

3. OBECNÉ ZÁKLADY BIOENERGETIKY ROSTLIN

3.1 ZDROJE ENERGIE RŮZNÝCH ORGANISMŮ

Energii potřebují živé bytosti

- (1) pro stavbu a údržbu (udržení uspořádanosti) svého těla a pro jeho rozmnožení (reprodukcii);
- (2) pro konání pohybů, k nimž musíme počítat i pohyb látek v organismu a jejich výměna s okolím.

V tom, kolik připadá energie na prvý (stavbu) a druhý (pohyb) cíl a v tom, jaký je základní zdroj energie, je výrazný rozdíl mezi rostlinami a živočichy.

Všechny organismy přijímají ze svého prostředí nějakou formu ušlechtilé energie (kterou lze přeměnit z velké části v práci), využijí z ní co největší podíl a ztráty odevzdají jako teplo do svého okolí. Jsou tedy organismy ostrovy negentropie, které čerpají volnou energii ze svého prostředí a zvyšují obsah entropie v tomto prostředí.

Rostliny nejsou z tohoto pravidla výjimkou, ale mají přece vyjimečné postavení. Uskutečňují vstup energie do biosféry zvenčí, přeměnou energie zachyceného slunečního záření na koncentrovanou energii chemickou. Tu pak používají k již zmíněné stavbě a provozování svého těla.

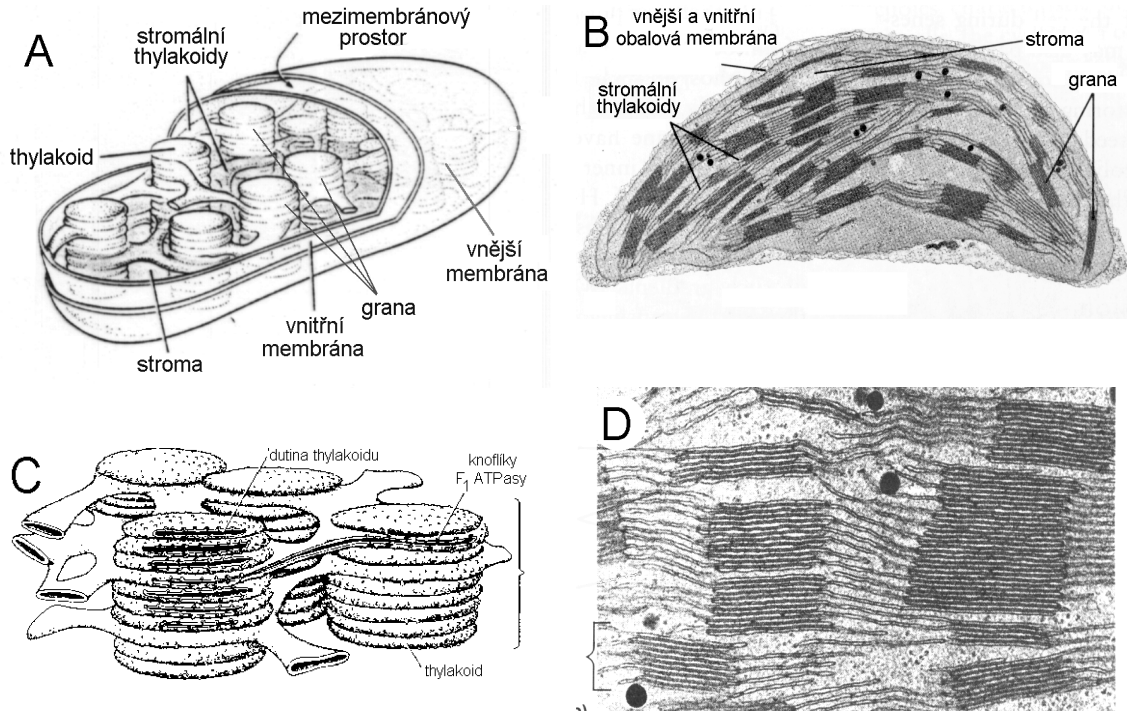
Kromě toho jsou rostliny také vstupem energie do živočišné říše. Její první stupeň v potravním řetězci, býložravci, přeměňují látky, z nichž jsou rostliny postaveny, opět na koncentrovanou chemickou energii a té zas používají (právě tak jako rostliny) ke stavbě svého těla a pohánění jeho úkonů. Rostliny dále poskytují chemickou energii jako látky svých živých či mrtvých těl houbám a heterotrofním mikroorganismům. Ty spolu s živočichy tvoří říši heterotrofií. Pro rostliny je tedy primární energie záření, pro heterotrofy energie chemických vazeb (organických sloučenin).

Zastoupením v biosféře nevelká, ale pro poznání bioenergetiky důležitá skupina, jsou organismy chemolithotrofní (chemoautotrofní), které využívají rozdíl volné energie mezi různými anorganickými látkami pro pohánění svých životních pochodů. Jsou to např. bakterie, které oxidují vodík, amoniak, sirovodík, dvojmocné ionty železa a manganu, ale i bakterie provozující řadu jiných reakcí.

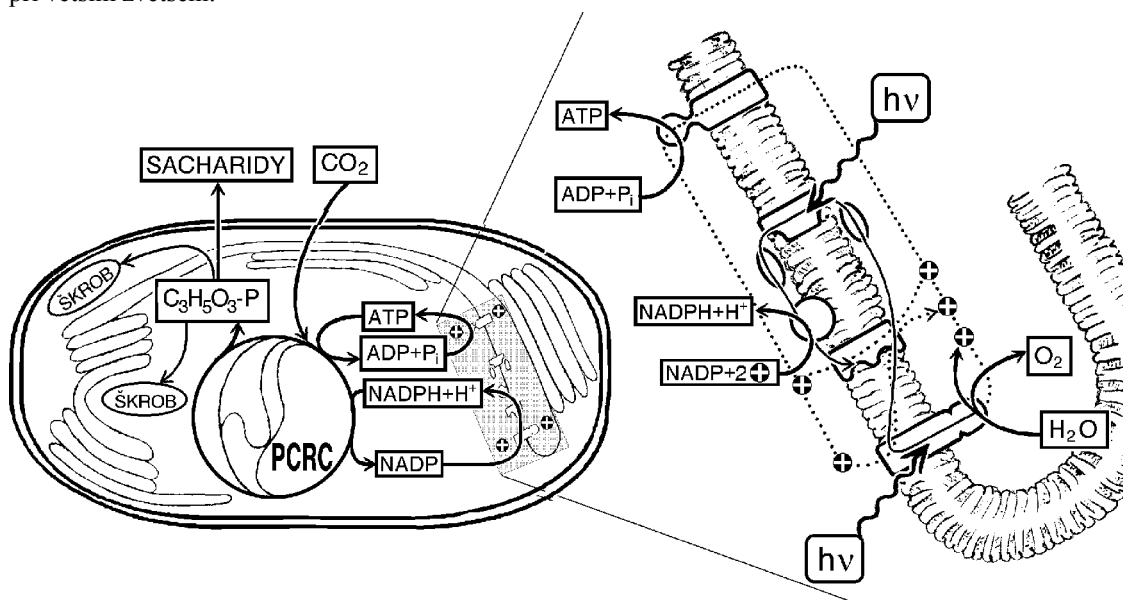
Obdobné postavení mají fotosyntetické bakterie, které provozují tzv. anoxygenní fotosyntézu. U oxygenní fotosyntézy rostlin je prvotním donorem elektronu (vodíku) pro redukci CO_2 voda a její oxidací vzniká kyslík. Fotosyntetické bakterie používají jako prvotního donoru elektronu (vodíku) jiné anorganické sloučeniny (např. H_2S) nebo sloučeniny organické (např. jantar). Žijí např. v anaerobních zonách v hlubších místech a na dně mnohých jezer. I když obývají jen velice úzce vymezený biotop a jejich úhrnný podíl v přeměně energie v biosféře je mizivý, jejich studium velmi významně přispělo k poznání molekulární struktury fotosyntetických membrán a k poznání mechanismu fotosyntézy.

Ve zjednodušeném schématu se pochody v rostlinné a živočišné říši (totéž platí pro ostatní heterotrofy) jeví protichůdné a v celkové bilanci takové jistě jsou. Pochody vytváření koncentrované energie a její základní přeměny jsou u všech organismů velmi podobné, probíhají na podobných strukturách a využívají tytéž základní sloučeniny. To je zřejmé zejména od té doby, co byla všeobecně přijata Mitchellova představa o dvou formách volné energie v buňce a o chemiosmotickém mechanismu jejich přeměny (viz oddíly 3.2.3 až 3.2.5).

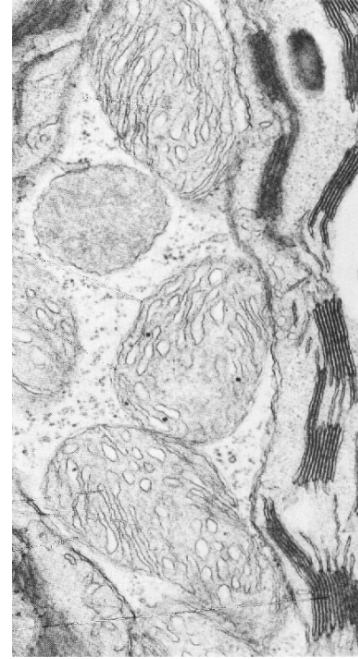
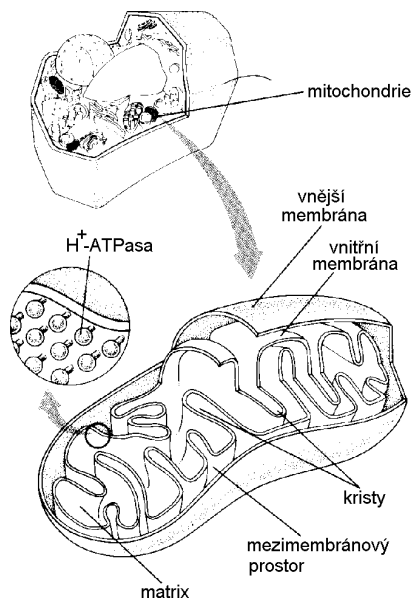
3.2 ROZČLENĚNÍ POCHODŮ V ORGANELÁCH PŘEMĚNY ENERGIE. MEMBRÁNOVÉ A ENZYMOVÉ POCHODY



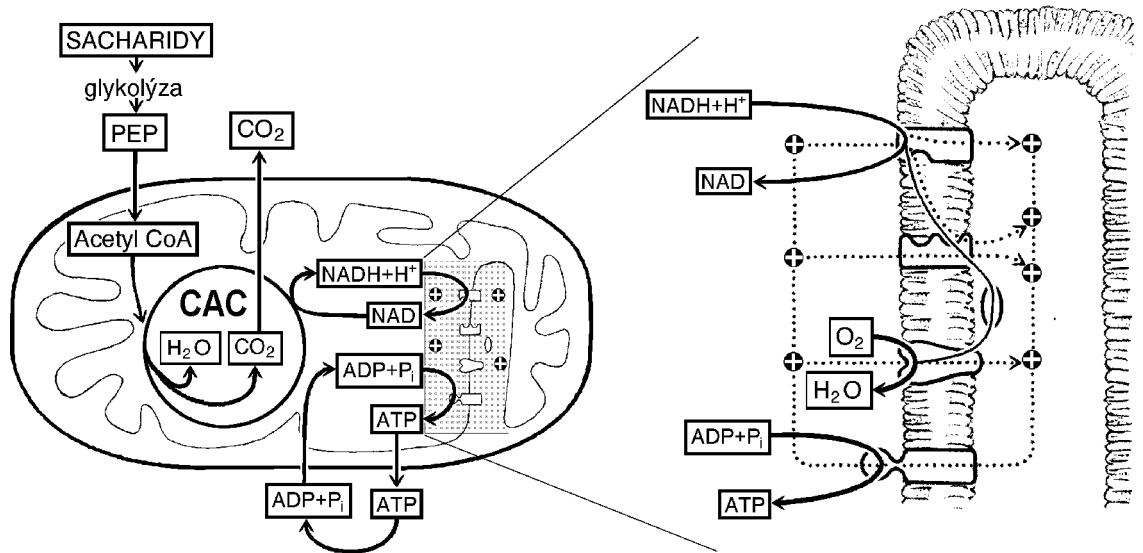
Obr. 3.2–1. Struktura chloroplastu vyšší rostliny. **A** - Schématická kresba uspořádání thylakoidů, které tvoří hojná grana. **B** - Elektronmikroskopický snímek velmi tenkého řezu chloroplastem. Řez šel kolmo na rovinu thylakoidů v granech, která jsou všechna orientována souběžně. Thylakoidy jsou zvýrazněny kontrastováním. **C** - Schématická kresba struktury gran. **D** - Elektronmikroskopický snímek skupiny gran při větším zvětšení.



Obr. 3.2–2. Rozčlenění pochodů v chloroplastu na membránové a enzymové pochody a jejich propojení přenašeči redukční síly ($\text{NADPH}+\text{H}^+$) a pohotové energie (ATP). PCRC - fotosyntetický cyklus redukce CO_2 (photosynthetic carbon reduction cycle), Calvinův cyklus. Vlevo zvětšený úsek thylakoidové membrány se schématem hlavních bílkovinných komplexů v ní zasazených a s vyznačením toku elektronů a protonů.



Obr. 3.2–3. Vlevo: Schématická kresba vnitřního uspořádání rostlinné buňky a vnitřní struktury mitochondrie. Mezi vnější a vnitřní membránou mitochondrie je tzv. mezimembránový prostor. Vnitřní membrána je hřebenovitě poskládána v tzv. kristy (crista = hřeben), odtud se jí často říká kristální membrána. Obklopuje matrix, ve které probíhají enzymové pochody Krebsova cyklu aj. Do matrix vyčnívají z povrchu membrány ”paličky” nebo ”knoflíky” ATP synthasy. Vpravo: Elektronmikroskopický snímek ultratenkého řezu buňkou. Na pravé straně a v levých rozích části chloroplastu s grany. Uprostřed skupina mitochondrií; jsou vždy menší nežli chloroplasty, jejich membrány se těžkými kovy nekontrastují tak výrazně, jako thylakoidy.



Obr. 3.2–4. Rozčlenění pochodů v mitochondrii na membránové a enzymové pochody a jejich propojení přenašeči redukční síly a energie. Kruh v matrix, v němž se acetyl mění na CO_2 a H_2O , znázorňuje Krebsův cyklus (CAC - citric acid cycle). Vpravo zvětšený výřez úseku vnitřní (kristální) membrány se schématem hlavních bílkovinných komplexů v ní zasazených a s vyznačením toku elektronů a protonů..

V eukaryontních buňkách se přeměny energie dějí v organelách specializovaných na přeměnu energie, jimiž jsou mitochondrie a chloroplasty (**Obr.3.2-1** a **Obr. 3.2-3**). V těchto organelách probíhají různé úseky přeměny energie v různých odděleních a na různých strukturách (**Obr. 3.2-2** a **Obr. 3.2-4**). Jak ukazují **Obr.3.2-1** až **Obr. 3.2-4** lze na organelách pro přeměnu energie rozlišit tyto struktury:

(1) Vnější neboli obalové membrány, tj. membrány, které celou organelu ohraničují. Ty se neúčastní přímo pochodů přeměny energie v organelu, ale významné jsou jejich schopnosti vyměňovat mezi organelou a cytoplasmou látky vstupující do reakcí přeměny energie a zplodiny těchto reakcí.

(a) Mitochondrie mají pouze jednu vnější membránu.

(b) Chloroplasty vyšších rostlin mají dvě obalové membrány (u některých řas jsou tři) různých vlastností. Selektivní přenašeče pro výměnu látek mezi chloroplastem a cytoplasmou má však jen vnitřní z nich.

(2) Membrány specializované na přeměnu energie, které se zkratkou označují ETM (energy transforming membranes). Na těchto membránách se uskutečňují vlastní přeměny různých druhů energie: energie fotonů, excitační energie molekul chlorofylu *a*, energie elektronů na různých hladinách oxidoredukčního potenciálu, energie koncentrací iontů na různých stranách membrány a energie anhydridové chemické vazby nukleotidtrifosfátů, především ATP.

(a) V mitochondriální kristální membráně se dehydrogenuje redukovaný přenašeč $\text{NADH} + \text{H}^+$ na NAD^+ ; vodík se spaluje na vodu. Elektrony se přenášejí z $\text{NADH} + \text{H}^+$ na O_2 složitým řetězcem přenašečů elektronu a přitom přesouvají protony přes membránu. Tak vytvářejí rozdíl v koncentraci protonů, který dále pohání syntézu ATP.

(b) V chloroplastové thylakoidní membráně se energie fotonů přeměňuje na redukční potenciál elektronů. Tak se jednak redukuje NADP na $\text{NADPH} + \text{H}^+$, jednak se umožní podobný tok elektronů jako v mitochondriální membráně, jehož důsledkem jsou přesuny elektronů a syntéza ATP.

(3) Soustavy enzymů, které uskutečňují kruhové pochody rozkladu nebo skladby organických sloučenin, při nichž se z těchto sloučenin energie odnímá nebo se do nich dodává. V povaze těchto pochodů se mitochondrie a chloroplasty liší:

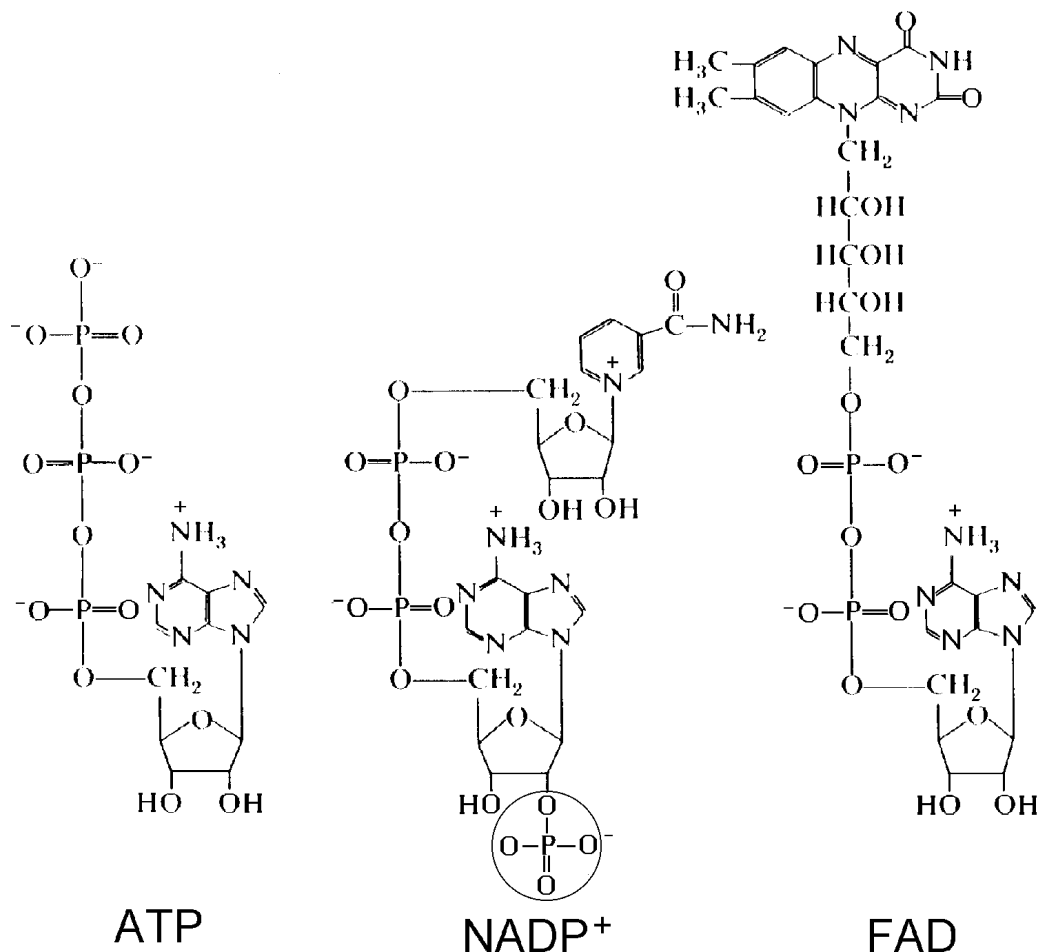
(a) Enzymy obsažené v mitochondriálním plasmatickém oddělení, zvaném matrix, naváží dvouuhlíkatý radikál na oxaloctovou kyselinu, čímž vznikne kyselina citronová. Z té pak v kruhovém sledu reakcí Krebsova cyklu (cyklu kyseliny citronové) odbourávají dvouuhlíkatou část, kterou přemění na CO_2 a H_2O a regenerují akceptor acetylu, oxaloacetát. Při těchto reakcích část vodíků organické sloučeniny redukuje přenašeče NAD nebo FAD na $\text{NADH} + \text{H}^+$ nebo FADH_2 , které jsou substrátem pro přeměnu energie na membráně. Z jednoho acetylového radikálu uvolní Krebsův cyklus pro membránu 3 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a 1 FADH_2 .

(b) Enzymy obsažené v plasmatickém oddělení chloroplastu, zvaném stroma, naváží oxid uhličitý na akceptor ribulosabisfosfát. Rozštěpením produktu karboxylace vzniknou dvě molekuly kyseliny fosfoglycerové, které se redukují na dvě triosy. Ty pak slouží jednak jako výsledný produkt chloroplastových reakcí, jednak v kruhovém sledu reakcí Calvinova cyklu (fotosyntetického pentosového redukčního cyklu) regenerují opět akceptor. Při karboxylaci ribulosabisfosfátu a redukcí kyseliny fosfoglycerové se oxiduje redukovaný přenašeč $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a hydrolyzuje energií bohatá vazba ATP. Obojí dodává fotosyntetická membrána, thylakoid. Na jednu molekulu oxidu uhličitého je třeba 3 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a 2 ATP.

Prokaryontní buňky nemají organely. Energií transformující membrána je jejich plasmová membrána. U některých fotosyntetických bakterií se fotosyntetická membrána tvoří na vchlípeninách membrány do vnitra buňky. Tyto vchlípeniny jsou kulovité nebo trubicovité, ale někdy již nabývají tvaru typického pro thylakoidy eukaryontních buněk, tj. jsou to silně sploštělé váčky. U sinic ztrácí dutina thylakoidu spojení s vnějším prostředím a thylakoidy se osamostatňují uvnitř buněk, jako je tomu s thylakoidy v chloroplastech eukaryont. V ETM prokaryont jsou vedle sebe komplexy umožňující fotochemické a respirační přenosy elektronů. Cyklické pochody přeměňující sloučeniny uhlíku se u nich dějí v cytoplasmě, v níž jsou opět vedle sebe enzymy Krebsova a Calvinova cyklu.

3.3 VAZBY MEZI MEMBRÁNOVÝMI A ENZYMOVÝMI POCHODY

Propojení mezi přeměnami energie v membránách a pochody v soustavách enzymů zajišťují dva druhy přenašečů (viz Obr. 3.3-1):



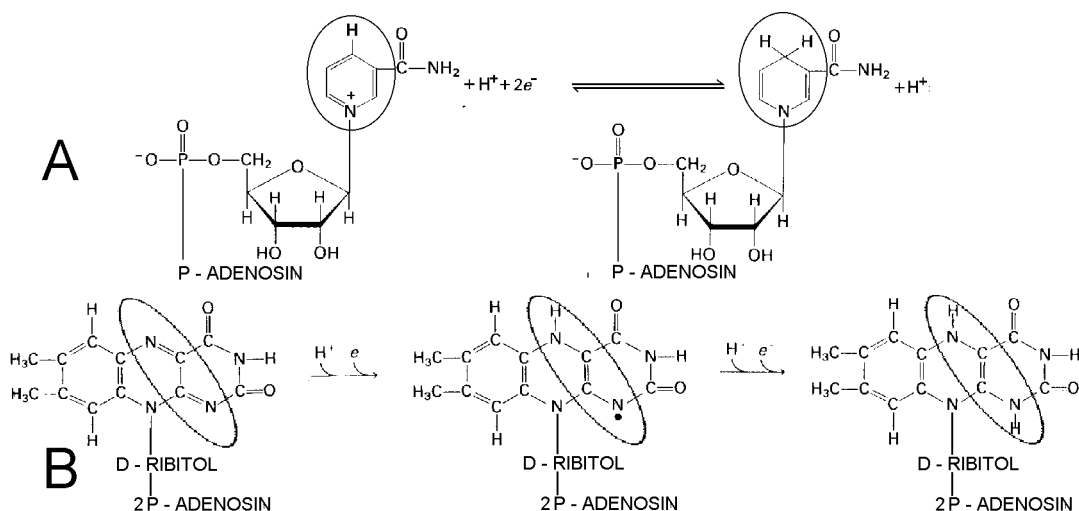
Obr. 3.3-1. ATP - adenosin trifosfát je přenašeč volné energie v buňce. NADP⁺ - nikotinamidadenin dinukleotidfosfát je přenašeč hydridových iontů (proton + 2 elektrony); stejně významný je nikotinamidadenin dinukleotid (NAD⁺), který se od NADP⁺ liší jen tím, že nemá na ribose fosfátový zbytek označený kroužkem. FAD - flavinadenin dinukleotid je přenašeč vodíkových atomů (proton + elektron), který pracuje zabudován v různých oxidoredukčních enzymech; nepohybuje se v plasmě volně jako NAD(P)⁺. Strukturální vzorce těchto sloučenin jsou tu vedle sebe, aby vynikl jejich společný strukturální základ.

(1) Přenašeče redukční síly (viz Obr. 3.3-2), jimiž jsou přenašeče vodíků nebo hydridových iontů (přenášejí proton s jedním nebo dvěma elektrony). Jsou to:

(a) nikotinamidadeninukleotid, $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$, dříve nazývaný difosfopyridinukleotid (zkratka DPN),

(b) nikotinamidadeninukleotidfosfát, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$, dříve nazývaný trifosfopyridinukleotid (zkratka TPN).

Tyto přenašeče mají téměř shodnou strukturu a jedna fosfátová skupina navíc v NADP^+ způsobuje jen bezvýznamný rozdíl v oxidačně redukčním potenciálu. Přesto mají výrazně rozděleny funkce: NAD^+ se účastní hlavně reakcí, v nichž dochází k dehydrogenacím (např. dehydrogenačních reakcí v Krebsově cyklu), $\text{NADPH}+\text{H}^+$ vystupuje převážně v biosyntetických reakcích, kde se substrát redukuje (např. při redukci kyseliny fosfoglycerové v Calvinově cyklu). Oba přenašeče přenáší vždy najednou dva elektrony s jedním protonem, tedy hydridový ion, H^- . Navzájem se mohou oxidovat a redukovat prostřednictvím membránového enzymu transhydrogenasy.

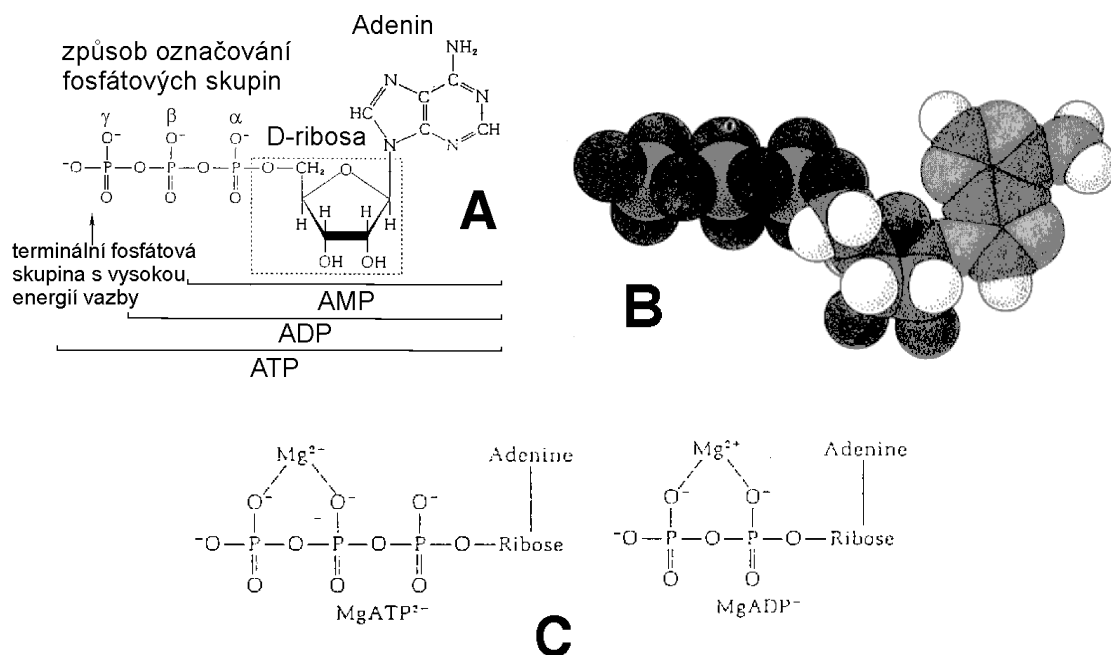


Obr. 3.3–2. A - Mechanismus redukce a oxidace $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$, která probíhá v nikotinamidové části molekuly (v kruhu). Oxidovaný nikotinamid má kladný náboj na heterocyklickém dusíku a na uhlíku v *p*-poloze jeden vodík. Po přijetí dvou elektronů a jednoho protonu se kladný náboj neutralizuje, v *p*-poloze jsou dva vodíky a zruší se konjugovaný kruh vazeb benzenového jádra. Jeden proton psaný na obou stranách rovnice patří k druhému přenášenému elektronu, NAD a NADP přenáší vždy dva elektrony současně. Rovnici redukce lze psát (chápat) také $\text{NAD(P)}^+ + 2\text{H} \rightleftharpoons \text{NAD(P)H} + \text{H}^+$.

B - Mechanismus redukce a oxidace FAD (který není pohyblivým přenašečem, ale součástí enzymů) se od redukce nikotinamidadeninukleotidů liší. Dva dusíky, které se v isoalloxazinové (flavinové) kruhové soustavě redukuje (označeny elipsou) se mohou redukovat (nebo oxidovat) postupně, přičemž po první redukci vznikne semichinonový radikál (uprostřed). Může však dojít i k dvouelektronovému současnému přenosu, který semichinonový stupeň vynechá.

(2) Přenašeče volné energie, kterými jsou anhydridové vazby kyseliny fosforečné v nukleosidtrifosfátech. Adenosintrifosfát (viz **Obr. 3.3-3**) je nejběžnější, ale nikoli jedinou sloučeninou, která ve formě anhydridové fosfátové vazby (často se používá značení $\sim\text{P}$) uchovává a přenáší volnou energii využitelnou pro pohánění chemických reakcí v buňce. Z dalších nukleosidtrifosfátů se nejčastěji v přenosech energie uplatňuje guanosintrifosfát (GTP). Kromě toho mezi ústředními sloučeninami metabolismu najdeme řadu takových, které mají fosfátovou skupinu připojenou vazbou označovanou jako vazba s vysokým obsahem energie (anglicky: high energy bond). Nesprávně se z toho někdy usuzuje, že vlastní vazebná energie je vysoká. To neodpovídá skutečnosti, hodnoty vazebné energie u $\sim\text{P}$ nepřesahují obvyklý průměr, ale celá vazebná energie se při přenosech skupin stejně neuplatňuje. To o čem se hovoří je, že hydrolýza těchto anhydridických vazeb je spojena s mimořádně velkým úbytkem volné energie. V metabolis-

mu se toho využívá tak, že hydrolýza ~P bývá spřažena s reakcemi, které dodávku energie potřebují. Některé z fosforečných sloučenin významných v metabolismu a hodnoty volné energie, která se uvolní hydrolýzou jejich fosfátové skupiny, jsou v **Tab. 3.3-1**.



Obr. 3.3–3. A - strukturní vzorec adenosintrifosfátu s označením jednotlivých fosfátových skupin α , β a $\gamma/6'$ - stavebnicový model molekuly ATP; C - můstky mezi fosfátovými skupinami, které vytvářejí ionty Mg^{2+} .

Sloučenina	ΔG° [kJ.mol ⁻¹]
fosfoenolpyruvát	-62,0
kyselina 1,3-difosfoglycerová	-49,4
kreatinfosfát	-41,8
acetylfosfát	-41,8
fosfoarginin (pH = 8,0)	-33,5
ATP \rightarrow ADP + P _i (+ Mg ²⁺)	-32,2
glukosa-1-fosfát	-21,0
pyrofosfát	-16,7
fruktosa-6-fosfát	-16,0
glukosa-6-fosfát	-13,8
glycerol-1-fosfát	-9,2

Tabulka 3.3-1. Změna standardní volné energie provázející hydrolýzu některých fosfátových anhydridů a esterů. Hodnoty ΔG° jsou udány pro prostředí, v němž je pH = 7,0.

Mezi sloučeninami uvedenými v **Tab. 3.3-1** zaujímá ústřední místo adenosintrifosfát tím, že hydrolýza jeho terminální fosfátové skupiny (tzv. skupiny γ) je spojena se středně velkou změnou volné energie ($\Delta G^{\circ} \cong -30$ kJ.mol⁻¹). Může tedy zprostředkovat přenosy mezi sloučeninami s vysokou hodnotou této energie (např. fosfoenolpyruvát, pro nějž

$\Delta G^{\circ} \cong -60$ kJ.mol⁻¹), z nichž se energie čerpá a sloučeninami s nízkou hodnotou ΔG° , okolo -12 kJ.mol⁻¹, které se fosforylací upravují pro další reakce.

Záporné náboje na molekule ATP jsou také dány tím, v jakém je molekula prostředí. pK_d pro disociaci $ATP^{3-} \rightarrow H^+ + ATP^{4-}$ leží mezi 6,5 a 7,0. Proto ΔG° hydrolýzy

závisí na pH, ale také na koncentraci iontů Mg^{2+} , které tvoří můstek mezi kyslíky fosfátových skupin β a γ (viz **Obr. 3.3-3.**).

3.4 PŘEMĚNA ENERGIE NA MEMBRÁNÁCH

3.4.1 DVĚ FORMY VOLNÉ ENERGIE V BUŇCE A VÝZNAM PROTONOVÉ REVERSIBILNÍ ATP-SYNTHASY (ATPasy)

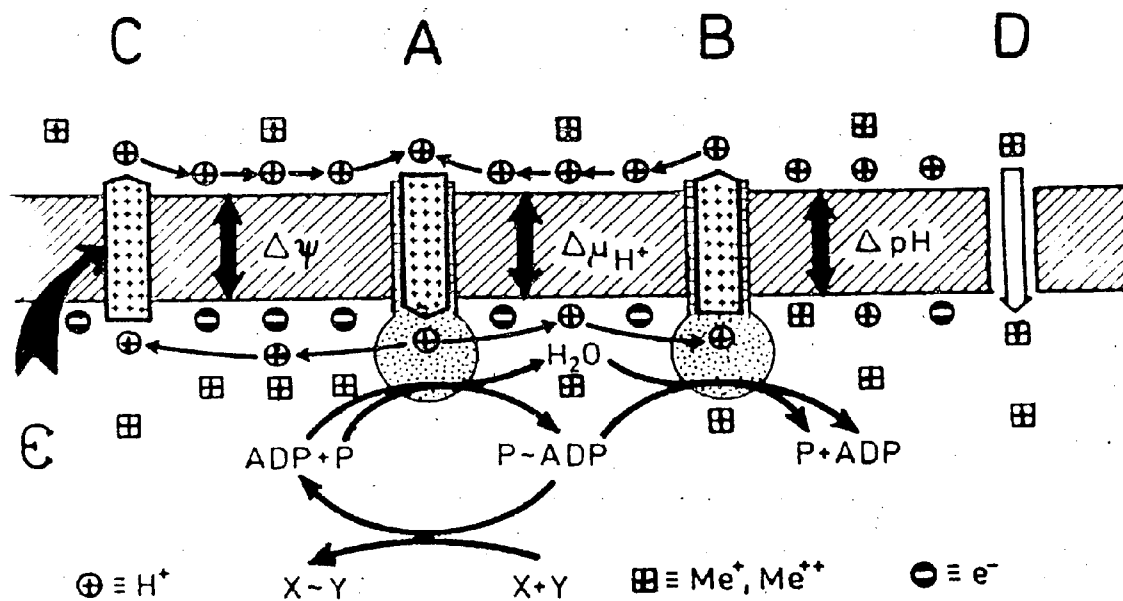
ATP nemá v přeměnách energie ústřední úlohu pouze proto, že volná energie hydrolýzy jeho fosfátové anhydrické vazby má příhodnou střední hodnotu. ATP je především jedním z hlavních činitelů přeměny energie na membránách, kde se odehrává velká část přeměn energie v buňkách. Na membránách dochází k přeměnám dvou forem volné energie, která tvoří bezprostředně použitelnou (pohotovostní) zásobu volné energie v buňkách a jejich odděleních. Jsou to:

(1) Anhydridové vazby kyseliny fosforečné, především adenosintrifosfátu, jehož vlastnosti jsou popsány v předchozím oddíle.

(2) Rozdíly chemického potenciálu (např. koncentrace) iontů na jedné a druhé straně lipoproteinových membrán ohraničujících různá buněčná oddělení a také buňku samotnou (ne zcela správně se také hovoří o koncentračním gradientu na membráně).

Lipidová dvojvrstva membrány je pro ionty zcela neprostupná. Proto ionty, které mají snahu rozdíly v chemickém potenciálu vyrovnat, mohou procházet pouze bílkovinnými kanály v membráně pro ně prostupnými. Pokud membrána takové kanály obsahuje, koncentrace na obou stranách membrány se vyrovnávají. Jsou-li k tomu bílkoviny, tvořící kanál, uzpůsobeny, může se potenciální energie koncentračního rozdílu měnit v jinou užitečnou formu energie např. mechanickou (bičiky bakterií), chemickou (ATP) nebo opět koncentrační (aktivní transport jiných iontů nebo látek přes membránu). Tento způsob přeměny energie na membránách a vysvětlení jeho mechanismu je jádrem chemiosmotické teorie biochemických přeměn energie, za niž dostal P. Michel v r. 1980 Nobelovu cenu. Touto teorií otevřel zcela nové přístupy k otázkám bioenergetiky, což vyvolalo její převratný rozvoj.

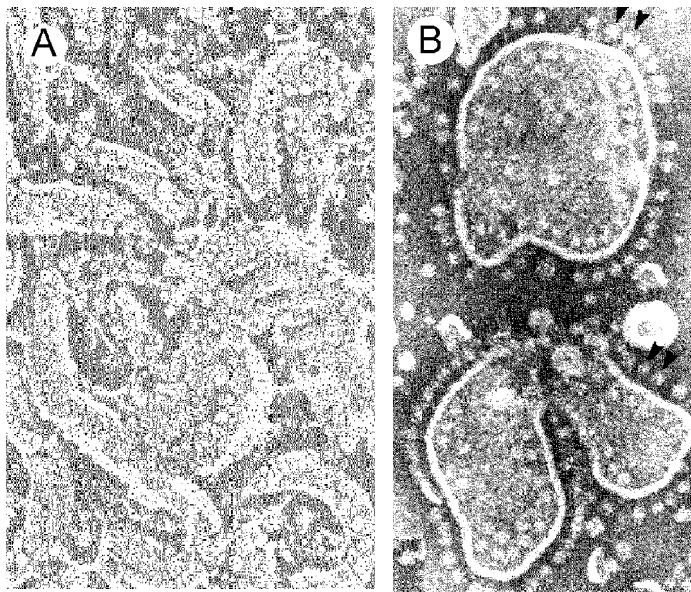
Ve všech membránách specializovaných na přeměnu energie je přítomna jako transformační prvek F-ATPasa, reversibilní protonová ATP synthasa (adenosintrifosfatasa). V buňkách je řada dalších ATPas, označovaných P-ATPasy a V-ATPasy, které volnou energii hydrolýzy terminální fosfátové skupiny ATP přeměňují v koncentrační energii iontů a tím tyto ionty přemísťují mezi buňkou a okolím a mezi různými odděleními buňky. Také přemísťování nejrůznějších pro buňku významných látek získává energii z těchto koncentračních rozdílů. Jen velmi málo z těchto ATPas však může katalyzovat opačnou reakci a měnit energii uloženou v rozdílech koncentrací iontů v energii ATP a žádná to nedělá tak dokonale jako reversibilní protonová ATP-synthasa (ATPasa). To dává tomuto enzymu a protonům výsadní postavení v přeměnách volné energie na membránách (**Obr. 3.4-1**). F-ATPasa přeměňuje energii toku protonů v energii makroergické anhydridové vazby a naopak energii uvolněnou štěpením této vazby může použít k čerpání protonů proti koncentračnímu spádu. Tento enzym, nazývaný také spřahující faktor (CF), dovede vzájemně přeměňovat dvě základní formy energie skládající aktuální energetický potenciál buňky.



Obr. 3.4-1. Schéma pochodů v membráně přeměňující energii. Jednotlivé funkční prvky: A – ATPasa syntetizující ATP na účet energie protonů tekoucích po spádu koncentračního gradientu; B – ATPasa štěpící ATP a využívající jeho energie k čerpání protonů proti koncentračnímu gradientu; C – generátor $\Delta\mu_{H^+}$ využívající jinou formu volné energie ($\Delta\psi$) k čerpání protonů; D – kanál, umožňující selektivní průchod iontů kovů (zejména Mg^{2+}), které částečně kompenzují $\Delta\psi$; tento kanál je nepropustný pro protony.

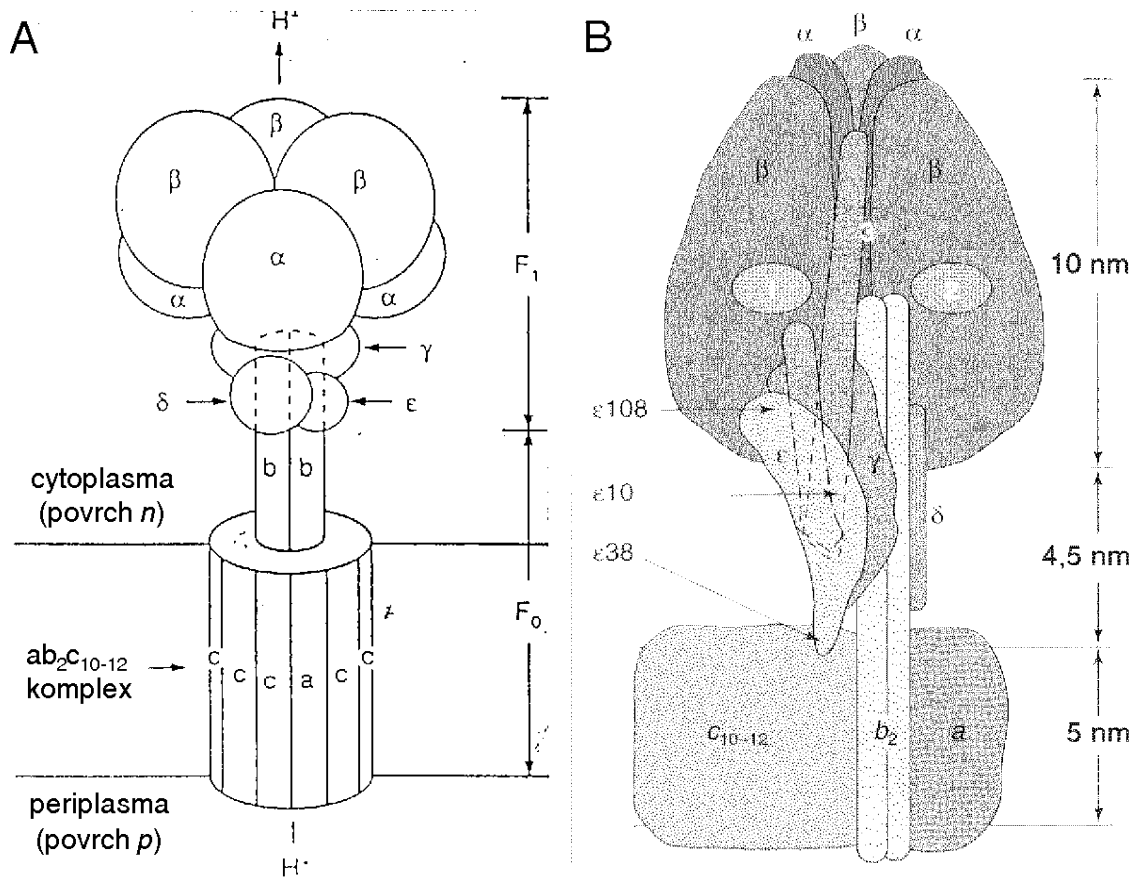
3.4.2 STRUKTURA A FUNKCE PROTONOVÉ REVERSIBILNÍ ATP-SYNTHASY

Na elektronových mikrofotografiích thylakoidů, mitochondriových membrán a bakteriových plasmových membrán lze vidět na povrchu membrán knoflíkové struktury (viz **Obr.3.4-2**). Jsou to obrazy částic F_1 protonové ATP-synthasy, které jsou připoutány k částicím F_0 ponořeným v membráně a vyčnívají do prostředí při p povrchu membrány (stroma u chloroplastů, cytoplasma u bakterií a matrix u mitochondrií).



Obr. 3.4-2. Elektronové mikrofotografie membrán s komplexy ATP synthasy, které zvýrazňují katalytické komplexy F_1 (“knoflíky”, “hlavičky”) vyčnívající z membrány. Ke zvýraznění se použilo tzv. negativního kontrastu, kdy se mezi fragmenty membrán nechá zaschnout roztok iontů (např. uranuly) nepropustných pro elektrony. “Stopky”, jimiž jsou “hlavičky” přichyceny k membránovému komplexu F_0 , nejsou vidět. **A** - krystalní membrána z mitochondrie. **B** - ATPasa izolovaná z chloroplastů špenátu a vložená do lipidových váčků.

Protonová reversibilní ATP-synthasa sestává ze dvou komplexů bílkovin, z nichž jeden, označovaný F_0 , prostupuje membránou a druhý, F_1 , leží v cytoplasmě (ve stromatu, v matrix). Schéma struktury ATP-synthasy je na **Obr. 3.4-3**.



Obr. 3.4-3. Dvě znázornění struktury ATP-synthasy. - **(A)** Schématické znázornění struktury CF_0F_1 a EF_0F_1 s nejčastěji používaným rozčleněním pouze na dvě části tj. F_0 a F_1 . - **(B)** Kresba se snaží naznačit skutečné tvary bílkovin a prostorové poměry na základě výsledků získaných převážně na bakteriální ATP-synthase (Capaldi et al. 1994). V obrázku není zakreslena třetí podjednotka U části F_1 , aby bylo vidět uspořádání podjednotek [X a Y. Model ukazuje, že 4,5 nm dlouhá "stopka" mezi hlavními hmotami F_0 a F_1 se skládá ze dvou složek. Jednak ji tvoří dvě tyčinky, z nichž každá je šroubovice α bílkoviny b , která je zakotvená v membráně a vede až do vnitřku F_1 a zpět k membráně. Druhou součástí jsou podjednotky [X a Y části F_1 , které se podílejí na mechanismu uvolňování ATP z katalytického centra. Dvě "tyčinky" vybíhající z podjednotky [X do části F_1 jsou šroubovice α na obou koncích tohoto polypeptidu. Jejich vzájemnému pohybu se připisuje rozhodující úloha ve spřažení toku protonů částí F_0 s katalytickým působením části F_1 .

Chloroplastová ATP-synthasa, která se také nazývá komplex CF_0CF_1 (nebo CF_0F_1 , C je odvozeno ze slova chloroplast) je téměř shodná s ATP-synthasou bakterií, která se označuje EF_0EF_1 (nebo EF_0F_1 , E je odvozeno od jména bakterie *Escherichia coli*, jejíž ATP-synthasa se nejintenzivněji studuje). Mitochondriální ATP-synthasa, MF_0MF_1 (MF_0F_1), se od obou předchozích liší strukturou části F_0 , ale tento rozdíl nemá velký vliv na funkci. Strukturou části F_1 , která je vlastní katalytickou částí enzymu, a funkcí se tedy všechny tři ATP-synthasy shodují.

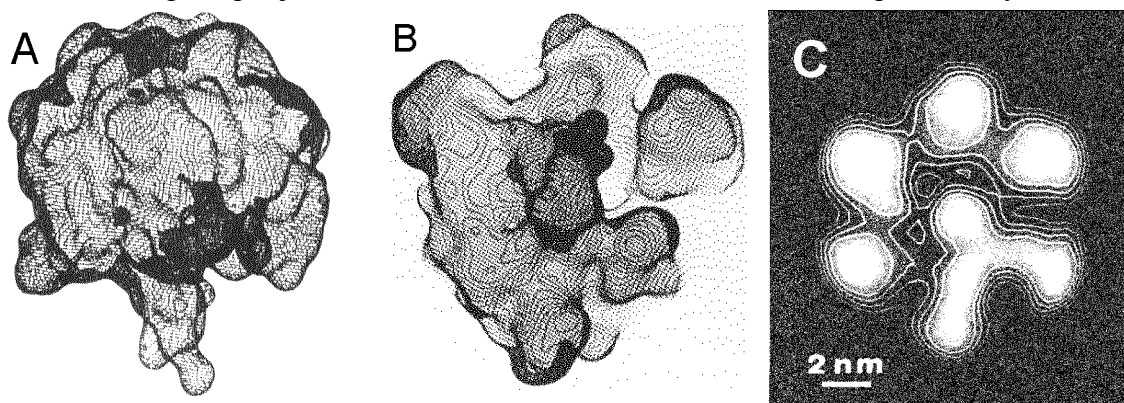
Tvar části F_1 určuje především šest velkých globulárních bílkovin: 3 stejné podjednotky označované U a 3 stejné podjednotky označované V, které se v přibližně kulovém útvaru hlavičky střídají jako díly pomeranče (viz **obr. 3.4-3**). Podjednotky V obsahují vlastní katalytická místa pro syntesu a hydrolysu ATP. Podjednotky U obsahují také místa pro vazbu ADP/ATP a katalýzu v podjednotkách V velmi podstatně urychlují. Menší podjednotky γ , δ a ϵ se podílejí na stavbě stopky a patrně také přímo na

spřažení toku protonů s katalytickou funkcí ATP-synthasy (viz dále). Kromě toho mají významné regulační úlohy.

Část F_0 tvoří kanál pro prostup protonů membránou a zprostředkuje konformační změny v části F_1 , které jsou nezbytné pro katalytické působení. Sestává z extrémně hydrofobních podjednotek a a c a z podjednotky b , která je převážně hydrofilní, ale šroubovice α na jejím N konci prochází membránou a je v ní pevně zakotvena. Dvě bílkoviny b tvoří základ “stopky”, na které je katalytická hlavička. Molekulové hmotnosti podjednotek F_0 z různých zdrojů jsou mnohem více rozdílné než u podjednotek F_1 . Pouze mitochondriální ATP-synthasy mají čtvrtou a někdy ještě další podjednotky zatím neznámé funkce.

Vazba F_1 na F_0 se uvolní snížením iontové síly roztoku, proto omýváním membrán destilovanou vodou nebo roztokem EDTA (chelatající činidlo) lze F_1 uvolnit a tak ji izolovat. F_0 se dá z membrány uvolnit pouze chaotropními činidly a detergenty: cholelátém, deoxycholátém, oktylglukosidem a Tritonem X-100.

Krystaly MF_1 z mitochondrií z krysích jater a z hovězích srdcí poskytly rentgenové difrakční obrazy s mezí rozlišení 9Å. To postačuje jen pro hrubé odhady strukturálního uspořádání podjednotek. Struktura F_1 z chloroplastů se studovala metodou rekonstrukce obrazu z elektronového mikroskopu. Výsledky získané oběma metodami (Obr. 3.4-4) svědčí pro přibližně souměrné hexagonální uspořádání šesti globulí (podjednotky U a β), při čemž jeden pár je těsněji než ostatní dva přidružen ke středové hmotě, která patří podjednotkám $[, \chi$ a ϵ . To dává celému obrazu nápadnou asymetrii.



Obr. 3.4-4. Struktura komplexu F_1 : (A) Pohled ze strany na model MF_1 z hovězího srdce sestavený na základě rentgenové analýzy krystalů s rozlišením 0,9 nm (Abrahams et al. 1993). Z jablkovitého tvaru komplexu podjednotek U a V vyčnívá stopka tvořená především podjednotkami $[$ a Y . (B) Pohled na komplex zespoda (směrem od membrány). Hmoty ve středu komplexu F_1 patří stopce tvořené podjednotkou b z části F_0 a malým podjednotkám F_1 . Na tomto pohledu je zřejmá asymetrie, která je výrazná také v (C). (C) Rekonstrukce obrazů získaných elektronovým mikroskopem na části F_1 ATP-synthasy z chloroplastů špenátu (Boekema et al. 1987).

Některá fakta nasvědčují tomu, že tato asymetrie má také funkční význam. Jsou podkladem tzv. turniketové hypotézy, podle níž se po syntéze každé molekuly ATP část F_1 pootočí o 120° , při čemž přijde do těsnějšího kontaktu s menšími polypeptidy zprostředkujícími vazbu F_1 na F_0 další dvojice podjednotek U a β . Toto přesmykávání se dává do souvislosti s konformační změnou, která je součástí pochodu, při němž se hotová molekula ATP uvolní do okolního prostředí. Podle současných představ totiž dehydratace ADP a P_i při tvorbě ATP proběhne v hydrofobním prostředí uvnitř komplexu F_1 s poměrně nízkým nárokem na dodanou energii. Té je hlavně zapotřebí právě pro uvolnění poměrně pevně vázaného ATP do vnějšího plasmatického prostředí, při němž se vlastně molekuly ATP “nabijí” volnou energií, neboť je to energie hydrolyzy, která se

v hydrofobním prostředí nemůže uplatnit. K tomu dojde při změně konformace bílkovin v F_1 (spojené s pootočením hlavičky na stopce).

Energii pro syntézu ATP ATP-synthasou dodává rozdíl elektrochemického potenciálu protonů ($\Delta\mu_{H^+}$), které protékají membránou kanálem v části F_0 ATP-synthasy. Dříve se soudilo, že tyto protony vtékají do dutiny hlavy a na cestě z ní ven přeměňují svoji energii. Když se dnes ví, že část stopky sestává jen ze čtyř U šroubovic patřících dvěma podjednotkám b části F_0 (viz **Obr. 5.3-2**), zdá se velmi nepravděpodobné, že by tudý vedl kanál pro protony dobře izolovaný proti jejich úniku. Je proto pravděpodobnější hypotéza, že protony hned při svém výstupu z membránové části kanálu způsobují nějakou konformační změnu bílkovin stopky a ta se přenáší až do hlavičky, kde napomáhá katalýze syntetické reakce.

Protonová ATP-asa je reversibilní. Jestliže tedy je volná energie syntézy ATP, δG_p , menší nežli protonmotorická síla na membráně, $\delta p = n \cdot \delta\mu_{H^+}$ (rozdíl chemického potenciálu protonů na obou stranách membrány násobený počtem protonů potřebných pro syntézu jedné molekuly ATP), pak se ATP syntetizuje, je-li tomu naopak, pak se hydrolyzuje.

3.4.3 OBSAH VOLNÉ ENERGIE V ROZDÍLU KONCENTRACÍ IONTŮ NA MEMBRÁNĚ. HYBNÁ SÍLA PROTONŮ.

Rozdíl koncentrace protonů na obou stranách membrány vytváří také rozdíl elektrických nábojů, takže rozdíl chemického potenciálu protonů, $\delta\mu_{H^+}$, má složku koncentrační, δp_H , a elektrickou, δm V dalším pojednáme o základních kvantitativních vztazích mezi těmito veličinami.

Obsah volné energie uložený v rozdílu koncentrace iontů na jedné a druhé straně membrány lze vypočítat s použitím Nernstovy rovnice. Podle ní je změna volné energie, ΔG , při přenesení 1 molu látky z oddělení A, kde je koncentrace látky $[X]_A$ do oddělení B, kde koncentrace látky je $[X]_B$ dána výrazem

$$\Delta G = RT \cdot \ln \frac{[X]_B}{[X]_A} = 2,3 \cdot RT \cdot \log_{10} \frac{[X]_B}{[X]_A} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

kde $R = 8,314 \text{ [J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}]$ je plynová konstanta, $T \text{ [K]}$ je absolutní teplota a 2,3 faktor, jenž převádí přirozené logaritmy na dekadické. Je důležité, že koncentrace roztoku, do něhož přenášíme, je v čitateli a koncentrace roztoku, z něhož přenášíme, ve jmenovateli.

Pokud rozpuštěná látka, o níž jde, je ion s elektrickým nábojem a přenáší se přes rozhraní (např. biologickou membránu), na němž je potenciální rozdíl (jak většinou na membránách bývá), je třeba uvážit také energii, kterou je do toho třeba vložit, nebo, která se při tom uvolní.

Přenášeli-li se ion X^{m+} nebo X^{m-} (tj. ion, který má m kladných nebo záporných nábojů) mezi dvěma roztoky, v nichž má stejnou koncentraci, ale na rozhraní je potenciální rozdíl $\Delta\psi$, bude změna volné energie, ΔG , při přenesení 1 molu iontů po spádu elektrického potenciálu dána rovnicí

$$\Delta G = -m \cdot F \cdot \Delta\psi \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

kde $F = 96,49 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ je Faradayova konstanta a $\Delta\psi$ je potenciální rozdíl na rozhraní udaný ve [V]. Při tom po spádu potenciálu znamená, že se kladný ion přenáší z kladné strany membrány na zápornou a záporný ion naopak. Je-li to obráceně, je absolutní hodnota ΔG stejná, ale znaménko bude opačné.

Přenášeli-li se ion X^{m+} (nebo X^{m-}) z roztoku o koncentraci $[X^{m+}]_A$ do roztoku o koncentraci $[X^{m+}]_B$ přes membránu, na které je potenciální rozdíl $\Delta\psi$ [V] bude změna volné energie součtem obou změn výše uvažovaných odděleně, tedy

$$\Delta G = -m \cdot F \cdot \Delta\psi + RT \cdot \ln \frac{[X^{m+}]_B}{[X^{m+}]_A} = -m \cdot F \cdot \Delta\psi + 2,3 \cdot RT \cdot \log_{10} \frac{[X^{m+}]_B}{[X^{m+}]_A} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

a pro výpočet při 25°C (kdy RT má hodnotu 2,479 kJ·mol⁻¹) můžeme použít rovnici

$$\Delta G = -m \cdot 96,5 \cdot \Delta\psi + 5,7 \cdot \log_{10} \frac{[X^{m+}]_B}{[X^{m+}]_A} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

Přitom stále platí, že $[X^{m+}]_B$ je koncentrace roztoku, do něhož se ionty přenášejí a znaménko prvního členu je záporné, pokud se tak děje po spádu elektrického potenciálu a kladné, pokud je to naopak. ΔG se zde také nazývá elektrochemický gradient iontu a označuje se $\Delta\mu_{X^+}$.

Rovnice se dále zjednoduší, jde-li o elektrochemický gradient protonů, poněvadž jsou jednomocné (tedy $m = 1$) a poněvadž logaritmus podílu koncentrací je roven rozdílu logaritmů koncentrací je $\log ([H^+]_B / [H^+]_A) = \log [H^+]_B - \log [H^+]_A = \text{pH}_A - \text{pH}_B = \delta\text{pH}$. Proto

$$\Delta\mu_{H^+} = -96,5 \cdot \Delta\psi + 2,3 \cdot RT \cdot \delta\text{pH} = -96,5 \cdot \Delta\psi + 5,7 \cdot \delta\text{pH} \quad [\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}]$$

Pokud elektrochemické poměry na membráně určují pouze protony, dosazuje se $\Delta\psi$ jako kladná hodnota ve [V], tedy potenciál zápornějšího povrchu odečten od potenciálu kladnějšího povrchu. Poněvadž protony potekou z místa vyšší koncentrace, $[H^+]_A$, na místo nižší koncentrace, $[H^+]_B$, tedy z místa s nižší hodnotou pH_A na místo s vyšší hodnotou pH_B a pH je záporný logaritmus koncentrace H^+ , dosazuje se δpH také jako kladná hodnota rozdílu v pH .

V membráně přeměňující energii se elektrony pohybují po spádu elektrochemického potenciálu, když se vyměňují mezi jednotlivými oxidoredukčními páry přenašečů elektronů. Tyto oxidoredukční reakce dodávají energii pro přesuny protonů přes membránu. Aby se usnadnilo srovnávání energie, která je utajena v rozdílu oxidoredukčních potenciálů a energie v gradientu protonů, navrhl Mitchell nový pojem, tj. "hybná síla protonů", anglicky protonmotive force (symbol Δp , česky někdy také nazýván protonmotorická síla), definovaný takto

$$\Delta p = -\Delta\mu_{H^+} / F = \Delta\psi - (2,3 \cdot RT / F) \cdot \delta\text{pH} = \Delta\psi - 0,059 \cdot \delta\text{pH} \quad [\text{V}]$$

Δp se velmi často udává v mV, pak se do rovnice dosazuje také $\Delta\psi$ v mV a součinitel u δpH je 59. V rovnici pro hybnou sílu protonů se opět dosazují jak $\Delta\psi$ tak δpH jako rozdíly, kde se hodnoty platící pro negativní stranu membrány (n-fáze, odkud se protony spolu s přenosem elektronů čerpají) odečítají od hodnot na pozitivní straně membrány (p-fáze, tam kde je vyšší koncentrace protonů).

Kapacita membrán přeměňujících energii (energy transducing membranes, ETM) je většinou poměrně nízká a δm dosáhne vysokých hodnot, když ještě δpH je poměrně nízké. Důležitou úlohu proto hrají ionty, které se mohou vlivem δm elektroosmoticky pohybovat membránou (vhodnými kanály) a mohou vyrovnávat rozdíl potenciálu (viz Obr. 3.4-1). Mohou to být buď ionty opačného náboje (Cl^-) přecházející ve stejném směru s protony, nebo souhlasně nabitě ionty (Mg^{2+}), které jdou opačným směrem.

Různé ETM se liší v tom, do jaké míry kompensují $\Delta\psi$ přesuny iontů a tedy jaký podíl z Δp tvoří $\Delta\psi$ a jaký δpH . Mitochondriální membrána tak činí v nepatrné míře a hlavní složkou Δp v mitochondriích je $\Delta\psi$. Typické hodnoty pro krystalní membránu aktivně přená-

šející elektrony jsou $\Delta\psi = 180$ mV a $\delta pH = 0,5$. Podobně je tomu i u fotosyntetických bakterií. Naproti tomu thylakoidní membrána chloroplastů přenáší jak ionty Mg^{2+} z dutiny thylakoidu ven, tak ionty Cl^- souběžně s protony a $\Delta\psi$ thylakoidů je převážně ve formě δpH . Typické hodnoty pro thylakoid přeměňující energii maximální rychlostí jsou: $\Delta\psi$ zanedbatelné, $\delta pH = 3,3$.

3.5 GENERÁTORY $\delta\mu_{H^+}$ A OBECNÉ ZÁKLADY STAVBY A ČINNOSTI ETM

3.5.1 OXIDOREDUKČNÍ POTENCIÁL A TOK ELEKTRONŮ

Energii přeměňující membrány, (ETM), obsahují vedle protonové reversibilní ATPasy ještě takové prvky, které vytvářejí rozdíl v elektrochemickém potenciálu (v koncentraci) protonů, potřebný pro funkci ATPasy, tedy generátory $\delta\mu_{H^+}$. To jsou komplexy bílkovin s kofaktory, které jsou schopny přeměňovat nějakou volnou energii v energii $\delta\mu_{H^+}$. Naprostá většina těchto generátorů využívá pro vytváření rozdílů v koncentracích protonů energii elektronů tekoucích po spádu elektrochemického potenciálu. Jsou to tedy elektrochemické generátory $\delta\mu_{H^+}$. V membránách přeměňujících energii pracují tyto generátory obvykle v určitých sestavách, tvořících řetězce přenosu elektronů. Těmito tekou elektrony poháněné energetickým spádem mezi oxidoredukčními potenciály krajních prvků řetězce. Vezmeme-li jako příklad respirační membránu mitochondrií, je na jednom konci redukován přenašeč ($NADH+H^+$), který elektrony poskytuje, na druhém konci kyslík, který elektrony přijímá. Rozdíl oxidoredukčních potenciálů páru $NADH+H^+/NAD^+$, který je $E_m = -0,32$ V a H_2O/O_2 , který je $E_m = +0,82$, pohání pak tok elektronů membránou. U fotosyntetické membrány je to poněkud složitější. Tam rozdíl oxidoredukčních potenciálů vytváří reakční centra, fotochemickou přeměnou energie fotonů v energii oxidoredukčního potenciálu elektronů (viz dále).

Přímý fotochemický generátor $\Delta\mu_{H^+}$, tj. takový, který používá energii fotonu k přenesení protonu přes membránu, je znám pouze jeden a je jím bílkovinný komplex bakteri-orhodopsin v extrémně slanomilných bakteriích z rodu *Halobacterium*. Tento typ velmi zajímavé, ale ojedinělé fotosyntézy zde nebudeme dále popisovat.

Fotochemické generátory ostatních fotosyntéz (bakteriální a oxygenní fotosyntézy) jsou dvousložkové. Vlastní fotochemická transformace energie se omezí na rozdělení nábojů, tj. vytvoření páru elektron – díra. To se děje v komplexech bílkovin s barvivy a jinými kofaktory zvaných fotochemická reakční centra. Jsou to vlastně generátory oxidoredukčního páru, složky redukované a složky oxidované, čili generátory $\delta\mathcal{E}$ žrozdílu (oxidoredukčních) potenciálů. Takto vzniklý rozdíl δE se ve fotosyntetické membráně využije částečně na přímou redukci přenašeče $NADP^+$ na $NADPH+H^+$. V membráně jsou však další složky, které druhou část potenciálního rozdílu δE využívají na pohánění toku elektronů membránou.

Povaha oxidoredukčních potenciálů a thermodynamika toku elektronů soustavou přenašečů se probírají ve fyzikální chemii a bioenergetice. Jako základní informace pro další úvahy, v nichž bude mít oxidoredukční potenciál významnou úlohu, jsou v **Tab. 3.5-1** uvedeny standardní oxidoredukční potenciály významných biologických sloučenin, zejména těch, které se uplatňují v přeměně energie na membránách.

Tab. 3.5-1 Střední oxidoredukční potenciály oxidoredukčních párů významných pro přeměnu energie na membránách. Ve sloupci **F** povaha sloučeniny: K – přenašeč-kofaktor bílkovinného komplexu; P – pohyblivý přenašeč; S – přirozený substrát (donor nebo akceptor elektronu nebo vodíku) oxidoredukční reakce; M - umělý mediátor přenosu elektronů, donor nebo akceptor elektronů

oxidoredukční pár	F	$E^{0'} (E_{m,7})$	poznámka
$P680 \rightarrow P680^+ + e^-$	K	+1170	P680 – primární donor PS2RC
$Tyr Z \rightarrow Tyr Z^{2+} + e^-$	K	~+1000	Tyr Z – sekundár. donor PS2RC
$2 H_2O \rightarrow O_2 + 4 H^+ + 4 e^-$	S	+820	
$P700 \rightarrow P700^+ + e^-$	K	+490	P700 – primární donor PS1RC
$P870 \rightarrow P870^+ + e^-$	K	+400 až +500	P870 - primární donor BRC2
$K_4Fe(CN)_6 \rightarrow K_3Fe(CN)_6 + e^- + K^+$	M	+440	
$NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2 e^- + 2 H^+$	S	+420	
$PC (Cu^+) \rightarrow PC (Cu^{2+}) + e^-$	P	+370	PC – plastocyanin
$cyt a (Fe^{2+}) \rightarrow cyt a (Fe^{3+}) + e^-$	K	+250 až +400	
$cyt b559_{vp} (Fe^{2+}) \rightarrow cyt b559_{vp} (Fe^{3+}) + e^-$	K	+380	
$cyt f (Fe^{2+}) \rightarrow cyt f (Fe^{3+}) + e^-$	K	+300	
$cyt c a c_2 (Fe^{2+}) \rightarrow cyt c a c_2 (Fe^{3+}) + e^-$	K	+300	
$H_2O_2 \rightarrow 1/2 O_2 + e^- + H^+$	S	+300	
$Rieske (FeS)^- \rightarrow Rieske (FeS) + e^-$	K	+290	
$1,4-BQH_2 \rightarrow 1,4-BQ + 2 e^- + 2 H^+$	M	+260	BQ – benzochinon
$cyt c_1 (Fe^{2+}) \rightarrow cyt c_1 (Fe^{3+}) + e^-$	P	+220	
$DPIP_{red} \rightarrow DPIP_{ox} + e^- + H^+$	M	+220	DPIP – dichlorfenolindofenol
$QH_2 \rightarrow Q + 2 e^- + 2 H^+$	P	+100	pro UQ i PQ
$PMS_{red} \rightarrow PMS_{ox} + e^- + H^+$	M	+80	PMS – fenazinmethosulfát
askorbát \rightarrow dehydroaskorbát + 2 e ⁻ + 2 H ⁺	M	+80	
$cyt b559_{np} (Fe^{2+}) \rightarrow cyt b559_{np} (Fe^{3+}) + e^-$	K	+80	
$cyt b_H (Fe^{2+}) \rightarrow cyt b_H (Fe^{3+}) + e^- + H^+$	K	+50	hem b_n cyt b/c_1 komplexu
sukcinát \rightarrow fumarát + 2 e ⁻ + 2 H ⁺	S	+30	
$MB_{red} \rightarrow MB_{ox} + e^- + H^+$	M	+10	MB – methylenová modř
$Q_B H_2 \rightarrow Q_B + 2 e^- + 2 H^+$	P,K	0	
$cyt b_6 (Fe^{2+}) \rightarrow cyt b_6 (Fe^{3+}) + e^-$	K	-50	
$Q_A^- \rightarrow Q_A + e^-$	K	-130	
laktát \rightarrow pyruvát + 2 e ⁻ + 2 H ⁺	S	-190	
$FMNH_2 \rightarrow FMN + 2 e^- + 2 H^+$	K	-210	FMN – flavin mononukleotid
$H_2S \rightarrow S + 2 e^- + 2 H^+$	S	-270	
$lipoát_{red} \rightarrow lipoát_{ox} + 2 e^- + 2 H^+$	P,K	-290	
$NAD(P)H + H^+ \rightarrow NAD(P)^+ + 2 e^- + 2 H^+$	P,K	-320	
$2 cysH \rightarrow (cys)_2 + 2 e^- + 2 H^+$	S	-340	cysH – cystein; (cys) ₂ – cystin
$BV \rightarrow BV^{2+} + 2 e^- + 2 H^+$	M	-360	BV – benzylviologen
$FADH_2 \rightarrow FAD + 2 e^- + 2 H^+$	K	-380 až +180	FAD – flavinadenindinukleotid
$H_2 \rightarrow 2 e^- + 2 H^+$	S	-410	
$Fd^- \rightarrow Fd + e^-$	P	-420	Fd – feredoxin
$MV \rightarrow MV^{2+} + 2 e^- + 2 H^+$	M	-450	MV – methylviologen
$F_A (FeS)^- \rightarrow F_A (FeS) + e^-$	K	-540	sekundární akceptor PS1RC
$F_B (FeS)^- \rightarrow F_B (FeS) + e^-$	K	-500	sekundární akceptor PS1RC
$Phaeo^- \rightarrow Phaeo + e^-$	K	-600	Phaeo – feofytin v RC PS2
$P680^* \rightarrow P680^+ + e^-$	K	-650	P680 – primární donor PS2RC
$Bphaeo^- \rightarrow Bphaeo + e^-$	K	-700	Bphaeo – bakteriofeofytin
$F_X (FeS)^- \rightarrow F_X (FeS) + e^-$	K	-705	F_X – primární akceptor PS1RC
$A_1^- \rightarrow A_1 + e^-$	K	-900	A_1 - fylochinon, přech. akc. PS1RC
$A_0^- \rightarrow A_0 + e^-$	K	~ -1000	A_0 – Chl a , přech. akceptor PS1RC
$P700^* \rightarrow P700^+ + e^-$	K	-1280	P700 – primární donor PS1RC

3.5.2 ŘETĚZCE PŘENOSU ELEKTRONŮ A PŘESUNY PROTONŮ

Tok elektronů membránou přeměňující energii, ať je to membrána respirační nebo fotosyntetická, je spřážen s vytvářením rozdílu v koncentracích protonů (rozdílu v $\Delta\mu_{H^+}$). Ústředním prvkem této přeměny je v obou membránách komplex cytochromů, cytochrom *b/c₁* komplex v membráně mitochondriální a cytochrom *b₆f* komplex v thylakoidu. Komplexy tohoto typu jsou téměř všudypřítomnou složkou všech energií přeměňujících membrán a jsou jedním z prvků spoluurčujících jednotný základní plán, podle něhož jsou ETM stavěny. Poněvadž mají velmi podobnou strukturu a téměř shodnou funkci budeme je někdy souhrnně označovat jako cytochrom *b/c/f* komplex.

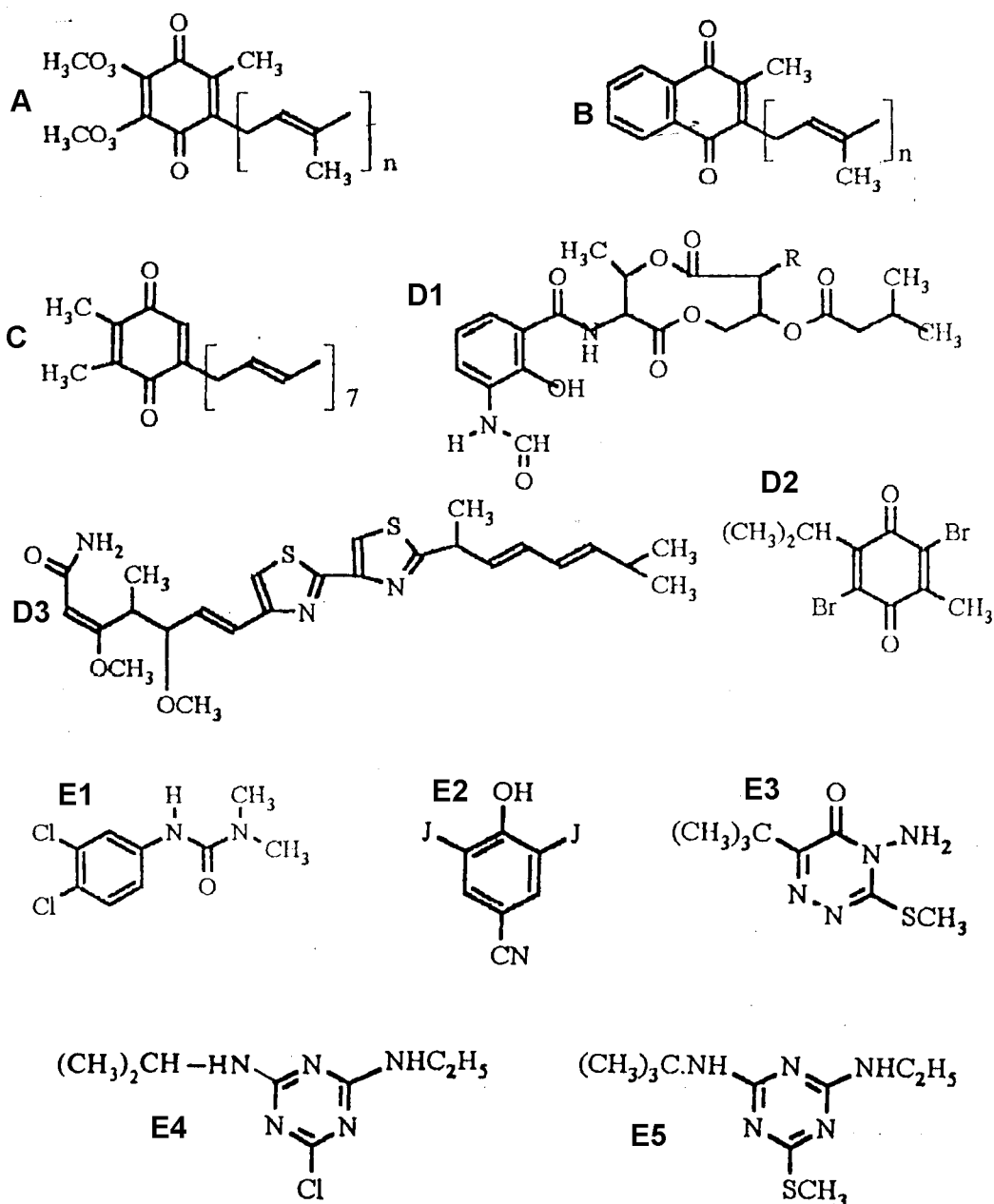
Úplný řetězec přenosu elektronů v mitochondriální nebo thylakoidální membráně, který tuto přeměnu energie elektronů na energii protonů zajišťuje, sestává ze dvou typů přenašečů zachycených schématicky na **Obr. 3.5-2**. Jsou to:

(1) Bílkovinné komplexy zasazené v membráně. Tyto komplexy vnášejí elektron do membrány, vynášejí ho z ní a (ve většině případů) ho přenášejí směrem od jednoho povrchu membrány ke druhému (tedy napříč membránou). Přenosy elektronů v těchto komplexech jsou různými mechanismy spřázeny s přenášením protonů s jednoho povrchu membrány na druhý. Tak se energie tekoucích elektronů přeměňuje na $\Delta\mu_{H^+}$. Bílkovinné komplexy jsou generátory $\Delta\mu_{H^+}$. Charakteristika těch nejvýznamnějších, které jsou jako komplexy A, B a C znázorněny na **Obr. 3.5-2** je v **Kap. 3.5.3** až **Kap. 3.5.5**. Zde jen upozorníme na to, že cytochrom *b/c/f* komplex zaujímá v obou membránách ústřední polohu, podle níž je uspořádání membrány souměrné (**Obr. 3.5-2**).

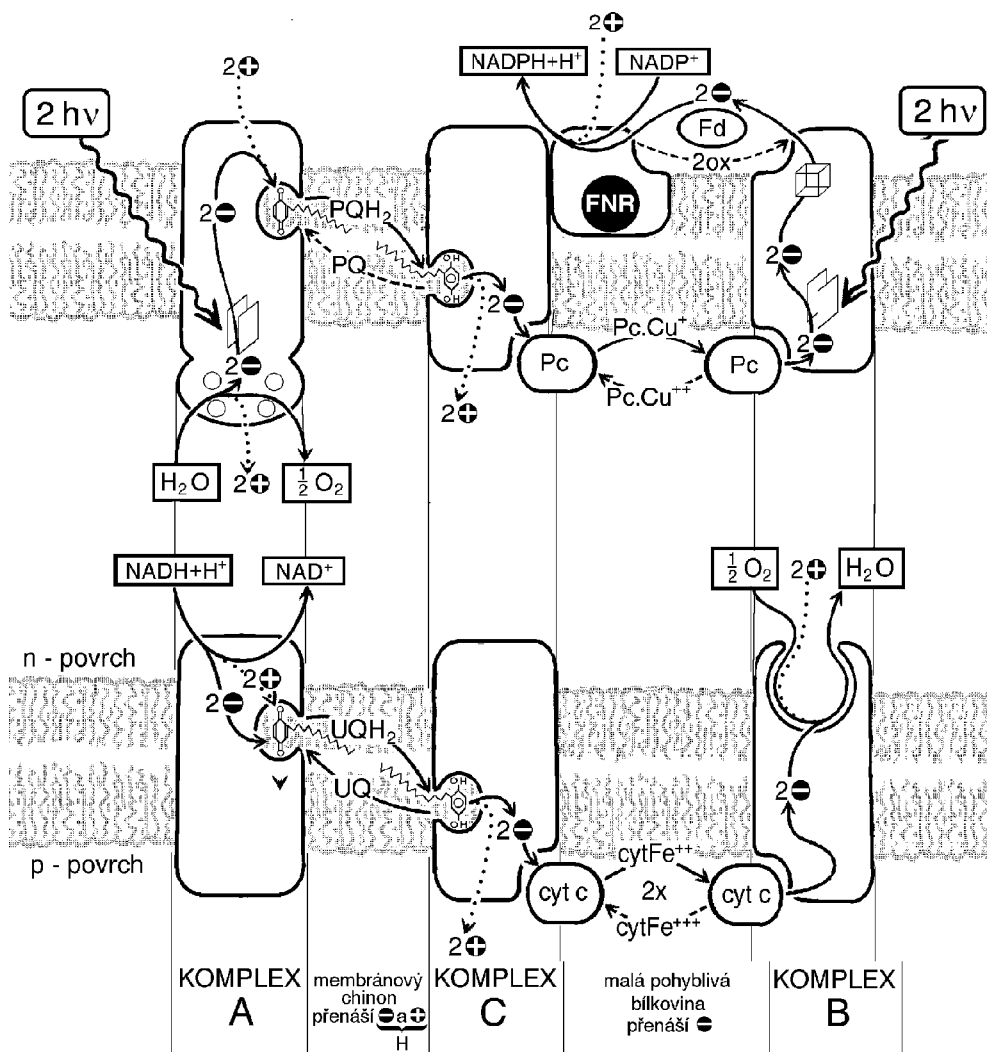
(2) Pohyblivé přenašeče elektronů, které zprostředkují přenosy elektronů mezi bílkovinnými komplexy zasazenými v membráně, případně mezi těmito komplexy a dalšími prvky, které se účastní přeměny energie v plasmatických odděleních. Pohyblivé přenašeče jsou tří druhů:

(a) Membránové chinony, což jsou deriváty p-benzochinonu (nebo naftochinonu), které mají dlouhý postranní polyisoprenový řetězec a tím jsou udržovány v hydrofobním středu membrány. Tam se také pohybují tam a zpět mezi dvěma komplexy a přenášejí vodíky (tedy elektrony + protony) v rovině membrány. Přitom vždy jeden komplex (“reduktasa chinonu”) chinon redukuje dvěma elektrony a dvěma protony, odhátými vodní fází na jedné straně membrány. Druhý komplex chinon oxiduje (“oxidasa chinonu”), protony vyloučí do vodní fáze na druhé straně membrány a elektrony předá pohyblivému přenašeči při tomto povrchu membrány. Vedle cyt *b/c/f* komplexu jsou membránové chinony druhou zcela universální součástí ETM. Strukturální vzorce nejdůležitějších membránových chinonů jsou v **Obr. 3.5-1**. Jsou tam dále uvedeny vzorce sloučenin, které s různými membránovými komplexy reagují jako analogy membránových chinonů a tak působí jako umělé přenašeče elektronů nebo, častěji, jako inhibitory.

(b) Bílkovinné přenašeče elektronu, což jsou malé bílkoviny pohybující se od jednoho membránového komplexu ke druhému ve vodné fázi při povrchu membrány. Jsou to především cytochrom *c* (přenáší elektrony v mitochondriích a bakteriích) a plastocyanin (v chloroplastech), které přenášejí elektrony od cyt *b/c/f* komplexu na jiný membránový komplex. V cytochromu je elektrony přenášejícím kofaktorem hem, v plastocyaninu ion mědi. Konečně mezi malé bílkovinné přenašeče patří také feredoxin, který odebírá elektrony reakčním centřům fotosystému I a zelených sírných bakterií a přenáší je na enzym pouze zakotvený v membráně (neprostupuje ji) a redukuje NAD(P). Vlastním přenašečem elektronu ve feredoxinu je sírou vázané železo. Některé podrobnosti o struktuře malých bílkovinných přenašečů jsou v **Kap. 3.5.4**.



Obr. 3.5–1. Chinony membrán přeměňujících energii a sloučeniny, které působí jako jejich kompetitivní inhibitory, **A** - ubiquinony (UQ); **B** - menachinony (MQ); **C** - plastochinon (PQ); Počet opakování isoprenových zbytků v postranním řetězci PQ je 9, u UQ je různý podle zdroje: eukaryotické mitochondrie obvykle 10 (UQ-10), méně často 9 (UQ-9), v mitochondriích kvasinek 6 (UQ-6). UQ-9 a UQ-10 jsou běžné u fotosyntetických bakterií. Menachinony MQ-6, 7, 8, 9 jsou u různých heterotrofních bakterií. MQ-7 je v poolu fotosyntetické bakterie *Chromatium*, MQ-9 jako Q_A v RC *Rhodospseudomonas viridis*. **D** - Kompetitivní inhibitory se strukturou podobnou chinonu, které se nejčastěji používají při studiu cyt *b/c/f* komplexu (některé se uplatňují i v chinonových kapsách jiných komplexů): **D1** - antimycin (R je n-hexyl pro antimycin a₁ a n-butyl pro a₃); **D2** - DBMIB (2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-benzochinon); **D3** - myxothiazol. **E** - Kompetitivní inhibitory známé především jako inhibitory RCII: **E1** - DCMU 3-(3,4-dichlorfenyl)-1,1-dimethylmočovina); tato sloučenina je jedním z nejúčinnějších inhibitorů elektronového transportu v thylakoidech a jedním z nejúčinnějších herbicidů; jako herbicid je známa pod jménem diuron; **E2** - atrazin; **E3** - metribuzin; **E4** - ioxynil; **E5** - terbutryn;



Obr. 3.5–2 Zjednodušená schémata přenosu elektronů v membráně oxygenní fotosyntézy a mitochondriálního dýchání ukazují základní stavební princip ETM a dva typy přenašečů elektronů. Komplexy označené A dehydrogenují substrát ($\text{NADH}+\text{H}^+$ nebo vodu) a vnášejí elektrony do membrány, kde jimi redukují membránový chinon (PQ nebo UQ). Komplex označený C je cyt b_6/c_1 komplex nebo cyt b_6/f komplex, který membránový chinon oxiduje a odděluje přitom protony od elektronů. Pohyblivý přenašeč při p povrchu membrány (cytochrom c nebo plastocyanin) přenáší elektron ke komplexu B, který ho přenesne přes membránu a použije k redukci kyslíku nebo NAD^+ . Obrázek také ukazuje převrácenou souměrnost obou membrán.

(c) Pohybliví přenašeči vodíkových atomů (vlastně hydridových aniontů, tedy protonu + 2 elektronů) ve vodné fázi při povrchu membrány. Jsou to oxidoredukční páry $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ a $\text{NADP}^+/\text{NADPH}+\text{H}^+$, o nichž se píše v **Kap. 3.3 (Obr. 3.3-1 a Obr. 3.3-2)**. $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ je především známý jako přenašeč v matrix mitochondrií, kde se redukuje při oxidaci jednotlivých složek citrátového cyklu a oxiduje působením membránového enzymu NADH-ubichinon oxidoreduktasy. V zelených sírných bakteriích je NAD^+ konečným akceptorem elektronu, který přijímá od redukováného feredoxinu prostřednictvím feredoxin : NAD oxidoreduktasy. V oxygenní fotosyntéze obdobným konečným akceptorem elektronů z fotosystému I je NADP^+ . Také na něj přenáší elektrony Fd : NADP^+ oxidoreduktasa z redukováného feredoxinu.

Z popisu funkce membránových chinonů a malých bílkovinných přenašečů již vyvstal jeden znak základního obecného plánu stavby ETM mitochondriálního dýchání a oxygenní fotosyntézy. Je zdůrazněn ve schématu na **Obr. 3.5-2**. Bílkovinný komplex A, v němž přenos elektronů začíná, redukuje membránový chinon, k čemuž použije

elektron a proton, které nemusí mít bezprostředně společný původ. **A** je v mitochondriích membránový enzym, který oxiduje $\text{NADH} + \text{H}^+$ (tedy NADH-ubichinon oxidoreduktasa), v chloroplastech je to fotosystém 2. Proton vždy pochází z povrchu, z něhož se obecně protony čerpají, tedy z negativního povrchu n .

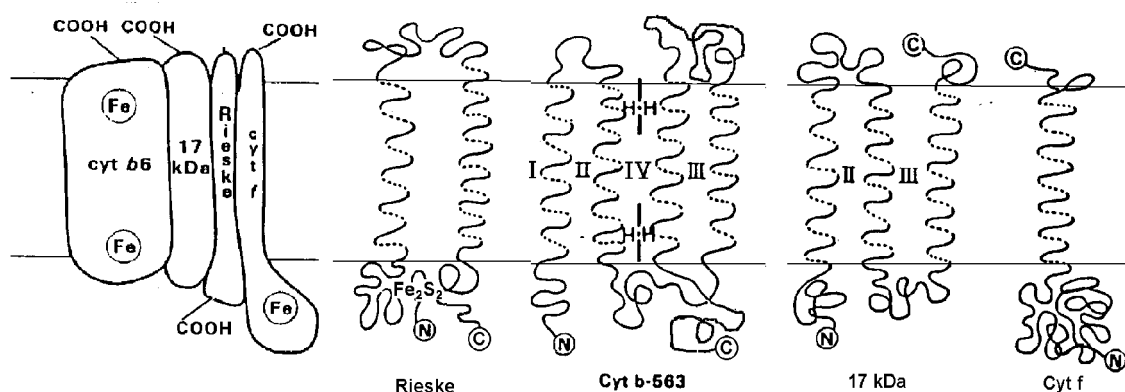
Redukovaný chinon, tedy chinol, QH_2 , se membránou přesune ke komplexu v obrázku označenému **C**, tj. k cytochrom $b/c/f$ komplexu a tam je oxidován. Přitom se protony vyloučí do prostředí hraničícího na této straně s membránou, tedy na pozitivně nabitý povrch p membrány. Elektrony se odevzdají malé pohyblivé bílkovině, cytochromu c nebo plastocyaninu. Ta je dopraví k poslednímu komplexu, v obrázku označenému **B**, který elektron přeneše na (relativně) stálý akceptor. Komplex **B** je v mitochondriální membráně cytochrom $c - \text{O}_2$ oxidoreduktasa. Ta elektrony z cyt c a protony z n povrchu membrány redukuje kyslík na vodu. V thylakoidní membráně chloroplastu komplex **B** odpovídá fotosystému 1. Ten s pomocí energie pohlceného fotonu dopraví elektron z plastocyaninu na ferredoxin a dále na NADP^+ . Enzym ferredoxin- NADP^+ oxidoreduktasa přidá k elektronům protony z n povrchu membrány a redukuje NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

3.5.3 CYTOCHROM b/c_1 (b_6/f) KOMPLEX, UBICHINOL-CYTOCHROM c OXIDOREDUKTASA, PLASTOCHINOL-PLASTOCYANIN OXIDOREDUKTASA

Na **obr. 3.5-2** je nápadné, že střední část řetězce přenosu elektronů, zahrnující chinon, cyt b/c_1 komplex (cyt b_6/f komplex) a bílkovinný pohyblivý přenašeč (cytochrom c nebo plastocyanin) je shodná a má touž funkci v obou typech membrán. Tento úsek ilustruje dobře jeden ze základních předpokladů o spřažení přenosu elektronů v membráně s přesuny protonů napříč membránou tak, jak jej vyslovil Peter Mitchell. Spřažení je důsledkem toho, že se při oxidaci chinolu elektron a proton, které náležely jednomu vodíkovému atomu v molekule chinolu, oddělí a každý dále postupuje samostatně. Naopak na komplexu **A** se tento elektron a proton v redukci chinolu sdružily i když pocházely z různých zdrojů, jak je dobře vidět, je-li komplex **A** reakční centrum fotosystému 2. Ve skutečnosti to platí i pro NADH dehydrogenasu, ale to je složitější úvaha. Přechodné sdružení a opětné oddělení protonu s elektronem v průběhu jejich přenosu od redukčního konce řetězce k oxidačnímu je tedy jedním prvkem vytváření $\Delta\mu_{\text{H}^+}$.

V cytochrom $b/c/f$ komplexech se tento funkční prvek uplatňuje dokonce dvakrát, čímž se dosáhne toho, že jeden elektron prošlý tímto komplexem přesune přes membránu dva protony. Cyklický pochod, který je základem tohoto stechiometrického poměru se obvykle označuje jako Q-cyklus. Je důležité mu porozumět, protože odráží významné prvky chemiosmotické teorie. Znázorněn je na **Obr. 3.5-4**. Pro jeho pochopení je třeba uvést základní údaje o struktuře komplexu, která je předpokladem pro jeho funkci. Jsou shrnuty v **Obr. 3.5-3**.

Cytochrom b/c_1 komplexu a cytochrom b_6/f komplexu z různých organismů mají shodné základní tři součásti, na jejichž souhře spočívá vlastní funkce komplexu. Jsou to: cyt b se dvěma hemy, cyt c nebo cyt f a Rieskeho bílkovina se sírou vázaným železem. Pro funkci Q-cyklu je zásadně důležité, že cyt b má dva hemy v různých částech membrány a s různým oxidoredukčním potenciálem.



Obr. 3.5-3. Cytochrom b_6/f komplex. **A.** Schématická kresba zasazení jednotlivých složek komplexu v membráně. **B.** Předpokládané šroubovice α v jednotlivých bílkovinách a jejich uložení v membráně. Donedávna se u cyt b 563 předpokládalo 5 šroubovic U , které procházejí membránou, jsou však pravděpodobně pouze 4 a proto C i N konec polypeptidového řetězce jsou na téže (n) straně membrány. Také o Rieskeho bílkovině se soudilo, že prostupuje membránu pouze jednou (jako cyt f), ale nyní je pravděpodobnější, že má dvě šroubovice prostupující membránu.

Hemy cytochromu b se označují podle povrchu membrány, kterému jsou blíže a aby označování bylo jednotné u různých energií přeměňujících membrán, je výhodné je označovat podle potenciálního rozdílu na energizované membráně jako hem b_n pro hem blíže k pozitivnímu povrchu (kam se čerpají protony) a hem b_p pro hem blíže povrchu negativního (odkud se protony čerpají). $E_{m,7}(b_p)$ se v různých membránách pohybuje mezi -100 a 0 mV, kdežto $E_{m,7}(b_n) \approx +50$ mV. Proto se také hem b_p nazývá často nízkopotenciálový hem a označuje se jako hem b_L (od anglického low-potential heme) a hem b_n se nazývá vysokopotenciálový hem a označuje se hem b_H (od anglického high-potential heme). Obdobně se také používají označení cyt b_L a cyt b_H .

Poblíž každého hemu je vazebné místo (kapsa) pro membránový chinon (ubichinon, plastochinon) a tyto kapsy se také rozlišují podle jejich polohy blíže negativnímu nebo pozitivnímu povrchu membrány jako kapsa Q_n a kapsa Q_p .

Právě popsaných názvů použijeme při popisu funkce Q-cyklu zobrazeného na **Obr. 3.5-4**. Mechanismus Q-cyklu lze rozdělit do tří stupňů:

(1) Oxidace UQH_2 v kapse Q_p : Molekula UQH_2 se dostane do kapsy Q_p a její oxidace má dva kroky: (a) Jeden elektron se z UQH_2 přenesse na $2Fe-2S$ centrum Rieskeho bílkoviny a oba vodíky se jako protony uvolní na p stranu membrány. V Q_p kapse zůstane tedy semichinonový anion UQ^- . (b) Druhý elektron se přenesse na hem b_L cyt b , který je v blízkosti kapsy Q_p .

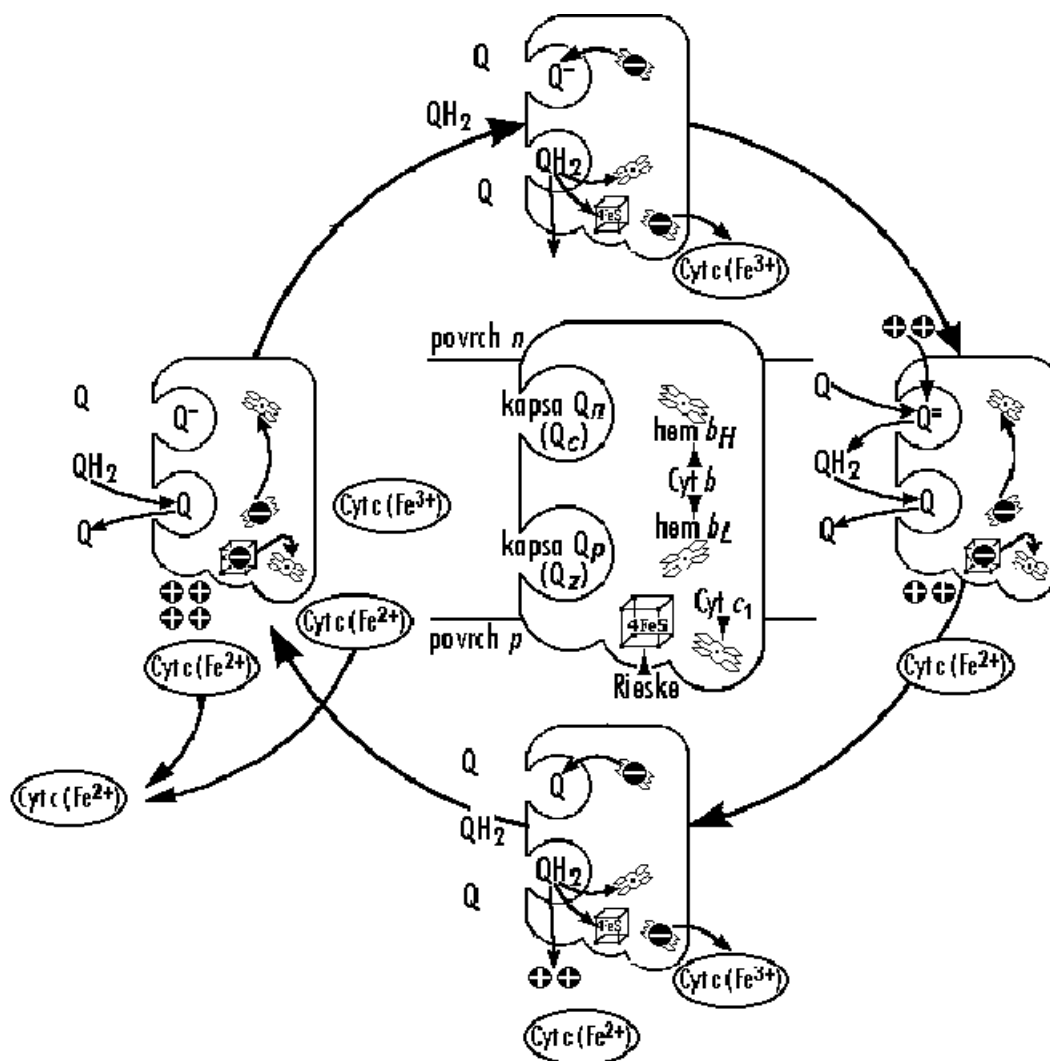
$E_{m,7}$ pro pár UQH_2/UQ^- je velmi vysoký, okolo $+280$ mV. V téže oblasti ($+250$ mV až $+300$ mV) se pohybuje $E_{m,7}$ Fe-S centra Rieskeho bílkoviny. Přenos je tedy možný a pokračuje na pohyblivý přenašeč cyt c , jehož $E_{m,7}$ je také okolo $+250$ mV, ale, protože je převážná část populace jeho molekul ve stavu oxidovaném, posouvá se E_h až nad $+300$ mV.

(2) Redukce UQ na UQ^- v kapse Q_n : Elektron z hemu b_L , jehož $E_{m,7} = -100$ mV nyní přejde na hem b_H s $E_{m,7} = +50$ mV. Poměrně velká energie daná rozdílem oxidoredukčních potenciálů obou hemů je pro tento přenos potřebná, protože elektron prochází napříč membránou, na níž je, pokud je energizovaná, potenciální rozdíl také asi 150 mV s negativním pólem u hemu b_H . Elektron si vlastně téměř celou svou energii zachová, protože spád oxidoredukčního potenciálu je právě kompenzován potenciálním rozdílem

mezi oběma hemy, který je dán jejich polohou v membráně. Je to příklad toho, že poloha daného přenašeče ve škále oxidoredukčních potenciálů je spoluurčována také potenciály na membráně.

Dalším krokem Q–cyklu je redukce molekuly UQ, která vstoupila z membrány do kapsy Q_n , nacházející se v blízkosti hemu b_H . Oxidoredukční pár UQ / UQ^- je charakterizován $E_{m,7} = -160$ mV a hem b_H $E_{m,7} = +50$ mV. Bez dalších vlivů by tedy elektrony tekly naopak od UQ^- na hem b_H . Avšak membránový potenciál snižuje střední potenciál hemu b_H alespoň o 100 mV a na druhé straně oxidoredukční potenciál UQ^- je zvýšen tím, že UQ^- je vázán v kapse Q_n mnohem pevněji nežli UQ.

(3) Redukce UQ^- na UQH_2 v kapse Q_n : V kapse Q_n je pevně vázán semichinon UQ^- . Aby jeho redukce pokročila, musí se nejprve v kapse Q_p oxidovat další molekula UQH_2 , při čemž se opakují kroky popsané v bodě (1): jeden elektron se přenesne na cyt c a jeden na hem b_H . Ten pak redukuje UQ^- na UQ^{2-} , který se ihned protonuje na UQH_2 .



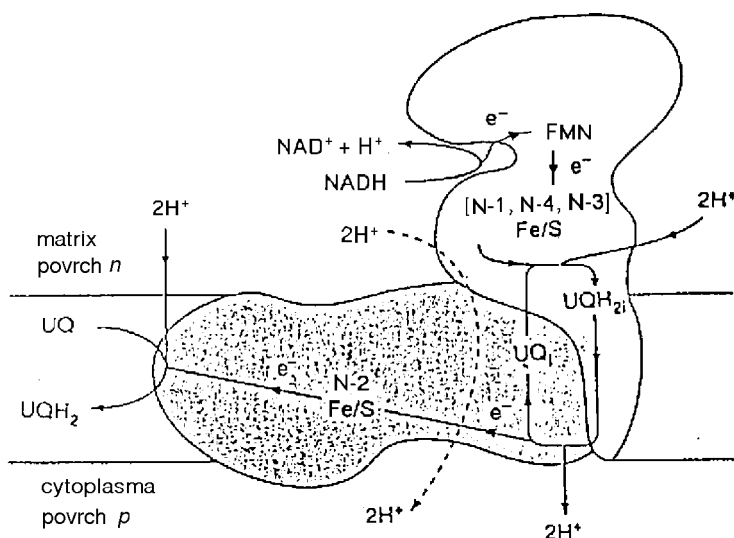
Obr. 3.5–4. Schématické znázornění funkce cytochrom *b/c/f* komplexu, v němž probíhá tzv. Q cyklus. Uprostřed jsou znázorněny a pojmenovány funkční složky komplexu. V kruhu jednotlivé kroky oxidace QH_2 , což je buď ubichinol (v mitochondriích a fotosyntetických bakteriích) nebo plastochinol (v chloroplastech). Cyt c přenáší elektrony k cytochromoxidase (v mitochondriích) nebo k reakčnímu centru (PS1RC, BRC2). Šipky naznačují přesuny elektronů nebo přenašečů, k nimž dojde v následujícím kroku (mezi dvěma zakreslenými stavy). Popis jednotlivých kroků je v textu

V Q-cyklu se odráží podstata chemiosmotické teorie. Je to také zatím jediný mechanismus čerpání protonů přes membránu, kterému rozumíme. S podobným čerpáním protonů, které vede ke stechiometrii $2H^+/e^-$ nebo $3H^+/e^-$, se setkáváme i u NADH-dehydrogenasy a cytochrom *c* oxidasy. Tam ale zatím podstata pochodu není jasná. U NADH-dehydrogenasy se uvažuje možnost cyklu obdobného Q-cyklu.

3.5.4 DALŠÍ BÍLKOVINNÉ KOMPLEXY PRO PŘENOS ELEKTRONŮ

3.5.4.1 NADH : UQ OXIDOREDUKTASA (NADH-DEHYDROGENASA, KOMPLEX I, FLAVOPROTEIN I, FPI)

Struktura a funkce tohoto komplexu jsou málo známy. Je to veliký komplex (m.h. asi 800 kDa, což je zhruba velikost velké podjednotky ribosomu) složený z více než 30 polypeptidových řetězců. Schématický náčrt, odpovídající současným znalostem je na **Obr. 3.5-5**.



Obr. 3.5-5. Schématický náčrt struktury a funkce NADH : UQ oxidoreduktasy. Šedá část je hydrofobní podjednotka vnořená v membráně. N-1 až N-4 jsou ta z mnohých FeS center, která byla podrobněji popsána. FMN - flavinmononukleotid. Čárkovaná šipka znázorňuje doplnkové čerpání protonů, jehož mechanismus není znám. UQ_i je ubiquinon, o němž se předpokládá, že je vázán v komplexu. Další popis v textu.

Funkce tohoto enzymu se obtížně analyzuje, poněvadž vedle jedné molekuly flavinmononukleotidu obsahuje asi sedm Fe/S center, z nichž jen čtyři jsou lépe definována. Označují se jako N-1, N-2, N-3 a N-4. N-1 je centrum typu 2Fe/2S, ostatní patří k 4Fe/4S centrům. Střední potenciály těchto center se mohou u různých organismů dosti lišit (např. $E_{m,7}$ centra N-2 od -20 do -160 mV). N-2 centrum má nejvyšší potenciál, u ostatních se předpokládají hodnoty nižší. Tak např. v mitochondriích *Neurospora crassa* jsou hodnoty $E_{m,7}$ -330 mV pro N-1, pro N-3 -230 mV a pro N-4 -300 mV. Podle hodnot $E_{m,7}$ by tedy pravděpodobná cesta elektronu byla $NADH \rightarrow FMN \rightarrow N-1 \rightarrow N-4 \rightarrow N-3 \rightarrow N-2 \rightarrow UQ$. Poněvadž ale komplex na jeden vodík (elektron + proton) přenesený z $NADH+H^+$ na UQ přeneše ještě nejméně jeden proton (ale nejspíše dva protony) přes membránu, pracuje v něm cosi jako Q-cyklus v cyt *b/c* komplexu a tok elektronů mezi přenašeči nemusí být jen jednosměrný.

Chaotropními činidly lze komplex I rozložit na tři části:

Prvá je ve vodě rozpustná tzv. flavoproteinová frakce. Skládá se ze tří polypeptidů ($M_r = 51, 24$ a 10 kDa), které obsahují vazebné místo pro NADH, FMN a dvě Fe/S centra (dosud blíže nedefinovaná, jedno je 2Fe/2S a jedno 4Fe/4S).

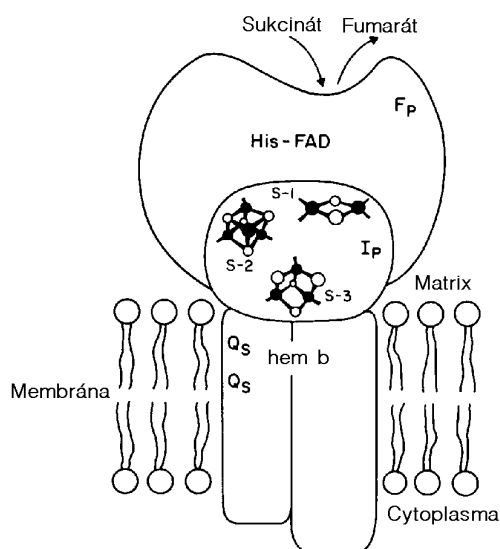
Druhá frakce je také (i když hůře) rozpustná ve vodě, sestává asi ze šesti polypeptidů (z nichž jeden má $M_r = 75\text{k Da}$), které váží nejméně tři Fe/S centra (N-1, N-4 a N-3). Označuje se jako frakce se železem vázaným sírou (iron-sulfur protein, IP).

Třetí frakce je silně hydrofobní (hydrophobic protein, HP). Sestává také z velkého počtu polypeptidů, které mají dohromady velký počet hydrofobních šroubovic α . Sedm z nich je kodováno v DNA mitochondrií. HP obsahuje Fe/S centrum N-2, které se vyznačuje vysokým oxidoredukčním potenciálem a přenáší pravděpodobně elektron na UQ v membráně. Poněvadž existují také nepřímé důkazy, že NADH : UQ oxidoreduktasa obsahuje vázanou molekulu chinonu, je možné, že tato molekula pracuje jako vnitřní přenašeč elektronu, podobně jako je tomu u fotosyntetických reakčních center. Že se tento chinon podílí na čerpání protonů přes membránu je zatím jen domněnka. V každém případě však je NADH : UQ oxidoreduktasa účinná protonová pumpa. Stechiometrický poměr přenášených protonů a elektronů v komplexu I je nejméně $4\text{H}^+/2\text{e}^-$, ale nejspíše $6\text{H}^+/2\text{e}^-$, tedy nejvyšší hodnota mezi membránovými přenašeči elektronů.

3.5.4.2 SUKČINÁTDEHYDROGENASA (KOMPLEX II), FLAVOPROTEIN PŘENÁŠENÍ ELEKTRONY (ELECTRON TRANSFERRING FLAVOPROTEIN) A α -GLYCEROFOSFÁTDEHYDROGENASA

Vedle NADH-ubichinol oxidoreduktasy se přenášejí elektrony na ubichinol ještě třemi dalšími cestami: (a) sukcinátdehydrogenasou (komplexem II), (b) s,n-glycerofosfát dehydrogenasou, (c) flavoproteinem, který přenáší elektrony od komplexu enzymů, v němž dochází k β -oxidaci mastných kyselin.

Prvé dva enzymy jsou umístěny na povrchu membrány, který se stýká s matrix, poslední je na cytoplasmatické straně membrány. Všechny tři jsou flavoproteiny a přenášejí elektrony ze substrátů, jejichž střední oxidoredukční potenciál leží okolo nuly. Proto také žádný z nich nepřenáší protony přes membránu. Struktura těchto přenašečů je málo prozkoumána.



Komplex II sestává z několika polypeptidů (viz Obr. 3.5-6). V největším je uložen FAD a dvě FeS centra, další obsahují ještě jedno FeS centrum a jeden cytochrom *b*, jehož funkce není jasná. Pro fotosyntetické membrány je tento komplex málo významný. Je však možné, že dehydrogenasy, které přenášejí elektrony ze sloučenin síry na UQ u zelených sírných bakterií, jsou příbuzného typu.

Obr. 3.5-6. Schématické znázornění sukcinátdehydrogenasy, která tvoří komplex s cytochromem *b*, vnořeným v membráně. Flavinadeninindinukleotid (FAD) je vázán ve flavoproteinu (F_p) přes histidin. Podjednotka I_p (iron protein) obsahuje tři lépe definovaná FeS centra.

3.5.4.3 OXIDASA CYTOCHROMU *c* (KOMPLEX IV, CYTOCHROM *c* OXIDASA, CYTOCHROM A_3)

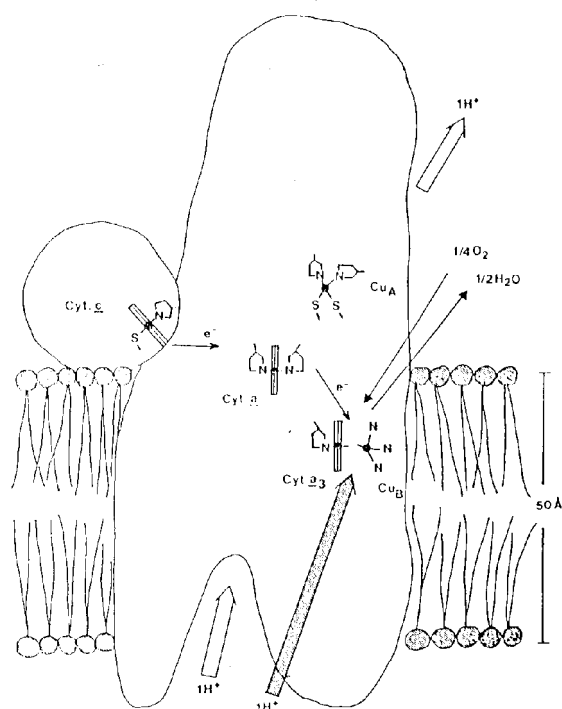
Tento velmi složitý komplex se vyskytuje jako dimer o úhrnné M_r asi 300 kDa (viz **Obr. 3.5-7**), každý monomer sestává z více než deseti podjednotek, z nichž tři největší jsou kodovány v DNA mitochondrií. Jako funkční kofaktory obsahuje každý monomer dva spektrálně odlišené, ale chemicky shodné hemy, hem *a* a hem a_3 , a dva atomy mědi Cu_A a Cu_B , které přenášejí elektrony tak, že z dvojmocného iontu přecházejí na jednomocný. Všechny tyto skupiny jsou soustředěny ve dvou největších jednotkách, které mohou uskutečnit celý přenos elektronu, jsou-li izolovány.

Nejpravděpodobněji se elektron přenáší z cyt *c* na atom Cu_A umístěný v menší ze dvou hlavních podjednotek. Oba hemy a Cu_B jsou v největší podjednotce velmi blízko u sebe; předpokládá se, že jsou blíže té straně membrány, která hraničí s matrix. V každém případě protony, jichž se použije na redukci vody, pocházejí z matrix.

Jeden z možných mechanismů redukce O_2 je tento (viz **Obr. 3.5-7**): Nejprve přijmou hem a_3 a Cu_B po jednom elektronu od hemu *a* ve dvou krocích. Pak se mezi nimi vytvoří peroxidový můstek, čímž se elektrony přenesou na kyslík. V dalším kroku se přijmou dva protony a další elektron, čímž se přeruší vazba mezi kyslíkovými atomy a jeden kyslík se váže dvojnou vazbou na železo hemu a_3 , které se tak vlastně stane čtyřmocné. Přijetí posledního elektronu a dvou protonů vede v posledních dvou krocích k uvolnění dvou molekul vody.

K potvrzení těchto hypotéz bude třeba stanovit strukturu celého komplexu s vysokým rozlišením, tak jak se to stalo u reakčního centra bakteriální fotosyntézy. K cíli povede spíše analýza dvojrozměrných útvarů elektronovou mikroskopií s vysokým rozlišením než rentgenová strukturní analýza, poněvadž se nedaří získat dostatečně pravidelné krystaly komplexu.

Funkční skupina, která váže kyslík, může navázat také CO, CN^- a N_3^- , čímž se vysvětluje, proč tyto látky inhibují činnost cytochrom-*c*-oxidasy a tím dýchání.



Obr. 3.5-7. Schématický náčrt struktury a funkce cytochromoxidasy. Znárodněny jsou jen dvě největší podjednotky (I a II), které dávají komplexu charakteristický tvar (podobný zubu nebo obrácenému Y) s velkým výčnělkem do fáze *p* (plasmatická strana u mitochondrií, u bakterií strana periplasmatická). Polohy jednotlivých kofaktorů jsou odvozeny z řady nepřímých důkazů, ale nejsou (kromě příslušnosti k podjednotkám) bezpečně známy. Místo redukce kyslíku se předpokládá u *n* povrchu membrány, protože z tohoto povrchu pocházejí protony, které se pro redukci používají. Může být však v hluboké kapse mezi oběma rameny Y (“kořeny zubu”). Šipkou je naznačeno také doplňkové čerpání protonů, jehož mechanismus není dosud jasný. Stechiometrie přesunu protonů při práci cytochromoxidasy je nejspíše $4 H^+ / 2e$

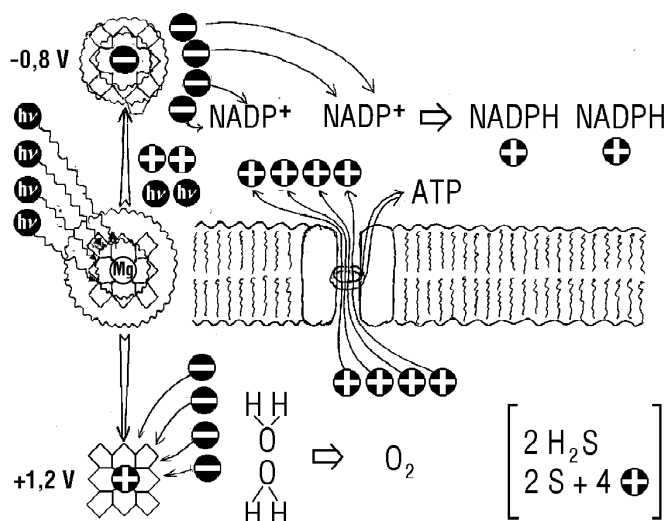
Cytochrom-*c*-oxidasa při redukcí kyslíku spotřebovává protony ze strany matrix (povrch *n*), a také přenáší protony přes membránu, přibližně jeden proton na elektron. Mechanismus tohoto pochodu není znám; snad je čerpání je spojeno s konformační změnou komplexu. Stechiometrie je nižší, než by se dalo očekávat. To lze vysvětlit tím, že reakce cytochrom-*c*-oxidasy je nevratná a tedy spojená se ztrátou volné energie.

Elektron se v tomto komplexu přenáší z hladiny oxidačně redukčního potenciálu $E_{h,7} \cong + 290 \text{ mV}$, na níž je v cyt *c*, až na hladinu páru $1/2 \text{ O}_2 / \text{H}_2\text{O}$, která je přibližně u $E_{h,7} \cong + 800 \text{ mV}$. Přitom se přenáší proti potenciálu na membráně, který je zhruba 180 mV . Úhrnný spád potenciálu pro elektron je tedy něco přes 300 mV . Čtyři elektrony padající s tímto spádem ($4 \times 330 \cong 1300 \text{ mV}$) mohou dodat energii pro přenos asi 6 protonů přes Δp asi 200 mV , které je na membráně.

3.5.5 REAKČNÍ CENTRA

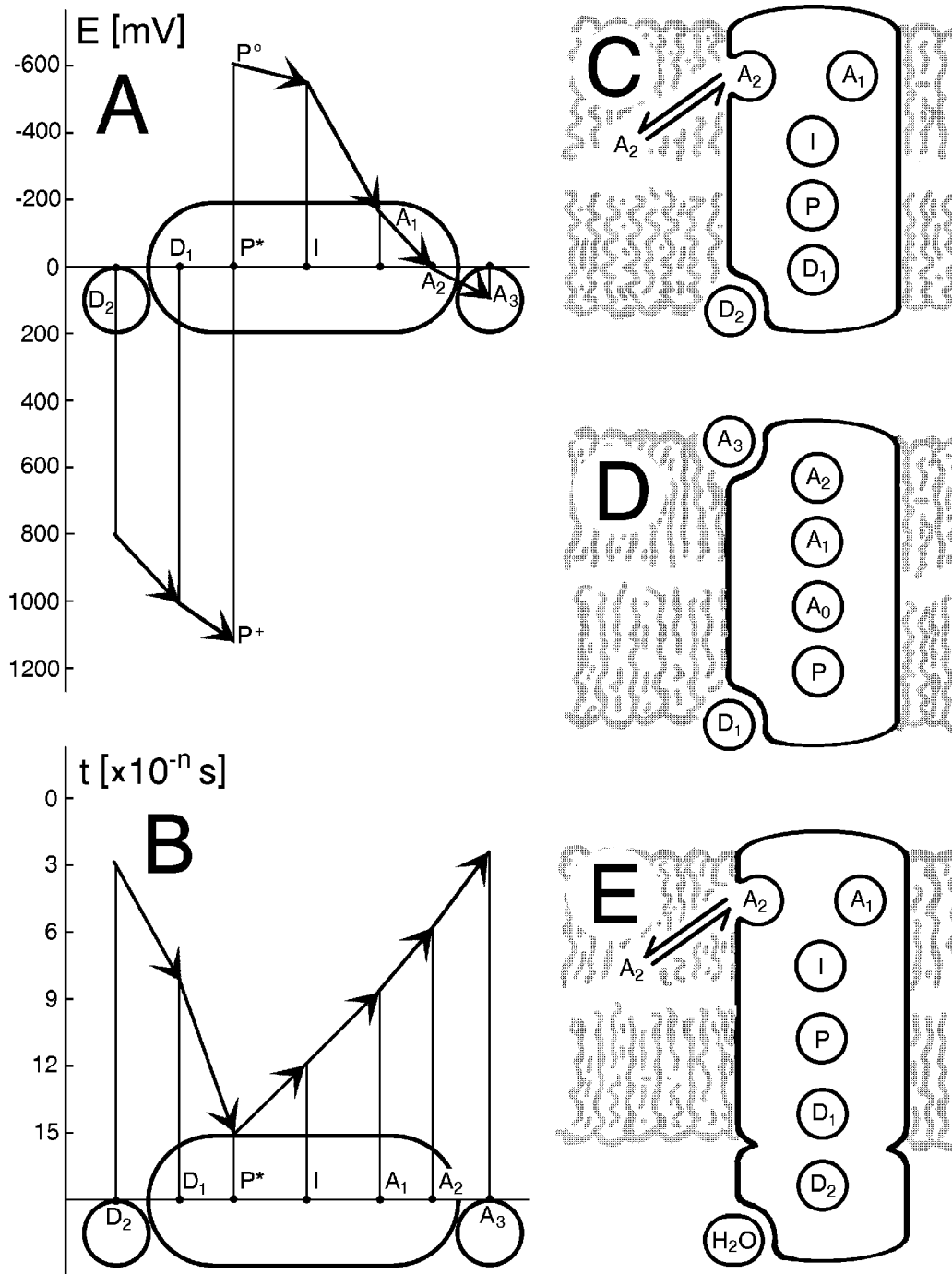
3.5.5.1 OBECNÉ VLASTNOSTI REAKČNÍCH CENTER

V reakčních centrech dochází k vlastní fotochemické přeměně energie: excitační energie, kterou chlorofyl získá pohlcením fotonu, se použije k rozdělení nábojů. Excitovaná molekula chlorofylu je silným redukčním činidlem, tj. má silný sklon zbavit se elektronu. Proto může přenést elektron na akceptor, který má velmi nízký oxidoredukční potenciál. Tak vznikne oxidovaný chlorofyl, jemuž chybí elektron, a ten je zase velmi silným oxidačním činidlem s vysokou afinitou pro elektron. Odnímá jej konečným donorům prostřednictvím různých přenašečů. Ve fotosystému 2 oxygenní fotosyntézy je afinita oxidovaného chlorofylu k elektronu tak vysoká, že může elektrony odnímat vodě, kterou oxiduje na kyslík. Tím, že se elektron z excitovaného chlorofylu přenesse na vzdálený akceptor a že se díra po tomto elektronu zaplní elektronem ze vzdáleného donoru, zmenší se významně pravděpodobnost zpětné reakce, tj. návratu elektronu do díry, kterou zanechal v chlorofylu. Dojde tak tedy ke stabilizaci rozdělených nábojů. Funkci chlorofylu při přeměně zářivé energie na energii elektrochemickou znázorňuje schématicky **Obr. 3.5-8**.



Obr. 3.5-8. Zjednodušené schématické znázornění funkce chlorofylu ve fotosyntéze. Excitovaný chlorofyl se stane silným redukčním činidlem a přeneše elektron na primární akceptor s velmi nízkým oxidoredukčním potenciálem ($-0,8 \text{ V}$, stupnice oxidoredukčních potenciálů je na levé straně). Chlorofyl s dírou po elektronu je silným oxidačním činidlem s oxidoredukčním potenciálem okolo $+1,2 \text{ V}$. Toto činidlo odsává elektrony z vody, čímž vzniká O_2 a uvolňují se protony. Elektron s vysokým chemickým potenciálem může redukovat silná redukční činidla jako NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a přitom spotřebovává protony. S přesuny elektronů jsou spřaženy přesuny protonů a tak vzniká rozdíl v koncentraci protonů na obou stranách

membrány. Energie v tomto rozdílu obsažená se využívá pro syntézu ATP. Schéma je silně zjednodušeno, funkce dvou fotochemicky účinných chlorofylů ve fotosyntetické membráně oxygenní fotosyntézy jsou zde spojeny.



Obr. 3.5–9. Schémata znázorňující nejdůležitější vlastnosti, nezbytné pro bezchybnou práci reakčních center (RC). P - primární donor, zvláštní pár (B)Chl; P* - excitovaný primární donor; P^o - oxidoredukční potenciál elektronu v excitovaném primárním donoru; I - přechodný akceptor; A₁, A₂, A₃ - primární, sekundární a terciární akceptor elektronu; D₂, D₃ - sekundární a terciární donor elektronu; **A** - oxidoredukční potenciály, v nichž se pohybují elektrony během jednoho cyklu rozdělení a stabilizace nábojů v RC fotosystému 2 (PS2RC); **B** - charakteristické časy, v nichž dochází k jednotlivým krokům přenosů elektronu v PS2RC; τ - záporný dekadický logaritmus charakteristického času; **v pravé části obrázku** schémata prostorového rozložení přenašečů elektronů v různých RC: **C** - v RC2 purpurových fotosyntetických bakterií (typu *Rhodospseudomonas viridis*, s připojeným komplexem cytochromů označeným D₁); **I** - (B)Pheo A₁ - Q_A; A₂ - Q_B; D₂ - cyt c; **D** - v PS1RC a v RC1 zelených sírných bakterií (A₀-feylochinon, A₁-FeS_X, A₂-(FeS_A + FeS_B), A₃ - feredoxin; **D** - plastocyanin nebo cyt c; **E** - v PS2RC; **I**, A₁ a A₂ jako v C; D₁ - TyrZ; D₂ - komplex oxidující vodu, průměrné časy a redoxpotenciály pro čtyři oxidoredukční stavy iontů Mn (pro čtyři stavy S).

Rozdělení a stabilizace nábojů se uskutečňují v reakčních centrech s vysokou účinností. Je tomu tak proto, že fotochemicky aktivní chlorofyl je součástí důmyslné prostorové struktury. Reakční centrum je komplex bílkovinných molekul zasazených v lipidní membráně a v něm jsou v optimálních prostorových vztazích zasazeny součásti potřebné pro nevratné rozdělení nábojů. Nazýváme je kofaktory.

Pro bezchybné rozdělení nábojů a jejich stabilizaci v reakčním centru jsou důležité tři vlastnosti reakčního centra (viz **Obr. 3.5-9**):

(1) Prostorové uspořádání jednotlivých kofaktorů, které se rozdělení a stabilizace náboje účastní (**Obr. 3.5-9 C, D, E**). Jsou rozmístěny v takových vzdálenostech, aby docházelo k vysoce účinnému přenosu elektronů, a tak, aby se elektron přenesl z jedné strany membrány na druhou. Reakční centrum je tedy v membráně zasazeno v určité orientaci a přenos má v membráně pevně daný směr napříč membránou.

(2) Oxidoredukční potenciály přenašečů. Náboje se ve velmi krátkém čase (10^{-12} až 10^{-9} s) po rozdělení přenesou na další přenašeče, s podstatně odlišnými oxidoredukčními potenciály (**Obr. 3.5-9A**). Z $P^+ \cdot I^-$ nebo $P^+ \cdot A_0^-$ tak vznikne sestava $D_2^+ \cdot P \cdot I \cdot A_1^-$ nebo $D_2^+ \cdot P \cdot A_0 \cdot A_1^-$. Tím se zvětší prostorová vzdálenost nábojů a zmenší se rozdíl elektrického potenciálu mezi nimi. Obojí přispívá ke stabilizaci rozdělených nábojů.

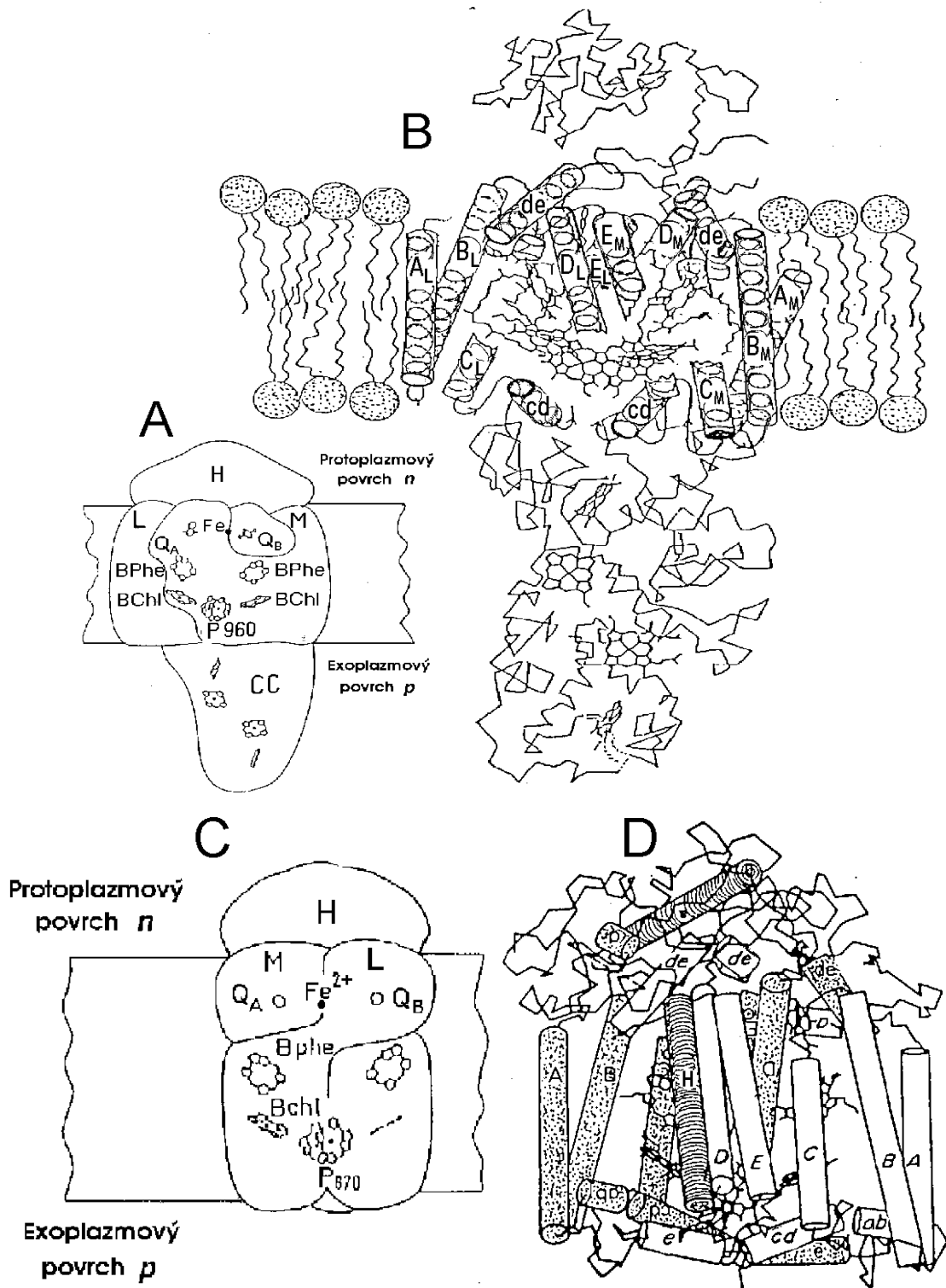
(3) Charakteristické časy jednotlivých dějů v RC (**Obr. 3.5-9B**) jsou důsledkem kombinace předchozích dvou uspořádání a mají též cíl: účinná stabilizace rozdělených nábojů je rychlá stabilizace. Proto první přesuny elektronů se dějí ve velmi krátkých časech (ps až ns). Charakteristické časy dějů v reakčním centru pokrývají obrovské rozpětí více než deseti řádů. K excitaci primárního donoru dojde v čase odpovídajícím času jednoho kmitu světelné vlny, tedy během několika fs (10^{-15} s). K rozdělení nábojů mezi $P^+ \cdot I^-$ dojde za několik ps (10^{-12} s). Stav $P^+ \cdot I \cdot A_1^-$ nastane v rozmezí ns (10^{-9} s), další pochody již nelze takto obecně charakterizovat, ale jsou tam kroky probíhající v as a konečného stavu (D_3 nebo $D_2^+ \cdot P \cdot I \cdot A_1 \cdot A_2^-$ se dosáhne v čase, který se blíží 1 ms (10^{-3} s).

3.5.5.2 REAKČNÍ CENTRA TYPU 2

Pojem reakčního centra byl poprvé použit ve spojení s fotosystémy fotosyntetických bakterií. Selektivní oxidací anténních bakteriochlorofylů v chromatoforech purpurové bakterie se podařilo Claytonovi r. 1963 dosáhnout toho, že jediné komplexy v membráně, které obsahovaly barviva, byly komplexy reakčních center. Tak mohl změřit jejich spektra i jiné vlastnosti. Později byla reakční centra fotosyntetických purpurových bakterií také prvými fyzicky izolovanými reakčními centry a jsou také zatím jedinými, u nichž se stanovila podrobná molekulová struktura rentgenovou analýzou jejich krystalů.

Bakteriální reakční centrum byl první komplex membránových bílkovin, u něhož se podařilo získat velmi pravidelné krystaly. Na nich se získala data o difrakci rentgenových paprsků s rozlišením 0,18 nm, které dovoluje navrhnout strukturu až do jednotlivých atomů (viz **Obr. 3.5-10**). I když získání difrakčních dat je velmi pracné, rozhodujícím krokem v celém projektu je získání krystalů s dostačující pravidelností. To se podařilo nejprve u reakčního centra z bakterie *Rhodospseudomonas viridis*. Za popis struktury tohoto RC byla v roce 1988 německým badatelům Michelovi, Deisenhoferovi a Huberovi udělena Nobelova cena za chemii.

Stanovení molekulové struktury bakteriálního reakčního centra se stalo neobyčejně významným mezníkem v pokroku poznávání mechanismu fotosyntézy. Protože jsou tyto údaje také základem našich představ o struktuře RC fotosystému 2 (viz dále), je třeba se se základními rysy RC purpurových bakterií seznámit.

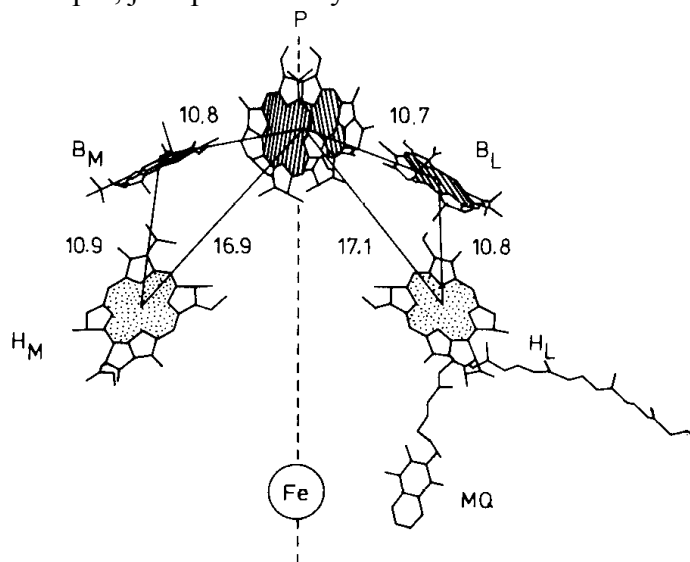


Obr. 3.5–10. Struktura reakčních center purpurových fotosyntetických bakterií. Uspořádání bílkovin (A) a jejich polypeptidových řetězců (B) v reakčním centru z *Rhodospseudomonas viridis*. L - lehká (light), M - střední (medium) a H - těžká (heavy) bílkovinná složka reakčního centra. CC - komplex čtyř cytochromů připojený k RC. Pět šroubovic α podjednotek L a M je označeno písmeny A až E; místy jsou přerušeny, aby bylo vidět uspořádání chlorofylů a feofytinů; šroubovice α ležící vně membrány jsou označeny malými písmeny těch šroubovic, které propojují. P960 - primární donor, BChl - bakteriochlorofyl, Bphe - bakteriofeofytin, QA, QB primární a sekundární akceptor elektronu. C, D - RC z *Rhodobacter sphaeroides*, k němuž není připojen cytochromový komplex. Šroubovice podjednotky L jsou tečkované, M jsou prázdné, šrafovaná šroubovice H patří podjednotce H, v B není zakreslena.

Reakční centra purpurových bakterií (viz **Obr. 3.5-10**) sestávají ze tří bílkovinných podjednotek: H (258 aminokyselinových zbytků), L (273 zbytků) a M (323 zbytků). Označení písmeny pochází z původního odhadu jejich hmotností podle jejich pohyblivosti při elektroforéze, které se ukázalo nesprávným: H podle heavy ($M_r = 28$ kDa), L podle light (19 kDa) a M podle medium (22 kDa). Ve skutečnosti je pořadí stoupající molekulové hmotnosti H→L→M.

Všechny tři podjednotky komplexu prostupují membránu. Podjednotky L a M mají velmi podobnou strukturu: obě mají 5 hydrofobních šroubovic U, které tvoří hlavní část hmoty RC v membráně. Podjednotka H je do membrány zanořena pouze jednou šroubovicí. Většina řetězce její molekuly je hydrofilní a tvoří na cytoplasmovém (*n*) povrchu membrány “čepičku” nad celým membránovým komplexem. Ta patrně pomáhá správně orientovat části řetězců podjednotek L a M, které leží vně membrány.

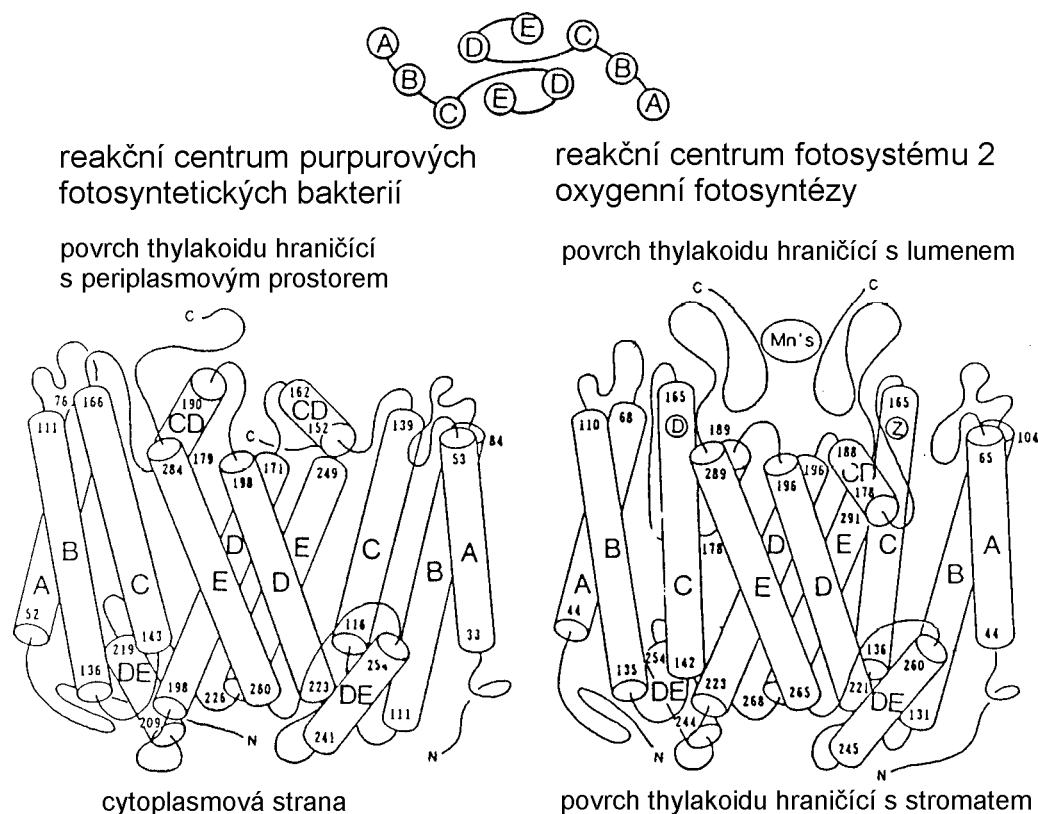
Podjednotky L a M vážou nekovalentními vazbami všechny kofaktory reakčního centra (viz **Obr. 3.5-11**). Bakteriochlorofyly zvláštního páru (primárního donoru) jsou vázány koordinačními vazbami hořčíku na zbytcích aminokyselin obou bílkovinných podjednotek. Každý ion Mg^{2+} je vázán na jeden histidylový zbytek bílkoviny, který tvoří jeho pátý ligand. Tetrapyrolové kruhy BChl zvláštního páru leží téměř rovnoběžně a jejich roviny stojí kolmo na rovinu membrány. Oblasti bílkovin, k nimž je připoután zvláštní pár, jsou převážně hydrofobní.



Obr. 3.5-11. Schéma prostorového uspořádání přenašečů elektronu (kofaktorů) v bakteriálním reakčním centru z *Rhodospseudomonas viridis*. Podle výsledků rentgenové strukturní analýzy krystalů RC. P - P960, primární donor, zvláštní pár (dimer) molekul Bchl *b*. B_M a B_L - molekuly přidatného bakteriochlorofylu (v podjednotce M a L) který je stálou součástí všech RC2, ale jeho funkce není dosud zcela jasná. H_M a H_L - bakteriofeofityny. MQ - menachinon, který v tomto RC má úlohu Q_A. Fe - ion železa propojující Q_A a Q_B. Q_B se při izolaci RC ztrácí. Vzdálenosti středů molekul jsou udány v Å.

Primární donor u *Rhodospseudomonas viridis* tvoří zvláštní pár molekul BChl *b*. Ten má maximum absorpce v dlouhovlnné oblasti u 960 nm a jeho fotochemická oxidace se projevuje změnou absorpce s maximem u této vlnové délky. Proto se tento primární donor označuje P960. Obdobně se podle maxima absorpce primární donor *Rhodobacter sphaeroides*, který je tvořen párem molekul BChl *a*, označuje P870. Je zvláštností bakteriálních RC, že se v nich primární fotochemické reakce účastní u některých druhů BChl *a* a u jiných BChl *b*. V oxygenní fotosyntéze se fotochemie účastní pouze Chl *a*.

V blízkosti primárního donoru je na každé bílkovinné podjednotce RC vázána ještě jedna další molekula BChl *a* nebo BChl *b*, o jejíž úloze (nebo neúčasti) v přenosu elektronu se stále vedou spory. Asi uprostřed hydrofobního jádra bílkovinné molekuly je na každé podjednotce (L a M) připoutána molekula BPheo *a* nebo *b*, která je přechodným akceptorem elektronů.



Obr. 3.5–12. Srovnání molekulární struktury dvou základních bílkovin, tvořících reakční centrum purpurových fotosyntetických bakterií a reakční centrum fotosystému 2 oxygenní fotosyntézy. V BRC2 jsou podjednotky L a M, v PS2RC polypeptidy D1 a D2. Šroubovice α , které procházejí membránou jsou v obou RC zcela shodně uspořádány. Schéma v horní části obrázku to ukazuje v průmětu do roviny membrány. Poloha spojovacích vněmembránových šroubovic *cd* se poněkud liší. V PS2RC D a Z v kroužku označuje polohu TyrZ a TyrD, OEC polohu manganového komplexu rozkládajícího vodu.

Konečně na negativní straně membrány, ale ještě v hydrofobní oblasti, uvnitř dvojné vrstvy lipidů, má každá z podjednotek vazebné místo (kapsu, také se někdy říká niku) pro chinon (pro názor srovnej s kapsami u PS2RC zakreslenými v **Obr. 3.5–13**). Kapsy v obou podjednotkách se výrazně liší. Kapsa Q_A váže chinon pevně a takovým způsobem, že chinon pracuje pouze jako jednoelektronový přenašeč. Redukuje se jedním elektronem na semichinonový radikál Q^- a elektron velmi rychle odevzdává chinonu v kapse Q_B . Dojde-li k další excitaci centra ještě když je Q_A redukován, nepřijme Q_A^- další elektron a excitace zaniká fluorescencí nebo přeměnou excitační energie na teplo. U *Rb. sphaeroides* (a jiných) se v obou podjednotkách váže ubichinon, u *Rps. viridis* (a některých jiných) je v podjednotce M (v kapse Q_A) menachinon a v podjednotce L (kapse Q_B) se váže ubichinon.

Přesně uprostřed mezi oběma chinony je koordinačně vázán ion železa. Ligandy pro Fe^{2+} jsou jednak čtyři histidinové postranní řetězce (po dvou v každé bílkovinné podjednotce), jednak karboxylový kyslík glutaminového postranního řetězce na podjednotce M (Glu-M232). Funkce Fe^{2+} v přenosu elektronu je dosud nejasná: není pro přenos elektronu nezbytný (může se z RC odstranit bez ztráty funkce), ale urychluje jej a zvyšuje jeho účinnost. Může být také nahrazen některými jinými těžkými kovy jako Mn.

Poznání struktury RC purpurových fotosyntetických bakterií (BRC2) vedlo k urychlenému poznávání struktury a funkce RC fotosystému 2 oxygenní fotosyntézy. Toto RC se dosud nepodařilo vykrytalizovat s uspokojivou pravidelností (i když krystaly již získalo několik badatelů).

Již dlouho se však ví, že PS2RC má mnohé funkční vlastnosti velmi podobné BRC2 (nazýváme je souhrnně RC2) a že pracuje s obdobnou sestavou kofaktorů (**Obr. 3.5-13**). Primární a sekundární akceptor jsou v obou případech chinony Q_A a Q_B v koordinační vazbě se železem. Primární donor je v obou reakčních centrech dimer (bakterio)chlorofylových molekul, a shodný je také přechodný akceptor tj. (B)Pheo. Konečně se ukázalo, že jsou velmi podobné i bílkoviny, které reakční centra tvoří: podjednotkám L a M v BRC2 odpovídají polypeptidy D1 a D2 v PS2RC. Tato poslední shoda byla dlouho zastírána tím, že D1 a D2 jsou velmi pevně vázány na chlorofylproteiny CP43 a CP47, které tvoří vnitřní anténu, kdežto u BRC2 nic podobného není. Předpokládalo se, že tyto bílkoviny jsou součástí reakčního centra PS2. Že tomu tak není, prokázala teprve izolace komplexu (Nanba a Satoh 1987), který uskutečňoval rozdělení nábojů, a sestával jen z D1, D2, cytochromu b 559 a jedné malé bílkoviny.

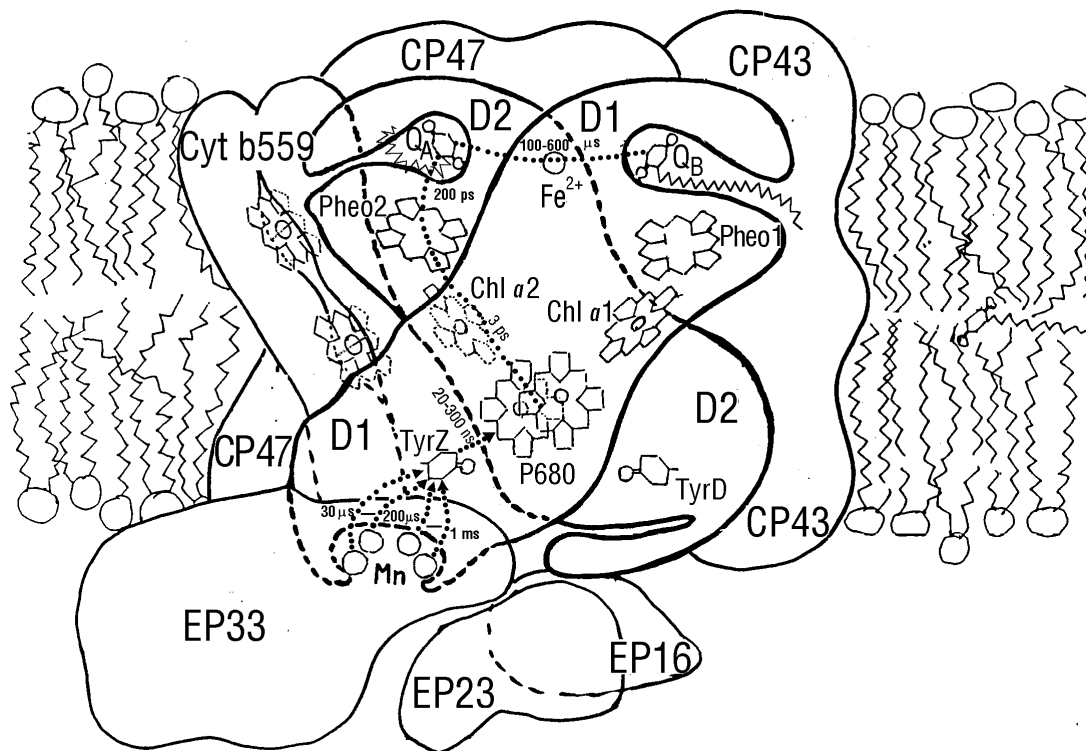
Pozoruhodným společným znakem RC2 je, že kofaktory uložené v bílkovinách L a M, nebo D1 a D2, tvoří dvě souměrné větve, které obě by mohly sloužit přenosu elektronu z excitovaného primárního donoru. Ve skutečnosti tak však pracuje pouze jedna větev, jak je vyznačeno v **Obr. 3.5-13** pro PS2RC (totéž však platí i u BTRC2). Elektron z excitovaného P680* jde přes Chl *a* 2 a Pheo 2 na Q_A a odtud na Q_B . Oxidovaný P680⁺ se redukuje elektronem z TyrZ a ten od OEC. Funkční nesouměrnost obou větví je dána rozdílnou povahou Q_A a Q_B a také tím, že TyrD neleží zřejmě v rovnocenné poloze jako TyrZ mezi P680 a OEC. Druhý důvod však odpadá u fotosyntetických bakterií, které nemají OEC a elektron z cytochromu *c* nepřenášejí přes TyrZ.

Ačkoli jsou si RC2 bakterií a oxygenní fotosyntézy velmi podobná, jsou mezi nimi také rozdíly. Q_A , Q_B i chinonový pool v membráně jsou u oxygenní fotosyntézy tvořeny plastochinonem, kdežto u bakterií je to ubiquinon. Také struktura kapsy Q_B je poněkud odlišná, poněvadž afinita různých chinonových analogů, které se v této kapse váží a tak zabraňují přenosu elektronů z Q_A na Q_B , je různá u PSIIRC a BRC. Tyto inhibitory byly u PSII velmi důkladně zkoumány, jak pro jejich význam v objasňování funkce dvou fotosystémů v oxygenní fotosyntéze, tak z praktických příčin: jsou to jedny z nejznámějších herbicidů. V kapse Q_B PSII je z těchto inhibitorů nejučinnější DCMU a v kapse Q_B fotosyntetických bakterií (kde DCMU vůbec nepůsobí) je nejučinnější terbutryn (vzorce obou sloučenin viz **Obr. 3.5-1**).

3.5.5.3 KOMPLEX OXIDUJÍCÍ VODU A VYVÍJEJÍCÍ KYSLÍK

Elektron, který redukuje oxidovaný primární donor RC2, P680⁺, přichází z komplexu oxidujícího vodu a uvolňujícího kyslík. Tento komplex se označuje OEC (oxygen evolving complex) nebo WOC (water oxidizing complex). Posuzováno důsledně, nepatří OEC do reakčního centra, které může pracovat (v izolovaných preparátech) i bez něho. Komplex je však nepochybně připoután na některé aminokyseliny skládající bílkoviny reakčního centra a rychlá redukce P680⁺, kterou umožňuje, má velmi výrazný vliv na chování PSIIRC.

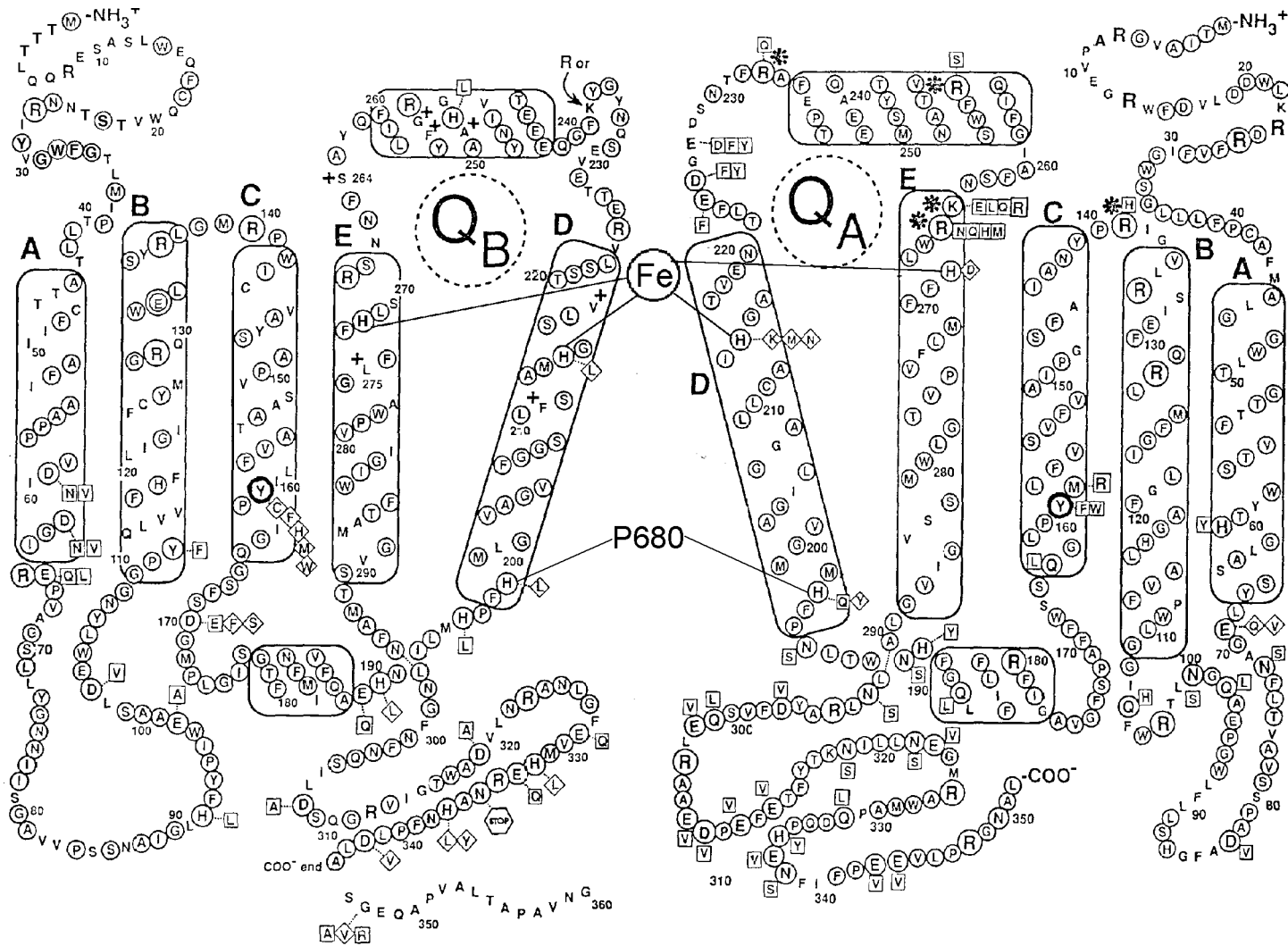
OEC je jedinečný enzym, jehož funkce není ještě do podrobností objasněna. Přimyká se těsně k PS2RC na povrchu membrány hraničícím s dutinou thylakoidu. Tvoří jej čtyři ionty Mn (se dvěma až čtyřmi kladnými náboji), další ionty (Ca^{2+} , Cl^-) a tři bílkoviny, které nejsou pro funkci komplexu naprosto nezbytné, ale velmi výrazně zvyšují účinnost jeho činnosti. Odtud také jejich označování jako OEE1, OEE2 a OEE3 (oxygen evolution enhancer polypeptides).

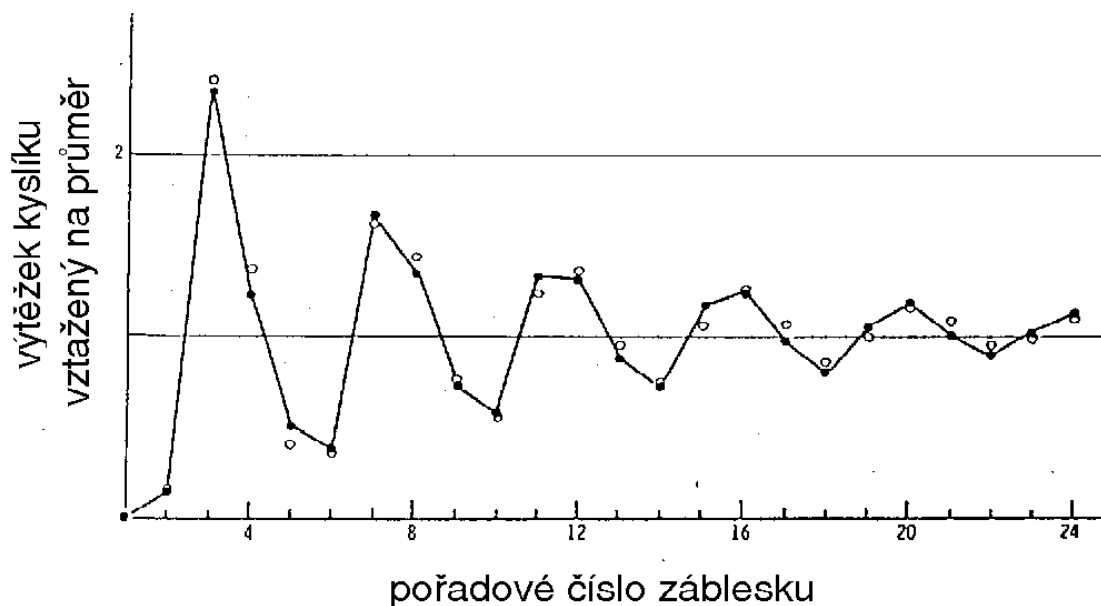


Obr. 3.5–13. Schéma struktury jádra fotosystému 2 s připojeným komplexem oxidujícím vodu. **D1, D2** - bílkoviny reakčního centra, které váží všechny kofaktory: **P680** - zvláštní pár Chl *a* je vázán mezi oběma bílkovinami k histidylovému zbytku na každé z nich (viz **Obr. 3.5-14**). **Tyr Z (161), TyrD (160)** - tyrosinové zbytky, které mohou dávat elektron oxidovanému **P680⁺**. **Chl a 1, Pheo 1, Chl a 2, Pheo 2** - přídatný (pomocný) chlorofyl a feofytin vázané na D1 nebo na D2. **Q_A** - primární akceptor, plastochinon pevně vázaný v kapse tvořené bílkovinou D2. **Q_B** - sekundární akceptor, plastochinon z membránového poolu přechodně vázaný v kapse D1. **Fe²⁺** - železnatý ion vázaný mezi D1 a D2, koordinačními vazbami na histidyly. **Cyt b 559** cytochrom ze dvou bílkovin svázaných dvěma hemy, který tvoří třetí bílkovinu reakčního centra; jeho funkce není dosud zcela jasná. **CP 43, CP 47** - chlorofylproteiny (každý obsahuje okolo 20 Chl *a*), na které jsou bílkoviny reakčního centra poměrně pevně vázány a které tvoří vnitřní anténu druhého fotosystému. **EP 16, EP 23, EP 33** - bílkoviny (o *M_r* 16, 23 a 33 kDa), které jsou připoutány k jádru fotosystému 2 v dutině thylakoidu a které se 4 manganovými ionty (kroužky s označením **Mn**) tvoří komplex rozkládající vodu. Tečkované šipky vyznačují cestu přenosu elektronu z vody na **Q_B**. U jednotlivých kroků jsou udány charakteristické časy přenosu.

Text k obrázku na protější straně ----->

Obr. 3.5–14. Sled aminokyselin v bílkovinách D1 (vlevo) a D2 (vpravo) reakčního centra PSII. Aminokyseliny jsou značeny jednopísmenným kódem. Obrázek ukazuje pravděpodobné rozdělení aminokyselin do jednotlivých šroubovic α žprostupujících membránu, které jsou od N konce polypeptidového řetězce označeny jako A, B, C, D a E (často se používá také označení římskými číslicemi I až V). Membránové šroubovice jsou propojeny úseky řetězce, ležícího mimo membránu, jejichž části (*cd* a *de*) mají také charakter šroubovic α . Zvláště významné jsou v obou podjednotkách šroubovice *de*, které s koncovými částmi šroubovic D a E tvoří kapsy chinonů akceptorové strany, **Q_A** a **Q_B**. Aminokyseliny, jejichž označení jsou v kroužcích, jsou na stejném místě u mnoha organismů (konzervativní aminokyseliny). Symboly aminokyselin napsané vedle řetězce označují prozkoumanou cílenou mutaci (záměnu původní aminokyseliny za novou). Je-li symbol aminokyseliny ve čtverečku, je mutace schopná fotosyntézy; kosočtvereček označuje mutaci neschopnou fotosyntézy. Jsou-li mutovány aminokyseliny označené + vznikne mutant odolný k herbicidům. Aminokyseliny označené * mají význam pro vazbu hydrogenuhlíčitánového iontu, bez něhož je přenos elektronů z **Q_A** na **Q_B** silně zpomalen.

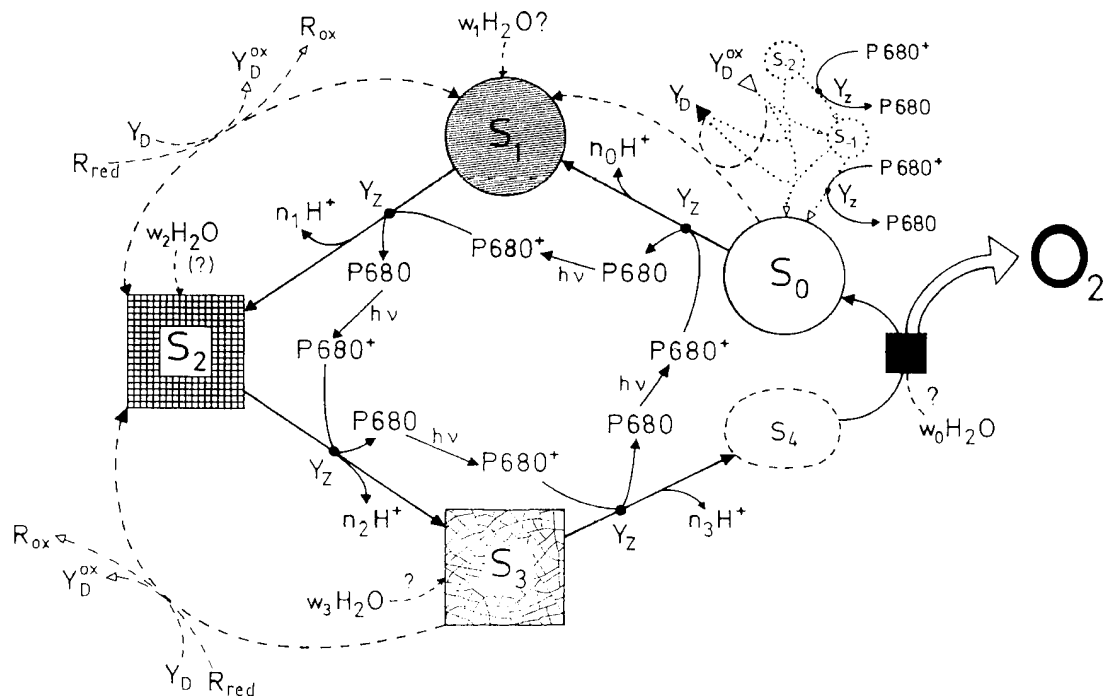




Obr. 3.5–15. Množství kyslíku uvolněné na jeden záblesk v závislosti na počtu krátkých sytících záblesků, jimiž byly osvětleny thylakoidy předtím uchovávané ve tmě. Prázdné kroužky ukazují hodnoty vypočtené za předpokladu, že na konci tmy je 25 % center vyvíjejících kyslík ve stavu S_0 a 75 % center ve stavu S_1 , dále že pravděpodobný počet nezasazených center je v každém kroku 10 % a pravděpodobný počet dvakrát zasažených center je 5 %.

Úkolem OEC je postupně shromáždit čtyři oxidační ekvivalenty a těmi zoxidovat dvě molekuly vody, takže vznikne jedna molekula kyslíku. Že se tak skutečně děje, objevili experimentálně v letech 1969 až 1975 nezávisle na sobě a později ve spolupráci P. Joliot a B. Kok. Suspensi jednobuněčných řas nebo izolovaných chloroplastů, která byla nějakou dobu ve tmě, osvětlovali řadou krátkých (např. 2 as), ale velmi silných záblesků. Fotony z každého záblesku zasáhly všechna reakční centra v měřeném preparátu a v každém způsobily právě jedno rozdělení nábojů (tzv. záblesky pro jeden obrat, one turnover flashes). Množství kyslíku uvolněné jednotlivými záblesky měřili platinovou rychlostní elektrodou. Jak je vidět na **Obr. 3.5-15**, v odezvu na první záblesk se nevyvinul téměř žádný kyslík a na druhý velmi málo, kdežto největší množství O_2 se uvolnilo po třetím záblesku. Odezva na čtvrtý záblesk byla podstatně nižší, i když ne minimální, a dále se střídání velikosti odezvy opakovalo jako tlumené kmity s periodicitou čtyř. Oscilace obvykle zcela zmizí mezi dvacátým a třicátým zábleskem.

Kok a Joliot z toho vyvodili: Na uvolnění jedné molekuly kyslíku (oxidaci dvou molekul vody) pracuje pouze jedno reakční centrum (nemůže se na ní podílet více center). K centru je připojen nějaký komplex, z něhož $P680^+$ postupně odebere čtyři elektrony. Komplex tak shromáždí čtyři kladné náboje a pak jich využije pro jednorázovou oxidaci vody. Stavy komplexu označili symboly S_0 , S_1 , S_2 , S_3 a S_4 , kde index označuje počet nábojů v komplexu shromážděných. Po každém rozdělení nábojů v reakčním centru odebere $P680^+$ (prostřednictvím přenašeče Z) jeden elektron z OEC a tím jej posune o jeden stav výše. Když se ze stavu S_3 odebere elektron, přejde do S_4 , který ihned přechází na S_0 a tento přechod provází uvolnění kyslíku. Schématicky je postup shromažďování nábojů nakreslen na **Obr. 3.5-16**. Utlumení oscilací s narůstajícím počtem záblesků se vysvětluje tím, že každý záblesk nezasáhne všechna centra a naopak, při každém záblesku je jistý malý podíl reakčních center zasažen dvakrát.

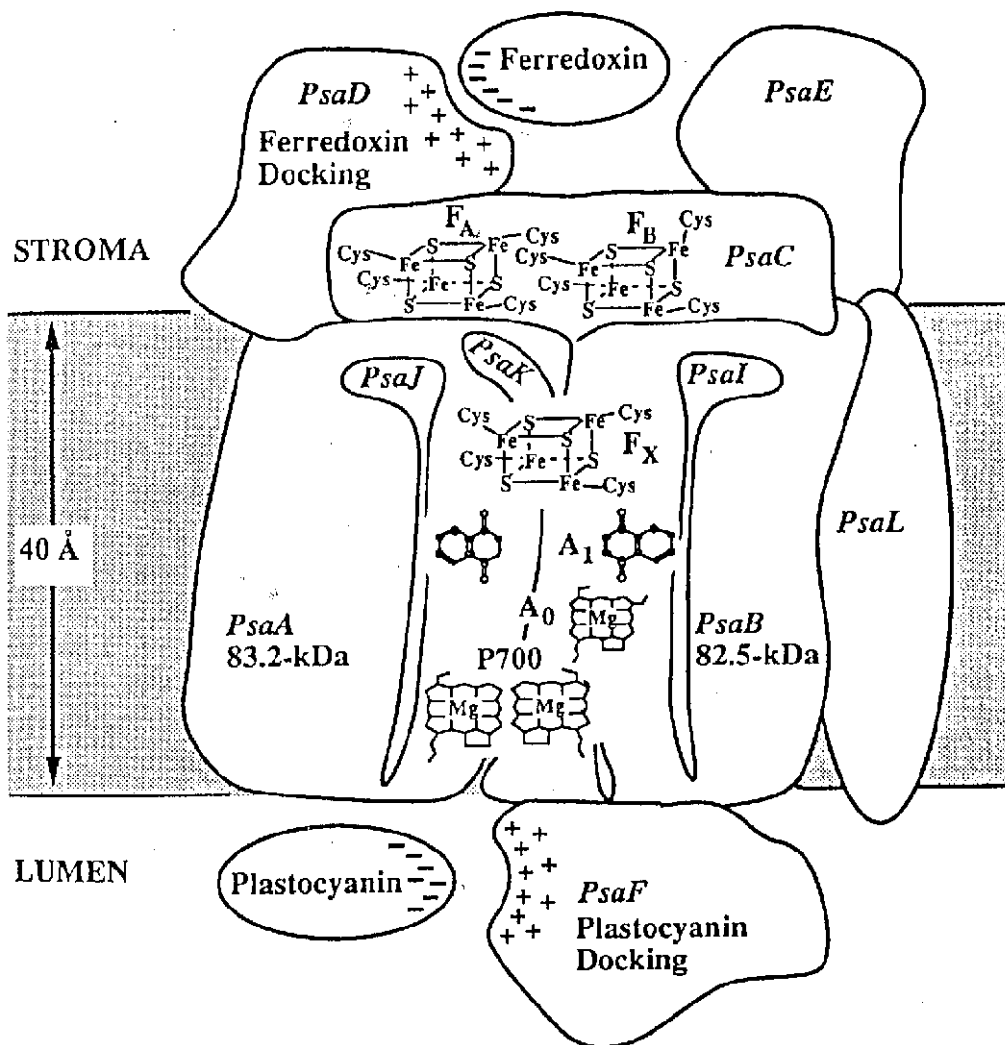


Obr. 3.5–16. Schéma čtyřstupňového mechanismu oxidace vody a povahy stavů S_x . Elektrony se postupně přenášejí na opakovaně oxidovaný $P680^+$ z Tyr Z (řádově v ns) a na Tyr Z^+ z manganového komplexu (50 μ s až 1,5 ms). Množství uvolněných protonů je v různých stupních různé (a dodnes není jednoznačně určeno), neví se také, ve kterých stupních vstupuje do cyklu voda. Kyslík se uvolňuje po dosažení stavu S_4 . Stavy stálé ve tmě jsou označeny kroužky, při čemž S_0 pomalu přechází na S_1 , S_2 a S_3 jsou nestálé a redukují se různými donory na S_1 (čas k tomu potřebný jsou minuty). V pravém horním rohu schématu jsou vyznačeny stavy S_1 a S_2 , na které se může stav S_0 redukovat různými činidly ve tmě.

Oscilace se projevují také v uvolňování protonů, výsledky jejich měření jsou však mnohem rozmanitější než výsledky měření uvolňování kyslíku. Počáteční představa, že se protony uvolňují společně s kyslíkem ve čtvrtém kroku, byla brzo vystřídaná představou, že se uvolňují v průběhu celého cyklu, ale nepravidelně. Různé laboratoře, používající různých metod pro měření pH (skleněná elektroda, různé typy indikátorů, spinová sonda a zpožděná fluorescence), se po jistou dobu shodovaly na tom, že se v jednotlivých krocích Kokova cyklu protony uvolňují v poměru 1:0:1:2. Dnes se ale má ponejvíce za to, že v tomto poměru nejsou celá čísla, a to proto, že odráží vlivy výše uvedených faktorů a že i jejich poměr je proměnlivý podle podmínek prostředí.

3.5.5.4 REAKČNÍ CENTRA TYPU 1

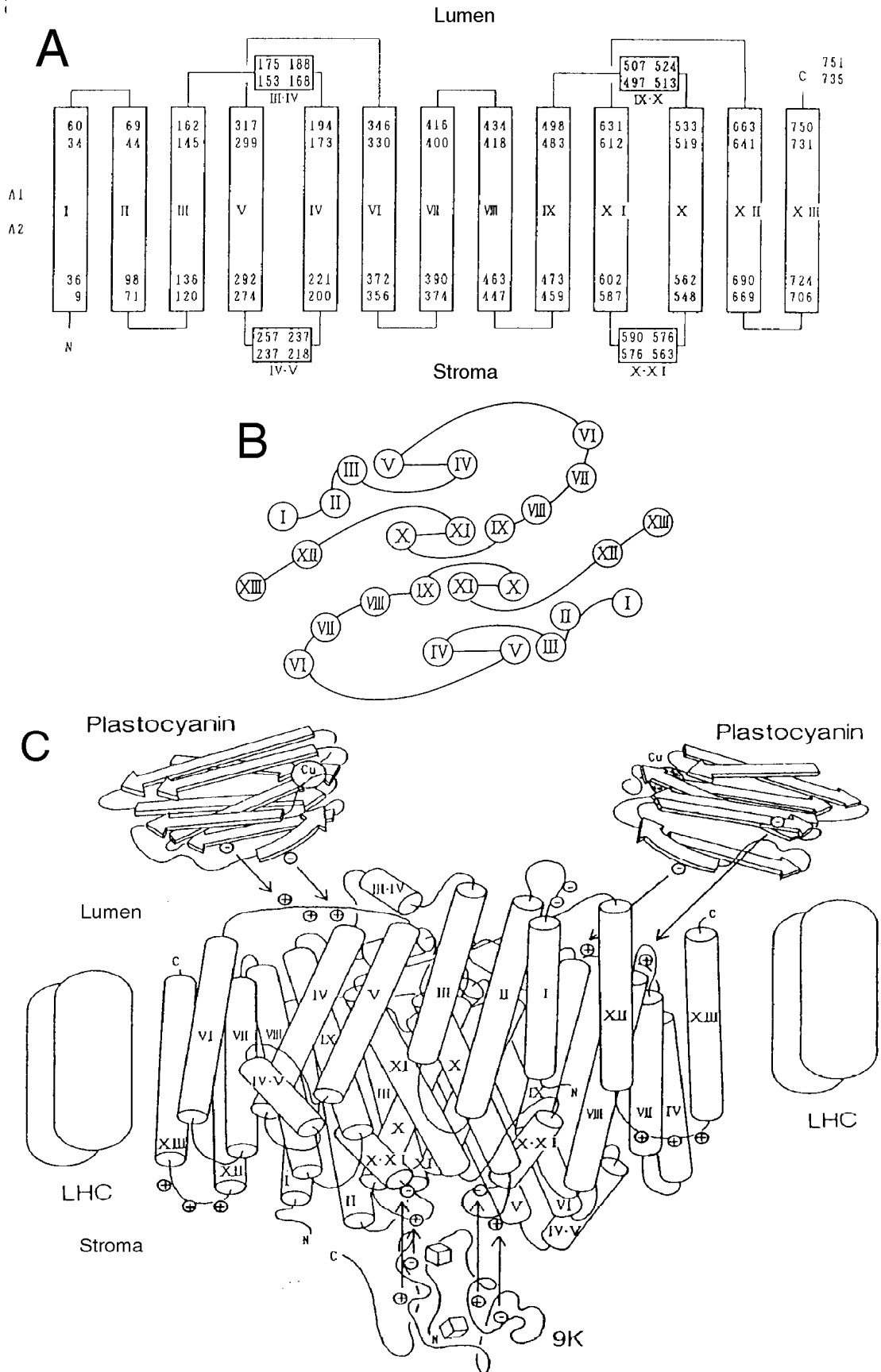
Již delší dobu je známo, že RC zelených sírných bakterií a heliobakterií se strukturou a funkcí velmi podobají RC fotosystému 1 a že se tato RC strukturou a podrobnostmi funkce liší od RC2, která jsme právě popsali. Označují se proto jako RC1. Žádné z těchto center se zatím nepodařilo krystalizovat s takovou pravidelností, aby to stačilo pro rentgenovou analýzu struktury s potřebným rozlišením. Z analýzy ohybu elektronů na komplexech PS1RC však známe jeho přibližný tvar a známe také sledy aminokyselin všech polypeptidů, které PS1RC skládají. Z těchto znalostí a výsledků mnoha jiných měření lze sestavit model komplexu bílkovin tvořících jádro PS1, který je jistě velmi blízký skutečnosti (**Obr. 3.5-15**). Reakčnímu centru PS1 se věnovalo mnohem více pozornosti než bakteriálnímu RC1, a proto je představa o jeho struktuře také mnohem podrobnější. Tok informací je v tomto případě opačný než u RC2: z poznatků o PS1RC se teží při vytváření představ o fotosystému zelených sírných bakterií.



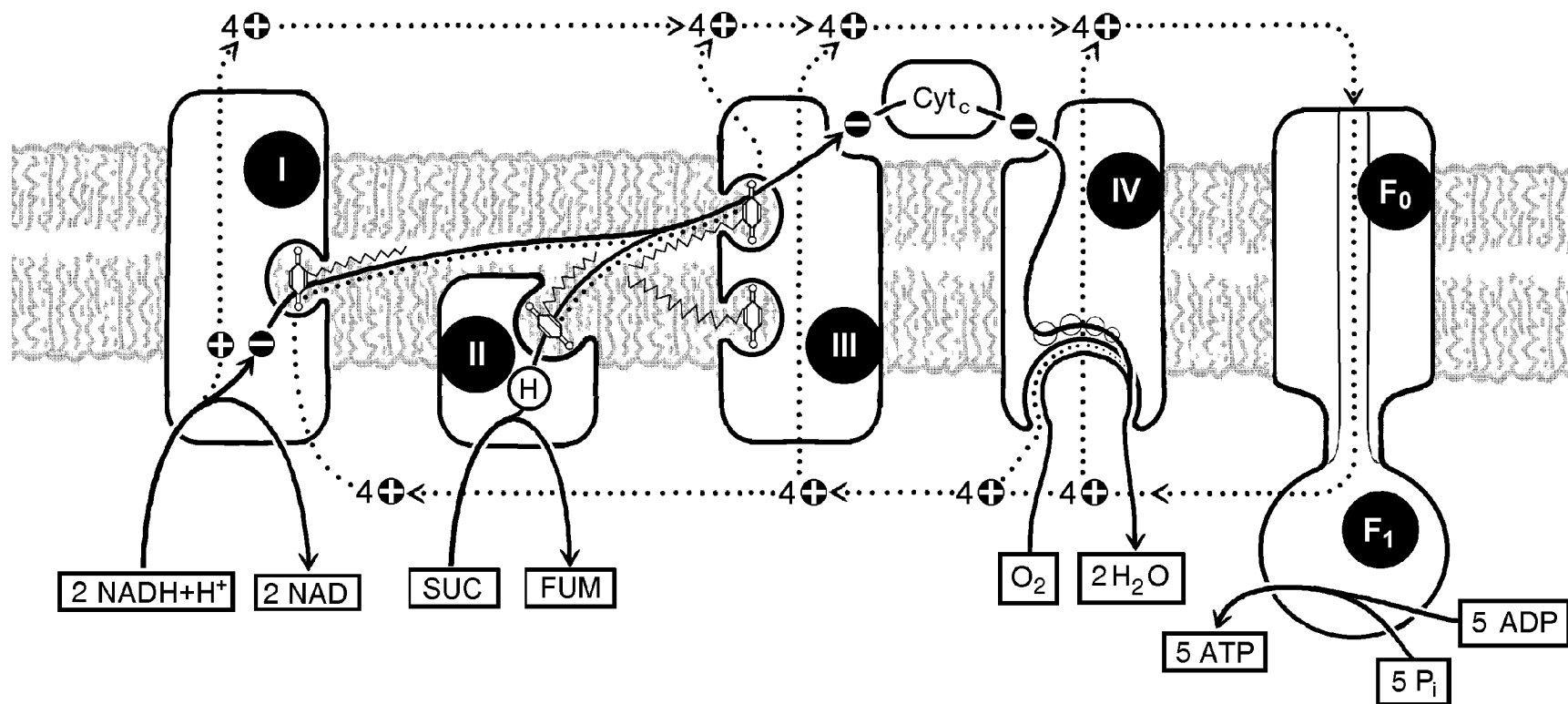
Obr. 3.5–17. Schéma struktury jádra PSI podle Golbecka (1992) se zvýrazněním polohy jednotlivých kofaktorů. PsaA a PsaB bílkoviny heterodimeru reakčního centra; PsaC - bílkovina v níž jsou uložena dvě [4Fe-4S] centra F_A a F_B , sekundární akceptory, které předávají elektrony feredoxinu; PsaD a PsaF - bílkoviny, které orientují feredoxin a plastocyanin do správné polohy pro přenos elektronů; PsaE bílkovina, která snad napomáhá správné orientaci feredoxinu; PsaI až PsaL - malé bílkoviny těsně spjaté s RC1, úloha zatím nejasná. P700 - zvláštní pár Chl *a* primárního donoru; A_0 - Chl *a*, A_1 - fylochinon (vitamin K_1), jsou přechodné akceptory (obdobné Pheo v RC2); F_X - [4Fe-4S] centrum, primární akceptor elektronu, je připoután na dva cysteinové zbytky v každé bílkovině dimeru RC.

Text k obrázku na protější straně---->

Obr. 3.5–18. Předpokládané uložení šroubovic α bílkovin PSI-A a PSI-B v membráně podle Otsuka et al. (1992). Předpoklad je založen na celkové podobnosti částí polypeptidického řetězce umístěných ve šroubovicích I až V (úsek **a**) a VII až XI (úsek **b**) s řetězcem bílkovin D1 (nebo L) a D2 (M) PSIIRC (nebo BRCII). **(A)** - Předpokládané rozdělení aminokyselin do šroubovic α prostupujících membránu a do šroubovic ležících ve smyčkách vně membrány. Mezi šroubovice V a VII bylo třeba vložit šroubovice VI, aby podobné úseky **a** a **b** byly zasazeny do membrány ve stejné orientaci. Do obdélníků znázorňujících šroubovice α jsou vepsána pořadová čísla aminokyselin v řetězci označující předpokládaný začátek a konec šroubovice. Horní čísla jsou pro bílkovinu PSI-A a dolní pro PSI-B. **(B)** - Navrhované rozložení šroubovic α v membráně při pohledu ve směru kolmém na rovinu membrány. **(C)** - Struktura komplexu při pohledu z boku (ve směru souběžném s rovinou membrány). Autoři uvažují možnost dvou shodných míst pro vazbu plastocyaninu a 9 kDa protein, který váže centra F_A a F_B , znázorňují v poloze, která by nasvědčovala postupnému přenosu elektronu (dnes se považuje paralelní přenos za pravděpodobnější).



Obr. 3.5-18. Text k obrázku je na protější straně



Obr. 3.6-1. Schéma uspořádání a činnosti přenašečů elektronů v mitochondriové kristální membráně. Komplexy jsou označeny římskými číslicemi, jak bývalo dříve zvykem. **I** - NADH : ubichinol oxidoreduktasa; **II** - sukcinátdehydrogenasa a jí podobné enzymy; **III** - cytochrom *b/c*₁ komplex; **IV** - cytochrom *c* oxidasa; **F₀F₁**-reversibilní protonová ATP syntasa; **cyt *c*** - cytochrom *c*.

Jádro PSI, sestává z deseti až dvanácti polypeptidů, které se označují velkými písmeny abecedy v pořadí jak byly popsány: PSI-A, PSI-B, PSI-C atd. Někdy se pro jejich označení používá také symbolů jejich genů: *psaA*, *psaB*, *psaC* atd. Vlastní reakční centrum, tedy komplex schopný fotochemického rozdělení nábojů, tvoří bílkoviny PSI-A a PSI-B, na nichž jsou vázány všechny kofaktory, pro toto rozdělení potřebné. Pro částečnou stabilizaci rozdělených nábojů je ještě potřebná bílkovina PSI-C se dvěma [4Fe-4S] centry, která přisedá k heterodimeru PSI-A/PSI-B na stromální straně membrány. Bílkoviny PSI-A a PSI-B jsou více než dvakrát větší než D1 a D2 a váží velké množství chlorofylu (každá okolo 45 molekul), který slouží jako vnitřní anténa PS1. Předpokládá se, že každá z bílkovin reakčního centra má 11 až 13 šroubovic α , které procházejí membránou. Poněvadž v polypeptidových řetězcích PSI-A, PSI-B a D1, D2 jsou shodující se úseky, není vyloučeno, že geny pro bílkoviny RC1 vznikly duplikací genů pro bílkoviny RC2. Hypotetický model rozložení šroubovic α v membráně založený na tomto předpokladu navrhli japoští badatelé (Obr. 3.5-16).

3.6 PŘEMĚNY ENERGIE V MEMBRÁNĚ MITOCHONDRÍÍ

Funkční prvky vnitřní (kristální) mitochondriové membrány, směr toku elektronů a přesunu protonů v ní ukazuje Obr. 3.6-1. Znázorněn je přenos 4 elektronů řetězcem přenašečů a odpovídající přesuny protonů. To odpovídá oxidaci dvou molekul $\text{NADH} + \text{H}^+$ na jednom konci řetězce a redukci jedné molekuly kyslíku na dvě molekuly vody na konci druhém. Často se přenosy v membráně charakterizují pro 2 elektrony, které projdou řetězcem. Proti takovým údajům jsou zde hodnoty dvojnásobné.

Toku elektronů v mitochondriové membráně dodává energii rozdíl oxidoredukčních potenciálů (rozdíl afinit pro elektron) mezi primárním donorem elektronu, jímž je $\text{NADH} + \text{H}^+$ a jeho konečným akceptorem, kterým je kyslík. $\text{NADH} + \text{H}^+$ přináší vodíky s vysokou redukční mohutností z pochodů glykolysy a Krebsova cyklu, při nichž se do těchto vodíků uložila část volné energie organických sloučenin, které se rozložily.

$\text{NADH} : \text{ubichinol oxidoreduktasa}$ (komplex I) těmito vodíky redukuje membránový chinon, jímž je v mitochondriích ubichinon (UQ), a energie touto reakcí uvolněná umožňuje ještě za každý k redukci použitý vodík přenést dva protony přes membránu postupem, který, jak uvedeno výše, není dosud jasný. Dříve se uvažoval pouze jeden navíc přenesený proton, dnes se všeobecně mínění kloní k počtu dvou. Přenos druhého je ve schématu naznačen tečkovanou čarou, ale v úhrnné stechiometrii s ním dále počítáme.

Vodíky na chinon navázané putují všeobecně používanou cestou přes cyt b/c_1 komplex (III) na p stranu membrány, kdežto elektrony se cytochromem c přenášejí na konečný komplex řetězce (IV), kterým je cytochrom c oxidasa (ferocytochrom : O_2 oxidoreduktasa). Tento enzym přenáší elektrony z cyt c na kyslík a redukuje jej na vodu.

Elektrony od cyt c^- ke kyslíku procházejí napříč membránou, takže protony na redukci kyslíku se spotřebují z n povrchu membrány. Tak se podílejí na zdánlivém přenosu protonů přes mitochondriální membránu, jehož druhou polovinu tvoří protony, které vyloučí cyt b/c_1 komplex na p straně membrány, ačkoli do membrány vstoupily $\text{NADH} : \text{UQ}$ oxidoreduktasou jako vodíky (tedy protony spolu s elektrony). Spád elektrochemického potenciálu mezi cyt c^- a kyslíkem umožňuje ještě přečerpání jednoho protonu přes membránu. Mechanismus tohoto pochodu není jasný.

Do respirační membrány mohou elektrony vstupovat kromě $\text{NADH} : \text{UQ}$ oxidoreduktasy (komplexu I) ještě řadou jiných oxidoredukčních enzymů, z nichž se nejčastěji hovoří o sukcinátdehydrogenase (komplex II). Ta redukuje ubichinon, stejně jako $\text{NADH} : \text{UQ}$ oxidoreduktasa a další osud elektronů (vodíků), které na ubichinon přenesou

je stejný jako osud elektronů (vodíků) dodaných komplexem I. Protože ale substráty oxidované sukcinátdehydrogenasou a jí podobnými enzymy mají vyšší oxidoredukční potenciál nežli $\text{NADH}+\text{H}^+$, mají elektrony nižší energii, která nestačí k čerpání dalších protonů přes membránu jako je tomu u $\text{NADH} : \text{UQ}$ oxidoreduktasy. Elektron, přicházející od komplexu II přesune tedy o jeden proton méně přes membránu, než elektrony od komplexu I.

Protony přenesené přes membránu při toku elektronů membránou dodávají nakonec energii k syntéze ATP prostřednictvím ATP-synthasy.

V přeměnách energie na mitochondriální membráně vystupují tito účastníci: $\text{NAD(P)}/\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$, $(1/2\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+)/\text{H}_2\text{O}$, ΔpH a ADP/ATP . Připojíme-li ještě také přeměny ve vazbách uhlíku, kyslíku a vodíku, přistoupí ještě poměry O_2/CO_2 a $\text{CO}_2/\{\text{HCOH}\}$. Pro zodpovězení mnohých otázek je důležité znát kvantitativní energetické vztahy mezi nimi.

Sledujme nejprve oxidaci $\text{NADPH}+\text{H}^+$ mitochondriální membránou. Výsledkem přenosu 2e^- z $\text{NADPH}+\text{H}^+$ na kyslík je přesun 10 protonů přes membránu (pokud počítáme se dvěma navíc čerpanými protony v komplexu I, jak uvedeno výše). Pro syntézu jednoho ATP z ADP musí projít ATPasou 3 protony. Jeden další je potřebný pro transport fosfátového iontu zpět do prostoru matrix; tento fosfát se z matrix vynesl spolu s ATP, jehož výstup z matrix je spřažen s přenosem ADP do matrix. Jsou tedy celkem na syntézu jednoho ATP zapotřebí 4 protony.

Tab. 5.6-1. Výtěžek ATP při glykolýze a mitochondriální oxidaci jejich produktů pro jednu molekulu glukosy.

stupeň oxidace	výtěžek $\text{NADH}+\text{H}^+$	výtěžek FADH_2	přímo ATP	ATP vzniklé přenosem elektronů	
				dřívější výpočet	upravený výpočet
<i>Glykolýza</i>					
glyceraldehyd-3P → → 1,3-bisfosfoglycerát	2			6	5
1,3-bisfosfoglycerát → → 3-fosfoglycerát			2		
3-fosfoglycerát → acetyl-CoA	2			6	5
<i>Krebsův cyklus</i>					
isocitrát → α -ketoglutarát	2			6	5
α -ketoglutarát → sukcinyl CoA	2			6	5
sukcinyl CoA → sukcinát			2		
sukcinát → fumarát		2		4	3
malát → oxaloacetát	2			6	5
<i>Úhrnem</i>	10	2	4	34	28

Účinnost přeměn energie v mitochondriové membráně se často charakterizuje poměrem $\text{ATP}/2\text{e}^-$ nebo ATP/O , tj. kolik molekul ATP se syntetizuje, projdou-li dva

elektrony celým respiračním řetězcem a redukují jeden atom O na vodu. Podle našeho výpočtu je tento poměr $10:4 = 2,5$. To je současně i poměr $\text{ATP}/\text{NADH}+\text{H}^+$, tedy počtu molekul ATP syntetizovaných při úplné oxidaci dvou elektronů z redukovaného $\text{NADH}+\text{H}^+$. Tyto poměry se obvykle v učebnicích udávají rovné 3. Tato hodnota však nepočítá s jedním protonem potřebným pro zpětný transport fosfátu a je také v rozporu s výsledky všech dosavadních pečlivých měření. Bude ji proto třeba opravit. Totéž se týká také elektronů odnímaných sukcinátu sukcinátdehydrogenasou (nebo elektronů odnímaných substrátům jinými enzymy na této úrovni, dosud se počítalo s koeficientem $\text{ATP}/\text{FADH}_2 = 2$ a je třeba jej snížit na 1,5. Při vstupu elektronů sukcinátdehydrogenasou, která je zavádí do plastochinonového poolu, se totiž na dva elektrony dopravené ke kyslíku přesune přes membránu šest protonů. Zatímco dříve výpočet byl $6:3 = 2$, nyní musíme počítat $6:4 = 1,5$. Zpětně tyto opravy postihnou také výpočet účinnosti aerobního dýchání. Dřívější a nyníjší bilance jsou uvedeny v **Tab. 5.6-1** (viz předchozí strana).

Úhrnem se tedy při oxidaci jedné molekuly glukosy vytvoří 38 molekul ATP podle dřívějšího výpočtu a 32 podle výpočtu opraveného. Tento rozdíl mění také naši představu o účinnosti přeměny energie v mitochondriích. Syntéza jednoho molu ATP z ADP za těch koncentrací složek, které jsou v mitochondriích, vyžaduje přibližně $55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Spalné teplo glukosy je přibližně $2820 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Je tedy energetická účinnost přeměny energie uložené v glukose na energii ATP $(55 \times 32) : 2816 = 0,625$ (neboli 62,5%), zatímco dříve vycházela $(55 \times 38) : 2820 = 0,741$ (čili 74,1%). Obdobná hodnota účinnosti vyjde také počítáme-li účinnost využití oxidačně-redukční energie, kterou lze získat mezi $\text{NADH}+\text{H}^+$ a kyslíkem. Oxidačně redukční potenciál páru $\text{NAD}/\text{NADH}+\text{H}^+$ je roven -320 mV při $\text{pH} = 7$ a potenciál redukce kyslíku, tj. páru $2 \text{ H}_2\text{O} / (\text{O}_2+4\text{H}^++4\text{e}^-)$ je $+820 \text{ mV}$. Celkový potenciální rozdíl je tedy $1,14 \text{ V}$ a odpovídající volná energie pro přenos 2 elektronů přes tento potenciální rozdíl je

$$\Delta G' = -nF\Delta E = -2 \times 96,5 \times 1,14 = 220 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Tímto přenosem se přesune 10 protonů přes membránu a vytvoří se 2,5 molů ATP. Účinnost je tedy $(2,5 \times 55) : 218 = 0,625$ (čili 62,5%).

I když musíme počítat se spotřebou 4 protonů na syntézu 1 ATP, energii pro vlastní syntézu dodávají pouze 3 protony. Že jejich energie pro to postačuje, ukazuje tento výpočet: $\Delta\psi$ na krystalní membráně v mitochondrii může být podle různých měření asi 170 mV . SpH bývá okolo 0,5. Δp je tedy $170 + 0,5 \times 59 \cong 200 \text{ mV}$. Tři protony přepravené po spádu tohoto rozdílu potenciálů dají celkovou elektrickou práci $\Delta G' = 3 \times 200 \times 96,5 = 57,9 \text{ kJ}$, tedy právě dost na syntézu jednoho ATP.

Je konečně někdy důležité vědět, kolik energie se může uvolnit při spotřebě jistého množství kyslíku na dýchání. Počítáme-li se zdýcháním substrátu na oxidačně redukční úrovni sacharidu, je celkové uvolněné množství energie při spálení jednoho molu uhlíku ve formě $\{\text{HCOH}\}$ rovno 470 kJ . Z celkové uvolněné energie je jí obsaženo (jak jsme vypočetli výše) v energii vytvořených vazeb ATP 62 %. Uvolní se tedy dýcháním dále využitelné energie $470 \times 0,62 \cong 290 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ spotřebovaného kyslíku. Na 1 litr O_2 to bude přibližně 21 kJ úhrnné energie a $21 \times 0,62 \cong 13 \text{ kJ}$ energie dále využitelné.

3.7 PŘEMĚNY ENERGIE V THYLAKOIDOVÉ MEMBRÁNĚ

V membráně oxygenní fotosyntézy (**obr. 3.7-1**) pracují dvě reakční centra (RC), označovaná jako RC2 a RC1. Číselné označení má historické důvody, přenos elektronů "začíná" vlastně v reakčním centru fotosystému 2 (RC2). K němu je také těsně přimknut vodu oxidující

a kyslík vyvíjející komplex (OEC), který dodává elektrony na zpětnou redukci primárního donoru v reakčním centru po jeho fotochemické oxidaci.

Celé uspořádání komplexů v thylakoidní membráně dosahuje sladěnou činností obou center nejen přenosu protonů přes membránu, ale také přetrvávajícího přenosu elektronu z vody, která se oxiduje na jednom konci řetězce na NADP^+ , který se na druhém konci řetězce redukuje.

Energie se tu tedy akumuluje dvěma pochody současně:

(a) vytvářením $\delta\mu_{\text{H}^+}$ a

(b) redukcí redukčního činidla (NADP) činidlem oxidačním (O_2), k níž dávají energii fotony. Bez účasti světla by tato reakce probíhala právě naopak s uvolněním velkého množství energie, jak se také děje v buněčném dýchání.

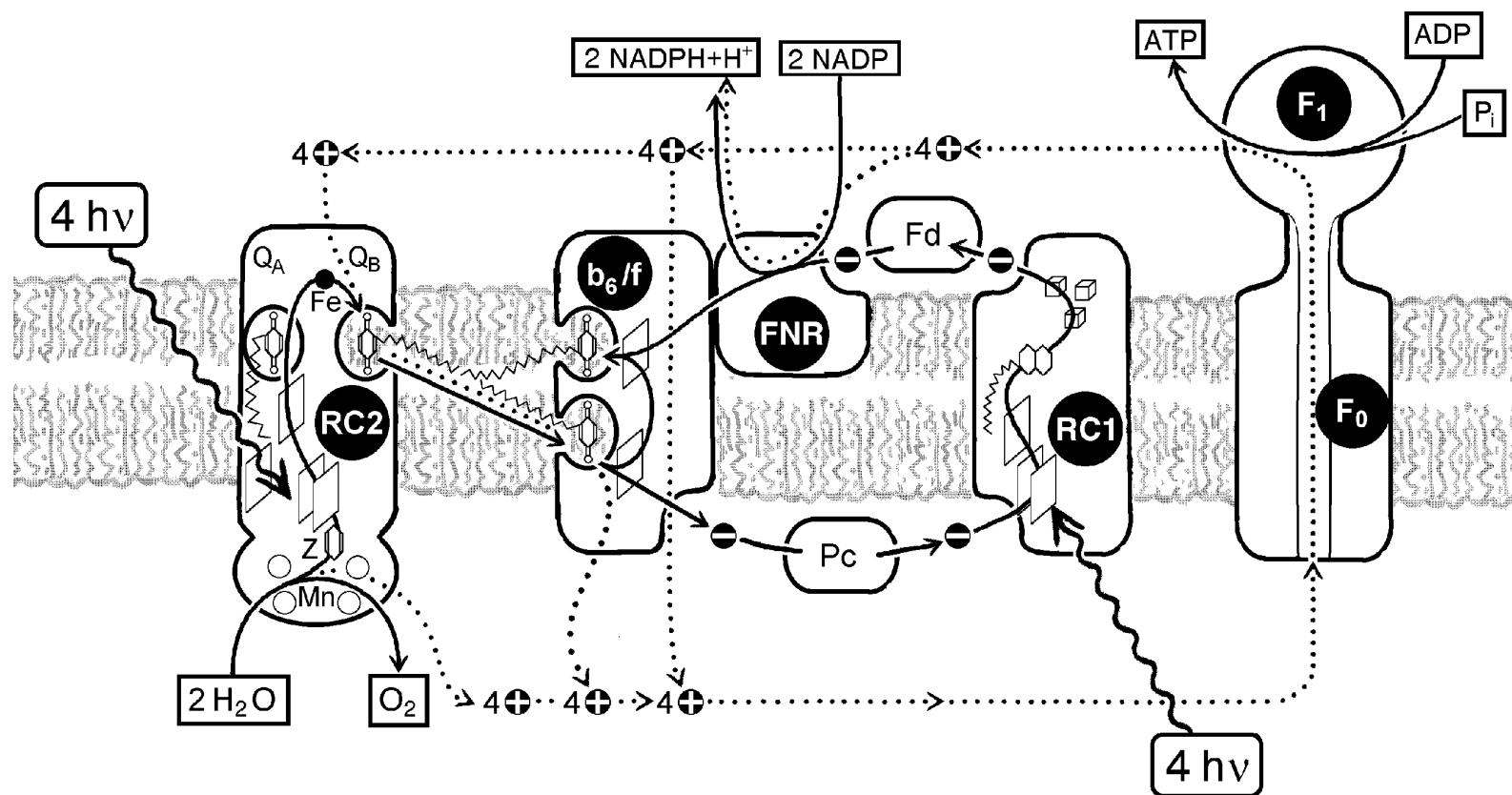
Celý mechanismus je opět složen ze základních kroků, z nichž mnohé jsou společné všem ETM: V reakčním centru fotosystému 2 (zkratka RC2), vede rozdělení nábojů k oxidaci primárního donoru P680 a k redukcí chinonu, jenž z plastochinonového poolu v membráně vstoupí do kapsy Q_B . Na úplnou redukci chinonu jsou však potřeba dva fotoakty a dva protony, tedy $(2 \times \text{P680}^+ \cdot \text{Q}^{2-} + 2\text{H}^+)$. Chinon přijímá elektrony od primárního donoru, ale protony na jeho redukci pocházejí z vodní fáze při povrchu membrány, hraničícím se stromatem (povrch n). Tento povrch označujeme písmenem n , poněvadž se odčerpáváním protonů stane negativním ve vztahu k druhému povrchu membrány. Povrch p , který hraničí s dutinou thylakoidu (lumen) je pozitivní, poněvadž se při něm hromadí protony čerpané dodutiny thylakoidu.

Redukovaný chinon (chinol) přenese vodíky (elektrony+protony) do cyt b_6/f komplexu, do jehož kapsy vstoupí. Cytochrom b_6/f komplex elektrony a protony opět oddělí: protony vyloučí do vodní fáze při povrchu membrány a elektrony od něj přijme plastocyanin (PC), který se při tomto povrchu pohybuje. Povrch označujeme písmenem p , poněvadž se vylučováním protonů stává pozitivním pólem membrány. Pokud cyt b_6/f komplex uskutečňuje tzv. Q-cyklus (viz **Kap. 3.5.3**) je pohyb elektronů složitější, ale nakonec se všechny dopravují plastocyaninem k reakčnímu centru PS1.

P680^+ se redukuje elektronem, který OEC odejme vodě. Přenosu elektronů z OEC na P680^+ se účastní tyrosinový zbytek jednoho řetězce bílkoviny tvořící reakční centrum, který označujeme jako TyrZ, nebo prostě Z. OEC vyloučí protony při oxidaci uvolněné do vodní fáze při p povrchu membrány.

Elektron, který cyt b_6/f komplex odevzdal plastocyaninu redukuje oxidovaný primární donor, P700^+ , reakčního centra prvního fotosystému (RCI). Toto reakční centrum využije energie fotonu opět k přenosu elektronu proti spádu elektrochemického potenciálu. Na akceptorové straně se však RCI liší od RCII. Elektron předává feredoxinu na n povrchu membrány. Bez účasti fotochemické reakce by feredoxin velmi prudce redukoval plastocyanin, neboť je velmi silným redukčním činidlem.

Feredoxin má dostatečně nízký oxidoredukční potenciál, aby mohl redukovat koenzym reduktas, kterým je NADP. Výsledkem dvou fotochemických přeměn energie na dráze jednoho elektronu od vody k feredoxinu je tedy jednak získaný redukční potenciál, jednak protony přenesené přes membránu.



Obr. 3.7–1. Schéma uspořádání a činnosti přenašečů elektronů a protonů v membráně oxygenní fotosyntézy. **RC2** - reakční centrum fotosystému 2; **RC1** - reakční centrum fotosystému 1; **b₆f** - cytochrom *b₆ / f* komplex; **FNR** - feredoxin : NADP⁺ oxidoreduktasa; **F₀F₁**-reversibilní protonová ATP syntasa; **PC** - plastocyanin; **Fd** - feredoxin; **Q_A**, **Q_B** - primární a sekundární akceptor elektronů v RC2, oba jsou plastoquinonové molekuly, **Q_A** je vázán pevně a pracuje jako jedoelektromnový přenašeč, **Q_B** se vyměňuje s poolem molekul v membráně a pracuje jako dvouelektronová branka; **Mn** - čtyři kroužky naznačují čtyři ionty Mn, které jsou součástí komplexu oxidujícího vodu; **Z** - tyrosinový zbytek v bílkovině reakčního centra, který přenáší elektrony mezi komplexem oxidujícím vodu a zvláštním párem molekul Chl *a* (P680) v reakčním centru 2. Ve schématu jsou znázorněny jen komplexy, účastníci se přímo přeměny energie; nejsou vyznačeny světlosběrné antény, kterým je věnována **Kap. 4**.

Na celkovém počtu přenesených protonů se tu podílí tři pochody:

- Skutečný přenos protonů pohlcených PSIIRC při redukci chinonu na n straně membrány a vyloučených cyt b_6/f komplexem na p straně membrány.
- Skutečný přenos protonů přenášených z n povrchu na p povrch samotným cyt b_6/f komplexem jako protonovým čerpadlem.
- Zdánlivý přenos protonů, který je dán tím, že při oxidaci vody se uvolní protony na p povrchu a při redukci NADP se protony pohltnou na n povrchu membrány.

Poslední způsob tvorby $\Delta\mu_{H^+}$, který se uplatňuje podle potřeby, je cyklický tok elektronů kolem fotosystému I. Uskutečňuje se tak, že ferredoxin přeneše postupně dva elektrony získané od RCI na cyt b_6/f komplex, a ten těmito elektrony redukuje plasto-chinon. PQ se oxiduje obvyklým způsobem na jiném místě cyt b_6/f komplexu a tak se vytváří protonový gradient (uplatňuje se kruhový pochodopsaný u Q-cyklu).

V předchozím se několikrát vyskytl pojem fotosystém. Poněvadž se v této kapitole zabýváme přeměnou energie na membránových komplexech, zajímají nás především reakční centra. Ve skutečných fotosyntetických membránách jsou však reakční centra vždy obklopena světloběrnými komplexy (anténními komplexy, anténami, podrobněji o nich viz **Kap. 4**). Reakční centrum spolu s anténami tvoří fotosystém.

Provedeme nyní pro fotosyntézu podobné obecné výpočty maximálních možných účinností, jako jsme výše počítali pro mitochondriální membránu. K tomu je opět výhodné rozdělit celý výpočet na účinnost přeměny energie v membránových pochodech, jimiž vznikají $NAD(P)H+H^+$ a ATP a na účinnost přeměny volné energie v biochemických pochodech Calvinova cyklu. V membránových pochodech budeme zase odděleně posuzovat přeměnu zářivé energie v oxidoredukční energii elektronů, účinnost přeměny energie elektronů v energii koncentrace protonů a konečně účinnost přeměny energie protonů v ATP.

Pro prvou část výpočtu je třeba nejprve uvážit obsah energie ve fotosynteticky účinném záření různé vlnové délky. Obsah energie jednoho fotonu je dán vztahem

$$E_\lambda = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$$

kde h je Planckova konstanta rovná $6,626 \times 10^{-34}$ [J.s] nebo $0,4136 \times 10^{-14}$ [eV.s], c je rychlost světla ve vakuu, tj. $2,998 \times 10^8$ [m.s⁻¹] a λ je vlnová délka záření, o které jde. Pokud chceme při výpočtu použít vlnovou délku udanou, jak je obvyklé, v nm, nabude výpočetní vzorec tvar

$$E_\lambda = 1240 \text{ [eV.nm]} / \lambda \text{ [nm]} = 1240/\lambda \text{ [eV]}$$

Při mnohých výpočtech se lépe hodí použít hodnotu energie, kterou nese jeden mol fotonů, také označovaný jako jeden Einstein (1 E, není to zákonná jednotka). Ta je dána rovnicí

$$E_\lambda = N \cdot h \cdot \nu = N \cdot h \cdot c / \lambda \quad [\text{J.mol}^{-1}]$$

kde N je Avogadrovo číslo. Vzorec pro výpočet pak je buď

$$E_\lambda = (6,022 \times 10^{23} \text{ [mol}^{-1}]) \times (6,626 \times 10^{-34} \text{ [J.s]}) \times \nu \text{ [s}^{-1}] \cong 3,99 \times 10^{-10} \times \nu \text{ [J.mol}^{-1}]$$

nebo

$$E_\lambda = (6,022 \times 10^{23} \text{ [mol}^{-1}]) \times (6,626 \times 10^{-34} \text{ [J.s]}) \times (2,998 \times 10^{17} \text{ [nm.s}^{-1}]) / \lambda \text{ [nm]} = (1,196 \times 10^8 \text{ [J.mol}^{-1}.\text{nm]}) / \lambda \text{ [nm]}$$

Hodnoty pro některé vybrané vlnové délky jsou uvedeny v **Tab. 3.7-1**.

Chceme-li vypočítat maximální možnou energetickou účinnost fotosyntézy, musíme vědět, jaký je minimální počet kvant potřebných pro asimilaci jedné molekuly CO₂, případně pro vyloučení jedné molekuly O₂. Ve čtyřicátých letech se o tuto hodnotu

vedl mezi badateli velmi prudký spor, neboť její velikost rozhodovala také o tom, jaké mechanismy lze pro fotochemickou část fotosyntézy předpokládat. Dnes, při podstatně hlubších znalostech o mechanismu oxygenní fotosyntézy, není tato otázka už tak palčivá. Je jasné, že pro rozložení dvou molekul vody (= vyloučení jedné molekuly kyslíku) a asimilaci jedné molekuly CO₂ Calvinovým cyklem se musí celým řetězcem přenosu elektronů oxygenní fotosyntézy přenést nejméně čtyři elektrony. Řetězec zahrnuje fotosystém 1 a fotosystém 2, je tedy na přenesení čtyř elektronů potřeba osm fotonů, které se nejen pohltily, ale také v reakčních centrech rozdělily náboje. Nejčastěji se jako důvěryhodné výsledky měření objevují hodnoty 10 až 12 kvant záření. Vypočteme tedy maximální energetickou účinnost fotosyntézy jednak pro teoretický počet osmi přeměněných kvant, jednak pro nejméně výhodný experimentálně podložený počet 12 kvant.

Všechna kvanta, která chlorofyl absorbuje, mají stejný fotochemický účinek. Mají však, jak uvedeno výše, různý obsah energie. Fotochemická reakce nemůže svázat větší množství energie, než které nese foton nejchudší na energii, který se ještě absorbuje (= excituje chlorofyl). Energie, o kterou jsou fotony vyšších kmitočtů (kratších vlnových délek) bohatší, se ztrácí jako teplo. Energeticky nejúčinnější ve fotosyntéze bude tedy přeměna fotonů nejchudších energií, tedy červených. Chceme-li spočítat teoreticky nejvyšší možnou účinnost fotosyntézy, budeme uvažovat tyto fotony. Současně ukážeme, jak se tato účinnost změní, pokud se budou ve fotosyntéze využívat fotony s průměrným obsahem energie, tedy zelené, což přibližně odpovídá průměrné energii jednoho fotonu v bílém (tedy všebarevném) světle.

Tab. 3.7-1. Vymezení a vlastnosti různých spektrálních oblastí fotosynteticky účinného záření (FAR nebo PHAR, photosynthetically active radiation). FAR je definováno jako oblast od 400 nm do 700 nebo 720 nm, tedy oblast, v níž absorbuje chlorofyl *a* a jiná barviva thylakoidů oxygenní fotosyntézy. Bakteriochlorofyly mají širší rozsah absorpce, zejména v blízké infračervené (bakteriochlorofyl *b* absorbuje až téměř do 1200 nm).

barva oblasti	rozsah vlnových délek (nm)	vybraná vlnová délka (nm)	kmitočet (hertz)	energie fotonu (eV.foton ⁻¹)	energie molu fotonů (kJ.mol ⁻¹)
ultrafialová	pod 400	254	$11,80 \times 10^{14}$	4,88	471
fialová	400 - 425	410	$7,31 \times 10^{14}$	3,02	292
modrá	425 - 490	460	$6,52 \times 10^{14}$	2,69	260
zelená	490 - 560	520	$5,77 \times 10^{14}$	2,38	230
žlutá	560 - 585	570	$5,26 \times 10^{14}$	2,18	210
oranžová	585 - 640	620	$4,84 \times 10^{14}$	2,00	193
červená	640 - 740	680	$4,41 \times 10^{14}$	1,82	176
infračervená	nad 740	1400	$2,14 \times 10^{14}$	0,88	85

Pro asimilaci jedné molekuly CO₂ Calvinovým cyklem je třeba dodat 2 molekuly NADPH+H⁺ a 3 ATP. Zda tento nárok mohou splnit čtyři elektrony prošlé řetězcem oxygenní fotosyntézy závisí na tom, pracuje-li v cyt *b₆/f* komplexu Q-cyklus nebo ne. Pokud ano, dojde při přenosu dvou elektronů řetězcem k přesunu šesti protonů přes membránu a souběžně s redukcí dvou NADP na NADPH+H⁺ se přes membránu přepraví 12 protonů, tedy dost pro syntézu 3 ATP. Pokud ovšem Q-cyklus nepracuje, sníží se poměr P/2e⁻ na 4 a úhrnný počet přesunutých protonů na 8, což pro syntézu 3 ATP ne-

postačuje. V tom případě se patrně musí další fotony uplatnit v cyklickém přenosu elektronů kolem fotosystému 1, který vede k tzv. cyklické fosforylaci a zlepši poměr nabídky ATP vzhledem k $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

Elektrony při fotochemickém přenosu v thylakoidu překonávají týž úhrnný rozdíl v oxidoredukčním potenciálu jako elektrony v membráně mitochondrií, od páru voda/kyslík k páru $\text{NADPH}+\text{H}^+/\text{NADP}$, tedy 1,14 V. Celkem tedy 4 moly elektronů, prošlých celým řetězcem, nahromadí $4 \times 96,5 \times 1,14 = 440$ kJ. K tomu je třeba přičíst ještě energii uloženou v makroergických vazbách tří molů ATP a to je přibližně 3×55 kJ, takže úhrnem se v těchto membránových pochodech nahromadí asi 600 kJ (přesný výsledek výpočtu je 605 kJ).

Jaký podíl to představuje z energie obsažené v osmi nebo dvanácti kvantech záření dvou vlnových délek a tedy, jaká je maximální možná účinnost membránových pochodů fotosyntézy ukazuje **Tab. 3.7-2**. V tabulce jsou dále uvedeny hodnoty účinnosti přeměny zářivé energie pro celou fotosyntézu, včetně asimilace CO_2 Calvinovým cyklem. Při jejich výpočtu se počítalo s tím, že obsah energie uložené v prvním uhlíkatém produktu fotosyntézy, tj. sacharidu, je 470 kJ na jednouchlíkový článek sacharidu, který označujeme {HCOH} nebo $\{\text{CH}_2\text{O}\}$. Poněvadž energie nahromaděná v produktech membránových pochodů, které se využijí na redukci 1 molu CO_2 , je přibližně 600 kJ, je účinnost biochemických pochodů Calvinova cyklu $\eta = 470 / 600 = 0,78$, čili 78 %.

Tab. 5.7-2. Nejvyšší možné účinnosti přeměny zářivé energie v chemickou za různých podmínek pro průběh fotochemických reakcí. Vypočtené hodnoty jsou zaokrouhleny na celá čísla.

Počet kvant	Vlnová délka	Energie kvant	Účinnost přeměny pro produkt	
			$2(\text{NADPH}+\text{H}^+ + 3\text{ATP})$	{HCOH}
8	680	1408	43	33
8	520	1840	33	25
12	680	2112	28	22
12	520	2760	22	17