

Hned na začátku jsme se zmínili o tom, že ribulosobisfosfátkarboxylasa má také aktivitu oxygenasovou. Na týž uhlík, na který se váže CO_2 se také může navázat O_2 (♣2) za vzniku PGA a fosfoglykolátu.

Oxygenační mechanismus není dosud dostatečně objasněn. Kvantoví chemici tvrdí, že si molekuly O_2 a CO_2 jsou v jistém smyslu velmi podobné a že není divu, že je RUBISCO nerozeznává. Dosud je však nejasné, jak se kyslík aktivuje. Neexistuje totiž jiný oxygenační enzym, který by neměl jako aktivátor Fe-hem, nebo jinou obdobnou skupinu.

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 (♣3). 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 zcela potlačit. Jak uvidíme dále, přírodní vývoj od fotosyntetických bakterií k vyšším rostlinám, však přece dosáhl znatelné změny poměru karboxylační a oxygenační rychlosti. Avšak tuto mez se nepodařilo překročit ani v laboratorních pokusech a nebyla dosud nalezena cílená mutace, která by změnila poměr oxygenasové a karboxylasové aktivity. To je pochopitelné, když se to přírodnímu vývoji nepodařilo za miliardy let.

Oxygenační aktivita Rubisco byla prokázána poměrně pozdě, teprve začátkem sedmdesátých let, když se pátralo po příčinách fotorespirace. Fotorespirace je také jeden z neprávě šťastných termínů, resp. je to termín, který se udržuje z historických důvodů. Poprvé se jasné důkazy o vylučování CO_2 v průběhu fotosyntézy získaly, když se koncem 60tých let s pomocí ^{14}C zkoumalo jaká je rychlost vylučování CO_2 během fotosyntézy. Bylo to spojeno s několika překvapeními pro něž tehdy nebylo hned vysvětlení. Především, že je to rychlost značná a závislá na ozáření, často převyšující 25% rychlosti současného pohlcování CO_2 fotosyntézou. Dále, že izotopové

složení vylučovaného CO_2 je velmi blízké pohlcovanému CO_2 , což naznačuje, že se zdýchávají sloučeniny blízké prvním vazebným reakcím, tedy reakcím Calvinova cyklu. Dnes víme, že nejde o respiraci, nýbrž o cyklus reakcí, které zmírňují důsledky oxygenasové aktivity Rubiscoa při nichž se také vyvíjí oxid uhličitý.

Jde o to, že fosfoglykolát, který vzniká oxygenasovou činností Rubisco nemůže najít žádné uplatnění v soustavě reakcí Calvinova cyklu. Některé fotosyntetické mikroorganismy jej skutečně vylučují do prostředí, čímž ztrácejí dva již dříve asimilované uhlíky. Fotosyntetické mikroorganismy se tomu nijak nápadně nebrání, neboť většina jich má účinné prostředky na nepřímé potlačení oxygenasové aktivity o nichž budeme mluvit za chvíli. Z vyšších rostlin si takovouto obranu vybudovaly jen některé, a to ještě poměrně pozdě) to jsou C_4 rostliny, o nichž se dozvíte v druhé části přednášky. Vyšší rostliny však kromě často velkých ztrát, které oxygenasová aktivita způsobuje, nemají také kam odkládat fosfoglykolát, a musely proto nějaký způsob jeho odstranění vytvořit. Tím je právě fotorespirace.

Tento název označuje cyklus reakcí, které ze dvou fosfoglykolátů udělají jeden fosfoglycerát, který se vrátí do Calvinova cyklu a čtvrtý uhlík vyloučí jako CO_2 . Tak se $\frac{3}{4}$ uhlíků vyřazených oxygenasovou reakcí zachrání pro další použití a to za cenu jedné molekuly ATP. To určitě stojí za to, protože kdyby těchto reakcí nebylo pak těch svrchu zmíněných 25% fotorespirací uvolňovaného oxidu uhličitého, by znamenalo na tři asimilované uhlíky čtyři ztracené jako fosfoglykolát a tedy jen ztrátovou reakci. Protože 25% je ve velmi mnoha situacích obvyklá hodnota, nemohla by ve všech těchto případech fotosyntéza probíhat s pozitivním výtěžkem. Vedle toho jak je fotorespirace užitečná je také velmi zajímavá s hlediska spolupráce reakcí, které probíhají v různých organelách (♣4).

(♣5) Prvým krokem je, že se fosfoglykolát v chloroplastu přemění na glykolát, který přejde do (♣6) peroxisomu. Tam ho oxidasa glykolátu oxiduje kyslíkem na glyoxylát za vzniku H_2O_2 . Glutamát-glyoxylát aminotransferasa přemění glyoxy-

lát na glycin. Glutamát se z ketoglutarátu regeneruje serin-ketoglutarát aminotransferasou, odkud přichází serin uvidíme za chvíli. (H_2O_2 se katalasou rozkládá na vodu a O_2). Glycin přejde do mitochondrie (♣7). Z každých dvou molekul glycinu, které vstoupí do mitochondrie vznikne po jedné molekule serinu, CO_2 a NH_3 a jeden NAD^+ se redukuje na $\text{NADH} + \text{H}^+$. Reakce katalyzují dekarboxylasa glycinu a hydroxymethyltransferasa serinu. Serin přechází znovu do peroxisomu (♣8), kde ho serin-glyoxylát aminotransferasa deaminuje na hydroxypyruvat, který hydroxypyruvatreduktasa redukuje na glycerát. Glycerát přejde opět do chloroplastu (♣9) s použitím téhož přenašeče, který exportuje glykolát z chloroplastu do peroxisomu. V chloroplastu je glycerát fosforylován a fosfoglycerát se začleňuje do reakcí Calvinova cyklu. Celý sled reakcí si lze zopakovat také podle schémat (♣10) a (♣11), která obě ukazují, že na aminaci dvou molekul glyoxylátu na dva glyciny, které se dále v mitochondrii zpracovávají, pracují souběžně serin-glyoxylát aminotransferasa a glutamat-glyoxylát aminotransferasa a glutamát se vlastně regeneruje z ketoglutarátu aminací v chloroplastu, k níž se používá amoniak uvolněný z glycinu v mitochondrii. Pro tuto reasimilaci amoniaku v chloroplastu podle rovnice

$\alpha\text{-ketoglutarát} + \text{NH}_3 + \text{ATP} + 2\text{e}^- = \text{glutamát} + \text{ADP} + \text{P}_i$
slouží glutamin synthetasa (GS) a glutamát synthasa (GOGAT) a potřebné elektrony a ATP se získávají z fotosyntetické aktivity chloroplastu.

Samozřejmě, že pohyb molekul v těchto reakcích se neděje po nějakých vytýčených drahách, nýbrž náhodně prostřednictvím přenašečů a difuzí podle koncentračních spádů. V buňce jsou však pro účinnou výměnu metabolitů mezi zmíněnými organelami dobré podmínky, protože, jak ukazují elektronmikroskopické snímky (♣12), tyto organely jsou v těsném kontaktu.

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 (♣13), je už poměrná rychlost oxygenace, označovaná α , rovna téměř 0,4.

Pro poměr karboxylasové a oxygenasové aktivity a poměr fotorespirace k fotosyntéze se používají tyto rovnice a veličiny:

(♣14) 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 (♣15) pro karboxylaci (veličiny s indexem c) i pro oxygenaci (veličiny s indexem o), které katalyzuje Rubisco současně:

$$v_c = V_c \times [CO_2] / K_c$$

$$v_o = V_o \times [O_2] / K_o$$

a z těchto rovnic získáme pro poměr rychlostí 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 $(V_c/K_c) / (V_o/K_o)$.

(♣16) 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). Graficky je část této závislosti znázorněna na (♣17).

Faktor specifity lze také použít k (přibližnému) výpočtu rychlosti fotorespirace při daných podmínkách fotosyntézy (♣18). Jeden takový učebnicový výpočet vychází z poměrně příznivých

koncentrací $[CO_2] = 8 \mu M$ a $[O_2] = 260 \mu M$ a z faktoru specifity 80.

Za takových podmínek je poměr rychlostí karboxylace a oxygenace

$$v_c / v_o = 80 \times 8 / 260 = 2,46 \text{ čili přibližně } 2,5 : 1.$$

Poněvadž rychlost tvorby CO_2 fotorespirací je 0,5 rychlosti oxygenace je poměr spotřeby CO_2 fotosyntézou a vzniku CO_2 oxygenací $2,5 : 0,5$, tj. tvorba CO_2 fotorespirací je 20 % jeho spotřeby při fotosyntéze.

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 $25^\circ C$ faktor specifity hodnotu 80, je tato hodnota při $35^\circ C$ 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 $35^\circ C$ změnil o 10 %.

Fotorespirace pouze zmírňuje neblahé důsledky oxygenační aktivity Rubisco. Mnohem vhodnější by bylo ovšem tuto aktivitu přímo potlačit.

Uvedli jsme, že vývoj udělal co bylo možné pokud jde o zlepšení faktoru specifity určujícího poměr karboxylační a oxygenační aktivity. Hlavní překážkou však je velmi nevýhodný poměr koncentrací, resp. parciálních tlaků CO_2 a O_2 v prostředí. Při nezměněném faktoru specifity lze tedy příznivějšího poměru karboxylační a oxygenační reakce dosáhnout také změnou koncentrací nebo parciálních tlaků uvedených plynů, konkrétně zvýšením velmi nízké koncentrace CO_2 v bezprostředním okolí Rubisco. K tomu jsou vhodné různé mechanismy hromadění oxid uhličitý čili Carbon(dioxide) Concentrating Mechanisms (CCM). Těm bude věnován zbytek tohoto oddílu.

Pokud vývoj počátků života probíhal podle scénáře, kterému mnozí z nás věří (♣20), pak to byly právě sinice (cyanobakterie), které se jako první musely vyrovnat s osudovým nedostatkem hlavního karboxylačního enzymu fotosyntézy. Ten se vyvinul velmi dávno před nástupem oxygenní fotosyntézy, který je spojen se sinicemi, a při jeho konstrukci se s kyslíkem nepočítalo.

Sinice skutečně mají velmi účinné mechanismy koncentrace CO₂ v okolí Rubisco, které se již velmi dlouho zkoumají a dospělo se v tomto směru k velmi zajímavým výsledkům. Nejpodstatnějším z nich je zjištění pravé podstaty karboxysomů (♣21) a prvé vhledy do mechanismu jejich funkce. Karboxysomy jsou velmi dávno známé buněčné inkluse u sinic s pravidelnými tvary připomínajícími krystaly (♣22), které byly dlouho považovány za tělíska sestávající z bílkovin nejasné funkce, nejčastější domněnky byly, že jsou to rezervní bílkoviny. U některých sinic zauímají centrální pozici (♣23) u jiných jsou hojně vmezeřeny mezi thylakoidy (♣24). Sestávají z velmi pravidelně, téměř krystalicky uspořádaných komplexů Rubisco, kterým k pravidelné struktuře pomáhají ještě další bílkoviny. Celý „krystal“ je uzavřen (♣25) v bílkovinné obálce o níž bude za chvíli řeč.

Jak karboxysomy fungují? Ve spolupráci s přenašeči, které na úkor energie poskytované fotosyntézou přenášejí do buňky proti koncentračnímu gradientu CO₂, ale hlavně bikarbonát, jehož koncentraci mohou v buňce zvýšit proti okolnímu prostředí o dva až tři řády. Bikarbonát difunduje do karboxysomu přes zmíněnou již obálku, která má zjevně velmi pozoruhodné vlastnosti, kterými vstup bikarbonátových iontů do karboxysomu usnadňuje. Jednou z bílkovin, které jsou v karboxysomu vedle Rubisco je anhydráza kyseliny uhličitě (carbonic anhydrase, CA) a ta uvolňuje z iontů bikarbonátu molekuly CO₂ s nimiž pracuje Rubisco. Pozoruhodnou vlastností obálky karboxysomu (♣26) je také, že minimalizuje únik CO₂ z vysoké koncentrace v karboxysomu do buňky neboť jeho difuzi klade velký odpor. Tento mechanismus koncentrující CO₂ v bezprostřední blízkosti aktivních center Ru-

bisco dovoluje sinicím provozovat účinnou fotosyntézu i ve velmi nevýhodných podmínkách, např. je-li pH prostředí vysoké a obsah plynného CO₂ velmi nízký. Zdánlivá Michaelis-Mentenovská konstanta pro fotosyntézu takových sinic může být až o několik řádů nižší, nežli skutečná konstanta enzymu Rubisco.

Pozoruhodné vlastnosti obálky karboxysomu (♣27) se právě nyní velmi intenzivně zkoumají. Je tvořena zvláštní bílkovinou, která patří do rodiny bílkovin vytvářejících obálky různých primitivních organel prokaryotických buněk. Hexamery této bílkoviny vytváří těsně semknutou dlaždicovitou vrstvu, v níž jsou póry s pozoruhodnými vlastnostmi. (♣28) Svým tvarem i kladným nábojem aminokyselinových zbytků na svém povrchu mohou usnadňovat difuzi bikarbonátových iontů do karboxysomu, ale soudí se, že některé mají specifickou funkci i pro import ribulosobisfosfátu a export fosfoglycerátu (♣26).