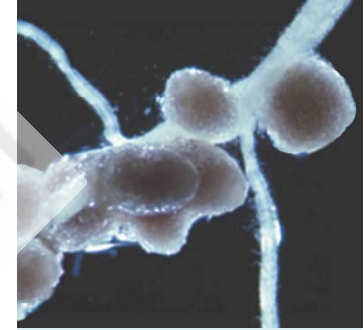
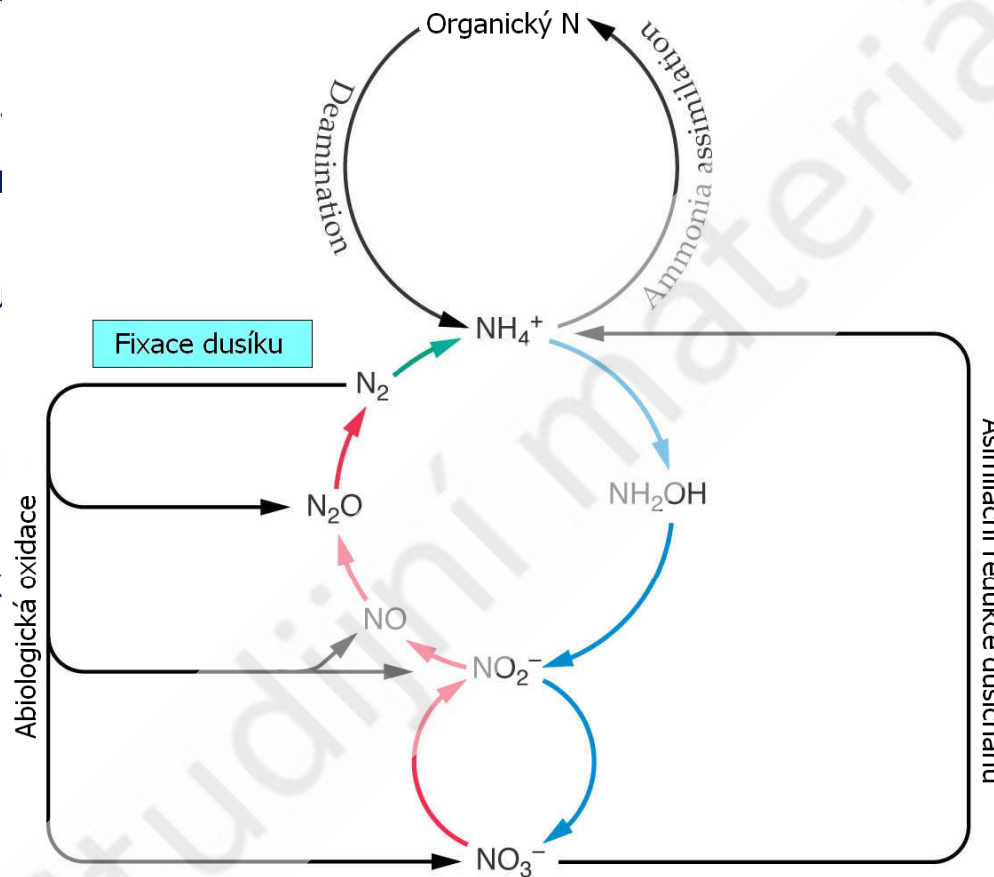


Metabolismus dusíku



Studijní materiál

- dusík je čtvrtýr
- nejvíce dusíku vytvořených jil
- hlavní zdroj du dusíku
- proces fixace d
- nejdůležitější k katalyzován en



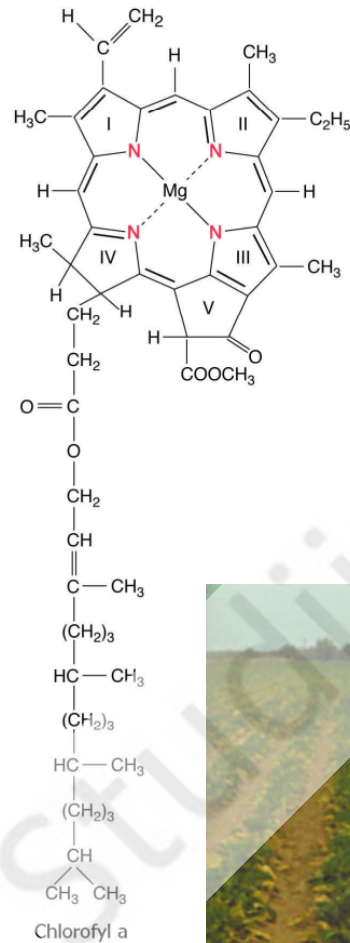
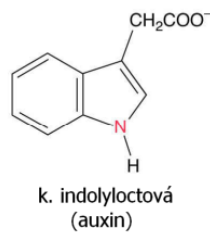
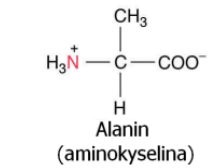
tých látek

1 procesem fixace

ibolity je

Cyklus dusíku

Vybrané důležité organické dusíkaté látky

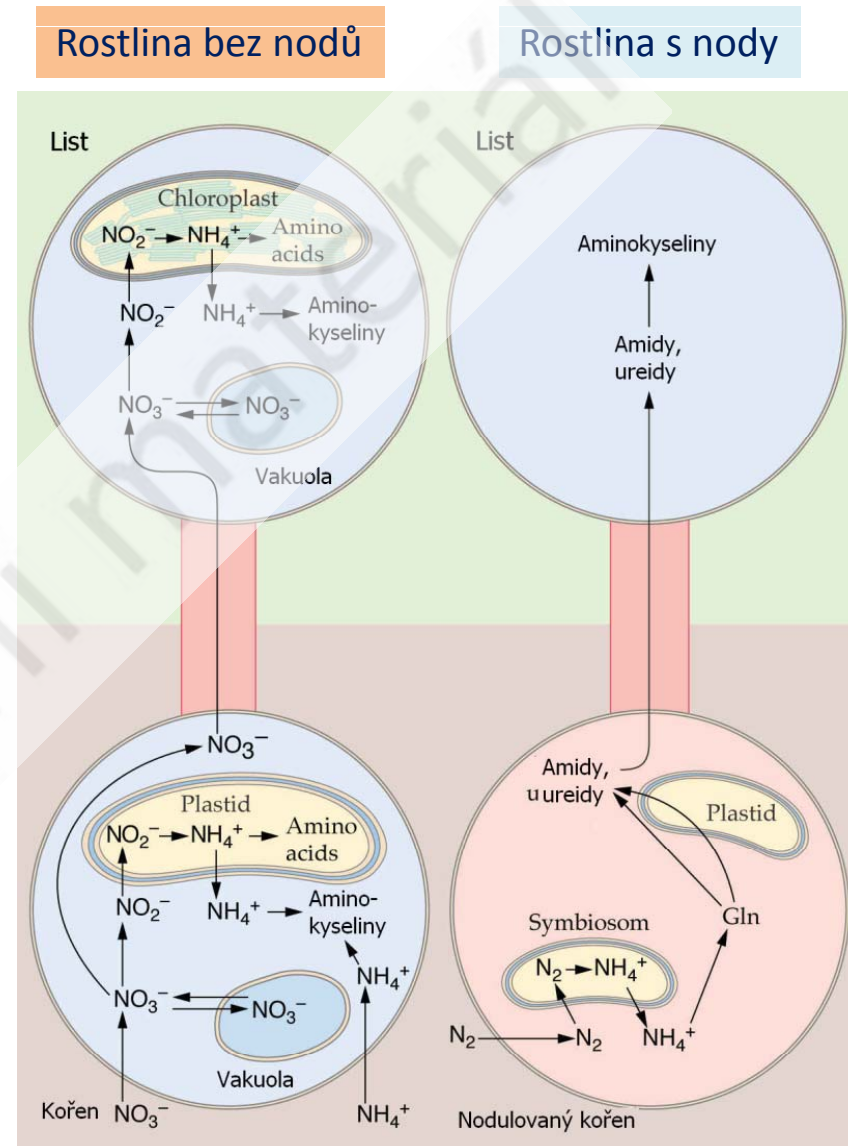


Anorganické sloučeniny dusíku

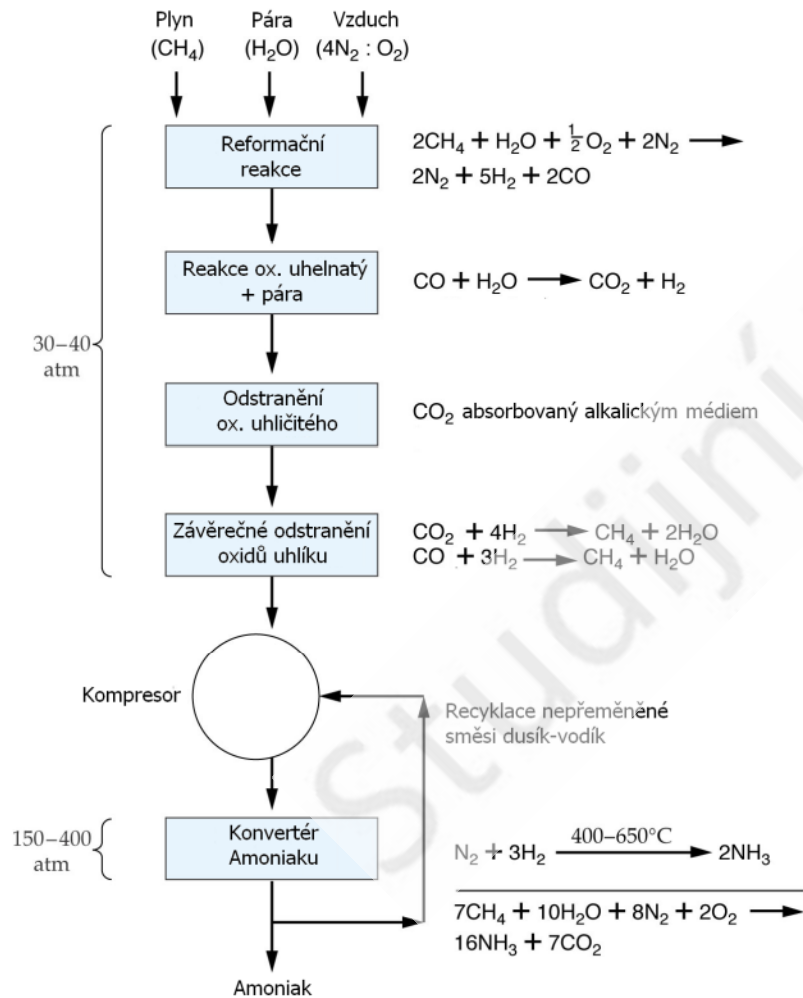
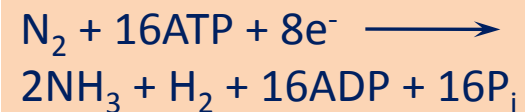
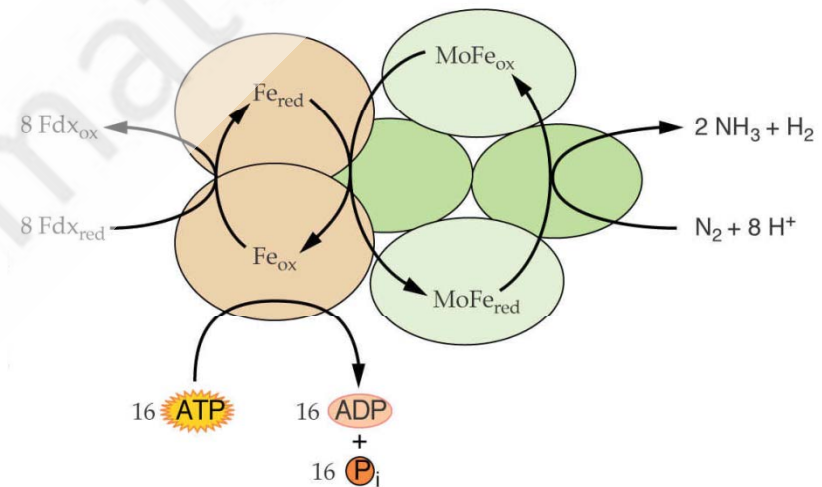
Sloučenina	Ox. stav	Název
N_2	0	Dusík
NH_3	-3	Amoniak
NH_4^+	-3	Amonný ion
N_2O	+1	Ox. dusný
NO	+2	Ox. dusnatý
NO_2^-	+3	Dusitan
NO_2	+4	Ox. dusičitý
NO_3^-	+5	Dusičnan

Rostliny mohou přijímat dusík ve formě:

- amonného iontu
- dusičnanu a následné redukci na amonný ion
- v případě přítomnosti bakteriálního symbionta fixujícího dusík ve formě atomárního dusíku



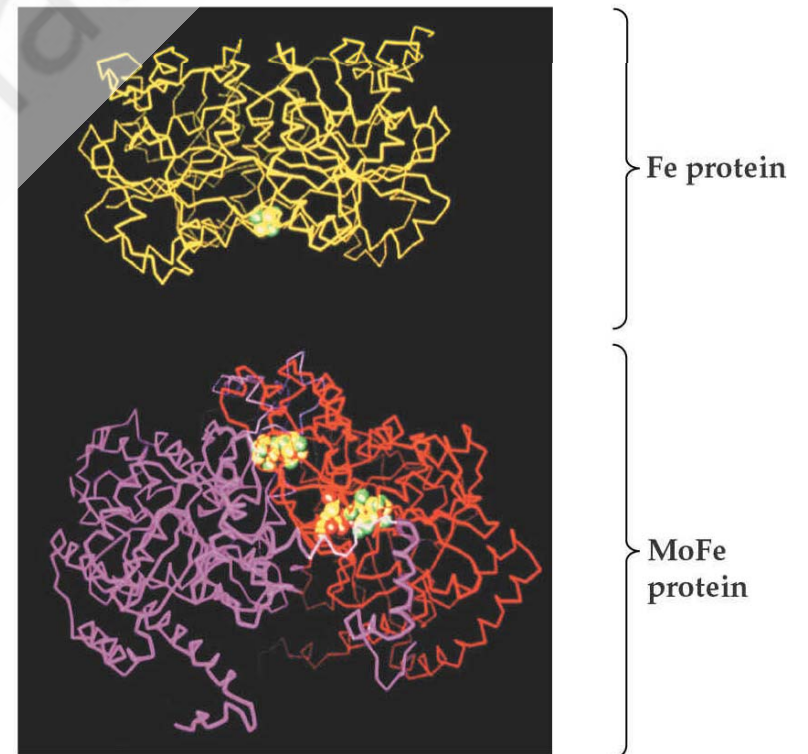
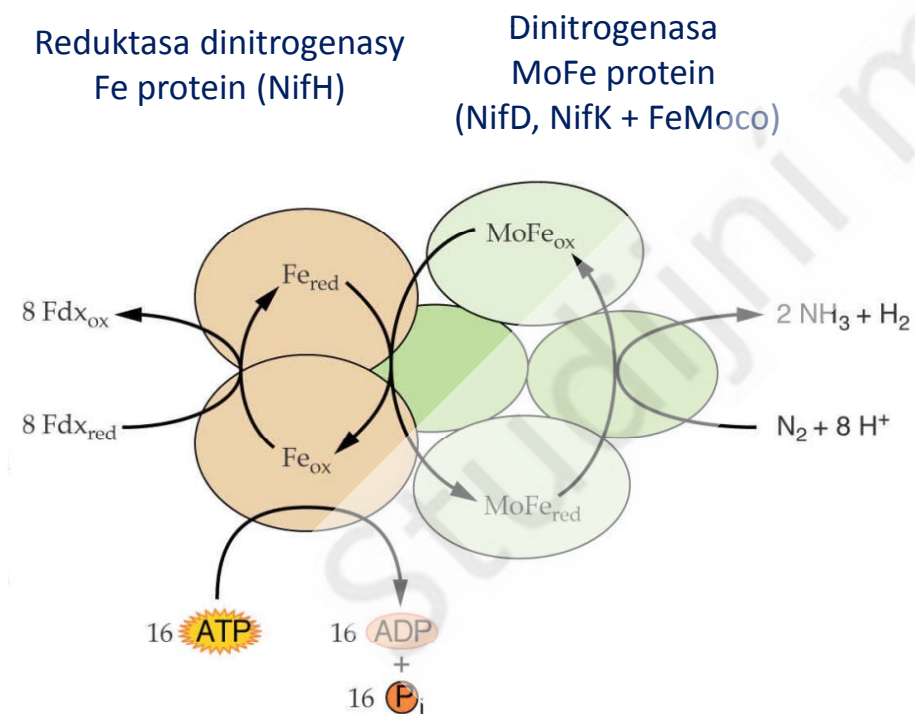
Fixace dusíku – redukce plynného dusíku na amonný ion

Chemická cesta přeměny
(Haber-Bosch)Biologická cesta přeměny
(*Cyanobacteria*, *Actinomycetes*, α -*proteobacteria*)

Enzymologie fixace dusíku

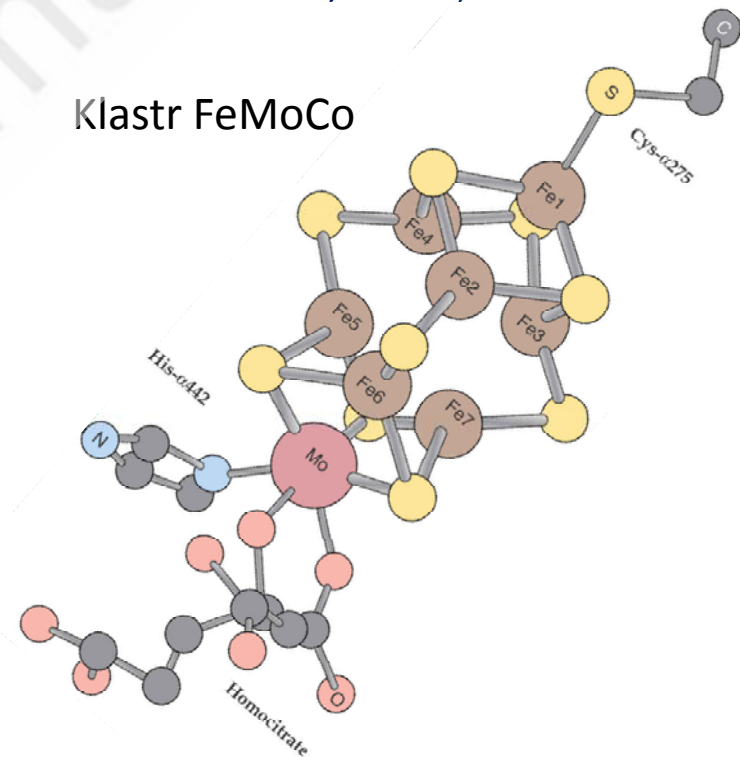
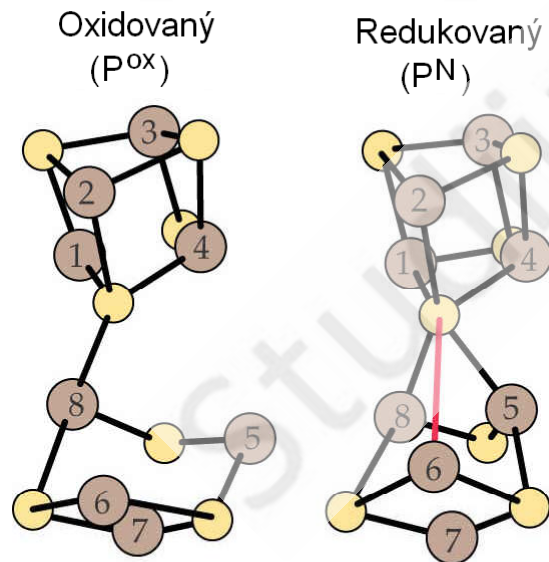
- redukce molekuly dusíku je prováděna dvěma enzymy, dinitrogenasou a reduktasou dinitrogenasy, jejichž komplex je označován jako nitrogenasa

Struktura nitrogenasového komplexu



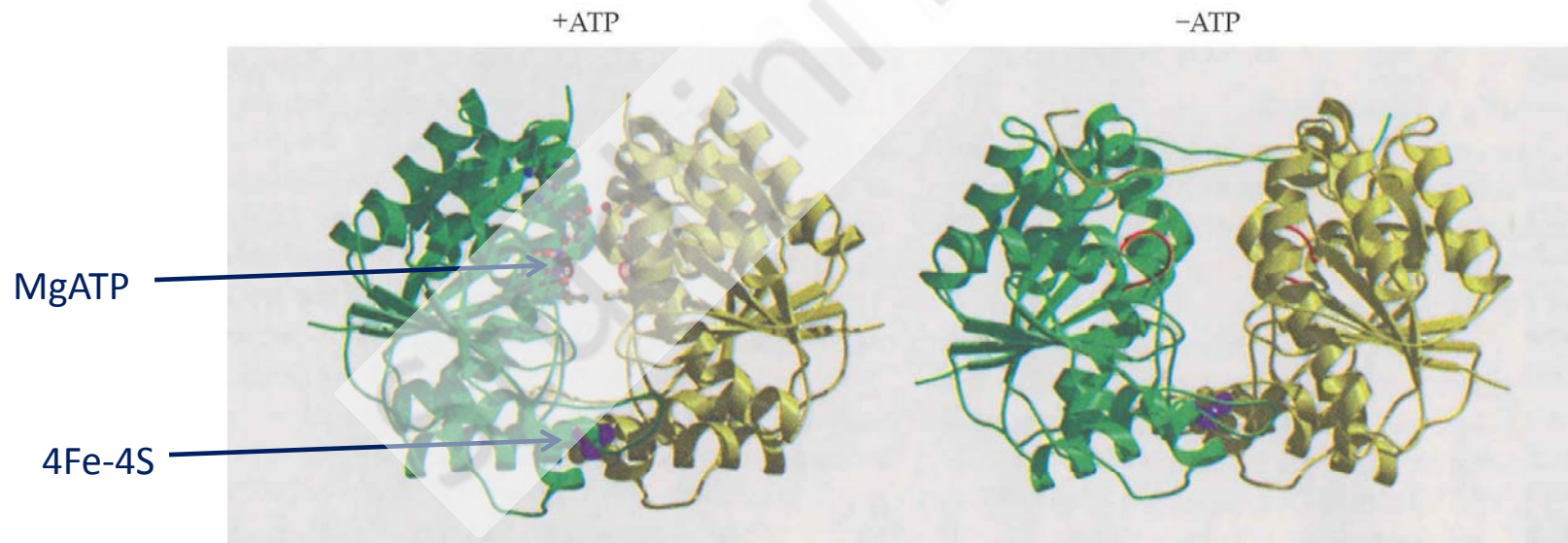
Struktura Dinitrogenasy (NifD, NifK)

- všechny dinitrogenasy obsahují dva identické P-klastry (8Fe-7S) vázané na protein 6 kovalentními vazbami mezi Cys a atomy Fe
- dále obsahují další dva klastry přichycené pouze přes atom S cysteinu a atom N histidinu, které lze reverzibilně z proteinu odstranit.
- klastry mohou obsahovat následující kombinace atomů kovů: FeMoCo, FeVCo, FeFeCo



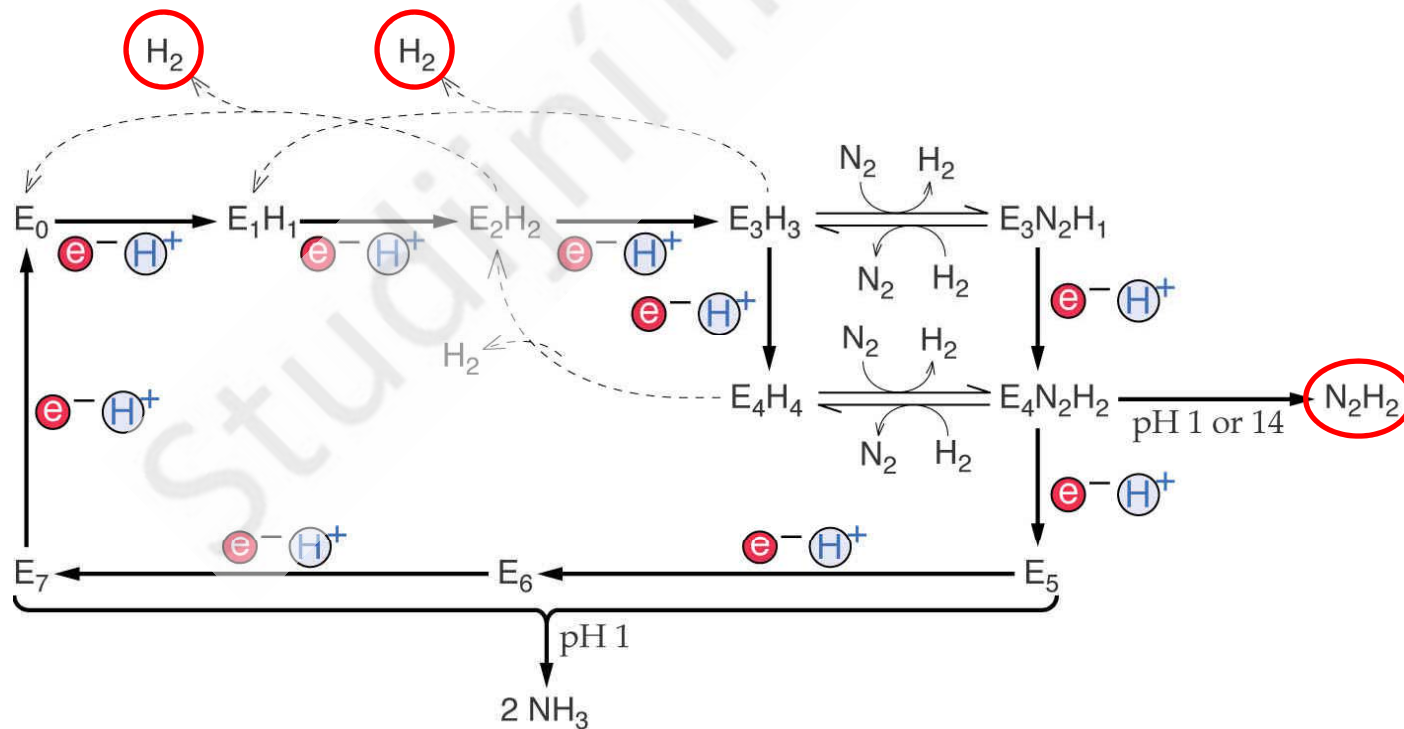
Struktura Reduktasy dinitrogenasy (Nifh)

- přijímá elektrony z redukováného feredoxinu nebo flavodoxinu a přenáší je na dinitrogenasu
- obsahuje 4Fe-4S klastr vázaný kooperativně mezi dvěma monomery proteinu
- po navázání dvou molekul MgATP se mění struktura proteinu, kdy Fe-S klastr se posouvá k Fe-S klastru dinitrogenasy a dochází k přenosu elektronu



Reakční schéma MoFe enzymového cyklu

- celý reakční průběh není ještě do detailu zcela popsán
- v počátečních fázích reakce může docházet k uvolnění molekuly H_2 , aniž by došlo k redukci N_2 a celý systém má tak “jalový výkon”.
- při vazbě na enzym molekula N_2 zřejmě vytěsňuje molekulu H_2 z reakčního centra
- Pokud přidáme ke komplexu $E_4N_2H_2$ silnou kyselinu nebo zásadu dojde k uvolnění hydrazinu.



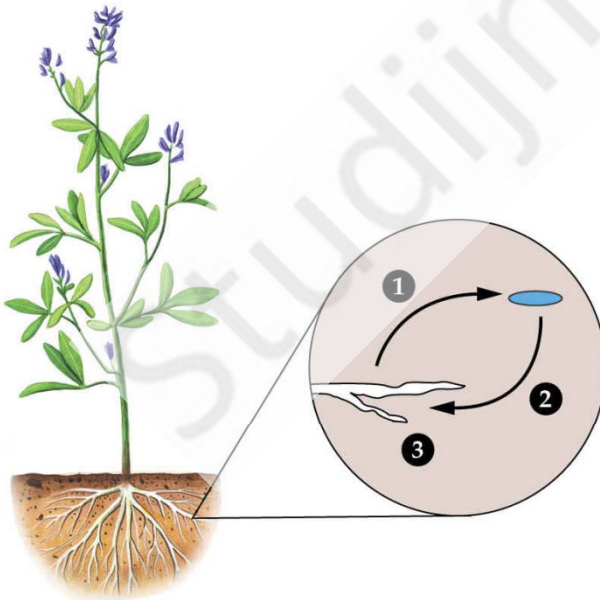
Symbiotická fixace dusíku

- v přírodních ekosystémech pochází 80-90% rostlinami využitelného dusíku z procesu fixace.
- při fixaci N_2 existují tři základní typy symbiózy:
 - i. Symbióza gram-negativních bakterií (rhizobií) s celou řadou luštěnin (hrách, fazole, sojové boby, čočka, vaječná)
 - ii. Symbióza gram-positivních bakterií actinomycet s některými dvouděložnými rostlinami (olše, myrta, přesličník)
 - iii. Symbióza mezi cyanobakteriemi a celou řadou rostlin (kapradí, jaterník, mech)
- výsledná symbióza vznikla zřejmě jako výsledek pozitivních a negativních tlaků během koevoluce symbiotického partnera a rostliny



Tvorba kořenových nodulů

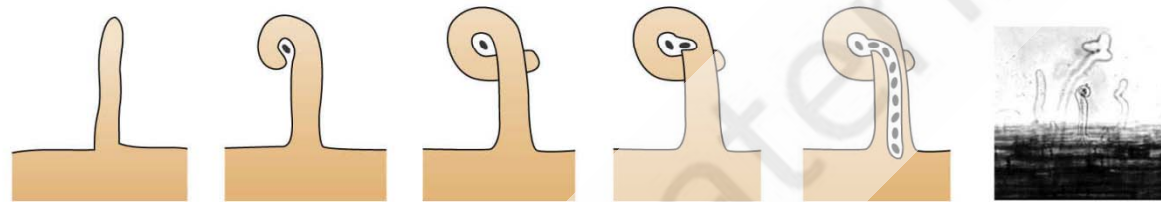
- symbióza rhizobií s luštěninami se odehrává ve speciálních strukturách nazývaných noduly (hlízky)
- tvorba nodulů je vyvolána bakteriálními signály na základě kterých dochází ke změnám na úrovni buněk a orgánů
- rozpoznání host-symbiont probíhá v kořenové sféře, kdy rostlina je infikována skrze kořenové vlásky
- samotná invazivní struktura se jmenuje infekční vlákno a je tvořena rostlinou



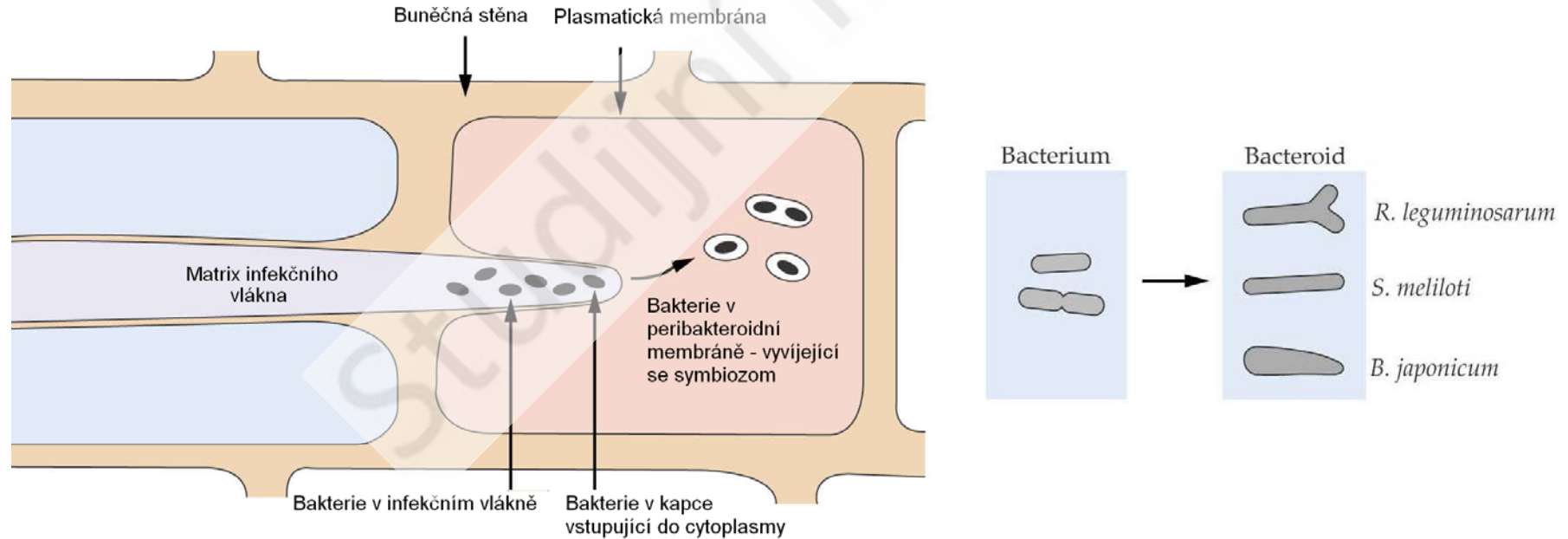
1. Kořeny rostlin uvolňují elicitory exprese *Nod* genu
2. Bakterie jako odpověď uvolňuje do okolí Nod faktor
3. Kořeny exprimující nodulinové proteiny jsou infikovány a prochází nodulační morfogenezí

Schéma tvorby kořenových nodulů

- kořenové vlásky se postupně stočí a dojde k polapení bakterie
- bakterie postupně vytváří invazní vlákno do cílové buňky



- bakterie v bakterioidech mají odlišnou morfologii od wt



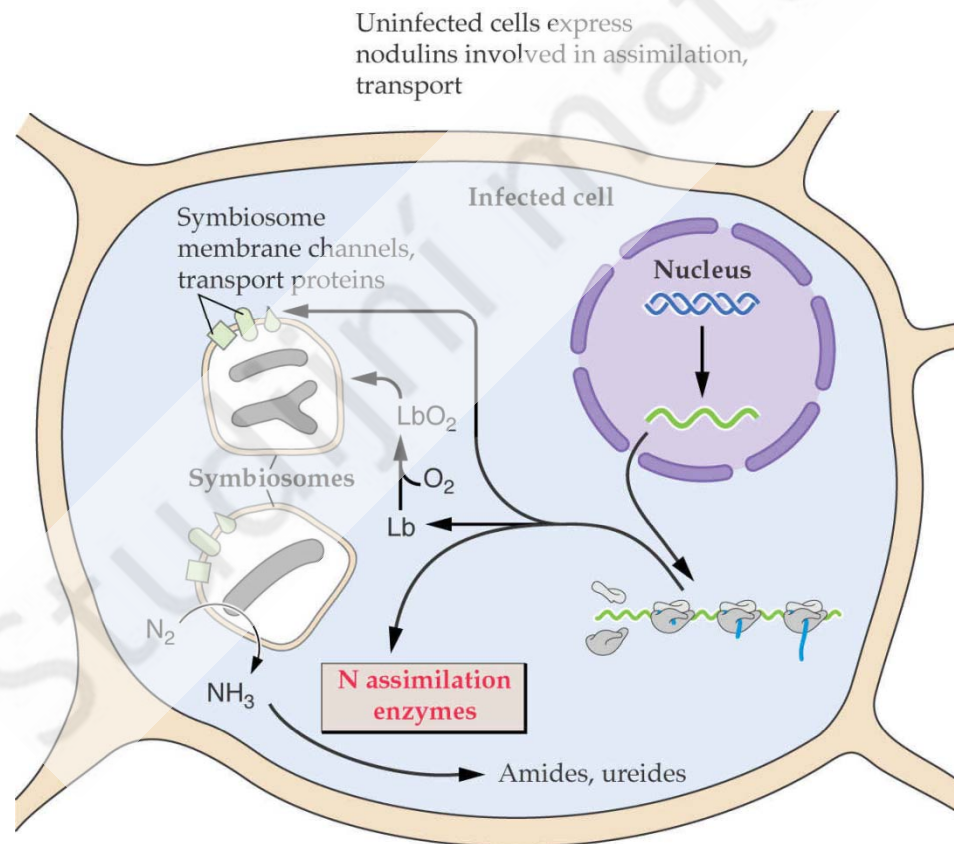
Geny zodpovědné za symbiózu - bakterie

- pro symbiózu rhizobií s luštěninami je nezbytným krokem výměna biochemických signálů
- látky uvolňované hostitelskou rostlinou vyvolávají expresi bakteriálních genů (*nod*), které po té modifikují metabolismus rostliny a její vývoj

Stádium symbiosy	Rhizobium gen	Funkce
Regulace genů v odpovědi na rostlinný signál	<i>nodD, nolR, nodVW</i>	Aktivace nebo represe <i>nod</i> promotoru
Formace nodulů, rozpoznání hostitele	<i>nod, nol, noe</i>	Enzymatická syntéza Nod faktorů
Růst invazivního vlákna	<i>exo, lps, ndv</i>	Syntéza extracelulárních polysacharidů
Diferenciace, metabolismus bakteroidu	<i>bacA</i> <i>dct</i> geny	Signál pro export/import Import dikarboxylových kyselin
Regulace genů fixujících dusík	<i>fixL, fixJ, fixA, fixK</i>	Odpověď na kyslík, transkripční kontrola <i>nif</i> promotoru
Fixace dusíku	<i>nifHDK, jiné nif, fix</i>	Enzym nitrogenasa a kofaktory

Geny zodpovědné za symbiózu - hostitel

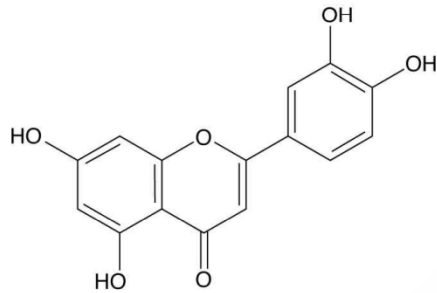
- během pozdní fáze nodulace rostlina exprimuje geny nazývané noduliny
- mezi noduliny patří leg-hemoglobin, membránové proteiny, enzymy katalyzující asimilaci amoniaku a zajišťující transport N_2 uvnitř rostliny



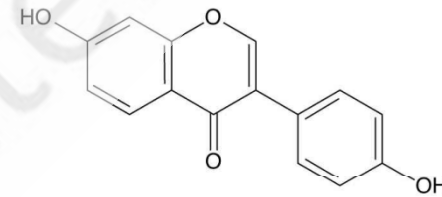
Látky uvolňované hostitelskou rostlinou indukující expresi *nod* genu

Flavonoidní povahy

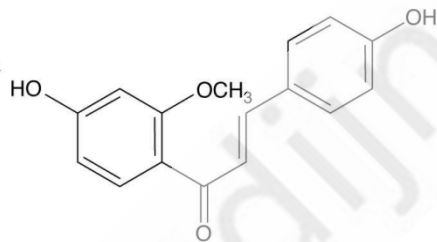
Luteolin,
a flavone inducer from
Medicago spp., active
on *S. meliloti*



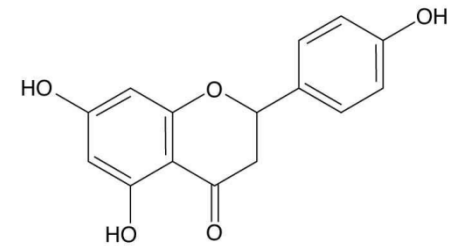
Daidzein,
an isoflavone
active on
B. japonicum



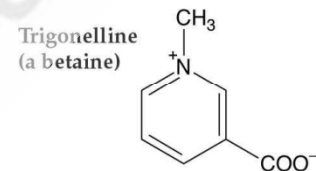
4,4'-Dihydroxy-2'-
methoxychalcone,
a chalcone inducer from
Medicago



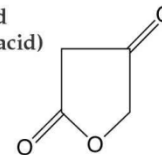
Naringenin,
a flavanone
active on
R. leguminosarum
bv. *viciae*



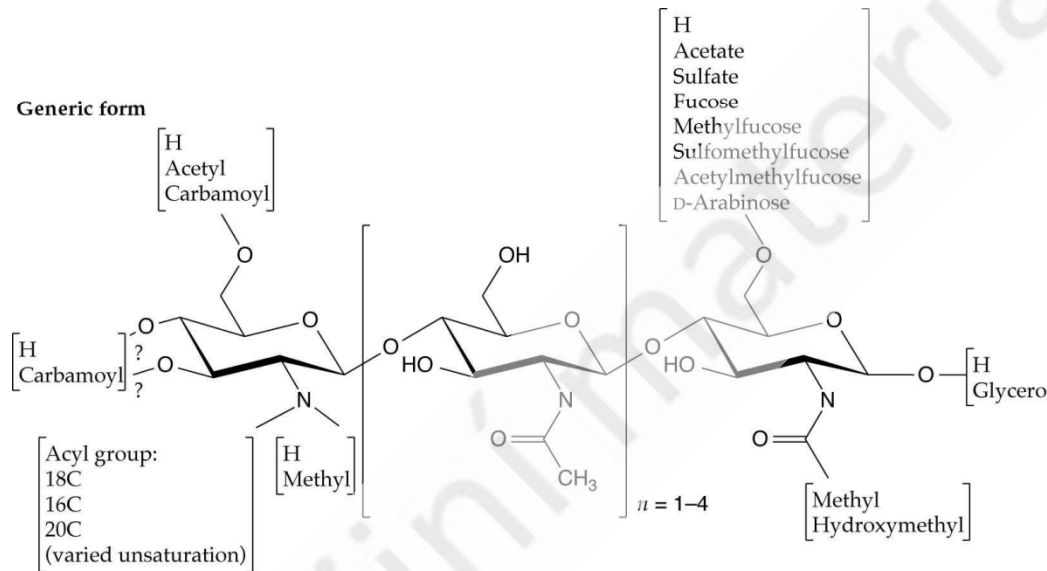
Jiné



Tetronic acid
(an aldonic acid)

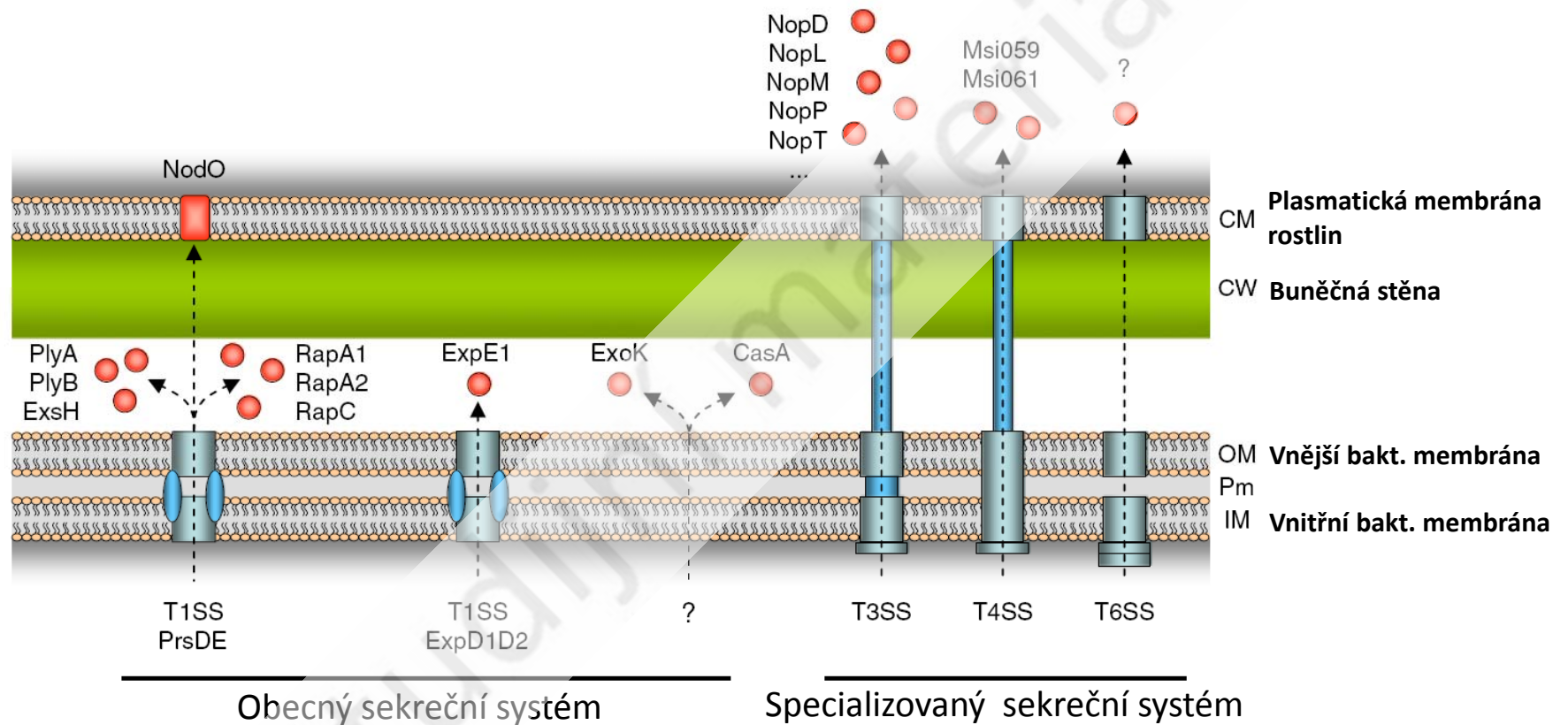


Základní struktura Nod faktorů (N-acylovaných chitooligosacharidů)



- Struktura rhizobiálního extracelulárního polysacharidu (EPS)
- Úloha jednotlivých EPS v procesu symbiózy se liší mezi jednotlivými páry hostitel-mikrob

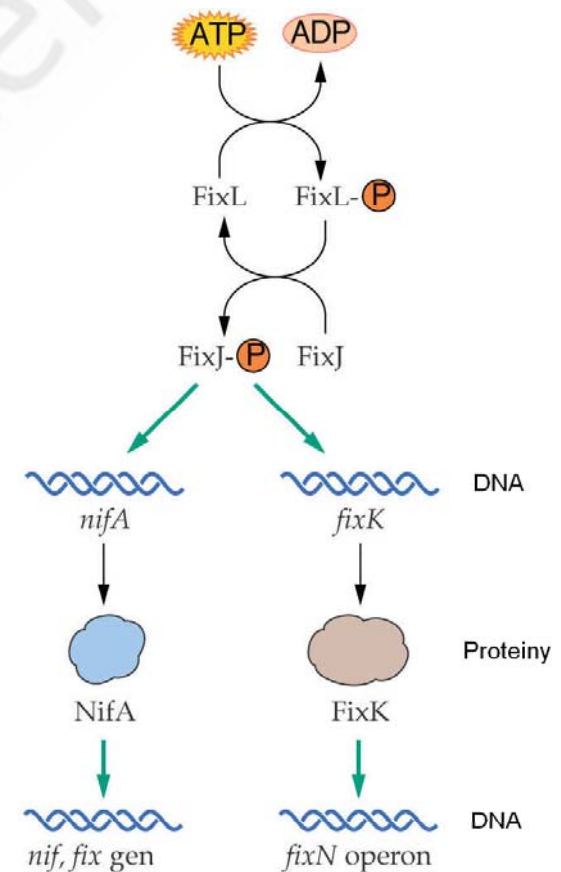
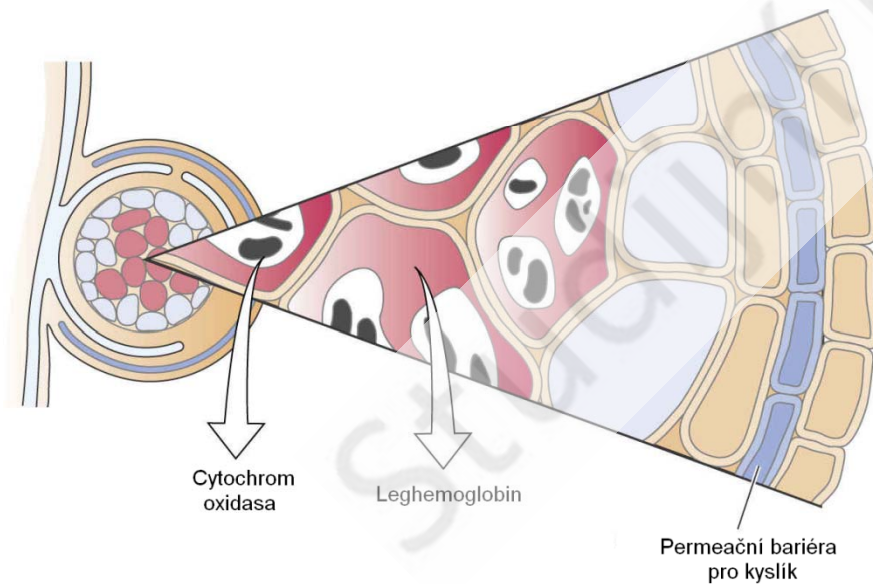
Přehled rhizobiálních proteinů hrajících roli při symbióze



NodO – kationt-selektivní kanál
 PlyA,B – polysacharidová lyasa
 RapA,C – adhesiny
 CasA – calsymin (EF motiv)

Fixace N_2 v nodulech

- při fixaci N_2 je nezbytné vytvořit mikro-aerobní redukční prostředí, ve kterém může docházet k aerobní tvorbě ATP
- pro udržení nízké koncentrace kyslíku v nodulech jsou potřeba tři základní faktory:
 - i. permeační bariéra v parenchymu nodulů
 - ii. přítomnost leghemoglobinu vázajícího volný kyslík
 - iii. výrazné snížení K_m rhizobiální cytochrom oxidasy (50nM/8nM)

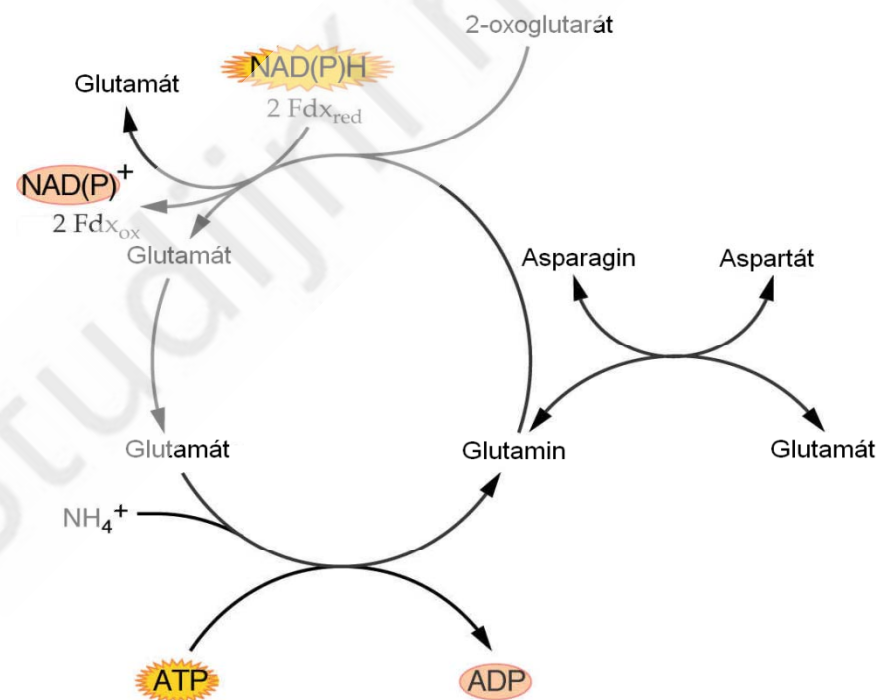


Regulace pomocí hemo-protein kinasy regulované c kyslíku

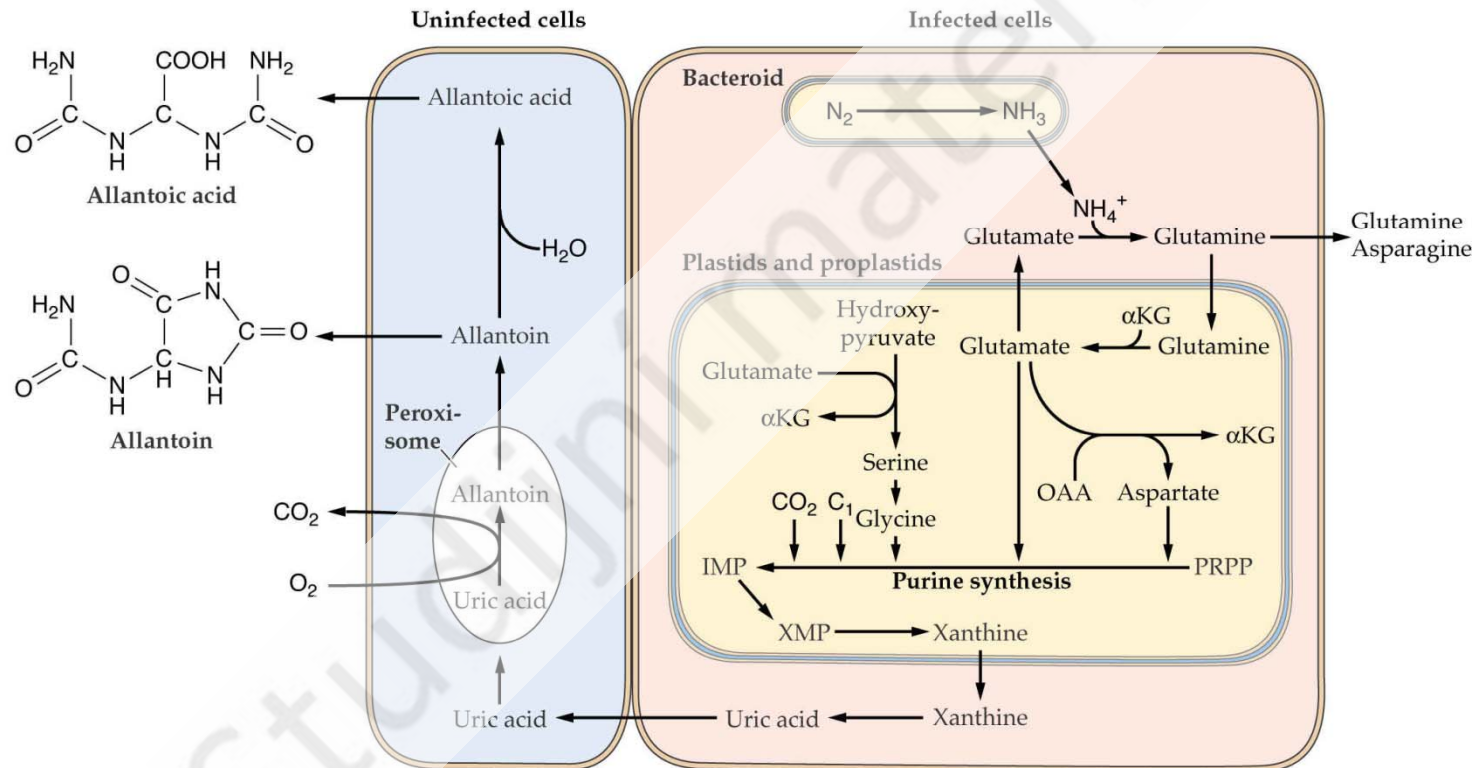
Asimilace amoniaku a transport dusíku z nodulů

- asimilace amoniaku probíhá v cytosolu a organelách nodulů
- za prvotní asimilaci dusíku jsou zodpovědné glutamin syntasa (GS) a NADPH-dependentní glutamát syntasa (GS-GOGAT)

GS-GOGAT cyklus

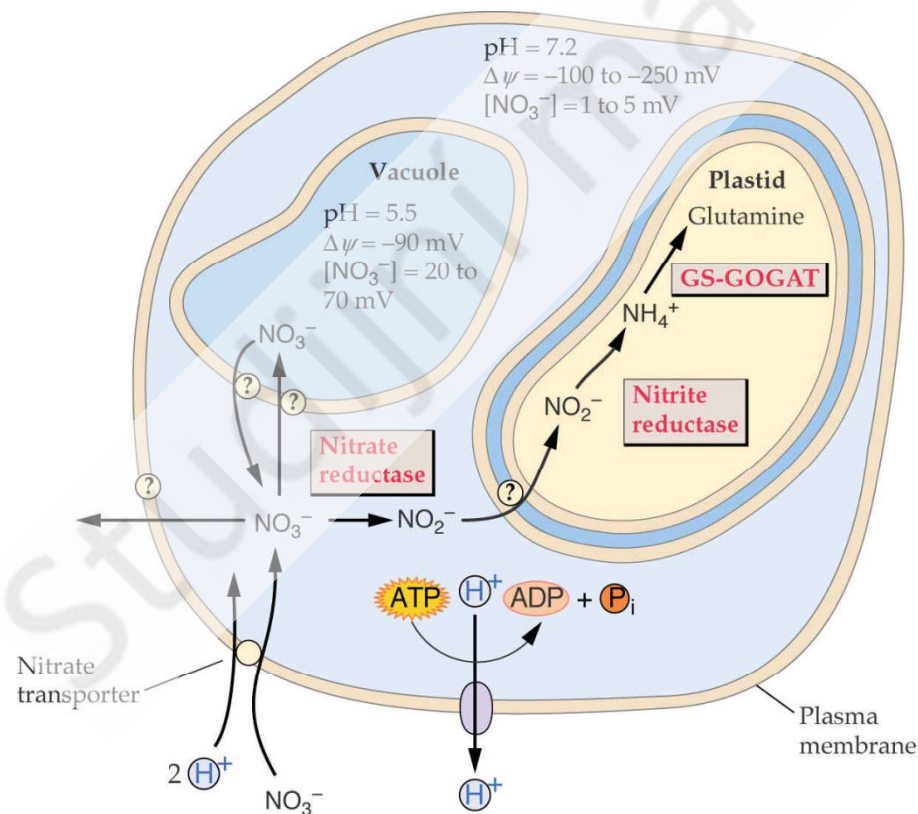


Transport dusíku u některých luštěnin (sója, vigna)



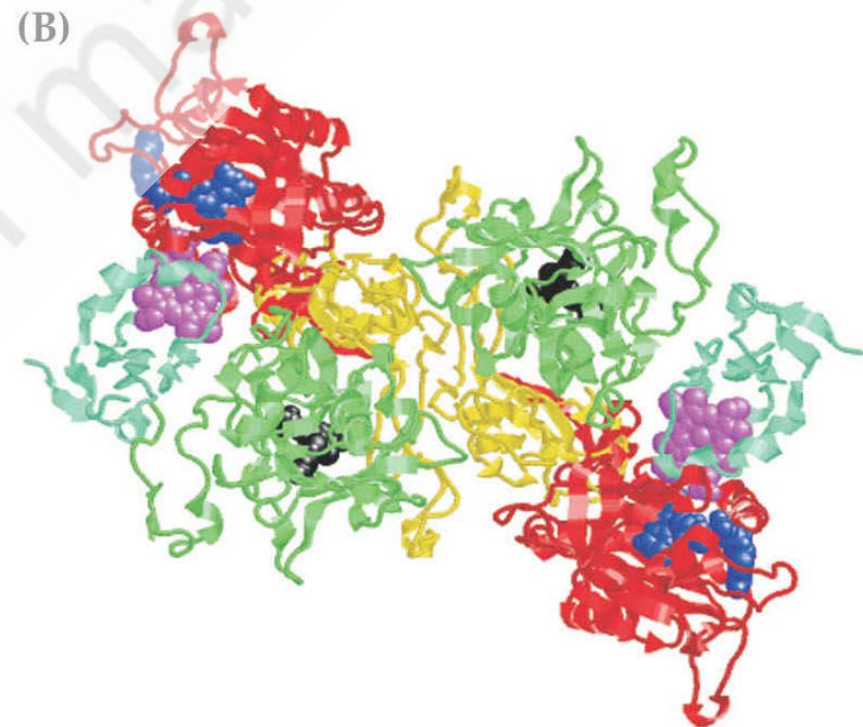
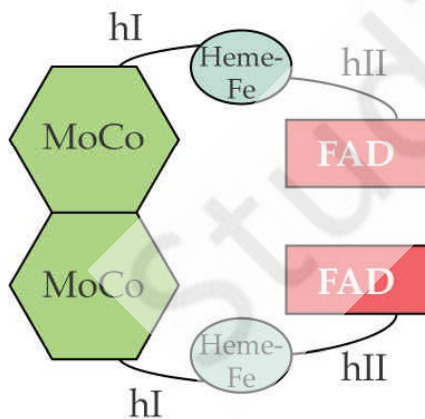
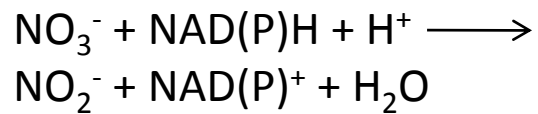
Asimilace dusičnanů

- dusičnan je hlavním zdrojem dusíku pro rostliny
- dusičnan je nejprve transportován do buňky (NRT1, NRT2) a poté je buď využit nebo skladován ve vakuole i ve velmi vysokých koncentracích (až 20mM)
- při asimilaci je dusičnan nejprve redukován na dusitan (NR), který je poté dále redukován na amoniak (NiR)

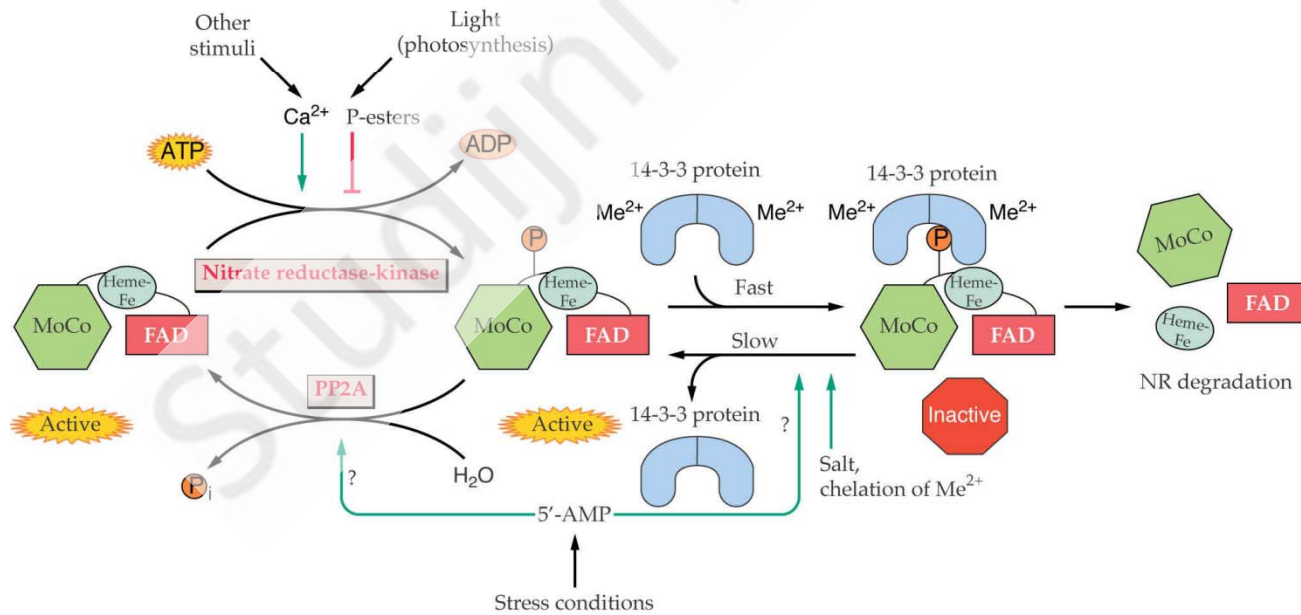
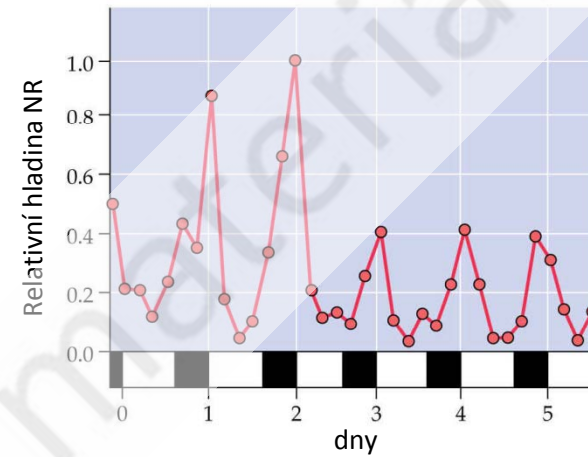
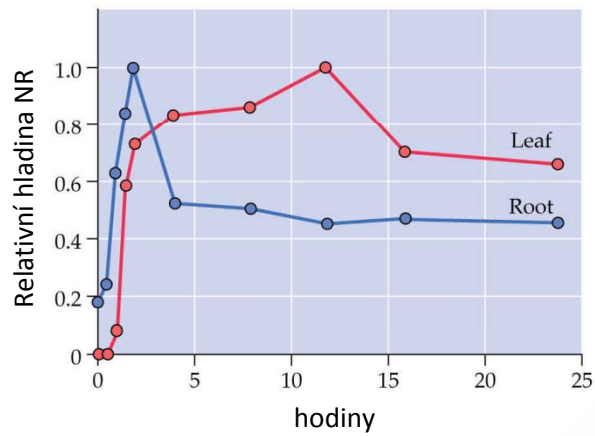


Nitrát reduktasa

- homotetramer s dvěma vaznými místy pro NADH a dusičnan
- jako zdroj redukčních ekvivalentů slouží NADH/NADPH
- obsahuje tři kofaktory (FAD, hem-Fe, MoCo)



Nitrát reduktasa - regulace



Nitrit reduktaasa

- zdrojem šesti elektronů je molekula feredoxinu produkovaná v chloroplastech při fotosyntetickém ne-cyklickém přenosu elektronů
- u “nebarevných plastidů” NADPH z pentosového cyklu redukuje feredoxin v reakci katalyzované ferredoxin-NADP reduktasou

