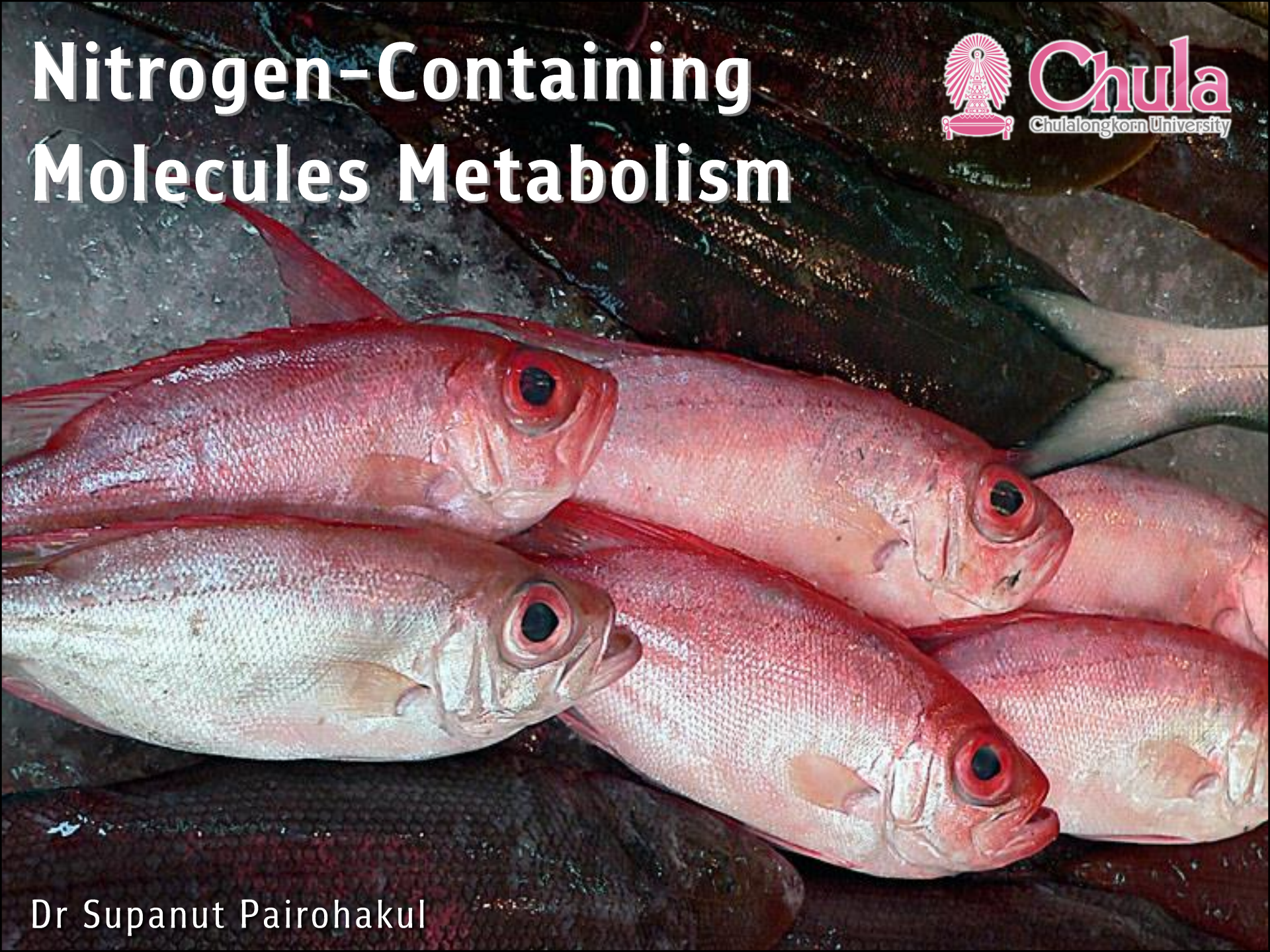
Nitrogen-Containing Molecules Metabolism



Dr Supanut Pairohakul

Introduction

- Nitrogen-containing molecules
  - เมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์
- Amino acid metabolism
  - กรดอะมิโนที่เกินความต้องการใน biosynthesis จะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน
  - กรดอะมิโนจะต้องมีการย้ายและกำจัดหมู่อะมิโน แล้วจึงเปลี่ยนโครงคาร์บอน (carbon skeleton) ที่เหลือไปเป็นสารตัวกลางในการเมแทบอลิซึม

Amino Acid Degradation

- Amino Acid Degradation: Overview
  - กรดอะมิโนเป็นสารชีวโมเลกุลที่ไม่มีการสะสมในร่างกาย
  - ขั้นตอนการสลายกรดอะมิโน
    - การเคลื่อนย้ายและกำจัดหมู่อะมิโน
    - เมทาบอลิซึมของ carbon skeleton

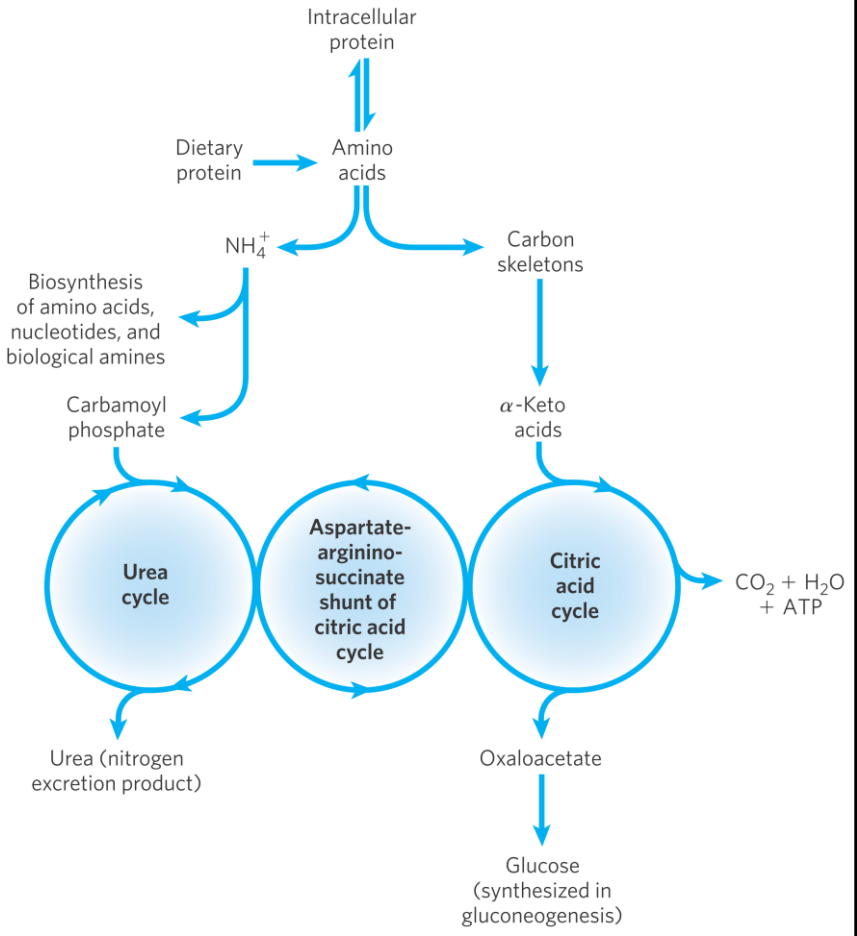
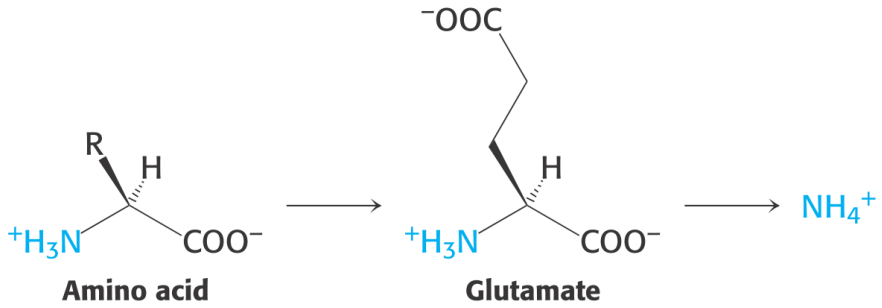


FIGURE 18–1 Overview of amino acid catabolism in mammals. The amino groups and the carbon skeleton take separate but interconnected pathways.

Amino Acid Degradation

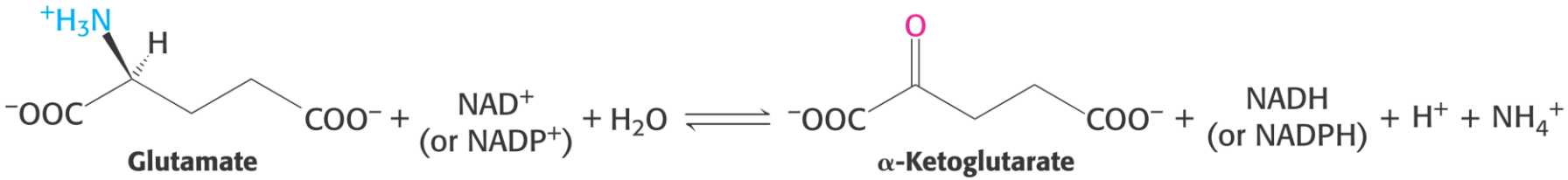
- Amino Acid Degradation (1)
  - α-amino acid ส่วนใหญ่จะมีการย้ายหมู่อะมิโนไปยัง α-ketoglutarate เป็นกลูตาเมต (glutamate) หลังจากนั้นจึงถูก oxidative deamination เป็น NH_4^+



  - เอนไซม์ที่ใช้ คือ aminotransferase (transaminase) e.g. aspartate aminotransferase หรือ alanine aminotransferase

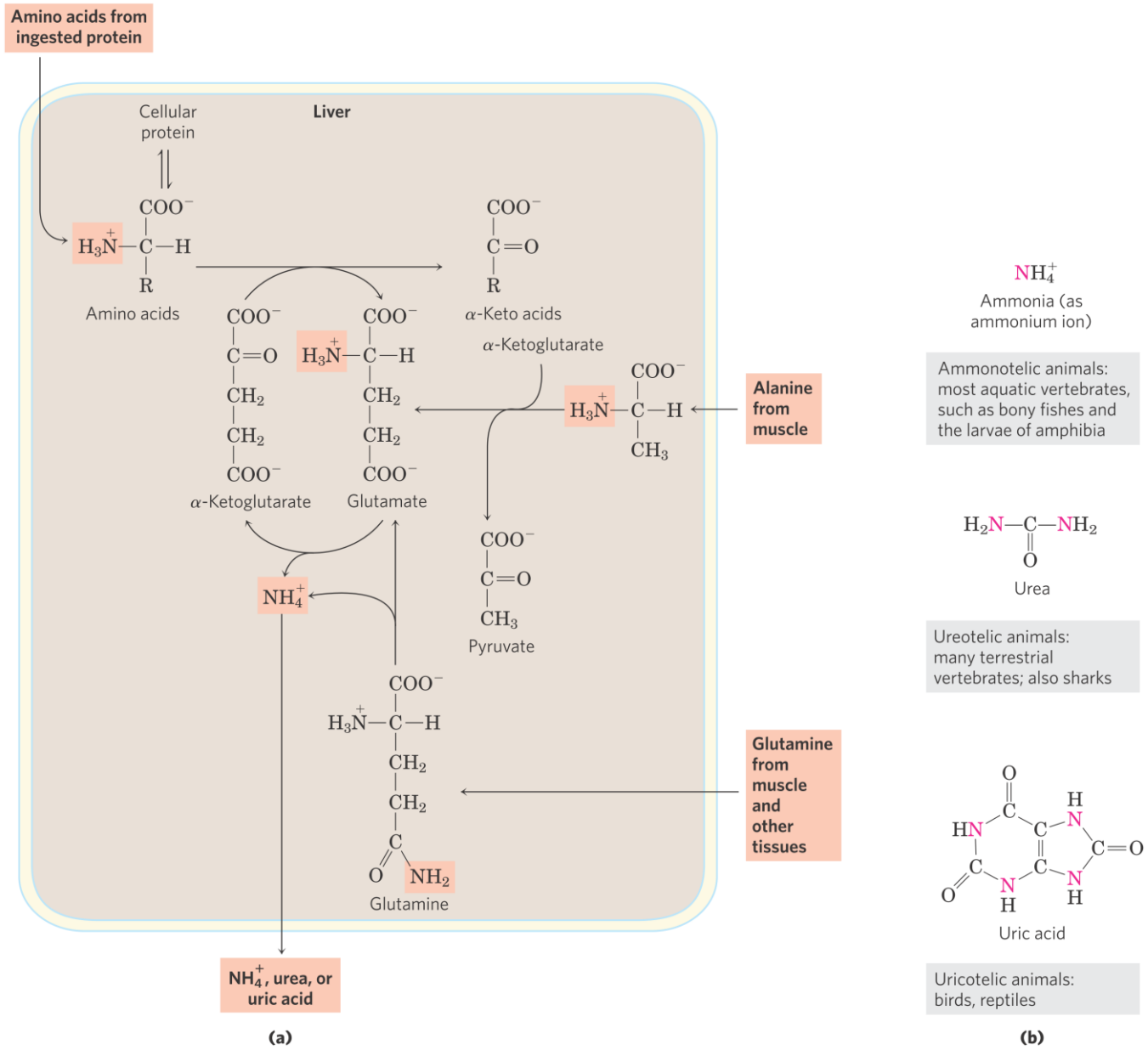
Amino Acid Degradation

- Amino Acid Degradation (2)
  - ไนโตรเจนใน glutamate จะถูกเปลี่ยนเป็น free NH_4^+ ด้วยกระบวนการ oxidative deamination และผลิตกลับเป็น α-ketoglutarate ใหม่อีกครั้ง
  - เอนไซม์ที่ใช้ คือ glutamate dehydrogenase
  - อาจใช้ได้ทั้ง NAD^+ หรือ $NADP^+$ เป็น reducing power



  - สำหรับ serine และ threonine จะสามารถเกิด deamination ได้โดยตรง

Amino Acid Degradation



NH_4^+

Ammonia (as ammonium ion)

Ammonotelic animals: most aquatic vertebrates, such as bony fishes and the larvae of amphibia

Urea

Ureotelic animals: many terrestrial vertebrates; also sharks

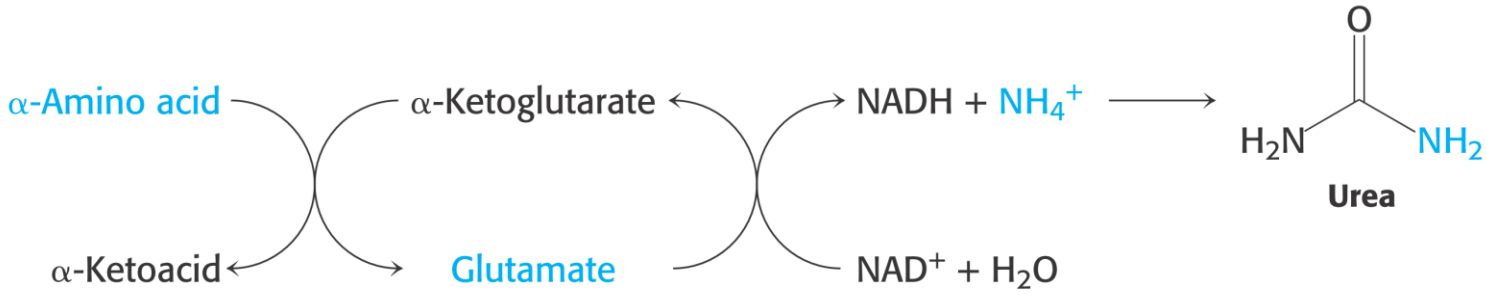
Uric acid

Uricotelic animals: birds, reptiles

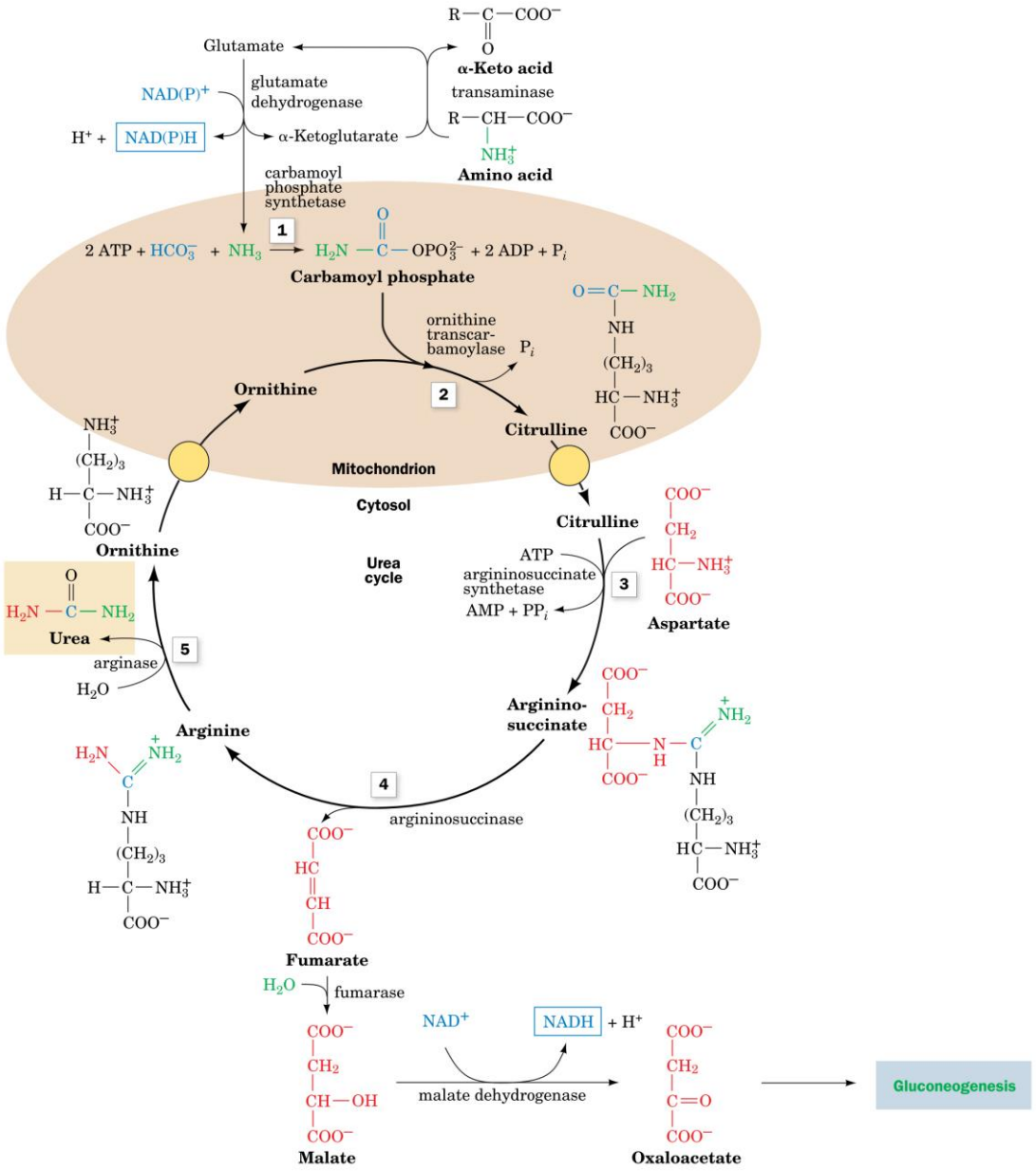
(b)

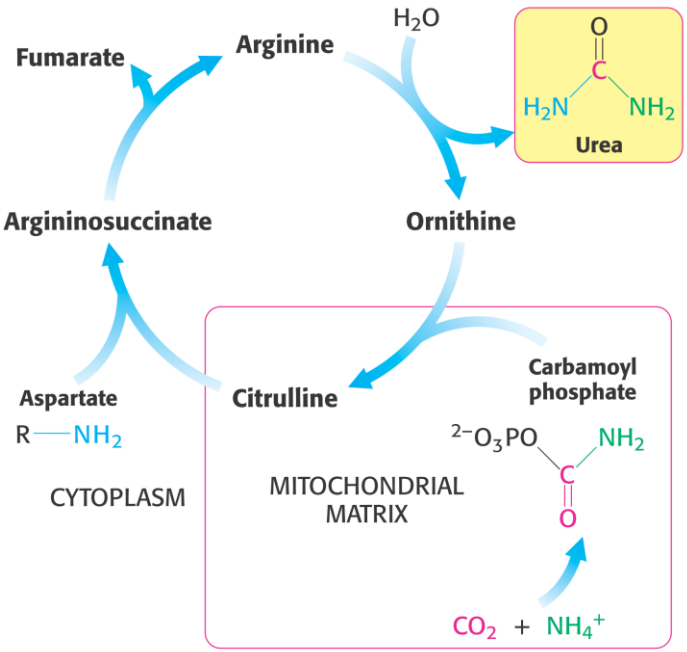
Amino Acid Degradation

- Amino Acid Degradation & Urea cycle
  - สัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิดจะมีการเปลี่ยนเป็นยูเรีย (urea) ที่ตับผ่านวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) และเรียกสัตว์กลุ่มนี้ว่า ureotelic animal



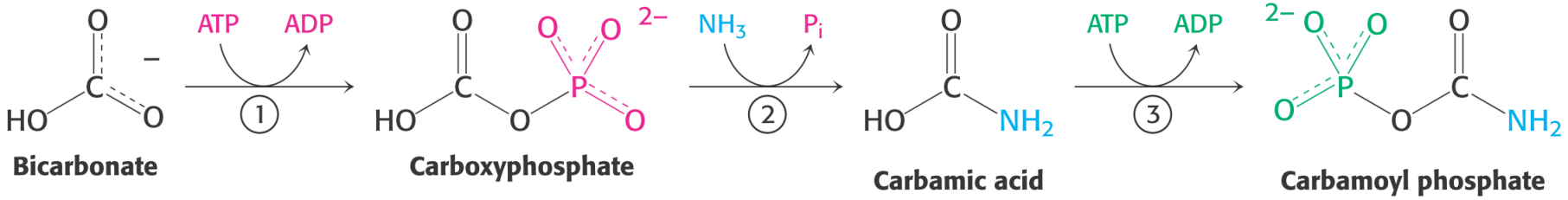
Amino Acid Degradation





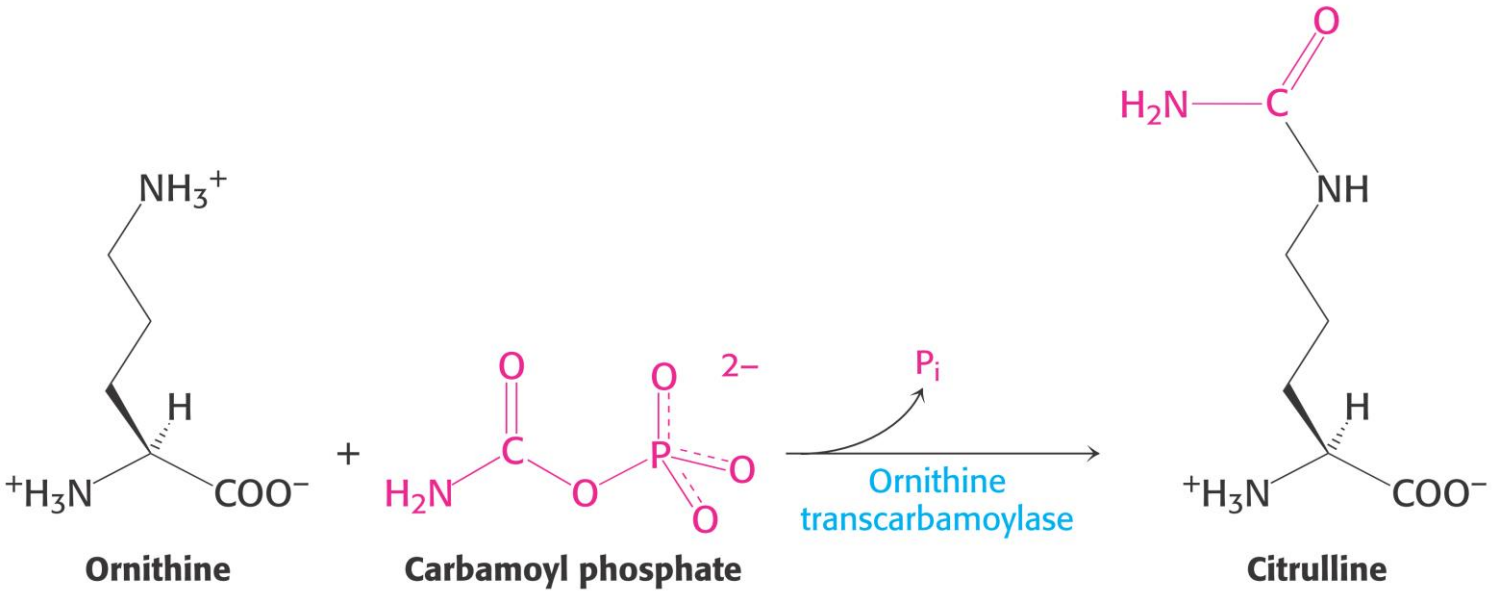
Urea Cycle

- วัฏจักรยูเรีย (Urea Cycle) (1)
  - การรวมกันของ NH_4^+ และ HCO_3^- เป็น carbamoyl phosphate
  - อาศัยการทำงานของ carbamoyl phosphate synthetase I (CPS I)
  - เกิดที่ matrix ของไมโทคอนเดรีย



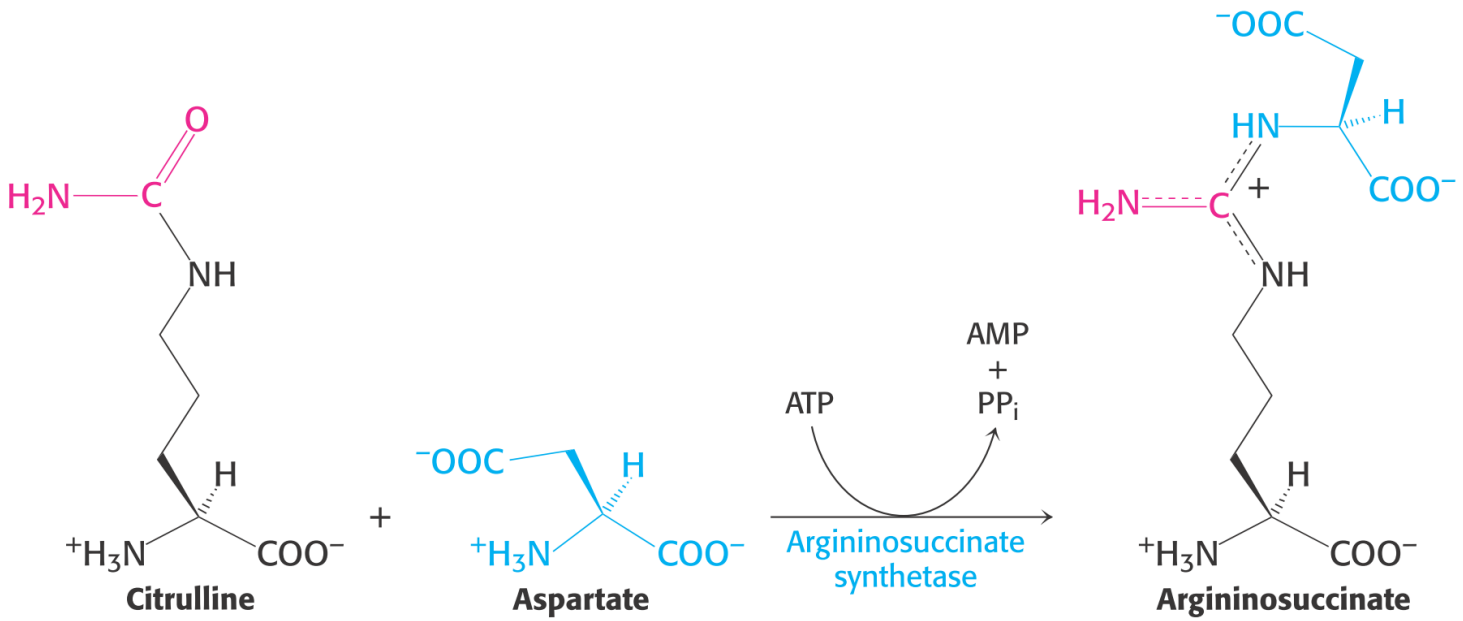
Urea Cycle

- วัฏจักรยูเรีย (Urea Cycle) (2)
  - Carbamoyl phosphate มีการย้าย carbamoyl group ไปยัง ornithine เกิดเป็น citrulline
  - เอนไซม์ที่ใช้ คือ ornithine transcarbamoylase
  - เกิดที่ matrix ของไมโทคอนเดรีย



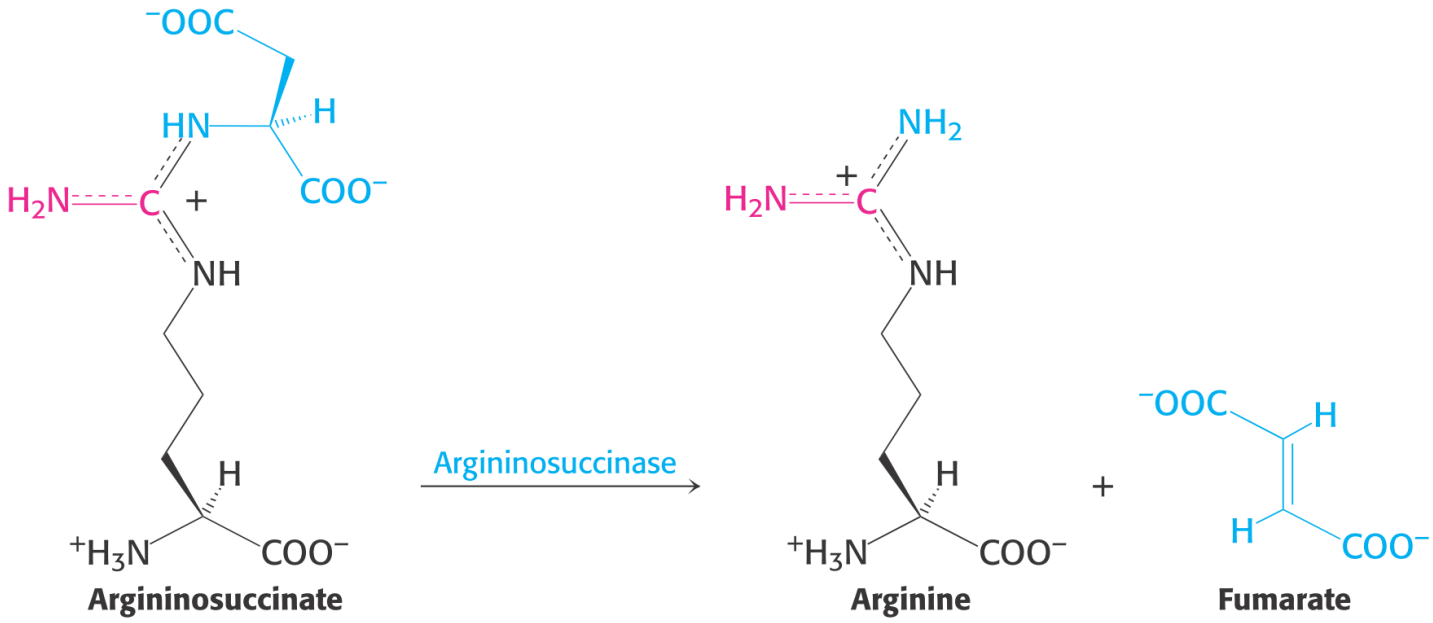
Urea Cycle

- วัฏจักรยูเรีย (Urea Cycle) (3)
  - Citrulline ลำเลียงมายัง cytosol และเกิด condensation รวมกับ aspartate เกิดเป็น argininosuccinate และมีการเกิด ATP cleavage เป็น AMP
  - อาศัยการทำงานของ argininosuccinate synthetase



Urea Cycle

- วัฏจักรยูเรีย (Urea Cycle) (4)
  - Argininosuccinate เกิดการ cleavage เป็น arginine และ fumarate
  - อาศัยการทำงานของเอนไซม์ argininosuccinase (argininosuccinate lyase)



Urea Cycle

- วัฏจักรยูเรีย (Urea Cycle) (5)
  - Arginine เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกลายเป็น ornithine และยูเรีย
  - เอนไซม์ที่ใช้ คือ arginase

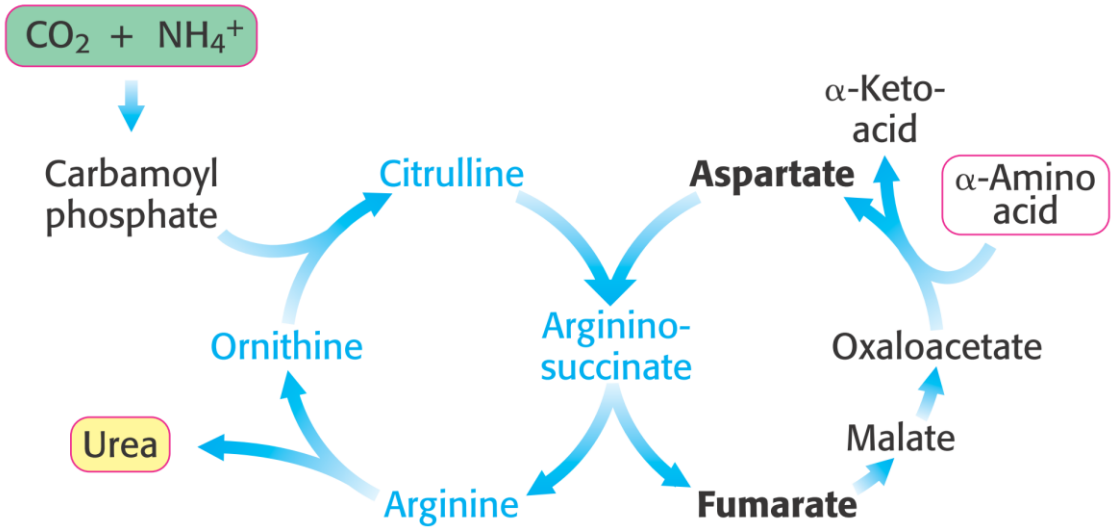
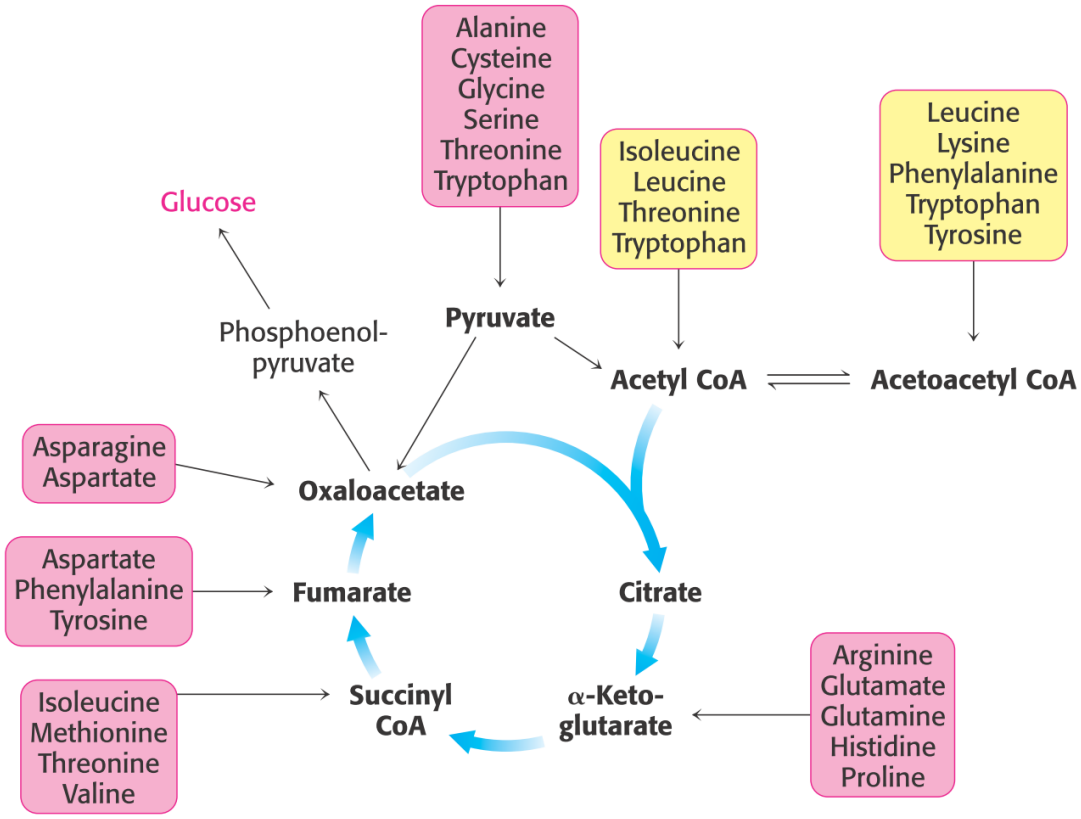


Figure 30.3 The metabolic context of nitrogen metabolism. The urea cycle, the citric acid cycle, and the transamination of oxaloacetate are linked by fumarate and aspartate.

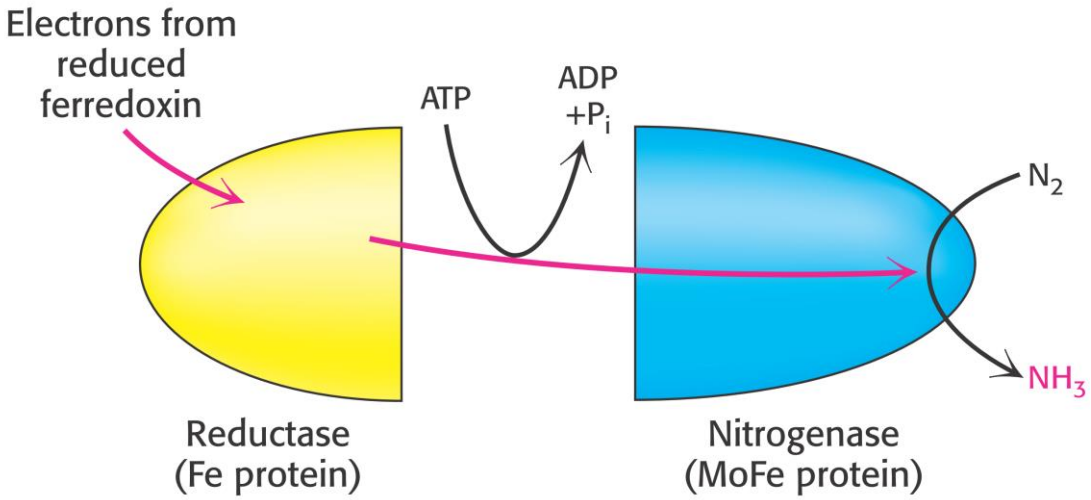
Carbon Skeletons and Metabolites

- Carbon Skeleton Transformation
  - Carbon skeleton ที่เกิดขึ้นหลังจากกำจัดหมู่อะมิโนจะสามารถเปลี่ยนกลับเป็นกลูโคสหรืออาจเข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริกได้
  - Carbon skeleton จากกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะสามารถเปลี่ยนได้เป็น 7 โมเลกุล คือ
    - Pyruvate
    - Acetyl CoA
    - Acetoacetyl CoA
    - α-ketoglutarate
    - Succinyl CoA
    - Fumarate
    - Oxaloacetate



Amino Acid Synthesis

- แหล่งไนโตรเจนและการตรึงไนโตรเจน
  - ไนโตรเจนพบมากที่สุดในอากาศ (ประมาณ 80%)
  - การตรึงไนโตรเจน (nitrogen fixation) – ใช้ nitrogenase complex
    - Reductase ทำให้เกิด high reducing power electron
    - Nitrogenase ใช้อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นในรีดิวซ์ N_2 ให้เป็น NH_3



Amino Acid Synthesis

- แหล่งไนโตรเจนและการตรึงไนโตรเจน
  - การรีดักชันของ N_2 เป็น NH_3 โดยปกติจะใช้ 6 อิเล็กตรอน

$$N_2 + 6\,e^- + 6\,H^+ \rightleftharpoons 2\,NH_3$$

  - ในระบบชีวภาพจะมีการผลิต H_2 เกิดขึ้น ดังนั้นจะใช้ 8 อิเล็กตรอน

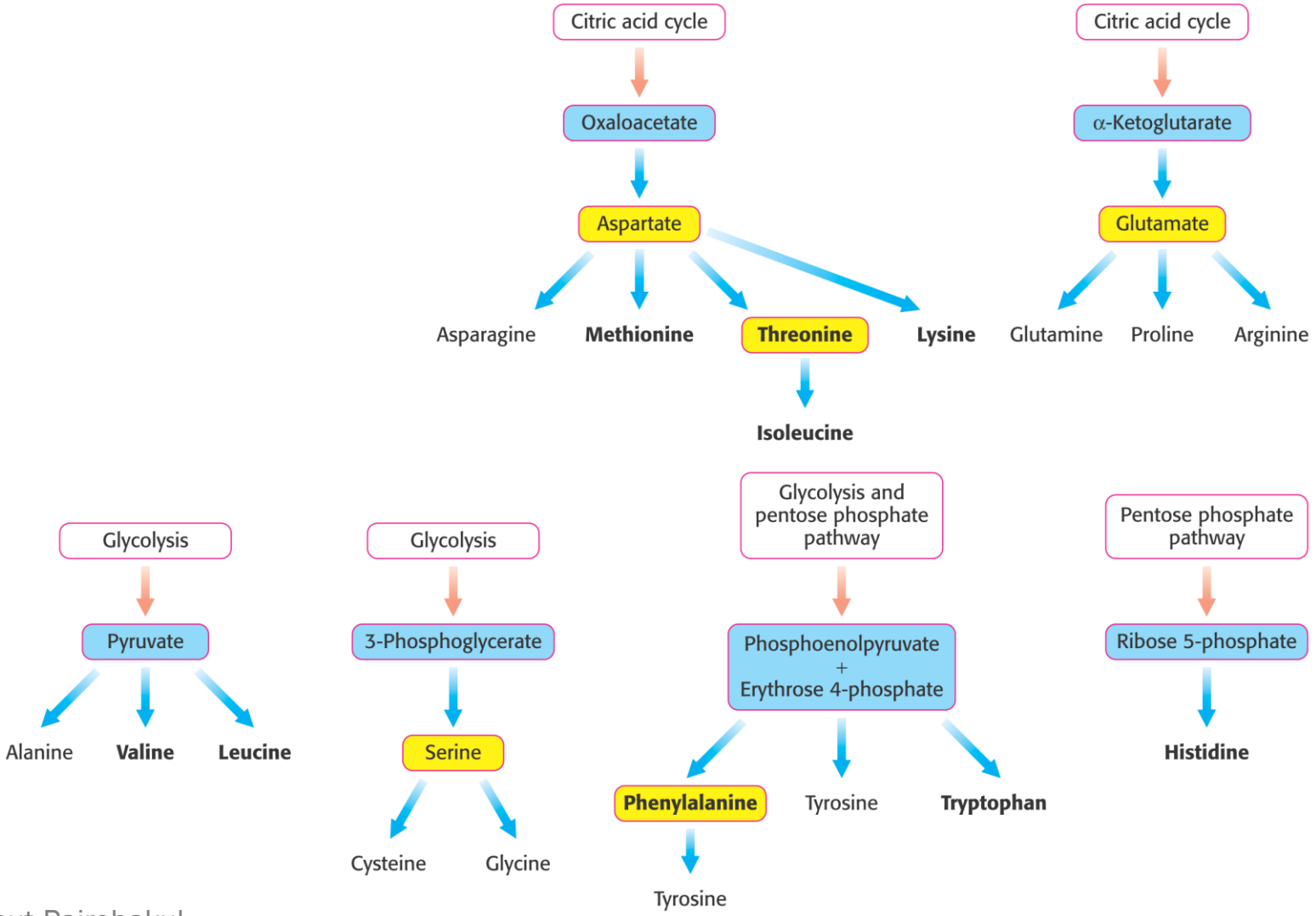
$$N_2 + 8\,e^- + 8\,H^+ \rightleftharpoons 2\,NH_3 + H_2$$

  - ในสิ่งมีชีวิตที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนได้สูง จะมีการใช้พลังงาน 16 ATP!

$$N_2 + 8\,e^- + 8\,H^+ + 16\,ATP + 16\,H_2O \rightleftharpoons 2\,NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16\,P_i$$

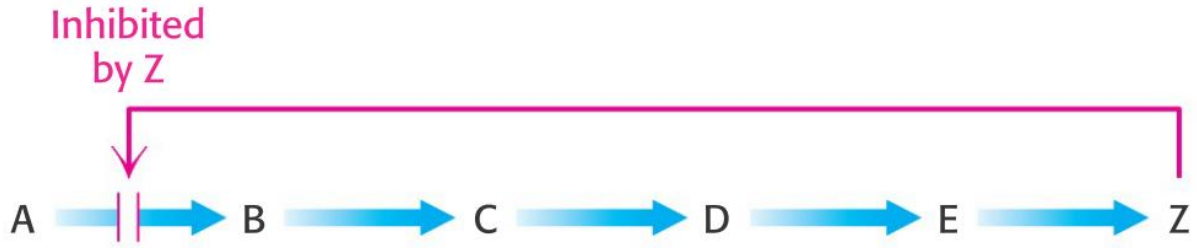
Amino Acid Synthesis

- การสังเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid synthesis)



Amino Acid Synthesis

- Amino Acid Synthesis – Regulation (1)
  - Feedback inhibition in linear pathway
    - ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะไปยับยั้ง committed step ใน pathway



Amino Acid Synthesis

- Amino Acid Synthesis – Regulation (2)
  - Feedback inhibition in branched pathway
    - Feedback inhibition and activation

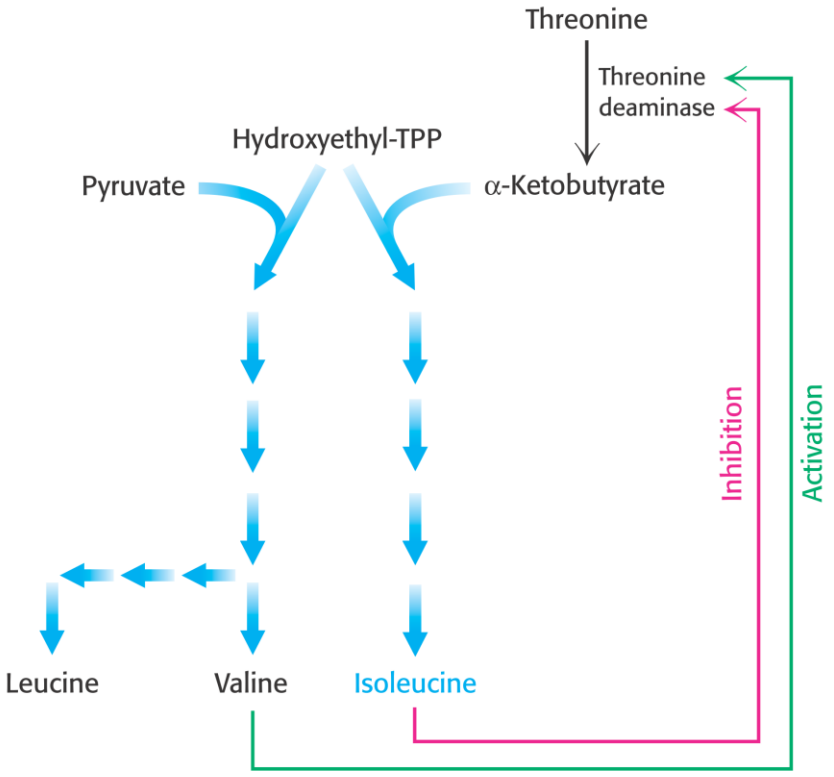
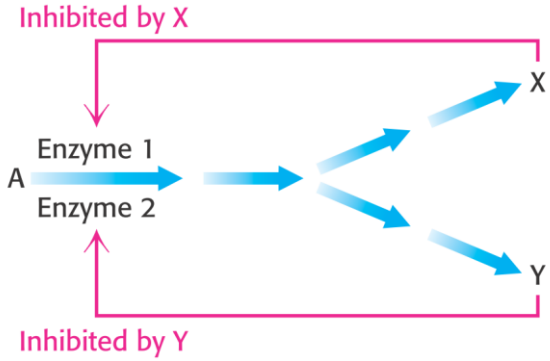


Figure 31.11 Regulation of threonine deaminase. Threonine is converted into α-ketobutyrate in the committed step, leading to the synthesis of isoleucine. The enzyme that catalyzes this step, threonine deaminase, is inhibited by isoleucine and activated by valine, the product of a parallel pathway.

Amino Acid Synthesis

- Amino Acid Synthesis – Regulation (3)
  - Feedback inhibition in branched pathway
    - Enzyme multiplicity



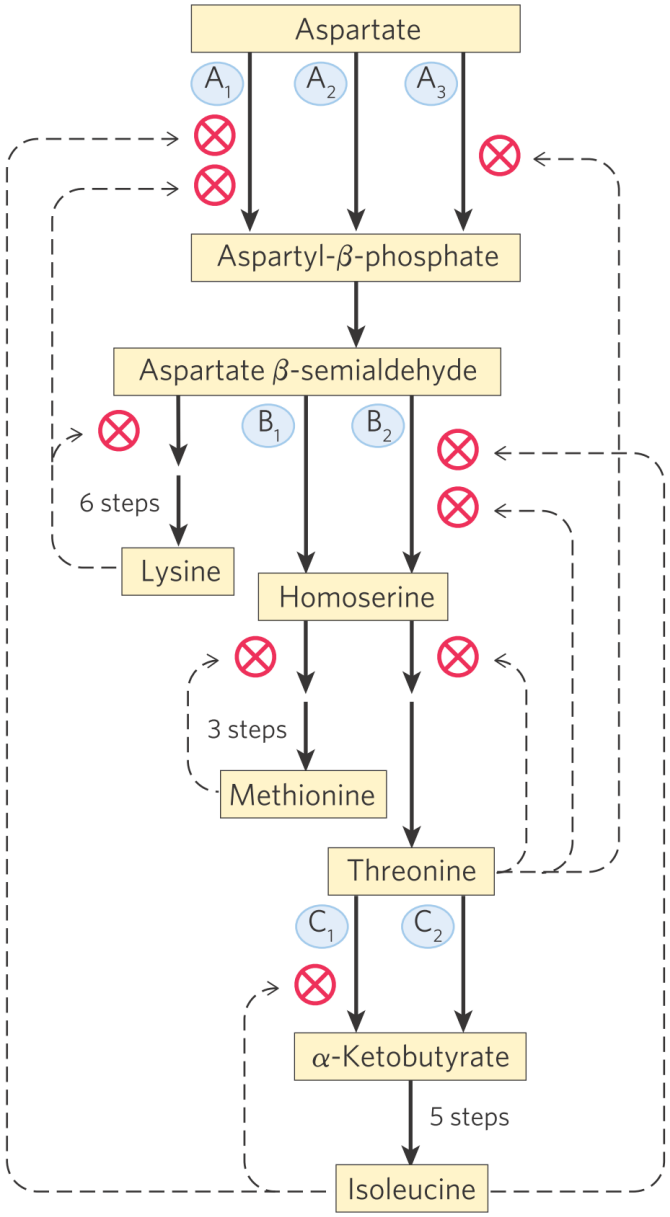
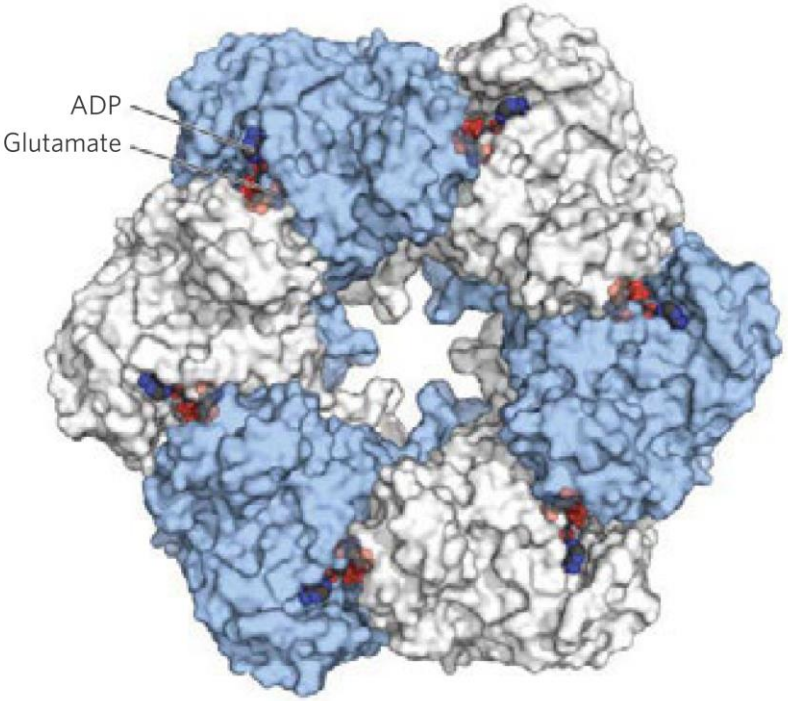


FIGURE 22–24 Interlocking regulatory mechanisms in the biosynthesis of several amino acids derived from aspartate in *E. coli*. Three enzymes (A, B, C) have either two or three isozyme forms, indicated by numerical subscripts. In each case, one isozyme (A_2, B_1, and C_2) has no allosteric regulation; these isozymes are regulated by changes in the amount of enzyme synthesized (Chapter 28). Synthesis of isozymes A_2 and B_1 is repressed when methionine levels are high, and synthesis of isozyme C_2 is repressed when isoleucine levels are high. Enzyme A is aspartokinase; B, homoserine dehydrogenase; C, threonine dehydratase.

Amino Acid Synthesis

- Amino Acid Synthesis – Regulation (4)
  - Feedback inhibition in branched pathway
    - Cumulative feedback inhibition
      - Example: glutamine synthetase



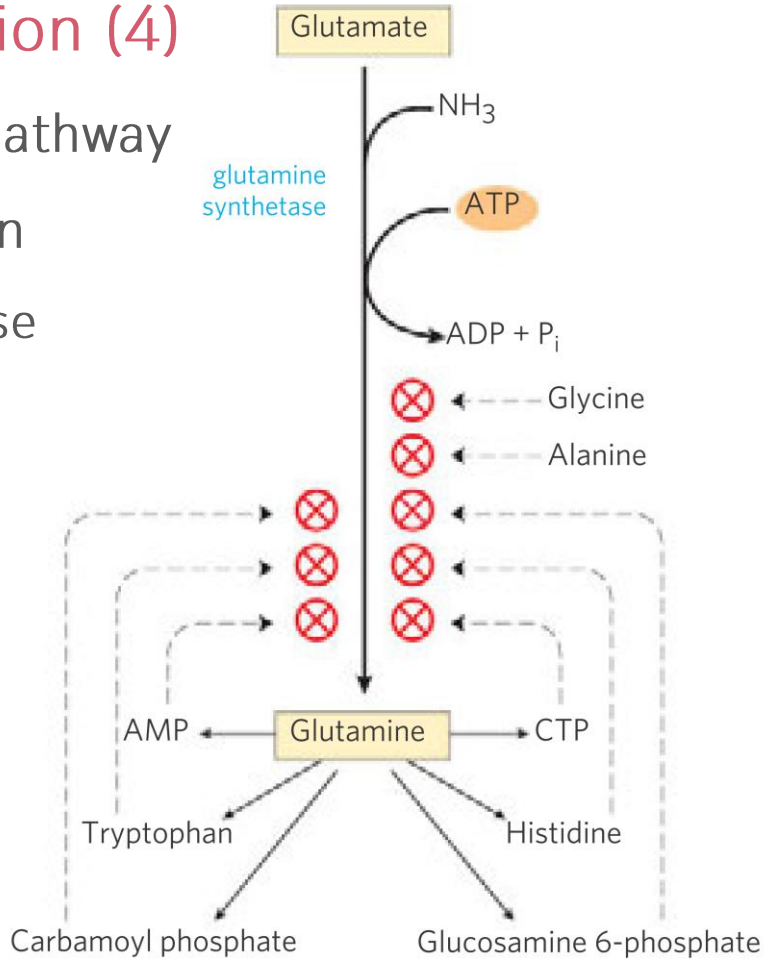
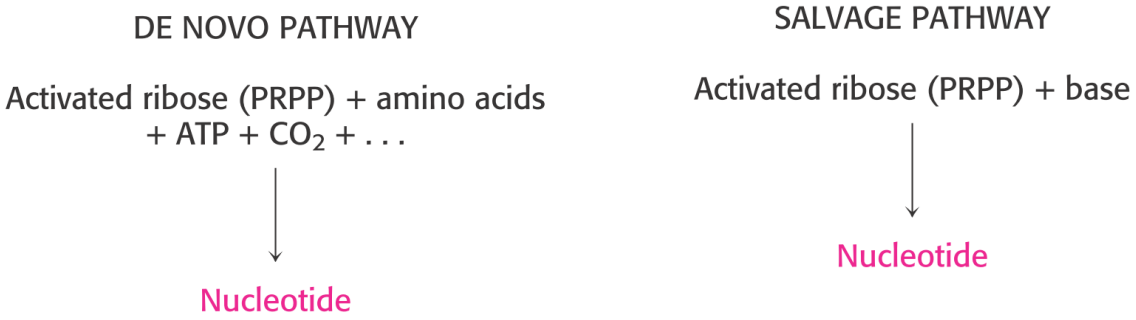


FIGURE 22–8 Allosteric regulation of glutamine synthetase. The enzyme undergoes cumulative regulation by six end products of glutamine metabolism. Alanine and glycine probably serve as indicators of the general status of amino acid metabolism in the cell.

Nucleotide Metabolism

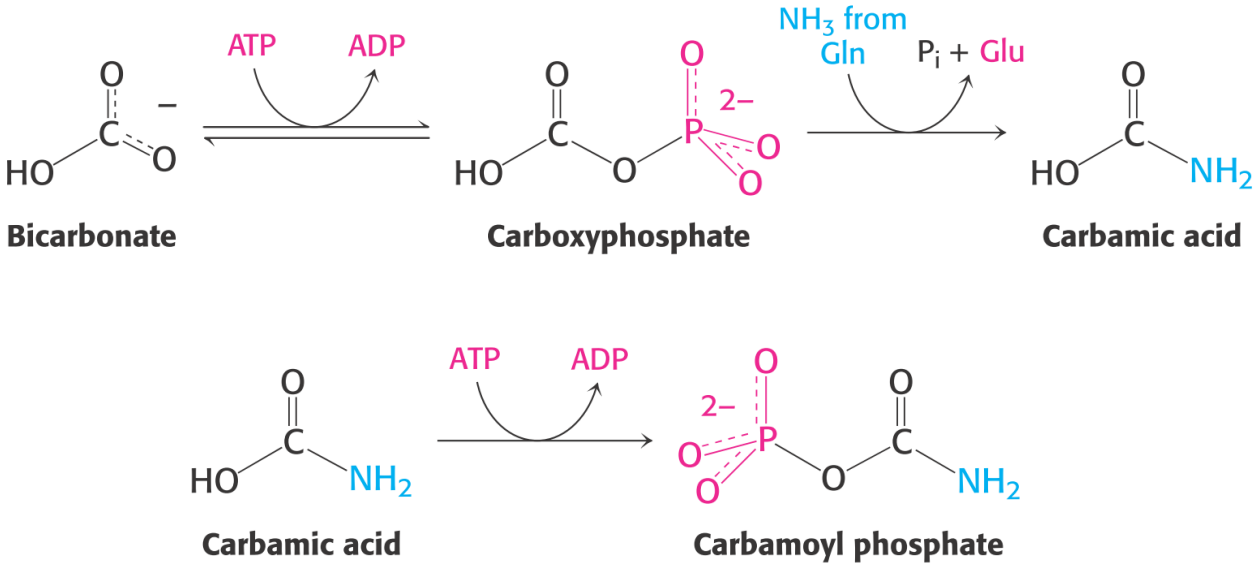
- การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (Nucleotide Biosynthesis)
  - การสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ
    - *de novo* pathway สังเคราะห์จาก simpler compound แล้วไปเชื่อมไรโบส
    - salvage pathway สังเคราะห์โดยตรงบน ribose-based molecule



  - deoxyribonucleotide เกิดจาก reduction ของ ribose ในสภาพที่เป็น nucleotide แล้ว

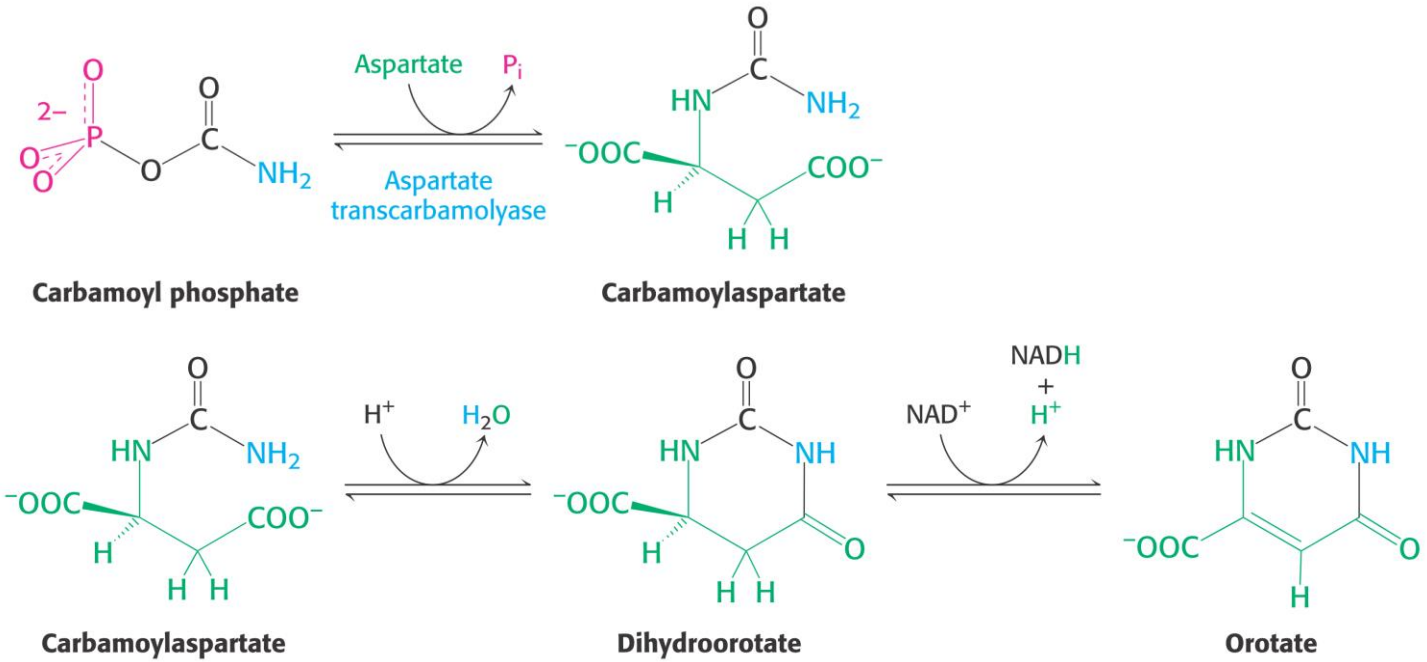
Nucleotide Metabolism

- Pyrimidine (Nucleotide) Biosynthesis
  - มีสารตั้งต้นการสังเคราะห์เป็น HCO_3^-, aspartic acid และแอมโมเนีย
  - ขั้นตอนการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide biosynthesis (1)
    - การสังเคราะห์ carbamoyl phosphate จาก HCO_3^- และแอมโมเนีย อาศัยการทำงานของ carbamoyl phosphate synthetase II (CPS II)



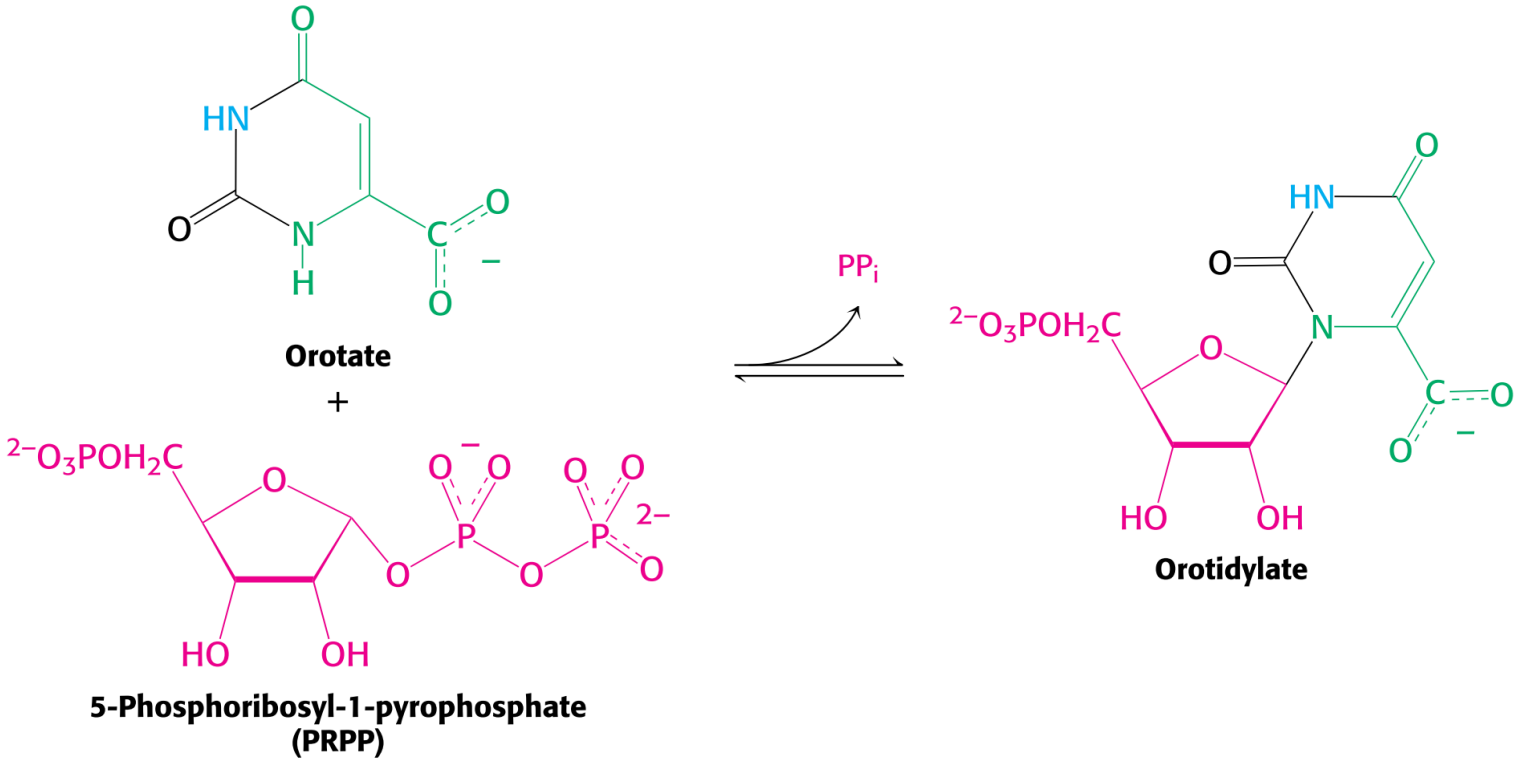
Nucleotide Metabolism

- Pyrimidine (Nucleotide) Biosynthesis
  - ขั้นตอนการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide biosynthesis (2)
    - carbamoyl phosphate จะเปลี่ยนเป็น orotate
    - เอนไซม์ที่ใช้ คือ aspartate transcarbamoylase (ATCase) และ dihydroorotase ตามลำดับ

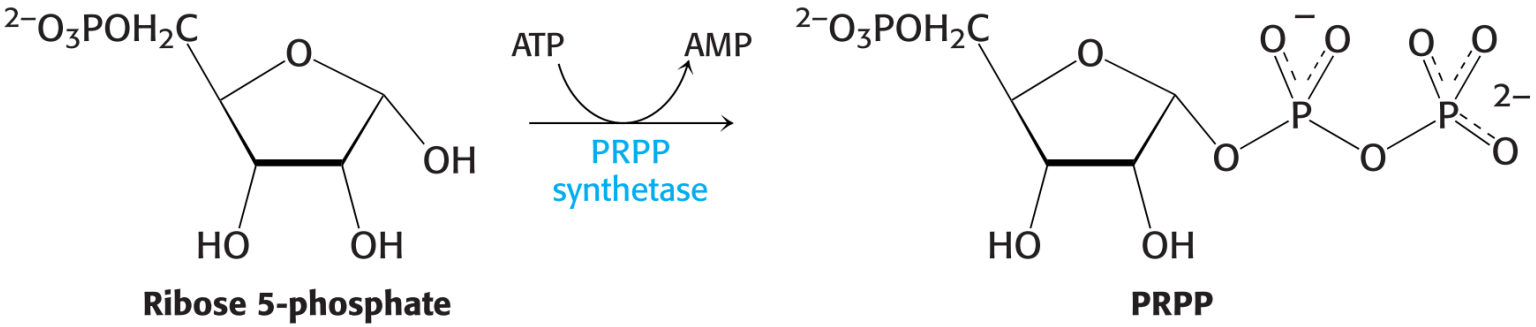


Nucleotide Metabolism

- Pyrimidine (Nucleotide) Biosynthesis
  - ขั้นตอนการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide biosynthesis (3)
    - Orotate จะไปเกิดปฏิกิริยากับ PRPP เกิดเป็น orotidylate
    - เอนไซม์ที่ใช้ คือ orotate phosphoribosyltransferase



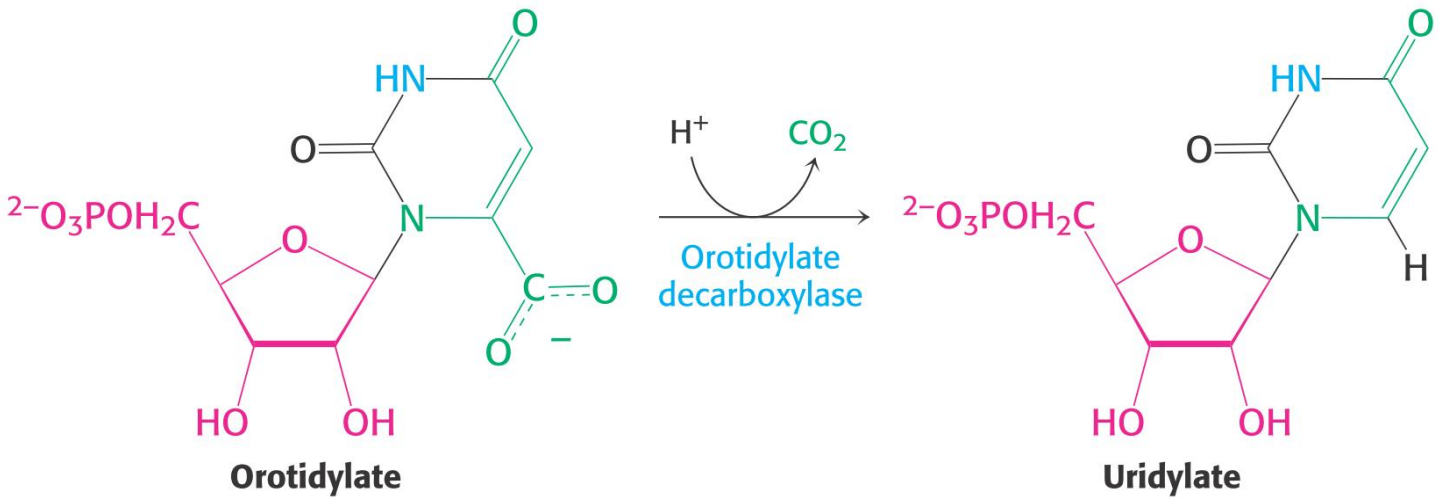
Nucleotide Metabolism



Ribose 5-phosphate **PRPP**

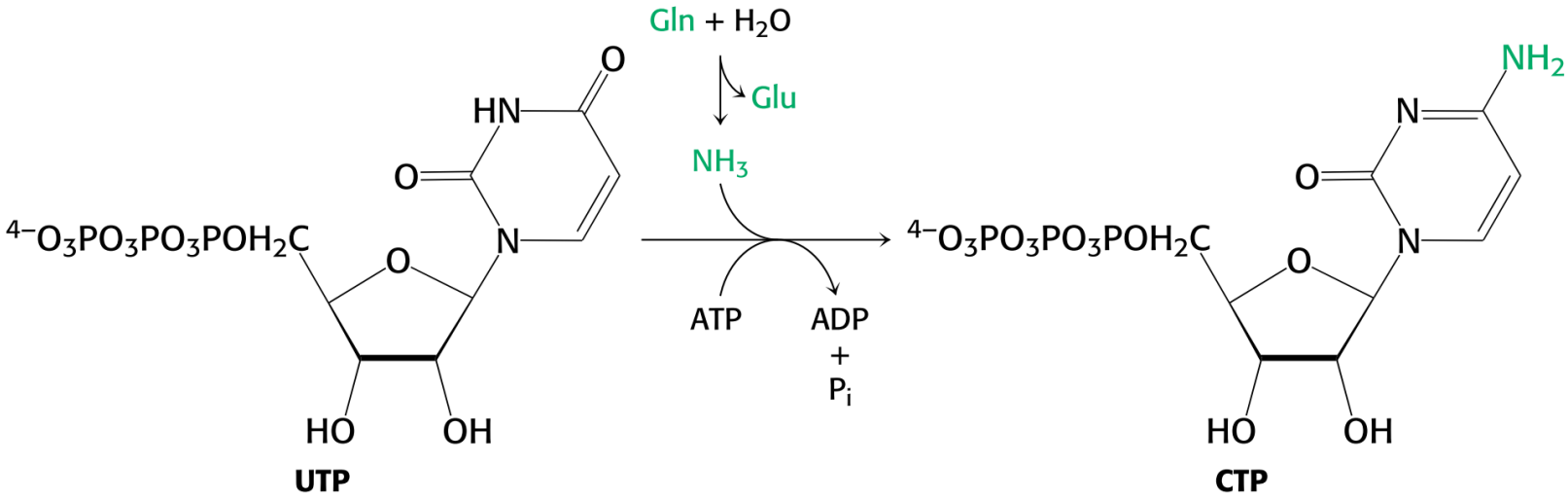
Nucleotide Metabolism

- Pyrimidine (Nucleotide) Biosynthesis
  - ขั้นตอนการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide biosynthesis (4)
    - Orotidylate เกิด decarboxylation เป็น uridine monophosphate
    - เอนไซม์ที่ใช้ คือ orotidylate decarboxylase



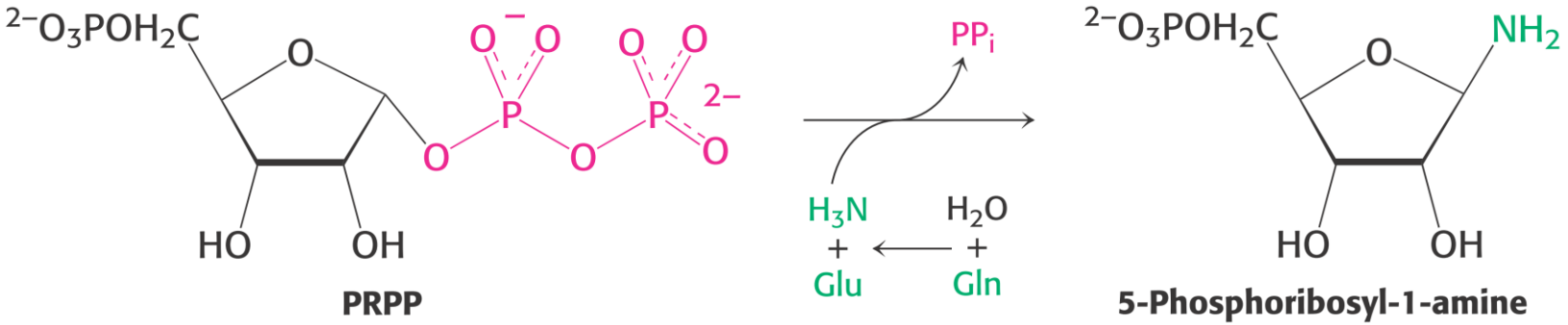
Nucleotide Metabolism

- Pyrimidine (Nucleotide) Biosynthesis
  - ขั้นตอนการสังเคราะห์ pyrimidine nucleotide biosynthesis (5) - CTP
    - การสังเคราะห์ cytidine triphosphate จะเกิดจาก UTP (uridylate triphosphate)



Nucleotide Metabolism

- Purine (Nucleotide) Biosynthesis
  - การสังเคราะห์ de novo จะคล้ายกับ pyrimidine แต่จะเริ่มต้นในขั้นตอนที่เกิดกับ ribose เป็นหลักก่อน โดยอาศัยแอนไซม์ glutamine phosphoribosyl amidotransferase (committed step)



Nucleotide Metabolism

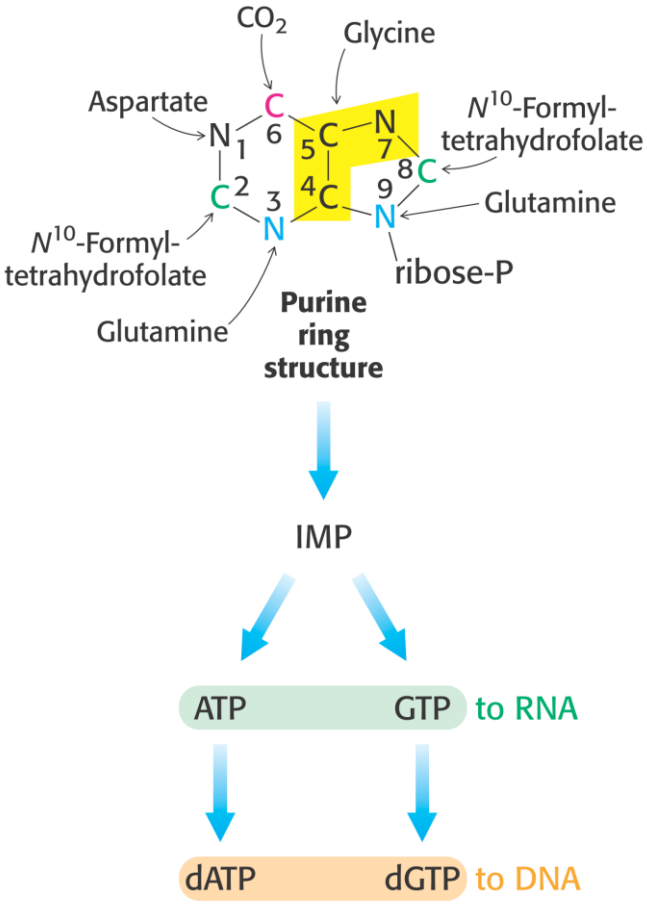


Figure 32.4 De novo pathway for purine nucleotide synthesis. The origins of the atoms in the purine ring structure are indicated.

Nucleotide Metabolism

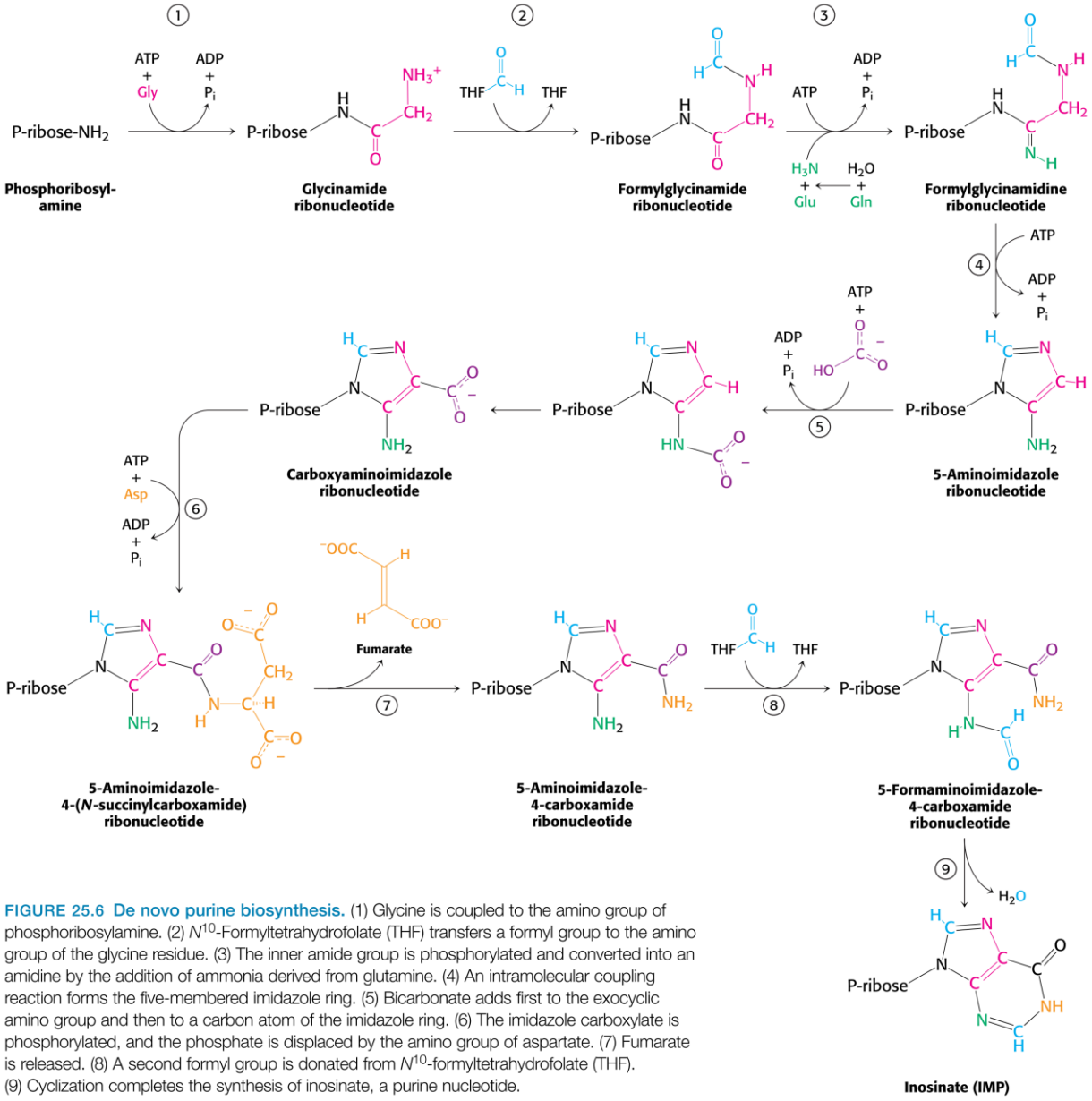
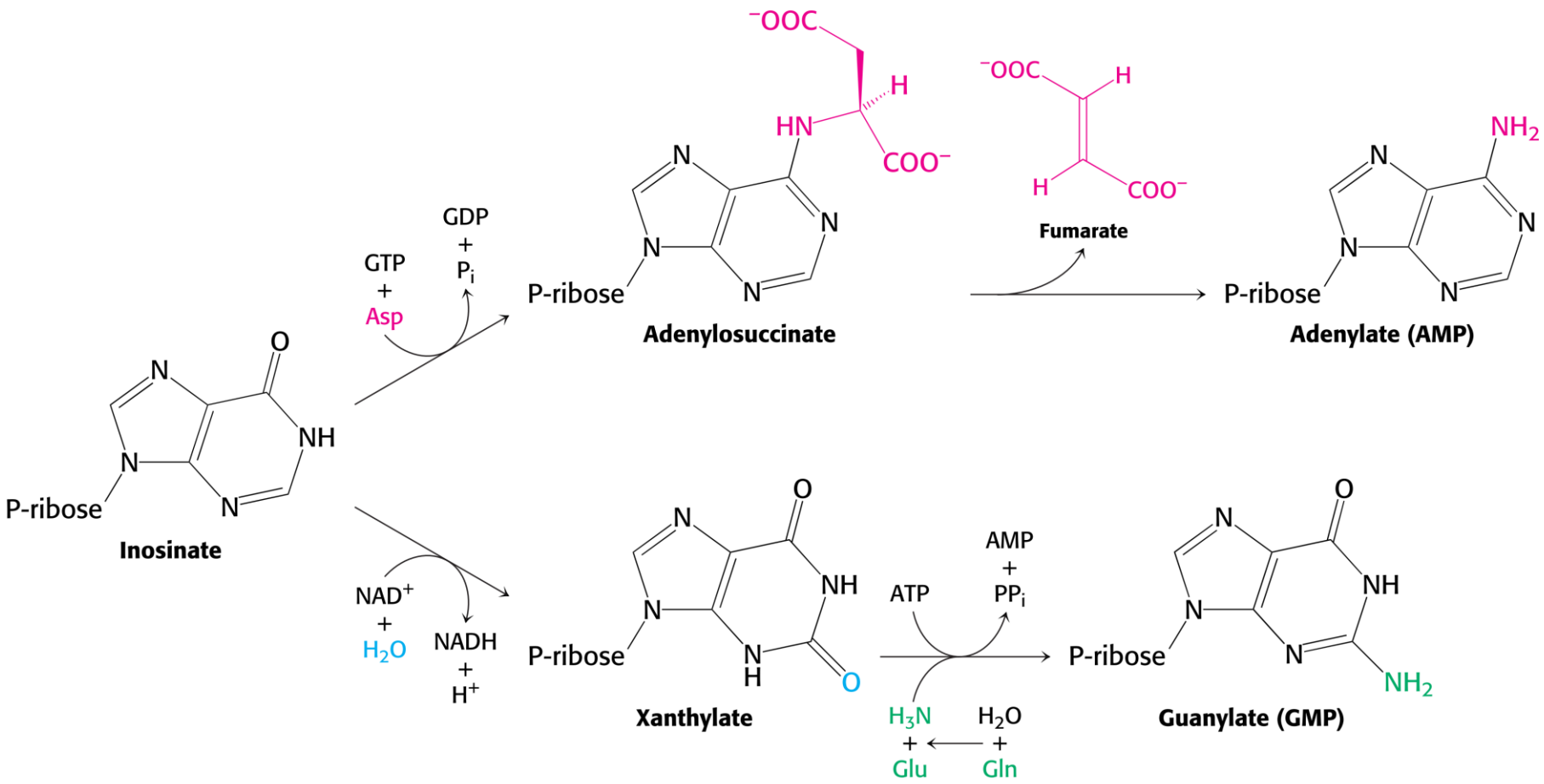


FIGURE 25.6 De novo purine biosynthesis. (1) Glycine is coupled to the amino group of phosphoribosylamine. (2) N^{10}-Formyltetrahydrofolate (THF) transfers a formyl group to the amino group of the glycine residue. (3) The inner amide group is phosphorylated and converted into an amidine by the addition of ammonia derived from glutamine. (4) An intramolecular coupling reaction forms the five-membered imidazole ring. (5) Bicarbonate adds first to the exocyclic amino group and then to a carbon atom of the imidazole ring. (6) The imidazole carboxylate is phosphorylated, and the phosphate is displaced by the amino group of aspartate. (7) Fumarate is released. (8) A second formyl group is donated from N^{10}-formyltetrahydrofolate (THF). (9) Cyclization completes the synthesis of inosinate, a purine nucleotide.

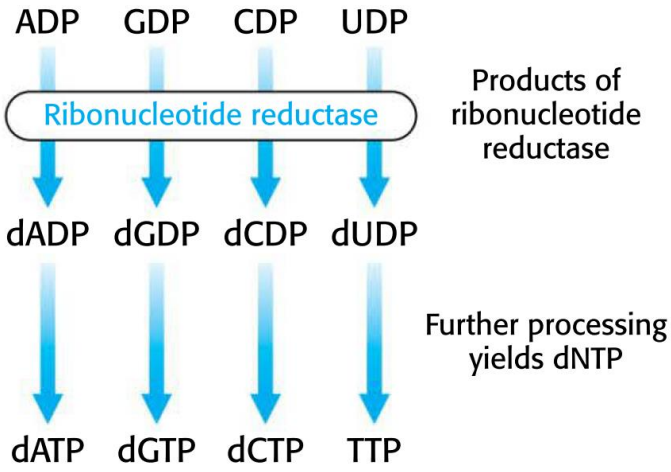
Nucleotide Metabolism



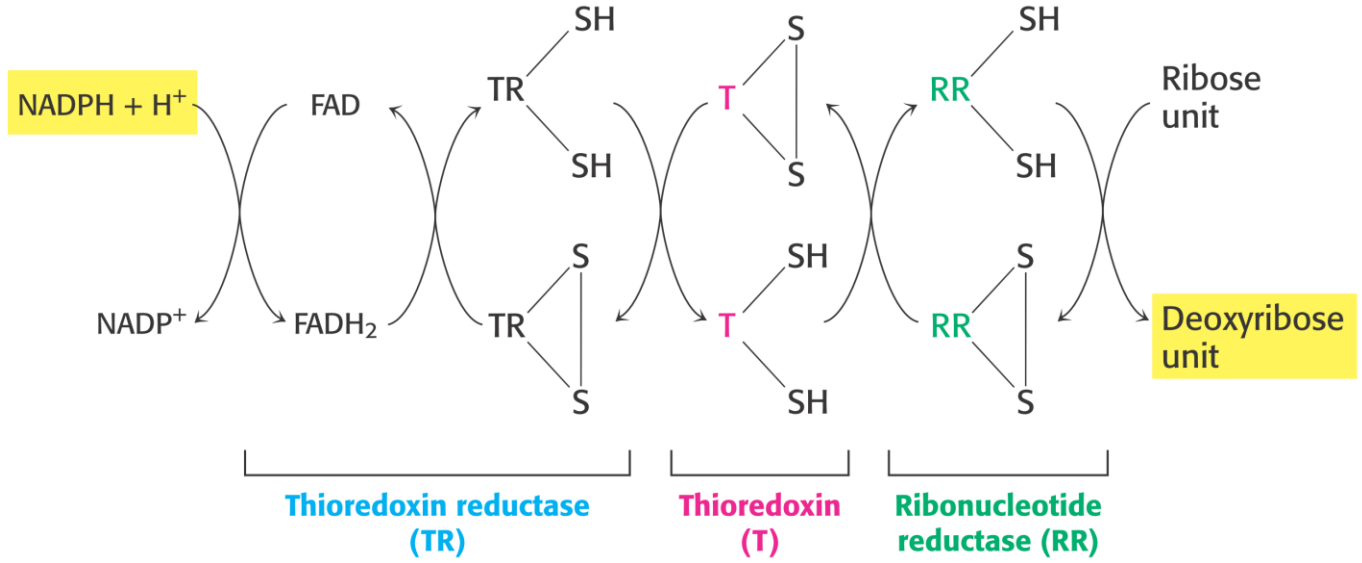
Nucleotide Metabolism

- Deoxyribonucleotides Biosynthesis
  - การสังเคราะห์ deoxyribonucleotides จะเกิดจากรีดักชันของ ribonucleotides
  - 2'-hydroxyl group จะถูกแทนที่ด้วยไฮโดรเจนอะตอมจาก NADPH
  - เอนไซม์ที่ใช้ คือ ribonucleotide reductase

$$\text{Ribonucleoside diphosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Ribonucleotide reductase}} \text{deoxyribonucleotide diphosphate} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$$



Nucleotide Metabolism



Nucleotide Metabolism

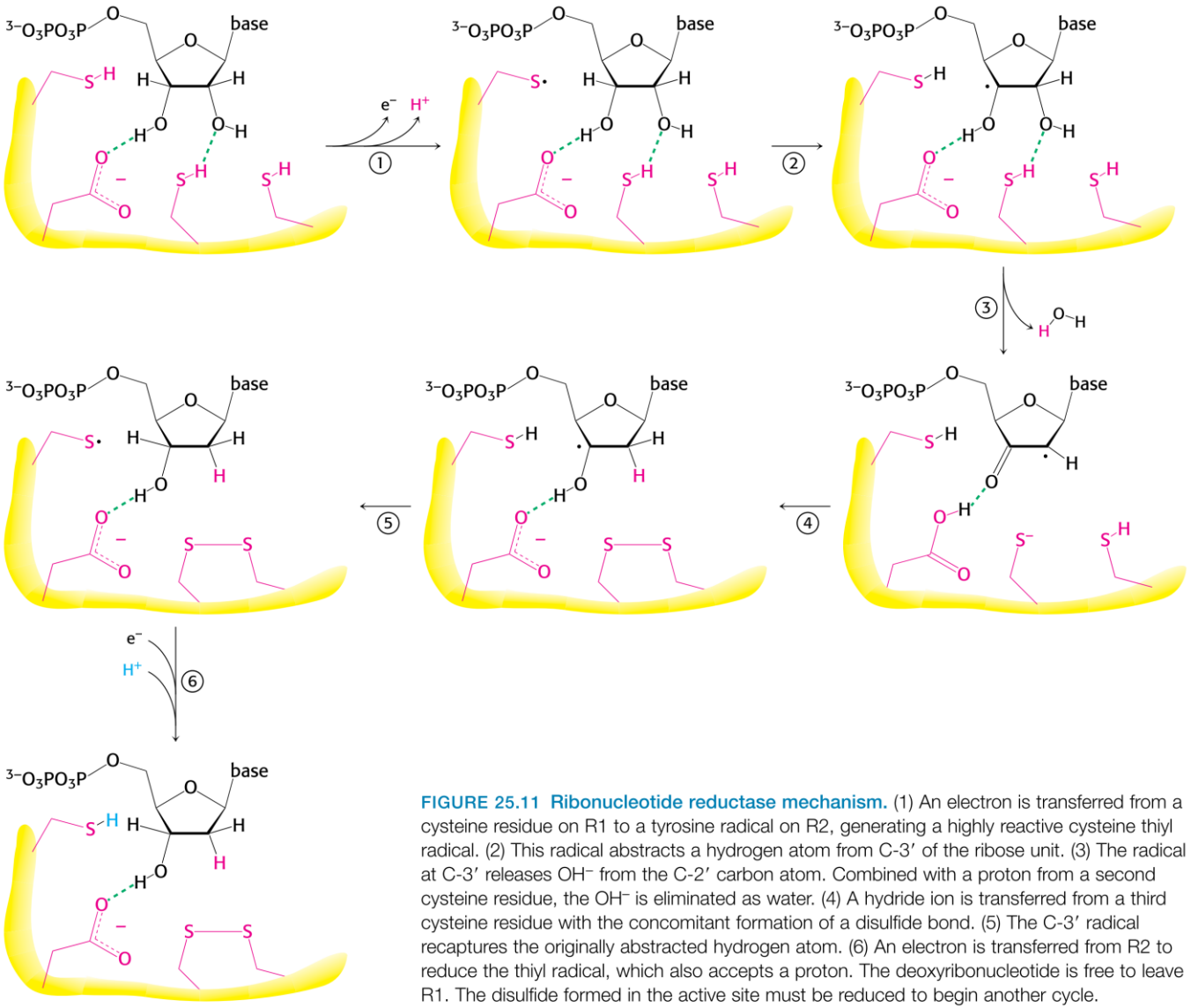
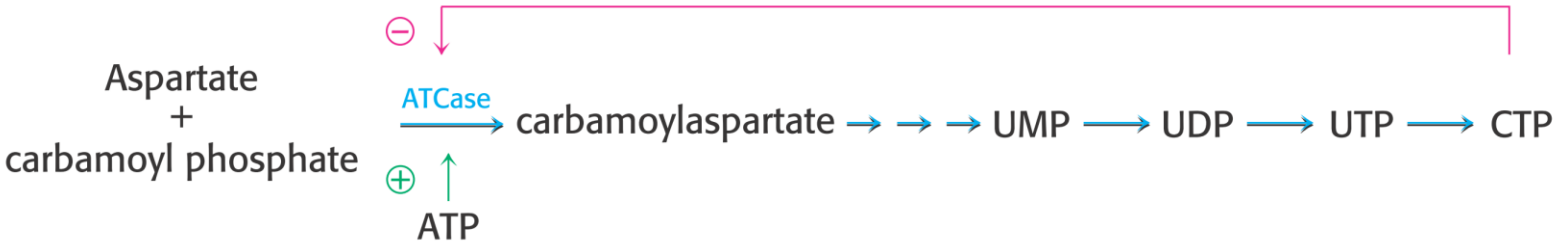


FIGURE 25.11 Ribonucleotide reductase mechanism. (1) An electron is transferred from a cysteine residue on R1 to a tyrosine radical on R2, generating a highly reactive cysteine thiyl radical. (2) This radical abstracts a hydrogen atom from C-3′ of the ribose unit. (3) The radical at C-3′ releases OH^- from the C-2′ carbon atom. Combined with a proton from a second cysteine residue, the OH^- is eliminated as water. (4) A hydride ion is transferred from a third cysteine residue with the concomitant formation of a disulfide bond. (5) The C-3′ radical recaptures the originally abstracted hydrogen atom. (6) An electron is transferred from R2 to reduce the thiyl radical, which also accepts a proton. The deoxyribonucleotide is free to leave R1. The disulfide formed in the active site must be reduced to begin another cycle.

Nucleotide Metabolism

- Nucleotide Biosynthesis – Regulation
  - Pyrimidine biosynthesis regulation
    - Aspartate transcarbamoylase (ATCase) เป็นเอนไซม์หลักที่ควบคุม
    - ถ้ามี CTP เพิ่มมากจะเกิด negative feedback control แต่ถ้ามี ATP จะกระตุ้นการสังเคราะห์แทน



Nucleotide Metabolism

- Nucleotide Biosynthesis – Regulation
  - Purine biosynthesis regulation