

Začnu schématem, ke kterému se ještě několikrát vrátíme, protože znázorňuje významnou vlastnost fotosyntetického aparátu, zde představeného ve formě chloroplastů. Je to rozdělení pochodů (♣2)

(1) na pochody, které probíhají v membránách a při nichž dochází k přeměně energie od záření až na energii chemickou reprezentovanou $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP.

(2) na pochody biochemických přeměn, které probíhají ve stromatu a při nichž se chemická energie $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP použije k asimilaci oxidu uhličitého do organických sloučenin.

Je důležité si uvědomit, co se tu vlastně děje. Na počátku se odehraje zcela výjimečná přeměna energie, na níž závisí veškerý život biosféry. (♣3) Vysoká účinnost primárních reakcí této přeměny a stabilizace jejích primárních produktů je dána strukturním a termodynamickým uspořádáním tohoto ústrojí. Jen tím je dáno že něco tak prchavého jako je energie fotonu, který se místem svého zachycení řítí nejvyšší rychlostí kterou náš vesmír zná (300 nm za fs) (♣4) může být tak účinně zachyceno a přeměněno strukturami na nichž se nezdrží více než několik setin femtosekundy. Když sledujeme návaznosti jednotlivých dílčích reakcí fotosyntézy sledujeme vlastně, jak se výsledek této nepředstavitelně rychlé přeměny energie postupně vtěluje do produktů, které si stále déle zachovávají svou povahu – a tím i na delší dobu skladují energii v nich uloženou. Zachycení fotonu je otázkou femtosekund. (♣5) Reakční centra rozdělí náboje a vytvoří velmi nestálý, ale energií bohatý základ. Ten se stabilizuje již pochody v reakčním centru (♣6,7). Elektron z excitovaného chlorofylu se na první akceptor (Q_A) přesune v pikosekundách, na druhý (Q_B) v mikrosekundách a na plastochinon v membránovém poolu mu to trvá milisekundy. S prodlužujícím se časem klesá také potenciálový rozdíl mezi rozdělenými náboji (♣8) Elektronový transport v membráně již pracuje ve mnohem delších časových intervalech (♣9) a jeho spřažení s transportem protonů přes membránu (♣ 10) zajistí stabilnější formu energie uložené v rozdílu koncentrace protonů. Elektronový transport

končí $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a elektro-chemicko-osmotický potenciál protonů končí jako ATP. Tyto dvě složky difundují plasmou stromatu k enzymům (♣ 11, 12) a dalším stupněm stabilizace energie dodané slunečními paprsky je sladěné využití $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP při syntéze organických sloučenin.

K tomu dochází velmi složitým cyklem reakcí (♣13), kterým oxid uhličitý vstupuje do organické vazby a redukuje se. Je to reduktivní pentosový cyklus (PRC, pentose reducing cycle), který se také nazývá fotosyntetický cyklus redukce oxidu uhličitého (PCRC, photosynthetic carbon reduction cycle), nebo prostě Calvinův cyklus (CBBC, Calvin Benson Bassham cycle). (♣14) Melvin Calvin se spolupracovníky A.A. Bensonem a J.A. Basshamem v Berkeley (California, USA) v padesátých letech s použitím isotopu uhlíku značeného $^{14}\text{CO}_2$ vystopovali sled těchto reakcí (cestu oxidu uhličitého) ve fotosyntéze. Nobelova cena za tuto práci byla udělena M. Calvinovi v r. 1962.

Jakkoli každá Nobelovka má v sobě osten pochyb, tato byla jistě v principu naprosto oprávněná, protože rozluštění hádanky, které tito autoři přinesli, bylo právě tak nečekané a převratné, jako na jiném poli bioenergetiky Mitchellova chemiosmotická teorie. Jak CO_2 vstupuje do organické vazby při fotosyntéze se hledalo již velmi dlouho a moc se o tom přemýšlelo. Všechny úvahy se však nesly takovým zcela logickým směrem. Z metabolismu bylo známo velmi mnoho reversibilních karboxylačních reakcí, jejichž rovnováha v katabolických pochodech je posunuta silně k dekarboxylaci. Jsou to např. reakce v hlavním katabolickém enzymatickém cyklu kyseliny citronové (Krebsově cyklu) (♣15). A tak se mnozí mořili otázkou jak by bylo možno tuto rovnováhu změnit ve prospěch karboxylace. Že to nebylo tak zcela pochybené ukazuje skutečnost (♣16, 17), že některé fotosyntetické bakterie skutečně pro asimilaci oxidu uhličitého používají obráceného Krebsova cyklu, který v obvyklém směru uskutečňuje dekarboxylace a dehydrogenace uhlíkatých sloučenin při jejich zdýchávání. Co však prokázala Calvinova laboratoř byl zcela nový do té doby neznámý karboxylační pochod.

Ústřední reakcí cyklu je (♣18) karboxylace ribulosa-(1,5)-bisfosfátu (RuBP), kterou vznikají dvě molekuly fosfoglycerátu (PGA). Karboxylace probíhá v mnoha krocích: (♣19) RuBP se naváže fosfátovými skupinami na bazické aminokyseliny enzymu (lysin) a současně jeho ketokyslík na C2 a kyslík hydroxylu na C3 váží koordinačními vazbami hořčíkový ion. Výměnou vodíku z C3 na C2 (♣20) pomocí karbamátové skupiny na lysinovém zbytku přejde RuBP na enolovou formu. Negativně nabitý druhý atom uhlíku endiolové molekuly se sváže s pozitivním atomem C v CO₂ (♣21) a vodík hydroxylu na C3 se přenesse na aminokyselinový zbytek molekuly enzymu his294. Tak vznikne 2-karboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát. Addicí vody na C3 vzniknou na tomto uhlíku dva hydroxyly (♣22). To je velmi nestabilní konfigurace, vodík jednoho hydroxylu přejde na zbytek his327 enzymové molekuly a produkt se rozpadne na dvě molekuly fosfoglycerové kyseliny (PGA) (♣23).

Celý sled reakcí (♣24) je značen jako jedna karboxylační reakce (♣25) ve schématu Calvinova cyklu (♣26). Od kyseliny k cukru vedou další reakce tohoto cyklu (♣27), což je nejprve další fosforylace fosfoglycerové kyseliny na kyselinu difosfoglycerovou a pak redukce této sloučeniny (za současnou defosforylace) na fosfoglyceraldehyd, což je první cukr, triosa. Ze dvou molekul fosfotrios (♣28) vzniká pak první fosfohexosa, tj. difosfofruktosa (♣29). Všechny další reakce Calvinova cyklu jsou jen různé cesty k regeneraci substrátu pro vlastní karboxylační reakci, která končí fosforylací ribulosofosfátu na ribulosobisfosfát (♣30, 31). Můžeme tedy v cyklu rozeznávat tři typy reakcí (♣32): ty které vedou ke karboxylaci ribulosobisfosfátu, k redukci fosfoglycerové kyseliny a k regeneraci substrátu. V našem schématu Calvinova cyklu jsou první dva typy reakcí zvýrazněny červeně, regenerační reakce zůstávají na bílém pozadí (♣33). Smyslem složité soustavy regeneračních reakcí je vyřešit úlohu jak z trios, které vzniknou z hlavních reakcí uspokojit odtok asimilovaného uhlíku ve formě trios nebo hexos a regenerovat pentosu (♣34).

Na první pohled chápete, že vystopovat, jak takováto reakce probíhá nebylo snadné. Že se to podařilo bylo do značné míry podmíněno tím, že Calvin a spolupracovníci mohli použít radioaktivní značení sloučenin pomocí $^{14}\text{CO}_2$, které umožnily reaktory vybudované v USA za druhé světové války pro výrobu atomových bomb. Pokusy o popis cesty oxidu uhličitého ve fotosyntéze se uskutečnily již dvakrát těsně předtím, nežli vystartovala Calvinova laboratoř. Nejprve byl však k dispozici pouze izotop ^{11}C s velice nízkým poločasem, který pokusy velmi ztěžoval. Druhou okolností, která pomohla Calvinovi bylo, že právě v těch poválečných letech se k dokonalosti vypracovala metoda papírové chromatografie, která umožňovala dělit rychle a spolehlivě produkty asimilačních reakcí. Calvin se spolupracovníky použili kultury řasy *Chlorella* v aparatuře (♣35), 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 (♣36) objevovalo velké množství značených sloučenin, mezi nimiž byly organické kyseliny, aminokyseliny, ale hlavně fosforylované sacharidy. Se zkracováním doby ozáření (♣ 37 ♣38) se počet sloučenin zmenšoval, až při expozici 2s převládl fosfoglycerát. Ten byl soustavnými pokusy bezpečně určen jako první produkt fixace CO_2 . A prokázalo se dále, že k této fixaci dochází navázáním CO_2 na ribulobisfosfát.

Jako příklad pokusů, které vedly k tomuto závěru uvádím: Fotosyntetizující kultuře řasy *Chlorella* byl v čase 0 přidán $^{14}\text{CO}_2$. Když značení poolů ribulobisfosfátu (RuBP, plné kroužky) a glycerinaldehydfosfátu (GAP, prázdné kroužky) dosáhlo stálé hodnoty, bylo zhasnuto světlo. (♣39) Koncentrace RuBP prudce klesne, kdežto GAP přechodně stoupne. Je to proto, že připravená zásoba ribulobisfosfátu se spotřebuje na karboxylační reakci a vytvoří se odpovídající množství fosfoglycerové kyseliny, ale pro její rychlou fosforylaci a redukci chybí už $\text{NADPH} + \text{H}^+$. V druhém pokusu byla kultuře fotosyntetizující v ustáleném stavu náhle snížena koncentrace CO_2 . (♣40) Výsledek je právě opačný: RuBP, pro jehož vznik fos-

forylací je dostatek ATP, ale který se nyní pomaleji karboxyluje se přechodně nahromadí, kdežto průtočná koncentrace PGA se sníží.

Z další úmorné práce pak vyvstalo schema Calvinova cyklu (♣41) , jehož jsou reakce, které jsme si ukázali součástí. Spočítáme-li jaké množství produktů činnosti fotosyntetické membrány se spotřebuje na jednu molekulu asimilovaného CO₂ jsou to 2 NADPH+H⁺ a tři ATP jak také názorně vyplývá ze schématu.

Základní karboxylační reakci Calvinova cyklu katalyzuje enzym ribulosobisfosfátkarboxylasa-oxygenasa, velmi často nazývána jen zkratkou RUBISCO (RBC, Rbc). Naprostá většina CO₂, který vstupuje do organických sloučenin, nejen ve fotosyntéze, ale také u chemolithotrofních mikroorganismů, prochází tímto enzymem. Je to jeden z nejstarších enzymů a enzym, jehož je na Zemi výrazně největší množství. Je však současně jedním z nejpomalejších enzymů a jeho aktivita je snižována ne zcela přísnou substrátovou specifitou, takže kyslík soutěží s CO₂ o místo v reakčním centru enzymu. Tato kompetice může snížit účinnost fixace CO₂ tímto enzymem až o 50%.

Schema ukazuje strukturu, která je u všech organismů oxygenní fotosyntézy shodná. 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 s katalytickým centrem, označovanou B. V této části šroubovice α a listy β tvoří tzv. α - β -tunely. Aktivní centrum je blízko ústí tunelu; bodové mutace v blízkosti aktivního centra silně snižují aktivitu.

Vždy dvě velké podjednotky k sobě přiléhají tak, že ústí tunelu je těsně u styčné plochy. Katalytická jednotka je tedy vlastně teprve dimer velkých podjednotek (♣43). Malé podjednotky přisedají k N-terminálním částem velkých podjednotek (♣44A) a čtyři takovéto dimery s přisedlými malými podjednotkami tvoří celý enzymový komplex (♣44B pohled „se

strany“, tj. ve směru osy dvoučetné souměrnosti; 45 pohled „shora“ ve směru osy čtyřčetné souměrnosti).

Malé podjednotky pravděpodobně jen vytvářejí kvarterní strukturu enzymu, ale neobsahují katalytická místa; sledy jejich aminokyselin jsou proměnlivé. Také sdružení osmi podjednotek v komplexu není podmínkou katalytické aktivity. Rubisco některých fotosyntetických bakterií má menší počet podjednotek, tak např. u *Rhodospirillum rubrum* se skládá pouze ze 2 velkých podjednotek. Na obr. (♣46B) je tento komplex, který se označuje jako Rubisco typ II (forma II), srovnán s jedním dimerem nejrozšířenější formy I (typu I) Rubisco (♣46A), která sdružuje čtyři tyto dimery s příslušnými malými podjednotkami.

(♣47) ukazuje blíže strukturu N-terminální části velké podjednotky, (♣48) strukturu C terminální části (N-terminální část je zde vypuštěna) s pohledem do tunelu, který je z jedné strany uzavřen jednou α -šroubovicí (♣49) a na druhé straně je katalytické centrum s hořčíkovým atomem. Pohled s boku ukazuje (♣50)

Poloha katalytických center v dimeru velkých podjednotek je ještě jednou ukázána v (♣51) a (♣52) ukazuje podrobněji strukturu aktivního centra s hořčíkovým atomem a jeho koordinačními ligandy z nichž jedním je karbamylovaný lysin 201 a tři vazby jdou na 2-karboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát. Karbamylace lysinu (♣53) je nutným krokem, který aktivuje enzym. To je situace z níž jsme nahoře začali sled karboxylačních reakcí (♣54) . Kdo si chce tento sled reakcí zopakovat na molekulových modelech najde ho na adrese (♣55)

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/lehre/bza/1rxo/e1rxom.htm>

Tamtéž si lze podrobněji prohlédnout strukturu podjednotek Rubisco.