

# Metabolismus aminokyselin II.

## Močovinový cyklus

Jana Novotná

2. LF UK, Ústav lékařské chemie a klinické biochemie

# Trávicí enzymy štěpící proteiny

## Trávicí trakt

### *Endopeptidasy*

Žaludeční - **pepsin**

Pankreatické - **trypsin, chymotrypsin, elastasa**

### *Exopeptidasy* (tenké střevo)

**aminopeptidasy, karboxypeptidasy, dipeptidasy**

➤ Hydrolýza → polypeptidy → oligopeptidy → aminokyseliny → střevní sliznice → transport k cílovým tkáním.

**Pepsin** (pH 1.5 – 2.5) – peptidová vazba před Tyr, Phe, mezi Leu, Glu

**Trypsin** (pH 7.5 – 8.5) – peptidová vazba za Lys a Arg

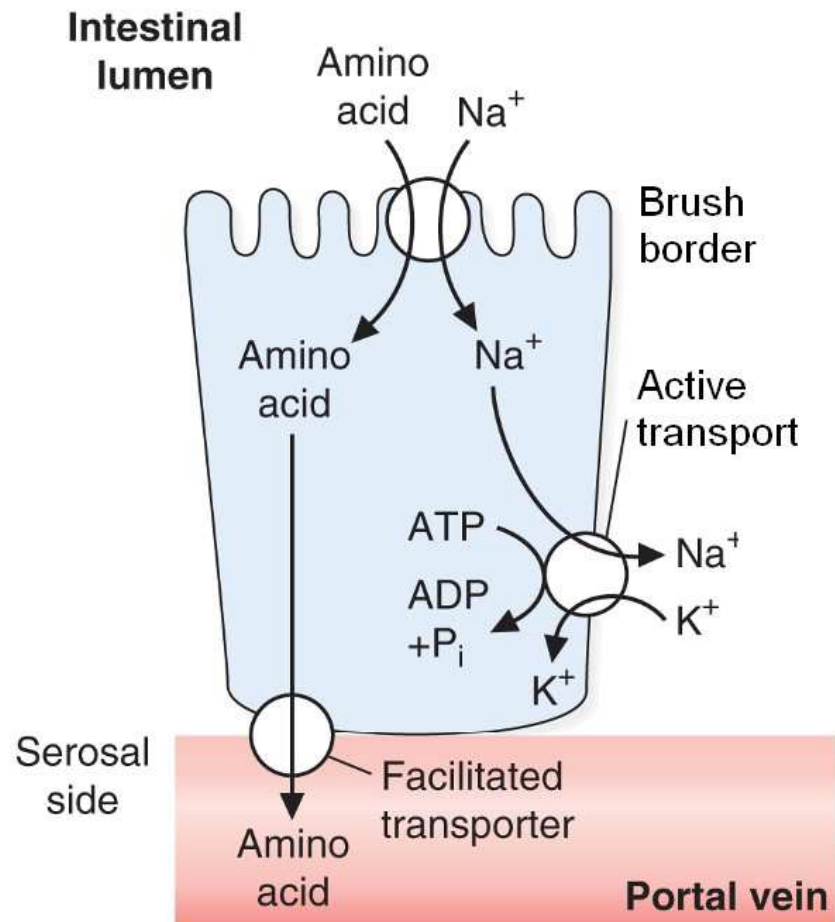
**Chymotrypsin** (pH 7.5 – 8.5) – peptidová vazba za Trp, Phe, Tyr, Met, Leu

**Pankreatická elastasa** (pH 7.5 – 8.5) – peptidová vazba za Ala, Gly a Ser

## Odbourávání aminokyselin intracelulárně

➤ Prvním krok - odstranění  $\alpha$ -aminoskupiny většinou jako  $\text{NH}_3$  → vyloučen přímo nebo přes další sloučeniny.

# Vstřebávání aminokyselin ve střevě



- Kotransport s  $\text{Na}^+$  - semispecifické  $\text{Na}^+$  dependentní proteiny
- Princip přenosu – vytvoří se sodíkový gradient
- Aminokyselina se dostává na serózní straně usnadněným transportem po koncentračním spádu.
- transportní systémy pro neutrální aminokyseliny, prolin a hydroxyprolin, kyselé, bazické aminokyseliny a cystin.

# Klinická korelace

Geneticky podmíněný porušený transport aminokyselin do buněk kartáčového lemu tenkého střeva a ledvinových tubulů, není reabsorpce v proximálním tubulu – proximálního tubulu → aminokyseliny do moče

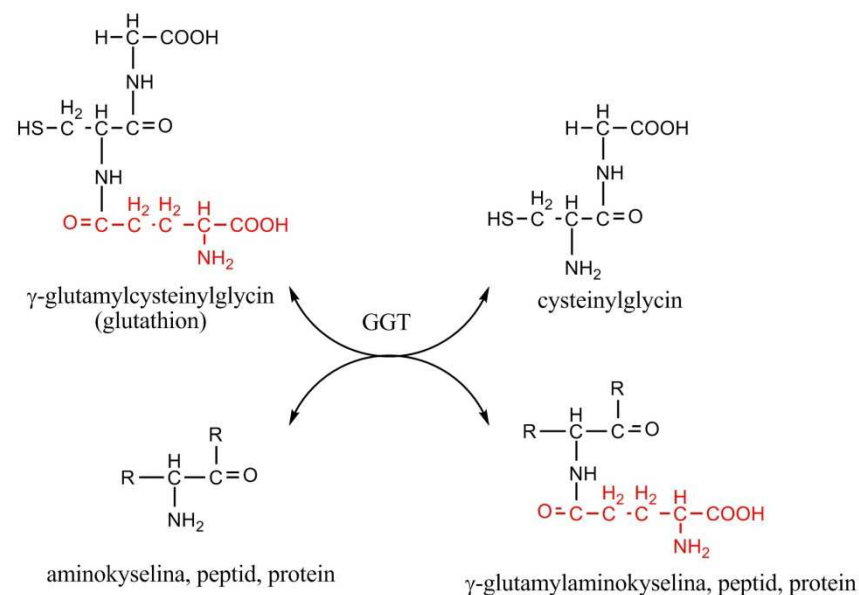
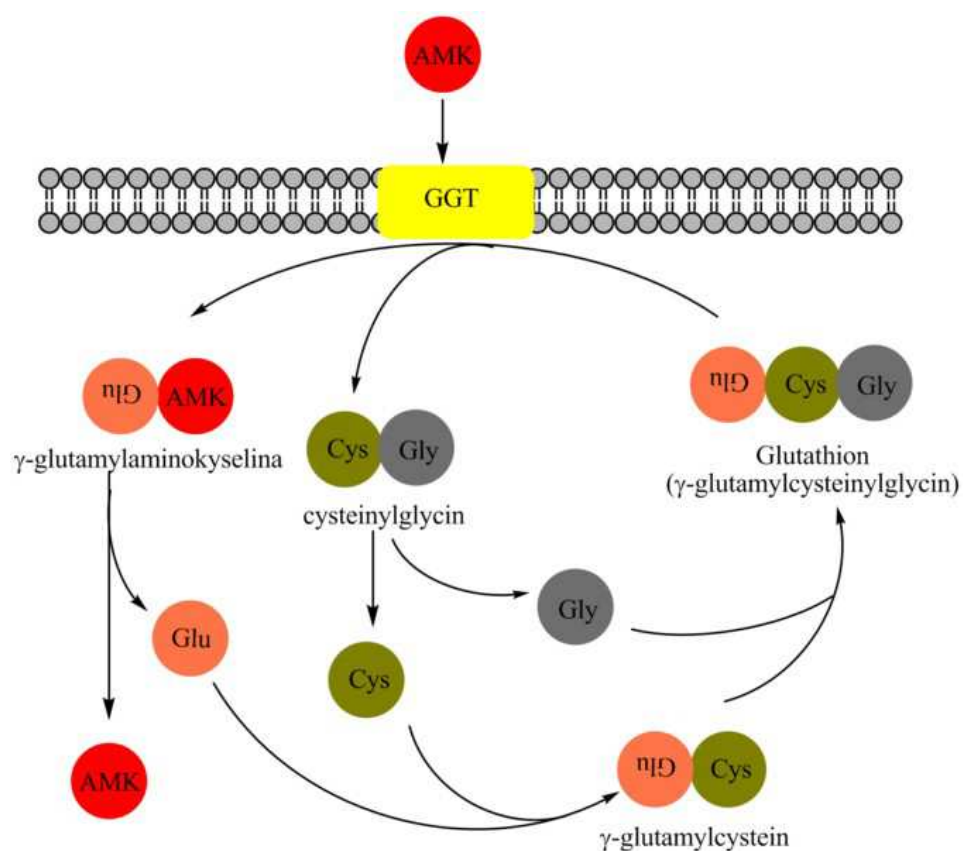
- **Cystinurie** – přenašeč pro cystin a bazické aminokyseliny, lysin, arginin, ornithin do buněk:
  - ledvinové kameny
- **Hartnupova choroba** – přenašeč pro neutrální aminokyseliny, včetně esenciálních (Ile, Leu, Val, Phe, Thr, Trp)
  - obvykle nevyvolává žádné klinické příznaky, pouze nedostatek esenciálních AK může vyvolat určité klinické obtíže

Moč novorozenců je rutinně vyšetřována

# Glutathion a přenos aminokyselin (gama-glutamylový cyklus)

$\gamma$ -glutamyltransferasa (GGT) v ledvinách (plasmatická membrána renálních tubulů) a v ER hepatocytů.

GGT má diagnostický význam u hepatobiliárních poruch



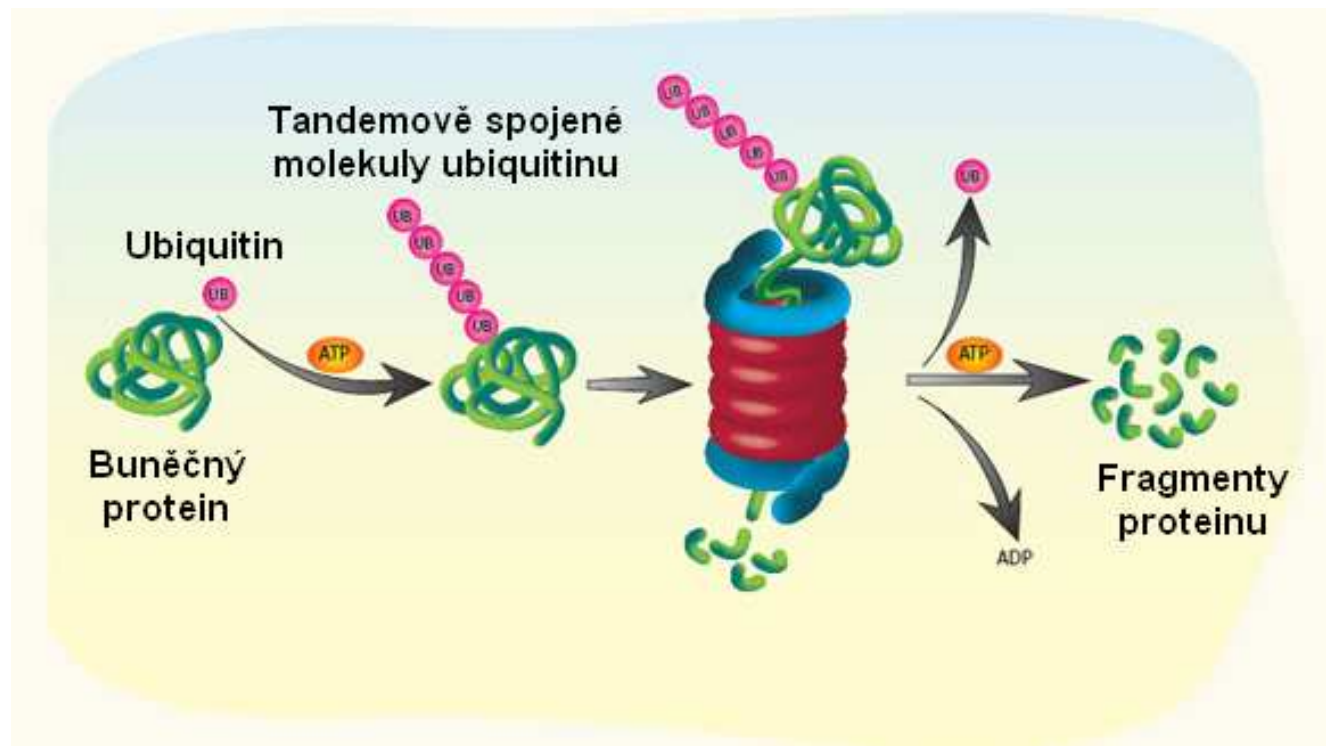
# Metabolický obrat (turnover) proteinů

- Rychlost turnoveru proteinů:
  - krátkodobé p. (regulační, špatně složené) – poločas minuty
  - dlouhodobé p. (většina buněčných proteinů) – poločas dny, týdny
  - strukturální p. (kolagen) – metabolicky stabilní
- Odbourání proteinů:
  - systém ATP-dependentního ubiquitinového proteasomu (cytosol) → endogenní proteiny
  - systém na ATP nezávislých lysosomálních enzymů (kyselé hydrolázy atd.) → extracelulární, povrchově membránové p.

## Proteasy podílející se na metabolismu/odbourávání proteinů

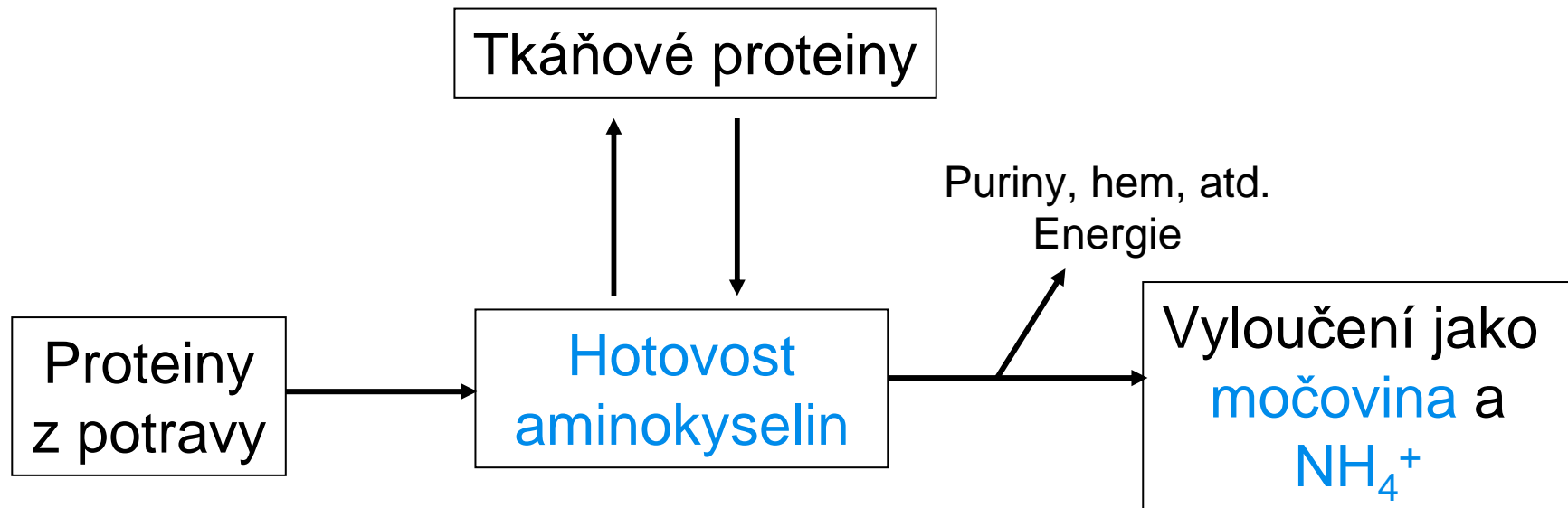
Klasifikace	Mechanismus	Úloha
Katepsiny	Cysteinové proteasy	Lysosomální enzymy
Kaspasy	Cysteinové proteasy štěpící za aspartátem	Apoptosa; aktivované z prokaspas
Matrixové metaloproteinasy	Zinek jako kofaktor	Degradace extracelulární matrix, regulace inhibitory TIMPs (tissue inhibitors of matrix metalloproteiniinases)
Proteasom	Velký komplex – degradace ubiquitinem značené proteiny	Metabolický obrat proteinů
Serinové proteasy	Serin v aktivním místě společně s histidinem a aspartátem	Mnoho enzymů odbourávání proteinů; koagulace, aktivované ze zymogenů
Kalpainy	Cysteinové proteasy, vápník jako kofaktor	Řada úloh v buněčné metabolismu

# Ubiquitin-proteasom



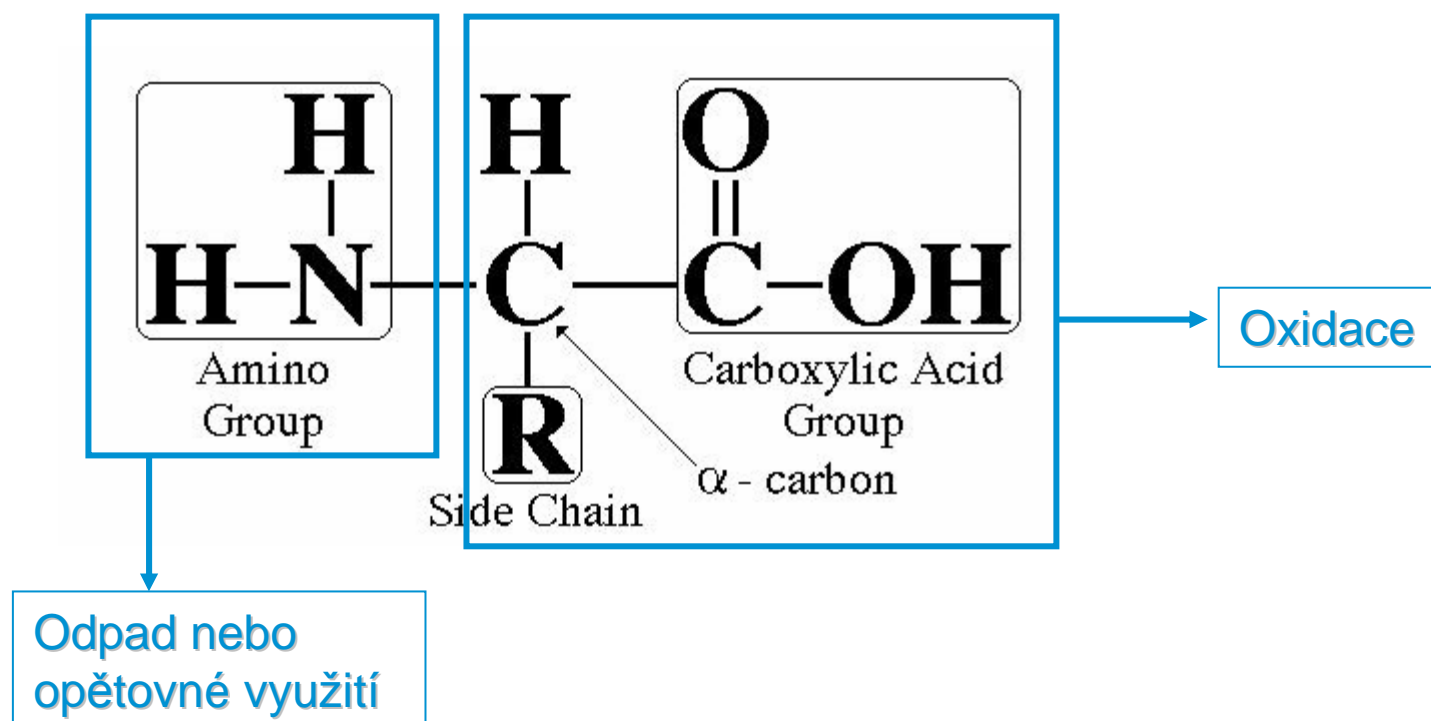


# Dusíková bilance



Množství dusíku přijatého v potravě je v rovnováze s vylučováním jeho ekvivalentního množství. Asi 80% vyloučeného dusíku je ve formě močoviny.

# Oxidace aminokyseliny a tvorba močoviny



# Zdroje amoniaku

- Amoniak pochází z **katabolismu aminokyselin** a ty především z **odbourávání proteinů** – jak přijatých potravou, tak endogenních:
  - trávicí enzymy
  - proteiny pocházející z odloučených buněk povrchu GIT
  - svalové proteiny
  - hemoglobin
  - intracelulární proteiny (poškozené, nepotřebné)

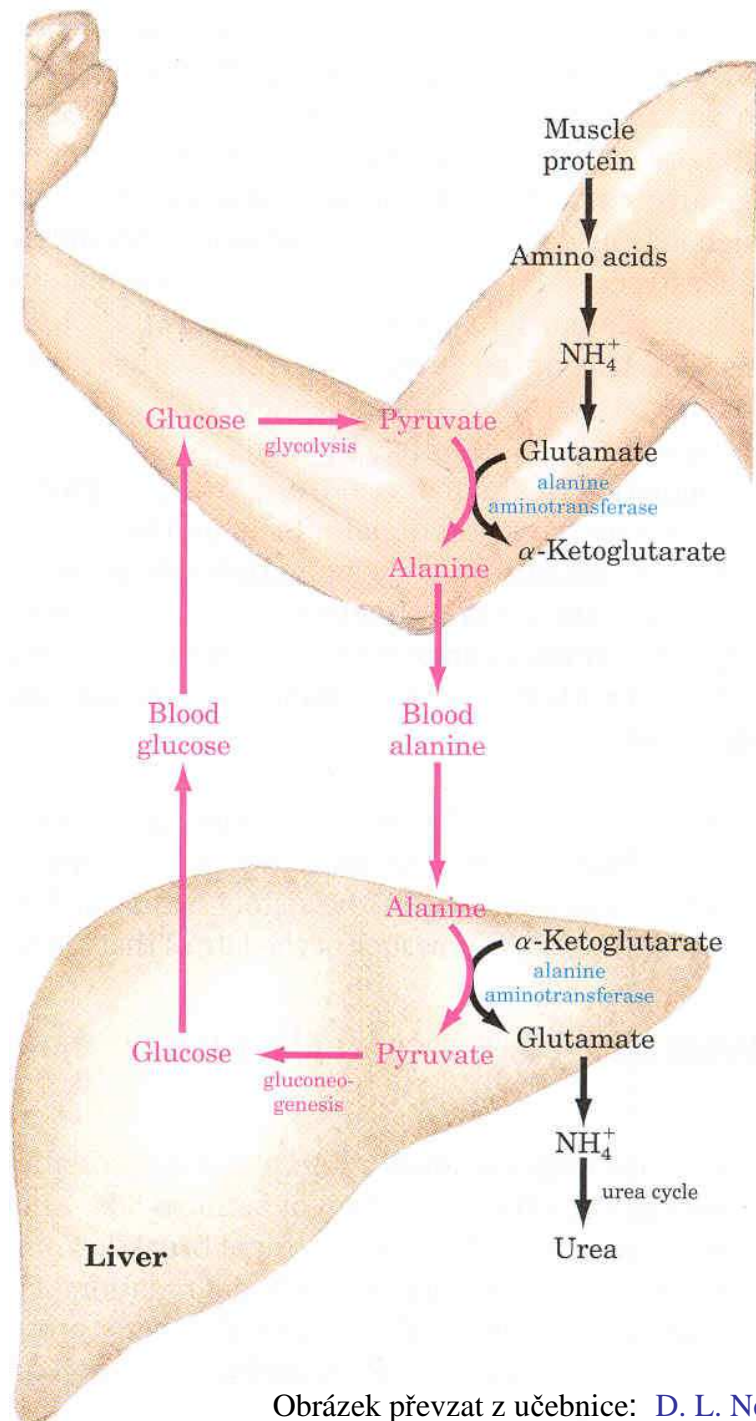
# Transport aminodusíku při odbourávání svalových bílkovin

## Glukoso-alaninový cyklus

**Alanin** vyplavený ze svalu a periferních tkání, je použit pro **glukoneogenezi** v játrech a glukóza je opětovně vychytávána svailem a periferními tkáněmi → **pyruvát** → alanin atd.

Aminodusík z alaninu je v játrech použit pro syntézu močoviny.

(Obdoba cyklu Coriových).



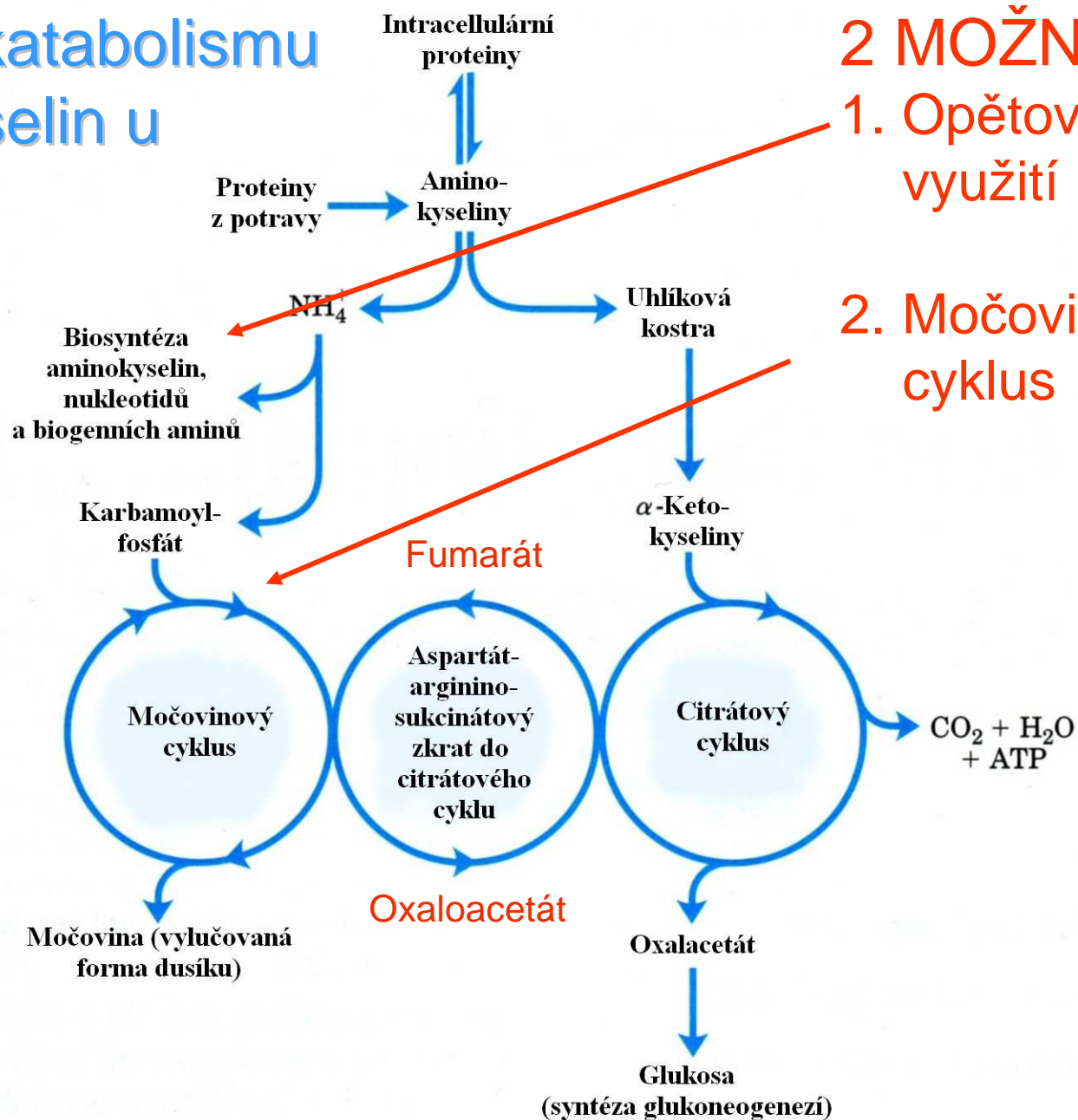
# Amoniak musí být odstraňován:

- Amoniak je toxický, zejména pro CNS, protože reaguje s  $\alpha$ -ketoglutarátem, a tak snižuje jeho dostupnost pro citrátový cyklus  $\Rightarrow$  kolaps CC a následně i syntézy ATP.



- Při poškození jater nebo vrozené metabolické poruše, kdy stoupá koncentrace amoniaku, se může objevit třes, nezřetelná řeč, rozmazané vidění, koma a smrt.
- Normální koncentrace amoniaku v krvi: 30-60  $\mu$ M

# Přehled katabolismu aminokyselin u savců

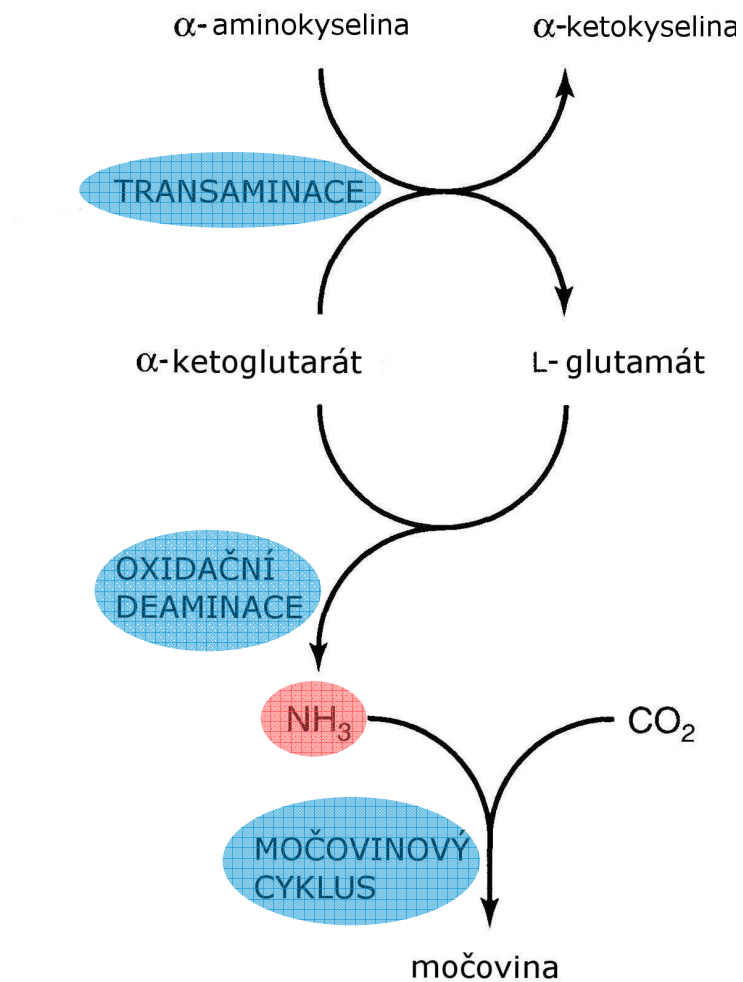


## 2 MOŽNOSTI

1. Opětovné využití

2. Močovinový cyklus

# Odstranění dusíku z aminokyselin



# Odstranění dusíku z aminokyselin

Krok 1: odstranění aminoskupiny

Krok 2: přesun do jater

Krok 3: vstup do mitochondrie

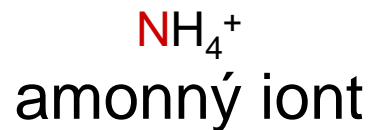
Krok 4: příprava dusíku pro vstup do močovino-  
vého cyklu

Krok 5: močovinový cyklus



# Exkreční formy dusíku

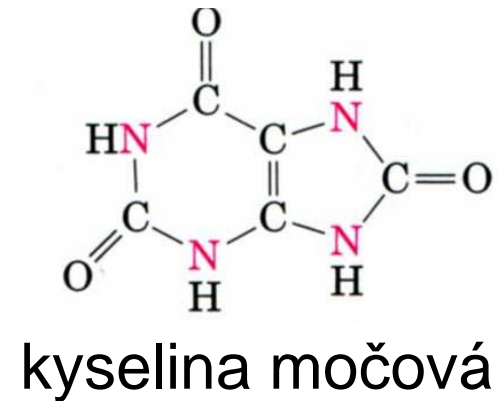
a)



b)



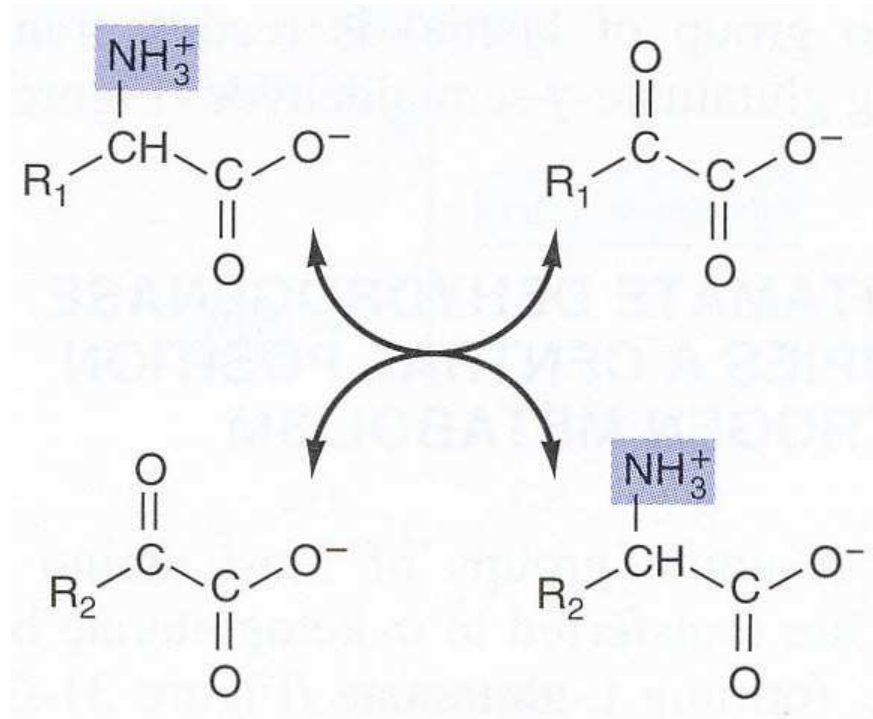
c)



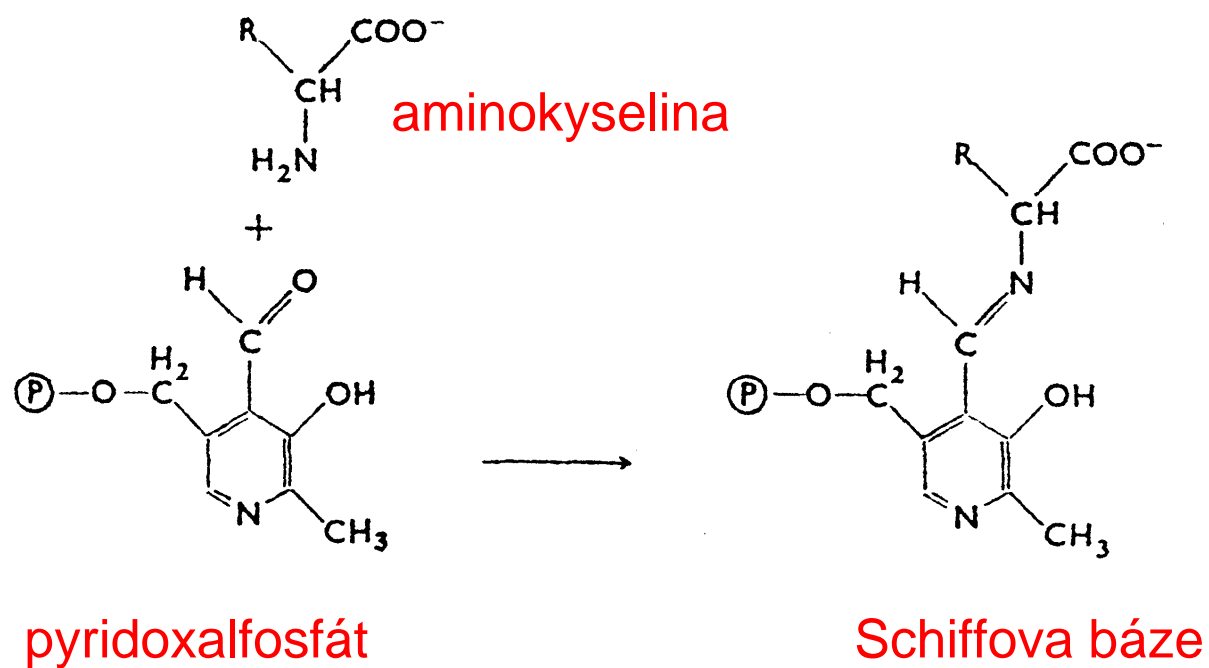
- a) přebytek  $\text{NH}_4^+$  se vyloučí jako amoniak (bakterie, vodní obratlovci nebo larvy obojživelníků),
- b) močovina (mnoho suchozemských obratlovců),
- c) nebo kyselina močová (ptáci a suchozemští plazi)

# Krok 1. odstranění aminoskupiny

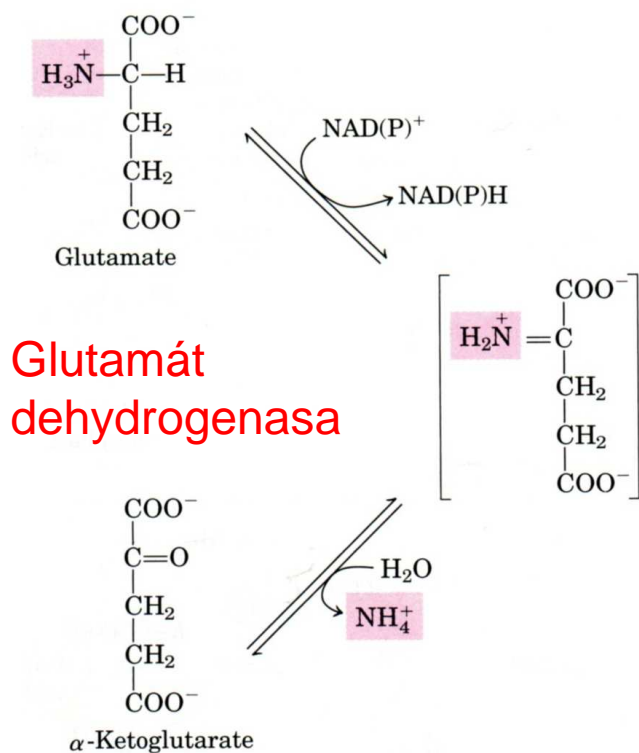
- Přenos aminoskupiny aminokyseliny na  $\alpha$ -ketokyselinu  $\Rightarrow$  původní AK se mění na  $\alpha$ -ketokyselinu a naopak:



- Transaminaci katalyzují **transaminasy** (**aminotransferasy**) s koenzymem **pyridoxalfosfátem**:



## Krok 2: přesun aminoskupiny do jater

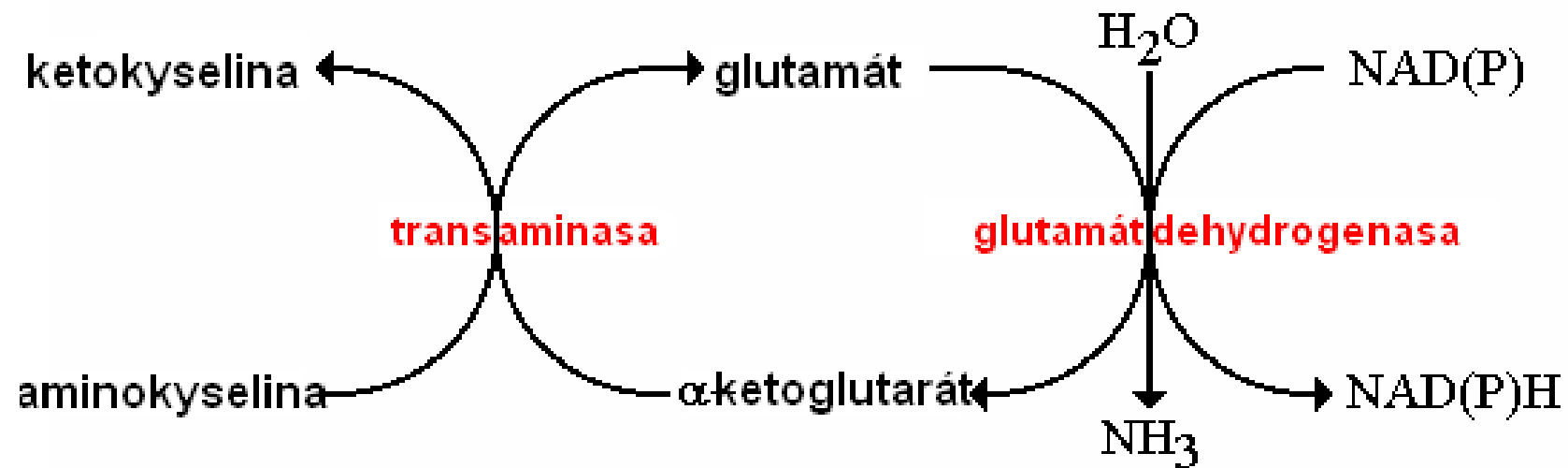


Aminoskupina z mnoha  $\alpha$ -aminokyselin se shromažďuje v játrech ve formě aminoskupiny L-glutamátu.

Oxidativní deaminace glutamátu (glutamátdehydrogenasa)  $\rightarrow$  uvolnění  $\text{NH}_3$  (mitochondrie) v játrech.

Jaterní glutamátdehydrogenasa - **jediná z enzymů schopná využívat  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  jako akceptory redukujících ekvivalentů.**

**Transdeaminace** - kombinované působení  
transaminasy a glutamátdehydrogenasy



# Látky dopravující dusík

## 1. Glutamát

přenáší jednu aminoskupinu UVNITŘ buněk:  
transaminasy → na  $\alpha$ -ketoglutarát přenášejí  
aminoskupinu za vzniku glutamátu

Glutamátdehydrogenase → opačná reakce

## 2. Glutamin

přenáší dvě aminoskupiny MEZI buňkami → uvolní je v  
játrech

## 3. Alanin

přenáší aminoskupinu ze tkání (svalů) do jater

Glutamin transportuje  
amoniak z krevního řečiště

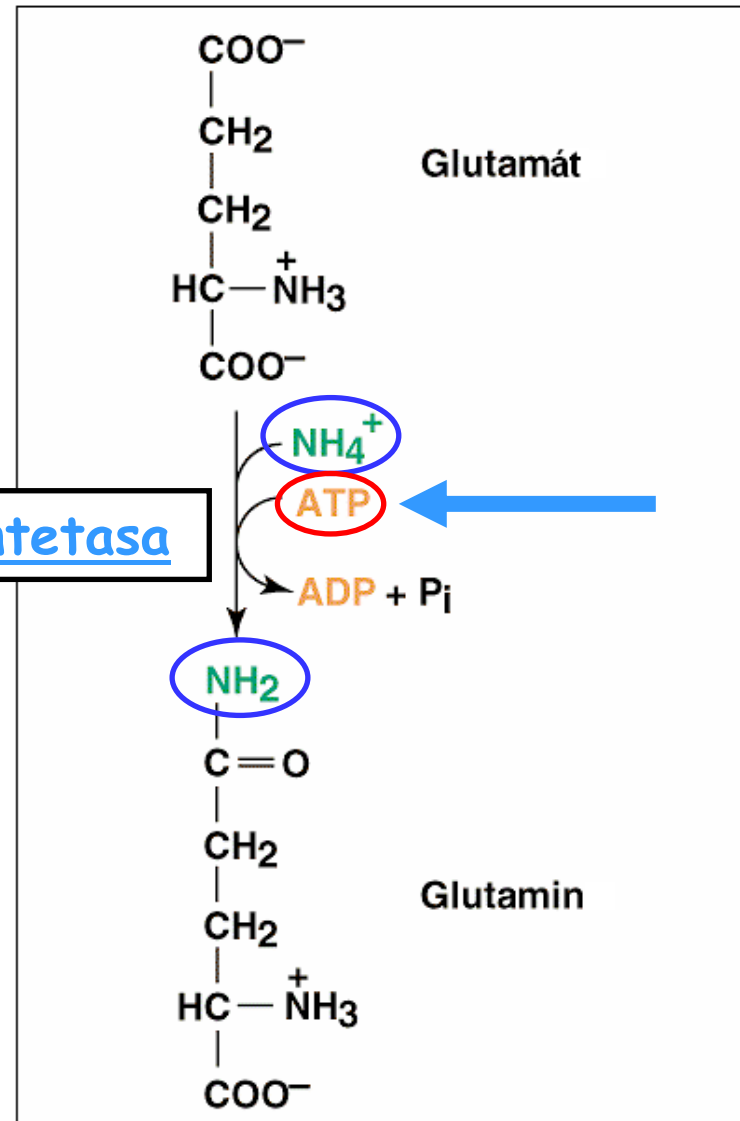
Nejvýznamnější transportní  
forma aminodusíku v krvi.

glutaminsyntetasa

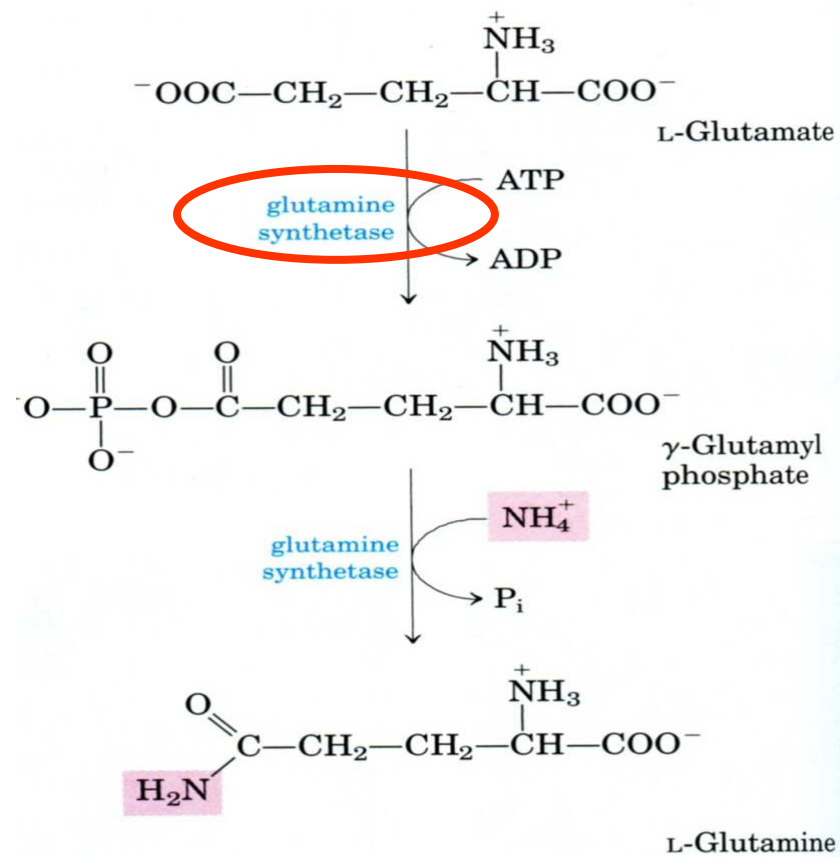
Glutamin transport do jater

Mitochondrie hepatocytů →  
**glutaminasa** → uvolnění  $\text{NH}_3$ ,  
glutamin se mění zpět na glutamát.

$\text{NH}_3$  se v močovinovém cyklu mění na  
močovinu.



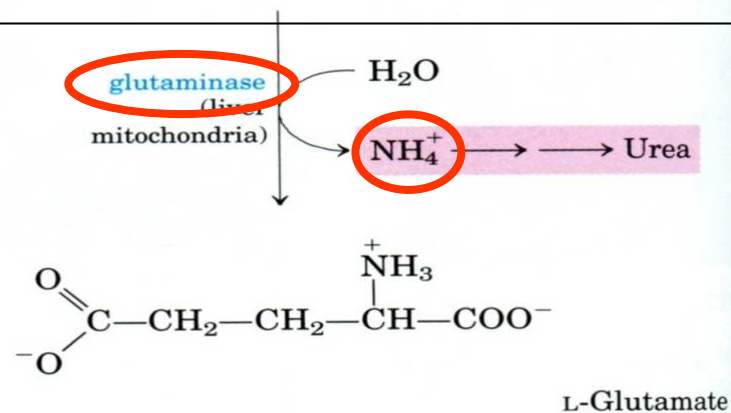
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



Přenos uvnitř buňky

Přenos mezi buňkami

V játrech





# Zdroje $\text{NH}_3$ pro močovinový cyklus

- Oxidační deaminace Glu, nahromaděného transaminacemi a glutamínasovou reakcí; vzniká  $\alpha$ -ketoglutarát a amoniak, který v játrech vstupuje do močovinového cyklu.
- Glutamínasová reakce – uvolňuje amoniak, který v játrech vstupuje do močovinového cyklu (v ledvinách do moče).
- Katabolismus Ser, Thr a His rovněž uvolňuje amoniak:

Serin - threonin dehydratasa

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

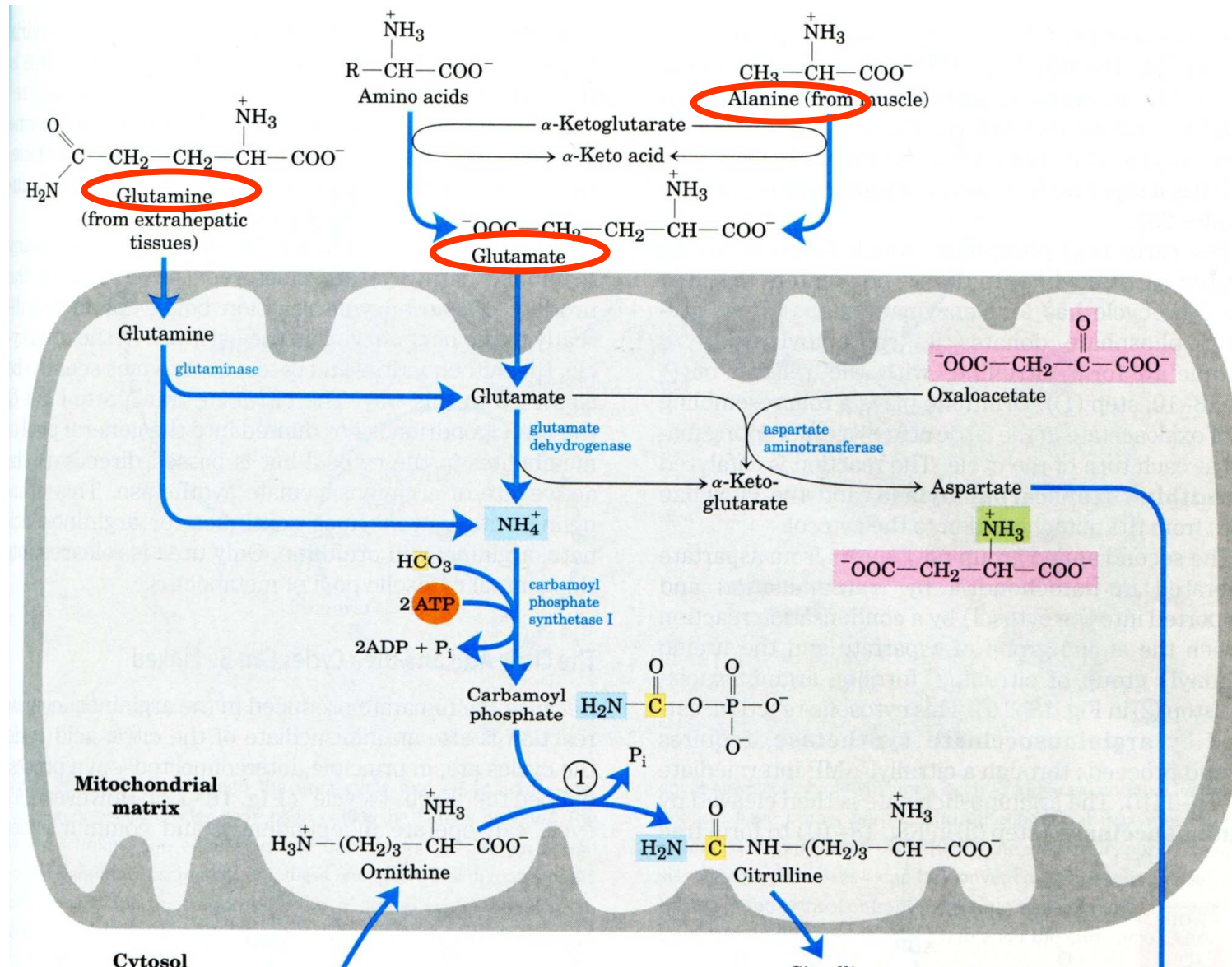
Threonin  $\rightarrow\rightarrow$   $\alpha$ -ketobutyrát +  $\text{NH}_4^+$

- Amoniak produkují také střevní bakterie.

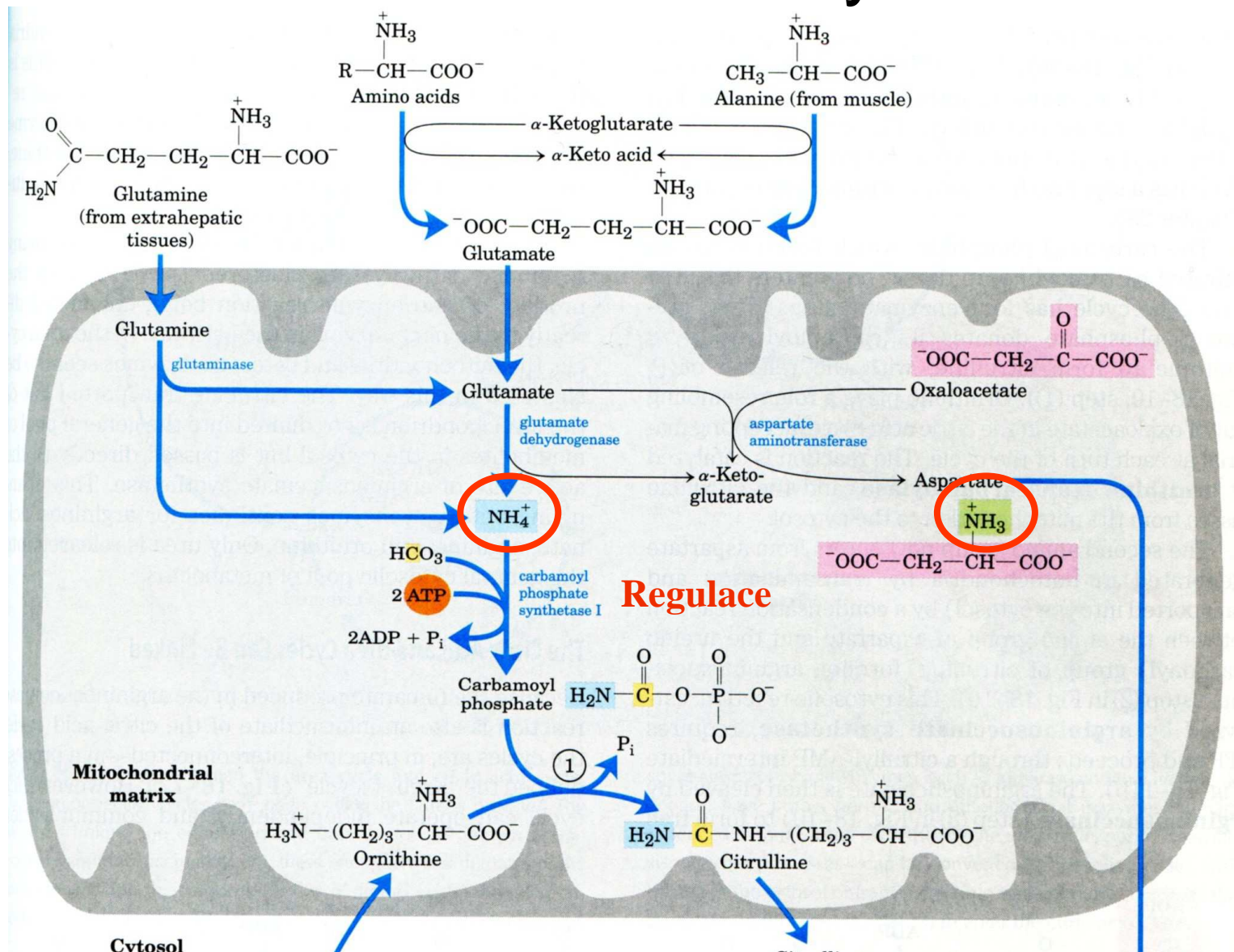
# Shrnutí:

- Nositelé dusíku  $\Rightarrow$  glutamát, glutamin, alanin
- 2 enzymy mimojaterní, 2 enzymy uvnitř jater:
  - **transaminasa** (PLP)  $\rightarrow$   $\alpha$ -ketoglutarát  $\rightarrow$  glutamát
  - **glutamátdehydrogenasa** (bez PLP)  $\rightarrow$  glutamát  $\rightarrow$   $\alpha$ -ketoglutarát (**v játrech**)
  - **glutaminsynthasa**  $\rightarrow$  glutamát  $\rightarrow$  glutamin
  - **glutaminasa**  $\rightarrow$  glutamin  $\rightarrow$  glutamát (**v játrech**)

# Krok 3: vstup dusíku do mitochondrie

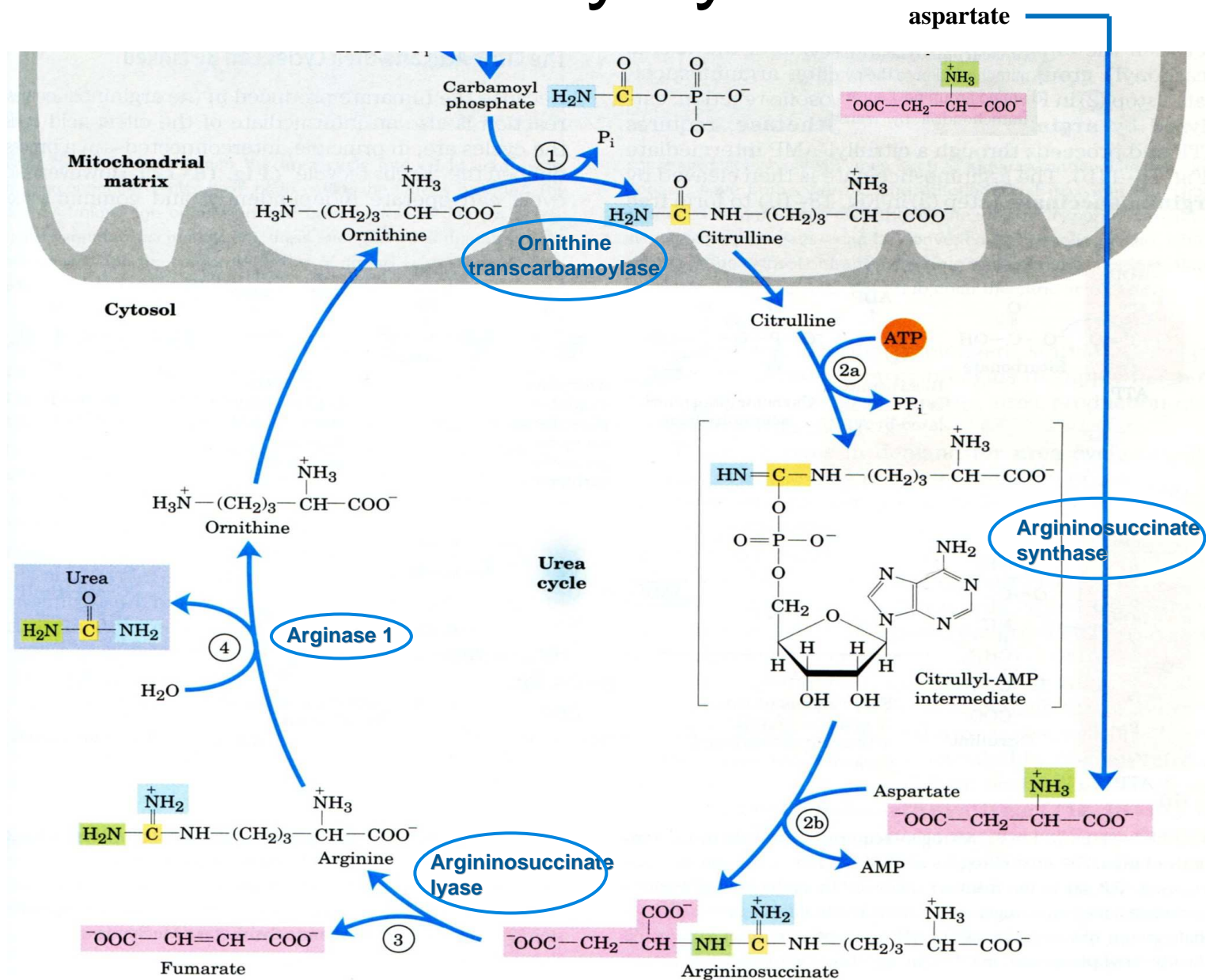


## Krok 4: příprava dusíku pro vstup do močovinového cyklu

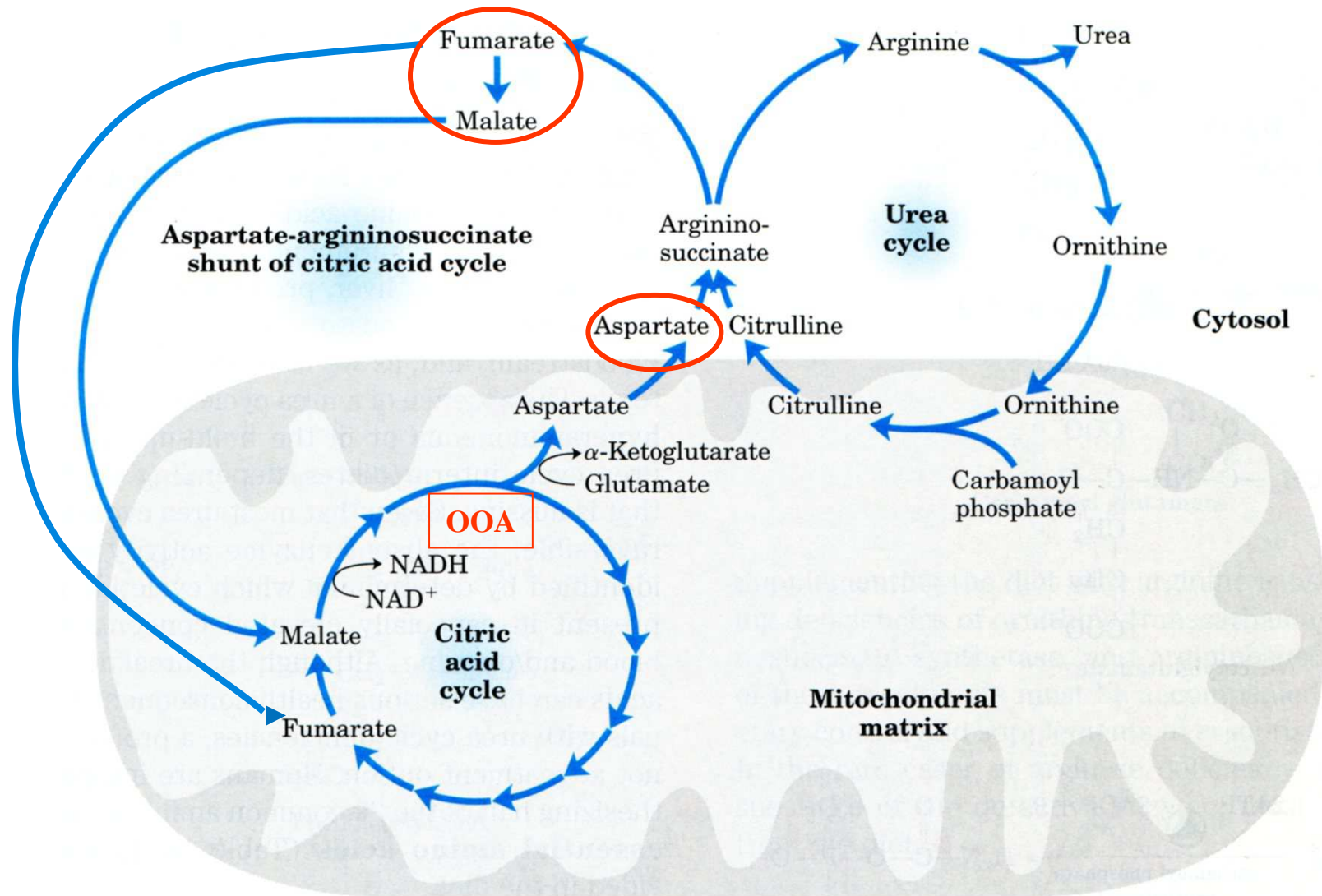




# Krok 5: močovinový cyklus



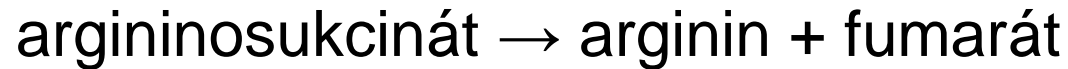
Oxaloacetát → aspartát



# Močovinový cyklus – opakování, sled reakcí

- **Karbamoylfosfát** - jeho tvorba v mitochondriích je nezbytným předpokladem pro močovinový cyklus  
– (*karbamoylfosfátsynthetasa*)
- **Citrulin** – tvorba z karbamoylfosfátu a ornithinu  
– (*ornithintranskarbamoylasa*)
- Aspartát poskytuje další dusík pro tvorbu **argininosukcinátu** v cytosolu  
– (*argininosukcinátsynthasa*)
- Tvorba **argininu** a **fumarátu**  
– (*argininosukcinátlyasa*)
- Hydrolýza argininu na **močovinu** a ornithin  
– (*arginasa*)

# Bilance močovinového cyklu





# Regulace močovinového cyklu

Aktivita je regulována na dvou úrovních:

- potravou jsou primárně proteiny → hodně močoviny (aminokyseliny se využijí jako zdroj energie)
- Dlouhodobé hladovění → odbourávání svalových proteinů → hodně močoviny také
- Rychlost syntézy čtyř enzymů močovinového cyklu a karbamoylfosfátsynthetasy I (CPS-I) v játrech je regulována změnami danými požadavky na aktivitu močovinového cyklu.

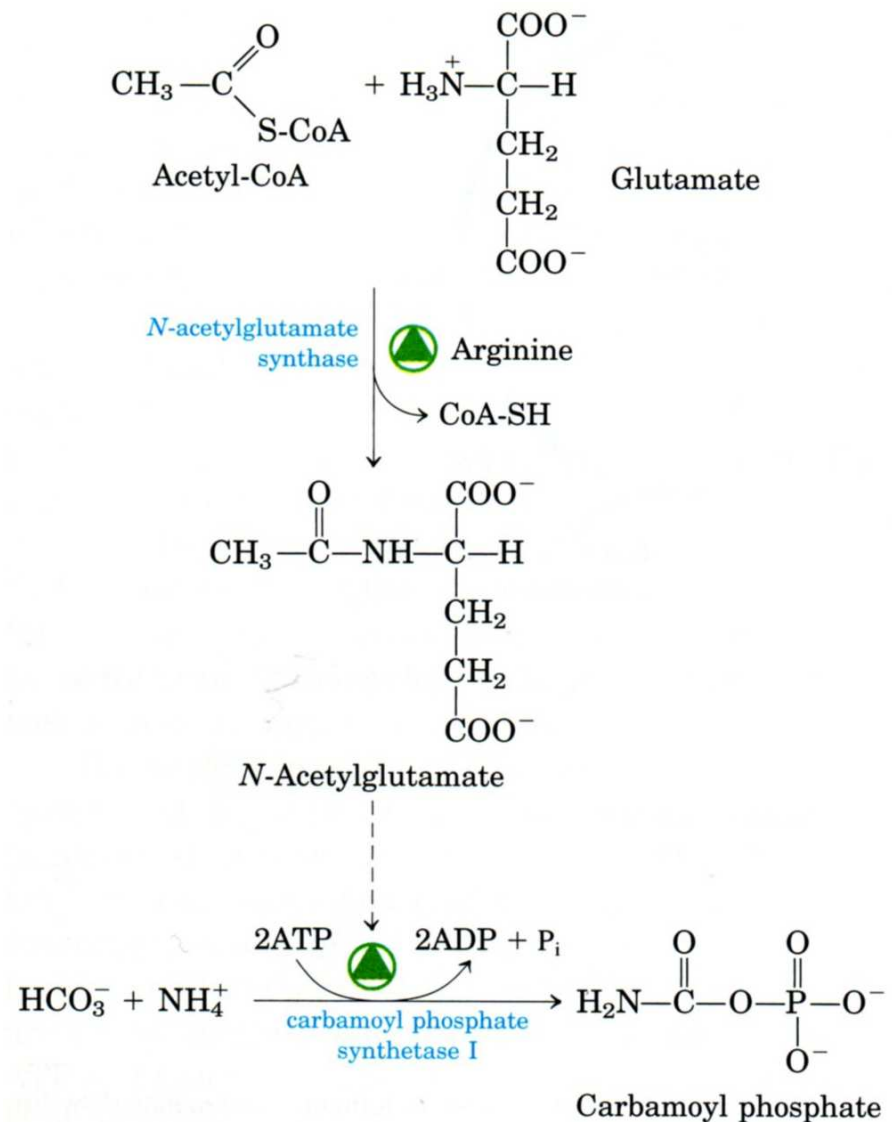
# Regulace močovinového cyklu

- Velmi rychle se enzymy syntetizují
  - během hladovění
  - u diety s vysokým obsahem proteinů
- Pomalu se enzymy syntetizují
  - u dostatečné stravy obsahující cukry a tuky
  - u bezproteinové diety

# Regulace močovinového cyklu

N-acetylglutamová kyselina –  
*alosterický* aktivátor **CPS-I**

- Vysoká koncentrace *Arg* →  
stimulace N-acetylace  
glutamátu acetyl-CoA



# Enzymatické poruchy močovinového cyklu

# Toxicita amoniaku

## *Jaterní encefalopatie*

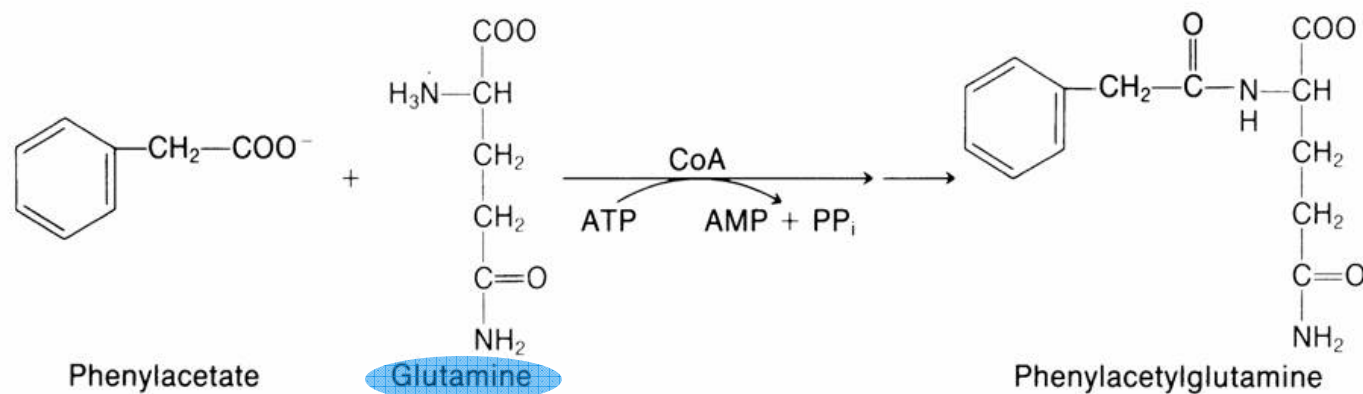
- Vysoká hladina amoniaku v krvi a jiných biologických tekutinách → difúze amoniaku do buněk, přes hematoencefalickou bariéru → zvýšená syntéza glutamátu z  $\alpha$ -ketoglutarátu, zvýšená syntéza glutaminu.
- vyčerpání  $\alpha$ -ketoglutarátu z CNS → inhibice citrátového cyklu a produkce ATP.
- Neurotransmitery – glutamát (excitační neurotr.) a GABA (inhibiční neurotr.), mohou přispívat k nežádoucím účinkům na CNS – bizarní chování.

## *Deficiencie N-acetylglutamátsynthasy:*

- Nedostatek nebo genetická mutace enzymu (autosomálně recesivní) → selhání močovinového cyklu.
- Těžká novorozenecká porucha s fatálními následky, není-li zjištěna ihned po porodu.
- Hyperamonemie a celková hyperaminoacidemie u novorozenců (játra nejsou schopná syntetizovat N-acetylglutamát).
- Mezi časné příznaky patří apatie, zvracení a hluboké bezvědomí .
- **Léčba:** podává se strukturální analog **N-karbamoyl-L-glutamát** – aktivuje CPS-I, snižuje intenzitu poruchy.

# Hyperamonémie I (*porucha karbamoylfosfátsynthetasy, CPS I*)

- autosomálně recesivní metabolická porucha, spojená s rozvojem mentální retardace a vývojovým opožděním.
- Hyperamonemie je pozorována u 0 – 50% množství syntetizované CPS-I v játrech oproti normálu.
- **Léčba:** podává se **benzoát** a **fenylacetát**, vzniklý hippurát a Phe-Ac-Gln se vyloučí močí:



## *Hyperamonémie II (porucha ornithintranskarbamoylasy, OTC):*

- Nejčastější, nejobvyklejší porucha močovinového cyklu, v důsledku zmutované a neúčinné formy enzymu.
- Recesivní na X chromosom vázaná porucha, způsobená řadou různých mutací genu pro OTC – u mužů je porucha závažnější než u žen (muži jsou asymptomatickými heterozygoty).
- Dochází k mentální retardaci a zpoždění vývoje.



## *Citrulinémie; citrulinurie - porucha argininsukcinátsyntetasy*

- autosomálně recesivní metabolická porucha, neschopnost kondenzace citrulinu s aspartátem.
- Hromadění citrulinu v krvi, ve velkém množství je citrulin vylučován do moči.
- Citrulinemie typu I - obvykle se projevuje v prvních dnech života.
- Citrulinemie typu II - příznaky a symptomy se obvykle projeví až v dospělosti a postižen je hlavně nervový systém.
- **Léčba** – specifická náhrada argininem pro syntézu proteinů a tvorbu kreatinu a ornithinu.

### *Argininosukcináurie - porucha argininosukcinátlyasy*

- Vzácné autosomálně recesivní onemocnění, argininosukcinát je vylučován ve velkém množství do moči.
- Závažnost příznaků se značně liší, je proto těžké určit vhodnou terapii - vhodné je dietní omezení dusíku .

### *Argininémie - porucha arginasy*

- Vzácné autosomálně recesivní onemocnění, vzniká řada abnormalit ve vývoji a funkci CNS.
- Hromadění Arg v krvi a vylučování Arg a prekurzorů a produktů jeho metabolismu v moči.
- **Léčba** – dieta s nízkým obsahem dusíku s obsahem esenciálních aminokyselin.

Hlavní zdroj pro přednášku: D. L. Nelson, M. M. Cox :  
LEHNINGER. PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY Fifth edition