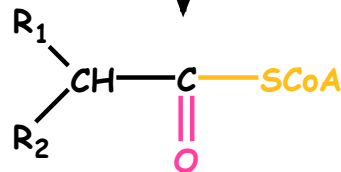
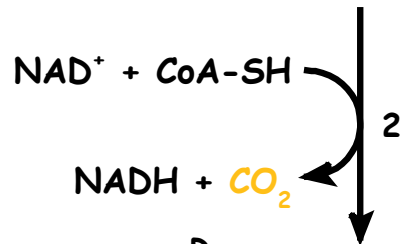
(C) Leucin: $\text{R}_1 = \text{H-}$, $\text{R}_2 = (\text{CH}_3)_2\text{CH-}$



(A) 2-Oxo-3-methylvalerát

(B) 2-Oxoisovalerát

(C) 2-Oxoisokapronát

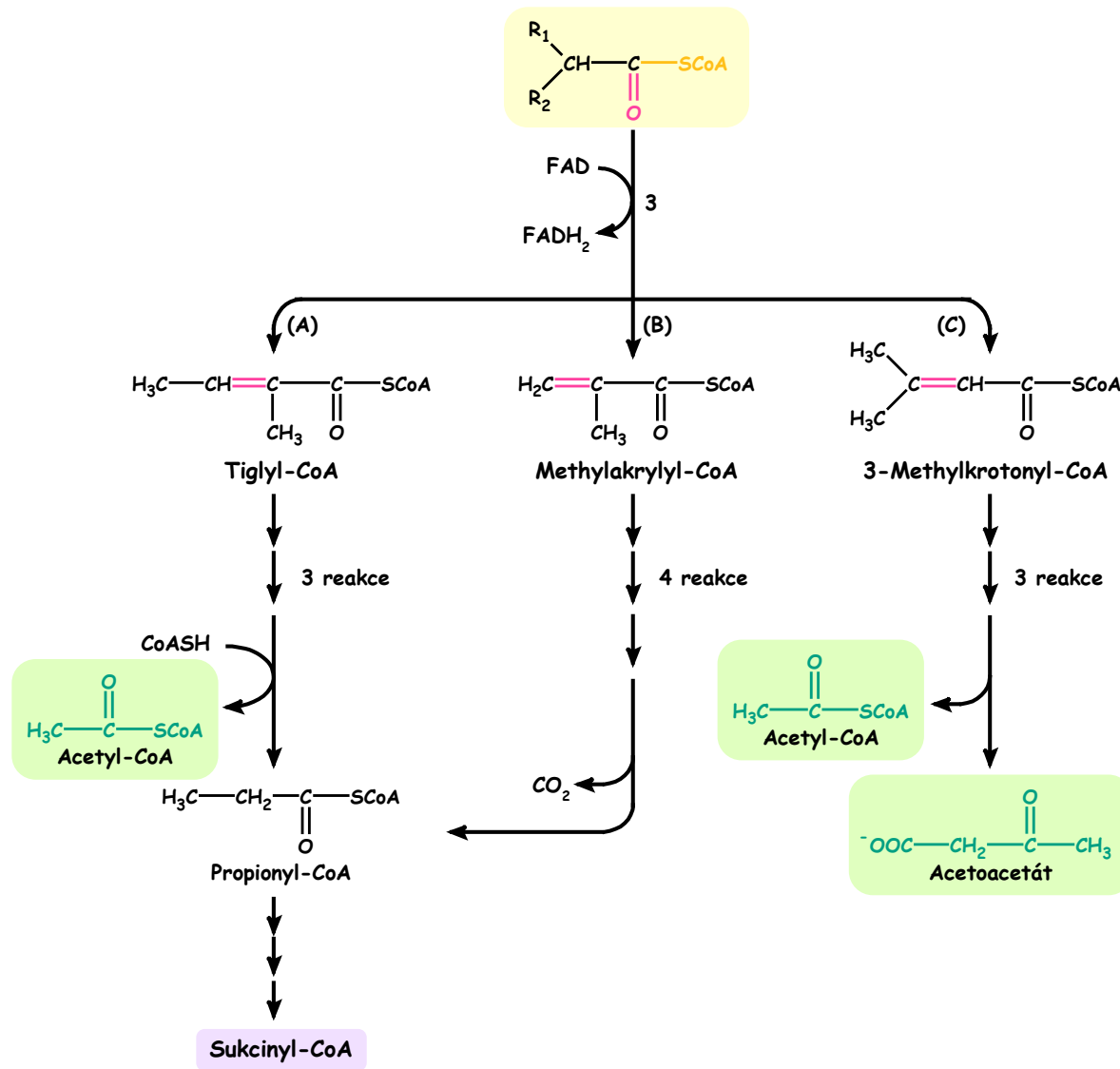


(A) 2-Methylbutyryl-CoA

(B) Isobutyryl-CoA

(C) Isovaleryl-CoA

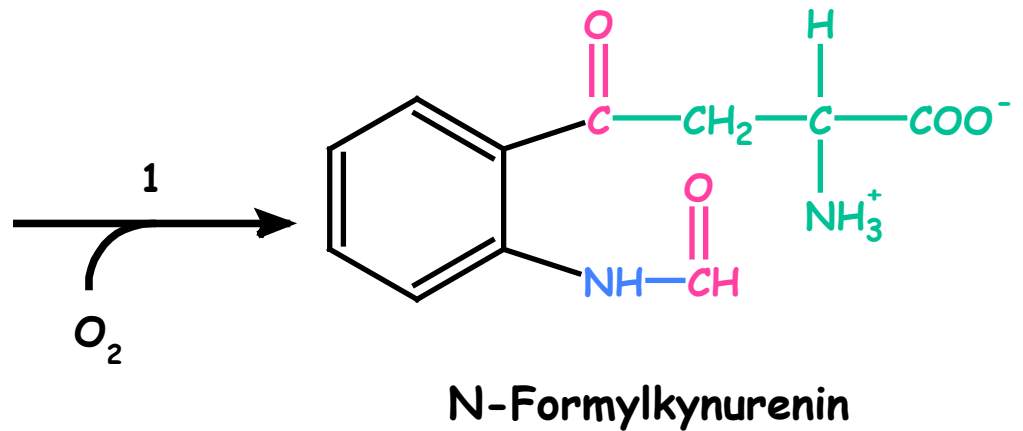
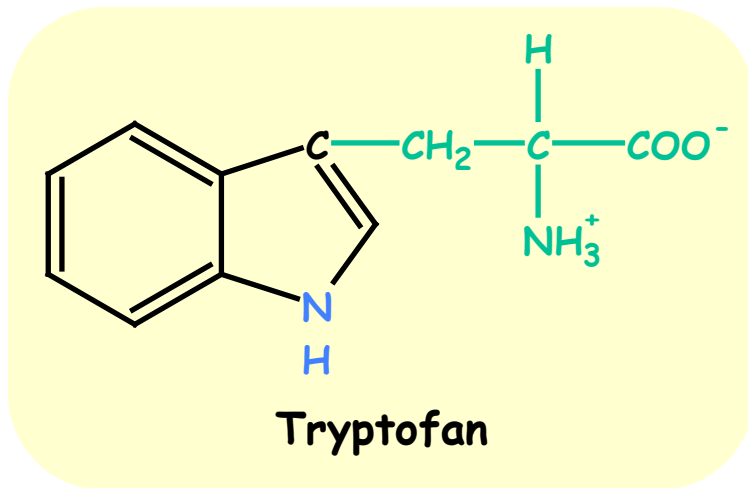
Pokračování odbourávání Ile, Val a Leu



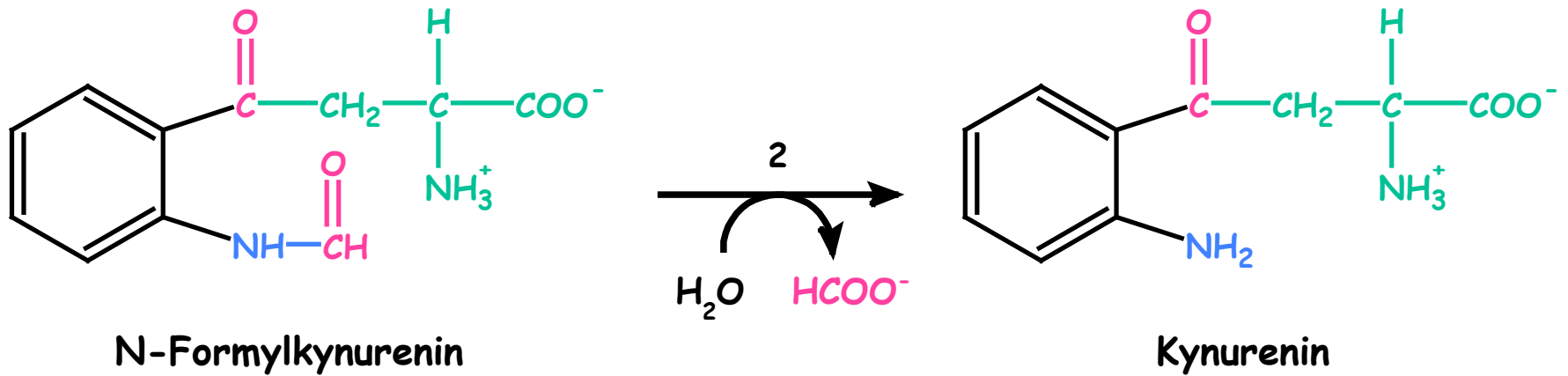
Odbourávání Lys a Trp

- Odbouráváním lysinu v savčích játrech se tvoří acetoacetát a 2 CO_2 přes adukt Lys s α -oxoglutarátem - **sacharopin**.
- Celé odbourávání zahrnuje celkem jedenáct dílčích reakcí.
- Lys a Leu jsou jediné dvě aminokyseliny, které jsou ketogenní.
- **Tryptofan se odbourává na Ala a acetoacetát**. První čtyři reakce jsou katalyzovány kinureninase, jejíž PLP koenzym umožňuje štěpení vazby C_β - C_γ za uvolnění Ala. Zbýlý Trp skelet je převeden v pěti reakcích na α -ketoacidipát, který je také meziproduktem odbourávání Lys. α -Ketoacidipát je štěpen na 2 CO_2 a acetoacetát v sedmi následných reakcích.

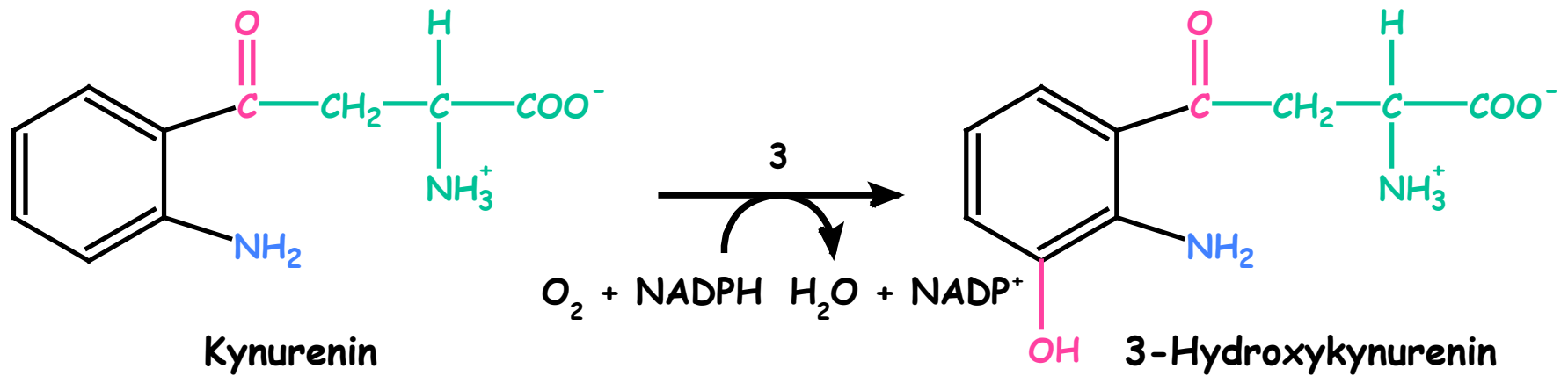
Odbourávání Trp- kinureninasa



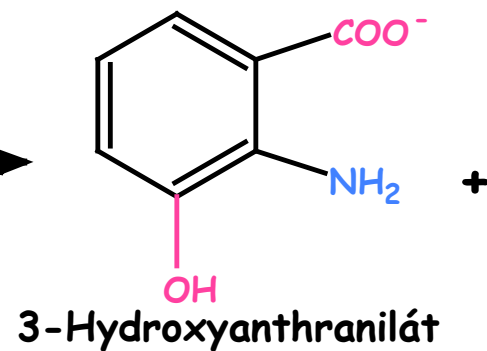
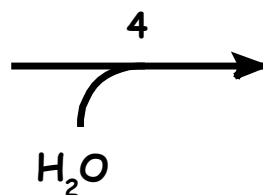
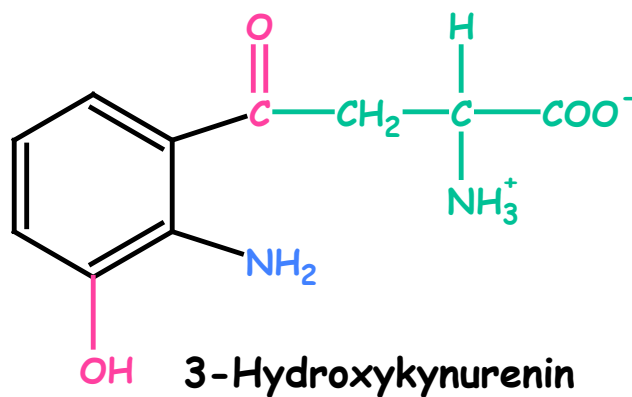
Odbourávání Trp- kinureninasa



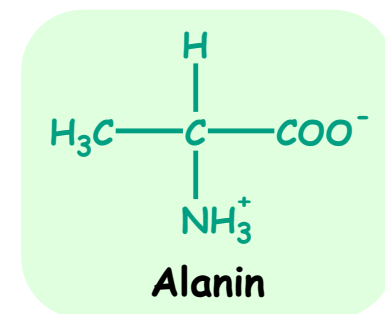
Odbourávání Trp- kinureninasa



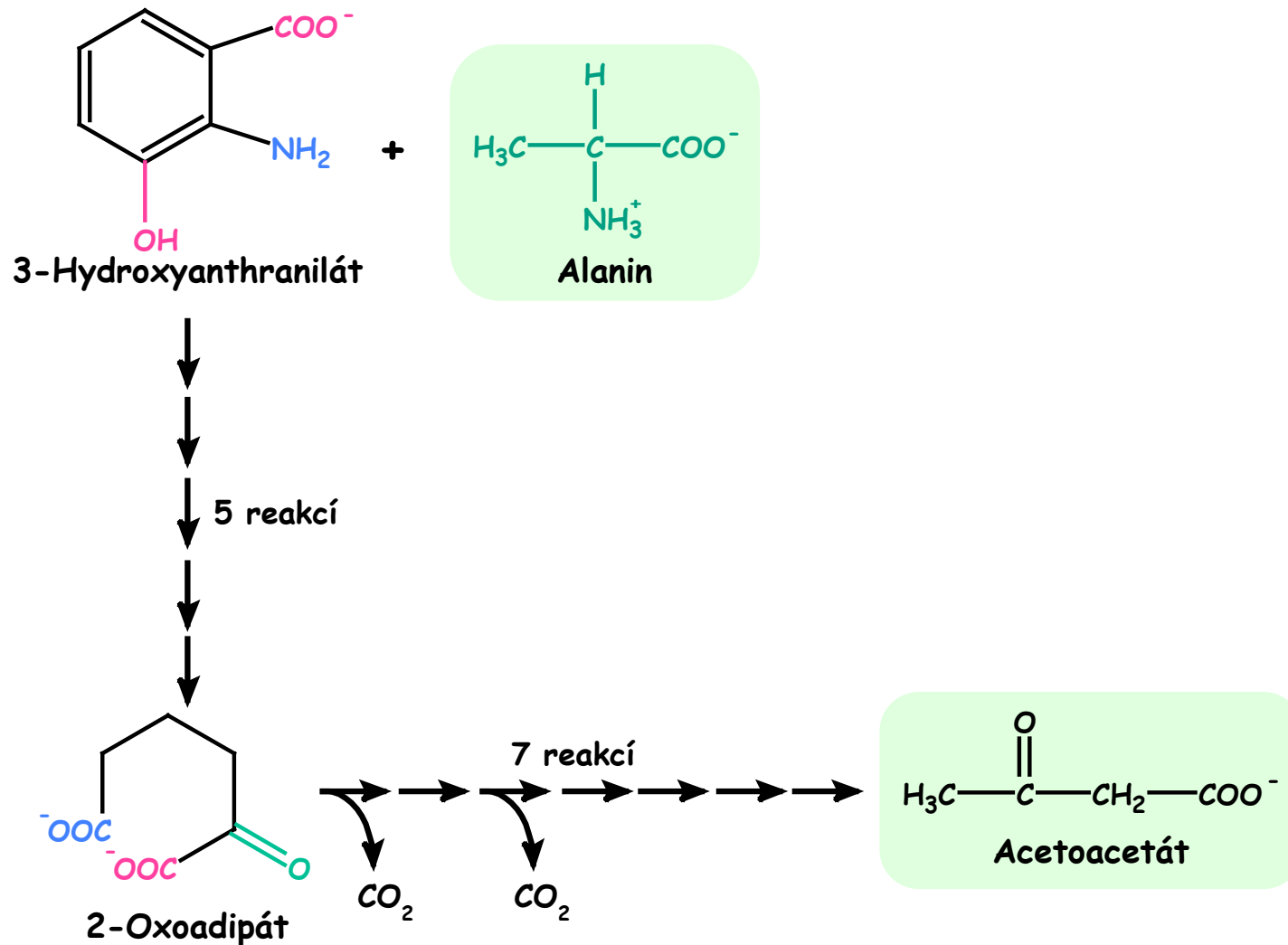
Odbourávání Trp- kinureninasa



+



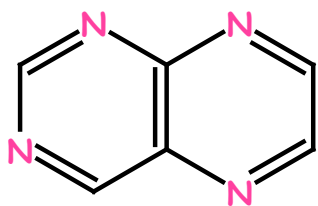
Další reakce odbourávání Trp



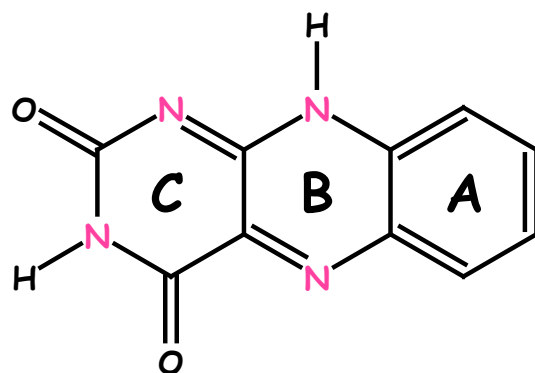
Fenylalanin a tyrosin se odbourávají na fumarát a acetoacetát Keto i glukogenní

- První reakce degradace Phe je hydroxylace fenylalaninu na tyrosin. Poté je dráha degradace společná s Tyr.
- Enzym - **fenylalaninhydroxylasa** (obsahuje Fe^{3+}), kofaktory jsou biopterin a pterin.
- **Pteriny** jsou sloučeniny obsahující pteridinový heterocyklus. Je jistá podobnost mezi pteridinovým kruhem a isoalloxazinovým flavinových koenzymů. Foláty také obsahují pterinový kruh !!
- Pteriny se podílejí na biologických oxidacích. Aktivní formou je plně redukovaný 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, tvořící se redukcí 7,8-dihydropterinu NADPH dihydrofolátreduktasou!

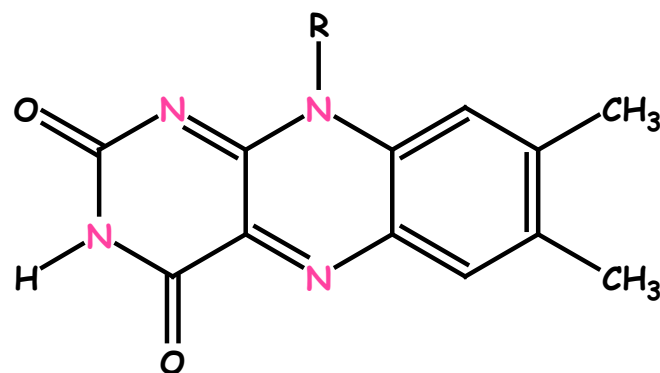
Podobnost mezi pteridiny, isoalloxaziny, biopteriny a foláty



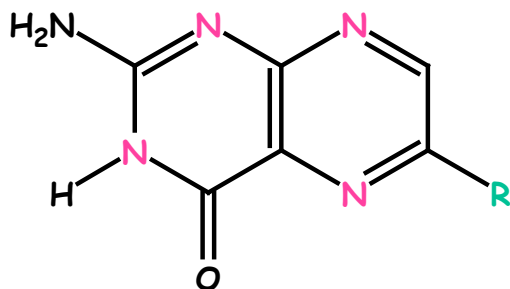
Pteridin



Isoalloxazin



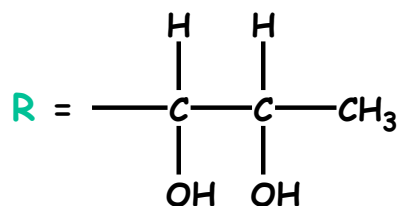
Flavin



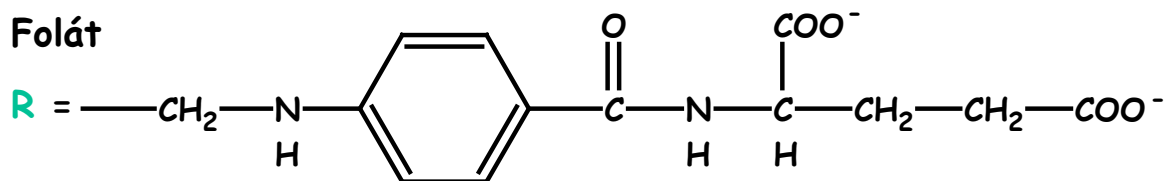
Pterin

(2-amino-4-oxopterin)

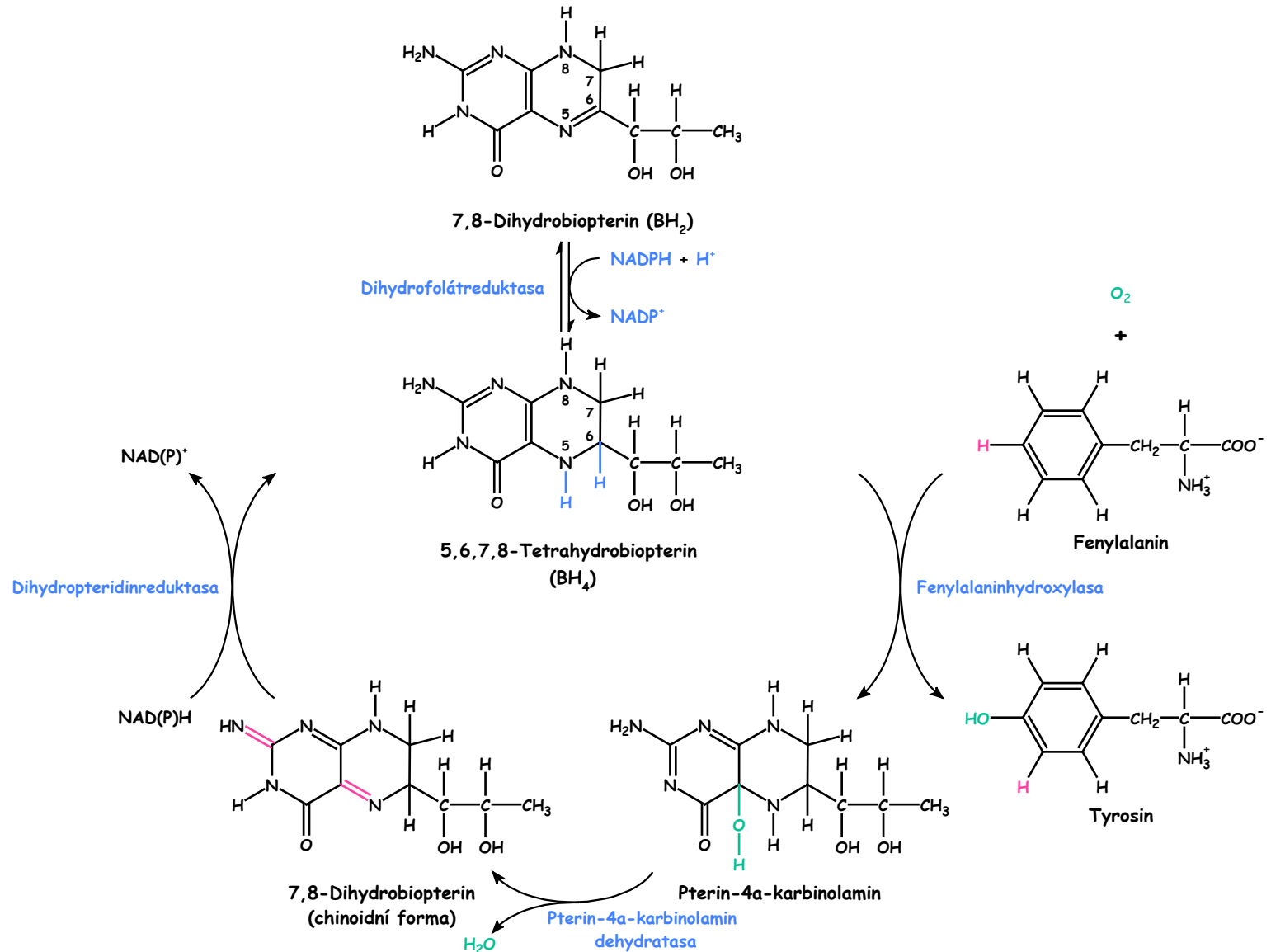
Biopterin



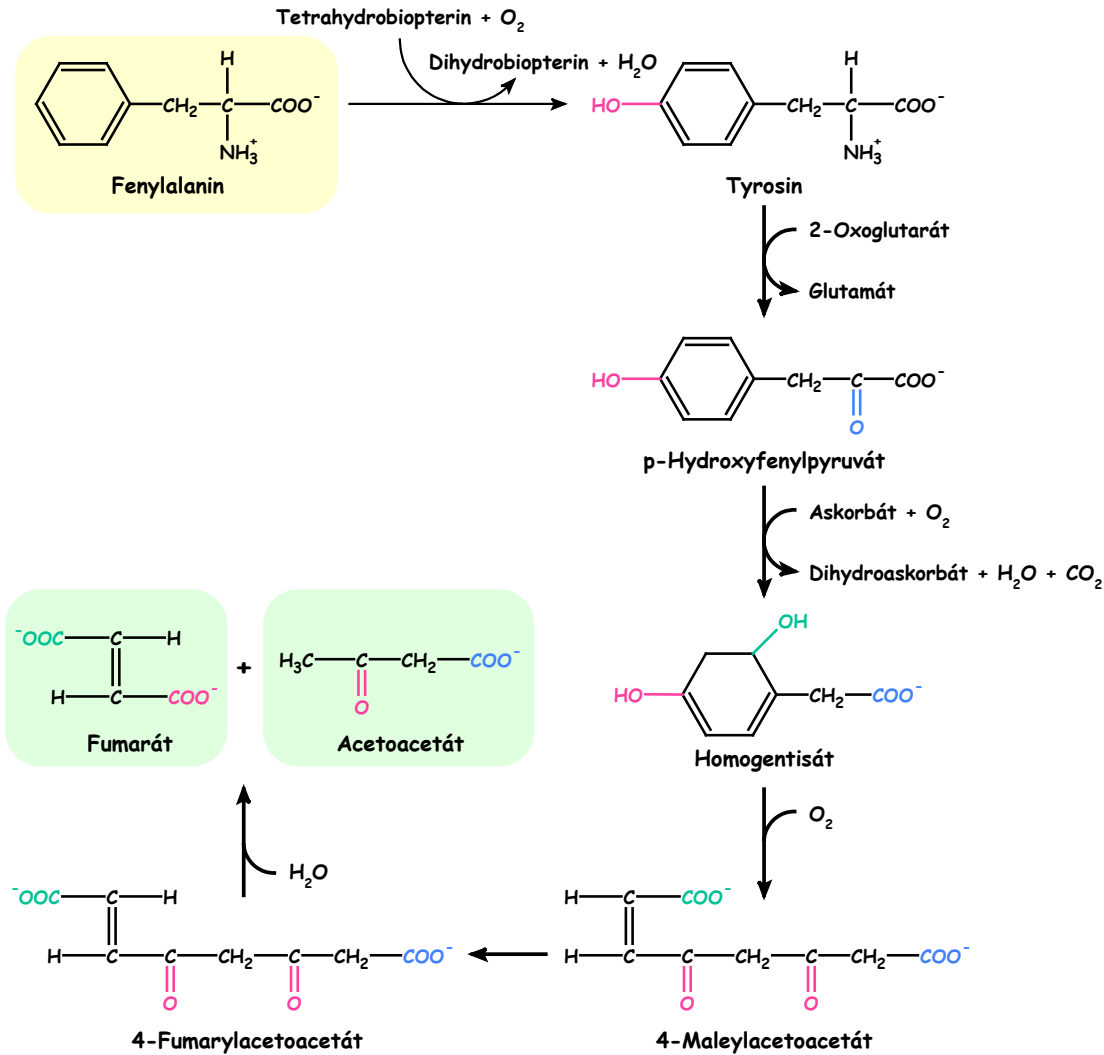
Folát



Tvorba, využití a regenerace 5,6,7,8-tetrahydrofolátu



Odbourávání fenylalaninu (fenylalaninhydroxylasa)

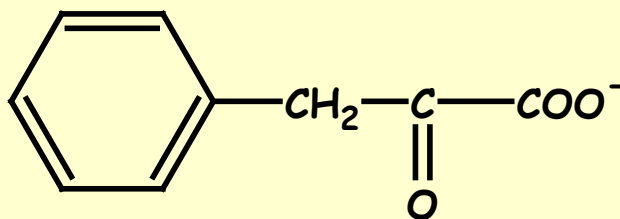


Fenylketonurie a alkaptonurie - poruchy odbourávání Phe

- **Alkaptonurie** se projevuje vylučováním velkého množství homogentisové kyseliny močí, která na vzduchu tmavne. Jedná se deficit **homogentisátdioxygenasy**.
- **Fenylketonurie** - defekt hydroxylace Phe, zvýšená hladina Phe v krvi (hyperfenylalaninemie) a v moči fenylpyruvát jako produkt transaminace Phe.

Pokud není po narození dítěte onemocnění zachyceno, dědičné onemocnění, a neléčeno, dochází k mentální retardaci.

Dieta prostá fenylalaninu. Mimo jiné se nesmí sladit **Aspartamem**, umělé sladidlo (Asp-Phe-methyl ester).



Fenylpyruvát

Biosyntéza aminokyselin

- Mnohé aminokyseliny jsou syntetizovány metabolickými drahami, které jsou přítomné jen u rostlin a mikroorganismů.
- Tyto aminokyseliny jsou nutné pro život savců a - **nazývají se esenciální.**
- Ostatní aminokyseliny, které si savci syntetizují sami se **nazývají neesenciální.**
- Všechny neesenciální aminokyseliny, kromě Tyr, se syntetizují ze společných metabolických meziproductů: pyruvátu, oxaloacetátu, α -oxoglutarátu a 3-fosfoglycerátu.
- **Tyr, který je klasifikován jako neesenciální je syntetizován jednostupňovou hydroxylací z esenciálního Phe. Přítomnost Tyr v potravě snižuje potřebu Phe.**

Esenciální a neesenciální aminokyseliny pro člověka

• Esenciální

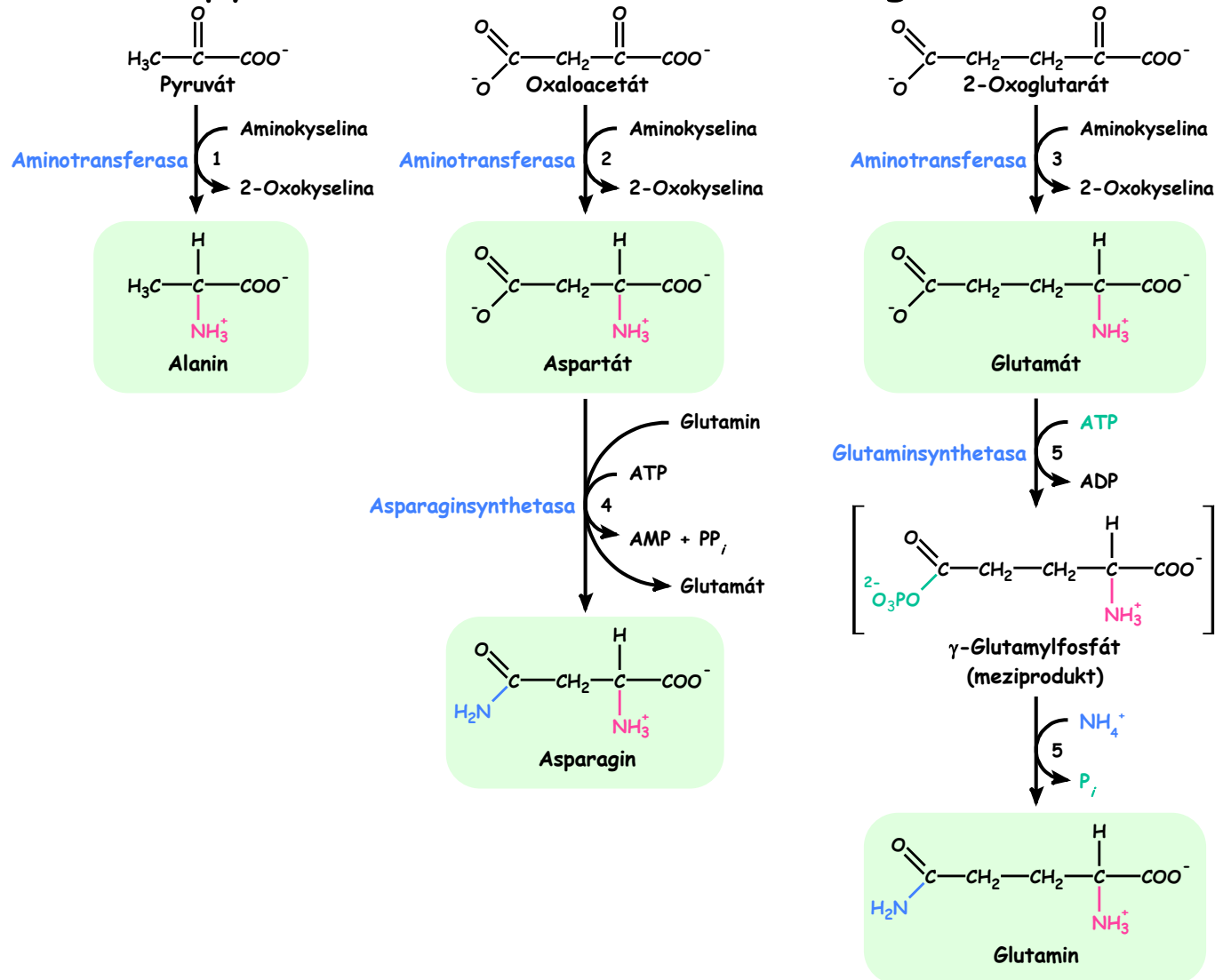
- Arginin^a
- Histidin
- Isoleucin
- Leucin
- Lysin
- Methionin
- Fenylalanin
- Threonin
- Tryptofan
- Valin

• Neesenciální.

- Alanin
- Asparagin
- Aspartát
- Cystein
- Glutamát
- Glutamin
- Glycin
- Prolin
- Serin
- Tyrosin

- ^aSavci syntetizují Arg v močovinovém cyklu, většina se však štěpí na močovinu a ornithin (děti).

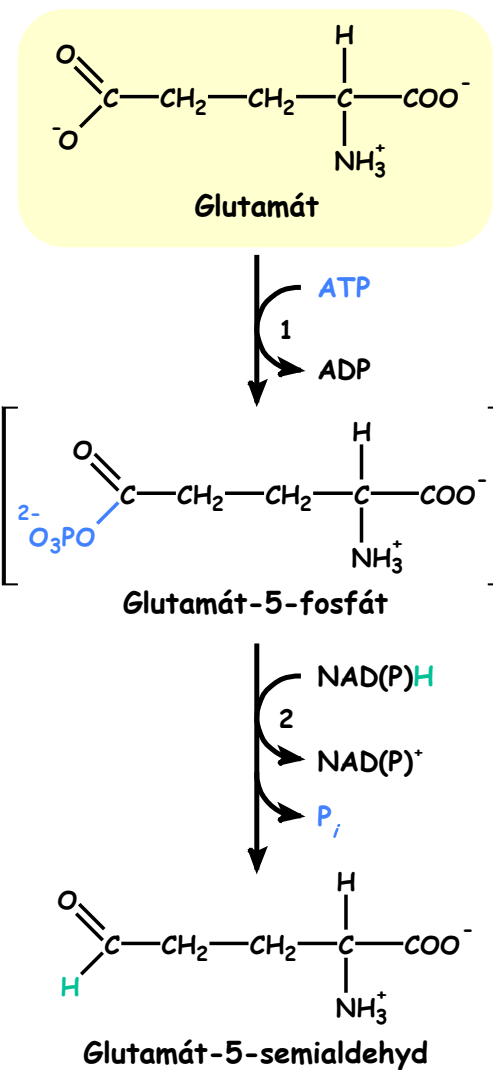
Aminokyseliny Ala, Asp, Asn, Glu, Gln jsou syntetizovány z pyruvátu, oxaloacetátu a α -oxoglutarátu.



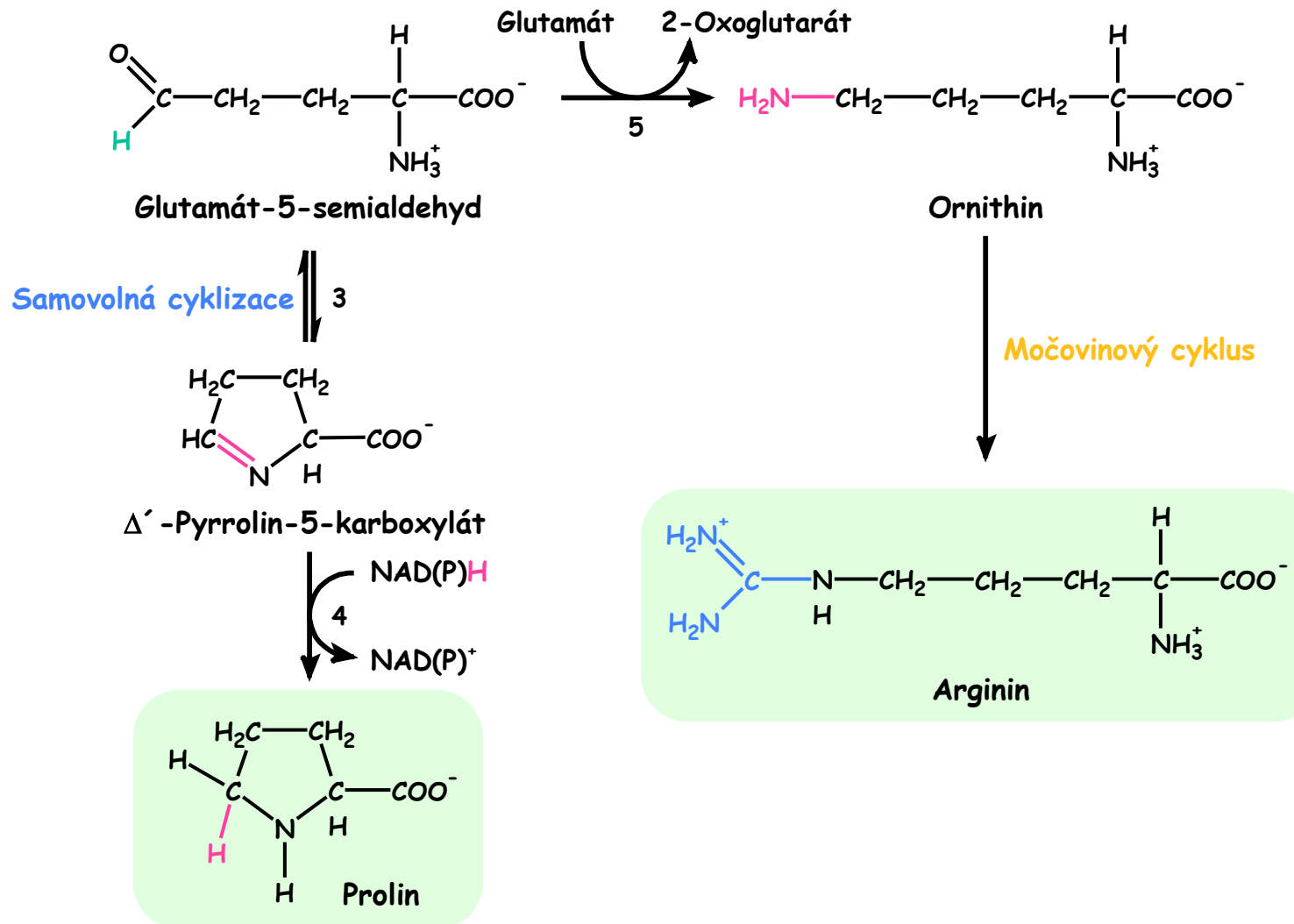
Syntéza Glutaminu a Asparaginu

- Zdrojem α -aminoskupin u těchto transaminačních reakcí je Glu.
- Glu je syntetizován mikroorganismy, rostlinami a nižšími eukaryoty enzymem **glutamátsynthasa, který nemají obratlovci**.
- Asn a Gln jsou syntetizovány z Asp a Glu ATP dependentní amidací.
- Gln je syntetizován za katalýzy **glutaminsyntetasy**. Mezprodukt je γ -glutamylfosfát (aktivovaný Glu). Poté NH_4^+ nahradí fosfát za tvorby Gln.
- Syntézu Asn katalyzuje **asparaginsyntetasa**. Zdrojem aminoskupiny je Gln a ATP se štěpí na AMP + PP_i .
- Glutaminsynthetasa hraje centrální roli v metabolismu dusíku!
- Gln je zdrojem dusíku pro řadu biosyntetických drah.
- **Savčí glutaminsyntetasa je aktivována α -oxoglutarátem. Tato regulace zabraňuje hromadění amoniaku.**

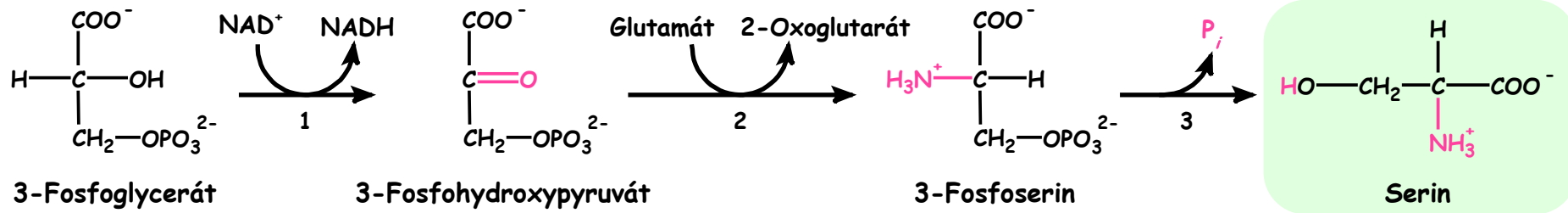
Glutamát je prekurzorem Pro, Orn a Arg



Glu je prekurzorem Pro, Orn a Arg



Prekurzorem Ser je 3-fosfoglycerát



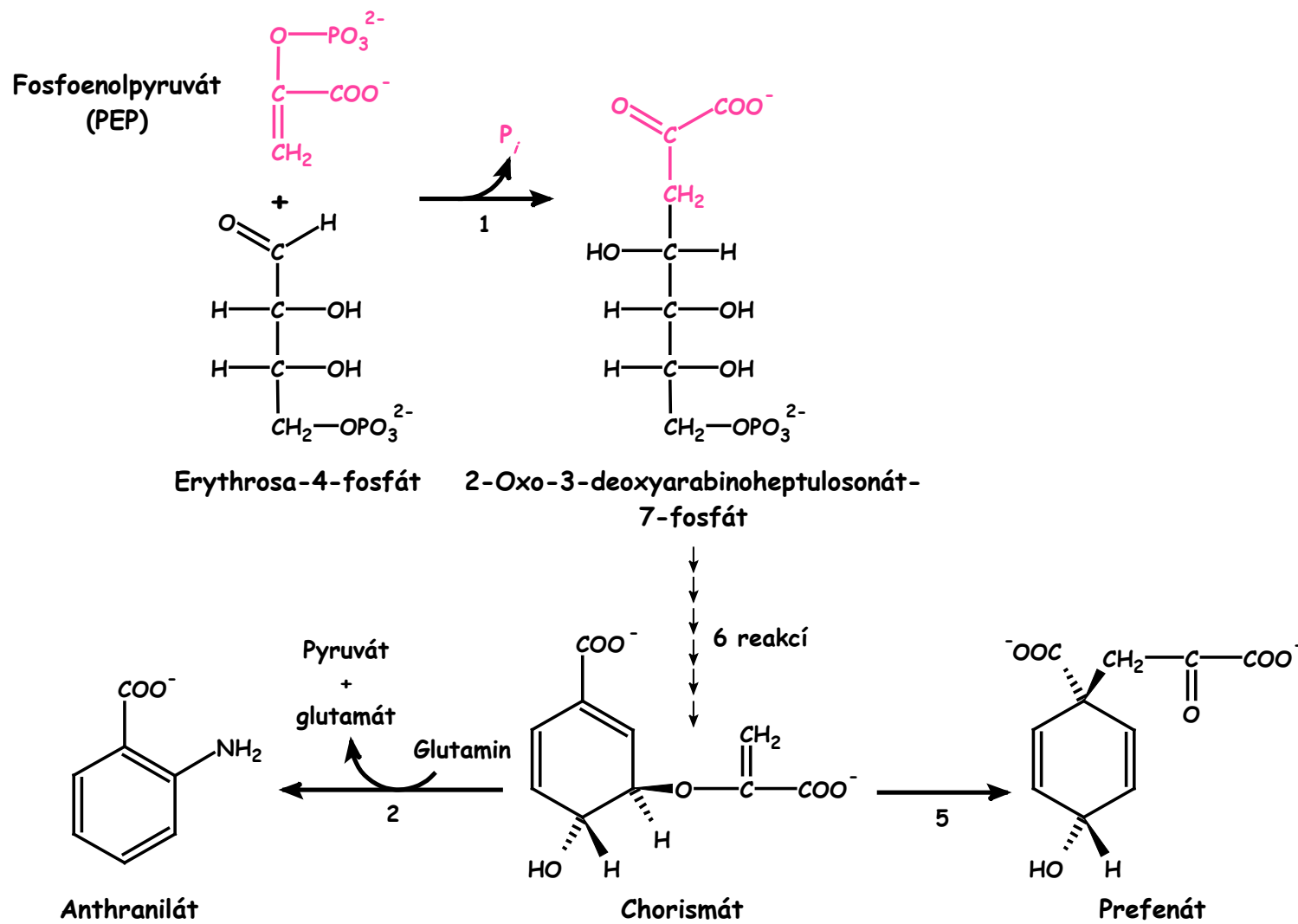
Syntéza Cys a Gly ze Ser (3-fosfoglycerátu)

- V metabolismu živočichů je Cys syntetizován ze Ser a homocysteinu, který je štěpným produktem Met. Kombinací homocysteinu a Ser vznikne cystathionin, který se rozpadá na Cys a α -oxobutyryát.
- Sulfhydrilová skupina Cys má původ v esenciálním Met - náleží Cys také k esenciálním aminokyselinám.
- Ser se podílí také na syntéze Gly.
- Ser se převádí přímo na Gly enzymem hydroxymethyltransferasou v reakce produkující také N^5 , N^{10} -metylen-THF.
- Druhou drahou vedoucí ke Gly je přímá kondenzace N^5 , N^{10} -metylen-THF s CO_2 a NH_4^+ za katalýzy glycinsynthasou.

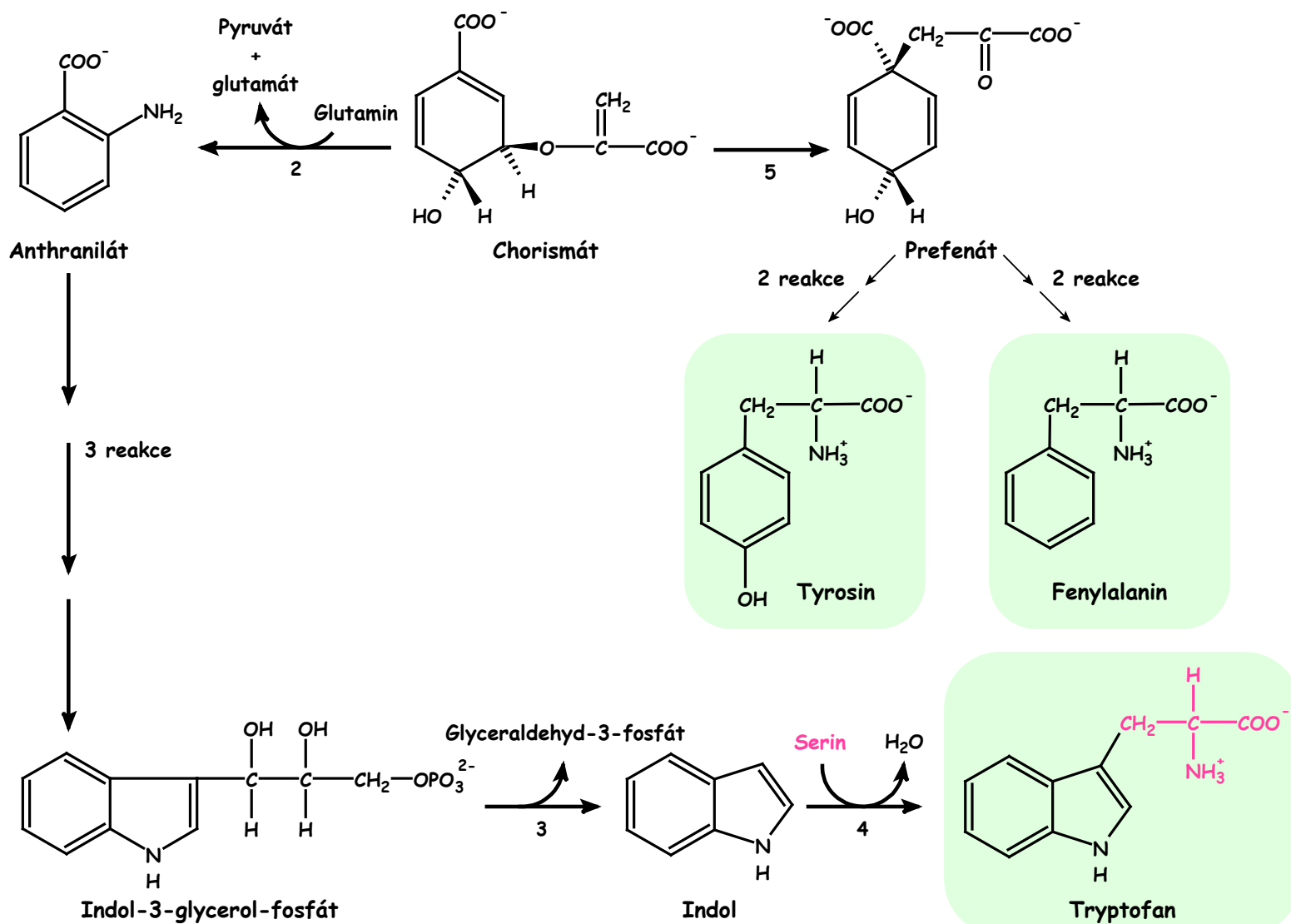
Syntézy esenciálních aminokyselin

- Esenciální aminokyseliny jsou syntetizovány ze stejných prekurzorů jako neesenciální, ale metabolické dráhy jejich syntézy jsou přítomny pouze u mikroorganismů a rostlin.
- Enzymy jejich syntézy u živočichů se ztratily během evoluce, protože aminokyseliny byly dostupné v potravě.
- Skupina aspartátu: Lys, Met a Thr.
- Skupina pyruvátu: Leu, Ile a Val.
- Skupina fosfoenolpyruvátu a erythrosa-4-fosfátu: Phe, Tyr a Trp.
- 5-Fosforibosyl- α -pyrofosfát (PRPP): His.
- Syntézy jsou mnohastupňové. Věnujeme se jen syntéze aromatických aminokyselin v souvislosti se syntézou aromatického benzenového cyklu.

Syntéza Phe, Tyr, a Trp



Syntéza Phe, Tyr a Trp



Syntéza His.

- Pět atomů ze šesti histidinových má původ v 5-fosforibosyl- α -pyrofosfátu.
Stejná látka je základem biosyntézy purinových a pyrimidinových bází nukleových kyselin.
Šestý atom je z ATP. Ostatní atomy z ATP se odštěpí jako 5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid, což je také meziprodukt syntézy purinů.

Tyto souvislosti podporují hypotézu, že život vznikl původně na bázi RNA.

Biosyntéza His je považována, z tohoto hlediska, za fosilii.

Biosyntéza a degradace hemu

- Hem je Fe-obsahující prosthetická skupina, důležitá komponenta mnoha proteinů, jako hemoglobin, myoglobin a cytochromy.
- Počáteční reakce syntézy hemu jsou shodné s tvorbou tetrapyrrolového skeletu chlorofylu u rostlin a bakterií a koenzymu B₁₂ u bakterií.
- **Všechny C a N atomy hemu mají původ v acetátu a Gly.**
- Syntéza probíhá částečně, v mitochondrii a částečně v cytosolu.
- **Prekurzory jsou sukcinyl-CoA a Gly.**
- Dvě hlavní místa syntézy hemu jsou erythroidní buňky (kostní dřeň) syntetizující asi 80 % hemu, játra syntetizující zbytek cca 15% a ostatní buňky 5% .
- V játrech reguluje syntézu hemu **δ-aminolevulinátsythasa**, kterou zpětnovazebně inhibuje hem nebo hemin (Fe³⁺).
- V erythroidních buňkách jsou limitující enzymy ferrochelatas a porfobilinogendeaminasa.

Hem je líčivá složka buněčných hemoproteinů, musí být syntetizován ve všech buňkách

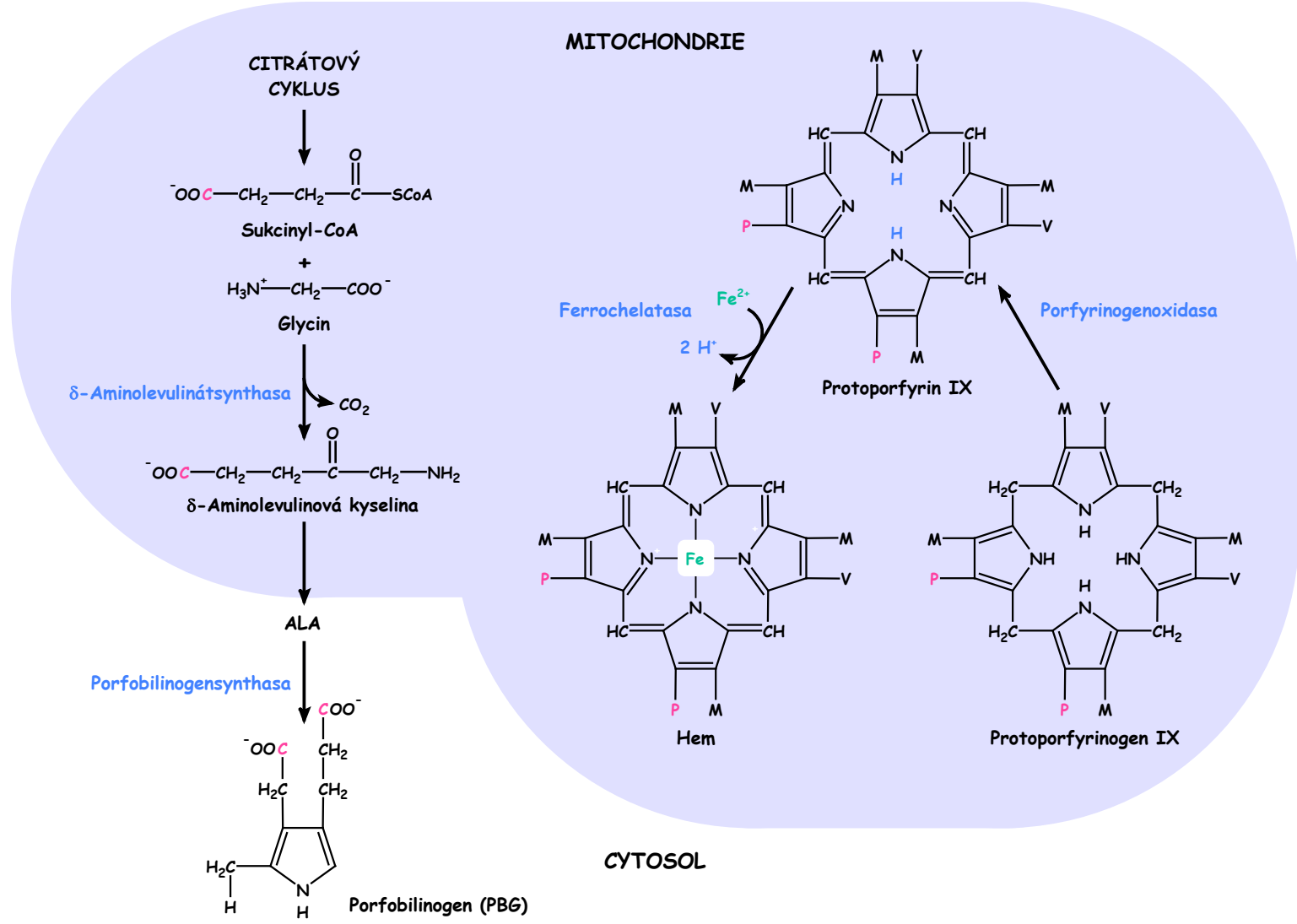
- Úloha a funkce hemu
- • Zachycování O_2 (hem a hemoproteiny)
- • Transport O_2 (hemoglobin)
- • Skladování O_2 (myoglobin)
- • Transport e^- (cytochromy v dýchacím řetězci)
- • Oxido-redukční reakce (cytochrom P450, tryptofanpyrrolasa, hemoxygenasa, guanylátcyklasa atd.)
- • Rozklad a aktivace H_2O_2 (katalasa a peroxidasa)
- • Syntéza NO (nitric oxide synthasa, NOS)
- • Regulace buněčných procesů
- • Efektor apoptosy

Hlavní místa biosyntézy hemu

- **a) Kostní dřeň** (~70 - 80 %) → biosyntéza hemoglobinu
- **b) Játra** (~15 %) → biosyntéza enzymů rodiny cytochromů P450 (hemoxygenasa, tryptofanpyrrolasa, prostaglandinendoperoxidsynthasa, indolamin-2,3-dioxygenasa) i dalších buněčných hemoproteinů (katalasa, peroxidasa a guanylátcyklasa)
- **c) ostatní somatické buňky** (zbytek ~5 %)

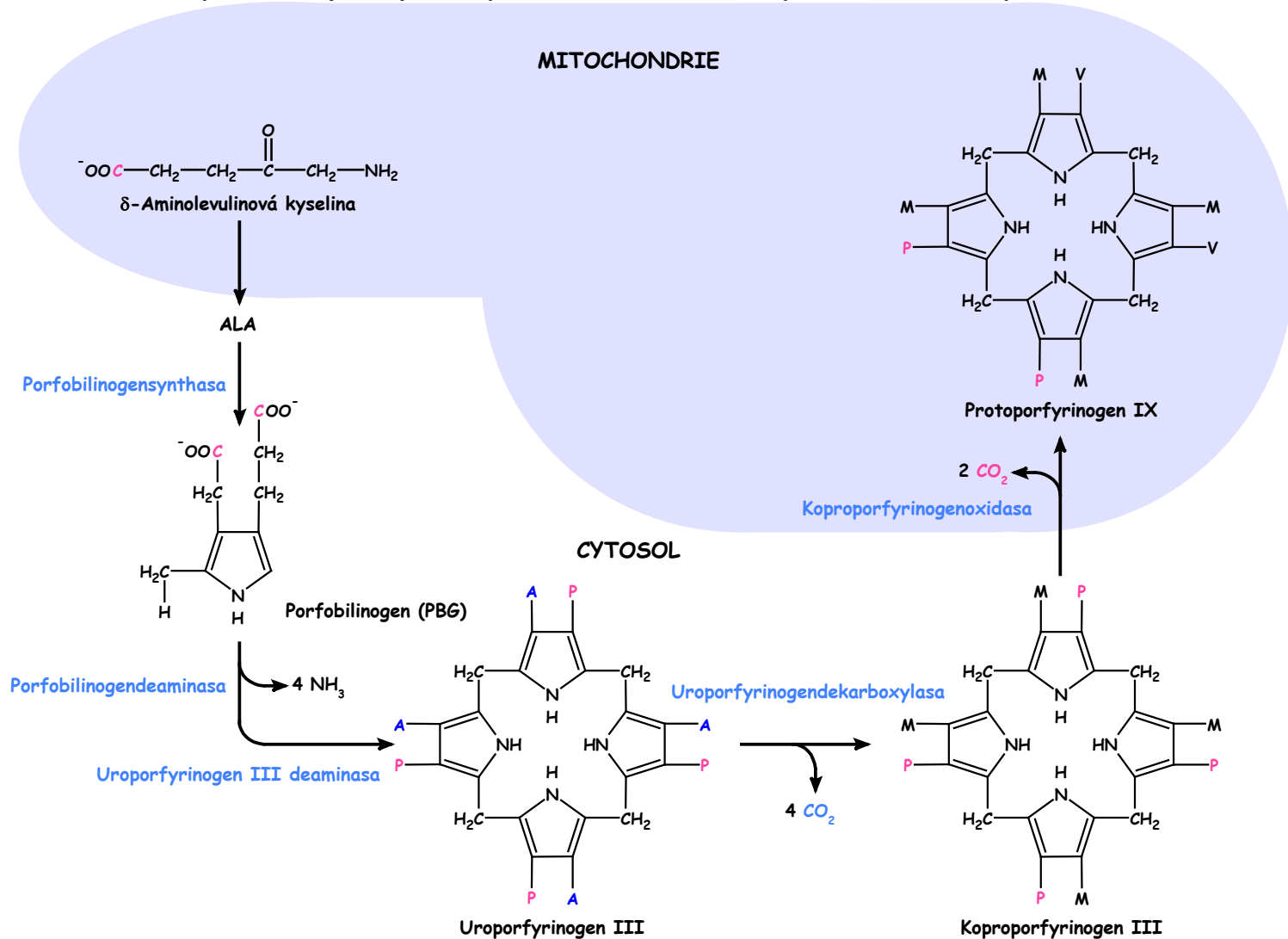
Tvorba δ -aminolevulinátu a porfobilinogenu

A=acetyl, P=propionyl, M = methyl a V=vinyl(-CH=CH₂)



Část syntézy hemu lokalizovaná v cytosolu.

A=acetyl, P=propionyl, M = methyl a V=vinyl(-CH=CH₂)



DEGRADACE HEMOGLOBINU

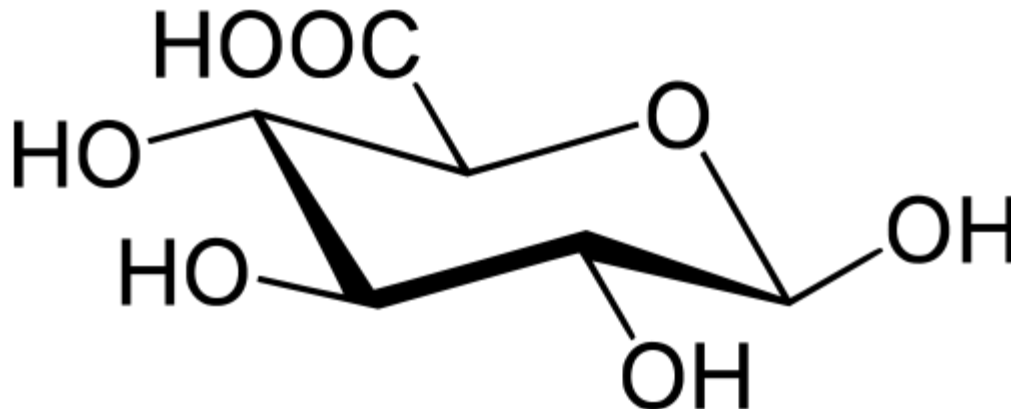
- Střední doba života erythrocytu (ery) je 120 dní.
- 5 - 8 mmol HEM/kg \approx 6 - 7 g Hb/24 hod. \approx 350 - 400 mmol bilirub./24 hod.
- 1 g Hb \approx 35 mg bilirubinu
- Rozpad erythrocytů v RES = 1 - 2 x 10⁸ ery/1 hod. →
- cca 6 - 7 g Hb/den → RES:
 - - slezina
 - - kostní dřeň
 - - Kupferovy buňky (buňky tvořící součást jaterních sinusů. Mají charakter tkáňových makrofágů)
 - - rozptýlené buňky **RES** (**r**etikulo**e**ndotheliální **s**ystém)
Makrofágová buňka = buňka usazená v tkáni, specializovaná na pohlcování cizorodých částic, např. odumřelých buněk

Normální hladiny Hb

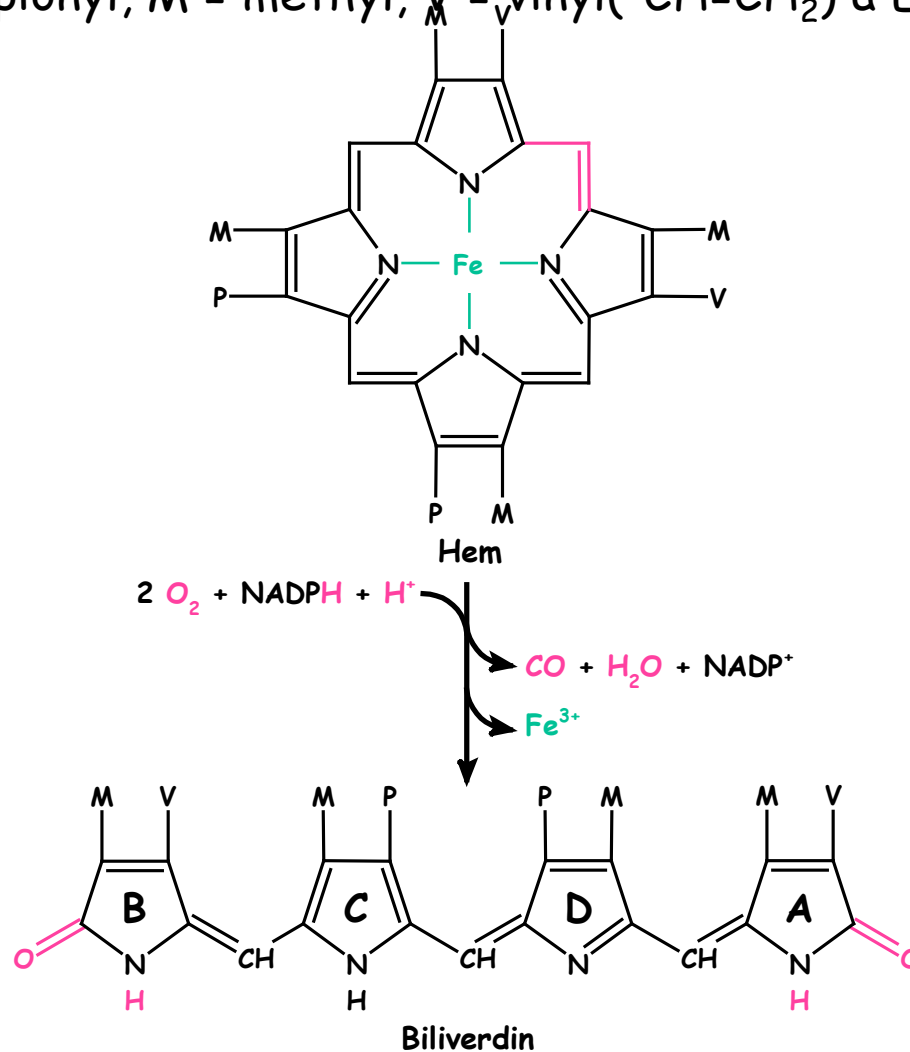
- Ženy: 12,1 až 15,1 g / dl
 - Muži: 13,8 až 17,2 g / dl
 - Děti: 11 až 16 g / dl
 - Těhotné ženy: 11 až 12 g / dl
-
- Cholesterol: 5 mM/L, triglyceridy: 2 mM/L
 - Zvýšená hladina LDL cholesterolu (nad 3 mmol/l) způsobuje usazování nadbytečného cholesterolu v cévních stěnách, kde tvoří sklerotické pláty.
 - HDL - „hodný cholesterol“ -vyšší hodnoty ++

DEGRADACE HEMOGLOBINU

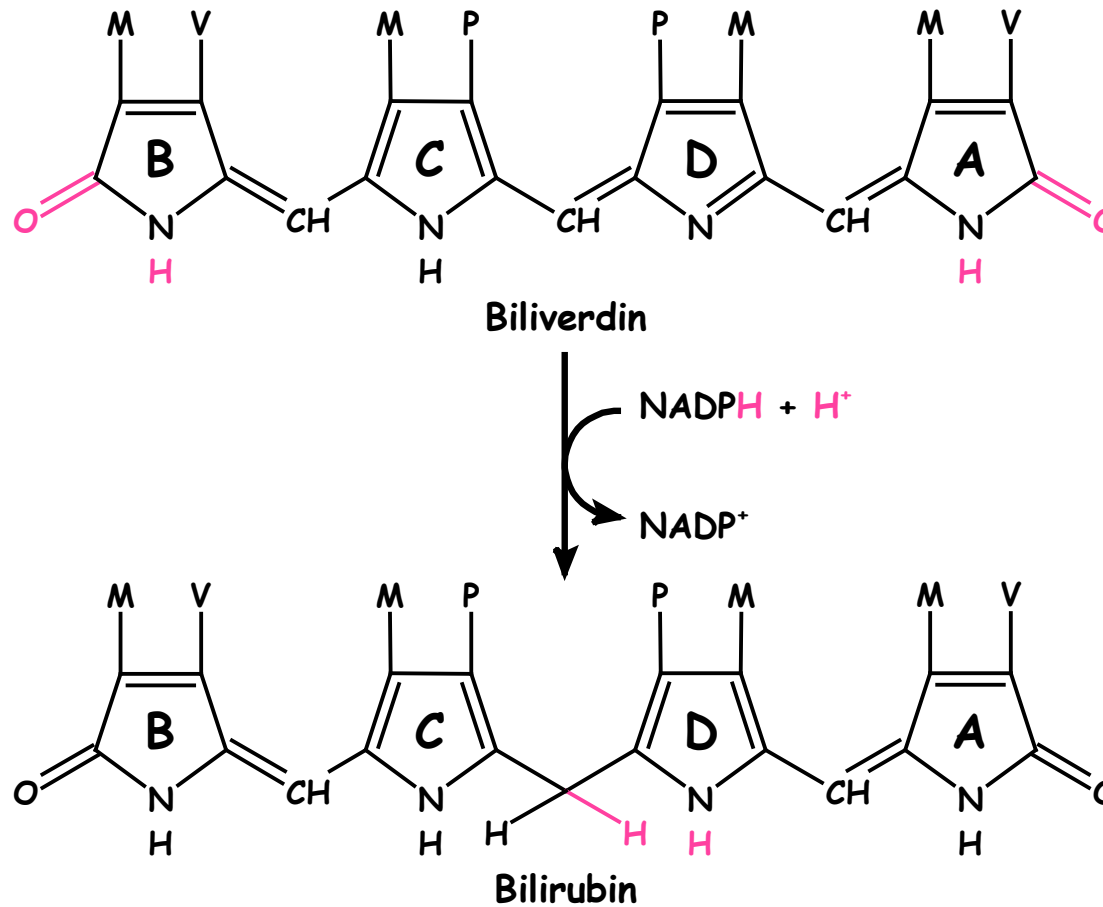
- Větší část bilirubinu se slučuje s kyselinou glukuronovou na bilirubinglukuronid (konjugovaný bilirubin) a odchází žlučovody do žluči. Spolu s ní je pak transportován do dvanáctníku.
- Redukčními procesy (střevní bakteriální flóra) se mění na urobilinoidy (sterkobilin, urobilin), které způsobují typické zbarvení moče a stolice.
- **Kyselina glukuronová, nebo také glukuronát**, zkratka GlcA nebo GlcUA je derivátem glukosy, u které je šestý uhlík oxidován na karboxylovou skupinu. Je jednou ze tří možných karboxylových kyselin odvozených z D-glukosy (spolu s kyselinou glukonovou a glukarovou), se kterými občas bývá zaměňována.



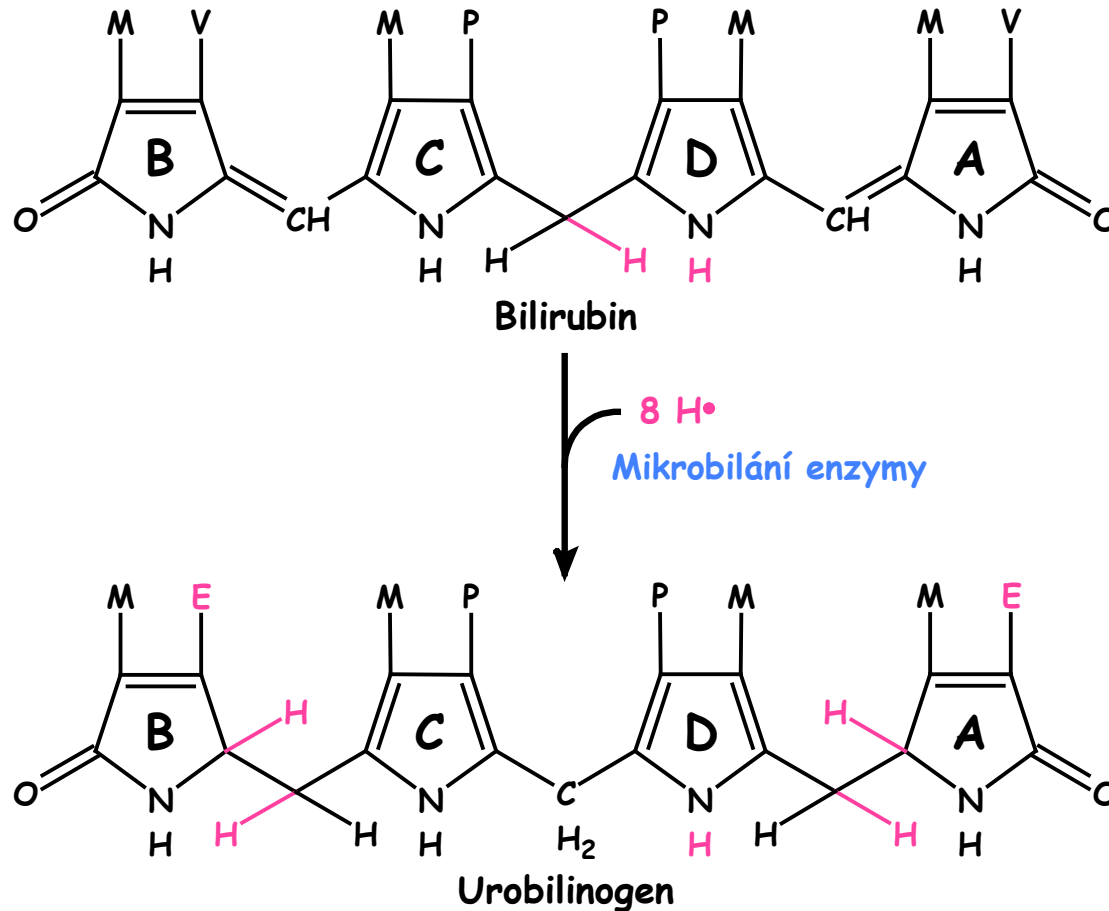
Degradace hemu. První produkt: verdoglobin - obsahuje ještě globin a Fe^{2+} , porfyrinový kruh je otevřen
 Biliverdin - zelený lineární tetrapyrrol.
 (P = propionyl, M = methyl, V = vinyl(-CH=CH₂) a E = ethyl).



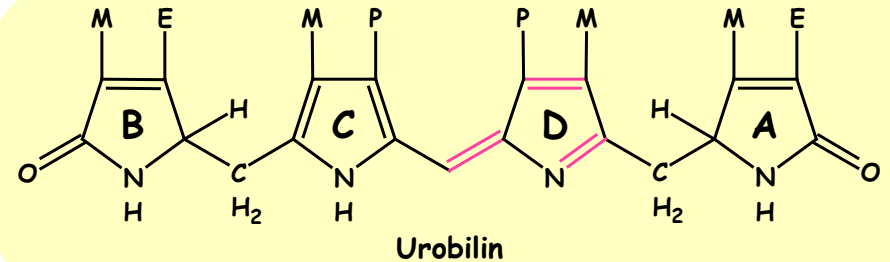
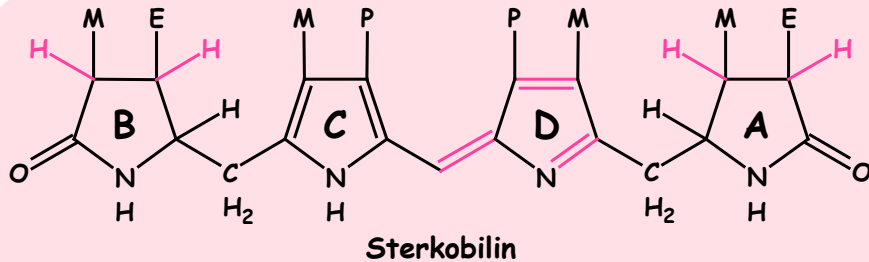
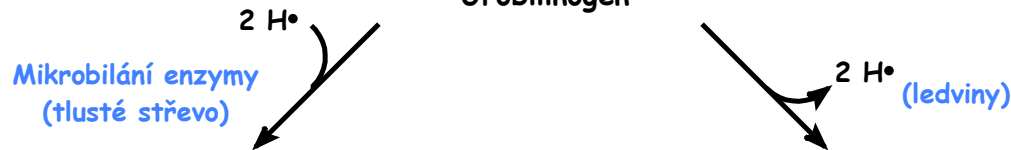
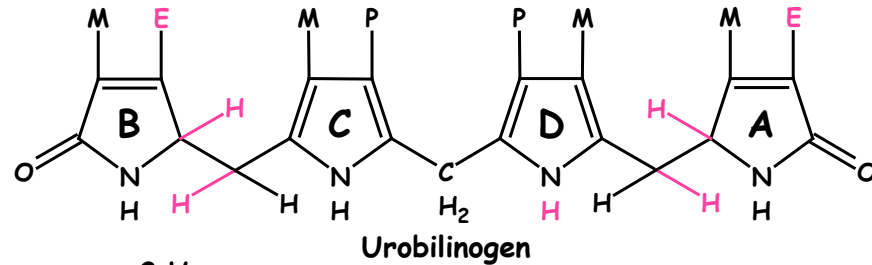
Bilirubin (červeno-oranžový)



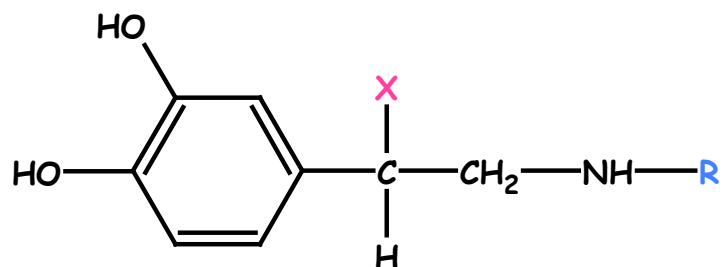
Vysoce lipofilní bilirubin je transportován krví v komplexu se sérovým albuminem. Ve střevech je mikrobiálně degradován na urobilinogen.



Sterkobilin je barvivo výkalů a urobilin moči.



Biosyntéza fyziologicky významných aminů



Adrenalin (epinefrin):

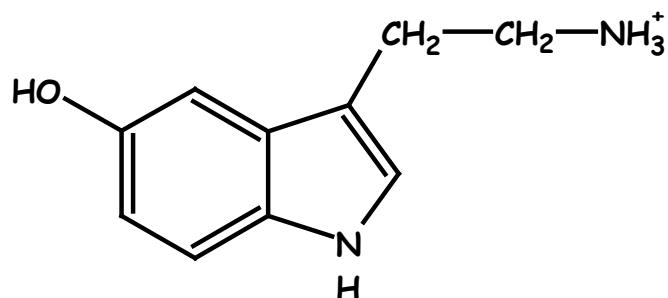
X = -OH, R = -CH₃

Noradrenalin (norepinefrin):

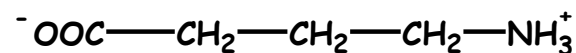
X = -OH, R = -H

Dapamin:

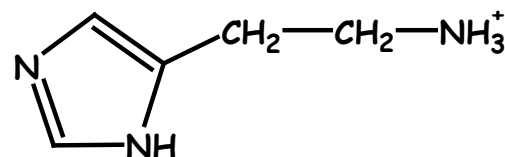
X = -H, R = -H



Serotonin
(5-hydroxytryptamin)

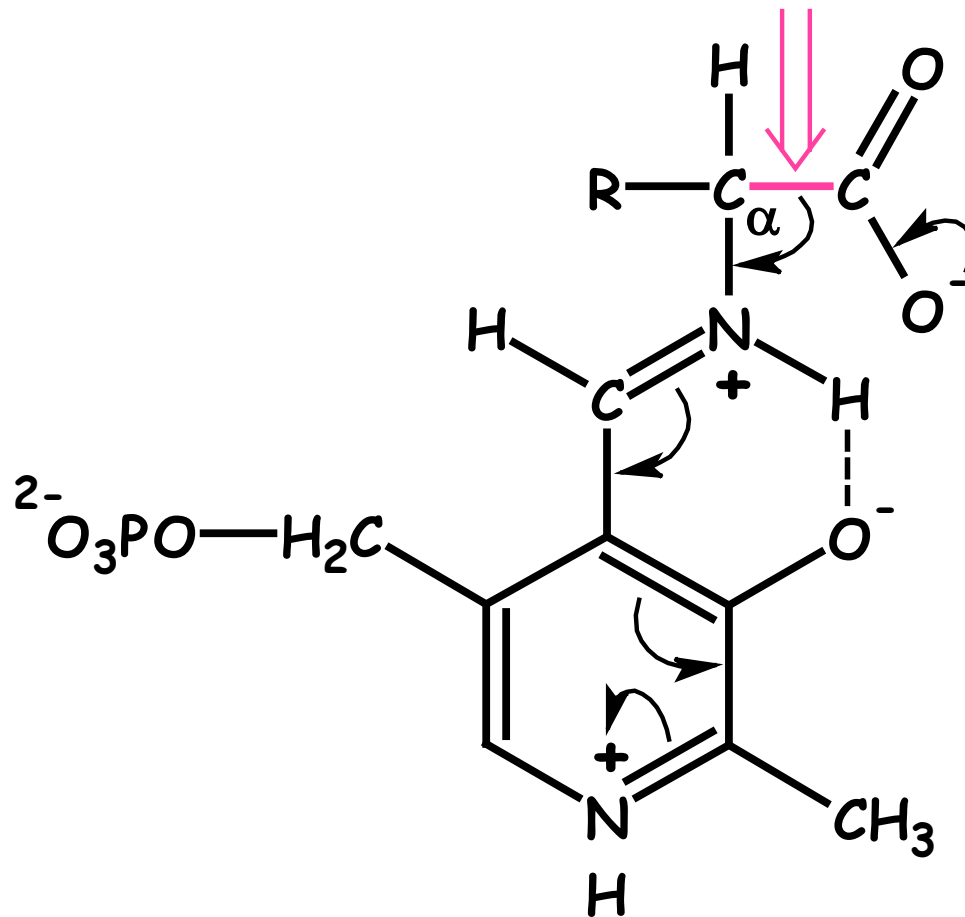


γ-Aminomáselná kyselina (GABA)



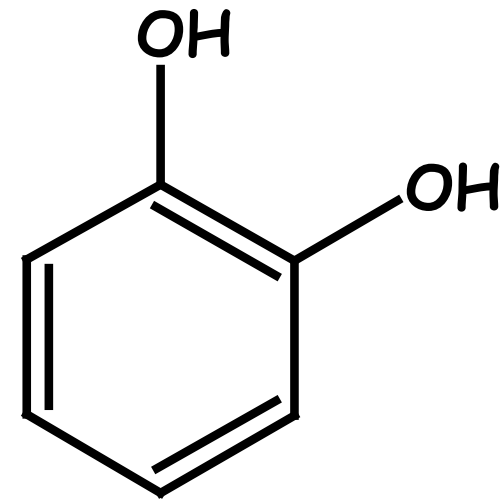
Histamin

Biosyntéza těchto aminů zahrnuje dekarboxylaci příslušné aminokyseliny.
Decarboxylasy aminokyselin mají jako koenzym PLP.



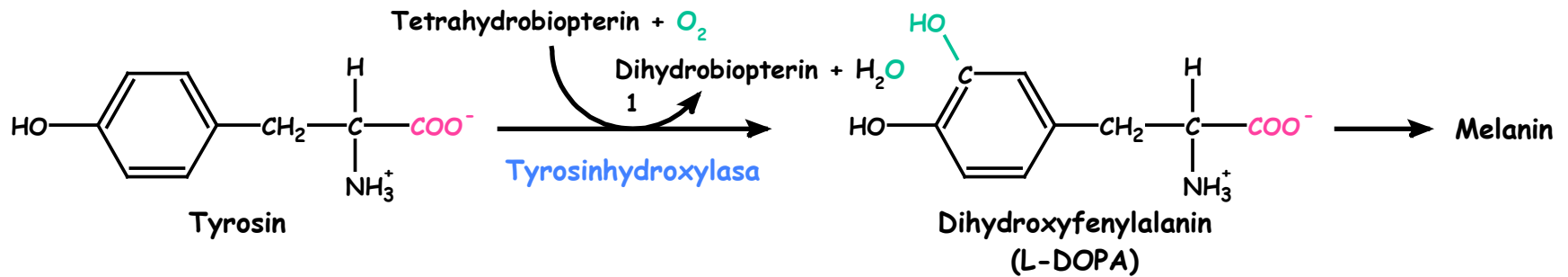
Katecholaminy. Dopamin, noradrenalin, adrenalin

- Katecholaminy jsou syntetizovány z Tyr hydroxylací za tvorby dihydroxyfenylalaninu
- (L-DOPA)-prekurzor melaninu.
- L-DOPA je dekarboxylován na dopamin.
- Další hydroxylace vede k noradrenalinu.
- Posledním stupněm je methylace aminoskupiny noradrenalinu
- S-adenosylmethioninem (SAM) za vzniku adrenalinu.

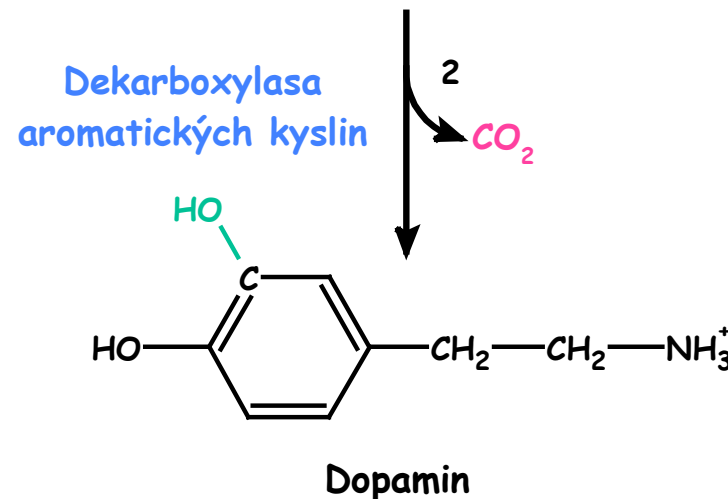
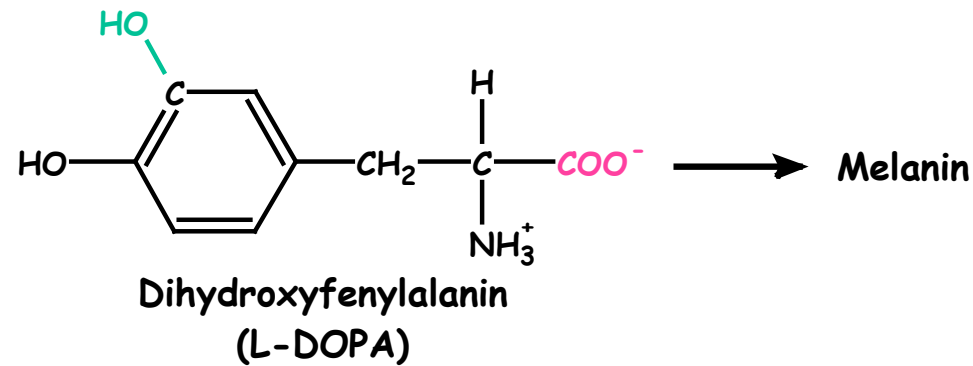


Katechol

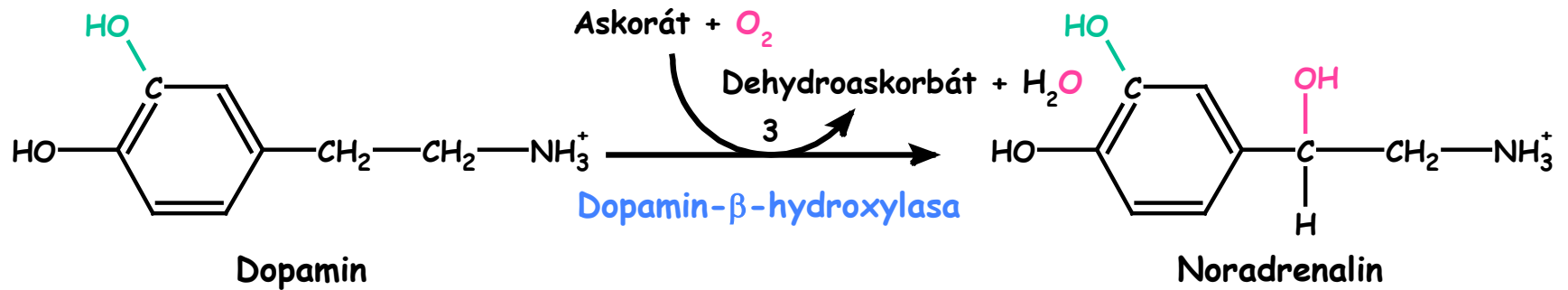
Syntéza L-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA)



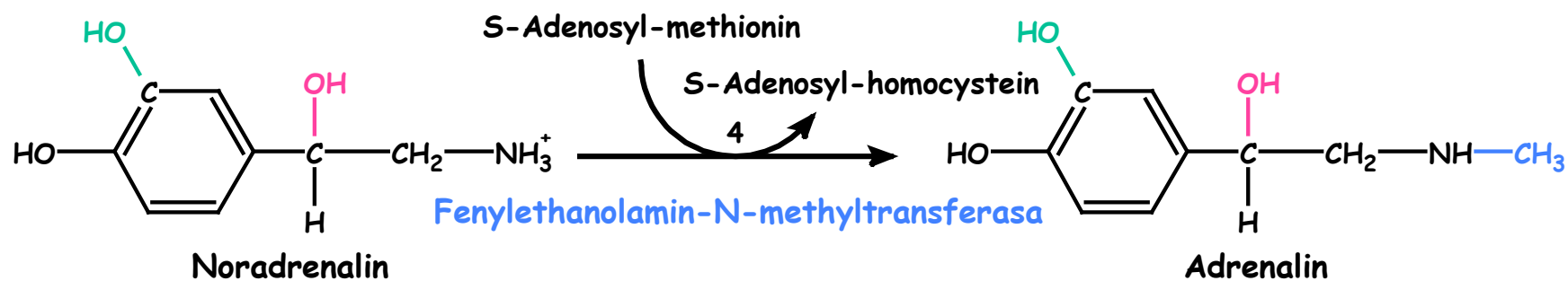
Syntéza dopaminu. L-DOPA je prekurzor kožního pigmentu melaninu.



Převedení dopaminu na noradrenalin

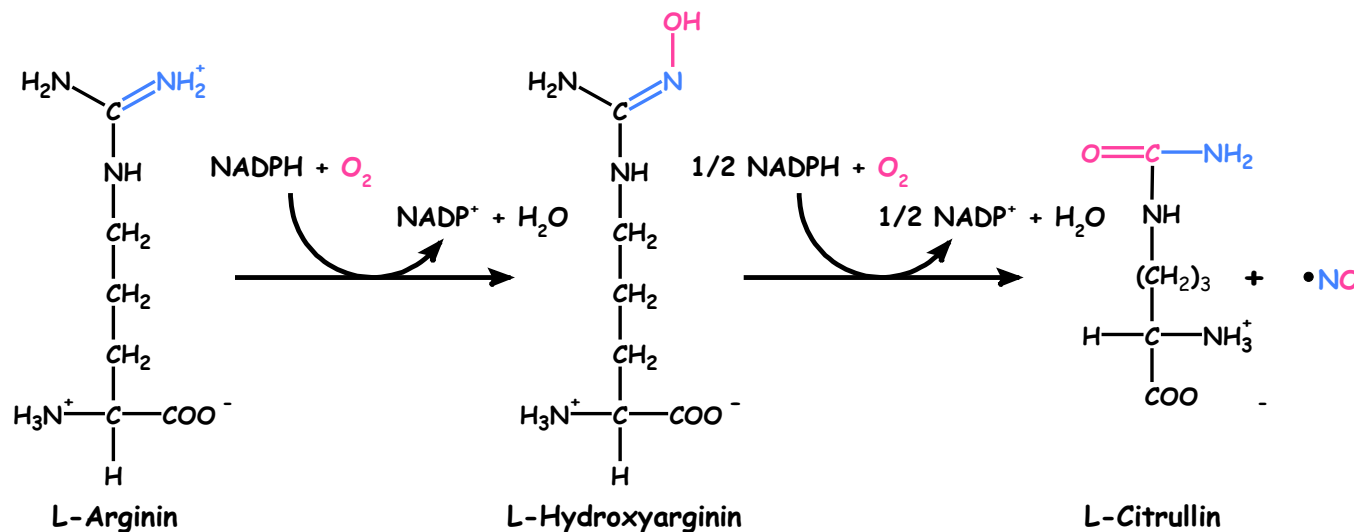


Metylace noradrenalinu - adrenalin



Oxid dusnatý - NO

- Arginin je prekurzorem původně nazvaného „v endotheliu utvořený relaxační faktor“ (endothelium-derived relaxing factor EDRF). Způsobuje relaxaci hladkého svalstva.
- Tímto faktorem je oxid dusnatý NO. Oxid dusnatý funguje jako signální molekula a je důležitý pro centrální nervový systém. Reakcí se superoxidovým radikálem vytváří vysoce reaktivní hydroxylový radikál působící antibakteriálně.
- Enzymem tvorby NO je NO-synthasa (NOS).



Fixace dusíku

- Nejdůležitějšími prvky živých systémů jsou O, H, C, N a P.
- Prvky O, H a P jsou snadno dostupné v metabolicky vhodných formách (H_2O , O_2 a P_i). Hlavní formy C a N, CO_2 a N_2 , jsou extrémně stabilní (nereaktivní). Vazebná energie trojné vazby dusíku je $945 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (např. ve srovnání s vazbou C - O, $351 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).
- Oxid uhličitý je, kromě několika výjimek, metabolizován (fixován) fotosyntetickými organismy.
- Dusík je metabolizován (převeden na metabolicky využitelné formy) jen několika kmeny bakterií zvaných **diazotrofy**.
- Mezi diazotrofy patří některé mořské cyanobakterie a bakterie kolonizující kořenové hlízy bobovitých rostlin jako jsou hrách, fazol, jetel a vojtěška.
- Převedení dusíku a vodíku na NH_3 je termodynamicky schůdné, ale kineticky problematické, protože meziprodukty jsou nestabilní.

Fixace dusíku

- Množství dusíku fixovaného diazotrofními (dusík fixujícími) mikroorganismy je asi 10^{11} kg za rok. Je to asi 60% na Zemi nově fixovaného dusíku.
- Světlo a UV záření fixuje dalších 15% a zbylých 25% je fixováno průmyslově.
- Průmyslová produkce amoniaku metodou Haber-Bosch (1910). Směs obou plynů v autoklávech za katalýzy sloučenin Fe, tlaku 300 atm a teploty 500°C .
- Principiálně je třeba na redukci N_2 na NH_3 šest elektronů.
- Biologická reakce produkuje navíc 1 mol H_2 při produkci 2 molů NH_3 a proto jsou třeba další dva elektrony:
 - $\text{N}_2 + 8 e^- + 8 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2$

Nitrogenasová reakce.

- Diazotrofy obsahují enzym **nitrogenasu**, která katalyzuje reakci:

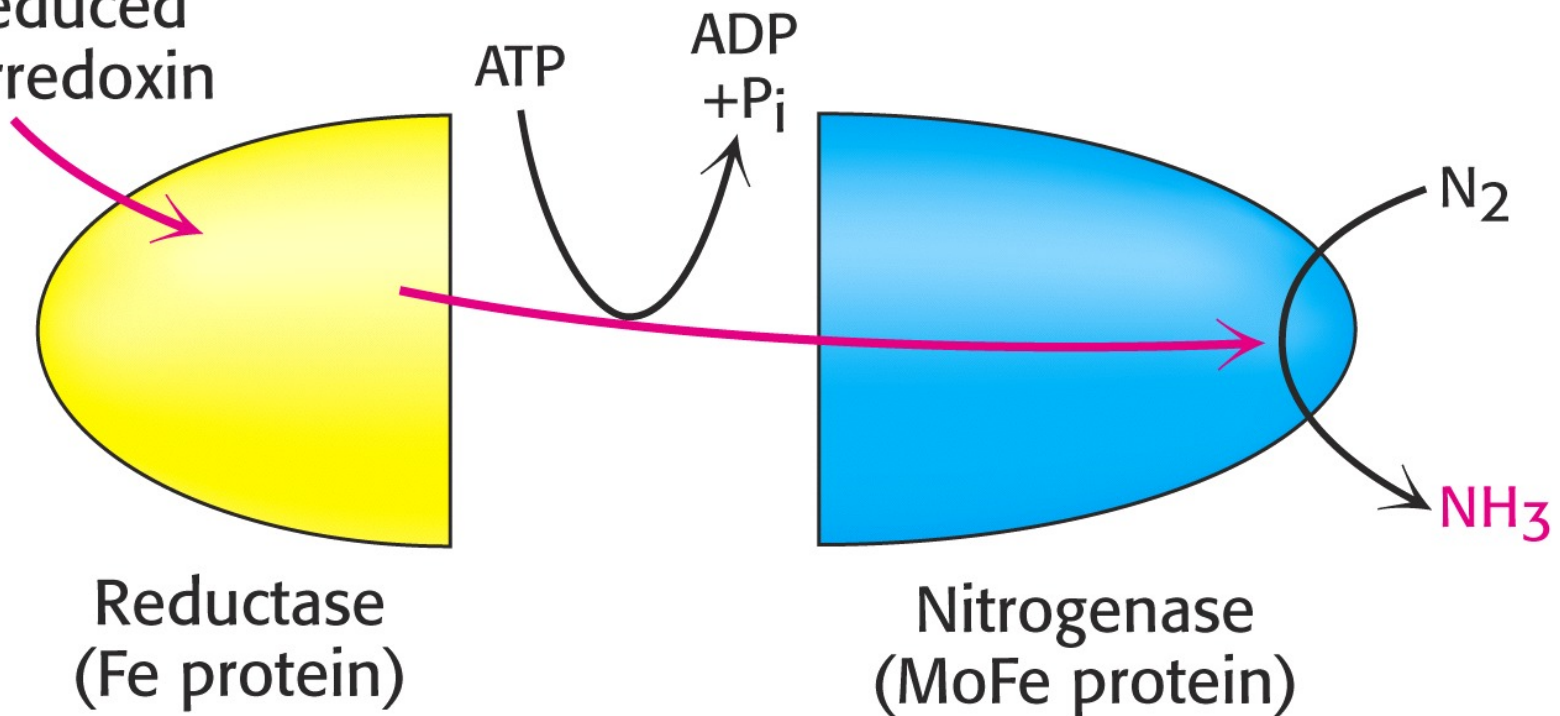
$$\text{N}_2 + 8 \text{H}^+ + 8 \text{e}^- + 16 \text{ATP} + 16 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16 \text{ADP} + 16 \text{P}_i$$
- U rostlin čeledi fabaceae (bobovité) produkuje tento systém mnohem více amoniaku než sám spotřebuje. Nadbytek se uvolňuje do půdy.
- Bakterie rodu *Rhizobium* (fixace dusíku) žije v symbioze s rostlinou ve formě kořenových hlíz. Leghemoglobin chrání nitrogenasu před O_2 !!



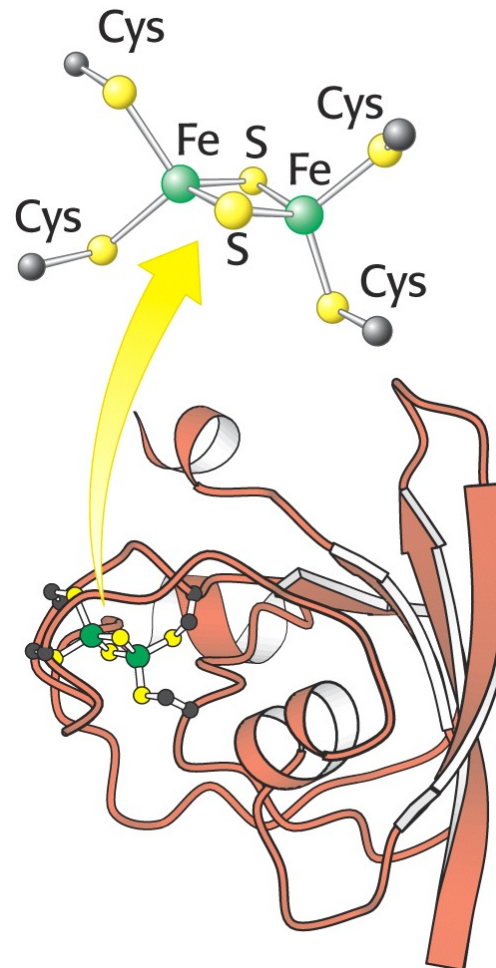
Figure 20-40 Fundamentals of Biochemistry, 2/e

Fixace dusíku. Tok elektronů z ferredoxinu na reduktasu a poté na nitrogenasu. Hydrolýza ATP pohání konformační změny nutné pro efektivní tok elektronů.

Electrons from
reduced
ferredoxin

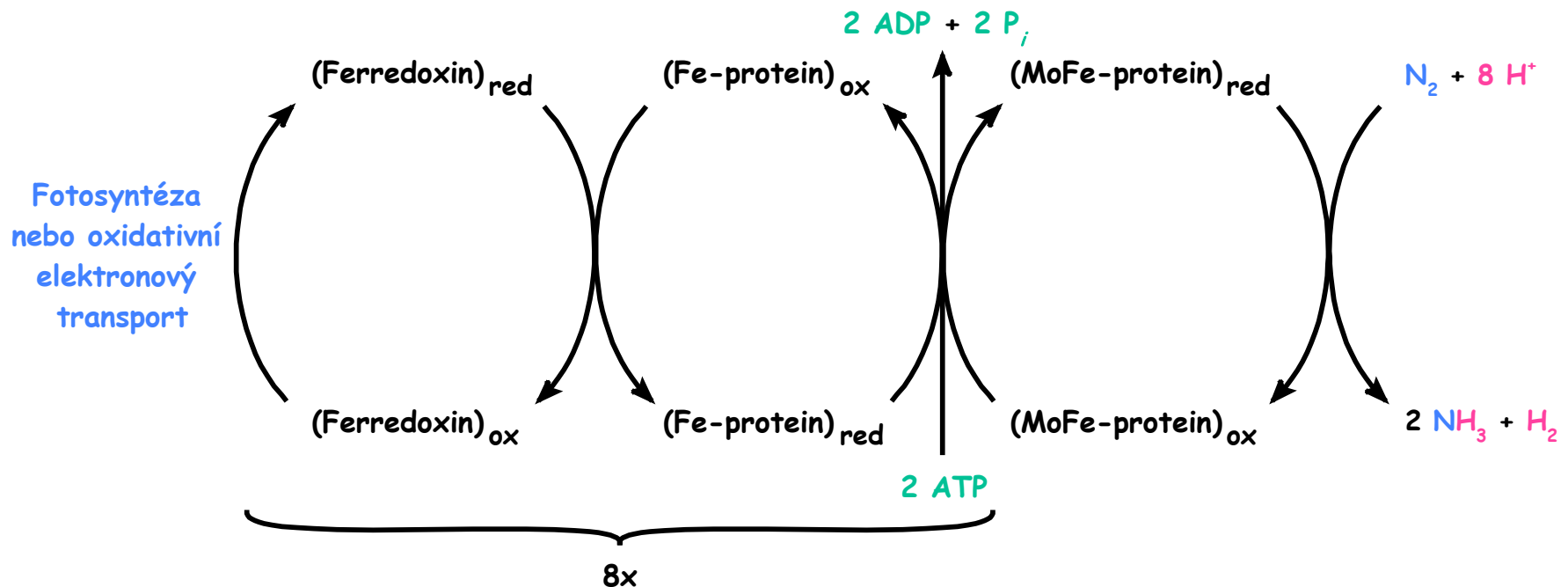


Ferredoxin vyšších rostlin obsahuje klastr 2Fe-2S. Protein přijímá elektrony od fotosystému I a přenáší je na ferredoxin-NADPreduktasu.



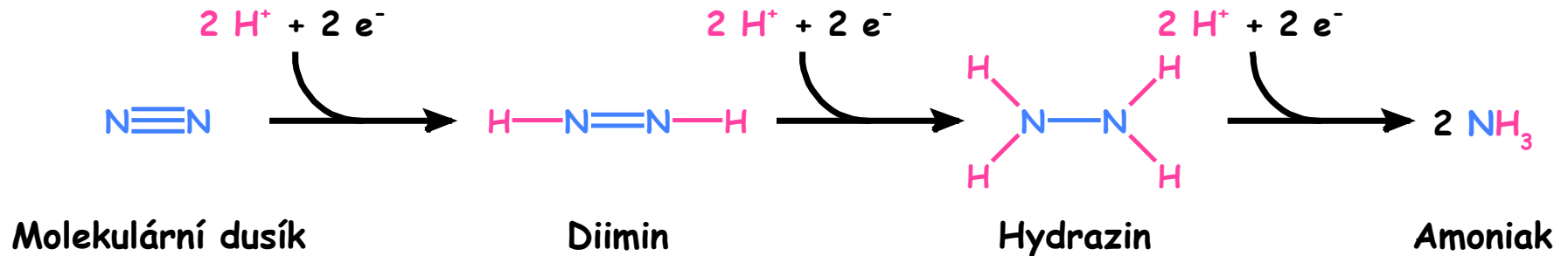
Nitrogenasa

- Nitrogenasa je komplexem dvou proteinů:
 - 1. **Fe-Protein**, homodimer obsahující jeden klastr [4 Fe - 4 S] a dvě vazebná místa pro ATP.
 - 2. **MoFe-protein**, $\alpha_2\beta_2$ heterotetramer obsahující Fe a Mo.
- Schéma toku elektronů při nitrogenasové reakci:



Energetická náročnost redukce N_2

- Redukce N_2 probíhá v FeMo-proteinu ve třech oddělených stupních. V každém se uplatňuje jeden elektronový pár.



Koloběh dusíku je biogeochemický cyklus, který popisuje přeměnu dusíku a jeho sloučenin v přírodě.

- Dusík prochází, zejména díky organismům, na Zemi neustávajícím koloběhem. Posloupnost organických látek je: vzdušný dusík - amoniak - organické látky (aminokyseliny, nukleové kyseliny, nukleotidy) - amoniak - dusitany - dusičnany - vzdušný dusík.
- **Diazotrofie**
- Při biologické fixaci neboli **diazotrofii** se rozbíjí trojná vazba vzdušného dusíku (N_2) pomocí enzymu nitrogenasa. Dusík se zabuduje do amonných iontů (NH_4^+) Tuto reakci zvládají jen některé prokaryotické organismy, které někdy využívají symbiotického svazku s vyššími rostlinami (bobovité, olše,...)
- Na biologické fixaci se podílí mnoho skupin prokaryotních organismů, ale zejména různé bakterie včetně aktinomycet a sinic. Tyto organismy můžeme rozdělit do dvou skupin, podle toho, zda vytvářejí symbiotický vztah s vyššími rostlinami.
- **Symbiotičtí vazači dusíku** (velmi často tzv. hlízkové bakterie): Rhizobium, Bradyrhizopodium, aktinomyceta Frankia, sinice Nostoc
- **Volně žijící vazači dusíku**
 - aerobní bakterie Azotobacter, Clostridium, žijí v půdě, slané i sladké vodě
 - autotrofní sinice: sladkovodní Anabaena a Aphanizomenon, mořská sinice Trichodesmium

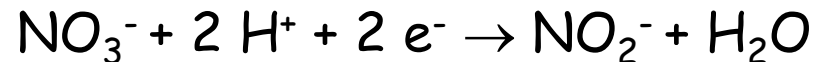
Koloběh dusíku je biogeochemický cyklus, který popisuje přeměnu dusíku a jeho sloučenin v přírodě.

- **Asimilace**
- Při asimilaci se začleňuje dusík do těla organismů.
- Rostliny přijímají dusík jako dusičnany, případně jako amonné ionty přímo z půdy. Dusičnany jsou redukovány na dusitany a posléze zabudovány do aminokyselin, nukleových kyselin, chlorofylu, a podobně.
- U rostlin, které přijímají amoniak díky hlízkovým bakteriím, je práce s dusitany a dusičnany zjednodušená. Dusík díky potravnímu řetězci proniká od rostlin a bakterií k jejich predátorům, až na vrchol potravní pyramidy, a to v podobě rostlinných aminokyselin a nukleotidů, vyrobených z jejich fixovaného dusíku.
- **Amonifikace**
- Amonifikace je přeměna dusíkatých organických látek zpět na amoniak. Tento jev zprostředkovávají rozkladači, tedy zejména bakterie a houby. Amonifikace je proto jedním z pochodů biologického rozkladu (mineralizace).
- **Nitrifikace**
- Nitrifikace probíhá ve dvou fázích.
- Nitritace - Nitritační bakterie převádějí amoniak na dusitany. Známá nitritační bakterie je Nitrosomonas.
- Nitratace - Nitratační bakterie převádí dusitany na dusičnany. Známá nitratační bakterie je Nitrobacter.
- **Denitrifikace**
- Denitrifikace je přeměna dusičnanů na plynný dusík. Při nedostatku kyslíku ji využívají některé bakterie např. Pseudomonas a některé houby

Cyklus dusíku v biosféře

- Některé bakterie produkují dusitany (nitrit, NO_2^-) a poté dusičnany (nitrát, NO_3^-) oxidací NH_3 v procesu zvaném **nitrifikace**.
- Řada organismů převádí nitráty zpět na N_2 v procesu zvaném **denitrifikace**.
- Nitráty jsou rostlinami, plísněmi a mnoha bakteriemi redukovány na NH_3 v procesu zvaném **amonifikace**.

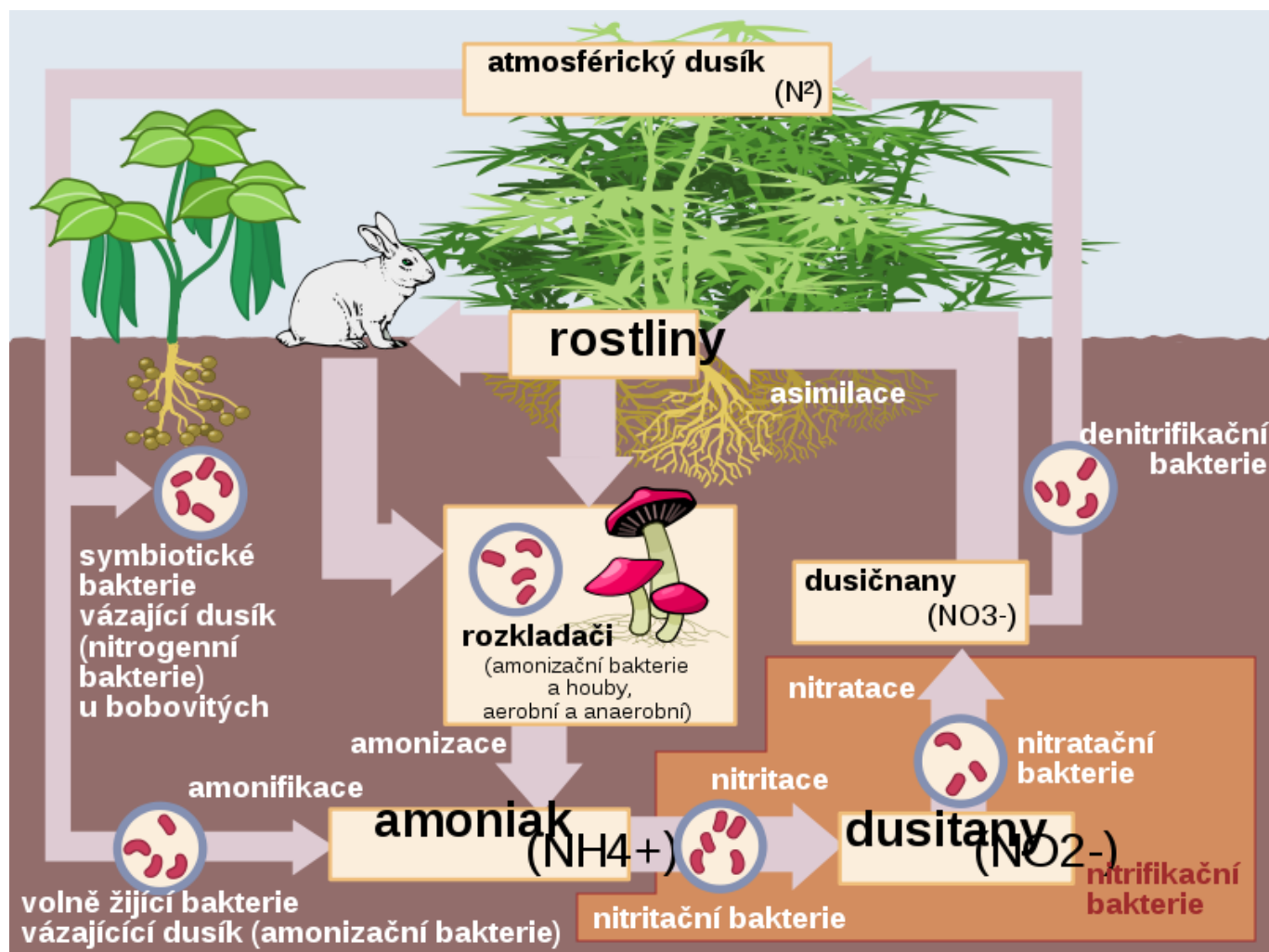
- **Nitrátreduktasa** katalyzuje dvouelektronovou redukci nitrátu na nitrit:

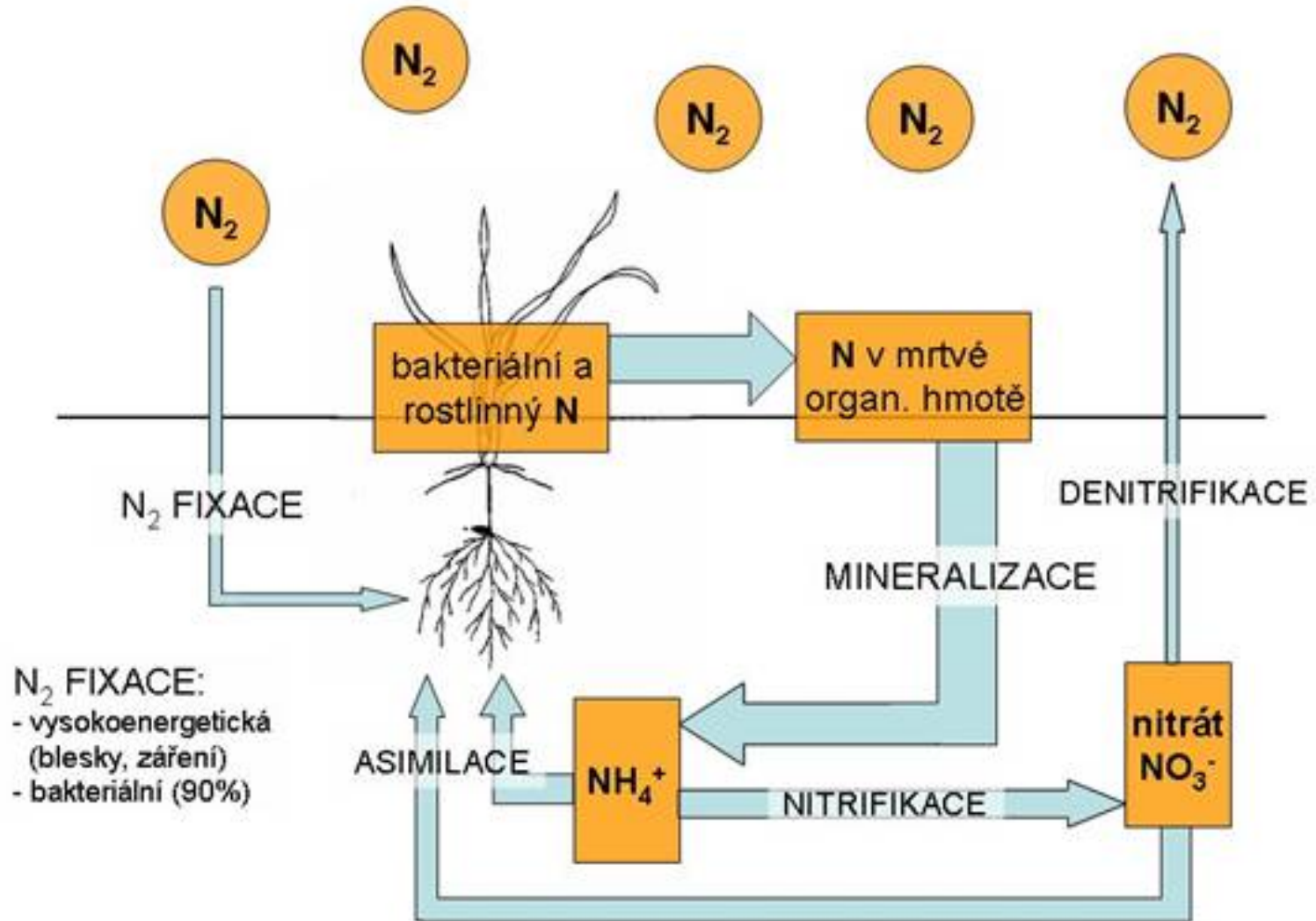


- **Nitritreduktasa** převádí nitrit na amoniak:



Cyklus dusíku v biosféře





Asimilace fixovaného dusíku

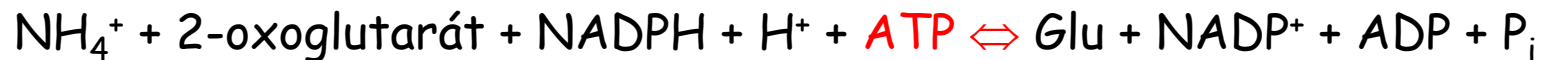
- Amoniak a dusičnany jako vzniklé biologicky užitečné formy dusíku musí být vloženy **-asimilovány-** do buněčných biomolekul.
- Když se dusík objeví v aminokyselinách je možné ho převést na ostatní dusíkaté sloučeniny.
- Většina organismů **nedokáže** fixovat dusík a proto musí přijímat dusík předem fixovaný.
- Glu je syntetizován z NH_4^+ a 2-oxoglutarátu za katalýzy glutamátdehydrogenasy (nerozlišuje NADH a NADPH !!):
- $\text{NH}_4^+ + 2\text{-oxoglutarát} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \Leftrightarrow \text{Glu} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$
- Druhé amonium vstupuje za katalýzy glutaminsyntetasy:
- $\text{Glu} + \text{ATP} \rightarrow \text{acylfosfátový meziprodukt}$.
- $\text{Acylfosfátový meziprodukt} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{Glutamin}$.
- Oba enzymy jsou přítomné ve všech organismech.

Prokaryota a fixace dusíku.

- **Většina prokaryot má** enzym **glutamátsynthasu** katalyzující reduktivní aminaci:



Za situace, kdy je koncentrace NH_4^+ limitující, je většina Glu tvořena sekvenčními reakcemi glutaminsynthetasy a glutamátsynthasy:



Tato dráha je energeticky náročnější (+ ATP).

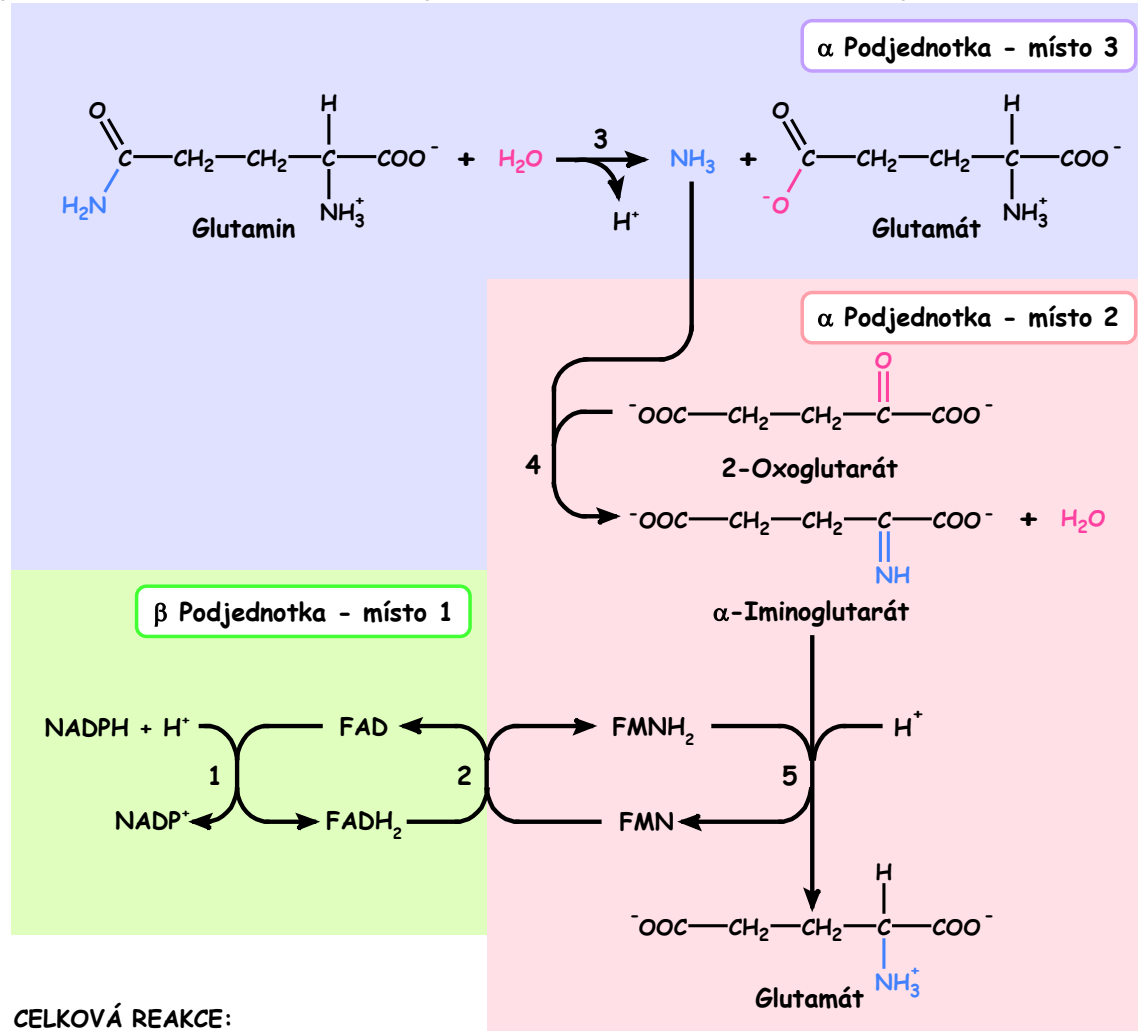
Proč ji prokaryota využívají ?

Hodnota K_m glutamátdehydrogenasy pro NH_4^+ je vysoká (cca 1 mM), enzym není satureován, když je NH_4^+ omezené množství.

Na rozdíl glutaminsynthetasa má vysokou afinitu k NH_4^+ .

Reakční mechanismus glutamátsynthasy (Tři aktivní místa).

NH₃ putuje kanálkem do podjednotky 2 kde reaguje s α-oxoglutarátem.



CELKOVÁ REAKCE:



Sumární výsledek asimilace dusíku

- Sumární výsledek glutaminsyntetase a glutamasyntetase reakce:



- Kombinací těchto dvou enzymových reakcí je asimilován fixovaný dusík (NH_4^+) do organické sloučeniny (α -oxoglutarát) za tvorby aminokyseliny glutamátu.
- Jednou asimilovaný dusík v glutamátu, může být využit k syntéze dalších aminokyselin transaminací !!