

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

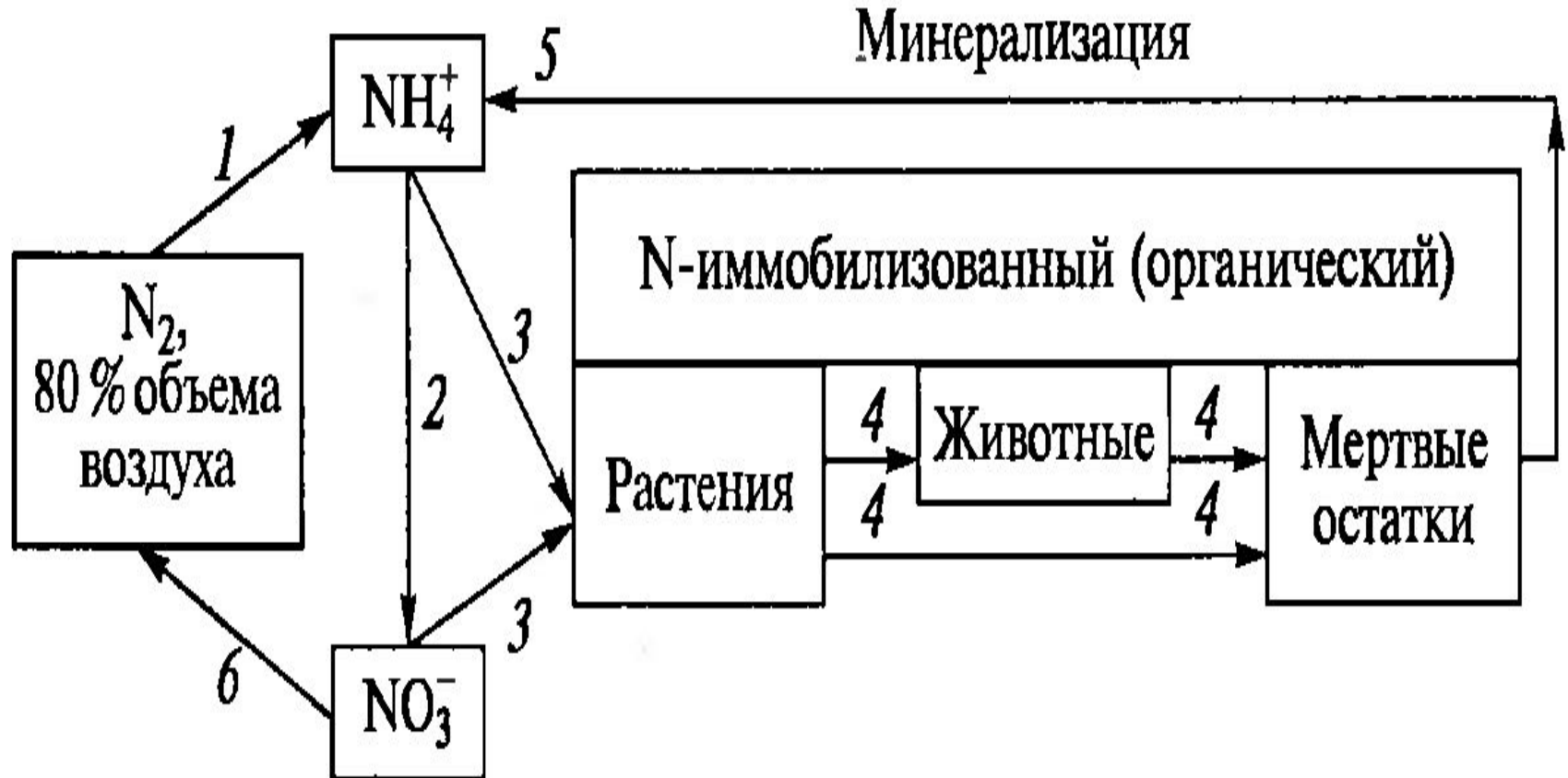
Для синтеза *заменяемых* аминокислот
человеку и животным подходит
ТОЛЬКО NH_3 (в воде NH_4OH , NH_4^+)

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



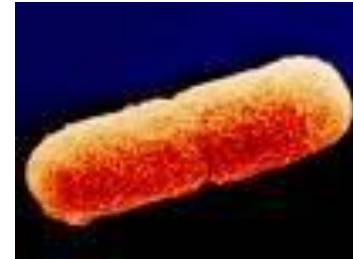
1) диазотрофы 2) нитрификация (бактерии) 3) поглощение и ассимиляция NH_4^+ и NO_3^- 4) поедание организмов другими и отмирание организмов 5) аммонификаторы, минерализация азота 6) денитрификаторы

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



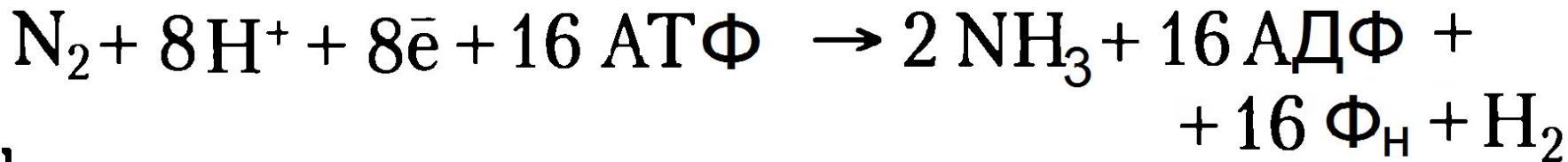
Повсеместность азотфиксации

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

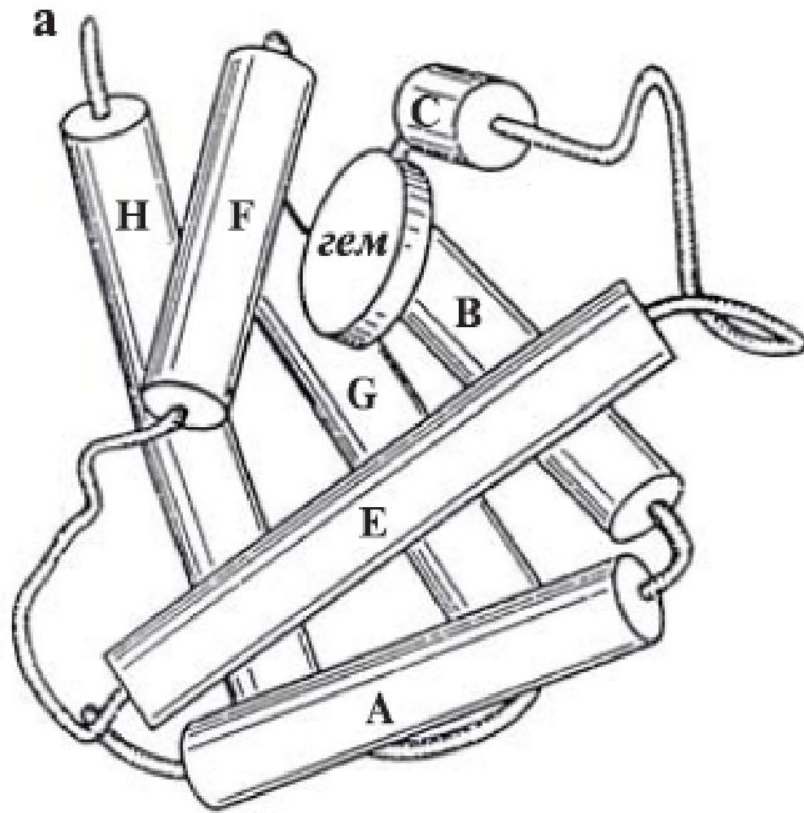


У *Rhizobium* для восстановления $1N_2$ может идти от 12 до 35

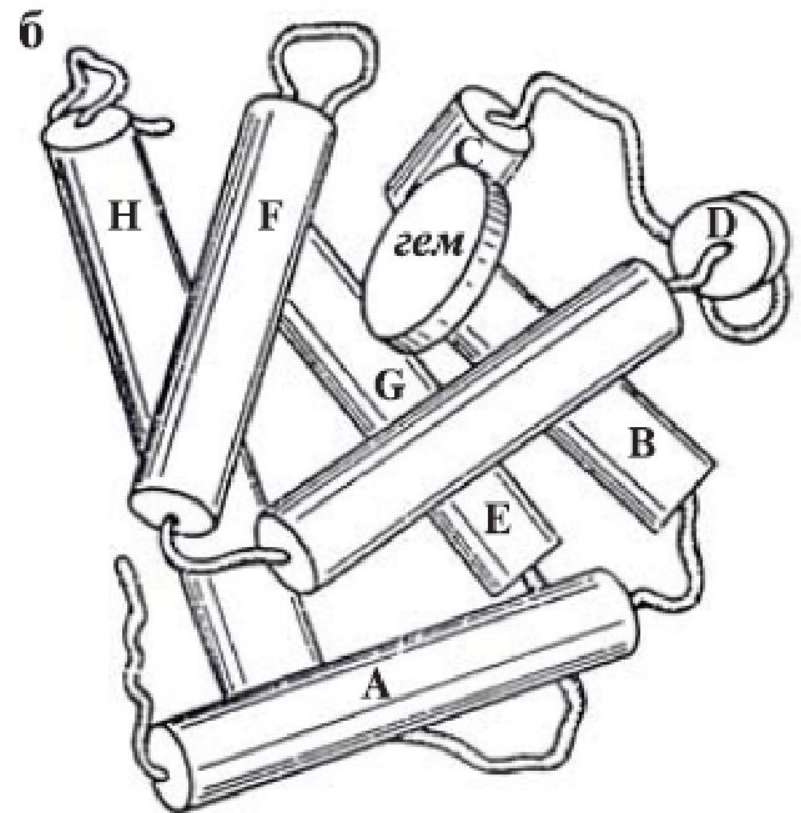
АТФ – для 12 АТФ см. Анисимов с. 247

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

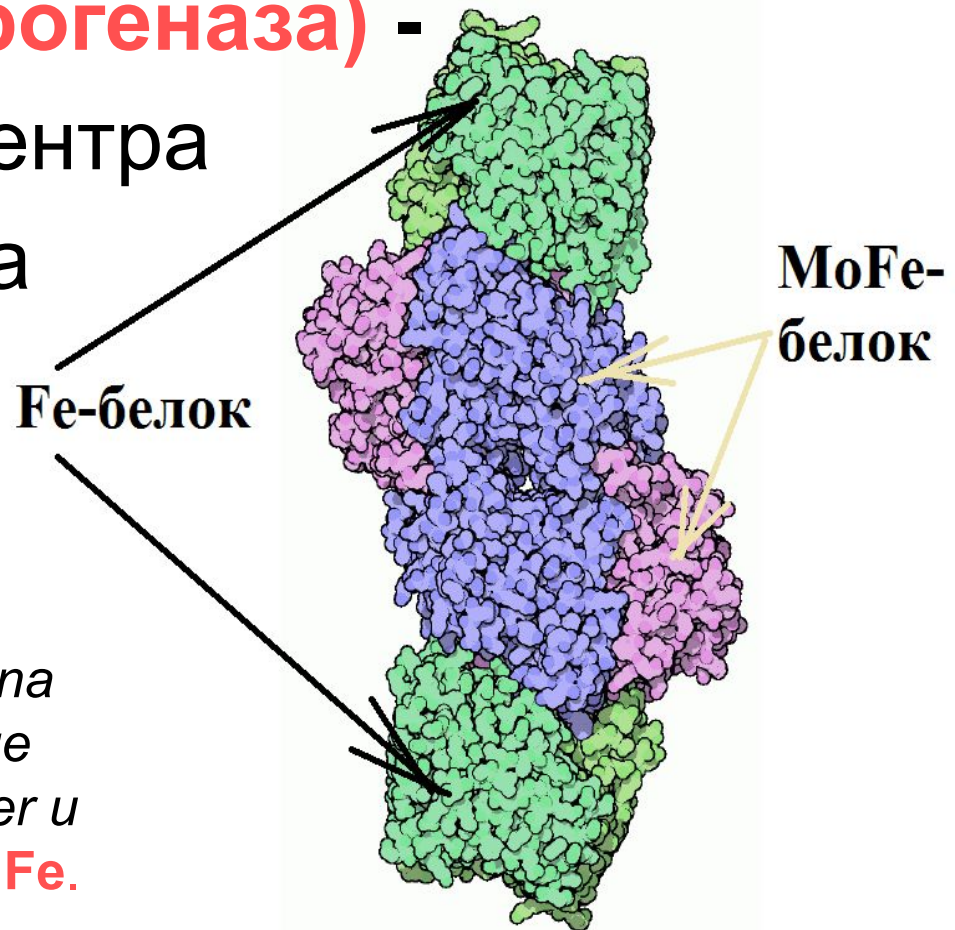


Миоглобин кашалота

- “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)

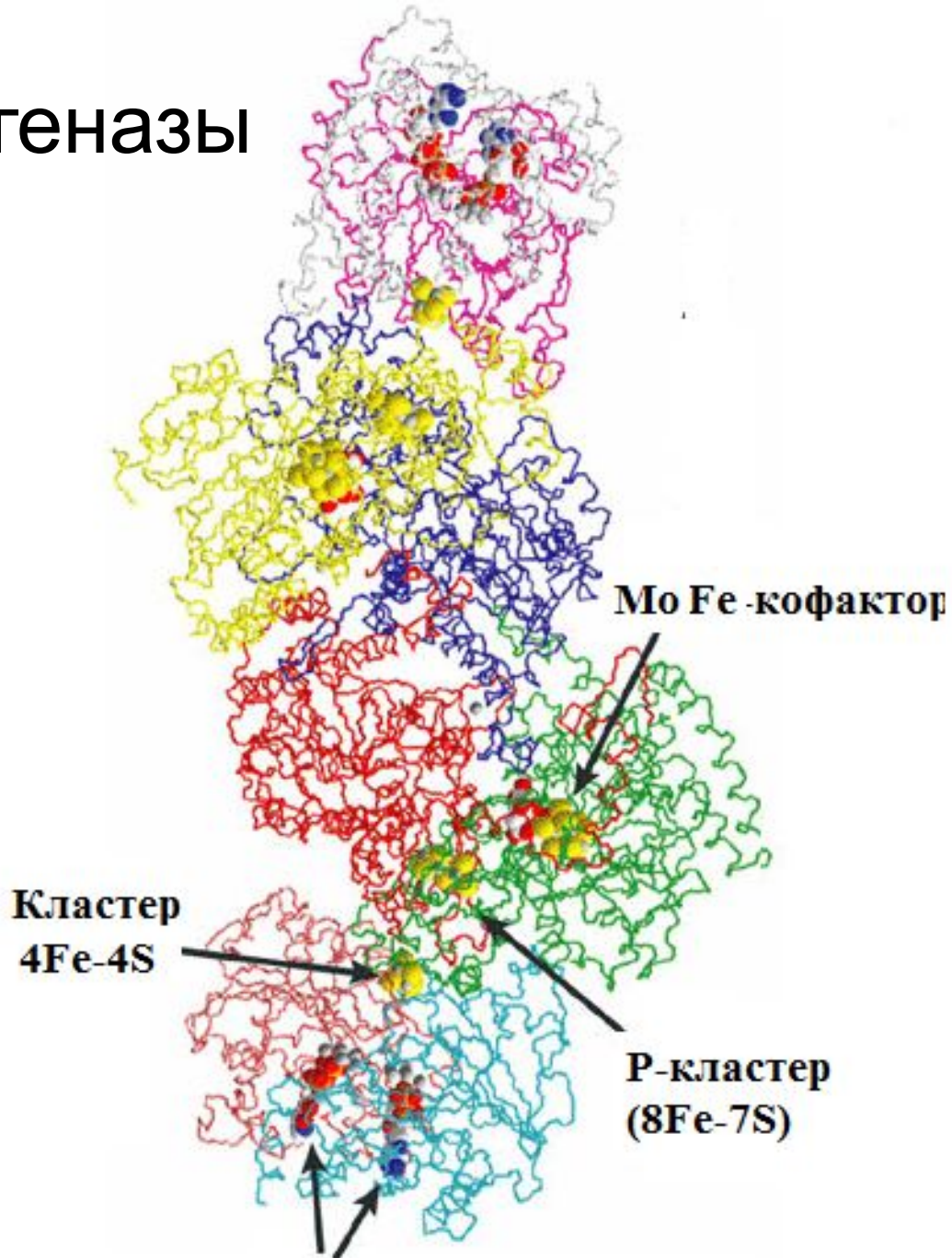
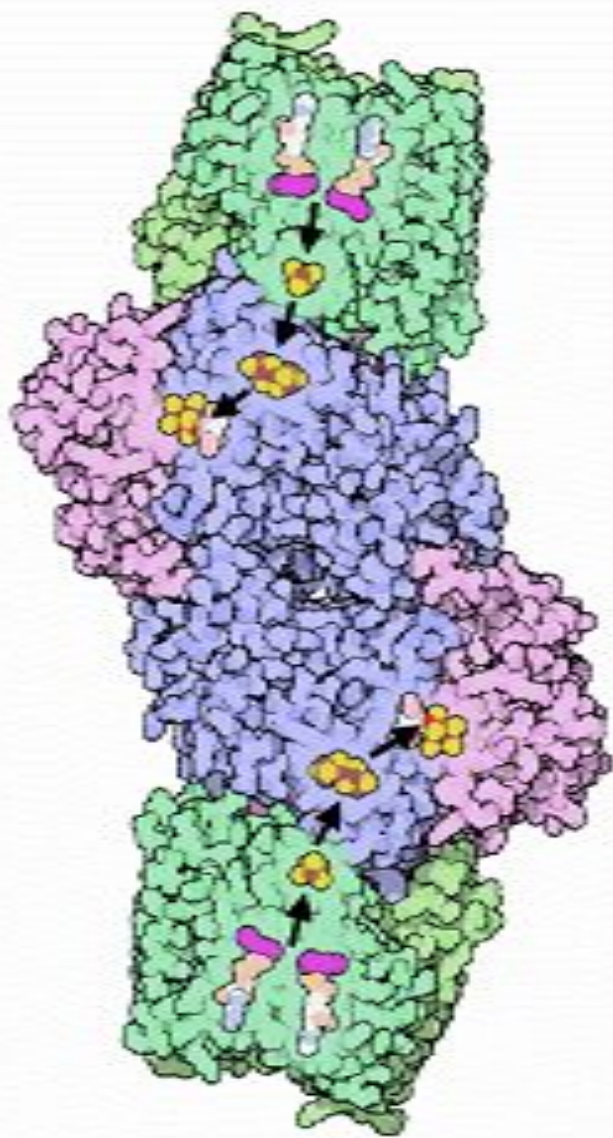
Нитрогеназный комплекс

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

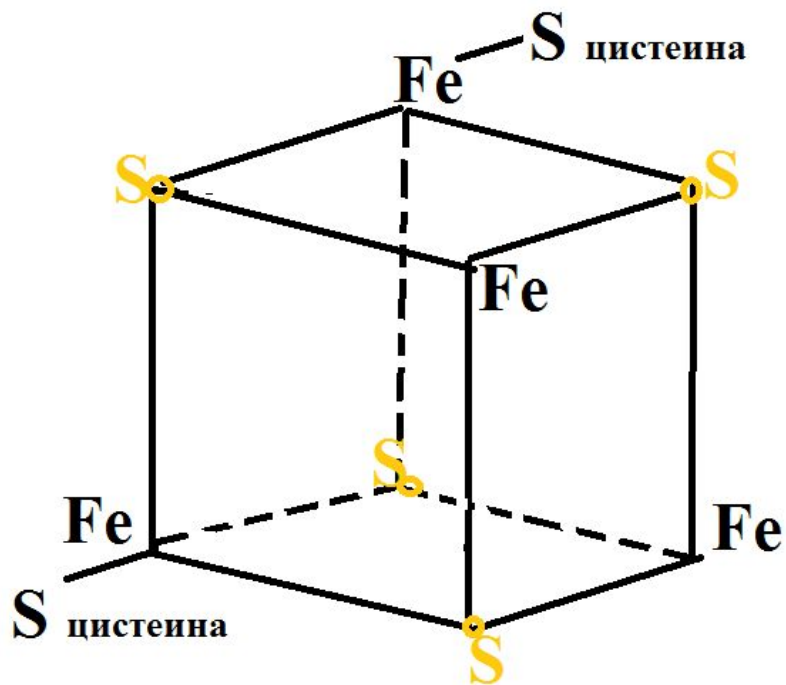


У *Clostridium*, *Azotobacter* и *Anabaena* бывают нитрогеназы, содержащие **ванадий**, у *Azotobacter*, *Rhodobacter* и *Rhodospseudomonas* – содержащие **Fe**.

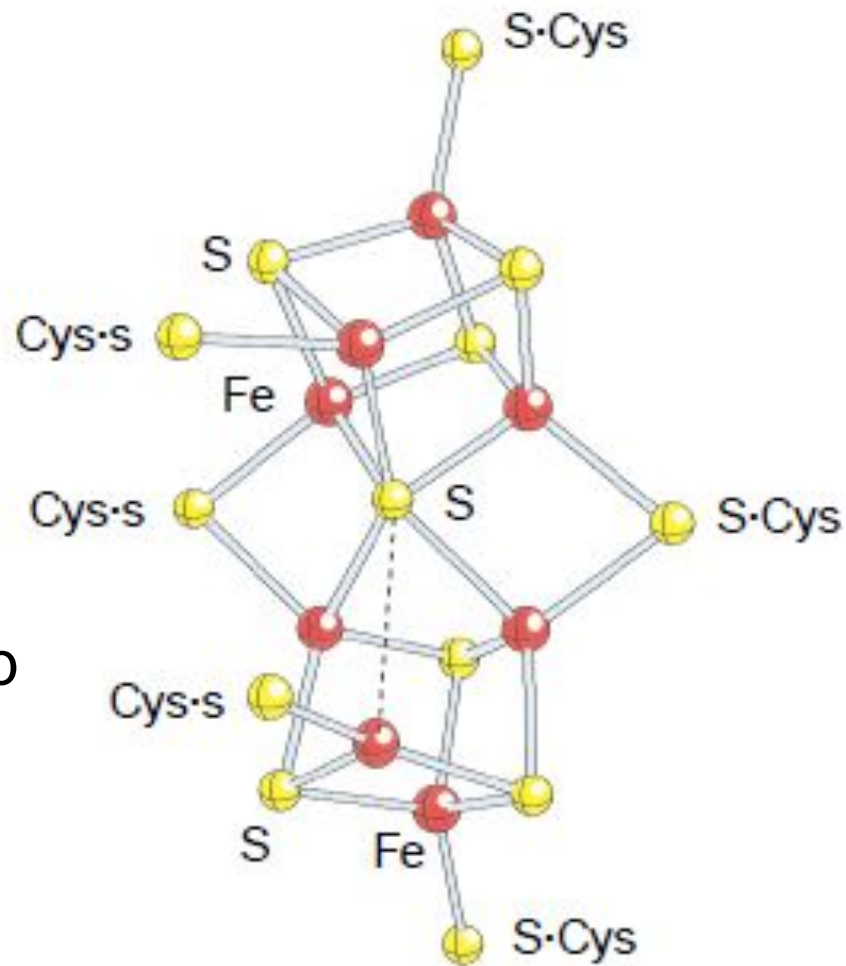
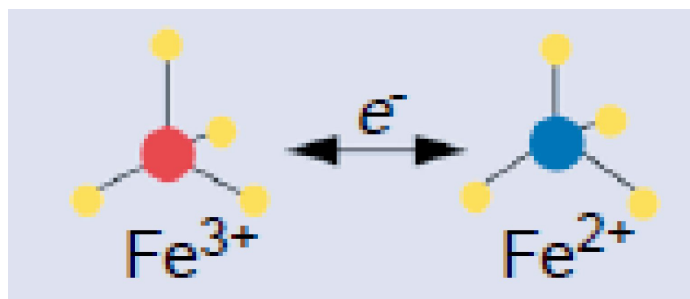
Кластеры нитрогеназы



FeS-центры в Fe-белке



4Fe-4S-кластер

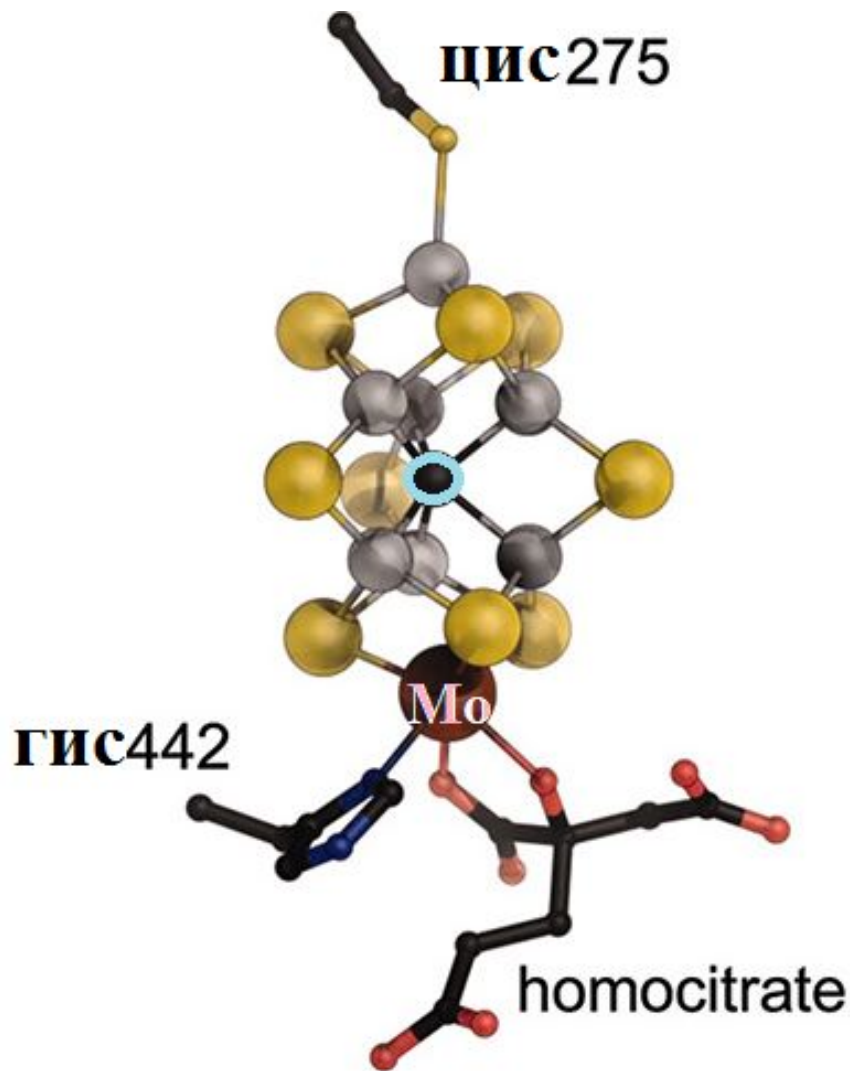


P-кластер (8Fe-7S)

MoFe-кофактор: что в центре?

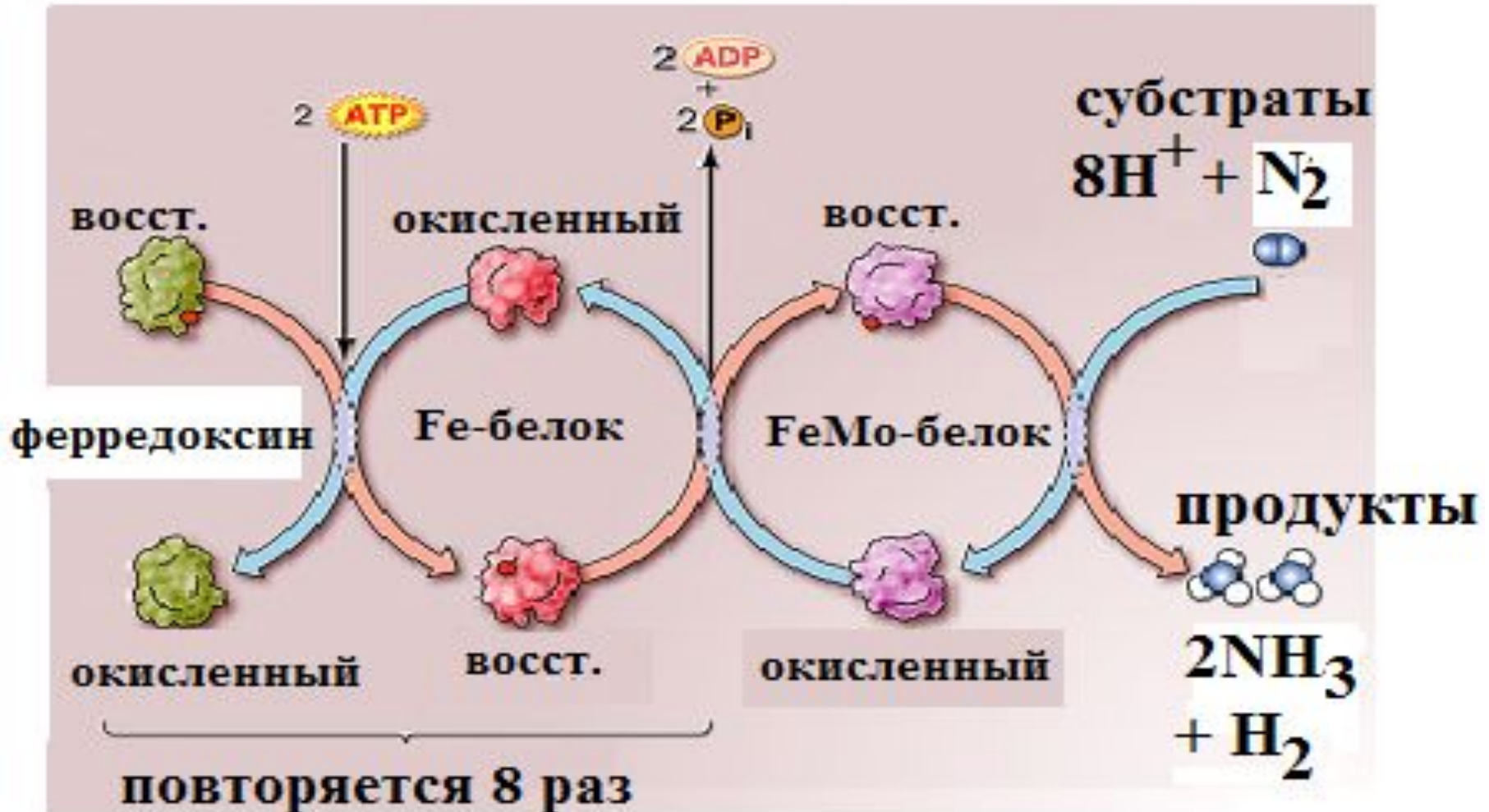
АТОМЫ:

- 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



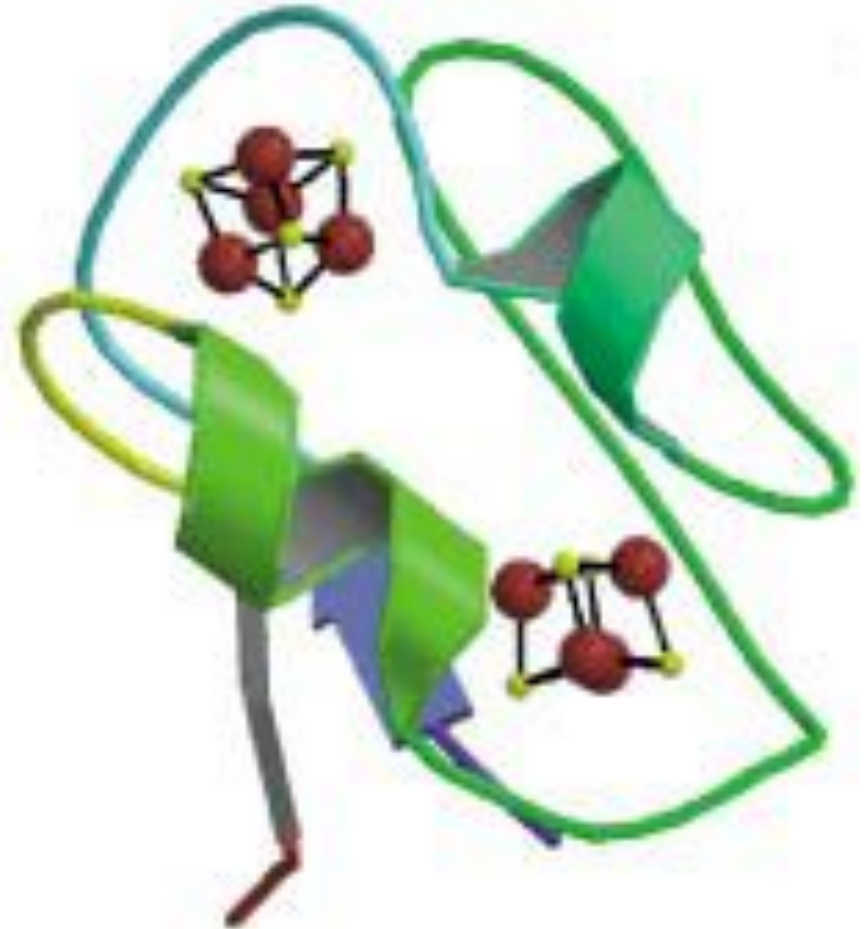
Расшифровка к предыдущему слайду

- 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.

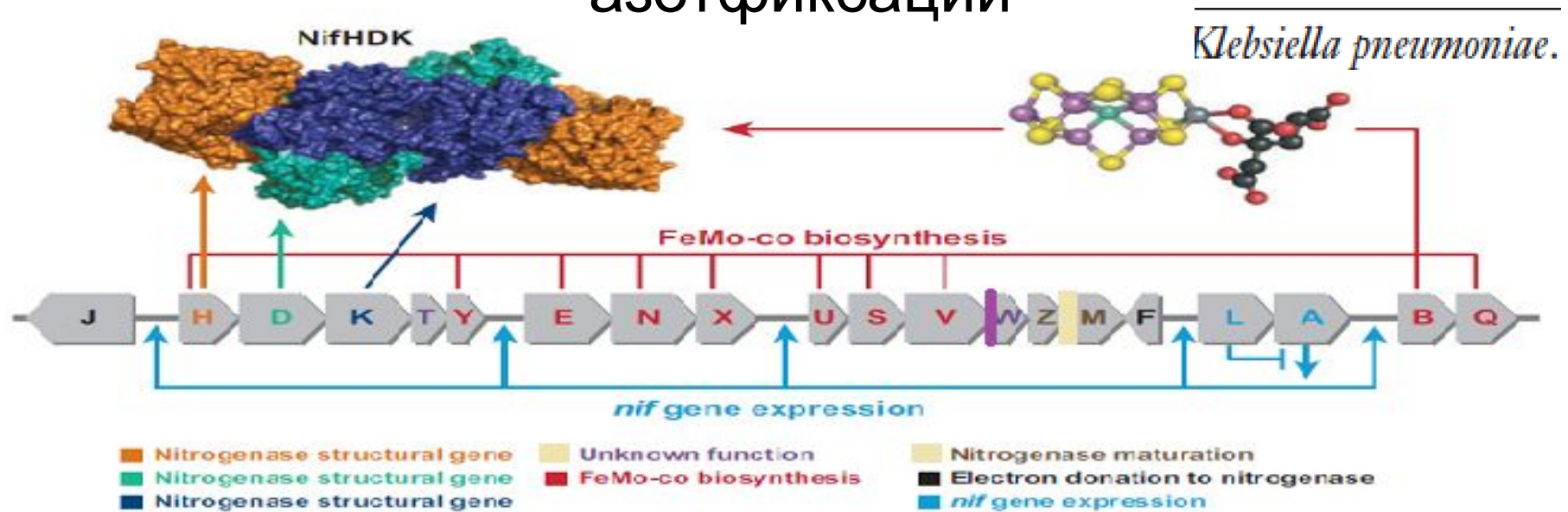


Дополнительный материал

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

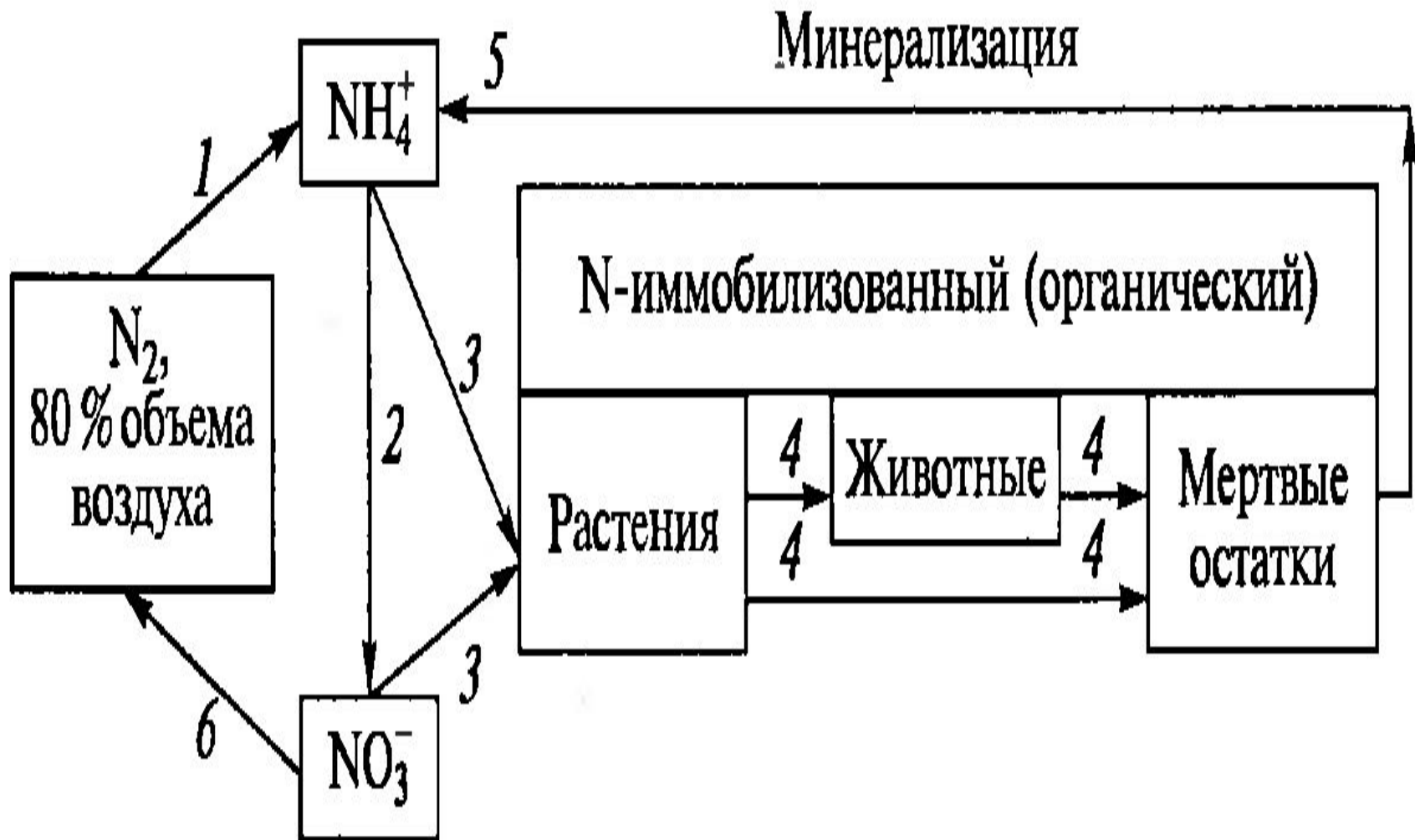
Дополнительный материал: Гены и белки азотфиксации



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

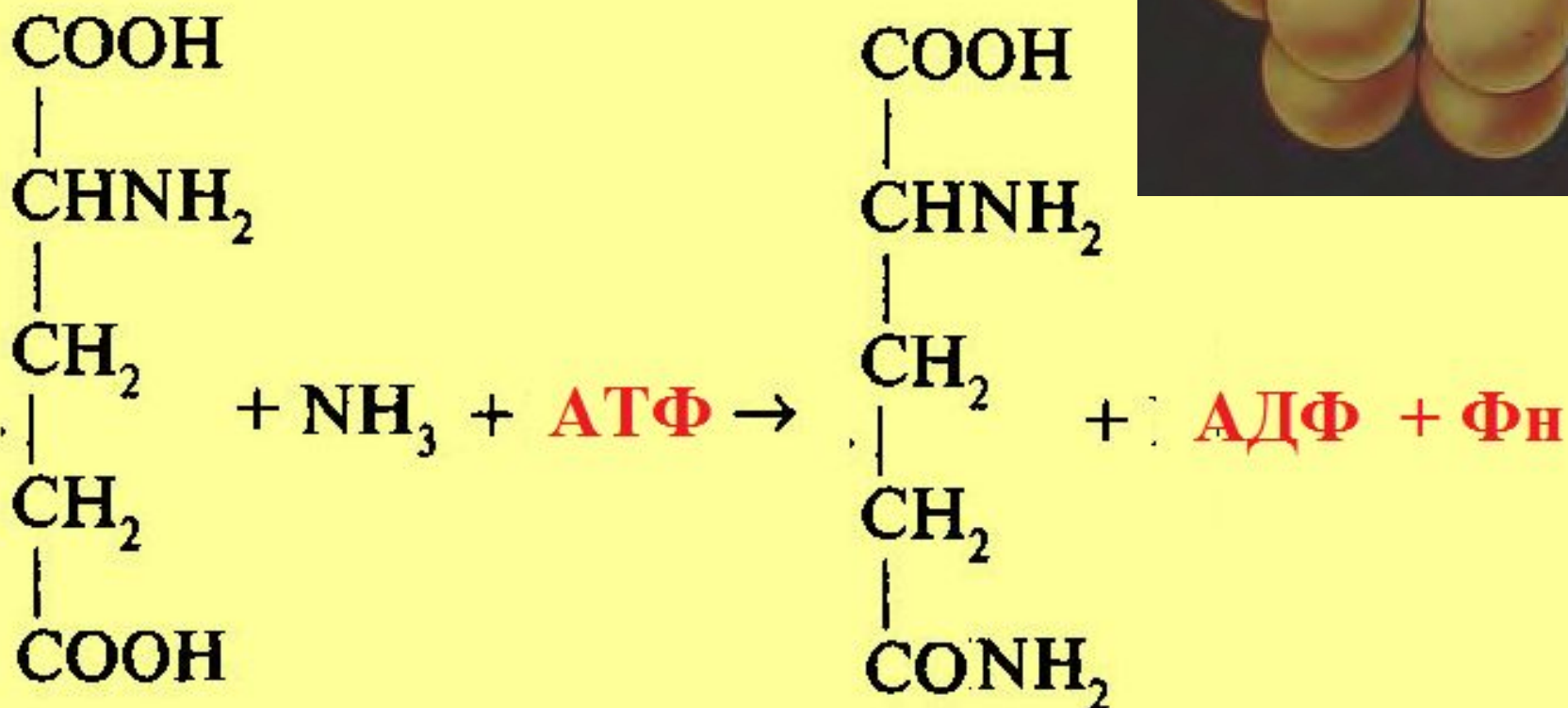
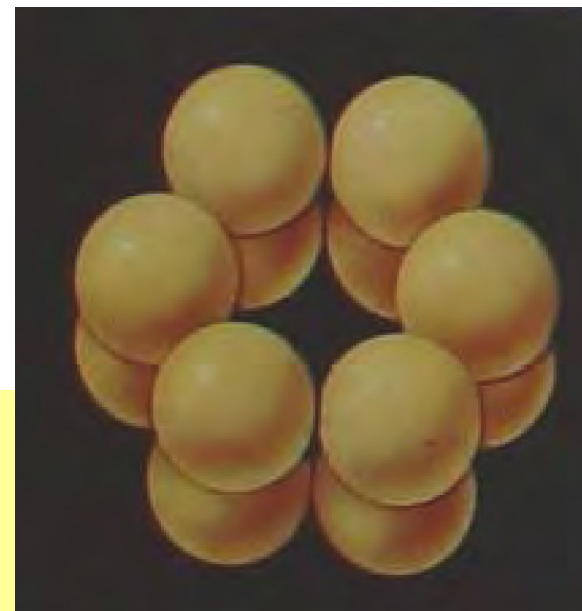
Прямое восстановительное аминирование – 1 путь синтеза а-к-т



Фермент – глутаматдегидрогеназа (глутаматДГ)

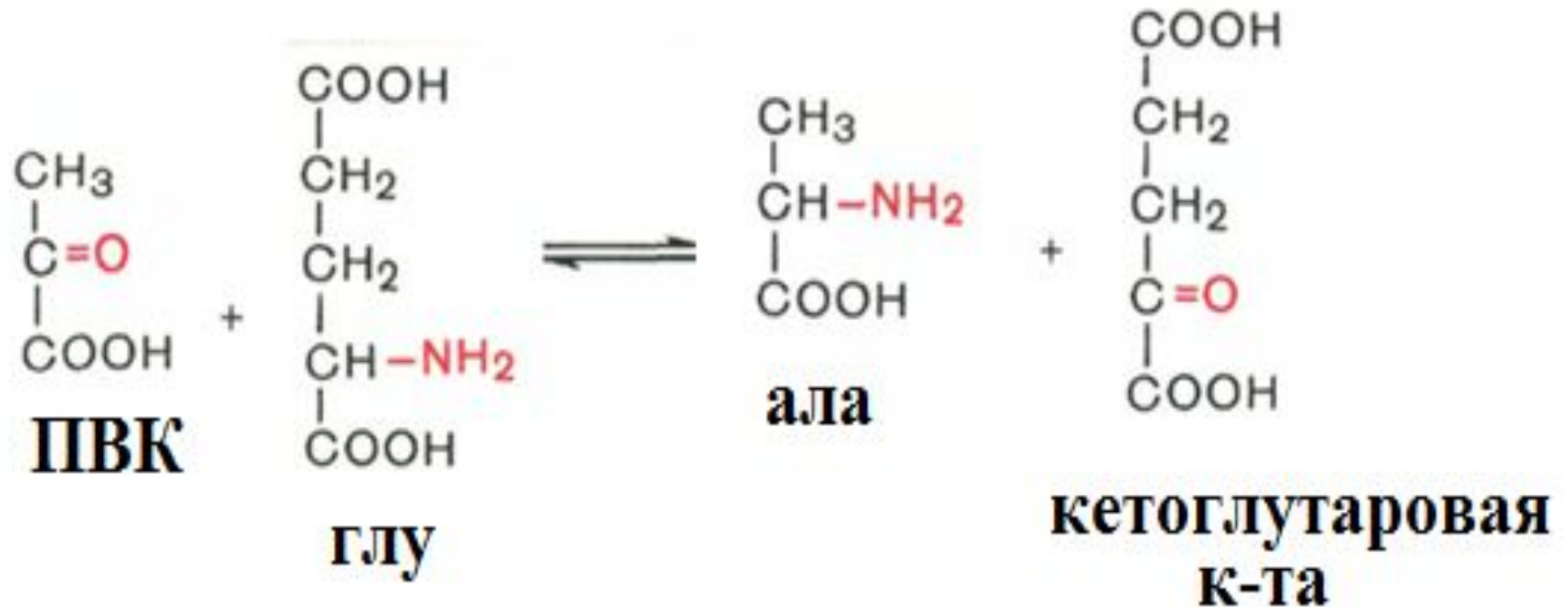
НАДН – никотинамид-аденин-динуклеотид в восстановленной форме

Образование глутамина – 1а путь синтеза



Фермент - глутаминсинтетаза

Переаминирование – 3 путь синтеза аминокислот

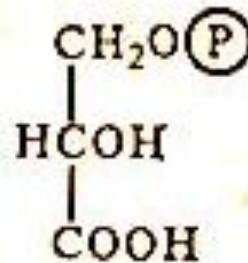


Ферменты переаминирования – *аминотрансферазы*
(например, аланин-амино-трансфераза (АлАт),
аспартатаминотрансфераза (АсАт))

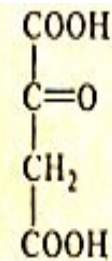
3 путь синтеза аминокислот - ферментативные превращения

!!! 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

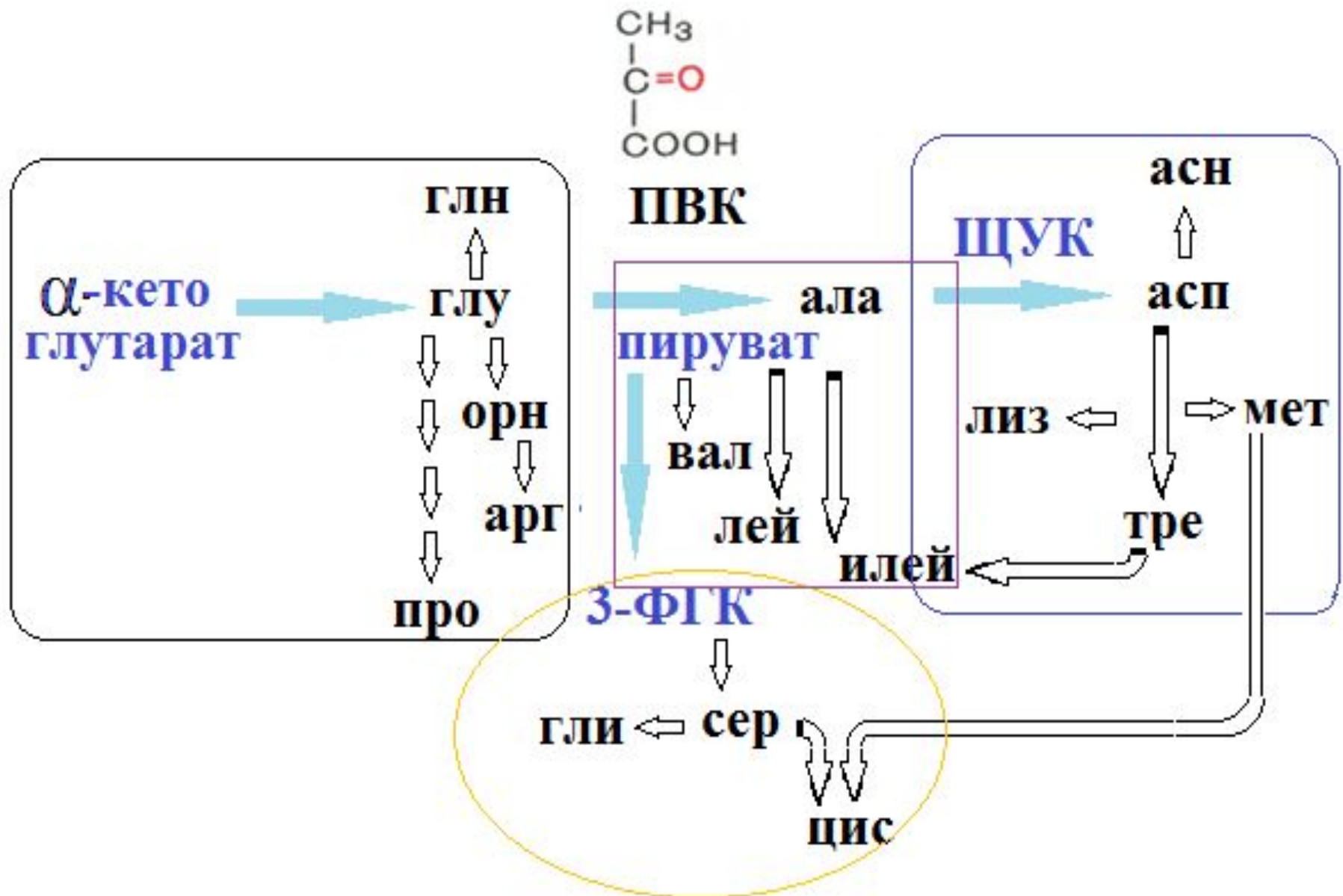


Щавелево-
уксусная к-та
(ЩУК, оксалоацетат)

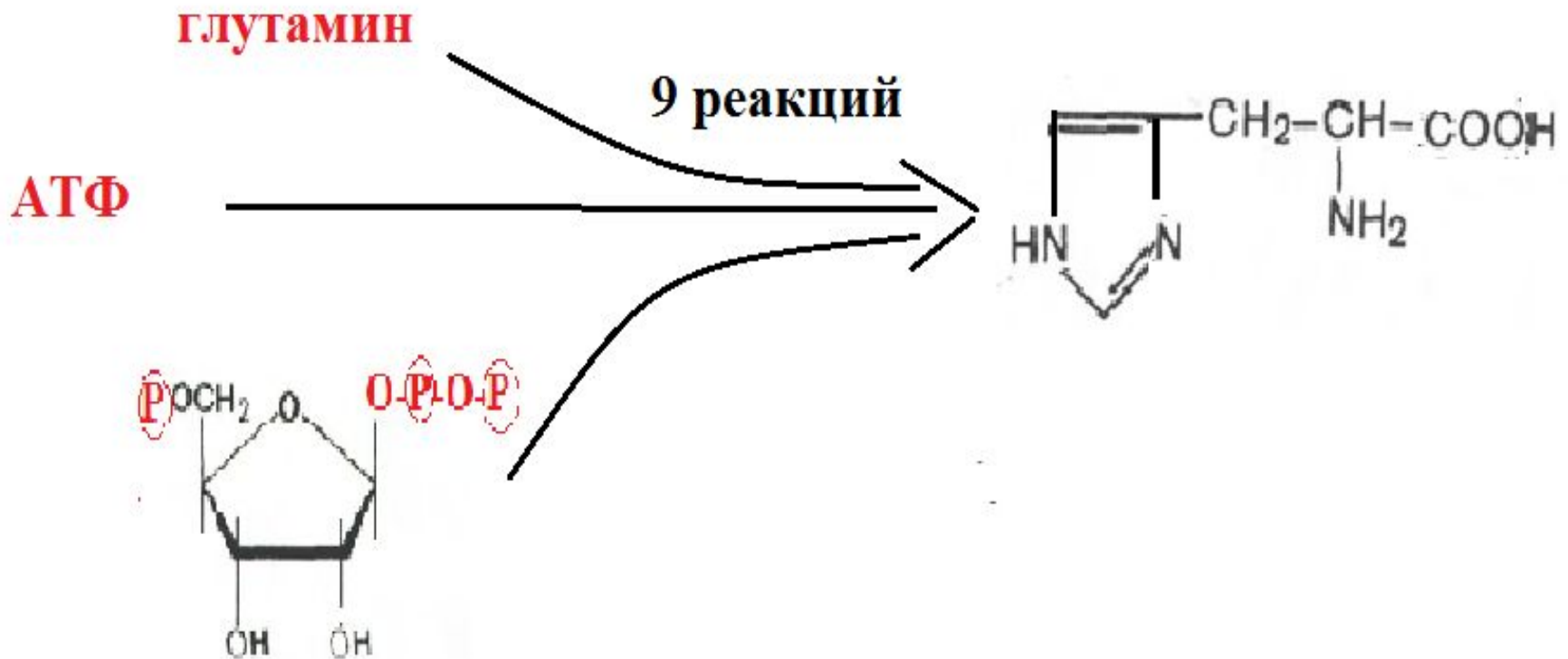
2) Гистидин

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

Семейства аминокислот 1-4



Гистидин – особый путь ! У животных гис не синтезируется

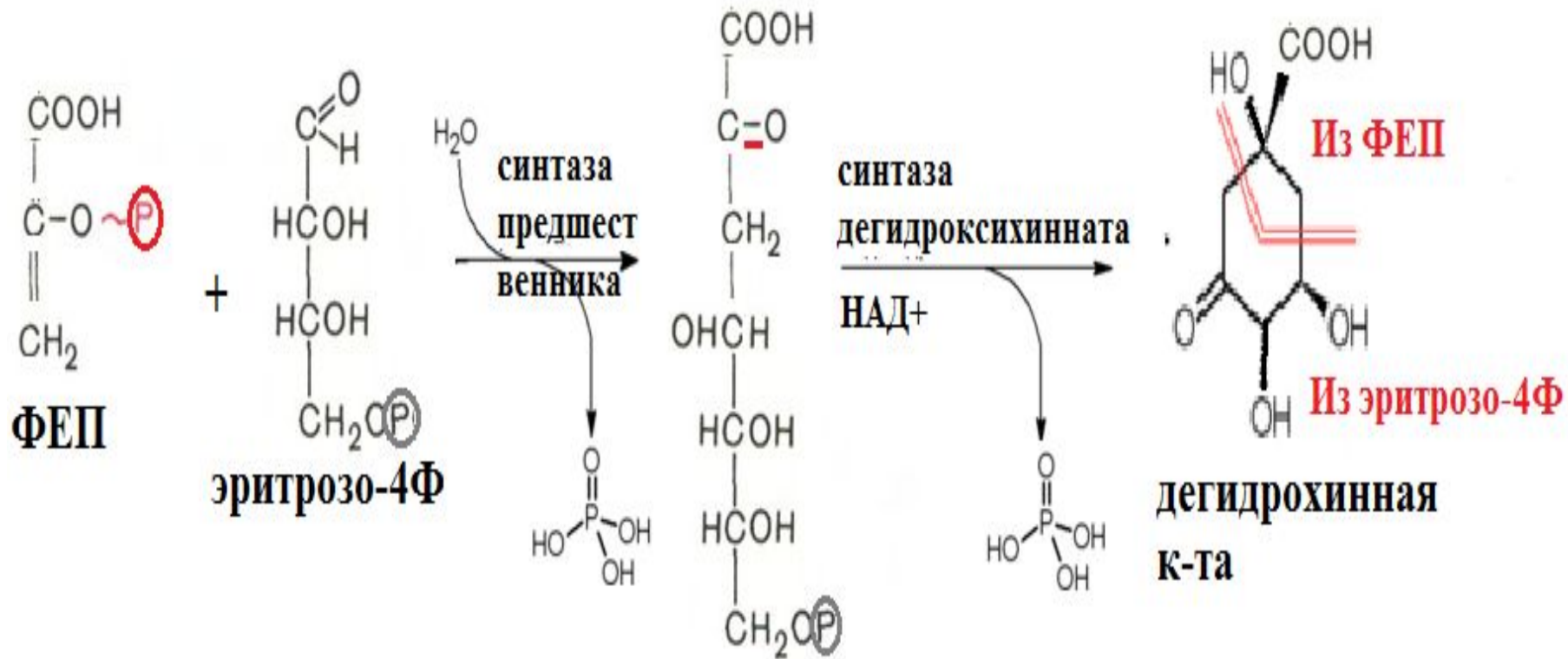


5'-ФОСФОРИБОЗИЛ-1'-ДИФОСФАТ

Семейство 5 (ароматические) – по *шикиматному* пути

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

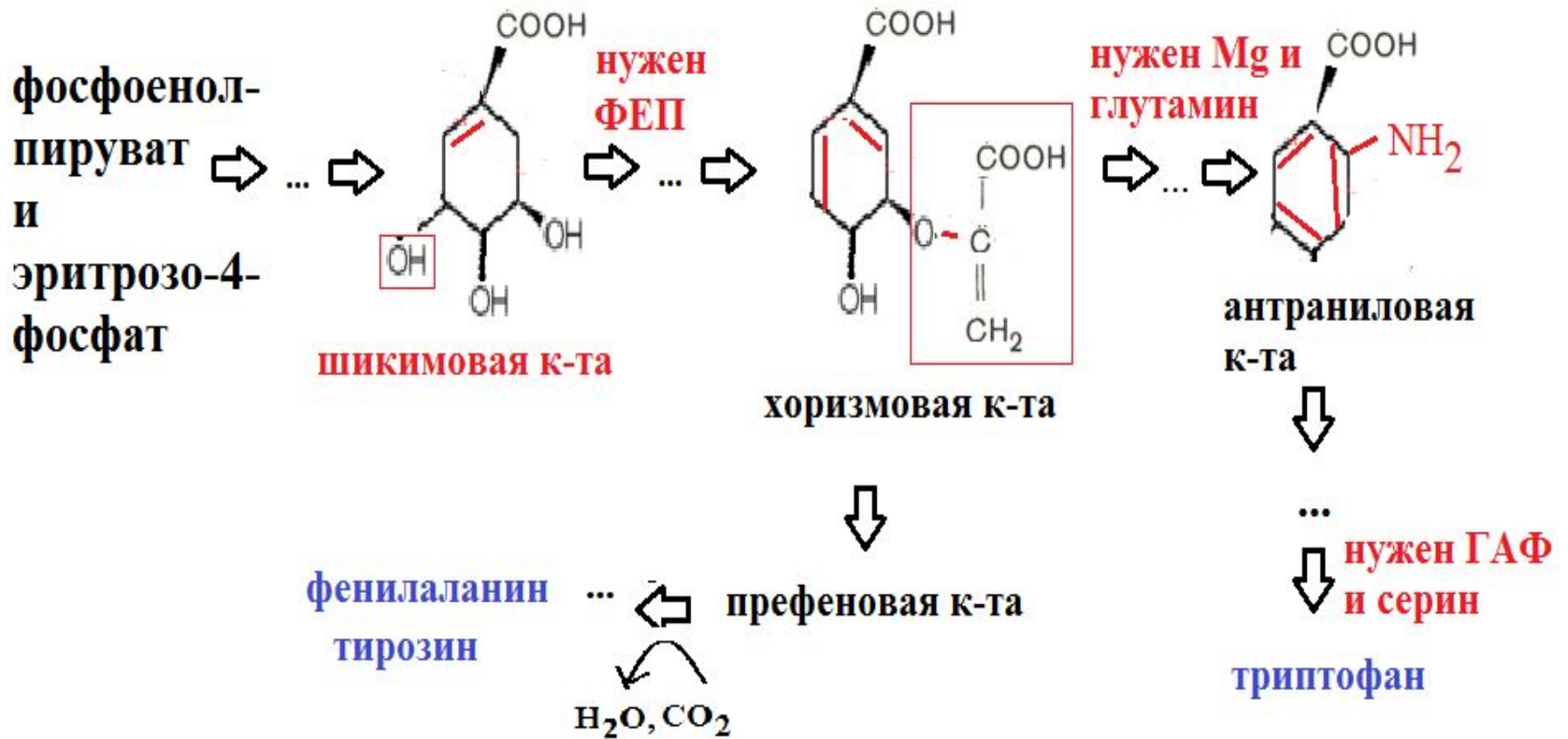
1) Основной путь синтеза дегидрохинната



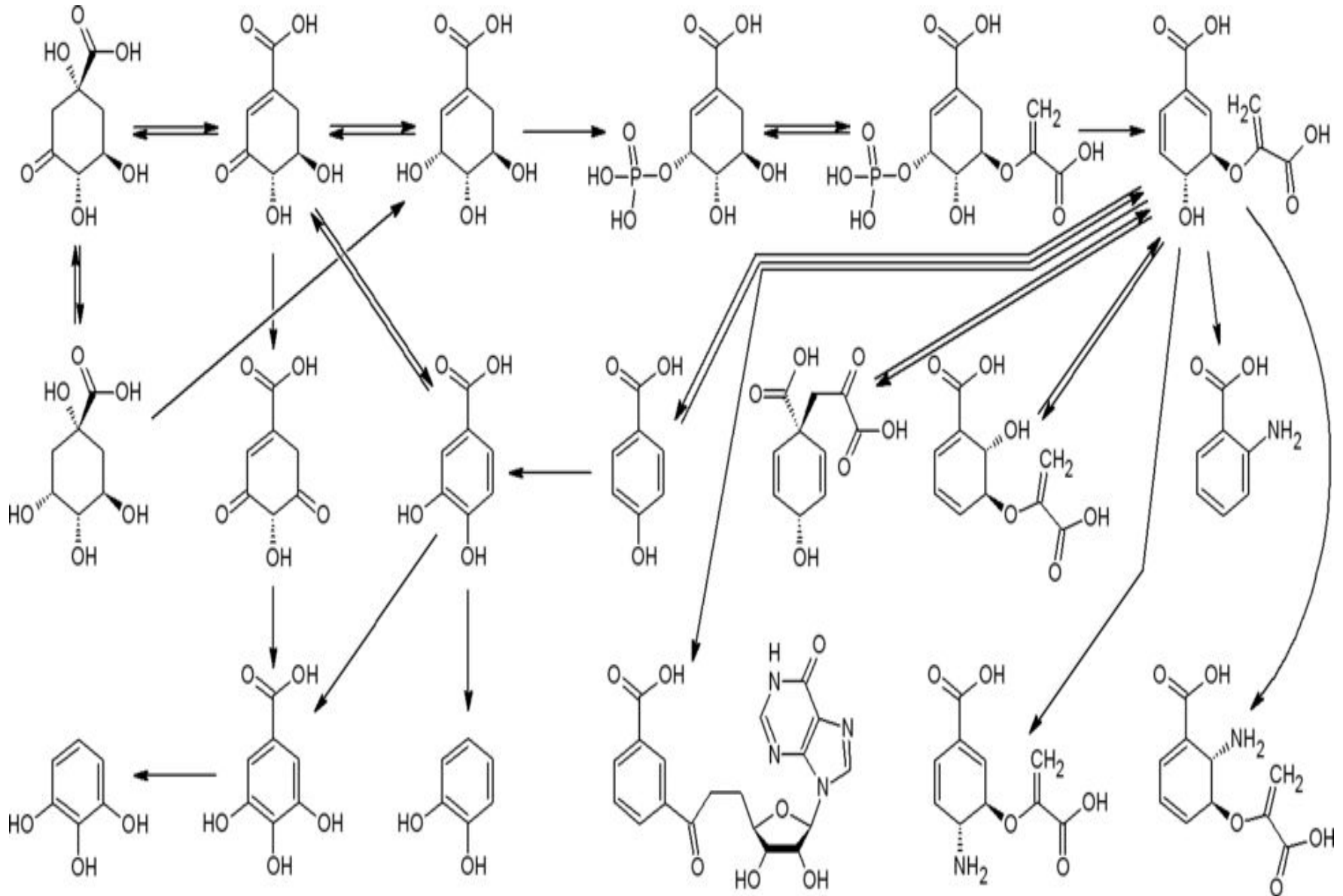
7-углеродный
предшественник
в виде фосфата

Главные ступени синтеза аминокислот из шикимата

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

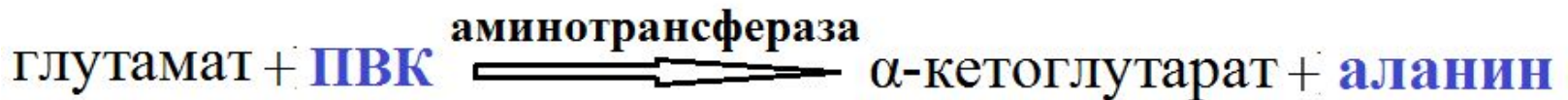


Шикиматный путь (начиная с дегидрохинната)



ИТОГО: основные пути синтеза белковых аминокислот

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

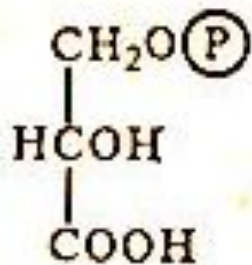


- 3) ферментативные превращения

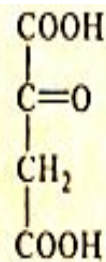
Ферментативные превращения в синтезе аминокислот

!!! 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

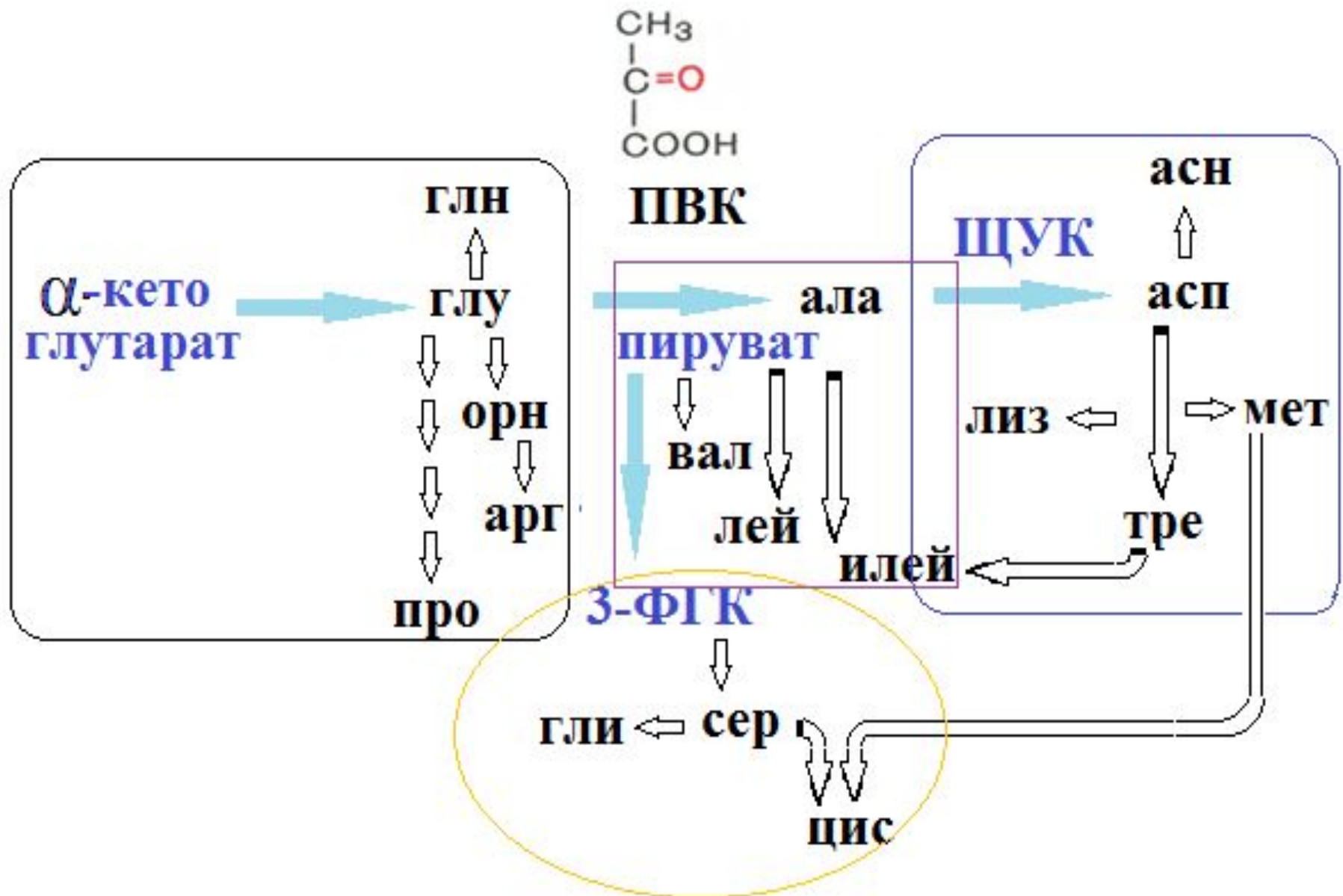


Щавелево-уксусная к-та
(ЩУК, оксалоацетат)

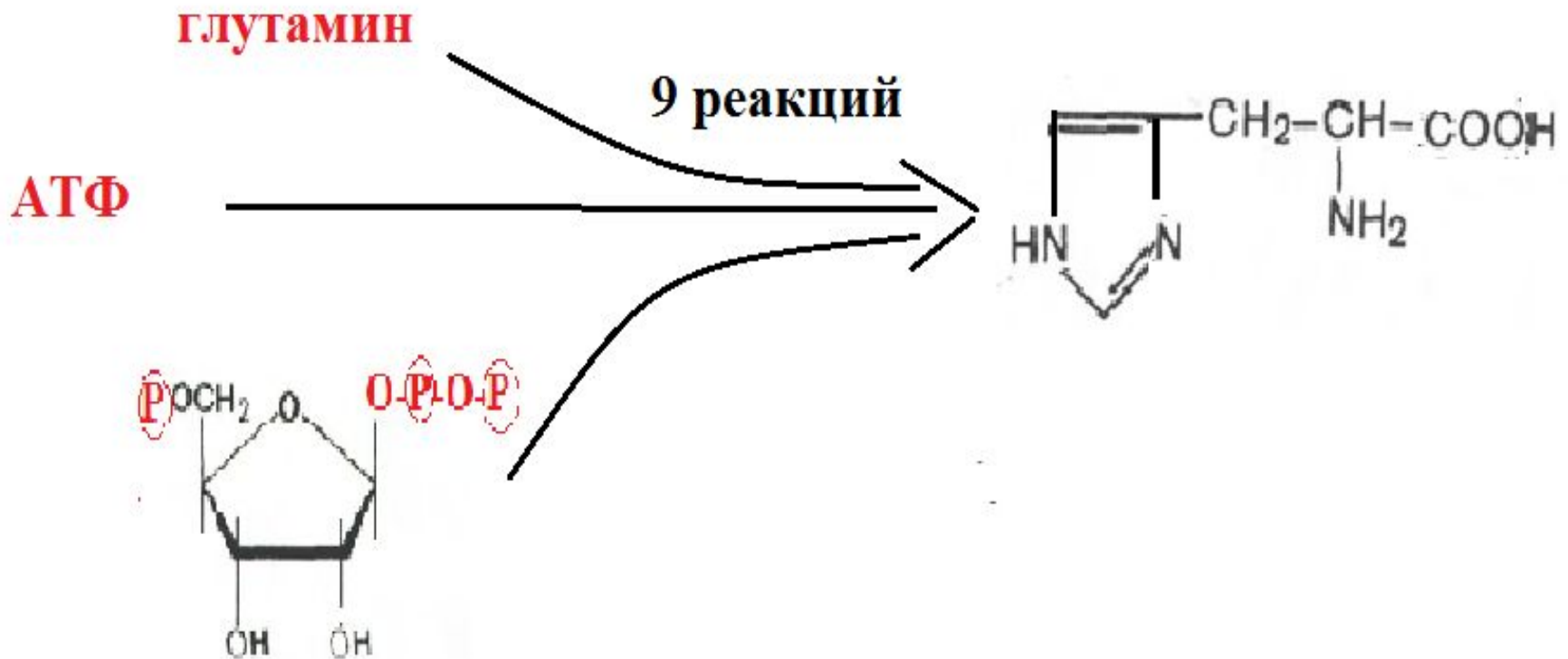
2) Гистидин

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

Семейства аминокислот 1-4



Гистидин – особый путь ! У животных гис не синтезируется

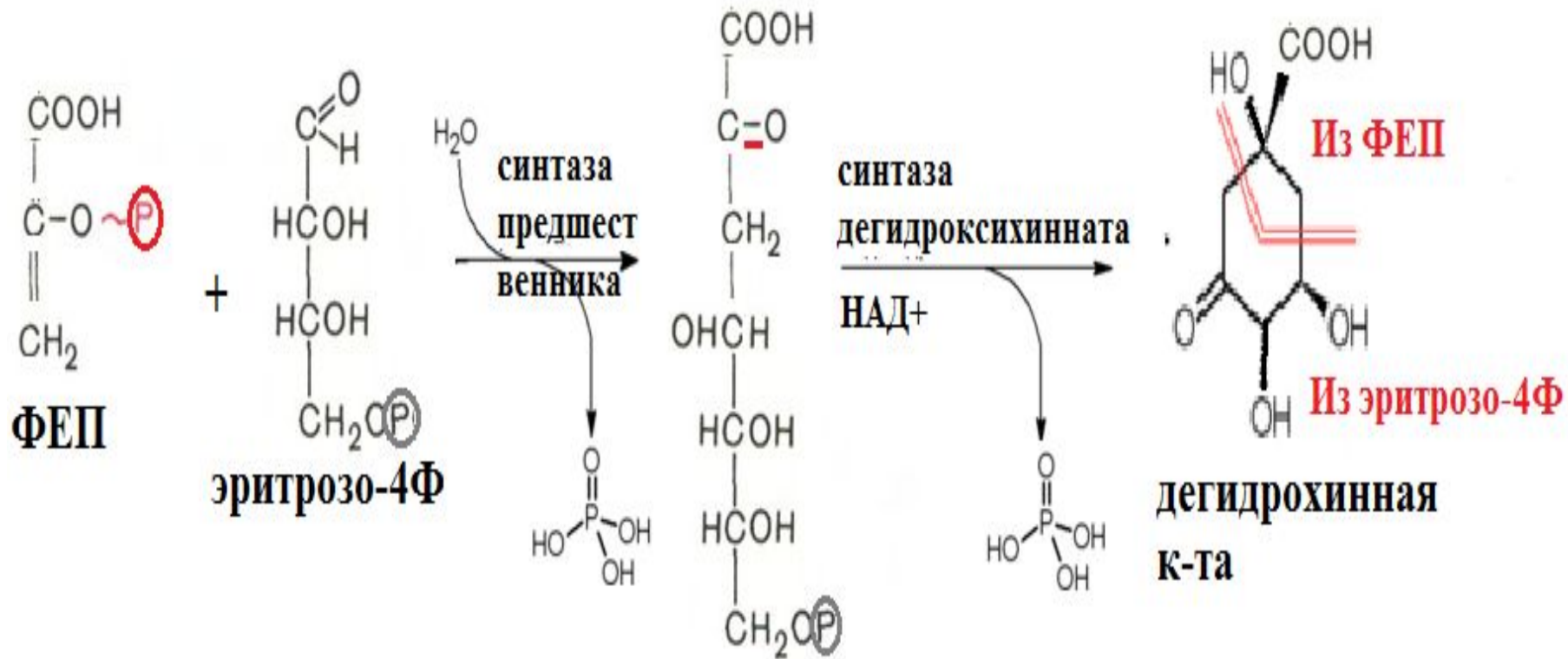


5'-ФОСФОРИБОЗИЛ-1'-ДИФОСФАТ

Семейство 5 (ароматические) – по *шикиматному* пути

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

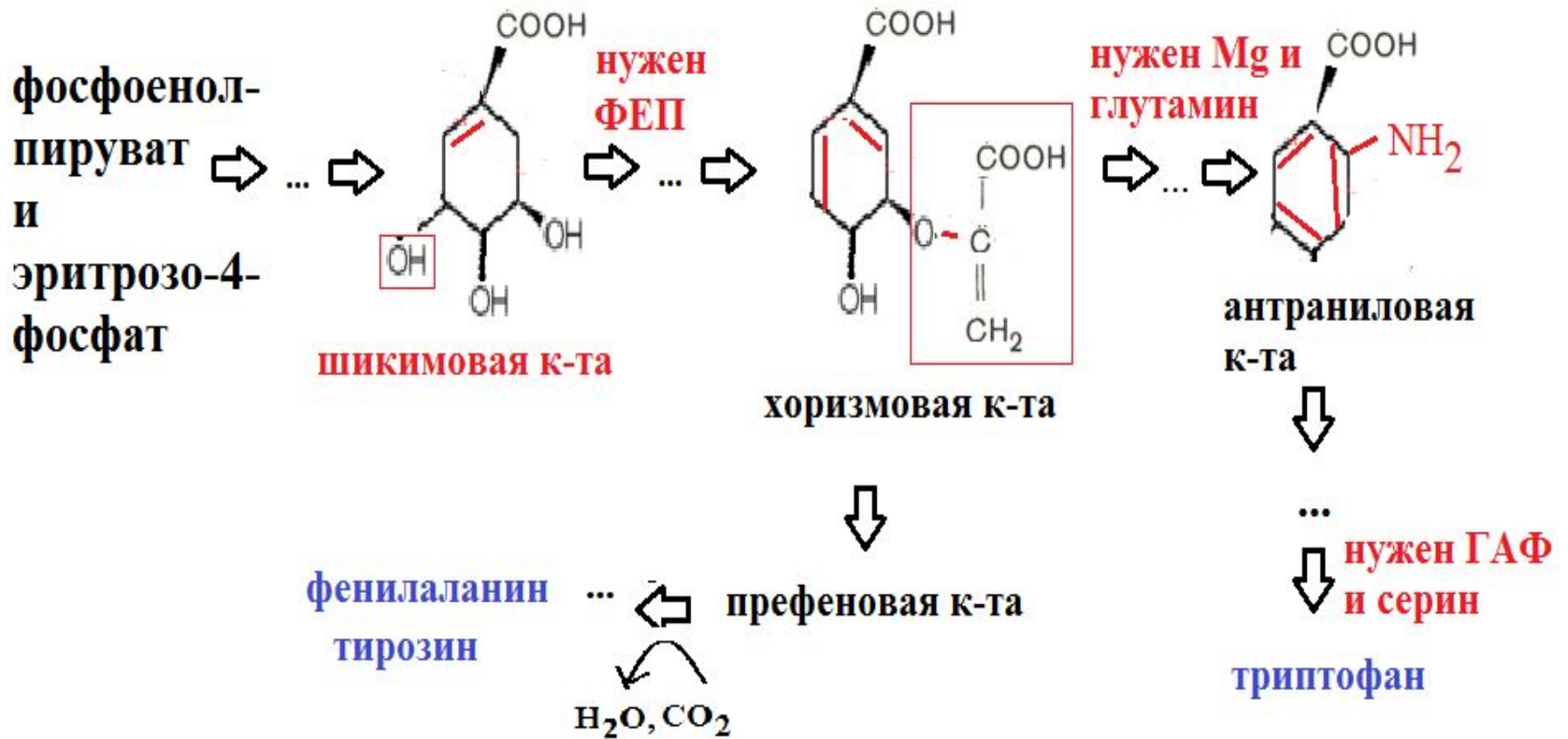
1) Основной путь синтеза дегидрохинната



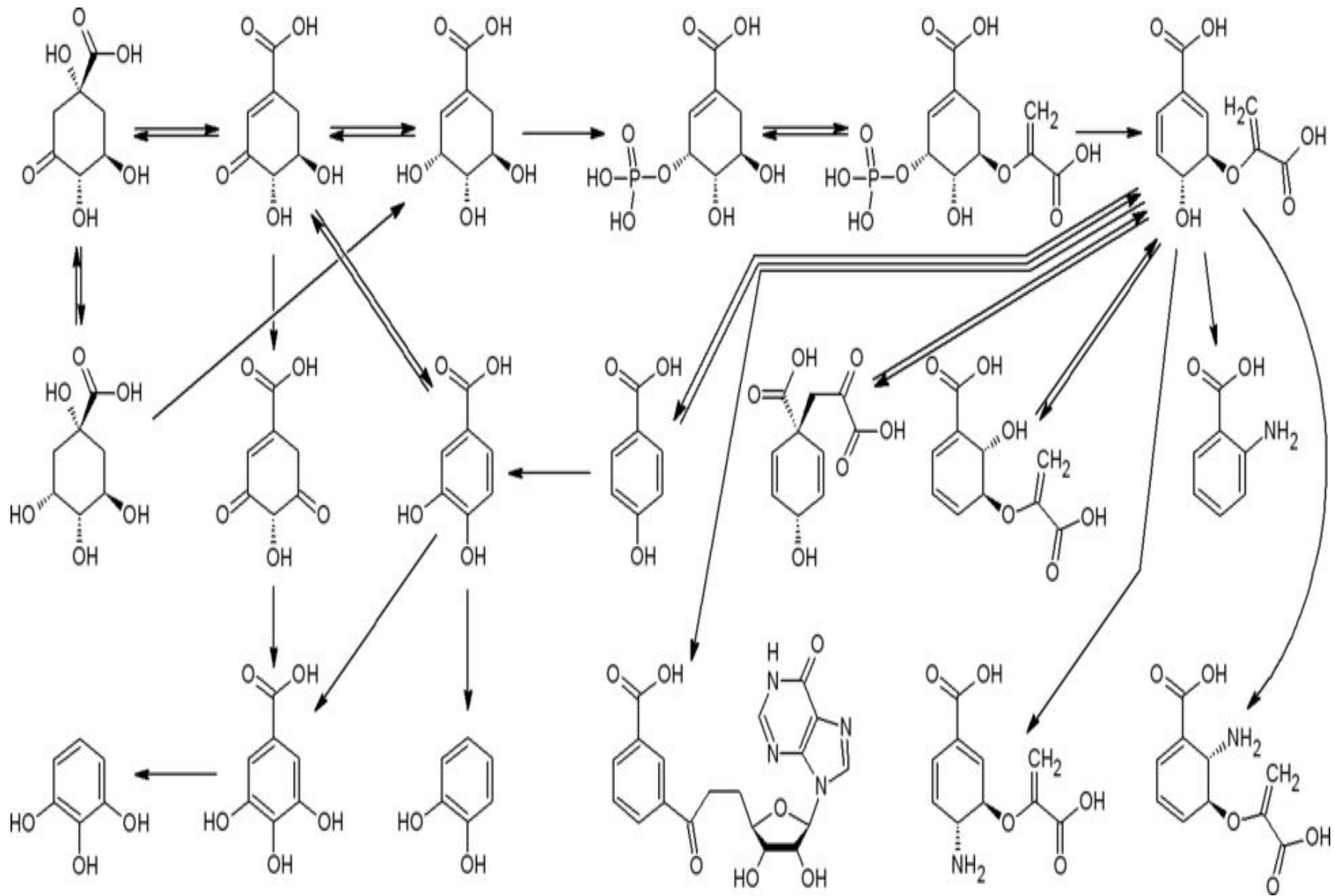
7-углеродный
предшественник
в виде фосфата

Главные ступени синтеза аминокислот из шикимата

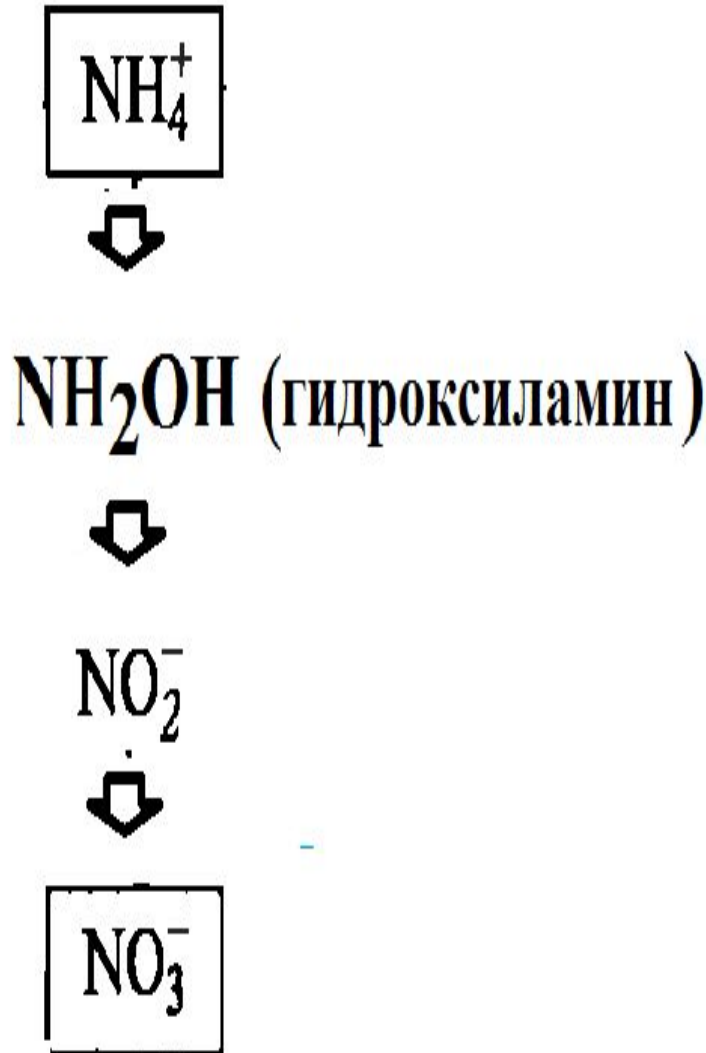
! У животных *фен* и *тир* – не синтезируются, *тир* может синтезироваться только при наличии *фен*



Шикиматный путь (начиная с дегидрохинната)



Если не в аминокислоты – то куда?

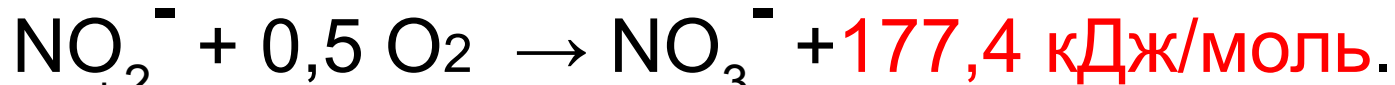


Нитрификация:

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^+ в клетку – транспортный белок **Си-содержащая транслоказа**

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

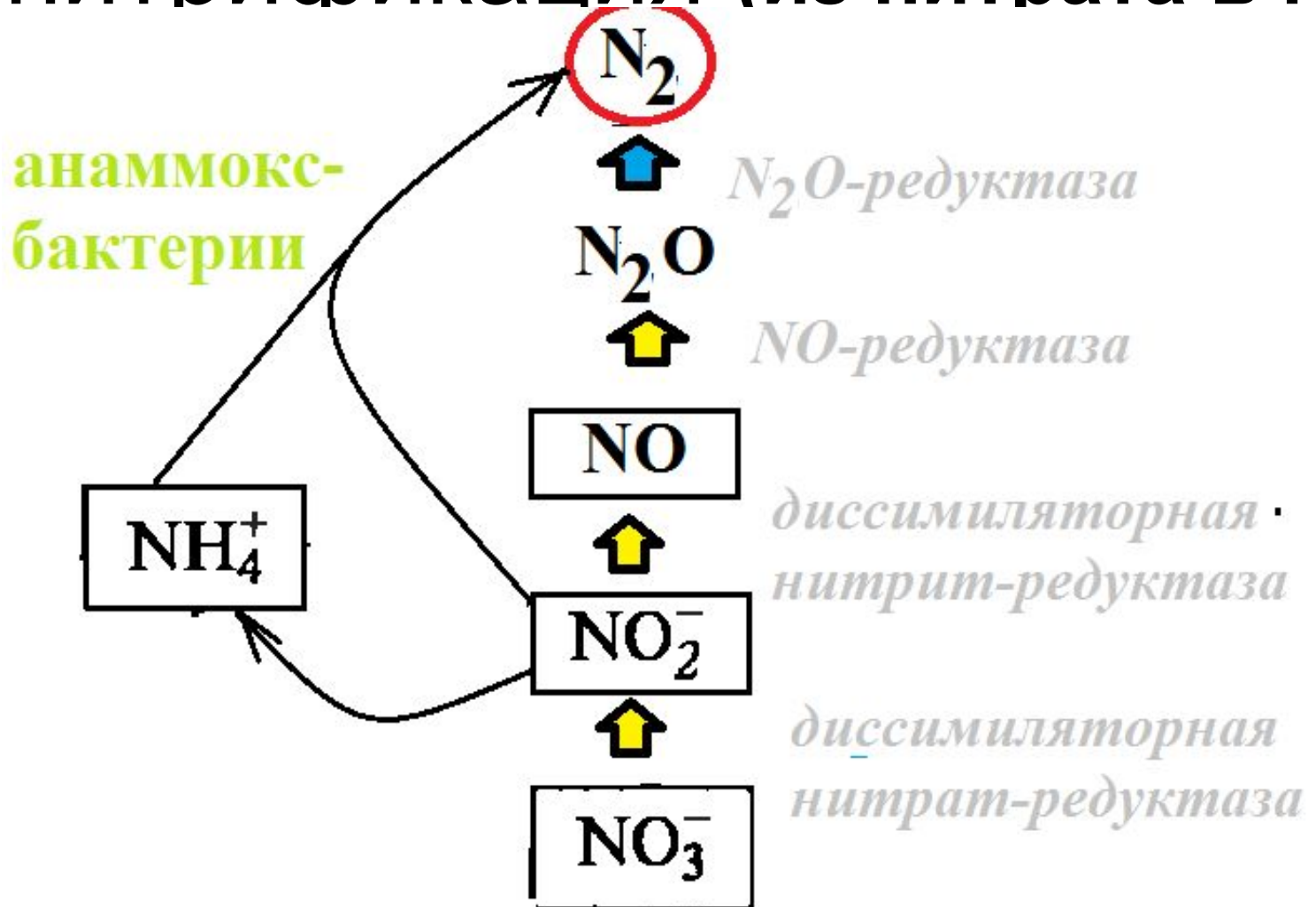


$\text{NH}_2\text{OH} + \text{O}_2 = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$ - Работает дыхательная ЭТЦ (с FeS-белками-цитохромами), из-за чего выделяется энергия и запасается в виде **АТФ**.

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

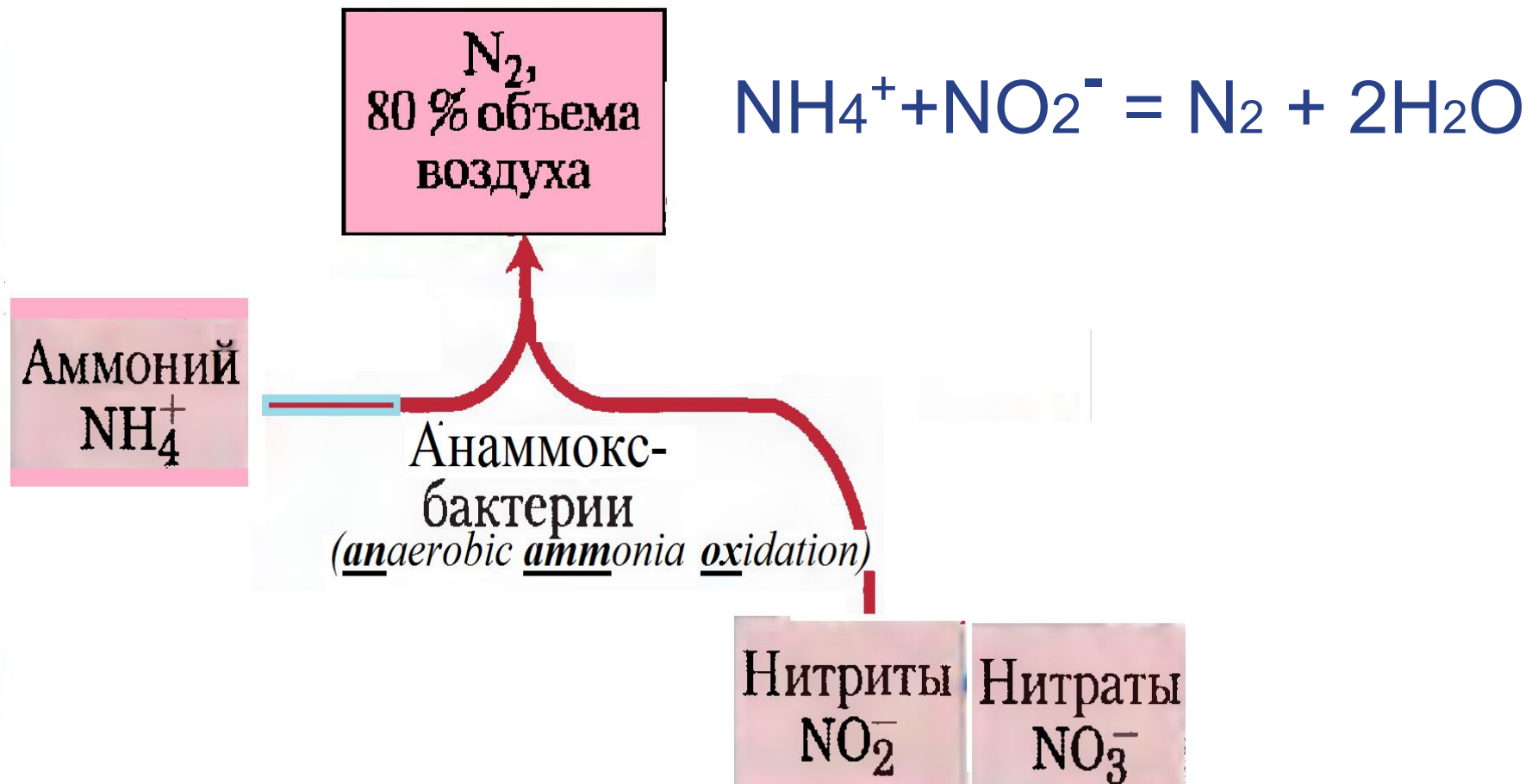
и ЭТЦ (с FeS-белками-цитохромами).

Денитрификация (из нитрата в N₂)



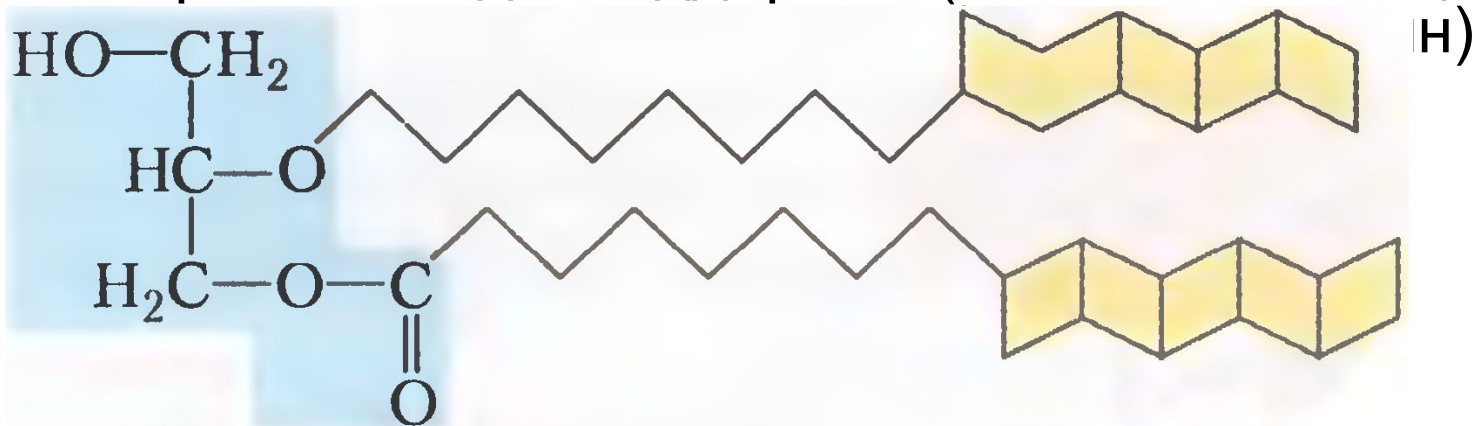
Денитрификация. Анаммокс

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

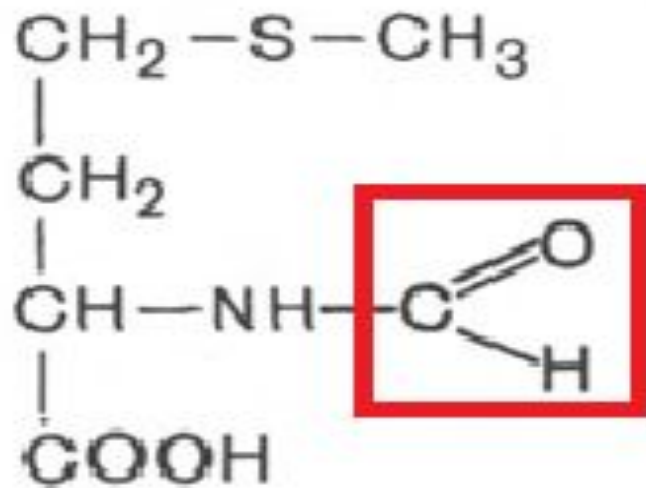


- Бактерии АНАММОКС – загадка на загадке...

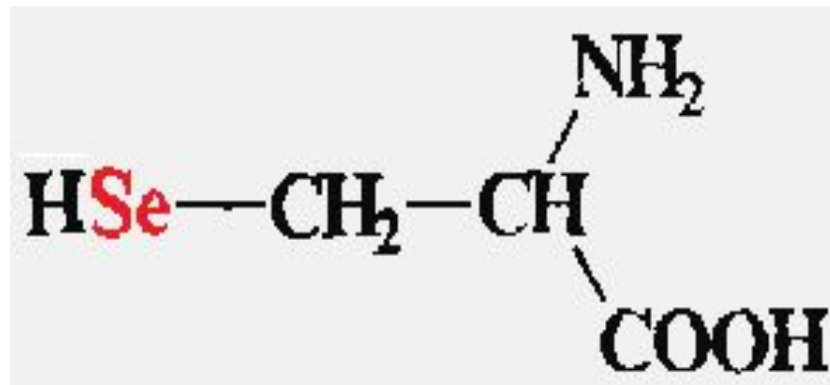
- до сих пор не выделены в чистую культуру (“кандидаты” в виды)
- нуклеоид в мембранной “оболочке” (рибоплазма - ядро?)
- анаммоксисома (до 50-70% объема клетки), в ее мембране липиды-ладдераны (*ladder* – лестница),



- не они ли LUCA - Last Universal Common Ancestor?



Формилметионин



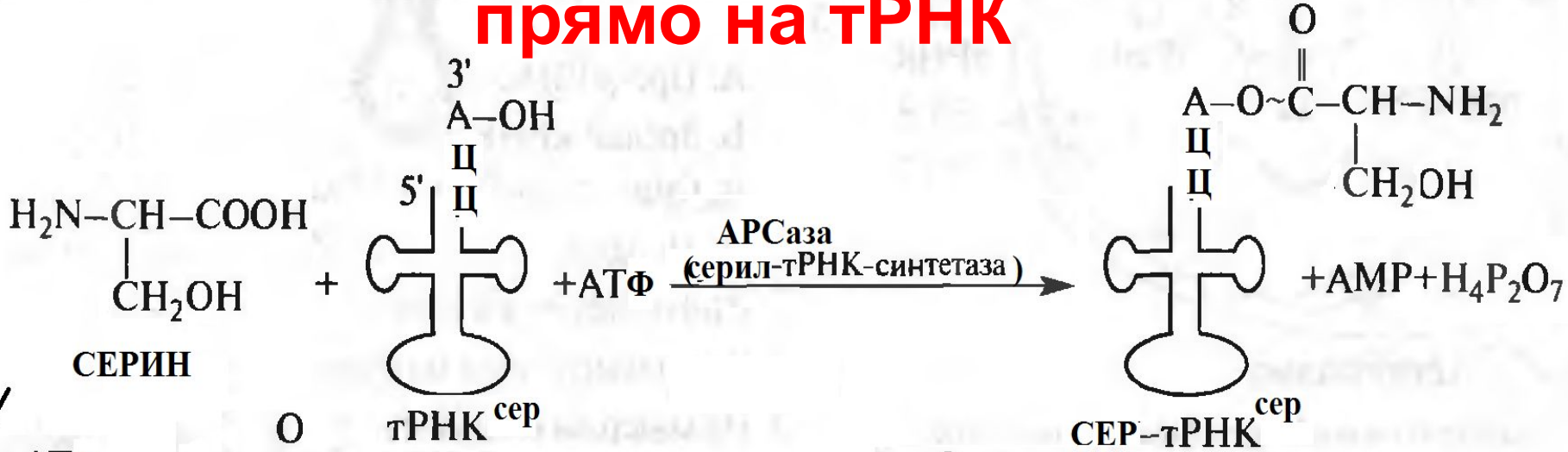
**Селеноцистеин
(Sec)**

Синтез формилметионина – прямо на тРНК, в 2 стадии



Селеноцистеин образуется из серина

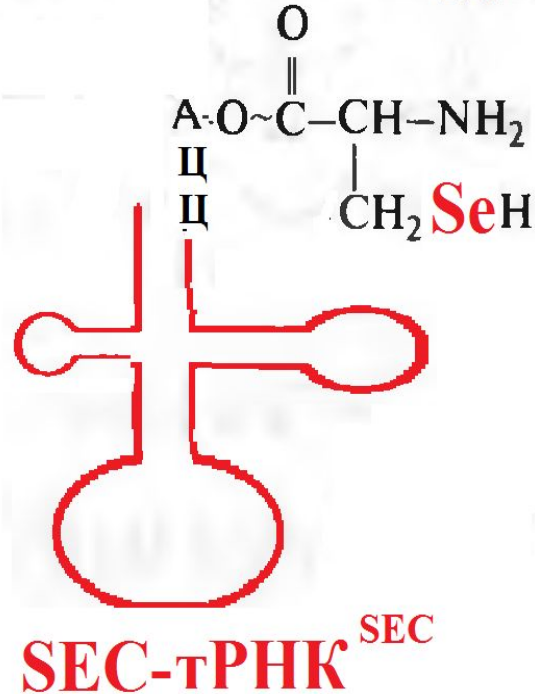
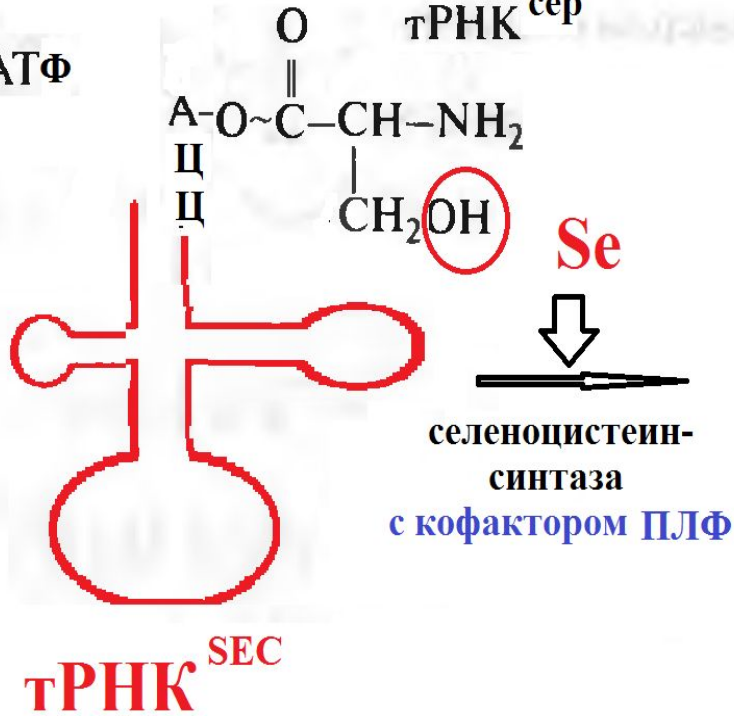
прямо на тРНК



серил-тРНК-синтетаза

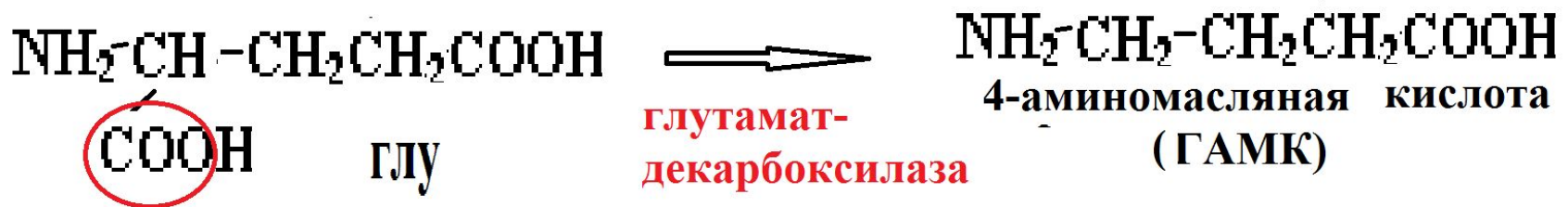
+ ATP

+



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?).

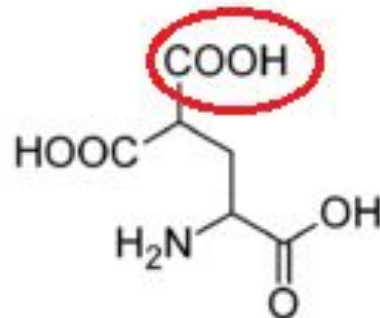
Синтез нетипичных аминокислот ПОСЛЕ построения белка

нужно:

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



Появление OH-важно для сшивок между коллагеновыми волокнами

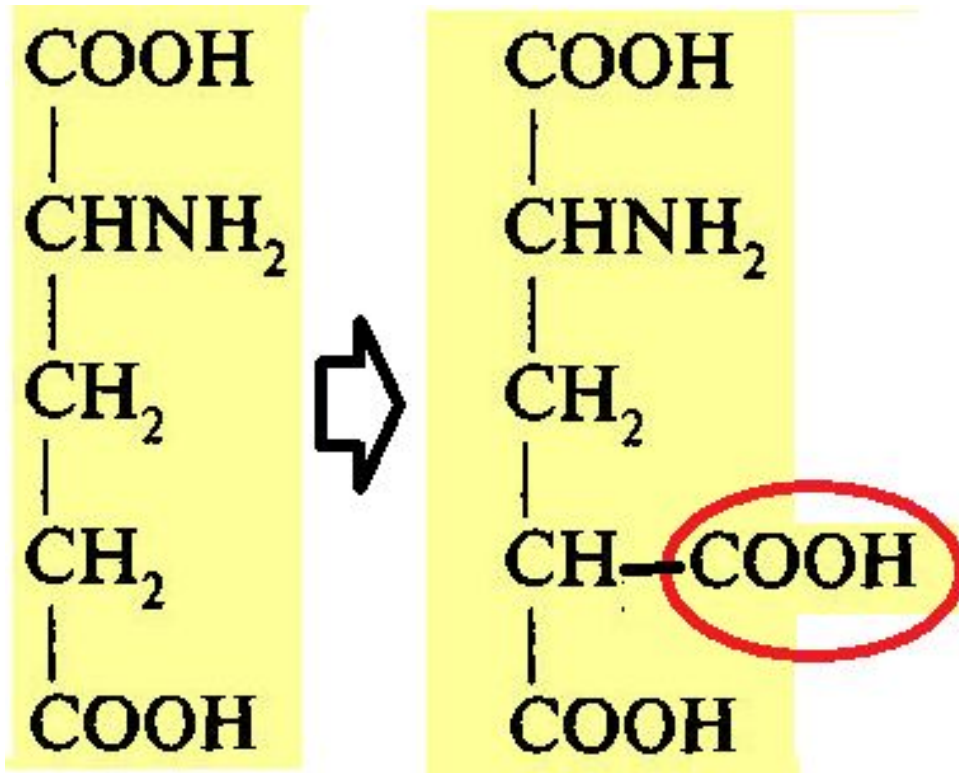


γ-карбокситамминовая к-та

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

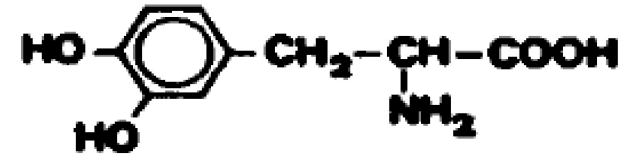
Образуется ПОСЛЕ
ТРАНСЛЯЦИИ (из ГЛУ,
находящейся уже в составе
белка) в N-области
протромбина.. Появление
еще одной COOH-группы
нужно для улучшения
связывания ионов Ca^{2+} ,
что важно для
инициации свертывания
крови

ЗАЩИТА. Аминокислоты - токсины

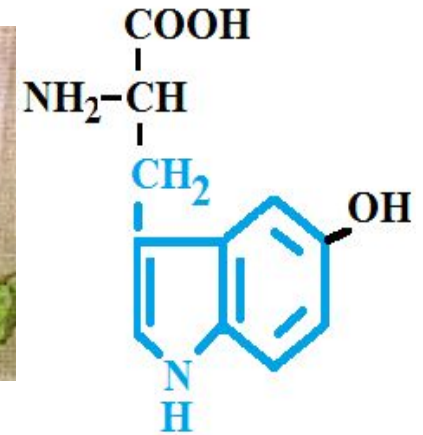
Мисина (сем. Бобовые) – зудящие бобы



3,4-дигидроксифенилаланин

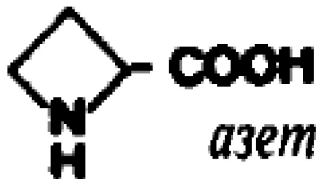


Гриффония (Griffonia simplicifolia, сем. Бобовые)

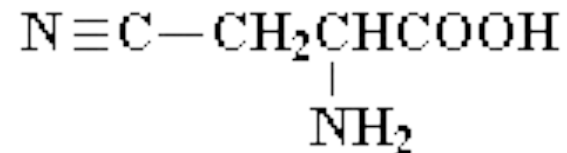


5-гидрокситриптофан

Ландыш, юкки

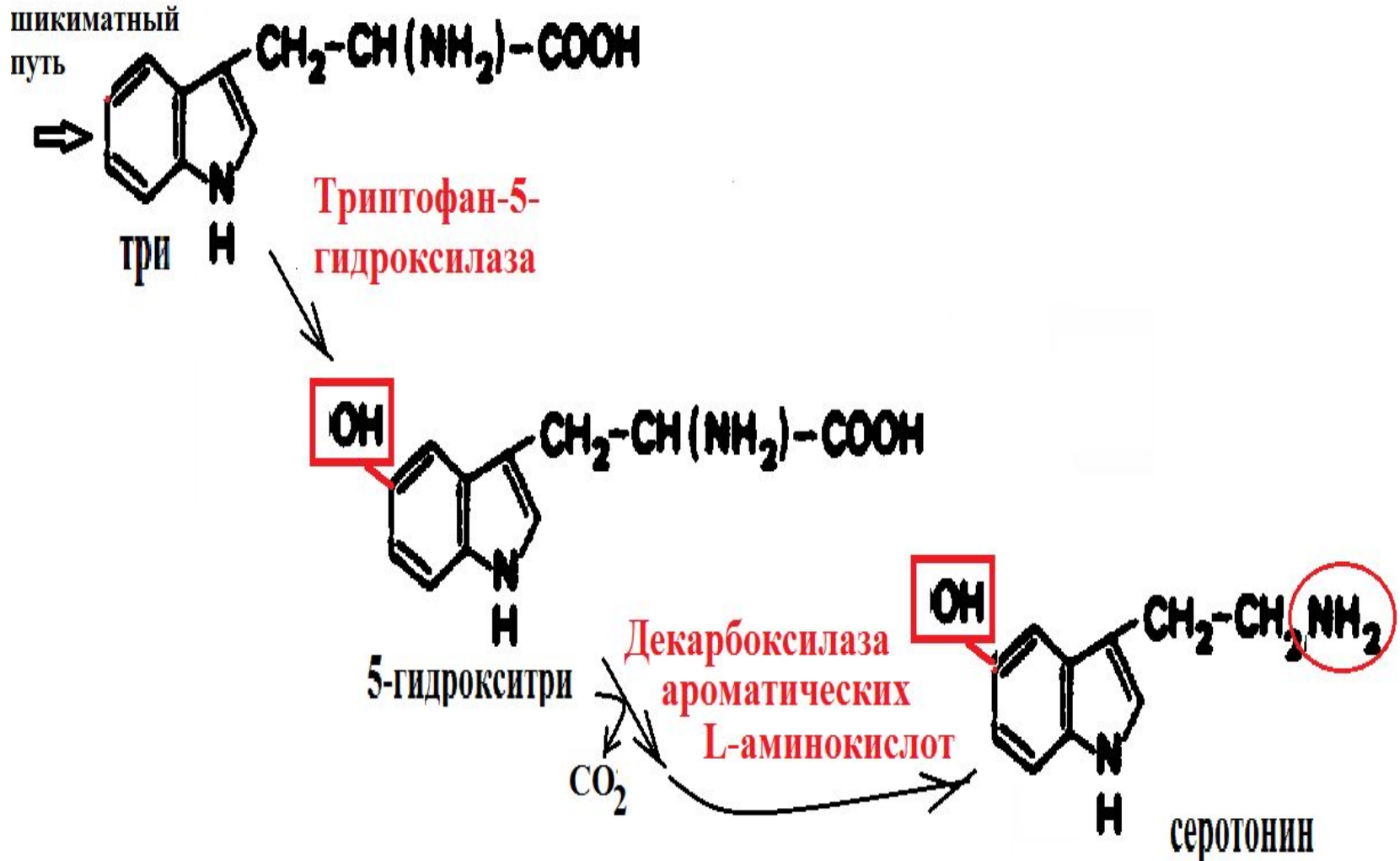


азетидин-2-карбоновая кислота



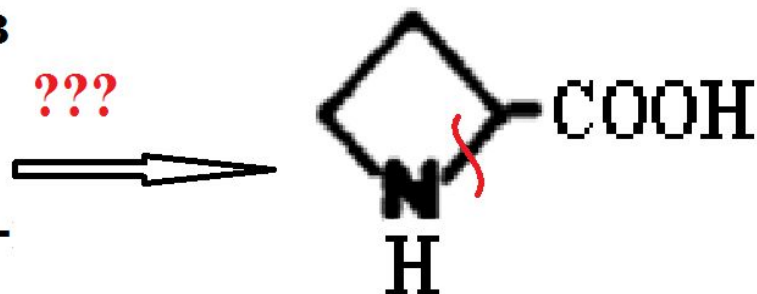
цианаланин

как в синтезе серотонина

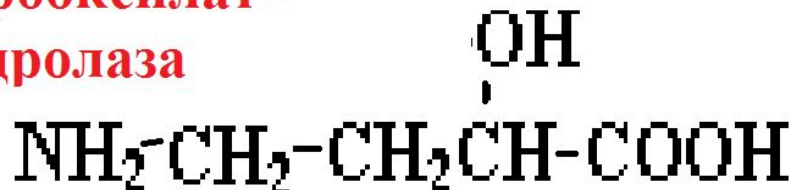


Синтез азетидин-2-карбоновой кислоты

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



у некоторых бактерий
азетидин-2-
карбоксилат-
гидролаза



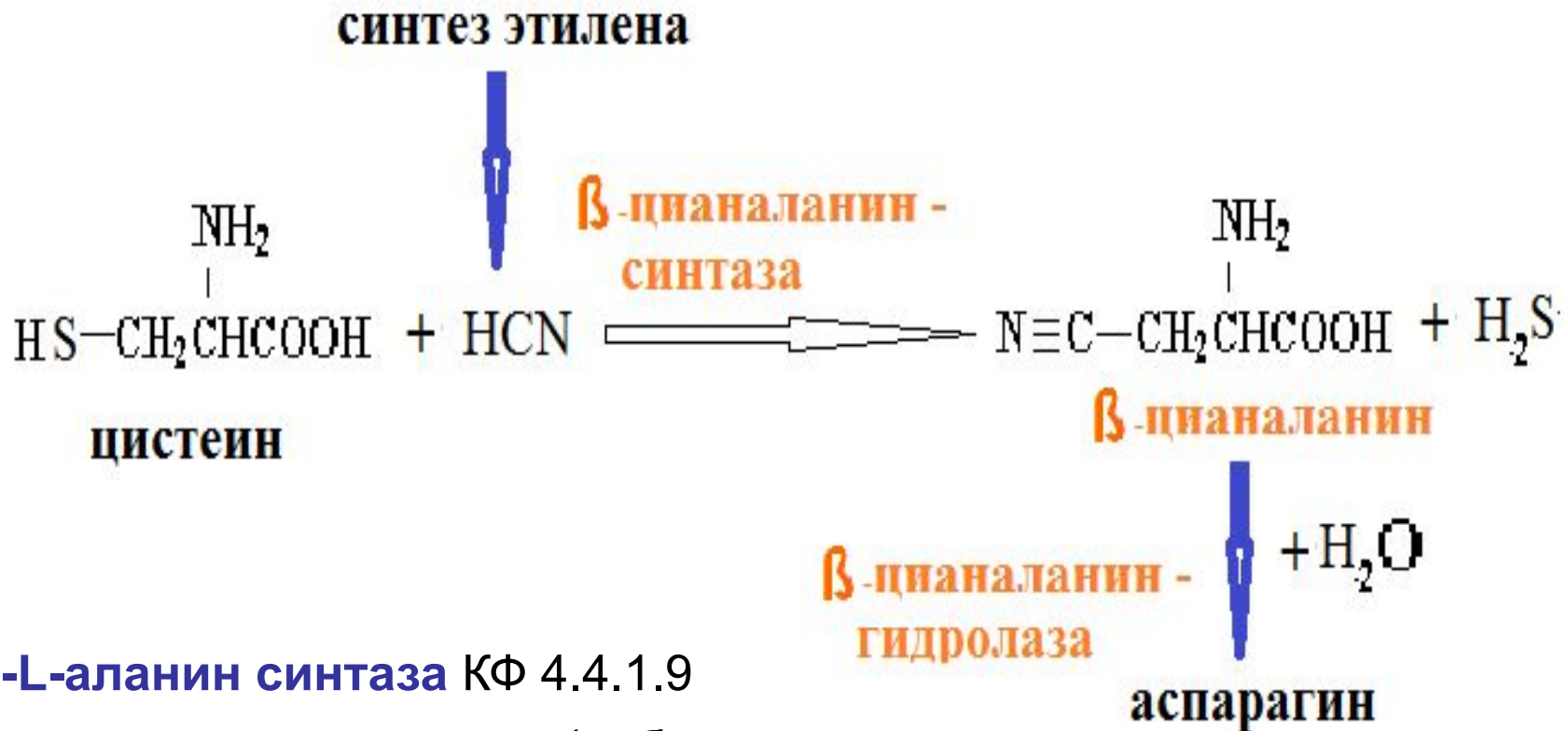
2-гидрокси-4-аминомасляная кислота
(гидроксиГАМК)

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

