

## Složení buněčné stěny

### Primární stěna, sekundární stěna, střední lamela

Primární stěna a střední lamela vzniká během buněčného dělení. Střední lamela tvoří interface mezi primárními stěnami buněk. Při diferenciaci vytvářejí buňka tzv. sekundární stěnu, vytvářející komplexní strukturu. Obr. 2.3, 2.4 - S1-S3 - sekundární stěny

Buněčná stěna je tvořena komplexem polysacharidů, proteinů a aromatických látek, které vytvářejí strukturu podobnou železobetonu. Některé složky tvoří vlákna, jiné zase výplň mezi těmito vlákny. Chemické složení a uspořádání jednotlivých komponent se liší v závislosti na druhu rostliny a typu buňky.

Cukerná složka je tvořena aldosi a ketosi: nejdůležitějšími cukernými složkami buněčné stěny je D-glukosa a její epimery D-mannosa a D-galaktosa, které se mohou vyskytovat ve své oxidované formě, kys. D-glukuronové, D-galakturonové a D-mannuronové. D-xylosa, pentosa v pyranosní formě, vzniká dekarboxylací kys. D-glukuronové. Další pentosou vyskytující se převážně v rostlinné říši je L-arabinosa. Buněčné stěny rostlin obsahují dále deoxysacharidy, které vznikají redukcí na uhlíku č.6, a to L-rhamnosu (6-deoxy-L-mannosa) a L-fukosu (6-deoxy-L-galaktosa).

### Obrázek struktur 2.9

Tyto sacharidy se vyskytují v buněčné stěně v polymerní formě. Základní stavební jednotkou polysacharidové složky je celobiosa ( $\beta$ -D-glukosyl-(1-4)-D-glukosa), kde jsou dvě glukosové jednotky vázány  $\beta$ -glykosidovou vazbou přes uhlík č.4. Další alternativou je  $\beta$ -glykosidová vazba přes uhlík č.3. Tento disacharid se nazývá laminaribiosa (řasa Laminaria?). Monosacharidové jednotky mohou být vzájemně vázány prostřednictvím hydroxylových skupin v různých polohách, a to  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -glukosidovou vazbou, takže vzniká složitá rozvětvená síť polysacharidů.

### Obr. 2.10

#### Základní složky vláknitých polysacharidů

Celulosa je nejhojnějším vláknitým polysacharidem. Tvoří 15 - 30% hmotnosti primární buněčné stěny a ještě více je obsažena v sekundární buněčné stěně. Rigidnost struktury celulosového vlákna, na rozdíl od vlákna amylosy (kdy jsou glukosové jednotky vázány  $\alpha$ -1,4-glykosidovými vazbami) je přítomnost vodíkové vazby mezi vodíkovým atomem na uhlíku č.3 a kyslíkem pyranosního kruhu ((Obr.2.11) Celulosa existuje ve formě mikrofibril (B-jednoduchá mikrofibrila), kde jsou jednotlivé paralelní řetězce celulosy vázány vodíkovými vazbami. Mikrofibrily rostlin obsahují průměrně 36 celulosových vláken. Jednotlivé polysacharidové řetězce, dlouhé 2 - 3  $\mu$ m, obsahují několik tisíc jednotek a jsou oproti sobě vzájemně posunuty, takže celková délka mikrofibrily může dosahovat několik stovek mikrometrů.

Dalším, vzácnějším polysacharidem je kalosa., kde jsou jednotlivé molekuly glukosy vázány  $\beta$ -1,3-glykosidovou vazbou. Sekundární struktura kalosy vytváří dvojitou nebo trojitou nebo šroubovici. Kalosa vzniká v buňce rostlin ve specifických stádiích vývoje a je syntetizována při napadení rostliny patogenem.

Dalším strukturálním sacharidem rostlin, který je vyskytuje pouze u řas jsou tzv. xylany a mannany?

Matrixové polysacharidy.

Tyto glykany vytvářejí příčné vazby a vyplňují strukturu stěny mezi celulosovými mikrofibrilami, ke kterým se vážou vodíkovými vazbami. Jejich roli lze přirovnat k roli betonové složky v železobetonu. Jsou tvořeny rozvětvenými heteropolysacharidy. Díky své vyšší rozpustnosti v alkalickém prostředí byly dříve nazývány "hemicelulosa", protože byly mylně pokládány za prekurzory celulosy. Matrixové složky propojují vláknité polysacharidy a vytvářejí složitou síť. Hlavním typem těchto rozvětvených matrixových polysacharidů jsou xyloglukany (XG) a glukuronoarabinoxylany (GAX). Hlavní kostra těchto polysacharidů je tvořena D-glukosou vázanou  $\beta$ -1,4-glykosidovými vazbami. XG tvoří součást buněčných stěn všech dvouděložných rostlin a poloviny jednoděložných. Buněčná stěna ananasovitých rostlin a palem obsahuje zejména GAX. Lineární řetězce XG jsou v poloze č. 6 modifikovány  $\alpha$ -D-xylosou. Některé z těchto xylos mohou být navíc substituovány  $\alpha$ -L-arabinosou nebo  $\beta$ -D-galaktosou a  $\alpha$ -L-fukosou. Substituce základního lineárního řetězce XG se u jednotlivých rostlin může lišit. Většina dvouděložných a polovina jednoděložných obsahuje fukosa-galaktosové substituenty, avšak např. lilkovité? rostliny mohou obsahovat navíc L-arabinosu.

Obr. Typická struktura xyloglukanu 2.12

Struktura glukoarabinoxylanů je mnohem rozmanitější. Tento polysacharid je v aspoň v malém množství obsažen v buněčných stěnách všech krytosemenných rostlin. Poloha substituce a její složení kolísá. Jedná se zejména o L-arabinosu a kys. D-glukuronovou. U commelinoidních? rostlin, kde je GAX hlavním matrixovým polymerem, je substituentem L-arabinosu vázaná  $\alpha$ -1,3 vazbou. U dvouděložných rostlin je L-arabinosu vázaná  $\alpha$ -1,2 vazbou.

Obr. Typická struktura glukoarabinoxylanu 2.12 CD

Třetím nejhojnějším polysacharidem propojující fibrilární polysacharidy jsou 1,4-1,3-glukany. Tento polysacharid najdeme u obilnin a trav. Jejich kostra je tvořena z cellootriosy a cellotetraosy, které jsou vzájemně propojeny  $\beta$ -1,3-glykosidovou vazbou. Dlouhé řetězce tohoto polysacharidu jsou vzájemně propojeny oligosacharidem složeným z  $\beta$ -1,4 glukosy.

Obr. 2.14

Všechny krytosemenné rostliny obsahují v malém množství další polysacharidy propojující mikrofibrily. Jsou to lineární polysacharidy, obsahující na rozdíl od celulosy  $\beta$ -1,4-D-mannosu (mannany), která může být substituována v poloze 6  $\alpha$ -D-galaktosou (galaktomannany), anebo  $\beta$ -1,4-glukosu s D-mannosou (glukomannany).

Obr. 2.15

Pektiny

Pektiny jsou směs rozvětvených heteropolysacharidů obsahujících zejména kys. D-galakturonovou, která bývá velmi často esterifikována methanolem. Z buněčných stěn se snadno extrahují  $\text{Ca}^{2+}$  chelátory, jako je oxalát amonný, EDTA nebo EGTA. Díky

přítomnosti náboje hrají v buněčné stěně roli nejen strukturní, ale ovlivňují porozitu stěny, díky zápornému náboji ovlivňují iontovou rovnováhu, regulují adhezi buněk ke střední lamelle. Podílejí se na rozpoznání přítomnosti patogenů či symbiotických organismů. Existují dva základní typy pektinů. první z nich je homopolysacharid - homogalakturonan, druhý typ je heteropolysacharid: rhamnogalakturonan.

Obr. Struktura homogalakturoinu a rhamnogalakturonanu.

Základní kostra homogalakturonanu je polymer složený z  $\alpha$ -1,4-D-galakturonové kyseliny (až 200 jednotek). Tato může být substituována xylosou. Základní kostra rhamnogalakturonanu I je složena z opakujících se disacharidových jednotek  $\alpha$ -1,2-L-rhamnosa- $\alpha$ -1,4 D-kys. galakturonová.

Existují dva základní typy modifikovaného homogalakturonanu. První z nich je základní kostra lehce modifikovaná xylosou v poloze 3 (xylogalakturonan). Druhý typ homogalakturonanu je vysoce rozvětvený polysacharid, kdy je základní kostra substituovaná širokým spektrem méně běžných modifikovaných monosacharidů, jako je apiosa, kys. acerová, 2-O-methylfukosa a dalších. Název tohoto homogalakturonanu je rhamnogalakturonan II, což je poněkud matoucí s ohledem na název rhamnogalakturonanu I. Navzdory nízkému obsahu u kvetoucích rostlin napovídá tato vysoce konzervovaná struktura o velmi důležité, doposud neobjasněné funkci těchto pektinů v buněčné stěně.

Struktura heteropolysacharidu rhamnogalakturonanu I je rovněž složitá. Základní heteropolysacharidová kostra může být substituována většinou neutrálními sacharidy, jako jsou arabinany, galaktany a arabinogalaktany, které jsou připojeny ke rhamnose v poloze 4. Zhruba polovina rhamnosových zbytků je takto modifikována bočními řetězci, tento poměr však značně kolísá v závislosti na typu buňky a jejích fyziologickém stavu.

Pektiny hrají významnou roli v potravinářském průmyslu. Při extrakci z rostlinných plodů vytvářejí díky svému zápornému náboji ve vodě koloidní roztoky. Jejich přeměna na formu gelu se docílí okyselením (odstranění záporného náboje) a sníženou hydratací odstraněním solvatačního obalu přidávkem cukru. Z toho důvodu se při vaření džemů přidává kys. citronová a cukr (konzervační účinky cukru navíc). Bohatá methylace kys. galakturonové je příčinou přítomnosti vyššího obsahu methanolu při výrobě ovocných vín. Polyuronáty vyráběné z řas jsou široce používány v potravinářském průmyslu jako stabilní gely (algináty a ...) při výrobě jogurů a krémů.

Algináty jsou polymery složené z kys. D-mannuronové ( $\beta$ -1,4) + L-guluronové  $\alpha$ -1,4. ...

Strukturní proteiny buněčné stěny

I když je buněčná stěna tvořena převážně polysacharidy, obsahuje malé množství strukturálních proteinů. Jsou to glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin (HRGP - hydroxyprolin-rich-glykoproteins), proteiny bohaté na prolin - (PRP: prolin-rich-proteins) a proteiny bohaté na glycin (GRP: glycin-rich-proteins). Vysoký obsah těchto méně obvyklých aminokyselin napovídá o jejich zvláštní sekundární a terciární struktuře. Jejich obsah v buňce závisí na druhu rostliny a typu buňky. Protože se vyskytují mimo buňky, jsou syntetizovány na ribosomech na hrubém

endoplasmatickém retikulu s příslušnou signální sekvencí, která je předurčuje pro sekreci mimo buňku.

Nejlépe prostudovaným HRGP je extensin, složený z opakujících se sekvencí Ser-(Hyp)<sub>4</sub> a Tyr-Lys-Tyr. Díky opakující se hydroxyprolinové sekvenci má tento protein tyčinkovitou molekulu typu "polyprolin II". Extensin může být v různé míře glykosylován. Na obrázku je uvedena struktura extensinu z rajčete.

Druhý typ proteinu, PRP, má pravděpodobně obdobnou sekundární strukturu jako HRGP. Na obrázku je uvedena struktura PRP ze sóji.

Na druhé straně GRP obsahuje až 70% glycinu a má pravděpodobně strukturu  $\beta$ -skládaného listu.

#### Obr. 2.18

Tyto proteiny buněčné stěny jsou kovalentně vázány do buněčné stěny a je tudíž obtížné je odtud extrahovat.

Posledním typem proteinu buněčné stěny je proteoglykan - arabinogalaktanový protein (AGP), obsahující až 90% sacharidů. Vyskytuje se nejen v buněčné stěně, ale také v plasmatické membráně a Golgiho aparátu, což je pravděpodobně místo glykosidace, která zahrnuje připojení bohatě rozvětvené sítě galaktanů a připojení arabinosy. AGP je často vázán ve stěně přes tzv. GPI kotvu (glykosylfosfatidylinositolovou kotvu) k ceramidové zbytku, ze které se může uvolnit prostřednictvím fosfolipasy? a sloužit jako signální molekula (viz...)

Obrázek: struktura HRGP, PRP, GRP, AGP 2.18, 2.20

#### Aromatické látky neligninového typu

Primární stěna commelinoidních řádů a dalších rostlin řádu? Chenopodiaceae (špenát, cukrová řepa) obsahuje velké množství derivátů kys. hydroxyskořicové, kys. ferulové a p-kumarové. Tyto látky jsou kovalentně vázány esterovou vazbou do polohy O-5 několika jednotek arabinosy v matrixovém glukuronoarabinoxylanu.

#### Struktura primární buněčné stěny

Buněčná stěna je tvořena ze dvou až tří strukturálně nezávislých komponent, které svou vzájemnou interakcí vytvářejí složitou síť. Základní struktura je tvořena mikrofibrilami celulosy, vzájemně propojenými rozvětvenými glykany. Tato síť je zanořena do druhé sítě matrixových pektinových polysacharidů.. Třetí nezávislá síť je tvořena strukturálními proteiny nebo fenylypropanoidy ligninového typu. Stěny buněk krytosemenných rostlin mají dva základní typy architektury.

#### Stěna typu I

Většina dvouděložných a nekomeloidní jednoděložné rostliny obsahují ve své stěně zhruba stejné množství celulosy a xyloglukanu (stěny typu I). Xyloglukany obklopují celulosové mikrofibrily a vzájemně je mezi sebou vážou. Tato síť je zanořena do matrix tvořené pektiny, zejména homogalakturonany (HGA). Tento pektin je přítomný ve vysoce methylované podobě a štěpení esterové vazby je katalyzované pektin methylesterasou. Vznikající záporné náboje pak vážou vápenaté ionty. Každý vápenatý iont váže dva protilehlé řetězce pektinu za vniku příčných vazeb. Tato

porézní struktura je doplněná řetězci rhamnogalakturonanu I. Některé z molekul rhamnogalakturoananu a homogalakturonanu jsou vázány esterovými vazbami k dalším polymerům buněčné stěny. Tyto vazby lze přerušit pouze enzymově. Některé typy buněčných stěn typu I obsahují větší množství proteinů, zejména bazických, které interagují s kyselými skupinami pektinové sítě.

Stěny typu II, které nacházíme u jednoděložných rostlin comelinoidních, obsahují celulosové mikrofibrily, avšak hlavním hemicelulosovým polysacharidem je převážně glukuronoarabinoxylan. Tento typ stěny obsahuje pouze malé množství pektinu. Záporné náboje ovlivňující porositu stěny jsou zajišťovány molekulami kys. D-glukuronové glukuronoarabinoxylanu. Ve srovnání s dvouděložnými rostlinami a zbytkem jednoděložných obsahuje tato stěna málo strukturních proteinů, avšak na druhé straně je schopna akumulovat větší množství fenylypropanoidních látek, zejména ve fázi končení růstu.

Obrázek: Stěna typu I a II obr. 2.23

Syntéza buněčné stěny a polysacharidů

Celulosová složka buněčné stěny je syntetizovaná na plasmatické membráně. Enzym katalyzující tuto reakci je celulosa synthasa, substrátem reakce je UDP-glukosa, kdy se celulosové zbytky postupně připojují na neredukující konec templátu.

Necelulosové polysacharidy jsou syntetizovány v Golgiho aparátu a hrubém endoplasmatickém retikulu. Golgiho aparát je místem pro syntézu, zpracování a cílené směřování glykoproteinů. Zde také probíhá cílená konverze UDP-glukosy na ostatní sacharidy. Enzymy, které tyto reakce katalyzují (epimerasy, dehydratasy) jsou zřejmě membránově vázané v komplexu ER-Golgiho aparátu. UDP-D-xyloza a UDP-L-arabinoza vznikají z UDP-D-glukuronátu. D-galaktosa vzniká z D-glukosy epimerací.

Syntézu necelulosových polysacharidů byla demonstrována in vitro za použití směsi vesíků plasmatické membrány, Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula. Za použití substrátu UDP-glukosa vzniká jako hlavní produkt  $\beta$ -1,3-glukan, což je kalosa. Předpokládá se, že kalosa je hlavní produkt polymerizace při poškození celulosa synthasy. Reakce je aktivována vápenatými ionty. Opakující se sekvence základního řetězce necelulosových polysacharidů jsou vytvářeny koordinovanými transglykosidačními reakcemi.

Celulosa a kalosa jsou syntetizovány na vnější straně plasmatické membrány. Tato reakce je katalyzována multimerními enzymy, které nacházíme přímo na rostoucím konci celulosových mikrofibril. Tyto mikrofibrily se tedy seskupují na vnějším povrchu buňky přímo. Ačkoli je této reakce známa již dlouho, pokusy o izolaci enzymu selhávají, protože aktivita enzymu při purifikaci velmi rychle mizí. Substrát reakce, UDP-glukosa, vzniká ze sacharosy a UDP enzymem sacharosa synthasou (obrácená reakce, než je syntéza sacharosy).

Růst buňky je spojen s extenzivními změnami hmotnosti a složení buněčné stěny. Během expanze nebo prodlužování buňky se musí architektura stěny měnit a inkorporovat nový materiál. Síla, která zajišťuje expanzi buňky je turgor řízený osmotickým potenciálem. Toto uvolňování buněčné stěny je řízeným procesem, kdy dochází k oddělování mikrofibril, a ukládání nově syntetizovaného polymeru. Mechanismus, kterým se tyto procesy zajišťují a koordinují jsou doposud spíše předmětem hypotéz. Vlivem osmotického potenciálu cytosolu a turgoru dochází k

postupnému oddělování mikrofibril a prodlužování délky glykanů vytvářejících příčné vazby.

Obr. 2.36

Mechanismus účinku auxinu (způsobujícího prodlužování buněk) na strukturu buněčné stěny je dlouhou dobu předmětem dohadů a hypotéz. Je prokázáno, že vazba auxinu na plasmatickou membránu způsobuje stimulaci aktivity H-ATPasy a tudíž i okyselování vnějšího povrchu, tj. buněčné stěny. Přepokládá se, že snížení pH má za následek aktivaci hydroláz obsažených ve stěně a tudíž uvolňování příčných vazeb mezi celulosovými mikrofibrilami. Proti této hypotéze působí fakt, že nebyly nalezeny hydrolázy, které by katalyzovaly hydrolytické reakce převážně při pH 5. V současnosti existují dva kandidáti z řady enzymů, které by mohly být zodpovědné za uvolňování struktury buněčné stěny. Prvním z nich je enzym provádějící transglykosylaci xyloglukanu (XyG), kdy se glukosidová vazba štěpí a připojuje se k jinému neredukujícímu konci xyloglukanového řetězce. Jedná se o enzym s poměrně složitým názvem xyloglukanendotransglykosidasa (XET). Druhý enzym, který se nazývá expansin (neplést s bílkovinou extensinem) katalyzuje prodlužování buněčné stěny, a to bez detegovatelných hydrolytických a transglykosidačních aktivit. Je to jediný enzym, u kterého byla prokázána aktivita in vitro. Katalyzuje pravděpodobně přerušování vodíkových vazeb mezi celulosou a glykany příčných vazeb. Expansiny se vyskytují ve všech rostlinných pletivech.

Syntéza sekundární buněčné stěny

Primární stěna je struktura, která se podílí na ireverzibilní expanzi buňky.

Diferenciace buňky je spojena s tvorbou sekundární stěny. Jakmile se růst buňky zastaví, její stěna se ustaví do konečné podoby vytvářením příčných vazeb.

Sekundární stěna je složena převážně z celulosy, může však obsahovat další necelulose polysacharidy, bílkoviny a aromatické látky (lignin). Její složení závisí na druhu rostliny, typu buňky a její vývojové etapě. Epidermální buňky obsahují značné množství suberinu a kutinu, které mají za úkol bránit ztrátám vody a představují bariéru proti průniku patogenů. Kutin je trojrozměrný polymer polyhydroxylovaných a epoxidovaných mastných kyselin C16, C18, vázaných vzájemně esterovými vazbami. Vzniká tak relativně rigidní hydrofobní síť. Některé patogeny vylučují kutinasy, které dokážou tento polymer hydrolyzovat. Tato struktura je pak pokryta kutikulárním vosky, které brání odpařování vody. Epidermální buňky kořene obsahují obdobný polymer zvaný suberin. Suberin obsahuje mastné kyseliny s řetězcem delším než je C18, mastné alkoholy, dikarboxylové kyseliny a fenolické látky (např. kys. kumarovou). Tato vrstva, na rozdíl od kutinu, má spíše hydrofobní charakter.

Struktura a funkce ligninu

Lignin je po celulose nejhojnější přírodní látkou. Trojrozměrný polymer lignin se vyskytuje takřka výlučně v sekundární buněčné stěně. Je to komplex aromatických látek zvaných fenylpropanoidy. Jedná se zejména o alkoholy odvozené od kys. p-hydroxyskořicové (p-kumaryl-, koniferyl- a sinapyl-alkohol). Tyto aromatické alkoholy vznikají, obdobně jako další fenolické látky, z aminokyseliny L-fenylalaninu deaminací katalyzovanou enzymem fenylalaninamoniaklyasou (PAL) za vzniku kys. skořicové a p-kumarové. Hydroxylace jsou prováděny převážně prostřednictvím cytochromu P450 a NADPH. Vznik methoxyskupiny je katalyzován enzymem O-

methyltransferasou, který využívá S-adenosylmethionin jako kofaktor. Redukce příslušné kyseliny přes aldehyd na alkohol probíhá přes acyl-KoA, zdrojem redukčních ekvivalentů je NADPH.

Obr. Syntéza monolignolů z L-fenylalaninu

24.49a, 24.49b

24.52

Krytosemenné rostliny obsahují lignin kde se vyskytuje převážně koniferylalkohol a sinapyl alkohol, zatímco nahosemenné rostliny převážně koniferylalkohol a malé množství kumarylalkoholu. Tvorba a mechanismus syntézy ligninu je dodnes předmětem spekulací. Jisté je, že se jedná a více méně spontánní proces probíhající radikálovou polymerací. Iniciační radikál vzniká pravděpodobně enzymovou reakcí. Nejpravděpodobnějšími enzymy jsou peroxidasa ( $H_2O_2$ ) nebo lakasa (enzym oxidující fenolické látky, substrátem je kyslík). Vzniklý radikál pak rozběhne polymerační reakci, za vzniku C-C vazeb mezi alifatickými anebo aromatickými uhlíky nebo vazeb C-O. Tento proces probíhá na rozdíl od iniciace neenzymově.

Obrázek: Schéma polymerace ligninu 24.58

Obr. Struktura ligninu - folie

Tento proces lignifikace lze demonstrovat in vitro. Vznikají tak polymery složením obdobné přírodnímu ligninu. Přírodní polymer ligninu se však od tohoto ligninu liší zastoupením jednotlivých typů vazeb a velikostí makromolekuly. To znamená, že v buňce existuje určitý regulační mechanismus, který předurčuje, které vazby mezi jednotkami jsou preferovány. Je možné že tato polymerace probíhá na proteinové matici. Před procesem lignifikace probíhají v buňce nevratné změny, které vedou k buněčné smrti a tvorbě vodivých pletiv a podpurných struktur. Na počátku biosyntézy jsou aromatické alkoholy transportovány z cytosolu do buněčné stěny. Biosyntéza ligninu začíná ve specifických místech, jako je střední lamela nebo roh buňky. Radioaktivní značení prokázalo, že jednotlivé monomery jsou ukládány řízeně v určitém poměru. Syntéza ligninu je spojena se sekrecí specifických proteinů (zejména prolich-rich proteiny) z Golgiho aparátu a jejich ukládáním v buněčné stěně. Je tedy možné, že ligninový polymer vzniká na základě bílkovinného templátu.

### Struktura a funkce plasmatické membrány

Plasmatická membrána tvoří aktivní funkční bariéru mezi buňkou a vnějším prostředím. Kontroluje transport látek ven a dovnitř buňky a prostřednictvím specifických receptorů přenáší signály z vnějšího prostředí, účastní se syntézy komponent buněčné stěny. Na rozdíl od živočišné buňky není každá z rostlinných buněk oddělena od okolí separátní plasmatickou membránou. Buňky mezi sebou komunikují prostřednictvím tzv. plasmodesmat, což jsou otvory v buněčné stěně (komunikace u živočišných buněk mezi sebou je zajištěna prostřednictvím proteinových kanálů zvaných "gap junction").

Fig. 1.12

Dalším podstatným rozdílem oproti živočišné buňce je přítomnost turgoru díky rozdílnému osmotickému potenciálu vnějšího prostředí a buňky. Živočišné buňky existují za isoosmotických podmínek vzhledem ke svému okolí.

Složení plasmatické membrány rostlinných buněk je velmi podobné jako u buněk živočišných, ovšem s několika rozdíly. Zatímco u živočišných buněk je hlavním sterolem cholesterol, u rostlinných buněk je to skupina sterolů s poněkud odlišným bočním řetězcem: stigmasterol, sitosterol a kampesterol (viz vzorce).

Fig. 1.4

Membrána rostlin obsahuje poněkud vyšší procento glykosylovaných a esterifikovaných sterolů. Zcela chybí sfingomyeliny, důležitá složka živočišných plasmatických membrán. Fosfolipidy rostlinných buněk obsahují kys. palmitovou, linolovou a linolenovou, zatímco u živočišných buněk kys. palmitovou, olejovou, stearovou a arachidonovou.

Plasmatická membrána obsahuje řadu proteinů. Jsou to jednak proteiny funkční (jako jsou enzymy celulosy synthasy a kalosa synthasy, membránové receptory, Další skupinou membránových bílkovin je AGP, vysoce glykosylovaná bílkovina typu proteoglykanu. Typické AGP jsou ukotveny do membrány pomocí tzv. GPI kotvy.

Obr. 1.10

Plasmatická membrána je hlavním místem kontrolujícím aktivní transport do rostlinné buňky. Hlavním motorem tohoto procesu je plasmatická H-ATPasa, která okyseluje vnější prostředí a vytváří transmembránový potenciál pozitivní vně. Elektrochemický potenciál (to je jeho elektrická a koncentrační složka) jsou pak využívány k sekundárnímu transportu dalších látek.

Obr. 3.1.

Membránový transport

Membránový transport u rostlin zahrnuje následující procesy

- Přítomnost pevné stěny umožňuje u rostlin generovat značný turgor. Tento turgor, zajišťovaný vysokým osmotickým potenciálem je zajištěn akumulací solí, zejména KCl.
- čerpání živin, jako je amoniak, nitráty, fosfáty a sírany, včetně stopových prvků
- distribuce metabolitů: sacharosa a aminokyseliny vytvářené v autotrofních částech rostliny jsou distribuovány floemem
- kompartmentalizace metabolitů zvyšuje metabolickou efektivnost. Například v mitochondriích na rozdíl od cytosolu je vysoká hladina ATP oproti ADP a NADH oproti NAD. Existuje specifický transportní systém provádějící export ATP a NAD z mitochondrií.
- přeměny energie probíhají v membráně mitochondrií a chloroplastů
- přenos signálu: od membrány do cytosolu a jádra buňky zprostředkovaný látkami typu druhého posla

Transportní systémy, které přenášejí ionty nebo nenabitě látky z jedné strany membrány na druhou na účet energie (hydrolýzy ATP) za vzniku elektrochemického potenciálu se nazývají pumpy. Transportní systémy, které propojují transport jedné látky po koncentračním spádu s transportem jiné látky proti koncentračnímu gradientu



se nazývají přenašeče (symport nebo antiport). Dalším typem membránového transportu jsou kanály, které svým otevřením zajišťují transport iontů po směru koncentračního gradientu.

### H<sup>+</sup>-ATPasa plasmatické membrány

Plasmatická H<sup>+</sup>-ATPasa se podstatně liší od multimerní ATP syntasy typu F mitochondrií a chloroplastů, a to jak po stránce evoluční, tak strukturní. Do skupiny těchto ATPas, typu P, patří další enzymy, jako je Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, atd. V případě plasmatické H<sup>+</sup>-ATPasy se jedná o monomer o mol. hmotnosti zhruba 100 kDa. Energie hydrolyzy ATP je využívána k transportu H<sup>+</sup> z jedné strany membrány na druhou.

Obr. 3.6,

Její role je následující:

- 1) Tento enzym generuje protonmotivní sílu využívanou dalšími mechanismy sekundárního transportu
- 2) Reguluje acidobazickou rovnováhu cytosolu, která se pohybuje v oblasti pH 7.3 - 7.5. pH optimum ATPasy se nachází v oblasti pH 6.6. Pokud poklesne pH cytosolu vlivem dalších metabolických procesů na 6.6, zvýšená aktivita enzymu zajistí efektivní čerpání H<sup>+</sup> do extracelulárního prostoru
- 3) Aktivita H<sup>+</sup>-ATPasy je regulována auxinem a elicitory vyvolávajícími obrannou reakci rostlin. Vazba auxinu na příslušný receptor má za následek aktivaci enzymu a acidifikaci apoplastu.

Reakční mechanismus:

H<sup>+</sup>-ATPasa pumpuje jeden iont H<sup>+</sup> při hydrolyze 1 molekuly ATP. Během této hydrolyzy je  $\gamma$ -fosfát pocházející z ATP kovalentně vázán na aspartátový zbytek enzymu vytvářející takto acyl-fosfát, makroergický intermediát. Hydrolyza této vazby poskytuje energii pro transport protonu z jedné strany membrána na druhou

Obr. 3.5

Toto je zásadní rozdíl oproti F-ATPase mitochondriálního a plastidového typu, kdy při syntéze ATP makroergický intermediát nevniká. Všechny ATPasy typu P jsou inhibovány vanádem (H<sub>2</sub>VO<sub>4</sub><sup>-</sup>), který blokuje vazbu fosfátu na enzym.

H<sup>+</sup>-ATPasa je u *Arabidopsis* kodována multigenní rodinou, kde bylo identifikováno nejméně 10 genů (AHA1 - 10), z nichž každý kóduje jeden isoenzym ATPasy. Bylo prokázáno, že exprese jednotlivých isoform je pletivově specifická. Tyto isoenzymy mohou mít rozdílné biochemické vlastnosti, jako je rozdílná velikost Michaelisovy konstanty, rozdílná citlivost k vanadátu, apod.

Na obrázku je ukázána struktura H<sup>+</sup>-ATPasy. Enzym obsahuje 10 transmembránových domén. Široká hydrofilní oblast mezi doménou 4 a 5 obsahuje vazebné místo pro ATP a aspartátový zbytek (D), který je fosforylován. Tato oblast je vysoce konzervována u mnoha protonových pump. Vazebné místo pro H<sup>+</sup> leží pravděpodobně mezi doménou 6 až 10. Karboxylový konec proteinu obsahuje autoinhibiční doménu, která se zásadním způsobem podílí na regulaci enzymu. Její odstranění, např. tryptickým štěpením nebo genetickou modifikací, značně zvyšuje aktivitu enzymu. Aktivita enzymu se dále zvyšuje přidávkem fusicoccinu, toxinu produkovaného houbou *Fusicoccum amygdali*. (Obr. 3.8) Tento toxin se váže na

specifický receptor mimo ATPasu, což je signální protein 14-3-3 typu.. Tyto proteiny jsou typické tím, že se jako dimery vážou na cílový protein o definované konsensus sekvenci, která zahrnuje fosforylaci serinového zbytku (liší se od fosforylace aspartátu v místě D!). Schéma regulace H<sup>+</sup>-ATPasy pomocí proteinů 14-3-3 a regulací C konce je ukázáno na obrázku.

Obr. 3.9.

Enzym je aktivován vazbou proteinů 14-3-3 typu, která je usnadňována jednak fosforylací serinu anebo fusiccocinem, který se váže jak na protein, tak na enzym.

#### H<sup>+</sup>-pumpy vakuoly

Membrána vakuoly, tzv. tonoplastu obsahuje další ATPasu, která katalyzuje identickou reakci jako H<sup>+</sup>-ATPasa plasmatická. Energie hydrolýzy ATP je využívána k transportu protonů do vakuoly. Tím se udržuje velmi nízké pH vakuoly, 5.5, oproti cytosolu. Tato H<sup>+</sup>ATPasa je V-typu, je podobnější F-ATPase mitochondriální, avšak pracuje zásadně ve směru hydrolýzy ATP. Podobný typ ATPasy najdeme pravděpodobně v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Stechiometrie přenosu je 2 protony na 1 molekulu ATP. Po stránce struktury má tato ATPasa multimerní V1 jednotku obsahující vazebné místo pro ATP a membránový sektor Vo zajišťující transport H<sup>+</sup> přes membránu. Existuje určitá homologie mezi podjednotkami F1 a V1 a dále Vo a Fo, při srovnání F-ATPasy a V-ATPasy. Zdá se však, že H<sup>+</sup>-ATPasy V typu mají mnohem komplexnější strukturu než F-ATPasy.

Obr. 3.11 - V-ATPasa kvasinek

V-ATPasy jsou velmi silně a specificky inhibovány antibiotikem bafilemycinem (3.12), které je produkováno *Streptomyces* a interaguje se sektorem Vo.

Membrána vakuoly obsahuje další unikátní H<sup>+</sup>-pumpu, a to H<sup>+</sup>-difosfátu (H<sup>+</sup>-PPasu). Tento systém provádí transport protonů na účet hydrolýzy anorganického difosfátu, který se nachází v cytosolu v mikromolárních množstvích. Jedná se o jednoduchou bílkovinu o mol. hmotnosti 80 kDa. Tato molekula obsahuje 16 transmembránových domén. Funkční jednotka H<sup>+</sup>-PPasy je zřejmě homodimer 160 kDa. Enzym je silně inhibován Ca<sup>2+</sup>. Důvod přítomnosti dvou H<sup>+</sup> pump v membráně vakuoly není znám. Zdá se pravděpodobné, že H<sup>+</sup>-PPasa se uplatňuje zejména v nezralých pletivech, zatímco H<sup>+</sup>-ATPasa ve zralých částech rostliny.

#### Transport vápníku

Transport vápníku proti směru koncentračního gradientu je zajišťován Ca<sup>2+</sup>-ATPasou, což je ATPasa P typu. Obdobný enzym najdeme kromě plasmatické membrány také v endoplasmatickém retikulu, vakuolární membráně a vnější membráně chloroplastů. Enzym čerpá vápenaté ionty ven z cytosolu, takže jejich koncentrace je udržována na hladině zhruba 0.2 μM. Tato nízká koncentrace je velmi důležitá, protože vápník hraje v buňce roli druhého posla. Ačkoli všechny tyto ATPasy katalyzují identickou reakci, jejich struktura je variabilní. Nejlépe jsou tyto enzymy charakterizovány u živočichů. Enzym z plasmatické membrány (PM) živočichů má mol. hmotnost 130 kDa a obsahuje regulační doménu na C-konci vázající kalmodulin. Enzym z endoplasmatického retikula (ER) neobsahuje kalmodulinovou doménu a jeho

hmotnost je 110 kDa. U rostlin je situace méně přehledná. Enzym ER byl lokalizován v endoplasmatickém retikulu rostlin. Enzym PM typu byl lokalizován v membráně chloroplastů a ve vakuole. Existence PM-typu v plasmatické membráně nebyla zatím prokázána. Vakuolární enzym je regulován kalmodulinem, který se váže na rozdíl od živočišného enzymu na N-konec. Transport vápníku je silně energeticky náročný, protože rozdíl koncentrací vápníku na jedné a druhé straně membrány dosahuje několik řádů a navíc se odehrává proti kladnému potenciálu (elektrochemický potenciál vápníku až  $-60$  kJ/mol). Z toho důvodu může být energie hydrolyzy ATP nedostatečná ( $-50$  kJ/mol). V tomto případě se uplatňuje specifický přenašeč, který provádí výměnu  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ .

Další důležité systémy, které se podílejí na transportu vápníku jsou vápenaté kanály. Hladina vápníku v cytosolu je udržována na velmi nízké hodnotě ( $0.1 \mu\text{M}$ ). Tato koncentrace je udržována pumpami a přenašeči. Tyto kanály jsou lokalizovány takřka na všech membránách organel, jako je plasmatická membrána, vakuola, endoplasmatické retikulum, jádro, chloroplasty, atd. Hladina vápníku v cytosolu představuje významný regulační prvek a vápník zde hraje roli druhého posla, který se nachází na počátku kaskád přenosu signálů v buňce, kde jsou zahrnuty nejen vápenaté kanály, ale také bílkovina kalmodulin, proteinkinasy, fosfolipasy, atd. Vápenaté kanály, tak jako ostatní kanály jsou řízeny buď napětím nebo ligandy. Jejich selektivita je většinou dosti široká, propouštějí další ionty, jako je draslík, sodík,  $\text{H}^{+}$ , atd. Selektivita vůči  $\text{K}^{+}$  se pohybuje v rozsahu 2:1 až 20:1. Kanály ovládané polarizací membrány se mohou otevírat při depolarizaci a nebo naopak při hyperpolarizaci membrány.

Membrány organel (zejména vakuoly a ER) mají minimálně 4 základní typy vápenatých kanálů. Dva z těchto kanálů se nacházejí na membráně vakuoly a jsou aktivovány ligandy: inositol-1,4,5-trisfosfátem ( $\text{IP}_3$ ) a c-ADP-ribosou (cADPR). Tyto dva kanály se velmi podobají svým protějškům, které nacházíme v membránách ER živočišných buněk. (cADPR kanál je ovládán, tzv. ryanodinovým receptorem). Selektivita těchto ligandových kanálů oproti draslíku je dosti vysoká. Kanály ER živočišných buněk jsou však na rozdíl od kanálů vakuol řízeny dalším ligandem, což je cytosolový vápník samotný. Vzrůst koncentrace vápníku v cytosolu vyvolá otevření vápenatých kanálů ER, výtok vápníku z této organely a zesílení signálu (tzv. calcium induced calcium release: CICR). U rostlin je tento efekt vyvolán spíše otevřením depolarizací aktivovaného  $\text{Ca}^{2+}$ , který je však navíc silně aktivována komplexem  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin..

Obrázek: 3.44 + CICR u rostlin

#### Transport draselných iontů

Ačkoliv transport draslíku, jakožto jednoho z nejdůležitějších iontů, je studován po mnoho desetiletí, znalosti o tomto systému byly dlouho neúplné. Cytosolová koncentrace draslíku dosahuje  $80$  až  $200$  mM, transport draselných iontů se tudíž odehrává proti silného koncentračního spádu. Nejlépe prostudován je transport draselných iontů do buněk kořene. Fyziologické studie svědčí o dvou systémech transportu draselných iontů: nízkoafinitním a vysokoafinitním. Čerpání draslíku kořenovými buňkami bylo dlouho spojováno s výtokem protonů, to znamená, že se předpokládala existence antiportu  $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ . Studia vysokoafinitního transportu v *Arabidopsis* však prokázala, že draslík je čerpán v symportu  $\text{H}^{+}\text{-K}^{+}$ , a to při stechiometrii 1:1. Tato funkce předpokládá roli  $\text{H}^{+}$ -ATPasy, která vytváří nutný elektrochemický potenciál protonů. Draselný přenašeč tudíž využívá gradient protonů

vytvářený ATPasou a jeho činností se přenáší 2 náboje na jeden iont draslíku. Nízkoafinitní transportní systémy draslíku obsahují komponenty draselných kanálů. Tyto kanály jsou dvojího typu. První typ, zvaný "inward-rectifying" se otvírají při hyperpolarizaci membrány a jejich otevření způsobí průnik draselných iontů dovnitř, tudíž čerpání draslíku do buňky. Druhý typ kanálu, "outward-rectifying" se otvírají při depolarizaci membrány: jejich otevřením se transportují draselné buňky ven z membrány. Jejich role je tedy spíše opačná. Draselné ionty jsou využívány ke zvýšení (obnovení) membránového potenciálu, snižování osmotického potenciálu buňky výtokem draslíku, apod. Oba tyto typy kanálů jsou inhibovány tetraethylamoniem. Tyto kanály však mohou být regulovány nejen velikostí potenciálu, ale také ligandy. Například outward-rectifying kanály buněk průduchů jsou aktivovány malým vzrůstem pH vyvolaným kys. abscisovou. Inward-rectifying kanály jsou modulovány G-proteiny a jsou inhibovány cytosolovým vápníkem a regulovány defosforylací vyvolanou proteinfosfatasou.

Struktura  $K^+$  "inward-rectifying" kanálů je dobře známa. Patří do super-rodiny tzv. shaker kanálů, kam patří  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanály ovládané potenciálem. Na obrázku je znázorněna struktura  $K^+$ -kanálu AKT1. Obsahuje 6 transmembránových domén. Čtvrtý helix, zvaný S4, obsahuje velké množství kladných nábojů (Lys, Arg). Tato oblast vytváří tzv. voltážový senzor, který se účastní otvírání kanálu vlivem napětí tak, že se vysune z membrány, což způsobí otevření brány v P-oblasti. Tento kanál funguje jako tetramer, oblast póru je lokalizována mezi pátý a šestý helix každé z podjednotek.

Obrázek 3.34, 3.36

Na druhé straně, outward-rectifying  $K^+$ -kanál (KCO1) patří do skupiny dvoupórových kanálů, protože každá jednotka obsahuje dvě P-oblasti (Obr. ). Tento enzym obsahuje pouze 4 transmembránové domény a C-konec obsahuje dvě  $Ca^{2+}$  vazebné domény (EF). Tento kanál je tedy citlivý ke koncentraci cytosolového vápníku. Otevřením kanálu, ke kterému dochází snížením potenciálu a zvýšením koncentrace cytosolového vápníku tedy vyvolá výtok draselných iontů ven z buňky. Vnější faktory, jako je červené světlo, vazba Nod-faktorů nebo elicitorů obranných reakcí má za následek zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu a depolarizaci membrány. Role těchto kanálů tedy spočívá upravení potenciálu na původní hodnotu. Další typ kanálu zajišťující transport draslíku se nachází na membráně vakuoly a je regulován napětím. Vykazuje velmi malou selektivitu vůči monovalentním kationtům ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Li^+$ , atd) (FV - fast vacuolar channels) a je inhibován zvýšením cytosolové koncentrace  $Ca^{2+}$ . Na druhé straně jiný draselný kanál vakuoly je vysoce selektivní vůči  $K^+$  je aktivován nízkou koncentrací cytosolového vápníku v rozsahu  $nmol/l$  až  $1 \mu M$  a je inhibován alkalizací cytosolu.

Obr. Outward kanál 3.38

Transport aniontů

Transport fosfátu. Díky své nízké rozpustnosti v půdě je fosfát hůře dostupný, než ostatní minerální látky. Jeho koncentrace v půdě je často nižší než  $1 \mu M$ . Do kořenových buněk se transportuje ve formě  $H_2PO_4^-$  a to proti směru elektrického potenciálu, který je negativní oproti extracelulárnímu prostoru. Koncentrace fosfátu v cytosolu je řádově milimolární. Tento transport jde na účet hydrolýzy ATP anebo na účet elektrochemického potenciálu generovaného  $H^+$ -ATPasou. Předpokládá se, že se

fosfát transportuje kotransportem s protony  $H^+$ -  $H_2PO_4^-$ . Důkazy pro tuto hypotézu jsou však zatím nedostatečné. Geny kódující přenašeče fosfátu byly nedávno klonovány u *Arabidopsis* a dalších rostlin. Všechny přenašeče  $P_i$  mají podobnou strukturu. Podobají se přenašečům, které byly zjištěny u kvasinek. Předpokládaná struktura přenašeče fosfátu rostlin obsahuje 6 transmembránových domén z N-konce a 6 domén z C-konce, které jsou odděleny rozsáhlým hydrofilním úsekem. Další vysoce konzervovaný úsek tohoto proteinu obsahuje sekvence identické pro fosforylační místo proteinkinasy C a kaseinkinasy II a dále N-glykosylační místo.

#### Transport amoniaku a nitrátu

Rostlinné buňky mají vysoce efektivní systém transportu  $NH_4^+$ . Fyziologické studie naznačují přítomnost mnohočetných transportních systémů s afinitou  $K_m$  v rozsahu 10 až 70  $\mu M$   $NH_4^+$ . Geny přenašečů  $NH_4^+$  u rajčete nebo *Arabidopsis* jsou vysoce homologní s geny přenašečů kvasinek.

Nitráty jsou efektivně čerpány epidermálními a kortikálními buňkami? kořene. Hlavními skladovacími organelami jsou vakuoly, kde koncentrace dosahuje až 20 mM. Obdobně jako u jiných iontů, byly objeveny dva transportní systémy: nízkoafinitní a vysokoafinitní. Vysokoafinitní systém je typickým  $K_m$  v oblasti 10 - 100  $\mu M$  a může mít dvě komponenty: konstitutivní existuje v buňce i za nepřítomnosti nitrátu v půdě a inducibilní komponenta se exprimuje po přidání nitrátu. Nízkoafinitní transportní systém je pozorován při koncentracích vyšších než 0.5 mM a nemá saturační kinetiku.

Rostlinné buňky čerpají nitrát proti elektrochemickému potenciálu. Transport nitrátu je řízen protonovým gradientem přes plasmatickou membránu. Původně se předpokládalo, že se jedná o kotransport  $H^+$ - $NO_3^-$ , tedy o nábojově neutrální transport. Experimentálně se však prokázalo, že přidání nitrátu způsobí depolarizaci membrány. Předpokládá se tedy, že se transportují  $2H^+$  spolu s jedním molekulárně biologické studie prokázaly existenci dvou rodin s odlišnými kinetickými a regulačními vlastnostmi. NRT2 rodina kóduje přenašeče inducibilního vysokoafinitního transportu. Exprese je inhibována dalšími formami dusíku jako je amoniak nebo glutamin. NRT1 rodina zahrnuje přenašeče s nízkou a vysokou afinitou. NRT1 protein u *Arabidopsis* je exprimován u buněk vnější vrstvy kořene. Je to hydrofobní protein obsahující 12 transmembránových domén. Tento protein má zřejmě dvojí afinitu pro nitrát, a to  $K_m$  zhruba 25  $\mu M$  a nízkoafinitní  $K_m$  8 mM. Další obdobný gen typu NRT1 u *Arabidopsis* je zřejmě komponentou nízkoafinitní a konstitutivní.

Druhým typem transportních mechanismů aniontů jsou iontové kanály. Jsou přítomny ve všech buňkách. Jejich hlavní rolí je udržování koncentrace solí uvnitř buňky a regulace turgoru. Z těchto kanálů jsou nejdůležitější  $Cl^-$  kanály. V buňkách průduchů (guard??) byly identifikovány 2 druhy těchto chloridových kanálů: tzv. rychlé a pomalé (R-typ a S-typ): Oba typy jsou regulovány jednak membránovým potenciálem a dále koncentrací vápenatých iontů. Protože intracelulární koncentrace chloridů je vyšší, otevření těchto kanálů vede ke ztrátám chloridů a depolarizaci membránového potenciálu. Tato depolarizace pak vede zřejmě k aktivaci "outward rectifying" draselných kanálů (viz výše). Důsledkem je ztráta  $KCl$  a pokles osmotického potenciálu buňky. Druhou funkcí těchto aniontových kanálů je depolarizace membrány, jakožto fenoménu, který pak vede a aktivaci dalších komponent signalizační kaskády.

### Transport vody

Permeabilita vody přes membránu je značná. Má dvě složky. první z nich je volný průchod molekul vody přes fosfolipidy. Druhý mechanismus předpokládá speciální kanály - obsahující bílkoviny akvaporiny

Obr. 3.50,

Obsahují 6 helixů a konzervovanou Asn-Pro-Ala doménu

U rostlin existují na PM a vakuole  
Jsou regulovány fosforylací a  $\text{Ca}^{2+}$ .

### METABOLISMUS SACHARIDU

Zásobním sacharidem rostlin je zejména škrob, transportním sacharidem se sacharosa.

#### Syntéza a degradace škrobu

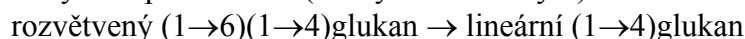
Škrob je složen ze dvou základních složek: amylosy a amylopektinu. , přičemž u většiny rostlin obsahuje 30% amylosy. Poměr obsahu obou složek je významným faktorem v potravinářském průmyslu. Amylopektinové molekuly tvoří většinou amorfni strukturu, spíše než krystalickou, díky bohatému větvení a vodíkovým vazbám. Textura potravin (pečivo), je totiž nepříznivě ovlivňována vyšším obsahem amylosy, která v chladném stavu krystalizuje, ztrácí vodu a produkt ztrácí gelovitou vláchnou strukturu. Obilniny s vysokým obsahem amylopektinu ("vosková" kukuřice) zajišťují stabilitu výrobků po dostatečně dlouhý čas. Mechanismus, který reguluje degradaci obou polysacharidů, není na rozdíl obdobné dráhy degradace glykogenu u živočichů objasněn. Odbourávání škrobu probíhá buď v plastidech, nebo semenech a hlízách. Na degradaci se podílejí dvě hlavní cesty: amylasy a fosforylasy. Degradací cestou fosforylasy vzniká glukosa-1-fosfát, který se metabolizuje v procesu anaerobní glykolysy nebo pentosafosfátovém cyklu. Aby mohlo dojít k úplné degradaci amylosy a amylopektinu, potřebuje buňka navíc dva enzymy. Větvící enzym (provádějí štěpení vazeb 1,6) a dále glukosyltransferasu.

Reakce, které tyto enzymy katalyzují:

Fosforylasa:



Enzym štěpící větvení (zvaný také R-enzym):



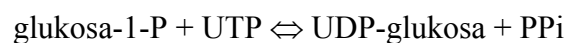
Glukosyltransferasa (zvaný D-enzym):



Obrázek

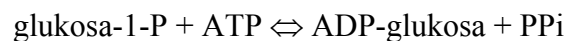
Fosforylasa štěpí  $\alpha$ -glukany od neredukujícího konce, avšak může hydrolyzovat pouze ty glukany, které mají minimálně 4 glukosové jednotky od místa

větvení. Kontinuální odbourávání amylosy a amylopektinu je tedy možné pouze díky R-enzymu, který odstraní větvení a díky transferase, která z krátkých štěpů vytvoří dlouhý glukonový řetězec. Fosforylase je přítomna zejména v plastidech, v zelených částech rostliny, ale také v hlízách kořenů. Fosforylase (na rozdíl od glykogenfosforylasy živočichů, která je regulována proteinkinasu, cAMP a hormony) není zřejmě regulována obdobným mechanismem. Nejvíce prostudována je hydrolýza škrobu v klíčících semenech. Zde je škrob štěpen skupinou amyláz, endoamylas a exoamylas (dříve zvaných  $\alpha$ -amylasy a  $\beta$ -amylasy). Produktem reakce endoamylas jsou nízkomolekulární glukany, produktem exoamylas je disacharid maltosa (tato je štěpena  $\alpha$ -glukosidasou na glukosu). Štěpení vazeb  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 vyžaduje další enzym. Klíčící semeno neobsahuje endoamylasy, jejichž syntéza *de novo* v aleuronové vrstvě je regulována gibereliny. Exoamylasa ( $\beta$ -amylasa) je přítomna v semenu ve formě proenzymu, který je aktivován během klíčení proteolysou, kdy se z C-konce odštěpí krátký peptid. Produktem štěpení škrobu těmito enzymy je tedy glukosa, která se přeměňuje hexokinasou na glukosa-6-fosfát a poté na sacharosu, aby mohla být transportována do vyvíjejícího se embrya. Startovní látkou syntézy škrobu je aktivovaná glukosa. V rostlinách existují dvě formy: ADP-glukosa a UDP-glukosa. UDP glukosa může vznikat z glukosy v reakci katalyzované UDP-glukosapyrofosforylasou:



Tento enzym existuje pouze v cytosolu. Reakce je rovnovážná. Vznikající UDP-glukosa však neslouží k syntéze škrobu, nýbrž sacharosy a glykosidů. Cytosol neobsahuje pyrofosfatasu, takže hladina disfosfátu v cytosolu je poměrně vysoká, 0.3 mM.

Druhý analogický enzym najdeme pouze v plastidech a katalyzuje reakci:



Plastidy, na rozdíl o cytosolu, obsahují pyrofosfatasu, takže disfosfát ne okamžitě štěpen na anorganický fosfát. Protože difosfát je obsahuje makroergickou vazbu, reakce se tím posouvá silně ve prospěch tvorby ADP-glukosy. ADP-glukosa je využita pro syntézu škrobu. ADP-glukosapyrofosforylase je hlavním regulačním enzymem syntézy škrobu. Tento enzym je heterotetramer složený ze dvou malých a dvou velkých jednotek. Je allostericky aktivován 3-fosfoglycerátem vznikajícím při fotosyntéze a inhibován fosfátem. Mezi plastidy a cytolem existuje antiport, kdy se triosafosfáty nebo glukosa-6-fosfát transportují výměnou za fosfát, takže vysoká hladina fosfátu znamená nízkou koncentraci sacharidů v plastidu.

Obr, 13.16 - upravený??

Syntézu škrobu zajišťuje enzym škrob-synthasa, který přikládá glukosové jednotky k neredukujícímu konci amylosové matrice. Vytváření vazeb  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 6 katalyzuje tzv. větvicí enzym.

Tato synthasa existuje ve formě několika izoenzymů. některé jsou vázány na membránu plastidů a katalyzují vznik lineární amylosy. Jiná forma, rozpustná, nacházející se ve stroma chloroplastů, syntetizuje kratší lineární řetězce, které jsou přeměňovány větvicím enzymem. Větvicí enzym je v podstatě transglukosidasa, která štěpí  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4 vazby a redukující konce pak přenáší na C-6, zhruba o 20 glukosových

zbytků směrem dolů od bodu štěpení vazby. Existují 2 hlavní formy tohoto větvičího enzymu. Ta první má vysokou afinitu k nerozvětvenému řetězci amylosy, druhá preferuje rozvětvený amylopektin, takže jeho činností vznikají vysoce rozvětvené formy amylopektinu. (Obr. 13.19??). Některé rostliny obsahují ve svých zásobních orgánech namísto škrobu polyfruktosany, což jsou polymery fruktosy.

x

upravit bývalou přednášku

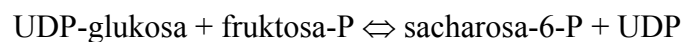
x

x

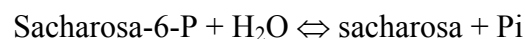
### Metabolismu sacharosy

Sacharosa je hlavním produktem fotosyntézy v zelených listech. Slouží jako transportní sacharid a u některým rostlin (cukrová řepa, cukrová třtina) je zásobním sacharidem. Sacharosa je syntetizována v cytosolu. Existují dvě možné dráhy syntézy sacharosy: cestou sacharosafosfát syntasy a sacharosasyntasy. V prvním případě vzniká glykosidová vazba sacharosy ve dvou následných reakcích.

Sacharosa-fosfátsynthasa:



Sacharosa-P-fosfatasa:



Tvorba UDP-glukosy glukosa-1-P a UDP, obdobně jako reakce katalyzovaná sacharosa-6-synthasou jsou reakce s mírně negativní  $\Delta G_0$  (-2.9 a -5.5 kJ/mol), zatímco hydrolysa sacharosa-6-P má  $\Delta G_0 = -25$  kJ/mol. Tím se stává syntéza sacharosy prakticky ireverzibilní reakcí.

Druhý enzym sacharosasyntasa katalyzuje vratnou reakci:



Přepokládalo se, že tento enzym se podílí jak na syntéze, tak na degradaci sacharosy. Stanovení koncentrace obou hlavních enzymů metabolismu sacharosy ukázalo, že části rostliny využívající a degradující sacharosu (např. semena nebo hlízy) obsahují vysokou koncentraci sacharosasyntasy, zatímco pletiva obsahující vysoké hladiny sacharosafosfátsynthasy se podílejí na syntéze sacharosy. Sacharosafosfátsynthasa (SPS) je regulačním enzymem, který je regulován jak allostericky, tak kovalentní modifikací příslušnou kinasou (SPS kinasa), a to velmi zajímavým způsobem. SPS kinasovou reakcí, kdy se SPS fosforyluje, vzniká méně aktivní forma. Tato se může defosforylovat na formu aktivní příslušnou SPSfosforylasou. Inhibitorem SPSkinasy je glukosa-6-fosfát, inhibitorem fosfatasy je fosfát. Vysoká hladina glukosa-6-P a nízká koncentrace fosfátu tudíž upřednostňuje vznik defosforylované, aktivní formy SPS. Allosterickým aktivátorem samotné aktivní SPS je glukosa-6-fosfát a inhibitorem anorganický fosfát. Poměr glukosa-6-fosfát/Pi tedy velmi citlivě reguluje syntézu sacharosy.

Obrázek 13.13 a 13.12



Kromě těchto enzymů obsahují rostliny enzym invertasu (který známe z kvasinek), jenž katalyzuje hydrolýzu sacharosu na dva monosacharidy. Tato reakce je ireverzibilní a její význam je zatím předmětem spekulací. Sacharosa může být zdrojem glukosa-1-P cestou sacharosasyntasy, nebo může být využívána přímo k syntéze glykosidové vazby.

Některé rostliny obsahují zvláštní oligosacharidy namísto sacharosu, jako zasobí látky.

rafinosa, verbaskosa, stachiosa

sacharopsa:  $\text{glc}(\alpha 1 \beta 2)\text{fru}$

rafinosa :  $\text{gal}(\alpha 1 6) \text{glc}(\alpha 1 \beta 2) \text{fru}$

stachiosa :  $\text{gal}(\alpha 1 6) \text{gal}(\alpha 1 6) \text{glc}(\alpha 1 \beta 2) \text{fru}$

Syntéza těchto látek probíhá přes myoinositol a galaktinol

$\text{UDPgal} + \text{myoinositol} \Leftrightarrow \text{galaktinol} + \text{UDP}$

$\text{galaktinol} + \text{sacharosa} \Leftrightarrow \text{rafinosa} + \text{myoinositol}$

x  
x  
x  
x

Anaerobní glykolýza a pentosafosfátový cyklus

Glykolýza je metabolickou drahou přeměňující glukosu na pyruvát za současně produkce NADH a ATP. Enzymy tohoto procesu se u živočišných buněk nacházejí v cytosolu a většina těchto reakcí je vratná. Při pentosafosfátovém cyklu se glukosa-6-fosfát přeměňuje na pentosa-fosfáty a NADPH. Další kroky pak zahrnují regeneraci hexos. Oba procesy jsou vzájemně propojeny společnými metabolity. Na rozdíl od živočišných buněk však musíme u rostlin navíc vzít do úvahy plastidy, kde se tyto metabolity a enzymy rovněž nacházejí. Oba procesy obsahují většinou rovnovážné reakce. Klíčovým enzymem pentosafosfátové dráhy je glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, využívající NADPH jako kofaktor. Enzym se nachází jak v cytosolu, tak v plastidech. Oba enzymy mají zhruba 75% homologii sekvence. Cytosolový enzym není allosterycky regulován, je však silně inhibován NADPH. Plastidový enzym podléhá komplexní regulaci. Enzym je kovalentně modifikován tvorbou disulfidových můstků katalyzovaným thioredoxinovým systémem. Během fotosyntézy je NADPH redukováno světlem. Za těchto podmínek je produkce NADPH v pentosafosfátovém cyklu zbytečná a enzym je tudíž deaktivován fotoredukovaným thioredoxinem.

Obr

Anaerobní glykolýza živočišných buněk obsahuje dva klíčové regulované procesy. První z nich je přeměna fruktosa-6-fosfátu na fruktosa-1,6-bisfosfát katalyzovaná ATP dependentní fosfofruktokináso -PFK (zatímco obrácený proces defosforylace je

katalyzovaný fruktosa-1,6-bisfosfátou). Druhým klíčovým procesem je pyruvátkinasová reakce. PFK je aktivována fruktosa-2,6-bisfosfátem a hormony. Produkt reakce, fruktosa-1,6-bisfosfát je aktivátorem pyruvátkinasy, druhého regulačního enzymu. U rostlin se PFK i fruktosa-1,6-bisfosfát nacházejí jak v cytosolu, tak v plastidech. Cytosol rostlin však obsahuje navíc třetí enzym, difosfát dependentní fosfofruktokinázu. Tato reakce je na rozdíl od předchozích rovnovážná. Enzym je zřejmě heterotetramer. Fyziologický význam tohoto enzymu nebyl doposud objasněn.

Obr. Vztah mezi fruktosa-6-fosfátem a fruktosa-1,6-bisfosfátem u rostlin (13.32)

PFK je u rostlin regulována jinak, než u živočichů. Rostlinná buňka obsahuje cytosolový a plastidový enzym. Oba jsou silně allostericky inhibovány fosfoenolpyruvát (zpětná inhibice), na rozdíl od buňky živočišné. Silným aktivátorem enzymu je naopak anorganický fosfát. Tento důvod lze pochopit. Pokud je zdrojem triosafosfátů fotosyntéza, není zapotřebí tyto látky vyrábět cestou anaerobní glykolýzy. Jak je ukázáno dále (,,), triosafosfáty jsou transportovány přes plasmatickou membránu nebo přes membránu plastidu výměnou za fosfáty. Vysoká hladina fosfátu tedy znamená zvýšený transport triosafosfátu a tudíž potřebu doplnit triosafosfátový pool. PFK rostlin je tudíž regulována poměrem fosfoenolpyruvát/fosfát. Enzym glukoneogenese, fruktosa-1,6-bisfosfátase je o rostlin přítomna jak v cytosolu, tak v plastidech. Cytosolový enzym s epodílí na vzájemné přeměně sacharosy a škrobu v listech a je silně allostericky inhibován fruktosa-1,6-bisfosfátem, na rozdíl od enzymu plastidového.

Pyruvátkinasová reakce slouží u živočichů k produkci ATP z fosfoenolpyruvátu. reakce je prakticky nevratná. Rostlinný enzym najdeme opět jak v cytosolu, tak v plastidech. Zatímco živočišná pyruvátkináza podléhá komplexní regulaci (kovalentní modifikace fosforylací), u rostlinného enzymu z cytosolu a plastidů takovou regulaci nenajdeme.

Posledním důležitým enzymem anaerobní glykolýzy je glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GPDH), která využívá energie oxidace glyceralddehyd-3-fosfátu na kyselinu za vzniku ATP. Reakce je prakticky rovnovážná a je ovlivňována poměrem NAD/NADH. Rostliny obsahují 3 enzymy s touto aktivitou. Kromě cytosolového, NAD dependentního enzymu najdeme dále plastidový enzym, který je NADP dependentní, a který je součástí Calvinova cyklu. Cytosol však obsahuje navíc ještě třetí enzym, nefosforylující NADP dependentní, který generuje rovnou kys. 3-fosfoglycerovou bez intermediátu kys. 1,3-bisfosfiglycerové. Enzym zřejmě zajišťuje tvorbu triosafosfátů i v případě velmi nízké koncentrace ADP.

Box 13.4.

Terminálním produktem anaerobní glykolýzy je pyruvát, který se za anaerobních podmínek o živočichů přeměňuje na laktát. U rostlin se na terminálním procesu podílí současně enzym laktátdehydrogenasa i pyruvátdekarboxylasa, kdy po redukci vzniká ethanol. Tvorba laktátu má však za následek pokles pH. LDH má pH optimum v neutrální oblasti, její aktivita tudíž tvorbou laktátu klesá. Naopak, pH optimum pyruvátdekarboxylasy však leží v kyselé oblasti, takže akumulace laktátu vede k produkci acetaldehydu a ethanolu. Ethanol samotný pH cytosolu neovlivňuje. Tolerance k hypoxii je u různých druhů rostlin rozdílná.

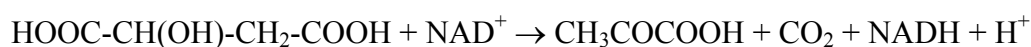
### Krebsův cyklus

Krebsův cyklus je u rostlin, stejně jako u živočichů lokalizován v matrix mitochondrií. Počet mitochondrií v buňce je dosti liší, obecně však lze tvrdit, že počet mitochondrií v rostlinných buňkách je nižší než v živočišných. Průběh cyklu a struktura enzymů je velmi podobná s průběhem cyklu u živočišných buněk. Rolí Krebsova cyklu je degradace acetylKoa na CO<sub>2</sub> a redoxní ekvivalenty (NADH, FADH<sub>2</sub>) anebo produkce dikarboxylových kyselin. Tyto látky hrají u rostlin velmi podstatnou úlohu, jak napovídá jejich koncentrace uvnitř buněk. Pravděpodobný význam tohoto zvýšeného obsahu je regulace osmotického tlaku. Tato skutečnost napovídá, že role Krebsova cyklu u rostlin jakožto cyklu syntezujícího dikarboxyláty je u rostlin významější než u živočichů.

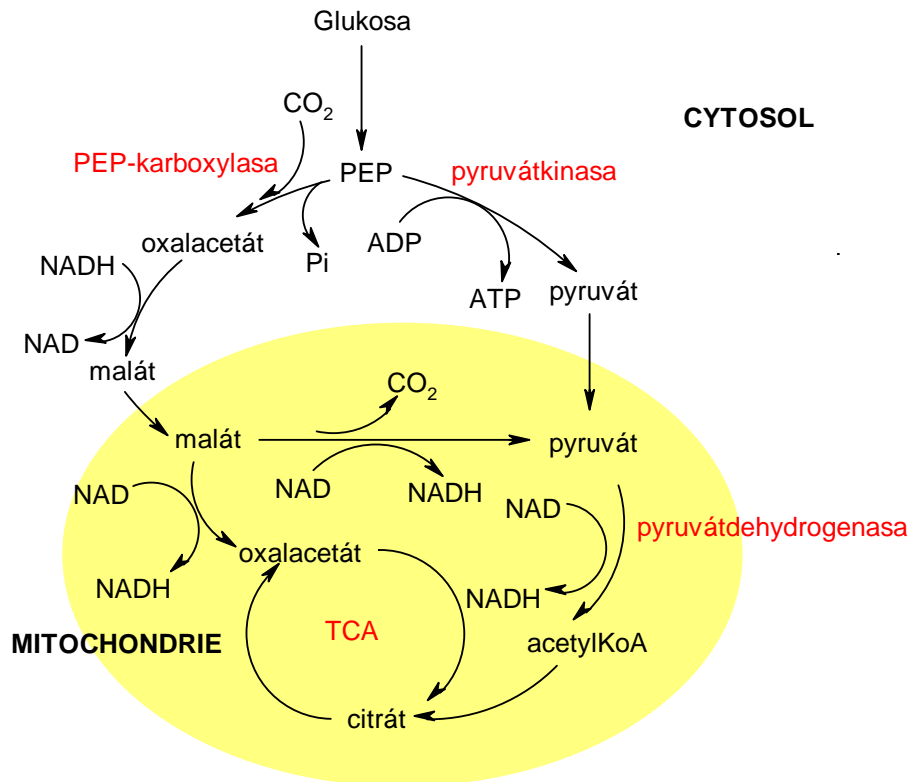
Obsah některých dikarboxylátů v rostlinách je uveden v následující tabulce.

Kyselina	Obsah (μmol/g čerstvé hmotnosti)					
	Arum	Kukuřice (kořen)	Kukuřice (koleopt)	Pšenice (list)	Bryophyl (list)	Játra krysí
Citrát	16.6	1.5	0.8	0.60	8.0	0.22
Isocitrát	0.11	-	-	-	60.0	0.01
Jantaran	-	0.2	0.2	0.2	-	0.75
Fumaran	0.90	-	-	-	-	0.08
Malát	21.6	7.5	2.7	1.7	19.0	0.39

Cyklus kyseliny citronové lokalizovaný v mitochondriích má u rostlin některé zvláštní rysy. Tak například při syntéze jantaranu vzniká přímo ATP a nikoliv GTP jako u mitochondrií živočišných. Nejdůležitějším rys však souvisí s velkým významem kyseliny jablečné u rostlin. Oxidace malátu je jak známo energeticky velmi nepříznivá ( $\Delta G_0 =$  ) a musí být stimulována odstraňováním vznikajícího oxalacetátu. Toho je docíleno buď transaminací za vzniku kys. L-asparagové anebo kondenzací s acetyl-Koa za vzniku kys. citronové. Rostlinné mitochondrie jsou charakteristické vysokou aktivitou tzv. jablečného enzymu dekarboxylujícího malát na pyruvát:



Tento enzym umožňuje rostlinám alternativní dráhu metabolizace PEP vznikajícího v procesu anaerobní glykolýzy. L-malát je syntezován v cytosolu karboxylací PEP a je posléze transportován do mitochondrií, kde vstupuje do Krebsova cyklu. Zde je pak odbouráván jablečným enzymem na pyruvát. Role malátu je obzvláště významná u takzvaných C<sub>4</sub> rostlin. Tato alternativa umožňuje rostlinám úplnou oxidaci organických kyselin i za nepřítomnosti pyruvátu produkovaného v cytosolu, např. při zpracování malátu uskladněného ve vakuole.



### Respirační řetězec

Struktura a funkce respiračního řetězce rostlinných mitochondrií je v zásadě shodná se strukturou a funkcí mitochondrií živočišného původu. Počet mitochondrií v rostlinné buňce velmi kolísá a souvisí s metabolickou aktivitou. Odlišnosti přenašečů respiračního řetězce mitochondrií rostlinných od živočišných jsou následující:

- i když respirační řetězec obsahuje stejné typy cytochromů, jejich absorpční maxima jsou poněkud odlišná od absorpčních maxim cytochromů živočišných. Důvodem je jiná bílkovinná část hemoproteinu.
- přítomnost ubichinonu  $\text{Q}_{9,10}$
- přítomnost flavoproteinů zodpovědných za rotenon necitlivou oxidaci **NADH**
- přítomnost alternativní, kyanid necitlivé, respirace

Kromě komplexů respiračního řetězce najdeme u rostlinných mitochondrií **NADH dehydrogenasu**, periferní bílkovinu, orientovanou do matrix. Tato dehydrogenasa je necitlivá k rotenonu, napojuje se na ubichinonový pool a tvoří tak obchvat komplexu I. Její činností však nevzniká **ATP**, protože nekatalyzuje vznik elektrochemického potenciálu protonů. Další obdobná dehydrogenasa oxiduje **NADPH**. Její role je doposud nejasná. Posledním vyjímečnou dehydrogenasou je **NADH dehydrogenasa** a **NADPH dehydrogenasa** lokalizované na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány. Oba enzymy se napojují na ubichinon a enzymy nekatalyzují translokaci protonů přes membránu. Regulace obou enzymů nebyla prozatím objasněna, jejich přítomnost však umožňuje oxidovat cytosolový **NADH** a **NADPH** bez přenosu obou koenzymů do matrix mitochondrií. Podílejí se zřejmě na regulaci redoxního stavu cytosolových enzymů.

Obrázek respiračního řetězce

Alternativní kyanid necitlivá oxidasa je nejlépe prostudovaným zvláštním enzymem rostlinného respiračního řetězce. Tento enzym provádí oxidaci ubichinonu cestou paralelní ke komplexu IV, akceptorem elektronů je kyslík, při oxidaci se opět nepřenašejí protony přes membránu, takže nevzniká ATP. Enzym je kódován jaderným genomem a lze jej nalézt nejen u rostlin, ale také u řas a hub. Je necitlivý ke všem běžným inhibitorům oblasti komplexu IV. Tato respirace tvoří nezanedbatelný podíl celkové respirační aktivity

Tabulka

Srovnání kyanid insenzitivní respirace rostlinné tkáně v přítomnosti 0.2 mM KCN a rozpojovače.

Druh	Resistence respirace na CN (%)
<i>Gossypium</i> kořen	36
<i>Phaseolus</i> kořen	61
<i>Spinacea</i> listy	40
<i>Zea</i> kořen	47
<i>Pisum</i> listy	39

Alternativní oxidasa je inhibována kys. salicylhydroxamovou (SHAM) a n-propylgalátem. Pravděpodobná struktura enzymu je ukázán na obr. jedná se zřejmě o homodimer 2x32 kDa, obě jednotky jsou propojeny disulfidickým můstkem. Dvě velké hydrofilní domény jsou vystaveny směrem do matrix. Aktivní místo enzymu zřejmě obsahuje kovy.

Role alternativní oxidázy není u všech typů rostlin zřejmá. Původní hypotéza, že se jedná o ochranu respirace v případě přítomnosti kyanidu v rostlinných glykosidech se nepotvrdila. Jasná je role enzymu při termogenezi některých květů liliovitých rostlin, kdy vzniklé teplo zvyšuje odpařování olejovitých látek přitahujících hmyz. Tato dráha byla dlouho považována za jakýsi ventil, který umožňuje reoxidaci částí vysoce redukovaného ubichinonového poolu v případě vysoké hladiny NADH. Pokud je redukce cytochromů blízká nasycení, tento alternativní pochod by měl umožňovat jejich rychlou reoxidaci. Tato hypotéza byla však postupně modifikována. Tato oxidasa se uplatňuje nejen při vysokém redoxním stavu respiračního řetězce.

Alternativní oxidasa je regulována dvěma faktory: hladinou uhlíkatých metabolitů a kovalentní modifikací. Aktivita enzymu se silně zvyšuje přítomností  $\alpha$ -oxokyselin (pyruvát, oxalacetát, glyoxylát, atd.). Aktivita enzymu je dále ovlivňována tvorbou disulfidového můstku homodimeru, zvyšuje se 4-5krát po redukcí můstku na -SH skupiny. Tato redukce je indukována přídatkem citrátu a izocitrátu, které zřejmě cestou isocitrát dehydrogenasy zvyšují hladinu NADH a NADPH v matrix. Redukce difulfidového můstku alternativní oxidasy je zřejmě katalyzována thio-redoxinovým systémem.

Obrázek: struktura alternativní oxidasy, vznik dimeru (14.35)

Obrázek: Role alternativní oxidasy, regulace: Obr. 14.33

Hladina enzymu je regulována na úrovni exprese. Byly detegovány nejméně dva izoenzymy. Okolní podmínky jako nízká teplota, sucho, tvorba aktivních forem kyslíku, herbicidy, inhibitory respiračního řetězce zvyšují koncentraci enzymu v buňce. Rovněž vysoká hladina citrátu indukuje transkripci alternativní oxidasy. Enzym se uplatňuje, pokud tok uhlíkatých látek převyšuje kapacitu respiračního řetězce. V případě nízké aktivity respiračního řetězce roste hladina NADH v cytosolu a tudíž dochází k inhibici Krebsova cyklu (regulace poměrem ATP/ADP a koncentrací NAD). Následkem toho roste hladina pyruvátu v buňce a dochází k aktivaci alternativní oxidasy. Vyšší hladina citrátu indukuje transkripci mRNA a syntézu enzymu. Vysoká koncentrace NADPH katalyzuje kovalentní modifikaci enzymu cestou thiooxidinu. Výsledkem je podstatné zvýšení aktivity alternativní oxidasy. To umožní rostlině udržovat dostatečně aktivní respiraci a zabránit poškození díky vniku aktivních forem kyslíku a eventuálně zabránit poškození buňky fermentačními procesy, ke kterým by mohlo docházet při vyšší koncentraci NADH (viz anaerobní glykolýza)..

Obrázek 14.36

Tento faktor je důležitý zejména i u jiných organismů, např. u dřevokazných hub, které žijí na substrátu obsahujícím velmi nízkou koncentraci dusíku oproti polysacharidům. Spálením celulózy až na oxid uhličitý a vodu zapojením alternativní oxidasy se omezí tvorba produktů, které by mohly sloužit jako substrát pro konkurenční organismy a navíc si tímto houba zajišťuje dostatek vody nutný pro svůj růst.

## METABOLISMUS LIPIDŮ

Lipidy hrají v buňce roli strukturní, zásobní i regulační. Jsou hlavní součástí biomembrán, obdobně jako u živočichů. Membrány chloroplastů obsahují vysokou koncentraci galaktolipidů, ostatní membrány jsou složeny převážně z fosfolipidů. Triacylglyceroly tvoří důležitou energetickou zásobárnu buňky. Jejich metabolismus je důležitý zejména u klíčících semen olejnatých rostlin. Důležitými signálními molekulami jsou fosfolipidy, produkty jejich hydrolýzy fosfolipasami, zejména kys. jasmonová. Řada látek lipidního charakteru jsou hormony nebo sekundární metabolity.

### Syntéza mastných kyselin

Syntéza mastných kyselin probíhá u rostlin v plastidech a podobá se obdobným procesům u bakterií. Průběh syntézy je zcela analogický, jak jej známe z obecné biochemie. Zdrojem NADPH, nutného pro redukční reakce je fotosyntéza. AcetylKoA, který je startovní látkou syntézy, vzniká přímo v plastidech

pyruvátdehydrogeasavým komplexem. Pyruvát transportovaný do chloroplastů vzniká při anaerobní glykolýze. Komplex syntasy mastných kyselin v přírodě je dvojího typu. Type I nacházíme u živočichů a kvasinek, a je to multifunkční enzymový komplex. Každá jednotka z tohoto komplexu je schopna katalyzovat několik různých reakcí. Rostliny a bakterie obsahují type II, kdy každá jednotka katalyzuje svoji oddělenou reakci. Tento komplex funguje tedy spíše jako metabolická dráha. Kondenzační reakce, kdy se vytváří nová C-C vazba je katalyzovaná 3-ketoacyl-ACPsynthasou (KAS). Obr. 10.15. Rostliny obsahují tři typy tohoto enzymu.

KAS I preferuje přenos C4-C14 zbytků, KAS II přenáší pouze dlouhé řetězce (C10-C16) a KAS III přenáší acetylovou skupinu, kterou využívá jak primer. Typická reakce končí syntézou mastných kyselin 16:0 a 18:0. Některé rostliny, jako např. kokosová palma produkují větší množství mastných kyselin C10-C12. Poslední reakcí je hydrolýza thioesterové vazby, kdy se mastná kyselina uvolní, nebo přenos acylové skupiny na glycerolipid anebo desaturace acyl-ACPdesaturasou.

Tvorba kyseliny olejové (18:1) je katalyzovaná desaturasou. Tuto reakci jsou schopny provádět všechny eukaryontní a některé prokaryontní organismy. U živočichů probíhá tato reakce se substrátem stearoyl-KoA, enzym se nachází na ER. U rostlin probíhá tato reakce na se substrátem stearoyl-ACP. Enzym obsahuje nehemové železo ve formě Fe-O-Fe, reakce probíhá radikálovým mechanismem a donory reakce jsou ferreoxin nebo cytochrom b6.

Obr. 10.20

Většina rostlinných desaturas je vázána na membrány ER nebo chloroplastů.

Syntéza MK s dlouhým řetězcem

Rostliny obsahují další mastné kyseliny C26-C32, které jsou nutné pro syntézu vosků. Také sfingomyeliny obsahují mastné kyseliny C24 a C22. Rostliny stejně jako další eukaryontní organismy obsahují tzv. elongasy, které jsou schopny doplňovat další douhlikaté zbytky C16 a C18. Tento systém je obdobný syntase mastných kyselin popsany v předchozí kapitole. Tento systém není lokalizovaný v plastidech nýbrž v cytosolu a neobsahuje ACP. Oleje některých rostlin obsahují další MK, které nenajdeme u živočichů.. Mezi nejdůležitější patří polynenasycené mastné kyseliny, jako je kys. linolová a linolenová. Vznikají postupnou desaturací MK v lipidu enzymovými systémy.

Obr. Deaturace 10.26

Další neobvyklé mastné kyseliny mohou obsahovat cis-dvojně vazby, hydroxylové skupiny, epoxidové kruhy, cyklopropylové kruhy apod. Tyto neobvyklé MK jsou často taxonomicky typické. Např. kys. chalmogrová, která se dlouho používala pro léčení lepry, se vyskytuje u rodiny Flacourtiaceae, kys. petroselinová u rodiny Apiaceae (mrkev, petržel), kysl laurová u vavřínovitých roslin a palem. Přítomnost těchto neobvyklých mastných kyselin je velmi důležitá z potravinářského hlediska, protože mohou způsobovat závažné zdravotní problémy. Příkladem je kyselina eruková (20:1<sup>Δ14</sup>) obsažená v řepkovém oleji, u které byla zjištěna souvislost mezi vyšší konzumací a infarktem myokardu. Některé z těchto kyselin jsou silně toxické, jako např. monoacetylenové kyseliny a jsou proto využívány rostlinami jako obranné látky.

## Syntéza lipidů

Obr. 10.25 10.27

## Syntéza lipidů

Syntéza glycerolipidů probíhá u rostlin obdobně jako u živočichů tak, že se na glycerolfosfát přenáší postupně mastné kyseliny za vzniku kys. fosfatidové, která pak buď hydrolyzuje na diacylglycerol, z kterého pak vzniká triacylglycerol, nebo se z něj syntetizují fosfolipidy. Syntéza kys. fosfatidové se u rostlin realizuje dvěma způsoby: buď v plastidech nebo v ER. Plastidová cesta (stejná jako u prokaryontní) zahrnuje přenos acylu přímo z acyl-ACP na glycerolfosfát. V případě druhé cesty (eukaryontní) se acyl exportuje do cytosolu ve formě acylKoA, odkud se přenáší transferasami do lipidů ER. Díky specifitě plastidové acyltransferasy obsahují lipidy syntetizované v plastidech MK většinou 16:0 v poloze sn-2 a 18:1 v poloze sn-1. Acyltransferasa v ER produkuje kys. fosfatidovou obsahující 18:0 nebo 18:1 v poloze sn-2. Mezi oběma kompartmenty existuje čilá výměna. Kys. fosfatidová vznikající v chloroplastech je hydrolyzována na DAG, který slouží jako prekurzor pro syntézu galaktolipidů a sulfolipidů, které jsou tvoří 16% glycerolipidů chloroplastu. Kys. fosfatidová vznikající v ER slouží pro syntézu fosfolipidů pro jiné membrány než plastidy. Na druhé straně DGA vznikající v ER se vrací do chloroplastů, kde z něj vznikají glycerolipidy chloroplastu. Díky specifitě transferas mastných kyselin lze ze složení MK odhadnout, kde daný glycerolipid vzniknul.

Obrázek 10.29, možná 10.30

Transport ve vodě nerozpustných mastných kyselin a glycerolipidů mezi organelami probíhá pomocí tzv. LTP (lipid transfer proteinů). Tyto proteiny jsou malé hydrofilní bílkoviny obsahující uvnitř své molekuly kavitu ve tvaru tunelu, která je schopna vázat uvnitř molekulu mastné kyseliny.

Galaktolipidy a sulfolipidy vzniká v plastidech z kyseliny fosfatidové, která je hydrolyzována specifickou fosfatasou. Vzniklý DAG slouží jako prekurzor syntézy galaktolipidů reakcí s UDP galakotsou, kdy vzniká monogalaktosylDAG a digalaktosylDAG (viz obr. 10.39). Sulfolipidy vznikají cestou přeměny UDP-glukosy na UDP-sulfochinovosu, která pak reaguje s DAG. Přítomnost galaktolipidů a sulfolipidů v chloroplastech má pro rostlinu velký význam. Protože fosfát je u rostlin limitující nutriční prvek, využití galaktolipidů a sulfolipidů, které v membráně nahrazují fosfolipidy znamená pro rostlinu velkou úsporu.

Obr. 10.39 a 10.40.

## Syntéza acylglycerolů

Tyto látky jsou hlavní zásobní formou energie rostlinných buněk. V rostlině jsou přítomny ve formě olejových tělísek. Tato tělíška jsou obklopena jednoduchou membránou, která je odděluje od cytosolu. Hydrofobní část této membrány je orientovaná do vody, zatímco řetězce mastných kyselin jdou orientovány do středu tělíška. Membrána těchto tělísek obsahuje značné množství bílkoviny, zvané oleosin. Tato bílkovina o mol. hm. 10-25 kDa obsahuje sekvenci hydrofobních aminokyselin. N a C-konec bílkoviny tvoří doménu, která spočívá na povrchu olejového tělíška.



Tyto oleosiny se nacházejí v semenech nebo v pylu. Jejich role je zřejmě stabilizovat tato tělíska při nízké koncentraci vody a regulovat jejich velikost. Olejová tělíska semen obsahují velmi často neobvyklé mastné kyseliny, zatímco membrány těchto rostlin obsahují pouze běžné mastné kyseliny. Přítomnost těchto neobvyklých MK by měnila vlastnosti membrán nežádoucím způsobem.

#### Metabolismus mastných kyselin

Oxidace mastných kyselin probíhá u živočichů v matrix mitochondrií. U rostlin probíhá tento proces v peroxisomech (v zelených částech rostliny) a glyoxisomech (klíčící semena). Tyto organely mají u rostlin podobnou strukturu. Zatímco u živočichů je cílem tohoto procesu úplná oxidace a získání energie, u rostlin jsou lipidy pokračující sacharidů, například při klíčení semen. Jednotlivé kroky  $\beta$ -oxidace které probíhají v peroxisomech nebo glyoxisomech jsou totožné s procesem  $\beta$ -oxidace probíhající v mitochondriích. U živočišných mitochondrií jsou tyto enzymy lokalizovány v matrix a jedná se o čtyři samostatné enzymy. V peroxisomech a glyoxisomech probíhá tento proces na enzymovém komplexu. Mastné kyseliny jsou uvolňovány z olejovitých tělísek lipasami a aktivovány na acylKoA. Hlavní metabolický rozdíl spočívá v tom, že FADH<sub>2</sub> vznikající při oxidaci acylKoA se u živočichů oxidován v respiračním řetězci, zatímco u rostlin se oxiduje kyslíkem za vzniku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Velké množství peroxidu je rozkládáno katalasou, která je u peroxisomu a glyoxisomu obsažena ve velkém množství. Zvlášť studována byla oxidace mastných kyselin u semen olejnatých rostlin. AcylKOA je přeměňován cestou glyoxylátového cyklu, který je modifikací Krebsova cyklu. Klíčovým enzymem tohoto procesu je isocitrátlyasa, která štěpí izocitrát na glyoxylát a sukcinát. Sukcinát přechází do mitochondrií, kde z něj vzniká malát a ten přechází do cytosolu. Glyoxylát vzniklý štěpením izocitrátu kondenzuje další molekulu acetylKoA za vzniku malátu, který je poté oxidován na oxalacetát. Tento proces umožňuje zpracování dvou molekul acetylKoA a přitom přitom se rostlina brání ztrátám uhlíku ve formě CO<sub>2</sub>, (ke kterému by docházelo v Krebsově cyklu). Malát je v cytosolu převáděn na sacharidy cestou glukoneogeneze.

Sumární rovnice glyoxylátového cyklu je následující:



Obr. Schéma glyoxylátového cyklu

Úprava olejů a jejich vlastností mutacemi??

## METABOLISMUS DUSÍKATÝCH LÁTEK

Dusík tvoří jeden z nejhodnějších prvků v živých organismech. Vyskytuje se mnoha podobách a mocenstvích.

Tab. 16.1

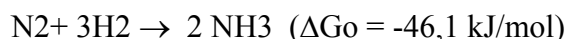
Většina dusíku obsaženého v živých organismech prochází recyklací z dusíkatých látek, které byly předtím obsaženy nebo vyloučeny jiným organismem.

Obr. 16.1??

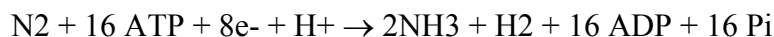
Většina dusíku na Zemi je však přítomna ve formě atmosférického dusíku, který je pro většinu organismů nedostupný. Schopnost fixovat tuto formu dusíku mají pouze prokaryontní organismy. Amoniak vzniklý touto cestou je pak zabudován do uhlíkaté kostry aminokyselin, nebo konvertován nitrifikačními bakteriemi na NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Na druhé straně nitráty jsou redukovány asimilační nebo disimilační cestou na nitrity a přes další metabolity až na amoniak nebo na dusík.

Fixace atmosférického dusíku

Dvojjatomová molekula dusíku je značně inertní látka. Jeho přeměna redukcí vodíkem chemickou cestou je exergonická reakce



Probíhá při vysoké teplotě a tlaku za katalýzy železem (Haber-Boschova syntéza) z důvodů vysoké aktivační energie. Tuto reakci jsou schopny katalyzovat některé prokaryontní organismy tzv. diazotrofy, z nichž některé žijí v symbióze s rostlinami. Souhrnná rovnice této energeticky náročné reakce je následující.



Tabulka: Příklady diazotrofů

Tyto procesy byly studovány na volně žijících organismech jako Clostridium, Klebsiella, Azotobacter, atd. Tato reakce je katalyzována nitroenasovým komplexem. Tento komplex byl izolován z bakterií a byla stanovena jeho trojrozměrná struktura. Skládá se ze dvou proteinů: Fe proteinu a MoFe proteinu. MoFe protein je heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) o celkové hmotnosti 240 kDa. Je kódován dvěma strukturálními geny nifD a nifK. Fe protein je homodimer ( $\gamma_2$ ) o celkové mol. hmotnosti 128 kDa a je kódován strukturálním genem nifH. Fe protein, jehož standardní redox potenciál je -400 mV přijímá elektrony od ferredoxinu nebo flavodoxinu a přenáší je na MoFe protein, kde probíhá vlastní redukce dusíku. Oba dva proteiny, Fe protein a MoFe protein, obsahují velmi neobvyklé typy železosírných klusterů. Celý tetramer MoFe proteinu obsahuje 4 FeS klustery dvojího typu. První z nich (P-klaster) je 8Fe-7S klaster je kovalentně vázaný k bílkovině železem přes cysteinové zbytky. Jeho struktura je znázorněna na obrázku. Skládá se ze dvou polovin. První část se podobá Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> klasteru, druhá polovina obsahuje pouze 7 atomů: Fe<sub>4</sub>S<sub>3</sub>. Jeden z atomů síry je vázán v oxidovaném stavu 4 vazbami, zatímco v redukovaném stavu 5 vazbami. Tato prostetická skupina se v redukovaném stavu podobá dvěma klusterům typu Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, zatímco v oxidovaném stavu se dolní klaster otevře. Druhý typ klasteru obsahuje molybden. Existují 3 formy tohoto kofaktoru: FeMo-klaster, FeV-klaster,

FeFe-kluster. Nejefektivnější formou je FeMo-kluster. Tato forma existuje u symbiotických bakterií. Volně žijící bakterie mohou v případě molybdenové deficiencie syntetizovat FeV-nebo FeFe-kluster. Tato forma je vázaná v nitrogenase přes jediný cystein a histidinový zbytek. Struktura FeMo-klasteru je ukázána na obrázku. Skládá se ze dvou polovin. První polovina je 4Fe-3S klaster a druhá polovina je 1Mo-3Fe-3S. Tyto dva klastery jsou přemostěny třemi atomy síry. Atom molybdenu je vázán na 3 atomy síry, na histidinový zbytek a molekulu homocitrátu.

Obr.16.8. 16.9

Fe-protein, první část nitrogenasového komplexu je homodimer, který váže klaster pouze jediný 4Fe-4S, což je neobvyklé. Tento enzym je schopen vázat MgADP nebo MgATP. Přitom se velmi výrazně mění jeho konformace. Při vazbě ATP se FeS klaster Fe-proteinu posouvá směrem dolů směrem k P-klasteru MoFe-proteinu.

#### Mechanismus redukce

Substrátem enzymu je nejen molekulární dusík, ale také další látky jako je H<sup>+</sup>, acetylén, kyanid, azid, oxid dusný a další. Oxidovaný Fe-protein je redukován jedním elektronem pocházejícím z ferredoxinu. Poté váže 2 molekuly ATP. Po konformační změně dojde k redukci FeMo-proteinu. Vazba ATP na Fe-protein totiž silně snižuje redoxní potenciál jeho FeS klasteru. Poté se 2 molekuly ATP hydrolyzují na ADP. Oxidovaný Fe-protein je opět redukován 1 elektronem, váže 2 molekuly ATP a redukuje FeMo-protein. Přenos 2 elektronů tedy souvisí s vazbou 4 molekul ATP. Přenos redukčních ekvivalentů přes FeMo-protein jde nejdřív přes P-klaster, kde se elektrony akumulují a poté se přenesou na FeMo-kofaktor. Na tento kofaktor se váže substrát, tedy N<sub>2</sub>. Vedlejší produkt nitrogenasové reakce je H<sub>2</sub>. Mezi produktem redukce dusíku je hydrazin: N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Pro úplnou redukci dusíku na NH<sub>3</sub>, je tedy zapotřebí 6 elektronů a tudíž 12 ATP, zbývající 4 ATP se spotřebují na redukci H<sub>2</sub>. Přesný molekulární mechanismus redukce N<sub>2</sub> není ještě zcela objasněn. Poměr mezi vznikajícím H<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> však závisí na dalších faktorech, jako je například parciální tlak dusíku. Navíc, H<sub>2</sub> může zpětnou inhibicí blokovat syntézu NH<sub>3</sub>, protože s e váže do aktivního místa N<sub>2</sub>.

Obrázek, asi vlastní, cyklus redukce

Aktivita enzymu se měří pomocí substrátu acetyleny, který se redukuje na ethylen. Koncentrace této látky se stanovuje pomocí plynové chromatografie. Nitrogenasa, a to její Fe-protein je velmi citlivá na kyslík, proto probíhá u anaerobních organismů. Anaerobní glykolýza i anaerobní respirace však nejsou dostatečným zdrojem ATP. Z tohoto důvodu musí anaerobní bakterie metabolizovat veliké množství substrátu. Aerobní organismy, např. ty které žijí v symbiose s rostlinami zajišťují velké množství ATP v respiračním řetězci. V tom případě, ale musí existovat mechanismus, který ochrání nitrogenasu před zhoubným vlivem kyslíku.

Funkce nitrogenázy vyžaduje striktně anaerobní podmínky, na druhé straně je však určitá koncentrace kyslíku u aerobních diazotrofů nutná pro zajištění ostatních životních pochodů. Tyto dva neslučitelné požadavky jsou řešeny různou strategií ochrany nitrogenázy před atmosferickým kyslíkem, např.:

- a) fotosyntetizující mikroorganismy neobsahují fotosystém II a nedochází tedy k produkci kyslíku.

- b) respirační řetězec některých diazotrofů neslouží ani tak k produkci ATP spíše jako k odstranění kyslíku. Donorem tohoto respiračního řetězce může být i vodík produkovaný v průběhu nitrogenázové reakce.
- c) symbiotické diazotrofy (vikvovité rostliny) jsou chráněny **leghemoglobinem** produkovaným rostlinou. Tento hemoprotein má vysokou aktivitu ke kyslíku, chrání Rhizobium před poškozením a současně je zásobuje kyslíkem nutným pro respiraci.

### Symbiotická fixace dusíku rostlinami

Symbiotická fixace dusíku má velký význam. Skoro 80% dusíku, který rostliny využívají pochází ze symbiosy. Existuje několik typů této symbiosy. První z nich se účastní Gram-negativní bakterie, rhizobia, které žijí v symbiose s luštěninami (sója, čočka, fazole, hrách, vřetěška, apod.). Druhý nejrozšířenější typ symbiosy je Gram-pozitivními aktinomycetami (Frankia), které žijí v symbiose se stromy a keři. Tato symbiosa je nesmírně důležitá v lesních ekosystémech. Nejlépe popsáným typem symbiosy je interakce mezi Rhizobii a luštěninami. Evoluční původ této symbiosy není zcela objasněn. Hostitelská rostlina dovoluje invaznímu organismu proniknout do kořenového systému. Proniknutí rhizobií do rostliny je charakterizováno tvorbou nodulů. Tyto noduly jsou tvořeny zcela rostlinným materiálem. Po proniknutí do buňky vytvářejí rhizobia bakteroidy, které jsou morfologicky odlišné od volných bakterií. V jádře rostliny jsou obsaženy série genů nutných pro vývoj nodulů. Tyto geny se obecně nazývají noduliny. Jedním z těchto genů kódovanou rostlinou je gen pro leghemoglobin, protein vázající kyslík. Další geny kódují nízkomolekulární látky typu flavonoidů, které se podílejí na expresi nodulačních genů bakteroidu. Geny nacházející se v bakterii a zodpovědné za syntézu nitrogenasy se nazývají *nif* geny. Bakteriální geny zahrnuté do procesu nodulace se nazývají *nod* geny (A, B, C a D) obsažené v plasmidu bakterie. Tyto geny nejsou exprimovány ve volně žijící bakterii, s výjimkou *nodD*, exprimovaným konstitutivně. *NodD* má schopnost vázat specifické flavonoidy vylučované kořeny hostitelské rostliny. Po vazbě flavonoidů se *nodD* stává transkripčním aktivátorem ostatních *nod* genů bakterie, které kódují enzymy syntézy nodulačních faktorů. *NodD* systém spolu s flavonoidy reguluje nejméně 20 operonů.

Struktura těchto flavonoidů, typických pro jednotlivé luštěniny je ukázána na obr.

#### Obr. Struktura flavonoidů

Produktem nejdůležitějších *nod* genů jsou tzv. *Nod*-faktory. Jedná se o lipooligosacharidy, deriváty chitinového typu. Tato struktura (3-5 N-acetylglukosaminových zbytků) je kódována *NodC* a je modifikována acylací neredukujícího konce faktory *NodA* a *NodB* a další modifikací, například acylací nebo vazbou fukosových zbytků.

#### Obr. Struktura nodulačních faktorů 16.24,

Tyto nodulační faktory působí pouze na hostitelské rostliny. Nodulační faktory se pravděpodobně vážou na specifické receptory na povrchu plasmatické membrány hostitelské buňky. Vazba těchto látek o koncentraci nižší než  $10^{-9}$  M vyvolává během několika minut depolarizaci membrány, což je spojeno s výtokem chloridů a

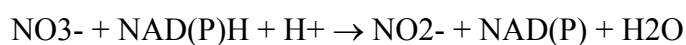
draselných iontů. Nodulační geny vyvolávají expresi genů hostitelské rostliny. Tyto geny se nazývají noduliny. Tato detekce byla pozorována 6 h po infekci. Vazba Nod faktorů vyvolává produkci obranných proteinů rostliny (jako jsou prolin-rich proteiny, peroxidasy, apod.). Dělení buněk v místě invaze je pozorováno asi 18 - 30 po infekci. Signály, které koordinují morfogenezi však nejsou objasněny. Je zajímavé, že houby obecně produkují tzv. elicitory, které jsou chitooligosacharidy obsahující 5-7 N-acetylglukosaminových jednotek. Tyto látky se od Nod-faktorů liší nepřítomností mdfifikujících skupin, jako je např. acylová skupina. Jejich interakce s rostlinou vyvolává podobné reakce, jako u Nod-faktorů, tzn. depolarizaci membrány, výtoky iontů a syntézu obranných látek, nedochází však k nodulaci. Nod-faktory a chitinové elicitory se tudíž vážou na odlišné receptory a regulují expresi odlišných genů. Uvnitř nodulu je generováno specifické mikroprostředí, které umožňuje zásobování buňky kyslíkem za účelem produkce ATP a současně brání nitrogenasu před zhoubným vlivem kyslíku. Toto je zajištěno tím, že některé části parenchymu nodulu tvoří nepermeabilní bariéru pro kyslík. Dalším faktorem je leghemoglobin produkovaný rostlinou. Tento monomerní hemoprotein a je obsažen v cytoplasmě. Jedna molekula leghemoglobinu váže jednu molekulu kyslíku. Tato látka koordinuje přenos kyslíku uvnitř nodulu. Obdobně jako hemoglobin je by mohla být ovlivňována malými molekulami, mechanismus však není znám. Koncentrace kyslíku v nodulu je dále regulována respiračním řetězcem. Cytochromoxidasa bakteroidu má vysokou afinitu ke kyslíku ( $K_m = 8 \text{ nM}$ , zatímco  $K_m$  rostlinného enzymu se pohybuje v oblasti  $100 \text{ nM}$ ). Je zajímavé že  $K_m$  enzymu ve volně žijící bakterii je zhruba  $50 \text{ nM}$ . Kyslík je spotřebováván bakteriální respirací za vzniku ATP. Toto ATP je využíváno nitrogenasou. Pokud koncentrace kyslíku vzroste, dojde k inaktivaci nitrogenasy, zastaví se spotřeba ATP a vysoký poměr ATP/ADP inhibuje reparaci.

Obr. 16.30 Faktory regulující zásobování nodulu kyslíkem.

Syntéza nitrogenasy je regulována kyslíkem na úrovni exprese. Produkty fotosyntézy syntetizované rostlinou vstupují do nodulu jako sacharosa, avšak bakteroidem jsou využívány ve formě organických kyselin, jako PEP, oxalacetát nebo malát. Oxalacetát je cestou Krebsova cyklu přeměňován na 2-oxoglutarát, látku nutnou pro vazbu amoniaku vytvořeného nitrogenasou. Méně podrobně je popsána symbióza mezi dvouděložnými dřevinami a aktinomycetou *Frankia*. I když jejich interakce vede k tvorbě nodulů, symbiont není obalen peribakteroidní membránou nýbrž vrstvou polysacharidů pocházejících z rostliny. Je popsána přítomnost látky podobné hemoglobinu mající stejnou úlohu jako leghemoglobin u vikkovitých rostlin.

Asimilace nitrátu a nitritu

Nitrát je důležitým zdrojem dusíku pro rostlinu. Prvním krokem asimilace je redukce na nitrit, katalyzovaná enzymem nitrátreduktasou (NR)



Nitrátreduktasa je metaloenzym tvořící homodimer nebo homotetramer. Mol.hmotnost monomeru je  $115 \text{ kDa}$ . Tento enzym obsahuje 3 kofaktory: FAD,

hemové železo a molybdenový kofaktor MoCo. V tomto kofaktoru je molybden vázán ve formě komplexu s molybdopterinem (na rozdíl od nitrogenasy)

Obr. 16.39.A

Sekvence přenosu elektronů je od NADH, na hem a dále na MoCo směrem k nitrátu

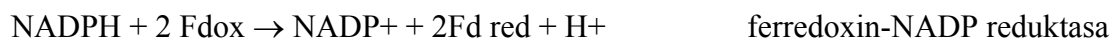
Obrázek, 16.38

NR monomer má tři hlavní domény, vázající FAD (C-konec enzymu), hem (uprostřed enzymu) a MoCo (poblíž N-konce enzymu). Enzym obsahuje regulační oblasti, které jsou fosforylované kinasou a dále vážou 14-3-3 proteiny. Struktura FAD-vázající oblasti je vysoce homologní ferredoxin-NADP oxidoreduktase (fotosyntéza). Oblast vázající hem je velmi podobná hemoproteinům typu cytochrom b5. Poslední oblast obsahující MoCo se podobá enzymům typu xanthinoxidasy, sulfitoxidasy, a dalším. NR je lokalizována v cytosolu buněk vegetativních orgánů, jako jsou kořeny nebo listy. Vysokou aktivitu najdeme v epidermálních buňkách nebo buňkách kortexu blízko povrchu kořene. C4 rostliny obsahují vysokou koncentraci NR v mesofylu, který generuje vysokou hladinu NADPH při fotosyntéze. Enzym je schopne redukovat chlorečnan na chloritan, který je toxický, což je podstatou herbicidního účinku chlorečnanu. Vegetativní orgány obsahují kromě NR současně nitrireduktasu, a to v koncentraci mnohonásobně vyšší než NR. Tím se zajistí efektivní odbourání vznikajícího nitritu. NR je regulována několika faktory, jako je koncentrací nitrátu a dusíkatých metabolitů (zejména glutaminu), dále uhlíkatými metabolity, hormony nebo světlem. Transkripce NR genu je velice efektivní. Koncentrace mRNA pro NR vzroste v buňce po přidavku nitrátu během několika minut. Je zajímavé, že v listech vyžaduje exprese NR přítomnost funkčních chloroplastů, což zajišťuje že vznikající nitrit bude odbourán. Pro maximální indukci NR je vyžadováno světlo a dostatek uhlíkatých metabolitů, např. sacharosy. Nadbytek dusíkatých látek tuto indukci blokuje, regulačním metabolitem je pravděpodobně glutamin. Aktivita NR je posttranslačně regulována kovalentní modifikací příslušné proteinkinasy a v obráceném směru pomocí proteinfosfatasy. Fosforylace na serinovém zbytku způsobuje inaktivaci NR, k této inaktivaci však dochází až po vazbě 14-3-3 proteinu. Faktorem vyvolávajícím tuto inaktivaci je nedostatek světla nebo nízké koncentrace CO<sub>2</sub>.

Obrázek: 16.42 zjednodušený

Redukce nitritu

Navazující reakcí NR je redukce vznikajícího nitritu šesti elektrony pomocí nitritreduktasy (NiR). Enzym je lokalizován v plastidech. Zdrojem redukce je ferredoxin, který ve fotosyntetizujících orgánech je redukována světlem a v kořenech enzymem ferredoxin-NADP reduktasou pomocí NADPH

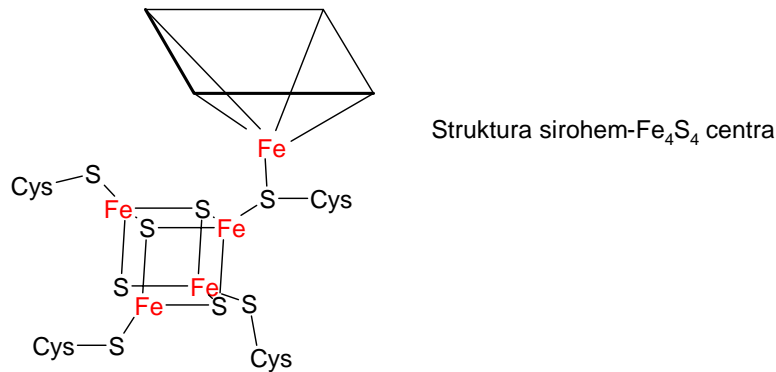


Vlastní NiR je monomerní enzym o mol. hmotnosti 60 - 70 kDa, který má dvě funkční domény a kofaktory. N-terminální část váže pravděpodobně ferredoxin, C-

terminální část obsahuje 4Fe-4S klaster a sirohem. Sirohem je hemoprotein obsahující tetrahydroporfyryl s osmi karboxylovými skupinami v bočním řetězci.

Obrázek: struktura sirohemu

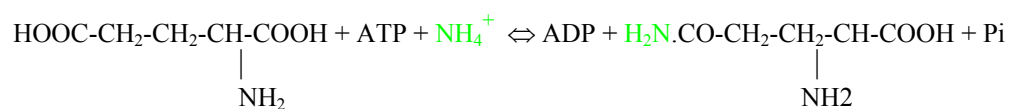
Struktura NiR 16.43 (sehnat 3D strukturu NiR)



Nitrit vznikající v cytosolu je transportován do plastidů, kde je redukován. NiR je transkripčně regulována současně s NR, a to světlem a nitrátem. Efektivní redukce nitritu vyžaduje intenzivní světlo, z tohoto důvodu obsahuje jarní zelenina poměrně vysokou koncentraci nitrátu.

Asimilace amoniaku

Amoniak se do rostliny dostává mnohými cestami. Transportem NH<sub>4</sub><sup>+</sup> z vnějšího prostředí, fixací vzdušného dusíku, nitrátovou asimilací anebo jako produkt fotorespirace nebo deaminace aminokyselin. Primárním enzymem, který inkorporuje amoniak do uhlíkaté kostry je u rostlin glutaminsyntetasa. Katalyzuje přenos dusíku do amidické skupiny L-glutaminu

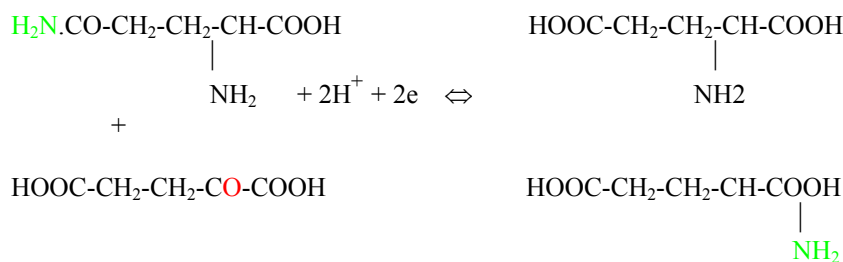


Meziproduktem reakce je glutamylfosfát, který je hydrolyzován amoniakem. Rostlinná GS je oktamer o mol. hmotnosti celkem 350 - 400 kDa. Glutaminsyntetasa (GS) se vyskytuje ve formě izoenzymů. V cytosolu se vyskytuje izoenzym GS1 a v plastidech izoenzym GS2. Oba dva enzymy jsou vysoce homologní, avšak jsou produkty rozdílných genů. Izoenzym GS2 je homooktamer kódovaný jedním jaderným genem. Izoenzym GS1 je heterooktamer, který se skládá ze dvou až čtyř typů podjednotek, které jsou opět kódovány jaderným genomem. U luštěnin, které žijí v symbiose s rhizobii produkují noduly další izoenzym GS<sub>n</sub>. Funkce izoenzymů GS je rozdílná. Izoenzym GS2 převládá v listech, kde asimiluje amoniak vznikající např. nitrátovou asimilací nebo dusík vznikající při fotorespiraci. Geny pro GS2 jsou exprimovány zejména v mezofyly. GS1 je obsažena v listech pouze v nízké koncentraci, oproti kořenům. Jeho role je asimilace amoniaku, který se transportuje nebo vzniká v kořenech. Geny pro GS1 se exprimují zejména ve floemu a GS1 tedy zajišťuje syntézu glutaminu, který je transportován na delší vzdálenosti. GS je velmi

efektivní systém asimilace amoniaku. Její  $K_m$  pro amoniak je řádově 3 - 5  $\mu\text{M}$ . Specifickými inhibitory této reakce jsou glutamátové analogy methionin sulfoximin nebo fosfinotricin. (viz obrázek).

### Glutamátsyntasa

L. glutamin je redukčně deaminován reakcí s oxoglutarátem enzymem glutamátsyntasou (GOGAT: glutamin:oxoglutarát aminotranferasa)



Ve vyšších rostlinách existují dvě skupiny GOGAT. První z nich je ferredoxin dependentní (Fd-GOGAT) a najdeme ji výlučně ve fotosyntetizujících organismech. Druhý enzym NAD(P)H-dependentní GOGAT existuje v rostlinách a bakteriích. U rostlin se oba typy enzymů vyskytují v plastidech. Fd-GOGAT je Fe-S protein skládající se z jedné podjednotky 140-160 kDa. NADH dependentní glutamátsyntáza je rovněž monomer zhruba 200 kDa. Imunologické studie prokazují, že příbuznost ferredoxinového enzymu a NADH enzymu je velmi malá, jedná se tudíž o dva různé proteiny. Cyklus GS/GOGAT je u rostlin hlavní drahou asimilace amoniaku.

Obr. 8.6.

Zatímco u GS je rozdílná funkce izoenzymů GS1 a GS2 mimo pochybnost, u GOGAT není role obou enzymů zcela objasněna. Ferredoxinový enzym najdeme v listech a je zodpovědný za více jak 95% aktivity. NADPH dependentní enzym je sice přítomen v nízkých koncentracích v listech, avšak tvoří dominantní izoenzym v nezelených orgánech jako jsou kořeny. Fd-GOGAT se tedy zřejmě podílí na asimilaci amoniaku vznikajícího při fotorespiraci, zatímco NADPH dependentní enzym asimiluje amoniak vznikající primární cestou, např. redukcí nitrátu. Mutanty deficientní na Fd-GOGAT jsou poškozovány v případě, pokud u rostliny probíhá fotorespirace, avšak jsou schopny asimilovat amoniak vzniklý primární cestou. Nízká koncentrace NADPH-dependentní GOGAT je zřejmě dostatečná k asimilaci amoniaku. Jiným enzymem, který se u bakterií podílí na asimilaci amoniaku je glutamátdehydrogenasa:



Reakce je posunuta ve prospěch syntézy glutamátu. U rostlin hraje tato cesta zřejmě roli pouze v případech silného nadbytku amoniaku, z důvodu relativně vysoké hodnoty  $K_m = 10 - 80 \text{ mM}$ , která se v listech nevyskytuje. Předpokládá se, že by hlavní roli enzymu byla spíše deaminace glutamátu na amoniak. Dusík přenesený na L-glutamát se účastní transaminačních reakcí katalyzovaných transaminasami, z nichž nejdůležitější je aspartátaminotranferasa. U C4 rostlin slouží



aspartát k transportu substrátů z mezofylových buněk do buněk pochev cévních svazků.

#### Transportní a zásobní formy dusíku

Transportní a zásobní formy dusíku jsou dusíkaté látky obsahující vysoký poměr N:C. Tento transport je důležitý především v klíčícím semeni, stárnutí rostliny, transport dusíku z nodulů, apod.. Jednou z nejdůležitějších látek je asparagin. Poměr N:C u asparaginu je 2:2, zatímco u glutamátu 1:5. Asparagin byl první aminokyselinou, která byla izolována zhruba před 200 roky. Vyskytuje se ve vysokých koncentracích ve floemu. Syntézu asparaginu katalyzují dva enzymy: Glutamin-dependentní a amoniak-dependentní asparaginsyntetasa. Tato reakce využívá ATP. Obecně platí, že  $K_m$  pro glutamin je nižší než  $K_m$  pro amoniak. Například u sóji je  $K_m$  pro glutamin 0.18 mM, zatímco pro amoniak 3 mM.

#### Obr. 8.19

Syntéza asparaginu je u některých rostlin velmi výrazně inhibována světlem a sacharosou. Luštěniny lze podle transportující se formy dusíku rozdělit na ty, které transportují amidy (asparagin, glutamin), což jsou zejména luštěniny mírného pásma nebo ureidy v případě luštěnin tropického původu, jako je sója.. Těmito ureidy je např. allantoin nebo kys. allantoová.

#### Obrázek ureidů

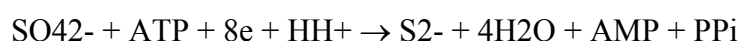
Cesta syntézy ureidů je složitá. Vznikají z purinové baze inosinmonofosfátu přes xanthin a kys. močovou. Přes složitost je syntéza ureidů o 50% levnější (ATP) než syntéza asparaginu. Cesta odbourání ureidů je rovněž složitá a v principu se jedná o postupné odbourávání allantoinu na allantoát, ze kterého se pak odštěpuje močovina rozkládaná ureázou na oxid uhličitý a amoniak. Skladovací formou dusíku u dřevin je arginin.

#### Metabolismus síry

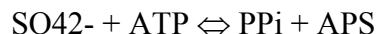
Síra je vyskytuje v buňce buď v redukované formě, SH-skupiny, je součástí vitaminů. Jako sulfátový ester je součástí polysacharidů. Nejdůležitější látkou obsahující síru je peptid glutathion. Hlavní formou, která se transportuje do rostliny je síran. Síran se přes plasmatickou membránu transportuje kotransportem s protony, stechiometrie přenosu je  $3H^+/SO_4^{2-}$ , transport je tedy elektrogenní. Ukazuje se však, že rostliny obsahují několik transportních systémů pro sírany. Transportní systém přenášející sírany do vakuoly je zřejmě uniport řízený velikostí transmembránového potenciálu, který je kladný uvnitř.

#### Obr. Transport síranu 16.56, do vakuoly??

Redukce síranu probíhá v chloroplastech, sírany tvoří součást obsahu vakuoly. Redukce síranu probíhá v několika stupních, výsledkem redukce je sulfid.



Tato reakce je energeticky náročná ( $\Delta G_0 = 732 \text{ kJ/mol}$ ). Energie je kryta jednak pomocí ATP a dále reduktanty pocházejícími z fotosyntézy (u nezelených částí rostliny zřejmě pomocí NADPH redukovaného v pentosafosfátovém cyklu). Prvním krokem reakce je aktivace sulfátu na adenosin-5'-fosfosulfát (APS) enzymem ATP-sulfurylasou.



strukturní rovnice

APS obsahuje makroergickou vazbu mezi fosfátem a síranem a reakce je silně posunuta doleva ( $\Delta G_0 = +42 \text{ kJ/mol}$ ). Vznikající difosfát je hydrolyzován pyrofosfatasou, čímž se reakce posouvá více doprava. Enzym je lokalizován zejména v chloroplastech, minoritní podíl izoenzymů obsahuje cytosol.. Enzym je tetramer o mol. hmotnosti 4x 50 kDa.

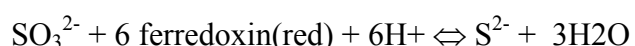
Průběh redukce APS na sulfid není zcela objasněn. S největší pravděpodobností se síran redukuje na siřičitan. Enzym redukující siřičitan na sulfid je v rostlině dobře znám. Jedna z hypotéz předpokládá, že APS se fosforyluje pomocí ATP na fosfoadenosinfosulfonát (PAPS)

rovnice

a ten se pak redukuje PAPS reduktasou na siřičitan. Zdrojem redoxních ekvivalentů je thioredoxin (tato cesta existuje u mikroorganismů a cyanobakterií). PAPS reduktasa však u rostlin zatím nebyla popsána. Druhou možností je přímo redukce APS pomocí APS reduktasy. Zdrojem redukce je redukovaný glutathion. Tento enzym byl popsán u Arabidopsis.

obr. 16.61

Sulfitreduktasa katalyzuje redukci siřičitanu na siřník.



V nezelených částech rostliny probíhá redukce pomocí NADPH. Struktura enzymu připomíná nitritreduktasu a je s ní silně homologní. Enzym obsahuje sirohlem jako kofaktor a klaster 4Fe-4S. Je složen ze 2 - 4 podjednotek (64 - 70 kDa). Sekvenční analýza prokázala, že oba enzymy patří do jedné superrodiny anionreduktas. Sulfitreduktasa ze špenátu je schopna redukovat nitrit, i když afinita enzymu pro nitrit je mnohem nižší.

Siřník vznikající redukcí sulfitu je inkorporován do molekuly cysteinu sledem dvou reakcí. První reakce tvorba O-acetylserinu ze serinu a acetyl-Koa. Druhá reakce je thiolysou.

Obrázek 16.64

Ačkoli redukce síran u vyžaduje redukovaný ferredoxin, nezdá se být regulována světlem, na rozdíl od enzymů redukce nitrátu. Enzymy jsou vysoce aktivní ve vyvíjející se rostlině, zatímco v dospělé rostlině aktivita silně klesá. Při nedostatku

síry v rostlině aktivita enzymů rovněž silně vzrůstá (opačně je tomu u nitrátu, kdy enzymy jsou exprimovány v přítomnosti nitrátu).

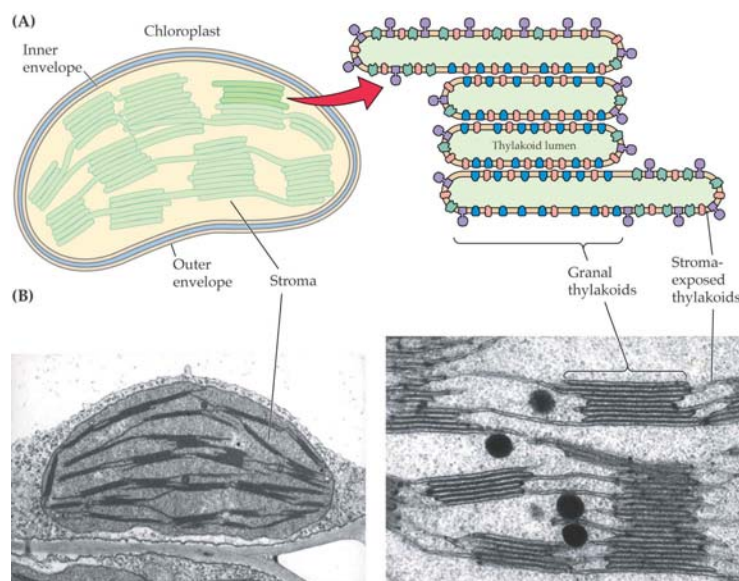
### Asimilace CO<sub>2</sub> - fotosyntéza

Fotosyntéza je oxidoredukční proces, kdy se CO<sub>2</sub> redukuje na cukerné látky (CH<sub>2</sub>O). Redukující látkou H<sub>2</sub>X je nejčastěji voda, vznikající oxidovanou látkou X je pak kyslík. Tato redukce je silně endergonická. Změna volné energie po tvorbu jedné hexosy je  $\Delta G_0 = +2840 \text{ kJ/mol}$ , tato energie je kryta elektromagnetickým zářením.



U eukaryotních organismů je tento proces lokalizovaný ve speciálních plastidech - chloroplastech. Předpokládá se, že tato organela vznikla endosymbiosou protoeukaryotní buňky a fotosyntetizující bakterie. Chloroplast obsahuje vnitřní membránový systém zvaný thylakoidy. Vnitřek chloroplastu se neztývá stroma. Membrána thylakoidu odděluje lumen thylakoidu od stroma chloroplastů. Některé thylakoidy jsou stohovány a pod mikroskopem se jeví ve formě tzv. gran.

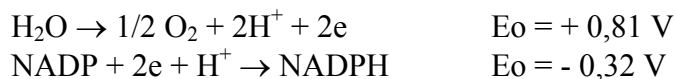
Obrázek chloroplastu 12.1  
Granální thylakoidy a thylakoidy stromatu



Fotosyntéza zahrnuje dvě fáze, světelnou (tzv. Hillovu reakci) a temnou (tzv. Calvinův cyklus). První z nich produkuje ATP, NADPH a eventuelně O<sub>2</sub>, které jsou pak využívány při temné fázi, tj. redukci oxidu uhličitého. Tyto reakce jsou lokalizovány v rozdílných částech chloroplastu: světelná fáze probíhá na thylakoidní membráně, temná fáze ve stroma chloroplastu.

#### Světelná fáze fotosyntézy

Při Hillově reakci se využívá energie světla k oxidoredukční reakci, kdy se NADP<sup>+</sup> redukuje na NADPH a voda se oxiduje na kyslík. Tento typ fotosyntézy se nazývá oxygenní.



$$\Delta E_0 = -1,14 \text{ V}$$

$$\Delta G_0 = +220 \text{ kJ/mol}$$

Standardní volná energie této reakce je tedy  $\Delta G = +220 \text{ kJ/mol}$ .

Přenos elektronů přes fotosyntetické komplexy je spojen s produkcí elektrochemického potenciálu protonů, který je využit k syntéze ATP enzymem ATP-synthasou.



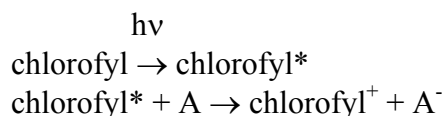
Existuje však typ fotosyntézy, kdy nedochází k uvolňování kyslíku, tzv. fotosyntéza anoxygenní, např. kdy nedochází k oxidaci vody, nýbrž  $\text{H}_2\text{S}$ , takže produktem reakce je síra, nebo v případě tzv. cyklického transportu elektronů, kdy je energie světla využívána pouze k produkci ATP

Tato reakce je umožněna díky speciálním barvivům zvaným chlorofyly. Světelné kvantum je absorbováno elektronovým systémem těchto chlorofylů, který se přitom excituje do tzv. excitovaného singletového stavu (nazývaný proto, že se spin elektronu se při excitaci nemění). Množství pohlcené energie  $\Delta E$  je přitom nepřímo úměrné vlnové délce světla.

$$\Delta E = hc/\lambda$$

Tento stav trvá velmi krátkou dobu (řádově  $10^{-9}$ s). Během tohoto stavu se může spin elektronu obrátit a molekula přejde do tripletového stavu, jehož doba života je nesrovnatelně delší (řádově až sekundy). Návrat elektronu do základního stavu může proběhnout tzv. relaxací, kdy se energie vyzáří ve formě tepla, nebo fluorescencí, kdy je energie vyzářena ve formě fluorescenčního záření. Třetí možností je tzv. transfer energie, kdy se energie přenesou postupně na další molekuly, které se nacházejí v těsné blízkosti. Poslední, a v případě fotosyntézy nejdůležitějším pochodem, je přenos náboje, kdy se elektron přenesou na akceptor, který se tímto redukuje.

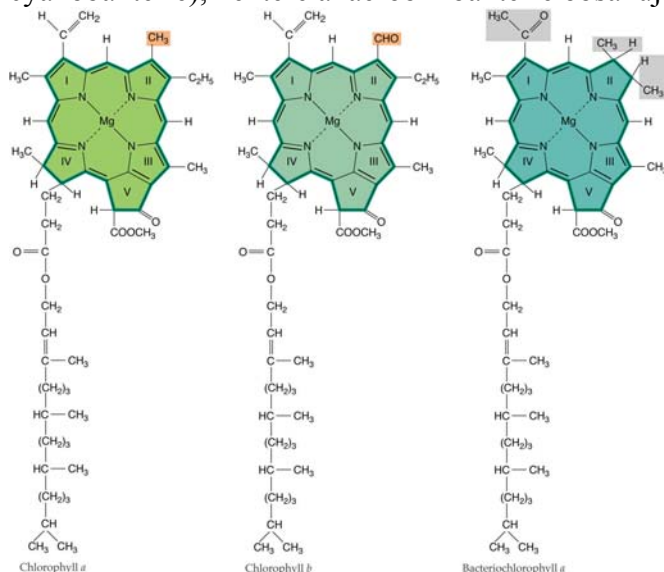
Obrázek elektronových přechodů



Energie 1 fotonu o vlnové délce 700 nm je  $2,83 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ . Tato energie je absorbována při excitaci molekuly chlorofylu ze základní hladiny na hladinu excitovanou. 1 mol chlorofylu ( $6,02 \cdot 10^{23}$  molekul) pohltí tedy 170 kJ. Pro redukci 1 molekuly NADP je tedy zapotřebí teoreticky 1-2 fotony. Praktická hodnota je však 4 fotony (viz níže). Světelná energie může být rovněž využita k tvorbě protonmotivní síly přes membránu thylakoidů a tudíž k syntéze ATP prostřednictvím ATP-synthasy.

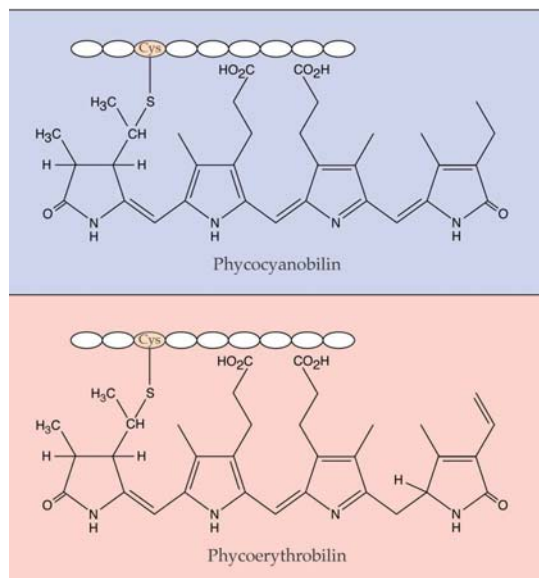
## Struktura a funkce fotosyntetických pigmentů

Většina fotosyntetizujících organismů obsahuje chlorofyl (rostliny, řasy a cyanobakterie), některé anaerobní bakterie obsahují bakteriochlorofyl.



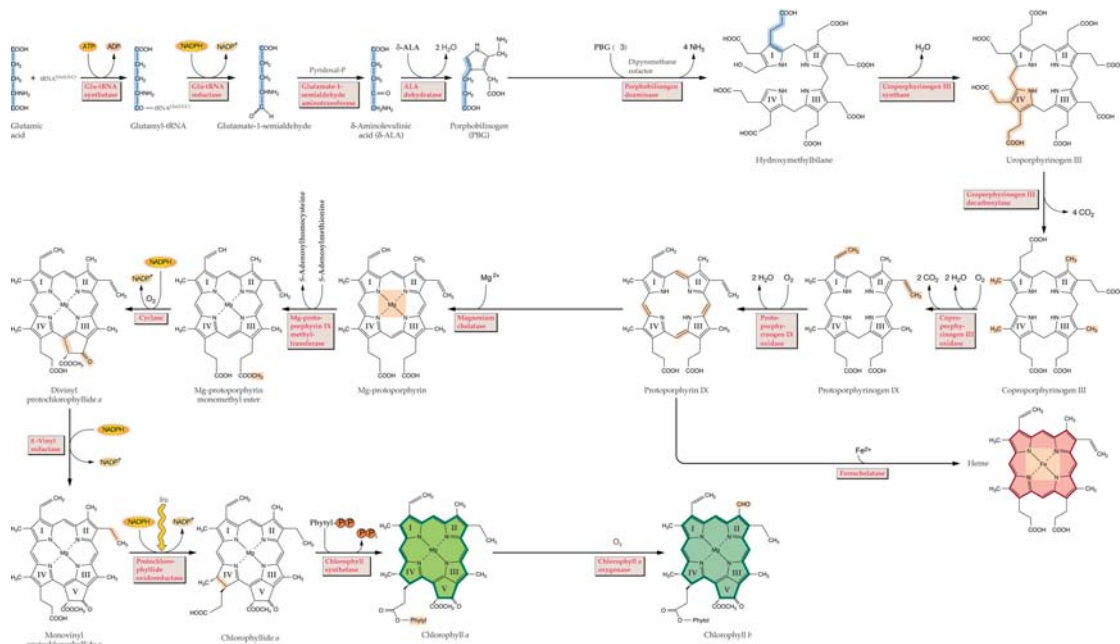
Některé bakterie obsahují další pigmenty absorbující zelené světlo, tzv. fykobiliny. Součástí fotosyntetických systémů jsou navíc karoteny.

Všechny fotosyntetizující organismy produkující kyslík obsahují chlorofyl a a karoteny. Rostliny a zelené řasy obsahují navíc chlorofyl b. Některé eukaryontní organismy obsahují namísto chlorofylu b jiné chlorofyl b, c, nebo d. Červené řasy a cyanobakterie obsahují kromě chlorofylu a fykobiliny.



Struktura chlorofylů se podobá hemu, s následujícími nejpodstatnějšími rozdíly: chlorofyly mají atom chelatovaného  $Mg^{2+}$  namísto železa, obsahují dlouhý hydrofobní řetězec  $C_{20}$ , zvaný fytol a obsahují kromě čtyř pyrrolových jader navíc pátý kruh. Syntetická dráha chlorofylů do stadia protoporphyrinu IX je totožná s hemem. Od tohoto bodu se obě dráhy větví. Enzymem magnesiumchelatasou se do molekuly inkorporuje  $Mg^{2+}$ , poté dochází k methylaci řetězce na kruhu III a vytvoření cyklu V. Po redukci vinylové skupiny na kruhu II se redukuje kruh IV. Po připojení fytolového

zbytku vzniká chlorofyl a. Chlorofyl b vzniká oxidací methylové skupiny na formylovou na kruhu II.



Chlorofyly mají dvě hlavní absorpční maxima. První v oblasti kolem 430 nm (absorpce modrého světla), druhé maximum kolem 650 (??) nm (červené světlo). Chlorofyly b, c d ???

### Syntéza chlorofylu 12.5

Další skupinou účastníci se fotosyntézy jsou tetra-terpeny karoteny. Cesta jejich syntézy vede od geranylgeranyldifosfátu, přes fytoen k lykopenu, které se liší počtem dvojných vazeb. Enzymy, které katalyzují tuto oxidaci se nazývají desaturasy. Prostřednictvím cykly pak vzniká buď  $\beta$ -karoten nebo  $\alpha$ -karoten, které se liší polohou jedné dvojných vazby na levém kruhu. Z  $\alpha$ -karotenu pak hydroxylací vzniká lutein. Z  $\beta$ -karotenu hydroxylací a epoxidací vznikají zeaxanthin a violoxanthin (tyto látky nazýváme xanthofyly). Karotenoidní pigmenty absorbují v oblasti 400 - 500 nm, jsou tedy žluté a oranžové. Hrají roli jako pomocné látky při zachytu světla a přenosu na chlorofylovou molekulu, dále mají důležitou strukturní roli v LHC (light harvesting complex, viz dále). jejich nejdůležitější role je však ochranná. Excitace chlorofylu může vést k tvorbě tripletového stavu (a tudíž k jejich zablokování) nebo ke vzniku singletového kyslíku, který má destruktivní účinek. Mutace, která blokuje syntézu karotenoidů, je pro rostliny vystavené světlu letální.

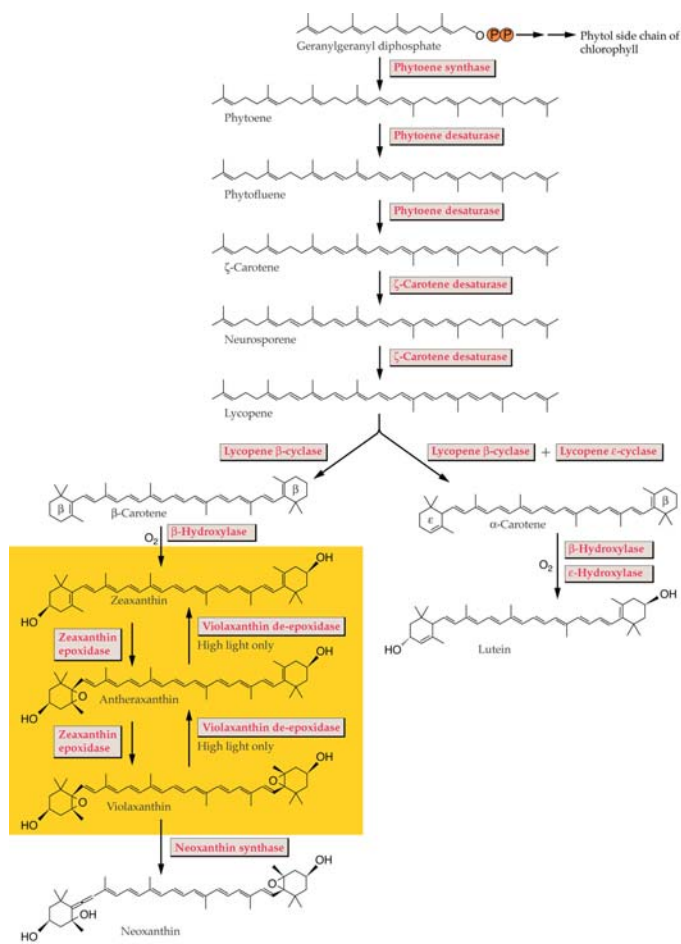


schéma účinku karotenů tripletový kyslík

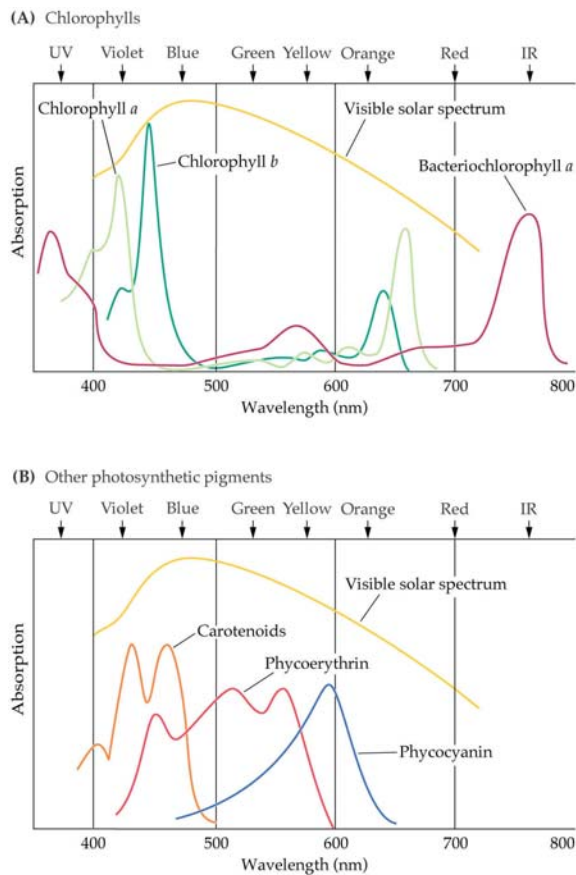
Schéma syntézy karotenoidů, upravené 12.7

Červené řasy a cyanobakterie obsahují další fotosyntetické pigmenty zvané fykobiliny. Tato barviva jsou tetrapyrrolové lineární struktury neobsahující atom kovu. Jsou hydrofilní díky nepřítomnosti lipidního řetězce. Na bílkovinu jsou vázány prostřednictvím thioéterových můstků. Existují dva základní typy těchto barviv: fykocyanobiliny a fykoerythrobiliny.

Obrázek 12.9

Tato barviva absorbují světlo v oblasti 500 - 650 nm.

Obrázek XY ukazuje absorpční maxima všech barviv, které se podílejí na fotosyntéze.



Obrázek spekter 12.6

### Struktura fotosyntetického reakčního centra

Fotosyntetická reakční centra realizují reakci přenosu náboje z excitovaného chlorofylu na akceptor.

$$h\nu$$

$$\text{chlorofyl} \rightarrow \text{chlorofyl}^*$$

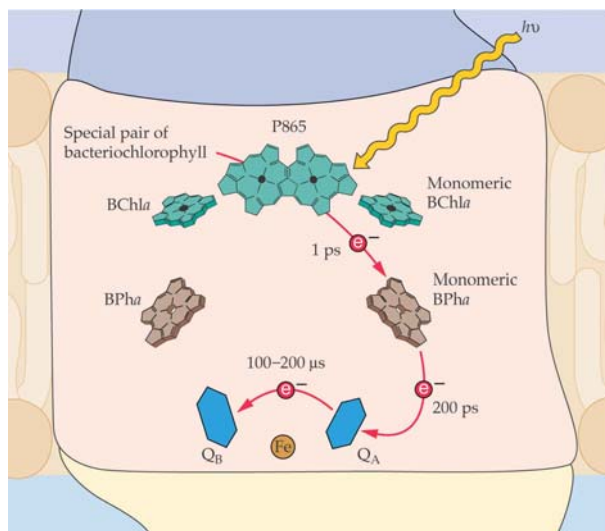
$$\text{chlorofyl}^* + A \rightarrow \text{chlorofyl}^+ + A^-$$

Struktura těchto center je postupně objasňována u mnoha fotosyntetizujících organismů. První etapa těchto rozsáhlých studií byla prováděna na *Rhodobacter sphaeroides*.

Tento relativně jednoduchý komplex obsahuje zvláštní pigment P865, což je dimer bakteriochlorofylu, nazvaný podle svého absorpčního maxima. U rostlin byly nalezeny analogické pigmenty P680 a P700. Kromě tohoto pigmentu obsahuje reakční centrum ještě bakteriopeophytin (chlorofyl neobsahující hořčík), lipidní chinony a atom železa. Sérií reakcí přenosů náboje se elektrony z excitovaného chlorofylu postupně na další složky reakčního centra. Tyto přenosy probíhají řádově v čase 1 ps, 200 ps a 100 - 200 μs.

Struktura a přenos elektronů z P865 je ukázána na obrázku. Tento přenos probíhá pouze jednou cestou v jedné polovině komplexu.



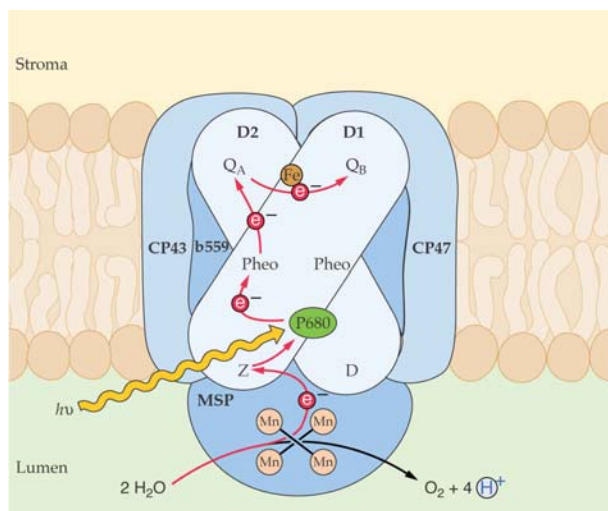


Obr. 12.11

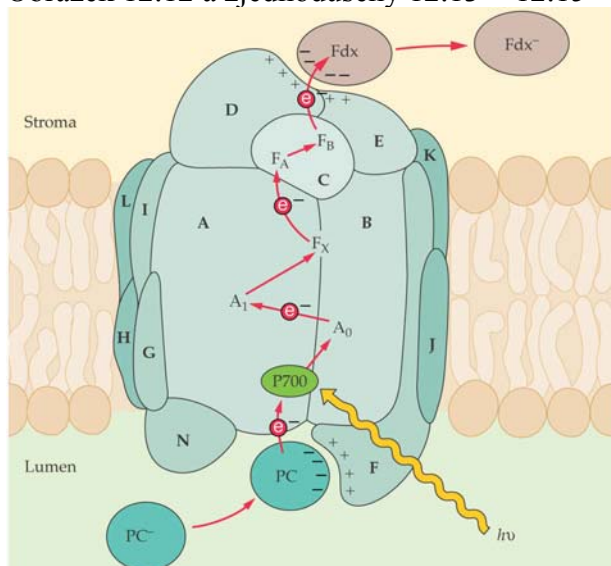
Všechny oxygenní fotosyntetizující organismy, bakterie, řasy a rostliny obsahují dva typy reakčních center: FSI a FSII. Struktury těchto center nebyly ještě určeny. Jejich složení je uvedeno v tabulce:

FSI	FSII
P700	P680
chlorofyl a	feofytin
fylochinon	plastochinon (Qa)
Fe-S centra	plastochinon (Qb)

FSI obsahuje komponenty velmi podobné reakčnímu centru *R. sphaeroides* nebo *R. viridis*. Předpokládaná struktura FSII u rostlin je uvedena na obrázku. Elektron se přenáší z excitovaného P690 postupně na feofytin a obě plastochinonové molekuly. Obdobný model pro FSI byl stanoven na základě studií komplexu FSI cyanobakterií. Elektrony se přenáší z P700 na molekuly chlorofylu a, na fylochinon a poté přes tři Fe-S centra až na akceptor, kterým je ferredoxin.



Obrázek 12.12 a zjednodušený 12.13 + 12.15



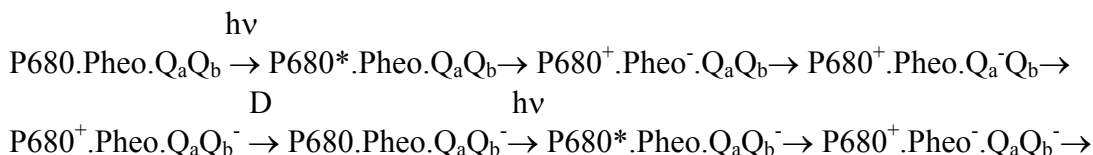
Kromě těchto chlorofylů reakčních center obsahuje membrána thylakoidů další molekuly chlorofylu a ve formě tzv. antén, a to zhruba 250 molekul chlorofylu a na 1 reakční centrum. Tyto molekuly absorbují při kratších vlnových délkách, než barviva P680 a P700. Energie světla absorbovaného těmito anténami se postupně přenáší až na pigmenty P680 a P700 pomocí tzv. "rezonančního transferu energie". Tento přechod (bez vyzaření a absorpce světla) vyžaduje těsnou blízkost donoru a akceptoru a blízkost energetických hladin jejich excitovaných singletových stavů.

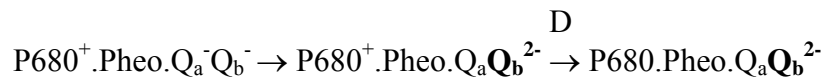
#### Transport elektronů fotosyntetickým systémem

Thylakoidová membrána chloroplastů obsahuje FSII, FSII a další složky, které při tzv. necyklickém transportu produkují O<sub>2</sub>, NADPH a ATP. Těmito složkami účastnicími se elektronového transportu jsou především plastochinon, transmembránový proteinový komplex cytochrom b<sub>6</sub>f, plastocyanin, ferredoxin, ferredoxin-NADP oxidoreduktasa a ATP-synthasa.

FSII je integrální membránový proteinový komplex. Jeho struktura u rostlin není přesně známa. Obsahuje více než 20 proteinů. Proteiny D1 a D2 (32 a 34 kDa) jsou hlavními bílkovinami vázajícími chlorofyly, feofytiny a chinony. Další bílkoviny CP43 (51 kDa) a CP47 (43 kDa) vážou chlorofyly a anténního systému. Součástí celého systému jsou dále hydrofilní proteiny 33, 23 a 17 kDa, které se podílejí na oxidaci vody. Většina těchto bílkovin je kódována genomem chloroplastu, některé jaderným genomem.

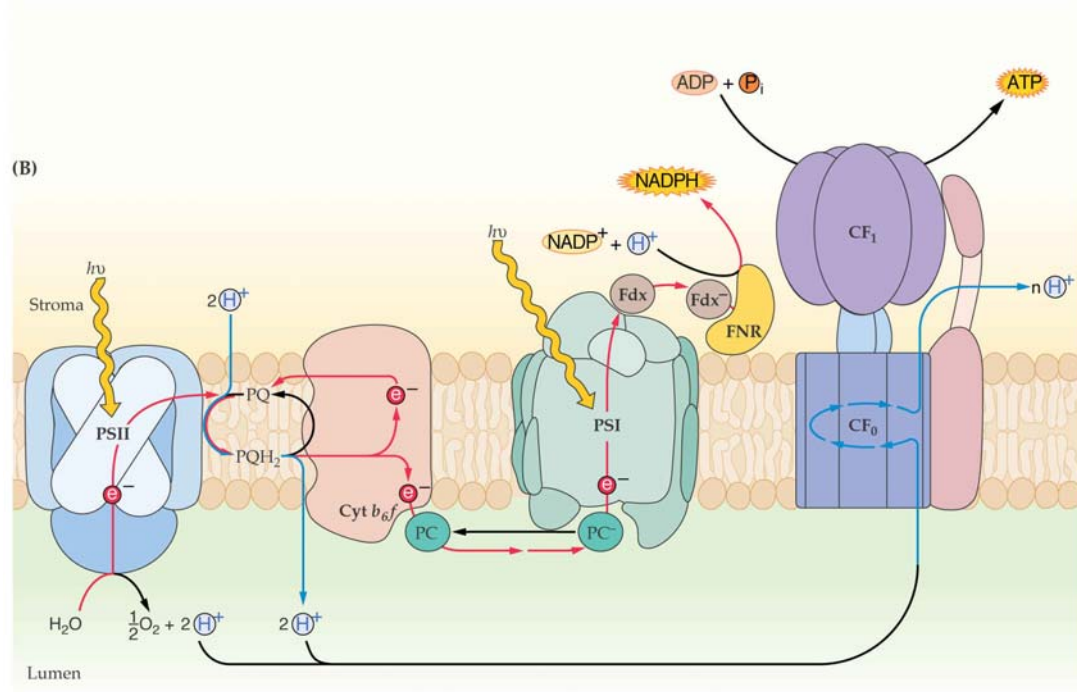
Absorpce světla se redoxní potenciál fotosystémů posouvá do záporných hodnot, tzn. zvyšují se jejich redukční schopnosti. Tyto elektrony se poté přenášejí na komponenty s elektropozitivnějším potenciálem. Akceptorem elektronů v systému FSII je molekula plastochinonu, kdy se účinkem dvou fotonů molekula Q<sub>b</sub> postupně mění na semichinon a poté na dianion Q<sub>b</sub><sup>2-</sup>. Poté se tento dianion asociuje s dvěma protony ze stroma. Vzniklý Q<sub>b</sub>H<sub>2</sub> oddisociuje od FSII do membrány thylakoidu. Oxidovaný P680, který je silným oxidovadlem, doplní chybějící elektrony z vody (D).





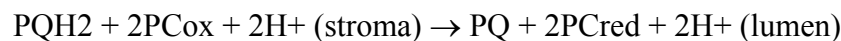
Obrázek - přenos elektronů 12.22 A,B

FSII funguje jako voda-plastochinon oxidoreduktasa, která je dependentní na světlo. Plastochinon je oxidován na straně lumen komplexem cytochromu  $b_6/f$ , oba protony přitom acidifikují prostor lumen. Tento komplex se svojí strukturou a funkcí podobá komplexu III respiračního řetězce (cytochrom  $bc_1$ ). Je složen z cytochromu  $f$  (typ cytochromu  $c$ , 32 kDa), železo-sírného proteinu 2Fe-2S (19 kDa) a cytochromu  $b_6$  (se dvěma typy hemu  $b$ , 24 kDa). Poslední složkou je protein vázající chinon (17 kDa).

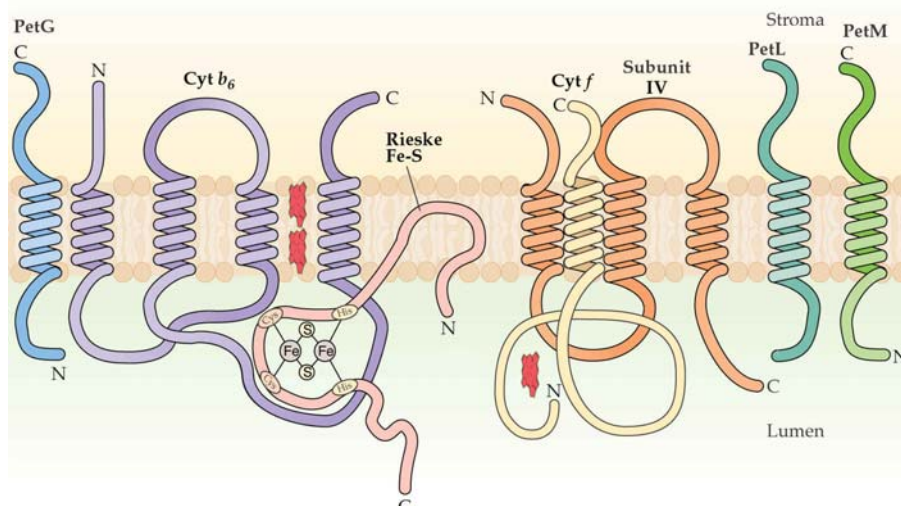


Obrázek 12.25

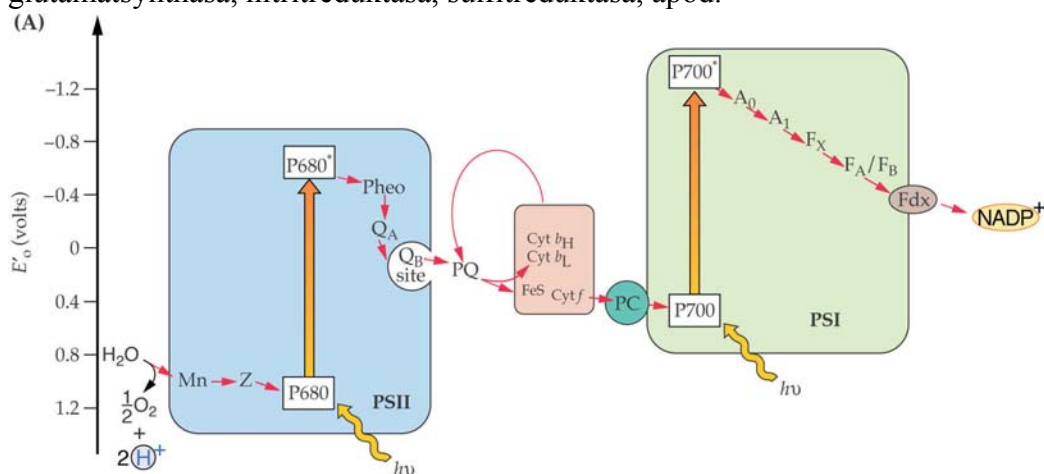
Tyto proteiny jsou kódovány chloroplastovým a jaderným genomem. Cytochrom  $b_6/f$  je integrální membránový protein, oxidoreduktasa, oxidující plastochinon a redukující platocyantin. Tato oxidace je spojena s přenosem  $4H^+/2e^-$  ze stroma do lumen.



Dva protony přitom pocházejí z oxidace  $PQH_2$ . Obdobně jako u cytochromu  $bc_1$  probíhá tato translokace pravděpodobně přes Q cyklus, přímé důkazy zatím chybí. Plastocyanin je malý protein (11 kDa) vázaný na straně lumen a obsahující měď. Tento protein redukuje FSI oxidovaný přenosem náboje vyvolaným absorpcí fotonu.



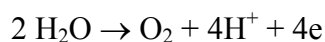
FSI lze chápat analogicky jako FSII jako plastocyanin-ferredoxin oxidoreduktasu závislou na světle. Tento integrální membránový komplex obsahuje zhruba 15 proteinů, z toho dva hydrofobní proteiny (80 kDa), které vážou elektronové přenašeče jako je P700, chlorofyl a, fylochinon a jeden železo-sírný kluster. Další malý železosírný protein (9 kDa) obsahuje dvě železo-sírná akceptorová centra Fa a Fb. Vazba plastocyaninu na straně lumen a ferredoxinu na straně stroma je zajištěna dvěma hydrofilními proteiny 17 a 18 kDa. Funkce dalších komponent není doposud známa. Proteiny komplexu FSI jsou kódovány jaderným a chloroplastovým genomem. Ferredoxin lokalizovaný na straně stroma má standardní redox potenciál -0.42 V, je tedy schopen redukovat NADP prostřednictvím enzymu ferredoxin-NADP-oxidoreduktasy. Enzym obsahuje FAD jako kofaktor a redukce probíhá přes stádium semichinonu. Ferredoxin může sloužit jako redukční substrát dalších enzymů, jako je glutamát-synthasa, nitritreduktasa, sulfitreduktasa, apod.



Obrázek

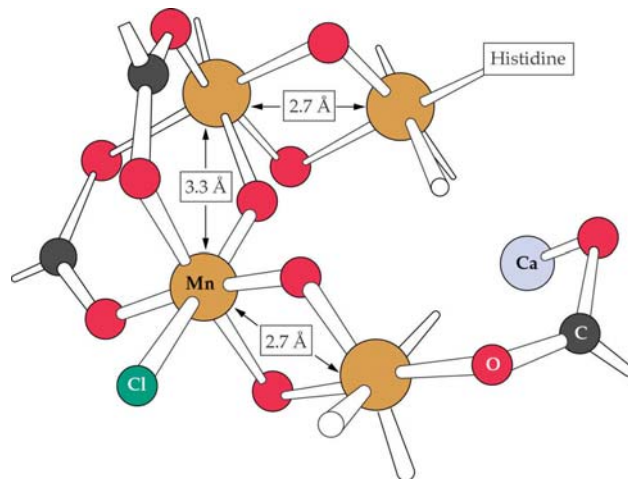
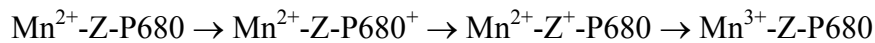
### Oxidace vody komplexem FSII

Při necyklické fotosyntéze se oxidovaný komplex FSII opět redukuje, prostřednictvím vody.



Tento proces vyžaduje předání 4 elektronů. Standardní redoxní potenciál páru O/H<sub>2</sub>O je +0.82 mV, to znamená že pár P680/P680<sup>+</sup> musí být mnohem elektropozitivnější (1-

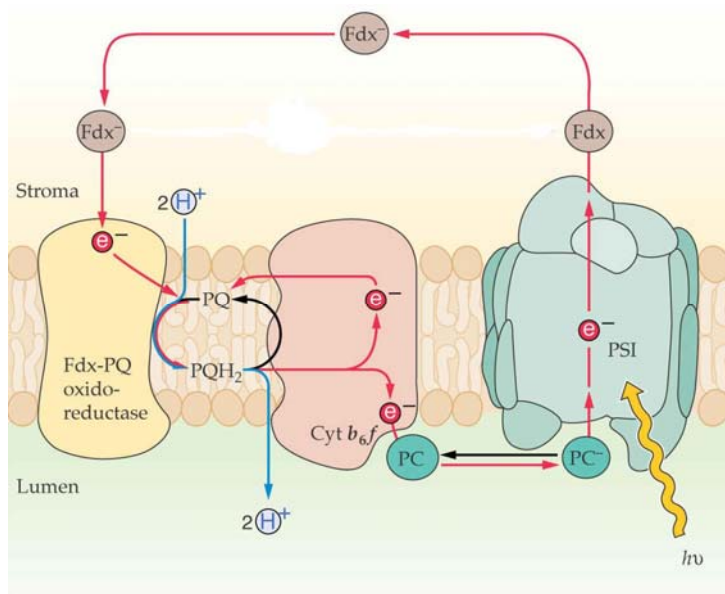
1,2 V). Bylo prokázáno, že oxidaci vody katalyzuje protein obsahující čtyři manganaté ionty. Deficience manganu u řas způsobuje poruchy při vývoji kyslíku. Zdá se pravděpodobné, že tyto manganaté ionty působí jako akumulátor elektronů a přitom se oxidují na  $Mn^{3+}$ . Manganaté ionty přitom nejsou přímým donorem pro P680. Pomocí bodové mutagenese se prokázalo, že tímto mezičlánkem je Tyr-160 podjednotky D1 systému FSII, kdy vzniká tyrosinový radikál ( $Z^+$ ) schopný oxidovat  $Mn^{2+}$ .



Cyklický transport elektronů při fotosyntéze.

Chloroplasty jsou schopny provádět cyklický transport elektronů, na kterém se podílí pouze FSI. Nedochází při něm k vývoji vody (tedy bez účasti FSII) a produktem není NADPH. Funkce řetězce apůsobuje přenos protonů ze stromatu do lumen thylakoidů. Tento gradient je pak využit k syntéze ATP přenosem  $H^+$  z lumen thylakoidů zpět do stromatu. Jediným produktem je ATP.

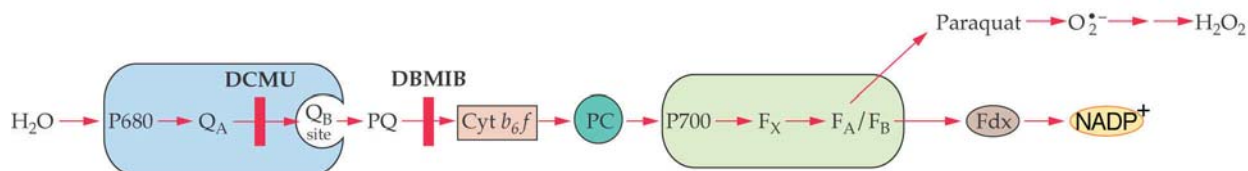
Donorem elektronů pro FSI je cytochrom  $b_6f$ , který sám je cyklicky redukován ferredoxinem. Způsob přenosu elektronů na ferredoxin není zcela objasněn. Předpokládá se, že ferredoxin je oxidovaný plastochinonem při reakci katalyzované Fdx-PQ oxidoreduktasou. Transport elektronů přes cytochrom  $b_6f$  generuje elektrochemický potenciál  $H^+$  v Q cyklu. Tento gradient je pak využíván při syntéze ATP.

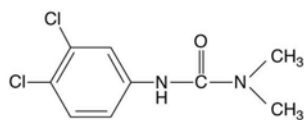


I když existence Fdx-PQ-oxidoreduktasy je zatím hypotetická, použití inhibitorů elektronového transportu u chloroplastů tento model potvrzuje.

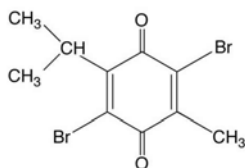
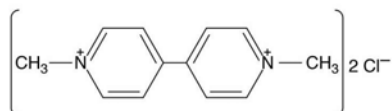
Obrázek 12.34

Použití specifických inhibitorů napomohlo ověření správnosti sekvence jednotlivých článků elektronového transportu při fotosyntéze. Tyto inhibitory bývají často používány jako herbicidy. Jedním z nejdůležitějších inhibitorů jsou látky typu Diuronu, deriváty N-alkylmočoviny, nebo herbicid atrazin. Tyto látky působí na úrovni FSII, a to tak, že inhibují přenos elektronů mezi chinony  $Q_A$  a  $Q_B$ . Blokují tudíž vývoj kyslíku. Energie excitovaného P680 se pak vyzařuje ve formě fluorescence, kterou lze měřit. Druhým typem inhibitorů jsou deriváty plastochinonu (DBMIB), které blokují vazbu PQ na cytochrom  $b_6f$ . Z toho plyne, že DBMIB, na rozdíl od diuronu blokuje cyklický transport elektronů. Posledním typem inhibitoru je paraquat (známý také pod názvem methylviologen), který funguje jako akceptor elektronů ve FSI, na úrovni železosírných center. Blokuje tudíž redukci ferredoxinu. Přitom se paraquat oxiduje kyslíkem za tvorby vysoce aktivního superoxidového radikálu, který poškozuje fotosyntetický aparát. Na tom je založen jeho herbicidní efekt, který se projevuje pouze na světle.





DCMU, an inhibitor of PSII

DBMIB, an inhibitor of the Cyt *b<sub>6</sub>f* complex

Paraquat (methyl viologen), an inhibitor of PSI

Obrázek 12.33

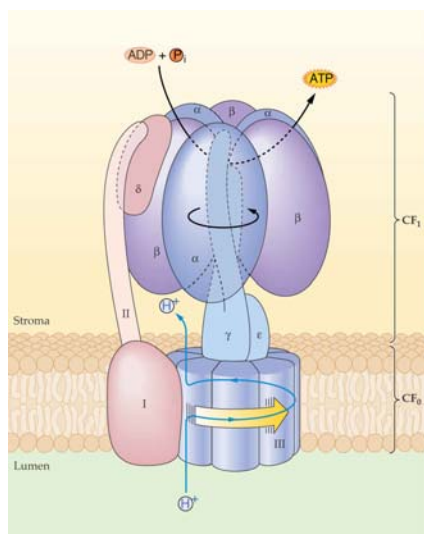
Syntéza ATP:

Protonmotivní síla:

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta pH + \Delta\psi$$

U chloroplastů je hlavní součástí  $\Delta\mu$  složka koncentrační  $\Delta pH$ .

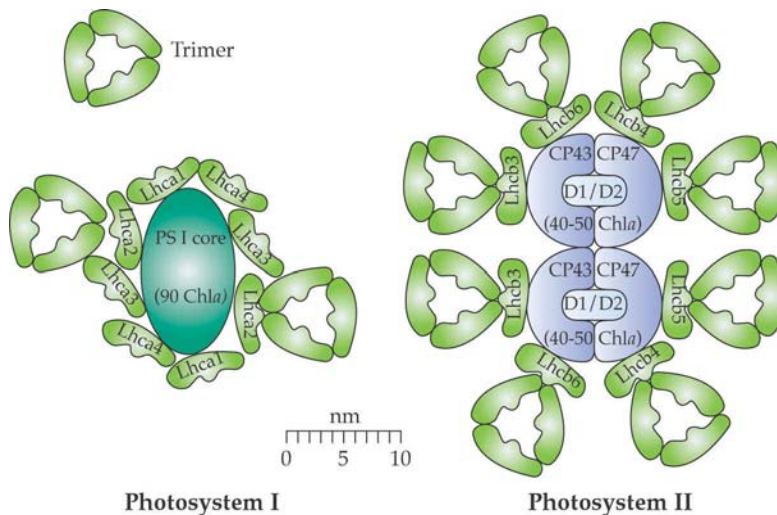
ATP syntáza: orientována hlavou do stromatalní části thylakoidů. Enzym je analogický mitochondriálnímu:  $CF_0 + CF_1$ . Enzym obsahuje 9 různých podjednotek. Kódovány jaderným i chloroplastovým genomem.  $CF_1 - \alpha_3\beta_3 (6 \times 50 \text{ kDa}) + \gamma, \delta, \epsilon$ .  $\gamma$  - kontroluje zřejmě tok  $H^+$  přes enzym,  $\delta$  připojuje  $CF_1$  k  $CF_0$ ,  $\epsilon$  je regulační jednotka, blokuje hydrolyzu ATP v temnu.  $\gamma$  a  $\delta$  jsou kódovány jaderným genomem.  $CF_0$  složena ze 4 typů podjednotek. Hlavní je podjednotka III, která zajišťuje translokaci protonů. Je nejmenší (8 kDa) a je přítomna jako dodekamer.



Obr. 12.35

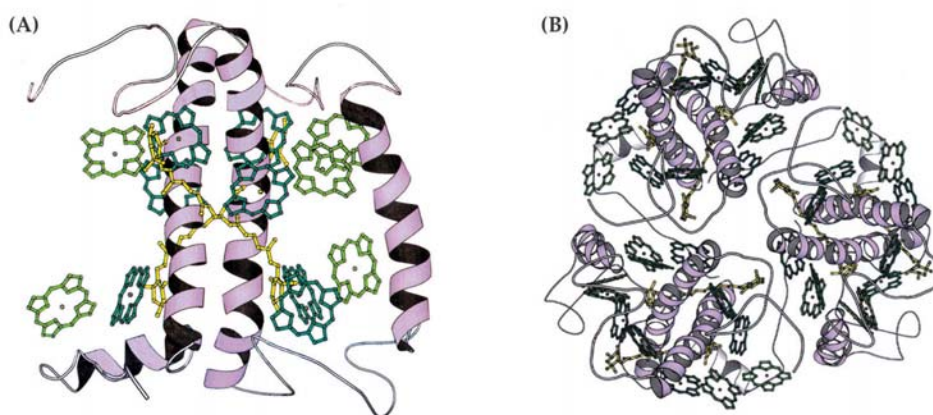
## Organizace PSI a PSII

Chlorofyl a se nachází pouze v reakčních centrech, zatímco chlorofyl b je obsažen v anténních komplexech. Chlorofyl v membráně je asociován se specifickými proteiny, všechny jsou kódovány jaderným genomem. Jejich interakce s chlorofyly mění jejich absorpční maximum. Další pigmenty jsou karotenoidy (chlorofyl:karoten = 0.5). Energie 400 - 500 nm je takto předávána na chlorofyly. Chlorofyly hrají roli přenašeče energie - radiationless transfer (nezářivý přenos energie). Hlavním centrem je LHC II (Light harvesting center II). Je ho obsaženo zhruba 50% totálního proteinu thylakoidové membrány.



Jeho struktura: 3 transmembránové helixy, 12 mol chl a a b, 2 molekuly karotenu

Obr. 12.16 (chl a temně zelený, chl b světle zelený, karoten žlutý)

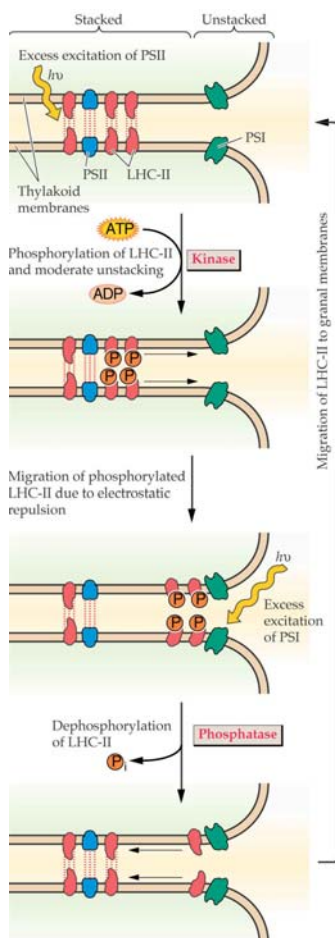
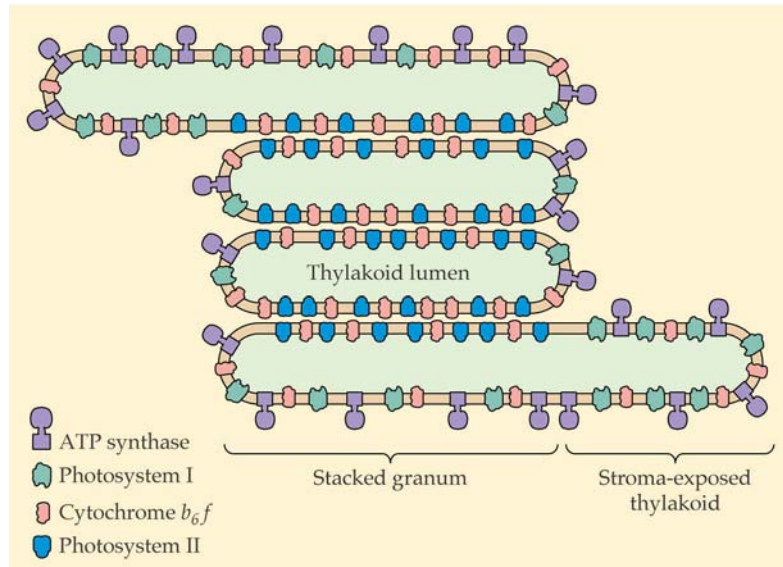


Organizace thylakodiů. Komplexy PSI a PSII nejsou rozloženy rovnoměrně. PSI zejména stromatové thylakoidy, PSII zejména stohované a granální thylakoidy. ATPsyntasa a ostatní komplexy nerovnoměrně. ATPsyntasa vylučně stromatálních thylakoidech. Poměr mezi PSI a PSII není rovnoměrný. PSI/PSII je u volně žijících bakterií 0,5, u rostlin je vyšší než 1 a závisí na složení vlnové délky světla (1,2 - 2,3).  
Obr. 12.19



## Regulace LHC-II

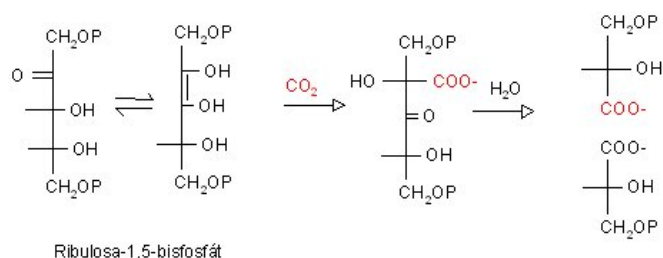
Tento komplex vylučně lokalizovaný v granálních thylakoidech. Funkce tohoto systému spočívá v regulaci přítoku fotonů. Část LHCII podstupuje fosforylaci. Po této fosforylaci se mění náboj a LHC se přesouvá do méně hydrofobní stromatální oblasti.



Obr. 12.20

## Temná fáze fotosyntézy

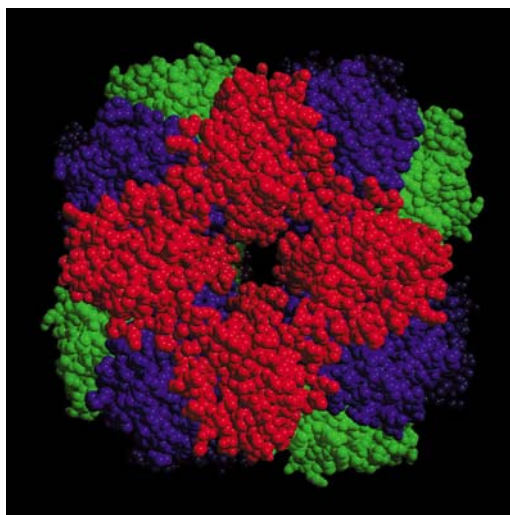
Většina rostlin produkuje sacharidy tzv. C3 cestou před glycerldehyd-3-fosfát. Enzymy tohoto Calvinova cyklu se nacházejí ve stroma chloroplastů. Klíčovým enzymem této reakce je Ribulosa-bisfosfát-karboxylasa oxygenasa (Rubisco). Enzym katalyzuje vazbu CO<sub>2</sub> na substrát (ribulosa-1,5-bisfosfát) ve formě endiolového intermediátu.



Rubisco rostlinného původu se skládá z osmi velkých podjednotek L (56 kDa) a osmi malých podjednotek S (14 kDa) L<sub>8</sub>S<sub>8</sub>. Katalytickou aktivitu má podjednotka L, role podjednotky S není ještě objasněna. Podjednotka L je kódována chloroplastovým a podjednotka S jaderným genomem. Některé fotosyntetické bakterie obsahují pouze podjednotku L.

Obr. 12.39, 12.40

červené smal, vidět jsou jen 4. Modré a zelené – large

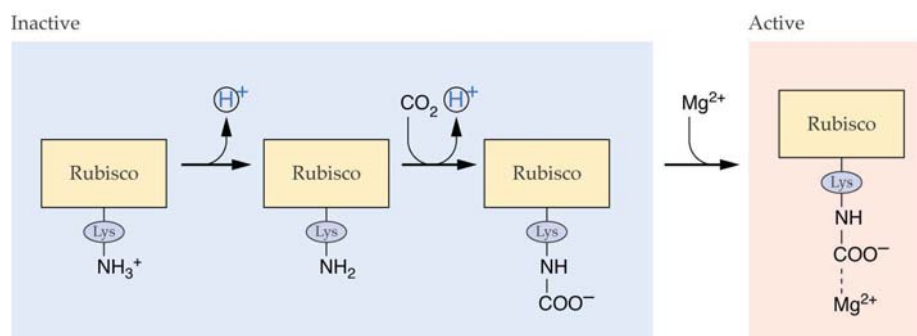


reakce katalyzovaná Rubisco  
regenerace pentos

Calvinův cyklus zahrnuje tři fáze: karboxylaci, redukci vzniklé kys. 3-fosfoglycerové a regeneraci ribulosabisfosfátu. Při těchto reakcích jsou spotřebovány ATP a NADPH nasyntetizované ve světelné fázi. Mnoho enzymů této dráhy je v plastidech součástí jak Calvinova cyklu, tak obráceného procesu, hexosamonofosfátové dráhy.

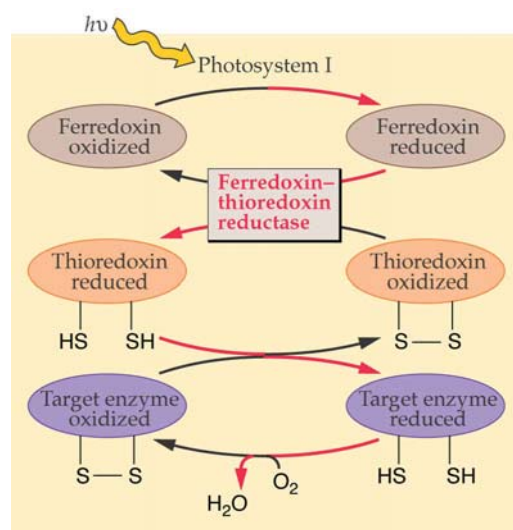
Obr. 12.38

Nejdůležitějšími regulačními faktory Calvinova cyklu jsou pH a koncentrace  $Mg^{2+}$  ve stromatu chloroplastů. Hořčík se váže ve formě karbamátového komplexu na lysinovou skupinu (Lys-120) v aktivním místě Rubisco a způsobí tak jeho aktivaci. Fotontetický proces vyvolává alkalizaci stromatu (přenos protonů ze stromatu do lumen). Pokles pH způsobí deionizaci  $NH_3^+$ - skupiny lysinu kde se naváže  $CO_2$  ve formě karbamátu a poté se vytvoří jeho komplex s  $Mg^{2+}$ . Při transportu  $H^+$  do prostoru lumen ve světelné fázi je transport kladného náboje kompenzován transportem  $Mg^{2+}$  do stroma, přičemž jeho koncentrace vzroste zhruba třikrát.



Obr. 12.42

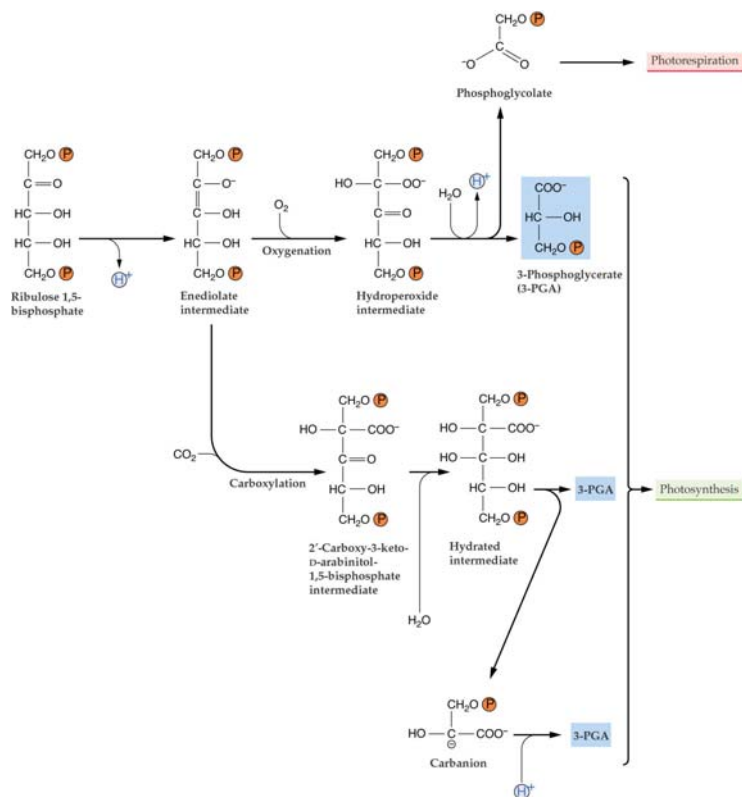
Řada enzymů temné fáze fotosyntézy je regulována tvorbou disulfidových můstků. Tento mechanismu byl nalezen u NADP-glyceraldehydfosfát-oxidoreduktasy, některých enzymů regenerace pentos a dokonce i u ATP-synthasy. Tyto enzymy jsou modifikovány přes ferredoxin-thioredoxinový systém, napojený na FSI. (Obr. 12.43). Tímto způsobem, to je redukcí disulfidových můstků může světlo zvyšovat aktivitu enzymů temné fáze fotosyntézy.



Enzym RUBISCO je jedinečný svou schopností katalyzovat ještě druhou enzymovou dráhu, a to oxidaci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Produkty jsou 3-fosfoglycerldehyd a 2-fosfoglykolát. Tomuto pochodu se říká fotorespirace, protože při něm dochází ke spotřebě kyslíku vyvolané světlem. Oba substráty, kyslík a oxid uhličitý si kompetují. I když katalytická konstanta karboxylace je zhruba třikrát vyšší, vzhledem k vysoké

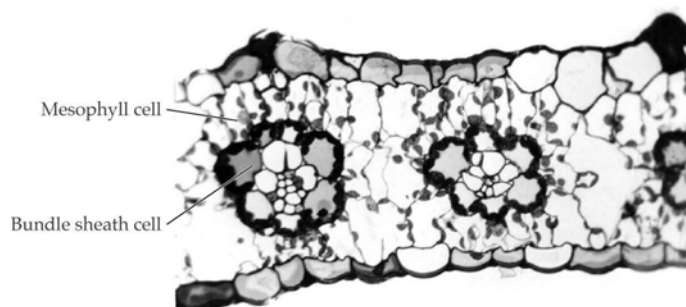
koncentraci kyslíku v atmosféře je proces fotorespirace u většiny rostlin srovnatelný s karoxylací, čímž se snižuje výtěžek fotosyntézy.

Obr. 12.38



#### Asimilace cestou C<sub>4</sub>

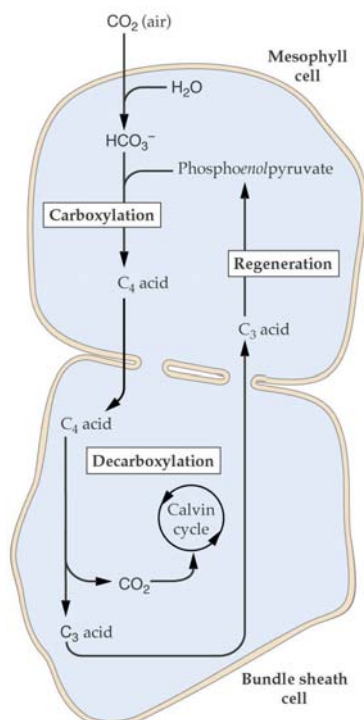
Některé jednoděložné rostliny jako kukuřice, cukrová třtina, i některé dvouděložné fixují oxid uhličitý cestou nikoli přes Rubisco, nýbrž za vzniku čtyřuhlíkatých sloučenin. Listy těchto rostlin mají zvláštní anatomii: obsahují dva typy buněk s chloroplasty - mesofylové buňky a buňky pochev cévních svazků.



Obr. 12.45

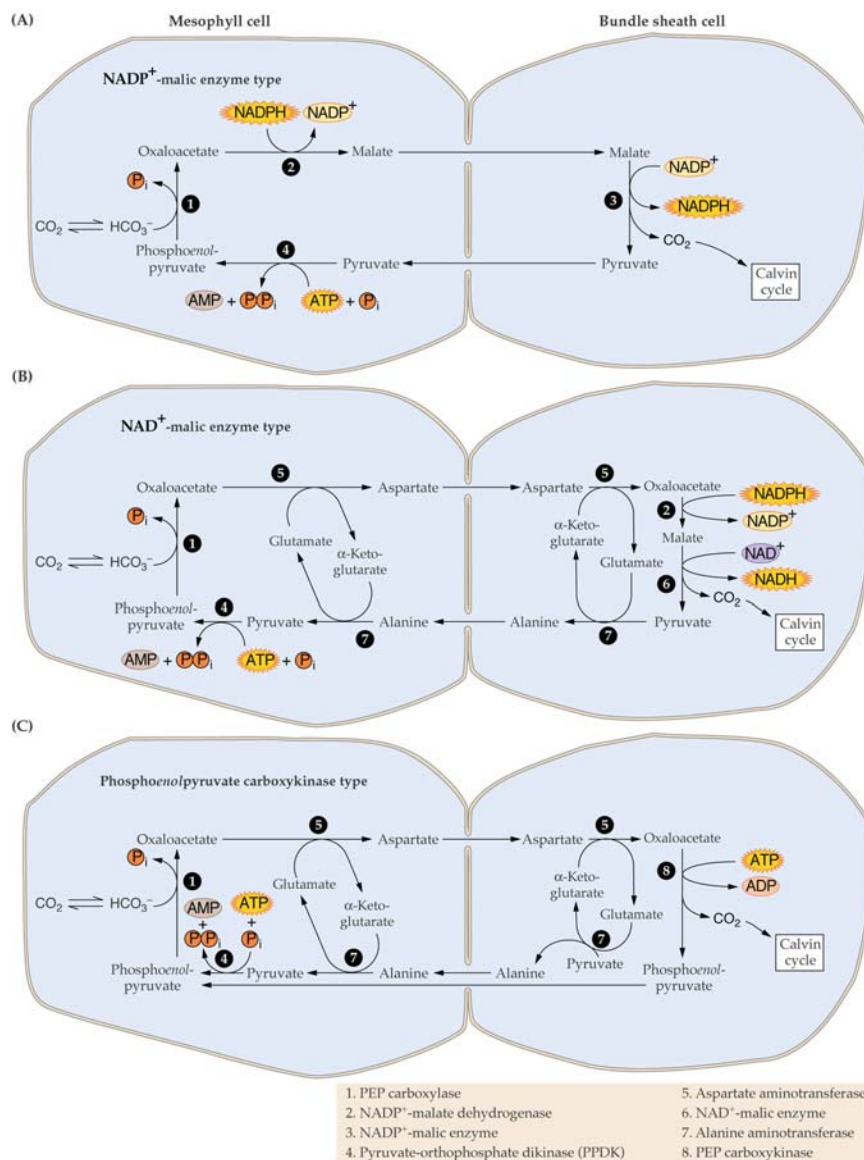
C<sub>4</sub> rostliny mají účinnější systém fixace CO<sub>2</sub>, zejména při vyšší teplotě a předpokládaných ztrátách vody. Při vyšších teplotách klesá totiž výrazně karboxylační aktivita Rubisco a vzrůstá oxygenační aktivita. Stejně tak při vyšších teplotách vzrůstají ztráty vody. Cesta C<sub>4</sub> je založena na interakci mezi oběma typy buněk. Fixace CO<sub>2</sub> probíhá v mezofylových buňkách, akceptorem je fosfoenolpyruvát (enzym PEP-karboxylasa). Vlastním substrátem enzymu je hydrogenuhlíčan, jehož

koncentrace v cytosolu je vyšší, nikoli  $\text{CO}_2$ . Kromě tohoto,  $K_m$  pro  $\text{HCO}_3^-$  je mnohem nižší (?) než  $K_m$   $\text{CO}_2$  pro Rubisco. Produktem reakce je oxalacetát. Tento produkt prochází po redukci nebo transaminaci ve formě malátu nebo aspartátu z mezofylových buněk do buněk pochev cévních svazků, kde se z něj vzniká zpět  $\text{CO}_2$  (který se v Calvinově cyklu mění na glukosu) a pyruvát, který se vrací do mezofylu recykluje se.



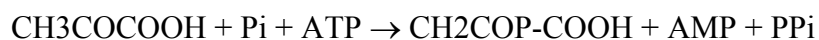
Obr. 12.46

Efektivnost tohoto mechanismu spočívá ve zvláštním složení chloroplastů buněk pochev cévních svazků, se sníženým obsahem FSII. Produktem fotosyntézy tudíž není kyslík, čímž se blokuje fotorespirace. Buňky mezofylu obsahují chloroplasty s FSI a FSII. produkce kyslíku zde nevadí, protože PEP karboxylasa není ovlivňována kyslíkem. Jednotlivé typy  $\text{C}_4$  rostlin se odlišují podle cyklujícího metabolitu mezi spolupracujícími buňkami. Může to být malát nebo aspartát.



Obr. 12.48

Mezofylové buňky musí obsahovat vysokou koncentraci PEP. Tento vzniká ve zvláštní reakci katalyzované enzymem pyruvát-fosfát-dikinasou.

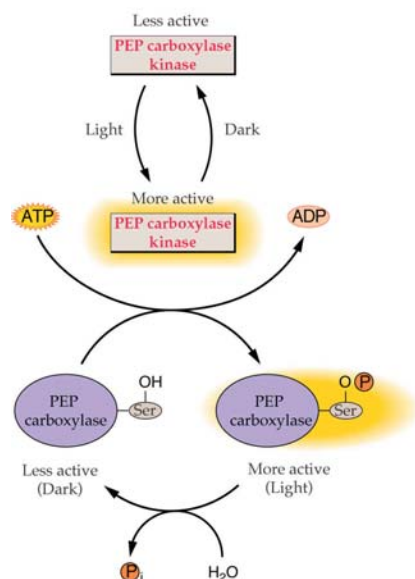


reakce je posouvána doleva enzymem pyrofosfatasou. Fixace CO<sub>2</sub> tedy vyžaduje 2 makroergické vazby. Ačkoli tato cesta je energeticky náročnější než C<sub>3</sub> cesta, díky nepřítomnosti fotorespirace je energeticky výhodnější.

### Regulace enzymů

Souhra mezi metabolismem probíhajícím v mezofylu a buňkách pohev cévních svazků vyžaduje dokonalou regulaci. Klíčové enzymy této dráhy, PEP-karboxylasa, pyruvát-fosfát-dikinas a NADP-malátdehydrogenasa jsou regulovány světlem. Regulace NADP-malátdehydrogenasy probíhá cestou tvorby disulfidových můstků, přes ferredoxin-thioredoxinový systém. Zbývající dva enzymy jsou regulovány příslušnými kinasami klasickým mechanismem. PEP-karboxylasa fosforylovaná kinasou: Enzym PEP-karboxylasa-kinasa je regulován světlem. Aktivní forma stimulována světlem provádí fosforylaci serinového zbytku pomocí ATP. Temná

forma (defosforylovaná) je inhibována již nízkými koncentracemi malátu a má nízkou afinitu k substrátu, PEP. Fosforylovaná forma (světelná) není inhibována malátem. Tento mechanismus zajišťuje, aby fixace CO<sub>2</sub> probíhala na světle přes rostoucí koncentraci malátu v buňce.

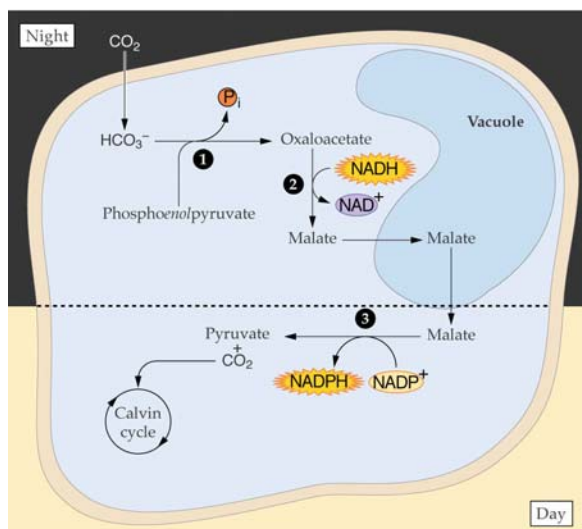


Obr. 12.49

Ezým pyruvát fosfát dikinasa syntetizující fosfoenolpyruvát je regulován rovněž světlem fosforylací. Mechanismus je složitější než u předchozího enzymu, světlem stimulovaná aktivní forma je však defosforylována, fosforylovaná forma vznikající příslušnou kinasou je inaktivní.

CAM, varianta C<sub>4</sub> metabolismu.

Tato varianta (crassulacean acid metabolismu) existuje u rostlin žijících v extrémně suchých podmínkách (např. sukulenty jako kaktusy, anebo ananasovité rostliny). metabolismus velmi připomíná typickou C<sub>4</sub> cestu avšak procesy jsou zde odděleny nikoli lokálně, ale časově. Vysoká intenzita světelného záření je zde komplikována vysokou teplotou a tím vysokým odparem vody. Proces fixace CO<sub>2</sub> na PEP za vniku oxalacetátu tedy probíhá pouze v noci, kdy se průduchy buněk otevřou za podmínek relativně nižší teploty a vyšší vlhkosti. Vznikající malát je ve vysokých koncentracích skladován ve vakuole. Po dobu světelné a horké periody se průduchy uzavírají, malát opouští vakuolu a je dekarboxylován. Vznikající CO<sub>2</sub> je asimilován Calvinovým cyklem, potřebné ATP a NADPH vzniká ve fotosyntéze. Vysoké koncentrace PEP potřebné během noční periody nemohou vznikat pomocí ATP. PEP tedy vzniká cestou anaerobní glykolýzy.



Obr. 12.51

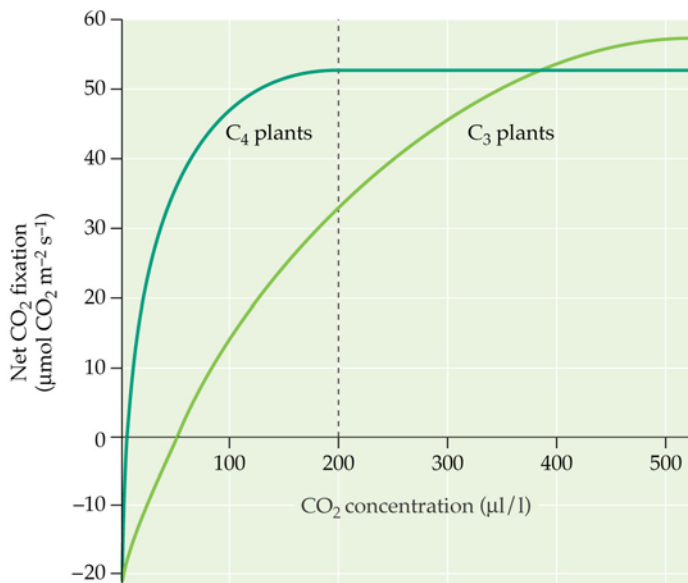
Klíčový enzym této dráhy, PEP-karboxylasa existuje v aktivní noční formě, a neaktivní denní formě. Regulace probíhá opět cestou kinasy, fosforylací. Na rozdíl od typického C<sub>4</sub> metabolismu se v tomto případě nejedná zřejmě o regulaci přímo světlem, ale circardiánským rytmem.

Některé rysy C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> a CAM rostlin jsou pro srovnání uvedeny v následující tabulce:

	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	CAM
Typický představitel	pšenice, rýže, brambory	kukuřice, cukrová třtina	ananas
Fotorespirace	až 40% fotosyntézy	nd	nd
Intracelulární obsah CO <sub>2</sub> (μl/l)	200	100	10000
Efektivnost využití vody (g CO <sub>2</sub> /kg vody)	1 - 3	2 - 5	10 - 40
Max. růstová rychlost (g/m <sup>2</sup> .d)	5 - 20	40 - 50	0,2

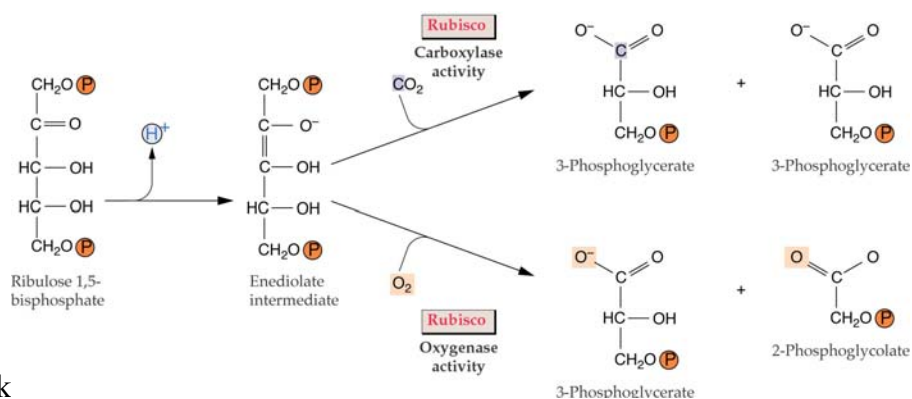
Vysoká efektivnost fotosyntézy u C<sub>4</sub> rostlin je zajímavá z technologického hlediska.





### Fotorespirace

Fotorespirace je světlem stimulovaná spotřeba kyslíku a výdej  $\text{CO}_2$ . Již ve dvacátých letech minulého století byla zjištěna souvislost tohoto procesu s fotosyntézou. Pokud byla zvýšena koncentrace kyslíku na dvojnásobnou hodnotu obvyklé koncentrace, rychlost fixace  $\text{CO}_2$  výrazně klesala. Obráceně byl pozorován intenzivní vzrůst asimilace při poklesu koncentrace kyslíku pod hodnotu 2%. Po ukončení osvětlovací periody byl navíc pozorován pulz výdeje  $\text{CO}_2$ . Byla zjištěna kompetice mezi kyslíkem a  $\text{CO}_2$  při fotosyntéze. Tento proces je intenzivní zejména u rostlin typu  $\text{C}_3$ . Příčinou fotorespirace je dvojitá substrátová specifita enzymu Rubisco. Tento enzym katalyzuje buď karboxylaci ribulosa-5-fosfátu na dvě molekuly kys. 3-fosfoglycerové anebo jeho oxygenaci, kdy vzniká jedna molekula kys. 3-fosfoglycerové a kys-fosfoglykolová.



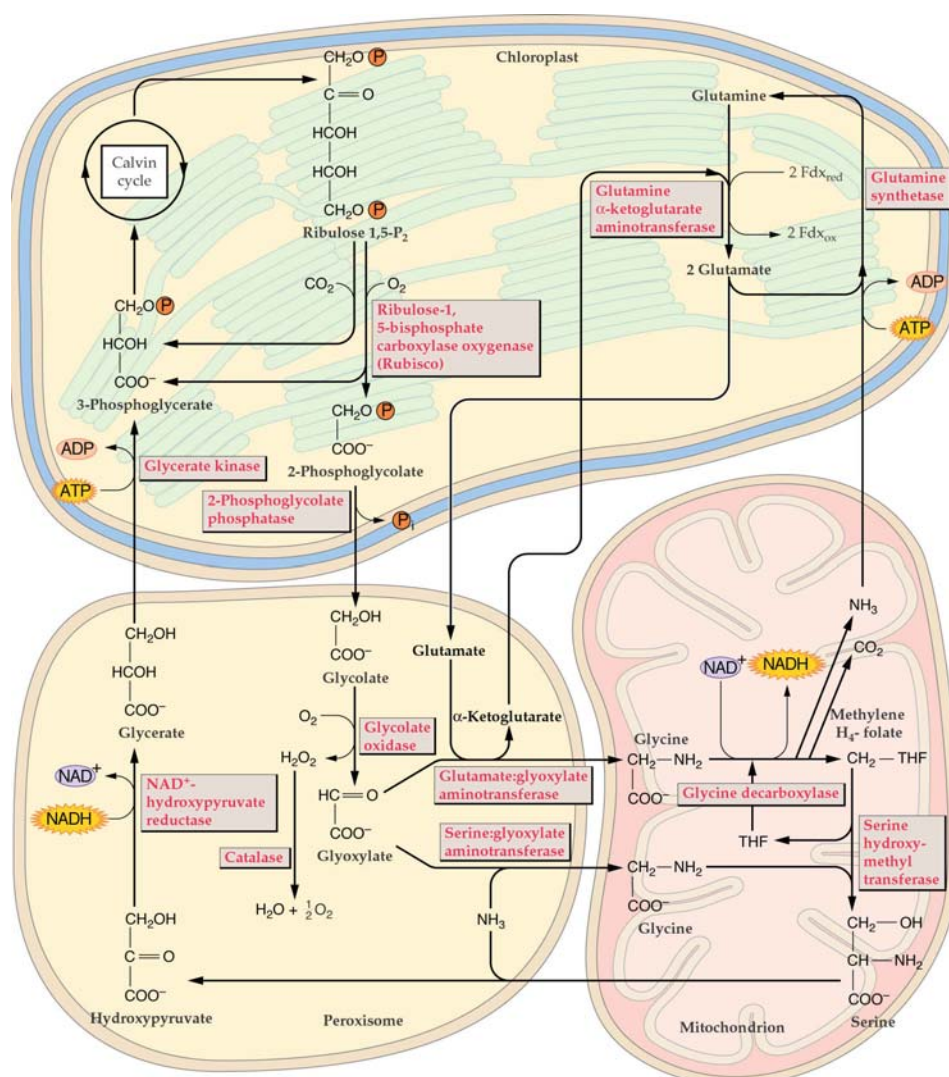
Obrázek

Poměr rychlosti karboxylace  $v_c$  a rychlosti oxygenace  $v_o$  v závislosti na koncentraci plynů je definován vztahem

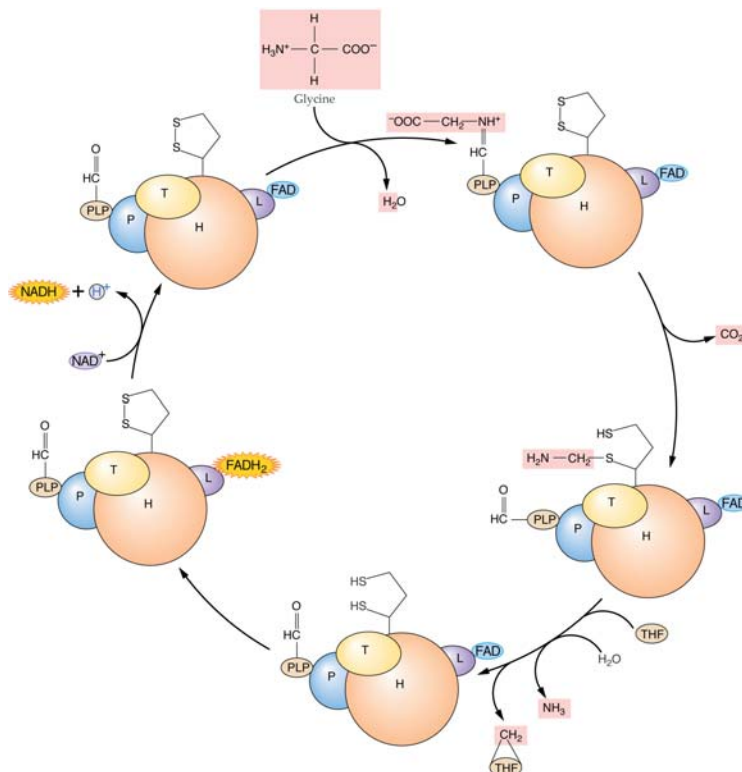
$$v_c/v_o = (V_c/K_c)(K_o/V_o) ([\text{CO}_2]/[\text{O}_2])$$

kde  $V_c$  a  $V_o$  jsou limitní rychlosti,  $K_c$  a  $K_o$  Michaelisovy konstanty. Při ekvimolární koncentraci plynů je poměr  $v_c/v_o$  roven 100. Vzhledem k aktuální koncentraci  $\text{CO}_2$  ( $8 \mu\text{M}$ ) a  $\text{O}_2$  ( $250 \mu\text{M}$ ) v atmosféře je však tento poměr roven zhruba 3.2. Produkt fotorespirace, kys. fosfoglykolová je pak metabolizována ve dvou organelách: peroxisomech a mitochondriích. Cílem procesu je regenerace trojuhlíkatého metabolitu.

Fosfoglykolát je defosforylován a vznikající glykolát je transportován do peroxisomů. Tam je oxidován enzymem glykolát oxidasou na glyoxylát a peroxid vodíku.



Glyoxylát je transaminován na glycin. Tento je transportován do mitochondrií. Glycin je metabolizován komplikovaným mechanismem. Enzymový komplex glycin dekarboxylasa s kofaktorem kysl. folovou, lipoátem, pyridoxalfosfátem a FAD rozkládá glycin na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NADH}$  a methylen tetrahydrofolát.

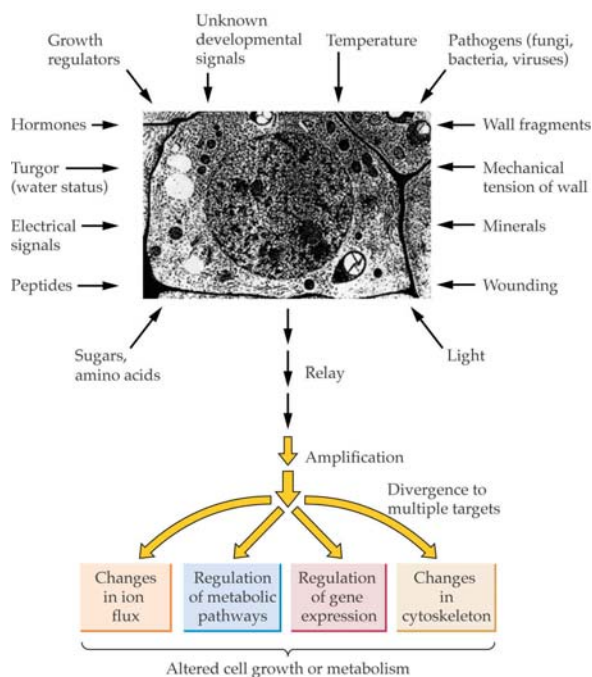


Glycin se váže na pyridoxalfosfát a po jeho dekarboxylaci se methylenaminová skupina přenesse na lipoát. Po deaminaci přechází methylenová skupina na folát. Methylenová skupina je pak z methylen tetrahydrofolátu přenesena na další molekulu glycínu za vzniku serínu. Reakci katalyzuje enzym serinhydroxymethyltransferasa. Serin se přenáší zpět do peroxisomu, kde se deaminuje na hydroxypyruvát a redukuje na glycerát. Tento je pak využit v chloroplastech v Calvinově cyklu.  
Obr. 12.48, zjednodužit

Produkt fotorespirace  $\text{NH}_3$ , je toxický. Amoniak je pak asimilován v chloroplastech cestou glutaminsynthetasy a glutamámsynthasy. Kofaktorem glutamámsynthasy je světél redukovaný ferredoxin (viz asimilace amoniaku).  
Role enzymu Rubisco a selekční tlak fotorespirace se postupně uplatňoval od počátku vývoje Země, kdy koncentrace kyslíku dosahovala minimálních hodnot. Postupně jak koncentrace kyslíku v atmosféře narůstala a klesal obsah  $\text{CO}_2$ , klesal výtěžek karboxylační reakce. Za těchto podmínek se cesta  $\text{C}_4$  rostlin ukázal být málo efektivní. Selektivnost reakce  $\text{CO}_2$  proti  $\text{O}_2$  závisí velmi podstatně na teplotě. S teplotou klesá více rozpustnost  $\text{CO}_2$  než  $\text{O}_2$  ve vodě. Z tohoto důvodu je maximum efektivnosti karboxylační reakce u  $\text{C}_3$  rostlin mezi  $25 - 35^\circ\text{C}$ , u  $\text{C}_4$  rostli mezi  $30 - 40^\circ\text{C}$ .

## Molekulární mechanismus signalizace rostlinných buněk

Po dobu svého vývoje vyvinuly rostliny dokonalý systém signalizačních drah, které umožňují reagovat rostlině na podněty fyzikálního a látkového typu. Fyzikálními podněty jsou světlo, teplota, mechanický stres, zranění, ultrafialové záření, zemská tíže, membránový potenciál, apod. Stimuly chemického typu jsou koncentrace plynů, vlhkost a koncentrace minerálních látek a dále přítomnost látek, které se k rostlině dostávají jako produkty metabolismu jejích vlastních buněk (např. hormony) nebo okolních organismů (alleopatické látky, elicitory obranných reakcí). Všechny tyto signály jsou rostlinou rozpoznány, zesíleny a modulovány a poté se projeví jako změny v koncentraci elektrolytů, enzymových aktivit anebo jako regulace exprese příslušných genů. Tyto procesy se odehrávají na dvou úrovních. Buďto s eprojeví jakožto krátkodobé efekty řádově vteřiny až minuty od aplikace signálu, anebo jako změny dlouhodobé, řádově hodiny až dny. Například regulace aktivity určitého enzymu může být těmito signály vyvolána v podobě kovalentní modifikace, jako například fosforylace (krátkodobá změna) anebo ve formě aktivace transkripce příslušného genu (dlouhodobý proces)



Obr. 18.1, 18.2

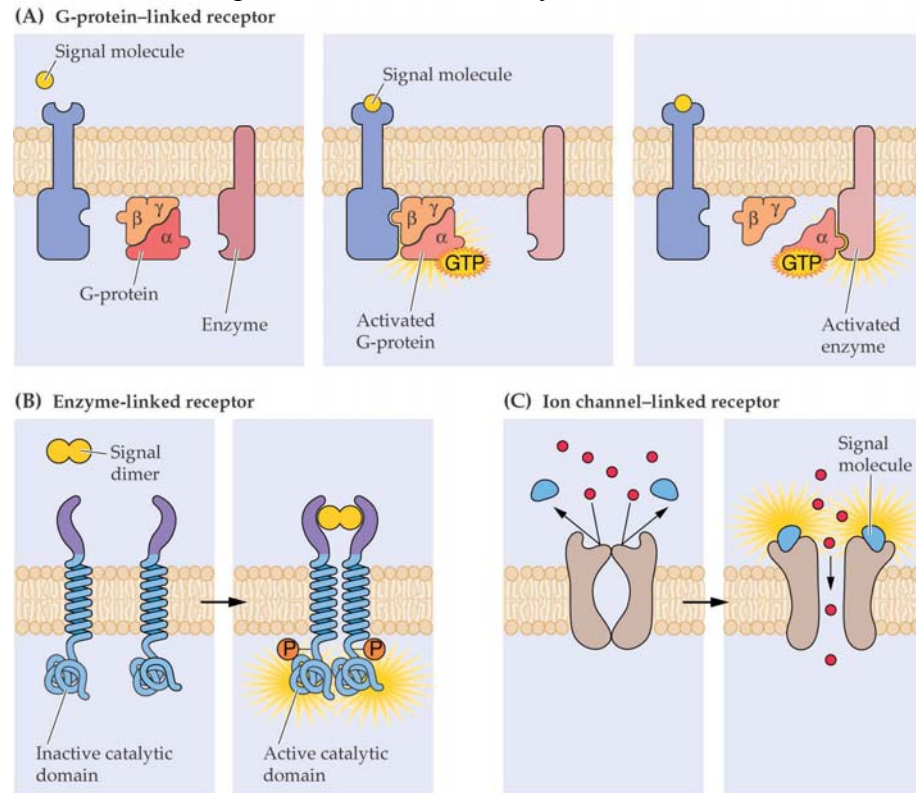
Studium těchto signalizačních drah si bere jako základ analogické pochody, které jsou detailně prozkoumány na živočišných, bakteriálních či kvasničných buňkách. Ukazuje se, že v podstatě je tato signalizace velmi analogická, v detailech však často dosti odlišná.

### Receptory

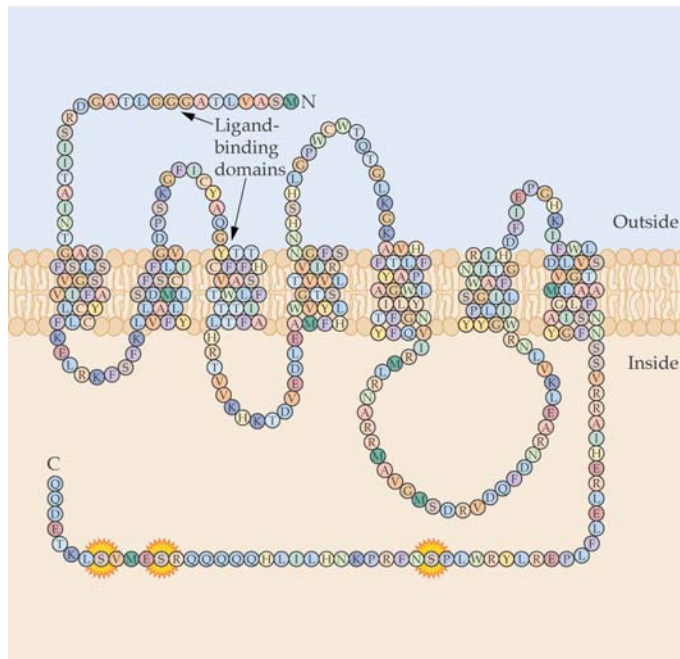
Stejně jako u živočichů, existují u rostlinných buněk dva typy receptorů, s ohledem na lokalizaci. První jsou lokalizovány na povrchu cytoplasmatické membrány, druhý typ receptorů se nachází v cytoplasmě. Tyto receptory jsou schopny reagovat na chemické signály, to je na přítomnost látek jako jsou např. hormony nebo elicitory obranných

reakcí. Kromě těchto receptorů jsou však buňky schopny vnímat i elektrické signály i světlo, a to pomocí tzv. iontových kanálů, schopných otevírat se nebo uzavírat v závislosti na směru a velikosti elektrického signálu.

Obr. Funkce receptoru membránového, cytosolového, kanálu Obr. 8.11

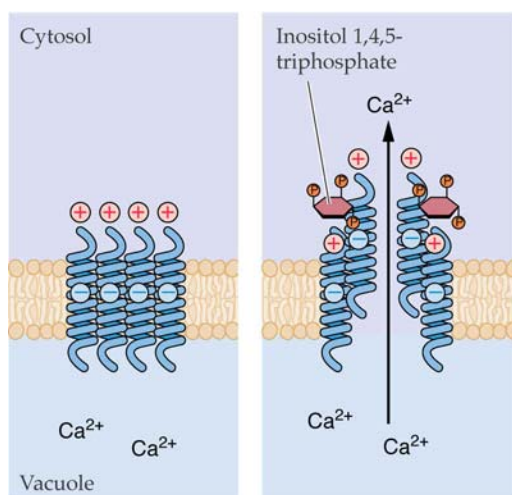


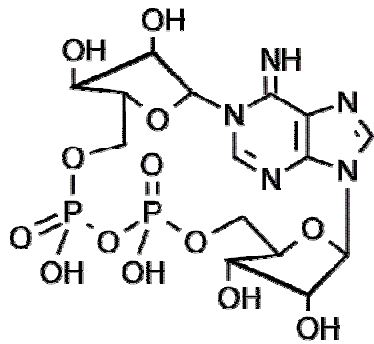
Receptor je obvykle monomerní nebo oligomerní integrální protein, mající většinou tři funkční části. První z nich se nachází na vnějším povrchu cytoplasmatické membrány (nejčastěji N-terminální část) a obsahuje domény schopné selektivně interagovat s ligandem. Druhou částí receptoru jsou transmembránové hydrofobní domény. Třetí část receptoru se nachází na cytosolové části proteinu a je zodpovědná za přenos signálu na další části signalizační kaskády (nejčastěji C-terminální část).



Obr. 18.14

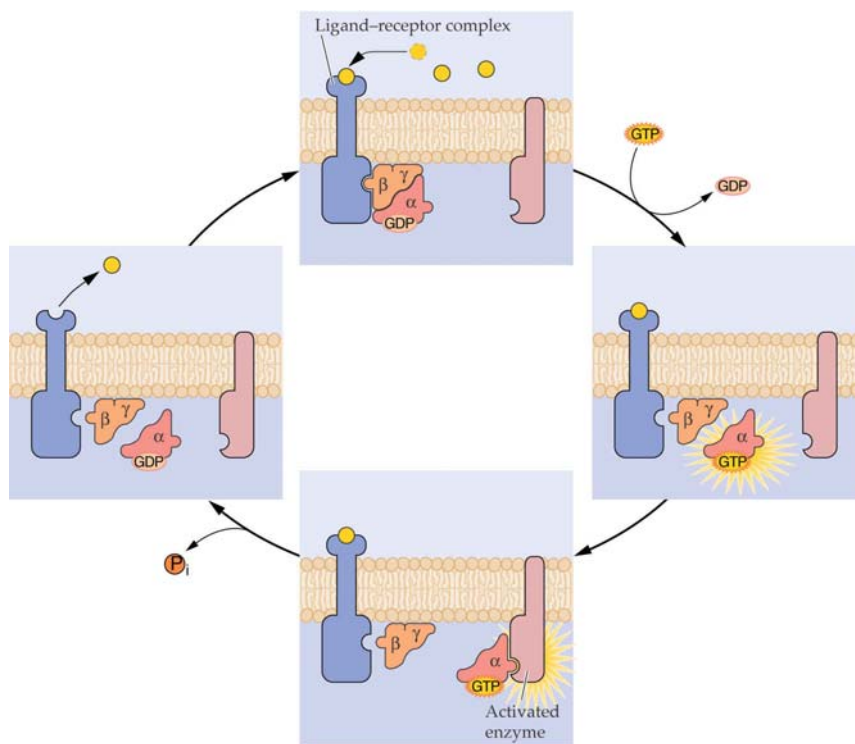
Z hlediska mechanismu přenosu signálu rozlišujeme u živočichů a prokaryotů tři základní druhy receptorů. Předpokládá se, že existují i u rostlin. První typ receptoru jsou iontové kanály ovládané ligandem. Příkladem takového receptoru je receptor na IP<sub>3</sub> (inositoltrisfosfát) nacházející se na membráně vakuoly. Vazba IP<sub>3</sub> vyvolá otevření vápenatého kanálu. U rostlin byl prokázán rovněž iontový kanál regulovaný cADPR,



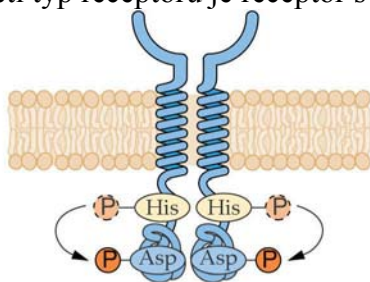


Obr. 18.15

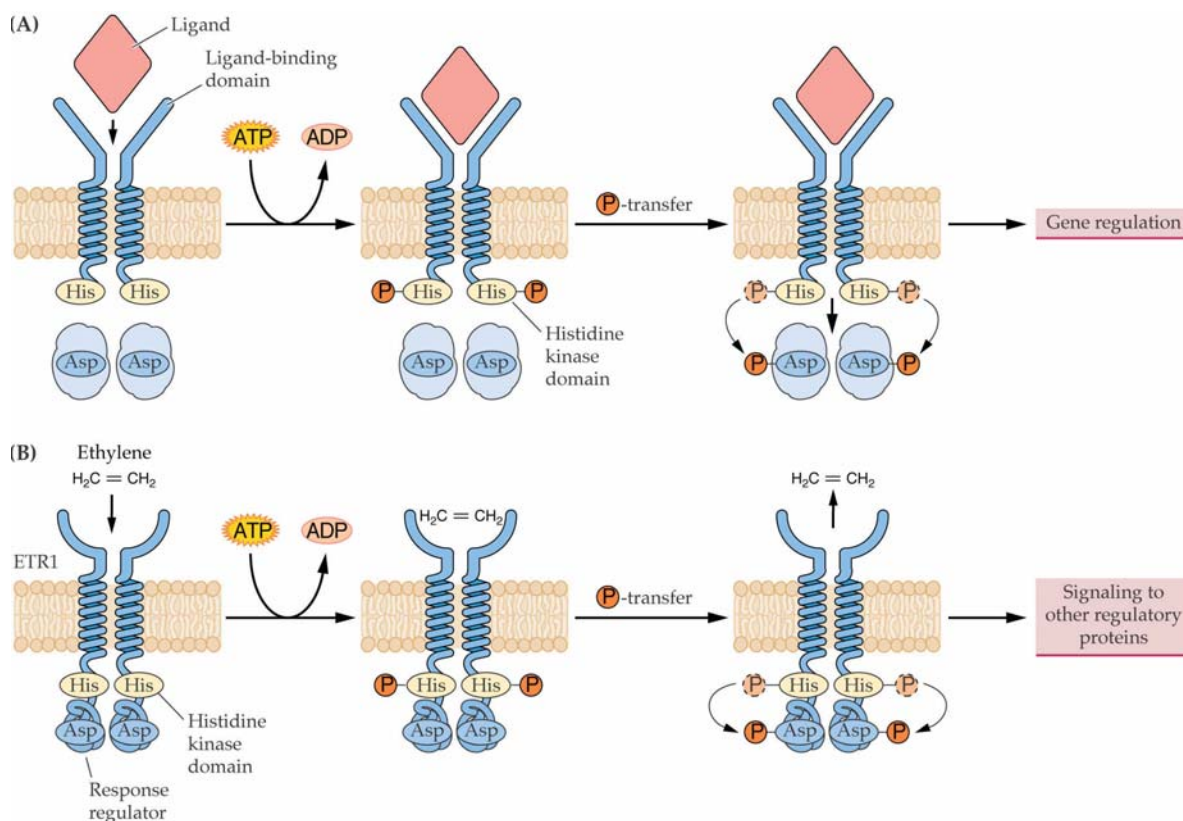
Druhý typ receptoru je receptor spojený s G-proteiny.



Třetí typ receptoru je receptor s enzymovou aktivitou, nejčastěji proteinkinasovou.



Proteinkinasy katalyzují fosforylaci serinových/threoninových, histidinových anebo tyrosinových zbytků. Proteinkinasy tyrosinového typu jsou však u rostlin poměrně vzácné. Zvláštním druhem receptoru jsou tzv. protein kinasy receptorového typu - RLK (receptor-like protein kinases). Vazba ligandu zde způsobuje dimerizaci receptoru, čímž se do blízkosti dostávají cytosolové části receptoru. Následující fosforylace pak stabilizuje aktivovaný komplex. Nejčastěji zde dochází k modifikaci serinových nebo threoninových zbytků. Tento stabilizovaný komplex pak může reagovat s dalšími membránovými nebo solubilními proteiny, jako jsou G-proteiny nebo Ras.



Obr. 18.11 + RLK

U rostlin, obdobně jako u bakterií byl prokázán tzv. dvoukomponentní receptorový systém. První částí systému je receptorová bílkovina, nejčastěji homodimer. Po vazbě ligandu dochází k autofosforylaci v obou C-terminálních částech, nejčastěji na histidinovém zbytku. Druhou komponentou je regulační protein, který je aktivován přenosem fosfátového zbytku z receptorového histidinu na aspartát. Aktivovaný regulační protein pak aktivuje transkripci nebo jiné signální proteiny. Regulační protein může tvořit hybrid s receptorem. Příkladem je známý receptor na ethylen (viz.)

Obrázek : dvoukomponentní a hybridní systém receptorů 18.18

Z hlediska specifity mohou být receptory přísně specifické, to znamená že reagují pouze s jedním typem ligandu, např. auxinem. Jiné receptory jsou substrátově široce specifické. Příkladem je receptor, interagující s oligoglukany (viz obranné reakce rostlin). Vazba ligandu je obvykle velmi pevná, s nízkou  $K_d$  a je reverzibilní.



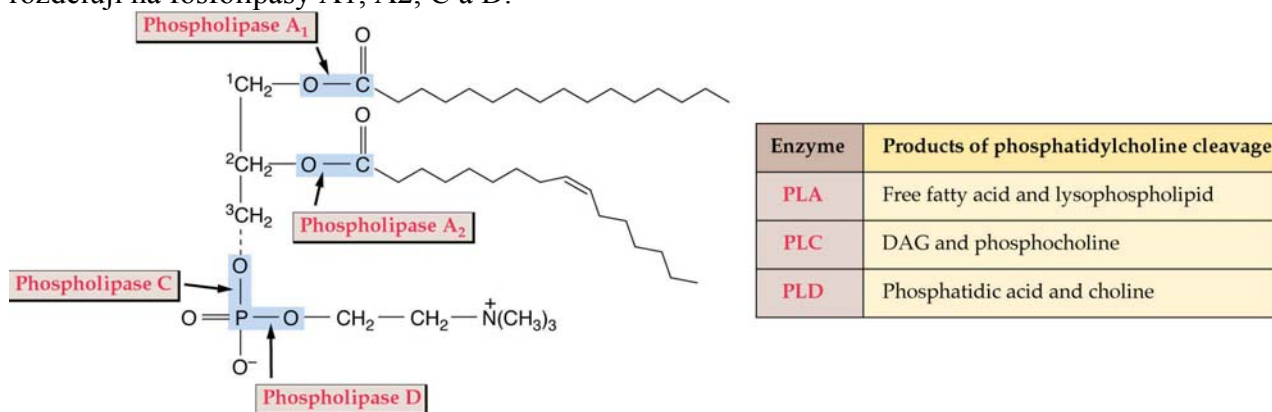
## G-proteiny

Tyto bílkoviny vázající GTP s autokatalytickou aktivitou regulují aktivity mnoha systémů v živočišných buňkách. Aktivní forma vázající GTP se po hydrolýze GTP na GDP stává inaktivní. Rozlišujeme dva základní typy těchto bílkovin. Heterotrimerní G-proteiny se skládají z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Druhý typ G-proteiny jsou tzv. malé monomerní a u živočichů zahrnují bílkoviny typu Ras, Rap, Rho a další. Existence G-proteinu u rostlin byla prokázána imunochemicky a molekulárně biologickými metodami, a to jak heterotrimerů, tak monomerů (Rho proteiny). Jejich role při buněčné regulaci však není zcela objasněna. Předpokládá se, že by mohly regulovat aktivitu fosfolipas C a fosfolipas A2.

## Obrázek- funkce G-proteinů 18.31

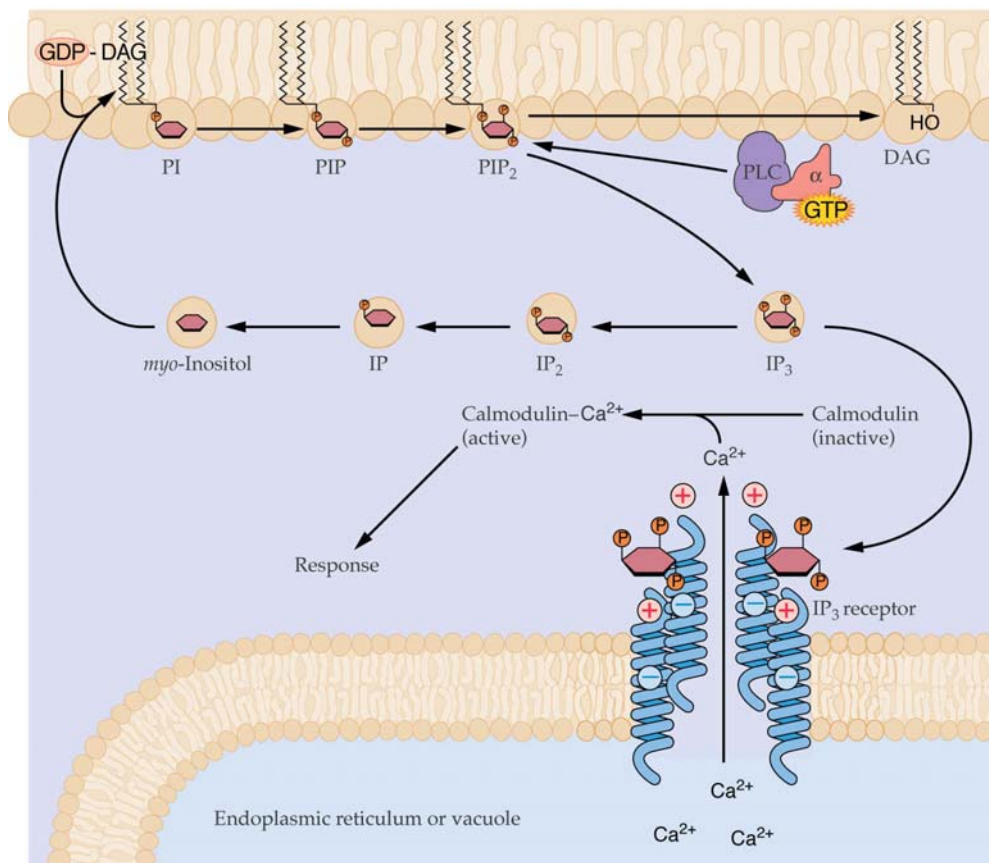
Fosfolipasy a proteinkiny jako součásti signalizačních kaskád

Fosfolipasy katalyzují hydrolýzu esterových vazeb fosfolipidu. podle místa zásahu se rozdělují na fosfolipasy A1, A2, C a D.



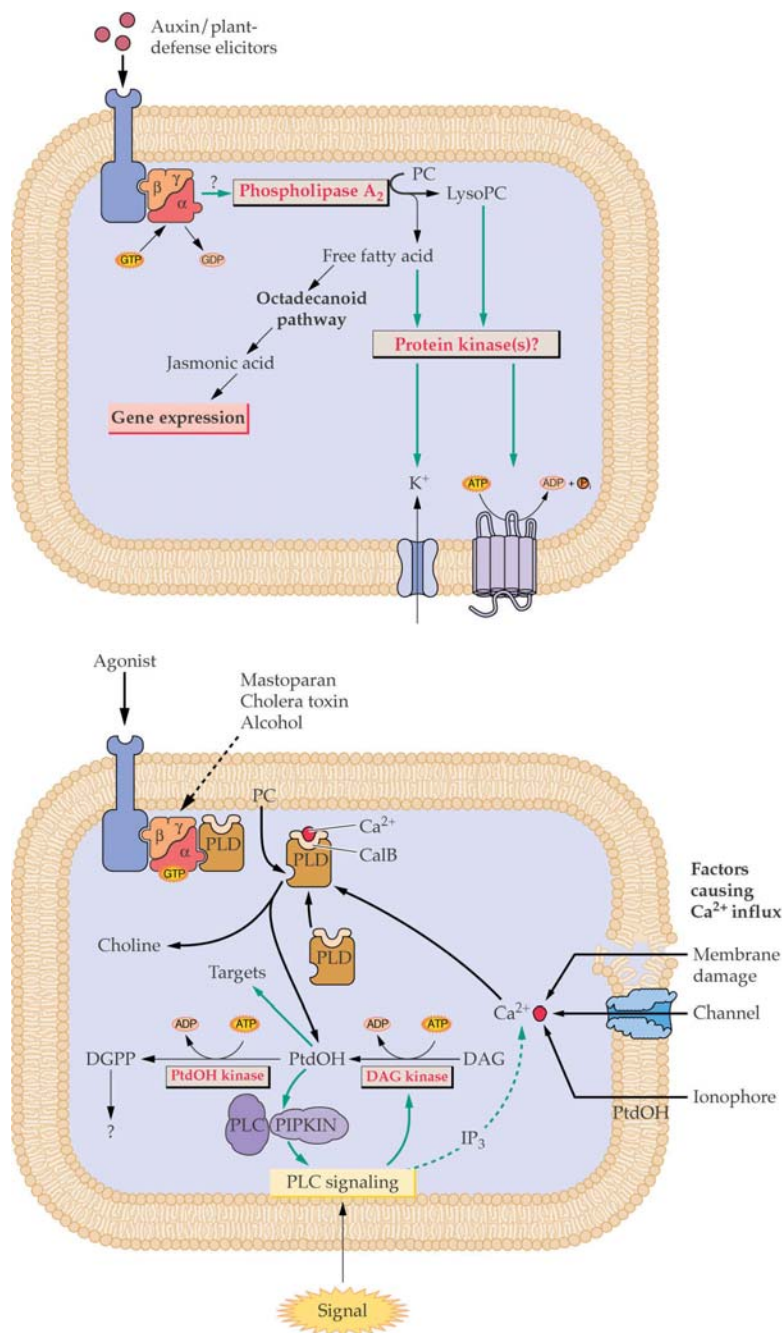
## Obrázek - fosfolipasy 18.35

Fosfolipasa C je typickým příkladem regulačního enzymu. Enzym byl přečištěn a charakterizován z několika rostlin. Substrátem enzymu PI-PLC je fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>). Produktem je inositol-1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol (DAG). Obě dvě látky jsou druzí poslové. IP<sub>3</sub> difunduje do cytosolu a váže se na receptor lokalizovaný na vakuolární membráně. DAG zůstává vázán v cytoplasmatické membráně. Signální molekula IP<sub>3</sub> je degradována fosfatasami až na myo-inositol. Tvorba a regenerace PIP<sub>2</sub> je katalyzovaná sérií reakcí přes PI, PIP a nakonec PIP<sub>2</sub>. Inhibitorem fosfatas jsou Li<sup>+</sup> ionty.



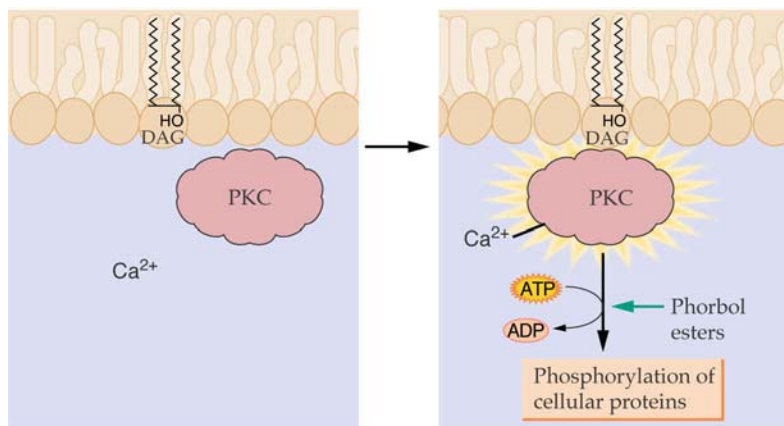
Fosfolipasy A degradují fosfolipidy na lysofosfolipidy a mastné kyseliny. Mastné kyseliny a lysofosfolipidy jsou regulátory mnoha membránových enzymů, např. H-ATPasy. Nejdůležitějším enzymem je fosfolipasa A2, která je pravděpodobně regulována G-proteiny. Tento enzym uvolňuje mastné kyseliny a lysofosfolipidy. Tyto látky silně stimulují aktivitu H-ATPasy. Důležitým produktem reakce tohoto enzymu je uvolňována kys. linolenová, která je prekurzorem kys. jasmonové (viz), důležitou látkou hrající roli při signalizaci rostlin. V poslední době se poukazuje na regulační roli fosfolipasy D. tento enzym uvolňuje kys. fosfatidovou a příslušnou bázi, např. cholin. Kys. fosfatidová hraje rovněž roli druhého posla a uplatňuje se při stárnutí rostlin a dozrávání plodů. Předpokládá se, že další její role spočívá v transportu vápenatých iontů přes membránu jakožto ionofor. Na druhé straně, kys. fosfatidová může vznikat fosforylací diacylglycerolu (uvolňovaného pomocí fosfolipasy C) příslušnou kinasou.

viz obrázek: kombinace PLC, PLD a DAG kinasy.



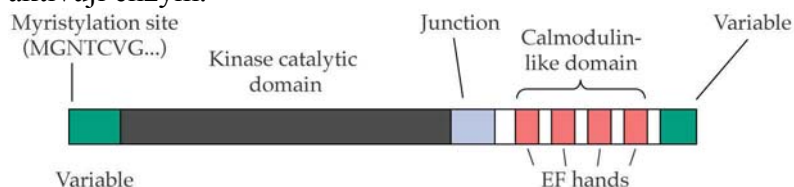
### Proteinkiny

Proteinkiny fosforylují serinového, theroninové, tyrosinové nebo histidinové zbytky bílkovin, zejména enzymů. Účastní se pochodů jako je odpověď na hormony, ataky patogenů, reakcí na světlo, stres, zranění, apod. Podílejí se tak významnou měrou na regulaci jejich aktivity. Proteinkinasa C je u živočichů regulována nejčastěji DAG a vápenatými ionty. Další varianty této proteinkinasy jsou  $Ca^{2+}$  necitlivé. Homologické proteinkiny C nebyly doposud u rostlin zjištěny, avšak výsledky za použití specifických inhibitorů a aktivátorů nasvědčují, že mnohé regulační dráhy u rostlin probíhají cestou proteinkinasy C.



Obr. 18.34

Co se týče mechanismu propojení s receptorem, byly u rostlin nalezeny proteinkinasy několika skupin. První z nich jsou tzv. RLK (receptor-like kinases). Tyto přenášejí signál přímo od ligandu přes membránu. Interakce s ligandem vyvolá tvorbu homodimeru spojenou s fosforylací cytosolové domény receptoru (viz receptory). Vazebné místo některých RLK obsahuje doménu LRR (leucin rich repeat), která je zřejmě zodpovědná za protein-proteinovou interakci. Druhou skupinou jsou  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní proteinkinasy. Tyto proteinkinasy, na rozdíl od všech ostatních obsahují na C-terminální části část vazající specificky vápník, což je sekvence homologní kalmodulinu. Tyto kalcium dependentní proteinkinasy (CDPK) bývají často vázány na cytoplasmatickou membránu. Jedna z těchto proteinkinás (CpCK1) obsahuje na N-konci myristoylační část, která připojuje enzym reverzibilně k membráně. Vápenaté ionty mění konformaci enzymu, způsobují myristoylaci a aktivují enzym.



Obr. 18 62 - Proteinkinasa clamodulinmoveho typu

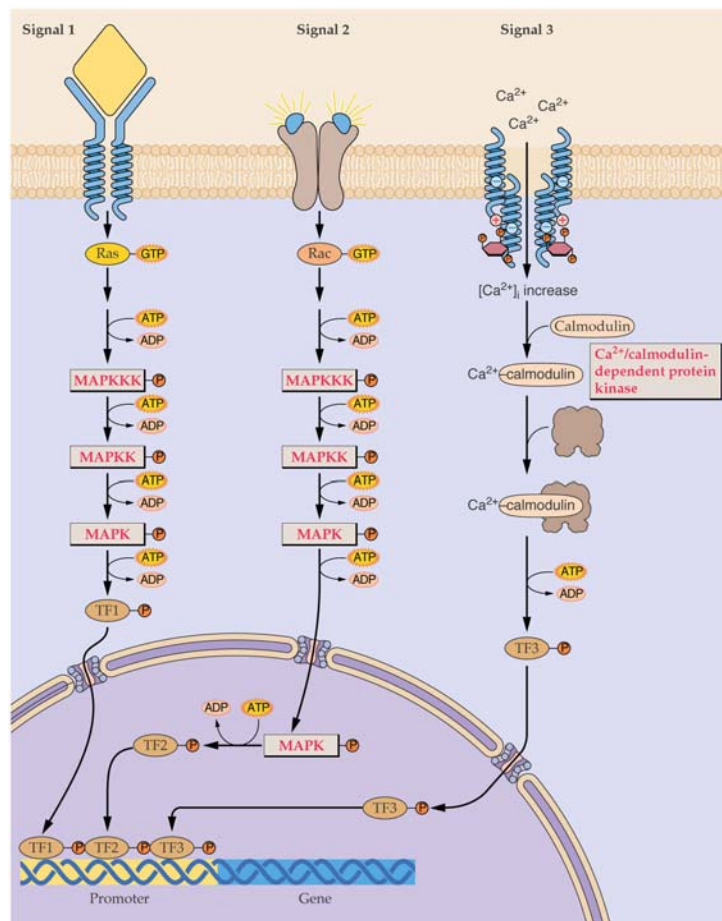
Významnou součástí signalizační kaskád jsou tzv. mitogen-activated protein kinases, MAP-kinasy (MAPK). Tyto kinasy jsou zodpovědné za aktivaci transkripčních faktorů, a to prostřednictvím dalších MAP-kinás (MAPKK). U živočichů jsou tyto enzymy aktivovány malými GTP-vazebnými proteiny (Ras, Rap, Rho, atd.).

Obr. 18.63, zjednodušený

MAP-kinasy se účastní přenosu mechanických signálů jako je dotek, zranění, vítr, ale také přenášejí signály vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů po interakci s růstovými faktory (gibbereliny, auxin, ethylen, houbové elicitory, apod.). Aktivace transkripčních faktorů znamená jejich fosforylaci, protože řada těchto bílkovin je schopna vázat se na DNA teprve po své fosforylaci.

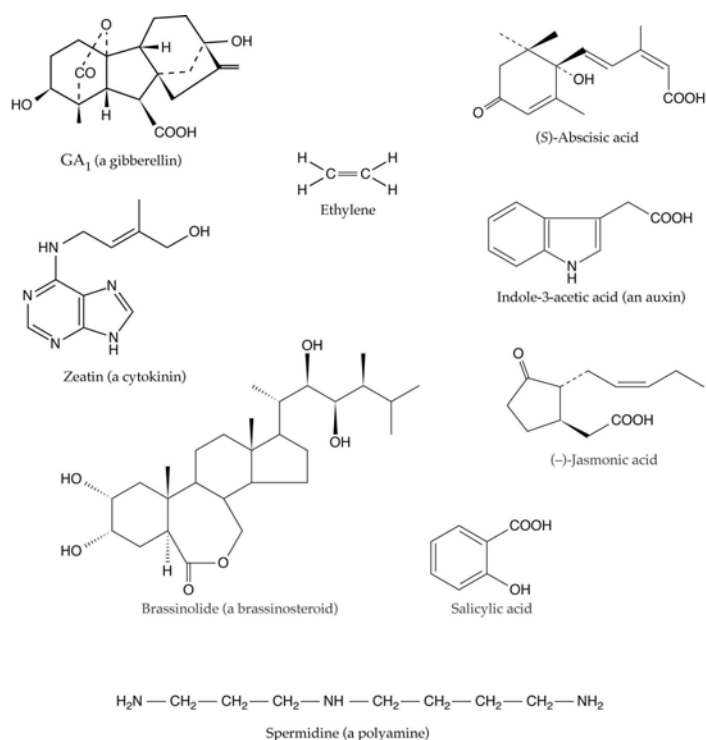
Proteinfosfatasy tvoří komplementární enzymy k činnosti proteinkinás. provádějí hydrolyzu fosfátových skupin vázaných esterovou vazbou na cílovém enzymu.

Analogicky s živočišnými buňkami byly u rostlin identifikovány dvě skupiny fosfatů: 1 a 2A. Tyto enzymy jsou blokovány několika antibiotiky, jako je calyculin, kys. okadaová a microcystin. Tímto způsobem byla např. prokázáno, že hormon kys. abscisová aktivuje signální dráhu zahrnující proteinfosfatů.



## ROSTLINNE HORMONY

Hormony jsou látky, které jsou syntetizovány živými organismy, jsou distribuovány do jiných částí za účelem regulace metabolismu. Původní, nejdéle známá skupina rostlinných hormonů zahrnovala auxiny, gibbereliny, cytokininy, kys. abscisovou a ethylen. V poslední době k nim přibyly další látky, jsou polyaminy a brassinosteroidy, jejichž role je rovněž hormonální. Fyziologické účinky některých hormonů jsou známy víc jak sto let. Postupně byla odhalována jejich struktura, cesty jejich syntézy a degradace. Molekulární mechanismus jejich účinku, receptory a signální dráhy, které jsou jimi aktivovány však doposud nebyly zcela objasněny. Podobně jako živočišné hormony mají rostlinné hormony obdobný způsob interakce s buňkou. Receptory se nacházejí buď na povrchu cytoplasmatické membrány (v tom případě se jedná o odpověď rychlou) anebo v cytoplasmě. Některé receptory se nacházejí na membránách organel, jiné v cytosolu. Vazba hormonu na receptor má za následek aktivaci transkripce genů.

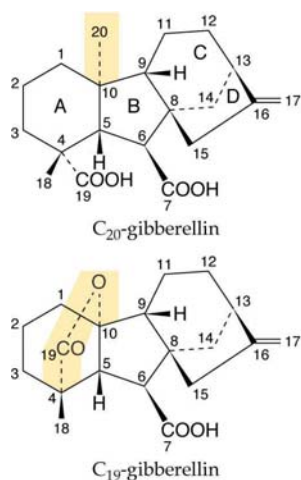


Většina hormonů má však zřejmě receptory obojího typu. navíc se velmi často jedná synergické působení více hormonů, kdy platí že, že efekty první a druhého hormonu izolovaně jsou zcela odlišné od účinku obou hormonů dohromady (například auxin a cytokinin).

Obr. 17.1

## Gibbereliny

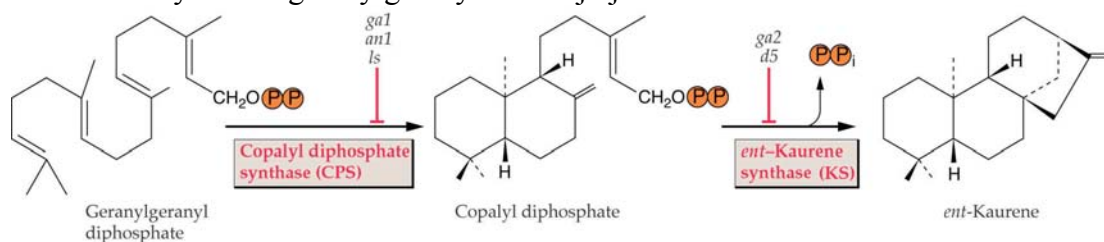
Gibbereliny byly poprvé izolovány v roce 1926 jako metabolity houby *Gibberela fujikuroi*. jejich účinky jsou popsány v učebnicích rostlinné fyziologie. Gibbereliny (GA) jsou tetracyklické diterpenoidy. V současnosti jich existuje zhruba kolem 125. Dvanáct z nich lze nalézt ve výše uvedené houbě, 100 derivátů je syntetizováno samotnými rostlinami. Obsahují buď 20 nebo 19 uhlíkových atomů (C<sub>19</sub> nebo C<sub>20</sub>). Druhá skupina nese navíc  $\gamma$ -laktonový kruh. Gibbereliny jsou klasifikovány číselně GA<sub>1-125</sub>.



Obr. 17.3.

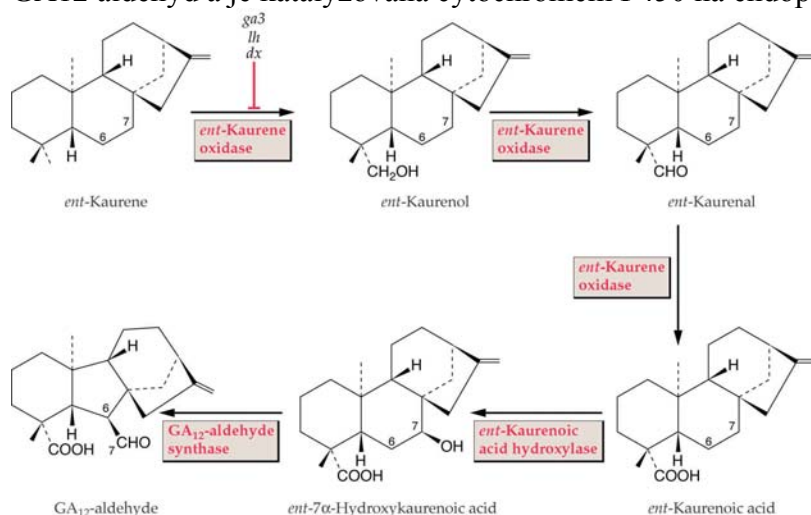
Většina rostlin syntetizuje minimálně 10 derivátů. Fyziologické účinky gibberelinů jsou velmi pestré. Klasickým fyziologickým efektem gibberelinů je prodloužení stonku trpasličích mutantů, potlačení chladové nebo světelné periody pro vývoj květů, zpomaluje stárnutí listů a plodů. Výrazným efektem na úrovni genové exprese je stimulace exprese  $\alpha$ -amylasy v klíčícím zrna.

Syntéza gibberelinů probíhá izoprenoidní cestou přes geranylgeranyldifosfát. Produktem cyklizace geranylgeranyldifosfátu je ent-kauren.



Obr 17.9 a 17.10

Enzymy této cyklizace jsou přítomny v plastidech. Další syntéza pokračuje oxidací na GA<sub>12</sub> aldehyd a je katalyzována cytochromem P450 na endoplasmatickém retikulu.



Obr. 17.12

Další cesta syntézy pokračuje přes GA<sub>12</sub> přes postupné hydroxylace na a dekarboxylaci, kdy vznikají C19-GA.

Zjednodužit obr. 17.13 ??

Deaktivace gibberelinů může probíhat například další hydroxylací, oxidací nebo glykosidací. Signální dráha gibberelinů zahrnuje aktivaci transkripčních faktorů.

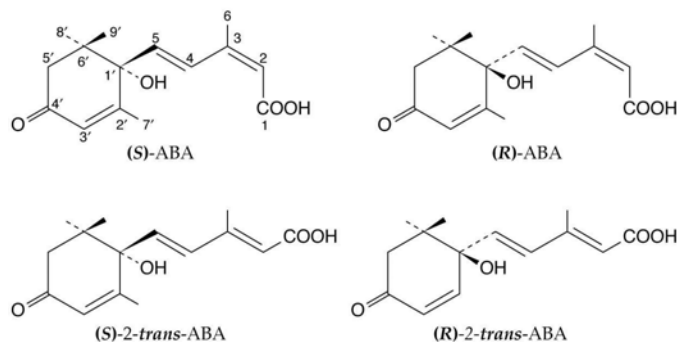
Obr. 18.68

Modifik. obr. 17.16 ??

Doplnit??

## Kyselina abscisová

Kys. abscisová byla objevena již v roce 1950 jako látka inhibující prodlužování koleoptilu ovsa. Postupně byla struktura této látky ztotožněna s dalšími aktivními látkami urychlujícími opadávání listů a faktor nabuzující dormanci. V roce 1965 byla určena struktura této látky, nazvané kys. abscisová. Jedná se o chirální látku a pouze jeden její enantiomer je aktivní (S-enantiomer, 2 cis, 4 trans). Později se zjistilo, že látkou, která vyvolává opadávání listů není kys. abscisová, ale spíše ethylen.



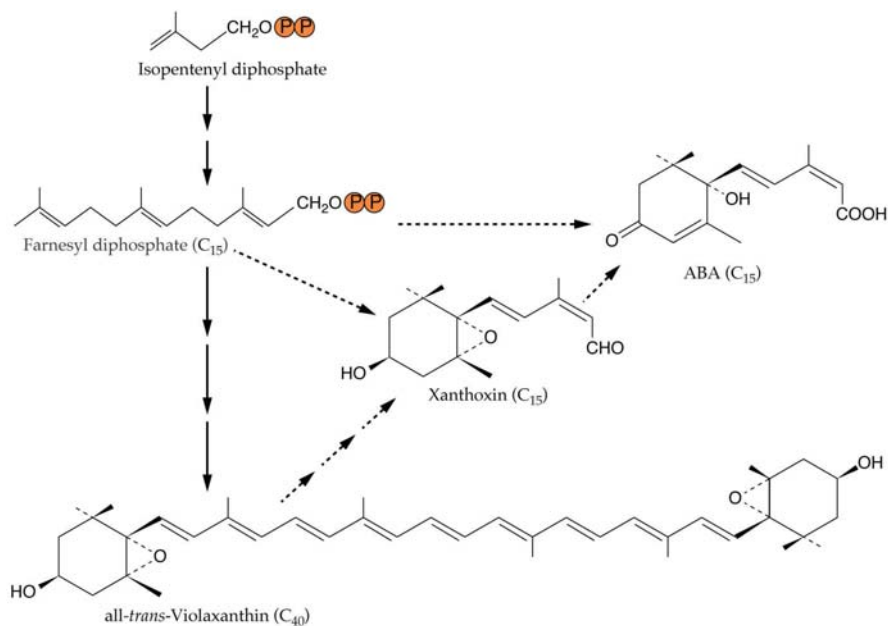
Obr. 17.21

ABA je důležitou látkou, která hraje roli při adaptaci rostliny na stres. Její role je regulace dozrávání semen (zejména blokování viviparie) a zejména regulace otevírání průduchů.

### 17.23

Tento hormon má poměrně jednoduchou strukturu, jeho syntéza však byla dlouhou dobu předmětem spekulací. Podle nejnovějších poznatků je hlavní cestou syntézy štěpení karotenoidů. Hlavní produkt syntézy karotenoidů,  $\beta$ -karoten oxidován a hydroxylován na all-trans-violaxanthin a tento je izomerován na 9-cis-violaxanthin. Dvojná vazba v poloze 11 je štěpena kyslíkem, produktem je xanthoxin. Tento je postupně hydroxylován a oxidován až na kys. abscisovou. Syntéza ABA na úrovni transkripce se zvyšuje, pokud se rostlina nachází ve stresu (např. teplotním nebo solném).

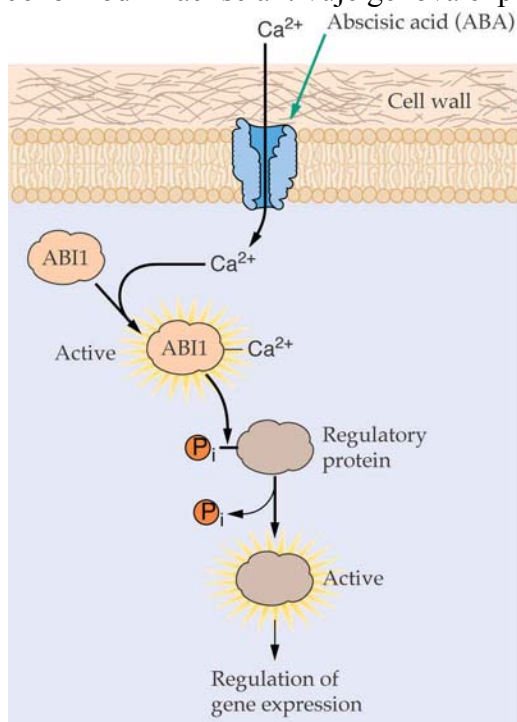




Nejpravděpodobnější cesta degradace je oxidace na kys. 8'-hydroxy-ABA, kys. phaseovou, dihydrophaseovou a konjugace na glykosid. Některé pathogenní houby (*Cercospora*) jsou schopny syntetizovat velké množství ABA a tím likvidovat rostlinu.

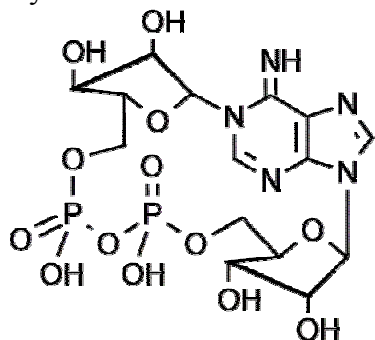
Obr. syntéza kys. abscisové 17.24

Kys. abscisová se váže na specifické receptory. Tyto receptory se nacházejí uvnitř buňky a také na cytoplasmatické membráně. Receptory na cytoplasmatické membráně jsou pravděpodobně vápenaté kanály. Vápenaté ionty pronikající dovnitř buňky aktivují protein ABI1. Tento protein má vysoce homologní sekvenci se Ser/Thr proteinfosfatasami. Protein ABI1 katalyzuje odštěpení fosfátu z regulačního proteinu. Jeho modifikací se aktivuje genová exprese.



Obr. 18.27

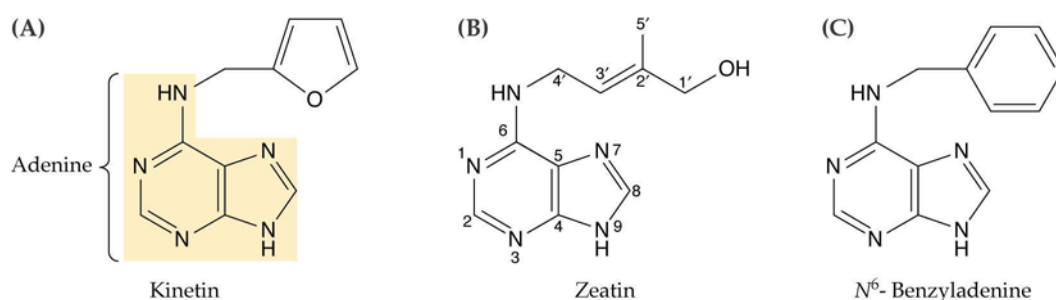
Působení kys. abscisové na regulaci otevírání průduchů předpokládá aktivaci G-proteinů. Působení ABA na buňky zvyšuje pH cytosolu. Je pravděpodobné, že mobilizace vápníku indukovaná ABA aktivuje tvorbu c-ADPR, který indukuje výtok vápenatých iontů z vakuol. Vysoká koncentrace vápníku aktivuje draselné kanály. Výtok draslíku má za následek ztrátu turgoru a uzavření průduchů.



Dále schéma?? viz přednáška?

### Cytokininy

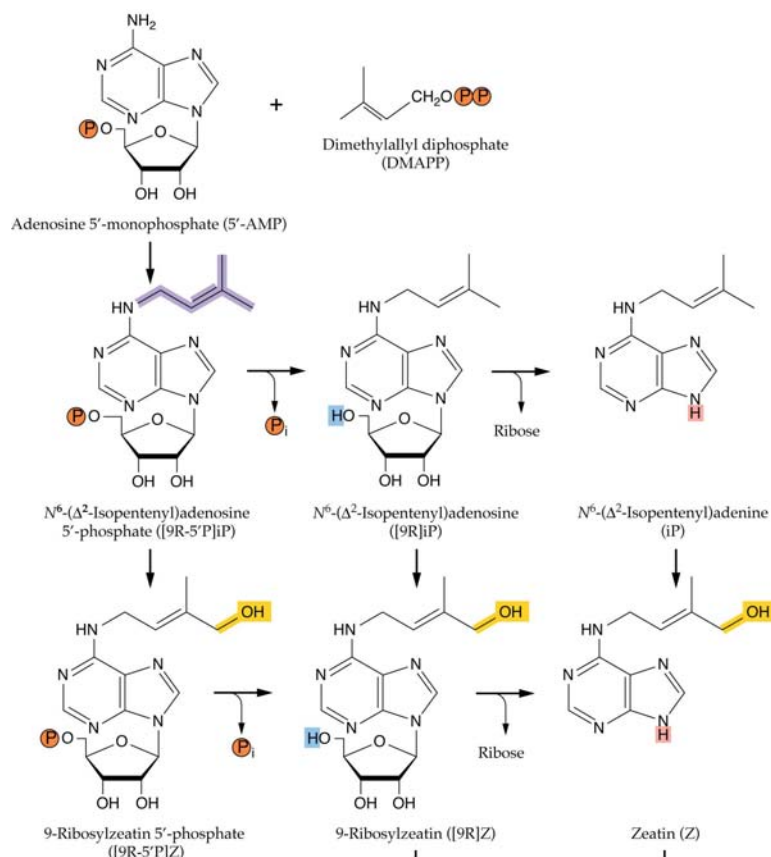
Cytokininy jsou N-deriváty adeninu. Jejich účinek byl poprvé popsán v roce 1950, kdy bylo zjištěno, že kokosové mléko stimuluje dělení buněk. Podobný efekt vykazoval produkt autoklavování DNA, který jak se později ukázalo, obsahoval artefakt, 1 N6-furfuryladenin. První přirozený cytokinin, zeatin, byl izolován v roce 1963 z kukuřičných semen. Cytokininy obsahují adenin substituovaný v poloze N6 např. izopentenylovým řetězcem. Syntetický derivát, N6-benzyladenin (nebo benzylaminopurin - BAP) má stejné účinky. Fyziologické účinky těchto látek jsou velmi pestré. Indukují otevírání průduchů, potlačují apikální dominanci vyvolanou auxiny, inhibují stárnutí listu. Ve spojení s auxiny indukují buněčné dělení a diferenciaci. Ekvimolární koncentrace auxinu a cytokininu stimuluje proliferaci nediferencovaných kalusů.



Obr. 17.30 A - artefakt, B-přirozený, C umělý

Cytokininy jsou syntetizovány z AMP a dimethylallyldifosfátu. N6-izopentenyl-AMP je hydroxylován, poté je odštěpen fosfát a ribosa.

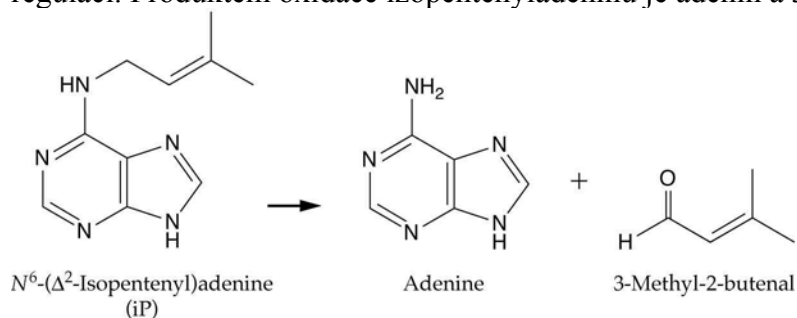
Schéma zjednodušené 17.32a



Některé patogenní bakterie jsou schopny syntetizovat cytokininy (Např. Agorbakterium tumefaciens). Geny pro syntézu hormonu jsou lokalizovány na plasmidu, který se integruje do genomu rostliny. Nadprodukce hormonu vyvolá tvorbu nádoru.

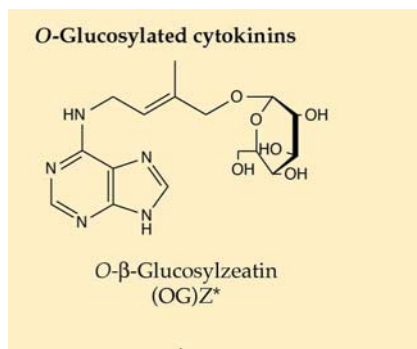
Některé tRNA rostlin, živočichů a mikroorganismů obsahují báze, které byly modifikovány za vzniku cytokininů, např. *N*<sup>6</sup>-isopentenyladenosin nebo jeho zeatinový analog. Množství těchto modifikovaných tRNA obsahujících cytokininovou strukturu je zřejmě mnohem nižší než cytokininů syntetizovaných de novo.

Pro biologickou aktivitu cytokininů je esenciální přítomnost bočního řetězce. Tento řetězec je odštěpován cytokininoxidasou, která zřejmě hraje významnou roli při regulaci. Produktem oxidace izopentenyladeninu je adenin a 3-methyl-2-butenal.

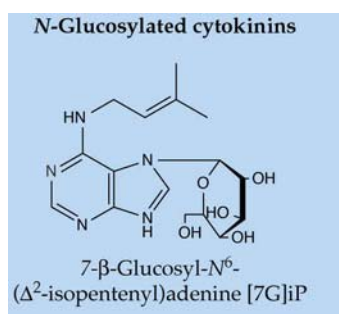


Obr. 17.39a

Další cestou regulace aktivity cytokininů je jejich O-glykosidace. Vzniklé O-β-glykosidy jsou sice biologicky inaktivní, mohou se však snadno hydrolyzovat glykosidasami na aktivní hormon. Druhou skupinou konjugátů jsou 3-, 7-, nebo 9 N-β-glykosidy, které jsou zřejmě ireverzibilní cestou jejich deaktivace.



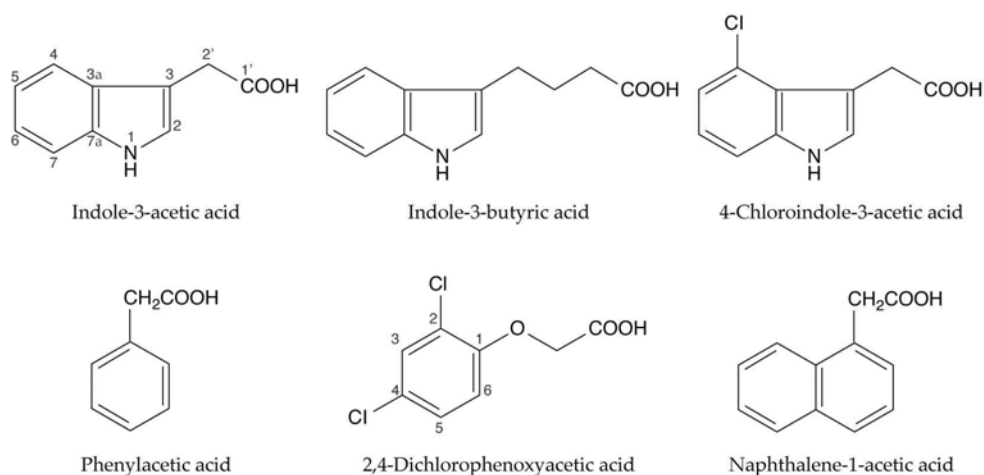
Obr. 17.40 a,b



Cytokininy se vážou na receptory, jejichž účast při signalizaci není ještě objasněna. Jedním z nich je zřejmě protein CKI1, o sekvenční homologii blízké hybridním dvoukomponentním kinasám.

### Auxiny

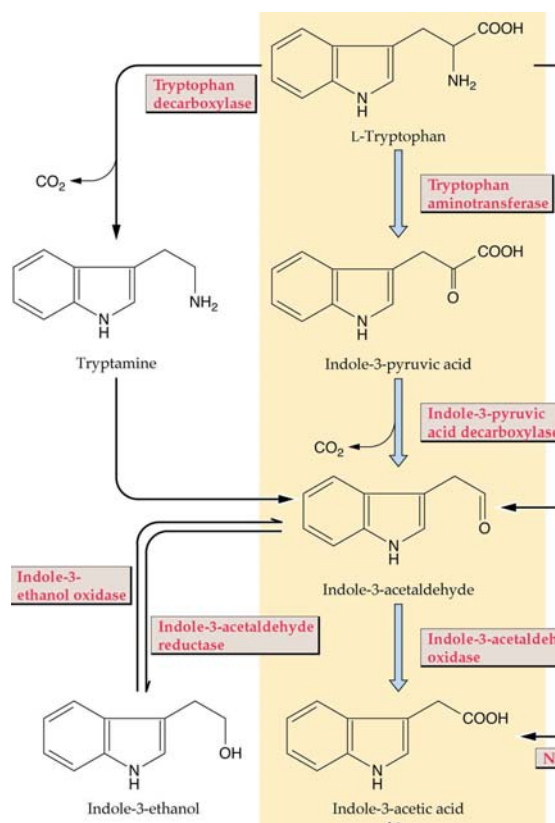
Auxin byl jedním z prvních objevených rostlinných hormonů. jeho účinky, fototropismus a geotropismus byly studovány již v 19. století Darwinem. Struktura auxinu, jako kys. indolyl-3-octové byla získána v roce 1926. Postupně byly objeveny další deriváty mající auxinový efekt, některé z nich zcela syntetické. Typické fyziologické účinky auxinu jsou apikální dominance, tropismy, prodlužování buněk. Syntetické auxiny jsou ve vyšších koncentracích používány jako účinné herbicidy.



Obr. Syntetické a přirozené deriváty auxinu

Prekurzorem syntézy auxinu de novo je L-tryptofan. Místem syntézy je apikální meristém a mladé listy, odkud se transportuje směrem ke kořenům. Kys. indolyl-3-

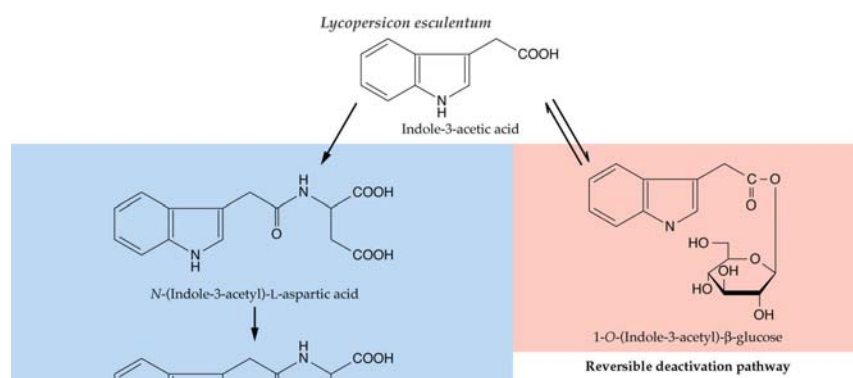
octová může vznikat z tryptofanu dvěma cestami. První zahrnuje transaminaci na indolyl-3-pyruvát, dekarboxylaci na aldehyd a poté oxidaci na kyselinu. Druhá cesta dekarboxylací přes tryptamin je méně pravděpodobná. Existují však i méně časté cesty syntézy, např. u brukvovitých rostlin, přes acetonitril. U některých rostlin byl nalezen další auxin, kys. indol-5-máselná, která vzniká z kys. indol-3.octové připojením acetátu.



Degradační cesty auxinu jsou poměrně pestré. Mohou probíhat dekarboxylací a následnou oxidací peroxidasou, na aromatickém jádře nebo bočním řetězci.

Obr. Modifikované schéma 17.45

Část auxinu je metabolizována konjugací a je možné, že tyto deriváty jsou skladovány ve vakuole a použity pro zpětnou syntézu auxinu. Na níže uvedeném obrázku je zachycen derivát auxinu a kys. asparagové (ireverzibilní cesta konjugace) a  $\beta$ -glykosid auxinu (reverzibilní cesta).



17.46b

Některé bakterie jsou schopny syntetizovat auxin, stejně jako cytokininy (A. tumefaciens). Geny pro syntézu se nacházejí v plasmidu, který se integruje do genomu rostliny. Je zajímavé, že syntéza auxinu může být ovlivňována jinými rostlinnými hormony. Například gibbereliny mohou výrazně zvyšovat obsah auxinu, naopak cytokininy obsah auxinu snižují. Mechanismus této regulace není znám. Účinek auxinu na celou rostlinu je velmi komplexní. Molekulární mechanismus účinku v buňce je předmětem intenzivního studia.

Fototropismus je zprostředkován flavoproteinem zvaným fototropin. Nejúčinnější část světelného spektra je v oblasti flavoproteinů. Auxin je transportován z růstového vrcholu do zastíněné části stonku, kde způsobuje prodlužování. Rovněž gravitropismus. Auxin je transportován z růstového vrcholu na spodní stranu kořene, kde inhibuje růst.

Polární transport: transport dovnitř vlivem pH gradientu (alkalický cytosol), dale asymetrická distribuce přenašeče (přenašeč se přenáší z Golgiho aparátu). Molekulární mechanismus účinku je dvojitý. Krátkodobý efekt auxinu způsobuje změny v transportu iontů (okyselení apoplastu). Turgor buňky působící na změkčenou buněčnou stěnu způsobuje prodlužování buněk. Tyto změny jsou iniciovány vazbou auxinu na receptor, pravděpodobně transmembránový protein ABP1 (auxin binding protein). Vazba auxinu způsobuje konformační změny v C-terminální oblasti proteinu. Signální dráha zahrnuje pravděpodobně fosfolipasu A2. Uvolněné lipidy pravděpodobně aktivují H<sup>+</sup>-ATPasu cestou fosforylace. Zvýšená kyselost apoplastu může způsobit prodlužování buněčné stěny. Dlouhodobý účinek auxinu je způsoben změnami v transkripci genů. Auxin se dostává do buňky cestou aktivního transportu přes cytoplasmatickou membránu. Váže na specifický protein ARF1 (auxin response factor). Tato bílkovina je transkripčním faktorem. Váže se v jádře na sekvenci TGTCTC. Tato sekvence je součástí promotorů genů, které reagují na auxin.

### Ethylen

Fyziologické účinky ethylenu byly pozorovány již koncem 19. století, kdy se zjistilo, že plyn používaný ke svícení ovlivňuje výrazným způsobem růst klíčících etiolovaných semen hrachu. Pomocí sérií klasických chemických reakcí se podařilo prokázat, že plynnou složkou zodpovědnou za tyto efekty je ethylen. Teprve kolem roku 1930 se podařilo prokázat, že ethylen je syntetizován samotnou rostlinou.

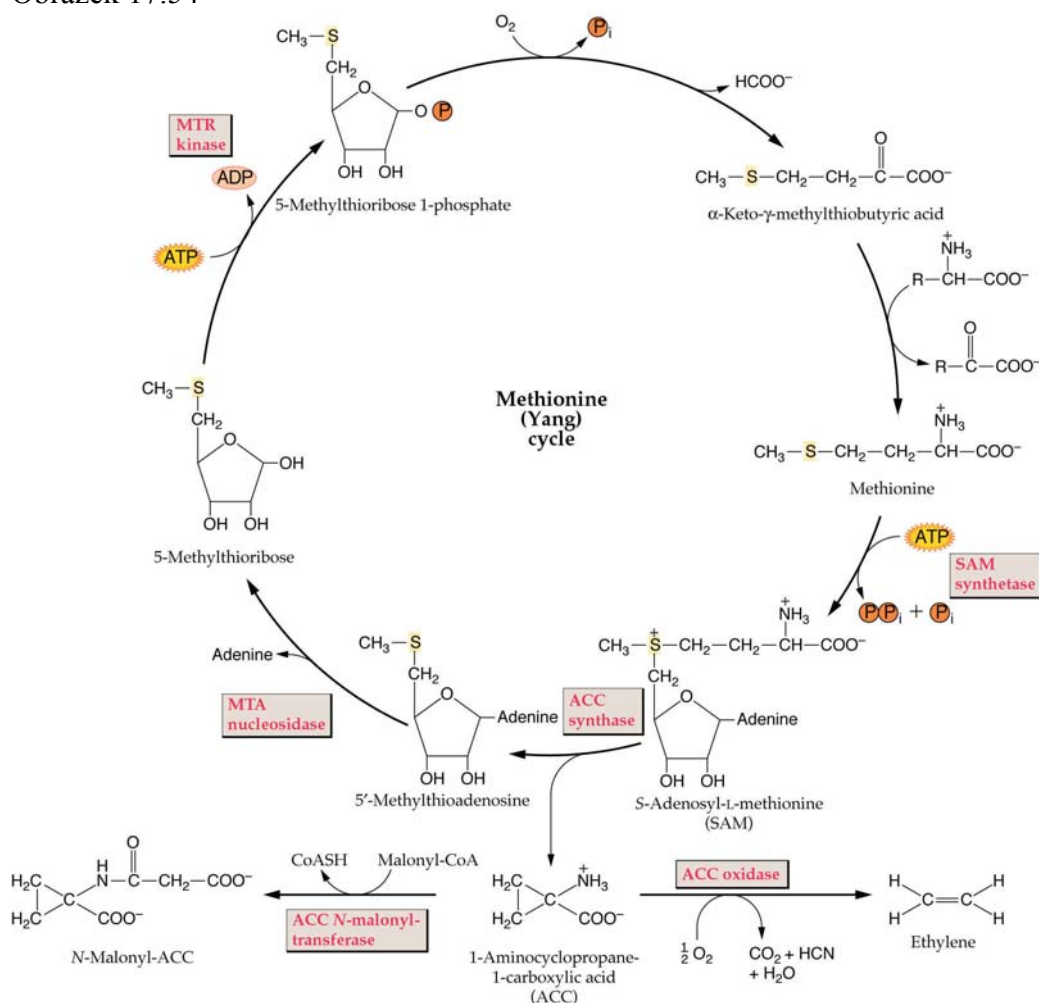
Studium jeho syntézy a role jakožto rostlinného hormonu byla omezena metodami jeho stanovení, což je dnes plynová chromatografie,

Jakožto hormon ovlivňuje klíčení semen, růst stonků a kořenů, stimuluje opadávání listů a zrání plodů. Účastní se rovněž obranných reakcí proti patogenům.

Cesta jeho syntézy byla velmi intenzivně studována. Hlavním prekurzorem je S-adenosylmethionin (aktivní methionin - SAM), která je v běžném metabolismu donorem methylové skupiny. V případě syntézy ethylenu však vzniká 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC) a 5'-methylthioadenosin. Cyklický derivát se pak oxiduje za vzniku ethylenu, CO<sub>2</sub>, a kyanovodíku. 5'-methylthioadenosin se pak regeneruje na methionin.

Klíčovým enzymem syntézy ethylenu je ACC synthasa. Kofaktorem enzymu je pyridoxalfosfát. Je tedy citlivý na příslušné inhibitory, jako je kyselina aminoxyoctová. Druhý enzym, ACC oxidasa využívá jako koenzymu kys. askorbovou.

Obrázek 17.54



Syntéza ethylenu je regulována hladinou ostatních hormonů, zejména auxinu. Auxin zvyšuje hladinu ACC synthasy v buňce a transkripci některých izoforem mRNA. Při napadení rostliny patogenem se hladina ethylenu rovněž přechodně zvyšuje.

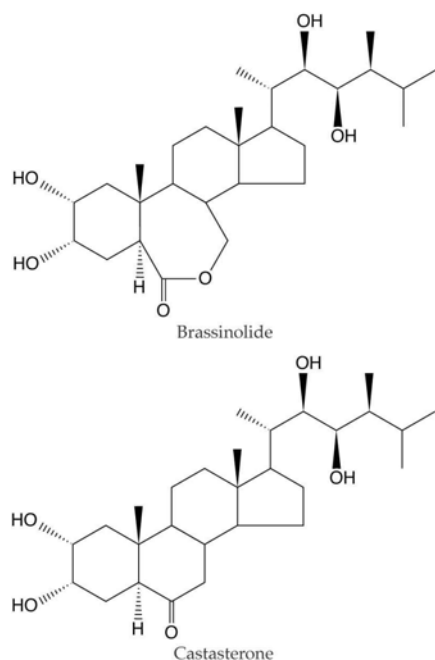
Ethylen se váže na specifický receptor, který byl jako jeden z prvních rostlinných receptorů klonován. Jedná se o protein ETR1 (79 kDa), jehož C-terminální část je homologní s dvoukomponentní kinasou. ETR1, jakožto jeden z těchto receptorů, existuje v membráně jako dimer. Po vazbě ethylenu dochází k dimerizaci obou monomerů, autofosforylaci a přenosu fosfátu na aspartátový zbytek. Existuje velmi těsná korelace mezi syntézou ACC synthasy a a hladinou celulasy, která by s emohla podílet na dozrávání plodů a opadávání listů.

### Brassinosteroidy

Steroidní struktura, hormony byly poprvé izolovány z pylu řepky (Brassica), dále z kaštanu.

Dva typy brassinolid, castasteron.

Obr. 17 57



Vyskytují se v řasách lišejníků nahosemenné rostliny, krytosemenné rostliny. C27, C28, C29, celkem izolováno asi 40.

Fyziologické účinky: růst stonků, inhibice růstu kořenů, aktivace protonové pumpy, reorientace celulosových mikrofibril, růst pylových zrn, syntéza ethylenu.

Syntéza brassinolidů:

zdroje je campesterol - hydroxylace -

Obr. 17.62a, zjednodušené schéma přes castasteron jako příklad

Cesta deaktivace: obr. 17.65

mechanismus funkce – receptor, odlišný od steroidního receptoru živočichů  
brassinost., receptor rostlin zřejmě RLK napojenou na MAPK

Polyaminy

Existence v rostlinách zjištěna již dávno, jejich hormonální role objevena nedávno.  
Role: buněčné dělení, syntéza DNA, RNA a proteinů. Koncentrace v buňkách poměrně vysoká

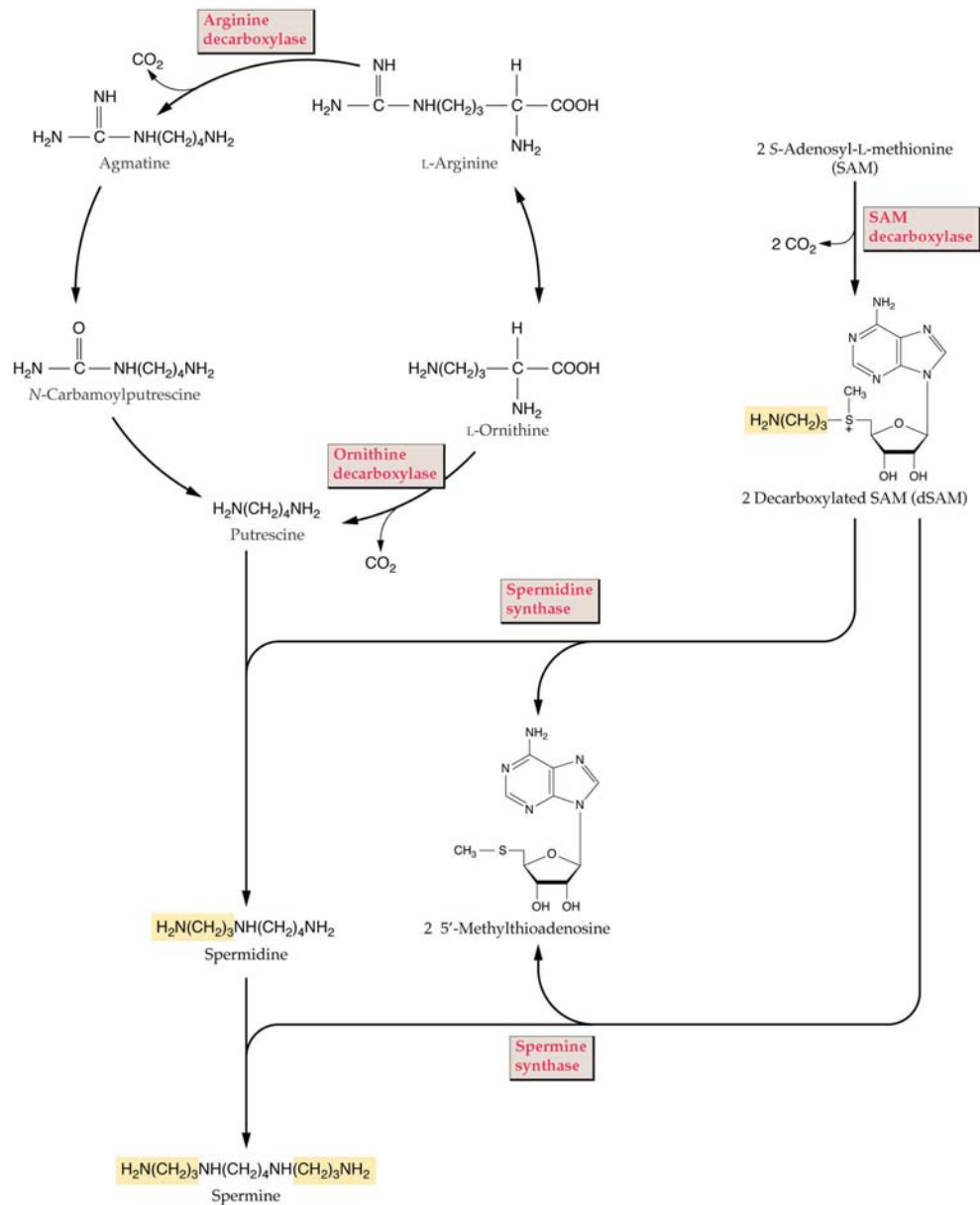
asociovány s kyselými složkami, DNA, RNA, fosfolipidy a kyselými proteiny

buněčné dělení, tvorba, hlíz, tvorba kořenů, embryogeneze, rozvoj květů, zrání plodů

putrescinn, spermidin a spermin

schéma syntézy: 17.68



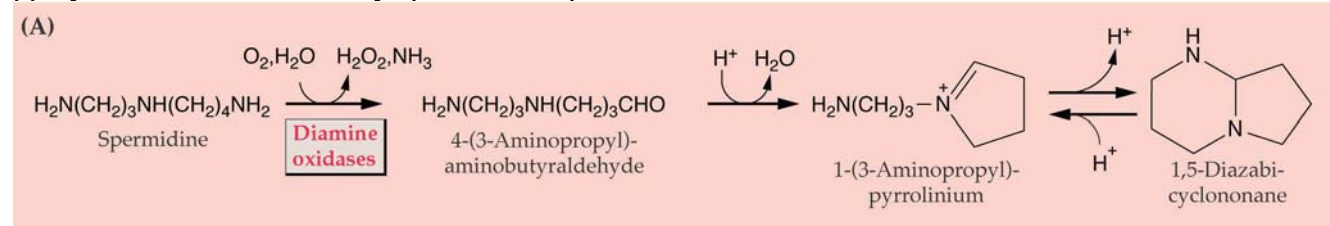


pozoruhodná role donoru propylaminu: S-adenosylmethioninu a dekarboxylasy

cesty katabolismu:

diaminoxidasa - substráty putrescin, kadaverin (méně sprmidin a spermin), tvorba aminoaldehydů

ppolyaminoxidasa - substráty spermidin a spermin



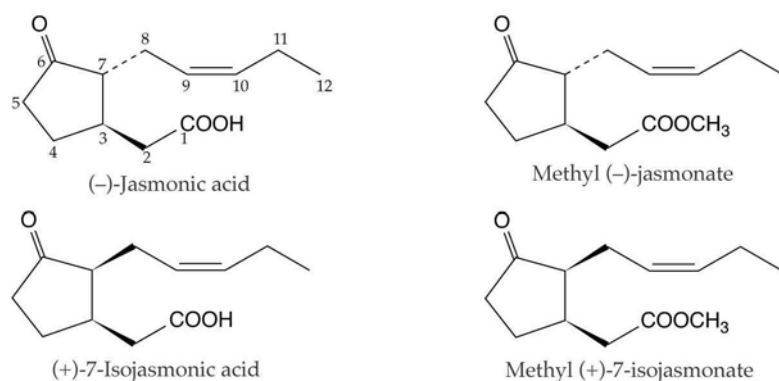
obr, 17.70

## Kyselina jasmonová

Strukturně podobná prostaglandinům, včetně cesty její syntézy. Původně byla objevena jako látka inhibující růst (1971), teprve epozději byla zjištěna role při obraně rostlin. Oba typy látek se syntetizují z mastných kyselin. V roce 1980 byl jasmonát a methyljasmonát objeveny jako látky zpomalující růst a urychlující stárnutí. Existuje mnoho derivátů, stereoisomery.

Obr. 17.72, deriváty jasmonátu

Přirozenými a nejčastějšími deriváty jsou (-)-JA a (-)-methyljasmonát. Methylester je těkavý.



Fyziologické efekty: inhibice růstu rýže, pšenice, zpomalení růstu kořenů, urychlování zrání plodů, roel při torbě květů a plodů. Hormadí se při zranění rostliny, při kontaktu s elicitory (oligosacharidy) a systeminem. Moduluje expresi četných genů. Aktivuje syntézu fytoalexinů.

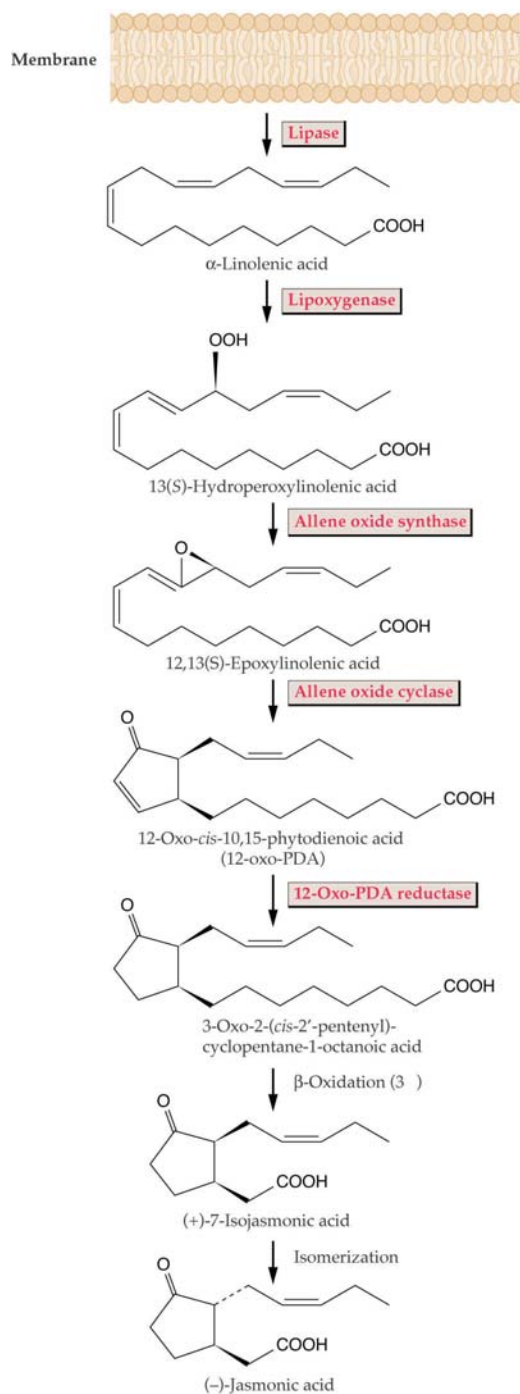
Syntéza kys. jasmonové: zdrojem kysl. linolenová

Obr. 17.73

Klíčové enzymy: lipoxygenasa, allen oxid synthasa a cyklasa. Allenoxid synthasa je klíčový enzym, obsahuje P450, nevyžaduje však kyslík, ani NADPH. Transkripce enzymu je indukována zraněním.

Degradace, hydroxylací a glukosidací.

Mechanismus – kys. Jasmonová se indukuje při zrenění rostliny neboi po napadení herbivorním hmyzem



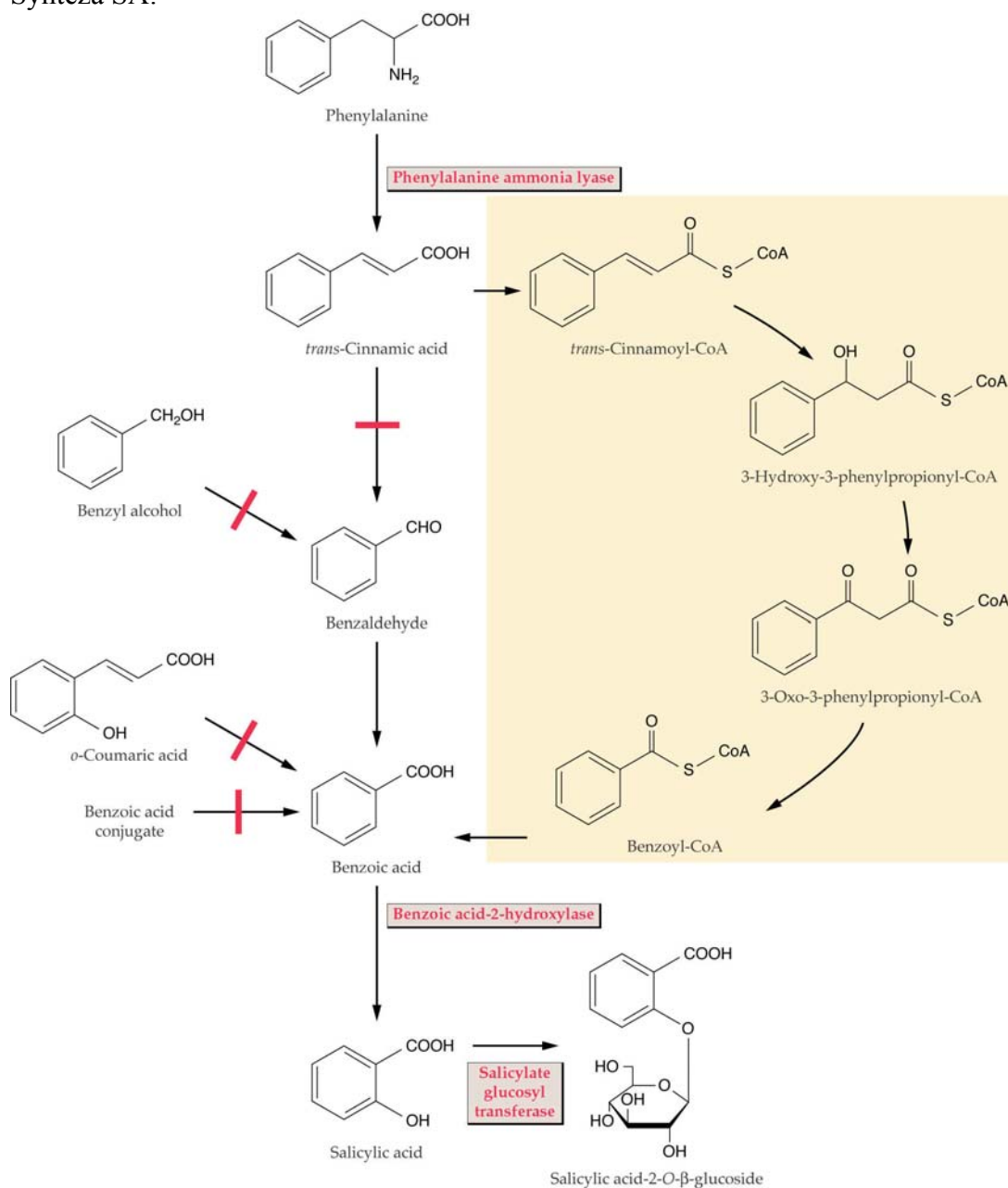
### Salicylát

Salicylát je přítomen konstitučně v mnoha rostlinách. Je znám efekt zpomaluje stárnutí květů, prodlužuje kvetení (přídavek do vázy s květinami). Podobnou roli hraje methylester, který je těkavý.

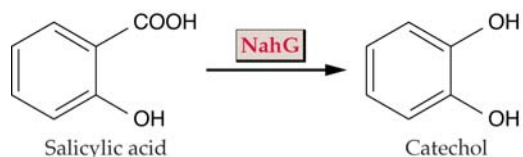
Známa je role při termogenezi v květu aronovitých roslin (aktivace CN necitlivé repirace). Látka vyvolávající termogenezi byla identifikována v roce 1987 jako salicylát. 0.12  $\mu\text{g/g}$ . SA hraje významnou roli při obraně rostlin indukcí PR proteinů. Přídavek SA vyvolává indukcí PR proteinů ( $\beta$ -1,3 glukanasý, chitinasý). Je SA

látkou, která způsobuje systémovou rezistenci, přenos signálu? Toto se neprokázalo, signál který se šíří teprve vyvolá syntézu SA v místě obrany.

Syntéza SA:



přes PAL, cinnamoylKOA, odbourání β-oxidací na benzoát., hydroxylací na salicylát, dále konjugace na glykosid.



Obr. 17.82

## SEKUNDÁRNÍ METABOLITY

Terpenoidy  
 Alkaloidy  
 Fenylproanoidy  
 Flavonoidy  
 Ligniny

Neúčastní se přímo růstu a vývoje, metabolismu. Jejich role – při ekologické interakci, alleopatie. Obranná funkce proti patogenům. Syntetizovány buď konstitučně nebo indukovány.

Allelopatie: Věda, která studuje oricesy zahrnující sekundární metabolity produkované rostlinami, řasami, bakteriemi, houbami, které ovlivňují růst a vývoj zemědělských a biologických systémů

Obsah sekundárních metabolitů v rostlině je součtem syntéz a odbourávání. Závisí na růstové periodě, části rostliny, denním období, světle, apod. Tyto látky se do okolí šíří: těkáním (terpenoidy). Lohováním a smýváním z listů (ve vodě rozpustné látka, dešť rosa), louhováním z kořenů a semen do půdy, při rozkladu zbytku rostlin.

Efekty: potlačení růstu, klíčení (dlouhodobé efekty – až 3 roky). Pěstování monokultur – zvyšování obsahu látek.

Terpenoidy

Základní jednotka izopren (C<sub>5</sub>). Velmi pestrá skupina, stejná dráha jako syntéza četných hormonů, steroidů, karotenů, apod.

Monoterpeny – C<sub>10</sub> – vonné a těkavé látky rostlin

Seskviterpeny – C<sub>15</sub> – fytoalexiny, ak. absicová

Diterpeny C<sub>20</sub>, např. fytol, gibbereliny, atd.

Základní syntetická dráha : přes HMG-CoA – k mevalonátu k isopenteyl DiP

Obr. 24.4.

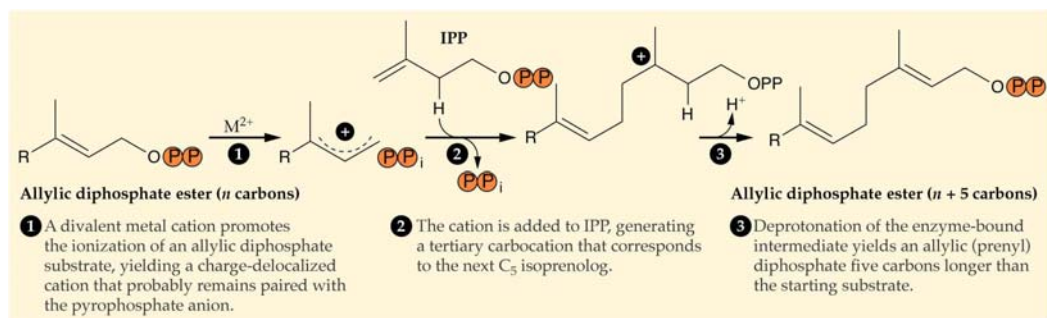
Syntéza buď v ER nebo v plastidech.

Další syntéza příkladem IPP

Obr. 24.7.

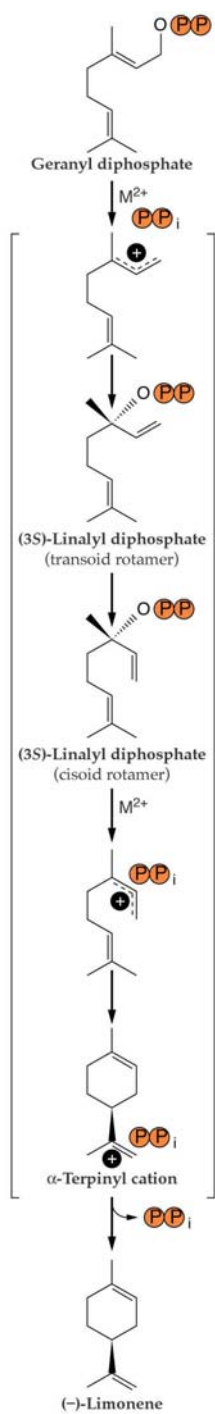
Enzymem je prenyltransferasa – karbokationický intermediát

Obr. 24.8. pouze 1. část



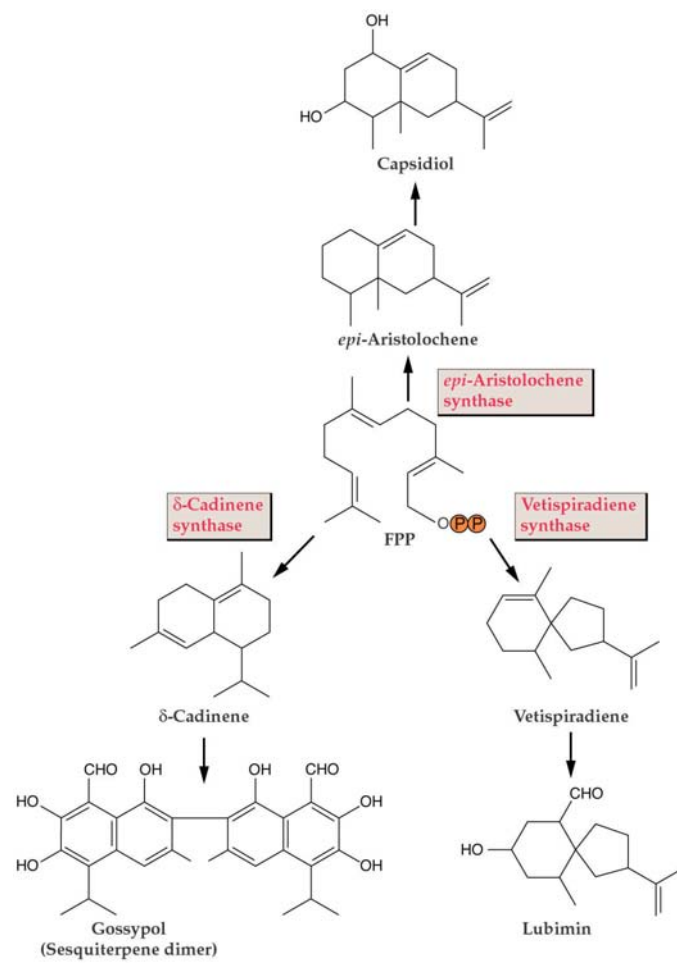
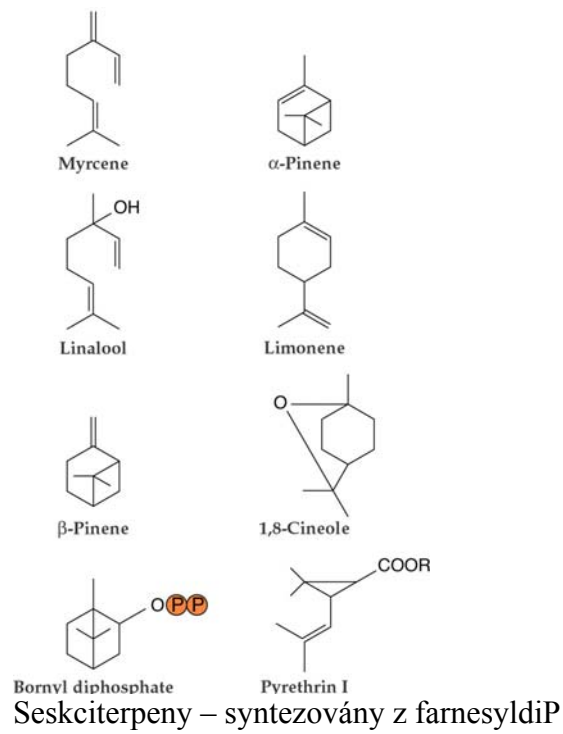
Syntéza monoterpenů – z geranyldifosfátu

Obr. 24.9.



Další příklady monoterpenů –

Obr. 24.10.



Obr. 24.13

capsidiol – fytoalexin, gossypol – obranná látka bavlníku,



## ALKALOIDY

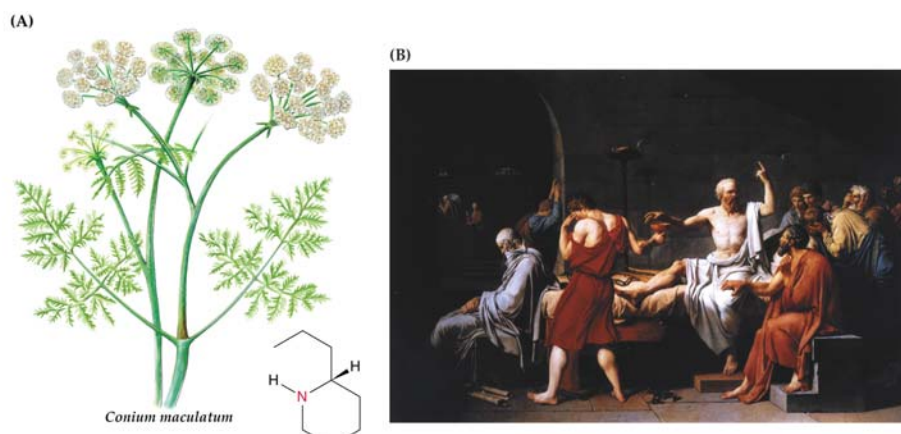
Alkaloidy – obsahují převážně bazický heterocyklický dusík (alkaloidy prave), pseudoalkaloidy neobsahují heterocyklický dusík. Původně rostlinného původu (mohou být i živočišné)

Alkaloidy se tvoří v zelených částech rostliny. Transportují se do celé rostliny, Nevyšší obsah alkaloidů bývá v semenech. Tyto látky mohou být metabolizovány a použity jako zdroj dusíku. Mají především, allelopatickou funkci. Inhibice růstu a klčení inhibice bakterií, jedovaté látky pro býložravců.

příklady

koniin- bolehlav - paralýza motorických nervů

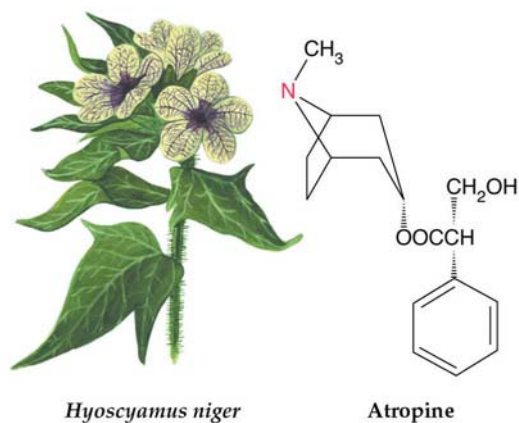
obr. 24.19



Tropanové alkaloidy

Atropin - *Hyoscyamus*, *Atropa belladonna* - anticholinergní alkaloid

Obr. 24.20



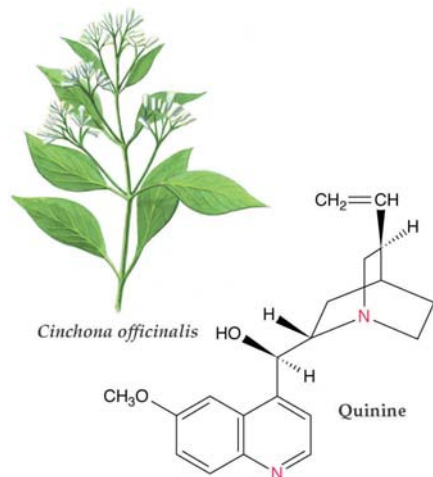
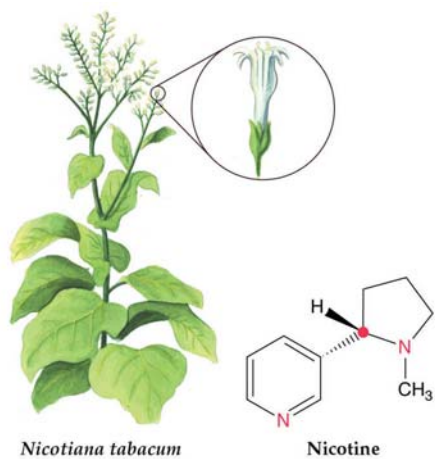
Isochinolinové alkaloidy

)Kodein, morfin, heroin

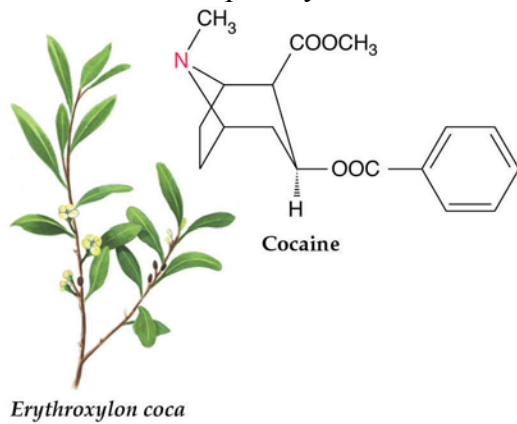
Obr. 24.21, 24.23



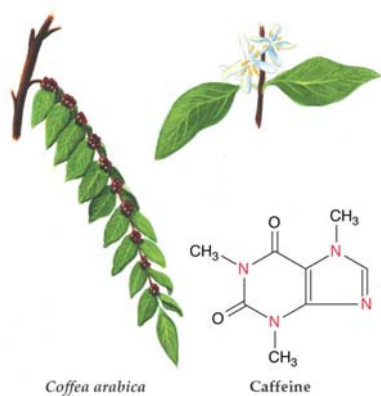
## Indolové alkaloidy

Pyridinové a piperidinové alkaloidy  
Nikotin 24,25

## Kokain 24.24 - tropanový alkaloid

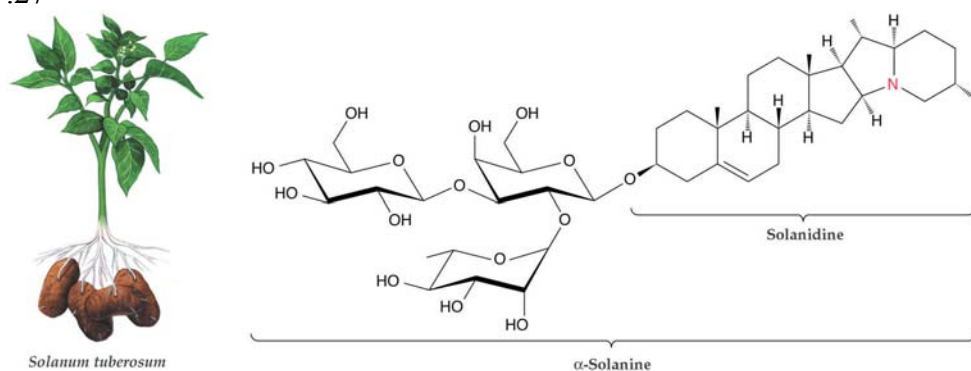


## Kofein 24.26

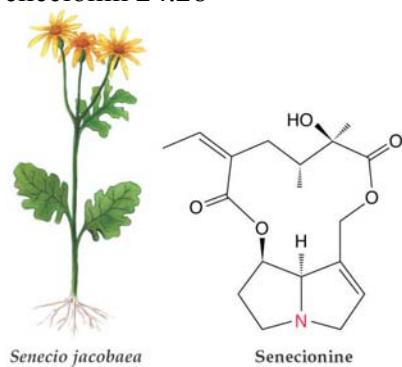


## Steroidní alkaloidy

.27



## Senecionin 24.28



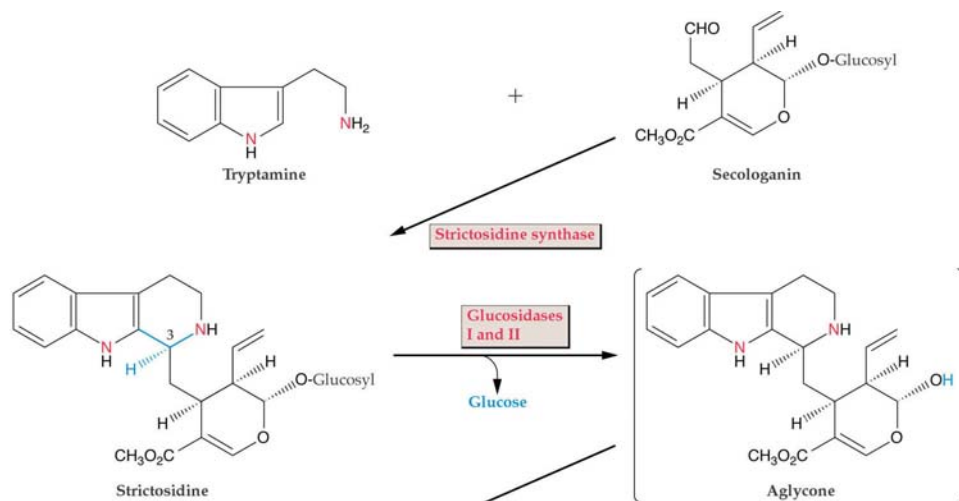
Použití sekundárních metabolitů  
v medicíně - tabulka 24.1.

Syntetizovány jako kosntitutivní obrana, avšak lze je indukovat elicitory  
Např. nikotin je kosntitutivní, po zranění vzniká N-acetylnikotin (tento je toxický pro  
členovce, zatímco vlastní nikotin ne).

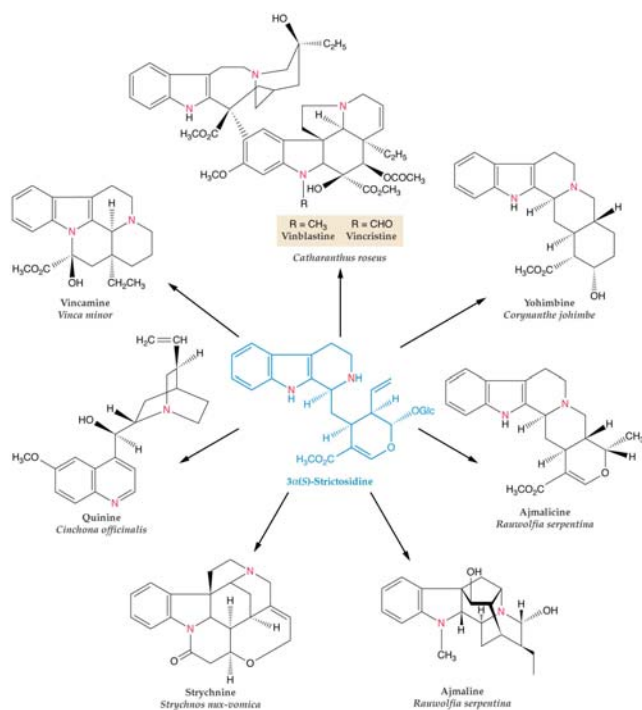
Syntézy:

Tryptaminová cesta

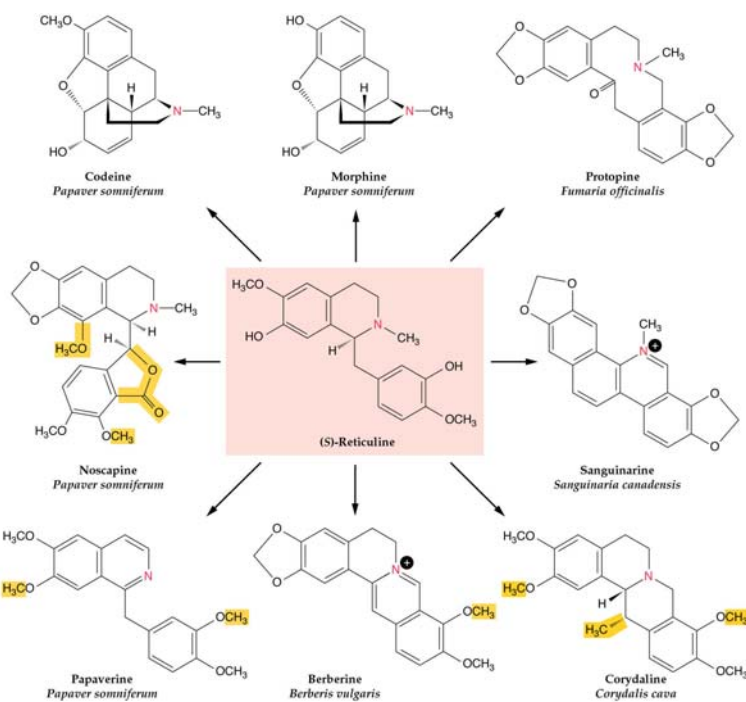
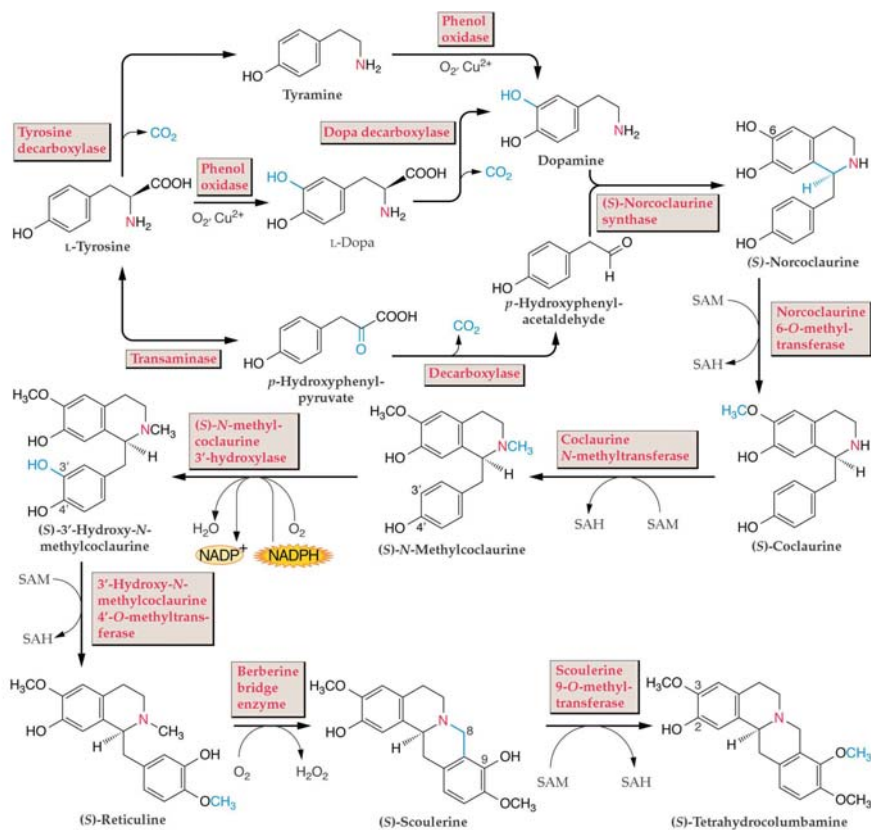
24.33, avšak pouze syntéza streictosidinu (secologanin je terpen)



dále obr. 24.34



Tyraminová cesta - obr. 24.37, pouze do stadia reticulinu  
dále 24.38



## Fenoláty

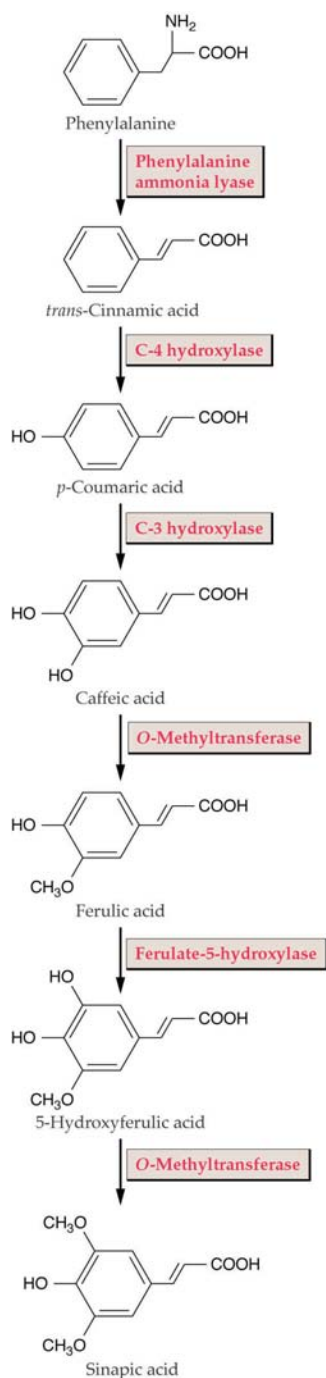
Nejrozšířenější skupina, skoro 40% biomasy (viz lignin). - vznikají fenylopropanoidním metabolismem (lignin, lignany, taniny, flavonoidy, kumariny, stilbeny...)

Základní cesta je PAL

Obr. 24.49 pouze levá část

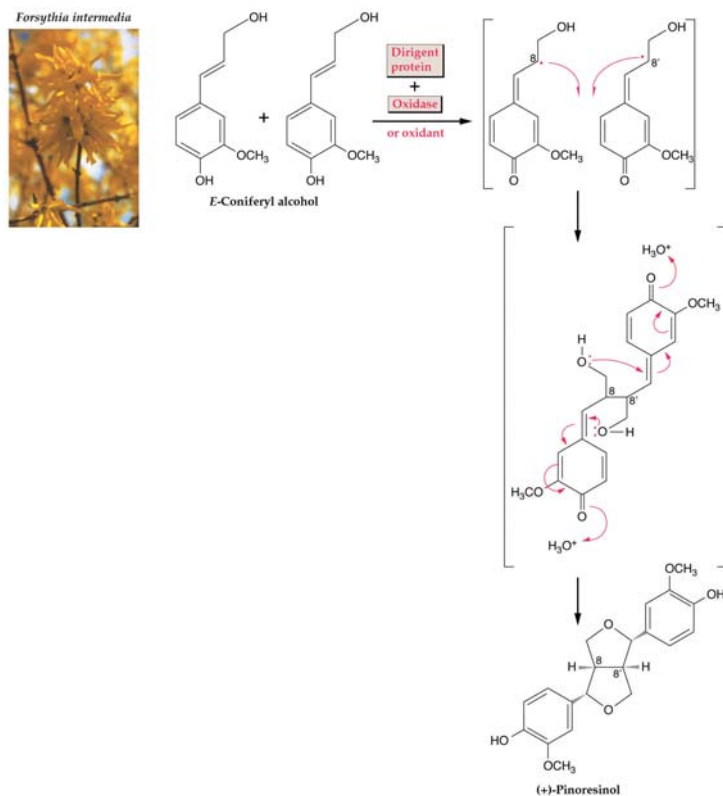
Další reakce: aromatické hydroxylace, O-methylace, CoA ligace a NADPH redukce

1. aromatické hydroxylace: cinnamoylhydroxylasa, P450, mikrosomální enzym
2. O- methylace , kofaktor S-adenosylMet
3. vazba CoA, dále reakce kyseliny na ldehyd a Alkohol - NADPH

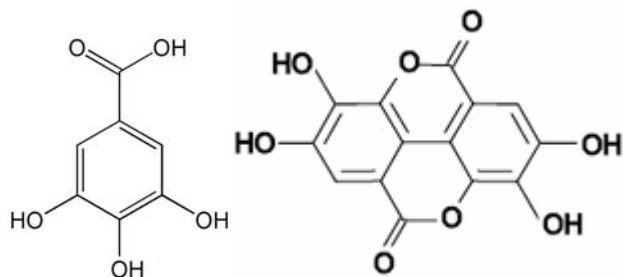


Lignany - dimery phenylpropanu, dimarizace 8-8', může být i dimarizace 8-6' i jiné  
pinosresinol vzniká dimarizací koniferylalkoholu

24.55



taniny - hydrolyzovatelné: kopolymer cukrů, kysů gallové a kys. elagové, obranná reakce, vyvkytují s eu některých dvouděložných



obr. 24.47

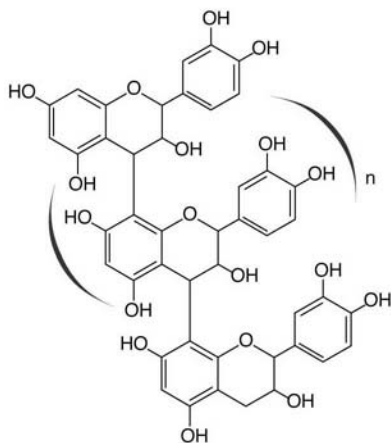
nehydrolyzovatelné taniny kondenzované taniny

- vyskytují s eu všech rostlin, strukturou proanthokyanidiny, polymery až 50 flavonoidů

Lékařství, čaj, víno. Tvoří černé sloučeniny s Fe - inkoust



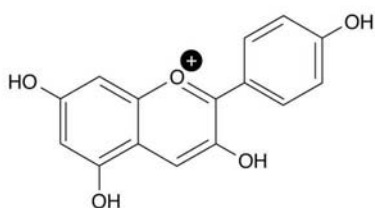
Red sorghum

Proanthocyanidin ( $n = 1-30$ )

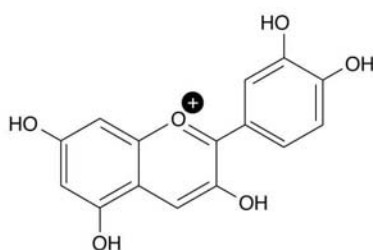
## Flavonoidy

Barevná součást květů, signalizační látky,

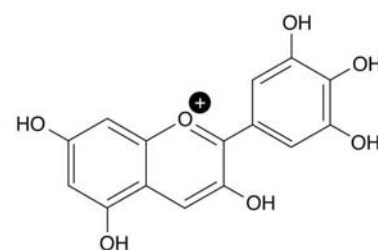
Obr. 24.66



Pelargonidin



Cyanidin

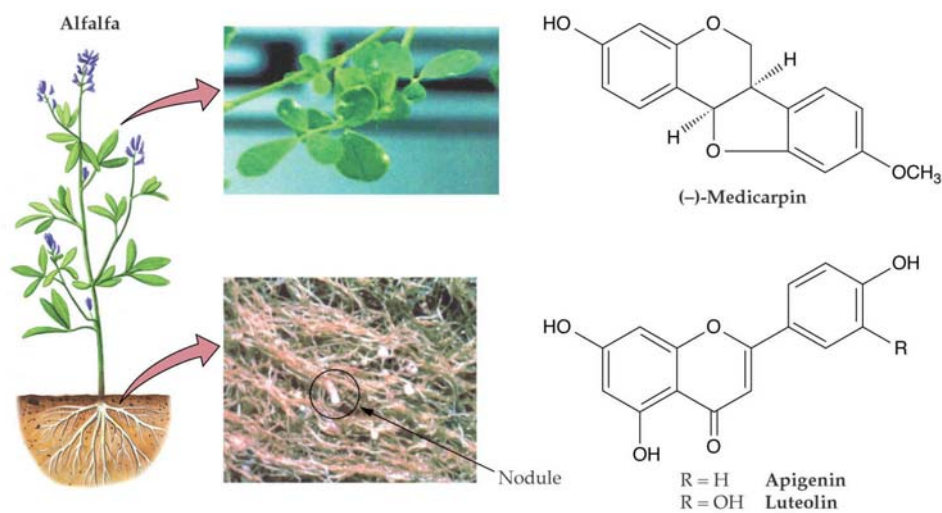


Delphinidin

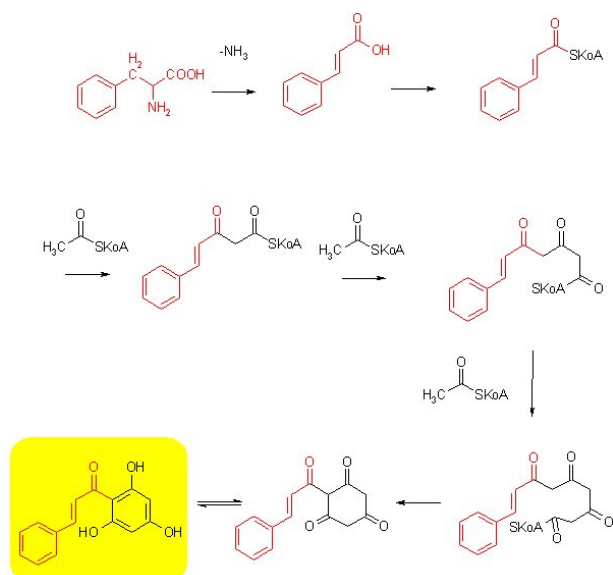
*Pelargonium*  
(Geranium)*Rosa*  
(Rose)*Delphinium*  
(Larkspur)

Apigenin, luteolin, signalizační látky při interakci s Rhizobii (obr. 24.69)  
obránná látka- medikarpin



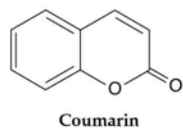


Chalkonsayntnhasa, kondenzace 3 acetylKoA + kumarylKoA - viz starý výklad

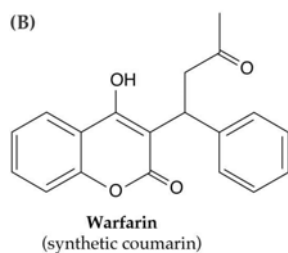


Kumariny - většinou role ochrany proti UV, inhibitory klíčení

(A)

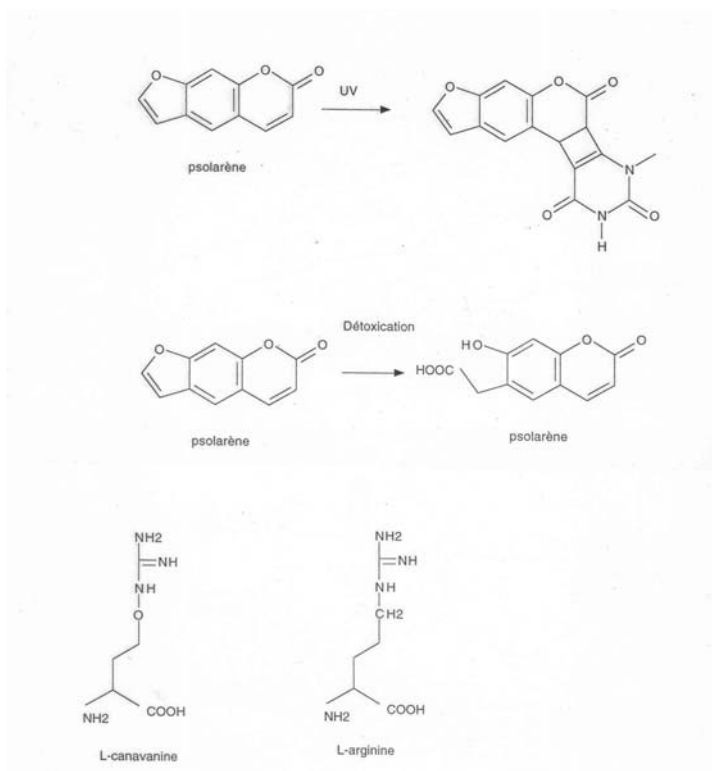


(B)

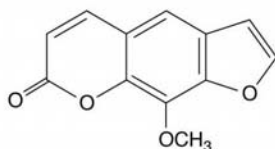


viz obr. 24.73 psolaren – furokumariny

interkalace do DNA, reakce s pyrimidinem, aktivace UV světlem. Někteří motýli detoxikují furokumariny



*Heracleum*



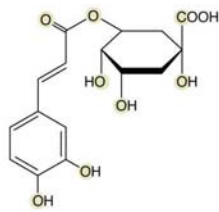
**8-Methoxypsoralen**  
(a furanocoumarin)



syntéza - obr. 24.75, pouze první část  
stilbeny a pyrony - tvoří součást pasivní a aktivní ochrany rostlin, antibakteriální a fungicidní vlastnosti, ochrana proti požití  
resveratrol- protirakovinná látka ve víně

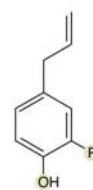
Flavonoidní vůně - viz box 24.6

Coffee beans

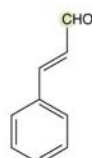


Chlorogenic acid

Cloves

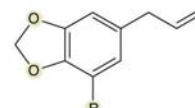
R = H Chavicol  
R = OCH<sub>3</sub> Eugenol

Cinnamon bark

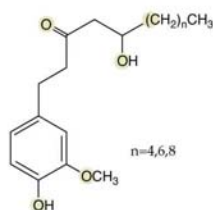


Cinnamaldehyde

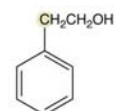
Nutmeg

R = H Safrole  
R = OCH<sub>3</sub> Myristicin

Ginger rhizome

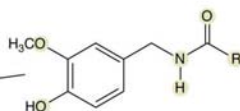
Gingerols  
n=4,6,8

Orchid



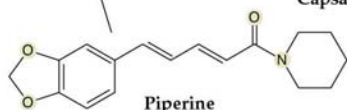
Phenylethyl alcohol

Red and black peppers



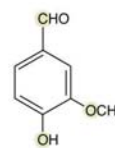
R = Nordihydrocapsaicin

R = Capsaicin



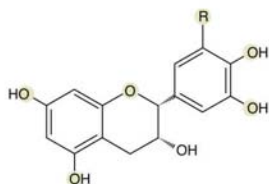
Piperine

Vanilla



Vanillin

Green tea

R = H (-)-Epicatechin  
R = OH (-)-Epigallocatechin

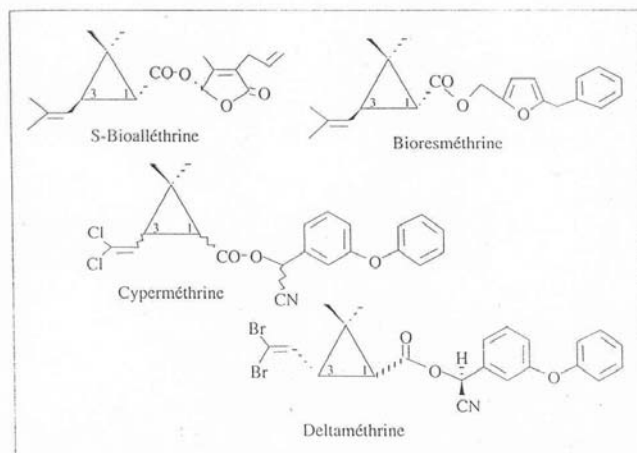
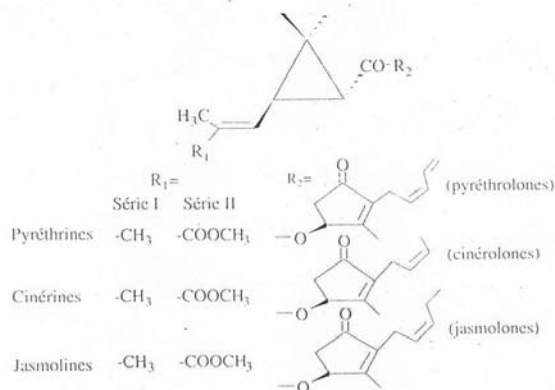
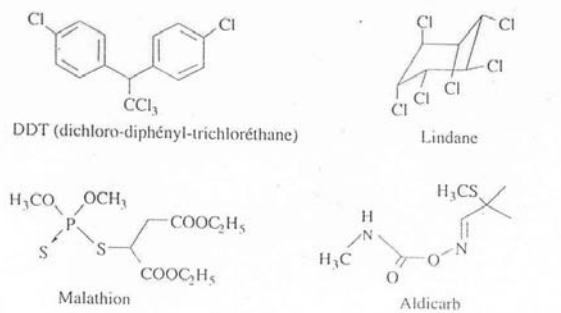
## Využití sekundárních metabolitů

### Pyrethrum

Produkce *Tanacetum cinerariaefolium*, chrysanéma. Čínský prášek. Složení: 6 esterů pyrethryny. Rozkládá se snadno v prostředí. Není karcinogenní, neškodí živočichům.

Vyrábí se 100 tis. tun ročně

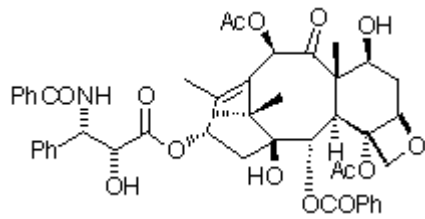
Účinek, blokování Na<sup>+</sup> kanálu hmyzu.



## Taxol

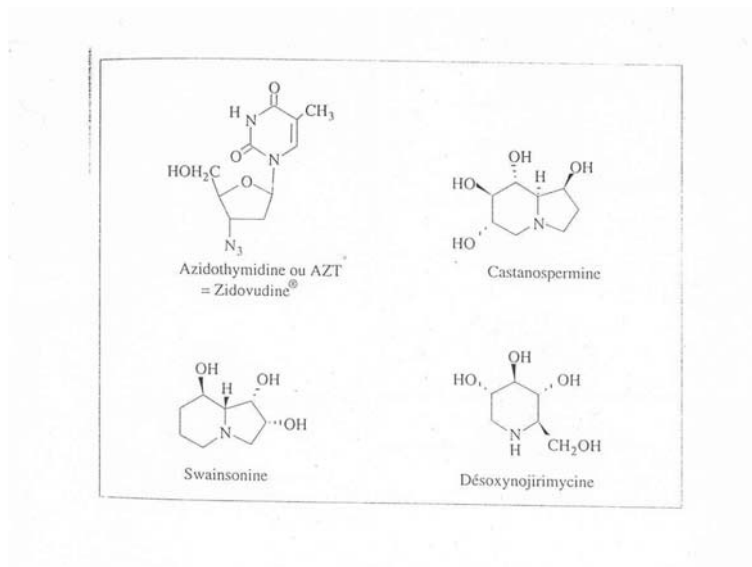
Boj proti rakovině. Taxol 1960. Výsledek screeningu. Objevena látka v kůře tisů. Původně se myslelo, že taxol destabilizuje mikrotubuly. Zjištěno, že naopak indukuje přeměnu tubulinu na mikrotubuly.

Problémm byla nutnost velkého množství materiálu. Strom pomalu roste. Objevena látka baccatin, izolována z jehličí *Taxus baccata*. Z ní syntetizován taxol. Relativně nejedovatý. Klinicky zkoušen proti některým druhům rakoviny. (vaječníky)



Castanospermin – látka pro HIV

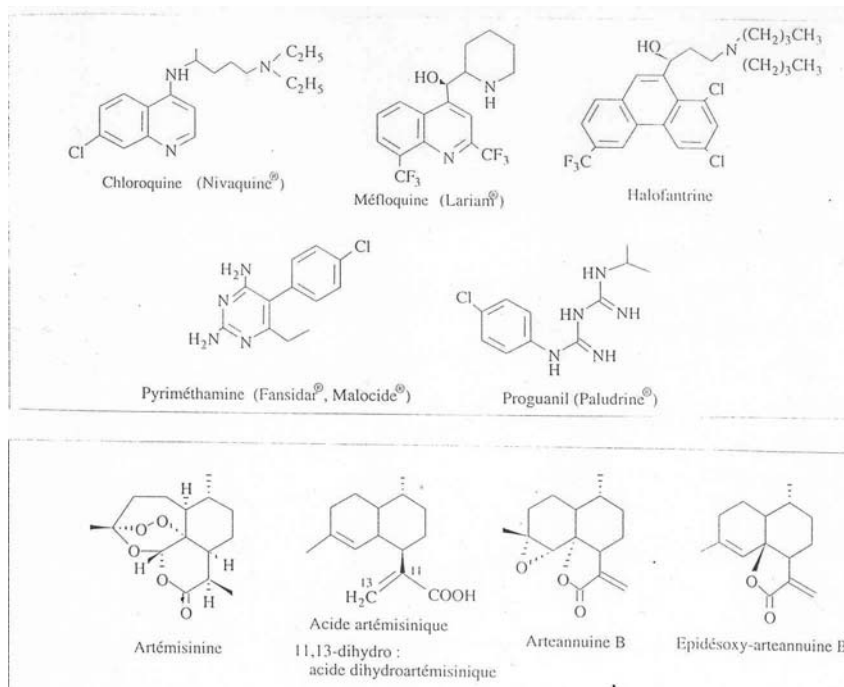
Izolován z australského ořechu *Castanospermum australe*. Inhibuje tvorbu proteinu gp120. Virové částice jsou neschopné se vázat na CD4 receptor,



Artemisin

ABSTRACT: Jedna z největších metel lidstva. Mechanismus malárie.... Díky rezistenci jsou látky chininového typu účinné – rezistence

Velmo účinný se zdá artemisin, *Artemisia annua* (pelyněk), tradiční lék v Číně. .

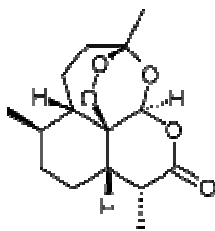


Although the

Syntetizováno mnoho derivátů. Původní látka je velmi špatně rozpustná ve vodě. (Artesunate, dihydroxyartemisinin, artemether, arteether, artelinic acid jsou rozpustné)

Výhody: artemisin a jeho deriváty jsou velmi málo toxické.

Účinek: Parazit – Plasmodium rozkládá hemoglobin, uvolňuje volný hem. Železo redukuje peroxid artemisinu, produkce peroxidových radikálů.



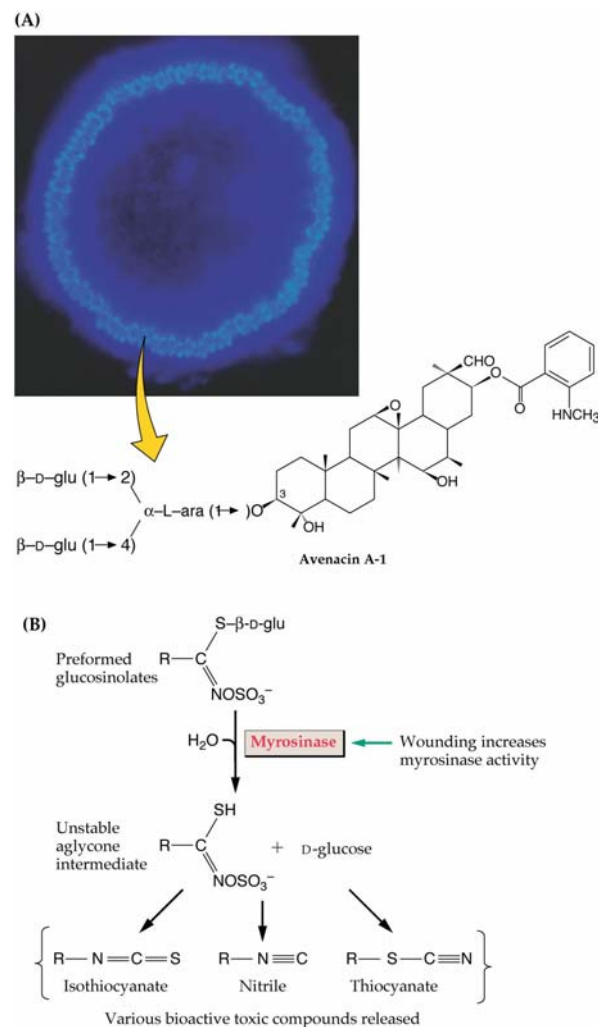
## INTERAKCE ROSLTIN S PATOGENY

Patogeny: houby, bakterie, viry, členovci

Obrana rostlin: konstitutivní (kutikula, přítomnost sekundárních metabolitů). Tyto látky toxické povahy jsou přítomny často ev vakuole a uvloňují s epu ataku. příklady- sekundární metabolity.

Příklad

avenacin - k ořechům ovsa. Velmi účinný proti některým parazitům houbám. Další houby jsou schopny detoxikovat avenacin štěpením vazeb 1-2 a 1-4 glukosy. glukosinoláty (stávají se aktivní teprve po myrosinase, po ataku):



obr. 21.17

Obrana indukovaná přítomností patogenu

způsoby infekce: nejčastěji kořeny nebo listy

Pronikání: stomata, enzymy (hydrolýza kutikuly, celulosy, buněčné stěny), zranění  
nekrotrofie: patogen zabíjí hostitele a využívá odumřelou hmotu, obvykle široká specifita

pohyb virů: přes plasmodesmata a floemem (nejsou enzymy)

biotrofie: hostitel zůstává naživu. obvykle velmi úzká specifita hostitele

hemibiotrofie: hostitel naživu, ale je zabíjen později (Phytophthora infestans)  
patogen - obecný termín, virulentní: patogen způsobující nemoc

použitá strategie patogenu: enzymy hydrolýzující buněčnou stěnu, toxiny

Výsledky interakce patogenu-rostlina:

1. po interakci neposkytuje rostlina vhodné podmínky - nehostitelská - nekompatibilní interakce
2. rostlina má vytvořenou bariéru (kutikula, metabolity), ubrání se rezistence nehostitelská, interakce nekompatibilní
- 2, patogen napadne rostlinu, ta jej rozpozná, startuje obrannou reakci, invaze je pouze lokální, inkompatibilita
4. Rostlina nerozpozná patogen, je hostitelská, infekce, kompatibilní interakce (zvlášť forma je symbiosa)

Hypersenzitivní reakce a programovaná buněčná smrt:

Rozpoznání patogenu má za následek aktivaci obranných mechanismů. Proces omezen na buňky v okolí ataku: látky vyvolávající obrannou reakci: elicitory (exogenní a endogenní - pocházející z rostliny). Následkem je smrt buněk v okolí ataku, brání se dalšímu šíření patogenu.

Geny avirulence a geny rezistence

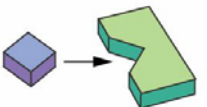
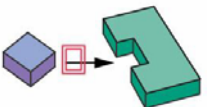
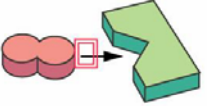
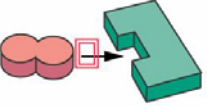
Vysvětlují proč některé kultivary rostliny jsou odolné vůči ataku (genetický důvod).

Model gen vs. gen

Obrana se aktivuje, jestliže rostlina vlastní gen rezistence R, který je komplementární ke genu avirulence patogenu (Avr). Podle paltí pro biotrofní patogeny. Gen rezistence je obvykle receptor.

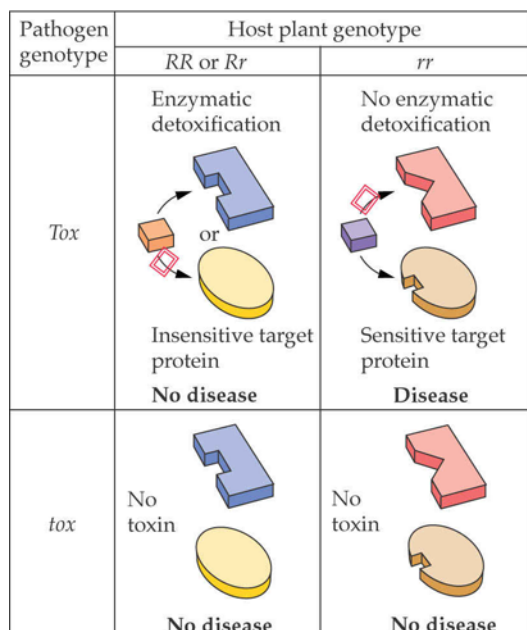
Produktem genu avirulence je buď látka (bílkovina, nízkomolekulární látka, oligosacharid).

Viz Obr. 21.18

Pathogen genotype	Host plant genotype	
	<i>R1</i>	<i>r1</i>
<i>Avr1</i>	 <p>Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are <b>incompatible</b>.)</p>	 <p>Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are <b>compatible</b>.)</p>
<i>avr1</i>	 <p>avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are <b>compatible</b>.)</p>	 <p>avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are <b>compatible</b>.)</p>

Jiný model zahrnuje interakci toxin (patogen) a detoxikující enzym (rostlina)





Obr. 21.21

Příklady Bakterie *Pseudomonas*. Produktem genu avirulence *avrD* bakterie je syringolid, který vyvolává rezistenci u soji, nesoucí gen rezistence *Rpg4*.

Geny avirulence u hub. příklad *Phytophthora*, gen avirulence - gen syntetizující elicitory, v případě genu rezistence *R* u tabáku (receptor).

#### Identifikace genů rezistence *R*

Většinou molekulárně biologické metody. Metoda spočívá v identifikaci sekvence genů při porovnání rezistentních a nerezistentních kultivarů rostlin a poté v identifikaci této sekvence vložím pohyblivého úseku - transposonu, který vede ke zničení tohoto genu. Bylo identifikováno jen málo těchto *R* genů. Tyto geny byly klonovány. Ukázalo se, že tyto geny mají často slovné motivy, podobné s eukaryotními receptory u živočichů:

LRR - leucine rich repeat, NBD - nucleotide binding site, TIR (Toll-interleukin1 resistance domain)

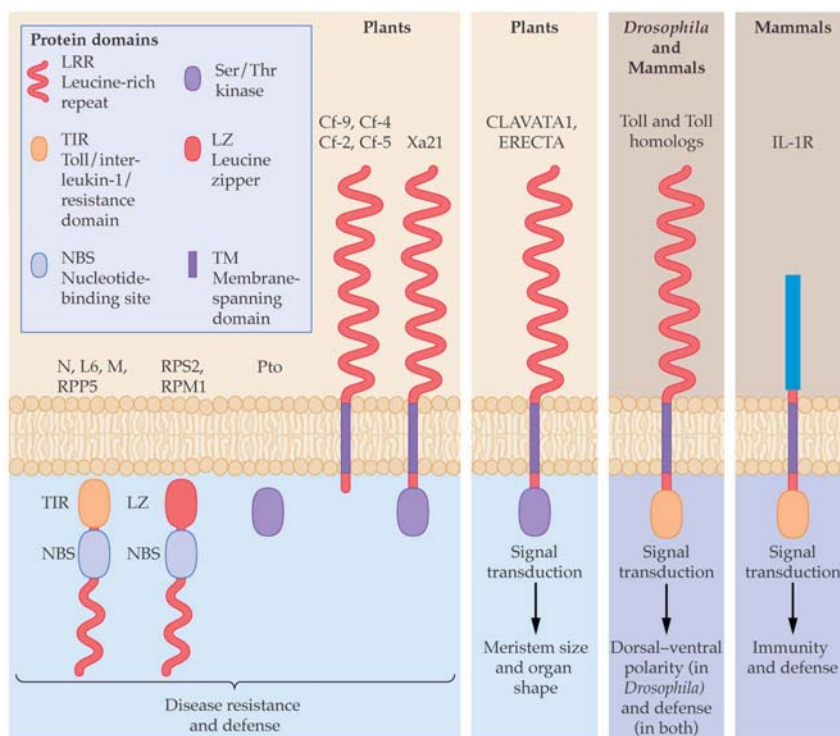
LRR - opakující se sekvence  $xxLxLxx$ , kdy  $xx$  jsou AK vystavené do slovnětu a určující variabilitu a specifitu interakcí

NBS - obvykle váže ATP nebo GTP, ale nemá kinasovou aktivitu

TIR - strukturní a funkční podobnost proteinu Toll z *Drosophila*, vyskytují se u savců jakožto homolog Toll proteinu, dále podobnost receptoru na interleukin 1.

Další receptory rostlin obsahují proteinkinasy anebo jsou to receptory spojené s G-proteiny. Receptory mohou být buď cytoplasmatické nebo transmembránové

Obr. 21.26



Rceptor má dvě hlavní funkce: rozpoznání produktu avr genu a dále vytvoření a přenos signálu.

Mechanismus vzniku rezistence nebo naopak kompatibility

Mutací avr genů, která je mnohem častější než mutace R genů u rostlin.

Geny R mohou existovat v několika allelách. Většina R genů v rostlinách je součástí multigenní rodiny a existují v rostlině ve skupině homologních genů (např. gen Cf-9 na rajčeti - 5 homologních genů). Tyto geny jsou sdruženy do klusterů. Jinou možností je existence pouze jediného genu, avšak uvnitř jednoho rostlinného druhu existuje ve formě mnoha allel. Některé geny R existují pouze v minimální diverzitě allel.

Obr. 21.32

Nové varianty mohou vznikat bodovou mutací (např v oblasti LRR) nebo typicky genetickým postupem,

Obr. 21.33

Mechanismus obranné reakce:

Po kontaktu elicitoru s receptorem (patogenu v buňce) pozorujeme

Rychlá odpověď:

syntéza AOS, otevření iontových kanálů, depolarizace membrány, syntéza NO, aktivace proteinkinás, hypersenzitivní reakce

syntéza fytoalexinů, modifikace sekundárního a primárního metabolismu, syntéza PR-proteinů,

akumulace signálních melekul (kys. salicylovám ethylen, k. jasmonová), zesílení buněčné stěny (kalosa, lignin, HPRP)  
systémová rezistence

#### Hyperznitivní reakce

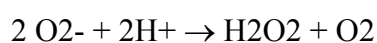
vzniká tek, že se bud aktivuje apoptoza anebo jsou buňky likvodovány aktivními formami kyslíku, ukazuje se, že hraje roli i syntéza NO. Je možná i likvidace buněk toxickými produkty patogenu. HR není vždy nuntým průvodním jevem interakce nebo vzniku rezistence.

#### Syntéza aktivních forme kyslíku.

Superoxidový radikál a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. TYto látky vznikají aktivací NADPOH oxidasy.

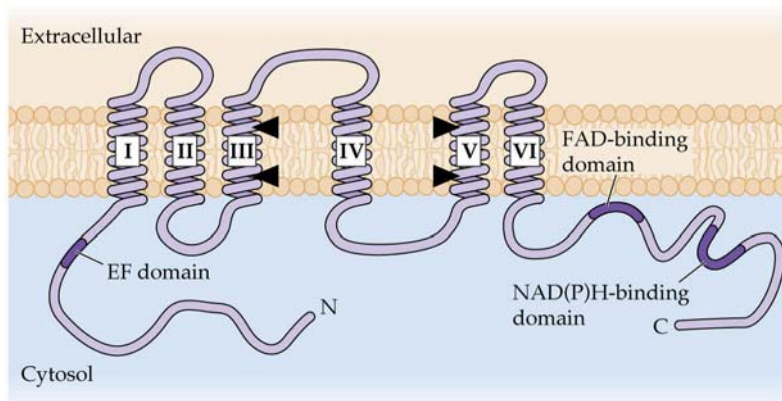


Superoxidový raidkál se dále rozkládá uperoxiddismutasou na H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



Tento enzym je velmi podobný (nikoli však totožný - s analogickým enzymem neutrofilů, imunologicky podobný). Na rozdíl od tohoto enzymu je to monomer. (Arabidopsis). 6 transmembránových domén, FAD a NADP vazebné místo. V cytosolu je EF doména vázající vápník (aktivace enzymu, u savců chybí). TROjúhelníky označují lokalizaci dovu hemů. U neutrofilů aktivace kumulací několika jendotek z cytosolu.

Obr. 21.36



Role H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - zabájení patogenu? nebo Fentonove reakcae (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> - vznik OH radikálu). Substrát syntézi ligninu, peroxidasa. askorbát peroxidasa, glutathion peroxidasa. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je rovněž signální molekula , samotný peroxid indukuje torbu kys. salicylové

#### Syntéza NO

Tato látka hraje signální roli u savců a bakterií, imunitní, nervové, cévní systém.

Rzopaná patogenu je rpovázeno u rostlin syntézou NO. HR není samotná způsobena

pouze H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na to je zapotřebí i NO. Možná je jeho role v inhibici peroxidasy a katalasy. Ukazuje se složitější role, aktivace genů, syntéza mRNA.

Modifikace buněčné stěny

Ukládání kalosy, syntéza ligninu

Extracelulární HRGP - hydroxyprolin rich glykoport. - již předtím přítomný váže se přes cross link do stěny přes tyrosin (PPPPY) prostřednictvím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Další HRGP de novo aktivuje syntézu ligninu

inhibitor polygalakturonasy - extracelulární, inhibuje enzym patogenu PGs (polygalakturonasu), výsledek zřejmě vede k nárůstu konc oligogalakturonidů - aktivace obranné reakce =elicitory

Salicylát a benzoát

Aktivace phenylpropanoidové dráhy interakcí s patogenem - transgenní rostliny s genem nahG (salicyláthydroxylasa), konveruje SA na katechol - silně se snižuje rezistence tabáku proti TMV

Obr. 21.41

Syntéza JA - navyšuje po ataku patogenu nebo hmyzu. Transgenní rostliny bez JA dráhy syntézy JA - snižuje se rezistence proti nektrotrofním parazitům ale nikoli biotrofním (proč?). Stejně tak se zvyšuje syntéza ethylenu. Zjistilo se, že pro expresi obranné reakce není ethylen nezbytný, avšak při kompatibilních interakcích syntéza ethylenu zvyšuje účinky HR.

PR - proteiny

Tabulka 21.4

Family	Type member	Properties
PR-1	Tobacco PR-1a	unknown
PR-2	Tobacco PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase
PR-3	Tobacco P, Q	chitinase type I, II IV, V, VI, VII
PR-4	Tobacco 'R'	chitinase type I, II
PR-5	Tobacco S	thaumatin-like
PR-6	Tomato Inhibitor I	proteinase-inhibitor
PR-7	Tomato P <sub>69</sub>	endoproteinase
PR-8	Cucumber chitinase	chitinase type III
PR-9	Tobacco 'lignin-forming peroxidase'	peroxidase
PR-10	Parsley 'PR1'	'ribonuclease-like'
PR-11	Tobacco class V chitinase	chitinase, type I
PR-12	Radish Rs-AFP3	defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	thionin
PR-14	Barley LTP4	lipid-transfer protein

několik minut až hodin po infekci se zvyšuje koncentrace transkriptů některých genů. Tyto PR proteiny jsou chitinasy, glukonasy a enzymy degradující stěnu hub. Bylo zjištěno, že transkripce některých genů je zprostředkována přes SA a ethylen. Mezi další obranné proteiny patří lipoxygenasy - stimulace syntézy JA. Defensiny - proteiny 7 kDa bohaté na Cys, signál jdou přes JA a ethylen ale nikoli SA. Homologie s defensiny hmyzu, ptáků a savců

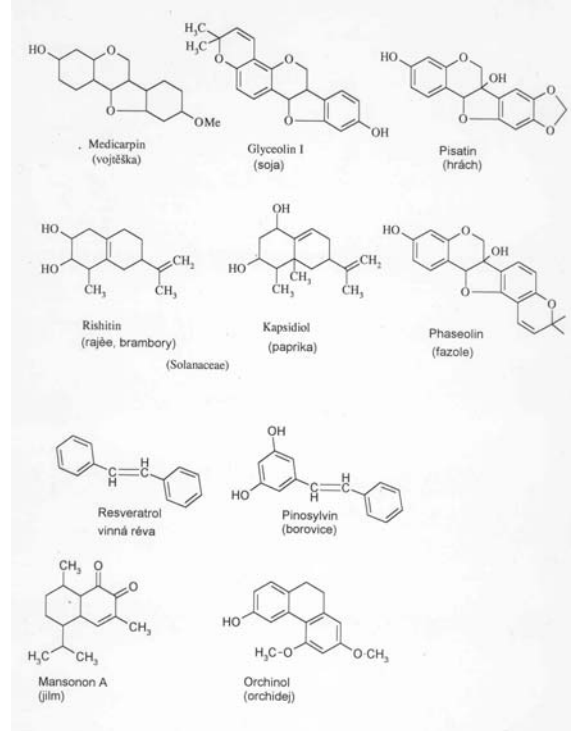
## Obr. 21.44 A

## Fytoalexiny

Ltáky nízkomolekulární produkované po ataku aptogenem. několik skupin: terpenoidy, flavonoidy a stilbeny.

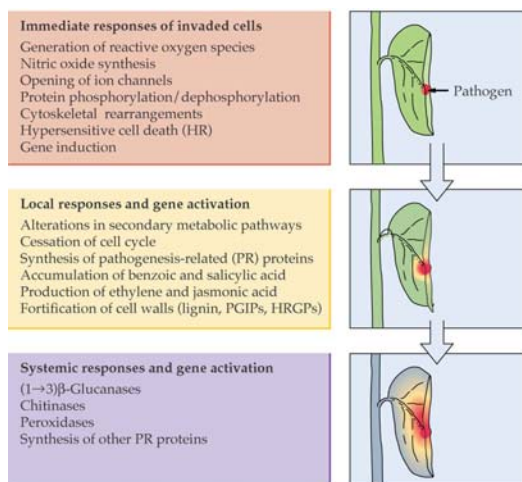
Zřejmě nutná aktivace všech anymů dané dráhy. Enzymy syntézy flavonoidů (PAL, 4CL a C4H) jsou regulovány jak na úrovni transkripcie, tak translace. Mechnismus účinku řady phytoalexinů není znám. , příklady známých resveratrol - stilbenyantibskteiální účinky, fungicidy, inhibice růstu konkurenčních rostlin  
camalexin

proteinase inhibitory - inmdukují s epo ataku hmyzem, inhibice serinových, cysteinových a aspartátových proteinas v trávicím traktu.



## Systémová získaná rezistence (SAR - systemic acquired resistance)

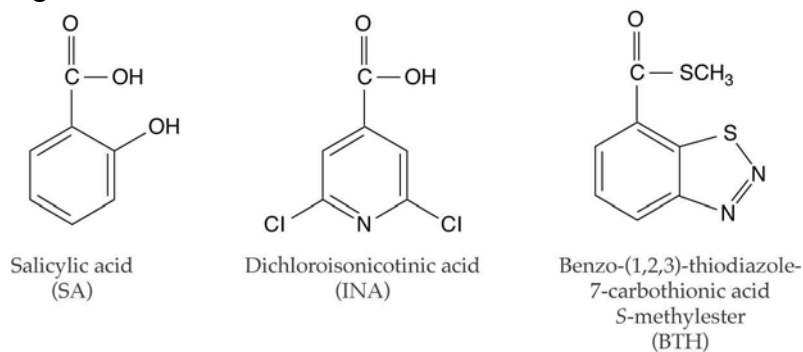
Víty, bakterie, houby. Lokální nekrosa mv místě ataku, spojená s akumulací SA a vznik signálu, který se šíří floemem. V důsledku toho se ve vzdálených místech zvyšuje koncentrace SA a methylsalicylátu. Odpovídající nárůst koncentrace PR proteinů. Tato rezistence je nespecifická, chrání proti širokému spektru dalších patogenů.



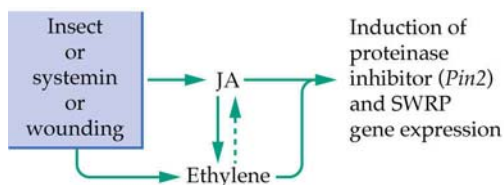
Některé látky jsou schopny vyvolat SAR, například INA (2,6-dichloroisoinikotínát) nebo BTH

Obr. 21.49

Jejich přidavek však nevyvolává nárůst SA, tudíž signály jdou dráhou, která je pod signalizací SA.



Odpověď na atak hmyzem: Hmyz, housenky, zranění vyvolávají nárůst ethylenu a JA, tekavý methylJA se šíří (systemin), aktivují odpověď, narůstá koncentrace proteinasových inhibitorů (PI) ve vzdálených místech



Celkové schéma

