

# Molybdén

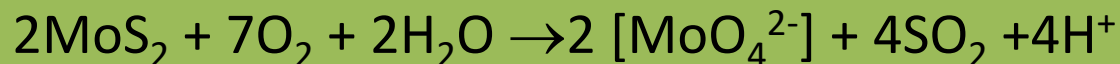
Mo [Kr] 4d<sup>5</sup> 5s<sup>1</sup>

- Je nevyhnutným prechodným kovom pre všetky formy života
- Je jediným 4d prvkom prítomným v živých organizmoch

## Výskyt

V predošlých dobách bol prítomný v podobe nerozpustného molybdenitu (MoS<sub>2</sub>)

Avšak, keď bolo na Zemi viac O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, MoS<sub>2</sub> sa konvertoval na molybdénan (molybdate) ([MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>]), ktorý je dobre rozpustný vo vode. Reakcia premeny MoS<sub>2</sub>:



- transportované pomocou proteínov, ktoré sa podobajú fosfátovým a sulfátovým **permeázám**

# Molybdén

- Prvá zmienka o potrebe Mo pre organizmus bola prezentovaná v roku 1930, práve z pozorovania mikroorganizmov fixujúcich dusík
- Neskôr sa zistilo, že je potrebný pre normálny rast a zdravie živočíchov, rastlín a mikroorganizmov, pretože zohráva významnú úlohu pri reakciách v cykloch C, N, S, Se a As v biosfére
- Ľudský organizmus taktiež používa niekoľko enzýmov Mo

# Molybdén

Reakcie, ktoré katalyzujú Mo enzýmy zahŕňajú  
vodu, protóny a elektróny

Všeobecne Mo enzýmy katalyzujú konverziu substrátu tak, že buď pridajú kyslík na substrát alebo odoberú kyslík zo substrátu:



# Molybdén

## Význam Mo enzýmov

Mo enzýmy majú značný strategický význam v biosfére:

- Redukcia  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NO}_2^-$  = nitrát reduktázy
- Fixácia dusíka = Mo-nitrogenázy

(v rastlinách, hubách a baktériách)

- Oxidácia  $\text{SO}_3^{2-}$  na  $\text{SO}_4^{2-}$  (konečná reakcia v oxidačnej degradácii aminokyselín obsahujúcich síru – Cys, Met a ďalších zlúčenín obsahujúcich síru) = sulfit oxidáza

(v pečeni zvierat a človeka, dospelý človek vylučuje cca 1g  $\text{SO}_4^{2-}$  každý deň)

- Oxidácia xantínu na kyselinu močovú (uric acid) (konečný krok metabolizmu purínu) = xantín dehydrogenázy-oxidázy  
(pečeň a obličky človeka a zvierat)

# Molybdén

## Význam Mo enzýmov

- Oxidácia aldehydov ( $\text{RCHO}$ ) na zodpovedajúce karboxylové kyseliny ( $\text{(RCOOH)}$ ) = **aldehyd oxidázy**. Ak  $\text{R} = \text{CH}_3$  – ide o druhý krok premeny etanolu na kyselinu octovú, prvý krok je katalyzovaný Zn enzýmom – alkoholdehydrogenáza

(pečeň stavovcov)

- **Redukcia DMSO (dimetylsulfoxid) na DMS (dimetylsulfid) = DMSO reduktázy**,
  - sú lokalizované v periplazme a pôsobia v respiračnom reťazci, kde sa ako koncový akceptor elektrónov používa DMSO,
  - produkt redukcie DMS je prchavý a zápachajúci,
  - po jeho uniku do atmosféry jeho fotooxidácia vyvolá produkciu kyseliny metylsulfónovej ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ ), ktorej soli pôsobia ako nukleačné centrá pre tvorbu mrakov

(vybrané anaerobné baktérie)

# Geochemický cyklus dusíka

# Geochemický cyklus dusíka

- Geochemický cyklus dusíka možno popísať tromi procesmi:
- **Fixácia dusíka**
- **Nitrifikácia**
- **denitrifikácia**

# Fixácia dusíka

- Malé množstvo  $N_2$  môže reagovať s kyslíkom za extrémnych podmienok (výboj blesku, vysoko-teplotné spaľovanie) – to je však malé množstvo pre potreby biosféry
- Potrebný N pochádza z procesu **fixácie  $N_2$**
- **Biologickú redukciu  $N_2$  na  $NH_3$  uskutočňuje skupina prokaryontov**
- Enzýmy, ktoré tento proces riadia musia pracovať za anaerobných podmienok
- Baktérie produkujú enzýmy (*in vitro*), aby rýchlo a nevratne deštruovali  $O_2$



# Fixácia dusíka

- Avšak existuje mnoho bakterií, ktoré dusík fixujú aerobne – *azotobacter*, *klebsiella*, *cyanobakterie*, *clostridia*
- Tieto organizmy majú rôzne stratégie ako zabrániť kontaktu  $O_2$  počas redukcie  $N_2$
- Napr. mnoho **symbióz** a spoluprác možno nájsť v prírode medzi vyššími rastlinami a dusík-fixujúcimi baktériami (*rhizobia*)
- Baktérie žijú v okolí koreňových vlásočníc, ktoré kontrolujú nízke rozpínanie  $O_2$
- **Rastlina produkuje k baktérii redukované zlúčeniny uhlíka z fotosyntézy, kým baktéria produkuje fixovaný dusík k rastline**

# Fixácia dusíka

## Termodynamika procesu

- Redukčný potenciál potrebný pre biologickú fixáciu  $N_2$  je približne -300mV
- Tento potenciál potrebujú redukčné činidlá ferredoxiny a flavíny vo svojej redukovanej forme, aby odovzdali svoje elektróny molekule  $N_2$
- Tento redukčný potenciál je následne obnovený redukovanými organickými molekulami, ktoré vznikajú pri fotosyntéze

# Fixácia dusíka

Kým proces fixácie  $N_2$  je ľahký z termodynamického hľadiska, **kineticky je náročný**

Veľká kinetická bariéra, je spôsobená náročnosťou tvorby intermediátov (diazén alebo hydrazín) počas konverzie  $N_2$  na  $NH_3$

Preto musia organizmy použiť veľké množstvo energie, ktoré získavajú hydrolýzou ATP na ADP, čím sa uvoľní  $8\text{kcal.mol}^{-1}$  energie pre túto tvorbu intermediátu

Teda redukcia  $N_2$  spotrebuje 16 ekvivalentov ATP na jeden ekvivalent  $N_2$  = **drahý proces**

Preto, ak majú organizmy príležitosť, používajú už fixované formy dusíka ( $NH_3$ ,  $NO_2^-$  alebo  $NO_3^-$ ) radšej ako by syntetizovali zložité dusík-fixujúce systémy

# Fixácia dusíka

- Biologický proces fixácie dusíka je závislý na dvoch proteínových systémoch s Mo a Fe iónmi kovov = **enzýmy nitrogenázy**
- **MoFeco** (MoFe kofaktor) je počas tohto procesu kľúčový avšak v prípade nedostatku Mo sa používajú aj FeV kofaktory (FeVco)

# Fixácia dusíka

- V súčasnosti poznáme štyri geneticky odlišné nitrogenázy, tri z nich sú relatívne podobné
- Tieto tri tvoria „klasickú“ skupinu nitrogenáz:
  - Mo-nitrogenáza
  - V- nitrogenázy
  - Fe-only nitrogenázy

Obsahujú rôzne heteroatómy, avšak sú si tak podobné, že je zrejmý ich spoločný pôvod

Štvrtá skupina je odlišná – iný evolučný proces, neskôr

# Fixácia dusíka

- Ktorá z nitrogenáz je preferovaná závisí od dostupnosti iónu kovu
  - ak je dostupný Mo = produkcia Mo-nitrogenázy je preferovaná,
  - ak V = produkcia V-nitrogenázy
  - ak sú nedostupné Mo aj V = začína produkcia Fe-only nitrogenázy

Najaktívnejšia je Mo- potom V- a až potom Fe-only nitrogenáza

Fe-only nitrogenáza počas procesu produkuje veľa  $H_2$  a málo  $NH_3$

# Fixácia dusíka

## Mo-nitrogenáza

- prvý metaloproteín v Mo-nitrogenáze (MoFe-proteín) sa nazýva aj dinitrogenáza
- druhý metaloproteín v Mo-nitrogenáze (Fe-proteín) sa niekedy nazýva aj dinitrogenáza reduktáza
- Triviálne názvy sú odvodené od toho aké ióny kovov obsahujú

# Fixácia dusíka

Fe proteín je homodimér

- Obsahuje dve MgATP väzbové miesta a jednoduchý 4Fe-4S klaster premostujúci dve subjednotky

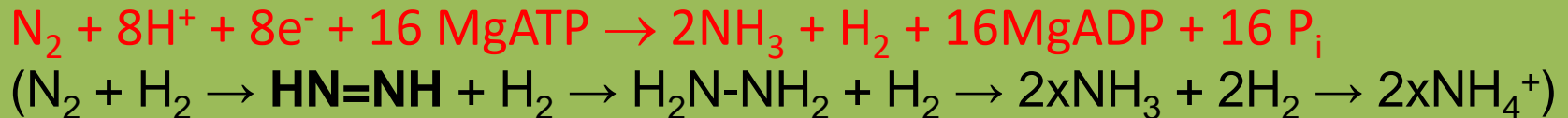
MoFe proteín je  $\alpha_2\beta_2$  heterotetramér

- Obsahuje dva páry dvoch rôznych metaloklastrov (tzv. P-klastre) a FeMo kofaktor (tzv. FeMoco, M-centrum)



# Fixácia dusíka-katalýza

**Mo-nitrogenáza** katalyzuje biologickú fixáciu dusíka, ktorá sa všeobecne popisuje rovnicou:



Okrem  $\text{N}_2$  a  $\text{H}^+$  substrátov, nitrogenáza katalyzuje redukciu mnohých ďalších malých substrátov, ktoré majú tie isté podmienky pre redukciu ako dusík, (konkrétne zásoba z MgATP) nízky redukčný potenciál a anaerobné prostredie

*Pozn.*

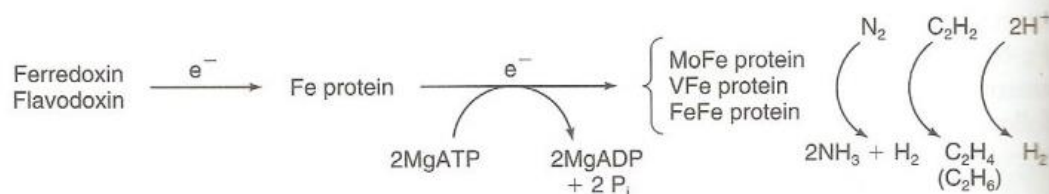
*In vivo* – nitrogenáza používa ako redukčné činidlá pre Fe proteín buď ferredoxín alebo flavodoxín

*In vitro* – možno použiť umelé redukčné činidlá, často sa používa ditioničitan sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )

# Fixácia dusíka

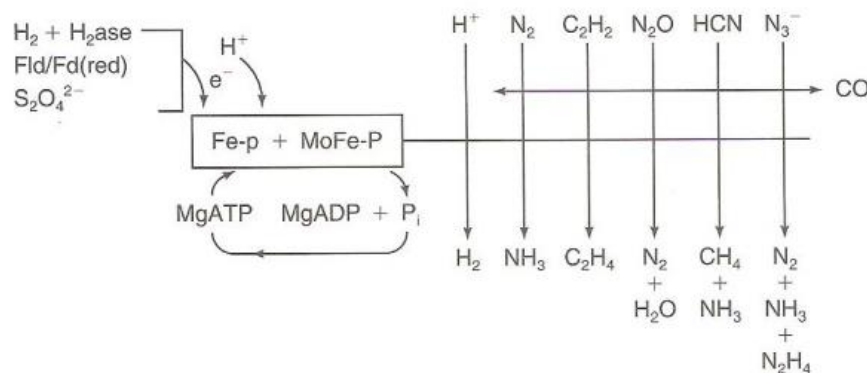
**Fig. XII.3.1.**

A general electron-transfer pathway through the nitrogenases. (Inorganic phosphate =  $P_i$ .)



**Fig. XII.3.2.**

Electron donors, substrates, and their products for wild-type Mo-nitrogenase catalysis. Carbon monoxide is a potent reversible inhibitor of all nitrogenase-catalyzed substrate reductions except for that of protons to  $H_2$ . The Fe protein is represented by Fe-p, MoFe-p is the MoFe protein,  $H_2ase$  is hydrogenase, Fld is flavodoxin, and Fd is ferredoxin.



# Fixácia dusíka

## Mechanizmus pôsobenia Nitrogenázy

- Počas katalýzy *in vitro* Fe-proteín uvoľňuje elektróny (jeden v danom čase) k MoFe proteínu v procese, ktorý je spojený s viazaním MgATP a jej súčasnou hydrolýzou v procesoch jej pripojenie a disociácie do a z proteínového komplexu zabezpečujúceho prenos elektrónov

# Fixácia dusíka

## Úloha MgATP počas katalýzy

Celková redukcia  $N_2$  na dve molekuly  $NH_3$  je termodynamicky výhodná, preto MgATP nie je termodynamicky potrebná

Z toho vyplýva, že má úlohu počas kinetického riadenia reakcie

Teda MgATP hydrolýza riadi prenos elektrónu pre redukciu substrátu a zabezpečuje, aby nedochádzalo k vratnej reakcii prenosu elektrónov na Fe-proteín

# Fixácia dusíka

## V-nitrogenáza a Fe-only nitrogenáza

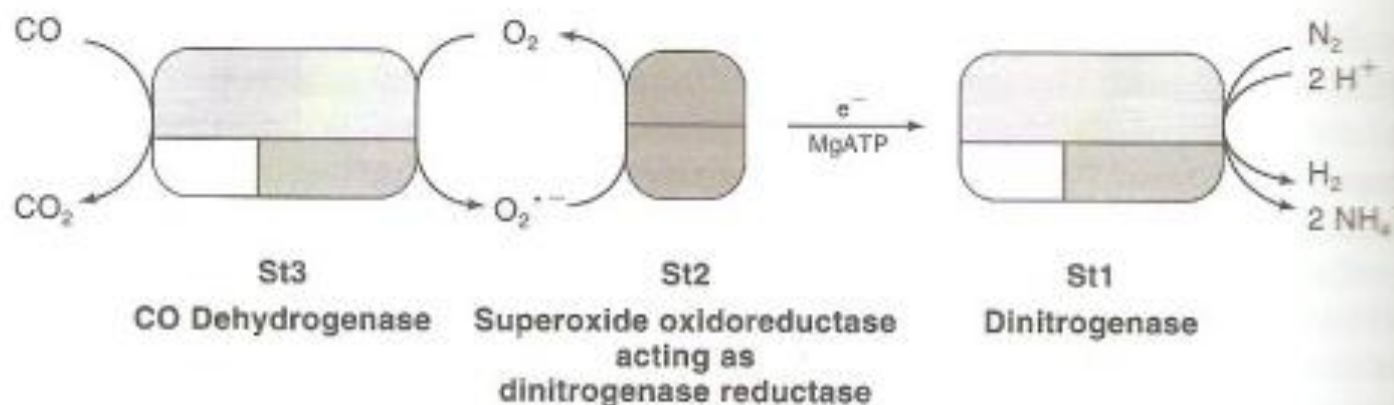
- Nazývané aj alternatívne nitrogenázy
- Každá má svoj vlastný Fe-proteín ako jednu zložku
- A tiež VFe-proteín alebo FeFe proteín ako druhú zložku, pričom v týchto zložkách bol nahradený Mo iónom V alebo Fe

# Fixácia dusíka

## *Streptomyces thermoautotrophicus* Nitrogenáza

- Štvrtý typ nitrogenázy, nedávno objavený
- Tiež obsahuje **dve** proteínové zložky, väčšiu, ktorá obsahuje **Mo, Fe a sulfid** a je podobná Mo-nitrogenáze
- Avšak neobsahuje Fe-proteín zložku, ale **Mn-superoxiddizmutázu**, ktorá oxiduje  $O_2^-$  na  $O_2$  a prenáša elektrón na MoFeS- proteín
- Tento proteín dodáva miesto, v ktorom je  $N_2$  redukovaný na dve molekuly  $NH_3$  sprevádzané vývojom jednej molekuly  $H_2$
- Ukazuje sa, že táto osem-elektrónová reakcia potrebuje hydrolýzu menšieho množstva MgATP na jednu  $N_2$  molekulu ako klasická Mo-nitrogenáza

# Fixácia dusíka



**Fig. XII.3.4.**

The N<sub>2</sub>-fixation system of *S. thermoautotrophicus*.<sup>24</sup> Dioxygen is reduced to superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) by electrons released from the oxidation of CO as catalyzed by the MoFeS-containing CO dehydrogenase (St3). Superoxide is subsequently reoxidized to O<sub>2</sub> by a Mn-containing superoxide oxidoreductase (St2) that then delivers the electrons to the MoFeS- and pterin-dithiolene-containing dinitrogenase (St1), where N<sub>2</sub> (or H<sup>+</sup>, but not C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) is reduced.

Fixácia N<sub>2</sub> pomocou štvrtého typu nitrogenázy

# Fixácia dusíka

## Rozdiely medzi klasickými nitrogenázami a 4. nitrogenázami

- na rozdiel od klasickej Mo-nitrogenázy, elektrón-donorom je Mo-obsahujúca CO dehydrogenáza, ktorá je spojená s oxidáciou CO počas súčasnej redukcie  $O_2$  na  $O_2^-$
- $N_2$  redukujúci MoFeS-proteín je  $\alpha\beta\gamma$  heterotrimér, úplne odlišný od  $\alpha_2\beta_2$  zloženia v „klasickej“ Mo-nitrogenáze
- Má aj niekoľko ďalších jedinečností:
  - je kompletne necitlivý na prítomnosť  $O_2$ , CO,  $H_2$ , ktoré sú potenciálnymi inhibítormi fixácie dusíka v klasických systémoch
  - nekatalyzujú redukciu acetylénu na etylén
  - ďalšie sa v súčasnosti sledujú



# Nitrifikácia

## Biologická nitrifikácia

- Je séria oxidačných reakcií, ktoré mikroorganizmy používajú na konverziu amoniaku ( $\text{NH}_3$ ) na dusitany (nitrity  $\text{NO}_2^-$ ) (priebeha v dvoch základných krokoch) a konverziu dusitanov na dusičnany (nitráty  $\text{NO}_3^-$ )
- Kým pri fixácii  $\text{N}_2$  (teda jeho redukcii z oxidačného stavu 0 na -3) nitrogenázy museli akumulovať viac ako 8 elektrónov na redukcii každej molekuly  $\text{N}_2$ , proces opačný, nitrifikácia, musí pokryť väčší rozsah oxidačných stavov na konverziu  $\text{NH}_3$  na  $\text{NO}_3^-$

# Nitrifikácia

- Opäť príroda vyvinula systém enzýmov, ktoré zabezpečujú tento viacelektrónový transport, avšak na rozdiel od **fixácie  $N_2$** , pri ktorej sa používa **jeden enzýmový systém**, **nitrifikácia** používa **tri rôzne enzýmové systémy**
- Nitrifikačný proces sa uskutočňuje u autotrofných a heterotrofných organizmov odlišne

# Nitrifikácia

## Enzýmy nitrifikácie u autotrofných organizmov

- Nitrifikácia sa uskutočňuje v troch krokoch
- Žiadna baktéria nie je známa, ktorá by katalyzovala všetky kroky spolu
- Baktérie, ktoré katalyzujú oxidáciu  $\text{NH}_3$  a majú v začiatku mena *Nitroso* ako napr. *Nitrosomonas*, obsahujú enzýmy
  - amoniak monooxygenáza (AMO)
  - hydroxylamin oxidoreduktáza (HAO)

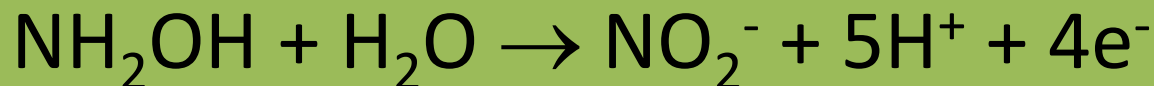
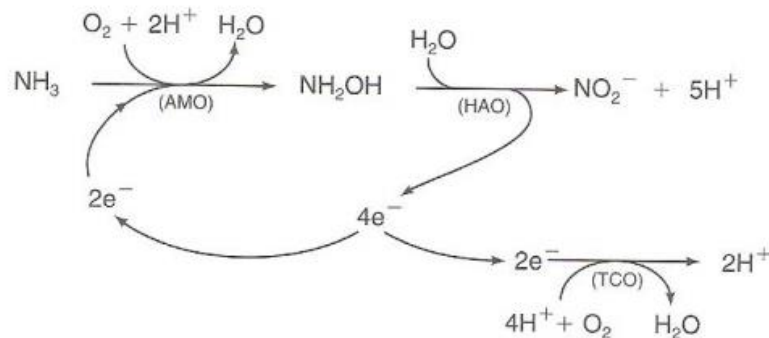
ktoré katalyzujú 1. a 2. krok procesu nitrifikácie

# Nitrifikácia

- Schéma oxidácie  $\text{NH}_3$  na  $\text{NO}_2^-$

**Fig. XII.3.11.**

A general scheme for the oxidation of ammonia to nitrite by the enzymes, AMO and HAO, as it occurs in autotrophic organisms, showing the partitioning of the resulting electrons between the terminal cytochrome oxidase (TCO; for energy generation) and further ammonia oxidation.



# Nitrifikácia

## štruktúra

### Amoniak monooxygenáza (AMO)

- Je to membránový enzým, v aktívnej forme ešte nebol izolovaný, informácie o funkcii tohto enzýmu pochádzajú zo štúdií neporušených buniek

AMO katalyzuje oxidáciu širokého rozsahu nepolárnych substrátov, podobne ako cytochrom P450 (napr.  $\text{CH}_4$ )

AMO obsahuje tri Cu ióny a jeden (aj viac) Fe ión

# Nitrifikácia

## Hydroxylamín oxidoreduktáza (HAO)

- Nie je membránový enzým, ale vodou rozpustný a bol nájdený v periplazmatickom priestore medzi vnútornou a vonkajšou membránou buniek

Čistý HAO je trimérna molekula kde každá z jej subjednotiek obsahuje osem kovalentne viazaných hémov typu c

# Nitrifikácia

## Nitrifikácia pomocou heterotrofných organizmov

organizmy (huby, aktinomycéty aj baktérie) používajú enzýmy na nitrifikáciu, ale častejšie používajú organický zdroj N (amíny) ako anorganický  $\text{NH}_3$

Tieto enzýmy môžu byť rozdielne od enzýmov autotrofov

- v jednom prípade je AMO podobný (izolovaný z *Thiosphaera pantotropha*) – obsahuje Cu ióny

Naopak HAO z *T. pantotropha* nie je podobný HAO z autotrofov – sú to enzýmy s nižšou molekulovou hmotnosťou a neobsahujú hémy, ale nehémové ióny železa

# Nitrifikácia

Konečná tvorba  $\text{NO}_2^-$  prechádza cez tvorbu medziproduktu  $\text{NOH}$ , pričom v tomto prípade tento medziprodukt reaguje s  $\text{O}_2$  a nie s  $\text{H}_2\text{O}$  ako je to v prípade autotrofov:





# Nitrifikácia

- **Tretí krok** (konverzia  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{NO}_3^-$ ) sa uskutočňuje cez  $\text{NO}_2^-$  oxidujúce baktérie (s názvom *Nitro* ako napr. *Nitrobacter*)
- Používajú **nitrit oxidoreduktázu** (**NIO**), ktorá katalyzuje reakciu:



# Denitrifikácia

- Je anaerobná spotreba častíc obsahujúcich oxidy dusíka ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  a  $\text{N}_2\text{O}$ ) pomocou baktérií
- Konečným produktom je  $\text{N}_2$
- Počas denitrifikácie sa uvoľňuje veľa  $\text{N}_2\text{O}$ , čo je významný skleníkový plyn narúšajúci ozónovú vrstvu
- Denitrifikácia má aj komerčný vplyv:
  - môže spôsobiť stratu značného množstva dusíkatých hnojív
  - denitrifikátory majú perspektívu pri spracovaní odpadov a odpadovej vody

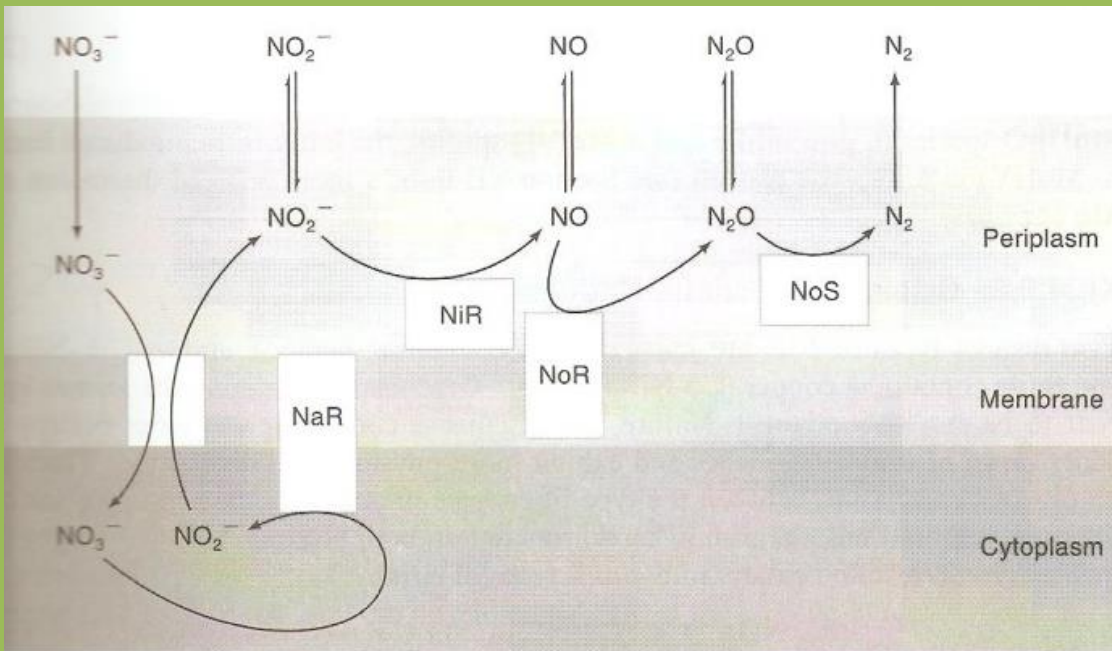
# Denitrifikácia

## Enzýmy denitrifikácie

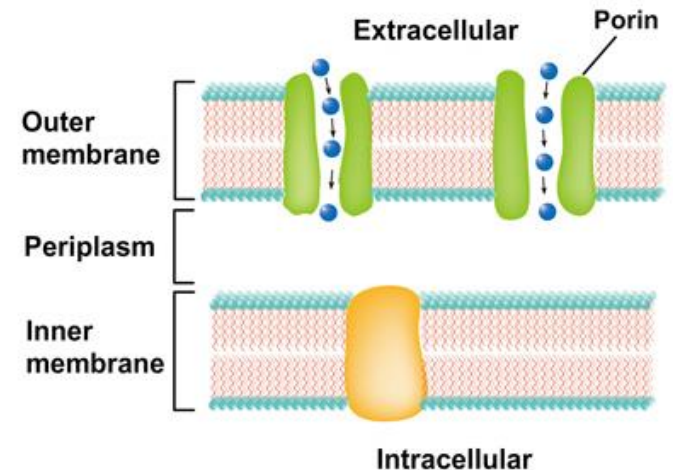
- Nitrát reduktáza (NaR)
- Nitrit reduktáza (NiR)
- Nitric oxide reduktáza (NoR)
- Nitrous oxide reduktáza (NoS)

# Denitrifikácia

- Umiestnenie enzýmov denitrifikácie v Gram-negatívnych baktériách

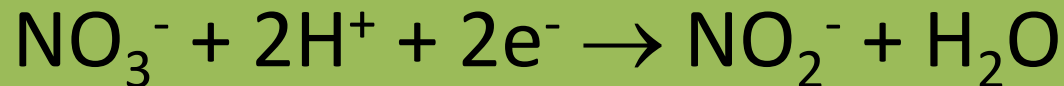


Double membrane of Gram-negative bacteria

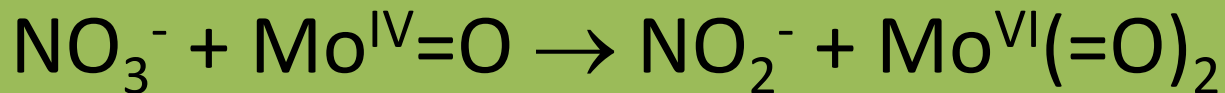


# Denitrifikácia

**NaR** katalyzuje reakciu:



Kľúčovým krokom je odstránenie atómu kyslíka z nitrátu pomocou tvorby častice  $\text{Mo}^{\text{IV}}=\text{O}$



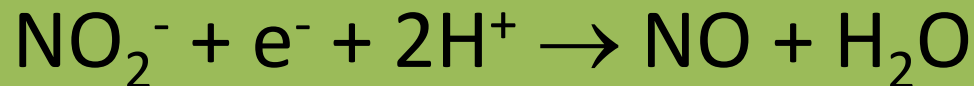
# Denitrifikácia

## Nitrit reduktáza (NiR)

Sú známe dva typy:

- Obsahujúce hémy *c* a *d*<sub>1</sub> (*cd*<sub>1</sub>-NiR)
- Obsahujúce Cu (Cu-NiR)

Oba typy katalyzujú reakciu:



# Denitrifikácia

## $cd_1$ NiR

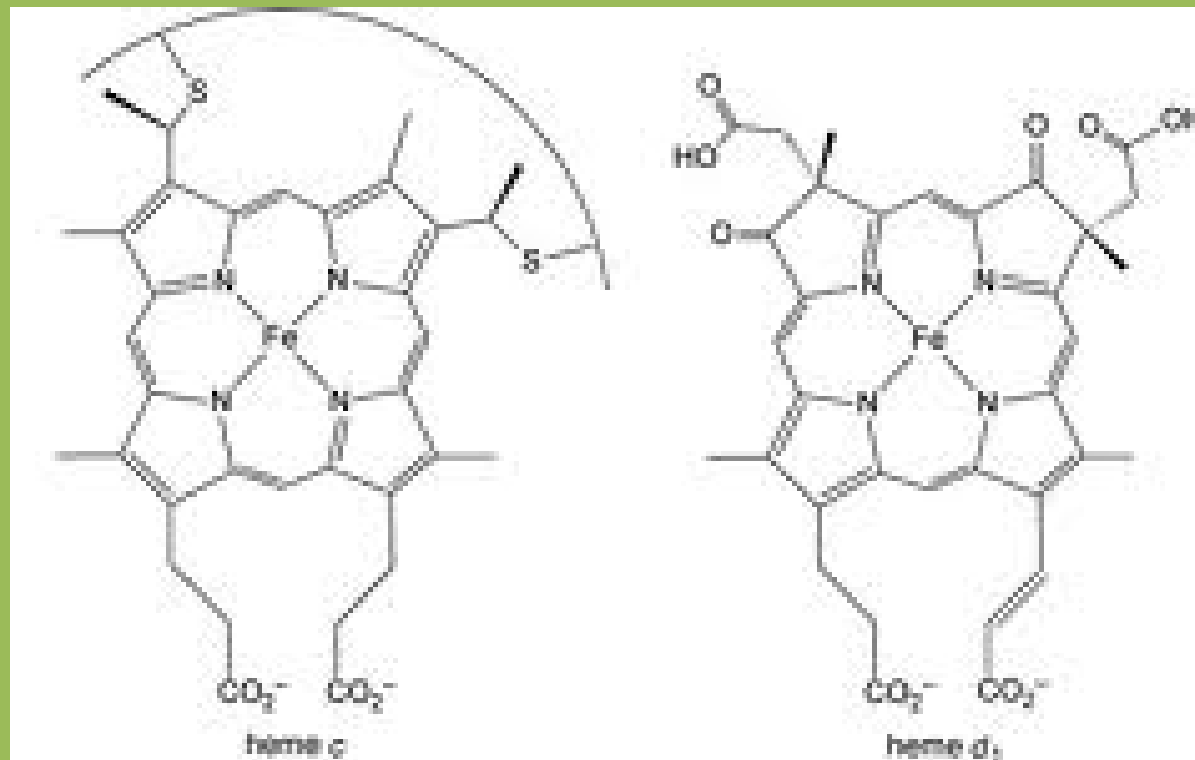
Štruktúrna analýza potvrdila, že **hém  $cd_1$  NiR** je enzým obsahujúci jednoduchý polypeptid s aspoň 559 aminokyselinami, ktoré sú zoradené do dvoch domén:

**menšej** (1-134 zvyškov AK), ktorá obsahuje kovalentne viazaný **hém c**

**väčšej** (135-567 zvyškov AK), ktorá obsahuje **hém  $d_1$**

Toto usporiadanie podporuje myšlienku separátneho elektrón-transportu (na hém c) a separátneho substrát – viazania ( na hém  $d_1$ )

# Denitrifikácia





# Denitrifikácia

## Cu NiRázy

- tvoria 1/3 denitrifikátorov izolovaných z pôdy
- Kryštálová štruktúra CuNiR z *Achromobacter cycloclastes* ukazuje, že ide o trimérny enzým s iónmi Cu lokalizovanými medzi subjednotkami (posledné štúdie dokazujú, že nie všetky CuNiR sú iba triméry)
- Sú podobné  $cd_1$  enzýmom, tým že obsahujú dva typy kovových centier

# Denitrifikácia

- **Cu centrum Typu 1**– je neobvyklý zelený variant tzv. skupiny modrých proteínov plastocyanínov alebo azurínov (koordinačné okolie = metionín tioester, cysteín tiolát, dva histidíny)
- **Cu centrum Typu 2**– nepatrí do skupiny modrých proteínov, má iné koordinačné okolie = tri histidínové zvyšky a vodu

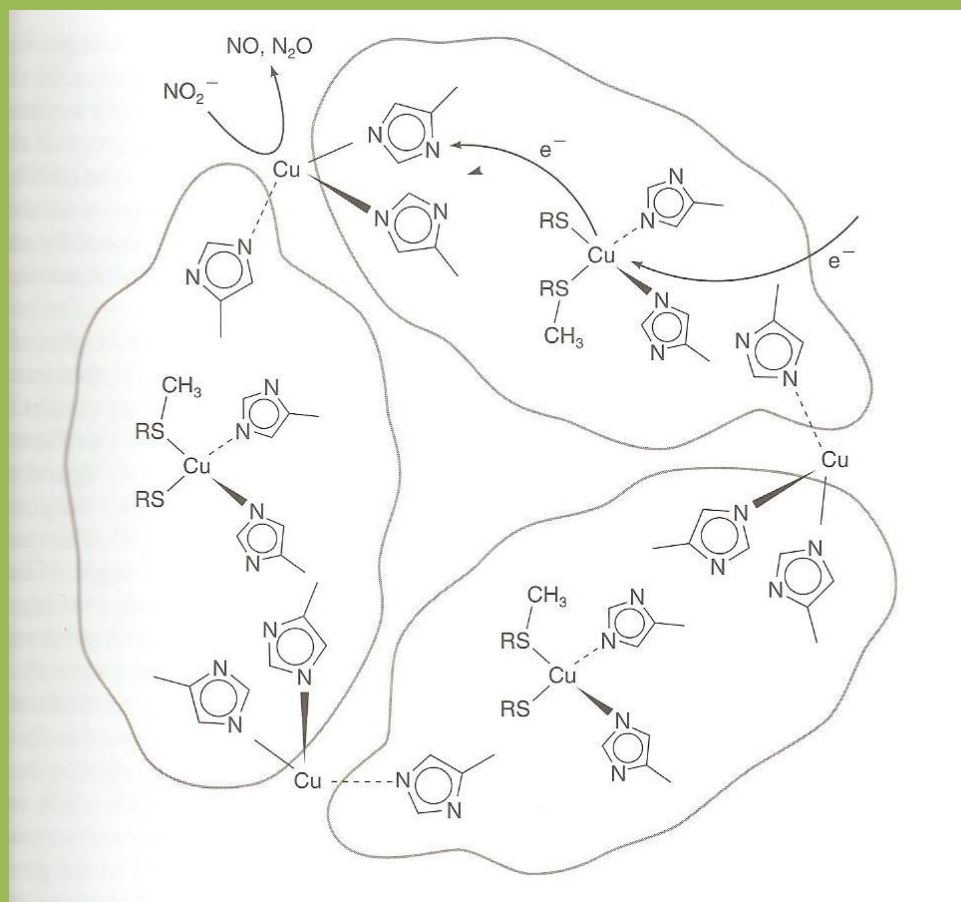
Dva atómy Cu sú spojené jedným histidínom a cysteínom, čím sa medzi iónmi Cu vytvára vzdialenosť 12,5 Å

# Denitrifikácia

- Kryštalografické a spektroskopické štúdie potvrdzujú, že substrát  $\text{NO}_2^-$  sa viaže na centrum Typu 2, kde je redukovaný, podobne ako v prípade  $d_1$  hému
- Centrum Typu 1 pravdepodobne slúži ako centrum transportu elektrónov, podobne ako v prípade hému c

# Denitrifikácia

Schematické zobrazenie dvoch centier v trimérnom enzýme Cu-NiR

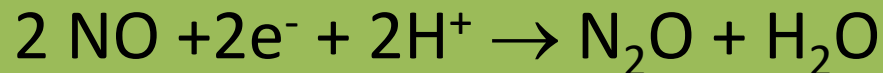


# Denitrifikácia

## Nitric oxide reduktáza (NoR) (NO reduktáza)

- Je enzým, ktorý sa ťažko izoluje = nemožné vyriešiť jeho štruktúru
- Použitím porovnávania rôznych separačných techník sa zistilo, že všetky NoR sú heterodiméry so subjednotkami obsahujúcimi hémy *b* a *c*
- Navyše sa zistilo, že obsahujú aj nemalé množstvo nehémového železa

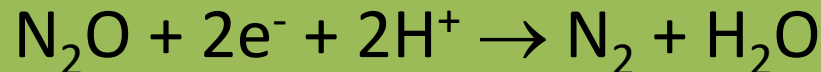
Enzým katalyzuje redukčnú dimerizáciu NO na N<sub>2</sub>O podľa reakcie:



# Denitrifikácia

## Nitrous oxide reductáza NoS (N<sub>2</sub>O reductáza)

- Konečným procesom denitrifikácie je redukcia N<sub>2</sub>O na N<sub>2</sub> podľa reakcie:



- Reakcia je katalyzovaná rozpustným enzýmom NoS, ktorý bol izolovaný ako homodimér so subjednotkami, ktoré obsahujú viac ako štyri aktívne miesta (4 atómy Cu) na jednu subjednotku
- Po izolácii je typicky ružový (závisí od spôsobu izolácie), modrý je iba ak sa uskutoční reverzibilná redukcia s ditioničitanom sodným, čím sa stáva enzým inaktívny

# Denitrifikácia

- Spetroskopicky bolo zistené, že obsahuje jednotku  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ , kde sú tieto dva ióny premostené tiolátovou skupinou, pričom táto jednotka je podobná dvojjadrovému  $\text{Cu}_A$  centru nájdenému v cytochróm c oxidáze
- Na základe tejto podobnosti sa predpokladá, že  $\text{N}_2\text{O}$  je viazaný na  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a prostredníctvom prenosu elektrónov z  $\text{Cu}^{\text{I}}$  je redukovaný
- Kompletný mechanizmus však nie je známy