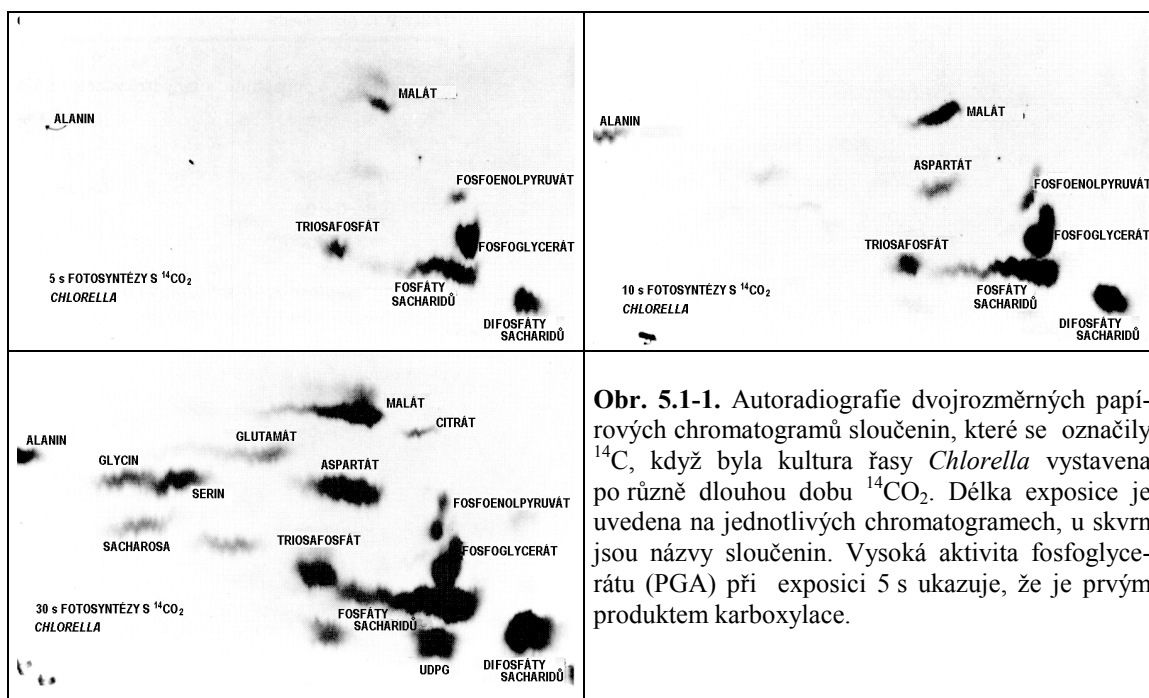


5. ENZYMOVÉ REAKCE FOTOSYNTÉZY

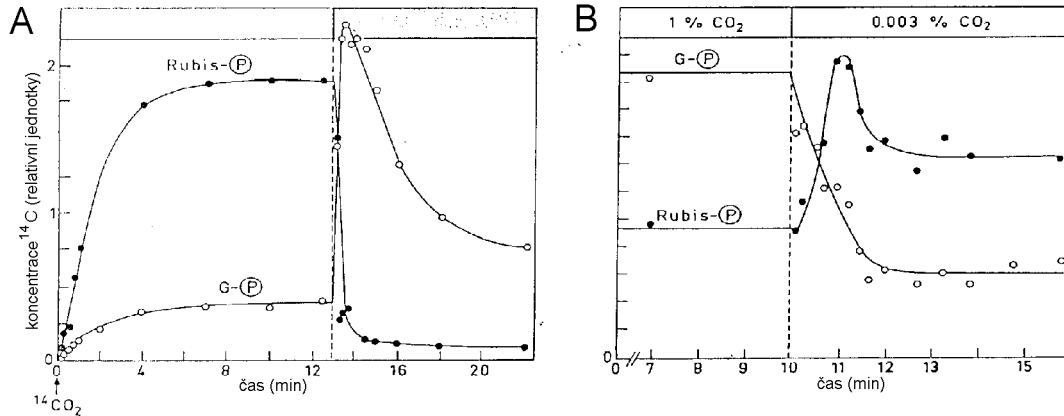
5.1. CALVINŮV CYKLUS

Oxid uhlíčitý vstupuje do organické vazby a redukuje se v reduktivním pentosovém cyklu (PRC, pentose reducing cycle), který se také nazývá fotosyntetický cyklus redukce oxidu uhlíčitého (PCRC, photosynthetic carbon reduction cycle), nebo prostě Calvinův cyklus. Melvin Calvin se spolupracovníky A.A. Bensonem a J.A. Basshamem v Berkeley (California, USA) v padesátých letech s použitím isotopem značeného $^{14}\text{CO}_2$ vystopovali sled těchto reakcí (cestu oxidu uhlíčitého) ve fotosyntéze. Nobelova cena za tuto práci byla udělena M. Calvinovi v r. 1962.

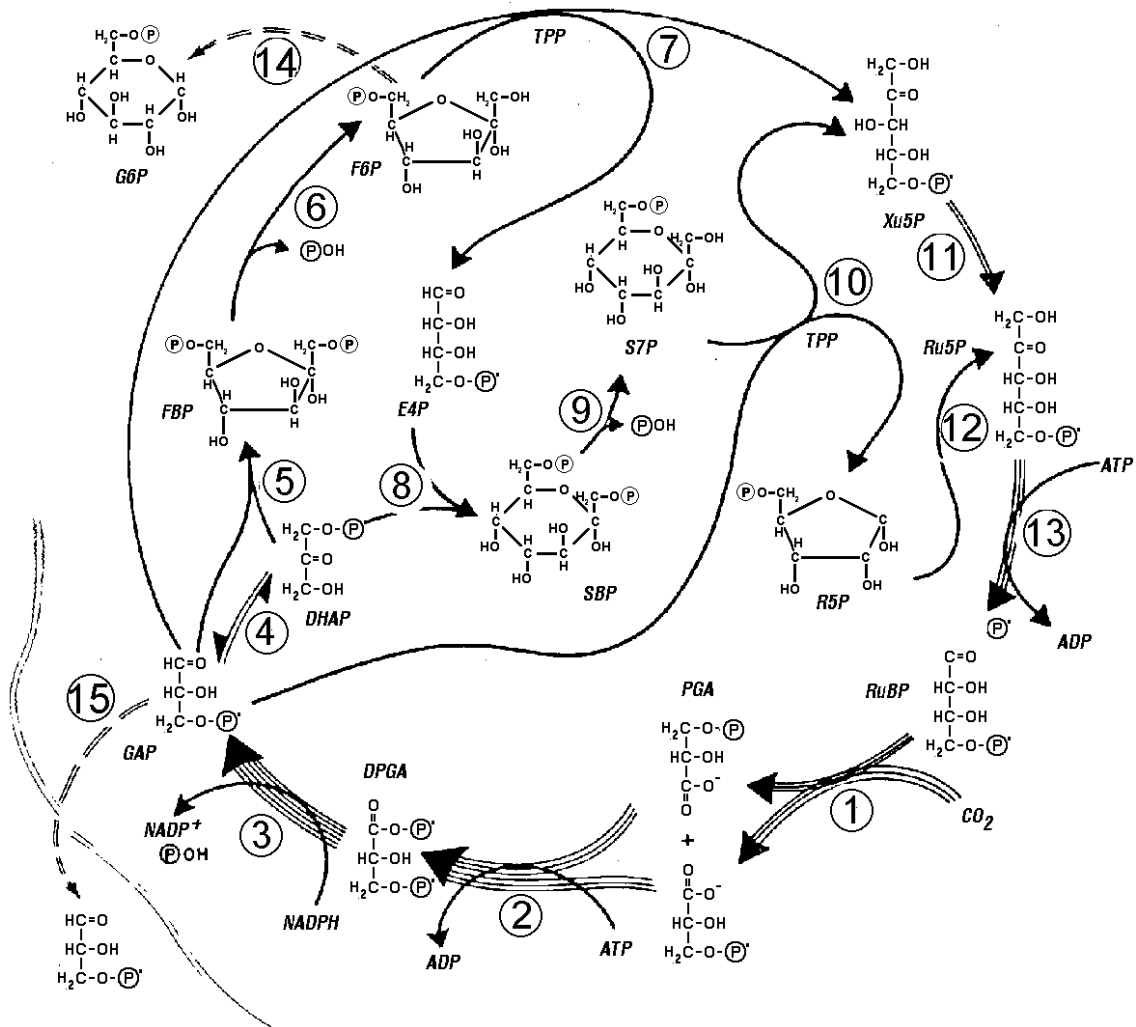
Radioaktivní $^{14}\text{CO}_2$ byl jednou z podmínek, aby se složitý sled reakcí dal analyzovat. Druhou byla papírová chromatografie, která umožnila dělit rychle a spolehlivě produkty asimilačních reakcí. Calvin se spolupracovníky použili kultury řasy *Chlorella* v aparatuře, která umožňovala rychlé zavedení $^{14}\text{CO}_2$ a rychlý (v sekundových intervalech) odběr vzorku a jeho usmrcení ve vroucím alkoholu. Při delších ozářeních se na chromatogramech objevovalo velké množství značených sloučenin, mezi nimiž byly organické kyseliny, aminokyseliny, ale hlavně fosforylované sacharidy. Se zkracováním doby ozáření se počet sloučenin zmenšoval, až při expozici 2s (**Obr. 5.1-1**) převládá fosfoglycerát. Ten byl soustavnými pokusy bezpečně určen jako první produkt fixace CO_2 . Když byla kultura asimilující $^{14}\text{CO}_2$ zatemněna a odebíraly se vzorky ve tmě (**Obr. 5.1-2A**) poklesla po zatemnění prudce koncentrace ribulosabisfosfátu (RuBP) a koncentrace glyceraldehydfosfátu (GAP) úměrně stoupla. Dále se ve tmě GAP zpracovává jen pomalu (oxidací a přeměnou na alanin). Když se během ozáření snížila prudce koncentrace CO_2 , klesla naopak koncentrace GAP a koncentrace ribulosabisfosfátu stoupla (**Obr. 5.1-2B**). Z takových a podobných pokusů se sestavilo schéma, které nese název Calvinův cyklus. Je uvedeno na **obr. 5.1-3**, povaha jednotlivých reakcí je charakterizována v **tab. 5.1-1**.



Obr. 5.1-1. Autoradiografie dvojrozměrných papírových chromatogramů sloučenin, které se označily ^{14}C , když byla kultura řasy *Chlorella* vystavena po různé dlouhou dobu $^{14}\text{CO}_2$. Délka expozice je uvedena na jednotlivých chromatogramech, u skvrn jsou názvy sloučenin. Vysoká aktivita fosfoglycerátu (PGA) při expozici 5 s ukazuje, že je prvním produktem karboxylace.



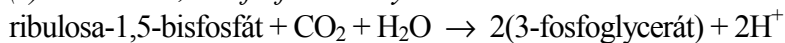
Obr. 5.1-2. Změny ve velikosti poolů ribulosabisfosfátu (RuBP, plné kroužky) a glyceraldehdfosfátu (GAP, prázdné kroužky) po náhlé změně podmínek ve fotosyntetizující kultuře řasy *Chlorella*. V části **A** byl fotosyntetizující kultuře v čase 0 přidán $^{14}\text{CO}_2$. Když značení obou sloučenin dosáhlo stálé hodnoty, bylo zhasnuto světlo. V části **B** byla kultuře fotosyntetizující v ustáleném stavu náhle snížena koncentrace CO_2 .



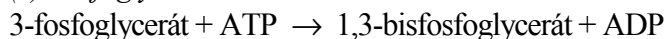
Obr. 5.1-3. Pentosový redukční cyklus, Calvinův cyklus. Počet čar v šipkách udává, kolikrát musí daná reakce proběhnout, aby vznikla jedna molekula GA3P ze tří molekul CO_2 . Čísla u jednotlivých reakcí odpovídají číslům v **Tabulce 5.1-1**, v níž jsou uvedeny popisy reakcí a názvy enzymů, které je katalyzují. Vysvětlení zkratk: RuBP - ribulosa-1,5-bisfosfát; BPGA - 1,3-bisfosfoglycerát; GA3P - 3-fosfoglyceraldehyd; FBP - fruktosa-1,6-bisfosfát; SBP - sedoheptulosa-1,7-bisfosfát; P v kroužku je $-\text{PO}_3^{2-}$, TPP - thiaminpyrofosfát.

Tab. 5.1-1. Popis jednotlivých reakcí Calvinova cyklu a názvy enzymů, které je katalyzují. Čísla odkazují k číslování reakcí Calvinova cyklu v **Obr. 5.1-3**. V legendě k tomuto obrázku jsou uvedeny plné názvy meziproductů, které jsou v obrázku označeny zkratkami.

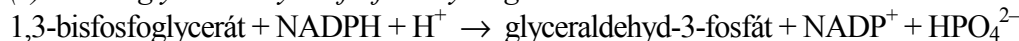
(1) *Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa*



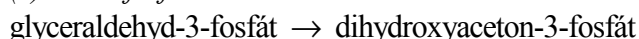
(2) *Fosfoglycerátkinasa*



(3) *NADP:glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa*



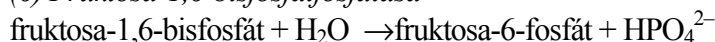
(4) *Triosafosfátisomerasa*



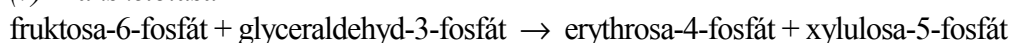
(5) *Aldolasa*



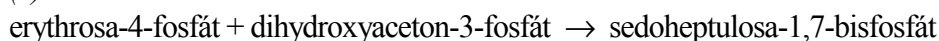
(6) *Fruktosa-1,6-bisfosfátfosfatasa*



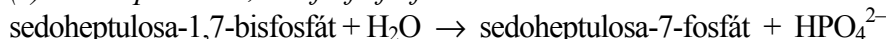
(7) *Transketolasa*



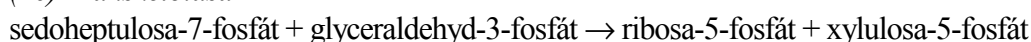
(8) *Aldolasa*



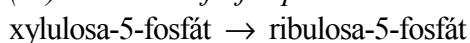
(9) *Sedoheptulosa-1,7-bisfosfátfosfatasa*



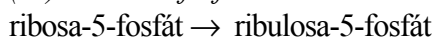
(10) *Transketolasa*



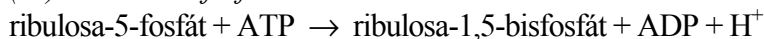
(11) *Ribulosa-5-fosfát epimerasa*



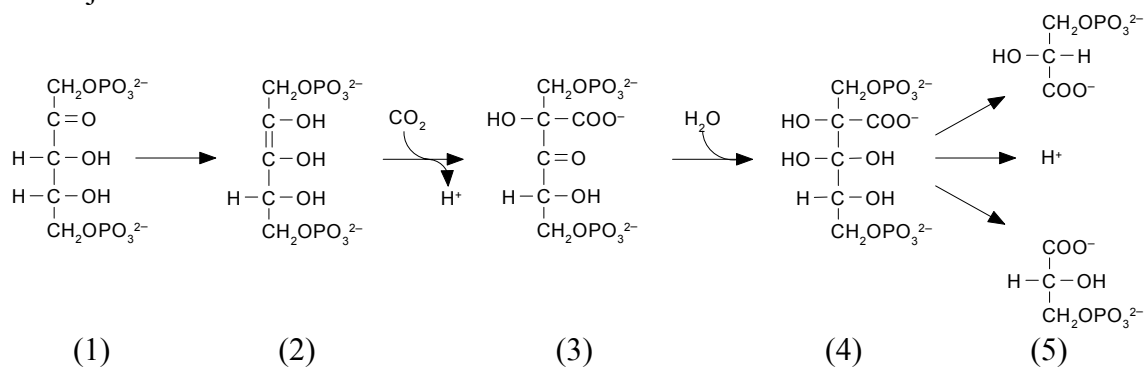
(12) *Ribosa-5-fosfátisomerasa*



(13) *Ribulosa-5-fosfátkinasa*

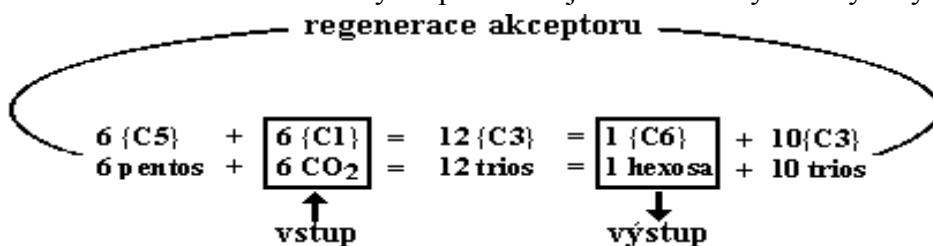


Ústřední reakcí cyklu [1, čísla v hranatých závorkách se dále odvoláváme na čísla reakcí v **Obr. 5.1-3**] je karboxylace ribulosa-(1,5)-bisfosfátu (RuBP), kterou vznikají dvě molekuly 3-fosfoglycerátu (PGA). Karboxylace probíhá v těchto krocích: RuBP (1 v rovnici pod tímto odstavcem) se naváže fosfátovými skupinami na basické aminokyseliny (lysin) enzymu, při čemž RuBP přejde na endiolovou formu (2). Negativně nabitý druhý atom uhlíku endiolové molekuly se naváže s pozitivním atomem C z CO₂ a vznikne 2-karboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát (3). Na něj se naváže OH⁻ z vody a produkt (4) se rozpadá na dvě PGA (5). Sled reakcí je tento:

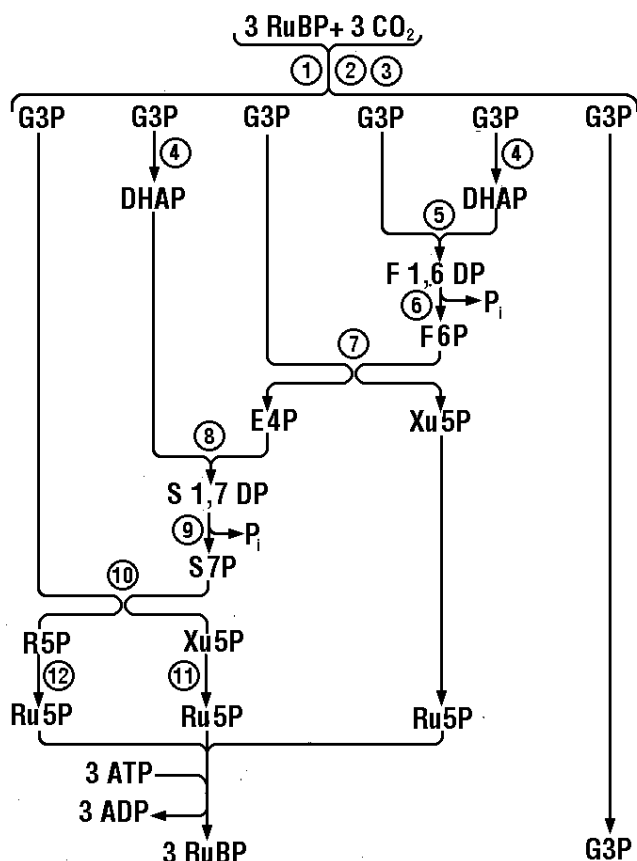


PGA se dále fosforyluje [2] na kyselinu 1,3-bisfosfoglycerovou (1,3-bisPGA), a tím se aktivuje pro redukci [3] na glyceraldehydrofosfát (při níž se jedna fosfátová skupina odhydrolyzuje a nahradí vodíkem). Glyceraldehydrofosfát (GAP) je v rovnováze [4] s fosfátem druhé triosy dihydroxyacetonfosfátem (DHAP). Kondensací obou triosafosfátů [5] vznikne fruktosabisfosfát (FBP) a jeho defosforylací [6] fruktosamonofosfát (F6P). F6P se může přeměnit [14] na glukosamonofosfát (G6P), který se využije pro polymeraci na zásobní škrob; GAP se může vynést z chloroplastu [15] a v cytoplasmě slouží k syntéze sacharosu. GAP, DHAP a G6P vstupují také do složitého cyklu transketolačních reakcí [7 až 10], jehož výsledkem je regenerace pentosového akceptoru.

Úhrnná stechiometrie cyklu pro vznik jedné molekuly hexosy tedy je:



Jak složitou soustavou reakcí se tato stechiometrie v pentosovém redukčním cyklu udržuje ukazuje názorně schéma na Obr. 5.1-4.



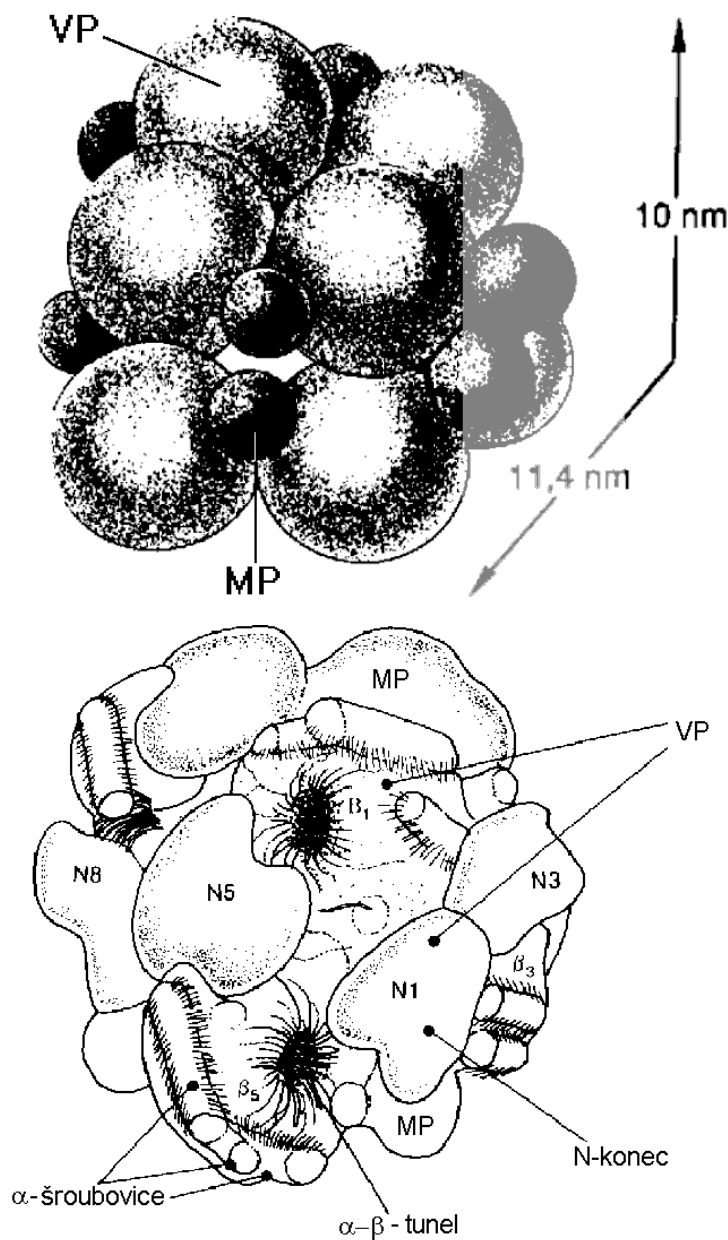
Obr. 5.1-4. Stechiometrie Calvinova cyklu. Karboxylací tří molekul RuBP vznikne šest molekul triosy. Z toho jedna je čistý výtěžek, opouští cyklus a využije se k libovolným dalším syntézám. Pět zbývajících trios (5 × 3 uhlíků) slouží k regeneraci tří pentos (3 × 5 uhlíků). Použijí se k tomu tři molekuly GAP a dvě DHAP (dihydroxyacetonfosfát). Čísla napsaná v šipkách značí počet uhlíků daného sacharidu. Konečný výsledek zajišťují tyto kondenzační a transketolační reakce: 3 + 3 → 6; 6 + 3 → 5 + 4; 4 + 3 → 7; 7 + 3 → 5 + 5.

Calvinův cyklus můžeme rozdělit na tři hlavní oddíly: (1) reakce karboxylační [1 v Obr. 5.1-3]; (2) redukce karboxylačního produktu [2 a 3]; (3) reakce regenerující karboxylační akceptor, tj. ribulosabisfosfát [4 až 13]. Z regeneračního cyklu odtékají v přiměřeném množství také konečné produkty Calvinova

cyklu, což jsou fosfáty hexos a trios.

Od fotochemické části fotosyntézy potřebuje cyklus při fixaci a redukci jedné molekuly CO₂: 1 ATP na fosforylaci RuP → RuBP a 2 ATP na fosforylaci

$2 \text{ PGA} \rightarrow 2 \text{ diPGA}$, celkem tedy 3 ATP. Na redukci dvou molekul diPGA na GAP jsou třeba 2 molekuly $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Úhrnem je tedy zapotřebí $2 (\text{NADPH} + \text{H}^+) + 3 \text{ ATP}$.



Obr. 5.1-5. Schématické znázornění struktury ribulosabisfosfátkarboxylasy. **A** - uspořádání velkých (VP) a malých (MP) podjednotek. **B** - podrobnější obraz, opřený o výsledky rentgenové strukturní analýzy. Vyznačeny jsou hlavní (B) a N-koncové (N) části hlavních podjednotek a U-V-tunely.

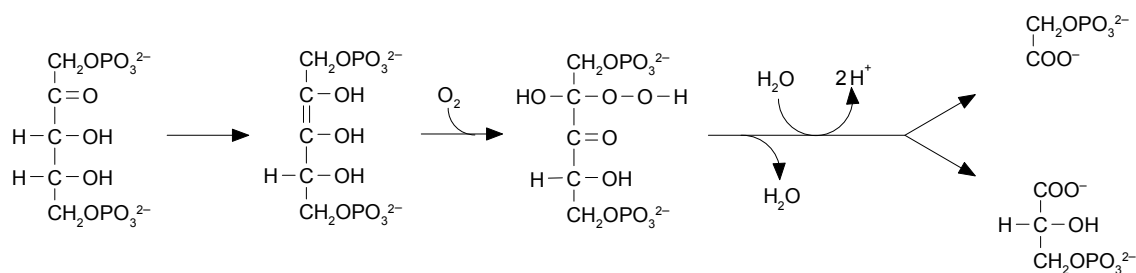
Základní karboxylační reakci, kterou oxid uhličitý vstupuje do organických sloučenin katalyzuje enzym ribulosabisfosfátkarboxylasa. Má tuto úlohu u všech organismů s oxygení fotosyntézou a u většiny ostatních autotrofních organismů (o výjimkách dále). Enzym tvoří polovinu rozpustných bílkovin v buňkách listů a je nejhojnějším enzymem i nejhojnější bílkovinou na Zemi.

U všech organismů oxygení fotosyntézy má ribulosabisfosfátkarboxylasa také shodnou strukturu (viz **obr. 5.1-5**). Skládá se z 8 velkých podjednotek (55 kDa, kódovány v chloroplastu) a 8 malých podjednotek (15 kDa, kódovány v jádře). Velké podjednotky

mají sled aminokyselin téměř shodný u všech vyšších rostlin. Každá má N-terminální část, označovanou N a hlavní část, označovanou B. Šroubovice α a listy β tvoří tzv. α - β -tunely. Aktivní centrum je blízko ústí jednoho tunelu; bodové mutace v blízkosti aktivního centra silně snižují aktivitu. To platí zejména o dvou lysinových zbytcích na části B a jednom glutaminu na části N sousední podjednotky. Avšak celý sled aminokyselin těch úseků listů β , které leží u ústí tunelů je většinou shodný u nejrůznějších organismů.

Malé podjednotky pravděpodobně jen vytvářejí kvarterní strukturu enzymu, ale neobsahují katalytická místa; sledy jejich aminokyselin jsou proměnlivé. Ribulosabisfosfátkarboxylasa některých fotosyntetických bakterií má menší počet podjednotek než 8. Tak např. u *Rhodospirillum rubrum* se skládá pouze ze 2 velkých podjednotek.

Ribulosobisfosfátkarboxylasa má také aktivitu oxygenasovou. Na též uhlík, na který se váže CO_2 se také může navázat O_2 za vzniku PGA a fosfoglykolátu:



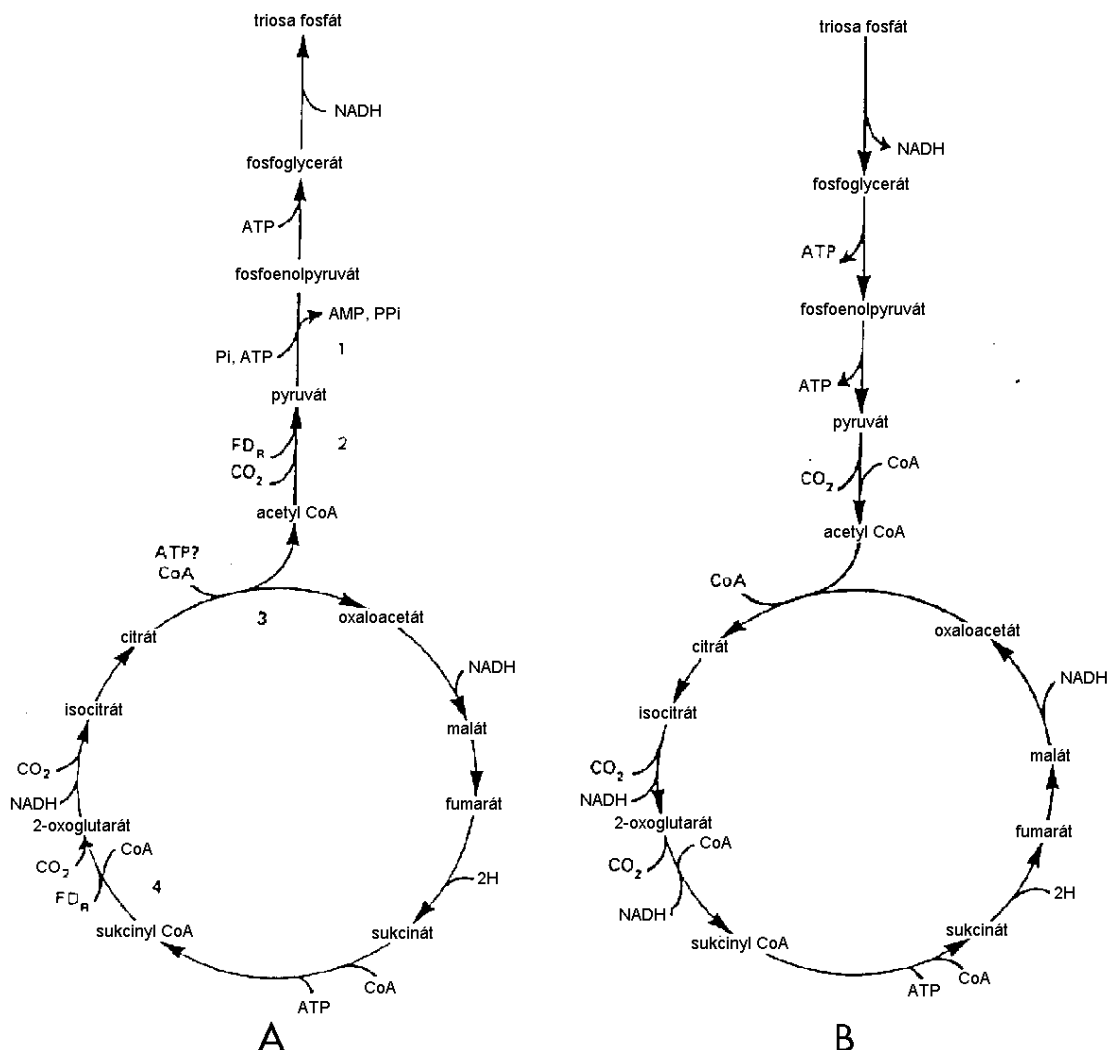
Vzhledem k oxygenasové aktivitě nazývá se dnes enzym obvykle ribulosabifosfátkarboxylasa-oxygenasa a často se pro něj používá zkratky RUBISCO.

Oxygenační mechanismus není dosud dostatečně objasněn. Zejména se neví, jak se kyslík aktivuje. Neexistuje totiž jiný oxygenační enzym, který by neměl jako aktivátor Fe-hem, nebo jinou obdobnou skupinu. V pokusech s kyslíkem a vodou, které byly označeny hmotovými isotopy kyslíku, se zjistilo, že do karboxylu glykolátu vstupuje jeden atom z kyslíkové molekuly, druhý se redukuje na vodu. Do karboxylu PGA vstoupí kyslík z vody.

Oxygenační aktivita je vlastností všech dosud zkoumaných forem RUBISCO, i těch, které se izolují z anaerobních autotrofních bakterií. Je pravděpodobně důsledkem toho, že se tento enzym vyvíjel hned na počátku vývoje života na Zemi v prostředí bez kyslíku. Tak se všeobecně rozšířil enzym, u nějž struktura aktivního centra pro karboxylaci předurčuje také jeho oxygenasovou aktivitu. Když se objevil v atmosféře kyslík, nebyly již fotosyntetické organismy schopny vývojem oxygenasovou aktivitu oslabit. Ani v laboratorních pokusech nebyla dosud nalezena cílená mutace, která by změnila poměr oxygenasové a karboxylasové aktivity. O důsledcích oxygenasové aktivity se píše v dalším oddíle věnovaném fotorespiraci.

Zelené sírné fotosyntetické bakterie nemají RUBISCO a používají reduktivní (obrácený) citrátový (Krebsův) cyklus. Je to opačně běžící sled reakcí, které v obvyklém pořadí (známém jako Krebsův cyklus, nebo cyklus kyseliny citronové) rozkládají při dýchání dvojuhlíkaté zbytky organických sloučenin na CO₂ za vzniku redukováného koenzymu NADH. V obvyklém směru probíhající Krebsův cyklus je sledem dehydrogenací a dekarboxylací; obrácený cyklus naopak zahrnuje reduktivní karboxylace. Přitom meziprodukty obou cyklů jsou tytéž, avšak nejvýznamnější reakce, které jsou prakticky nevratné jsou katalysovány různými enzymy v jednom a v druhém směru (viz **Obr. 5.1-6**).

Obrácený Krebsův cyklus používají při svém ftoheterotrofním životě také purpurové nesírné bakterie, pokud je pěstujeme na organickém substrátu (např. kys. jantarová) bez dodávky CO₂. Jantaran (sukcinát) používají nejprve jako zdroj elektronů pro fotosyntetickou reakci, přičemž jej oxidují na fumarát. Ten pak obráceným Krebsovým cyklem zužitkují pro stavbu organických molekul.

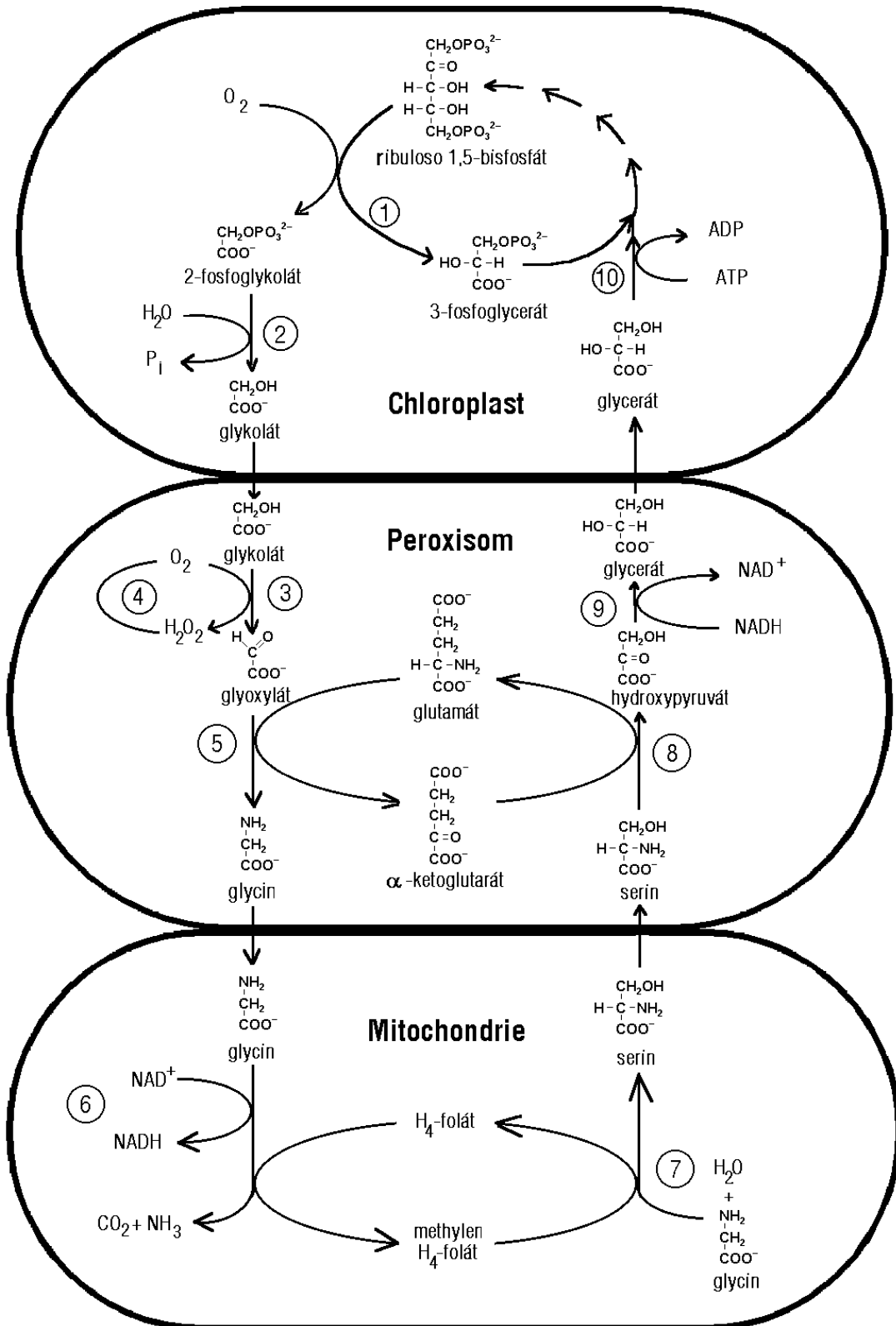


Obr. 5.1-6. A - Reduktivní citrátový cyklus. Tuto metabolickou dráhu používá pro asimilaci CO₂ místo Calvinova cyklu několik druhů zelených sírných bakterií. Je to jediný způsob vázání CO₂ odlišný od Calvinova cyklu. Je to vlastně Krebsův cyklus, jehož reakce probíhají v opačném směru. Některé z nich jsou katalyzovány enzymy odlišnými od enzymů Krebsova cyklu. Jsou to: (1) pyruvát P_i dikinasa; (2) pyruvát syntetasa; (3) citrát lyasa; (4) 2-oxoglutarát syntetasa (FD_R znamená redukovaný feredoxin). V části (B) je pro srovnání uveden normální Krebsův cyklus.

5.2. FOTORESPIRACE

5.2.1. FOTORESPIRAČNÍ CYKLUS

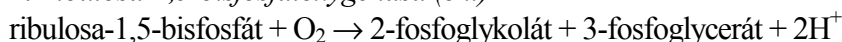
Fotorespirace je důsledkem oxygenasové aktivity RUBISCO. Na rozdíl od karboxylasy oxygenasa dává vznik jedné molekule fosfoglycerátu a jedné molekule fosfoglykolátu. Fosfoglycerát se po redukci může zapojit do Calvinova cyklu. Fosfoglykolát se v asimilačních buňkách v listech vyšších rostlin dále zpracovává složitým cyklem reakcí. Je to tzv. fotorepirační cyklus, označovaný PCOC (photorespiratory carbon oxidation cycle). Je pozoruhodný tím, že při něm dochází ke kooperaci enzymů ve třech organelách, jak je to znázorněno na **Obr. 5.2-1** a popsáno v **tab. 5.2-1**. Tato soustava reakcí přeměňuje fosfoglykolát vzniklý oxygenasovou reakcí a 3/4 uhlíku v něm obsaženého vrací do Calvinova cyklu v podobě fosfoglycerátu. Energetický nárok tohoto postupu je hydrolýza jednoho ATP při fosforylaci glycerátu.



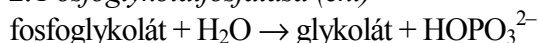
Obr. 5.2-1. Schématické znázornění reakcí fotorespiračního cyklu, kterým se ze dvou molekul fosfoglykolátu, vzniklého oxygenační reakcí, vytvoří jedna molekula fosfoglycerátu a jedna molekula CO_2 . Reakce probíhají ve třech organelách fotosyntetizující buňky. Číslice u šipek odkazují na čísla reakcí a názvů enzymů v tab. 5.2-1.

Tab. 5.2-1. Názvy jednotlivých enzymů podílejících se na fotorespiraci a popis reakcí, které katalyzují. Čísla odkazují k číslování reakcí na **Obr. 5.2-1** na protější straně. V závorce za názvem enzymu je označení jeho lokalizace: *chl* - chloroplast, *per* - peroxisom, *mit* - mitochondrie.

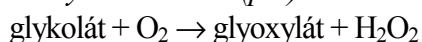
1. *Ribulosa-1,5-bisfosfátoxygenasa (chl)*



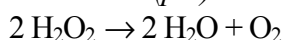
2. *Fosfoglykolátfosfatasa (chl)*



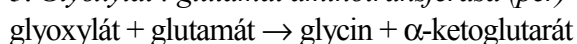
3. *Glykolát oxidasa (per)*



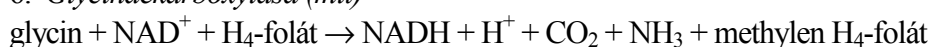
4. *Katalasa (per)*



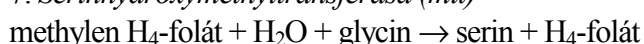
5. *Glyoxylát : glutamát aminotransferasa (per)*



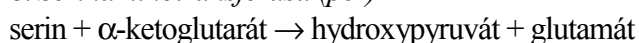
6. *Glycinderkarboxylasa (mit)*



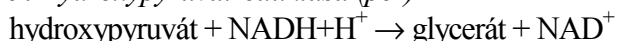
7. *Serinhydroxymethyltransferasa (mit)*



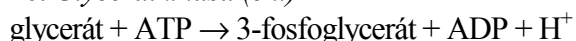
8. *Serinaminotransferasa (per)*



9. *Hydroxypyruvát reduktasa (per)*



10. *Glycerátkinasa (chl)*



5.2.2. KINETIKA FOTOESPIRACE

Rychlostní konstanta pro oxygenaci je asi osmdesátkrát menší než pro karboxylaci, ale při poměru koncentrací $\text{CO}_2 : \text{O}_2$ v roztoku, který je v rovnováze se vzduchem, je už poměrná rychlost oxygenace, označovaná α , rovna téměř 0,4. Jak je popsáno v dalších kapitolách, některé rostliny vyvinuly mechanismy koncentrování CO_2 , které podíl fotorespirace snižují. Mezi vyššími rostlinami jsou takové rostliny označovány jako rostliny C4. Údaje o kinetice fotorespirace v této kapitole se týkají rostlin, které tuto soustavu pochodů koncentrujících CO_2 nemají a které označujeme jako rostliny C3.

Pro poměr karboxylasové a oxygenasové aktivity a poměr fotorespirace k fotosyntéze se používají tyto rovnice a veličiny: Předpokládá se Michaelis-Mentenovská kinetika pro oba pochody, podle níž rychlost pochodu

$$v = V_{\max} \times [S] / (K_M + [S])$$

kde v je rychlost reakce, V_{\max} je maximální rychlost reakce pro enzym za daných podmínek, $[S]$ je koncentrace substrátu a K_M je koncentrace substrátu, při níž je rychlost reakce polovinou maximální rychlosti ($v = V_{\max}/2$). Pro koncentrace substrátu, které jsou nízké ve srovnání s K_M , lze psát

$$v = V_{\max} \times [S] / K_M$$

Takové rovnice můžeme napsat pro karboxylaci (veličiny s indexem c) i pro oxygenaci (veličiny s indexem o), které katalyzuje RUBISCO současně:

$$v_c = V_c \times [\text{CO}_2] / K_c$$

$$v_o = V_o \times [\text{O}_2] / K_o$$

a z těchto rovnic získáme pro poměr rychlosti karboxylace a oxygenace

$$v_c / v_o = (V_c K_o / V_o K_c) \times ([CO_2] / [O_2])$$

kde V_c a V_o je psáno místo $V_{c,max}$ a $V_{o,max}$, K_o a K_c je psáno místo $K_{M,o}$ a $K_{M,c}$.

Výraz $(V_c K_o / V_o K_c)$ určuje tedy poměr rychlostí obou reakcí při stejné koncentraci CO_2 a O_2 . Sestává z konstant charakteristických pro enzym a nazývá se faktor (poměrné) specifity (relative specificity factor) nebo rozdělovací koeficient (partitioning coefficient) a označuje se někdy S_{rel} . S_{rel} popisuje míru specifity enzymu pro dvě reakce, které enzym katalyzuje a je to vlastně poměr poměrů maximálních rychlostí k Michaelisovým konstantám obou reakcí, tedy $(V_c/K_c) / (V_o/K_o)$. Pro vyšší rostliny má tento faktor hodnotu okolo 80, zjištěné hodnoty pro řasy jsou okolo 60, pro sinice okolo 50 a velmi nízké jsou pro některé fotosyntetické bakterie, např. 9 nebo 15 (zde záleží již také na struktuře RUBISCO, která je u těchto bakterií zjednodušená).

Hodnoty K_c zjištěné pro RUBISCO z vyšších rostlin se pohybují v rozmezí 10 - 20 μM , hodnoty K_o v rozmezí 400 - 600 μM . Údajů pro V_c je v literatuře podstatně méně a jsou okolo 1 $\mu mol \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$. Pro RUBISCO z řas byly naměřeny hodnoty K_c v rozmezí 30 - 60 μM , u sinic v rozmezí 100 - 200 μM .

S rostoucí teplotou se poměr fotorespirace k fotosyntéze výrazně zvyšuje. Tento jev má dvě příčiny: Předně se stoupající teplotou se snižuje afinita RUBISCO k CO_2 více nežli afinita k O_2 . Má-li při 25 °C faktor specifity hodnotu 80, je tato hodnota při 35 °C už jen 60 (rozdíl 25 % !). Za druhé rozpustnost CO_2 klesá s teplotou rychleji než rozpustnost O_2 . Poměr jejich rozpustností se mezi 25 a 35 °C změní o 10 %.

Faktor specifity lze také použít k (přibližnému) výpočtu rychlosti fotorespirace při daných podmínkách fotosyntézy. Přibližný je tento výpočet proto, že koncentraci CO_2 a O_2 v těsném okolí aktivního centra enzymu můžeme jenom odhadovat. To je obtížné zejména pro O_2 . Avšak tyto výpočty lze ověřovat měřením výměny značených plynů, kterým lze - zase jenom přibližně - odlišit spotřebu $^{14}CO_2$ ($^{18}O_2$) a produkci $^{12}CO_2$ ($^{16}O_2$). Přibližně proto, že přímo v buňkách probíhá reasimilace části uvolněného CO_2 a podobně je tomu s kyslíkem. Jeden takový učebnicový výpočet vychází z koncentrace $[CO_2]$ rovné 8 μM a $[O_2]$ rovné 260 μM a z faktoru specifity 80. Poměr rychlostí karboxylace a oxygenace je pak

$$v_c / v_o = 80 \times 8 / 260 = 2,46$$

čili přibližně 2,5 : 1. Poněvadž rychlost tvorby CO_2 fotorespirací je 0,5 rychlosti oxygenace, je poměr spotřeby CO_2 fotosyntézou a vzniku CO_2 fotorespirací 2,5 : 0,5, tj. tvorba CO_2 fotorespirací je 20 % jeho spotřeby při fotosyntéze. Poněvadž jedna molekula CO_2 ve fotorespiraci vznikne při projití 4 atomů C (dvou molekul glykolátu) fotorespiračním cyklem, je tok uhlíku tímto cyklem v daném příkladu 80 % toku C Calvinovým cyklem. Přitom tento výpočet dává spíše podhodnocené rychlosti fotorespirace. Koncentrace rozpuštěného O_2 v chloroplastu může snadno být (při 25 °C) např. 300 μM a CO_2 jen 6 μM . Obdobný výpočet jako výše dá pak pro poměr rychlostí obou reakcí RUBISCO hodnotu 1,6 a poměr obou toků CO_2 je pak 1,6 : 0,5. Je tedy v tomto případě fotorespirační tok CO_2 okolo 30 % z toku fotosyntetického a rychlost toku uhlíku fotorespiračním cyklem převyšuje rychlost jeho toku cyklem Calvinovým.

V případě, že fotorespirace uvolňuje CO_2 rychlostí, která je 25 % rychlosti fixace CO_2 Calvinovým cyklem (průměrná hodnota z obou výše uvedených výpočtů), může se fotosyntéza zvýšit až o 50 %, pokud zamezíme oxygenaci: každá molekula uvolněného CO_2 je výsledkem dvou oxygenačních reakcí, které mohou být nahrazeny karboxylacemi. Experimentálně se skutečně ověřil nárůst rychlosti fotosyntézy, když se koncentrace O_2 v atmosféře obklopující C3 listy snížil z 21 % na 1 %. Z toho je jasné, že oxygenasová aktivita a z ní plynoucí fotorespirace může v obvyklých podmínkách, v nichž rostliny žijí, významně snižovat produktivitu rostlin. Rostliny soji, pěstované po 69 dnů v atmosféře obsahující jen 5 % O_2

skutečně vytvořily dvojnásobné množství sušiny proti rostlinám, pěstovaným v atmosféře s 21 % O₂.

Poněvadž jsou jisté rozdíly v poměru karboxylační a oxygenační reakce, které se odráží např. v rozdílných hodnotách faktoru specifity, je stále aktuální otázka, zda by nebylo možno genetickými zásahy do struktury RUBISCO snížit podíl fotorespirace u C₃ rostlin. Vzhledem k tomu, že CO₂ i O₂ reagují s tímž meziproductem enzymatické reakce, tj. ribuloso-2,3-endiolem, je jediná možnost umožnit nějak snazší přístup CO₂ k aktivnímu místu ve srovnání s O₂. Tuto cestu v podstatě zvolily C₄ rostliny a protože u C₃ i C₄ rostlin je faktor specifity stejně velký, je zřejmé, že příroda již nenašla způsob, jak mutačními změnami v okolí aktivního centra poměr karboxylace a oxygenace změnit. Dosavadní informace o struktuře aktivního centra také nenaznačují jak toho dosáhnout. Molekulární biologie však dává možnosti se o to pokoušet cílenými mutacemi.

5.2.3. KOMPENZAČNÍ KONCENTRACE CO₂

Jestliže C₃ rostlinu osvětlíme v neprodyšně uzavřené nádobě bude spotřebovávat nebo vyvíjet CO₂ (podle jeho koncentrace), až se dosáhne rovnovážné koncentrace, která je 45 ppm CO₂ při 25 °C a 21 % O₂. Tuto koncentraci CO₂ nazýváme kompenzační koncentrace a označujeme ji Γ . V rovnovážném stavu, k němuž dojde při Γ , je rychlost oxygenasové reakce dvojnásobná ve srovnání s karboxylasovou reakcí. Oxygenasová reakce dává vznik jedné molekule glykolátu a jedné molekule PGA a ze dvou molekul glykolátu dále vzniká jedna molekula CO₂.

Fotorespiračním cyklem se ze dvou fosfoglykolátů jeden uhlík uvolní a tři zachovají jako jeden glycerát, který vstoupí do Calvinova cyklu. Při $\alpha = 0,4$ charakteristickém pro fotosyntézu ve vzduchu s normální koncentrací CO₂ vzniknou na tři asimilované molekuly CO₂ dva glykoláty a ztratí se tedy jeden CO₂. To je tedy ztráta 25 % již asimilovaného CO₂. Při koncentraci O₂, jaká je ve vzduchu (21 kPa), se asimilace Calvinovým cyklem rovná fotorespiračním ztrátám (tzv. kompenzační bod CO₂) při tlaku CO₂ \cong 4 Pa (tj. asi 12 % normálního obsahu CO₂ ve vzduchu). Plyne to z následující úvahy:

Rychlost tvorby CO₂ fotorespirací je 0,5 \times rychlost oxygenace (v_o). Poměr rychlostí fotosyntézy a fotorespirace (obě vyjádřeny v rychlosti výměny CO₂) je tedy

$$v_c / 0,5 \cdot v_o = V_c \cdot K_o \cdot [CO_2] / 0,5 \cdot V_o \cdot K_c \cdot [O_2]$$

Koncentrace CO₂, při níž se rychlost fotosyntézy právě rovná rychlosti fotorespirace, se nazývá kompenzační koncentrace CO₂. Označíme-li ji Γ pak můžeme napsat

$$V_c \cdot K_o \cdot \Gamma = 0,5 \cdot V_o \cdot K_c \cdot [O_2]$$

a odtud

$$\Gamma = 0,5 \cdot V_o \cdot K_c \cdot [O_2] / V_c \cdot K_o = 0,5 \cdot [O_2] / S_{rel}$$

Použijeme-li hodnotu $S_{rel} = 80$ a koncentraci rozpuštěného O₂, je-li roztok v rovnováze se vzduchem při 25 °C, $[O_2] = 270 \mu\text{l} \cdot \Gamma^{-1}$, pak je hodnota Γ

$$\Gamma = 0,5 \cdot 270 / 80 = 1,7 \mu\text{mol} \cdot \Gamma^{-1}$$

rozpuštěného CO₂, což odpovídá asi 50 $\mu\text{l} \cdot \Gamma^{-1}$ v plynné fázi (roztok v rovnováze s CO₂ o tlaku 0,1 MPa při 25 °C, má $[CO_2] = 34,1 \text{ mmol} \cdot \Gamma^{-1}$, takže $1,7 / 34100$ je $50 \cdot 10^{-6}$). Kompenzační koncentrace naměřené u C₃ rostlin při obvyklých koncentracích CO₂ a O₂ ve vzduchu se skutečně pohybují v rozmezí 40 - 60 $\mu\text{l} \cdot \Gamma^{-1}$ CO₂.

Při výpočtu Γ jsme uvažovali pouze vyrovnání mezi toky CO₂ ve fotosyntéze a ve fotorespiraci. To není přesné, poněvadž ke spotřebě CO₂ přispívá ještě mitochondriální dýchání. To je však ve zdravých listech na vrcholu fotosyntetické aktivity jen malým zlomkem

(okolo 5 %) rychlosti fotosyntézy, zejména pokud je list osvětlen a dýchání je tím do značné míry sníženo. Jak uvidíme dále je rychlost fotorespirace u C₃ rostlin podstatně vyšší (je podstatně vyšším podílem rychlosti fotosyntézy) a proto výpočty Γ , které zanedbávají mitochondriální dýchání dávají přibližně správné výsledky. Nemusí tomu tak být u velmi mladých, intenzivně rostoucích listů, nebo u listů stárnoucích a nemocných, u nichž rychlost dýchání bývá výrazně vyšší.

Zpočátku se soudilo, že Γ je u různých druhů rostlin velmi různé, ale dnes se ukazuje, že pro všechny C₃ rostliny je velmi podobné a to okolo 40 $\mu\text{l.l}^{-1}$ v plynné fázi. Musí se ovšem uvažovat skutečná koncentrace rozpuštěného CO₂ v buňkách nebo alespoň koncentrace v intercelulárách. Souhlasí to také s tím, že faktor specifity je také pro všechny vyšší rostliny (v tomto případě včetně C₄ rostlin) velmi podobný (nejvíce hodnot je mezi 77 a 88).

C₃ dráha má jako hlavní nedostatek fotorespirační ztráty, které jsou důsledkem oxygenasové aktivity RUBISCO. Obrácený Krebsův cyklus tyto ztráty nemá, kromě toho je podle prostého výpočtu energeticky podstatně úspornější, potřebuje 4ATP místo 9ATP (při přepočtu NAD(P)H+H⁺ na ATP) na asimilaci jedné molekuly CO₂. Přesto se v průběhu vývoje rozšířil Calvinův cyklus, snad proto, že v něm základní karboxylační reakce je zcela nevratná a jeho enzymy mají mnoho regulačních mechanismů.

5.2.4. FOTORESPIRACE U C₄ ROSTLIN

Soustavné analýzy ukázaly, že mezi C₄ rostlinami se častěji nacházejí takové, které mají nižší hodnoty faktoru specifity, tak např. u *Sorghum bicolor* až 64. Při vysoké koncentraci, kterou udržují C₄ rostliny v okolí RUBISCO, se tyto nižší hodnoty nijak nepříznivě neprojeví zvýšením fotorespirace. Soudí se proto, že to může být odraz sníženého selekčního tlaku na vysokou specifitu RUBISCO. Výsledky, které uvádějí Jordan a Ogren (1983), naznačují, že typy RUBISCO, které se vyznačují vysokými hodnotami faktoru specifity, mají sníženou hodnotu maximální rychlosti karboxylační reakce, V_c. Pro C₄ rostliny, které mohou snést mírné snížení specifity, to může být výhodné, poněvadž tím získají možnost zvýšit maximální rychlost fotosyntézy.

C₄ rostliny a fotosyntetické organismy, které umějí zvyšovat koncentraci CO₂ v buňce (viz následující oddíl), mají hodnoty kompenzační koncentrace CO₂, označované Γ , velmi blízké nule. Tyto hodnoty jsou přitom nezávislé na koncentraci O₂ v prostředí a na teplotě. Poněvadž pochody, které koncentrují CO₂, pracují rychleji, nežli karboxylace katalyzovaná RUBISCO, je v okolí tohoto enzymu stále podstatně vyšší koncentrace CO₂, než u C₃ rostlin. Odhady koncentrace CO₂ v buňkách pochev svazků cévních u C₄ rostlin se pohybují mezi 160 a 900 μM , což je 20 až 120 krát více, než je obvyklá koncentrace ve fotosyntetizujících mezofylových buňkách C₃ rostlin.

Tak vysokou koncentrací CO₂ je velmi účinně potlačena oxygenační aktivita RUBISCO. Je tomu tak přesto, že v průměru jsou hodnoty K_c pro RUBISCO u C₄ rostlin o něco vyšší než u C₃ rostlin a úhrnná aktivita RUBISCO v buňkách C₄ rostlin je o něco nižší než u C₃ rostlin. Ve velmi malé míře však k oxygenační reakci dochází i v buňkách pochev svazků cévních a to se dá dokázat, pokud se vhodnými látkami zastaví některé reakce fotorespiračního cyklu a sleduje se nahromadění jeho meziproduktů.

Buňky asimilačního pletiva C₄ listů mají také peroxisomy, které jsou mnohem hojnější v buňkách pochev svazků cévních než v mezofylových buňkách. I tak je jich tam nanejvýše 50 % ve srovnání s mezofylem C₃ rostlin. Buňky pochev cévních svazků mohou tedy to malé množství glykolátu, které přece jenom vznikne, dále metabolizovat a dekarboxylovat. Jsou však dokonale obklopeny mezofylovými buňkami, které všechny

CO₂ velmi účinně pohltí karboxylační reakcí PEP-karboxylasy. Údaje hodnoty K_c pro PEP-karboxylasu jsou různé, ale pohybují se mezi 0,7 a 0,05 μM, což je 20 až 300 krát nižší hodnota nežli K_c pro RUBISCO. To vysvětluje, že se jakákoli fotorespirační aktivita u C₄ rostlin navenek neprojevuje a nedá se měřit.

5.3. MECHANISMY KONCENTRUJÍCÍ CO₂.

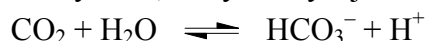
Poněvadž fotorespirační ztráty jsou zvláště vysoké při velmi nízkých koncentracích CO₂ v prostředí, vyvinuly se u fotosyntetických organismů různé mechanismy, které zvyšují koncentraci CO₂ v okolí RUBISCO. Jsou to zejména: (1) koncentrování CO₂ u sinic a řas, ke kterému dochází aktivním přenosem CO₂ nebo HCO₃⁻ a (2) koncentrování CO₂ u rostlin s mechanismy C₄ a CAM, při nichž dochází ke karboxylaci a dekarboxylaci přenašeče, kterým je organická kyselina; karboxylace a dekarboxylace jsou přitom odděleny buď prostorově nebo časově.

5.3.1. KONCENTROVÁNÍ CO₂ U ŘAS A SINIC.

Pokud jsou buňky sinic a mikroskopických řas dostatečně zásobeny CO₂ (roztok provzdušňovaný směsí vzduchu s několika procenty CO₂), probíhají u nich souběžně s fotosyntézou také pochody fotorespirace. Část glykolátu vzniklého oxygenační reakcí se často z buněk řas a sinic vylučuje do roztoku, v němž rostou, takže z asimilovaného uhlíku fotorespirační ztrácejí dokonce vyšší podíl než vyšší rostliny.

Pokud se však koncentrace CO₂ v prostředí sníží pod jistou mez (např. v roztoku probublávaném čistým vzduchem), indukuje se v buňkách sinic a některých řas syntéza přenašečů a enzymů, které jsou schopny velmi podstatně zvyšovat koncentraci CO₂ v buňkách proti koncentraci v prostředí. U řas jsou to řádově desetinásobky (např. 40×) a u sinic stonásobky (500 až 1000 ×) vnější koncentrace. Hromadění anorganického uhlíku v buňkách se děje u různých fotosyntetických mikroorganismů různými mechanismy, v žádném ze známých případů však nejde o využití sledu reakcí, na němž je založeno koncentrování CO₂ u rostlin C₄. To platí i o těch řasách, u nichž se zjistila vysoká aktivita PEP-karboxylasy.

Mechanismy hromadění CO₂ u fotosyntetických mikroorganismů nejsou dosud zcela jednoznačně vyjasněny. Významná úloha v nich však připadá aktivnímu přenosu iontu HCO₃⁻ a enzymu karboanhydrase, který katalyzuje reakci



Sinice jsou alkalifilní nebo alkalitolerantní, mnohé mohou dobře růst i při pH vyšším než 10. V takovém prostředí je obvykle vysoká koncentrace hydrogenuhlíčitanových iontů a sinice jich dovedou účinně využívat pro fotosyntézu. Hromadí ionty HCO₃⁻ v buňkách aktivním transportem a karboanhydrasou z nich uvolňují oxid uhličitý, který se zpracovává RUBISCO. V buňkách sinic jsou drobná tělíška, karboxysomy, která obsahují jednak RUBISCO, jednak karboanhydrasu. Enzymy jsou v karboxysomech ve vysoké koncentraci a pravidelně uspořádány, což patrně umožňuje velmi účinné využití karboanhydrasou uvolněného CO₂ pro karboxylační reakci RUBISCO.

Pro aktivní příjem HCO₃⁻ do buněk sinic je nezbytná jistá koncentrace sodných iontů v prostředí. Uvažuje se o dvou mechanismech aktivního příjmu HCO₃⁻, v nichž hraje Na⁺ úlohu: (1) HCO₃⁻ se přenáší elektrogenní ATPasou. Na⁺/H⁺ antiport dopravuje H⁺ do buněk a tak zabraňuje stoupání pH v buňce. Tento mechanismus vyžaduje ještě další systém přenosu, který do buňky vnáší Na⁺. (2) HCO₃⁻ se do buňky dostává symportem s Na⁺, poháněným koncentračním spádem sodných iontů. Koncentrační spád Na⁺ na membráně vytváří Na⁺ ATPasa, která čerpá Na⁺ ionty z buněk ven.

Také pro využívání HCO_3^- eukaryotními řasami byly navrženy dva různé mechanismy. Prvý z nich se opírá o důkaz extracelulární (z buňky vylučované) karboanhydrasy, která může při povrchu buňky uvolňovat CO_2 z HCO_3^- . V těsné blízkosti buňky je tedy vyšší koncentrace CO_2 a pokud thylakoidy udržují v buňce velmi nízkou koncentraci poteče CO_2 přednostně do buňky. Někteří autoři předpokládají ještě funkci bílkoviny v obalové membráně chloroplastu, která aktivně přenáší nějakou formu anorganického uhlíku (CO_2 nebo HCO_3^-) do chloroplastu. Hromadění anorganického uhlíku izolovanými chloroplasty bylo skutečně v několika případech pozorováno.

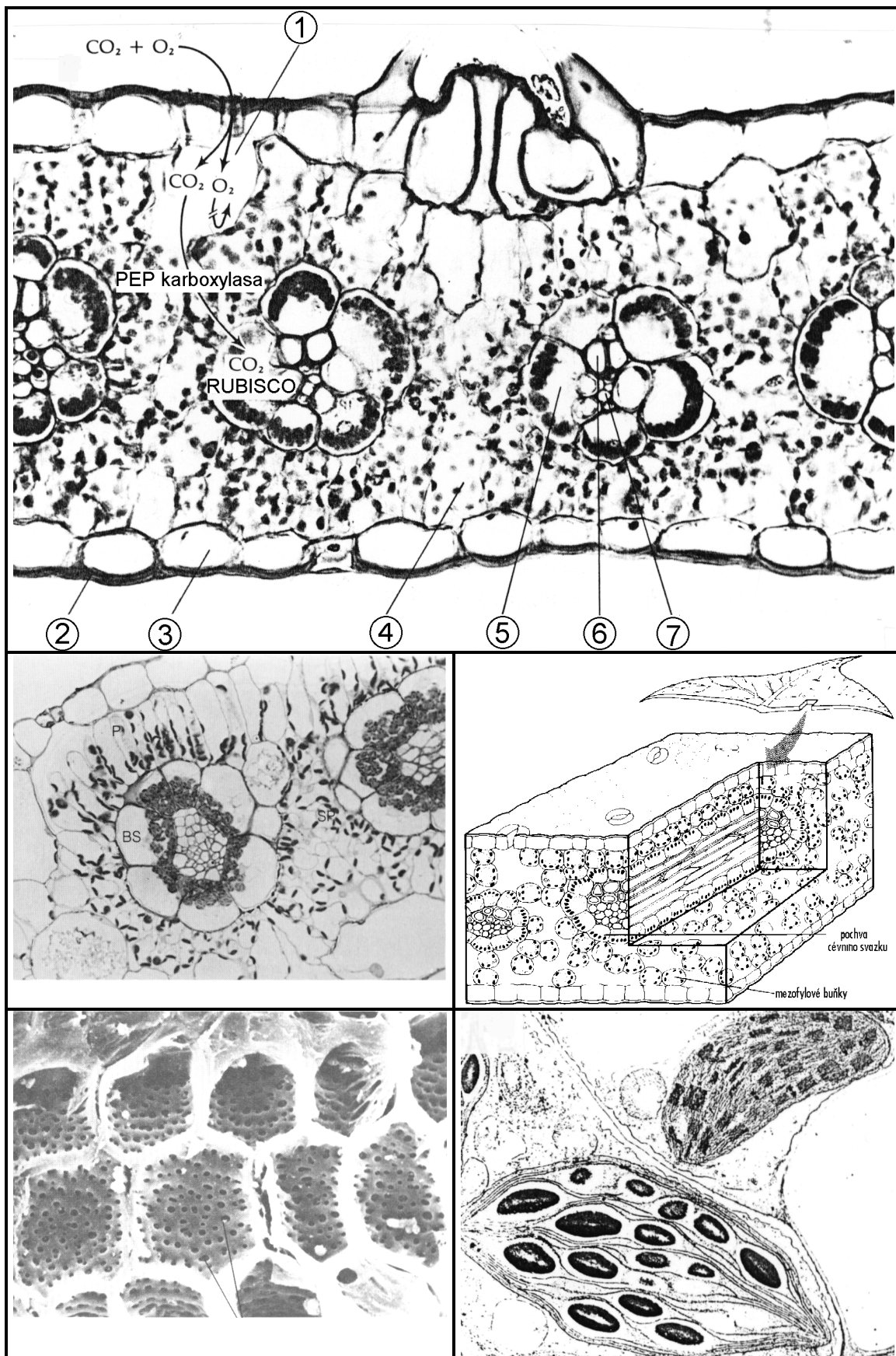
Druhý navržený mechanismus počítá s aktivním transportem HCO_3^- přes buněčnou membránu. Karboanhydrasa v buňce pak uvolňuje z hydrogenuhličitanových iontů CO_2 a tak je koncentrace CO_2 okolo chloroplastu mnohem vyšší, nežli v prostředí obklopujícím buňky. Oba mechanismy mohou vhodně doplňovat i v jedné buňce. U některých mořských řas byla také prokázána závislost hromadění CO_2 v buňce na přítomnosti Na^+ v mediu. Platí pro ně tedy obdobné úvahy, jako jsou výše uvedeny pro sinice.

5.3.2 KONCENTROVÁNÍ CO_2 U ROSTLIN S CYKLEM C_4 KYSELIN (U C_4 -ROSTLIN)

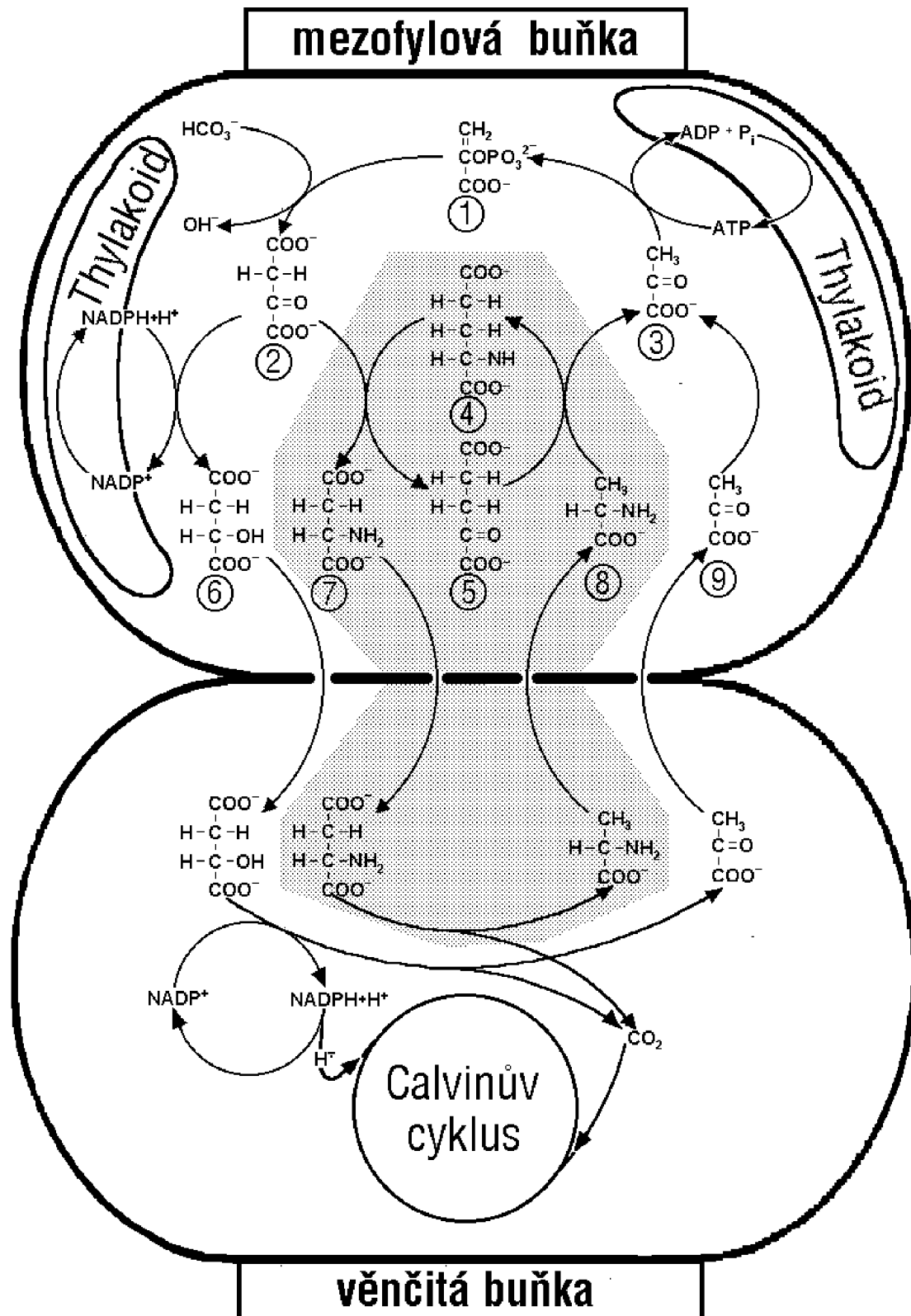
U některých vyšších rostlin koncentraci CO_2 v místě, kde pracuje RUBISCO, obstarává tzv. cyklus C_4 kyselin. Používá se pro ně název C_4 rostliny, kdežto ostatní rostliny se označují jako C_3 rostliny. Důležitou podmínkou pro fungování biochemického mechanismu akumulace CO_2 je zvláštní anatomická stavba listového pletiva u C_4 rostlin, tzv. věnčitá anatomie (Kranz anatomy). Buňky asimilačního pletiva C_4 listů jsou rozlišeny na dva druhy, které mají odlišné vybavení a odlišnou funkci chloroplastů. Souhra pochodů v těchto dvou typech buněk a přenos látek mezi nimi zajišťuje koncentrování CO_2 (viz **Obr. 5.3-1** a **Obr. 5.3-2**) v buňkách pochev svazků cévních.

Text k obrázku na protější stránce →

Obr. 5.3-1. A - Mikrofotografie příčného řezu listem kukuřice ukazující charakteristickou stavbu listu C_4 rostliny. Pochvy svazků cévních jsou tvořeny několika velkými věnčitými buňkami, jejichž chloroplasty jsou nahloučeny při obvodové stěně. Mezofylové buňky obklopují věnčité buňky v jedné, nanejvýše ve dvou vrstvách. **1**-dutina pod průduchem, **2**-kutikula, **3**-epidermis, **4**-mezofylové buňky, **5**-věnčité buňky, **6**-xylém, **7**-floém. **B** - Mikrofotografie příčného řezu listem dvojděložné C_4 rostliny. Rozdíl v uložení chloroplastů ve věnčitých buňkách je dán příslušností k jinému typu C_4 mechanismu (viz **obr. 5.3-4**) nikoli tím, že jde o dvouděložnou rostlinu. **C** - Kresba mikroskopických obrazů příčného řezu listem C_3 rostliny (a) a C_4 rostliny (b) ukazující charakteristické rozdíly v anatomické stavbě. **D** - Snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu ukazující četné velké plasmodesmy spojující mezofylové buňky s buňkami věnčitými. **E** - Mikrofotografie z transmisního elektronového mikroskopu ukazující ultratenký řez chloroplastem mezofylové buňky (vpravo nahoře, s grany a bez škrobu) a chloroplastem věnčité buňky (vlevo dole, bez gran a s velkým množstvím škrobových zrn).



Obr. 5.3-1. Anatomické a cytologické znaky listů s C4 mechanismem koncentrace CO_2 . Text k obrázku je na protější straně

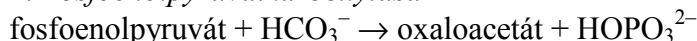


Obr. 5.3-2. Schématické znázornění obecného základu mechanismu koncentrování CO₂ ve věčtitých buňkách C4 rostlin. Znázorněna je jednak cesta, při níž přenašenými sloučeninami jsou malát a pyruvát, jednak cesta, při níž úlohu přenašečů mají anionty kyseliny asparagové a alaninu (šedě označená část schématu). Číslice v kroužcích označují sloučeniny: 1 - fosfoenolpyruvát, 2 - oxaloacetát, 3 - pyruvát, 4 - glutamát, 5 - α-ketoglutarát, 6 - malát, 7 - aspartát, 8 - alanin, 9 - pyruvát. Další v textu.

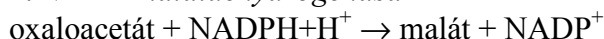
V listech C4 rostlin jsou cévní svazky obklopeny pochvami, jež tvoří tzv. věnčité buňky seskupené kolem cévního svazku. Chloroplasty v nich provozují intensivně Calvinův cyklus a produkují asimiláty, které se cévním svazkem hned odvádějí. Ostatní buňky asimilačního pletiva, tzv. mezofylové buňky, obklopují pochvu věnčitých buněk v jedné nebo dvou vrstvách. Mají velmi sníženou aktivitu enzymů Calvinova cyklu, zato mají v cytoplasmě velmi silnou aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxylasy, která karboxyluje fosfoenolpyruvát na oxaloacetát. Ten se v mezofylových buňkách některých C4 rostlin dále redukuje na jablečnan, u jiných rostlin se transaminuje na aspartát. Sloučenina se čtyřmi atomy uhlíku pak přechází z mezofylové buňky do buňky věnčité. Tam se dekarboxyluje a tak se ve věnčitých buňkách obklopujících pochvy cévního svazku vytváří vysoká koncentrace CO₂. V důsledku toho je velmi silně potlačena oxygenasová aktivita RUBISCO. O mohutné výměně sloučenin mezi mezofylovými a věnčitými buňkami svědčí četné plasmodesmy velkého průměru v buněčných stěnách, které tyto buňky oddělují (viz **Obr. 5.3-1**). Plasmodesmy jsou otvory ve stěnách rostlinných buněk, jimiž procházejí tenké provazce cytoplasmy z jedné buňky do druhé.

Tab. 5.3-1. Popisy reakcí znázorněných v **Obr. 5.3-2** a **5.3-3** a názvy enzymů, které je katalyzují.

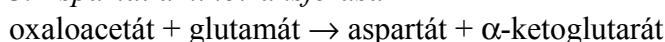
1. *Fosfoenolpyruvátkarboxylasa*



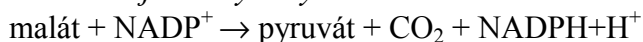
2. *NADP-malátdehydrogenasa*



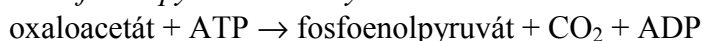
3. *Aspartát aminotransferasa*



4. *NADP-jablečný enzym*



5. *Fosfoenolpyruvátkarboxykinasa*



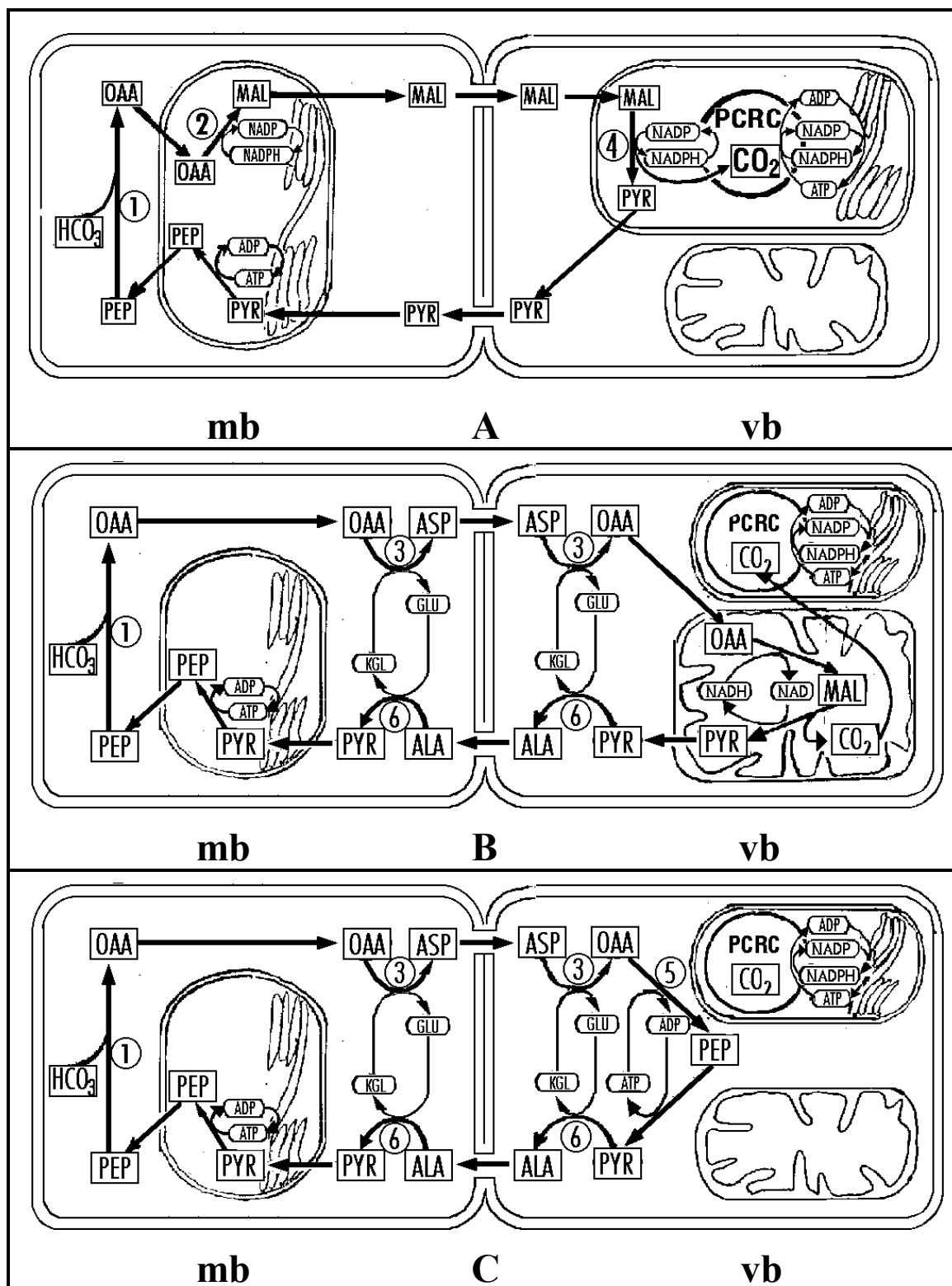
6. *Alanin-aminotransferasa*



7. *Pyruvát-orthofosfát dikinasa*



Základní rysy koncentračního mechanismu společné všem C4 rostlinám jsou znázorněny ve schématu na **Obr. 5.3-2**. Rovnice reakcí v tomto obrázku znázorněných a enzymy, které je katalyzují, shrnuje **Tab. 5.3-1**. Všem C4 rostlinám je společná základní karboxylační reakce v mezofylových buňkách katalyzovaná enzymem fosfoenolpyruvátkarboxylasou (PEP-karboxylasou). Podle toho jaká sloučenina se z karboxylací vzniklého oxaloacetátu vytvoří a přenáší z mezofylových buněk do buněk věnčitých a jakým mechanismem se v buňkách věnčitých dekarboxyluje, rozlišují se C4 rostliny na tři typy. Mechanismy koncentrace CO₂ u jednotlivých typů znázorňuje schématicky **obr. 5.3-3**, jejich charakteristické znaky a rostlinné druhy, u nichž byly prokázány, jsou shrnuty v **tab. 5.3-2**.



Obr. 5.3-3. Schématické znázornění reakcí, jimiž dochází ke koncentraci oxidu uhličitého a jejich rozmístění v mezofylových a věnčitých buňkách u různých typů C4 rostlin. **A** - typ NADP-ME; **B** - typ NAD-ME; **C** - typ PEP-CK. Vlevo je vždy buňka mezofylová (mb), vpravo věnčitá buňka (vb) z pochvy cévního svazku. Čísla v šipek odkazují na čísla reakcí v **tab. 5.3-1**. Zkratky označující sloučeniny jsou: ALA - alanin, ASP - asparagin, GLU - glutamin, KGL - ketoglutarát, OAA - oxaloacetát, PEP - fosfoenolpyruvát, PYR - pyruvát. PCRC je fotosyntetický cyklus redukce uhlíku (photosynthetic carbon reduction cycle). Charakteristika jednotlivých typů a jejich zástupci jsou také v **tab. 5.3-2**.

(1) U prvního typu (**Obr. 5.3-3A**) se produkt karboxylace, tj. oxaloacetát, v chloroplastech mezofylových buněk redukuje na malát. Malát přechází do chloroplastů buněk věnčitých a tam se oxidativně dekarboxyluje na pyruvát, při čemž uvolňuje CO₂, ale také H, který se naváže na přenašeč NADP. Dekarboxylaci katalyzuje enzym, který se nazývá NADP vyžadující jablečný enzym a označuje se zkratkou NADP-ME (NADP-dependent malic enzyme). Pyruvát se vrací do chloroplastů mezofylových buněk a tam se mění na fosfoenolpyruvát, substrát pro karboxylaci, která ale probíhá v cytoplasmě mezofylových buněk.

(2) U druhého typu (**Obr. 5.3-3B**) se oxaloacetát transaminuje v cytoplasmě mezofylové buňky na aspartát a ten přechází do cytoplasmy buňky věnčité. Zde se transaminací mění zpět na oxaloacetát a ten se v mitochondrii dekarboxyluje na pyruvát. Mezi postupně této reakce je převedení oxaloacetátu na malát, který je vlastním substrátem dekarboxylační reakce. Katalyzuje ji enzym, který se nazývá NAD vyžadující jablečný enzym, označuje se NAD-ME (NAD-dependent malic enzyme) a při dekarboxylaci regeneruje NADH, které se spotřebuje předtím na redukci oxaloacetátu. Pyruvát se v cytoplasmě věnčité buňky transaminuje na alanin, který přestupuje do cytoplasmy mezofylové buňky a tam se opět transaminací mění na pyruvát. Pyruvát vstoupí do chloroplastu a tam se přemění na fosfoenolpyruvát, čímž se kruh uzavírá.

(3) U třetího typu (**Obr. 5.3-3C**) jsou děje v mezofylové buňce a sloučenina přestupující do věnčité buňky (aspartát) zcela stejné jako u typu druhého. Rozdíl je však v dekarboxylační reakci, která probíhá v cytoplasmě věnčité buňky a je katalyzována enzymem fosfoenolpyruvátkarboxykinasou, označovaným zkratkou PEP-CK (odvozenou z anglického phosphoenolpyruvate carboxykinase). Také návrat trojuhlikaté sloučeniny do mezofylové buňky je většinou obdobný jako u typu 2: fosfoenolpyruvát se přemění v pyruvát, transaminuje se v alanin a ten přechází do mezofyly. U některých rostlin však jsou náznaky, že přecházející sloučeninou je přímo fosfoenolpyruvát.

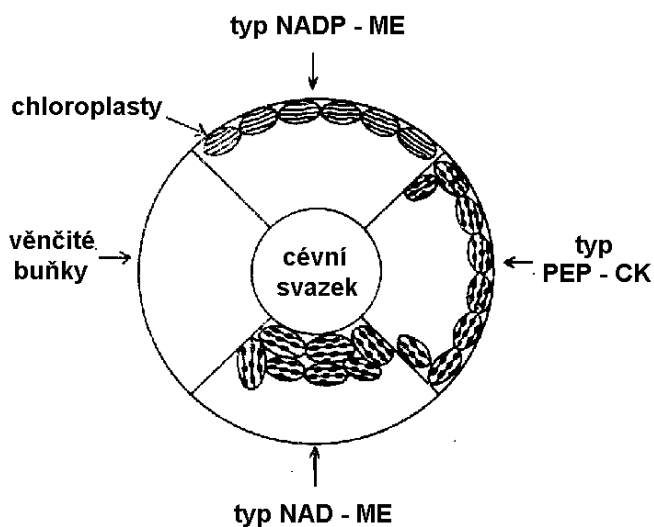
Tab. 5.3-2. Charakteristika jednotlivých typů C₄ mechanismu koncentrace CO₂ a jejich význační představitelé. V záhlaví u přenášené sloučeniny MB → VB znamená z mezofylových buněk do buněk věnčitých, VB → MB znamená opačným směrem.

| Označení typu | Přenášená sloučenina | | Dekarboxylace enzym (místo) | Význační představitelé |
|---------------|----------------------|---------------------------|--|--|
| | MB→VB | VB→MB | | |
| NADP-ME | malát | pyruvát | NADP vyžadující jablečný enzym (chloroplast) | kukuřice (<i>Zea mays</i>), cukrová třtina (<i>Saccharum officinarum</i>), širok dvojbarevný (<i>Sorghum bicolor</i>), rosička krvavá (<i>Digitaria sanguinalis</i>), proso hliznaté (<i>Panicum bulbosum</i>) |
| NAD-ME | aspartát | alanin | NAD vyžadující jablečný enzym (mitochondrie) | laskavec ohnutý (<i>Amaranthus retroflexus</i>), lebeda (<i>Atriplex spongiosa</i>), šrucha zelná (<i>Portulaca oleracea</i>), proso seté (<i>Panicum miliaceum</i>) |
| PEP-CK | aspartát | alanin (fosfoenolpyruvát) | PEP karboxykinasa (cytoplazma) | proso největší (<i>Panicum maximum</i>), chloris (<i>Chloris gayana</i>) |

U C₄ rostlin typu NADP-ME se s malátem přenáší do věnčitých buněk nejen CO₂, ale i redukční ekvivalenty, neboť při dekarboxylaci malátu vzniká NADPH+H⁺. Je to však pouze polovina množství potřebného pro redukci produktů karboxylace, které vzniknou vazbou jedné molekuly CO₂. Druhý redukční ekvivalent (NADPH+H⁺) se získává tak, že se část PGA vzniklé karboxylací přesune do mezofylových buněk, tam se

redukuje na triosu a jako DHAP se přenáší zpět do věnčitých buněk. Tento kyvadlový mechanismus je patrně stejně účinný i u druhých dvou typů C₄ rostlin. U nich ale je v chloroplastech věnčitých buněk obsažen fotosystém II, takže do jisté míry mohou PGA redukovat samy.

Tři typy C₄ rostlin se liší také ultrastrukturou chloroplastů věnčitých buněk a jejich polohou v buňce **obr. 5.3-4**: U typu NADP-ME chloroplasty věnčitých buněk nemají grana, jejich thylakoidy jeví velmi slabou aktivitu PSII a nevyvíjejí kyslík. Jejich typická poloha je u stěny nejvíce vzdálené od buněk pochev cévního svazku. U typu NAD-ME chloroplasty mají grana, i když aktivita fotosystému II je velmi slabá. Jejich typická poloha je při stěně, kterou se buňky mezofylu a cévní pochvy stýkají. Konečně typ PEP-CK má v chloroplastech též grana a poloha chloroplastů je při stěnách, které nesousedí s věnčitými buňkami.



Obr. 5.3-4. Různá ultrastruktura chloroplastů (bez gran a s grany) a jejich poloha ve věnčitých buňkách C₄ rostlin patřících k různým typům C₄ mechanismu

Dodnes byl C₄ cyklus prokázán asi u 900 druhů rostlin patřících do 19 čeledí, z nichž nejvíce zástupců mají Graminae, Cyperaceae a Chenopodiaceae. Významné C₄ rostliny jsou především některé tropické trávy jako cukrová třtina (*Saccharum officinarum*), kukuřice (*Zea mays*), proso (*Panicum*), čirok (*Sorghum*), rosička (*Digitaria*), mnohé trávy savan aj.,

ale také dvojděložné rostliny jako lebeda (*Atriplex*), laskavec (*Amaranthus*) a mnohé jiné. Je známo více než 10 rodů, které mají jak druhy C₃ tak C₄ a v literatuře jsou také zajímavé práce o přechodných typech a křížencích mezi C₃ a C₄ rostlinami. Příslušnost některých význačných C₄ druhů k různým typům C₄ mechanismu je uvedena v **tab. 5.3-2**.

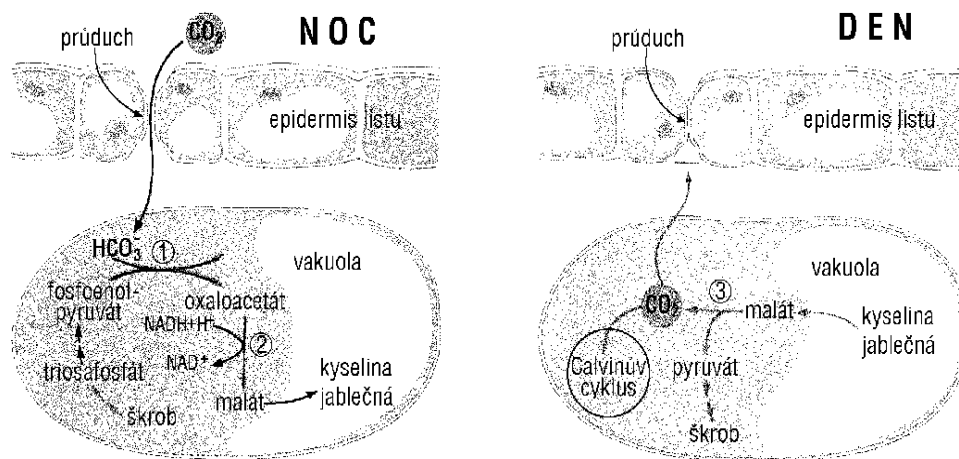
Koncentrace CO₂ v místě činnosti RUBISCO dává C₄ rostlinám řadu výhod, především tím že odstraňuje ztráty fotorespirací. Chceme-li tuto výhodu zhodnotit kvantitativně, musíme vědět, jaký je energetický náklad na tuto koncentrační práci. Z přehledu reakcí C₄ cyklů v **obr. 5.3-3** a v **tab. 5.3-1** vyplývá, že je to energie vložená do převedení pyruvátu na fosfoenolpyruvát v chloroplastech mezofylových buněk. Tato energie pak pohání karboxylaci fosfoenolpyruvátu na oxaloacetát, při níž se hydrolyzuje vazba fosfátu ve fosfoenolpyruvátu. Při dekarboxylaci C₄ sloučeniny (malátu nebo oxaloacetátu) ve věnčitých buňkách se již žádná volná energie nezachovává, ať už tato reakce probíhá kterýmkoli ze tří uvedených způsobů. Při fosforylaci pyruvátu na fosfoenolpyruvát (viz reakce 7 v **tab. 5.3-1**) se ATP mění na AMP a vzniká jedna molekula pyrofosfátu. AMP se převádí na ADP reakcí AMP + ATP = 2ADP. Vyžaduje tedy fosforylace pyruvátu energii, kterou poskytne hydrolyza dvou vazeb ATP. O toto množství energie je tedy vyšší energetický nárok na asimilaci jedné molekuly CO₂, využívá-li se pro jeho koncentraci cyklu C₄ kyselin. Zisk, který z toho C₄ rostliny mají je, že výtěžek jejich fotosyntézy není snižován fotorespirací. V oddíle o fotorespiraci je uvedeno, že za obvyklých podmínek fotosyntézy ztrácí C₃ rostliny asi 0,25 již asimilovaného CO₂ fotorespirací. Na asimilaci 1 molekuly CO₂ Calvinovým cyklem je zapotřebí

$2\text{NADPH}+\text{H}^+$ a 3ATP . Energie uložená v redukční schopnosti jedné molekuly $\text{NADPH}+\text{H}^+$ odpovídá přibližně energii hydrolyzy tří vazeb ATP. Je tedy celkový energetický náklad na asimilaci jedné molekuly CO_2 Calvinovým cyklem v přepočtu na ATP roven energii 9 makroergických vazeb ATP. Ztráty způsobené fotorespirací mají tedy energetický ekvivalent $9\text{ATP} \times 0,25 = 2,25\text{ATP}$. Z toho plyne, že již při obvyklých podmínkách fotosyntézy se C4 rostlině mírně vyplatí vynaložení dvou ATP na koncentraci CO_2 , která fotorespiraci zabrání. Výhoda se však výrazně stupňuje s dalším klesáním koncentrace CO_2 , k němuž dochází při intenzivní fotosyntéze za vyšších teplot. Také v podmínkách nedostatečného zásobení vodou, kdy rostlina přivírá průduchy a koncentrace CO_2 uvnitř listu se snižuje, se vydatně uplatňují výhody poskytované C4 koncentračním mechanismem.

5.3.3. KONCENTRACE CO_2 V C₄ KYSELINÁCH U ROSTLIN CAM

Rostliny přizpůsobené krajně suchým stanovištím využívají spřažení karboxylace PEP a dekarboxylace malátu k tomu, aby omezily na nejmenší míru výdej vody transpirací. Mechanismus se obvykle označuje CAM, což je akronym z „crassulacean acid metabolism“, tedy metabolismus kyselin u tučnolistých. U tučnolistých byl mechanismus poprvé popsán, ale využívají ho hojně také rostliny z jiných čeledí, které jsou přizpůsobeny aridním podmínkám. Souhrnně tyto rostliny označujeme jako „rostliny CAM“.

Reakce karboxylace a dekarboxylace, které jsou u C4 rostlin odděleny prostorově (v různých typech buněk asimilačního pletiva), jsou u rostlin CAM odděleny v čase. CO_2 se váže v průběhu noci do malátu a v průběhu dne se z něj uvolňuje a zpracovává se Calvinovým cyklem. Rostliny CAM mají tedy při silném denním oslunění průduchy zavřené a otevírají je v noci, kdy nehrozí velké ztráty vody odparem. Reakce mechanismu CAM jsou schématicky znázorněny na Obr. 5.3-5.



Obr. 5.3-5. Schématické znázornění pochodů probíhajících v asimilačních buňkách rostlin CAM. Čísla u některých šipek se vztahují k popisu reakcí a enzymů v **tab. 5.3-2**. Levá část obrázku znázorňuje pochody probíhající v noci: Glykolysou škrobu se získává fosfoenolpyruvát, jako substrát pro karboxylaci, a $\text{NADH}+\text{H}^+$ pro redukci oxaloacetátu na malát. Vzniklý jablečnan se ukládá ve vakuolách buněk (až do koncentrace $0,1\text{mol.l}^{-1}$), v nichž vzniká velmi kyselá reakce (pH dosahuje hodnoty 3,5). Pravá část obrázku ukazuje pochody probíhající ve dne. Malát se dekarboxyluje na pyruvát, CO_2 vstupuje do Calvinova cyklu, pyruvát slouží ke tvorbě škrobu cestou glukoneogeneze.

Střídání pochodů popsaných v **Obr. 5.3-5** v jedné buňce je možné jen, pokud jsou aktivity enzymů, katalyzujících protichůdné reakce nějak regulovány, jinak by docházelo k planým kruhovým reakcím. Pro PEP karboxylasu bylo dokázáno, že se mění fosforylací z inaktivní formy, která je v buňkách ve dne, na formu aktivní, pracující

v noci. Mechanismus regulace dekarboxylačních enzymů není dosud objasněn. Různé rostliny ze skupiny CAM používají pro dekarboxylaci různé cesty, buď NADP vyžadující jablečný enzym nebo PEP karboxykinasu.

Mechanismus CAM umožňuje rostlinám především výrazné úspory ve výdeji vody. Tzv. transpirační kvocient, tj. váhové množství vody spotřebované na jednotku váhového přírůstku sušiny, je u CAM rostlin 50 až 100, tedy 5 krát nižší než u C4 rostlin a 10 krát nižší než u C3 rostlin. Ačkoli schopnost provozovat mechanismus CAM je dána genetickou výbavou, u některých rostlin se potřebné enzymy indukují jen v podmínkách nedostatečného zásobení vodou. Je-li vláhy dostatek, provozují normální C3 fotosyntézu. Jako příklad lze uvést kosmatec *Mesembryanthemum crystallinum*.