

UNIVERZITA PAVLA JOZEFA ŠAFÁRIKA V KOŠICIACH
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA
Ústav chemických vied

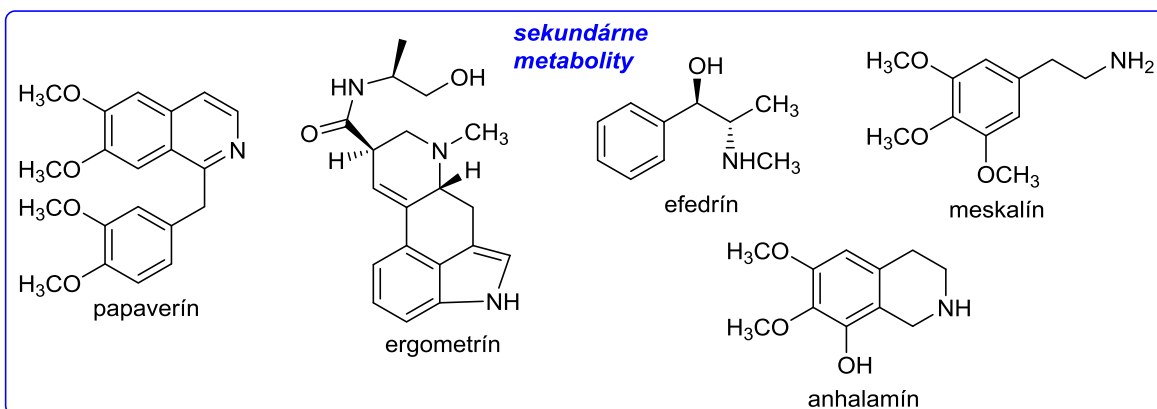
Katedra organickej chémie



SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS

Úvod do štúdia prírodných látok

Miroslava Martinková



Košice 2024

SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS
Úvod do štúdia prírodných látok
Vysokoškolský učebný text

Autorka:

doc. RNDr. Miroslava Martinková, PhD.
Prírodovedecká fakulta, UPJŠ Košice

Recenzenti:

prof. RNDr. Štefan Toma, DrSc.
Prírodovedecká fakulta UK Bratislava

RNDr. Dávid Maliňák, PhD.
Prírodovedecká fakulta, Univerzita Hradec Králové

Tento text je publikovaný pod licenciou CC BY NC ND Creative Commons Attribution-NonCommercial-No-derivates 4.0 („Uveďte pôvod – Nepoužívajte komerčne - Nespracováajte“)



Za odbornú a jazykovú stránku tejto publikácie zodpovedá autor. Rukopis neprešiel redakčnou ani jazykovou úpravou.

Dostupné od: 08.02.2024

Umiestnenie: www.unibook.upjs.sk

ISBN 978-80-574-0283-1 (e-publikácia)

Predhovor

Tieto elektronické skriptá sú sústredené na problematiku sekundárneho metabolizmu a jeho produktov – **sekundárnych metabolitov**. Predložený materiál podáva prehľad o základných stavebných blokoch a konštrukčných mechanizmov, prostredníctvom ktorých je možné v živých systémoch (rastlinách) syntetizovať zaujímavé molekuly. Procesy vzniku zmiených metabolitov sú vysvetlené pomocou základných mechanizmov organických reakcií. Skriptá sú určené predovšetkým pre študentov magisterského študijného programu organická chémia ako podporný materiál k profilovému predmetu *Chémia prírodných látok*.

Okrem toho môže byť tento dokument zaujímavý aj pre poslucháčov magisterského študijného programu biochémia ako rozširujúci materiál k povinne voliteľnému predmetu *Bioorganická chémia*.

Na tomto mieste sa chcem poďakovať recenzentom tohto študijného materiálu prof. RNDr. Štefanovi Tomovi, DrSc. z Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave a RNDr. Dávidovi Maliňákovi, PhD. z Katedry chémie, Prírodovedeckej fakulty Univerzity Hradec Králové za cenné rady a pripomienky.

Autor, september 2023

Poznámka autora

Pri schémach a obrázkoch, ktorých súčasťou je sprievodný komentár, chýbajú pri niektorých písmenách (č, l, ň, t) mäkkéne, čo bolo spôsobené použitým kresliacim programom, ktorý nedisponoval príslušným fontom. Za uvedený nedostatok sa ako autor ospravedlňujem.

Obsah

1. **Primárny a sekundárny metabolizmus (vymedzenie pojmov) (5)**
2. **Stavebné bloky (7)**
3. **Konštrukčné mechanizmy (12)**
 - 3.1. Alkylačné reakcie: nukleofilná substitúcia (13)
 - 3.2. Alkylačné reakcie: elektrofilná adícia (16)
 - 3.3. Aldolová a Claisenova reakcia ako jeden z konštrukčných mechanizmov (17)
 - 3.3.1. Tvorba a aplikácie malonyl-CoA (19)
 - 3.4. Dekarboxylačné reakcie (20)
 - 3.4.1. Dekarboxylácia α -oxokyselín (20)
 - 3.4.1.1. Biosyntéza acetyl-CoA (20)
 - 3.4.2. Dekarboxylácia α -aminokyselín (23)
 - 3.4.2.1. Tvorba stavebných blokov C_6C_2N a indol. C_2N (23)
 - 3.5. Transaminácia ako jeden z konštrukčných mechanizmov (29)
 - 3.5.1. Konštrukcia stavebného bloku C_6C_2 (32)
 - 3.5.2. Konštrukcia stavebného bloku C_6C_3 (33)
 - 3.5.3. Konštrukcia stavebného bloku C_6C_1 (36)
 - 3.5.4. Konštrukcia stavebného bloku C_5 (37)
 - 3.5.5. Konštrukcia stavebného bloku C_4N (47)
 - 3.5.6. Konštrukcia stavebného bloku C_5N (48)
 - 3.6. Mannichova reakcia ako jeden z konštrukčných mechanizmov (49)
 - 3.7. Glykozylácia ako jeden z konštrukčných mechanizmov (51)
 - 3.8. Wagnerove-Meerweinove prešmyky ako jeden z konštrukčných mechanizmov (53)
 - 3.9. Oxidačné a redukčné reakcie ako konštrukčné mechanizmy (54)
 - 3.9.1. Dehydrogenázy (54)
 - 3.9.2. Monooxygenázy (56)
 - 3.9.3. Dioxygenázy (58)
 - 3.9.4. Aminooxygenázy (59)
 - 3.10. Sacharidy ako východiskové látky pre biosyntézu sekundárnych metabolitov (60)
4. **Použitá literatúra (66)**

SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS

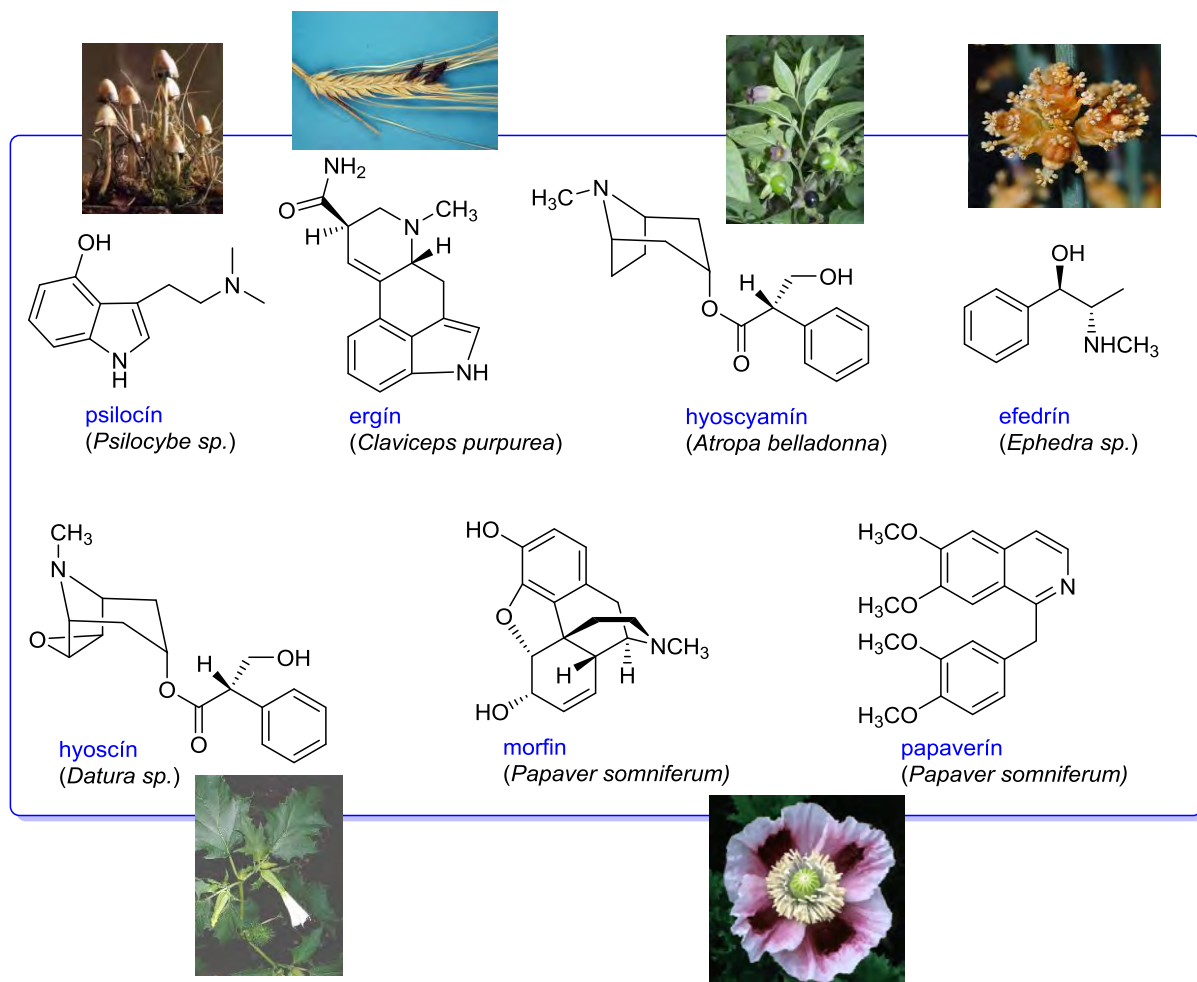
1. Primárny a sekundárny metabolizmus (vymedzenie pojmov)

Všetky organizmy potrebujú transformovať a navzájom meniť veľké množstvo organických molekúl na to, aby boli schopné existovať, rásť a rozmnožovať sa. Pre vyššie spomenutú skutočnosť potrebujú byť vybavené energiou vo forme ATP a stavebnými blokmi potrebnými pre konštrukciu ich vlastných tkanív. Pre dosiahnutie vyššie uvedeného cieľa používajú komplexnú sieť enzýmovo sprostredkovaných a starostlivo regulovaných chemických reakcií, veľmi často označovaných ako **metabolické cesty** (*metabolic pathways*). Sacharidy, proteíny, lipidy a nukleové kyseliny predstavujú kľúčové biomolekuly, nevyhnutné pre život. Okrem tukov, ostatné disponujú polymérnou štruktúrou. Sacharidy sú zložené z jednoduchých cukorných jednotiek, zatiaľ čo proteíny sú tvorené aminokyselinami a nukleové kyseliny zodpovedajúcimi nukleotidmi. Jednotlivé organizmy sa značne odlišujú v ich kapacite a schopnosti syntetizovať a transformovať organické molekuly. Napríklad rastliny veľmi efektívne produkujú organické molekuly prostredníctvom fotosyntézy z jednoduchých anorganických zlúčenín ako sú CO_2 a voda, zatiaľ čo iné organizmy ako živočíchy a mikroorganizmy sa spoliehajú na získanie potrebných látok, napríklad konzumáciou rastlinného materiálu. Z toho dôvodu veľa metabolických dráh je zodpovedných predovšetkým za degradáciu látok prijatých zo stravy, zatiaľ čo iné dráhy sú potom požadované pre konštrukciu špecializovaných molekúl zo základných zlúčenín, získaných z potravy. Navzdory neobyčajne rozmanitým charakteristikám, ktoré nachádzame v živých systémoch sa zistilo, že dráhy pre modifikáciu a syntézu sacharidov, proteínov, lipidov a nukleových kyselín sú esenciálne a v podstate rovnaké, okrem zopár výnimiek, vo všetkých organizmoch. Tieto procesy demonštrujú základnú jednotu živej hmoty a sú spoločne označené ako **primárny metabolizmus**. Jeho produkty sú potom pomenované ako **primárne metabolity**.

Na rozdiel od primárneho metabolizmu, prostredníctvom ktorého sa syntetizujú, degradujú a vzájomne premieňajú organické zlúčeniny a s ktorým sa stretávame naprieč celým spektrom živých organizmov, existuje ešte aj metabolizmus zodpovedný za generovanie molekúl, ktoré sú v oveľa menšej miere zastúpené v prírode. Takéto zlúčeniny sú označené ako **sekundárne metabolity** a procesy, ktorými sú tvorené, ako **sekundárny metabolizmus**.

Spomenuté sekundárne metabolity sú viazané len na špecifické organizmy alebo skupiny organizmov, predovšetkým na rastliny, huby, mikroorganizmy a morské organizmy. Nie sú nevyhnutné pre existenciu jedinca, ktorým sú produkované, nie sú nutne tvorené za každých podmienok a vo väčšine prípadov nie je sú známe ani funkcie a výhody týchto látok pre daný organizmus.

Niektoré sekundárne metabolity sú nepochybne produkované ako toxické entity poskytujúce ochranu voči predátorom, ďalej napríklad ako prchavé vonné atraktanty pre ten istý alebo iný druh alebo ako farebné látky pre prilákanie alebo naopak varovanie iných druhov. Navyše, sekundárny metabolizmus je zdrojom množstva zaujímavých, biologicky a farmakologicky aktívnych zlúčenín ako sú psilocín, morfín, papaverín, hyoscyamín, hyoscín, efedrín, ergín a mnohé ďalšie (Obr. 1). Na to, aby boli biosyntetizované, musí mať daný jedinec k dispozícii **stavebné bloky**, resp. ich zdroje a samozrejme aparát potrebných enzýmov.



Obrázok 1. Príklady sekundárnych metabolitov.

2. Stavebné bloky

Stavebné bloky pre sekundárne metabolity sú odvodené z produktov primárneho metabolizmu, tak ako je to ilustrované v Schéme 1.¹

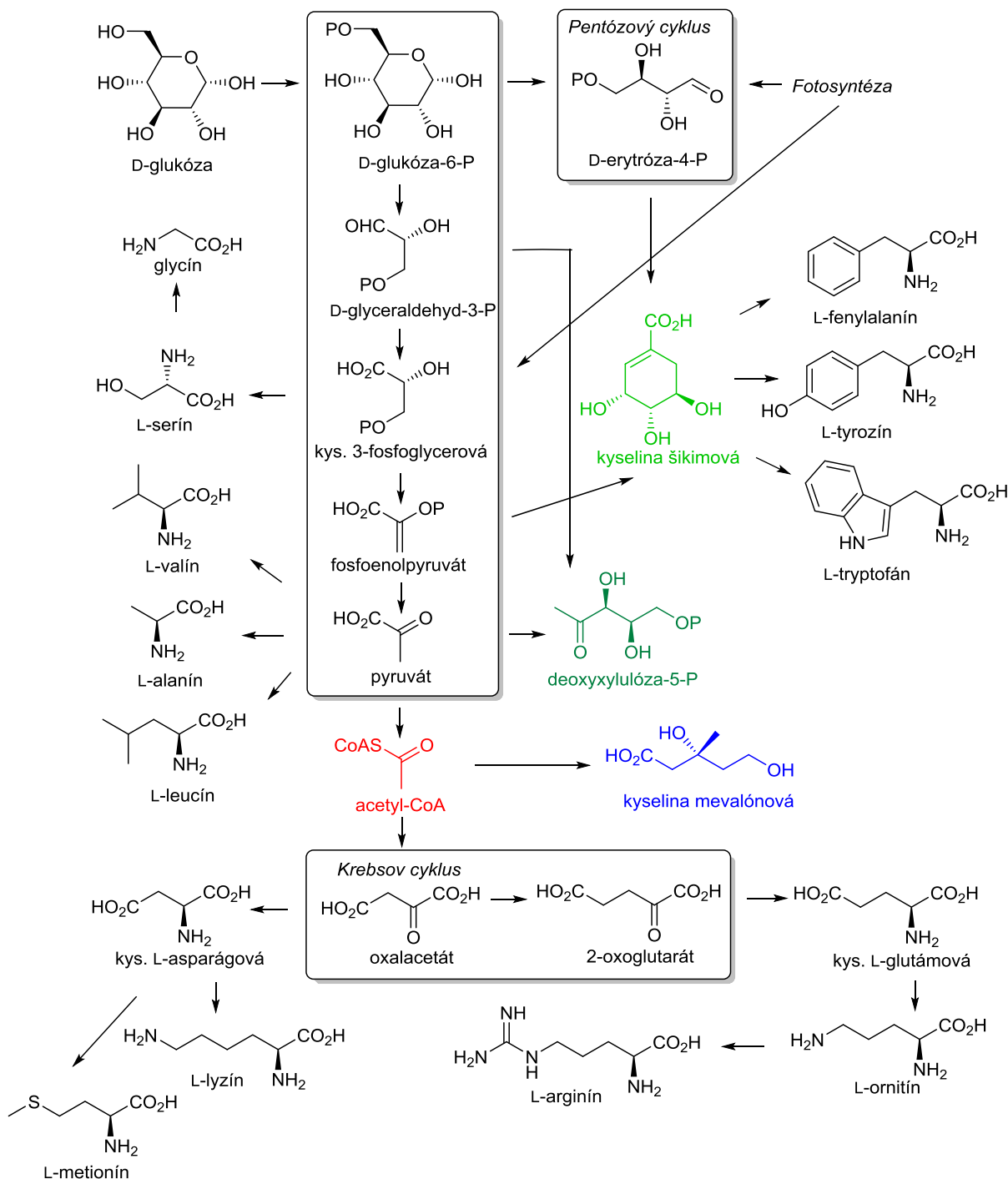


Schéma 1. Intermediáty pre biosyntézu sekundárnych metabolitov.

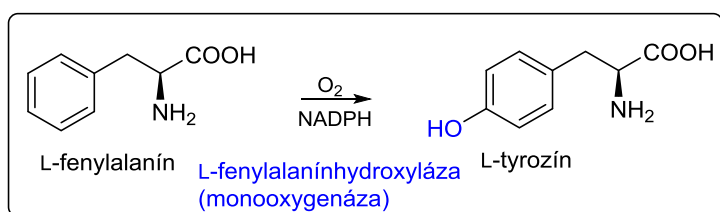
Uvedená schéma zároveň demonštruje ako sú molekuly pochádzajúce zo základných procesov akými sú fotosyntéza, glykolýza a Krebsov cyklus (KC) využívané na tvorbu

medziproduktov, nevyhnutných pre tvorbu stavebných blokov. Treba však poznamenať, že počet potrebných stavebných blokov, aj napriek pestrej palete známych sekundárnych metabolitov, je relatívne nízky. Najdôležitejšie stavebné bloky používané pre biosyntézu sekundárnych metabolitov sú odvodené z nasledovných intermediátov ako sú: **acetyl-CoA**, **kyselina šikimová**, **kyselina mevalónová** a **1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát** (pre ich vznik, pozri *Schému 1*).

Tie sú následne využité, postupne ako sú uvedené, v *acetátovej*, *šikimátovej*, *mevalonátovej* a *deoxyxylulóza-fosfátovej* dráhe.

Acetyl-CoA je tvorený oxidačnou dekarboxyláciou pyruvátu, pochádzajúceho z glykolýzy (pre jeho tvorbu, pozri kapitolu *Konštrukčné mechanizmy*, *Schéma 15*). Je tiež tvorený aj β -oxidáciou mastných kyselín. Acetyl-CoA vstupuje do Krebsovho cyklu, kde je modifikovaný na α -oxokyseliny (2-oxoglutarát a oxalacetát), potrebné pre konštrukciu niektorých neesenciálnych aminokyselín. Rovnako tak je využívaný na biosyntézu kyseliny mevalónovej, mastných kyselín, steroidných látok a ďalších dôležitých štruktúr.

Kyselina šikimová je tvorená „kaplingom“ fosfoenolpyruvátu, pochádzajúceho z glykolýzy a D-erytróza-4-fosfátu, ktorý je produktom pentózového cyklu (*Schéma 1* a potom *Schéma 17*, kapitola *Konštrukčné mechanizmy*). Šikimátová biosyntetická cesta vedie k tvorbe veľkého počtu zlúčenín obsahujúcich aromatické jadro, vrátane derivátov kyseliny škoricovej, alkaloidov (indolové alkaloidy) a rovnako tak je nevyhnutná pre konštrukciu aromatických aminokyselín, z ktorých dve, neskôr uvedené, sú esenciálne pre živočíchy, vrátane cicavcov a človeka (L-tyrozín, **L-tryptofán**, **L-fenylalanín**). L-Tyrozín dokáže ľudský organizmus syntetizovať z L-fenylalanínu pomocou enzýmu L-fenylalanínhydroxyláza, ktorá patrí do skupiny monooxygenáz, teda enzýmov katalyzujúcich adíciu jedného kyslíkového atómu z molekuly O₂ do príslušného substrátu (napríklad inercia kyslíka do C-H väzby). Druhý atóm je potom redukovaný na vodu ako vedľajší produkt biosyntetického procesu (*Obr. 2*).



Obrázok 2. Biosyntéza L-tyrozínu u človeka.

Kyselina mevalónová (Schéma 32, kapitola *Konštrukčné mechanizmy*) je tvorená z troch molekúl acetyl-CoA a slúži ako prekursorová molekula pre biosyntézu izoprénovej stavebnej jednotky C₅.

1-Deoxy-D-xylulóza-5-fosfát (Schéma 34, kapitola *Konštrukčné mechanizmy*) vzniká z dvoch produktov glykolýzy, kyseliny pyrohroznovej a D-glyceraldehyd-3-fosfátu (Schéma 1) a rovnako tak je zdrojom stavebného bloku C₅. Mevalonátová a deoxyxylulóza-fosfátová dráha sú spolu zodpovedné za biosyntézu veľkého počtu terpenoidov a steroidných látok. Počas mnohých rokov bola mevalonátová cesta považovaná za spoločnú pre tvorbu celého okruhu prírodných terpenoidných látok. Neskôr sa však zistilo, že existuje aj alternatívna dráha, ktorá sa ukázala byť oveľa viac využívaná prírodou ako spomínaná mevalonátová.

Živočíchy, vrátane človeka a huby vykazujú nedostatok 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu, preto využívajú výlučne mevalonátový spôsob syntézy. Rastliny, množstvo baktérií a riasy môžu použiť obe cesty, pretože sú na to vybavené aparátom enzýmov. U rastlín sú tieto dve cesty rozdiferencované tak, že enzýmy pre mevalonátovú cestu sa nachádzajú v cytoplazme. Na druhej strane, enzýmy pre 1-deoxy-D-xylulózovú dráhu sú lokalizované v chloroplastoch.

Ako bolo povedané v úvodnej časti, biosyntéza známych sekundárnych metabolitov nevyžaduje veľký počet stavebných blokov. V Schéme 2 sú prezentované tie, ktoré sú prírodou najčastejšie využívané. Týchto osem stavebných blokov tvorí základ pre vznik veľkého počtu prírodných látok.

- **C₁**: predstavuje najjednoduchší stavebný blok, ktorý pozostáva z jedného uhlíkového atómu, zvyčajne vo forme metylovej skupiny. Najčastejšie býva zabudovaný na kyslíkový a dusíkový atóm, príležitostne na uhlík. Pochádza z S-metylu aminokyseliny L-metionín. Kofaktorom enzýmov, ktoré prenášajú -CH₃ fragment na substrát je S-adenozylmetionín (Schéma 3).
- **C₂**: ide dvojuhlíkovú stavebnú jednotku, pochádzajúcu z acetyl-CoA. Zvyčajne tvorí časti dlhých alkylových reťazcov alebo môže byť časťou aromatického systému (pozri napr. kyselina tetrahydrokanabinolová, Obr. 3). Pred jej inkorporáciou do substrátu býva v niektorých prípadoch najskôr modifikovaná na reaktívnejší malonyl-CoA (Schéma 13, kapitola *Konštrukčné mechanizmy*).

- **C₅**: vetvená izoprénová jednotka je znakom zlúčenín tvorených z kyseliny mevalónovej alebo 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu. Samotný mevalonát vzniká z troch molekúl acetyl-CoA, ale treba pripomenúť, že je využitých iba päť z jeho šiestich uhlíkov. Jeden je pri tvorbe zmienenej jednotky eliminovaný vo forme CO₂ (*Schéma 33, pozri Konštrukčné mechanizmy*). Alternatívny prekursor, 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát, podlieha skeletálnemu preusporiadaniu, aby vytvoril spomínanú C₅ jednotku (*Schéma 35, pozri Konštrukčné mechanizmy*). Len pre doplnenie. Konštrukcia C₅ fragmentu z deoxyxylulóza-5-fosfátu nie je doposiaľ kompletne biosynteticky objasnená.
- **C₆C₃**: označená ako fenypropylová jednotka, pochádza zo základného skeletu L-fenylalanínu alebo L-tyrozínu (*Schéma 29, pozri Konštrukčné mechanizmy*). Ide o dve aminokyseliny, ktoré sú biosyntetizované z kyseliny šikimovej (*Schémy 18-20, pozri Konštrukčné mechanizmy*). Vznik uvedeného stavebného bloku si vyžaduje odstránenie aminoskupiny. Trojuhlíkový bočný reťazec býva nasýtený alebo nenasýtený a v niektorých prípadoch môže byť fragmentovaný odstránením jedného alebo dvoch uhlíkových atómov. Potom skupiny označené ako C₆C₂ a C₆C₁ predstavujú modifikované skrátene verzie C₆C₃ systému (príklady ich vzniku, pozri *Schémy 26 a 30, kapitola Konštrukčné mechanizmy*).
- **C₆C₂N**: stavebný blok je tvorený buď z L-fenylalanínu alebo L-tyrozínu. Pri tvorbe uvedenej jednotky je karboxylová funkčná skupina odstránená procesom dekarboxylácie (*Schéma 16, pozri Konštrukčné mechanizmy*).
- **Indol.C₂N**: uvedený stavebný blok vzniká z aminokyseliny L-tryptofán procesom dekarboxylácie (*Schéma 16*). L-Tryptofán, ako esenciálna aromatická aminokyselina pre živočíchov, vrátane človeka, je tvorená z kyseliny šikimovej (*Schémy 18, 21-23, pozri Konštrukčné mechanizmy*).
- **C₄N**: je obvykle nájdený v prírodných látkach ako heterocyklický pyrolidínový systém a je generovaný z neproteinogénnej aminokyseliny L-ornitínu (jej pôvod je v Krebsovom cykle, *Schéma 1*). Na rozdiel od C₆C₂N a indol.C₂N stavebných blokov, pre vznik cyklickej štruktúry neposkytuje ornitín dusík z α-aminoskupiny, ale z pozície δ. Karboxylová a α-aminoskupina sú z molekuly odstránené (*Schéma 41, pozri Konštrukčné mechanizmy*).

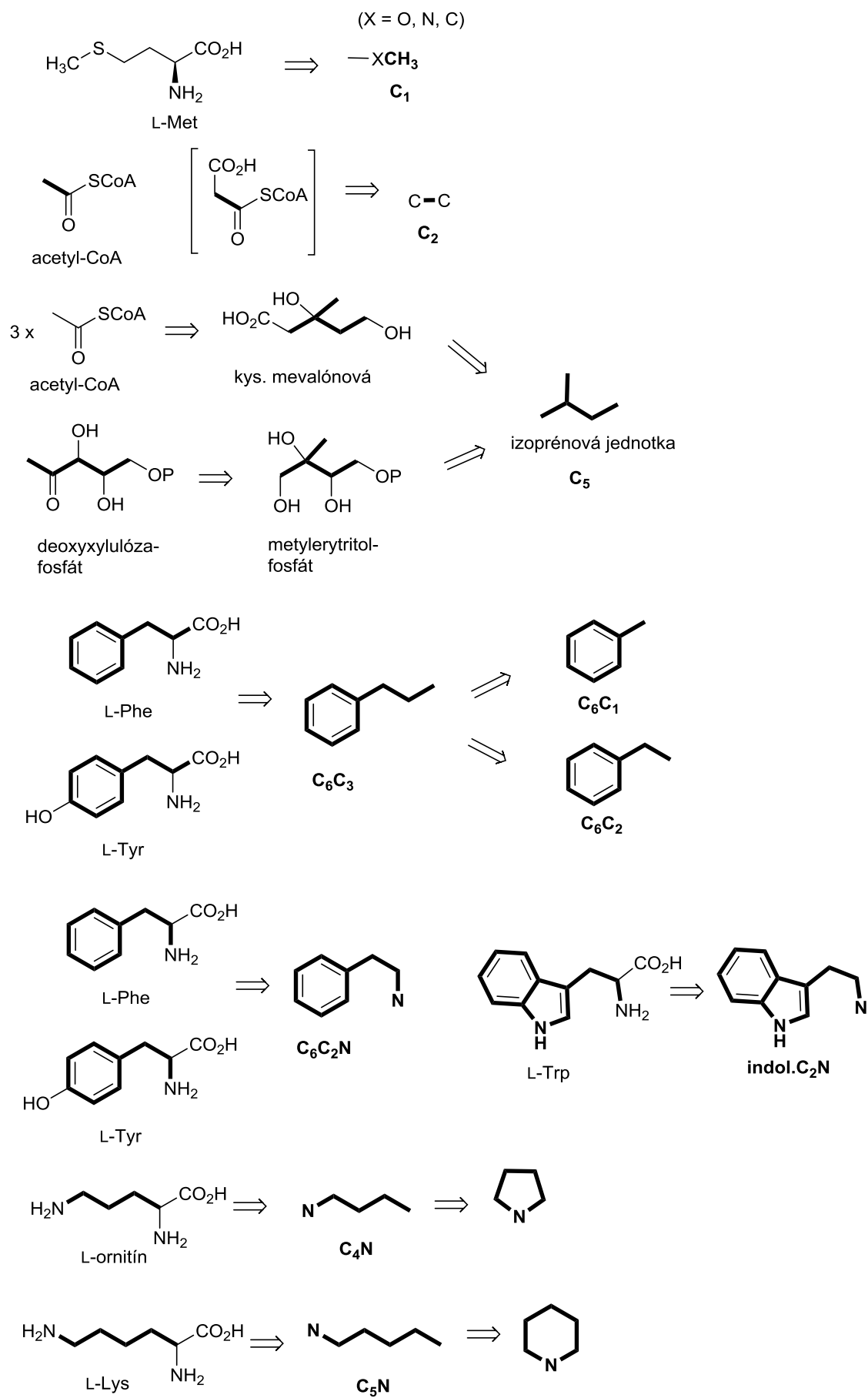
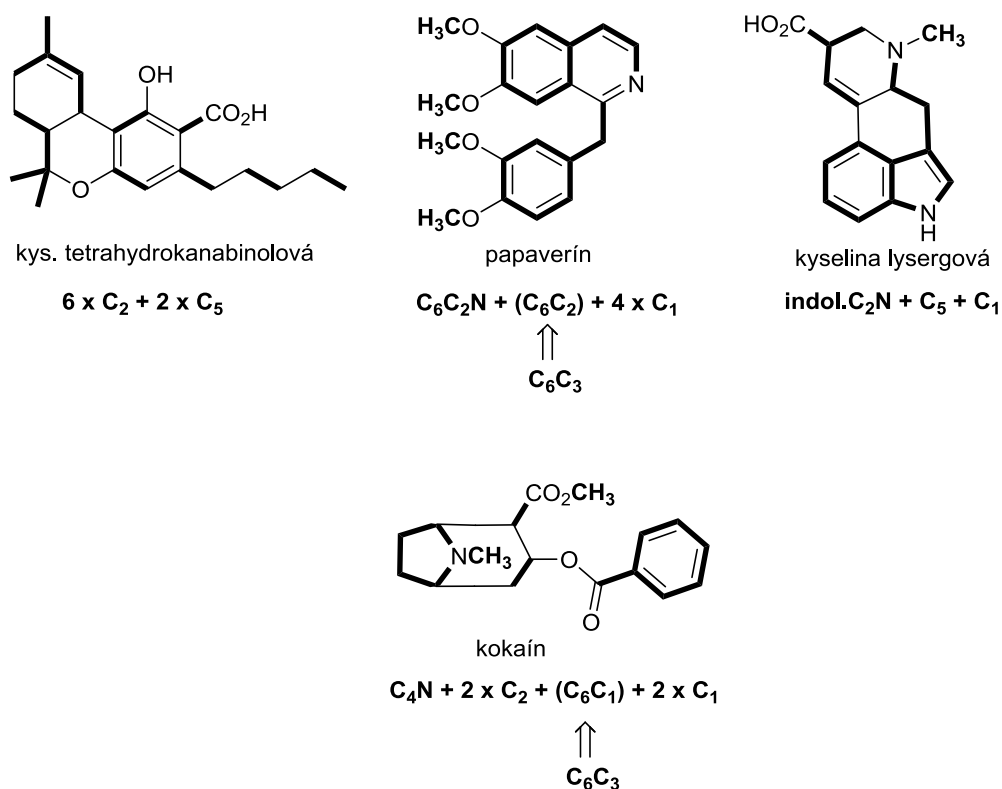


Schéma 2. Príklady stavebných blokov.¹

- **C₅N**: uvedená jednotka je tvorená rovnakým prístupom ako **C₄N**, pričom ako východiskový substrát slúži aminokyselina L-lyzín (jej pôvod je v KC, *Schéma 1*). Dusík ε-aminoskupiny je zachovaný a uvedený blok existuje v prírodných látkach vo forme piperidínového skeletu (*Schéma 42*, pozri *Konštrukčné mechanizmy*).

Na *Obrázku 3* je názorne ilustrované, ako sú cieľové sekundárne metabolity vybudované zo spomínaných stavebných jednotiek.



Obrázok 3. Príklady využitia stavebných blokov pri konštrukcii prírodných látok.¹

3. Konštrukčné mechanizmy

V uvedenej kapitole postupne preberieme vznik a aplikáciu stavebných blokov a pri uvedených transformáciách rozoberieme aj niektoré z používaných konštrukčných mechanizmov.

Prírodné látky sú biosyntetizované sekvenciou reakcií, ktoré sú, s malými výnimkami, katalyzované enzýmami a je ich vo všeobecnosti možné vysvetliť prostredníctvom

základných princípov a mechanizmov organických reakcií. Enzýmy majú schopnosť ovplyvniť tieto procesy efektívnejšie a rýchlejšie ako ich chemické analógy a prebiehajú tiež za oveľa miernejších podmienok. V prípade kreovania jedného, prípadne viacerých stereogénnych centier, tie vznikajú s vysokým stupňom enantio- a diastereoselektivity.

3.1. Alkylačné reakcie: nukleofilná substitúcia

Stavebný blok **C₁** pochádza z L-metionínu a je do substrátov inkorporovaný substitučnou nukleofilnou reakciou. V prírode, transformácia L-metionínu na S-adenozylmetionín (SAM) (Schéma 3) kreuje kladne nabitú síru, čím je generovaná ľahko odstupujúca skupina, čo uľahčuje priebeh S_N2 substitúcie.

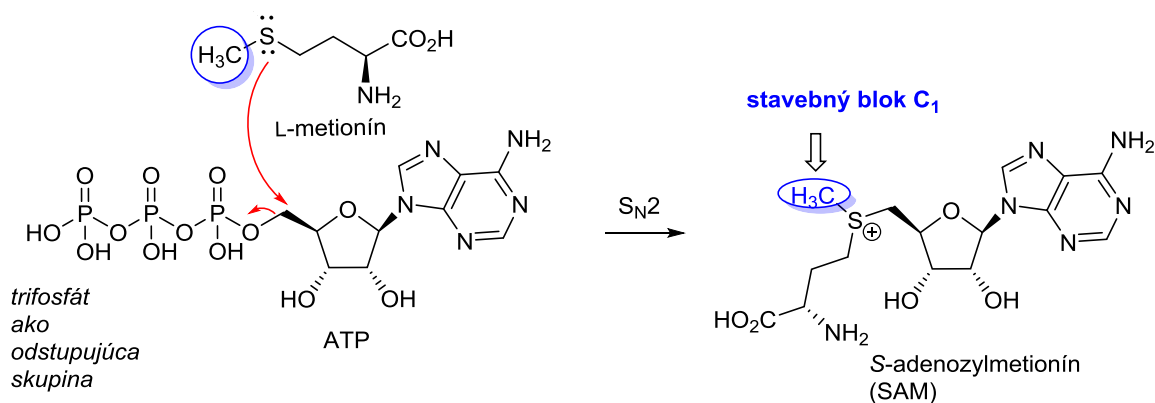


Schéma 3: Tvorba SAM ako zdroja stavebného bloku **C₁**.

Vhodnými nukleofilmi pre inkorporáciu uvedeného stavebného bloku **C₁** sú hydroxy a aminoskupiny, čím teda vznikajú zodpovedajúce O-metyl alebo N-metylsubstráty (Schéma 4), ktoré môžeme nájsť v prírodných látkach ako napríklad morfín, papaverín, kokaín a mnohé ďalšie (Obr. 4).

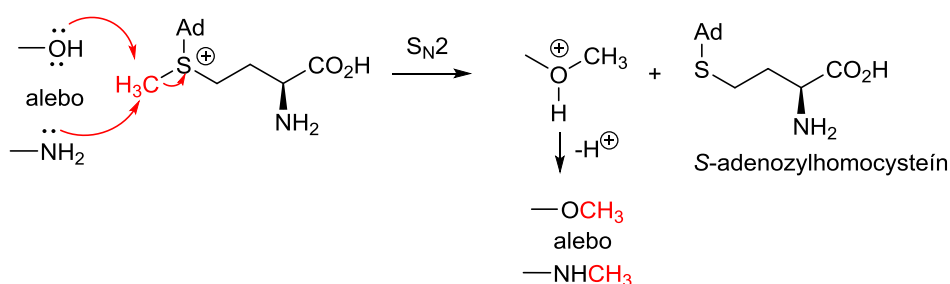
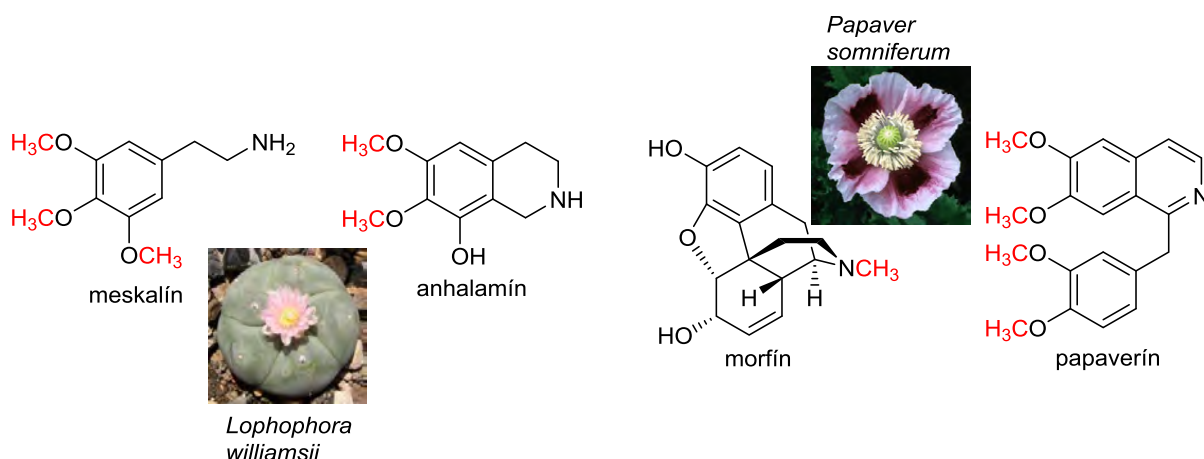


Schéma 4. O- a N-Alkylácie pomocou SAM.



Obrázok 4. Príklady sekundárnych metabolitov obsahujúcich stavebný blok C₁.

Krátka poznámka k uvedenej transformácii. Rovnakým princípom sú napríklad v ľudskom organizme biosyntetizované alebo metabolizované endogénne substráty (napríklad produkcia adrenalínu z noradrenalínu (Schéma 5) alebo metabolizmus dopamínu (Schéma 6)). Rovnako tak niektoré xenobiotiká (cudzorodé látky), ktoré vstúpia do organizmu a disponujú nukleofilným dusíkom, kyslíkom alebo aj sírou, môžu podliehať biotransformačným reakciám, ktoré sú označované aj ako konjugačné reakcie alebo reakcie fázy II a jednou z takýchto reakcií je aj metylácia, pri ktorej enzýmy inkorporujúce –CH₃ skupinu do molekuly využívajú ako kofaktor zmieneny SAM.

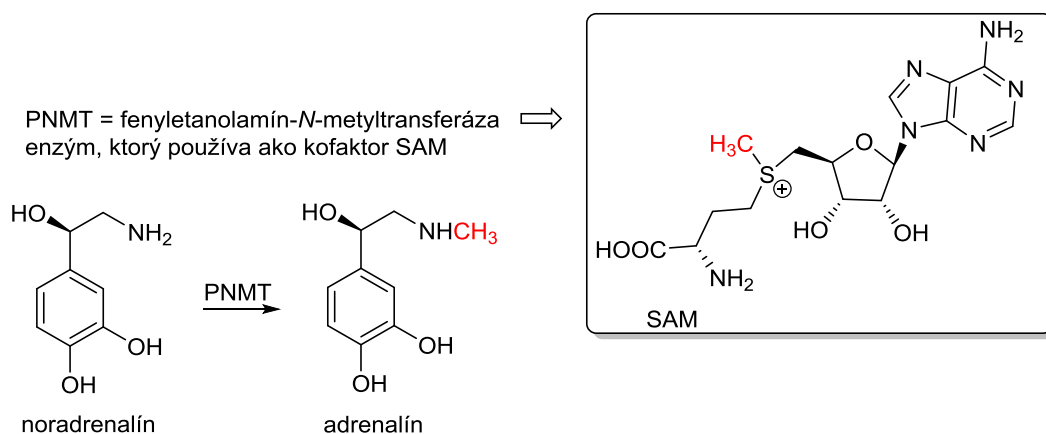


Schéma 5. Biosyntéza adreanalínu z noradrenalínu využívajúca stavebný blok C₁.

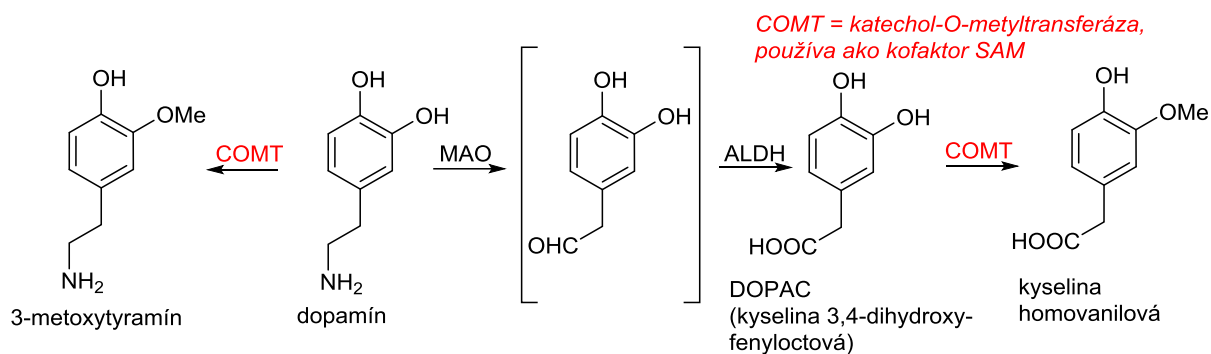


Schéma 6. Metabolizmus dopamínu cez enzým katechol-*O*-metyltransferáza (COMT).

Inkorporovanie stavebného bloku **C₁** na uhlíkový atóm vyžaduje prítomnosť uhlíka s parciálnym záporným nábojom. Polohy *ortho*- alebo *para*- voči –OH skupine na aromatickom jadre (napríklad v prípade fenolu) alebo pozície medzi dvomi karbonylovými skupinami (štruktúra cyklohexán-1,3-diónu) sú vhodnými kandidátmi pre C-metyláciu (Schéma 7).

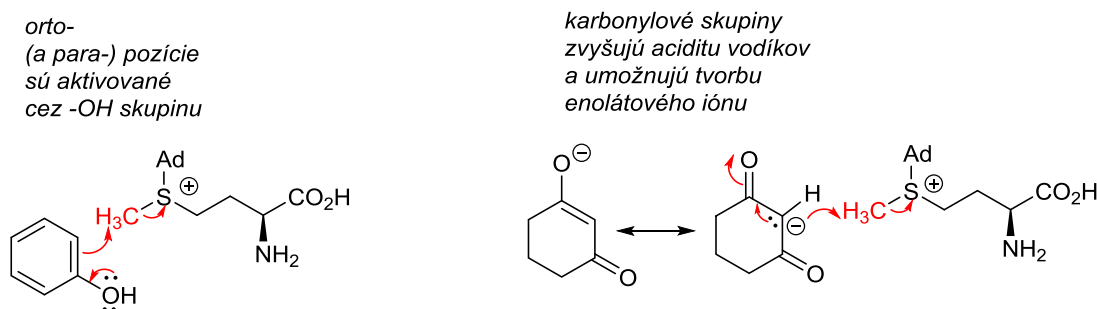


Schéma 7. C-Alkylácia pomocou SAM.

Alkylačným činidlom môže byť aj izoprénová stavebná jednotka **C₅** v podobe **dimetylalylidifosfátu (DMAPP, Schéma 8)**, pretože difosfátová skupina predstavuje dobre odstupujúcu skupinu (uplatní sa mechanizmus S_N2). V niektorých prípadoch bolo potvrdené, že pri DMAPP sa môže uplatniť aj S_N1 mechanizmus za tvorby rezonančne stabilizovaného allylového karbkatiónu.

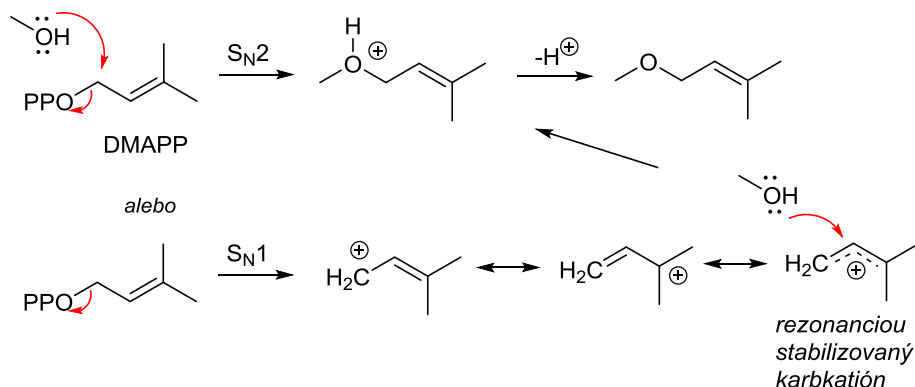
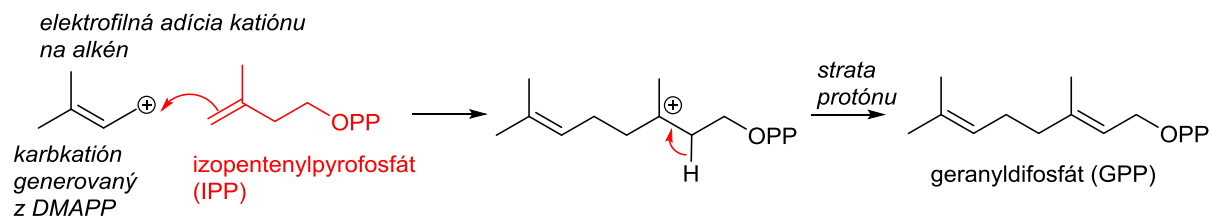


Schéma 8. O-Alkylácia prostredníctvom DMAPP.

3.2. Alkylačné reakcie: elektrofilná adícia

Ako už bolo vyššie zmienené, izoprénový stavebný blok C_5 (DMAPP, Schéma 8) môže, vzhľadom na svoje charakteristické štruktúrne prvky, vystupovať aj ako alkylačné činidlo. Pri biosyntéze terpenoidov a steroidov dve alebo viacero C_5 jednotiek je navzájom spájaných, pričom uvedené reakcie možno z hľadiska reakčného mechanizmu postulovať ako elektrofilnú adíciu karbkatiónu generovaného z DMAPP na násobnú väzbu druhej izomérskej C_5 jednotky označovanej ako **izopentenyldifosfát (IPP)**. Výsledný karbkatiónový intermediát je potom stabilizovaný stratou protónu za kreovania elektroneutrálneho geranyldifosfátu alebo geranylpyrofosfátu (GPP), ktorý predstavuje základný templát pre tvorbu monoterpénov (C_{10}). Podrobnejší komentár týkajúci sa konštrukcie syntónu C_5 a jeho aplikácií pri produkcii terpénov bude diskutovaný neskôr (*vide infra*). Okrem intermolekulovej adície je samozrejme možný aj intramolekulový variant ako *cornerstone* pre tvorbu cyklických štruktúr terpénov (Schéma 9).

(a) intermolekulová adícia



(b) intramolekulová adícia: cyklizácia

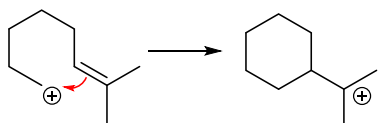


Schéma 9. Alkylačné reakcie prebiehajúce mechanizmom elektrofilnej adície.

Na tomto mieste je potrebné uviesť, že iniciačný karbkatión môže byť generovaný cez viacero mechanizmov ako sú napríklad: (a) strata odstupujúcej skupiny (S_N1 reakcia), (b) protonizácia alkénu, (c) protonizácia epoxidu a jeho následné otvorenie, (d) metylácia alkénu pomocou SAM (Schéma 10).

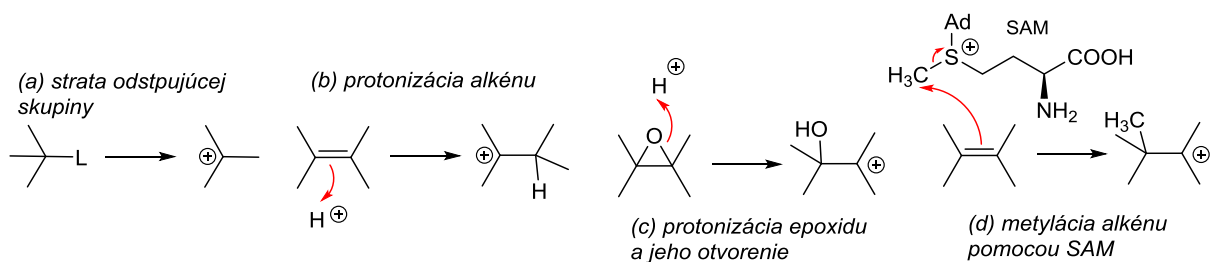


Schéma 10. Možnosti generovania karbkatiónov.

3.3. Aldolová a Claisenova reakcia ako jeden z konštrukčných mechanizmov

Kľúčovým atribútom aldovej a Claisenovej reakcie je kreovanie novej väzby uhlík-uhlík. Ide o bázicky katalyzované transformácie, závisiace na generovaní rezonančne stabilizovaných enolátových iónov z vhodných karbonylových systémov. Či bude tvorený aldolový alebo Claisenový typ produktu, to závisí na povahe skupiny X a jej potenciáli ako odstupujúcej skupiny (Schéma 11). Teda z pohľadu organickej syntézy, dve molekuly acetaldehydu poskytujú aldol, zatiaľ čo dve molekuly etyl-acetátu môžu produkovať etyl-acetoacetát. Oba tieto procesy sú vitálne dôležité v biosyntéze primárnych aj sekundárnych metabolitov.

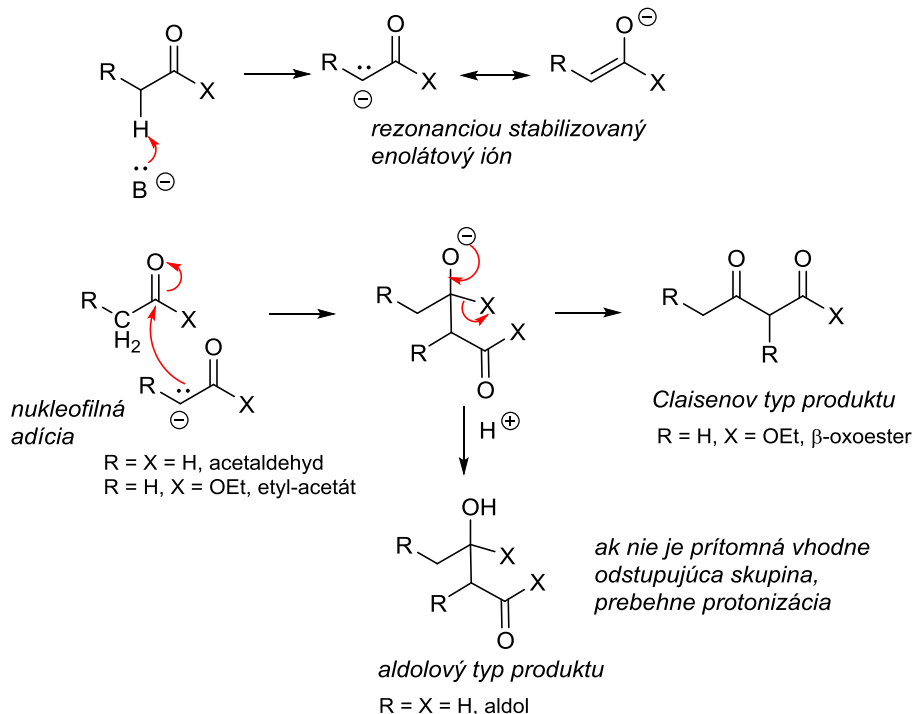
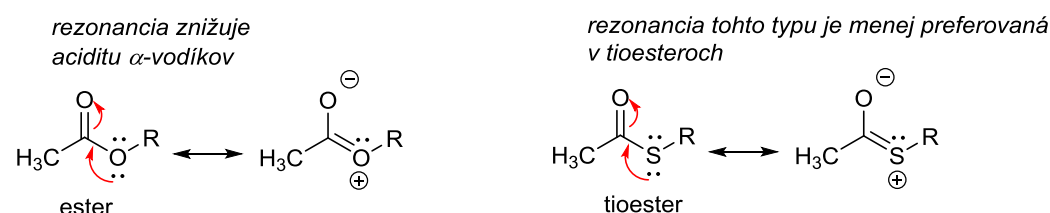
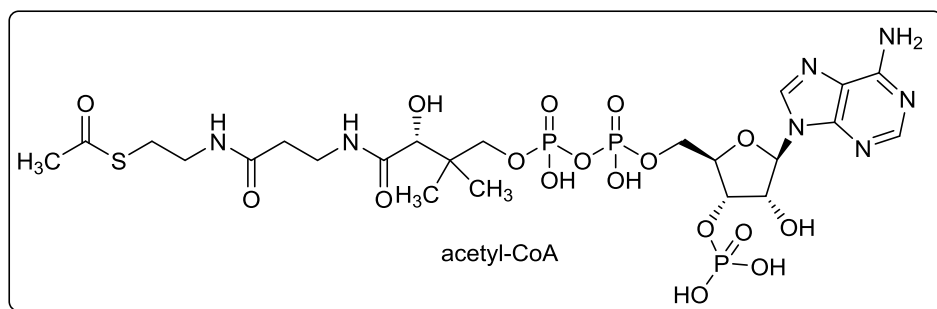


Schéma 11. Aldolová a Claisenova reakcia.

Vo väčšine prípadov využívajú biologické reakcie acetyl-CoA (Obr. 5). Ide o tioester, ktorý má výhody v porovnaní s klasickými „kyslíkovými“ esterami ako je napríklad etyl-acetát v tom, že prítomné α -vodíky sú kyslejšie, čo je spôsobené nižšou schopnosťou delokalizácie elektrónov (menej preferovaná rezonancia). Okrem toho, tioester disponuje ľahšie odstupujúcou skupinou (SR) (Obr. 5). Kombinácia týchto dvoch zmiených efektov zvyšuje reaktivitu tioesterov a preferuje tieto štruktúry pre aldolový aj Claisenov typ reakcie.



Obrázok 5. Porovnanie reaktivít dvoch foriem esterov.

Ďalej treba zmieniť, že nielen klasické ale aj reverzné formy aldolovej a Claisenovej reakcie sú zakomponované do procesu modifikácie prírodných látok. Reverzný Claisen je prominentnou črtou β -oxidácie mastných kyselín, počas ktorej C_2 jednotka vo forme acetyl-CoA je eliminovaná z príslušného reťazca (Schéma 12). V ďalšom texte budú uvedené aj iné príklady takýchto reverzných reakcií.

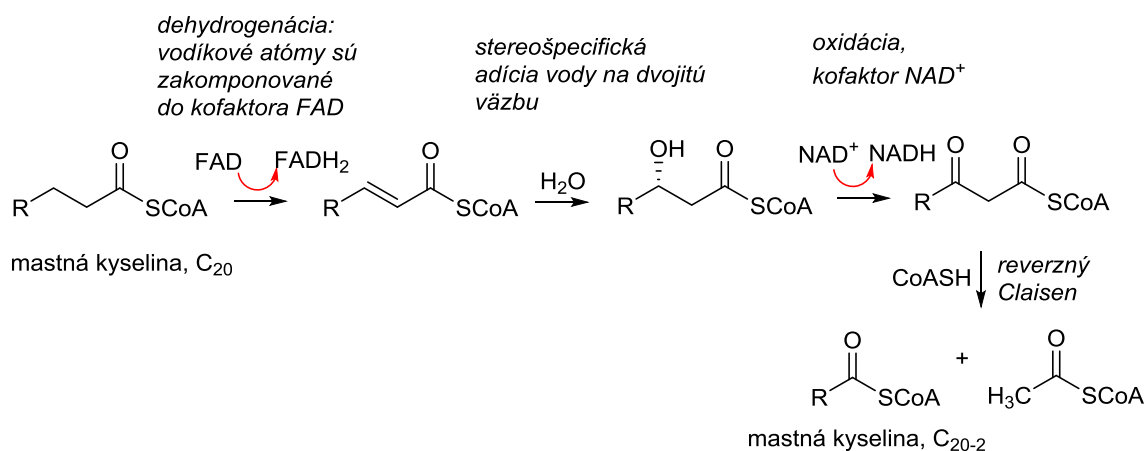


Schéma 12. β -Oxidácia mastných kyselín.

3.3.1. Tvorba a aplikácie malonyl-CoA.

Stavebná jednotka C_2 pochádza z acetyl-CoA, ktorý je generovaný z pyruvátu procesom oxidačnej dekarboxylácie (pozri, *Schéma 15*). Ako už bolo povedané pri jej charakterizácii (pozri, kapitola 2, *Stavebné bloky*), pred inkorporáciou C_2 do substrátu býva v niektorých prípadoch najskôr modifikovaná na reaktívnejší malonyl-CoA (*Schéma 13*).

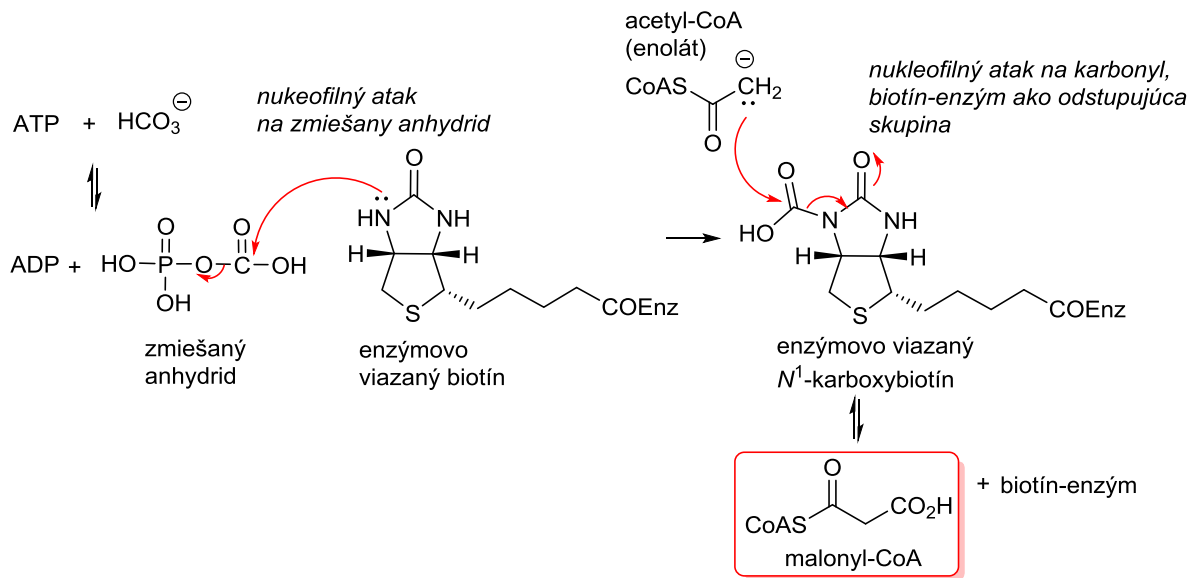
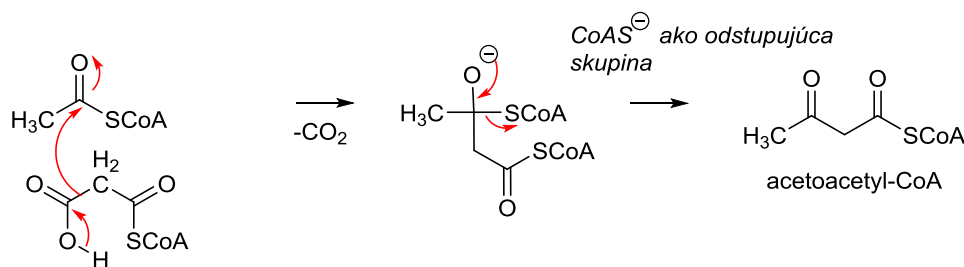


Schéma 13. Biosyntéza malonyl-CoA.

Claisenove reakcie, zahŕňajúce acetyl-CoA, sú realizované ešte efektívnejšie, ak najskôr prebehne už vyššie zmienená modifikácia acetyl-CoA na malonyl-CoA, ktorá je realizovaná karboxylačnou reakciou s CO_2 , použijúc ATP a kofaktor biotín. ATP a CO_2 (vo forme HCO_3^-) vytvárajú zmiešaný anhydrid (*Schéma 13*), ktorý karboxyluje kofaktor biotín, zabudovaný v príslušnom komplexe biotín-enzým. Štandardne sa biotín využíva na prenos karboxylovej funkčnej skupiny vo forme CO_2 z jedného substrátu do druhého. Výsledkom premeny acetyl-CoA na malonyl-CoA je skutočnosť, že ku α -vodíkom sú teraz z oboch strán pripojené dve elektrón-akceptorné funkcionality, čo zvyšuje ich aciditu a dáva možnosť tvorby vhodného nukleofilu pre Claisenovu transformáciu.



*nukleofilný atak na karbonyl
spojený so simultánnou
elimináciou CO₂.*

Schéma 14. Tvorba acetoacetyl-CoA s využitím malonyl-CoA.

Pri uvažovanej Claisenovej reakcii (*Schéma 14*), karboxylová funkcionálna inkorporovaná do malonyl-CoA je simultánne odstránená procesom dekarboxylácie, ktorý poskytuje príslušný enolátový ión bez toho, aby bola požadovaná prítomnosť silnej bázy. Produktom, tvoreným z acetyl-CoA ako elektrofilu a malonyl-CoA ako nukleofilu je príslušný acetoacetyl-CoA. Úloha karboxylačného kroku je jasne definovaná: karboxyl aktivuje α -uhlík, čo uľahčuje Claisenovu reakciu a je z molekuly okamžite eliminovaný, aby mohla byť uvedená transformácia finalizovaná.

3.4. Dekarboxylačné reakcie

Mnohé cesty vedúce k prírodným látkam zahŕňajú reakčné kroky, ktoré vyžadujú odstránenie jedného uhlíkového atómu. Táto požiadavka je uskutočňovaná procesom **dekarboxylácie**, ktorá je osobitou črtou biosyntetického využitia aminokyselín, čoho dôkazom je aj tvorba dvoch dôležitých stavebných blokov **C₆C₂N** a **indol.C₂N**, ktoré sú odvodené z aminokyselín, využívajúc práve elimináciu CO₂. O uvedenom type reakcií budeme hovoriť pri generovaní zmiených stavených blokov (*vide infra*, *Schéma 16*).

3.4.1. Dekarboxylácia α -oxokyselín

3.4.1.1. Biosyntéza acetyl-CoA

Dekarboxylácia α -oxokyselín je charakteristickým rysom primárneho metabolizmu, zahŕňajúcim napríklad transformáciu kyseliny pyrohroznovej na acetaldehyd alebo celkovú premenu kyseliny pyrohroznovej na acetyl-CoA (oxidačná dekarboxylácia, *Schéma 15*) pred jeho vstupom do Krebsovho cyklu. Obe vyššie zmienené transformácie závisia na

tiamíndifosfáte, resp. tiamínpyrofosfáte (TPP). Ide o koenzým obsahujúci tiazolové jadro, ktoré disponuje kyslým vodíkovým atómom, čo umožňuje tvorbu karbaniónu. Ten potom vystupuje ako nukleofil voči karbonylovej skupine, prítomnej v kyseline pyrohroznovej. Dekarboxyláciou je tvorený príslušný énamín, ktorý v oxidačnom kroku reaguje s druhým, enzýmovo viazaným kofaktorom, kyselinou lipoovou (*Schéma 15*), pričom dochádza k štiepeniu väzby S-S a vzniku redukovaného fragmentu kyseliny lipoovej. Následnou fragmentáciou (reverzný typ aldolovej reakcie) sa regeneruje TPP a acetyl zostáva viazaný na kyseline dihydrolipoovej. Jeho reakciou s CoA-SH dochádza k prenosu acetylu na príslušný koenzým A za vzniku požadovaného acetyl-CoA. Uvoľnená kyselina dihydrolipoová je následne transformovaná procesom oxidácie na kyselinu lipoovú (*Schéma 15*).

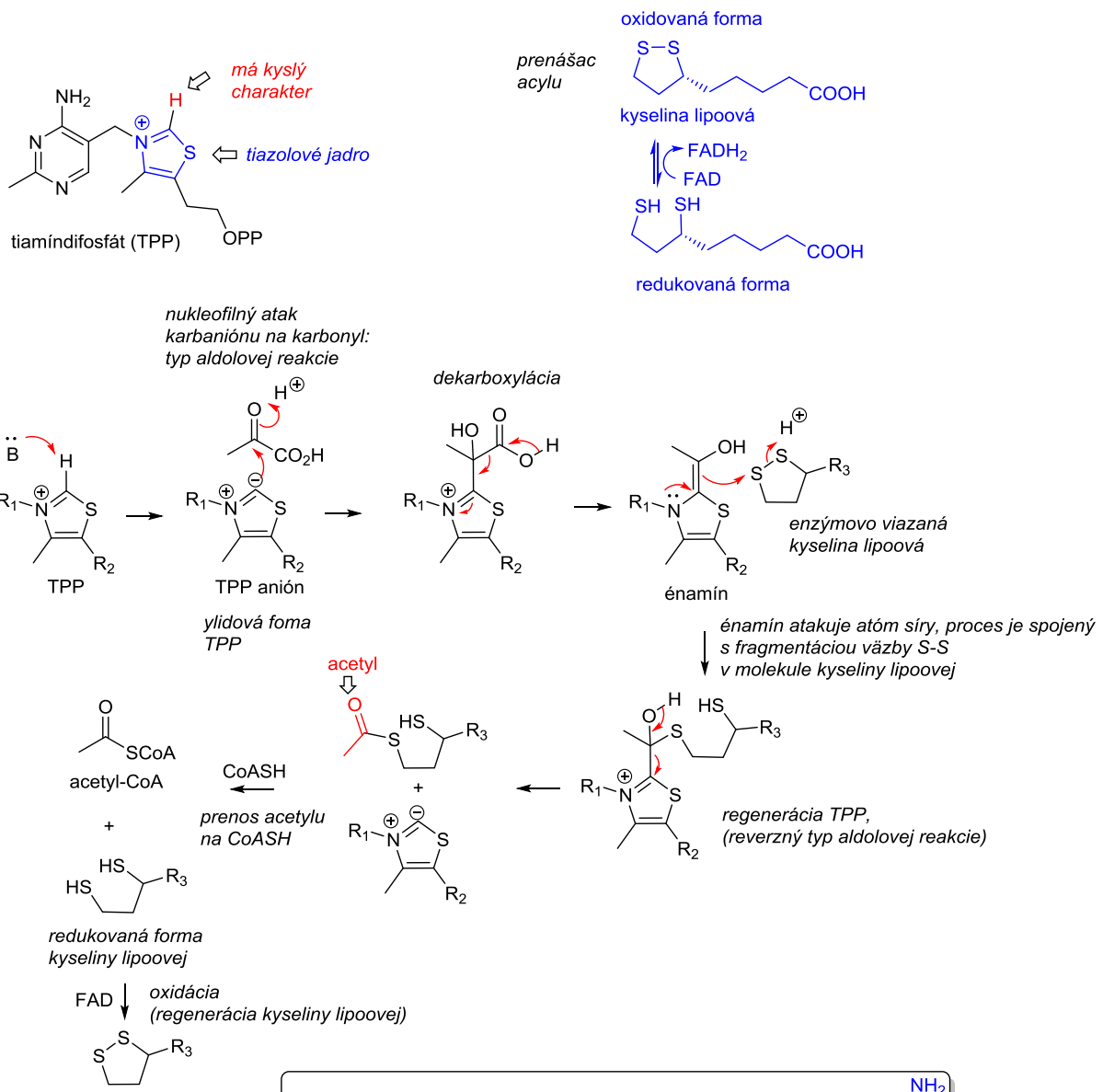


Schéma 15. Biosyntéza acetyl-CoA cez oxidačnú dekarboxyláciu kyseliny pyrohroznovej.

3.4.2. Dekarboxylácia α -aminokyselín

3.4.2.1. Tvorba stavebných blokov C₆C₂N a indol.C₂N

Tvorba stavebných blokov C_6C_2N a $indol.C_2N$ je spojená s elimináciou uhlíka vo forme CO_2 , teda dekarboxyláciou (Schéma 16). Enzymy, katalyzujúce uvedený proces, vyžadujú ako kofaktor pyridoxal-5'-fosfát (PLP). Reakcia začína tvorbou Schiffovej bázy, ktorá vzniká ako dôsledok reakcie medzi aminoskupinou príslušnej α -aminokyseliny a aldehydovou funkcionalitou kofaktora. Po dekarboxylácii a protonizácii pôvodného α -uhlíka je amín, reprezentujúci stavebný blok, uvoľnený z koenzýmu hydrolýzou príslušného imínu, mechanizmus ktorej je prezentovaný v kapitole 3.5., v Schéme 25.

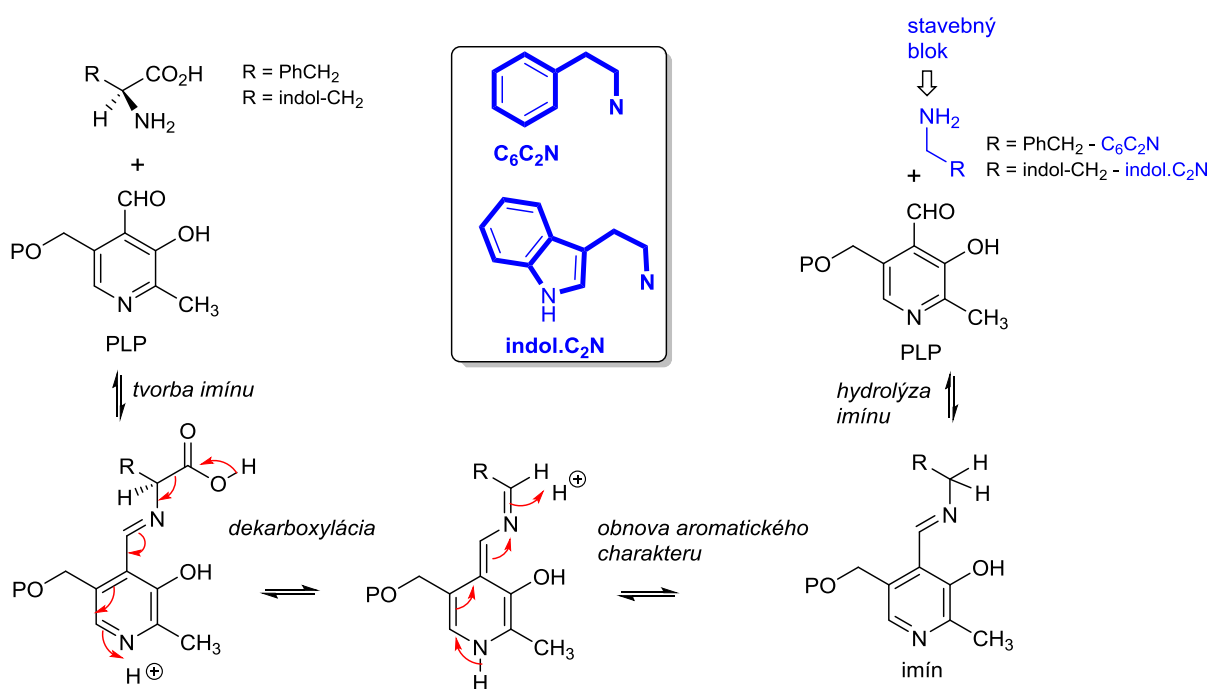


Schéma 16. Dekarboxylácia α -aminokyselín. Biosyntéza stavebných jednotiek C_6C_2N a $indol.C_2N$.

3.4.2.1.1. Biosyntéza kyseliny šikimovej – východisková molekula pre prípravu L-fenylalanínu, L-tyrozínu a L-tryptofánu

L-Fenylalanín, L-tyrozín, L-tryptofán sú prírodou využívané pre tvorbu stavebných blokov obsahujúcich aromatické jadro. Pre človeka a živočíchov sú napríklad L-fenylalanín a L-tryptofán esenciálnymi aminokyselinami, ktoré dokážu syntetizovať iba rastliny a niektoré mikroorganizmy. Preto v tejto kapitole zmienime ich konštrukciu. Východiskovou látkou pre ich biosyntézu je **kyselina šikimová**, ktorej príprava začína medzimolekulovou aldolovou reakciou medzi fosfoenolpyruvátom (pochádza z glykolýzy) a D-erytróza-4-fosfátom, ktorý je medziproduktom pentózového cyklu (Schéma 17). Formálnou elimináciou kyseliny fosforečnej z aldolizačného produktu a následnou intramolekulovou aldolovou reakciou

vzniká kyselina 3-dehydrochinová. V skutočnosti proces zahŕňa oxidáciu hydroxyly susediaceho s eliminovaným protónom, čo vyžaduje prítomnosť kofaktora NAD^+ . Karbonylová skupina je následne redukovaná späť na príslušný alkohol. Dehydratácia kyselina 3-dehydrochinovej poskytuje najskôr kyselinu 3-dehydrošikimovú, z ktorej redukciou karbonylu je potom generovaná samotná kyselina šikimová. Na to, aby z nej mohli byť syntetizované vyššie uvedené aromatické aminokyseliny ako L-fenylalanín, L-tyrozín a L-tryptofán, musí byť ďalej modifikovaná cestami, ktoré sú prezentované v *Schémach 18, 19* a *20*.

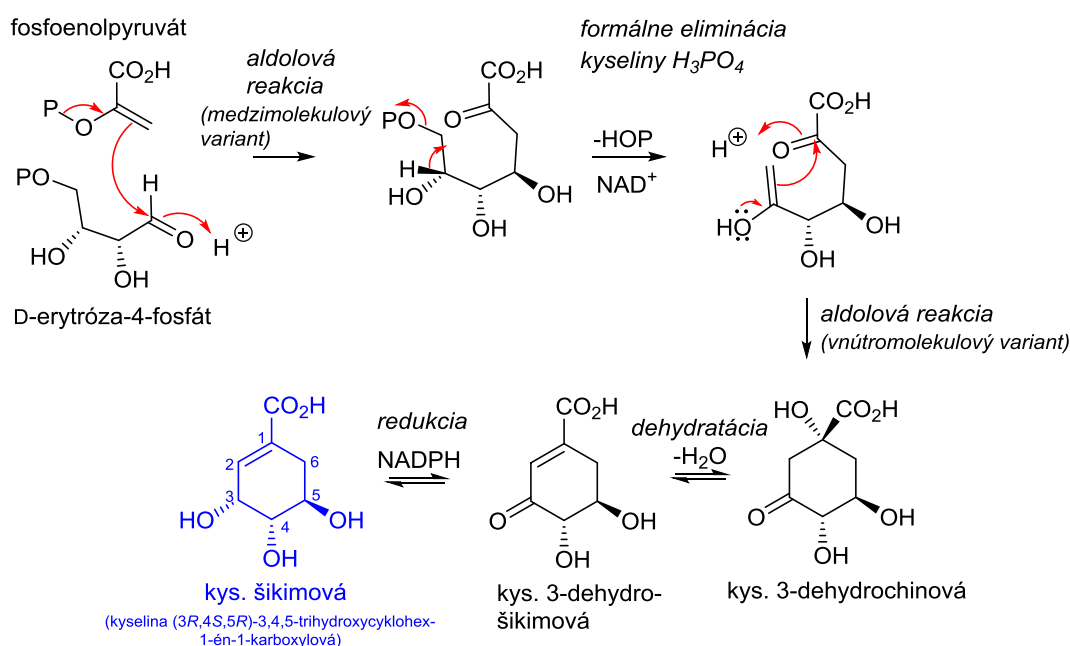


Schéma 17. Biosyntéza kyseliny šikimovej.

3.4.2.1.2. Biosyntéza L-fenylalanínu a L-tyrozínu

Biosyntéza L-fenylalanínu a L-tyrozínu pozostáva z nasledovných dielčích krokov:

1. Transformácia kyseliny šikimovej na kyselinu chorizmovú

Syntéza začína selektívnou ATP-dependentnou fosforyláciou sekundárneho hydroxyly na uhlíku C-3, po ktorej nasleduje adícia $-\text{OH}$ skupiny v pozícii C-5 na fosfoenolpyruvát, spojená s 1,2-elimináciou kyseliny fosforečnej. Obe zmienené transformácie sú katalyzované spoločným enzýmom (EPSP-syntetáza) a výsledným produktom je fosforylovaná kyselina enolpyruvylšikimová. Jej modifikácia na kyselinu chorizmovú potom zahŕňa 1,4-elimináciu kyseliny fosforečnej (Schéma 18).

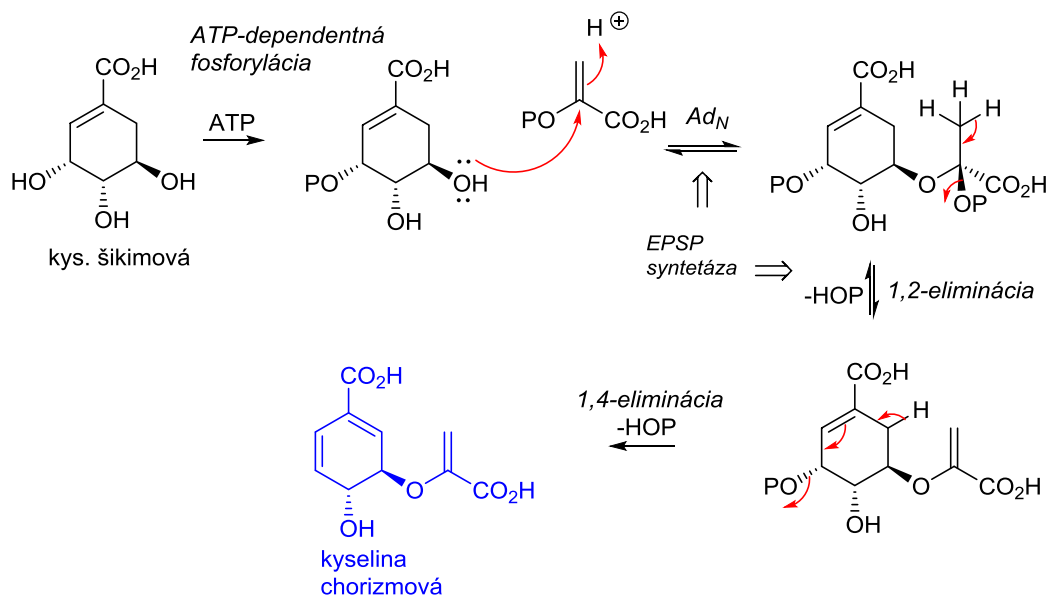


Schéma 18. Biosyntéza kyseliny chorizmovej.

2. Modifikácia kyseliny chorizmovej na kyselinu prefénovú

Uvedená transformácia vyžaduje syntetickú operáciu, ktorou je [3,3]-sigmatropný Claisenov prešmyk, ktorý je realizovaný cez stoličkový tranzitný stav (Schéma 19). Enzým katalyzujúci tento proces (chorizmátmutáza) sa viaže na pseudoaxiálny konformér kyseliny chorizmovej a prebieha s kompletným 1,3-prenosom chiralít. Len pre zaujímavosť, je to doposiaľ iba jediný identifikovaný príklad využitia takýchto prešmykov v biosyntéze prírodných látok.

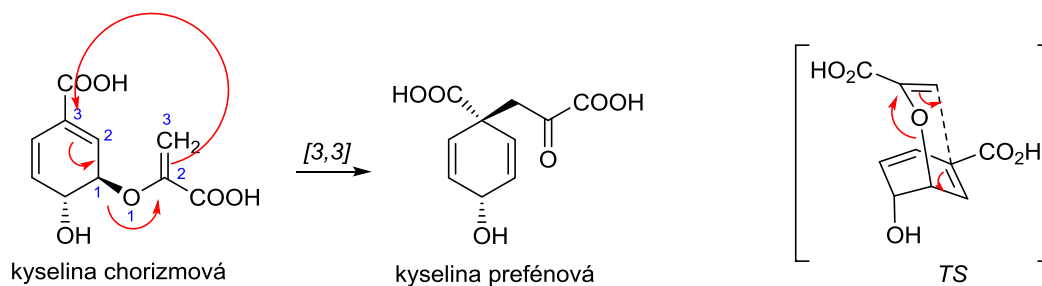
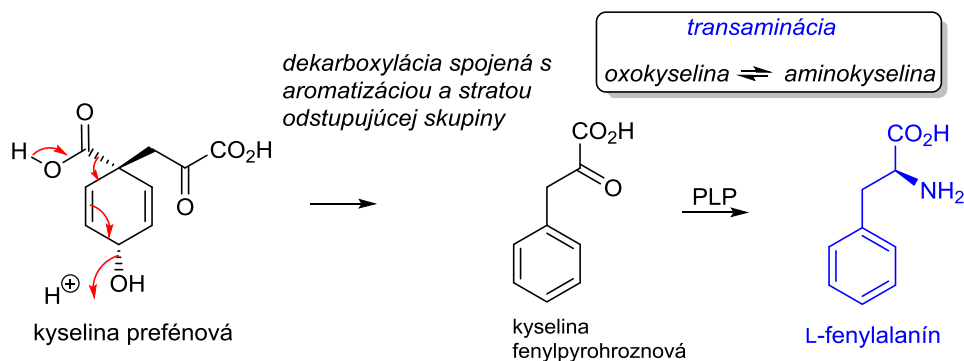


Schéma 19. Biosyntéza kyseliny prefénovej.

3. Transformácia kyseliny prefénovej na L-fenylalanín a L-tyrozín.

Biosyntéza L-fenylalanínu z kyseliny prefénovej involvuje (i) dekarboxylačnú aromatizáciu a (ii) transamináciu (transaminácia patrí medzi konštrukčné mechanizmy, ktoré sú zahrnuté v biosyntéze primárnych aj sekundárnych metabolitov a bude diskutovaná neskôr). V prípade konštrukcie L-tyrozínu je potrebná ešte oxidácia (Schéma 20).

V prítomnosti NAD^+ -dependentnej dehydrogenázy, dekarboxylačná aromatizácia je realizovaná so zachovaním hydroxylovej skupiny (konštrukcia L-tyrozínu). U mikroorganizmov a rastlín, aminokyseliny L-fenylalanín a L-tyrozín vznikajú separátne, tak ako je naznačené v uvedenej schéme. U živočíchov, vrátane cicavcov a človeka, u ktorých neprebíha šikimátová cesta, je L-tyrozín biosyntetizovaný hydroxyláciou esenciálneho L-fenylalanínu (pozri, Obr. 2).



v prítomnosti NAD^+ dependentnej dehydrogenázy, dekarboxylácia a aromatizácia prebiehajú so zachovaním hydroxylovej skupiny

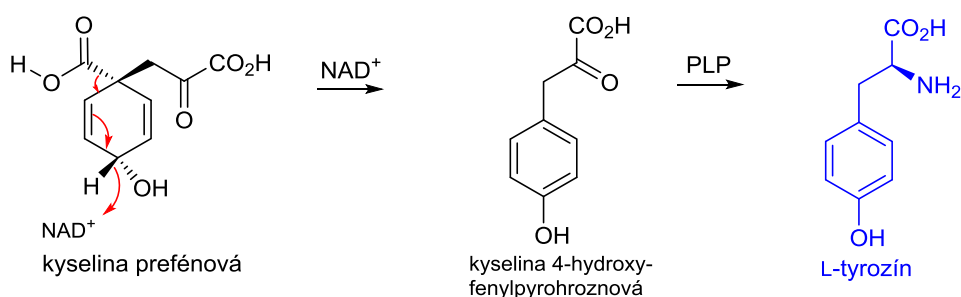


Schéma 20. Biosyntéza L-fenylalanínu a L-tyrozínu.

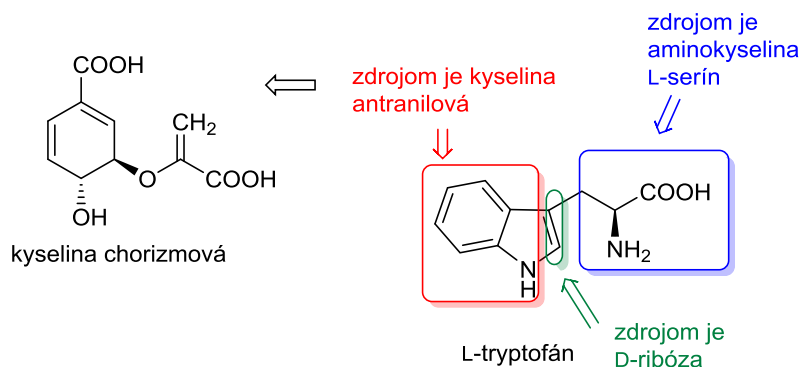
3.4.2.1.3. Bisoyntéza L-tryptofánu

Ako už bolo vyššie uvedené, L-tryptofán je východiskovým substrátom pre konštrukciu stavebného bloku **indol.C₂N**. Vzhľadom k tomu, že predstavuje základný fragment pre konštrukciu veľkej skupiny indolových alkaloidov, na tomto mieste je dôležité uviesť jeho biosyntézu, ktorá využíva už zmienenú kyselinu chorizmovú, resp. jej medziprodukt, kyselinu šikimovú (Schéma 18).

Samotná syntéza L-tryptofánu zahŕňa dva kľúčové procesy (Obr. 6):

(i) Biosyntézu kyseliny antranilovej z kyseliny chorizmovej

(ii) Modifikáciu kyseliny antranilovej na L-tryptofán



Obrázok 6. Schematické znázornenie biosyntézy L-tryptofánu.

(i) Biosyntéza kyseliny antranilovej

Uvedená transformácia zahŕňa izomerizáciu, ktorá prebieha cez S_N2' typ reakcie, kde prístupný amoniak nukleofilne atakuje diénový systém na uhlíku C-2 a substituuje príslušnú hydroxylovú skupinu za vzniku kyseliny 2-amino-2-deoxyizochorizmovej. Následná eliminácia kyseliny pyrohroznovej produkuje požadovanú kyselinu antranilovú. Potrebný amoniak je získaný hydrolýzou L-glutamínu (Schéma 21).

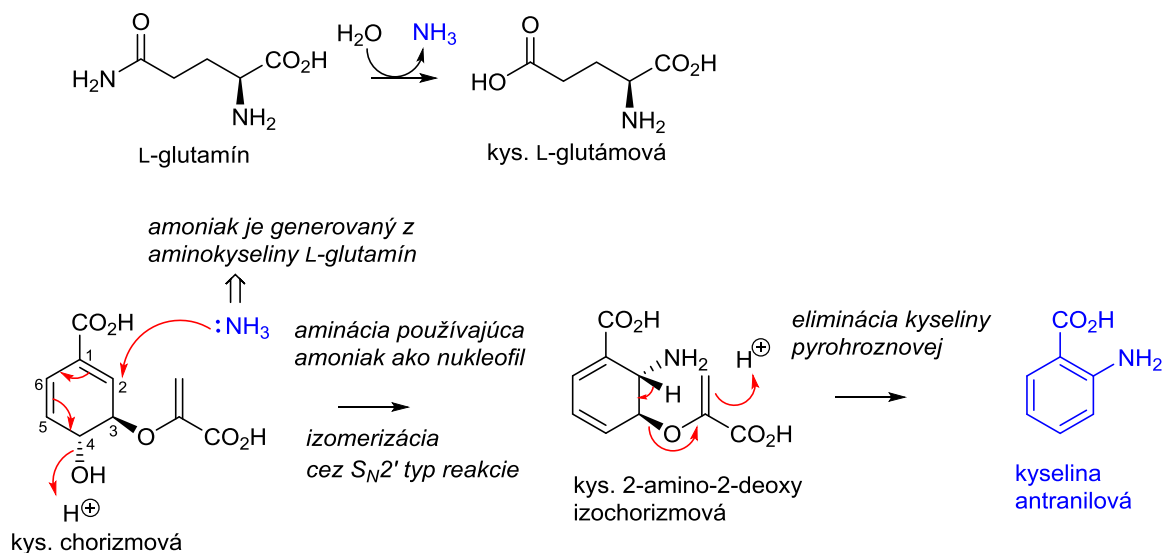


Schéma 21. Biosyntéza kyseliny antranilovej.

(ii) Modifikácia kyseliny antranilovej na L-tryptofán

Samotné indolové jadro (presnejšie pyrolový skelet) je tvorené inkorporovaním dvoch uhlíkových atómov, ktoré pochádzajú z fosforibozyldifosfátu (anomérny a uhlík C-2), do štruktúry kyseliny antranilovej (Schéma 22). Zvyšné tri uhlíkové atómy sú potom z molekuly D-ribofuranózy eliminované vo forme D-glyceraldehyd-3-fosfátu prostredníctvom reverznej aldolovej reakcie. Pôvodná kyselina antranilová stráca jeden uhlíkový atóm vo forme CO₂.

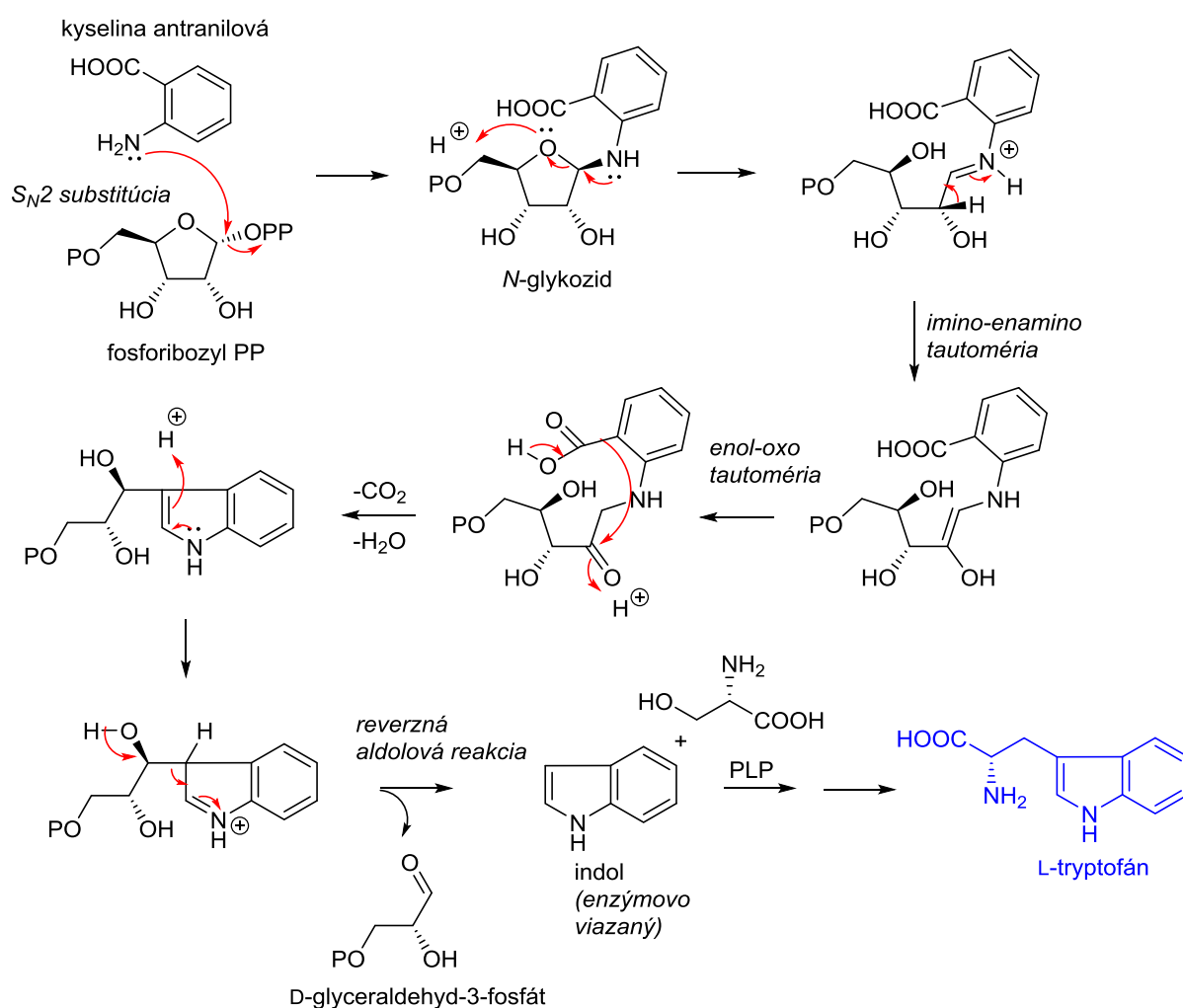


Schéma 22. Modifikácia kyseliny antranilovej na L-tryptofán.

Bočný reťazec L-tryptofánu pochádza z aminokyseliny L-serín (Schéma 23). Jej ukotvenie na indolové jadro je pomerne komplikovaný proces, ktorý je katalyzovaný enzýmom tryptofánsyntáza, používajúcim ako kofaktor pyridoxal-5'-fosfát (PLP). Celý proces zahŕňa tvorbu imínu, vytrhnutie α -vodíka, ktorý má vo vytvorenej Schiffovej báze kyslý charakter, elimináciu vody a tvorbu iminoakrylátu, s ktorým indol reaguje ako nukleofil. Následná rearomatizácia a hydrolýza imínu vedú k tvorbe cieľovej aminokyseliny.

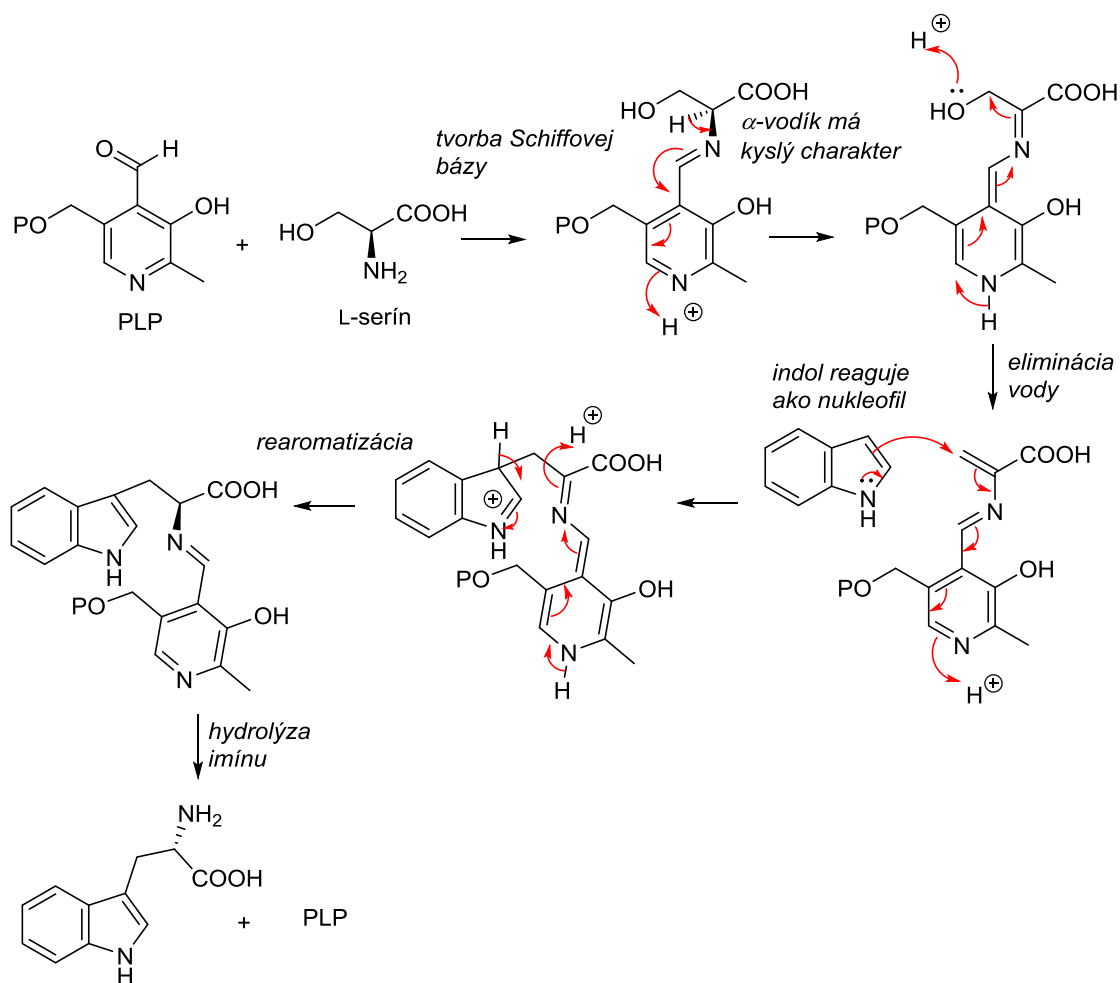


Schéma 23. Ukotvenie bočného reťazca na indolové jadro.

3.5. Transaminácia ako jeden z konštrukčných mechanizmov

Transaminácia je proces, pri ktorom si skupina $-\text{NH}_2$ z kyseliny glutámovej vymení miesto s ketoskupinou príslušnej oxokyseliny. Uvedená transformácia poskytuje najbežnejší spôsob inkorporovania dusíka do produkujúcich sa aminokyselín a rovnako tak aj spôsob jeho odstránenia. Zodpovedajúci pár, kyselina L-glutámová/kyselina 2-oxoglutárová, sú najčastejšie donor/akceptorové molekuly (Schéma 24) pre aminoskupinu. Redukčná aminácia kyseliny 2-oxoglutárovej, ako produktu Krebsovho cyklu (pozri, Schéma 1), je zodpovedná pre počiatočnú inkorporáciu dusíka. Reakcia zahŕňa tvorbu imínu a jeho následnú redukciu (Schéma 24). Transaminácia potom dovoľuje aminoskupine, aby bola prenesená z kyseliny glutámovej na vhodnú oxokyselinu alebo v opačnom móde z aminokyseliny na 2-oxoglutarát. Táto transformácia je PLP-dependentná. Samotný proces (prvý krok je veľmi podobný dekarboxylačnému konštrukčnému mechanizmu) začína tvorbou Schiffovej bázy/aldimínu, ktorý vzniká reakciou aldehydovej skupiny kofaktora, teda PLP a aminoskupiny príslušnej

aminokyseliny. Vo vzniknutom imíne je α -vodík pochádzajúci z pôvodnej aminokyseliny kyslejší a je eliminovaný. Následná reprotonizácia vedie k tvorbe druhého imínu (ketimínu) za súčasnej obnovy aromatického charakteru pyridínového jadra. Zodpovedajúca oxokyselina je následne uvoľnená hydrolýzou imínu, pričom ako druhý komponent uvedenej modifikácie vzniká pyridoxamínfosfát. Ostávajúca časť tejto sekvencie potom prenáša aminoskupinu z pyridoxamínu na inú oxokyselinu (Schéma 25).

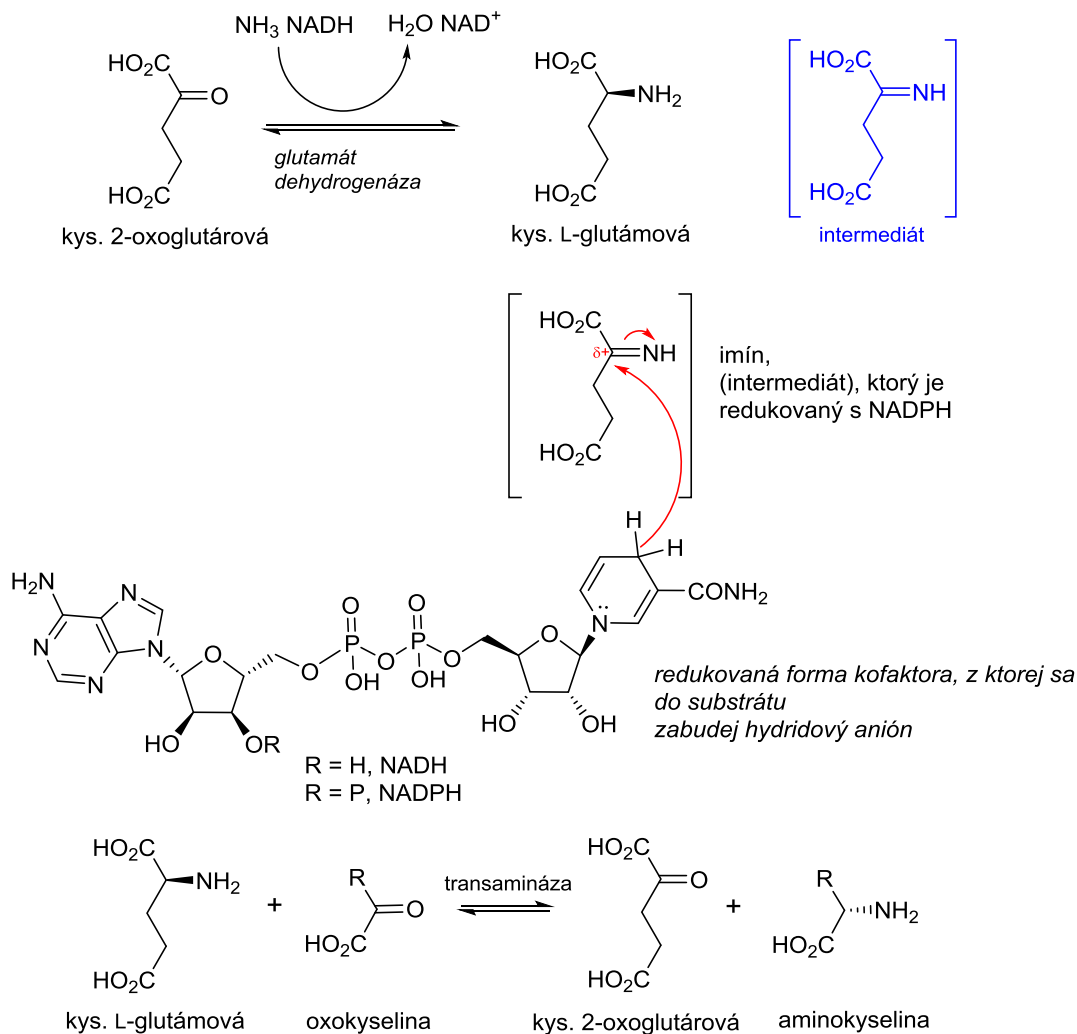


Schéma 24. Základný princíp transaminácie.

Poznámka:

V rámci tejto kapitoly bude, kvôli prehľadu diskutovaná aj tvorba zostávajúcich stavebných blokov C_6C_2 , C_6C_3 , C_6C_1 , C_5 , C_4N a C_5N aj napriek tomu, že nie všetky využívajú transamináciu ako konštrukčný mechanizmus, prípadne pri ich biosyntéze sú aplikované iné, ktoré už boli spomenuté v rámci predchádzajúcich kapitol alebo budú uvedené v nasledujúcich.

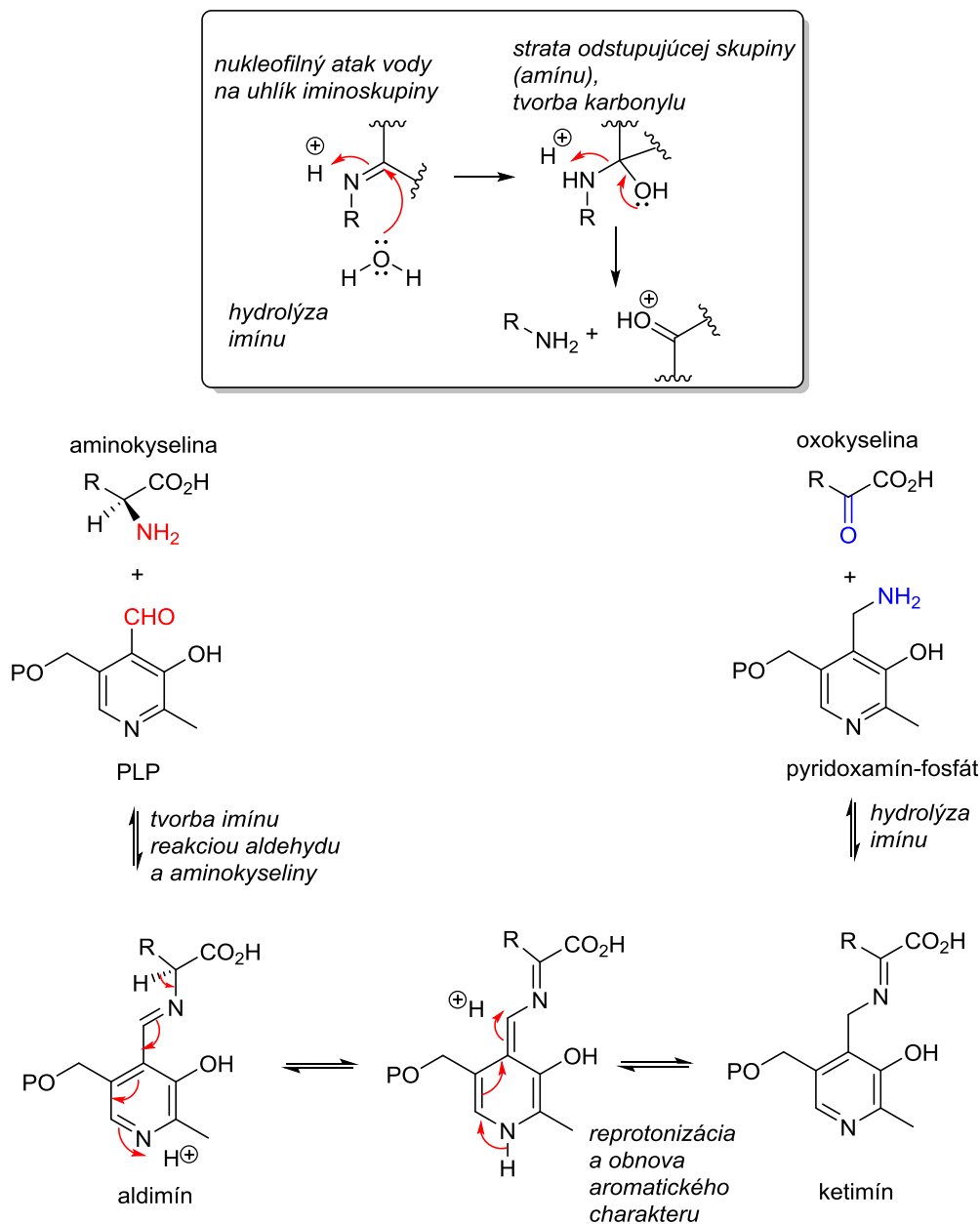


Schéma 25. Mechanizmus transaminačnej reakcie.

3.5.1. Konštrukcia stavebného bloku C_6C_2

Kreovanie stavebného bloku C_6C_2 využíva ako konštrukčné mechanizmy transaminácie a dekarboxyláciu α -oxokyselín (Schéma 26). Východiskovým substrátmi pre jeho tvorbu môžu byť aminokyseliny L-fenylalanín a L-tyrozín. Ich transamináciou, ktorá je PLP-dependentná, vznikajú zodpovedajúce α -oxokyseliny, teda postupne kyselina fenylpyrohroznová a 4-hydroxyfenylpyrohroznová. Ich dekarboxyláciou, ktorá je závislá na tiamíndifosfáte (TPP) je potom produkovaný požadovaný stavebný blok. Rovnakým spôsobom prebieha v organizme aj dekarboxylácia kyseliny pyrohroznovej na acetaldehyd. Konštrukcia uvedeného stavebného bloku v podobe 4-hydroxyfenylacetaldehydu (Schéma 26) je potrebná napríklad pre biosyntézu alkaloidov ópia, konkrétne pri syntéze (S)-koklaurínu a (S)-retikulínu (Schéma 27). Ten skôr menovaný predstavuje východiskový syntón pre prípravu papaverínu. Inverzia konfigurácie u (S)-retikulínu, realizovaná cez oxidačno-redukčný protokol, vedie k tvorbe jeho antipódu (R)-retikulínu, ktorý je pilotnou látkou pre biosyntézu tebaínu, kodeínu a morfínu (Schéma 28).

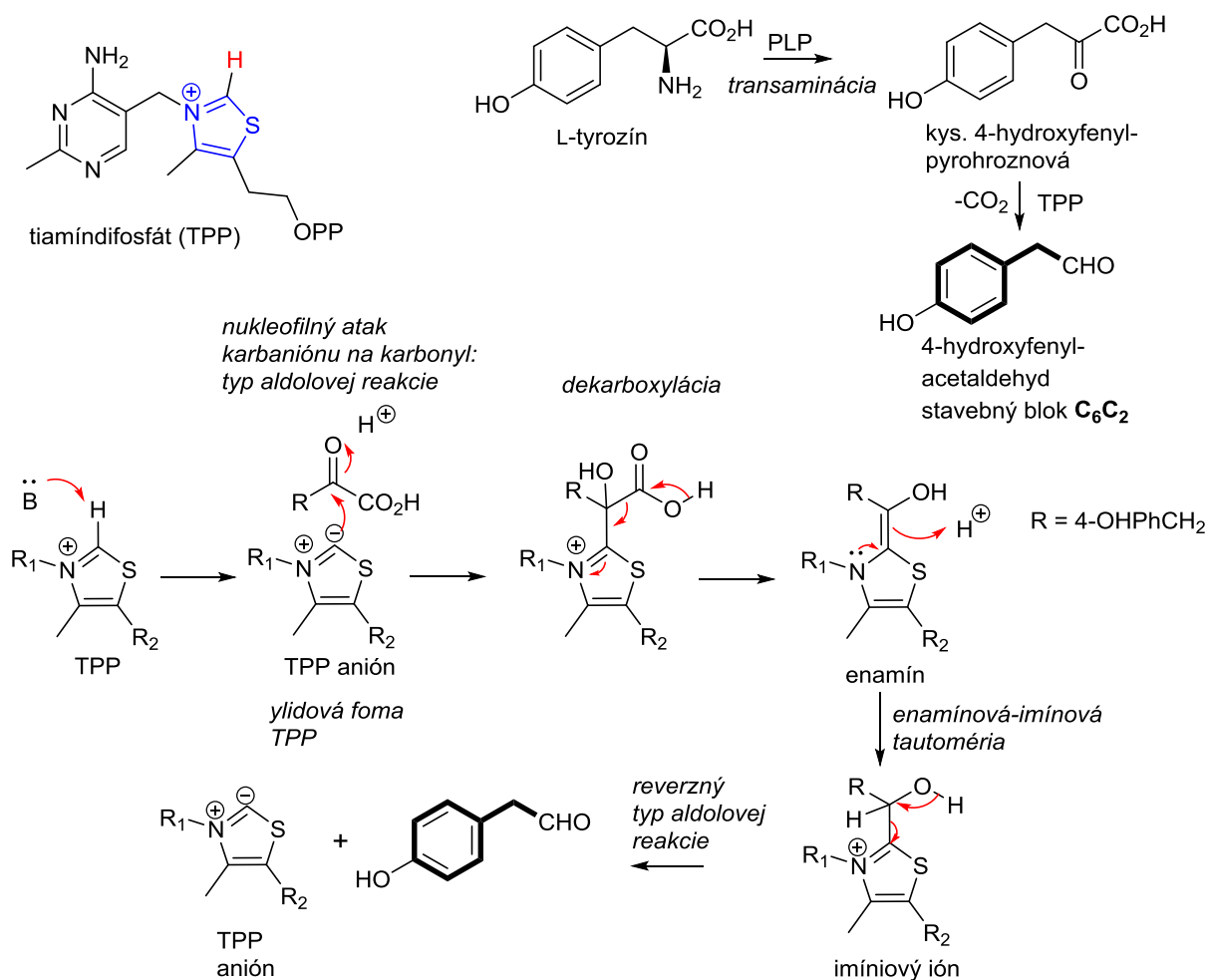


Schéma 26. Biosyntéza stavebného bloku C₆C₂.

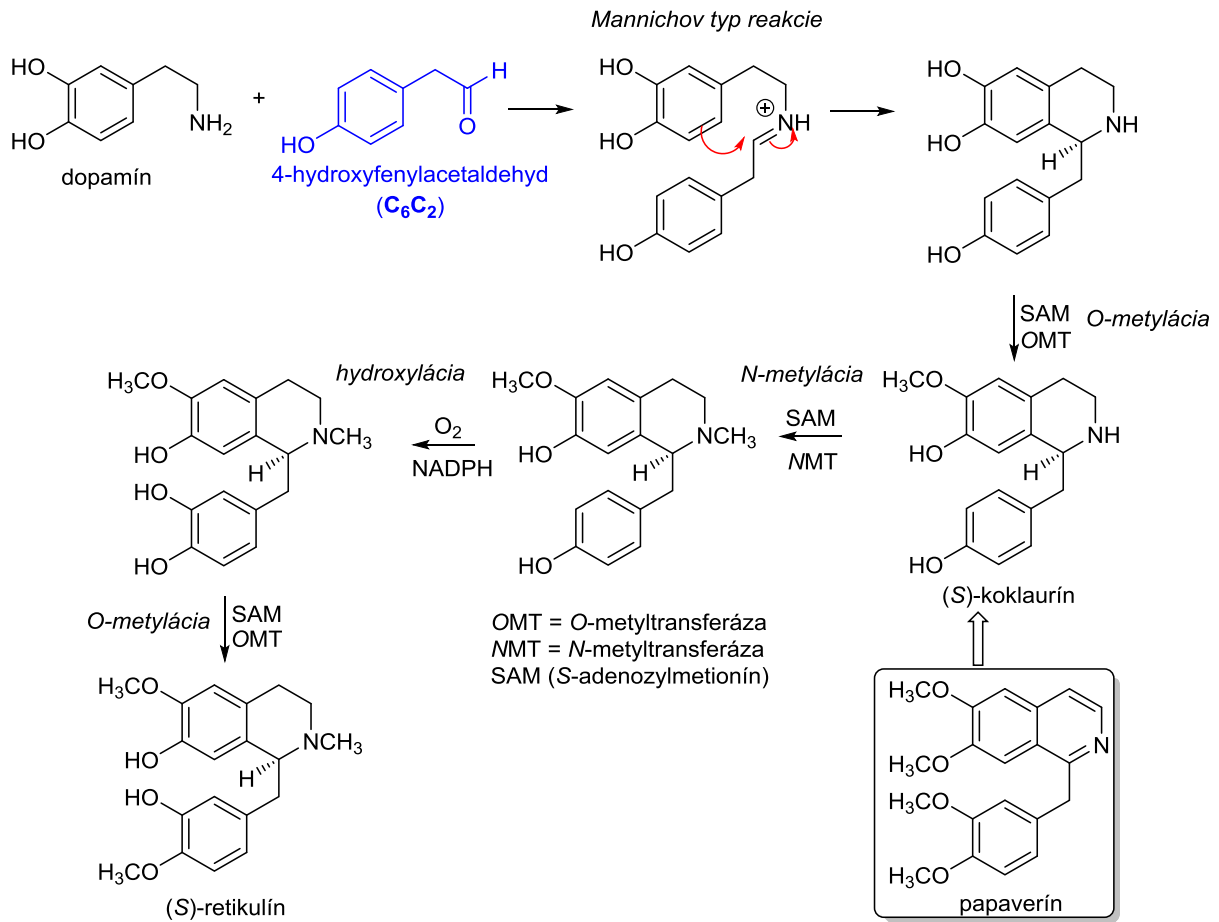


Schéma 27. Biosyntéza (S)-koklaurínu a (S)-retikulínu.

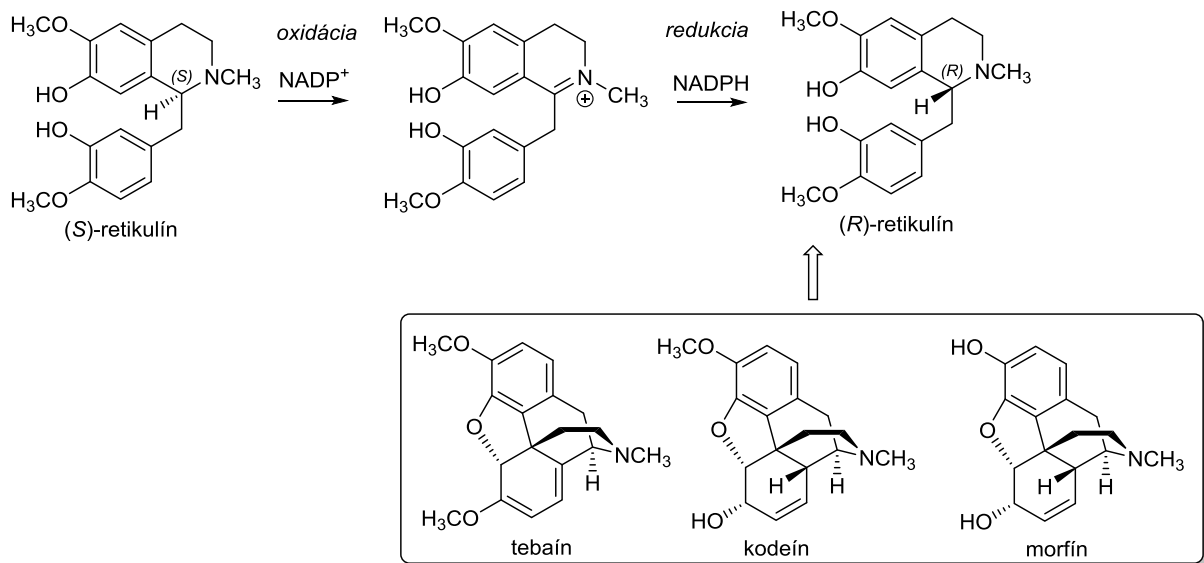


Schéma 28. Biosyntéza (R)-retikulínu.

3.5.2. Konštrukcia stavebného bloku C₆C₃

L-Fenylalanín a L-tyrozín sú prekursorovými molekulami pre konštrukciu stavebného bloku C₆C₃ a uvedená jednotka tvorí základ pre široký diapazón prírodných látok obsahujúcich aromatické jadro. Jeho biosyntéza u rastlín začína elimináciou amoniaku z bočného reťazca za tvorby (*E*)-konfigurovanej dvojitej väzby. V prípade L-fenylalanínu vzniká týmto procesom kyselina (*E*)-škoricová, v prípade L-tyrozínu, kyselina *p*-kumárová (Schéma 29). Rastliny demonštrujú schopnosť deaminovať fenylalanín pomocou enzýmu PAL (fenylalanínová amoniakálna lyáza). U tyrozínu je tento proces obmedzený len na skupinu tráv čeľade *Poaceae*. Či v uvedených rastlinách existuje nezávislý enzým TAL (tyrozínová amoniakálna lyáza) alebo je proces katalyzovaný PALom so širšou substrátovou špecificitou, to je zatiaľ iba v rovine diskusií. Ako už bolo zmienené v kapitole 2, bočný reťazec u stavebného bloku C₆C₃ môže byť nasýtený, často disponuje násobnou väzbou, prípadne podlieha oxidácií. V niektorých prípadoch dochádza k jeho fragmentácii, čím sú generované dve jednotky: C₆C₂ a C₆C₁.

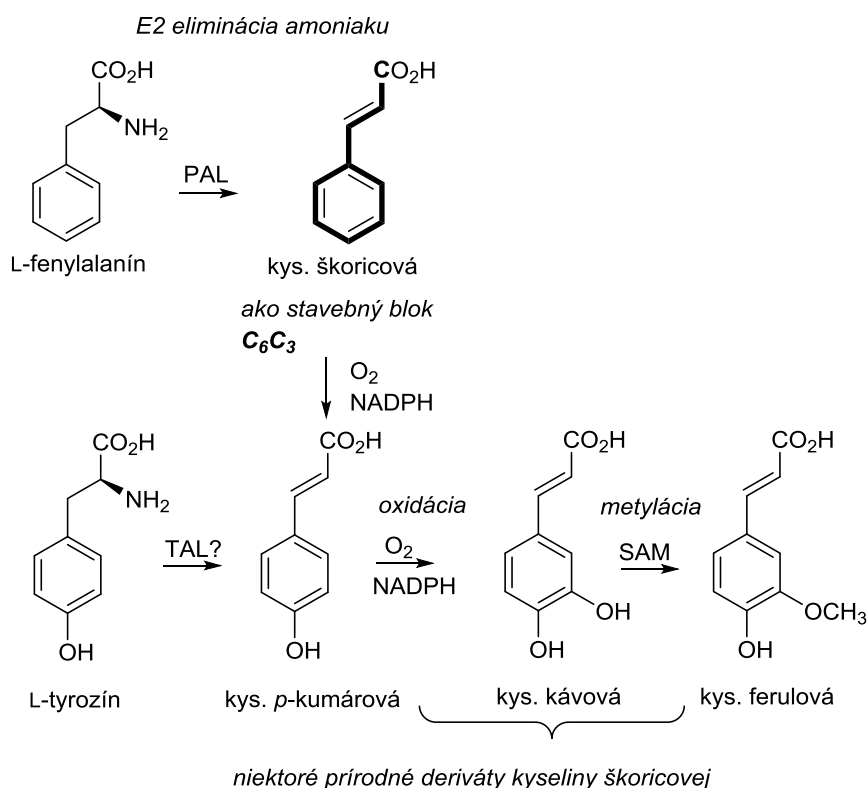


Schéma 29. Biosyntéza stavebného bloku C₆C₃.

3.5.3. Konštrukcia stavebného bloku C₆C₁

3.5.3.1. Biosyntéza substituovaných benzénkarboxylových kyselín a ich derivátov

Fragment C₆C₁ môže vznikáť z derivátov kyseliny škoricovej stratou dvoch uhlíkov z bočného nenasýteného reťazca (Schéma 30). Sekvencia krokov je podobná stratégií zahŕňajúcej β-oxidáciu mastných kyselín (pozri, Schéma 12) a začína aktiváciou karboxylovej funkčnej skupiny cez tvorbu esteru (Schéma 30). Konjugovaná 1,4-adícia poskytuje β-hydroxyderivát, ktorý je následne oxidovaný na β-oxoester a ten procesom reverznej Claisenovej reakcie generuje acetyl-CoA a ester zodpovedajúcej kyseliny 4-hydroxybenzoovej (R = H) alebo vanilínovej (R = OCH₃). Zmiený prístup je v rastlinnej ríši všeobecne akceptovaný, avšak bolo potvrdené, že existuje aj iný mechanizmus štiepenia bočného reťazca, ktorý je rozdielny od β-oxidácie mastných kyselín. V uvedenej alternatívnej ceste nie je zahrnutá tvorba esterov, ale adíciou vody a následnou reverznou aldolovou reakciou je generovaný príslušný aldehyd, oxidáciou ktorého vzniká potom zodpovedajúca kyselina. Aromatické aldehydy, také ako napríklad vanilín, produkovaný rastlinou *Vanilla planifolia* z čeľade *Orchidaceae*, sú produktom štiepenia derivátov kyseliny škoricovej prebiehajúcej bez tvorby esterov, teda priamo, uplatňujúc novší mechanizmus (Schéma 30).

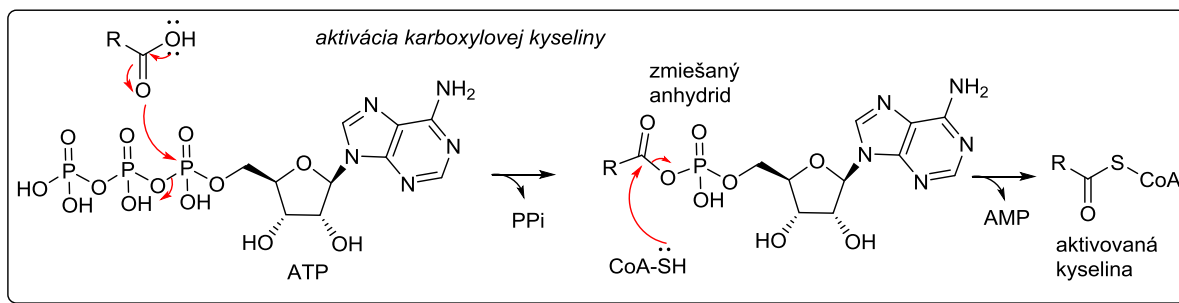
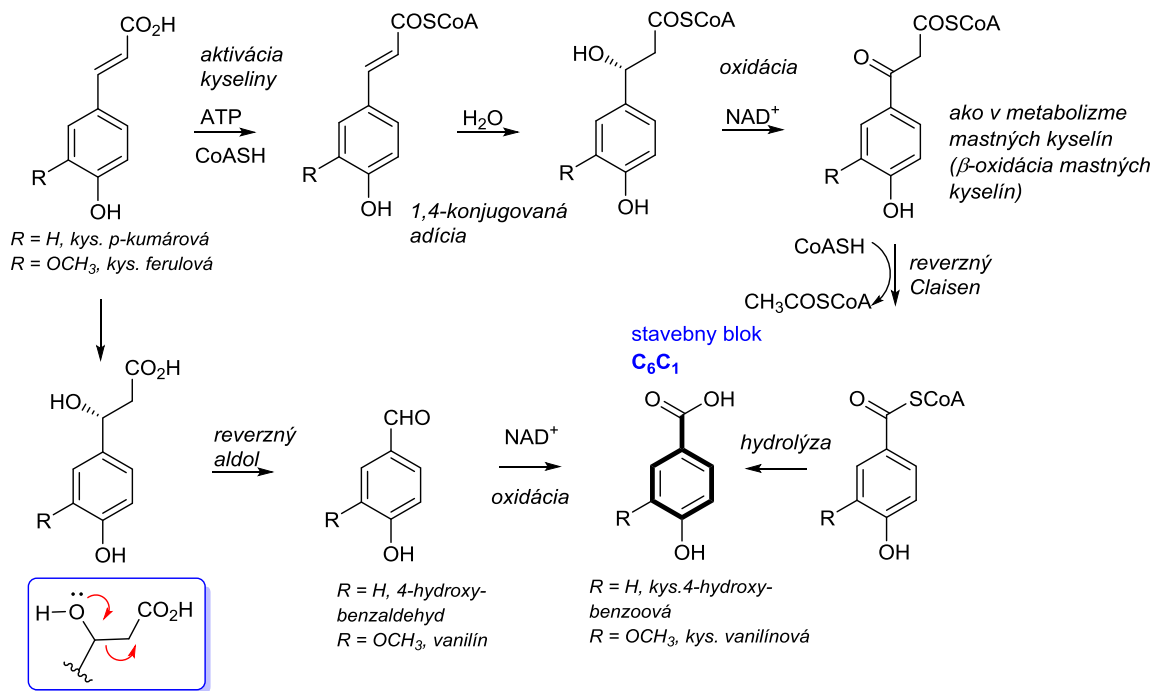


Schéma 30. Biosyntéza stavebného bloku C_6C_1 , v rámci ktorej je uvedená aj aktivácia karboxylovej kyseliny.

3.5.4. Konštrukcia izoprénovej stavebnej jednotky C_5

Základným stavebným fragmentom terpenoidov a steroidov je izoprénová jednotka (C_5 stavebný blok), ktorá môže byť všeobecne generovaná dvomi nezávislými cestami (Schéma 31):

1. z kyseliny mevalónovej (MVA) (mevalonátová cesta, *MVA pathway*)
2. z 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXP), označovaná tiež ako metylerytritolová fosfátová dráha (*methylerythritol phosphate pathway* alebo *mevalonate-independent pathway*)

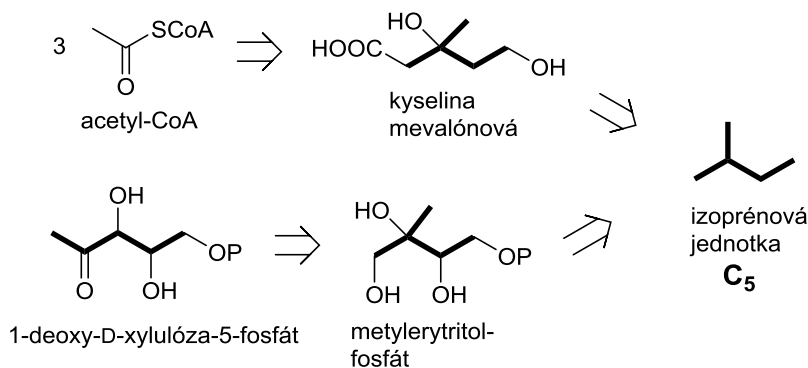


Schéma 31. Biosyntetické cesty vedúce k izoprénovej stavebnej jednotke C₅.

1. Mevalonátová cesta

(i) Biosyntéza kyseliny mevalónovej

Kyselina mevalónová je biosyntetizovaná z troch molekúl acetyl-CoA (Schéma 32). Claisenovou esterovou kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA vzniká klasický acetoacetyl-CoA, tretí mól acetyl-CoA je inkorporovaný cez stereošpecifickú aldolovú reakciu, ktorej výsledkom je tvorba vetveného esteru (*branched-chain ester*) β -hydroxy- β -metylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Treba poznamenať, že posledná molekula acetyl-CoA vstupuje do aldolovej reakcie viazaná na enzým cez tiolové ukotvenie. Napokon, dvojstupňová redukcia tioesterovej skupiny na primárny alkohol poskytuje finálnu molekulu kyseliny mevalónovej.

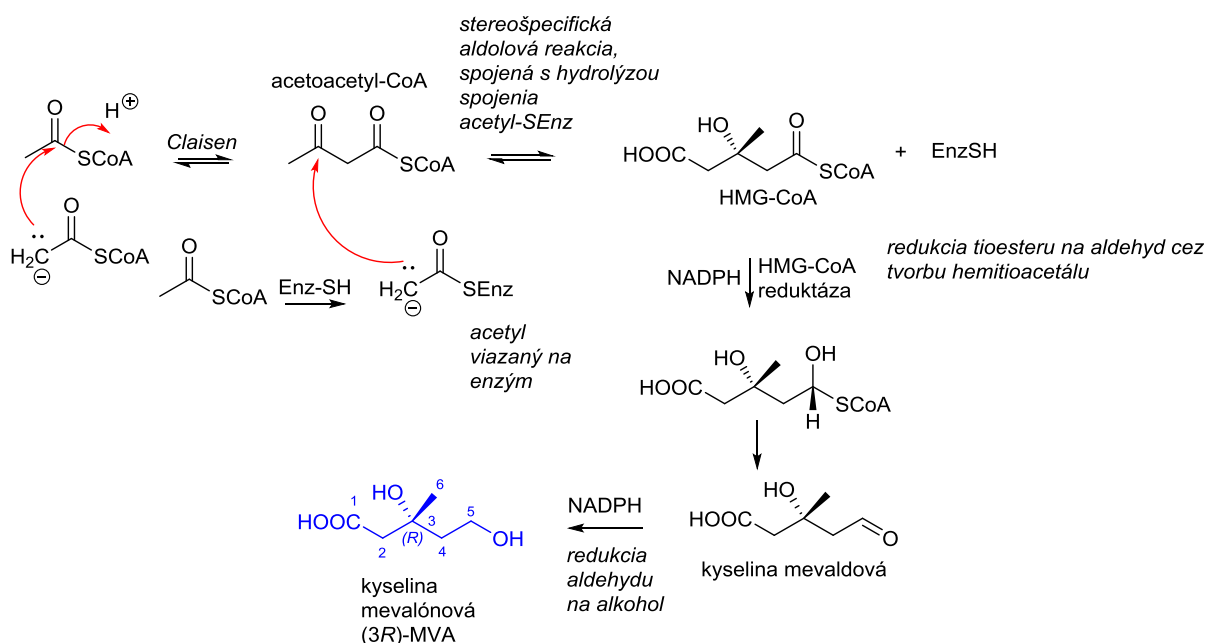


Schéma 32. Biosyntéza kyseliny mevalónovej.

(ii) Modifikácia kyseliny mevalónovej na izoprénovú stavebnú jednotku C₅

Aby bola z kyseliny mevalónovej vybudovaná izoprénová jednotka, na to sú potrebné nasledovné transformácie: (i) postupná ATP dependentná fosforylácia primárnej hydroxylovej skupiny poskytujúca difosfát, (ii) fosforylácia terciárneho hydroxyly a (iii) dekarboxylácia spojená s elimináciou fosfátovej skupiny, produkujúca izopentenylpyrofosfát (IPP), ktorý predstavuje jeden z dvoch izomérnych C₅ syntónov. Alylová izomerizácia IPP vedie k tvorbe druhého C₅ stavebného bloku, dimetylalylpyrofosfátu (DMAPP). Obe tieto jednotky sú využívané pre konštrukciu terpenov a ich príbuzných derivátov (terpenoidov), vrátane stereoidných zlúčenín (Schéma 33).

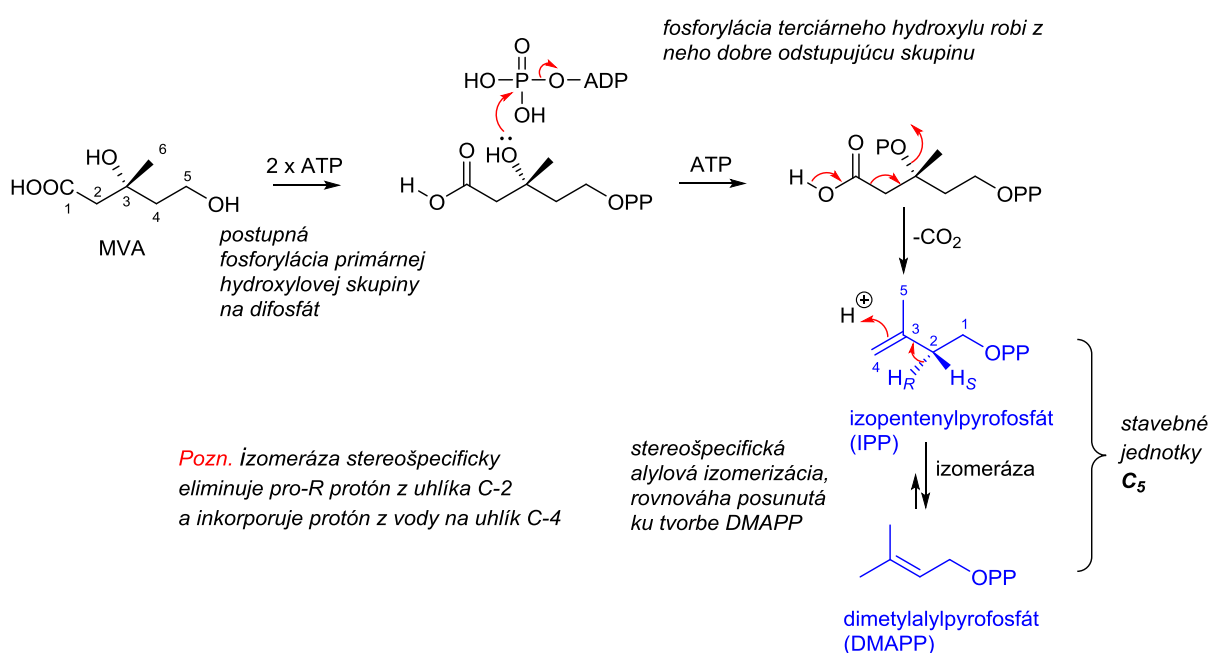


Schéma 33. Biosyntéza izoprénových stavebných jednotiek C₅.

2. Metylerytritolová fosfátová dráha

(i) Biosyntéza 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXP)

Biosyntéza DXP začína tvorbou enamínu (Schéma 34), ktorý je popísaný pri konštrukcii acetyl-CoA (pozri, Schéma 15, kapitola 3.4.). Generovaný enamín reaguje ako nukleofil s glyceraldehyd-3-fosfátom, ktorý pochádza z glykolýzy (pre jeho vznik, pozri Schéma 1), pričom požadovaná molekula 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu je produkovaná uvoľnením TPP aniónu z príslušného aduktu (reverzný typ aldolovej reakcie) (Schéma 34).

transformácie sú podrobne opísané
v schéme týkajúcej sa biosyntézy acetyl-CoA
(Schéma 15)

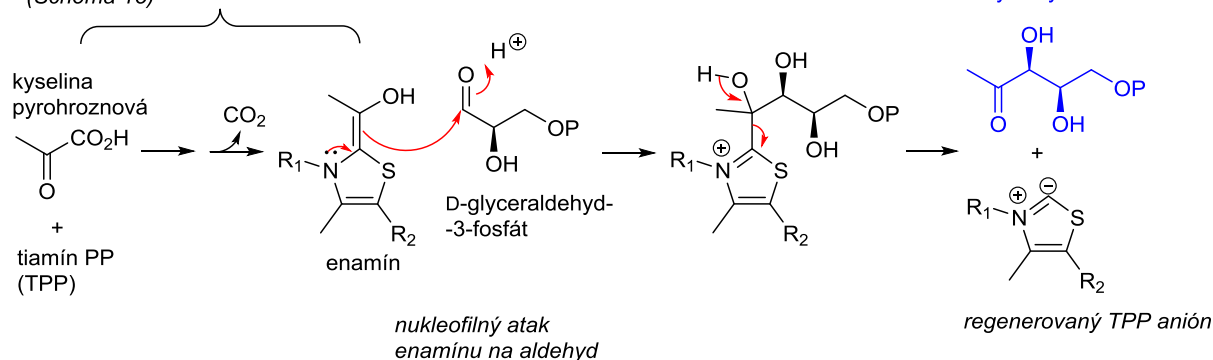


Schéma 34. Biosyntéza 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu (DXP).

(ii) Transformácia 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu na izoprénovú stavebnú jednotku C₅

Vytvorený 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfát (Schéma 34) je ďalej transformovaný na 2-C-metyl-D-erytritol-4-fosfát prostredníctvom skeletálneho preusporiadania, ktoré zahŕňa reverznú aldolovú reakciu spojenú s redukciou. Enzým katalyzuje obe vyššie uvedené transformácie (skeletálny prešmyk a redukciu) bez uvoľnenia žiadaného medziproduktu. Výsledný 2-C-metyleritritol zostáva enzýmovo viazaný ako ekvivalent izoprénovej jednotky, obsahuje potrebný vetvený systém pre jeho finálnu konštrukciu. Následná reakcia s CTP (cytidíntrifosfát) poskytuje cytidíndifosfosubstrát, ktorého terciárna hydroxylová skupina je fosforylovaná pomocou ATP. Vzniknutý medziprodukt je modifikovaný na cyklický fosfoanhydrid elimináciou CMP (cytidínmonofosfát). Nasledujúce kroky vedúce k dvom izoprénovým jednotkám sú najmenej pochopenými procesmi, výskum v tejto oblasti však ukázal, že na ich tvorbe sa podieľajú dva enzýmy. Prvý zabezpečuje tvorbu 4-hydroxy-3-metylbut-2-ényl-difosfátu a druhý uvedenú molekulu mení na IPP a tiež DMAPP. Oba zmienené procesy sú redukčné, ale ich mechanizmus nie je ešte jednoznačne objasnený (Schéma 35).

Či bola pri konštrukcii terpenoidných látok použitá mevalonátová alebo deoxyxylulózová dráha, to musí byť potvrdené experimentálne cez izoláciu izopentenylidifosfátu (IPP), použijúc izotopom značenú D-glukózu (Schéma 36). Živočíchy vykazujú nedostatok DXP, preto výlučne využívajú mevalonátovú dráhu. Na druhej strane, rastlinná ríša môže aplikovať oba procesy, pretože je na to vybavená aparátom enzýmov.

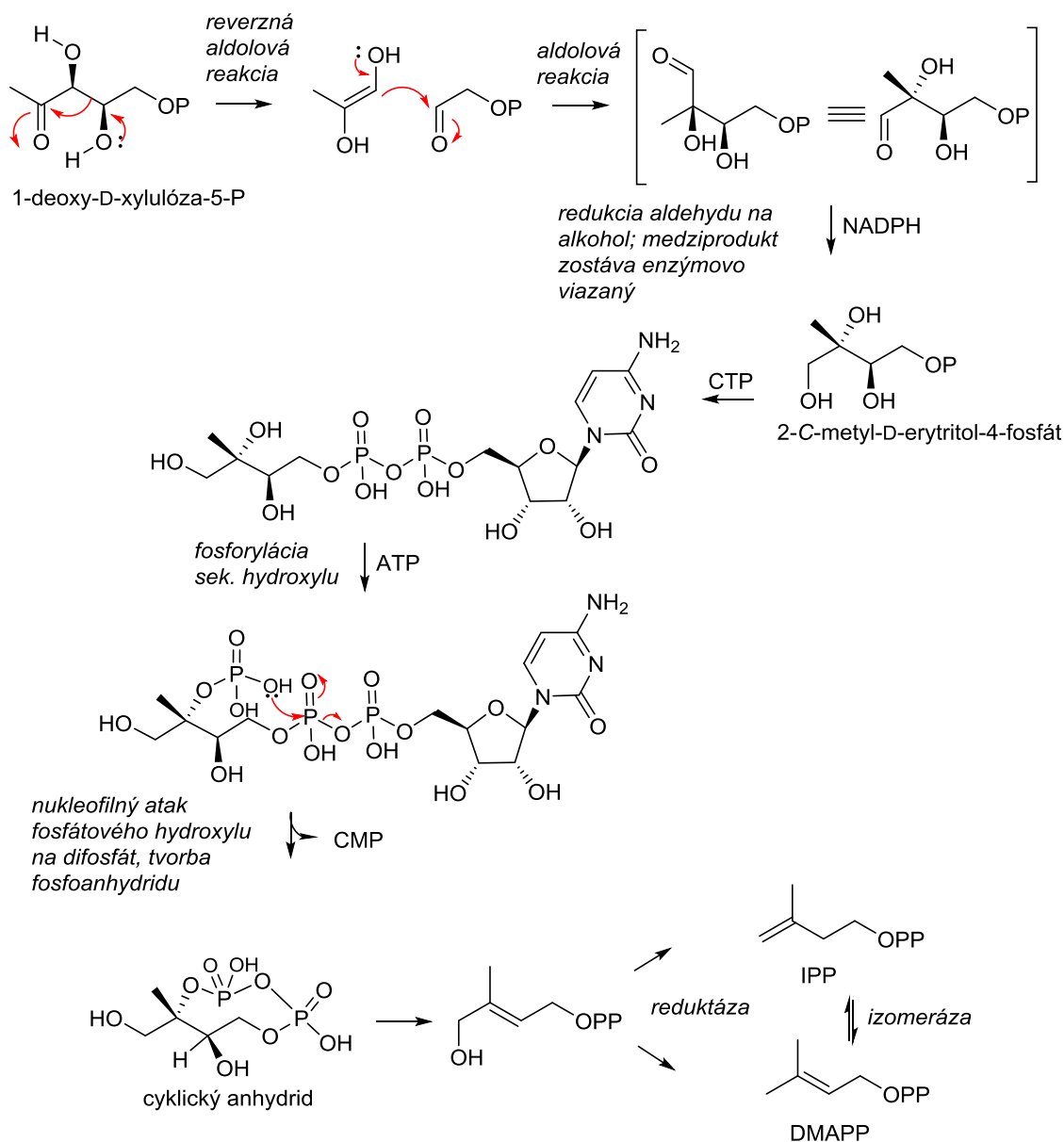


Schéma 35. Transformácia 1-deoxy-D-xylulóza-5-fosfátu na izoprénovú jednotku C₅.

U rastlín sú tieto dve cesty rozdiferencované tak, že enzýmy pre mevalonátovú dráhu sa nachádzajú v cytoplazme, enzýmy pre metyleytritolovú stratégiu v chloroplastoch. Tritepény, vrátane steroidov, sú cytozolické produkty, ostatné terpenoidy sú produkované v chloroplastoch. Samozrejme, že sa môžu vyskytnúť aj výnimky.

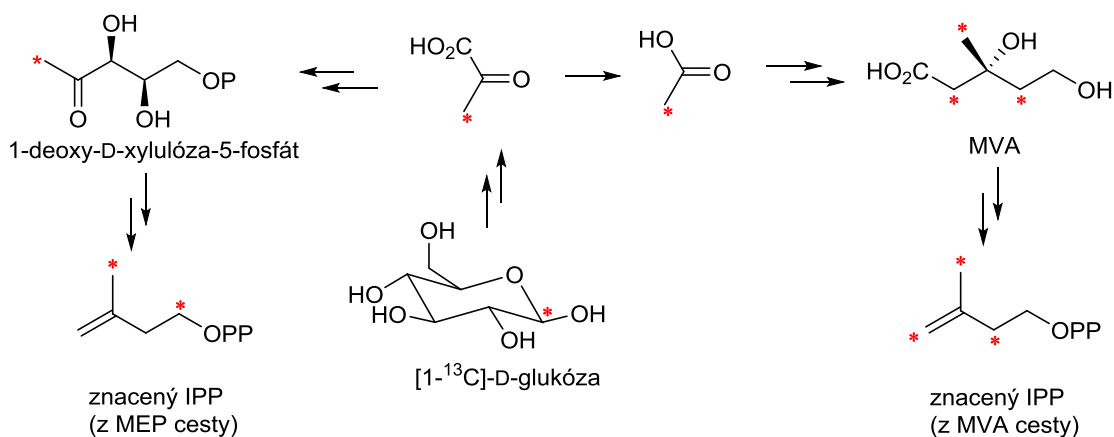


Schéma 36. Dôkaz využitia dvoch biosyntetických dráh vedúcich k terpénov v jednotlivých organizmoch na základe izolácie značeného izopentenyldifosfátu (IPP).

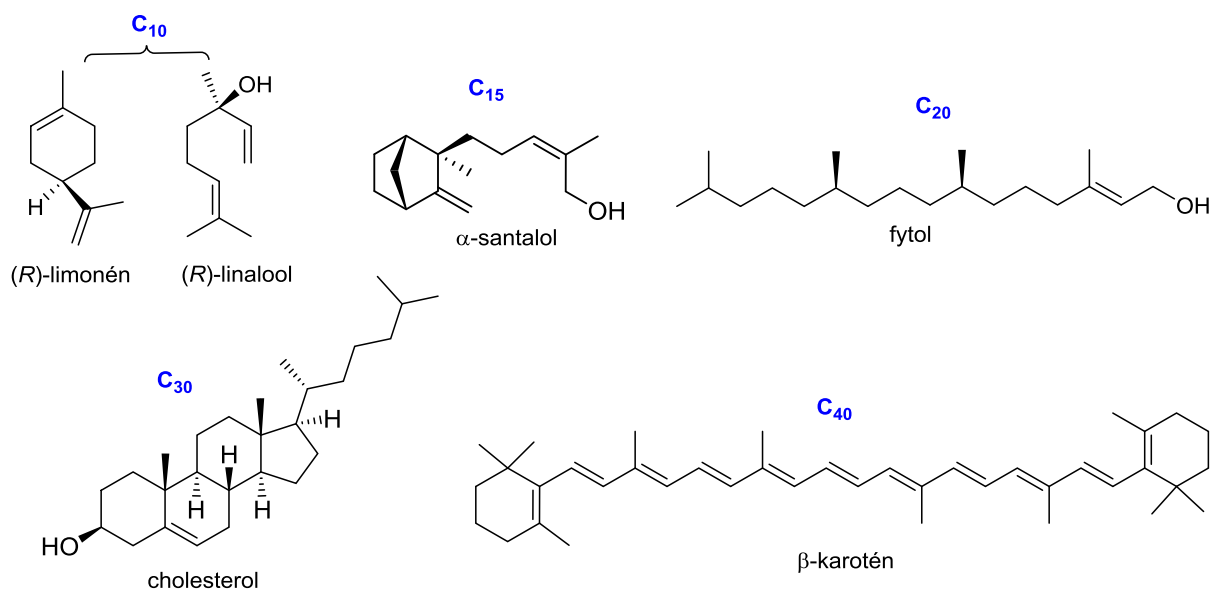
Poznámka ku klasifikácii terpenoidov.

Termín **terpény** je vzťahovaný len na uhľovodíky, acyklické aj cyklické, nasýtené alebo nenasýtené, ktoré obsahujú iba vodíky. V prípade, že štruktúry disponujú napríklad kyslíkovým atómom, je korektné použiť terminológiu **terpenoidy** (Obr. 7). Je známych viac ako 22 000 terpenoidných štruktúr. Aj napriek svojej štruktúrnej rozmanitosti, sú terpenoidy navzájom príbuzné - všetky možno odvodiť z jednoduchej izoprénovej jednotky, obsahujúcej 5 uhlíkových atómov (stavebný blok **C₅**).

Ak by sme sa sústredili iba na terpény, tak tie klasifikujeme podľa počtu **C₅** jednotiek (Tabuľka 1).

Tabuľka 1. Klasifikácia terpénov

Typ terpénu	Počet uhlíkov	Počet C ₅ jednotiek
hemiterpény	C ₅	1
monoterpény	C ₁₀	2
seskviterpény	C ₁₅	3
diterpény	C ₂₀	4
sesterterpény	C ₂₅	5
triterpény	C ₃₀	6
tetraterpény	C ₄₀	8

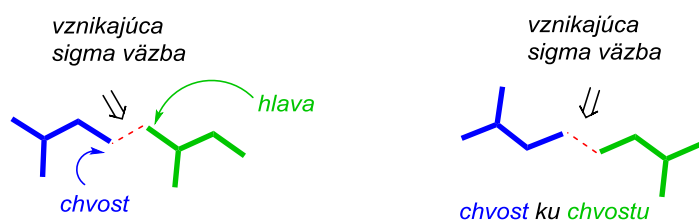


Obrázok 7. Príklady niektorých prírodných terpénov a terpenoidov.

Základný princíp konštrukcie terpénov

DMAPP vlastní ľahko odstupujúcu skupinu, difosfát, a môže tak poskytnúť alylový kation, ktorý je stabilizovaný rezonanciou. Vystupuje teda v konštrukcii terpenoidných štruktúr ako elektrofilný fragment (pozri, *Schéma 8*).

Na rozdiel od DMAPP, IPP vlastní terminálnu dvojitú väzbu, preto bude pravdepodobnejšie reagovať ako nukleofil, predovšetkým vo vzťahu k elektrofilnému DMAPP. Tieto odlišné reaktivity izoprénových stavebných jednotiek sú základom pre ich vzájomné spájanie sa. Podľa tzv. *izoprénového pravidla*, navrhnutého chemikom Leopoldom Ružičkom (1887-1976, nositeľ Nobelovej ceny za chémiu), si možno predstaviť tak, že jednoduchšie terpény C₁₀-C₂₀ vznikajú spájaním izoprénových jednotiek systémom „*hlava-chvost*“ (*Obr. 8*). Biosyntéza triterpénov a tetraterpénov je komplikovanejšia a je realizovaná procesom „*chvost-chvost*“.



Obrázok 8. Princíp spájania izoprénových stavebných jednotiek.

Vznik monoterpénov (C_{10})

Spájanie izoprénových jednotiek je vysvetlené na príklade tvorby monoterpénov (C_{10}). „Kaplingom“ dvoch C_5 stavebných blokov (DMAPP a IPP) vzniká **geranyldifosfát (GPP)** (pozri, Schéma 9).

Linalyldifosfát (LPP) a **neryldifosfát (NPP)** sú izoméry geranyl-difosfátu (GPP) (Schéma 37). Sú pravdepodobne tvorené z geranyl-difosfátu cez tvorbu allylového kationu, ktorý môže byť následne modifikovaný pripojením difosfátovej skupiny na terciárny uhlík v linalyldifosfáte alebo zmenou stereochemie na dvojitej väzbe v neryldifosfáte.

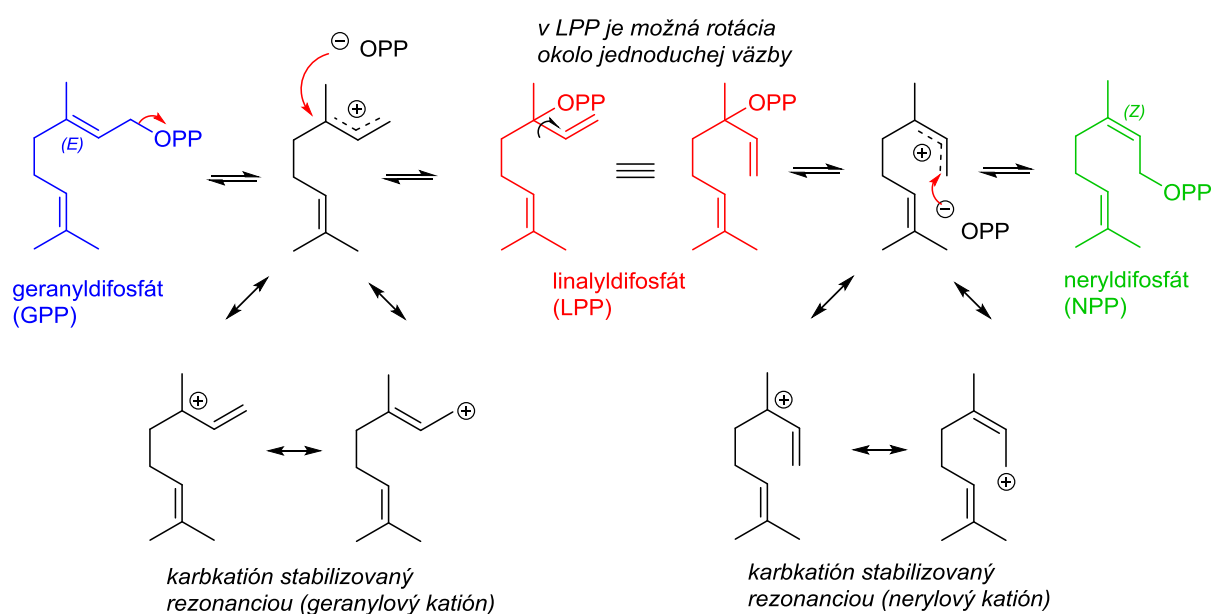


Schéma 37. Tvorba linalyldifosfátu a neryldifosfátu.

Tieto tri zlúčeniny (GPP, NPP a LPP) môžu byť ďalej rastlinami, ako hlavnými producentmi terpenoidov, modifikované (nie veľkými zmenami) na lineárne monoterpény, resp. monoterpenoidy, ktoré sú využívané napríklad v parfumérii ako súčasť vonných kompozícií. Takýmto spôsobom môžu vzniknúť prípraviť uhľovodíky, alkoholy, aldehydy a estery (acetáty) (Schéma 38).

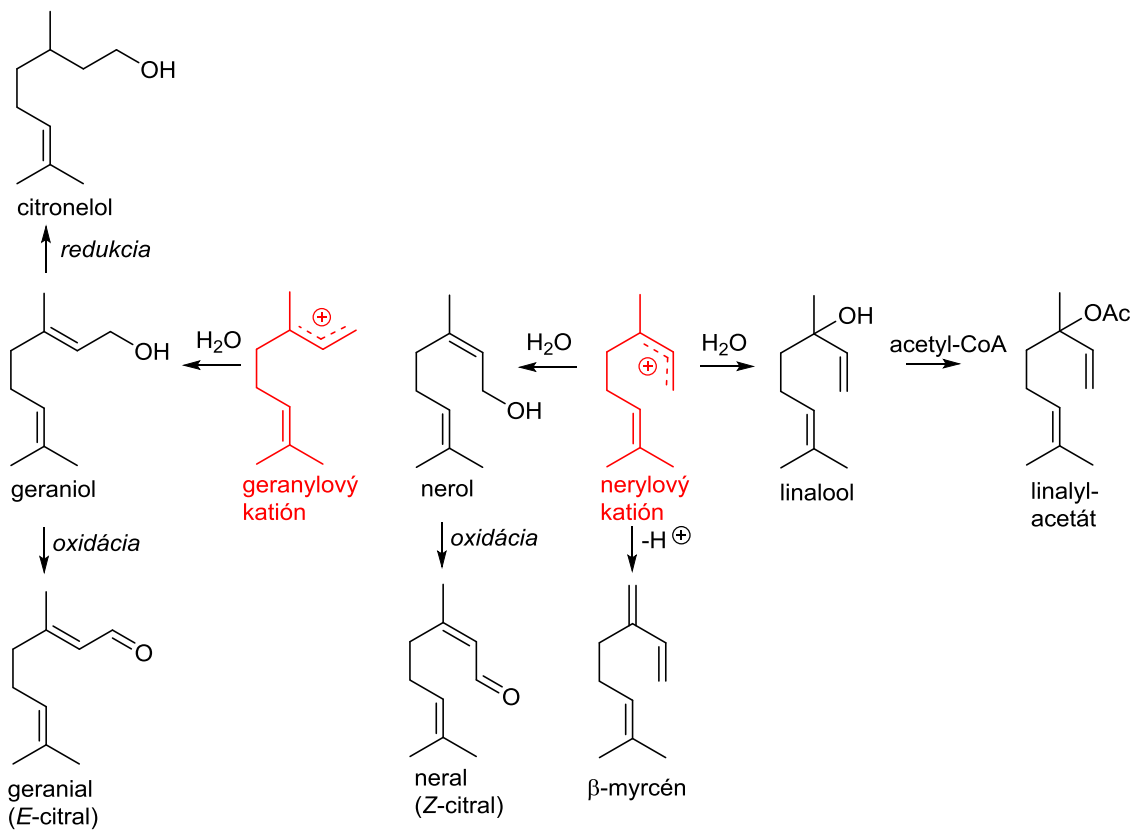


Schéma 38. Modifikácia GPP, LPP a NPP na monoterpény a monoterpenoidy.

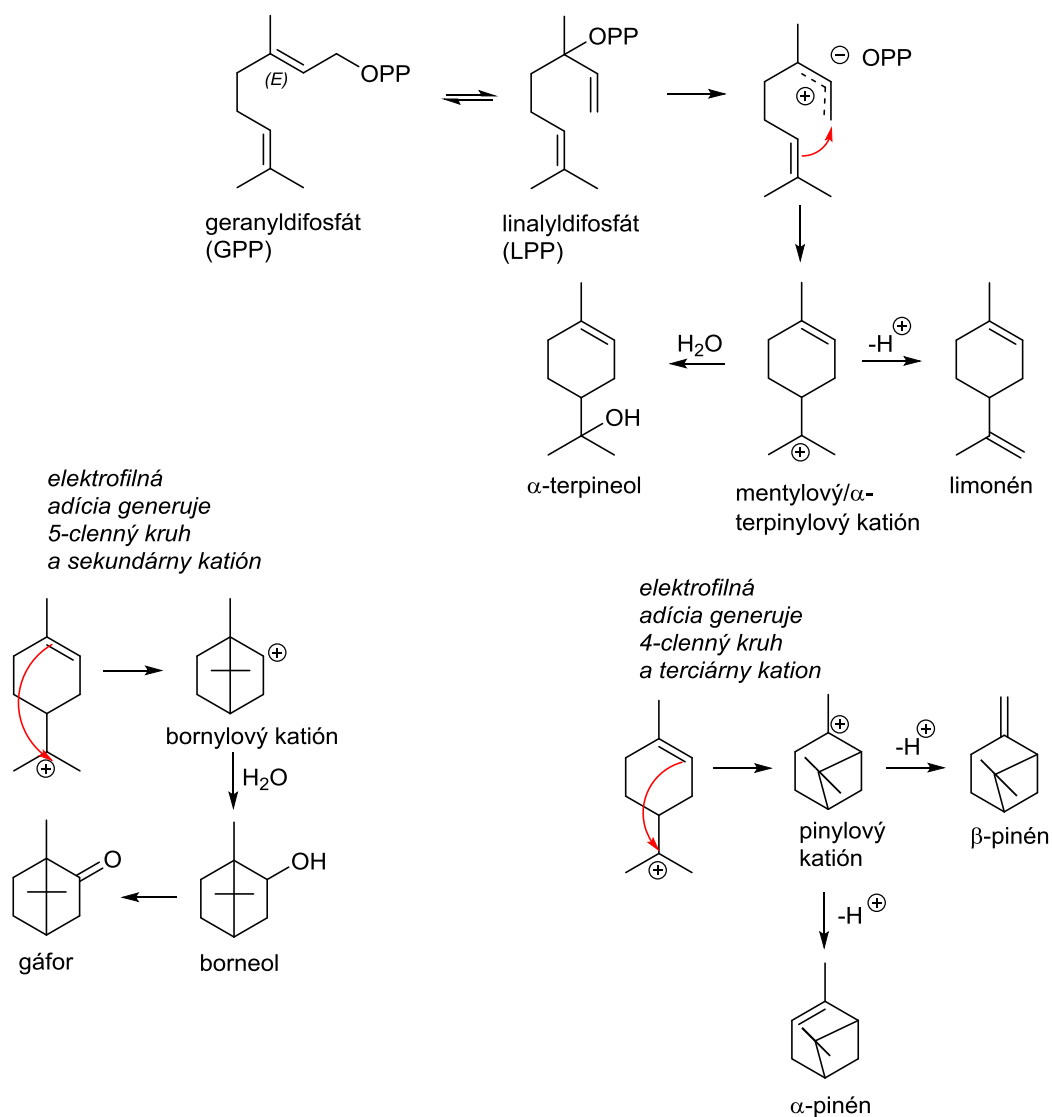


Schéma 39. Tvorba cyklických terpenov a terpenoidov v rastlinách.

Všetky terpény a terpenoidy, uvedené v Schémach 37-39, majú vonný potenciál a sú prítomné v rastlinných siliciach, ktoré sú kumulované v špeciálnych siličných bunkách. Silice sa z rastlinného materiálu izolujú viacerými spôsobmi:

- **extrakcia do tuku** (tzv. anfleráž, z francúzskeho slova *enfleurange*)
- **destilácia vodnou parou**
- **extrakcia organickými rozpúšťadlami** (dietyléter, *n*-hexán, petroléter, acetón)
- **lisovanie** (získavanie silíc napríklad z oplodia citrusových plodov)

Extrakcia do tuku patrí medzi najstaršie spôsoby, je nákladná a časovo náročná, preto sa v súčasnosti používa len na získavanie vzácnych silíc (napríklad z kvetov jazmínu a horkého pomarančovníka). Destilácia vodnou parou je asi najbežnejším izolačným postupom,

pomocou ktorého možno získať silice z rôznych častí rastliny (kvety, listy, drevo, semená, oplodie plodov, živica, prípadne sa využíva celá rastlina).

Poznámka ku extrakcii do tuku.

V praxi sa postupuje tak, že sa čerstvo natrhané kvety poukladajú na tenkú vrstvu zmesi viacerých tukov, ktorá je nanosená na skle. Tuk potom zachytí silicu, ktorá sa z kvetov vyparuje. Čerstvé kvety sa opakovane ukladajú na tuk tak dlho, až je ten postupne nasýtený. Tuk nasýtený silicou sa nazýva **pomáda**. Tá sa potom extrahuje etanolom. Extrakt sa vymrazí a vypadnutý nerozpustný podiel sa separuje filtráciou. Výsledný filtrát sa nazýva **laváž** (z franc. *lavage*), z ktorej sa oddestiluje etanol a získané rezíduum je zafinované ako **absolútna silica**.

3.5.5. Konštrukcia stavebného bloku C₄N

V prírodných látkach je uvedený stavebný blok reprezentovaný pyrolidínovým systémom a je tvorený z neproteinogénnej aminokyseliny L-ornitínu. U živočíchov je uvedená aminokyselina generovaná z L-arginínu v močovinovom cykle. U rastlín vzniká z kyseliny L-glutámovej (Schéma 40).

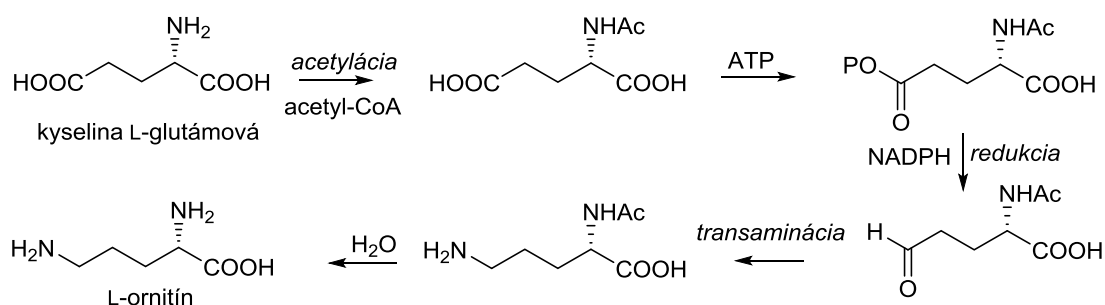


Schéma 40. Biosyntéza L-ornitínu v rastlinách.

Ornitín disponuje δ- a α-aminoskupinami, pričom pri tvorbe syntónu C₄N je implementovaný práve ten skôr zmienený dusíkový atóm. Karboxylová a α-aminoskupina sú z molekuly pri konštrukcii pyrolidínového kruhu odstránené. Keďže zmienený heterocyklus je prítomný v alkaloidoch (nikotín, kokaín a iné) a ich producentmi sú predovšetkým rastliny, ilustrácia tvorby tohto kruhu je prezentovaná na sekvencii, ktorá predstavuje počiatkové kroky pri biosyntéze kokaínu. L-Ornitín je procesom dekarboxylácie modifikovaný na putrescín, metyláciou dusíkového atómu pomocou SAM vzniká následne N-metylputrescín. Ten

prostredníctvom oxidačnej deaminácie, katalyzovanej diaminooxidázou (DAO) poskytuje aminoaldehyd, ktorý je transformovaný na cyklický imín cez vnútromolekulový proces tvorby imíniového iónu (Schéma 41). Enzým diaminooxidáza požaduje diamín ako substrát a oxiduje jednu aminoskupinu, využívajúc pritom molekulový kyslík.

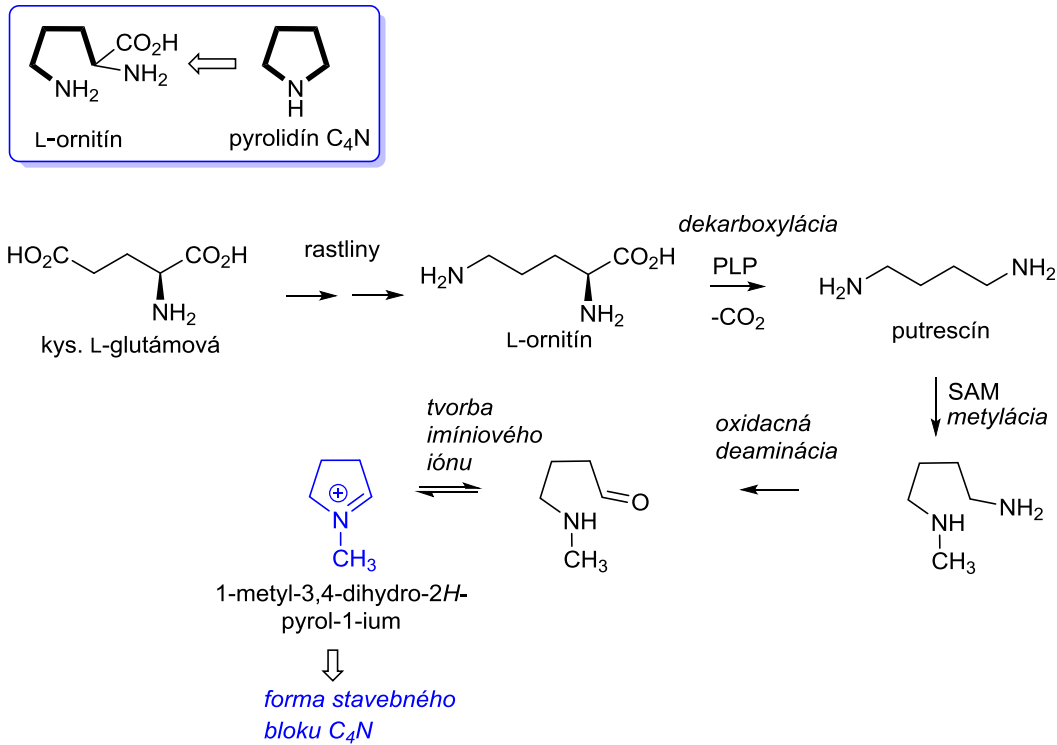


Schéma 41. Biosyntéza stavebného bloku C₄N.

3.5.6. Konštrukcia stavebného bloku C₅N

Biosyntéza stavebnej jednotky C₅N (v prírodných látkach vystupuje ako piperidínový kruh a je zastúpený hlavne v alkaloidoch) vychádza z aminokyseliny L-lyzínu a z hľadiska konštrukčného je podobná biosyntéze stavebného bloku C₄N. Rovnako tak aj v tomto prípade je skôr využívaná ε-aminoskupina a α-aminoskupina sú spolu s karboxylovou eliminované v procese biosyntézy (Schéma 42).

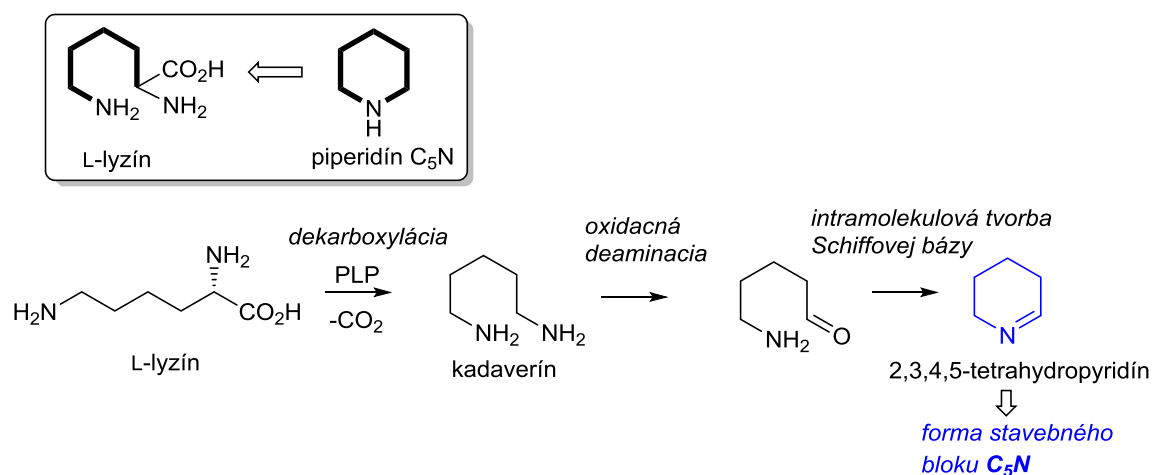


Schéma 42. Biosyntéza stavebného bloku C₅N.

3.6. Mannichova reakcia ako jeden z konštrukčných mechanizmov

Jedným z dôležitých konštrukčných mechanizmov v biosyntéze prírodných látok je **Mannichova reakcia**, veľmi často aplikovaná predovšetkým v biosyntéze alkaloidov. Ide o trojkomponentnú reakciu, pri ktorej v prvom kroku dochádza najskôr k tvorbe imíniovej soli, a to reakciou primárneho alebo sekundárneho amínu s reaktívnou karbonylovou zlúčeninou. Následným nukleofilným atakom tretieho komponentu (zlúčenina poskytujúca enol alebo enolátový ión) na generovaný imíniový kation (*Schéma 43*) je kreovaná požadovaná štruktúra, niekedy označovaná aj ako Mannichova báza. Dôležitou črtou tejto reakcie je skutočnosť, že prostredníctvom nej sme schopní implementovať do výslednej molekuly dva typy väzieb (uhlík-uhlík a uhlík-dusík). Mannichova reakcia našla svoju aplikáciu napríklad v biosyntéze jednoduchých β-karbolínových alkaloidov (*Schéma 44*), alkaloidov obsahujúcich tetrahydroizochinolínový skelet, ópiových alkaloidov ako sú papaverín, morfin, tebaín, kodeín, tropánových alkaloidov a ďalších, pre niektoré z menovaných príkladov pozri aj *Schému 27* (kapitola 3.5.)

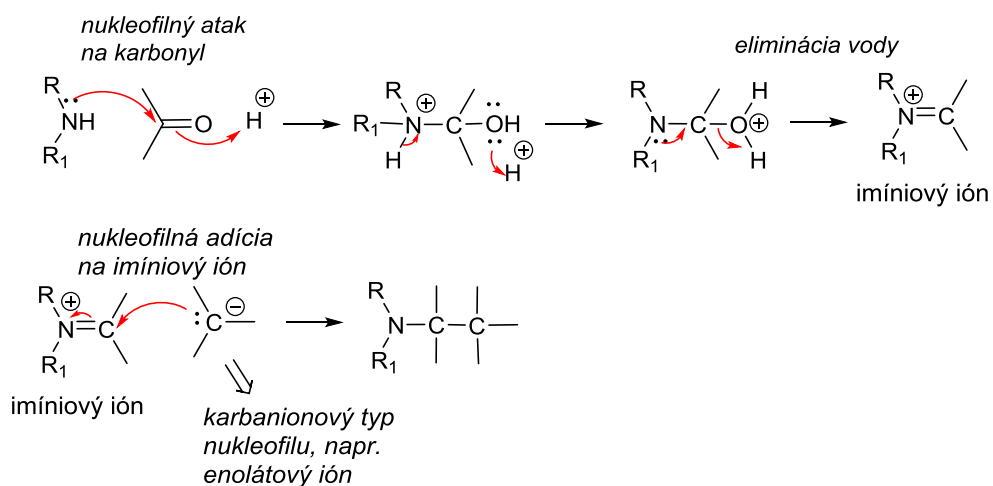


Schéma 43. Princíp Mannichovej reakcie.

Aplikácia Mannichovej reakcie v biosyntéze alkaloidov

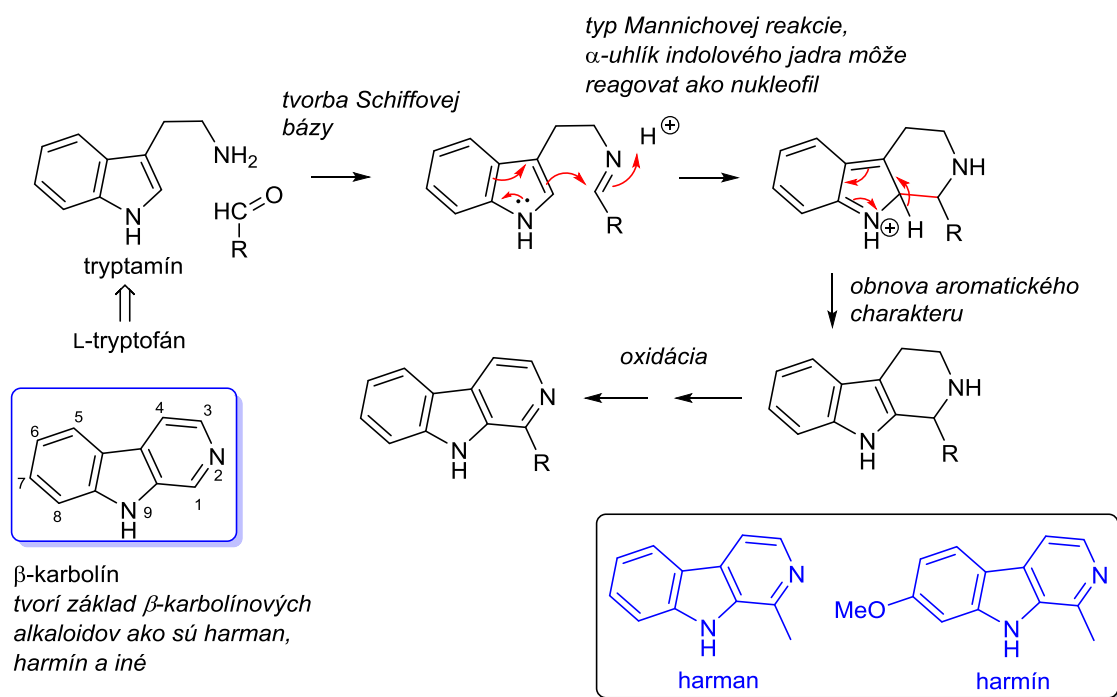
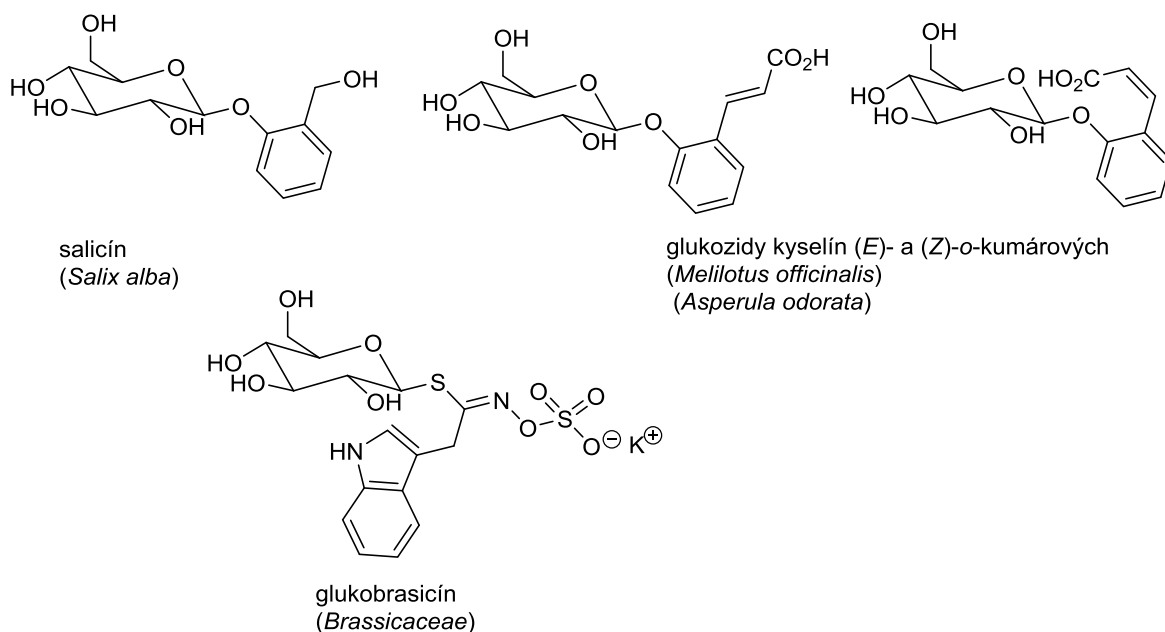


Schéma 44. Aplikácia Mannichovej reakcie. Biosyntéza jednoduchých β -karbolínových alkaloidov.

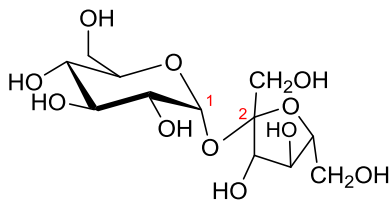
3.7. Glykozylácia ako jeden z konštrukčných mechanizmov

Mnohé z biosyntetizovaných látok sa v prírodných zdrojoch vyskytujú vo forme glykozidov (Obr. 9). Pre uvedenú modifikáciu, teda implementáciu cukornej jednotky a konštrukciu zodpovedajúcich O-, N-, S- a aj C-glykozidov sú potrebné sacharidové templáty.



Obrázok 9. Príklady niektorých typov prírodných glukozidov.

Substrátom pre glykozyláciu je príslušný komplex uridíndifosfát-cukor, konkrétne napríklad UDP-glukóza (inak v prírode asi najviac využívaná), ktorá je syntetizovaná z glukóza-1-fosfátu a UTP (uridíntrifosfát). Samotná glukozylácia prebieha S_N2 mechanizmom, keďže UDP-glukóza vlastní ľahko odstupujúcu skupinu v α -pozícií cukornej jednotky, výsledný produkt má potom β -konfiguráciu (Schéma 45). Iné UDP-cukry ako napríklad UDP-galaktóza, UDP-xylóza sú rovnako tak používané pre konštrukciu glykozidov, obsahujúcich inú cukornú jednotku. Ich hydrolýza a uvoľnenie aglykónu je docielené špecifickými hydrolytickými enzýmami ako sú napríklad β -glukozidáza pre β -glukozidy a β -galaktozidáza pre β -galaktozidy. Chemizmus tohto procesu je ilustrovaný v Schéme 46. Hydrolyzované sú aj N- a S-glykozidy. Na druhej strane, C-glykozidy sú voči podmienkam kyslej hydrolýzy stabilné. Ďalej si všimnime si, že niektoré dôležité sacharidy ako napríklad sacharóza (Obr. 10) alebo škrob vlastnia α -glykozidové spojenia. Tie zrejme vznikajú cez dvojitý S_N2 proces (Schéma 45).



sacharóza

β -D-fruktofuranozyl- α -D-glukopyranozid

Obrázok 10. Štruktúra sacharózy.

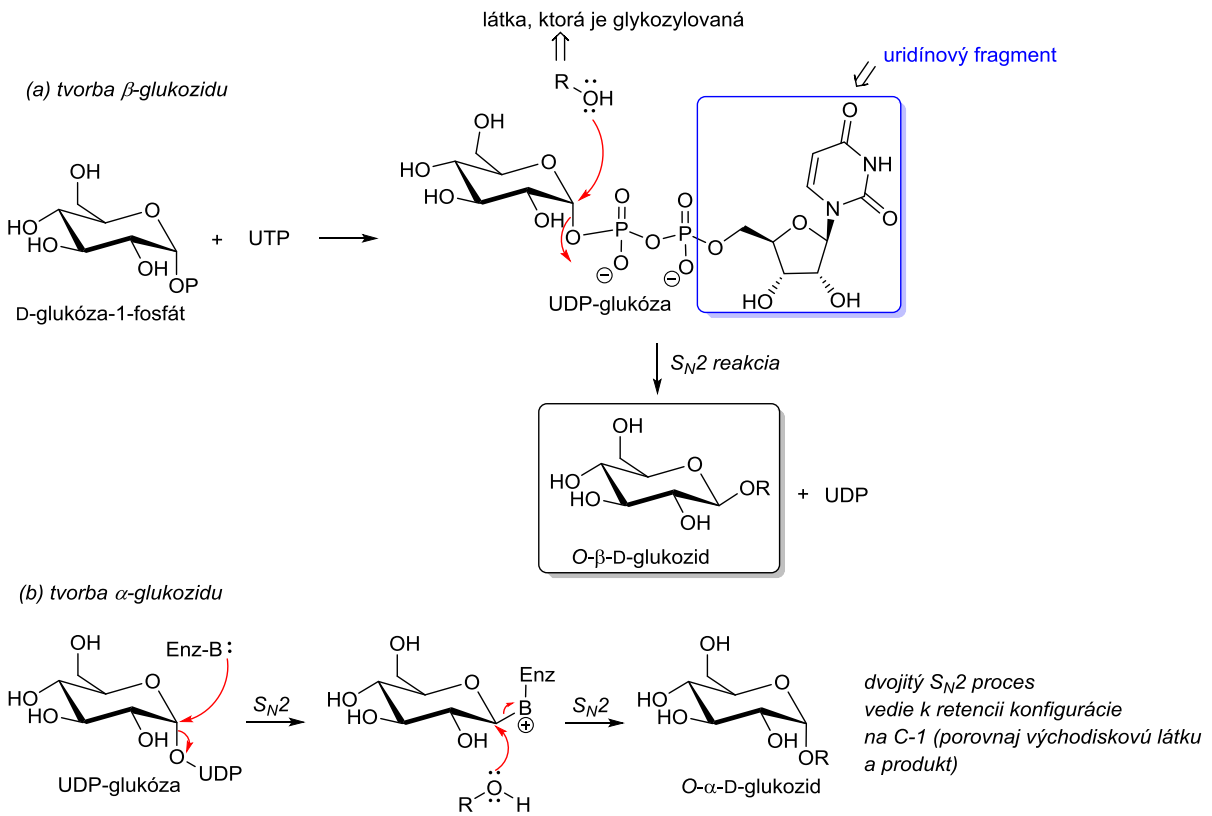


Schéma 45. Glykozylačné reakcie: O-glukozylácia.

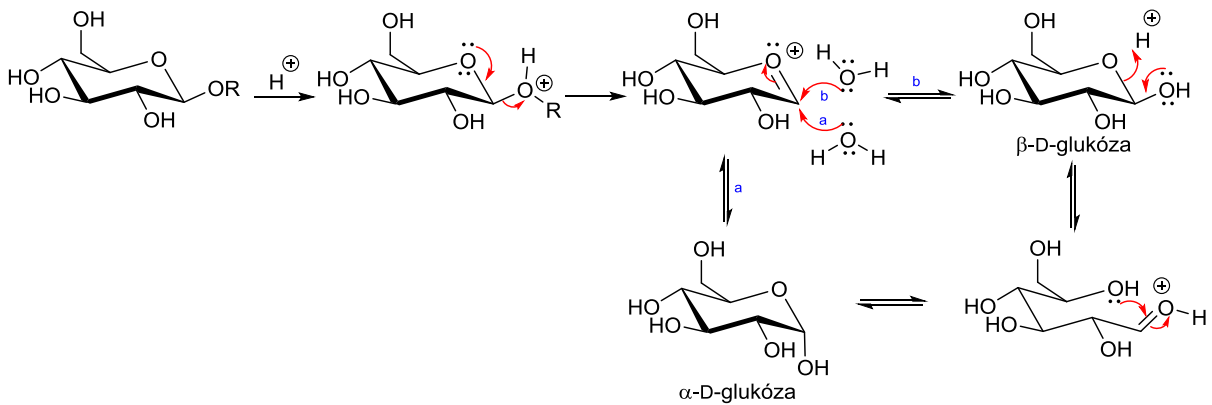


Schéma 46. Hydrolýza O-glukozidov.

C-Glykozidy, ktoré sú v prírode oveľa menej časté, sú tvorené mechanizmom podobným C-alkylácií, ktorá vyžaduje dostupnosť vhodného nukleofilného uhlíkového atómu, napríklad aromatický systém aktivovaný hydroxylovými skupinami (Schéma 47). Takouto formou sú viazané niektoré fenolové zlúčeniny. Výsledný C-glykozid tak obsahuje novú väzbu uhlík-uhlík a pre jej štiepenie je potrebná oxidácia, nie hydrolýza.

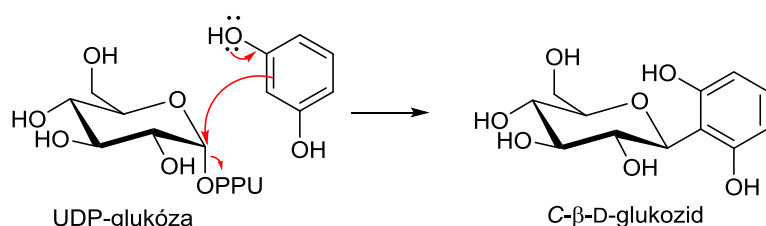


Schéma 47. C-Glukozylácia.

3.8. Wagnerove-Meerweinove prešmyky ako jeden z konštrukčných mechanizmov

Sú charakteristické predovšetkým pri biosyntéze terpénov a steroidných látok. Sú realizované z dôvodov tvorby viac stabilnejšieho karbkatiónu, alebo odstránenia pnutia v generovaných kruhoch a sprevádzajú predovšetkým procesy, pri ktorých dochádza k tvorbe karbkatiónu ako sú S_N1 alebo E1 reakcie. Ide o 1,2-posun hydridového aniónu, metylu alebo alkylových skupín. Ojedinele sa môžeme stretnúť aj s 1,3-alternatívou takého posunu (Schéma 48).

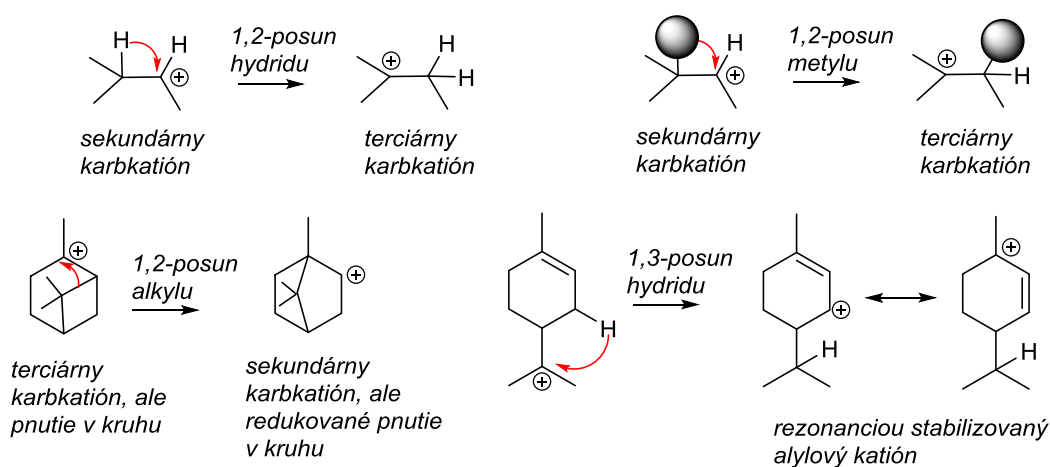


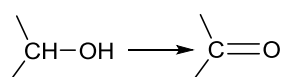
Schéma 48. Príklady Wagnerových-Meerweinových prešmykov.

3.9. Oxidačné a redukčné reakcie ako konštrukčné mechanizmy

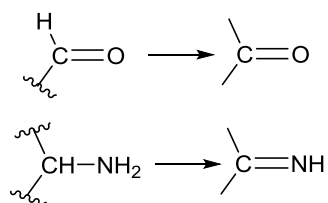
Oxidácie a redukcie sú rovnako tak súčasťou reakčných sekvencií, ktoré vedú k biosyntéze alebo modifikácií sekundárnych metabolitov. Tieto procesy nie sú vždy kompletne vysvetlené, resp. pochopené, ale nasledovné všeobecné črty, ktoré budú komentované, sú viac-menej rešpektované. Tieto procesy môžu byť klasifikované podľa použitého typu enzýmu a mechanizmu samotnej transformácie.

3.9.1. Dehydrogenázy

Dehydrogenázy eliminujú dva vodíkové atómy a odovzdávajú ich vhodnému kofaktorovému akceptoru. Ak ide o oxidáciu ilustrovanú nasledovnou schémou,



potom nikotínamidadeníninukleotid (NAD^+) alebo nikotínamidadeníninukleotid fosfát (NADP^+) má tendenciu fungovať ako akceptor vodíka. Jeden vodík zo substrátu (ten, ktorý je viazaný na uhlíkový atóm) je inkorporovaný ako hydridový anión do koenzýmu a druhý (ako protón) prechádza do prostredia (*Schéma 49*). NADP^+ môže byť tiež použitý pri oxidáciach uvedených nižšie.



Opačný proces, teda redukcia, je rovnako tak prezentovaná v *Schéme 49* a ako taká môže byť porovnaná s chemickou alternatívou, používajúcou komplexné hydridy kovov (LiAlH_4 alebo NaBH_4), a to v zmysle nukleofilnej adície hydridu a následnej protonizácie. Redukované formy NADH a NADPH sú považované za donory hydridu (redukčné ekvivalenty).

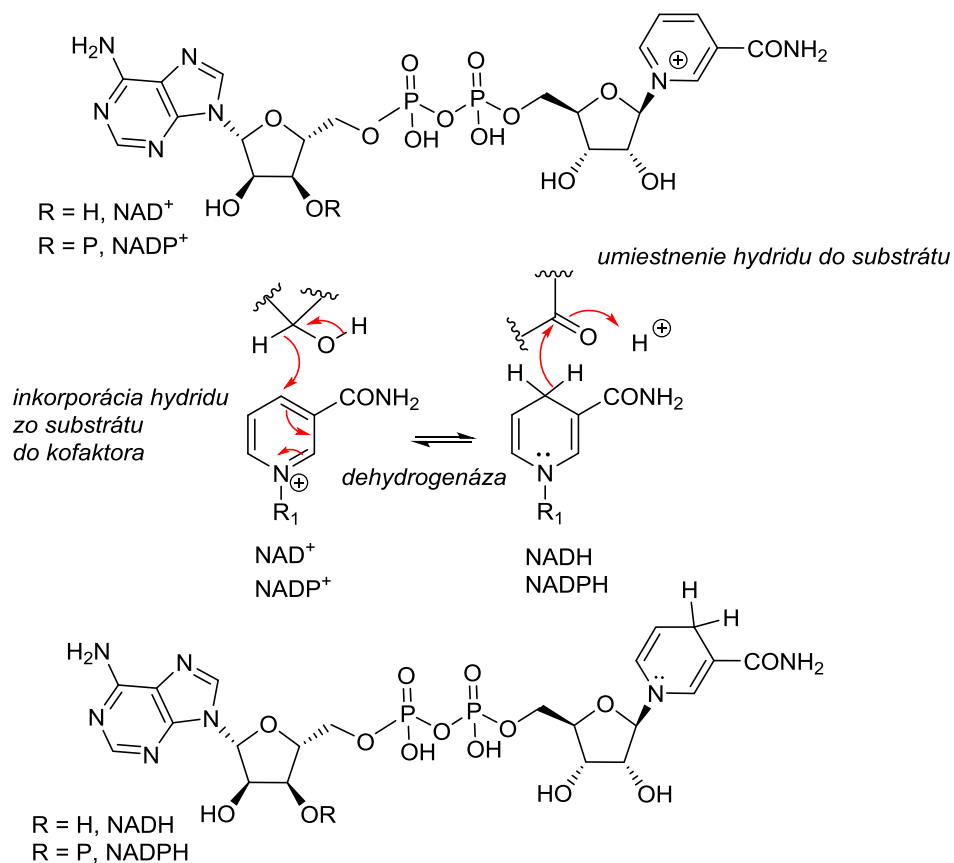
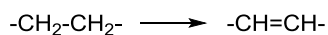


Schéma 49. Oxidačno-redukčné procesy katalyzované dehydrogenázami.

Ak je oxidačným procesom konverzia alkánu na alkén,



koenzýmom použitým ako akceptor je zvyčajne flavínadenínindinukleotid (FAD) alebo flavínadenínmononukleotid (FMN). Tieto entity sú viazané k enzýmu vo forme flavoproteínu a prijímajú dva vodíkové atómy, hydridový atóm zo substrátu a protón z prostredia. Systém môže pracovať aj v opačnom móde s redukovanou formou kofaktora (FADH₂, resp. FMNH₂) (Schéma 50).

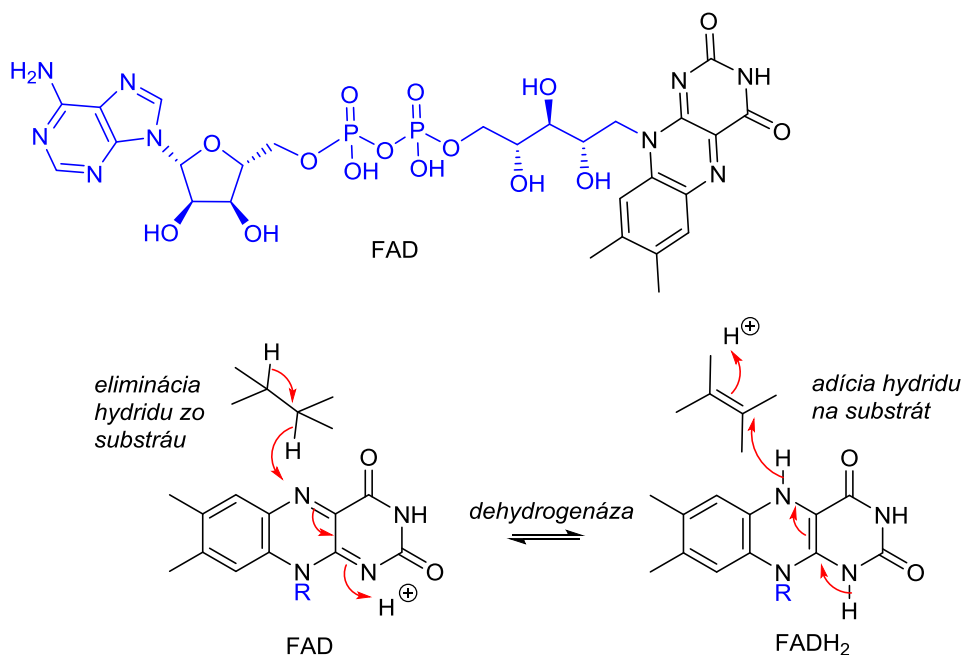
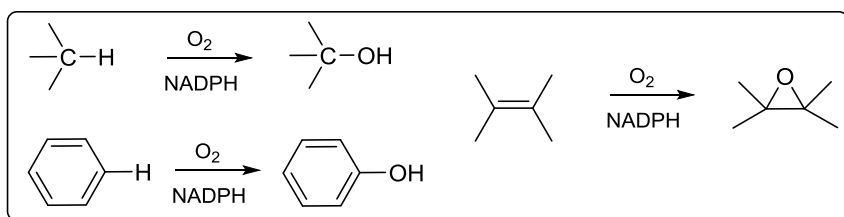


Schéma 50. Oxidačno-redukčné procesy katalyzované dehydrogenázami.

3.9.2. Monoxygenázy

Oxygenázy katalyzujú priamu adíciu kyslíka z molekuly O_2 na substrát. Sú klasifikované na mono- a dioxygenázy podľa toho, či jeden alebo oba kyslíkové atómy sú zabudované do štruktúry, ktorá má byť oxidovaná. V prípade monoxygenáz, druhý atóm kyslíka je redukovaný na vodu vhodným donorom vodíkov ako napríklad NADH, resp. NADPH alebo kyselina askorbová. Dôležitými príkladom takýchto enzýmov je **cytochróm P-450 monoxygenázový systém**, ktorý zahŕňa sústavu monoxygenáz, ktoré sa podieľajú na dôležitých biologických hydroxyláciach, vrátane detoxikačných procesov prebiehajúcich pri metabolizme xenobiotík (cudzorodé látky) naprieč celým spektrom živých organizmov. Tento typ enzýmov patrí do kategórie hém-obsahujúcich enzýmov, kde železo je v oxidačnom stave Fe^{3+} a je schopný katalyzovať hydroxylácie alifatických a aromatických systémov ako aj tvorbu epoxidov z alkénov (*Obr. 11*).



Obrázok 11. Príklady oxidačných reakcií katalyzovaných cytochróm P-450 monoxygenázovým systémom.

Aromatická hydroxylácia, katalyzovaná monoxygenázami zahŕňa tvorbu epoxidového intermediátu, jeho otvorenie, migráciu hydridového iónu na susedný uhlíkový atóm a následnú enolizáciu. Pomocou izotopového značenia sa zistilo, že veľký podiel týchto vodíkov zostáva v produkte, aj keď kreovanie výsledného enolu spôsobuje určitú stratu tohto atómu a tvorbu dvoch produktov (Schéma 51).

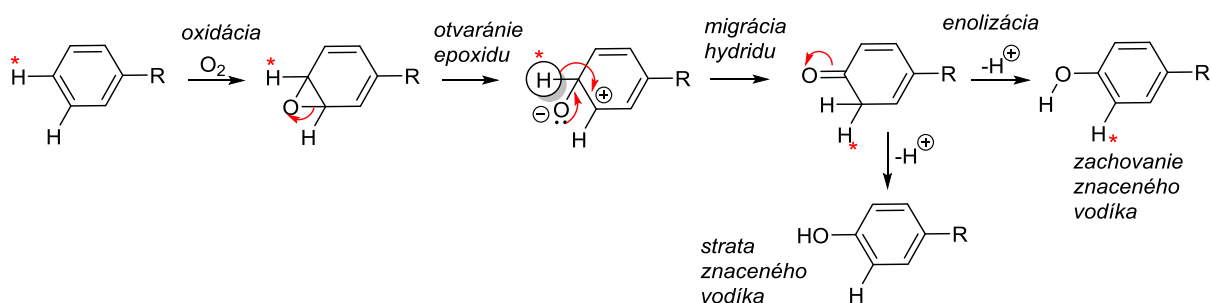


Schéma 51. Navrhnutý mechanizmus aromatickej hydroxylácie.

V niektorých prípadoch biosyntézy sekundárnych metabolitov, oxidácia *o*-hydroxy-metoxysubstituovaných aromatických zlúčenín poskytuje metyléndioxykupinu, pričom aj na tomto type oxidácií participuje cytochróm P-450 monoxygenáza. Tento enzým hydroxyluje metyl a vedie k tvorbe hemiacetálového intermediátu, ktorý môže cyklizovať za vzniku vyššie uvedeného metyléndioxy-mostíka (acetál fomaldehydu) cez iónový mechanizmus (Schéma 52).

Uvedený typ acetálu je možné vidieť napríklad v štruktúre tetrahydroizochinolínových alkaloidov izolovaných z kaktusu *Lophophora williamsii* (napríklad lofoforín, Schéma 52).

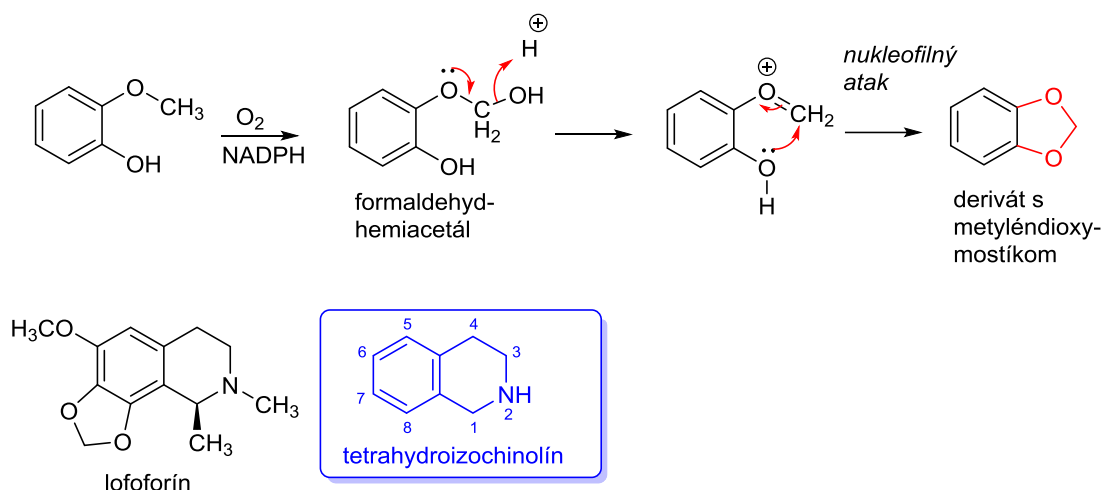


Schéma 52. Príklad oxidácie metylovej skupiny cez katalýzu monoxygenázami.

3.9.3. Dioxygenázy

Dioxygenázy inkorporujú oba kyslíkové atómy z molekuly O_2 do príslušného substrátu a sú sprevádzané následným štiepením väzieb. V prípade aromatických zlúčenín dochádza k fragmentácii kruhov. Intermediátmi týchto oxidačných procesov sú cyklické peroxidy (dioxetány) (Schéma 53).

Niektoré dioxygenázy využívajú dva akceptorové substráty a implementujú po jednom kyslíkovom atóme do každej z nich. Medzi takýto typ enzýmov patrí aj 2-oxoglutarát-dependentná dioxygenáza, ktorá hydroxyluje jeden substrát a súčasne tiež transformuje kyselinu 2-oxoglutarátovú na kyselinu jantárovú za uvoľnenia oxidu uhličitého. Príkladom takejto aplikácie v prírode je modifikácia (-)-hyoscyamínu na (-)-hyoscín (skopolamín) (Schéma 54).

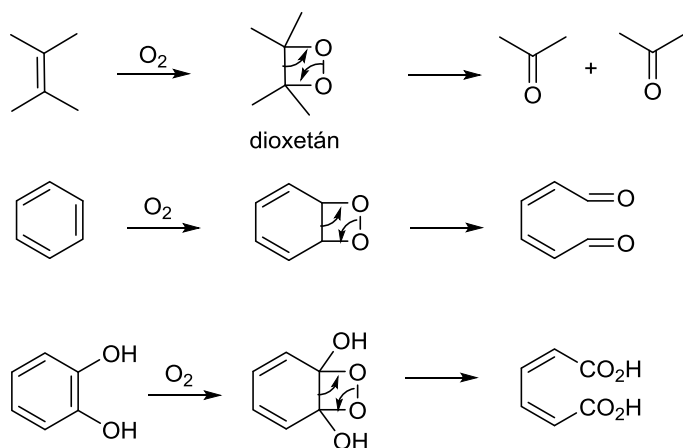


Schéma 53. Príklady oxidačných reakcií katalyzovaných dioxygenázami.

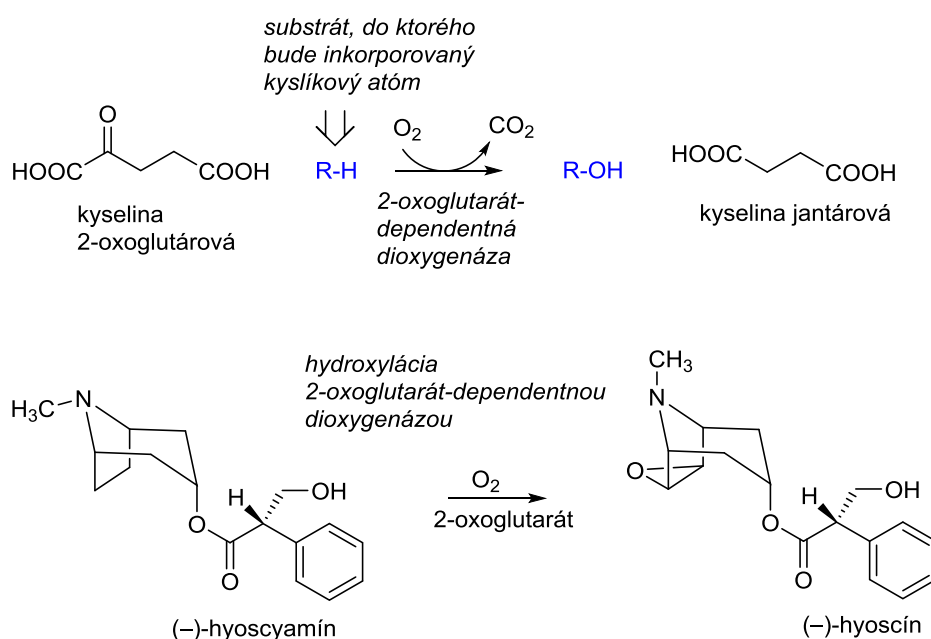


Schéma 54. Príklad dioxygenázy, ktorá využíva dva akceptorové substráty.

3.9.4. Aminooxidázy

Aminooxidázy sú enzýmy, ktoré sa podieľajú na transformácii amínov na aldehydy a sú často využívané v metabolických procesoch. Uvedená skupina zahŕňa monoaminooxidázy (MAO) a diaminooxidázy (DAO). MAO využívajú ako kofaktor FAD a O_2 a sú zodpovedné za iniciačnú dehydrogenáciu vedúcu k imínu ako intermediátu, ktorý je následne podrobený spontánnej hydrolýze, poskytujúcej aldehyd a amoniak (*Schéma 55*). U človeka sa uvedený enzým, ktorý existuje v dvoch izoformách (MAO_A a MAO_B) podieľa na metabolizme biogénnych amínov ako je noradrenalín, adrenalín, serotonín, dopamín a histamín (*Obr. 12*). Tak napríklad noradrenalín a serotonín sú prednostne oxidované cez MAO_A, na druhej strane metabolizmus dopamínu využíva izoformu MAO_B. Obe formy enzýmov participujú aj na biotransformácii xenobiótík, obsahujúcich primárnu aminoskupinu.

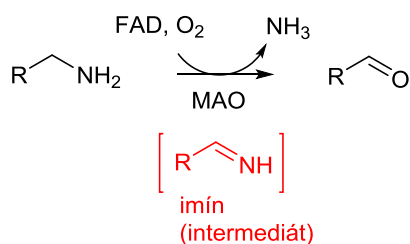
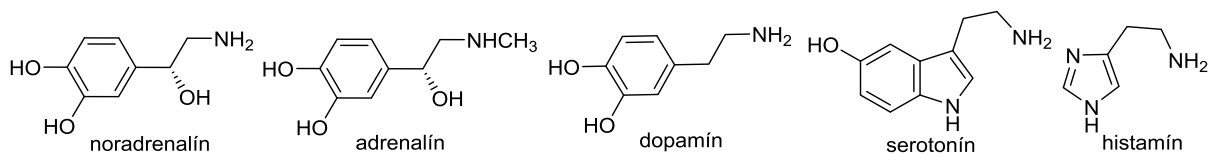


Schéma 55. Oxidačná deaminácia katalyzovaná MAO.



Obrázok 12. Príklady biogénnych amínov metabolizovaných pomocou MAO.

Diaminooxidázy vyžadujú diamínový substrát a oxidujú jednu aminoskupinu používajúc O_2 , pričom výstupom reakcie je tvorba aldehydu. Peroxid vodíka a amoniak sú vedľajšími produktmi takýchto modifikácií (Schéma 56). DAO používa ako kofaktor TPQ (Schéma 57). Produkovaný aminoaldehyd, vzhľadom na svoju štruktúru, môže byť ďalej transformovaný na cyklický imín (pozri, Schémy 41 a 42). Uvedená skutočnosť je využívaná napríklad pri biosyntéze tropánových alkaloidov a alkaloidov obsahujúcich piperidínový skelet.

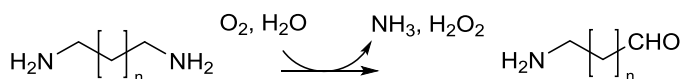


Schéma 56. Oxidačná deaminácia katalyzovaná DAO.

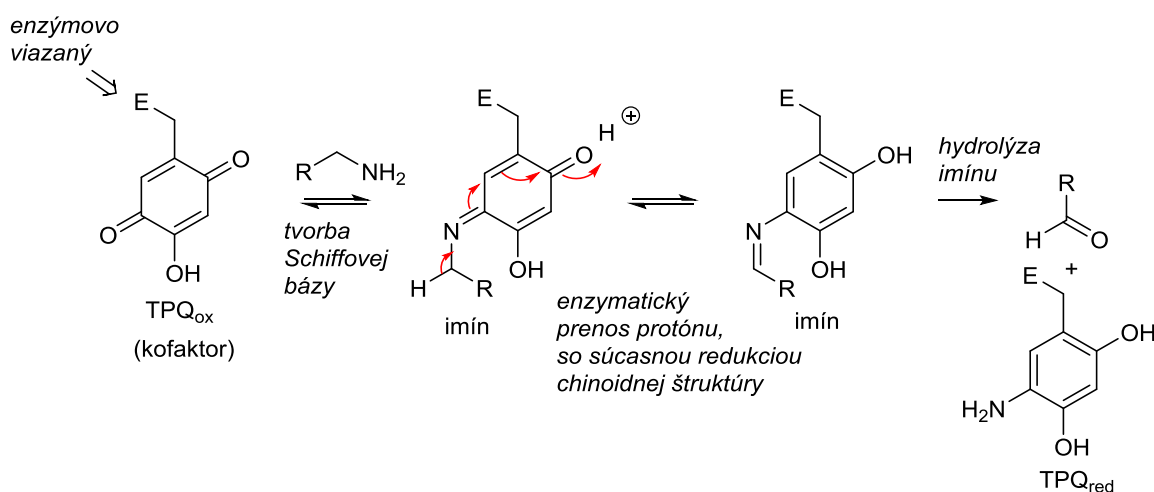


Schéma 57. Navrhnutý mechanizmus oxidačnej deaminácie katalyzovanej DAO.

3.10. Sacharidy ako východiskové látky pre biosyntézu sekundárnych metabolitov

Aj napriek tomu, že sacharidy, ako najrozšírenejšia skupina látok zastúpená naprieč celým spektrom živých organizmov, patria do kategórie primárnych metabolitov, budú v tejto kapitole diskutované niektoré základné typy reakcií, ktoré poskytujú tieto molekuly v rámci primárneho metabolizmu aj z toho dôvodu, že základ biosyntézy sekundárnych metabolitov sa odvíja práve z cukorných templátov.

Hexózy a pentózy sú najčastejšie monosacharidové jednotky, ktoré nachádzame v prírode. Procesom fotosyntézy je na začiatku produkovaný najjednoduchší cukor D-fosfoglyceraldehyd-3-fosfát, dve molekuly ktorého sú použité na konštrukciu D-glukóza-6-fosfátu, ktorý vstupuje do glykolýzy, kde je následne modifikovaný na kyselinu pyrohroznovú. Komplexom reakcií Calvinového cyklu môže byť spomínaný D-fosfoglyceraldehyd-3-fosfát využitý na výstavbu monosacharidov, obsahujúcich v základnom skelete 5 uhlíkov ako sú ribóza-5-fosfát, ribulóza-5-fosfát a xylulóza-5-fosfát (Schéma 58).

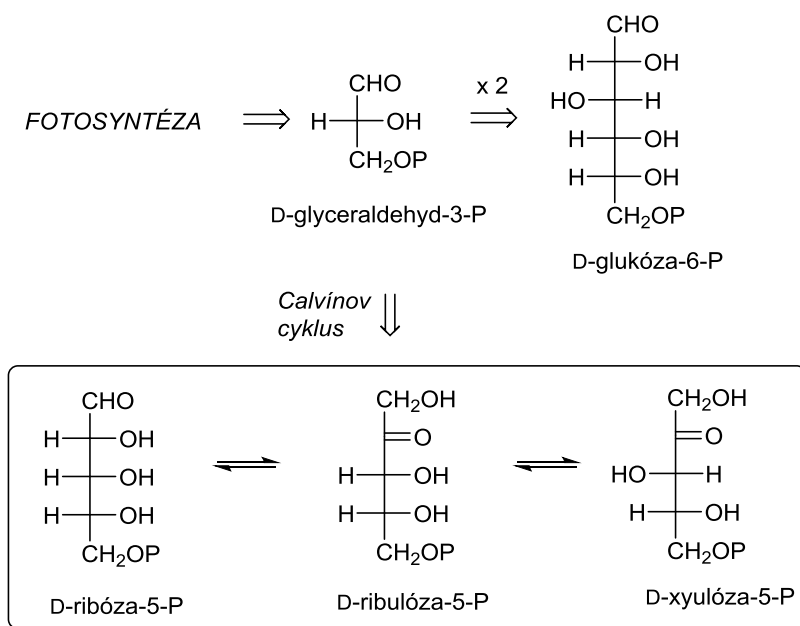


Schéma 58. Príklad primárneho metabolizmu u sacharidov.

Nižšie uvedené procesy zahŕňajú niektoré zo základných reakcií, ktoré sú využívané pri biochemických premenách cukorných substrátov. Príkladom je napríklad **epimerizácia**, ktorá sa uplatní pri vzájomnej premene D-ribulóza-5-fosfátu na D-xylulóza-5-fosfát (Schéma 59). Uvedený proces zhŕňa zmenu konfigurácie na stereogénnom centre, ktoré priamo susedí s karbonylovou skupinou a pravdepodobne prebieha cez spoločný enolový tautomér. Uvedený proces je katalyzovaný enzýmom D-ribulózafostát-3-epimerázou. Substrátom pre epimerizáciu je častejšie príslušný UDP-cukor ako zodpovedajúci fosforylovaný monosacharid.

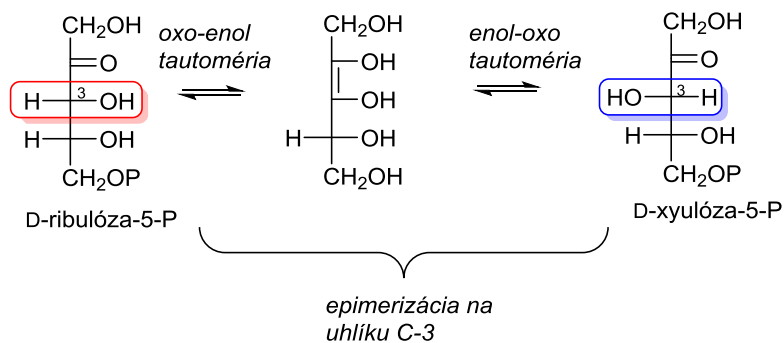


Schéma 59. Príklad epimerizačnej reakcie.

Ďalším príkladom je vzájomná premena aldózy na ketózu (*aldose-ketose interconversion*), ilustrovaná na modifikácií D-glukóza-6-fosfátu na D-fruktóza-6-fosfát a rovnako ako v predchádzajúcom prípade, aj tu reakcia prebieha cez spoločný enolový intermediát (*Schéma 60*) a je katalyzovaná enzýmom D-glukóza-6-fosfát izomerázou.

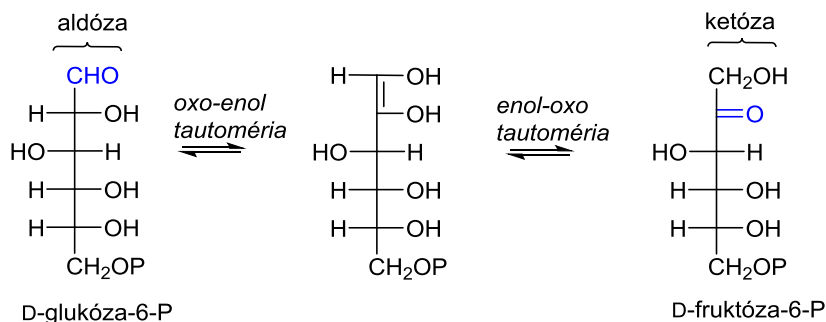


Schéma 60. Príklad izomerizačnej reakcie (premena aldózy na ketózu).

Prenosom dvojuhlíkovej jednotky pri reakciách katalyzovaných transketolázami je možné modifikovať dĺžku základného reťazca príslušného sacharidu. Uvedené enzýmy sú schopné odstrániť C₂ fragment z ketóz takých ako je napríklad D-fruktóza-6-P alebo D-xyulóza-5-P cez participáciu kofaktora akým je tiamíndifosfát (TPP, pre jeho štruktúru, pozri *Schéma 15*). Nukleofilný atak TPP na karbonylovú skupinu poskytuje adukt, ktorý podlieha fragmentácií procesom reverznej aldolovej reakcie, čoho výsledkom je vznik D-erytróza-4-P a dvojuhlíkoveho aniónu, pripojenému k TPP (*Schéma 61*).

Ďalšími reakciami typickými pre sacharidy sú oxidácie. Enzýmy, ktoré ich katalyzujú, využívajú typické kofaktory ako NAD⁺, resp. NADP⁺. Oxidácia na C-1 modifikuje aldózy na kyseliny aldónové. Tak napríklad oxidácia D-glukóza-6-P vedie k tvorbe D-glukonolaktónu-6-P a následne po hydrolýze poskytuje zodpovedajúcu kyselinu aldónovú (*Schéma 62a*).

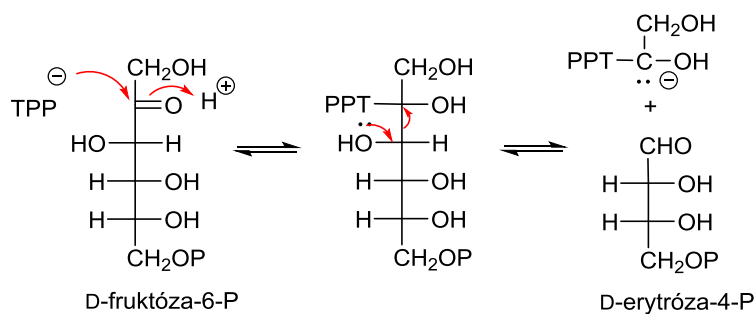
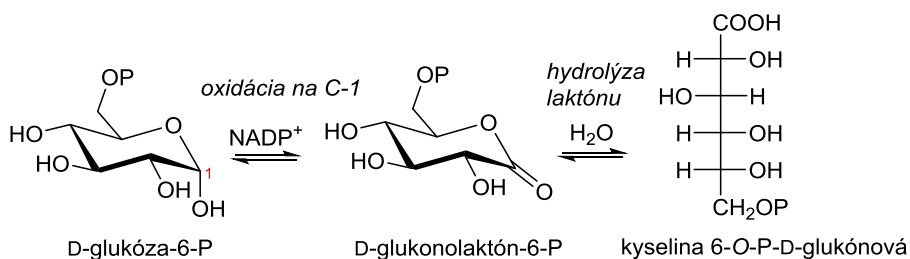


Schéma 61. Príklad skracovania dĺžky základného reťazca u sacharidových molekúl.

Oxidácia hydroxyskupiny na uhlíku C-6 u príslušných hexóz generuje zodpovedajúce kyseliny urónové. Do príslušnej oxidácie vstupujú monosacharidy ako UDP-substráty (Schéma 62b).

(a) tvorba aldónových kyselín



(b) tvorba urónových kyselín

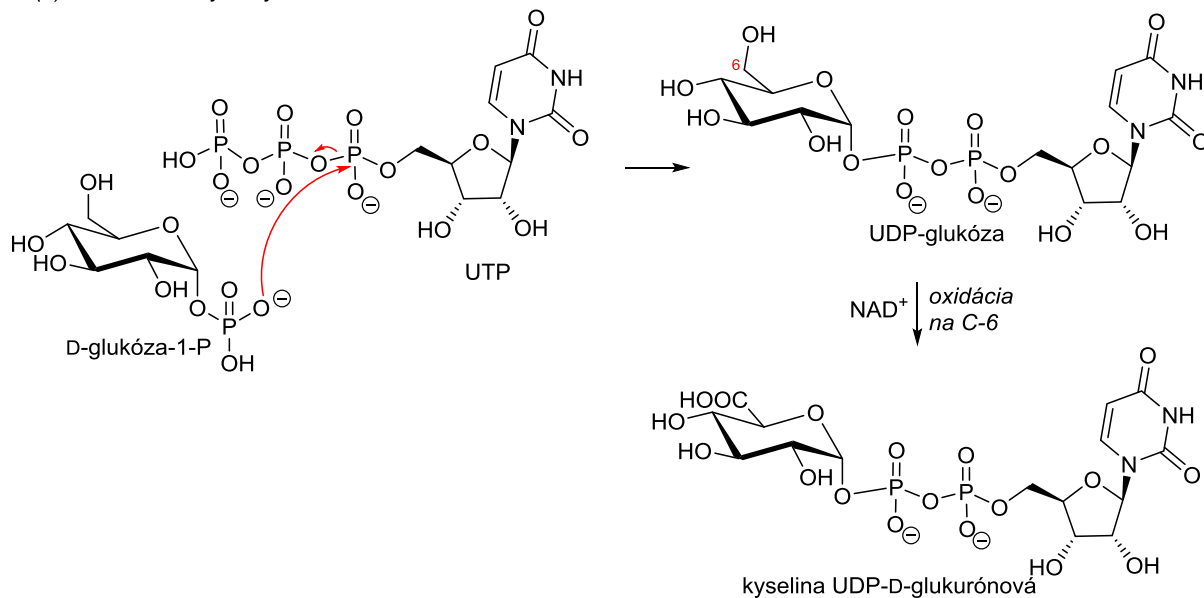


Schéma 62. Príklady oxidácie hexóz na zodpovedajúce kyseliny.

Na druhej strane, redukcie aldóz a ketóz poskytujú zodpovedajúce alkoholy označované termínom alditoly. Tak napríklad redukciou D-glukózy vzniká D-glucitol, redukcia D-fruktózy vedie k vzniku D-glucitolu a D-manitolu. Enzýmy využívajú ako kofaktory redukované formy NAD^+ a NADP^+ (Schéma 63).

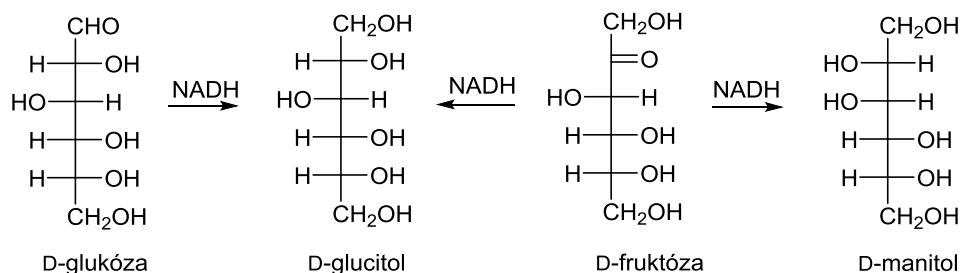


Schéma 63. Redukcia aldóz a ketóz.

Poslednou zmienou reakciou v rámci tejto kapitoly je transaminácia, prostredníctvom ktorej je možné do vhodnej ketózy zabudovať aminoskupinu. Tak napríklad hlavná cesta vedúca k tvorbe D-glukozamínových derivátov je realizovaná cez konverziu D-fruktóza-6-fosfátu na D-glukozamín-6-P a je katalyzovaná transaminázo-izomerázovým enzýmom (Schéma 64).

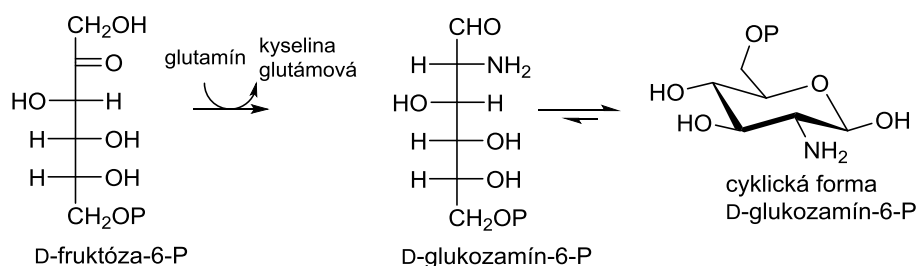
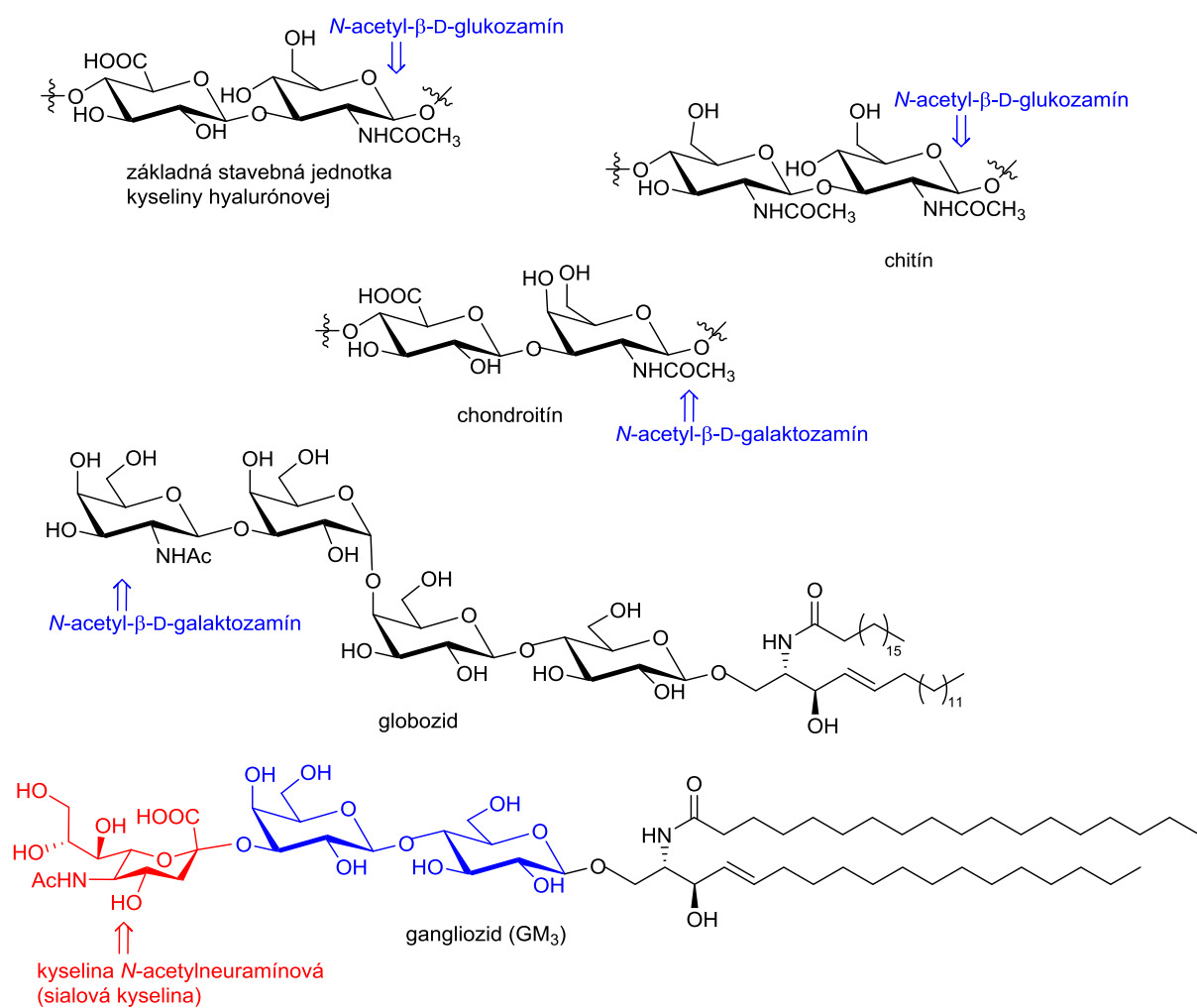


Schéma 64. Konštrukcia aminocukrov.

Vznikajúce aminocukry vo forme ich zodpovedajúcich N-acetylovaných analógov sú prítomné ako stavebné komponenty vo viacerých polysacharidoch ako je napríklad kyselina hyalurónová, chitín alebo chondroitín. Rovnako tak sú zastúpené aj v molekulách glykosfingolipidov, konkrétne v štruktúrach globozidov a gangliozidov (Obr. 13). Aminocukry sú aj neodmysliteľnou súčasťou sialových kyselín (napríklad kyselina N-acetylneuramínová, NANA), ktoré nachádzame už vo vyššie zmienených gangliozidoch.



Obrázok 13. Príklady chránených aminocukrov prítomných v polysacharidoch a glykosfingolipidoch.

Použitá literatura

1. Dewick, P. M.: *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd, UK, 2009.
2. Dewick, P. M. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181–222.
3. Bugg, T. D. H. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 465–493.
4. Thomas, R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 224–248.
5. Miljković, M.: *Carbohydrates*, Springer, New York, 2009.
6. Levy, E. D., Fügedi, P.: *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis, LLC, 2006.
7. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S., Wothers, P.: *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 2001.
8. Sinnott, M. L.: *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, RSC Publishing, 2007, UK.

SEKUNDÁRNY METABOLIZMUS

Úvod do štúdia prírodných látok

Vysokoškolský učebný text

Autorka: doc. RNDr. Miroslava Martinková, PhD.

Vydavateľ: Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Vydavateľstvo ŠafárikPress

Rok vydania: 2024
Počet strán: 66
Rozsah: 3,36 AH
Vydanie: prvé



ISBN 978-80-574-0283-1 (e-publikácia)