

Обмен азота. Пути синтеза аминокислот

NEN

Лекция 3

Зачем организмам нужен азот?
Как они его приобретают и куда
используют?



Линдерстрём-Ланг (Linderstrøm Lang)
Кай Ульрик (1896 — 1959), датский
биохимик, иностранный член АН СССР

Первичная
структура

| |
|-----|
| Pro |
| Ala |
| Asp |
| Lys |
| Thr |
| Asn |
| Val |
| Lys |
| Ala |
| Ala |
| Trp |
| Gly |
| Lys |
| Val |

Вторичная
структура

Третичная
структура

Четвертичная
структура

Аминокислотная
последовательность

Полипептидная
цепь

Мультисубъединичный
комплекс

Уровни организации белковых молекул.

Как живые организмы получают азот?

- ЦИКЛ АЗОТА В БИОСФЕРЕ

по: Нельсон, Кокс т.2, стр.6 и стр. 506-509. О нитратах читать “Практикум по биохимии”

- СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ,

по учебнику Анисимова п. 5.1 и 5.2

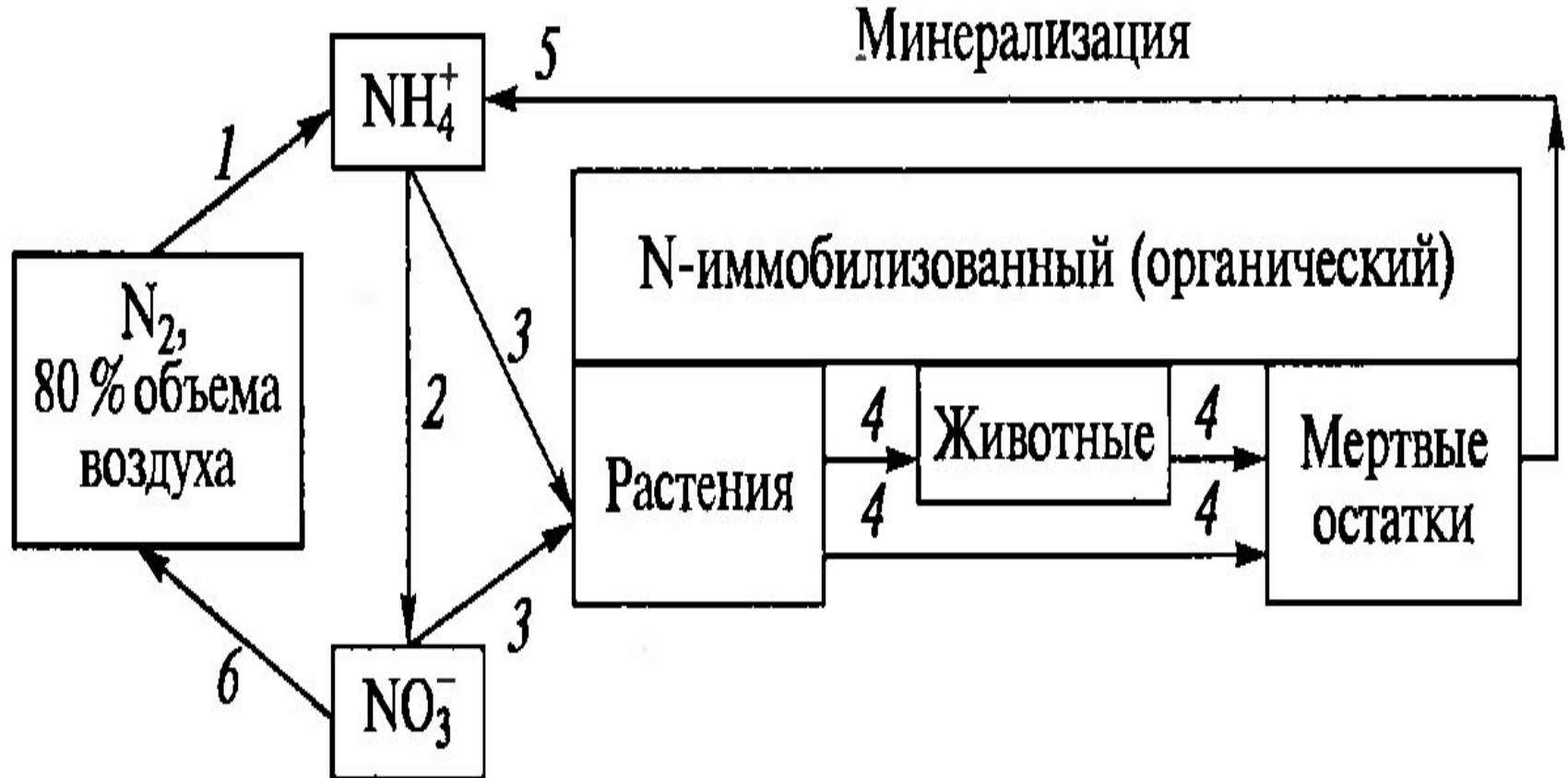
Для синтеза *заменяемых* аминокислот
человеку и животным подходит
ТОЛЬКО NH_3 (в воде NH_4OH , NH_4^+)

Источники аммиака

| Источник | Примерный диапазон, млн т N/год |
|-----------------------------------|---|
| Биологическая фиксация | |
| Суша | 44–200 |
| Мировой океан | 1–120 |
| Сжигание топлива | 15–40 |
| Пожары | 10–200 |
| Грозы | 8–30 |
| Промышленное производство аммиака | 100 |
| в том числе | но...+500⁰С, 300-350 атм. |
| удобрения | 84 |
| прочие | 16 |

Фриц Габер, Карл Бош – Нобелевская премия 1918 и 1931 соответственно за создание технологии промышленного получения аммиака

Цикл азота в биосфере



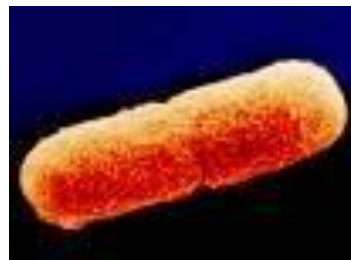
1) диазотрофы 2) нитрификация (бактерии) 3) поглощение и ассимиляция NH_4^+ и NO_3^- 4) поедание организмов другими и отмирание организмов 5) аммонификаторы, минерализация азота 6) денитрификаторы

1. Фиксация N_2 . НИТРОГЕНАЗА

БАКТЕРИИ – диазотрофы:

- - свободноживущие (пр. *Azotobacter*, *Clostridium*, все фотосинтезирующие, ряд АРХЕЙ...)
- - в симбиозе или ассоциации с растениями (пр. *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Anabaena*, *Frankia* ...)
- - в кишечнике животных (р. *Klebsiella*...)

60% N в теле термита – продукт азотфиксации бактерий пищеварительного тракта



•*Azotobacter*

Rhizobium на люпине



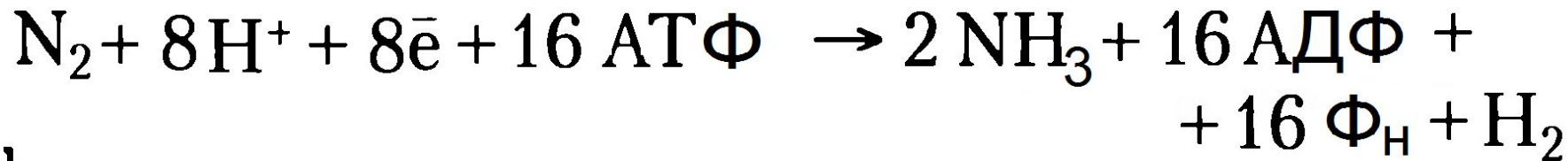
Повсеместность азотфиксации

В год на 1 га почвы в умеренных широтах:
Свободноживущие микроорганизмы - 15-30 кг N
Симбионты – 200-300 кг N.

Кроме бобовых, активно фиксируют N ризосферные и симбиотические бактерии у березы, облепихи, малины, ольхи, ивы, дикие и культурные злаки...

1895 - Наббе, Хилтнер – патент на микробное удобрение *Nitragin* (культуры азотфиксаторов для разных растений)

Общая схема азотфиксации

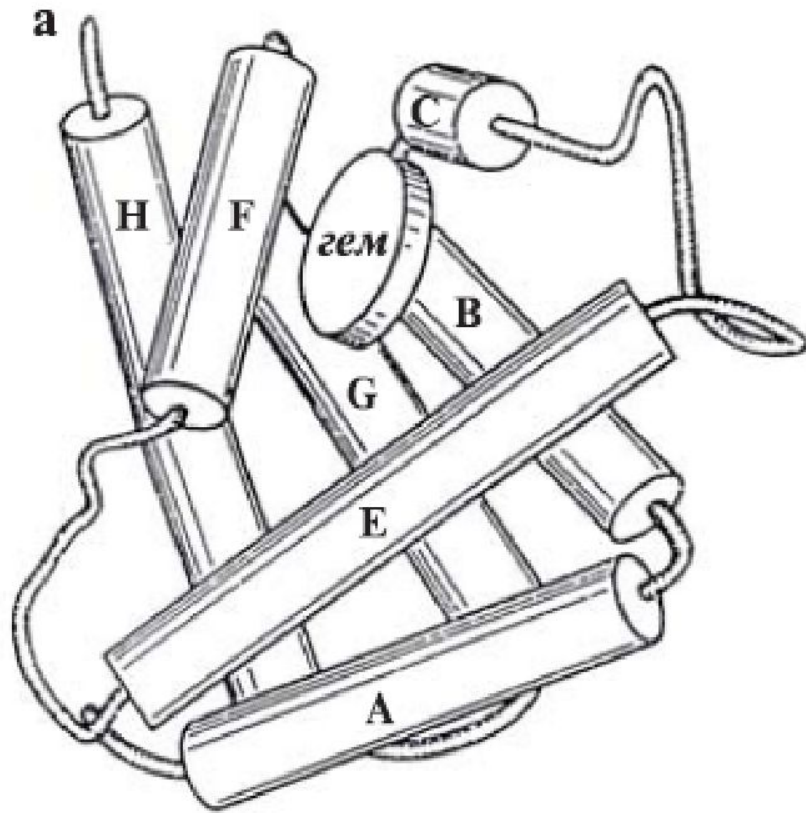


У *Rhizobium* для восстановления $1N_2$ может идти от 12 до 35

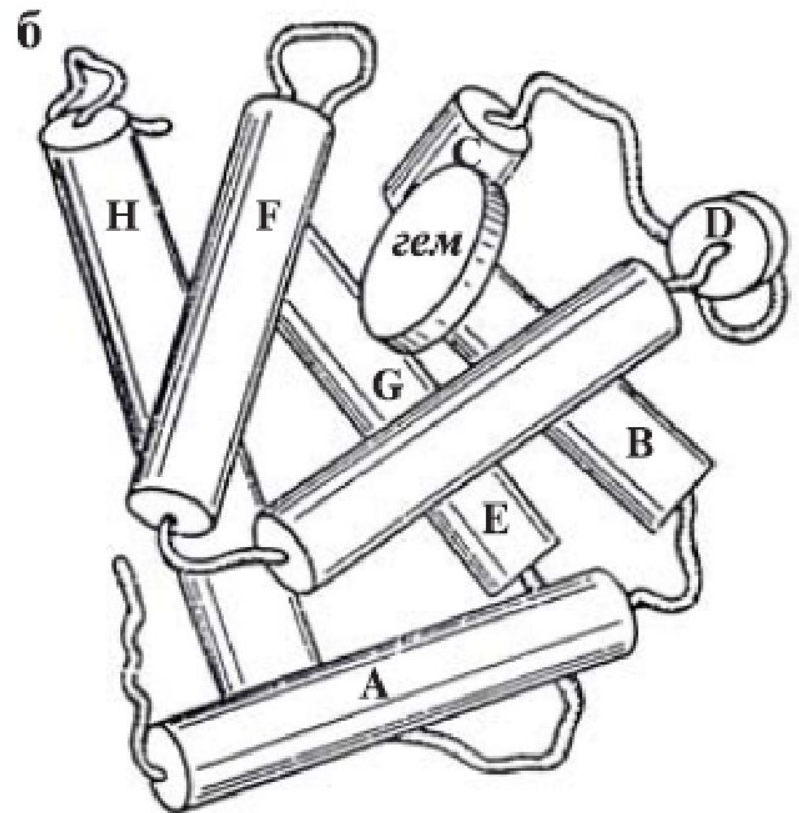
АТФ – для 12 АТФ см. Анисимов с. 247

Побочная реакция при азотфиксации – восстановление H^+ до H_2 . В результате только 40-60% всего потока e^- через нитрогеназу передается на N_2 . Как убрать ненужные потери?

Легоглобины – защита от O_2



Из люпина

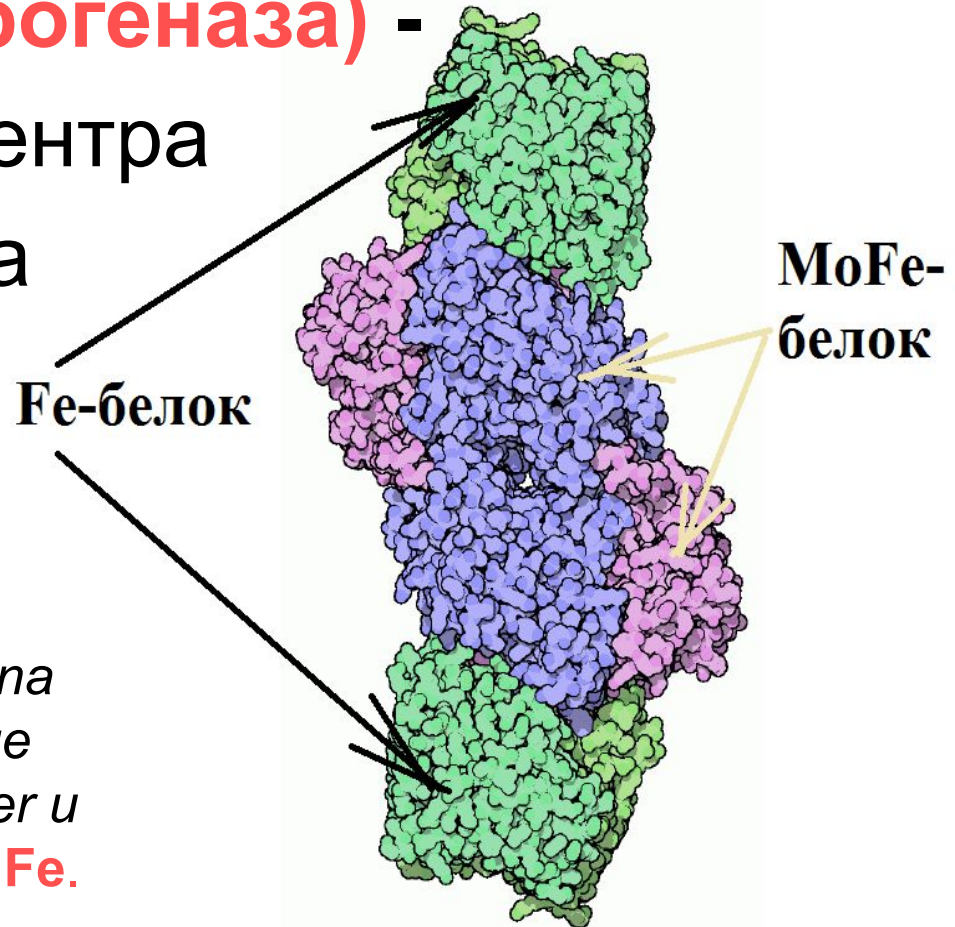


Миоглобин кашалота

- “Из аммиака в аммонийную форму” - работает **нитрогеназный комплекс** (упрощенно называемый **нитрогеназой**).
- Комплекс состоит из 2х видов белков:
 - 1) Азоферредоксин = дегидрогеназа или **редуктаза** динитрогеназы = **Fe-белок**. Он переносит электроны от доноров (белка ферредоксина) на MoFe-белок. Содержит Fe и S в FeS-кластерах .
 - 2) Молибдоферредоксин = **динитрогеназа = MoFe-белок (FeMo-белок)**. Именно он связывает и восстанавливает N. Содержит Mo, Fe и S (MoFe-кофактор)

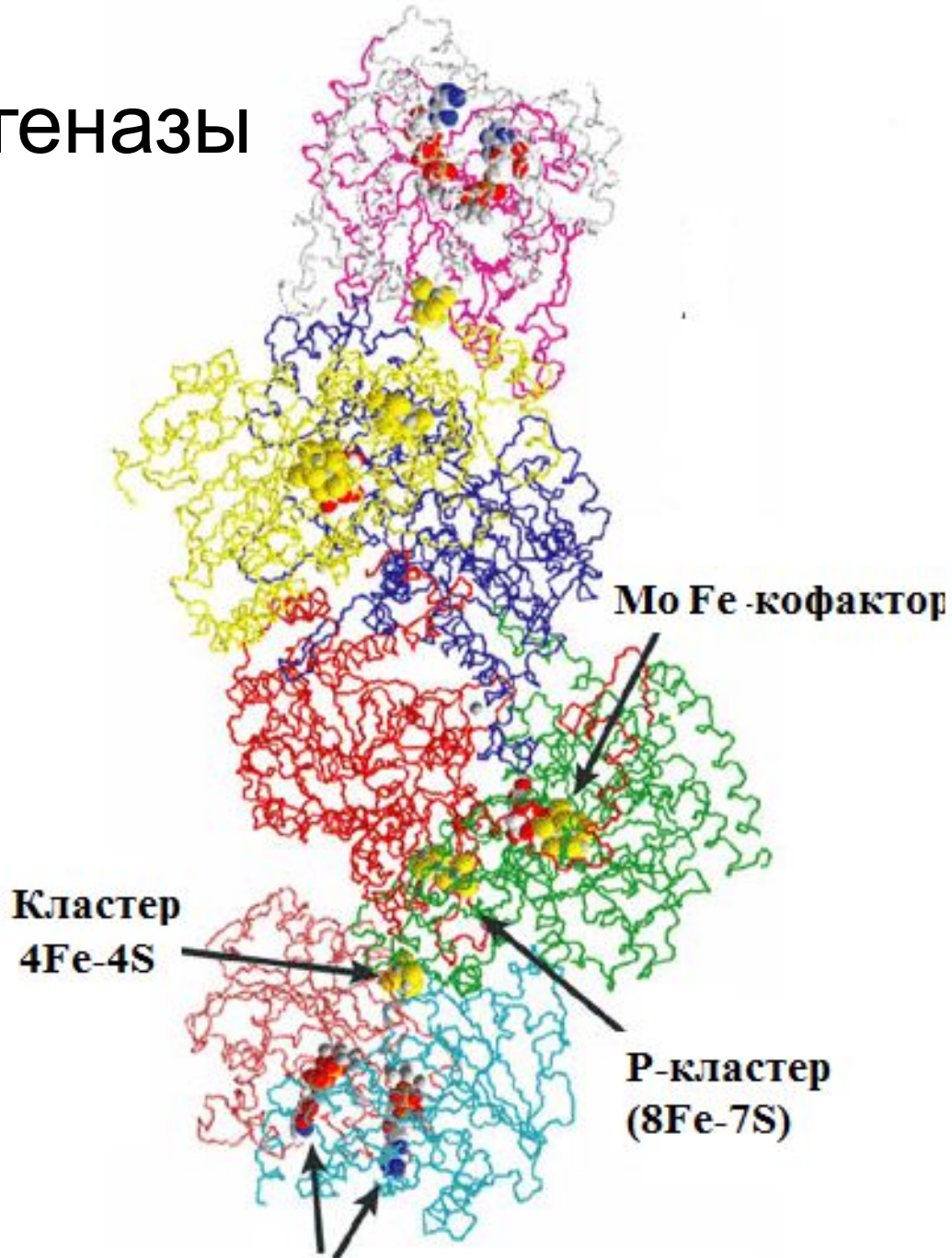
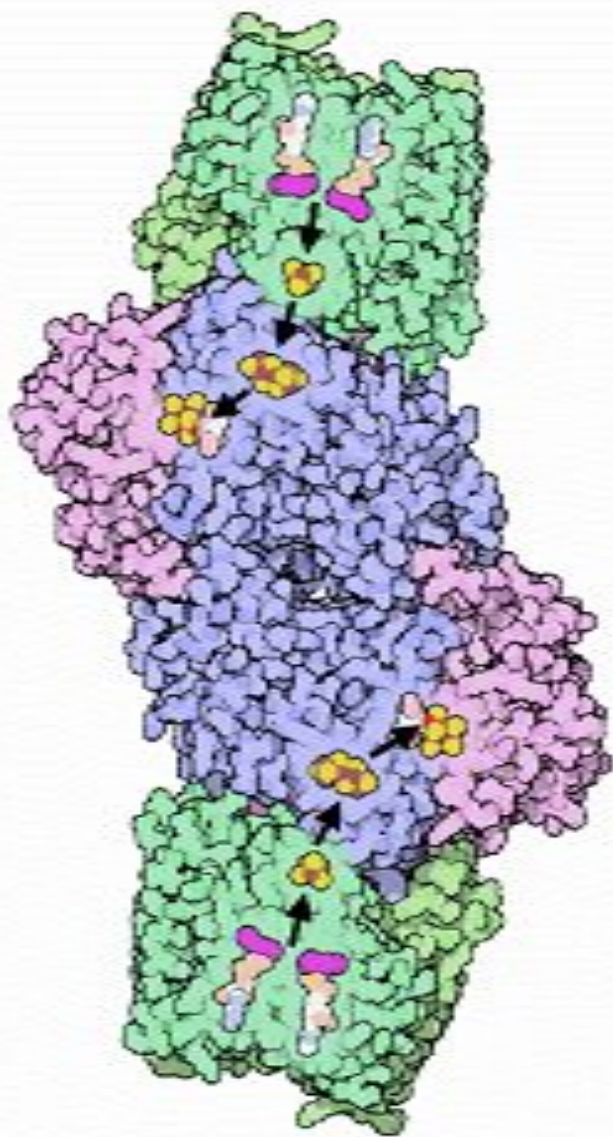
Нитрогеназный комплекс

- **Fe-белок** (редуктаза динитрогеназы) – каждый из 2х - димер
- **MoFe-белок** (динитрогеназа) - тетрамер, имеет 2 центра связывания Fe-белка

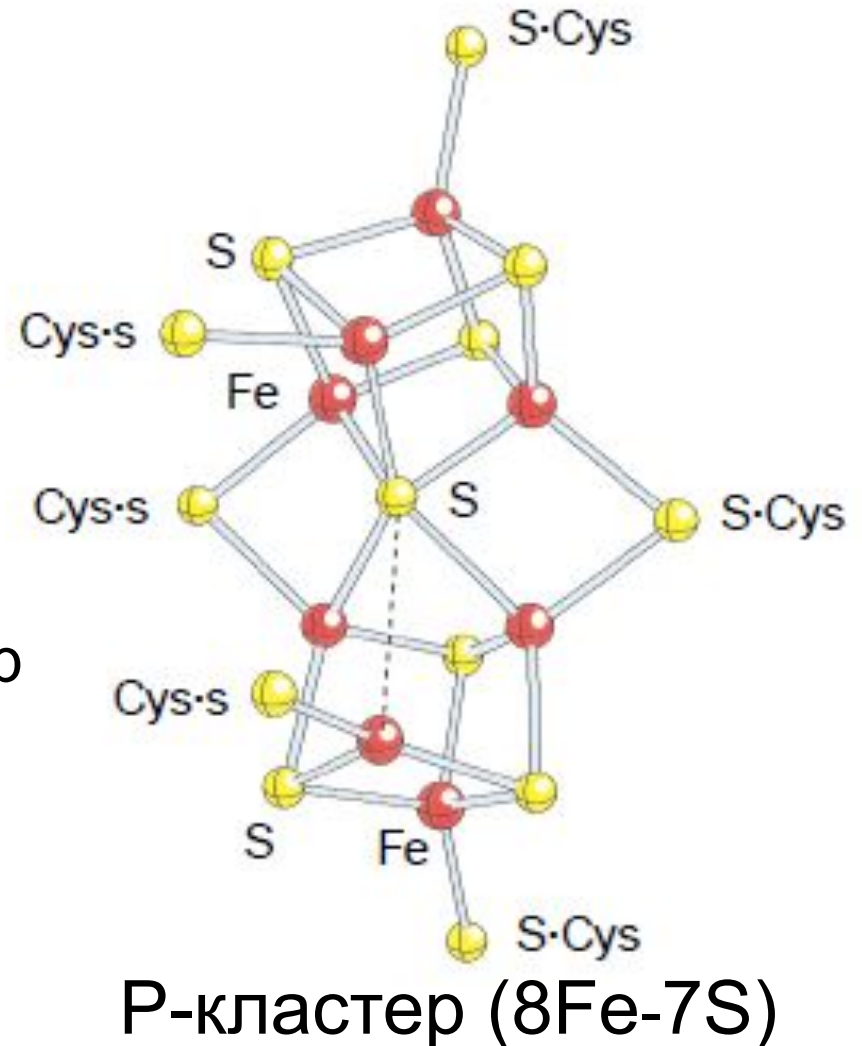
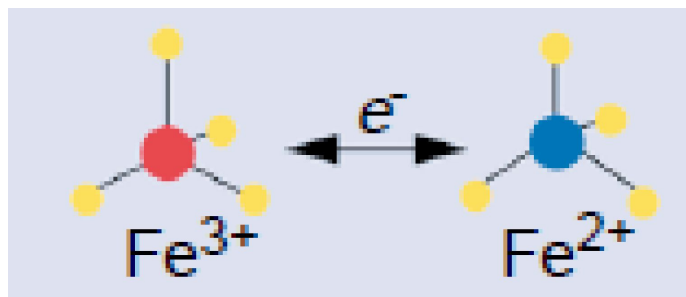
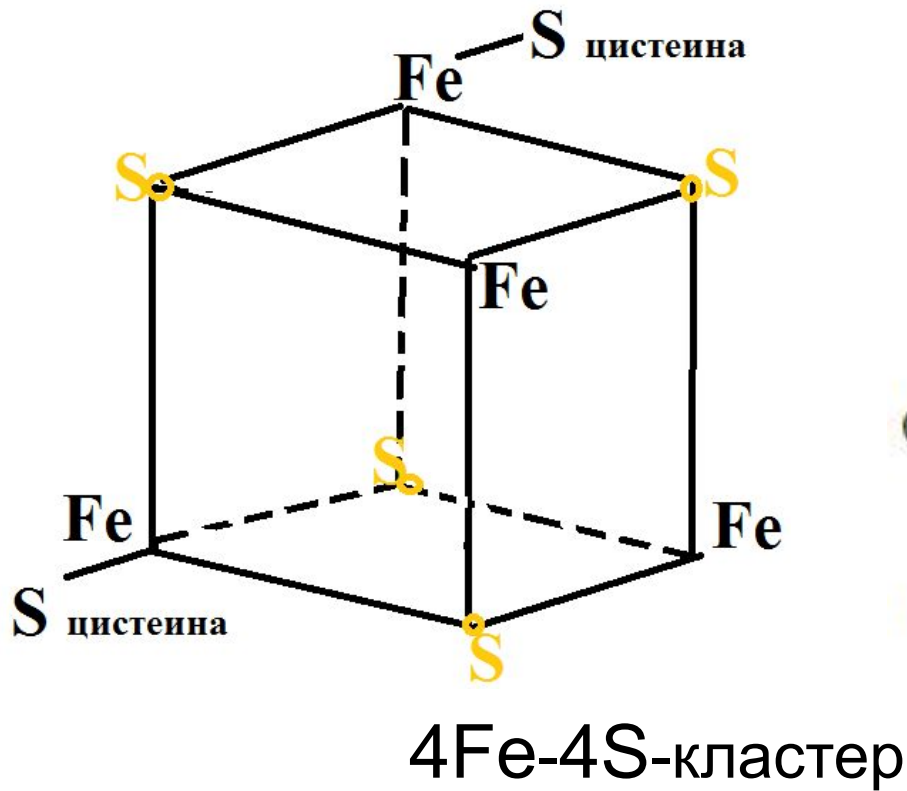


У *Clostridium*, *Azotobacter* и *Anabaena* бывают нитрогеназы, содержащие **ванадий**, у *Azotobacter*, *Rhodobacter* и *Rhodospseudomonas* – содержащие **Fe**.

Кластеры нитрогеназы



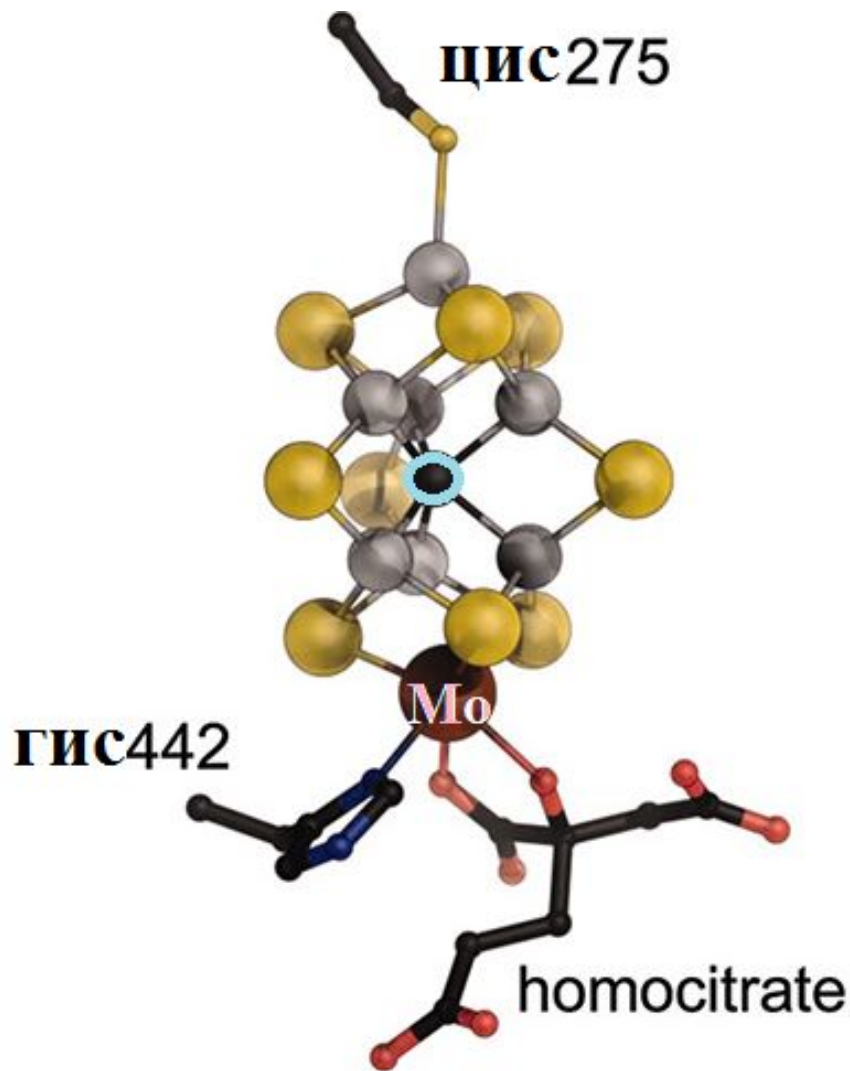
FeS-центры в Fe-белке



MoFe-кофактор: что в центре?

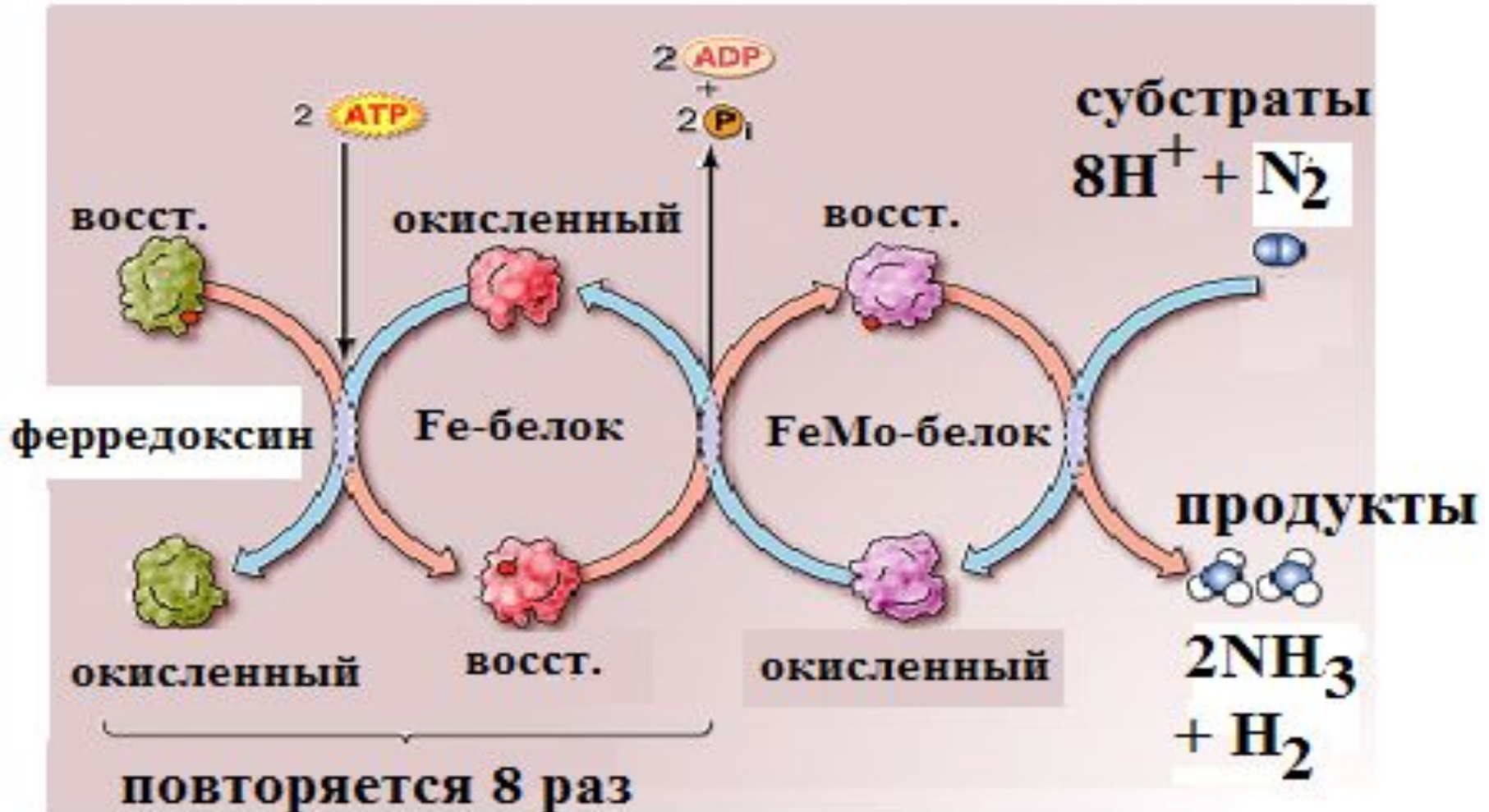
АТОМЫ:

- серые – Fe (7),
- желтые – S (9),
- черные – C,
- подписан Mo (1),
- обведен голубым – недавно выявленный C.



T. Spatzal et al Evidence for Interstitial Carbon in Nitrogenase FeMo Cofactor // *Science*. 2011. V. 334. P. 940.

Работа нитрогеназы



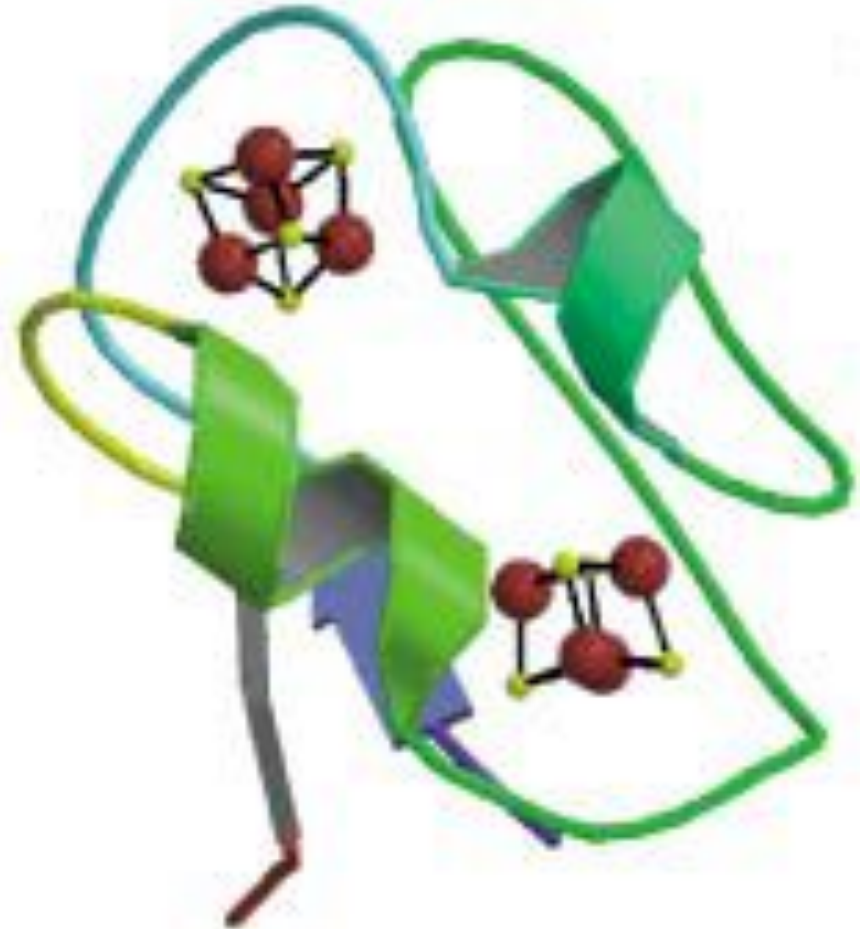
Расшифровка к предыдущему слайду

- В молекуле Fe-белка (димере) 1 FeS-центр, поэтому **Fe-белок** может переносить только по 1 электрону, получая их от **ферредоксина**. Ферредоксин может получать электроны от **ПВК** (пирувата). В FeS-белке 2 центра связывания АТФ, поэтому он может связать 2 АТФ, которые (обе) расходуются при переносе 1 электрона.
- В **MoFe-белке** 2 атома Mo, 2 FeS-центра и MoFe-кофактор. Фиксировать азот может только полностью восстановленный MoFe-белок. Для полного восстановления MoFe-белка нужно 8 электронов. Их по одному доставляет Fe-белок, суммарно затрачивая на перенос $8 \times 2 \text{ АТФ} = 16 \text{ АТФ}$.

-

Ферредоксины (Фд, Fd)

- **Ферредоксины** (*ferrum* — железо; сокращённо обозначается «Фд») — группа небольших (6—12 кДа) растворимых белков, являющихся подвижными переносчиками электронов в ряде метаболических процессов. Обычно они переносят один или два электрона за счёт изменения окисленности атомов железа.

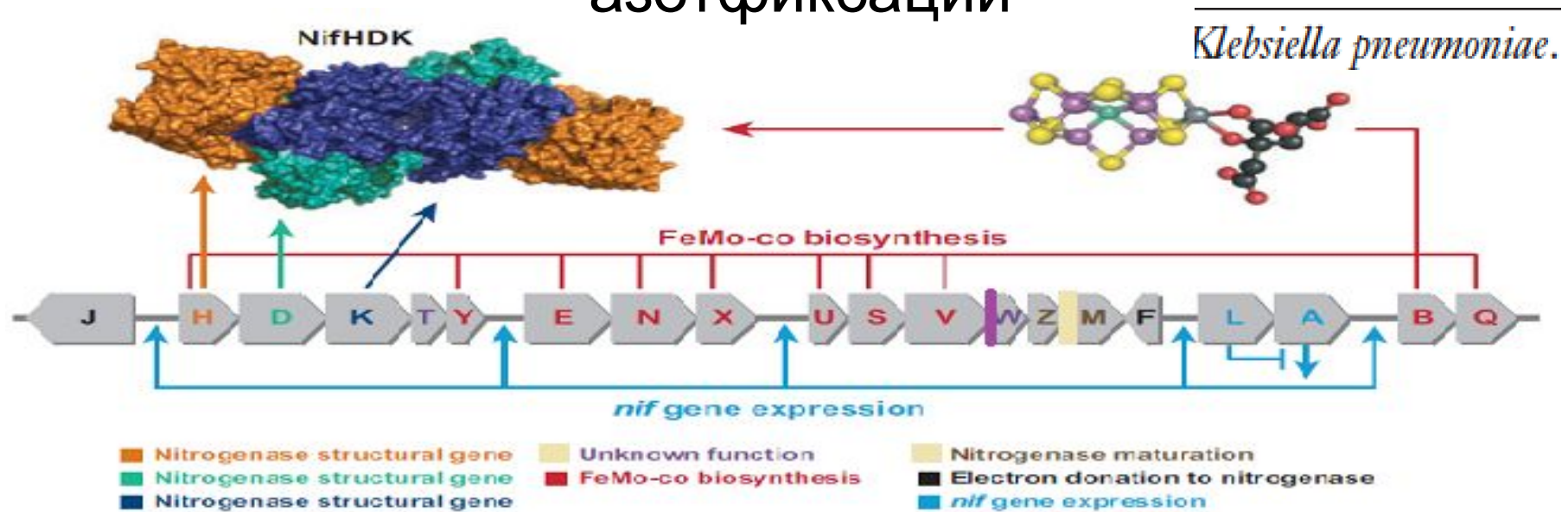


Дополнительный материал

Направления исследований:

- 1) Разработка технологий для сельского хозяйства на базе изучения физиологии и биохимии азотфиксаторов, закономерностей азотфиксации
- 2) Создание генноинженерным путем азотфиксирующих растений и микроорганизмов – на базе изучения генетики азотфиксации. Но защита от кислорода!
- 3) Конструирование улучшенных нитрогеназ (дающих больше NH_4^+ или H_2 (по желанию человека) – на базе познания физических и физико-химических основ азотфиксации и энзимологии.
- 3) Генноинженерное улучшение создания симбиоза азотфиксаторов с растениями – на базе познания биохимических механизмов стадий распознавания хозяина, неотторжения симбионта.
- 4) Поиск новых, более эффективных симбиозов такого рода в природе

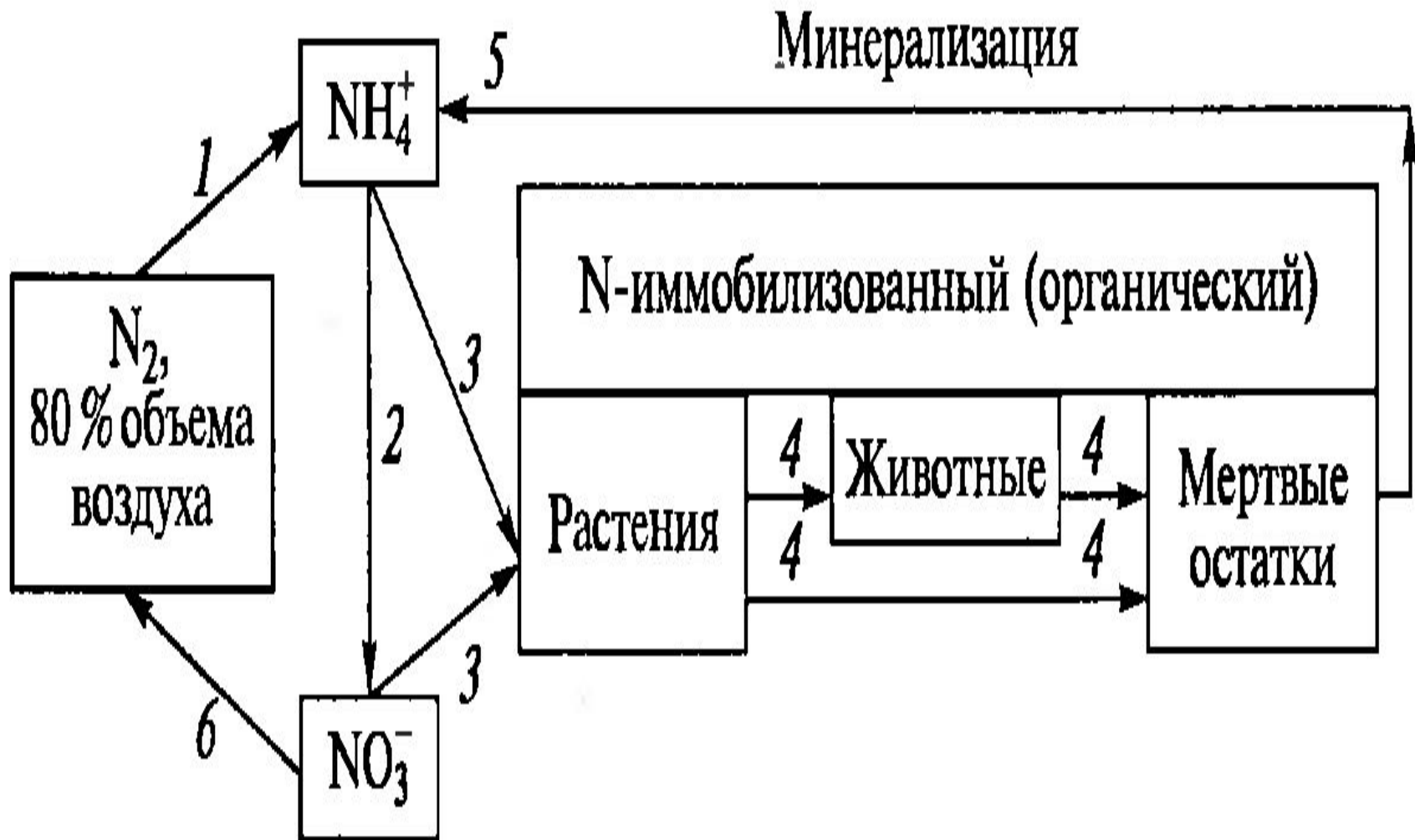
Дополнительный материал: Гены и белки азотфиксации



Вершинина З.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Симбиотические реакции корней облепихи, трансгенных по гену лектина гороха посевного// Физиология растений, 2010, том 57, № 1 (Ин-т биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН – трансгенная облепиха, “приманивающая” ризобий гороха

- ПУТИ СИНТЕЗА
АМИНОКИСЛОТ
Семейства аминокислот
по происхождению

- Из аммиака в аминокислоты



РАСТЕНИЕ: поглощение и переработка NH_4^{\pm} из почвы (или от симбионтов)

- Дополнит. информация: 2 типа транспортных систем:

если аммония мало – система высокого сродства (аммонийный транспортер АМТ, антипорт с H^+), несколько разных АМТ.

если аммония много – система низкого сродства (ионный канал).

Внутри растения –
аминирование, амидирование...

У животных эти процессы тоже
происходят

Прямое восстановительное аминирование – 1 путь синтеза а-к-т

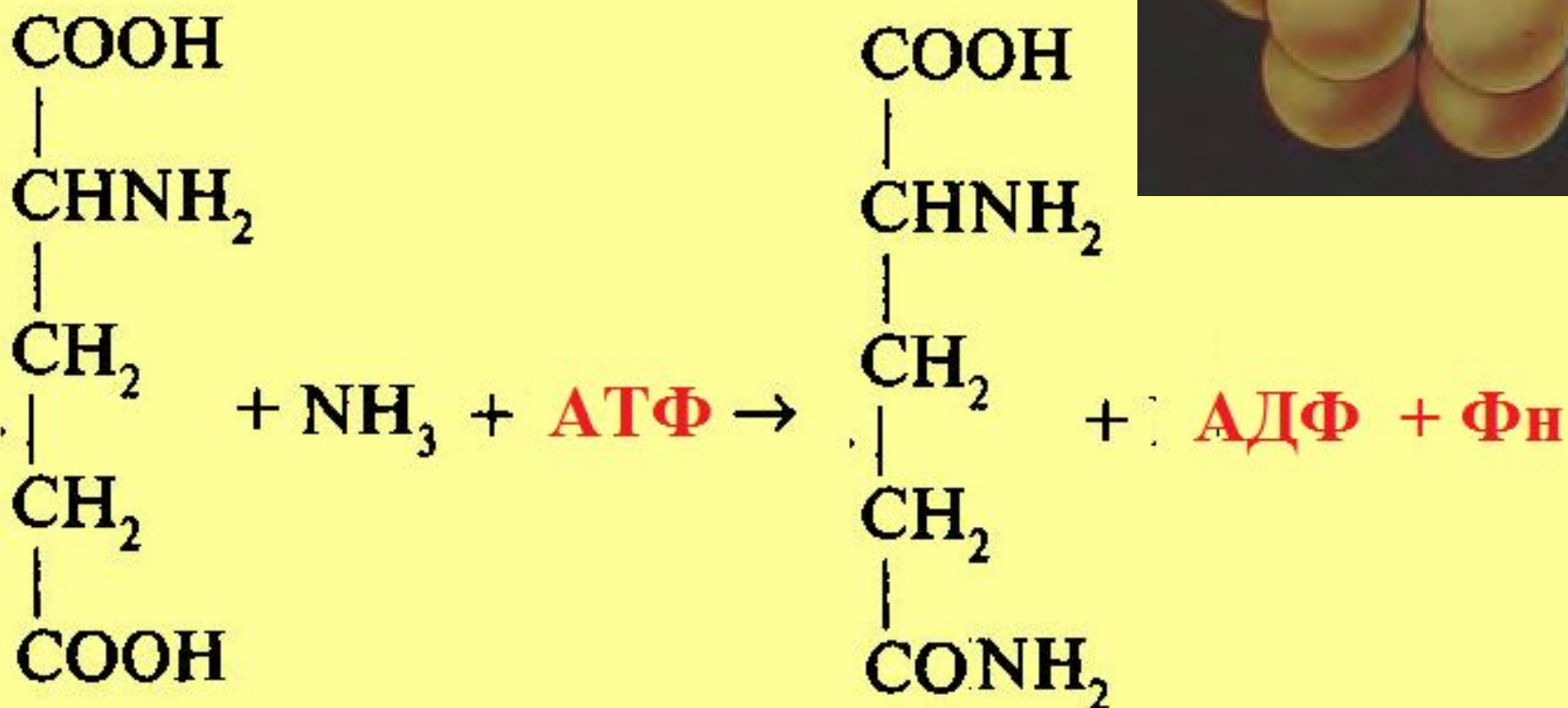
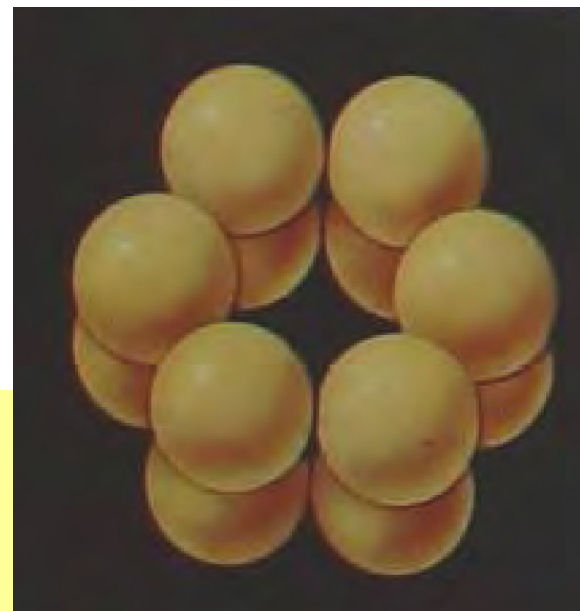


Фермент – глутаматдегидрогеназа (глутаматДГ)

НАДН – никотинамид-аденин-динуклеотид в восстановленной форме

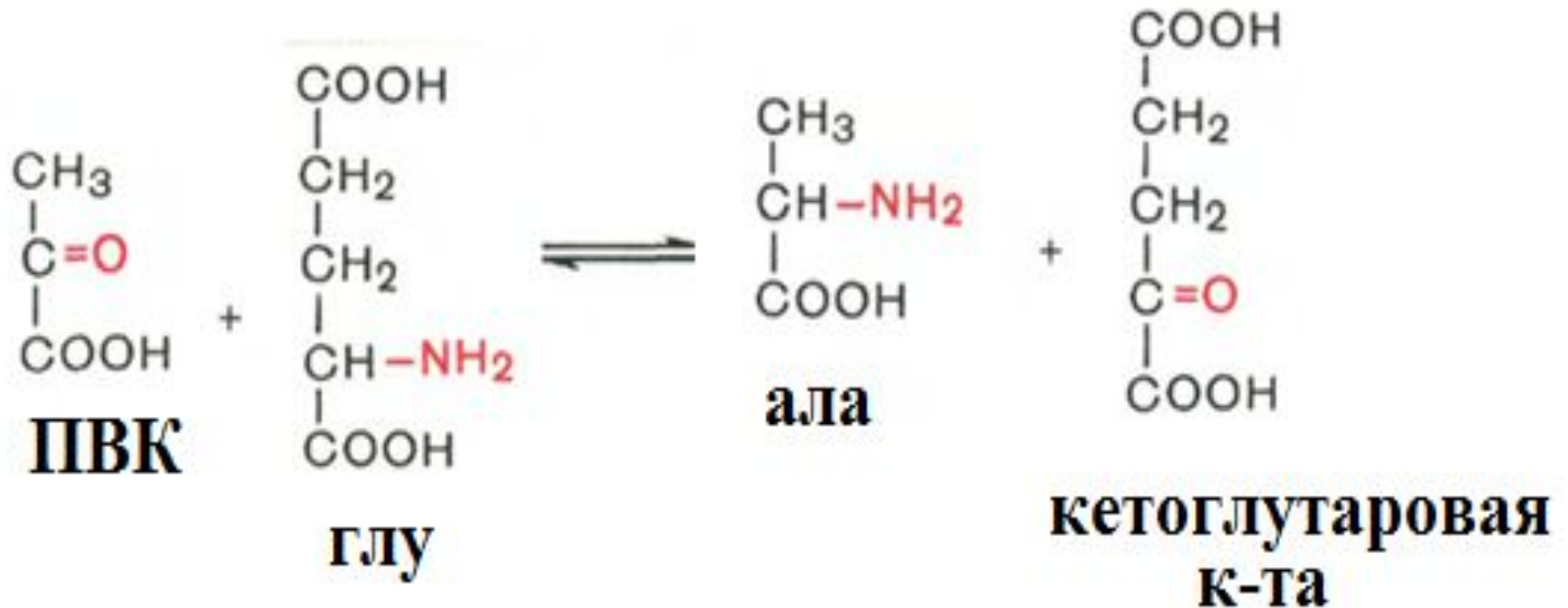
Образование глутамина

– 1а путь синтеза



Фермент - глутаминсинтетаза

Переаминирование – 3 путь синтеза аминокислот

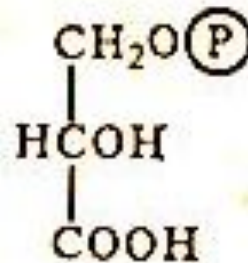


Ферменты переаминирования – *аминотрансферазы*
(например, аланин-амино-трансфераза (АлАт),
аспартатаминотрансфераза (АсАт))

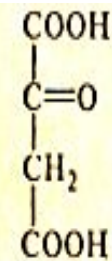
3 путь синтеза аминокислот - ферментативные превращения

!!! У ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СИНТЕЗА НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ
НЕТ НЕОБХОДИМЫХ ФЕРМЕНТОВ. ПРИ САМОПОДГОТОВКЕ
ОТМЕТЬТЕ НА СХЕМАХ СЕМЕЙСТВ НЕЗАМЕНИМЫЕ!

1) Семейства аминокислот 1 – 4 (на основе α -
кетоглутаровой к-ты, ПВК, 3-ФГК и ЩУК.



3 ФГК

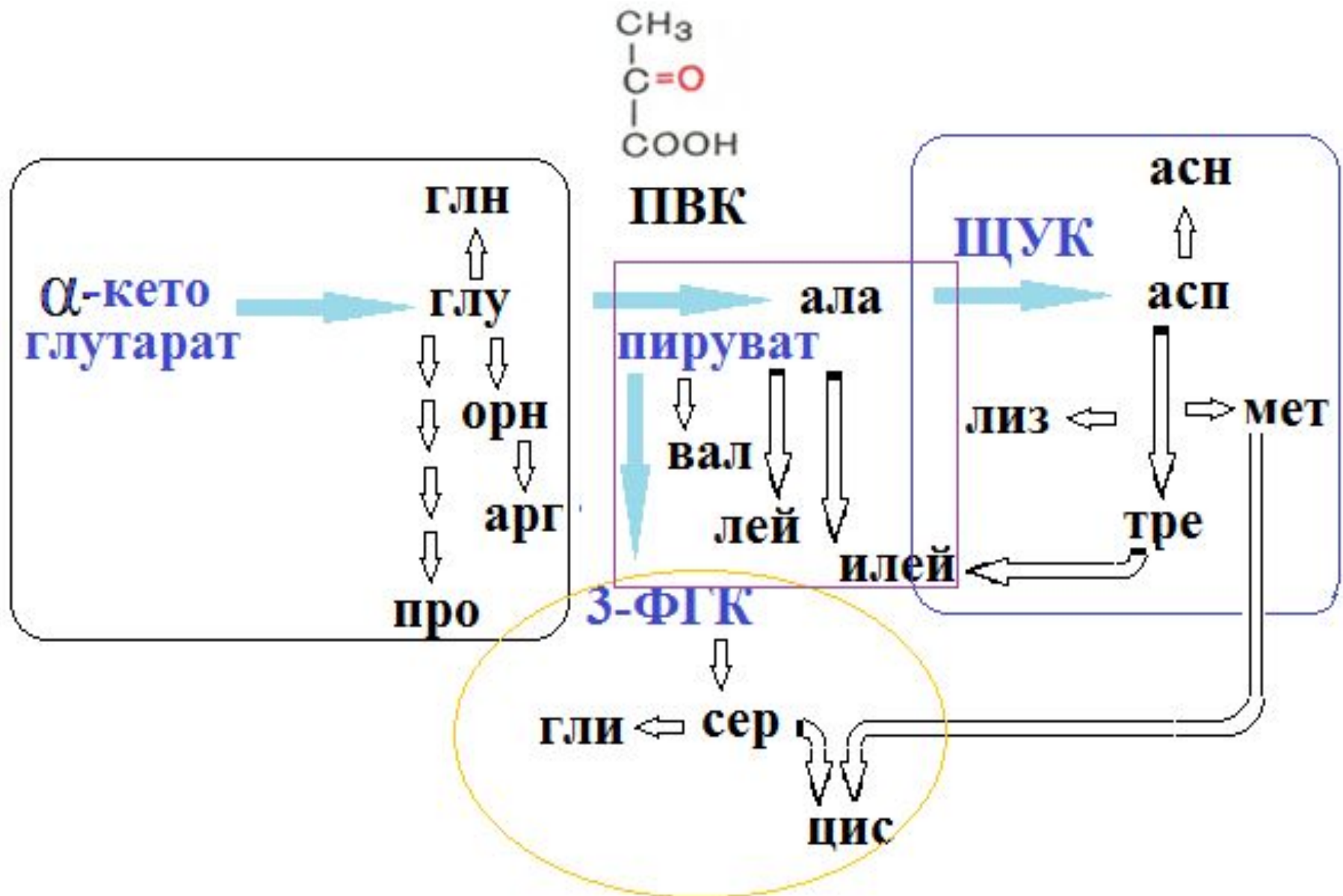


Щавелево-
уксусная к-та
(ЩУК, оксалоацетат)

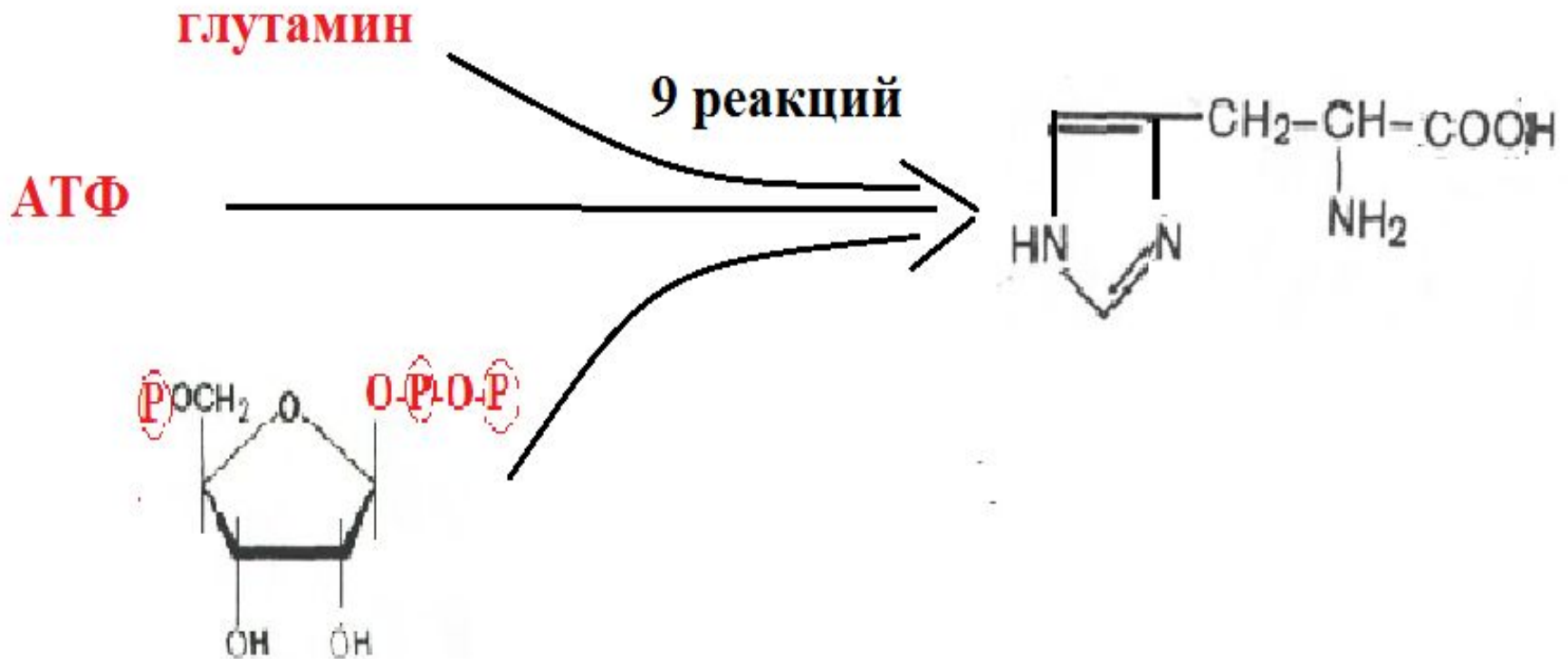
2) Гистидин

3) Ароматические аминокислоты
(шикиматный путь) (семейство 5)

Семейства аминокислот 1-4



Гистидин – особый путь ! У животных гис не синтезируется

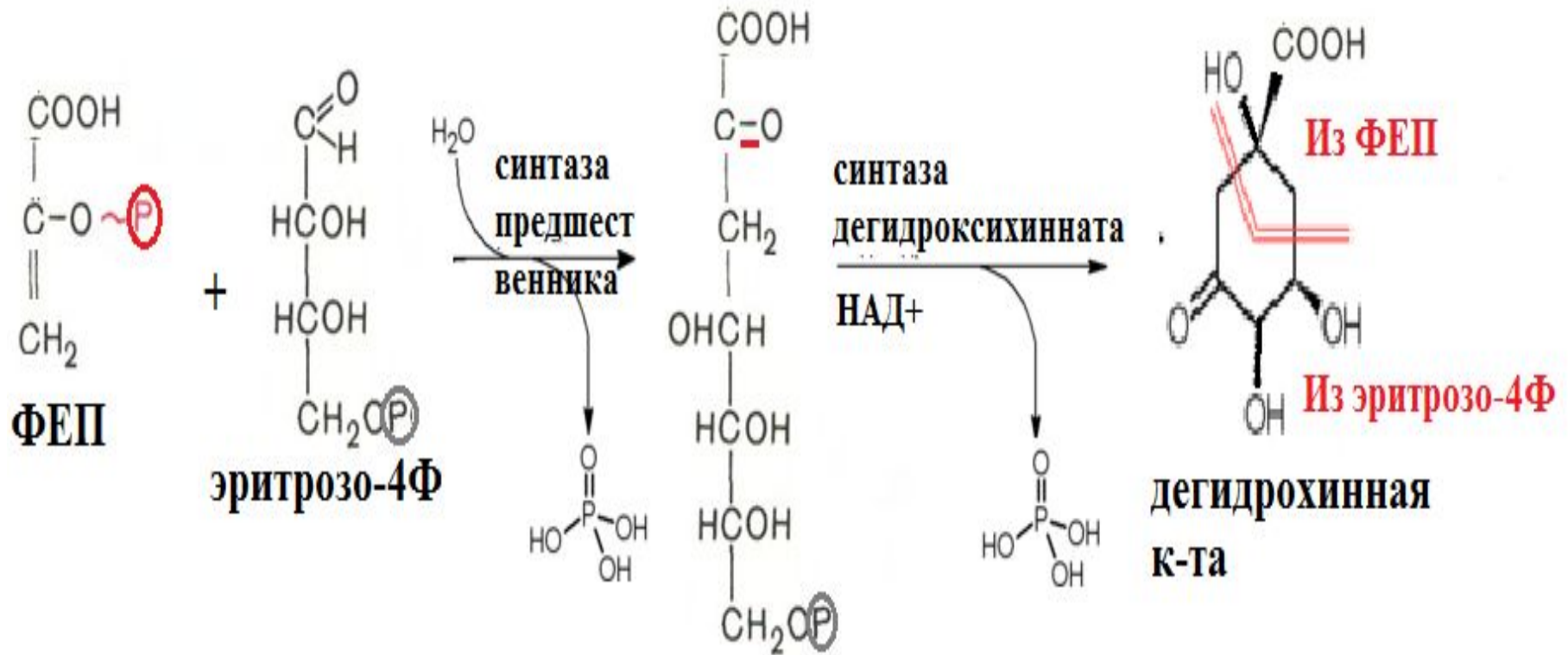


5'-ФОСФОРИБОЗИЛ-1'-ДИФОСФАТ

Семейство 5 (ароматические) – по *шикيماتному* пути

- 1) синтез дегидрохинной кислоты (дегидрохинната), у большинства видов - из эритрозо4Ф и ФЕП.
- 2) синтез шикимовой кислоты из дегидрохинната
- 3) синтез фенилаланина, тирозина, триптофана

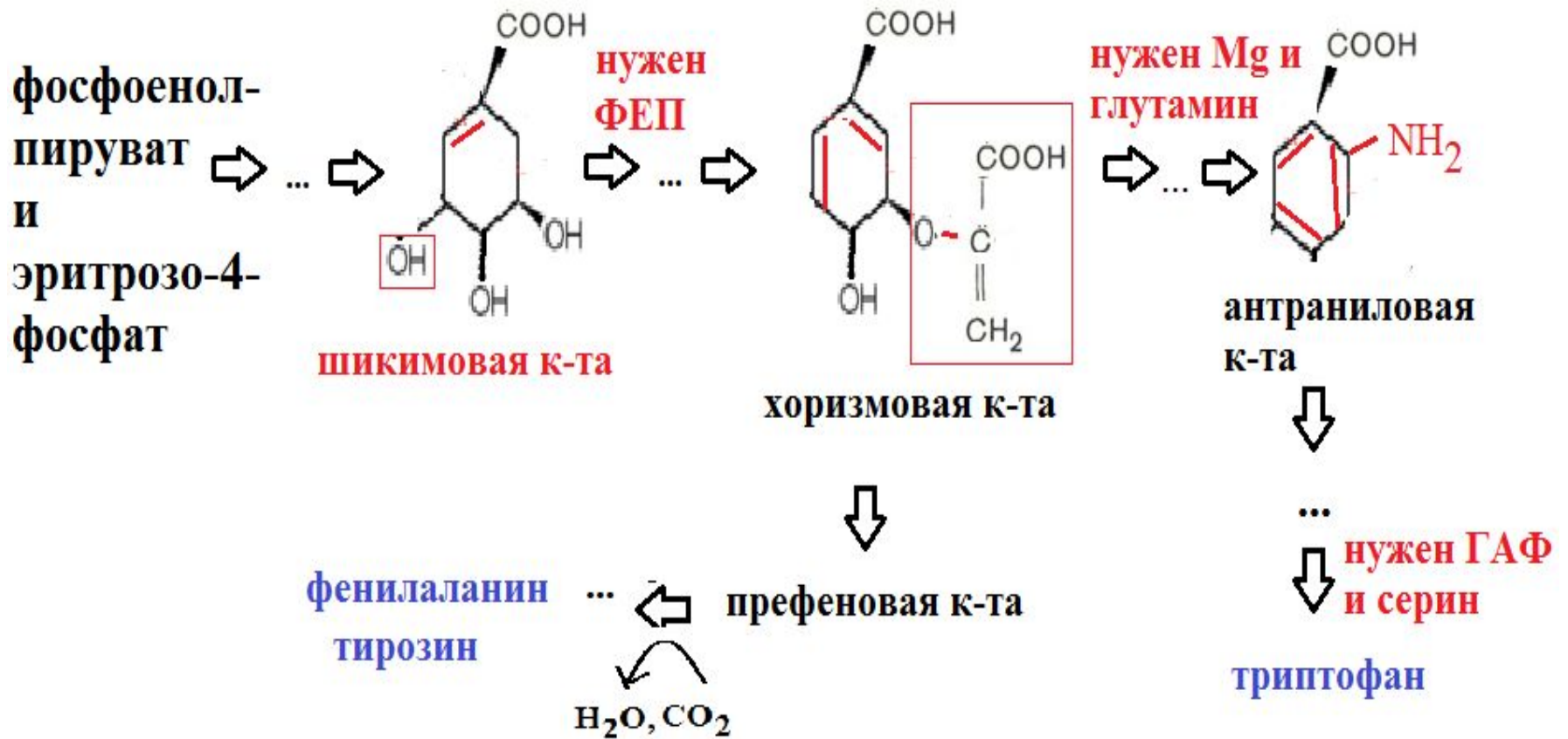
1) Основной путь синтеза дегидрохинната



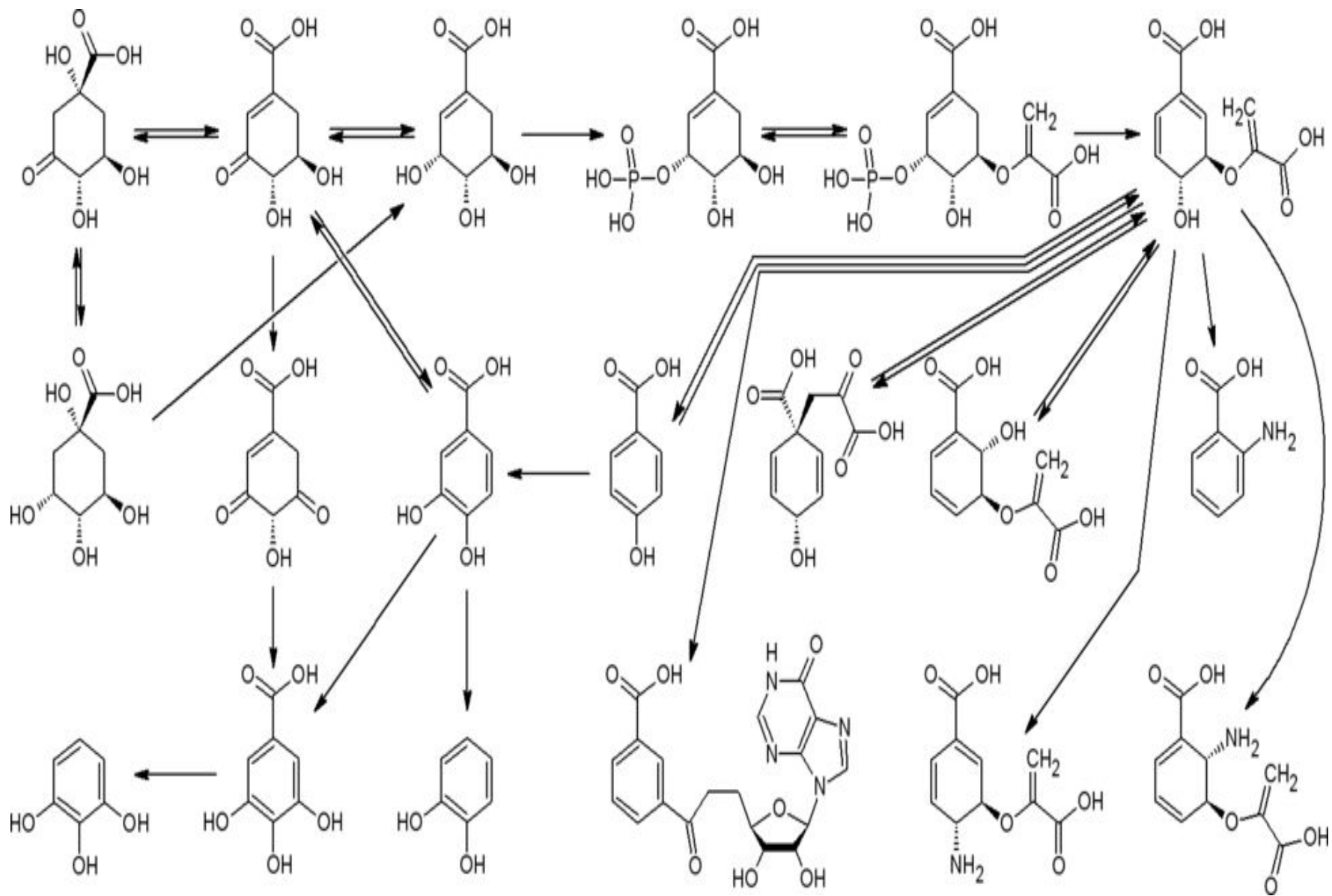
**7-углеродный
предшественник
в виде фосфата**

Главные ступени синтеза аминокислот из шикимата

! У животных *фен* и *тир* – не синтезируются, *тир* может синтезироваться только при наличии *фен*

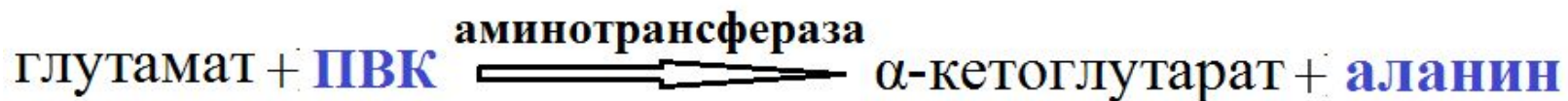


Шикиматный путь (начиная с дегидрохинната)



ИТОГО: основные пути синтеза белковых аминокислот

- 1) прямое восстановительное аминирование
 - 1а) – образование амидов
- 2) переаминирование

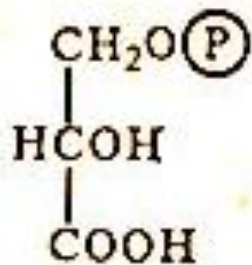


- 3) ферментативные превращения

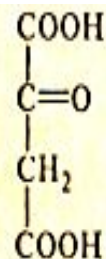
Ферментативные превращения в синтезе аминокислот

!!! У ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СИНТЕЗА НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ НЕТ НЕОБХОДИМЫХ ФЕРМЕНТОВ. ОТМЕТИТЬ НА СХЕМАХ СЕМЕЙСТВ НЕЗАМЕНИМЫЕ!

1) Семейства аминокислот 1 – 4 (на основе α -кетоглутаровой к-ты, ПВК, 3-ФГК и ЩУК).



3 ФГК

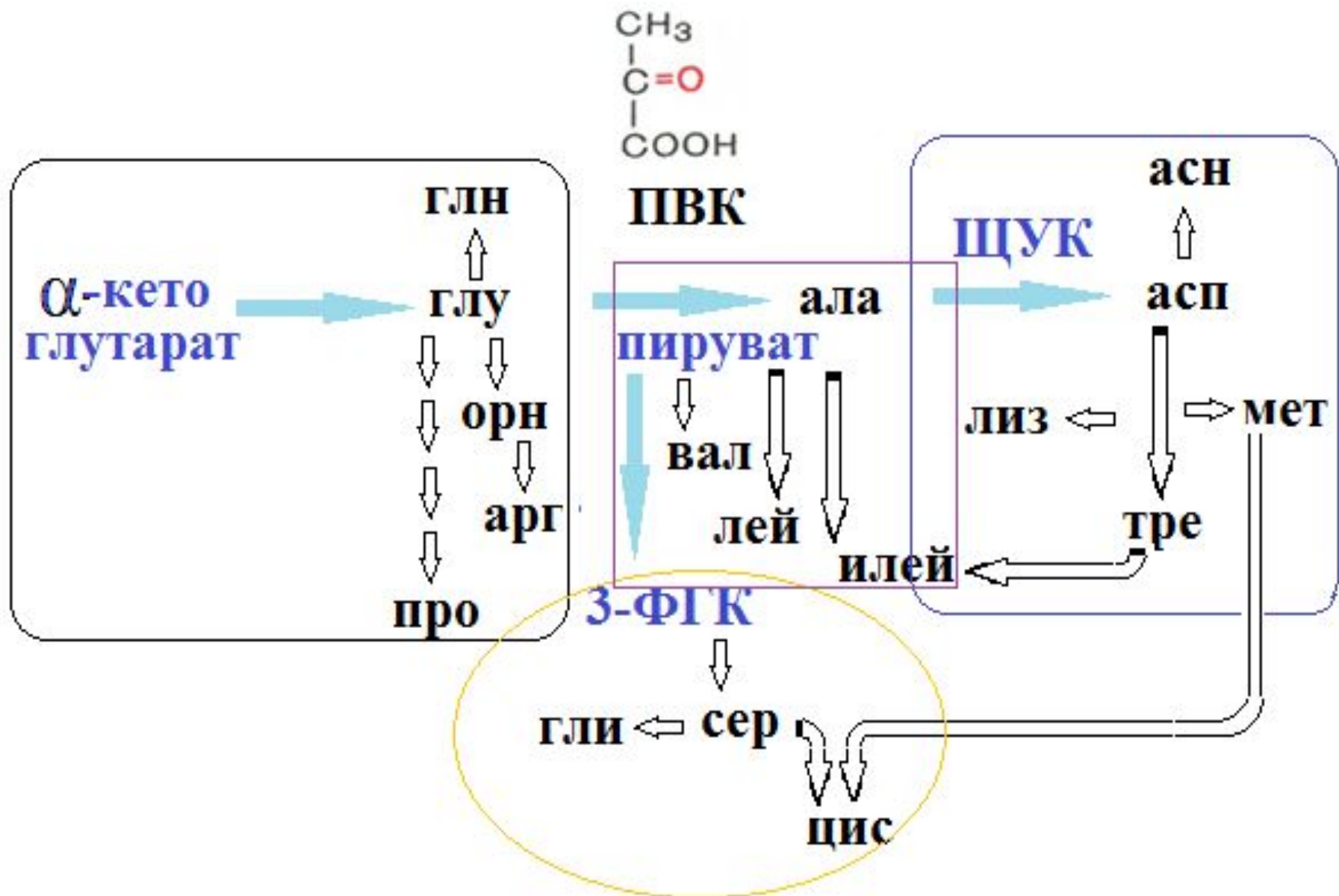


Щавелево-уксусная к-та
(ЩУК, оксалоацетат)

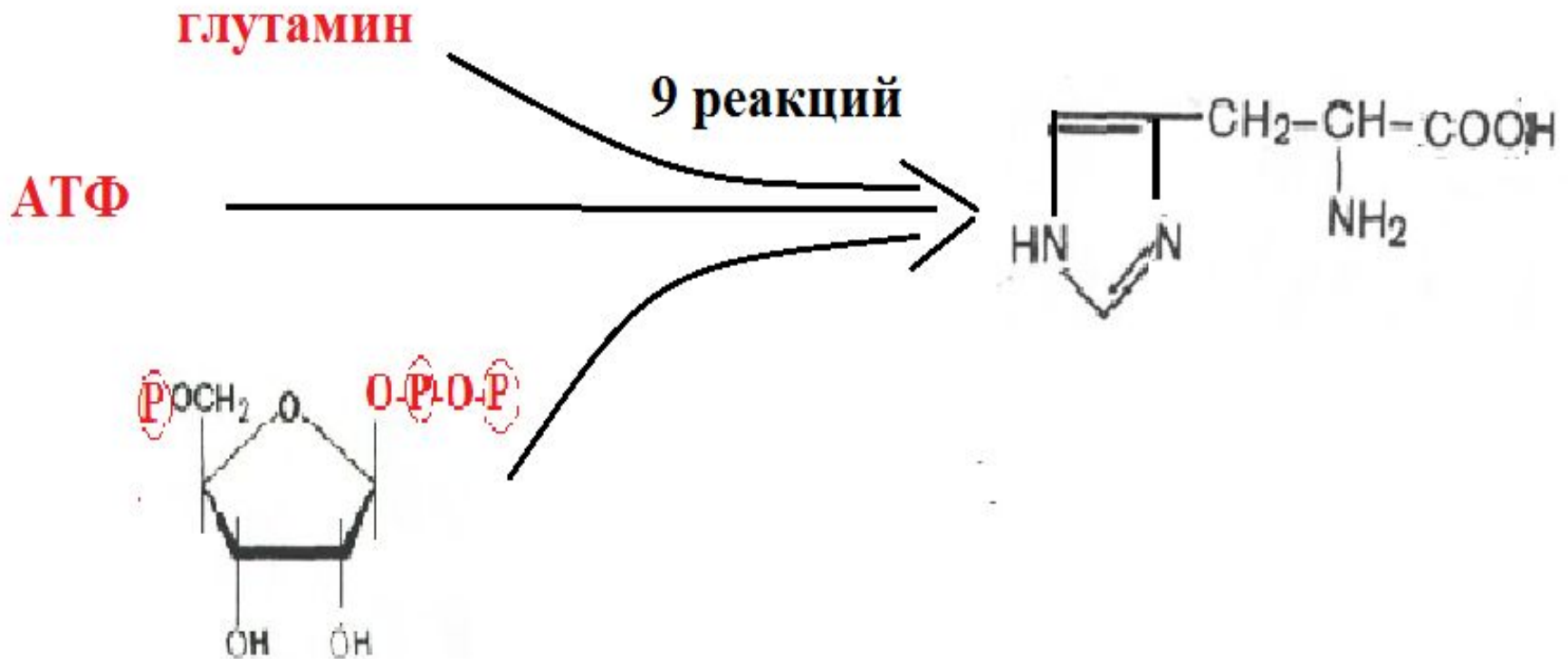
2) Гистидин

3) Ароматические аминокислоты
(шикиматный путь) (семейство 5)

Семейства аминокислот 1-4



Гистидин – особый путь ! У животных гис не синтезируется

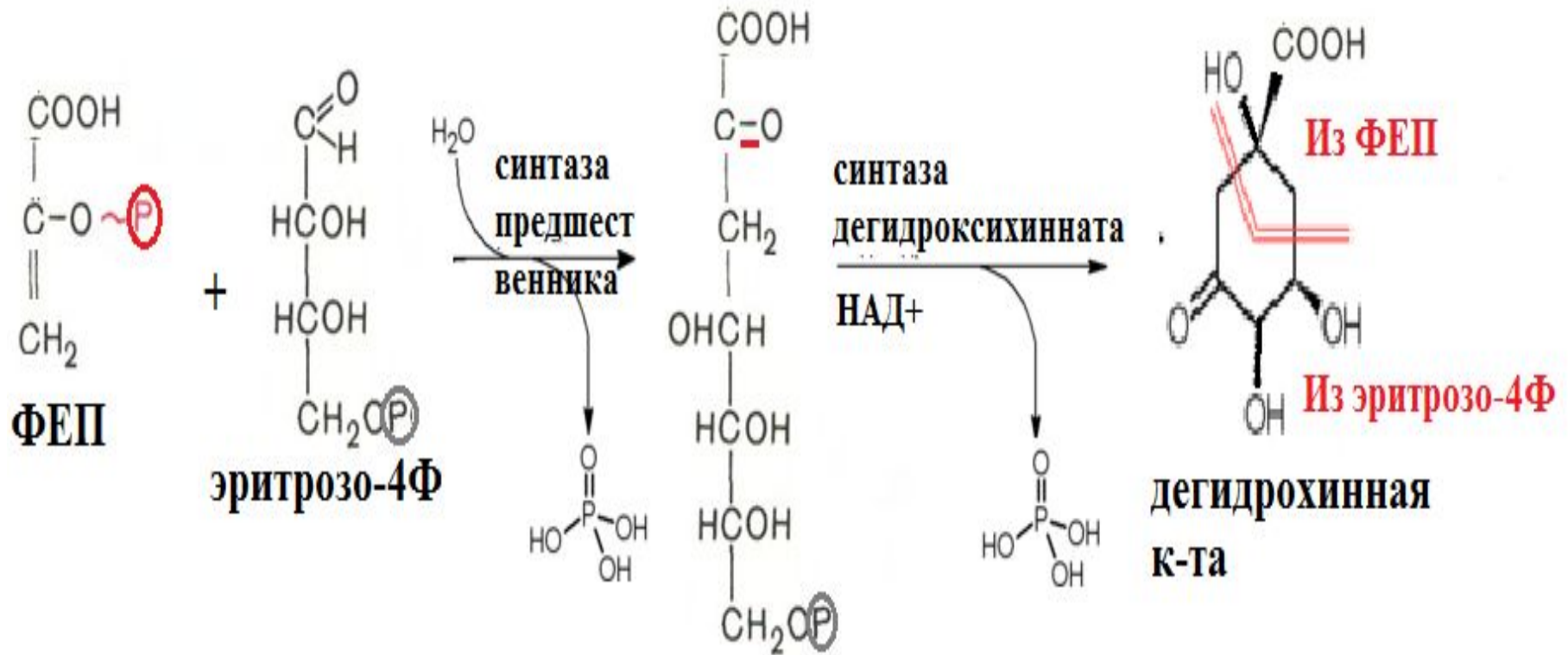


5'-ФОСФОРИБОЗИЛ-1'-ДИФОСФАТ

Семейство 5 (ароматические) – по *шикيماتному* пути

- 1) синтез дегидрохинной кислоты (дегидрохинната), у большинства видов - из эритрозо4Ф и ФЕП.
- 2) синтез шикимовой кислоты из дегидрохинната
- 3) синтез фенилаланина, тирозина, триптофана

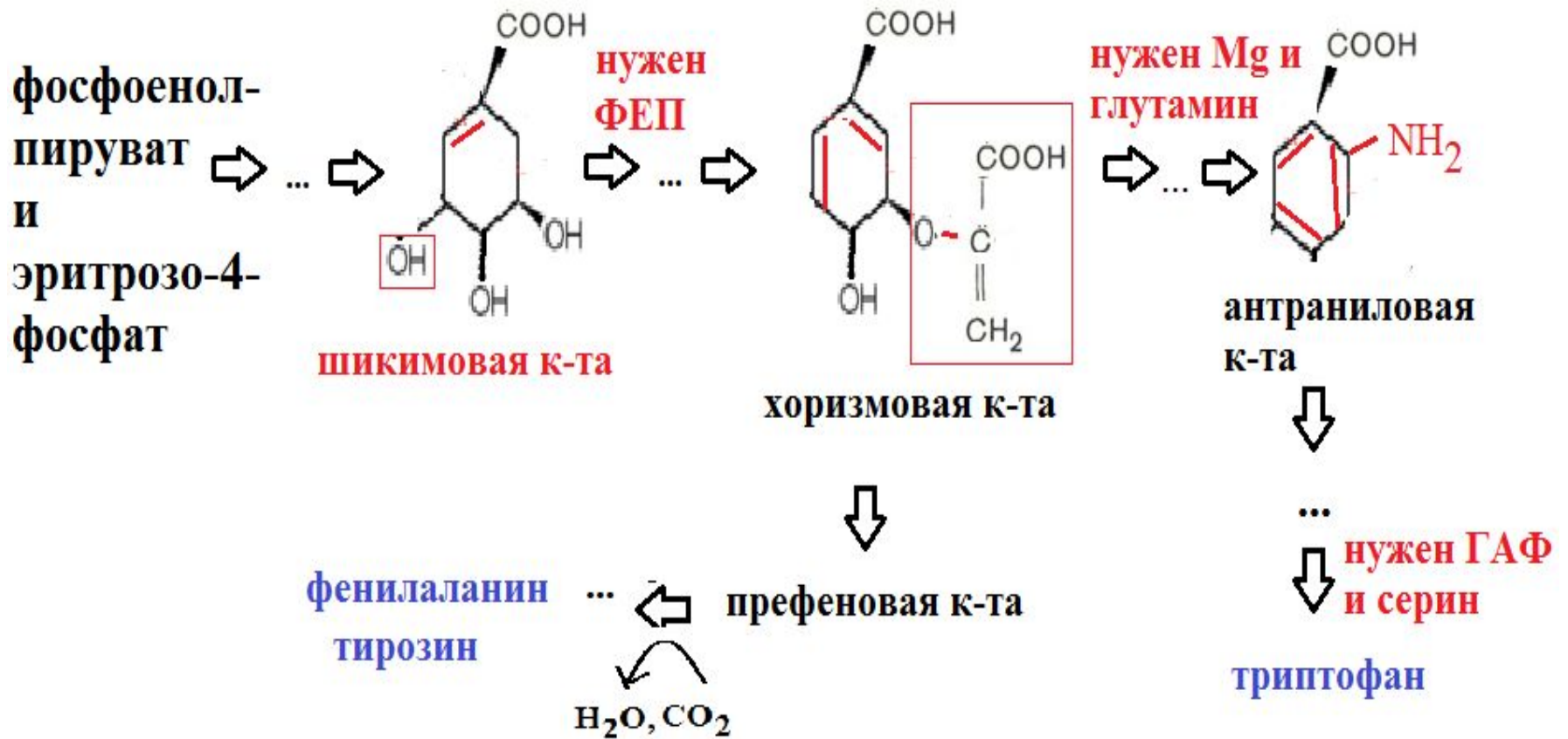
1) Основной путь синтеза дегидрохинната



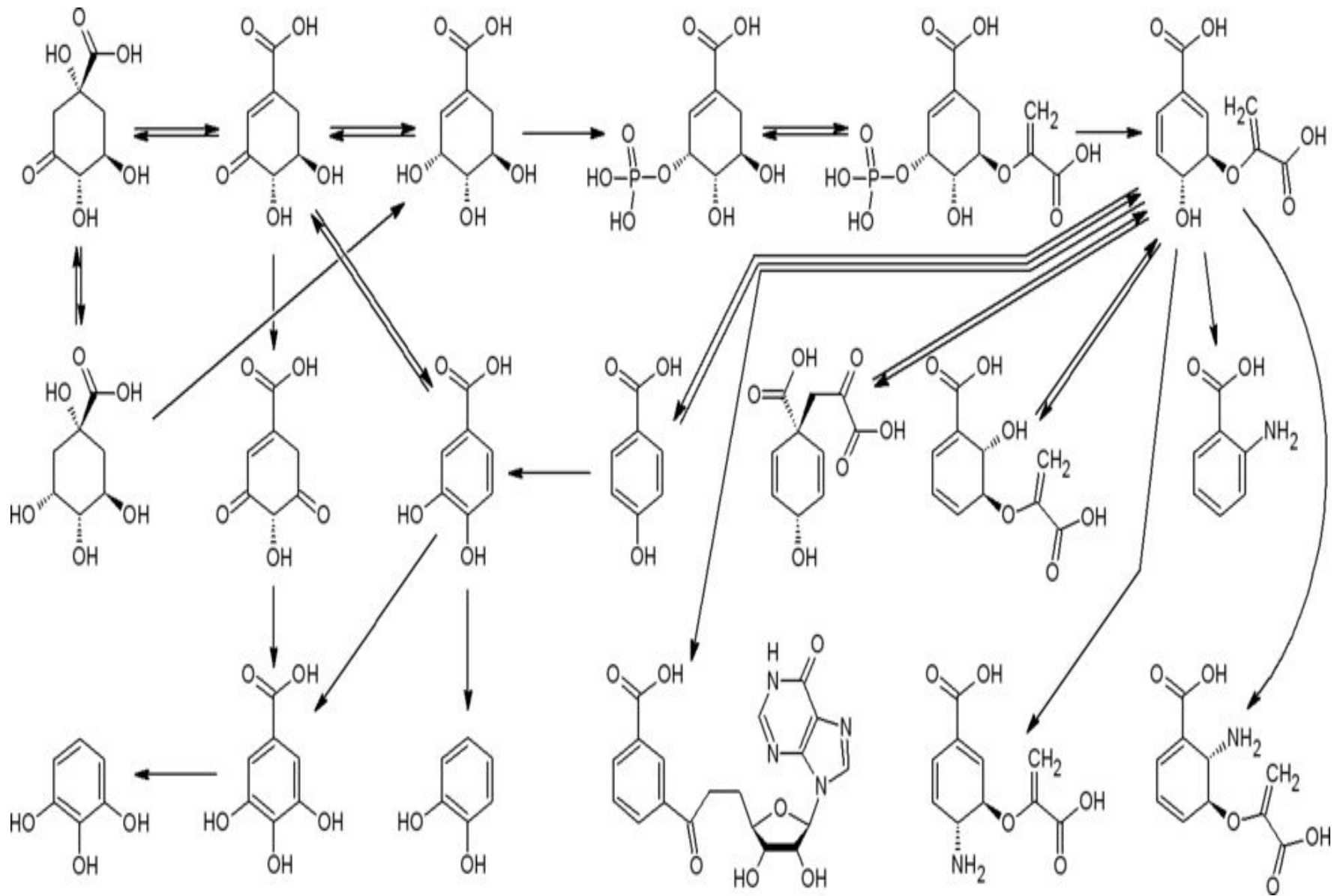
7-углеродный
предшественник
в виде фосфата

Главные ступени синтеза аминокислот из шикимата

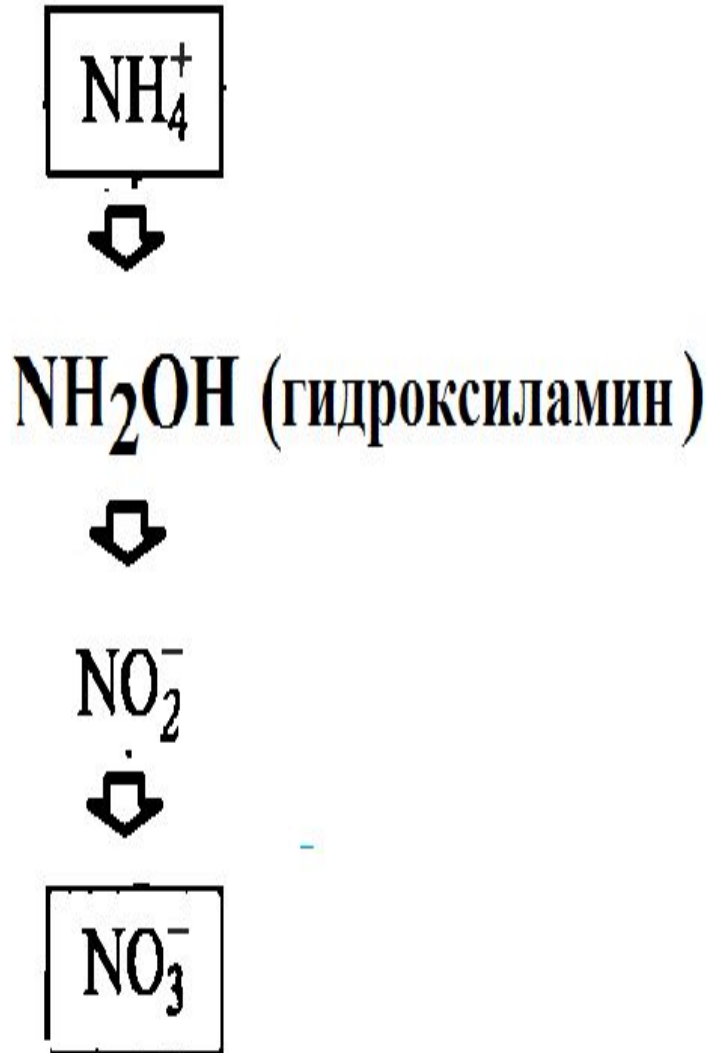
! У животных *фен* и *тир* – не синтезируются, *тир* может синтезироваться только при наличии *фен*



Шикиматный путь (начиная с дегидрохинната)



Если не в аминокислоты – то куда?

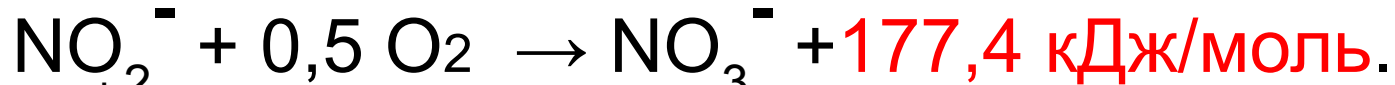


Нитрификация:

1) автотрофная (бактерии сем. *Nitrobacteriaceae*, археи), при окислении аммиака получающие энергию в виде АТФ, которую используют для фиксации CO_2 .

2) гетеротрофная (бактерии, грибы) – энергии не получают, процесс нужен для защиты от NH_4^+ , свободных радикалов и др.

Автотрофная нитрификация у бактерий



а) NH_4^{+2} в клетку – транспортный белок **Си-содержащая транслоказа**

б) образование нитрита через **гидроксиламин** (один набор видов бактерий)

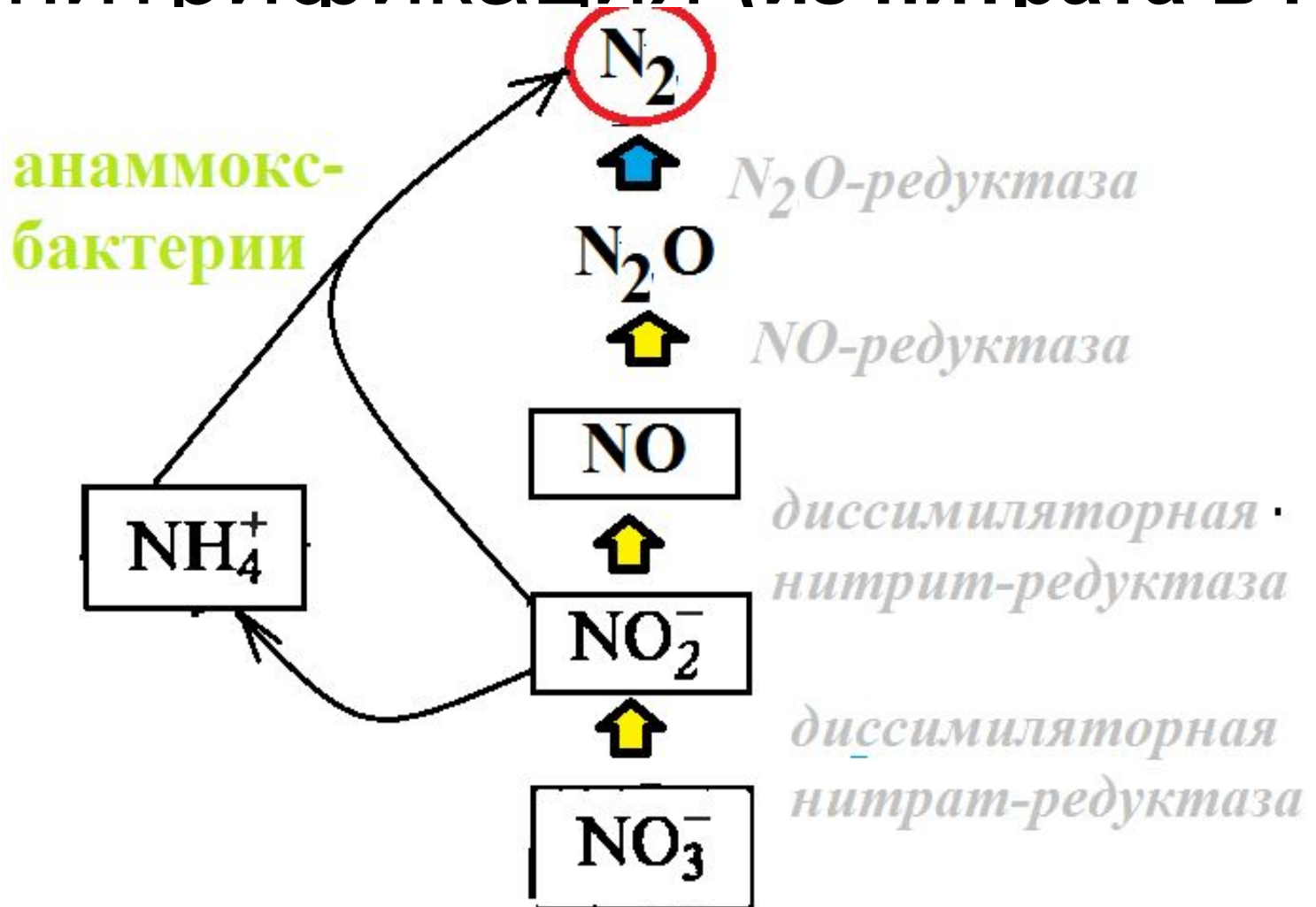


$\text{NH}_2\text{OH} + \text{O}_2 = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ - Работает дыхательная ЭТЦ (с FeS-белками-цитохромами), из-за чего выделяется энергия и запасается в виде **АТФ**.

в) образование нитрата из нитрита (другой набор видов) – **Мо-зависимая мембраносвязанная НИТРИТРЕДУКТАЗА**.

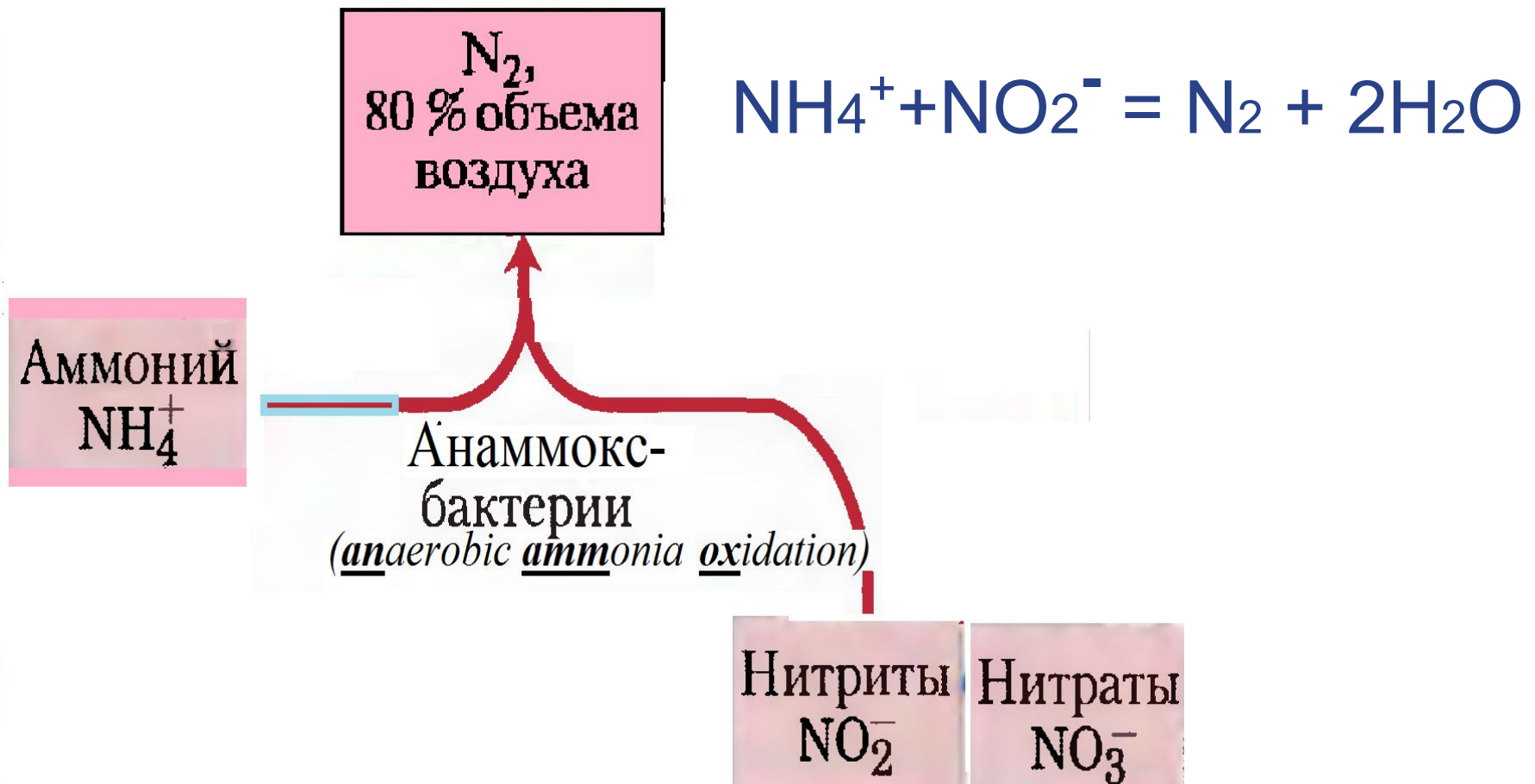
и ЭТЦ (с FeS-белками-цитохромами).

Денитрификация (из нитрата в N₂)



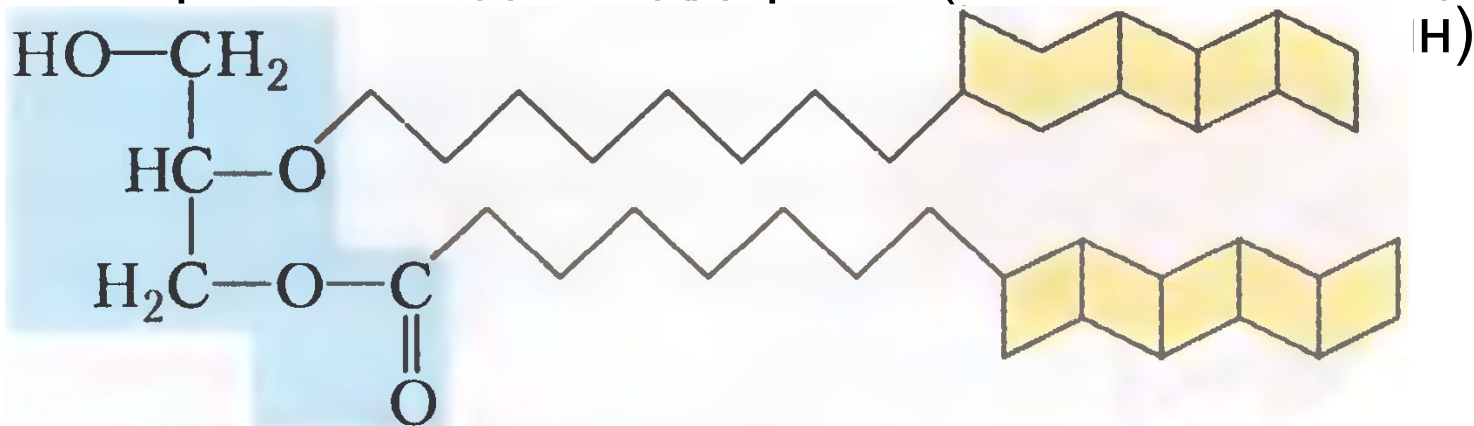
Денитрификация. Анаммокс

Недавнее открытие (1999г) – возможность окисления аммиака бактериями в анаэробных условиях

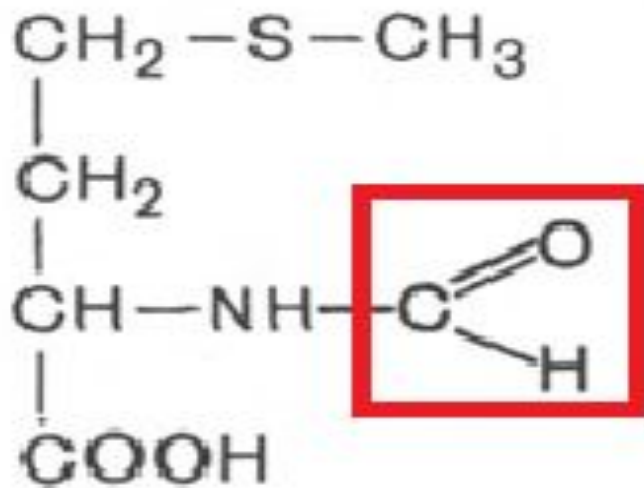


- Бактерии АНАММОКС – загадка на загадке...

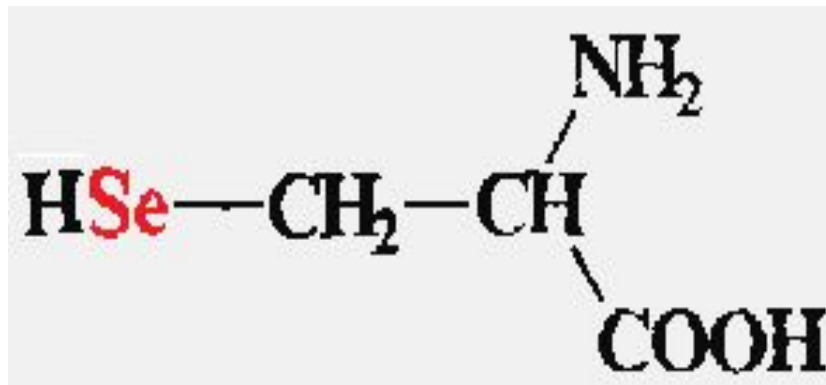
- до сих пор не выделены в чистую культуру (“кандидаты” в виды)
- нуклеоид в мембранной “оболочке” (рибоплазма - ядро?)
- анаммоксисома (до 50-70% объема клетки), в ее мембране липиды-ладдераны (*ladder* – лестница),



- не они ли LUCA - Last Universal Common Ancestor?



Формилметионин



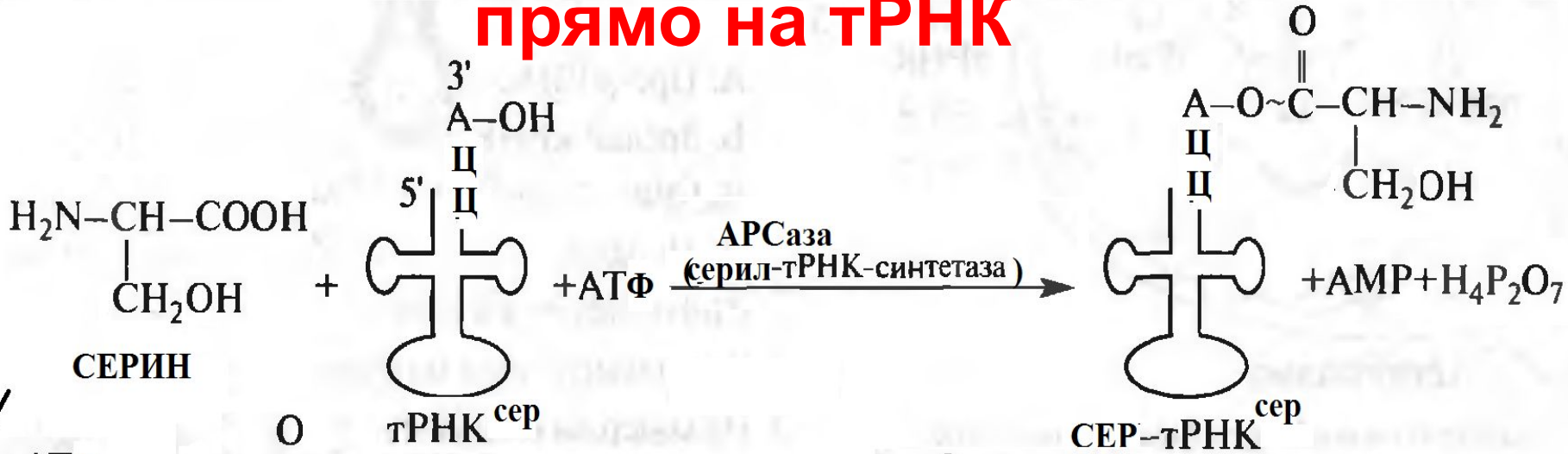
**Селеноцистеин
(Sec)**

Синтез формилметионина – прямо на тРНК, в 2 стадии



Селеноцистеин образуется из серина

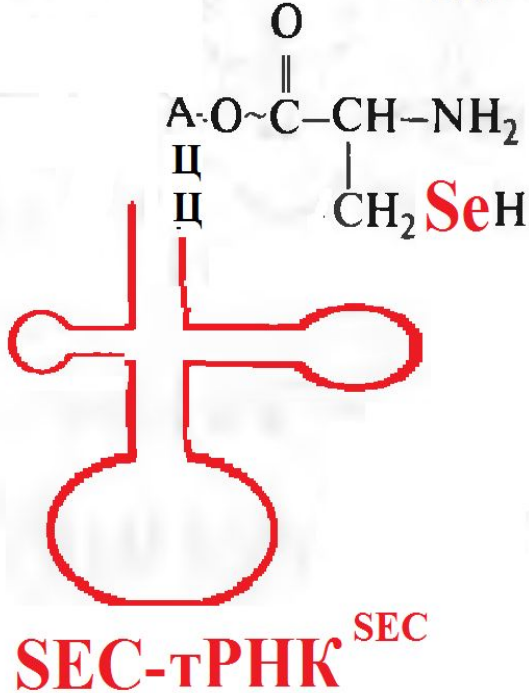
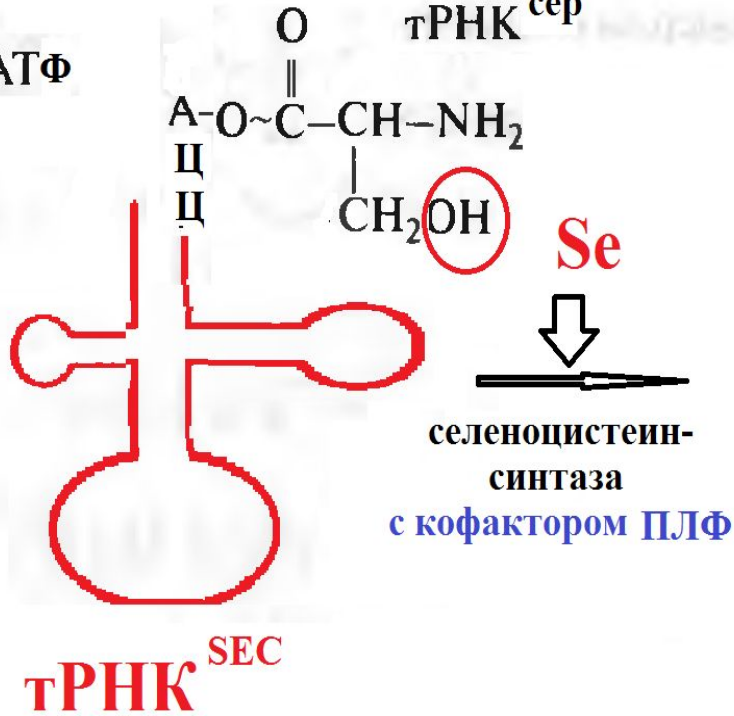
прямо на тРНК



серил-тРНК-синтетаза

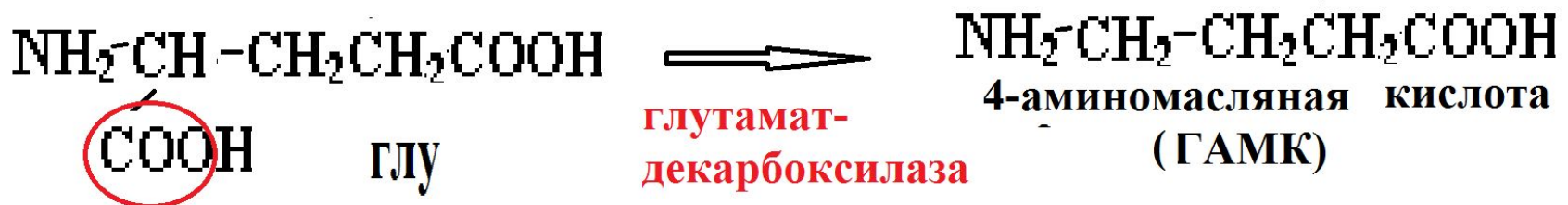
+АТФ

+



Сигнальная функция (ГАМК) и предшественник (глу)

γ-аминомасляная кислота (ГАМК)



КФ 4.1.1.15, активна в основном в сером веществе мозга, кофактор ПЛФ

- основной нейромедиатор торможения, рецепторы ГАМК А и ГАМК С – ионные каналы, активация которых блокирует передачу нервного импульса
- усилитель усвоения и переработки глюкозы в ЦНС (→ больше АТФ)
- В 2007 г. рецепторы ГАМК найдены и в эпителии дых. путей (участие в развитии астмы?).

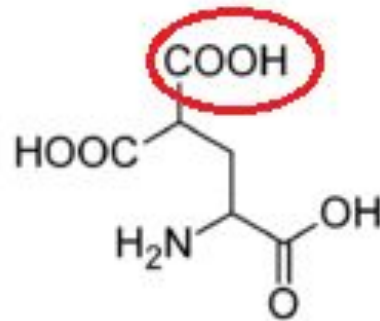
Синтез нетипичных аминокислот ПОСЛЕ построения белка

нужно:

- для выполнения функций,
- регуляции функционирования
- определения местоположения белка-мишени.



Появление OH-важно для сшивок между коллагеновыми волокнами

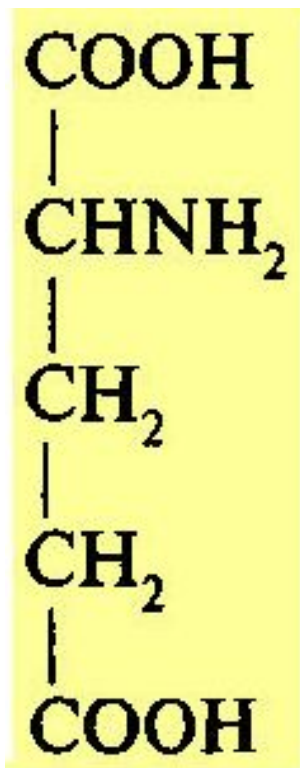


γ -карбокситаминовая к-та

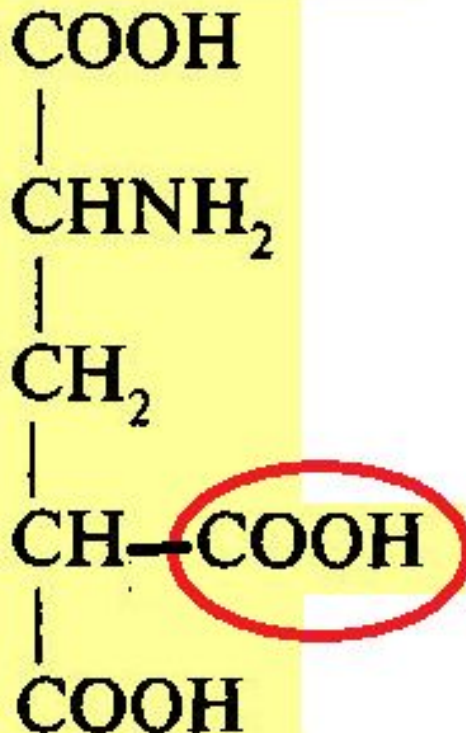
РЕАКЦИИ

- **Ацилирование (метилирование и др.)** по $-NH_2$ -группе бокового радикала ЛИЗ и АРГ – для нейтрализации +‘ заряда
- **фосфорилирование** по $-OH$ группе СЕР и ТРЕ – для приобретения ‘-‘ заряда
- **фарнезилирования** остатков ЦИС (например, в G-белках) для закрепления их в мембране. Присоединяется изопрен из фарнезил-пирофосфата – промежуточного продукта синтеза холестерина.

Роль γ -карбоксиглутаминовой кислоты в улучшении связывания Ca^{2+}



ГЛУ



γ -карбоксиГЛУ

Фермент - **глутаминкарбоксилаза**

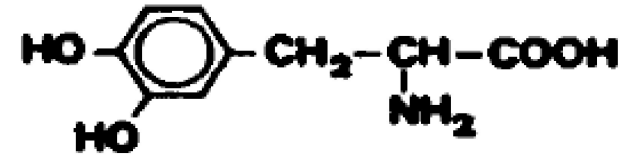
Образуется ПОСЛЕ
ТРАНСЛЯЦИИ (из ГЛУ,
находящейся уже в составе
белка) в N-области
протромбина.. Появление
еще одной COOH -группы
нужно для улучшения
связывания ионов Ca^{2+} ,
что важно для
инициации свертывания
крови

ЗАЩИТА. Аминокислоты - токсины

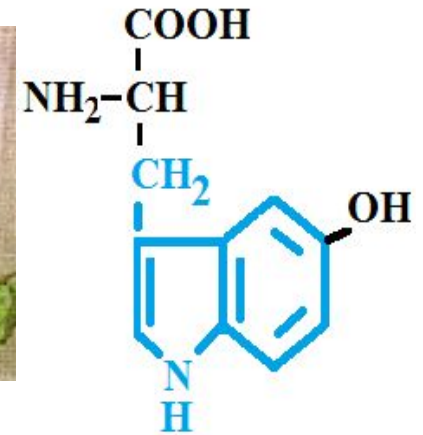
Мисина (сем. Бобовые) – зудящие бобы



3,4-дигидроксифенилаланин

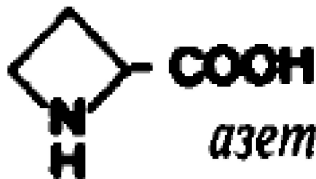


Гриффония (Griffonia simplicifolia, сем. Бобовые)

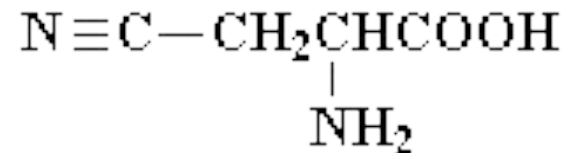


5-гидрокситриптофан

Ландыш, юкки

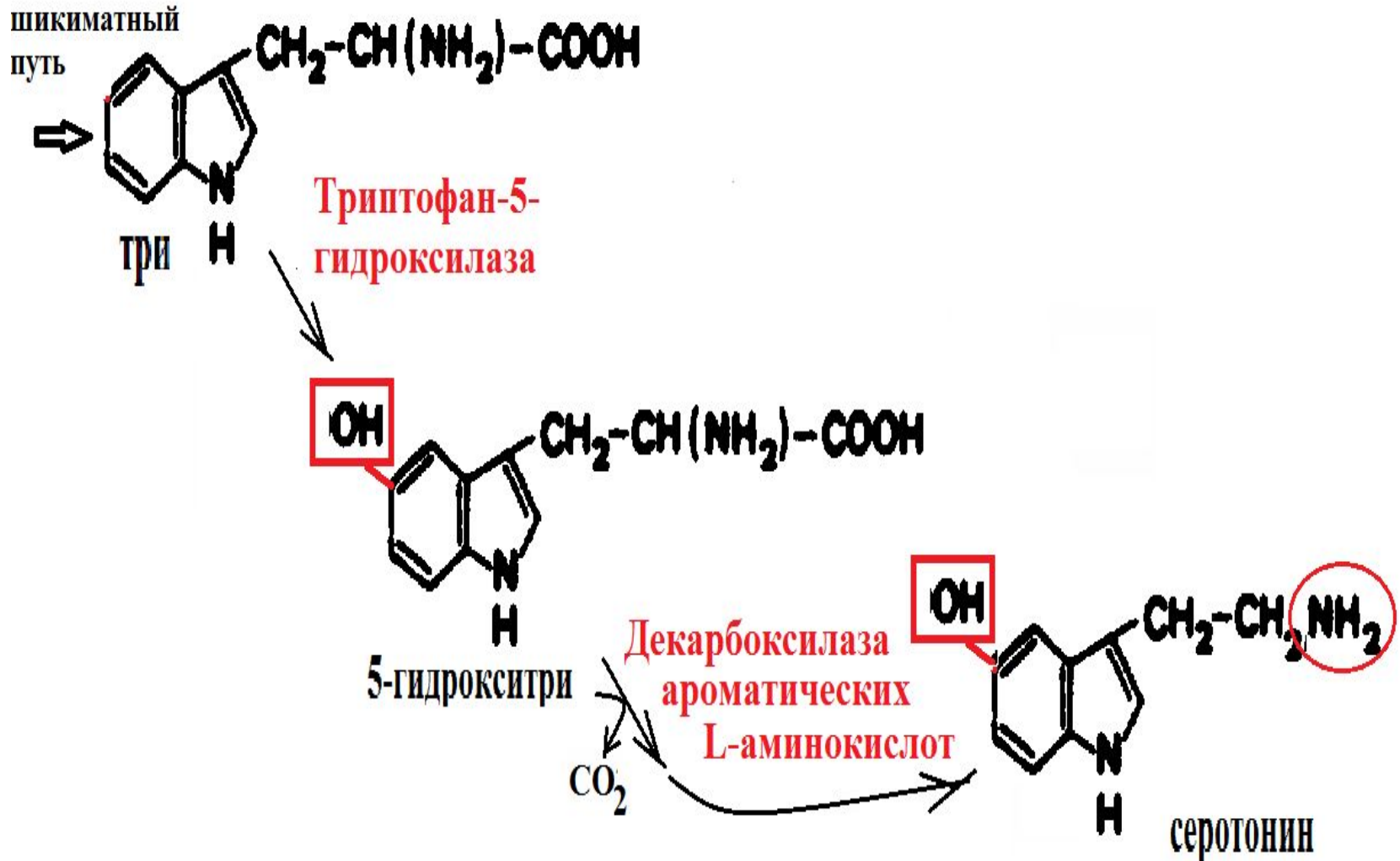


азетидин-2-карбоновая кислота



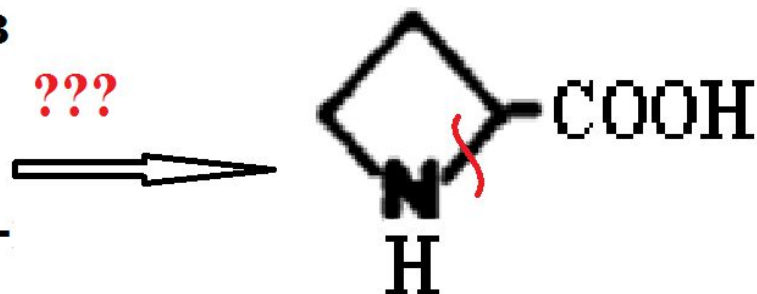
цианаланин

как в синтезе серотонина

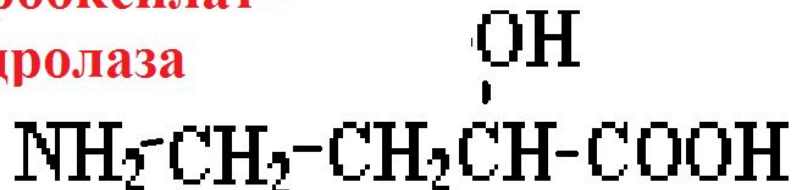
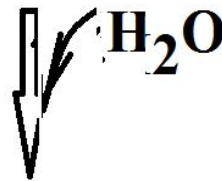


Синтез азетидин-2-карбоновой кислоты

предположительно либо из метионина, либо из гомо-серина через различные производные аминокислотной кислоты



у некоторых бактерий
азетидин-2-карбоксилат-гидролаза



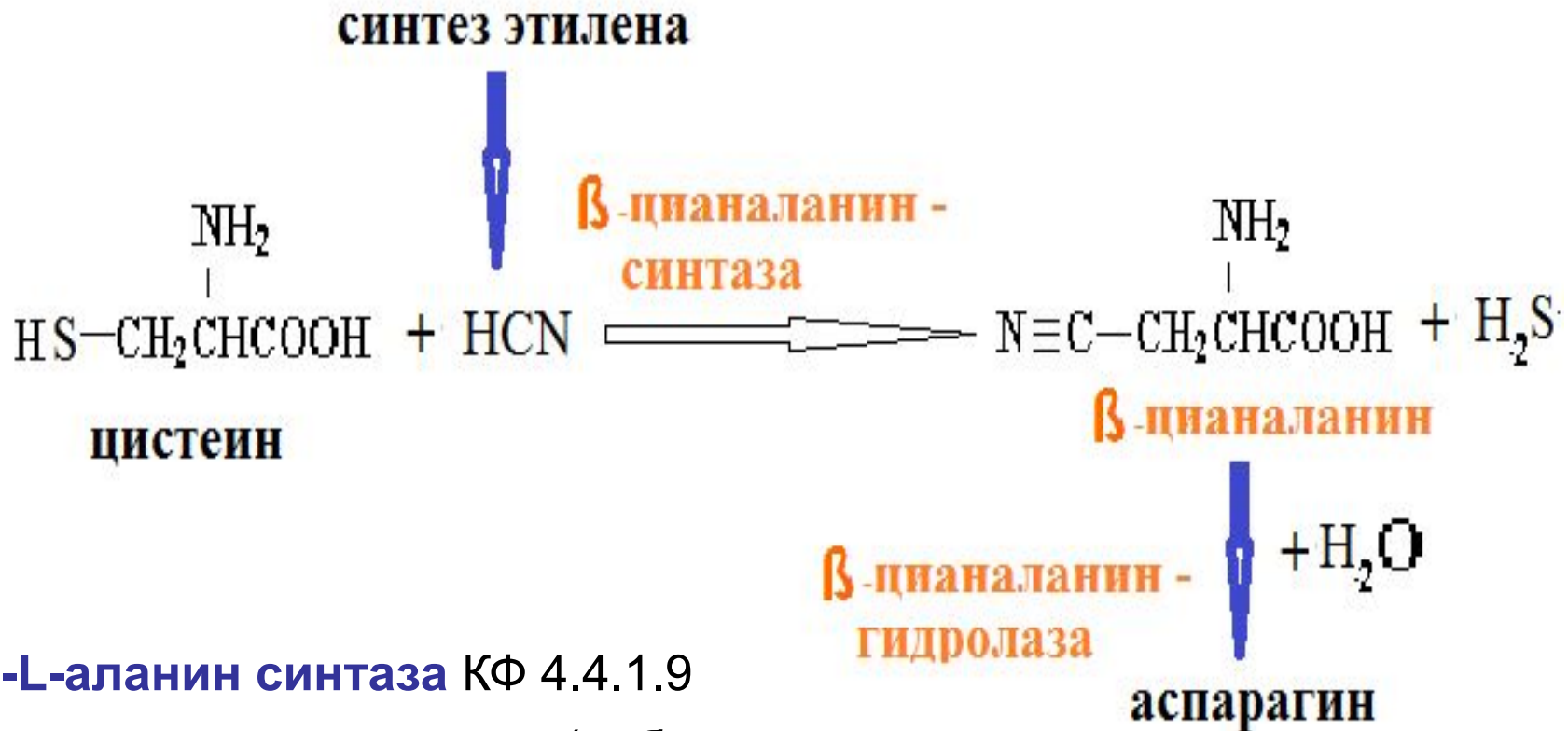
2-гидрокси-4-аминомасляная кислота
(гидроксиГАМК)

У ряда *Streptomyces* - антибиотик и сильный токсин для человека.



Синтез β-циан(о)аланина - токсина

бобовых (*Lupinus angustifolia*, *Lathyrus cicera* и др., виды р. *Vicia*). При питании вызывает **латиризм** – параличи у человека и животных из-за нейротоксического действия на спинной мозг (Франция, Италия, Алжир, Ост-Индия).



β-циан-L-аланин синтаза КФ 4.4.1.9

(L-цистеин-сероводород-лиаза (добавляющая

HCN), ее кофактор пиридоксальфосфат

Предшественник...(асп). Защита.

Синтез β -аланина (у м/о) – из асп

