

**J I H O Č E S K Á U N I V E R Z I T A
V Č E S K Ý C H B U D Ě J O V I C Í C H
Z e m ě d ě l s k á f a k u l t a**



BIOCHEMIE

doc. Ing. Jiří ŠPIČKA, CSc.

České Budějovice

2004

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta**

BIOCHEMIE

doc. Ing. Jiří ŠPIČKA, CSc.

Recenzent: doc. Ing. Vladimír HORÁK, CSc.

Agronomická fakulta

ČZU Praha

Skripta jsou určena studentům zemědělské a pedagogické fakulty JU, kteří si zapíší jednu z variant předmětu biochemie.

Vzhledem k tomu, že konkrétní náplň předmětu je pro jednotlivé studijní obory poněkud odlišná a to jak co do obsahu, tak i rozsahu jednotlivých témat, je třeba při studiu vycházet ze sylabu předmětu a zejména z přednášek, určených pro daný obor.

Aby skripta nebyla neúměrně rozsáhlá, jsou v jednotlivých kapitolách uváděny většinou pouze základní informace. Podrobnější vysvětlení problematiky jednotlivých metabolických procesů a zejména vzájemných vazeb mezi nimi je rovněž obsahem přednášek.

V Č.Budějovicích 2004

Autor

Obsah

1. Předmět biochemie	6
2. Stavba buňky	8
2.1.1. Biomembrány	8
2.1.2. Cytoskelet	9
2.1.3. Buněčné organely	9
3. Enzymy	13
3.1. Funkce enzymů	13
3.2. Stavba enzymů	14
3.2.1. Bílkovinná složka	14
3.2.2. Nebílkovinná složka	15
3.3. Mechanismus působení enzymů	16
3.3.1. Enzymová specifita	19
3.4. Klasifikace enzymů	21
3.5. Enzymová kinetika	24
3.5.1. Koncentrace substrátu	24
3.5.2. Teplota	27
3.5.3. Vliv pH	28
3.5.4. Aktivátory a inhibitory	28
3.5.5. Enzymová aktivita	30
3.6. Biochemická energetika	31
3.6.1. Biochemická termodynamika	31
3.6.2. Makroergické látky	32
3.6.3. Metabolické dráhy	33
3.7. Transportní procesy	36
3.8. Regulace enzymové aktivity	37
3.8.1. Allosterická regulace	38
3.8.2. Kovalentní modulace	38
4. Aerobní metabolismus	40
4.1. Citrátový cyklus	40
4.1.1. Mechanismus citrátového cyklu	40
4.1.2. Regulace citrátového cyklu	42

4.1.3.	Amfibolická povaha citrátového cyklu	43
4.1.4.	Anaplerotické reakce.....	43
4.2.	Oxidační fosforylace	44
4.2.1.	Terminální oxidace	44
4.2.2.	Fosforylace.....	46
5.	Metabolismus sacharidů.....	47
5.1.	Glykolytická dráha	47
5.1.1.	Regulace glykolýzy.....	49
5.2.	Přeměna pyruvátu	49
5.2.1.	Anaerobní přeměny pyruvátu.....	49
5.2.2.	Aerobní přeměna pyruvátu.....	51
5.2.3.	Metabolismus dalších hexos	53
5.3.	Glukoneogeneze.....	56
5.3.1.	Metabolická dráha glukoneogeneze.....	56
5.4.	Regulace glukoneogeneze a glykolýzy	58
5.5.	Pentosový cyklus.....	58
5.5.1.	Průběh pentosového cyklu	59
5.5.2.	Regulace pentosového cyklu.....	62
5.6.	Fotosyntéza	62
5.6.1.	Světelná fáze fotosyntézy.....	63
5.6.2.	Temnostní fáze fotosyntézy (mechanismus C3)	65
5.6.3.	Temnostní fáze fotosyntézy (mechanismus C4)	69
5.7.	Metabolismus oligo a polysacharidů.....	71
5.7.1.	Katabolismus oligo a polysacharidů	71
5.7.2.	Syntéza oligo a polysacharidů.....	74
5.7.3.	Regulace metabolismu glykogenu	76
6.	Metabolismus lipidů.....	78
6.1.	Katabolismus lipidů	78
6.1.1.	Oxidace mastných kyselin	79
6.1.2.	β -oxidace mastných kyselin.....	81
6.2.	Syntéza lipidů.....	84
6.2.1.	Biosyntéza mastných kyselin.....	84
6.2.2.	Syntéza triacylglycerolů a glycerolfosfatidů.....	89

6.3.	Glyoxylátová dráha	93
6.4.	Metabolismus lipidních látek.	95
7.	Metabolismus sloučenin dusíku.	97
7.1.	Katabolismus aminokyselin.....	97
7.1.1.	Ornithinový cyklus	100
7.2.	Biosyntéza aminokyselin.....	102
7.2.1.	Fixace anorganických forem dusíku.....	104
7.2.2.	Metabolismus sirných aminokyselin.	106
7.2.3.	Metabolismus aromatických kyselin	108
7.3.	Metabolismus nukleotidů	111
7.3.1.	Katabolismus nukleotidů	111
7.3.2.	Anabolismus nukleotidů.....	114
8.	Metabolismus nukleových kyselin a syntéza bílkovin	117
8.1.	Struktura a funkce nukleových kyselin	118
8.1.1.	Struktura a funkce DNA.....	119
8.1.2.	Struktura RNA.....	120
8.2.	Replikace	122
8.3.	Transkripce.....	125
8.3.1.	Posttranskripční úprava.	126
8.3.2.	Regulace transkripce.	127
8.4.	Translace.....	129
8.4.1.	Posttranslační úprava bílkovin.	132
9.	Biochemická regulace organismů.....	133
9.1.	Humorální regulace	133
9.1.1.	Mechanismus působení hormonů	134
9.2.	Nervová regulace.....	137
9.2.1.	Dráždivost buněk.....	137
9.2.2.	Nervová regulace.....	138
9.3.	Imunochemická regulace.....	140
10.	Biochemická podstata fyziologických funkcí	144
10.1.	Biochemie svalové kontrakce.....	144
10.1.1.	Mechanismus svalového stahu	144
10.1.2.	Řízení svalové kontrakce.....	147

10.1.3.	Energetika svalové kontrakce	147
10.2.	Biochemie vidění	148

1. PŘEDMĚT BIOCHEMIE

Biochemie je vědní obor, který studuje chemické a fyzikálně chemické děje v živé přírodě. Na tomto základě se pak snaží vysvětlit hmotnou podstatu biologických jevů. Biochemie je poměrně mladý obor. Za okamžik jejího vzniku, tj. čas, kdy se biochemie oddělila od organické chemie, je považován rok 1897, kdy německý chemik Eduard Buchner zjistil, že pro vyvolání fermentačních reakcí není nutná přítomnost neporušených buněk kvasinek, ale stačí pouze jejich bezbuněčný extrakt. Takto přesné datování je ovšem nutno brát se značnou rezervou.

Biochemie je mnohdy rozdělována do čtyř oddílů, které mají i historickou návaznost :

biochemie statická, dynamická, funkční a organizační.

Nejstarší z nich je biochemie statická, nazývaná dnes spíše chemií přírodních látek. Zabývá se složením živé hmoty. Od původní izolace a identifikace jednotlivých látek v živých organismech se postupným vývojem přešlo ke studiu struktury a obecných zákonitostí vztahu struktury a biochemických vlastností hlavně v oblasti proteinů a nukleových kyselin.

Dynamická biochemie se zabývá přeměnou látek v živých organismech. Studuje zejména různé dílčí biochemické pochody a jejich vzájemné vazby.

Biochemické pochody jsou velmi složité. To je způsobeno zejména komplikovanou organizací živých soustav. Je proto nutné zkoumat jednotlivé děje nejen odděleně, ale také ve vazbě na konkrétní fyziologické funkce v daném okamžiku a místě organismu. Touto oblastí se zabývá funkční biochemie.

Nejmladším odvětvím biochemie je biochemie organizační. Zabývá se organizací pochodů v živých organismech. Významné je zejména studium programovaných vazeb jednotlivých reakčních soustav a způsob tohoto programování.

Biochemická problematika prolíná do řady vědních oblastí, zejména chemie a biologie. Na jejich pomezí vzniká řada specializovaných oborů. V důsledku dynamického vývoje dochází k neustálému prolínání oblastí zájmů jednotlivých disciplín. Přesné vymezení různých podoborů je velmi obtížné a zřejmě i zbytečné.

Za podobor organické chemie je považována již zmiňovaná chemie přírodních látek. Radí se sem i bioorganická chemie, která se zabývá aplikací základních chemických zákonů a reakčních mechanismů organické chemie na biochemické reakce. Molekulární biologie se zabývá objasňováním biologických dějů na molekulární (chemické) úrovni a

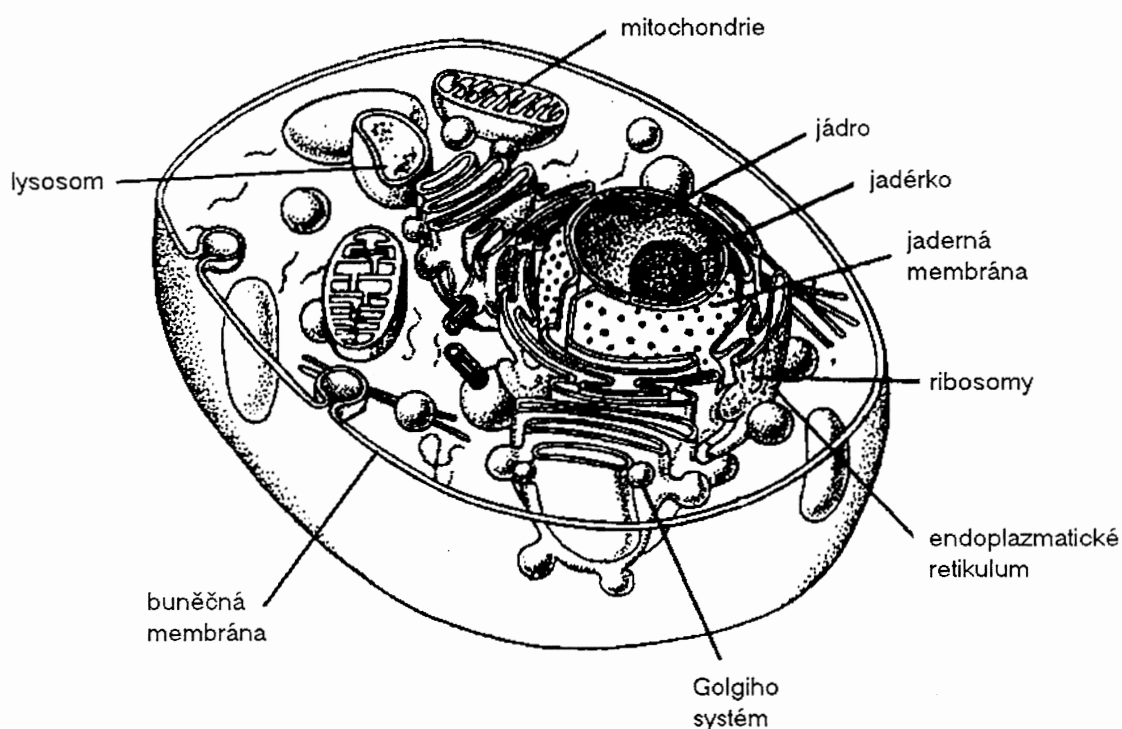
je tedy, v širším smyslu, součástí biochemie. Součástí molekulární biologie je i molekulární genetika, která je ovšem mnohdy pojímána jako samostatný obor.

Biochemie má těsné vazby k řadě odvětví. Nejvýznamnější jsou patrně vazby k medicíně. Vznikla zde řada speciálních oborů např. patobiochemie jako biochemie chorobných procesů, xenobiochemie, která zkoumá přeměny cizorodých látek v organismu, molekulární farmakologie, která studuje biochemickou podstatu funkce léčiv a mnohé další.

Poznatky biochemie se uplatňují v řadě praktických oborů. K nejznámějším patří zemědělství nebo ekologie. Technickým uplatněním biochemie se zabývají biotechnologie.

2. STAVBA BUŇKY

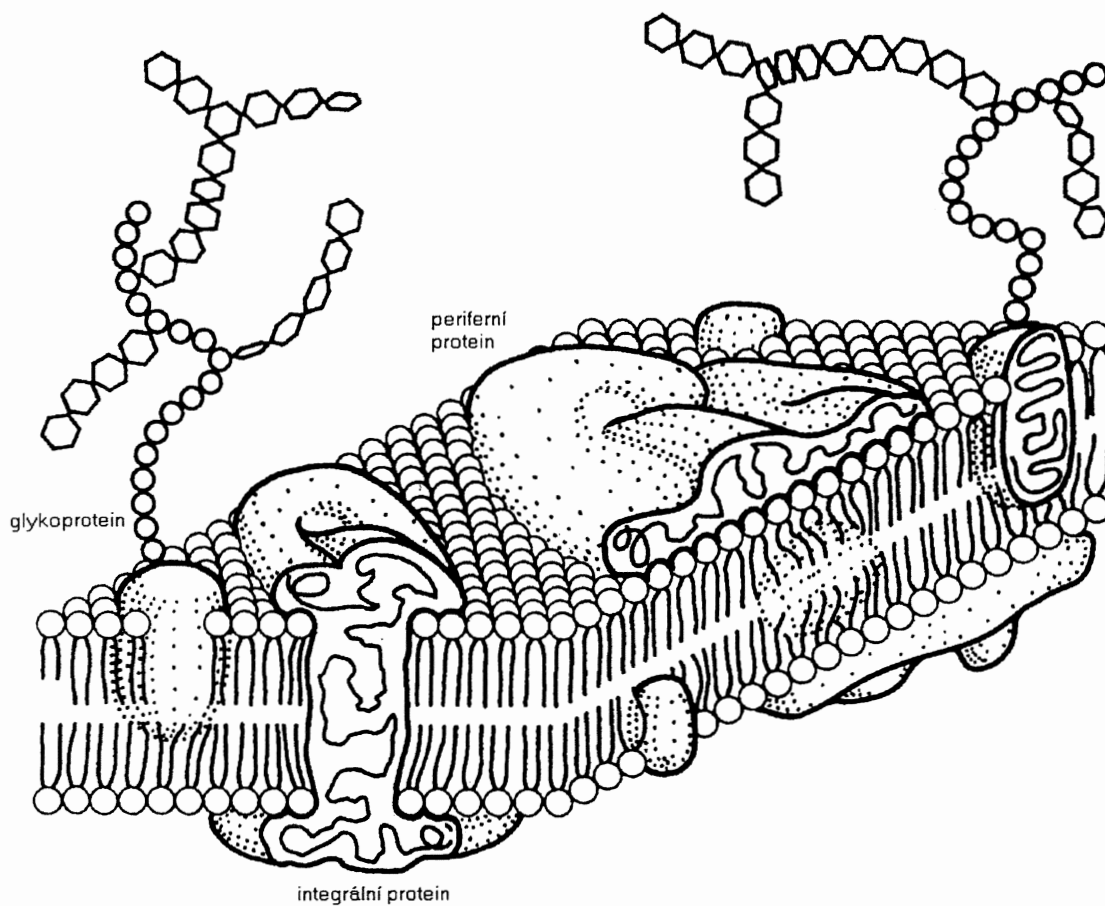
Základní jednotkou všech známých forem života je buňka. Jde o vysoce organizovanou a regulovanou jednotku. V přírodě se vyskytují dva základní typy buněk – prokaryotické a eukaryotické. Vývojově starší prokaryotické buňky mají jednodušší stavbu a méně komplikovaný metabolismus. Vývojově mladší eukaryotické buňky mají podstatně složitější stavbu a i jejich metabolismus je složitější. Jeden z hlavních rozdílů mezi oběma typy buněk spočívá v přítomnosti prostorově ohraničených vnitřních struktur v eukaryotických buňkách – buněčných organel.



Obr. 1 Eukaryotická buňka.

2.1.1. Biomembrány

Prostorové ohraničení buněk, ale i buněčných organel, zajišťují biomembrány. Jedná se v podstatě o lipidové dvojvrstvy s integrovanými proteiny. Strukturu a funkci biomembrán vysvětluje model tekuté mozaiky, který vypracovali v roce 1972 Jon Singer a Garth Nicolson (Obr. 2). Hlavní funkcí biomembrán je uskutečňování řízených transportních procesů.



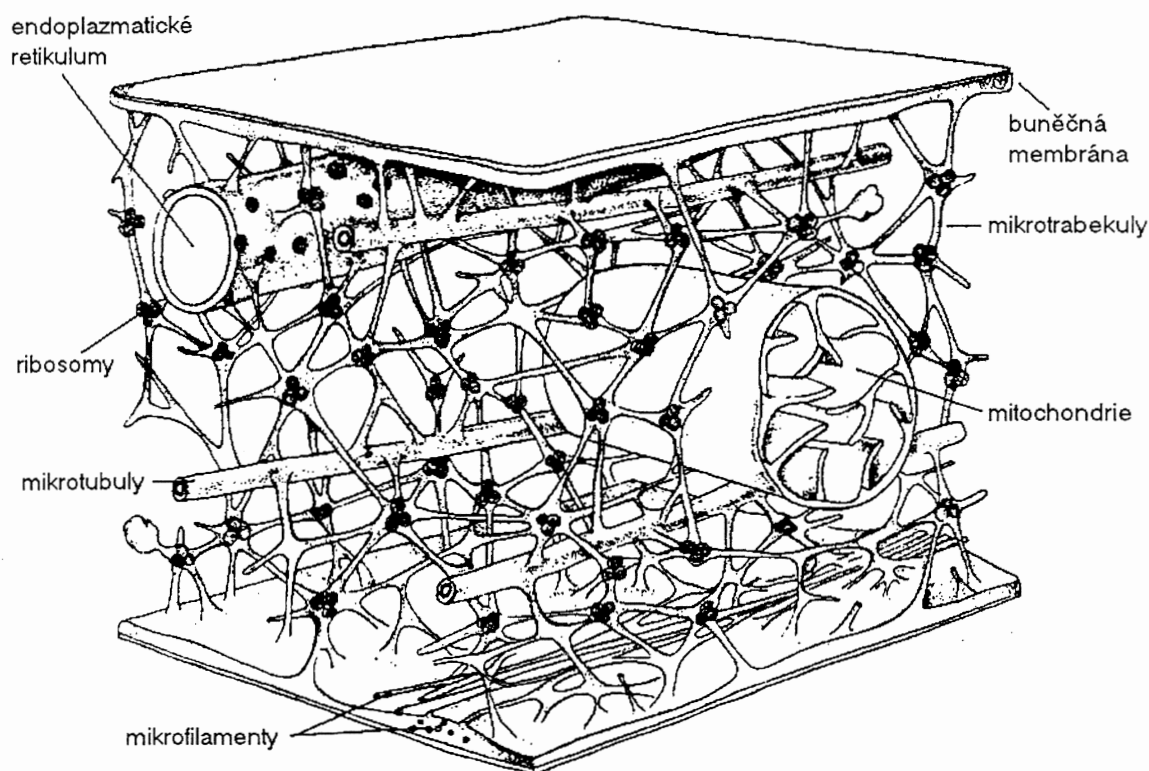
Obr. 2 Biomembrána.

2.1.2. Cytoskelet

I když je vnitřní prostředí buňky (cytoplasma) zdánlivě nediferencovaný koloidní roztok, mají buňky (zejména eukaryotické) složitý vnitřní systém zvaný cytoskelet (Obr. 3). Tato „kostra“ buňky je tvořena systémem proteinových útvarů, které jsou podle typu nazývány mikrofilamenty, mikrotubuly a mikrotrabekuly. Jedná se většinou o tzv. kontraktilní proteiny (proteinová vlákna, která mohou měnit svou délku řízeným procesem). Jejich funkcí je zajišťovat koordinovaný pohyb vnitřní části buňky i změny tvaru buněčné membrány.

2.1.3. Buněčné organely

Vnitřní prostor buňky (cytoplasma) je membránami rozdělen do funkčních oblastí. Tato skutečnost se označuje jako kompartmentace a vzniklé prostory kompartmenty.



Obr. 3 Cytoskelet

Kompartmenty eukaryotických buněk se nazývají buněčné organely. Některé druhy organel jsou společné pro buňky rostlinné i živočišné, jiné se vyskytují pouze u určitého druhu organismu. Zdá se, že některé organely vznikly na základě symbiozy vyvíjejících se eukaryotních buněk s jejich prokaryotními předchůdci.

Buněčné jádro

Jádro je obaleno dvojitou membránou. V membráně se vyskytují póry, které umožňují přechod látek (zejména RNA) do okolního prostředí. Hlavním biochemickým procesem, který v jádře probíhá, jsou metabolické přeměny nukleových kyselin (replikace, transkripce).

Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je tvořeno složitou soustavou membrán, která obklopuje jádro buňky. Na části membrány jsou vázány ribosomy (tzv. drsné ER). Části, kde nejsou ribosomy vázány, se označují jako hladké ER. Hlavním

biochemickým procesem vázaným na ER je syntéza bílkovin (translace) a následná posttranslační úprava bílkovin (limitovaná proteolýza, glykosylace).

Golgiho systém

Golgiho systém tvoří soustava váčků, které funkčně navazují na ER. Jeho hlavní funkcí je další úprava a transport nově syntetizovaných bílkovin.

Mitochondrie

Mitochondrie je organela opatřená dvojitou membránou. Vnitřní membrána je zvrásněná a vytváří přihrádky (krysty). Vnitřní prostor mitochondrie se nazývá matrix. V mitochondriích jsou lokalizovány biochemické procesy spojené s tvorbou ATP. Proto se mitochondrie někdy označují jako energetická centrála buňky. V matrixu mitochondrií jsou lokalizovány např. enzymy citrátového cyklu a β -oxidace mastných kyselin, ve vnitřní membráně se nacházejí enzymy aerobní fosforylace (dýchací řetězec a ATP syntetasa)

Lysosomy

Tyto organely obsahují pestrý soubor hydrolytických enzymů. Slouží zejména k štěpení biopolymerů, které se do buňky dostávají z extracelulárního prostoru tzv. fagocytozou. Fagocyt, obsahující pohlcený biopolymer, se spojí s lysosomem za vzniku tzv. fagolysosomu a hydrolasy polymer rozštěpí.

Mikrotělíška

Mezi mikrotělíška se řadí peroxisomy a glyoxysomy. Peroxisomy obsahují zejména oxidoreduktasy. Působením těchto enzymů se v peroxisomech vytváří peroxid vodíku a hydroperoxidové radikály, které přispívají k rozkladu složitých látek, přijatých z okolí buňky. Glyoxysomy se vyskytují hlavně v klíčících semenech olejnatých rostlin. Obsahují enzymy tzv. glyoxylátového cyklu.

Plastidy

Tyto organely se vyskytují pouze v rostlinných buňkách. Rozdělují se podle barvy na chromoplasty (barevné) a leukoplasty (bezbarvé). Nejznámějším zástupcem plastidů jsou zelené chloroplasty.

Chloroplasty jsou obklopeny dvojitou membránou. Vnitřní membrána vytváří složité záhyby zvané thylakoidy, které se skládají k sobě a vytváří grana. Vnitřní prostor chloroplastu se nazývá stroma. Hlavní funkcí chloroplastů je fotosyntéza. Enzymy tohoto procesu se nacházejí jak ve stromatu, tak zabudované v membráně gran.

Vakuoly

Zejména v rostlinných buňkách jsou dobře patrné poměrně velké organely zvané vakuoly. Vyskytují se i v buňkách živočišných, kde jsou ale málo zřetelné. Jejich hlavní funkcí je ukládání zásobních biopolymerů (např. polysacharidů).

3. ENZYMY

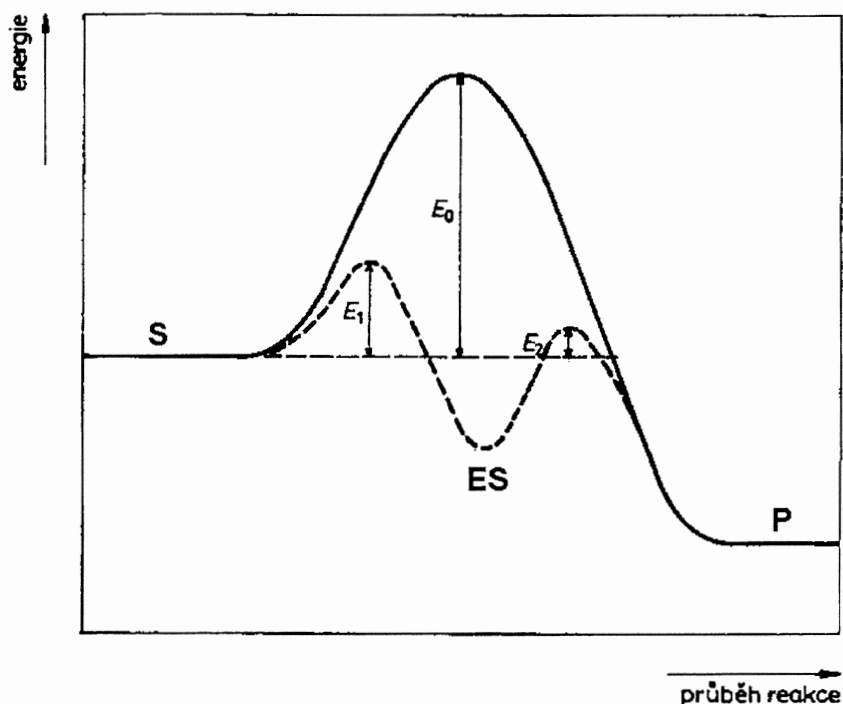
Časná historie enzymologie, vědy o enzymech, je spojena s počátky biochemie. Tyto disciplíny se vyvíjely společně od devatenáctého století sledováním fermentace a trávení.

Za začátek výzkumu fermentace je považováno zjištění Josepha Louise Gay-Lussaca z roku 1810, že kvasinky rozkládají cukr převážně na ethanol a CO₂. Roku 1835 ve své obecné teorii o chemické katalýze uvedl Jacob Berzelius, že extrakt sladu, známý jako diastasa, katalyzuje hydrolýzu škrobu účinněji než kyselina sírová. Nereprodukovatelnost většiny biochemických reakcí v laboratoři vedené Louistem Pasteurem v polovině devatenáctého století, vedla k předpokladu, že fermentace je vázána na živé buňky. Jak bylo v té době obvyklé, Pasteur předpokládal, že živé systémy jsou vybaveny „životní silou“ (vis vitalis), která jim dovoluje obcházet přírodní zákony, řídící neživou hmotu. Na druhé straně Justus Liebig dokazoval, že příčinou biologických procesů je činnost chemických sloučenin tehdy známých jako „fermenty“. A tak název enzym“ (řecky: enzyme- ..kvasinka), který navrhl Friedrich Wilhelm Kühne, měl zdůraznit, že ne kvasinky samy, ale něco v kvasinkách katalyzuje reakce kvašení neboli fermentace. Teprve v roce 1897 Eduard Buchner získal bezbuněčný extrakt z kvasinek, schopný syntetizovat ethanol z glukosy. Tím bylo prokázáno, že biochemické procesy nemusí být vázány na existenci živé buňky.

3.1.Funkce enzymů

Chemické reakce v živých organismech podléhají stejným zákonům jako reakce v neživé přírodě. Aby proběhla chemická reakce, při níž se látka A mění na látku B, musí být molekulám dodána energie, která postačí na překonání energetické bariery (tzv. aktivační energie), která brání jejich vzájemné interakci (Obr. 4).

Aktivační energii si lze zjednodušeně představit jako kinetickou energii (energie tepelného pohybu) molekul, potřebnou pro jejich interakci. Za podmínek, které existují v živých buňkách, je kinetická energie molekul příliš nízká a biochemické reakce proto nemohou probíhat. Aby reakce proběhla, musí dojít ke snížení zmíněné energetické bariery. Tak fungují katalyzátory chemických reakcí. V živých buňkách mají funkci katalyzátorů specializované proteiny - enzymy.



Obr. 4 Aktivační energie nekatalyzované (E_0) a katalyzované (E_1 a E_2) reakce.

(S – substrát, ES – enzýmsubstrátový komplex, P – produkt)

Každá biochemická reakce má nějaký svůj, dosti úzce specializovaný, enzym. To je velmi důležité pro řízení metabolických procesů v buňkách. Probíhat budou jen ty reakce, pro které bude přítomen aktivní enzym.

3.2.Stavba enzymů

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly. Některé enzymy jsou jednoduché proteiny, jiné obsahují ještě nízkomolekulární nebílkovinnou složku (složené enzymy – holoenzymy). Tato nebílkovinná složka může být v aktivním místě enzymu vázána kovalentně nebo slabými interakcemi. Pro kovalentně vázanou nebílkovinnou složku se užívá název prostetická skupina, složka vázaná slabými interakcemi je označována jako koenzym, společné označení nebílkovinné složky je kofaktor. Pro bílkovinnou složku se užívá označení apoenzym.

3.2.1. Bílkovinná složka

Pro funkci enzymu je rozhodující struktura jeho bílkovinné molekuly a případná vazba na další buněčné struktury. Z tohoto hlediska (bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost kofaktorů) můžeme definovat několik strukturních stupňů enzymů :

Monomerní enzym	Nejjednodušší typ enzymu. Skládá se z jediné proteinové jednotky. Takových enzymů je poměrně málo.
Oligomerní enzym	Skládají se z více stejných proteinových subjednotek. V jedné jednotce se tak vyskytuje více katalytických center.
Komplexní enzym	Skládá se z více subjednotek. Nejméně jedna obsahuje katalytické centrum. Ostatní se podílí zejména na regulaci aktivity enzymu
Enzymový komplex	Skládá se z různých subjednotek, které katalyzují odlišné reakce. Jde tedy o komplex různých enzymů. Jednotlivé subjednotky mohou být spojeny slabými interakcemi (pyruvátdehydrogenasa) nebo kovalentními vazbami (komplex syntetasy mastných kyselin)
Membránově vázané struktury	Jde o složitý systém více enzymů, které ke své funkci vyžadují přesné uspořádání v membráně. Patří sem např. systém terminální oxidace (ve vnitřní membráně mitochondrie) nebo systém světelné fáze fotosyntézy (ve vnitřní membráně chloroplastu)

3.2.2. Nebílkovinná složka

Některé z biochemických reakcí mohou enzymy katalyzovat pouze ve spojení s dalšími nebílkovinnými složkami – kofaktory. Kofaktory mohou být kovové ionty (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ...) nebo organické molekuly. Chemické vzorce nejvýznamnějších kofaktorů jsou uvedeny na obrázku 5 (u kofaktorů $NADH+H^+$ a $FADH_2$ je uvedena pouze změněná část molekuly).

Kofaktor	Katalyzovaná reakce
ATP	všeobecný zdroj energie, přenos fosfátu
Biotin	karboxylace
FAD	oxidoredukce
FMN	oxidoredukce
Koenzym A	přenos acylů
Lipoová kyselina	oxidoredukce
NAD ⁺	oxidoredukce
NADP ⁺	oxidoredukce
Pyridoxalfosfát	přenos aminoskupin
Tetrahydrolistová kyselina	přenos jednouhlíkatých skupin
Thiamindifosfát	přenos aldehydů

Řada organismů ztratila v průběhu evoluce schopnost syntetizovat některé organické kofaktory (nebo jejich části) a musí je přijímat v potravě. Takové prekurzory kofaktorů jsou známy jako vitaminy

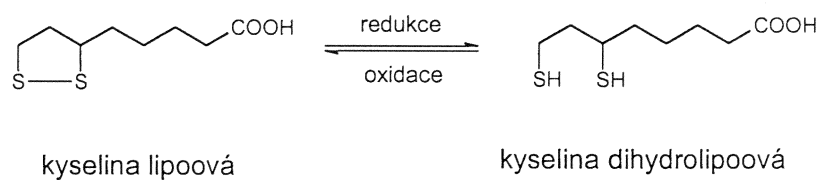
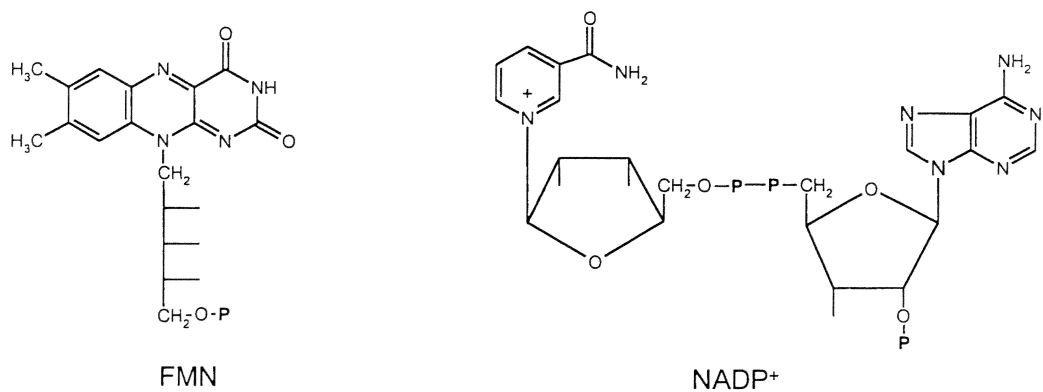
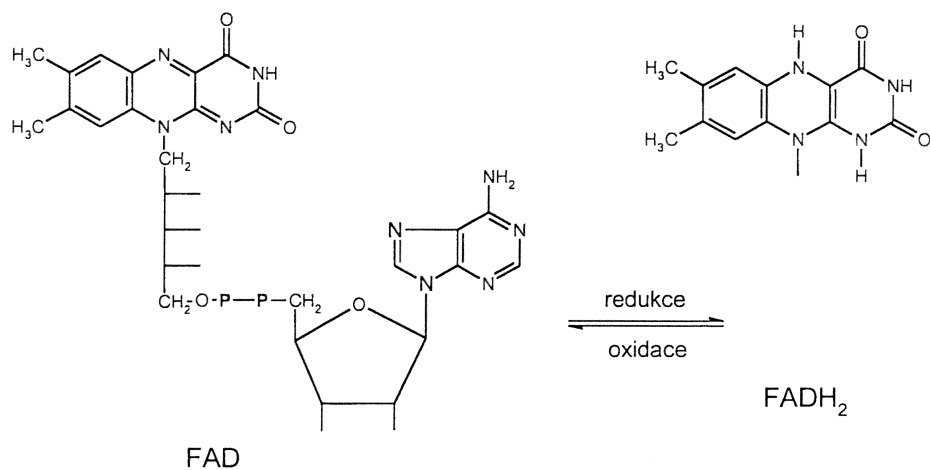
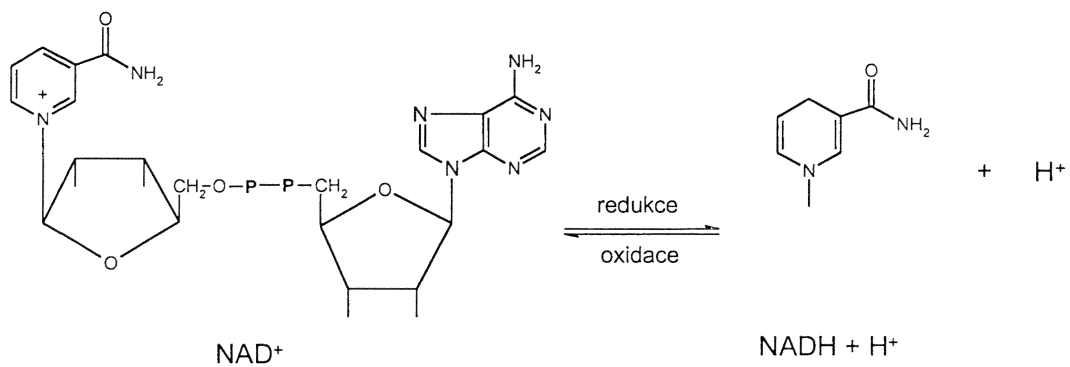
Vitamin	Kofaktor
B ₁ (thiamin)	Thiamindifosfát
B ₂ (riboflavin)	FMN, FAD
B ₅ (kyselina panthotenová)	Koenzym-A
B ₆ (pyridoxol)	pyridoxalfosfát
PP (nikotinamid)	NAD ⁺ , NADP ⁺

3.3.Mechanismus působení enzymů

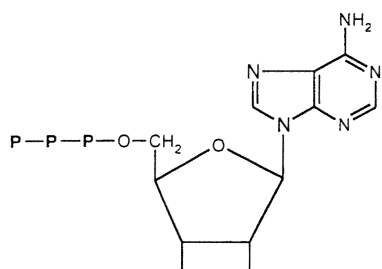
V nejjednodušším případě lze enzymem katalyzovanou reakci zapsat následujícím schématem:



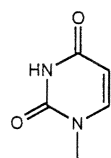
Reagující látka S (substrát) se váže na enzym E za vzniku enzym-substrátového komplexu ES, který se následně rozpadá na produkt P a enzym se uvolní.



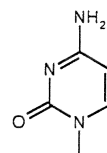
Obr. 5 Kofaktory enzymů



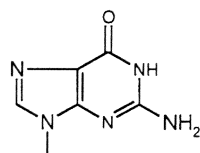
ATP



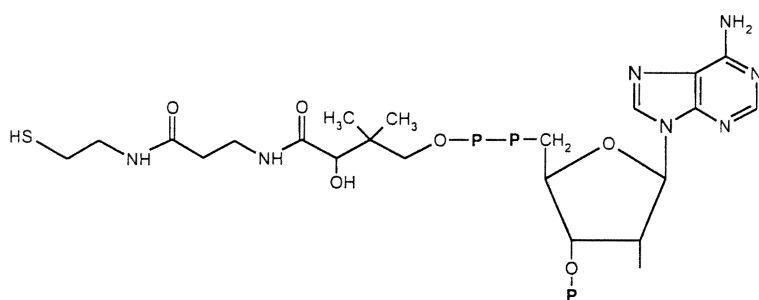
UTP



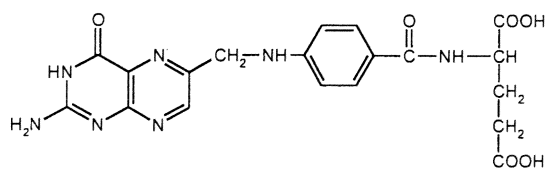
CTP



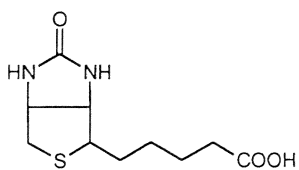
GTP



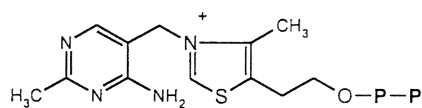
koenzym A



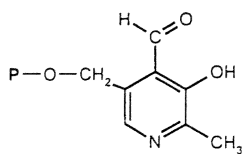
kyselina listová



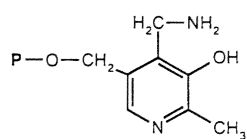
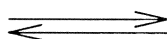
biotin



thiamindifosfát



pyridoxalfosfát



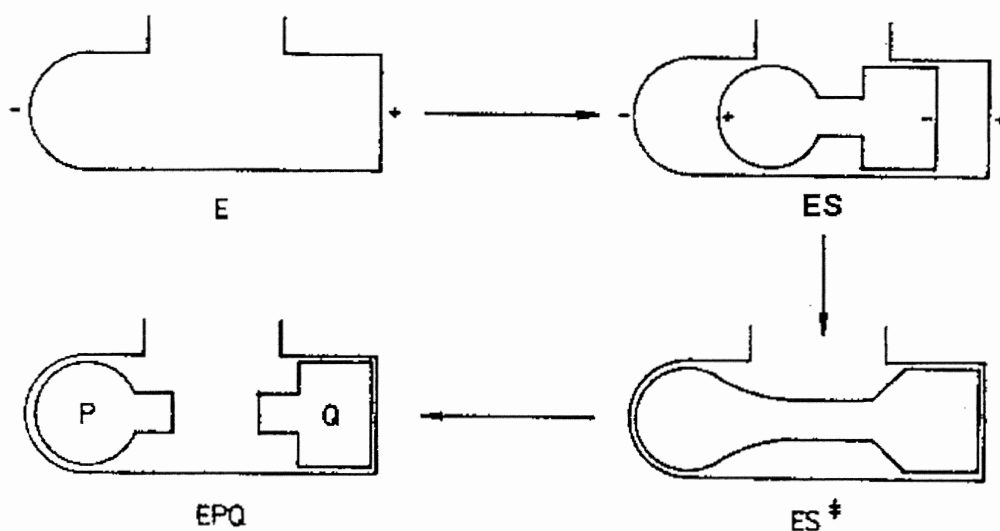
pyridoxaminfosfát

Obr. 5 Kofaktory enzymů (pokračování)

Molekula enzymu je obvykle mnohonásobně větší než substrát. I v případě velkých substrátů (biopolymery – proteiny, polysacharidy) probíhá reakce jen v prostorově silně omezeném úseku molekuly. Substrát se proto váže jen na malou, přesně definovanou oblast enzymové molekuly - aktivní místo enzymu. Aktivní místo je tvořeno přesně prostorově uspořádanými zbytky aminokyselin (obecně tří) potřebných pro navázání substrátu.

Mechanismus působení enzymů se poprvé pokusil vysvětlit Emil Fischer (1834) hypotézou „zámku a klíče“. Podle této představy zapadá molekula substrátu do pevného aktivního místa enzymu jako klíč do zámku. Hypotéza ovšem nevysvětlovala proč následně dochází k rozpadu substrátu na produkt a některé další otázky. Novou hypotézu vyslovil Daniel Koshland (1959).

Podle této, nyní již experimentálně potvrzené, „teorie indukovaného přizpůsobení“ nejsou vazebné skupiny aminokyselin v aktivním centru v optimální poloze. Teprve po interakci se substrátem dochází k přizpůsobení komformace enzymu a k vytvoření aktivního enzym-substrátového komplexu. Snaha enzymu zaujmout původní konformaci pak vede k rozpadu substrátu (Obr. 6).



Obr. 6 Teorie indukovaného přizpůsobení

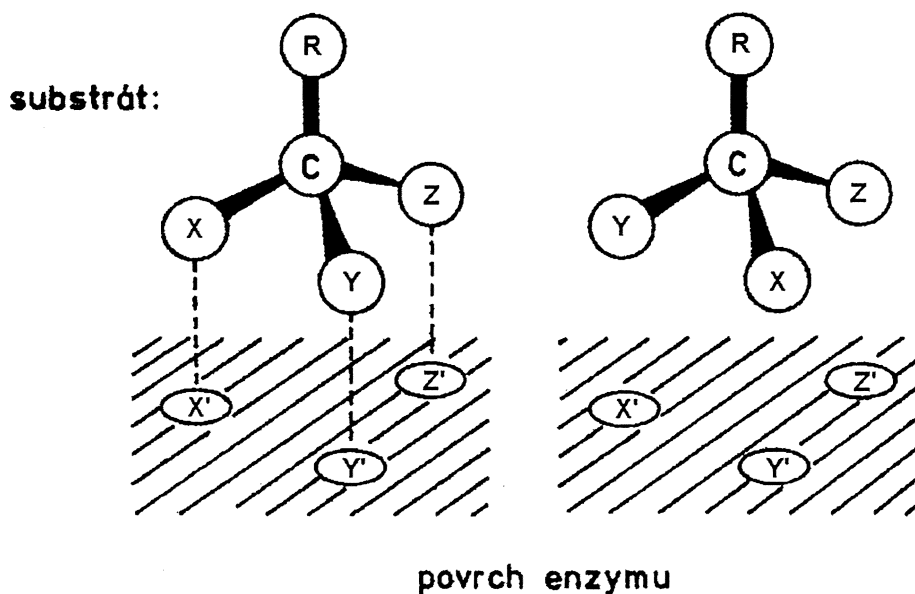
3.3.1. Enzymová specifita

Enzymy jsou obecně velmi specifické k substrátům. Tato jejich vlastnost je vyvolána nutností velmi přesné vazby substrátu do aktivního místa enzymu. Tato tzv. substrátová specifita se však svým stupněm u jednotlivých enzymů značně liší. Některé enzymy

vykazují tzv. absolutní substrátovou specifitu, tj. nepůsobí kromě molekuly substrátu ani na velmi podobné molekuly. Známým příkladem je enzym ureasa, která štěpí pouze molekuly močoviny. Jiné enzymy mají specifitu širší. Jsou schopny katalyzovat reakce několika podobných substrátů. Např. enzym hexokinasa je schopen katalyzovat fosforylaci několika hexos (glukosa, fruktosa) na příslušné fosfoestery.

Specifita enzymů, které katalyzují přeměny biopolymerů (proteinasy, nukleasy) se vztahuje vždy jen k určité části makromolekuly substrátu. Některé mají výraznou specifitu. Např. trypsin štěpí peptidové vazby zejména mezi aminokyselinami Arg-Lys, tzv. restriční endonukleasy štěpí DNA ve velmi přesně určeném místě daném určitým sledem nukleotidů. U jiných je stupeň specifity značně nižší, např. chymotrypsin štěpí peptidové vazby v místech karboxylů aminokyselin Thr, Trp, Phe, Leu. Obecně však všechny tyto enzymy štěpí různé bílkoviny nebo nukleové kyseliny a určující je pouze struktura v místě reakce.

Významnou vlastností enzymů je jejich stereospecifita, daná prostorovým uspořádáním tří vazebných bodů v aktivním místě.



Enzymy tak katalyzují např. přeměnu D-glukosy, ale ne L-glukosy nebo L-aminokyselin, ale ne D-aminokyselin.

Enzymy jsou dosti úzce specializované i pokud se týče druhu reakce. Obvykle katalyzují jen jednu z termodynamicky možných reakcí substrátu. Například jedna aminokyselina může podléhat dekarboxylaci nebo deaminaci. Pro každou reakci téže

aminokyseliny však musí být k dispozici samostatný enzym. Tomuto typu specifity se někdy říká specifita účinu (účinku).

3.4. Klasifikace enzymů

V současnosti je již přesně identifikováno kolem 3000 enzymů. Tento velký počet si vynutil zavedení přesné enzymové klasifikace a přesného názvosloví. Klasifikace enzymů je založená na jejich třídění podle základních typů reakcí, které katalyzují. Na těchto reakcích je založeno i systematické názvosloví. Protože jsou systematické (systemové) názvy značně komplikované, používají se i názvy racionální (doporučené, zjednodušené). Kromě těchto názvů se dosud užívají i historické triviální názvy. V jednotné klasifikaci je každému enzymu přiřazen číselný kód tvaru

$$\text{EC} . a . b . c . d$$

kde

- a – označuje třídu enzymu, tj. základní typ reakce, kterou katalyzuje
- b,c – označuje podtřídu a podpodtřídu enzymu, které blíže vymezují typ reakce
- d – je pořadové číslo v seznamu enzymů dané podpodtřídy

Rozeznáváme šest enzymových tříd

EC 1.b.c.d – oxidoreduktasy

EC 2.b.c.d – transferasy

EC 3.b.c.d – hydrolasy

EC 4.b.c.d – lyasy

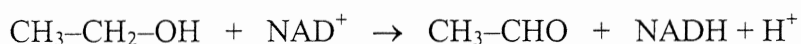
EC 5.b.c.d – isomerasy

EC 6.b.c.d – ligasy (synthetasy)

Oxidoreduktasy katalyzují oxidační reakce, tj. reakce spojené s přenosem elektronů. Oxidovaný substrát je donor elektronů, redukováná látka je akceptor elektronů. Systémový název je tvořen podle schematu :

donor : akceptor – oxidoreduktasa

Doporučený název je tvořen z názvu substrátu s připojeným bližším typem enzymu např. dehydrogenasa pro enzymy, které přenáší vodíkové atomy nebo oxygenasa, pokud je při reakci zabudována do molekuly akceptoru celá molekula kyslíku (O₂). Například pro reakci



je systémový název enzymu: ethanol : NAD⁺- oxidoreduktasa

doporučený název: alkoholdehydrogenasa

kodové číslo: EC 1.1.1.1

Transferasy jsou enzymy, které přenášejí skupiny atomů z jedné sloučeniny (donor) na jinou (akceptor). Systémový název je založen na schematu

donor : akceptor – přenášená skupina-transferasa

Doporučené názvy se skládají z názvu substrátu s připojeným typem enzymu podle skupiny (CH₃– methyltransferasa, NH₂– aminotransferasa, R–CO– acyltransferasa apod.) Pro enzymy fosfotransferasy (přenos fosfátu) se často užívá název kinasa.

Např. pro reakci



je systémový název enzymu: ATP : 3-fosfo-D-glycerátfosfotransferasa

doporučený název: fosfoglycerátkinasa

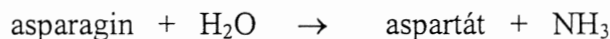
kodové číslo: EC 2.7.2.3

Hydrolasy katalyzují štěpení různých vazeb za účasti molekuly vody, tedy reakce hydrolytické. Systémový název je tvořen podle schématu

substrát – odštěpená skupina-hydrolasa

Doporučený název je tvořen názvem substrátu a koncovkou – asa.

Např. pro enzym katalyzující reakci



je systémový název enzymu: L-asparagin-aminohydrolasa

doporučený název: asparaginasa

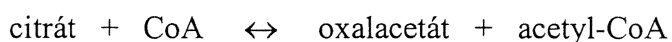
kodové označení: EC 3.5.1.1

U hydrolas se často vyskytují i triviální názvy např. trypsin, pepsin, papain, diastasa

Lyasy jsou enzymy, které štěpí vazby (C–C, C–O, C–N) jiným způsobem než hydrolýzou nebo oxidací. Systémové názvy jsou tvořeny podle schematu:

substrát – skupina lyasa .

Od ostatních tříd enzymů se lyasy odlišují tím, že v jednom směru (štěpení) působí na jeden substrát, ale ve směru opačném (syntéza) na substráty dva. Doporučený název je pak tvořen z názvu štěpeného substrátu - lyasa nebo vznikajícího substrátu - synthasa. Používá se ten z názvů, který je pro funkci enzymu výstižnější. Např. pro reakci



je systémový název enzymu: citrát – oxalacetátlyasa.

doporučený název: citrátsynthasa (tento směr reakce je pro enzym hlavní)

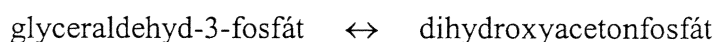
kodové číslo: EC 4.1.3.7

Izomerasy katalyzují přeměnu uvnitř jedné molekuly. Systémové názvy jsou tvořeny podle schematu:

substrát – děj – isomerasa.

Pokud při reakci dochází k přenosu celé skupiny na jiný atom, používá se i termín mutasa.

Např. pro reakci

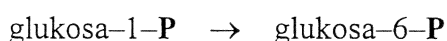


je systémový název enzymu: D-glyceraldehyd-3-fosfátketolisomerasa

doporučený název: triosafosfátisomerasa

kodové číslo: EC 5.3.1.1

Pro enzym, který katalyzuje reakci



je užíván doporučený název fosfoglukomutasa.

Ligasy jsou enzymy, které katalyzují sloučení dvou látek, tedy vznik nových vazeb (C–C, C–N). Při tom se energie potřebná pro vznik těchto vazeb získává současným štěpením energeticky bohaté látky, nejčastěji ATP. Systémové názvy jsou tvořeny podle schématu

substrát 1 : substrát 2 – ligasa (tvořící ADP).

(Místo ADP může být AMP nebo jiné zbytky nukleotidu).

Doporučené názvy jsou tvořeny z názvu vznikající látky + synthetasa (nebo ligasa).

Např. pro reakci



je systémový název enzymu: L – aspartát : NH₃ – ligasa (tvořící AMP)

doporučený název: asparaginsynthetasa

kodové číslo: EC 6.3.1.1

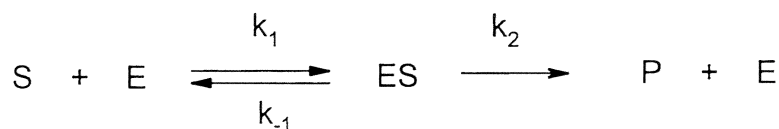
3.5. Enzymová kinetika

Podobně jako chemická kinetika se také enzymová kinetika zabývá studiem faktorů, které ovlivňují rychlost enzymové reakce. Tyto faktory jsou spojeny zejména s fyzikálně-chemickými podmínkami prostředí, ve kterém reakce probíhají. Mezi hlavní faktory patří :

- koncentrace substrátu a enzymu
- teplota
- pH
- aktivátory a inhibitory

3.5.1. Koncentrace substrátu

Základní představa mechanismu působení enzymu vychází z toho, že enzym tvoří se substráty tzv. enzymsubstrátový komplex, který se následně rozpadá na produkty a původní enzym. V nejjednodušším případě lze uvažovat jednosubstrátovou reakci, která je jako celek nevratná.



(S-substrát, E-enzym, ES-enzymsubstrátový komplex, P-produkt, k-rychlostní konstanty)

Celý děj se skládá ze tří dílčích reakcí pro které platí příslušné kinetické diferenciální rovnice dílčích reakcí:

$$v_1 \equiv \frac{d[S]}{dt} = -k_1 \cdot [S] \cdot [E]$$

$$v_{-1} \equiv \frac{d[ES]}{dt} = -k_{-1} \cdot [ES] + k_1 \cdot [S] \cdot [E]$$

$$v_2 \equiv \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES]$$

Aby bylo možno soustavu diferenciálních rovnic řešit, je nutno přidat ještě dvě podmínky. První je tzv. konzervační rovnice, která předpokládá, že celková koncentrace enzymu (C_E) se nemění

$$C_E = [E] + [ES]$$

Druhá podmínka vychází z předpokladu ustáleného stavu. Platí :

$$[ES] = konst. \Rightarrow \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Řešením soustavy je pak výraz

$$v \equiv \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 \cdot C_E \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Rovnici odvodili v r. 1913 angličtí enzymologové Leonor Michaelis a Maude Menten a uvedli ji ve tvaru

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde :

v = rychlost enzymové reakce

V = limitní rychlost enzymové reakce

K_m = Michaelisova konstanta

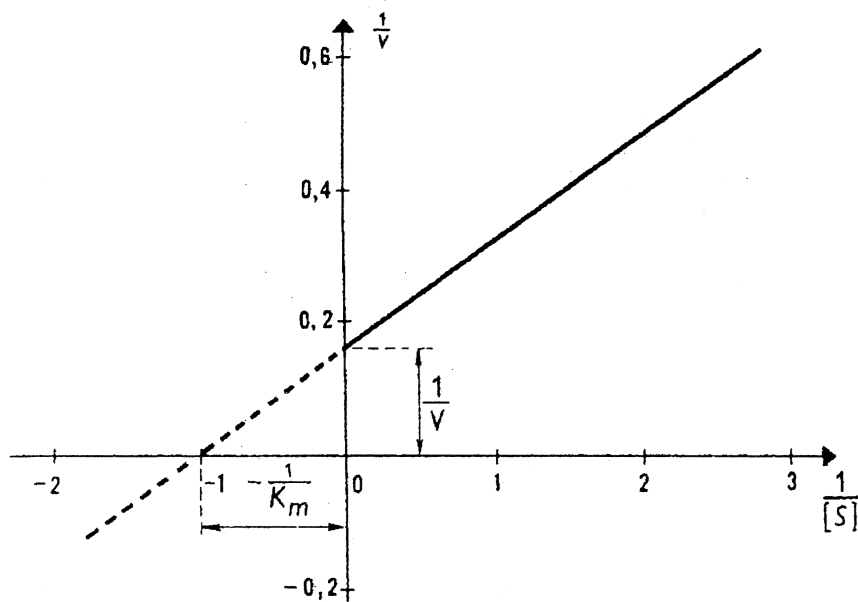
$[S]$ = koncentrace substrátu

Grafem této rovnice je větev rovnoosé hyperboly. Rozborem podle poměrů velikosti K_m a $[S]$ lze charakterizovat význam veličin V a K_m a určit i další charakteristické vlastnosti enzymové reakce. Z rozboru vyplývá, že limitní rychlost enzymové reakce (V) je dosahována při velmi vysoké (teoreticky nekonečné) koncentraci substrátu a K_m je rovna koncentraci substrátu, při které je rychlost reakce právě rovna polovině limitní rychlosti ($V/2$). K_m tedy vyjadřuje afinitu substrátu k enzymu. K_m

V enzymologické praxi se často stanovuje K_m jako významná charakteristika enzymu. Stanovení V a K_m přímo z křivky sestavené z experimentálních údajů je značně nepohodlné. Proto byly zavedeny přístupnější způsoby, z nichž je nejběžnější linearizace hyperboly. Užívaná je metoda Hanse Lineweavera a Deana Burka, kteří v r. 1934 použili lineární vztah mezi reciprokými hodnotami obou proměnných, tj. $1/[S]$ a $1/v$:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

Jde o rovnici přímky o směrnici K_m/V a úseku $1/V$ na ose $1/v$. Úsek na ose $1/[S]$ má pak hodnotu $-1/K_m$ (Obr.7)

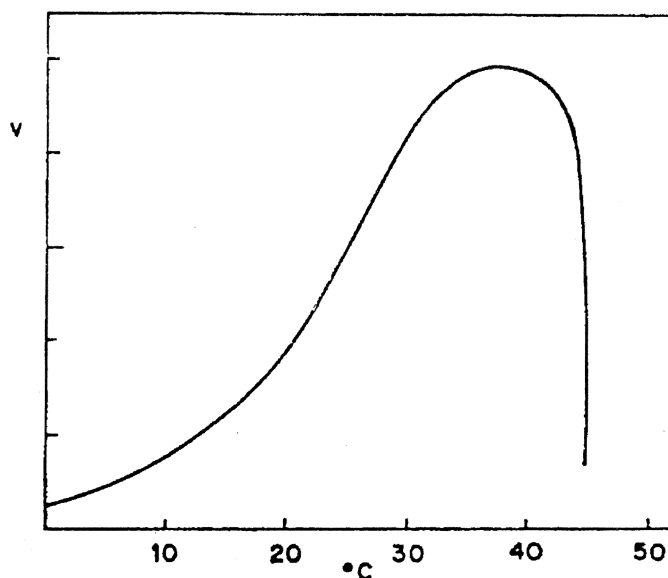


Obr. 7 Kinetika enzymové reakce podle Lineweavera a Burka

Podrobným studiem enzymových reakcí lze charakterisovat i složitější vícesubstrátové reakce.

3.5.2. Teplota

Zvyšováním teploty roste rychlost enzymové reakce, ale též rychlost rozkladu enzymu, např. disociace koenzymu z jeho povrchu. Dosažením určité teploty se dosáhne nejvyšší rychlosti reakce, dalším zvyšováním teploty rychlost klesá. Jde o teplotní optimum enzymu



Tato význačná charakteristika závisí na době, po kterou daná teplota působila. Za vyšších teplot (kolem 70°C) je enzymová aktivita podstatně bržděna a to zpravidla nevratně. Z počátku se vzrůst rychlosti reakce řídí Arheniovým vztahem :

$$v = k \cdot \exp\left(-\frac{E}{RT}\right)$$

kde:

k – konstanta

E – aktivační energie

R – univerzální plynová konstanta

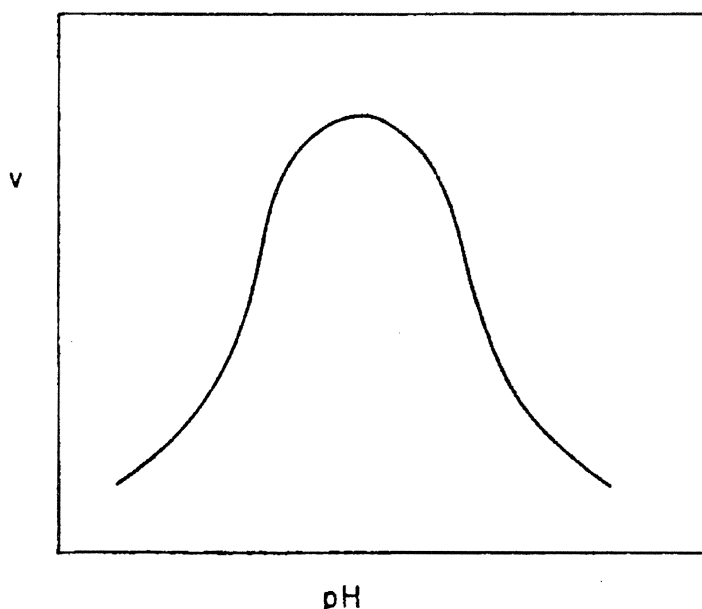
T – absolutní teplota

Tato závislost však u enzymů platí pouze při nižších teplotách (15-40°C). V teplotních optimech enzymů jsou značné rozdíly. U většiny se tato hodnota pohybuje kolem 40°C,

jsou však známy enzymy se značně vyšší tepelnou odolností (zejména u termofilních bakterií).

3.5.3. Vliv pH

Na rychlost enzymové reakce má výrazný vliv pH prostředí. To je dáno chemickým charakterem proteinů. Změny koncentrace vodíkových iontů a hydroxylových aniontů ovlivňují konformaci proteinových molekul a tedy i aktivního místa enzymu. Při určitém pH dosahuje rychlost reakce maximální hodnoty. Tomuto pH se říká optimální pH nebo pH-optimum. Závislost rychlosti enzymové reakce na pH je uvedena na obrázku 8.



Obr. 8 Závislost rychlosti enzymové reakce na pH

Většina enzymů má pH- optimum v rozmezí 5–7, ale existují i výjimky (např. pepsin 2, arginasa 9 až 10).

3.5.4. Aktivátory a inhibitory

Řada enzymů vyžaduje pro svou funkci přítomnost iontů kovů. Ty se účastní vazby substrátu do aktivního místa enzymu. Bez jejich přítomnosti jsou enzymy neaktivní nebo mají výrazně sníženou aktivitu. Takové látky se označují jako aktivátory. Některé příklady jsou uvedeny v tabulce.

Ion	Enzym
Mg^{2+}	ATP-asy
Cu^+ , Cu^{2+}	cytochromoxidasa
Zn^{2+}	peptidasy
Mo^{2+} , Mo^{3+}	nitrátreduktasa
Mn^{2+}	peptidasy
Fe^{2+} , Fe^{3+}	peroxidasy

Některé sloučeniny mohou aktivitu enzymů snižovat nebo zcela blokovat. Takové látky se nazývají inhibitory. Podle mechanismu působení inhibitoru můžeme rozlišit několik typů inhibicí:

- kompetitivní
- nekompetitivní
- akompetitivní

Kompetitivní inhibice

Látka, která soutěží se substrátem o vazebné místo, je označována jako kompetitivní inhibitor. Takový inhibitor je strukturně podobný substrátu do té míry, že se specificky váže v aktivním místě. Na rozdíl od substrátu však není přeměněn v produkt. Protože se inhibitor váže na enzym podobně jako substrát, může být z vazby substrátem vytěsněn.

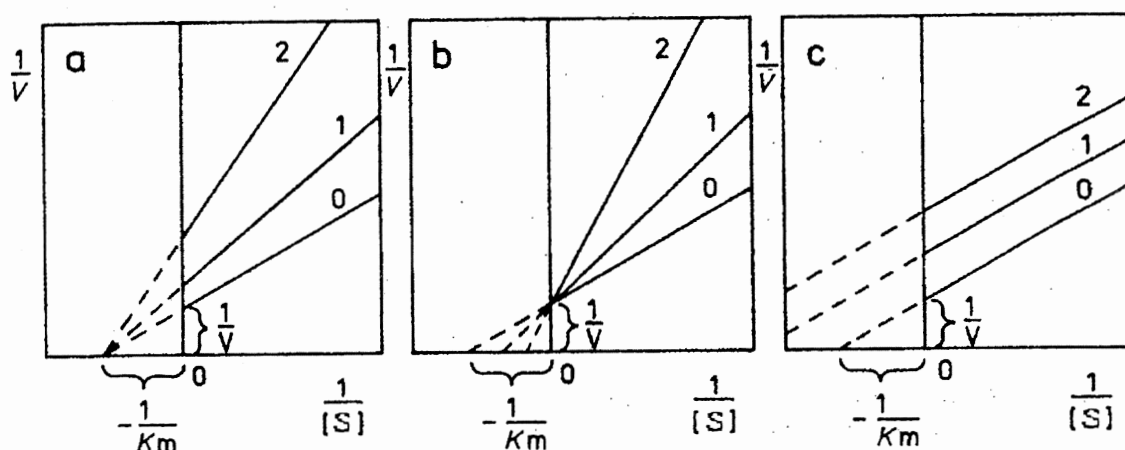
Nekompetitivní inhibice

Při nekompetitivní inhibici nemůže být inhibitor substrátem vytěsněn. Klasickým příkladem je vazba inhibitoru mimo aktivní centrum enzymu. Funkce enzymu je změnou konformace nevratně blokována. Příkladem nekompetitivních inhibitorů jsou některé těžké kovy (Pb^{2+} , Hg^{2+} apod.).

Akompetitivní inhibice

V akompetitivní inhibici se inhibitor váže přímo na komplex enzym-substrát, ale nikoli na volný enzym.

Na obrázku 9 je znázorněn vliv jednotlivých typů inhibitorů v Lineweaver-Burkově grafu.



Obr. 9 Vliv jednotlivých typů inhibitorů na kinetiku enzymové reakce.
 a – nekompetitivní inhibice, b – kompetitivní inhibice, c – akompetitivní inhibice
 0 – bez inhibitoru, 1 a 2 – rostoucí účinnost inhibice

V reálných případech se mnohdy nesetkáme s čistým případem některého typu inhibice, ale jde často o smíšené typy.

3.5.5. Enzymová aktivita.

U reakcí katalyzovaných enzymy je jejich rychlost určena především součinem množství enzymu a „účinností“ jednotlivé enzymové molekuly. Rychlost, kterou taková reakce probíhá za definovaných podmínek se nazývá aktivita enzymu. Tato veličina má v soustavě SI jednotku katal (kat). Enzym má aktivitu jednoho katalu, jestliže přemění jeden mol substrátu za jednu sekundu. Rozměr katalu je tedy $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. Katal je jednotka velmi velká, a proto se většinou uplatňují její zlomky (μkat , nkat).

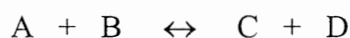
V některých případech je užitečné uvádět tzv. specifickou aktivitu, což je aktivita vztážená na množství bílkoviny. Pokud máme čistý enzym, lze aktivitu vztáhnout na i na mol enzymu (molární aktivita). Často je však k dispozici pouze enzymový preparát (extrakt tkáně nebo tělní tekutina). V takovém případě se aktivita vztahuje např. na ml enzymového preparátu (v medicíně např. na ml krevního séra = koncentrace enzymové aktivity).

3.6. Biochemická energetika

3.6.1. Biochemická termodynamika

Všechny procesy v živých organismech se řídí základními zákony termodynamiky. Posuzovat směr chemické, a tedy i biochemické, reakce umožňuje stavová funkce G (Gibbsova energie).

Aby reakce probíhala v daném směru, musí být změna Gibbsovy energie (ΔG) menší než nula. Je-li $\Delta G > 0$ bude reakce probíhat v opačném směru, je-li $\Delta G = 0$ je systém v termodynamické rovnováze. Pro výpočty ΔG pro konkrétní rovnici.



platí vztah

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \left(\frac{[C] \cdot [D]}{[A] \cdot [B]} \right)$$

Veličina ΔG^0 je tzv. standardní změna Gibbsovy energie. Její hodnota nám vlastně udává „polohu rovnováhy“ reakce. Je-li $\Delta G = 0$ (rovnováha) platí:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K$$

kde K je rovnovážná konstanta reakce

Standardní změna Gibbsovy energie je běžně definována pro tzv. standardní stav (teplota 25°C, tlak 0,101MPa, jednotková aktivita látek). Protože v biochemických systémech probíhají reakce ve velmi zředěných vodných roztocích při pH blízkém neutrálnímu, byly za standardní stav zvoleny pozměněné podmínky. Aktivita vody je volena 1 a aktivita H^+ iontu je volena jako jednotková pro $pH = 7$. Pro reakce, kterých se účastní voda nebo H^+ ionty, se tím získá mírně odlišná hodnota standardní změny Gibbsovy energie, která se označuje $\Delta G^0'$.

Termodynamika se zabývá změnami stavu systému. Přitom nezávisí na cestě, kterou se do tohoto stavu systém dostane, ale pouze na počátečním a koncovém stavu. Pro sled reakcí



pak platí

$$\Delta G^0 = \Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 + \Delta G_3^0$$

Je-li $\Delta G^0 < 0$ je rovnováha celého systému posunuta ve směru látky D. Přitom může být např. $\Delta G_2^0 > 0$, tj. rovnováha v samotné dílčí reakci $B \leftrightarrow C$ posunuta ve směru látky B. V celém sledu reakcí je ovšem tato dílčí reakce „tažena“ reakcí $C \leftrightarrow D$ (je-li $\Delta G_3^0 < 0$) nebo „tlačena“ reakcí $A \leftrightarrow B$ (je-li $\Delta G_1^0 < 0$). Takovým reakcím se říká reakce spřažené. To je běžný případ právě metabolických drah, kde se často vyskytují dílčí reakce s $\Delta G^0 > 0$

3.6.2. Makroergické látky.

Řada biochemických reakcí vyžaduje (pro dosažení $\Delta G < 0$) dodání energie. Zdrojem této chemické energie jsou látky s vysokým obsahem vnitřní energie (makroergické látky). Hlavními typy těchto látek jsou zejména ty, které v molekule obsahují trifosfátová, thioesterová nebo enolfosfátová uskupení. Za makroergické látky jsou považovány i redukované kofaktory oxidoreduktas.

Nejvýznamnější makroergickou látkou v buňkách je ATP. Vzniká obvykle podle schématu



Podle energetického zdroje pro uvedenou reakci lze definovat tři základní mechanismy tvorby ATP

- fosforylace na substrátové úrovni
- oxidační fosforylace
- fotofosforylace

Při fosforylaci na substrátové úrovni je energie pro syntézu ATP bezprostředně získávána např. oxidací substrátu. Tento mechanismus není vázán na využití kyslíku a probíhá proto i za anaerobních podmínek. V případě anaerobních organismů je to vlastně jediná cesta tvorby ATP. Jako příklad lze uvést jednu z dílčích reakcí glykolýzy:



Oxidační fosforylace je nejdůležitějším zdrojem ATP pro aerobní organismy. Zdrojem energie jsou zde redukované kofaktory $\text{NADH} + \text{H}^+$ a FADH_2 , které vznikají biologickými oxidacemi v katabolických drahách. Celý proces je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně.

Fotofosforylace je významným zdrojem ATP pro fototrofní organismy. Zdrojem energie je zde energie světelných kvant. Proces je lokalizován ve vnitřních membránách chloroplastů.

3.6.3. Metabolické dráhy

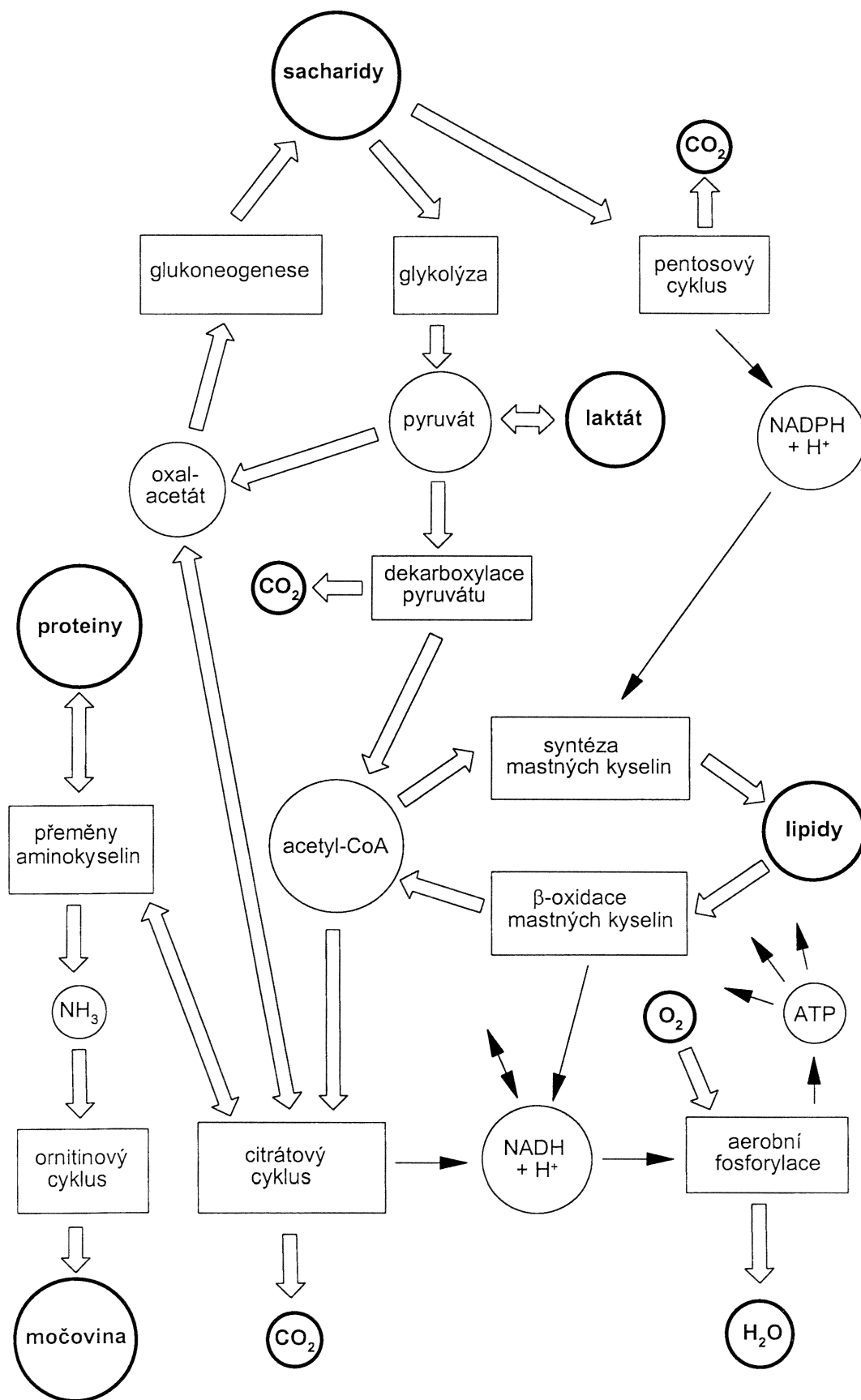
Živé organismy se nenacházejí v termodynamické rovnováze. Naopak vyžadují nepřetržitý tok volné energie pro udržení své existence. Metabolismem se nazývá soubor procesů, jimiž živé soustavy získávají a využívají volnou energii, kterou potřebují pro udržování svých rozličných funkcí. Dosahují toho spojením exergonických reakcí oxidace živin s endergonickými procesy, vyžadovanými k zachování života, jako je mechanická práce, aktivní transport molekul proti koncentračnímu gradientu a biosyntéza složitých sloučenin.

Fototrofní organismy (rostliny a některé bakterie) získávají volnou energii ze Slunce prostřednictvím fotosyntézy, při níž je endergonická reakce CO_2 s H_2O , vedoucí k sacharidům, poháněna energií světelných kvant.

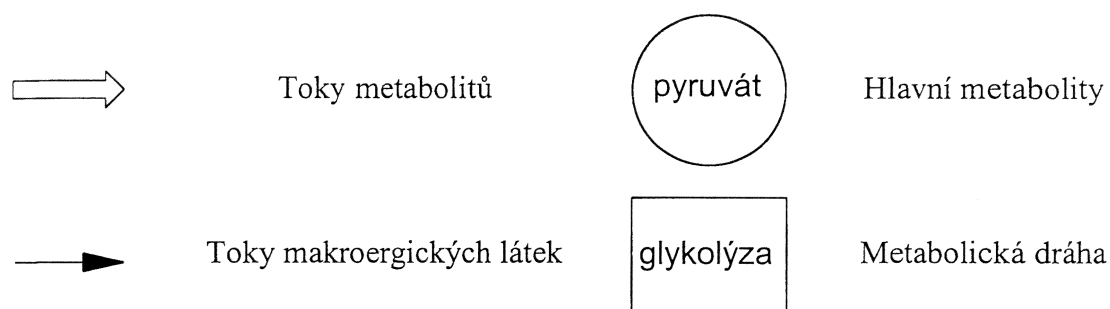
Chemotrofní organismy získávají volnou energii oxidací organických sloučenin (sacharidů, lipidů, proteinů), získaných z jiných organismů, primárně z fototrofních. Volná energie pro endergonické reakce je často vázána v syntetizovaných makroergických fosfátových sloučeninách jako je ATP.

Kromě úplné oxidace živin probíhá i jejich stěpení řadou reakcí na společné meziprodukty, které jsou dále využívány jako prekursory biosyntézy dalších látek.

Metabolická dráha je řada následných enzymových reakcí, která vede k tvorbě určitého produktu. Reakční složky (vstupní látky, meziprodukty a produkty) dráhy jsou označovány jako metabolity. Na obrázku 10 je uvedena velmi zjednodušená metabolická mapa. Jsou zde uvedeny jen základní metabolické dráhy, které budou v tomto textu dále probírány.



Obr. 10 Jednoduchá metabolická mapa



Reakční dráhy, které jsou součástí metabolismu, se rozdělují do dvou kategorií : degrační dráhy (katabolismus) a biosyntetické dráhy (anabolismus). V katabolických drahách dochází k exergonickému rozkladu složitých metabolitů na jednodušší produkty. Volná energie, uvolněná při těchto pochodech, je konzervována zejména v ATP, syntetizovaném z ADP a fosfátu, nebo v $\text{NADPH} + \text{H}^+$, vzniklém redukcí NADP^+ . ATP a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ jsou hlavními zdroji volné energie pro anabolické dráhy. Vlastností degračního metabolismu je to, že při něm dochází ke konverzi velkého počtu rozmanitých látek (sacharidů, lipidů a proteinů) na společné meziprodukty. Tyto meziprodukty jsou poté dále metabolizovány hlavní oxidační drahou, která vede k několika koncovým produktům. Např. rozkladem různých živin vzniká často jako společný meziprodukt acetyl-CoA. Poté následuje oxidace acetylové skupiny na oxid uhličitý a vodu přes citrátový cyklus, řetězec přenosu elektronů a oxidační fosforylaci. Biosyntéza reprezentuje opačný pochod. Relativně málo metabolitů, především pyruvát, acetyl-CoA a meziprodukty citrátového cyklu, slouží jako výchozí materiál pro syntézu velkého množství rozmanitých produktů.

Metabolické dráhy se vyznačují několika základními vlastnostmi, které jsou nezbytné pro jejich funkci v buňce.

- Metabolické dráhy jsou nevratné

Aby jejich reakce proběhly až do konce, musí být vysoce exergonické. Tato vlastnost dává dráze určitý směr. Pokud mají být dvě látky navzájem metabolicky převeďte, musí být dráha vedoucí od první látky k druhé odlišná od dráhy, vedoucí od druhé látky k první. To vyžaduje, alespoň pro některé stupně, jinou reakci (jiný enzym). Existence odlišných cest pro vzájemné přeměny dvou látek je důležitou vlastností metabolických

drah. Umožňuje nezávislou kontrolu rychlostí obou pochodů. Takováto nezávislá kontrola je bez existence dvou různých drah nemožná.

- Všechny metabolické dráhy jsou regulované

Aby bylo možno řídit tok metabolitů metabolickou drahou, je nezbytné regulovat stupeň, limitující její celkovou reakční rychlost. Určující stupeň je nevratný a působí příliš pomalu na to, aby se jeho substráty a produkty mohly dostat do rovnováhy. Protože většina dalších reakcí probíhá v blízkosti rovnováhy, limituje tento určující stupeň metabolické dráhy i její celkovou rychlost. Většina metabolických drah je tudíž kontrolována regulací enzymu, katalyzujícího jejich určující stupeň. Tento určující stupeň se označuje jako stupeň regulační. Nachází se obecně na počátku dráhy – časný regulační stupeň – a „směruje“ tvořený meziprodukt dále po dané dráze. Je to současně i nejúčinnější způsob kontroly, protože je jím bráněno syntéze metabolitů ve zbylé části metabolické dráhy, není-li jich zapotřebí.

- Metabolické dráhy probíhají v eukaryotních buňkách na specifických místech.

Syntéza metabolitů, probíhající ve specifických buněčných oddílech uzavřených membránami, vyžaduje jako životně důležitou složkou metabolismu buněk transport mezi těmito oddíly. Biologické membrány jsou pro metabolity selektivně propustné, protože obsahují specifické transportní proteiny. Transportní procesy se tak významně podílí na „komunikaci“ jednotlivých metabolických drah prostřednictvím jejich metabolitů.

3.7. Transportní procesy

Transport jednodušších i složitějších látek biomembránami, a to jak buněčnou membránou, tak i membránami organel, je důležitý proces z hlediska koordinace biochemických procesů celé buňky. Nejjednodušší mechanismus transportu je prostá difuze. Tímto způsobem prochází biomembránami pouze nejjednodušší látky (zejména voda a rozpuštěné plyny). Transport probíhá vždy ve směru koncentračního spádu, a nevyžaduje proto žádné energetické zdroje.

Mnohem významnější je zprostředkovaný transport. Na něm se podílí různé specifické membránové proteiny, tzv. přenašeče. I v tomto případě jde o transport relativně nízkomolekulárních látek. Zprostředkovaný transport lze, podle energetické potřeby, rozdělit na transport aktivní a pasivní. Pasivní transport probíhá ve směru koncentračního spádu a nemá tedy žádné energetické nároky. Dodatečné zdroje energie

vyžaduje aktivní transport, který je uskutečňován proti koncentračnímu spádu. Existují různé konkrétní procesy zprostředkovaného transportu.

- usnadněná difuze – transportovaná látka se váže na přenašeč, který ji přenesení na druhou stranu membrány, nebo se v membráně vytváří specifické kanálky
- membránové pumpy – transportované látky (zejména ionty) jsou přenášeny membránou, obvykle za spotřeby energie.
- skupinová translokace – transportovaná látka podléhá při transportu chemické přeměně.

Vysokomolekulární látky, případně celé větší části buněk, jsou obvykle transportovány procesy, které jsou spojeny s přestavbou membrán. Pro tyto děje se používají termíny fagocytoza nebo pinocytoza. Transportovaná látka se váže na povrch membrány na specifické receptory. Tím je aktivován mechanismus, který látku obklopí membránou. Vzniklý váček se pak od membrány oddělí a utvoří uvnitř buňky samostatnou organelu - fagocyt.

Konkrétní příklady transportu jsou dále uvedeny u jednotlivých biochemických procesů.

3.8. Regulace enzymové aktivity

Organismus musí být schopen regulovat katalytickou aktivitu svých enzymů tak, aby mohl řádně řídit své metabolické pochody, reagovat na změny prostředí, koordinovat růst a diferenciaci a to vše v určitém pořádku. Jsou dvě možnosti, jak toho dosáhnout :

- Regulací množství přítomného enzymu. (Množství enzymu závisí jak na rychlosti jeho syntézy, tak na rychlosti odbourávání.)
- Regulací enzymové aktivity. (Katalytická aktivita enzymů může být regulována přímo strukturními konformačními změnami proteinové molekuly).

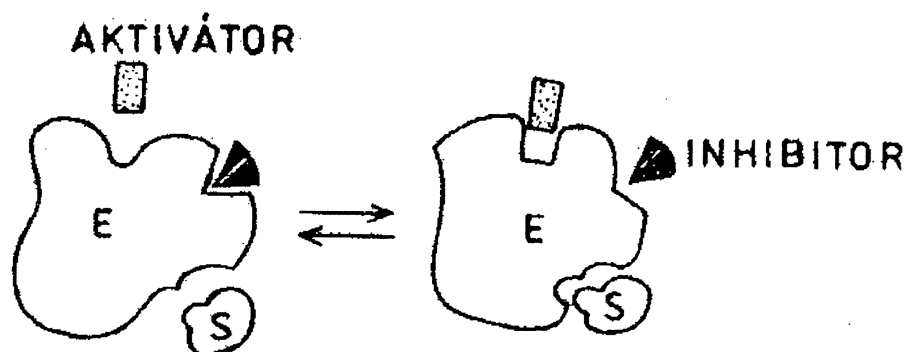
V prvním případě jde v podstatě o nevratné procesy. Syntéza enzymů je vlastně proteosyntéza a je regulována zejména na úrovni transkripce (viz kapitola Transkripce). Syntetizovaný protein je již přímo aktivním enzymem nebo se jedná o tzv. proenzym (zymogen), který ještě není aktivní a pro jeho aktivaci musí proběhnout další úprava proteinu. Nejvýznamnějším procesem takové aktivace enzymu je tzv. limitovaná proteolýza. Při ní je z proteinové molekuly odštěpena přesně určená část a tím dojde k vytvoření potřebné struktury molekuly. Tímto mechanismem jsou aktivovány některé

trávicí enzymy (např. trypsin z trypsinogenu). Procesy jako srážení krve nebo imunochemická funkce komplementu (viz Imunochemická regulace) jsou řízeny celými sledy takových proteolytických reakcí kdy jedna složka aktivuje následnou atd.

Ve druhém případě jde o regulaci již „hotového“ enzymu. Tyto procesy jsou vratné a podle mechanismu aktivace a deaktivace enzymů je lze rozdělit na procesy allosterické a tzv. kovalentní modulaci.

3.8.1. Allosterická regulace

Allosterické enzymy jsou složeny ze subjednotek. Nejjednodušší takový enzym obsahuje jednu katalytickou a jednu regulační subjednotku. Katalytická subjednotka obsahuje aktivní centrum a katalyzuje přeměnu substrátu. Allosterická subjednotka obsahuje tzv. allosterické centrum, na které se může vázat nízkomolekulární látka - allosterický efektor. Po vazbě efektoru dojde ke konformační změně struktury celého enzymu (tedy i oblasti aktivního centra) a enzym je tak aktivován nebo inhibován.



Jako allosterické efektory mohou působit přímo metabolity určité metabolické dráhy. Vzrůst koncentrace vstupního substrátu způsobí aktivaci allosterického enzymu a metabolická dráha se „spustí“. Naproti tomu hromadění koncového produktu působí inhibičně (metabolická dráha se „brzdí“). Jako allosterické efektory mohou působit i meziprodukty jiných metabolických drah. Je tak zajištěna vzájemná koordinace procesů.

3.8.2. Kovalentní modulace

Struktura enzymu může být měněna i kovalentní vazbou určité skupiny atomů na enzymovou molekulu. Konkrétní regulovaný enzym tak opět může být aktivován nebo inhibován. Odštěpením skupiny se opět obnoví původní stav. Protože v tomto případě jde o vznik nebo zánik kovalentních vazeb, je celý děj katalyzován dalšími enzymy. Nejvýznamnější skupinou, která modifikuje vlastnosti enzymu, je skupina fosforečná

(fosforylace a defosforylace), ale mohou to být i jiné skupiny (adenylová, guadinylová). Regulace metabolických drah pomocí uvedených procesů je vzájemně propojena. Vytváří se tak celé složité následné regulační systémy nazývané regulační kaskády. Konkrétní příklady jsou uvedeny u jednotlivých metabolických drah.

4. AEROBNÍ METABOLISMUS

4.1.Citrátový cyklus

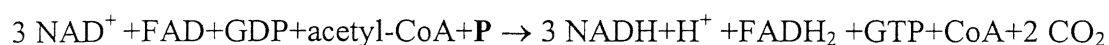
Citrátový cyklus je obvyklou drahou oxidační degradace u eukaryot a prokaryot. U eukaryotních buněk je tento metabolický proces lokalizován v mitochondriích. Citrátový cyklus, který je také znám jako cyklus trikarboxylových kyselin, TCA-cyklus nebo Krebsův cyklus, je jakýmsi centrem celého metabolismu – odpovídá za oxidaci většiny sacharidů, mastných kyselin i aminokyselin a vytváří četné biosyntetické prekurzory.

Citrátový cyklus byl navržen v r. 1937 Hansem Krebsem, ovšem k úplnému objasnění došlo až po objevu koenzymu A Nathanem Kaplanem a Fritzem Lipmannem v r.1945 a určením, že acetyl-CoA kondenzuje s oxalacetátem za vzniku citrátu Severem Ochoaou a Fedorem Lynenem v r. 1951. Bylo také prokázáno, že oxidační dekarboxylace oxoglutarátu na sukcinát se účastní koenzym A.

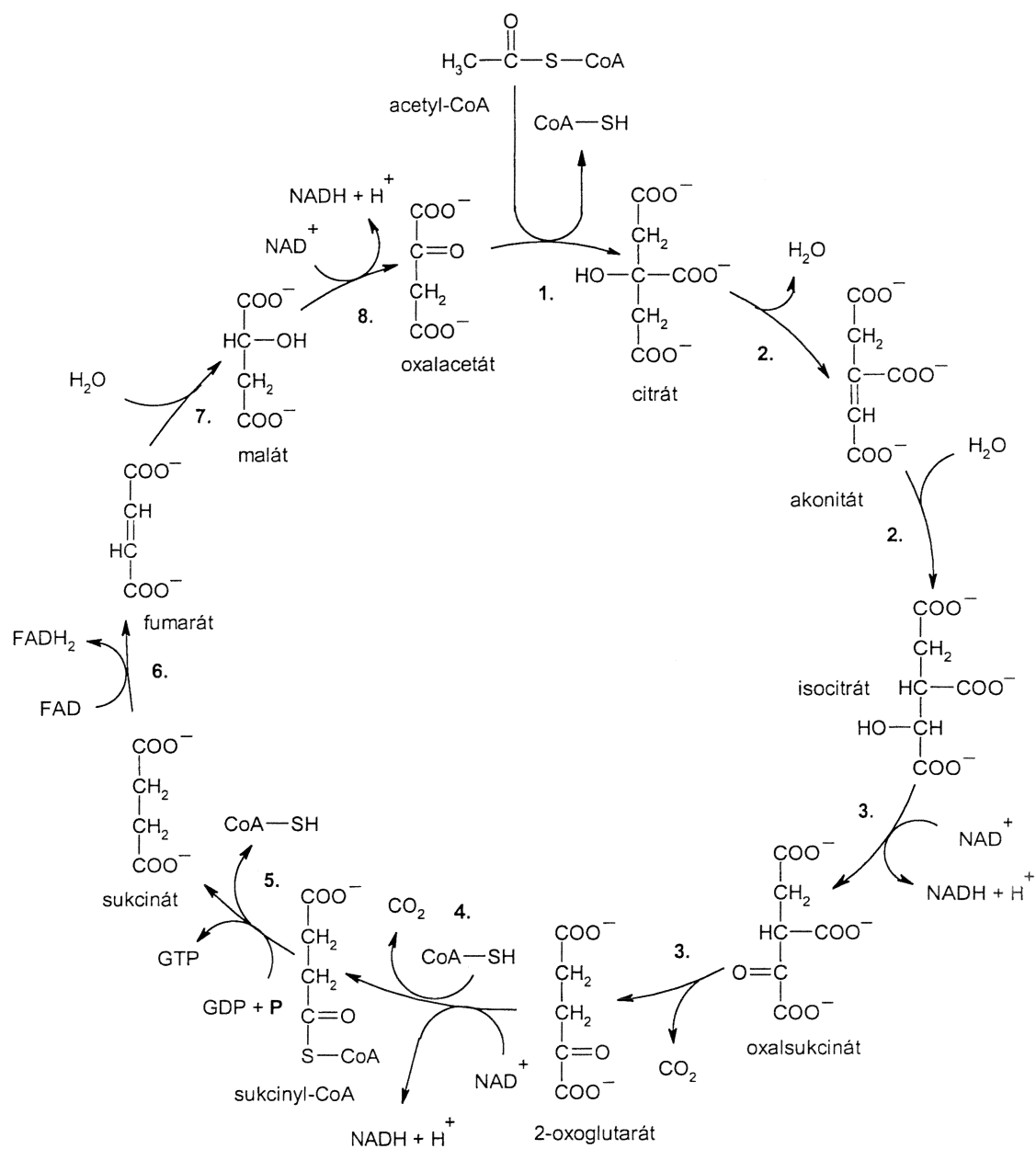
4.1.1. Mechanismus citrátového cyklu

V principu je citrátový cyklus sledem reakcí, při kterých se oxiduje acetylová skupina acetyl-CoA na dvě molekuly CO₂ a uvolněná energie se přitom akumuluje v řadě makroergických sloučenin. Sled reakcí katalyzovaných osmi enzymy je uveden na obrázku 11.

Acetyl skupina je tedy úplně oxidována na CO₂ podle schématu :



Redukované kofaktory NADH+H⁺ a FADH₂ jsou obvykle reoxidovány kyslíkem v oxidační fosforylaci, při které dochází k syntéze ATP.



Obr. 11 Schema citrátového cyklu

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	Citrátsynthasa	kondenzace acetyl-CoA a oxalacetátu za vzniku citrátu
2.	Akonitasa	dehydratace, při níž vznikne cis-akónitát vázaný na enzym a následná hydratace za vzniku isocitrátu

Reakce	Enzym	Poznámka
3.	Isocitrátdehydrogenasa	oxidace isocitrátu na oxalsukcinát a následná dekarboxylace za vzniku 2-oxoglutarátu, při reakci je redukován NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$ a uvolňuje se CO_2 .
4.	2-oxoglutarátdehydrogenasa	multienzymový komplex, který oxidačně dekarboxyluje 2-oxoglutarát na sukcinylkoenzym A, při reakci je redukován NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$ a uvolňuje se CO_2 .
5.	Sukcinyl-CoA syntetasa	přeměna sukcinyl-CoA na sukcinát, tvoří se makroergický GTP z $\text{GDP} + \text{P}$
6.	Sukcinátdehydrogenasa	oxidaci sukcinátu na furamát při současné redukci koenzymu FAD na FADH_2
7.	Furamasa	hydratace furamátu za vzniku malátu
8.	Malátdehydrogenasa	oxidace malátu na oxalacetát, při reakci je redukován NAD^+ na $\text{NADH} + \text{H}^+$

4.1.2. Regulace citrátového cyklu

Citrátový cyklus je regulován třemi poměrně jednoduchými mechanismy

- dostupností substrátu (acetyl – CoA, oxalacetát)
- inhibicí produktem ($\text{NADH} + \text{H}^+$ a ATP)
- kompetitivní inhibicí intermediáty cyklu

Hlavním regulačním prvkem je dostupnost acetyl-CoA. Nejvýznamnějšími zdroji acetyl-CoA je oxidace pyruvátu a β -oxidace vyšších mastných kyselin. Tyto metabolické procesy jsou řízeny zejména prostřednictvím cAMP a Ca^{2+} (u živočichů jsou koncentrace těchto látek řízeny hormonálně) tak, že při zvýšené energetické spotřebě organismu dojde k jejich aktivaci a tím roste tvorba acetyl-CoA. Protože při zvýšené energetické spotřebě klesá koncentrace ATP a $\text{NADH} + \text{H}^+$ je aktivován i citrátový cyklus a tyto makroergické látky jsou intenzivně doplňovány. Pokud je ovšem energetická potřeba organismu nízká a dodávka sacharidů potravou vysoká je sice produkován acetyl-CoA, ale citrátový cyklus je blokován (stejně i β -oxidace mastných kyselin). Je ale stimulována syntéza mastných kyselin, což vede k tvorbě lipidů.

4.1.3. Amfibolická povaha citrátového cyklu

Citrátový cyklus je katabolický proces. Intermediáty cyklu jsou vyžadovány jen v takových množstvích, aby zachovaly degradační funkci cyklu. Mnoho biosyntetických drah ale tyto intermediáty také využívá jako vstupní substráty (anabolismus). Z tohoto hlediska je cyklus amfibolický (anabolický i katabolický).

Dráhy využívající intermediáty citrátového cyklu jsou zejména

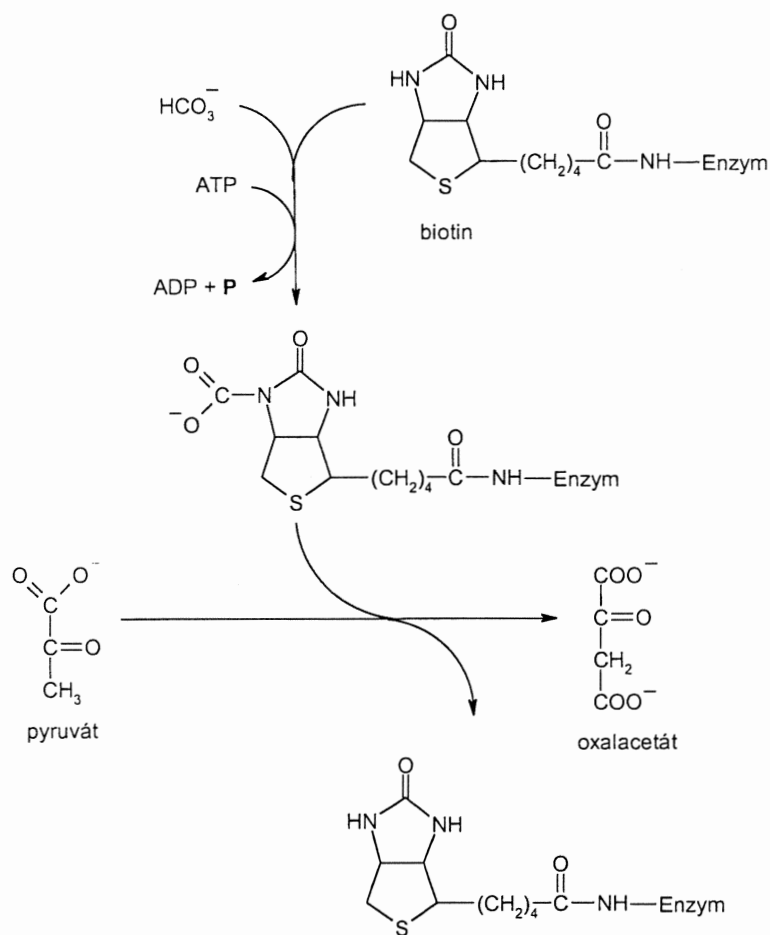
- Biosyntéza glukosy (glukoneogeneze) odehrávající se v cytosolu, která využívá malát transportovaný mitochondriální membránou.
- Biosyntéza aminokyselin, kdy jsou využívány zejména 2-oxoglutarát (syntéza glutamátu) nebo oxalacetát a fumarát (syntéza aspartátu).
- Syntéza porfyrinu, která využívá sukcinyl-CoA.

4.1.4. Anaplerotické reakce

Vzhledem k úbytku intermediátů cyklu je nutné je opět nahradit. K tomu dochází v tzv. anaplerotických (doplňujících) reakcích. Hlavní reakce tohoto typu je katalyzována pyruvátkarboxylasou a produkuje oxalacetát. Pyruvátkarboxylasová reakce probíhá ve dvou krocích (Obr. 12):

1. Biotin je karboxylován hydrogenkarbonátovým iontem v reakci, která využívá současně probíhající hydrolýzu ATP na ADP a **P**. Výsledná karboxylová skupina je „aktivovaná“ a může být tedy přenesena bez dalšího dodání volné energie.
2. Aktivovaná karboxylová skupina je přenesena z karboxybiotinu na pyruvát za vzniku oxalacetátu.

Pyruvátkarboxylasa je allostericky aktivována acetyl-CoA. Enzym je bez navázaného acetyl-CoA zcela neaktivní. Každý pokles rychlosti cyklu, způsobený nedostatkem oxalacetátu nebo jiného intermediátu, vyvolá nadbytek acetyl-CoA. Tím je aktivována pyruvátkarboxylasa, která doplní oxalacetát, čímž se rychlost cyklu zvýší. Je-li rychlost cyklu bržděna na jiném místě (např. vysokou koncentrací $\text{NADH} + \text{H}^+$), pak zvýšená hladina oxalacetátu cyklus neaktivuje. Přebytek oxalacetátu se však dostane do rovnováhy s malátem, který je transportován z mitochondrie a použit v glukoneogenezi. V degradačních drahách vznikají i další intermediáty citrátového cyklu, např. sukcinyl-CoA (oxidace mastných kyselin s lichým počtem atomů uhlíku nebo štěpení isoleucinu) a 2-oxoglutarát (transaminace a deaminace glutamátu).



Obr. 12 Pyruvátkarboxylasová reakce

4.2. Oxidační fosforylace

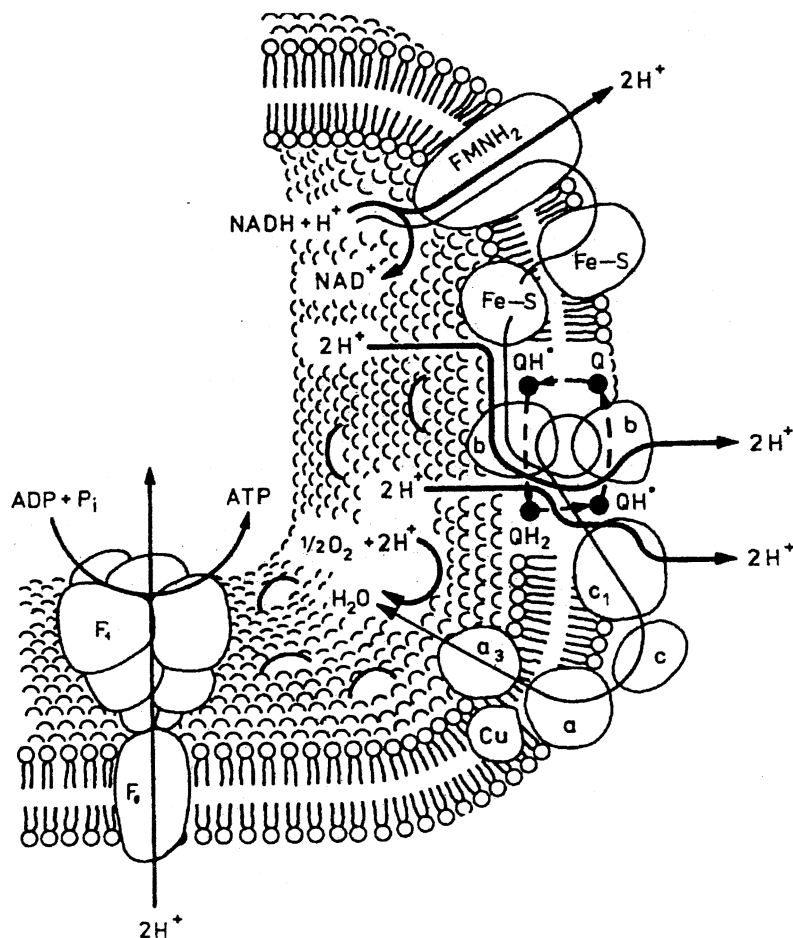
Oxidační (aerobní) fosforylace slouží zejména k syntéze ATP. Jako zdroj energie jsou zde využívány redukované kofaktory ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2), které vznikají v řadě katabolických drah, zejména v citrátovém cyklu a při β -oxidaci mastných kyselin.

Oxidační fosforylaci lze rozdělit do dvou dílčích procesů :

- terminální oxidace (také nazývaná dýchací řetězec)
- vlastní fosforylace

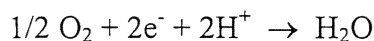
4.2.1. Terminální oxidace

Proces uskutečňuje komplex enzymů, zabudovaný ve vnitřní membráně mitochondrií. Schematicky je znázorněn na obrázku 13.



Obr. 13 Schema oxidační fosforylace

Kofaktor $\text{NADH} + \text{H}^+$ je oxidován oxidoreduktasou s kofaktorem FMN. Vzniklý FMNH_2 je následně oxidován ferredoxiny (Fe-S), kde je akceptorem elektronů Fe^{3+} . Ionty H^+ se uvolní na vnější stranu membrány. Elektrony z ferredoxinů jsou přeneseny na cytochromy b. Přenos se uskutečňuje prostřednictvím koenzymu Q. Chinonové uskupení koenzymu Q se přitom mění na hydrochinonové. Potřebné H^+ ionty jsou odebírány na vnitřní straně membrány a následně uvolněny na vnější straně. Elektrony jsou dále převáděny řetězcem cytochromů c_1 a c na cytochromoxidasu (komplex cytochromů $a+a_3$). Cytochromoxidasa katalyzuje redukci kyslíku podle schematu



Při transportu elektronů komplexem enzymů je tedy získaná energie využita k přenosu H^+ iontů membránou. Tím dojde na jedné straně membrány ke zvýšení jejich koncentrace a chemická energie $\text{NADH} + \text{H}^+$ a FADH_2 je přeměněna na

elektrochemickou energii koncentračního spádu H^+ . Konečným akceptorem elektronů je kyslík.

Celkově dojde při oxidaci $NADH + H^+$ na NAD^+ k transportu $3 \times 2 H^+$ iontů přes membránu a při oxidaci $FADH_2$ na FAD pouze $2 \times 2 H^+$ (oxidace $FADH_2$ se uskutečňuje až v oblasti působení koenzymu Q).

4.2.2. Fosforylace

Elektrochemická energie koncentračního spádu H^+ iontů na membráně může být buňkou využita k různým účelům. Nejvýznamnější je tvorba ATP. Tuto reakci uskutečňuje ATPasový komplex F_0, F_1 (ATP-synthasa), který je lokalizován v biomembráně v blízkosti systému dýchacího řetězce (Obr. 13).

Komplex ATPasy se skládá ze dvou částí, membránové části F_0 a vnější části F_1 . Protein vytváří v membráně kanálek, kterým mohou procházet H^+ ionty. Při průchodu těchto iontů dochází patrně ke konformačním změnám jednotky F_1 a tak dojde k syntéze ATP podle schematu



K syntéze jedné molekuly ATP jsou třeba $2H^+$ ionty. To znamená, že oxidace 1 molekuly $NADH + H^+$ postačí na syntézu 3 molekul ATP, oxidace 1 molekuly $FADH_2$ na 2 molekuly ATP.

Protože procesy terminální oxidace a fosforylace jsou spojeny transportem H^+ iontů membránou, může dojít k rozpojení oxidační fosforylace. V podstatě jde o zvýšení propustnosti biomembrány pro H^+ ionty. Energie koncentračního spádu H^+ iontu se v takovém případě uvolní ve formě tepla. Teplokrevní živočichové uskutečňují tento proces v tzv. hnědé tukové tkáni. Zvýšení propustnosti mitochondriální membrány vyvolávají volné karboxylové kyseliny a jejich uvolňování v membráně je řízeno hormonálně.

Propustnost biomembrán pro H^+ ionty mohou vyvolat i jiné látky. Tyto tzv. rozpojovače oxidační fosforylace pak znemožní tvorbu ATP. Působí tak např. některé herbicidy (dinitro-o-kresol).

5. METABOLISMUS SACHARIDŮ

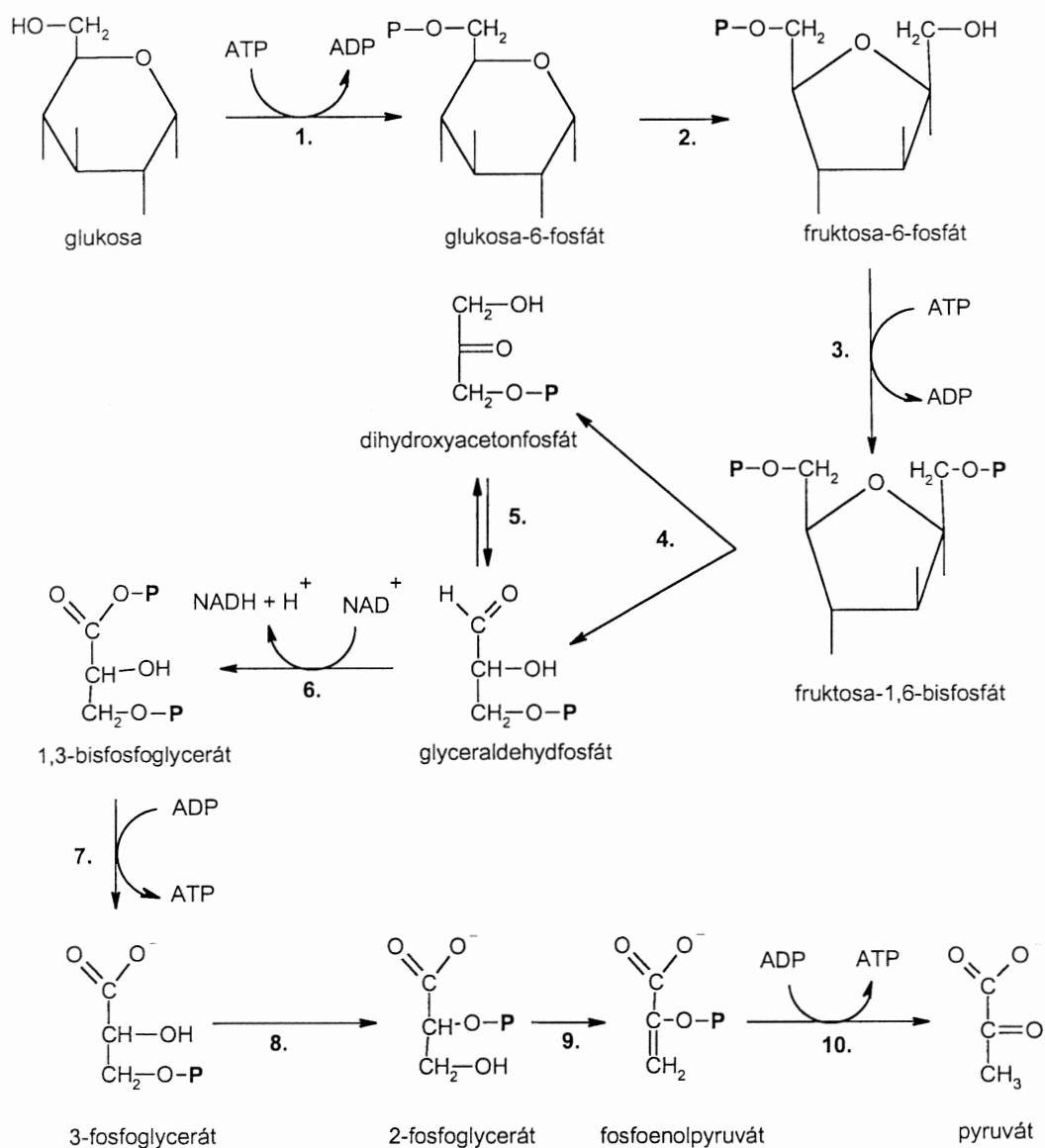
5.1. Glykolytická dráha

Glykolýza je jeden z nejvýznamějších katabolických procesů v buňkách. Některé buňky (např. mozkové) dokáží získávat energii pouze z glukosy a to právě tímto procesem.

Využití kvašení glukosy na ethanol a oxid uhličitý, zprostředkovaného kvasinkami, je známo již tisíce let (např. při přípravě vína a kynutého pečiva). Vědecké zkoumání mechanismu glykolýzy započalo teprve v druhé polovině devatenáctého století. V letech 1854 – 1864 zjistil L. Pasteur, že kvašení je způsobováno mikroorganismy a v r. 1897 Buchner dokázal, že tento pochod může probíhat i v bezbuněčném extraktu z kvasinek. V roce 1940 byla glykolytická dráha zcela objasněna. Podle tří z vědců (G. Embden, O. Meyerhof a J. Parnas), kteří se o celkové objasnění nejvíce zasloužili, obdržela glykolýza svůj druhý název Embden-Meyerhof-Parnasova dráha. Významným způsobem se o objasnění této dráhy zasloužili rovněž manželé C. a G. Coriovi, C. Neuberg, R. Robinson a O. Warburg.

Glukosa jako vstupní substrát glykolýzy je produktem rozkladu vyšších polysacharidů nebo syntézy z nesacharidových zdrojů (glukoneogeneze). Do glykolýzy mohou ovšem vstupovat i jiné hexosy (např. fruktosa nebo galaktosa). Do většiny buněk glukosa vstupuje prostřednictvím specifického přenašeče. Glykolytické enzymy jsou lokalizovány v cytosolu, kde mohou být volně asociovány s buněčnými strukturami (např. membránami), a zjevně nevytvářejí žádné navzájem organizované komplexy. Glykolytickou dráhou je přeměněna glukosa na pyruvát a uvolněná energie je využita k syntéze ATP. Jednotlivé reakce glykolýzy katalyzuje deset enzymů. Metabolické schéma je uvedeno na obrázku 14.

Na počátku glykolýzy dochází ke spotřebě ATP na syntézu fosforylovaných sloučenin (reakce 1 a 3), v pozdějších fázích je ATP opět resyntetizován (reakce 7 a 10). Celkový zisk glykolýzy je tedy 2 moly ATP na 1 mol glukosy (v první fázi jsou 2 ATP spotřebovány, ve druhé fázi 4 ATP vznikají).



Obr. 14 Schema glykolýzy

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	hexokinasa, glukokinasa	aktivace glukosy za spotřeby ATP
2.	fosfogluoizomerasa	
3.	fosfofruktokinasa	fosforylace fruktosa-6-fosfátu za spotřeby další molekuly ATP
4.	aldolasa A	
5.	triosafosfátisomerasa	
6.	glyceraldehydfosfátdehydrogenasa	oxidační reakce za současné redukce NAD ⁺ na NADH + H ⁺

Reakce	Enzym	Poznámka
7.	fosfoglycerátkinasa	přenos fosfátu za vzniku ATP
8.	fosfoglycerátmutasa	
9.	enolasa	
10.	pyruvátkinasa	přenos fosfátu za vzniku další molekuly ATP

5.1.1. Regulace glykolýzy

Tři reakce glykolýzy, katalyzované hexokinasou, fosfofruktokinasou a pyruvátkinasou, probíhají za fyziologických podmínek s velkou změnou volné energie. Tyto nerovnovážné reakce jsou regulační body dráhy. Ostatní reakce jsou téměř ve stavu rovnováhy. Uvedené tři enzymy jsou regulovány allosterickým mechanismem působením celé řady efektorů. Hlavním regulačním stupněm glykolýzy je reakce katalyzovaná fosfofruktokinasou a nejúčinnějším efektozem je fruktosa-2,6-bisfosfát. Protože tato regulace těsně souvisí s „obrácením“ glykolytické dráhy (glukoneogeneze) bude mechanismus probrán až v kapitole Glukoneogeneze v souvislosti s celkovou regulací metabolismu glukosy.

5.2. Přeměna pyruvátu

Primárním oxidačním činidlem při glykolýze je NAD^+ . Aby jím bylo možno dráhu zásobovat, musí být vznikající $\text{NADH} + \text{H}^+$ nepřetržitě reoxidován. Pro přeměny pyruvátu je rozhodující zda probíhají za anaerobních nebo aerobních podmínek.

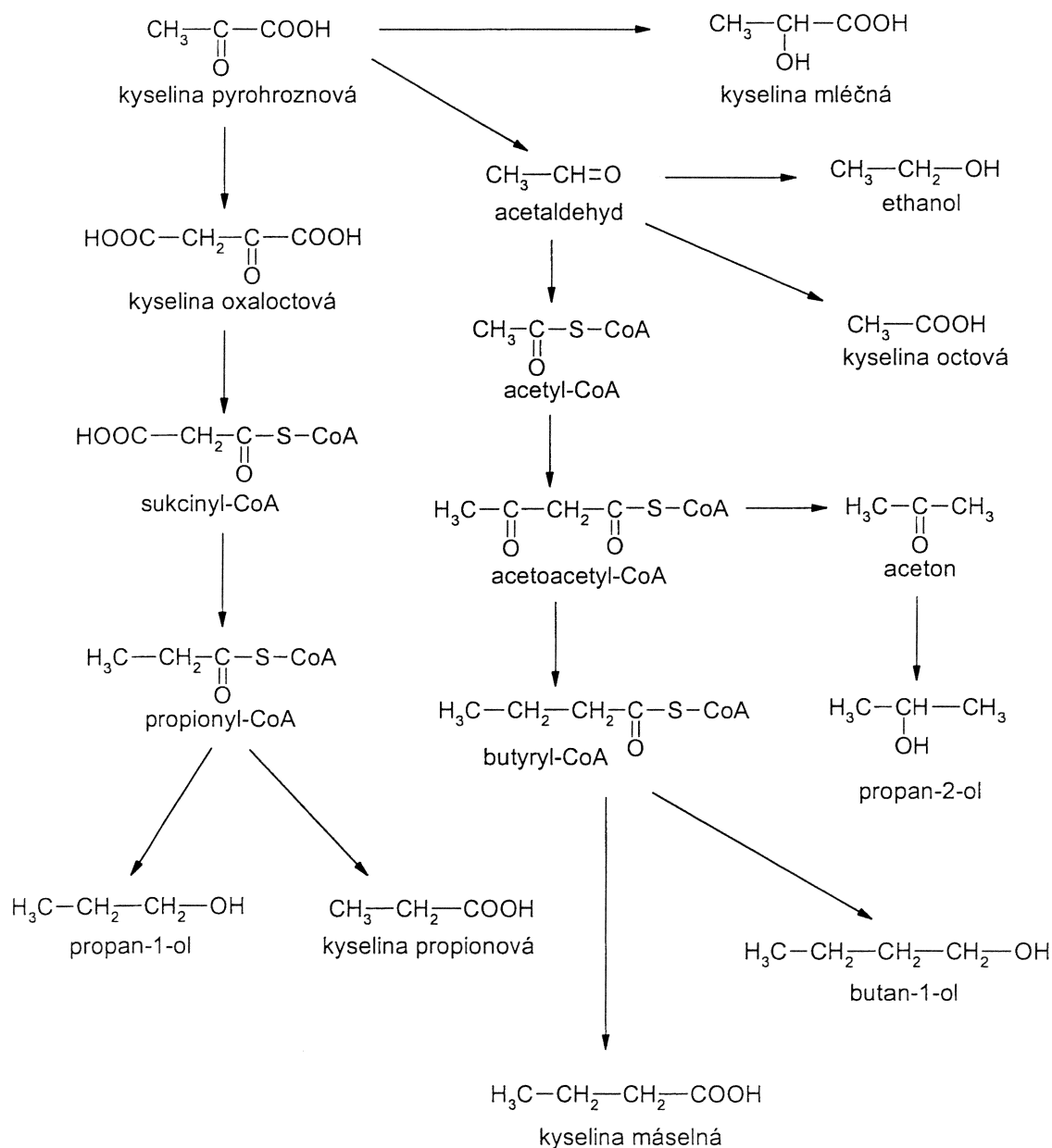
Glykolýza je využívána pro rychlou produkci ATP. Za anaerobních podmínek poskytuje glukosa 2 moly ATP na 1 mol glukosy, zatímco výtěžek oxidační fosforylace je 38 molů ATP na 1 mol glukosy. Rychlost tvorby ATP za anaerobních podmínek může být ovšem být až stonásobně vyšší než při oxidační fosforylaci. V důsledku toho, pokud tkáň (sval) spotřebovává ATP rychle, regeneruje jej prakticky výhradně anaerobní glykolýzou.

5.2.1. Anaerobní přeměny pyruvátu

Anaerobní přeměna pyruvátu je běžně označována jako kvašení. Nejvýznamnější zástupci kvasných (fermentačních) procesů jsou mléčné a ethanolové kvašení. Mimoto

existuje i řada dalších kvasných procesů (např. butanolové, acetonové atd.). V současnosti jsou jako kvašení označovány i některé procesy aerobní (např. máselné, propionové apod.)

Zjednodušené schema různých kvasných procesů je uvedeno v obrázku 15.



Obr. 15 Obecné schema fermentace

Mléčné kvašení

Ve svaly, zejména v době jeho zvýšené aktivity kdy je velká spotřeba ATP a současně je spotřebován kyslík, je redukován pyruvát na laktát v reakci katalyzované

laktátdehydrogenasou za spotřeby $\text{NADH} + \text{H}^+$. Vznikající laktát je opět v játrech přeměňován na glukosu. V podstatě stejným mechanismem probíhá fermentace v mléčných bakteriích. Vznikající laktát je bakterií vylučován do okolního prostředí. Protože kyselina mléčná patří mezi relativně silnější organické kyseliny, dochází tak k značnému snížení pH prostředí. Toho se využívá již od nepamětných dob ke konzervaci krmiv a potravin (siláž, kysané zelí, mléčně kvašené okurky).

Alkoholové kvašení

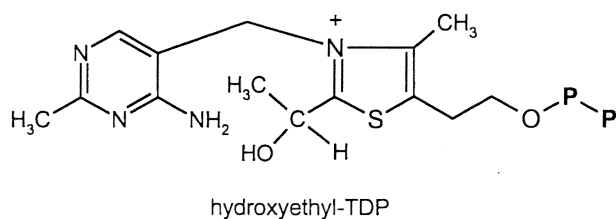
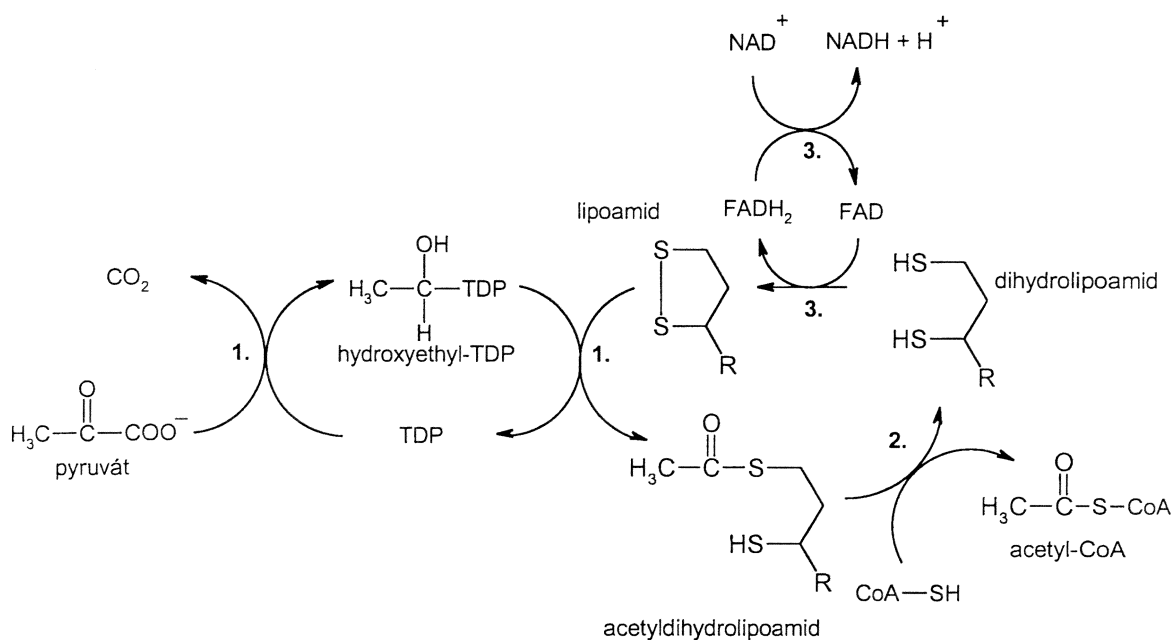
U kvasinek je za anaerobních podmínek regenerován NAD^+ přeměnou pyruvátu na ethanol a oxid uhličitý. Kvasinky produkují ethanol a oxid uhličitý dvěma reakcemi. První reakcí je dekarboxylace pyruvátu za vzniku acetaldehydu a CO_2 , kterou katalyzuje pyruvátdekarboxylasa. Tento enzym není přítomen u živočichů. Acetaldehyd vytvořený dekarboxylací pyruvátu je redukován $\text{NADH} + \text{H}^+$ na ethanol v reakci, kterou katalyzuje alkoholdehydrogenasa.

5.2.2. Aerobní přeměna pyruvátu

Za aerobních podmínek je $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidován v mitochondriích v dýchacím řetězci. Pyruvát proto může být podroben další oxidaci. Tzv. oxidační dekarboxylací vzniká z pyruvátu acetyl-CoA. Reakci katalyzuje multienzymový komplex pyruvátdehydrogenasy. Tento komplex se skládá z několika kopií nejméně tří různých enzymů: pyruvátdehydrogenasy, dihydrolipoylacetyltransferasy a dihydrolipoyldehydrogenasy. Ty dohromady katalyzují oxidační dekarboxylaci pyruvátu na acetyl-CoA v několikastupňové reakci, které se zúčastní jako koenzymy TDP (thiamindifosfát), FAD, NAD^+ , kys.lipoová (lipoamid) a koenzym A. Celkové schema oxidační dekarboxylace je uvedeno na obrázku 16.

Regulace pyruvátdehydrogenasy

Multienzymový komplex pyruvátdehydrogenasy reguluje vstup acetyl skupin, dodávaných z cukerných zdrojů, do citrátového cyklu. Dekarboxylace pyruvátu enzymem E_1 je ireverzibilní, a protože savci nemají jinou dráhu pro syntézu acetyl-CoA z pyruvátu, má dokonalá regulace této reakce zcela zásadní význam.



Obr. 16 Oxidační dekarboxylace pyruvátu

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	Pyruvátdehydrogenasa (E_1)	dekarboxyluje pyruvát přes hydroxyethyl-TDP a dále katalyzuje oxidaci hydroxyethyl-TDP lipoamidem (vázaným na E_2) za vzniku acetyldihydrolipoamidu
2.	dihydrolipoylacetyltransferasy (E_2)	přenos acetyl skupiny na CoA za vzniku acetyl-CoA a dihydrolipoamidu
3.	dihydrolipoyldehydrogenasy (E_3)	oxidace dihydrolipoamidu za současné redukce FAD a následná reoxidace vzniklého FADH_2 působením NAD^+ za vzniku $\text{NADH} + \text{H}^+$

Všeobecně je celý proces řízen inhibicí produktem. $\text{NADH} + \text{H}^+$ a acetyl-CoA soutěží s NAD^+ a CoA o vazebná místa příslušných enzymů. Vysoký poměr $\text{NADH} + \text{H}^+$ k NAD^+ a acetyl-CoA ke CoA zabraňuje uvolnění produktů a snižuje tak rychlost dekarboxylace pyruvátu.

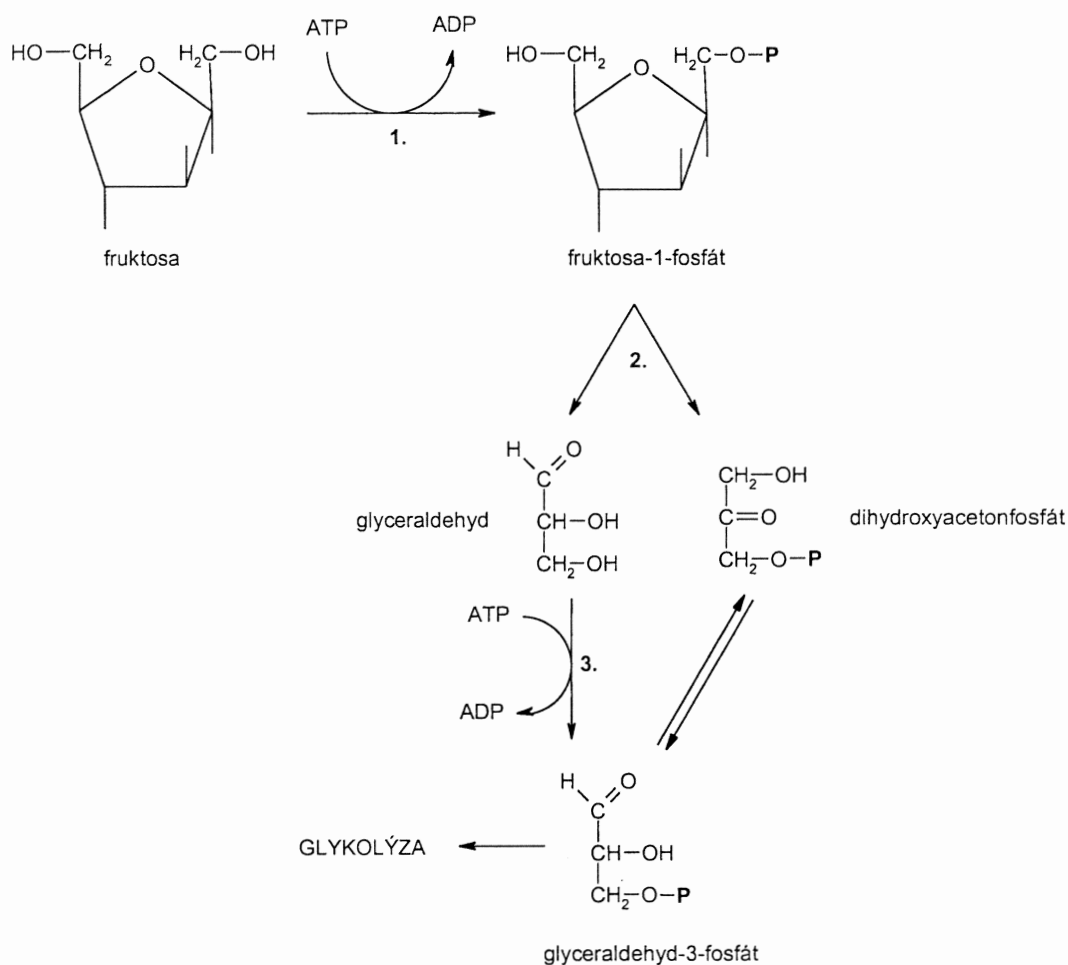
V enzymových komplexech eukaryot je hlavním procesem regulace kovalentní modulace fosforylací a defosforylací pyruvátdehydrogenasové podjednotky. Příslušné komplexy obsahují pyruvátdehydrogenasakinasu a pyruvátdehydrogenasafosfatasu. Kinasa inaktivuje fosforylací pyruvátdehydrogenasu a k reaktivaci komplexu dojde defosforylací působením fosfatasy. Pyruvátdehydrogenasakinasa je aktivována allostericky $\text{NADH} + \text{H}^+$ a acetyl-CoA a inhibována Ca^{2+} , pyruvátdehydrogenasafosfatasa je aktivována Ca^{2+} . Komplex pyruvátdehydrogenasy regulují i další aktivátory a inhibitory, ale na rozdíl od regulace metabolismu glykogenu, není systém ovlivňován cAMP.

5.2.3. Metabolismus dalších hexos

Vedle glukosy, která představuje primární koncový produkt štěpení škrobu a glykogenu, jsou důležitými zdroji energie i další tři hexosy : fruktosa, získávaná z ovoce a hydrolýzou sacharosy, galaktosa, vznikající hydrolýzou laktosy a mannosy, vznikající trávením polysacharidů a glykoproteinů. Tyto monosacharidy se dostávají do krevního oběhu a jeho prostřednictvím do různých tkání. Metabolismus fruktosy, galaktosy a mannosy probíhá přes jejich přeměnu na glykolytické intermediáty, které jsou poté degradovány stejně jako intermediáty vzniklé z glukosy.

Fruktosa

Fruktosa je hlavním energetickým zdrojem při dietě, která obsahuje velká množství sacharosy. Metabolismus fruktosy ve svaly se liší jen málo od metabolismu glukosy. Hexokinasa , přeměňující glukosu při vstupu do svalové buňky na glukosa-6-fosfát, také fosforyluje fruktosu na fruktosa-6-fosfát. Vstup fruktosy do glykolytické dráhy tedy obsahuje pouze jeden reakční stupeň. Mnohem významější je metabolismus fruktosy v jaterních buňkách. Ty obsahují jen málo hexokinasy a hlavní roli zde má glukokinasa, která však fosforyluje pouze glukosu. Metabolismus fruktosy v játrech vedoucí ke glykolytickým meziproduktům je znázorněn na obrázku 17.

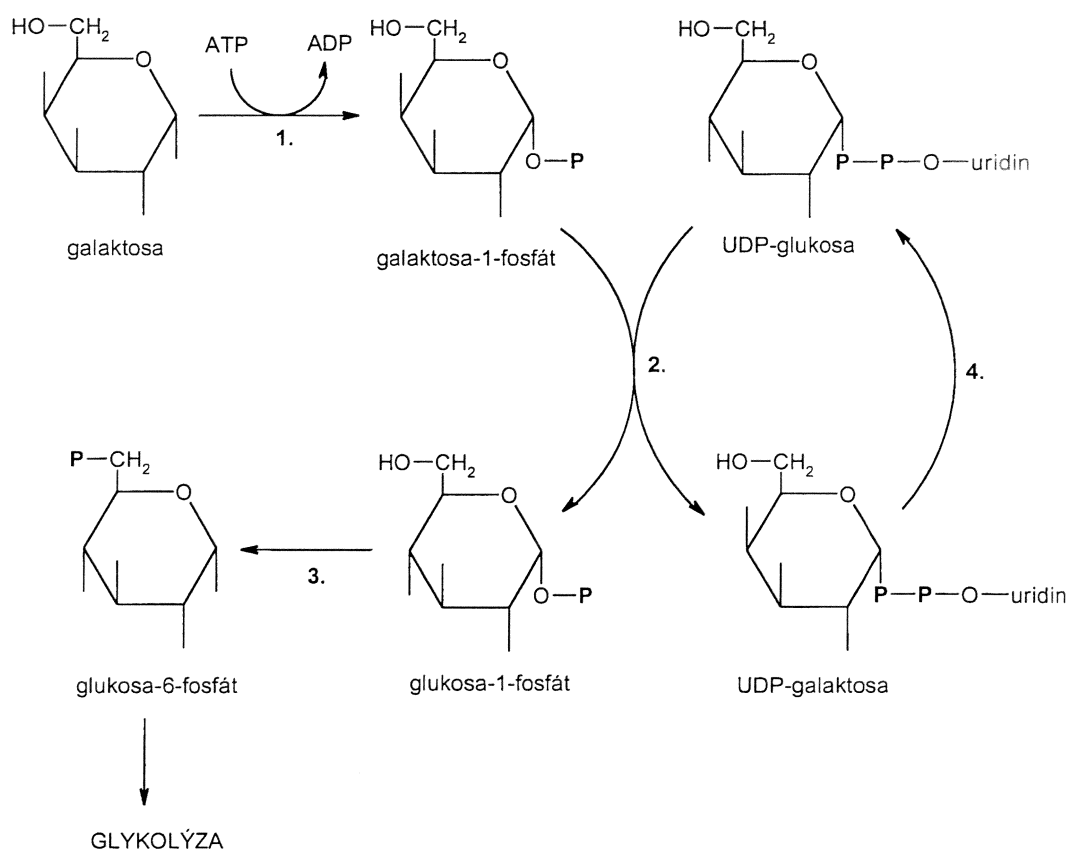


Obr. 17 Metabolismus fruktosy

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	Fruktokinasa	
2.	Aldolasa B	je odlišná od typu A přítomného ve svalech
3.	glyceraldehydkinasa	

Galaktosa

Galaktosa a glukosa jsou epimery, které se liší pouze konfigurací na C₄. Glykolytické enzymy jsou specifické a nemohou rozpoznat galaktosovou konfiguraci. Proto musí, před vstupem do glykolytické dráhy, podstoupit galaktosa epimeraci. Dráha přeměny galaktosy na glykolytický intermediát je uvedena na obrázku 18.



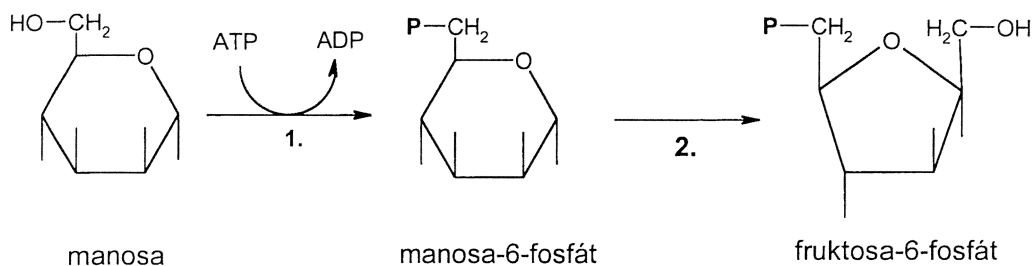
Obr. 18 Metabolismus galaktosy

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	galaktokinasa	
2.	galaktosafosfáturidylyltransferasa	
3.	fosfoglukomutasa	
4.	UDP-galaktosaepimerasa	vzniklá UDP-glukosa opět vstupuje do reakce 2

Mannosa

Mannosa je isomerem glukosy a liší se konfigurací na druhém uhlíku. Mannosa vstupuje do glykolytické dráhy po přeměně na fruktosa-6-fosfát reakcí, která probíhá ve dvou stupních.

První reakci katalyzuje již známá hexokinasa (1.). Vzniklý manosa-6-fosfát je pak přeměňován fosfomannosaisomerasou (2.).



5.3. Glukoneogeneze

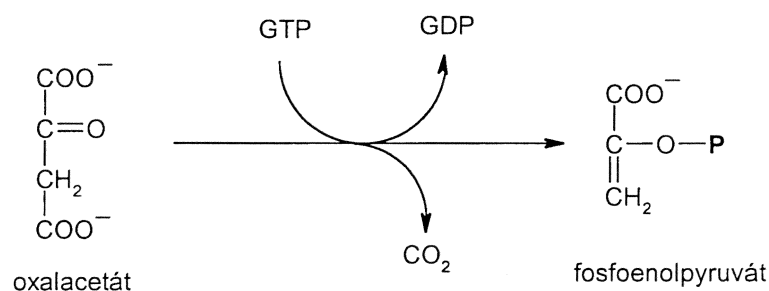
Glukosa má centrální úlohu v metabolismu jako energetický zdroj a jako prekursor strukturních sacharidů a jiných biomolekul. Buňky mozku a červené krvinky jsou téměř výhradně závislé na glukose jako zdroji energie. Kapacita jater na uskladnění glykogenu postačuje k zásobování mozku glukosou asi na půlden. Při hladovění proto musí být většina glukosy doplněna glukoneogenezí (doslova nová syntéza glukosy), tj. biosyntézou glukosy z necukerných prekursorů.

Glukoneogeneze probíhá v játrech a v menším rozsahu v ledvinách. Necukerné prekursory, které mohou vstupovat do glukoneogeneze, musí být nejprve převedeny na oxalacetát, výchozí látku celé dráhy. Takovými prekursory je většina aminokyselin, kyselina mléčná, kyselina pyrohroznová, glycerol a jiné. Naproti tomu nemohou u živočichů sloužit jako prekursory glukosy mastné kyseliny, protože většina je zcela degradována na acetyl-CoA, který nejsou živočichové schopni převádět na oxalacetát (u rostlin produkuje tzv. glyoxylátový cyklus oxalacetát z acetyl-CoA, takže lipidy mohou u nich sloužit jako zdroj pro syntézu glukosy).

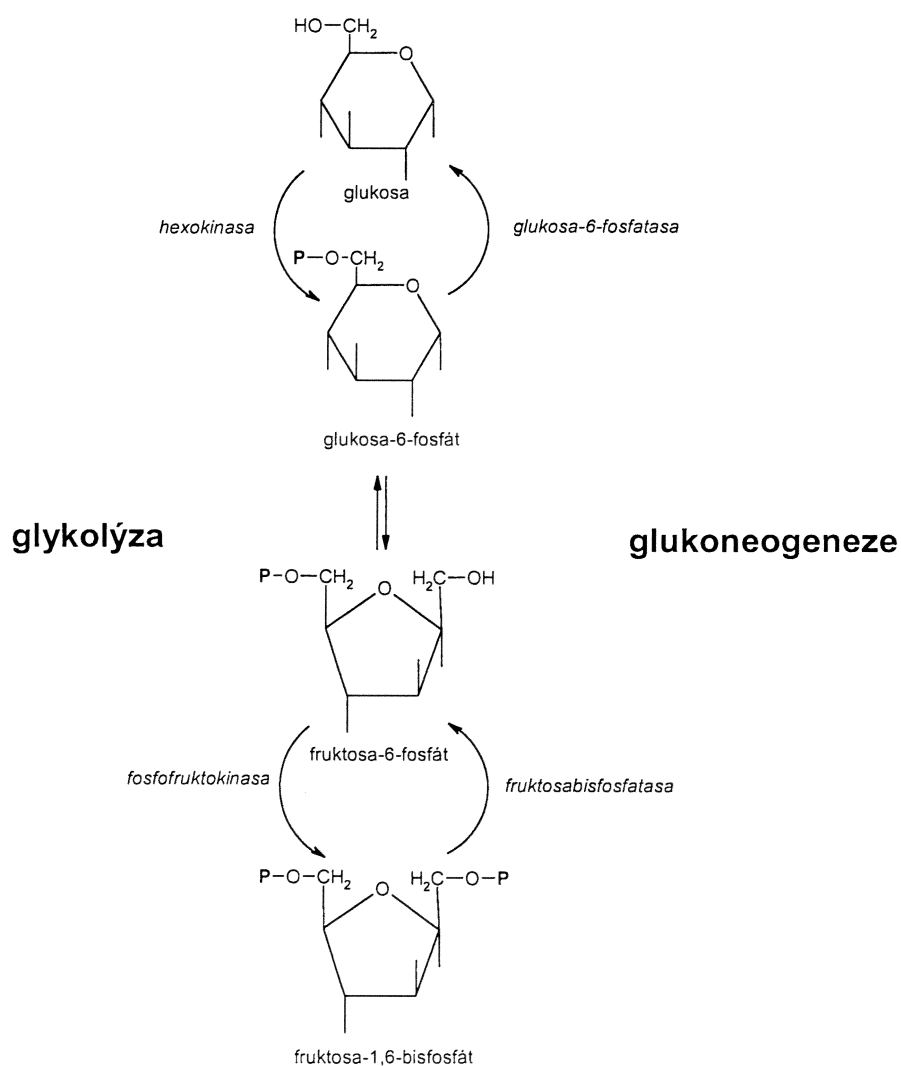
5.3.1. Metabolická dráha glukoneogeneze

Glukoneogeneze využívá většinu glykolytických enzymů. Pouze tři z těchto enzymů, hexokinasa, fosfofruktokinasa a pyruvátkinasa, nemohou katalyzovat zpětné reakce a musí být proto nahrazeny jinými enzymy, které zpětné reakce umožní.

Pyruvát je převeden na oxalacetát pyruvátkarboxylasou. Jde vlastně o anaplerotickou reakci popsanou v kapitole Citrátový cyklus. Je-li citrátový cyklus inhibován (vlivem ATP a $\text{NADH} + \text{H}^+$), vstupuje oxalacetát do glukoneogeneze. Oxalacetát je energeticky bohatý meziprodukt, jehož exergonická dekarboxylace poskytuje volnou energii, nezbytnou pro syntézu fosfoenolpyruvátu. Oxalacetát převádí na fosfoenolpyruvát fosfoenolpyruvátkarboxykinasa za využití GTP.



Glykolytické reakce katalyzované fosfofruktokinásou a hexokinásou jsou obcházeny hydrolytickými reakcemi, které katalyzují enzymy fruktosa-1,6-bisfosfatasa a glukosa-6-fosfatasa. Glukosa-6-fosfatasa je přítomna pouze v játrech a ledvinách, které jsou zdrojem glukosy pro ostatní tkáně. Reakční schema pro tyto dva kroky glukoneogeneze je uvedeno na obrázku 19.



Obr. 19 Hlavní regulační stupně glukoneogeneze

5.4. Regulace glukoneogeneze a glykolýzy

Glykolýza i glukoneogeneze jsou navzájem regulovány podle potřeb organismu. Ve stavu nasycenosti (kdy je vysoká hladina krevní glukosy) je v játrech syntetizován glykogen a glykolytická dráha i pyruvátdehydrogenasa jsou aktivovány. Glukosa je pak rozkládána na acetyl-CoA pro biosyntézu mastných kyselin a tuku. Při hladovění však játra udržují hladinu glukosy v krvi stimulací štěpení glykogenu i zvratem glykolýzy ve směru glukoneogeneze.

Glykolýza a glukoneogeneze jsou regulovány allostericky i kovalentními modifikacemi. Rychlost a směr těchto dvou drah jsou řízeny v reakcích, katalyzovaných systémy hexokinasa/glukosa-6-fosfatasa, fosfofruktokinasa/fruktosa-1,6-bisfosfatasa a pyruvátkinasa/pyruvátkarboxylasa-fosfoenolpyruvátkarboxykinasa.

Hlavním regulačním stupněm je systém fosfofruktokinasa/fruktosa-1,6-bisfosfatasa, který je řízen allostericky fruktosa-2,6-bisfosfátem, který aktivuje fosfofruktokinasu a inhibuje fruktosa-1,6-bisfosfatasu. Tento allosterický efektor je syntetizován a odbouráván samostatnou dvojicí enzymů: fosfofruktokinasa-2 a fruktosabisfosfatasa-2. Hlavním regulačním mechanismem, který je ovlivňován cAMP (hladina cAMP je řízena hormonálně), je pro tyto enzymy fosforylace (kovalentní modulace). Fosforylace aktivuje fruktosabisfosfatasu-2 a současně inhibuje fosfofruktokinasu-2. Tyto reakce tak ovlivňují koncentraci fruktosa-2,6-bisfosfátu a určují, zda bude probíhat přednostně glykolýza nebo glukoneogeneze.

5.5. Pentosový cyklus

Mimo hlavní makroergickou látku ATP potřebují buňky pro biosyntézu ještě další zdroj „redukční“ energie a tou je $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Redukce NADP^+ na $\text{NADPH} + \text{H}^+$ probíhá v metabolické dráze zvané pentosový cyklus, ale také pentosomonofosfátový zkrat, pentosofosfátový cyklus nebo fosfoglukonátová dráha.

Navzdory jejich blízké chemické příbuznosti nejsou $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ metabolicky zaměnitelné. Zatímco $\text{NADH} + \text{H}^+$ se využívá zejména pro syntézu ATP (oxidační fosforylace), $\text{NADPH} + \text{H}^+$ slouží hlavně pro redukční reakce biosyntézy. Na enzymy pentosového cyklu jsou bohaté zejména buňky jater, tukové tkáně, mléčné žlázy a kůry nadledvin. To souvisí s intenzivní syntézou lipidů (vyšších mastných kyselin) a dalších lipidních látek (cholesterol a odvozené sloučeniny), která v buňkách

těchto orgánů probíhá. V jaterních buňkách souvisí vysoká spotřeba $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zejména s přeměnami různých cizorodých (xenobiotických) látek.

První informace o existenci pentosové dráhy souvisí s objevem NADP^+ Otto Wartburgem ve 30. letech minulého století. Vlastní pentosový cyklus objasnili v 50. letech Frank Dickens, Bernard Horecker, Fritz Lipmann a Efraim Racker.

5.5.1. Průběh pentosového cyklu

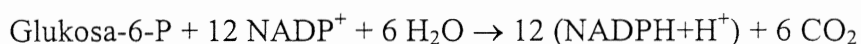
Celkové schema pentosového cyklu je uvedeno na obrázku 20. Celou dráhu lze rozdělit na dvě hlavní fáze :

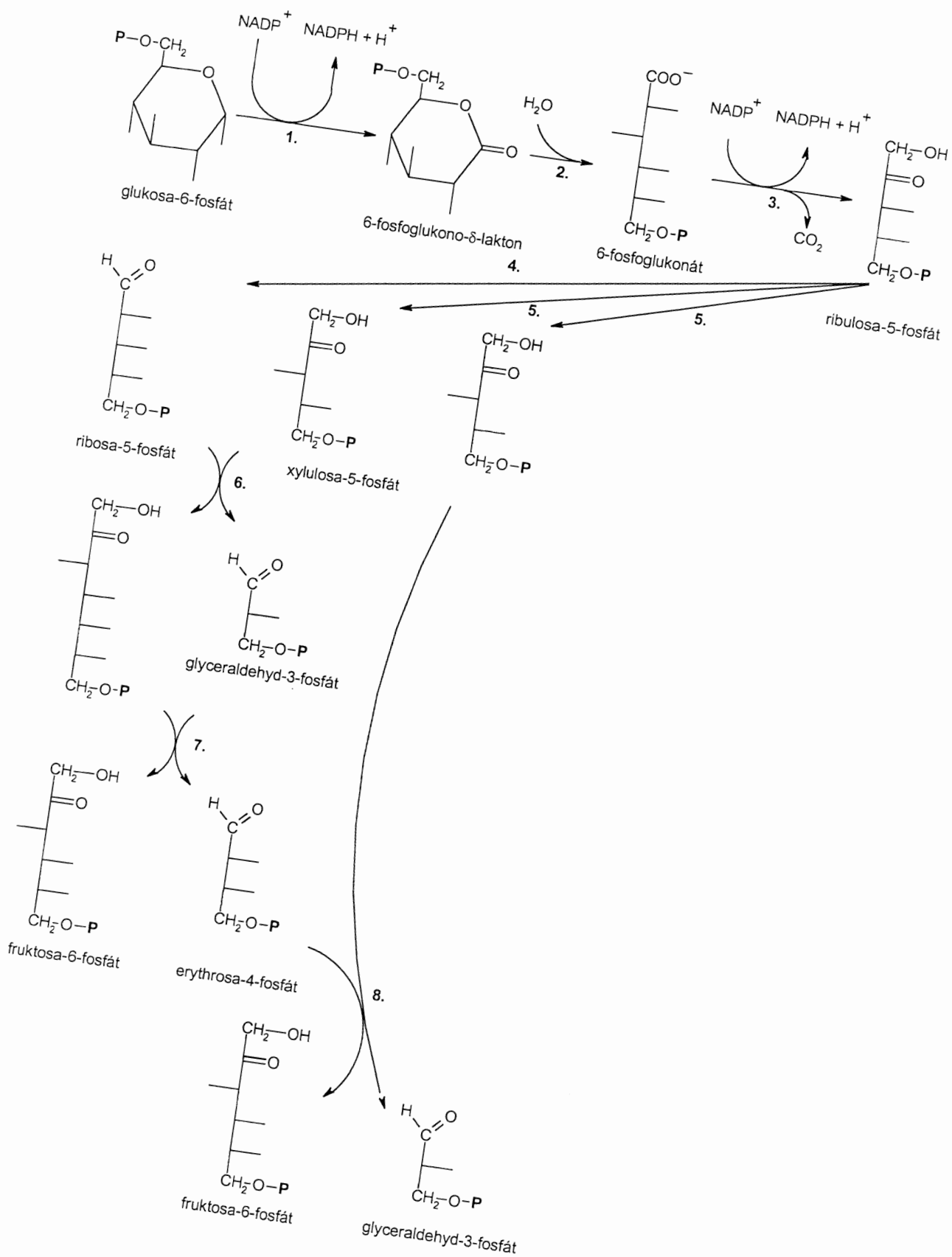
- Oxidační a dekarboxylační reakce, v nichž vzniká $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ribulosa-5-fosfát (reakce 1 až 3)
- Regenerační reakce, které převádějí ribulosa-5-fosfát zpětně na glukosa-6-fosfát

Hlavními produkty pentosového cyklu jsou, mimo $\text{NADPH} + \text{H}^+$, i ribulosa-5-fosfát a erythrosa-4-fosfát. Ribulosa-5-fosfát je využíván při biosyntéze nukleotidů a erythrosa-4-fosfát je jednou z výchozích látek pro syntézu aromatických sloučenin tzv. šikimátovou drahou (u rostlin).

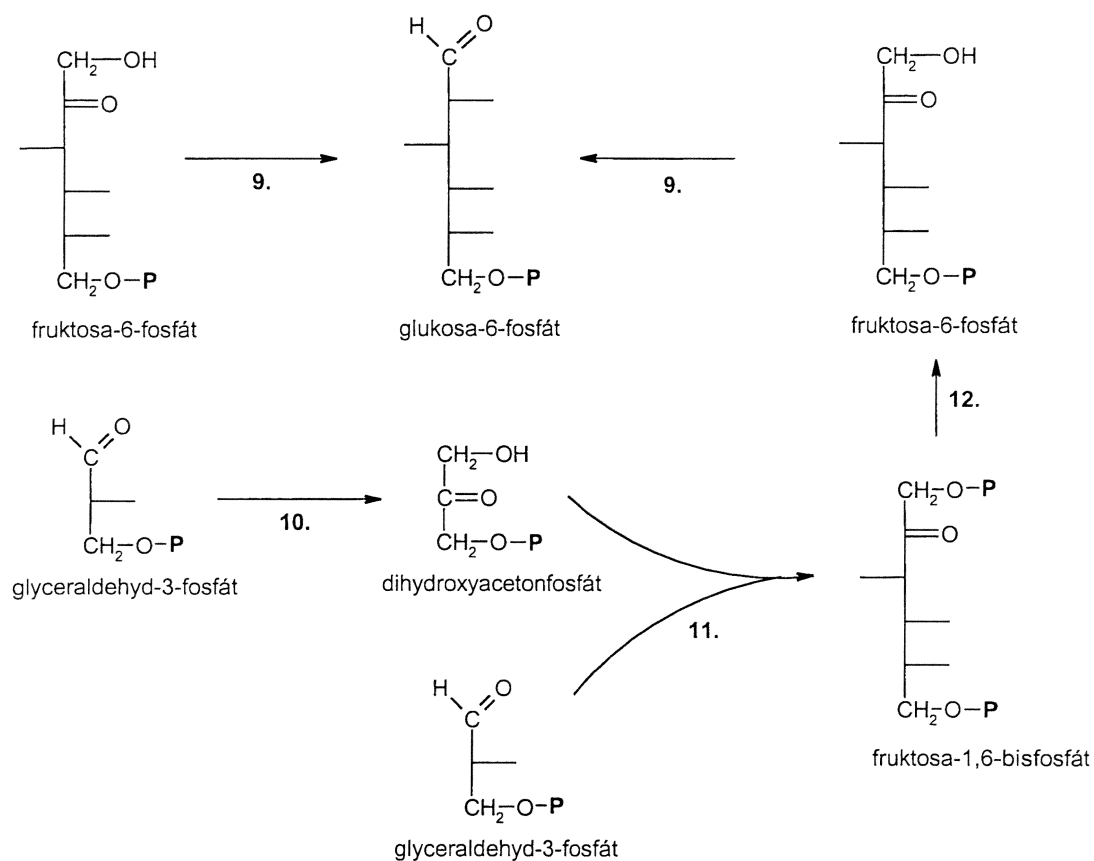
Glyceraldehyd-3-fosfát a fruktosa-6-fosfát mohou být využity v glykolýze nebo převedeny glukoneogenezí na glukosa-6-fosfát. Toto přímé propojení je umožněno i společnou lokalizací všech potřebných enzymů v cytosolu buněk. Pokud je potřeba ribulosa-5-fosfátu vyšší než potřeba $\text{NADPH} + \text{H}^+$, mohou být glyceraldehyd-3-fosfát a fruktosa-6-fosfát z glykolýzy využity k syntéze ribulosa-5-fosfátu zvratem transaldolasové a transketolasové reakce.

Celkovou bilanci pentosového cyklu lze vyjádřit tak, že jedna molekula glukosa-6-fosfátu může být převedena šesti pentosovými cykly na šest molekul CO_2 , přičemž vzniká 12 molekul $\text{NADPH} + \text{H}^+$.





Obr. 20 Schema pentosového cyklu



Obr. 20 Schema pentosového cyklu (pokračování)

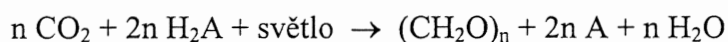
Reakce	Enzym	Poznámka
1.	glukosa-6-fosfátdehydrogenasa	vznik první molekuly $\text{NADPH} + \text{H}^+$
2.	6-fosfoglukonolaktonasa	
3.	fosfoglukonátdehydrogenasa	vznik druhé molekuly $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a uvolnění CO_2
4.	ribulosa-5-fosfátisomerasa	
5.	ribulosa-5-fosfátépimerasa	
6.	transketolasa	
7.	transaldolasa	
8.	transketolasa	stejný enzym jako u reakce 6.
9.	fosfogluoizomerasa	enzym glykolytické dráhy
10.	triosafosfátisomerasa	enzym glykolytické dráhy
11.	aldolasa A	enzym glykolytické dráhy

5.5.2. Regulace pentosového cyklu

Pentosový cyklus, a tedy i rychlost produkce $\text{NADPH} + \text{H}^+$, jsou řízeny rychlostí reakce katalysované glukosa-6-fosfátdehydrogenasou. Aktivita tohoto enzymu je regulována koncentrací NADP^+ (dostupnost substrátu). Pokud buňka spotřebovává $\text{NADPH} + \text{H}^+$, koncentrace NADP^+ roste. Tím se zvyšuje rychlost katalyzované reakce a i rychlost celé dráhy.

5.6. Fotosyntéza

Fotosyntéza je všeobecně považována za nejvýznamnější biochemický proces na Zemi. Zejména zelené rostliny při něm poutají světelnou energii Slunce a mění ji na energii chemickou. K tomuto závěru došel již německý fyziolog Robert Mayer v roce 1842. Celkově lze fotosyntézu popsat rovnicí

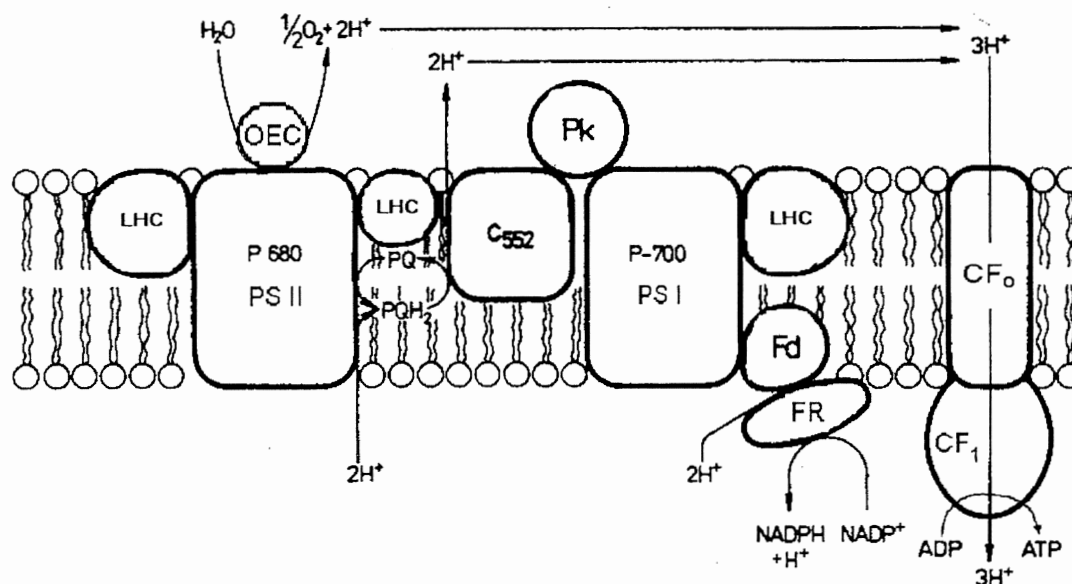


Prvek A (pro tzv. oxygenovou fotosyntezu kyslík, ale některé mikroorganismy mohou využívat např. i síru) je donorem elektronů, které slouží k redukci CO_2 na sacharidy. Kyslík, který se při oxygenové fotosyntéze uvolňuje, má tedy původ v H_2O (tuto skutečnost prokázali Samuel Ruben a Martin Kamen v roce 1941). Protože světelná kvanta nemohou přímo převádět elektrony na CO_2 , musí se celá fotosyntéza skládat ze dvou procesů. V první fázi, která je bezprostředně vázaná na světlo (světelná fáze), vznikají primární zdroje chemické energie (ATP a $\text{NADPH} + \text{H}^+$). Teprve ve druhé fázi, která již není na světle závislá (temnostní fáze), jsou primárně vzniklé makroergické látky využity pro vlastní syntézu sacharidů. U eukaryot (tj. u řas a vyšších rostlin) probíhá fotosyntéza v chloroplastu. To je buněčná organela velmi bohatá na membrány. Vnitřní membrána chloroplastu tvoří mnohonásobně poskládaný systém, čímž je vytvořena soustava plochých váčků (tzv. thylakoidů). V řezu chloroplastu jsou tyto váčky poskládány na sebe a vytváří sloupce zvané grana.

V membránách thylakoidů (zejména v oblasti gran) jsou lokalizovány enzymy světelné fáze fotosyntézy. Vnitřní prostor thylakoidu (tzv. stroma) obsahuje rozpustné enzymy temnostní fáze fotosyntézy.

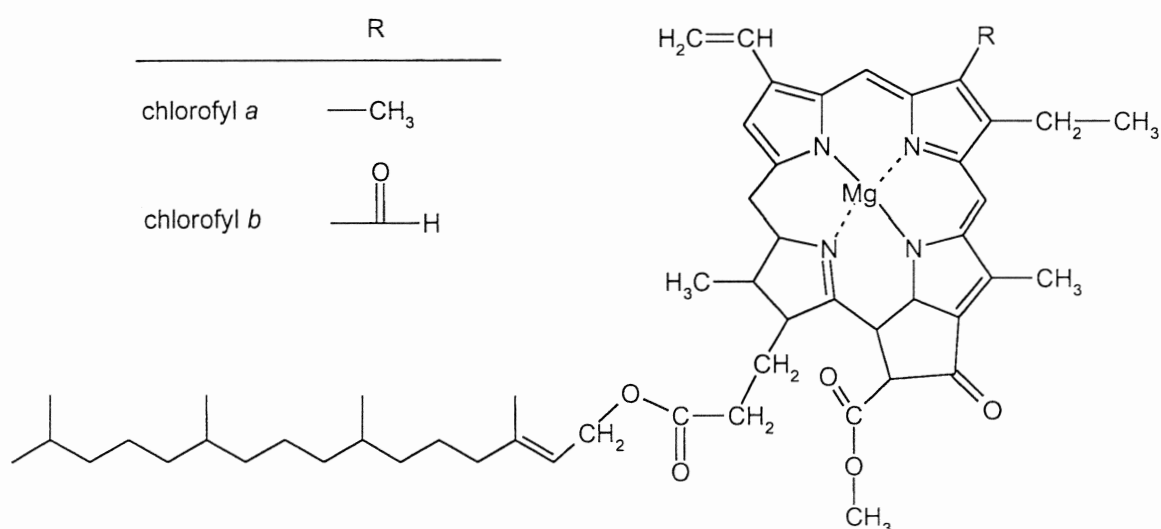
5.6.1. Světelná fáze fotosyntézy

Enzymový systém světelné fáze fotosyntézy v membráně tylakoidů je schematicky znázorněn na obrázku 21.



Obr. 21 Schema světelné fáze fotosyntézy

Membrána obsahuje komplexy dvou fotosystémů PS I a II s reakčními centry P 700 a P 680. Každý fotosystém je opatřen „anténou“ (LHC), která zachycuje energii fotonů a převádí ji na příslušný fotosystém. Hlavní sloučeninou , která zachycuje energii fotonů, je chlorofyl (Obr. 22).



Obr. 22 Chlorofyl

Chlorofyl je přítomen v reakčních centrech obou fotosystémů, ale většina molekul je soustředěna v systémech LHC. Kromě chlorofylu jsou v systémech LHC přítomny ještě další světlosběrné látky. Tato barviva pohlcují světlo v těch oblastech spektra, kde chlorofyly pohlcují slabě. Nejznámější jsou karotenoidy, xanthofyly a další.

Kromě již zmiňovaných fotosystémů s příslušnými anténami jsou v membráně tylakoidů přítomny další enzymové komplexy, které se účastní přenosu elektronů. Je to zejména komplex cytochromů (např. c_{552}), plastochinonu (PQ) a plastocyaninu (Pc), dále komplex ferredoxinu (Fd) a ferredoxin-NADP-reduktasy (FR) a konečně „kyslík vyvíjející komplex“ (OEC), který uskutečňuje tzv. fotolýzu vody (Hillova reakce).

Průběh světelné fáze oxygenové fotosyntézy je následující :

Foton, který dopadá na PS I, vybudí elektron reakčního centra na vysokou energetickou hladinu. Elektron je pak převáděn přes komplex cytochromů a plastochinon zpět na PS I (cyklická dráha). Přitom odevzdává energii, která je využita na transport H^+ iontů membránou. Tím se na membráně vytváří elektrochemický potenciál H^+ iontů.

Vybuzený elektron PS I může být také převáděn přes komplex ferredoxinu a ferredoxin-NADP-reduktasy na $NADP^+$ a vytváří se tak $NADPH+H^+$. Chybějící elektron na PS I je doplněn z PS II. Přitom je opět vybuzený elektron, tentokrát z PS II, převáděn přes komplex cytochromů a plastochinon na PS I. Energie je opět využita k transportu iontů H^+ . Chybějící elektron na PS II je doplněn z vody působením komplexu OEC. Komplex obsahuje jako esenciální prvek mangan. Při fotolýze vody přechází Mn přes řadu oxidačních stavů, ve kterých na sebe váže různý počet atomů kyslíku, který se nakonec uvolní jako O_2 . Sumárně lze celý děj zapsat rovnicí



V popsaném průběhu je energie fotonů (světla) převedena na chemickou energii $NADPH+H^+$ a elektrochemickou energii gradientu H^+ iontů na membráně. Přitom se uvolní O_2 , který vlastně představuje „odpadní“ produkt.

Posledním dějem světelné fáze fotosyntézy je tvorba ATP. Tu uskutečňuje komplex ATP-synthasy (jednotky CF_0 a CF_1), který je rovněž vázán v membráně tylakoidu. Tento komplex využívá koncentrační gradient H^+ iontů, které přes něj přechází, a uvolněná energie je využita pro syntézu ATP

Konečným výsledkem světelné fáze fotosyntézy je chemická energie (obsažená v $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP), která je následně využívána pro redukci CO_2 .

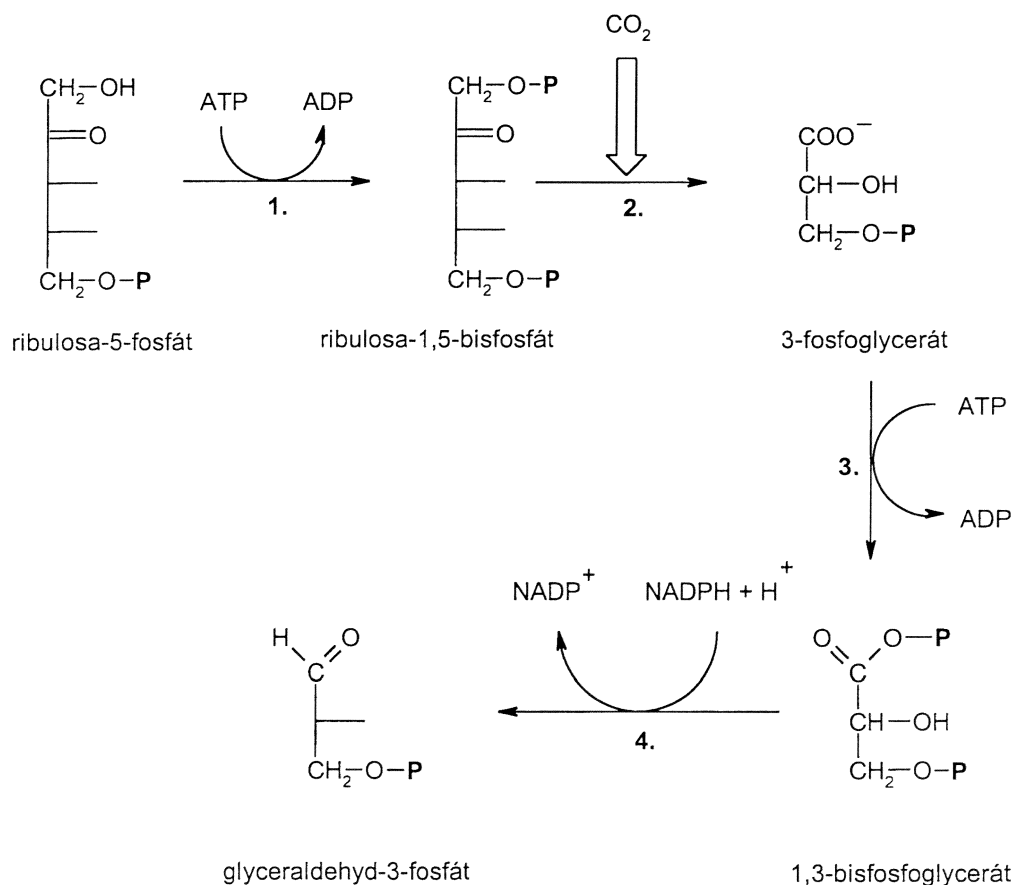
5.6.2. Temnostní fáze fotosyntézy (mechanismus C3)

Metabolickou dráhu, kterou převádí rostliny CO_2 na sacharidy, objasnili v létech 1946-1953 Melvin Calvin, James Bassham a Andrew Benson. Tato dráha je známa jako Calvinův cyklus. Rostliny, které fixují CO_2 pouze Calvinovým cyklem se, podle prvního produktu (kyseliny 3-fosfoglycerové), označují jako rostliny C3.

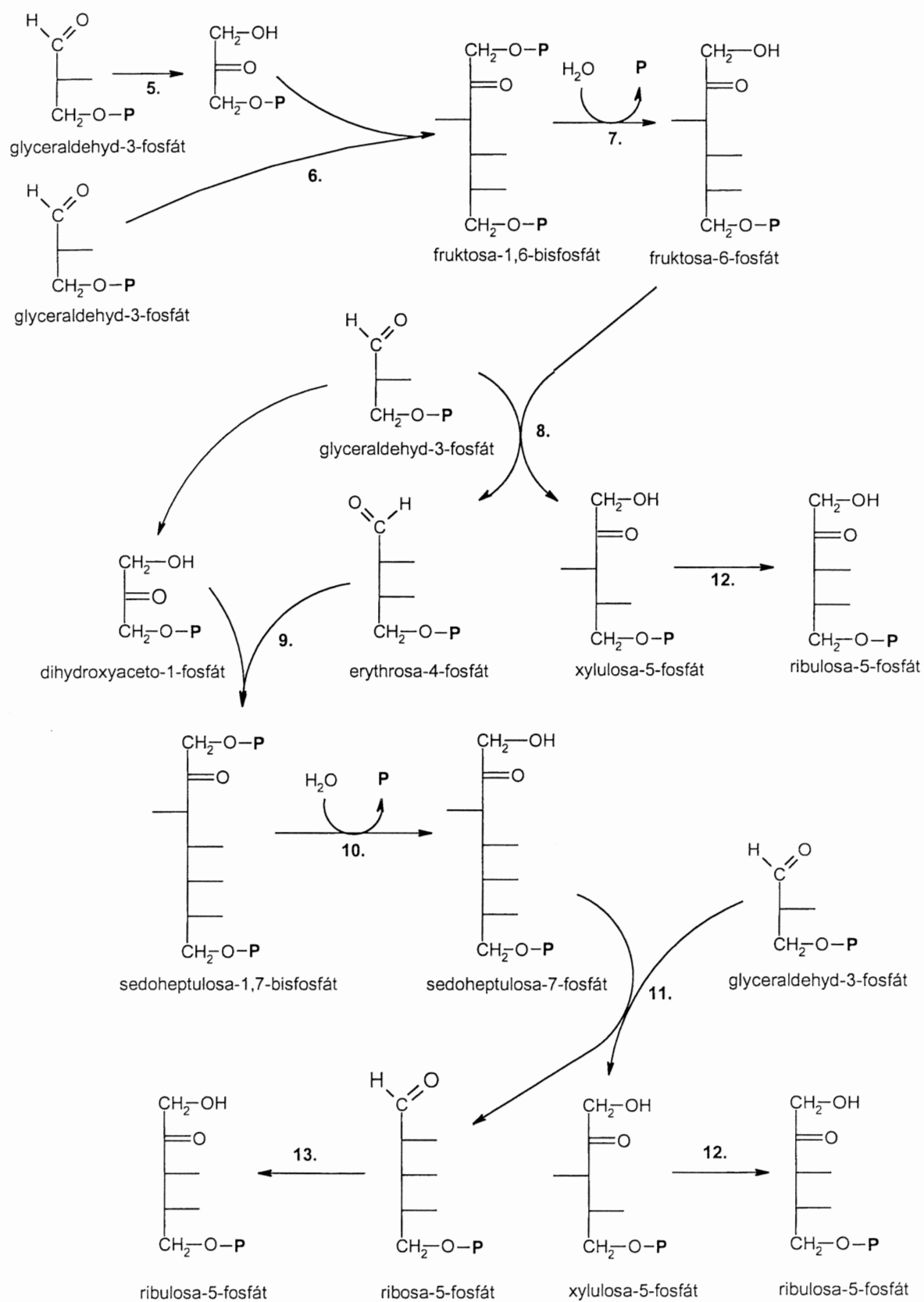
Celý cyklus můžeme rozdělit do dvou částí:

- část karboxylační a redukční (reakce 1 až 4)
- část regenerační (reakce 5 až 11)

V produkční fázi (Obr. 23) dochází ke vzniku sacharidů (trios).



Obr. 23 Karboxylační a redukční fáze Calvinova cyklu



Obr. 24 Regenerační fáze Calvinova cyklu

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	fosforibulokinasa	aktivace Rbu-5P – na Rbu-1,5 bisP
2.	ribulosobisfosfátkarboxylasa	karboxylace za současného rozkladu na 2 molekuly kyseliny 3-P glycerové
3.	fosfoglycerátkinasa	
4.	glyceraldedydfosfátdehydrogenasa	první vzniklý sacharid (triosa).
5.	triosafosfátisomerasa	
6.	aldolasa	
7.	fruktosabisfosfátfosfatasa	
8.	transketolasa	
9.	aldolasa	stejný enzym jako v reakci 6.
10.	sedoheptulosobisfosfátfosfatasa	
11.	transketolasa	stejný enzym jako v reakci 8.

V regenerační fázi (Obr. 24) je pak ze vzniklých trios syntetizována opět vstupní pentosa. Celkově si můžeme představit, že do reakce vstupuje 6 molekul pentosy a 6 CO₂. V první fázi se vytvoří 12 trios (C₃). Na obnovu 6 molekul pentos je třeba 10 molekul trios a 2 zbylé molekuly poskytnou 1 molekulu hexosy (fruktosa–6 fosfát).

Primárně vzniklý glyceraldehyd–3-fosfát je transportován ven z chloroplastů a využíván v ostatních biochemických drahách. Zejména slouží k syntéze sacharosy, transportního sacharidu rostlin, a následně stavebních a zásobních polysacharidů.

Klíčovým enzymem celého děje je ribulosabisfosfátkarboxylasa. Jedná se zřejmě o nejvýznamnější enzym na Zemi a je patrně nejrozšířenější enzymovou bílkovinou v biosféře.

Regulace Calvinova cyklu

Ve dne kryjí rostliny svou potřebu energie fotosyntézou. V noci však musí potřebnou energii získávat katabolickými procesy (např. glykolýza a pentosový cyklus). Musí proto existovat mechanismus, který zabráni spotřebě katabolicky vytvořených ATP a NADPH+H⁺ k fixaci CO₂, která by neměla smysl. Tento mechanismus je primárně řízen světlem a ovlivňuje aktivitu ribulosabisfosfátkarboxylasy a dvou významných enzymů regenerační části, fruktosabisfosfatasy a sedoheptulosabisfosfatasy. Aktivita

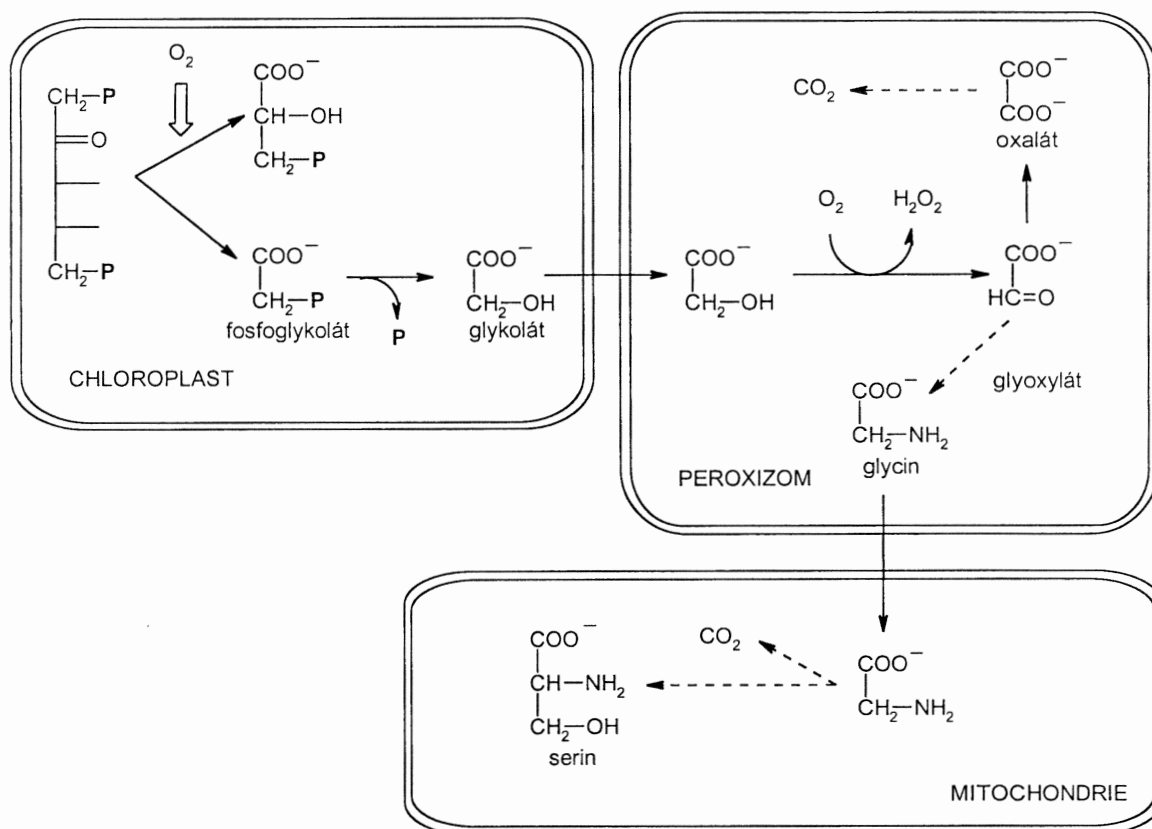
ribulosabisfosfátkarboxylasy je ovlivňována změnou pH na světle, allostericky NADPH+H⁺ a některými dalšími mechanismy. Tyto vlivy vedou k poklesu aktivity enzymu ve tmě.

Nejvýznamnějším regulačním mechanismem Calvinova cyklu je patrně změna aktivity fruktosabisfosfatasy a sedoheptulosabisfosfatasy. Tyto enzymy obsahují ve své molekule -SH skupiny, které mohou přecházet na oxidované -S-S- seskupení. Za světla existuje v chloroplastu vysoký redox potenciál, daný přítomností redukovaného ferredoxinu (viz světelná fáze fotosyntézy). Tento ferredoxin prostřednictvím enzymu ferredoxin-thioredoxin-oxidoreduktasy mění redox stav bílkoviny thioredoxinu. Redukovaný thioredoxin pak za světla redukuje -S-S- skupiny fruktosabisfosfatasy a sedoheptulosabisfosfatasy a tím je aktivuje. Současně ale redukuje i obdobné skupiny fosfofruktokinasy (enzym glykolýzy) a inaktivuje tak glykolýzu v chloroplastu. Tak světlo aktivuje Calvinův cyklus a inaktivuje glykolýzu zatímco tma má opačný účinek.

Fotorespirace

V šedesátých letech minulého století bylo zjištěno, že za světla produkují rostliny CO₂ ještě jinou cestou než reakcemi spojenými s citrátovým cyklem. Tento pochod byl nazván fotorespirace a při nízké koncentraci CO₂ a naopak vysoké koncentraci O₂ může převládnout nad fotosyntézou. Fotorespirace je vyvolána druhou (oxygenázovou) aktivitou klíčového enzymu fotosyntézy - ribulosabisfosfátkarboxylasy (název tohoto enzymu byl proto změněn na ribulosabisfosfátkarboxylasa-oxygenasa, ve zkratce Rubisco). Celý proces je značně složitý a probíhá v několika buněčných organelách. Biochemické schema je uvedeno na obrázku 25.

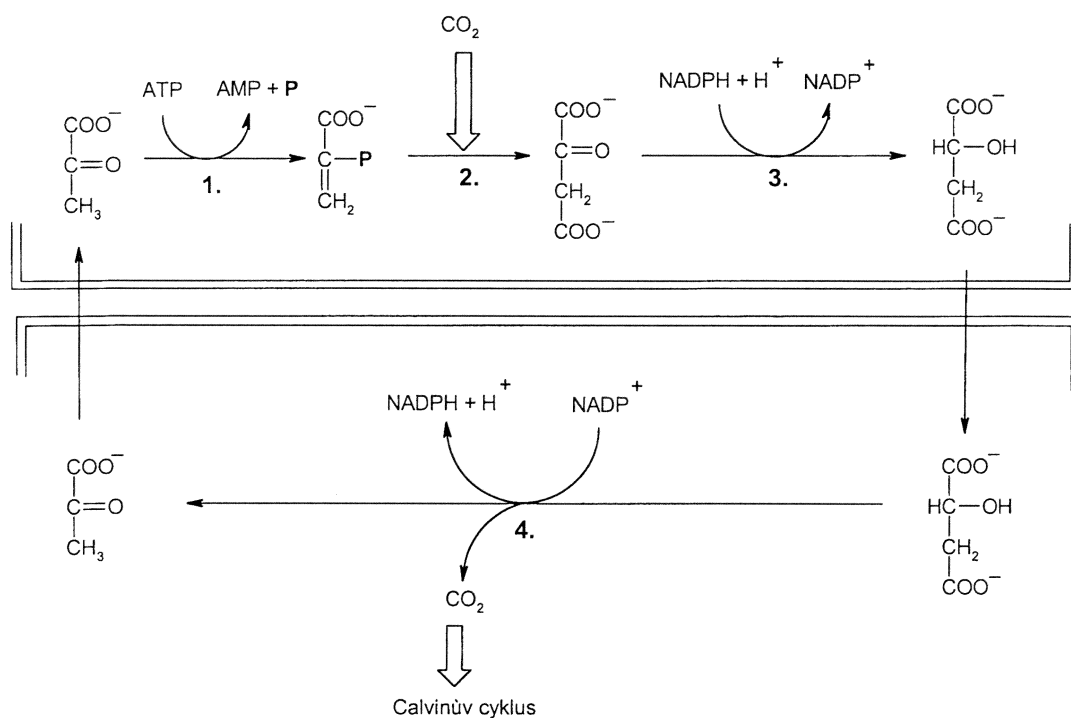
Fotorespirace sice snižuje výtěžek fotosyntézy, ale zdá se, že představuje určitou ochranu systému fotosyntézy. Při nedostatku CO₂ může totiž dojít k jeho poškození vlivem velmi agresivního O₂, vznikajícího ve světelné fázi fotosyntézy.



Obr. 25 Schema fotorespirace

5.6.3. Temnostní fáze fotosyntézy (mechanismus C4)

Některé rostliny, jako cukrová třtina, kukuřice a další, mají metabolický cyklus fixace CO_2 odlišný od rostlin C3. Tato odlišnost jim umožňuje takřka úplně potlačit fotorespiraci (vysokou koncentrací CO_2 v buňkách) a mají proto mnohem vyšší účinnost produkce sacharidů. Tato vysoká účinnost je způsobena i mnohem větší aktivitou fosfoenolpyruvátcarboxylasy ve srovnání s ribulosabifosfátcarboxylasou. Fotosyntéza u rostlin C4 je rozdělena do dvou druhů buněk. V jejich listech jsou cévní svazky obaleny vrstvou buněk, které tvoří tzv. pochvu cévního svazku. Tato pochva je pak obalena vrstvou mezofylových buněk. V mezofylových buňkách probíhá světelná fáze fotosyntézy a primární fixace oxidu uhličitého. Tato primární fixace je odlišná od mechanismu rostlin C3. C4-cyklus objasnili v šedesátých letech minulého století Marshall Hatch a Robert Slack. Schema Hatch-Slackova cyklu je uvedeno na obrázku 26.



Obr. 26 Schema Hatch-Slackova cyklu

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	pyruvátkinasa	aktivace vstupního substrátu
2.	fosfoenolpyruvátkarboxylasa	hlavní enzym fixace CO ₂
3.	malátdehydrogenasa	
4.	jablečný enzym	

Jako primární akceptor CO₂ zde vystupuje fosfoenolpyruvát a produktem je oxalacetát (proto C₄). Oxalacetát je redukován na malát, který přechází do buněk cévní pochvy. V chloroplastech těchto buněk je malát opět oxidován a současně dekarboxylován na pyruvát a CO₂, který vstupuje do Calvinova cyklu. Pyruvát se vrací do mezofylních buněk, kde je fosforylován na fosfoenolpyruvát enzymem pyruvátkinasa.

Vzhledem k tomu, že při fosforylaci pyruvátu vzniká až AMP je energetická spotřeba C₄-rostlin větší než rostlin C₃. Proto se C₄-rostliny vyskytují převážně v tropickém pásmu. V chladnějším podnebí, kde se vliv fotorespirace tolik neuplatňuje, jsou ve výhodě rostliny C₃, které spotřebují méně energie.

5.7. Metabolismus oligo a polysacharidů

Glukosa, hlavní zdroj energie pro metabolismus, nemůže být v buňkách přítomna ve vysokých koncentracích a to zejména z důvodu vysoké osmotické aktivity. Vyšší organismy se chrání před možným nedostatkem tohoto energetického zdroje tím, že nadbytek glukosy přemění na zásobní vysokomolekulární glukany (glukosové polysacharidy). Z nich se může v době metabolické potřeby glukosa opět snadno uvolnit. U rostlin je tímto zásobním polysacharidem škrob (směs amylosy a amylopektinu) a u živočichů glykogen, který se liší od amylopektinu pouze větším větvením molekuly. Mimo tyto zásobní polysacharidy jsou zejména v rostlinách přítomny i stavební polysacharidy. Z nich nejdůležitější je celulóza.

K významným oligosacharidům patří zejména disacharidy, např. sacharosa nebo laktosa.

5.7.1. Katabolismus oligo a polysacharidů

Aby mohly být zásobní polysacharidy využity jako zdroj energie pro buňku, musí být nejprve rozštěpeny na monosacharidové jednotky (zejména glukosu). Základní reakcí je tedy hydrolýza glykosidových vazeb. Vzhledem k složitosti molekul polysacharidů se rozkladných procesů účastní řada enzymů a mechanismus se u jednotlivých polysacharidů částečně liší.

Katabolismus škrobu

Odbourávání škrobu v rostlinách se účastní řada enzymů. α -amylasa hydrolyzuje 1,4- α -D-glykosidové vazby na různých místech molekuly škrobu. Vznikají tak tzv. maltodextriny s různou délkou řetězce. β -Amylase hydrolyzuje postupně od neredukujícího konce molekuly každou druhou 1,4- α -D-glukosidickou vazbu za vzniku maltosy. R-enzym štěpí 1,6 rozvětvení amylopektinu i zbytkových dextrinů, které vznikly působením α -amylasy na amylopektin. Glukanotransferasa (D-enzym) katalyzuje přenos glykosylového zbytku na jinou molekulu maltodextrinu. Průběžně tak regeneruje substráty vhodné pro reakci s enzymy, které nemohou štěpit příliš krátké řetězce.

Jiným mechanismem štěpení škrobu je působení fosforylasy, která přenáší postupně z neredukujícího konce molekuly škrobu glykosylové zbytky na anorganický fosfát. Vzniká tak glukosa-1-fosfát.

Koordinovaným sledem uvedených reakcí se tedy může úplně odbourávat škrob na látky, které se pak zapojují do glykolýzy.

Katabolismus glykogenu

Glykogen je u živočichů obsažen zejména ve svalových a jaterních buňkách. Ve svalu je glykogen přeměňován na glukosa-6-fosfát, aby mohl vstoupit do glykolytické dráhy. V játrech spouští nízká koncentrace glukosy v krvi štěpení glykogenu na glukosa-1-fosfát, který je poté hydrolyzován na glukosu, která vstupuje do krevního oběhu. Podobně jako u škrobu je i štěpení glykogenu katalyzováno několika enzymy:

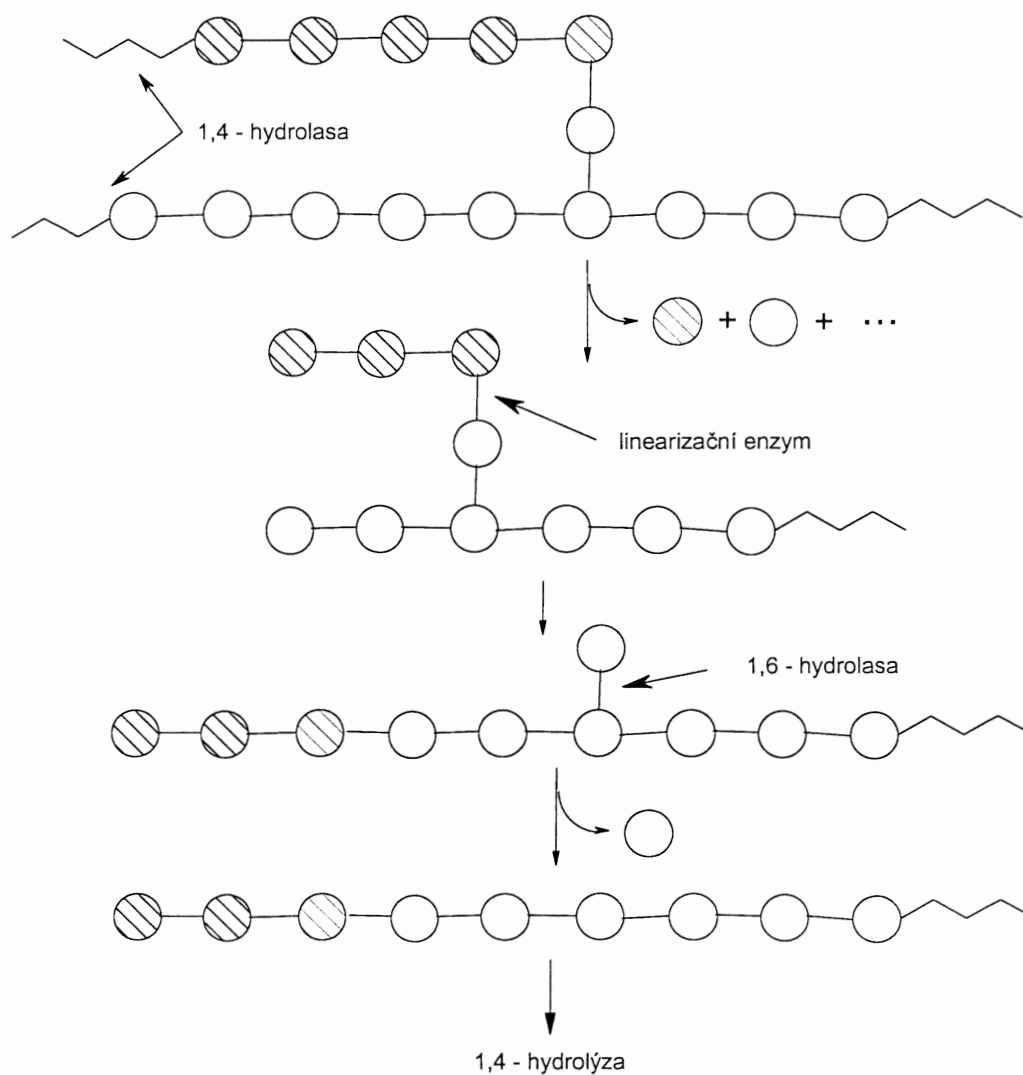
Glykogenfosforylasa katalyzuje fosforolýzu (štěpení vazby zavedením fosfátové skupiny) glykogenu za vzniku glukosa-1-fosfátu. Tento enzym může odštěpovat glukosu pouze tehdy, je-li vázána ve vzdálenosti pět nebo více glukosových jednotek od místa větvení.

Amylo-1,6-glukosidasa štěpí α -(1 $\rightarrow$ 6) glykosidové vazby v místech větvení a tím umožňuje další působení glykogenfosforylasy.

Linearizační enzym, který působí jako α -(1 $\rightarrow$ 4) glykosyltransferasa, přenáší α -D-(1 $\rightarrow$ 4) – vázané trisacharidové jednotky z krátkých větví glykogenu na neredukující konec jiné větve, kde se tyto jednotky váží vazbou α -(1 $\rightarrow$ 4). Takto prodloužený řetězec může být poté štěpen glykogenfosforylasou. Enzym rovněž hydrolyzuje (nikoliv fosforolyzuje) vazby α -D-(1 $\rightarrow$ 6), které spojují zbývající glukosové jednotky, za vzniku glukosy a nevětveného glykogenu. Enzym tedy má jednak transferasovou aktivitu, jednak α -(1 $\rightarrow$ 6)-glukosidasovou aktivitu.

Fosfoglukomutasa přeměňuje glukosa-1-fosfát na glukosa-6-fosfát, který poté vstupuje do glykolytické dráhy (ve svalu) nebo je hydrolyzován na glukosu (v játrech).

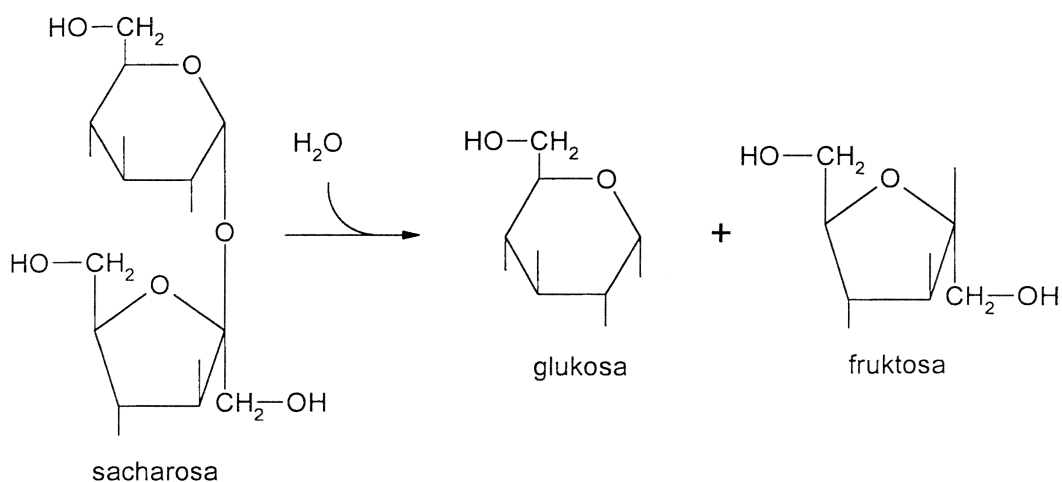
Obecné schema štěpení polysacharidů je uvedeno na obrázku 27.



Obr. 27 Obecné schema štěpení polysacharidů

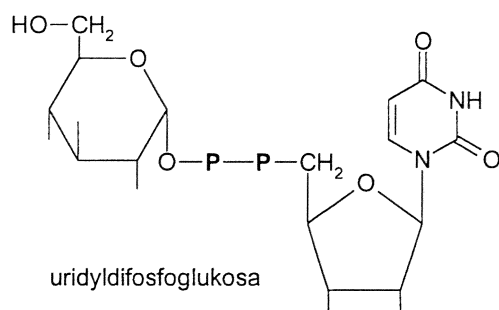
Katabolismus oligosacharidů

Disacharidy, sacharosa i laktosa, jsou štěpeny hydrolytickými enzymy na monosacharidy. U sacharosy je to tzv. sacharasa (také invertasa), u laktosy laktasa. Vzniklé monosacharidy pak vstupují do metabolismu monosacharidů.



5.7.2. Syntéza oligo a polysacharidů

Vznik oligo a polysacharidů je, obecně vzato, transferasová reakce, tj. přenos monosacharidových (ale případně i oligosacharidových) jednotek na rostoucí molekulu polysacharidu. Monosacharidové jednotky musí být před přenosem aktivovány a to nejčastěji vazbou na nukletidy. Nejvýznamnějším nukleotidem je zde UTP. Při vzniku glukanu je glukosa aktivována na UDP-glukosu. Reakci katalyzují enzymy třídy ligas.



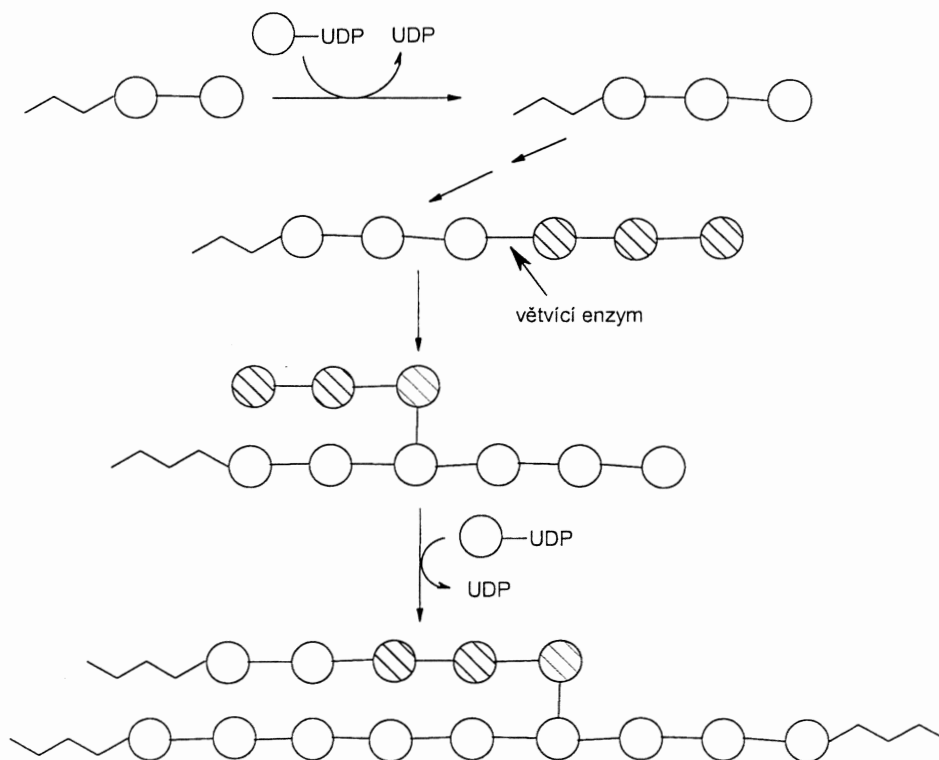
Syntéza škrobu

Při syntéze škrobu spolupracují tři enzymy. ADP-glukosasyntetasa katalyzuje vznik ADP-glukosy. (Při syntéze škrobu v rostlinách se, na rozdíl od jiných polysacharidů, uplatňuje ADP-glukosa). Glykosyltransferasa (tzv. syntetasa škrobu) přenáší glukosylové jednotky na rostoucí řetězec škrobu za vzniku α -D-(1 $\rightarrow$ 4)- glykosidové vazby. „Větvící“ enzym (tzv. Q-enzym) odštěpuje oligosacharidové jednotky z rostoucího řetězce škrobu a váže je α -D-(1 $\rightarrow$ 6) glykosidovou vazbou dovnitř řetězce. Tak je vytvářeno rozvětvení škrobových molekul.

Syntéza glykogenu

Syntéza glykogenu se v principu skládá ze stejných reakcí jako syntéza škrobu. UDP-glukosasyntetasa katalyzuje reakci vzniku UDP-glukosy. V dalším kroku syntézy je přenášena glykosylová jednotka z UDP-glukosy na neredukující konec molekuly glykogenu, kde se váže α -D-(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovou vazbou. Tato reakce je katalyzována tzv. glykogensynthasou, ve skutečnosti se ovšem jedná o transferasu. Větvení glykogenu se uskutečňuje působením větvicího enzymu (amylo-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-transglykosylasa). Při větvení glykogenu dochází ke štěpení α -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidových vazeb a k tvorbě nových vazeb α -D-(1 $\rightarrow$ 6).

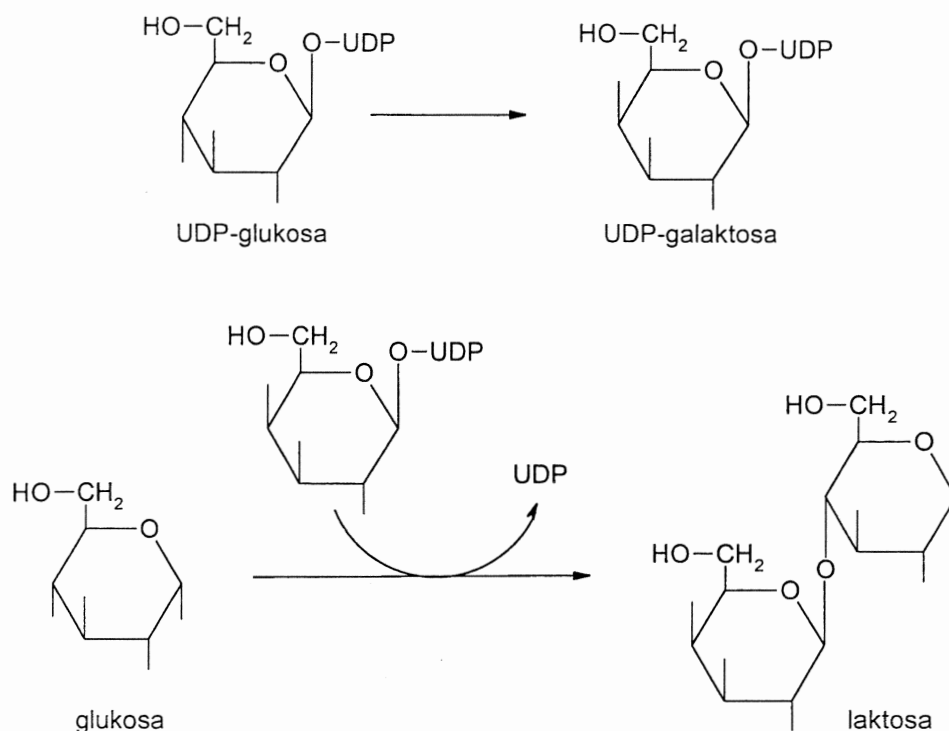
Obecné schema syntézy polysacharidů je uvedeno na obrázku 28.



Obr. 28 Obecné schema syntézy polysacharidů

Syntéza oligosacharidů

Podobně jako u polysacharidů, musí i při syntéze oligosacharidů dojít nejprve k aktivaci monosacharidových jednotek reakcí s UTP. Např. syntéza laktosy probíhá podle schematu



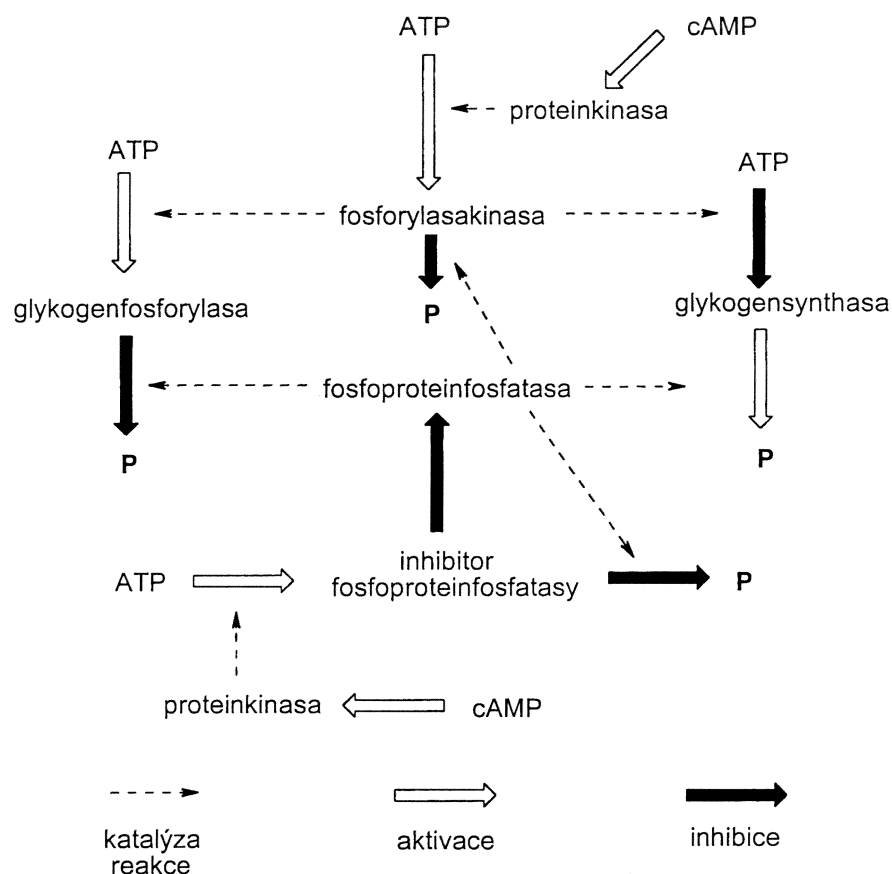
5.7.3. Regulace metabolismu glykogenu

Štěpení a syntéza glykogenu katalyzované glykogenfosforylasou a glykogensynthasou musí být pod přísnou kontrolou, aby byl glykogen podle okamžité potřeby buňky buď syntetizován nebo naopak štěpen. Celý proces je řízen zejména kovalentní modulací glykogensynthasy i glykogenfosforylasy. Vlastní reakce kovalentních modulací jsou primárně pod hormonální kontrolou.

Glykogenfosforylasa je aktivní ve fosforylované formě (glykogenfosforylasa *a*). Neaktivní glykogenfosforylasa *b* naopak fosforylována není. Přeměny těchto dvou forem jsou uskutečňovány trojicí enzymů:

1. Fosforylasakinasu, která specificky fosforyluje glykogenfosforylasu *b*.
2. cAMP-dependentní proteinkinasa, která fosforylací aktivuje fosforylasakinasu.
3. Fosfoproteinfosfataasa, která defosforylací inaktivuje glykogenfosforylasu *a* i fosforylasakinasu.

Schema regulace je následující:



Fosforylasakinas vyžaduje pro svou aktivaci, kromě fosforylace, i přítomnost iontů Ca^{2+} , pro aktivitu cAMP-dependentní proteinkinasy je nutná přítomnost cAMP. Koncentrace obou těchto allosterických efektorů je řízena hormonálně, ve svalech je hladina Ca^{2+} řízena i nervovými signály. Fosfoproteinfosfatasa je inhibována proteinovým inhibitorem fosfoproteinfosfatasy. Ten je aktivní ve své fosforylované formě, která vzniká působením cAMP-dependentní proteinkinasy. Nefosforylovaná forma inhibitoru vzniká působením fosfoproteinfosfatasy. To znamená, že cAMP reguluje celý proces snížením rychlosti defosforylace.

Podobně jako glykogenfosforylasa, existuje i glykogensynthasa ve fosforylované a defosforylované formě. Aktivní je zde ovšem forma defosforylovaná. Proces fosforylace a defosforylace je i zde řízen souhrou fosforylasakiny a fosfoproteinfosfatasy. Kromě toho je ale známa ještě řada dalších proteinkinasy, které se na celém procesu podílí.

6. METABOLISMUS LIPIDŮ

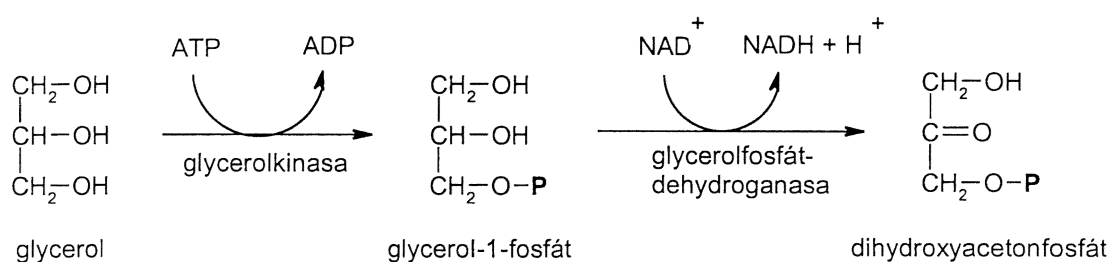
Lipidy tvoří pestrskou skupinu látek s velmi širokou a nezastupitelnou úlohou ve struktuře a metabolismu buněk. Například triacylglyceroly jsou významnou zásobárnou metabolické energie u živočichů, cholesterol je životně důležitou složkou buněčných membrán, prekursorem steroidních hormonů a žlučových kyselin, arachidonát je nenasycená mastná kyselina, která slouží především jako prekursor prostaglandinů. Glykolipidy a fosfolipidy jsou hlavními složkami biomembrán.

6.1. Katabolismus lipidů

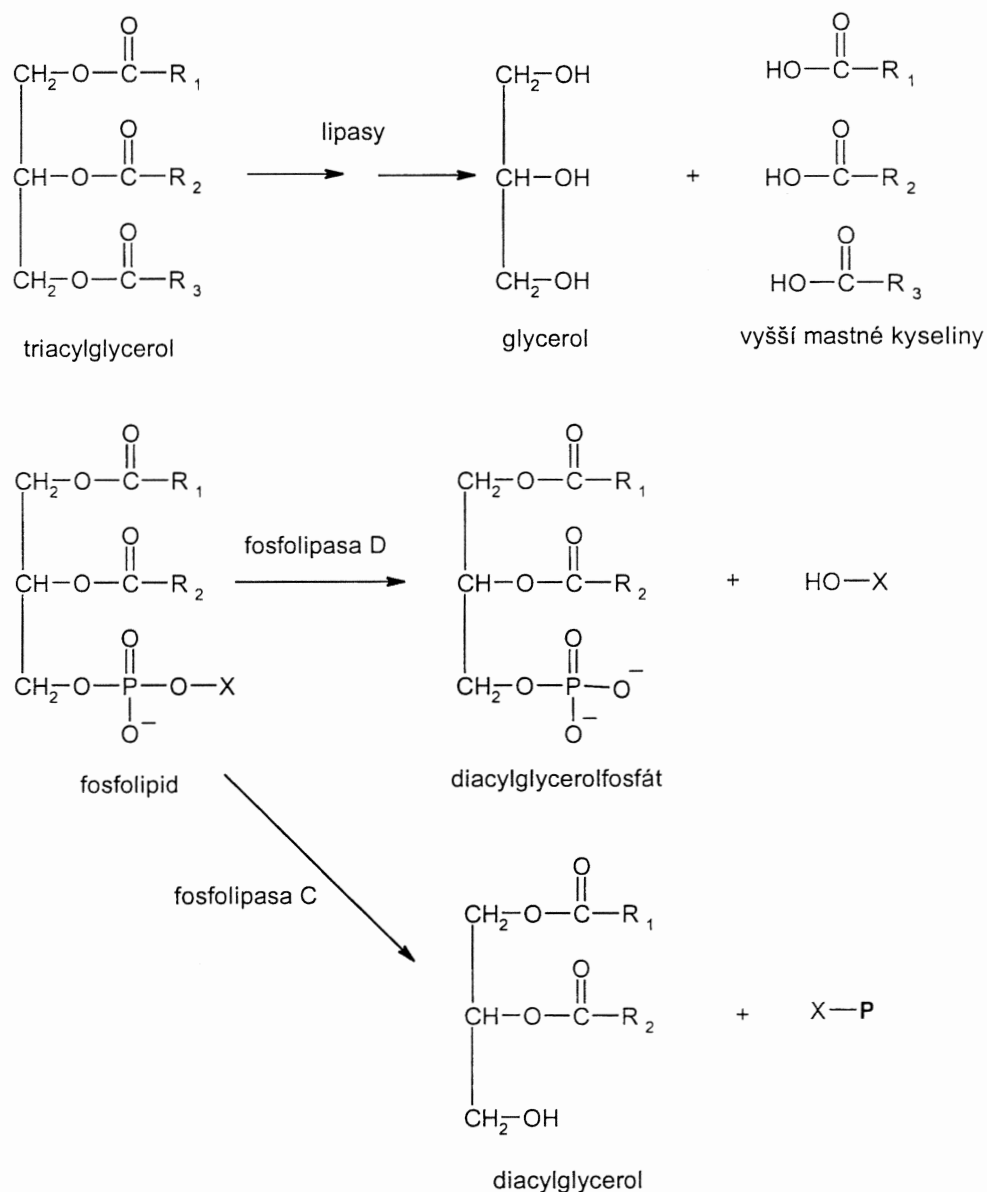
Pro využití lipidů v metabolismu je nutný jejich počáteční rozklad na jednotlivé složky (vyšší mastné kyseliny, glycerol apod). Tyto procesy katalyzují enzymy třídy hydrolas, obecně označované jako lipasy.

Triacylglycerolové složky transportních lipoproteinů jsou hydrolyzovány na volné mastné kyseliny a glycerol lipoproteinlipasou. Štěpení triacylglycerolů uložených v tukové tkáni vyžaduje jejich hydrolýzu na glycerol a volné mastné kyseliny triacylglycerollipasou. Fosfolipidy jsou analogicky štěpeny fosfolipasami (Obr. 29).

Vzniklé produkty jsou následně metabolisovány specifickými procesy. Glycerol je převáděn na glykolytický meziprodukt dihydroxyacetonfosfát následnými reakcemi glycerolkinasy a glycerolfosfátdehydrogenasy.



Volné mastné kyseliny mohou podléhat několika typům oxidačních procesů.



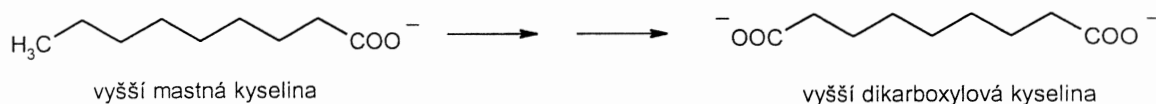
Obr. 29 Hydrolýza triacylglycerolů

6.1.1. Oxidace mastných kyselin

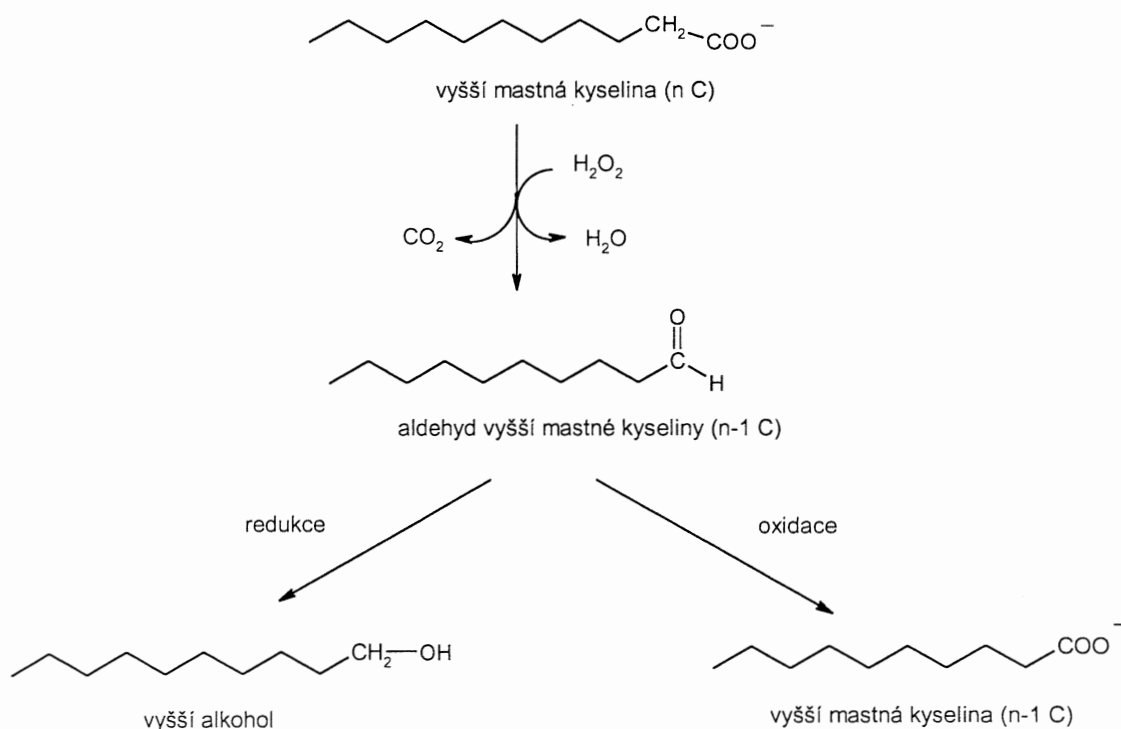
Mastné kyseliny vstupují do metabolických procesů v aktivované formě. Tou je příslušný acyl-CoA. Tato aktivace je katalyzována řadou acyl-CoA-synthetas (také nazývaných thiokinasy). Tyto enzymy katalyzují reakci.



Je známo několik mechanismů oxidace mastných kyselin. Podle uhlíku, na kterém k oxidaci dochází, jsou označovány jako α -, β - a ω - oxidace. Při ω -oxidaci vznikají α,ω -dikarboxylové kyseliny. Význam tohoto procesu však není zcela objasněn.



V rostlinách byl objeven mechanismus α -oxidace, při kterém dochází k dekarboxylaci a následné oxidaci α -uhlíku na aldehydickou skupinu. Reakci katalyzují tzv. peroxidasy mastných kyselin. Reakce se účastní H_2O_2 , který je produkován za účasti kofaktoru FAD. Vzniklý aldehyd může být dále oxidován na kyselinu nebo redukován na alkohol. Soudí se, že funkce α -oxidace vede k tvorbě alkoholů s dlouhým alifatickým řetězcem pro syntézu rostlinných vosků.



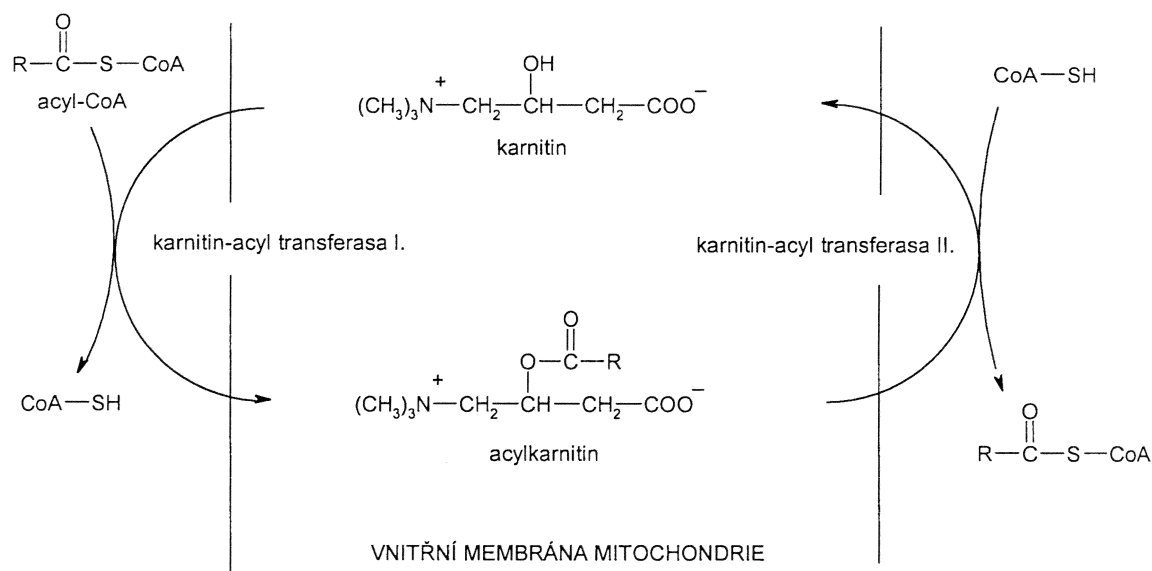
6.1.2. β -oxidace mastných kyselin

Nejvýznamnější metabolickou drahou katabolismu mastných kyselin je β -oxidace. Enzymy této dráhy jsou lokalizovány v mitochondriích. Vzhledem k tomu, že výstupním produktem je acetyl-CoA, je tak umožněna těsná vazba na citrátový cyklus.

První hypotézu o průběhu β -oxidace formuloval Franz Knoop v roce 1904. Plně objasnit mechanismus β -oxidace se podařilo v padesátých letech po objevu koenzymu A. Na této práci se podílela řada pracovníků (Lynen, Gveen, Ochoa a další). Celý metabolický proces β -oxidace mastných kyselin je také, podle jednoho z objevitelů, nazýván Lynenova spirála. V roce 1950 Eugene Kennedy a Albert Lehninger zjistili, že ačkoli jsou mastné kyseliny pro oxidaci aktivovány v cytosolu, oxidovány jsou v mitochondriích.

Transport acetyl-CoA mitochondriální membránou

Acyl-CoA s dlouhým řetězcem nemůže projít vnitřní mitochondriální membránou přímo. K přenosu je využíván karnitin a je uskutečňován karnitinpalmitoyltransferasou I a II a specifickým přenašečem.

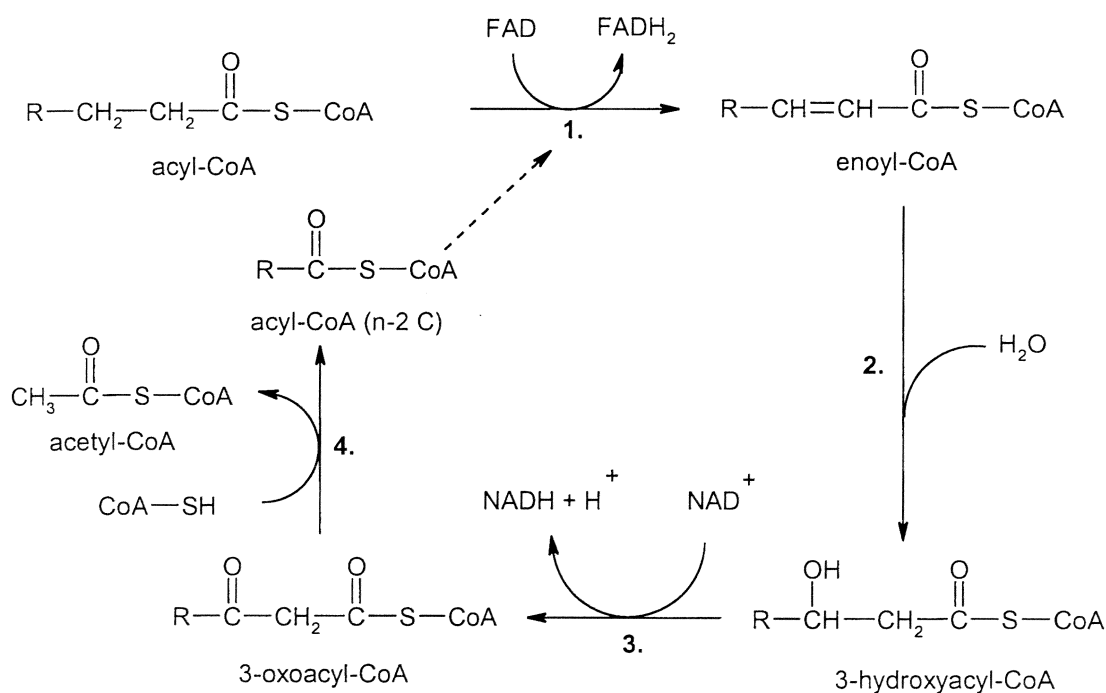


Samo přemístění je zprostředkováno specifickým přenašečovým proteinem, který dopravuje acylkarnitin do mitochondrie a současně přenáší volný karnitin v opačném směru. Transport acyl-CoA tedy probíhá ve čtyřech reakcích:

- Acylová skupina cytosolového acyl-CoA je přenesena na karnitin za současného uvolnění CoA do jeho cytosolové rezervy.
- Výsledný acylkarnitin je přenesen transportním systémem do mitochondriální matrix.
- Acylová skupina je přenesena na molekulu CoA z mitochondriální rezervy.
- Uvolněný karnitin je opět vrácen do cytosolu.

β -oxidace nasycených mastných kyselin

Mastné kyseliny jsou v průběhu oxidace rozštěpeny až na acetyl-CoA. Biochemické schema je následující:

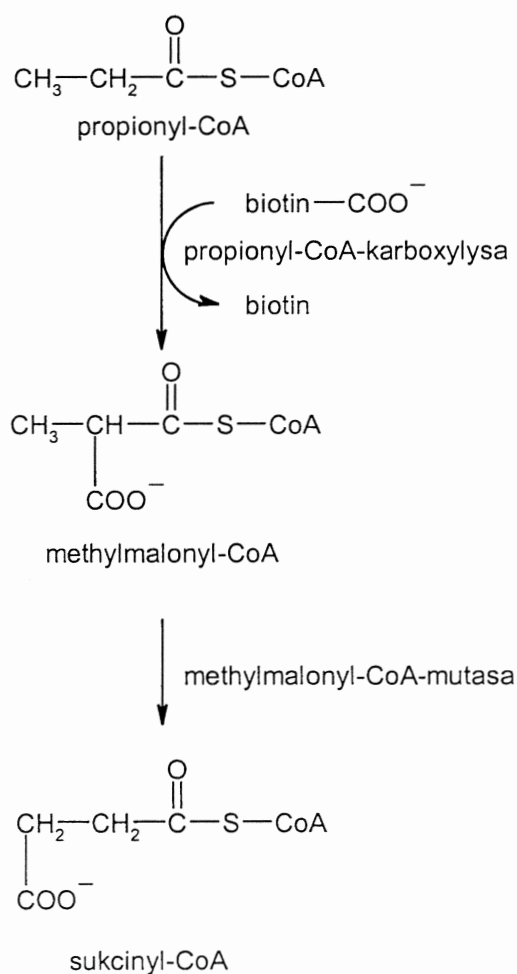


Reakce	Enzym	Poznámka
1.	acyl-CoA-dehydrogenasa	dehydrogenace za účasti FAD
2.	enoyl-CoA-hydratasa	
3.	hydroxyacyl-CoA-dehydrogenasa	dehydrogenace za účasti NAD^+
4.	oxoacyl-CoA-thiolasa	štěpení za účasti CoA, vzniká acetyl-CoA a zbylý acyl-CoA, který je o 2 C kratší, znovu vstupuje do reakce 1.

β - oxidace nenasycených a rozvětvených mastných kyselin

Základní schéma β oxidace platí pouze pro nasycené nerozvětvené kyseliny (případně části takových řetězců). Nenasycené nebo rozvětvené mastné kyseliny, případně kyseliny s lichým počtem uhlíků v řetězci, poskytují meziprodukty, které nejsou substráty pro základní enzymy β -oxidace. V buňkách jsou přítomny další enzymy, které katalyzují přeměnu těchto meziproduktů na meziprodukty β -oxidace. Důležitý meziprodukt vzniká při β -oxidaci α -rozvětvených mastných kyselin nebo kyselin s lichým počtem uhlíků. Je to propionyl-CoA. Produkce této látky při β -oxidaci není významná, ale její význam značně roste v metabolismu přežvýkavců. Zde vzniká tzv. propionovým kvašením sacharidů v batoru. Přežvýkavci tak, na rozdíl od ostatních živočichů, neabsorbují z trávicího traktu sacharidy, ale právě kyselinu propionovou. Jejich buňky ovšem sacharidy potřebují, a proto je pro ně metabolismus kyseliny propionové životně důležitý.

Metabolické schema přeměny propionyl-CoA je následující:



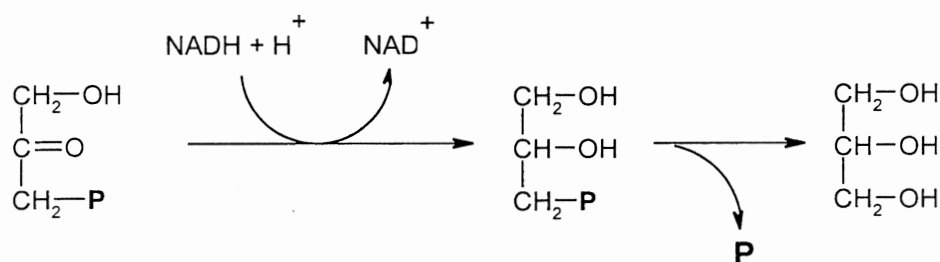
Konečný produkt této přeměny (sukcinyl-CoA) může vstupovat do glukoneogeneze.

Energetika β -oxidace.

Účelem oxidace mastných kyselin je tvorba metabolické energie. Každá obrátka β -oxidace vytvoří jeden $\text{NADH} + \text{H}^+$, jeden FADH_2 a jeden acetyl-CoA. Oxidace acetyl-CoA v citrátovém cyklu vede k 12 ATP. Výtěžek oxidace jedné molekuly palmitátu je pak 129 molekul ATP.

6.2. Syntéza lipidů

Lipidy jsou syntetizovány ze svých precursorů, mastných kyselin a alkoholů. Významný alkohol pro syntézu lipidů, glycerol, může být získáván ze sacharidů, odbočkou z glykolytické dráhy.



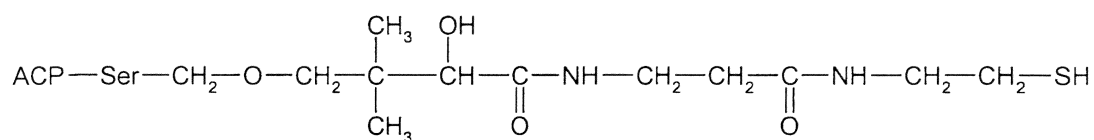
Syntéza vyšších mastných kyselin probíhá vlastní metabolickou drahou.

6.2.1. Biosyntéza mastných kyselin

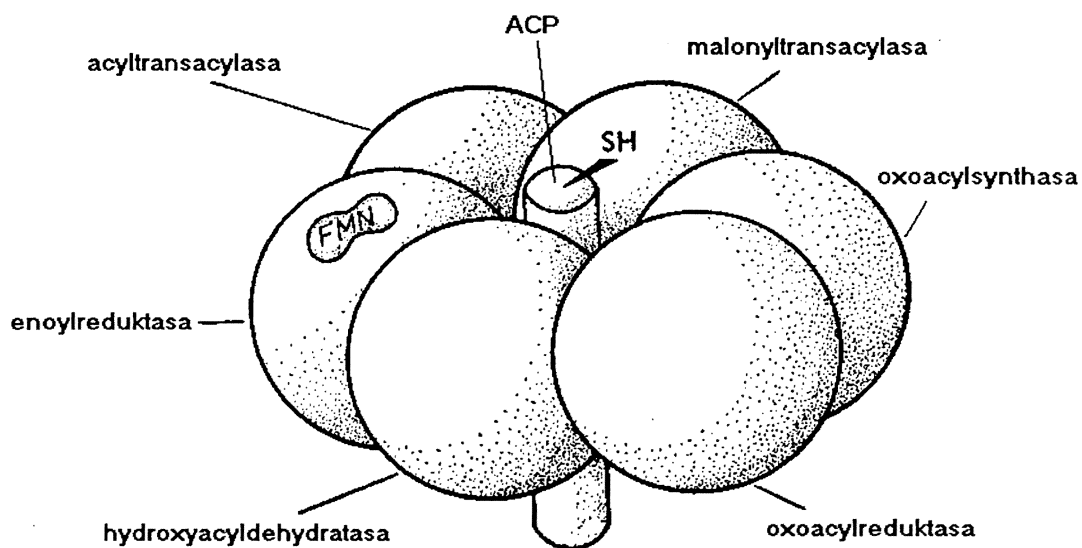
Biosyntéza mastných kyselin probíhá jako kondenzace jednotek C_2 , tedy, formálně, jako obrácená β -oxidace.

V roce 1945 dokázali David Rittenberg a Konrad Bloch, že prekurzorem pro syntézu mastných kyselin je aktivovaná kyselina octová. Brzy bylo zjištěno, že aktivovanou kyselinou je acetyl-CoA, ale až koncem 50.let objevil Salih Wakil, že meziproduktem syntézy je malonyl-CoA.

Biosyntéza mastných kyselin probíhá převážně v cytosolu. Katalyzuje ji multienzymový komplex (u bakterií a v rostlinách jsou tyto reakce katalyzovány nezávislými enzymy), jehož součástí je protein přinášející acylové skupiny (ACP = acyl carrier protein). Ten obsahuje, podobně jako CoA, fosfopantetheinovou skupinu, která tvoří thioestery s acylovými skupinami.



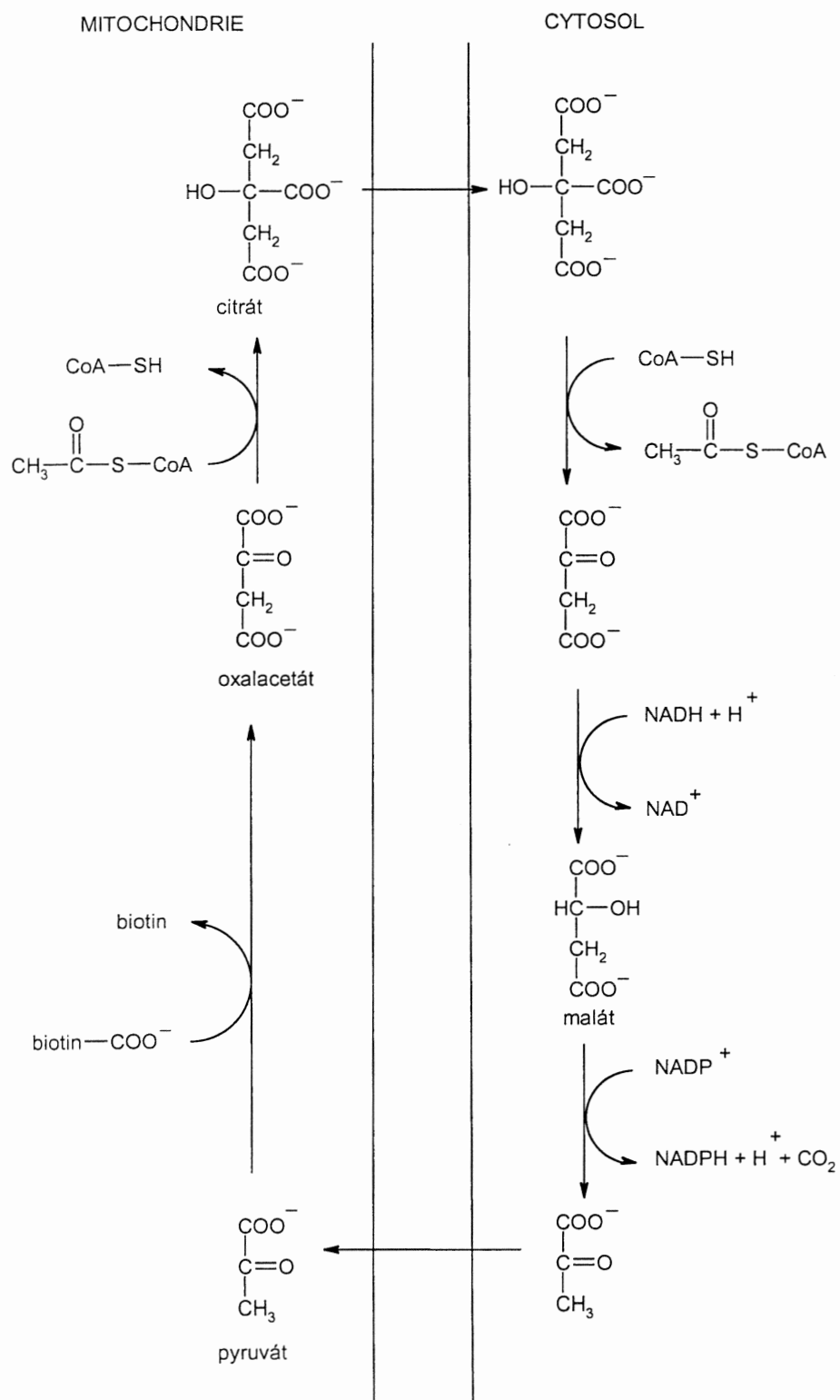
Celý komplex se nazývá synthasa mastných kyselin.



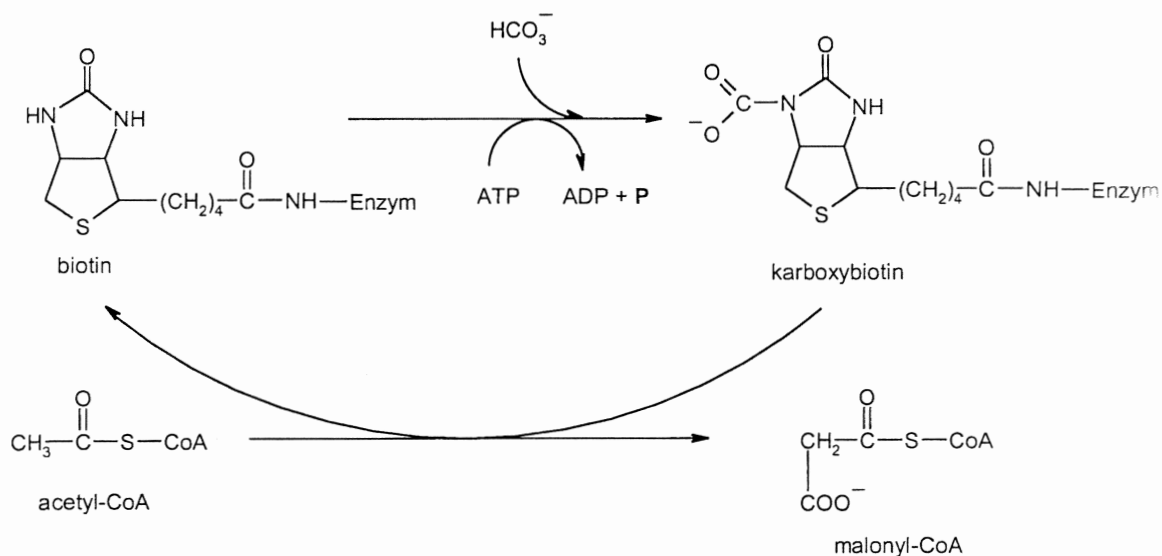
Transport acetyl-CoA

Acetyl-CoA, nutný pro biosyntézu mastných kyselin, vzniká v mitochondriích, ale biosyntéza mastných kyselin probíhá v cytosolu. Mitochondriální membrána je pro acetyl-CoA v podstatě nepropustná. Acetyl-CoA proto vstupuje do cytosolu ve formě citrátu pomocí specifického transportního systému (Obr. 30).

Prvním krokem biosyntézy mastných kyselin je tvorba malonyl-CoA. Tento děj zahrnuje dva kroky. Nejprve je aktivován CO_2 vazbou na biotin ze spotřeby ATP a následně dojde ke karboxylaci acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA. Celý děj katalyzuje acetyl-CoA-karboxylasa, která má biotin jako prostetickou skupinu. Změnou aktivity acetyl-CoA-karboxylasy je také řízena rychlost celé biosyntézy mastných kyselin (Obr.31).



Obr. 30 Transport acetyl-CoA mitochondriální membránou



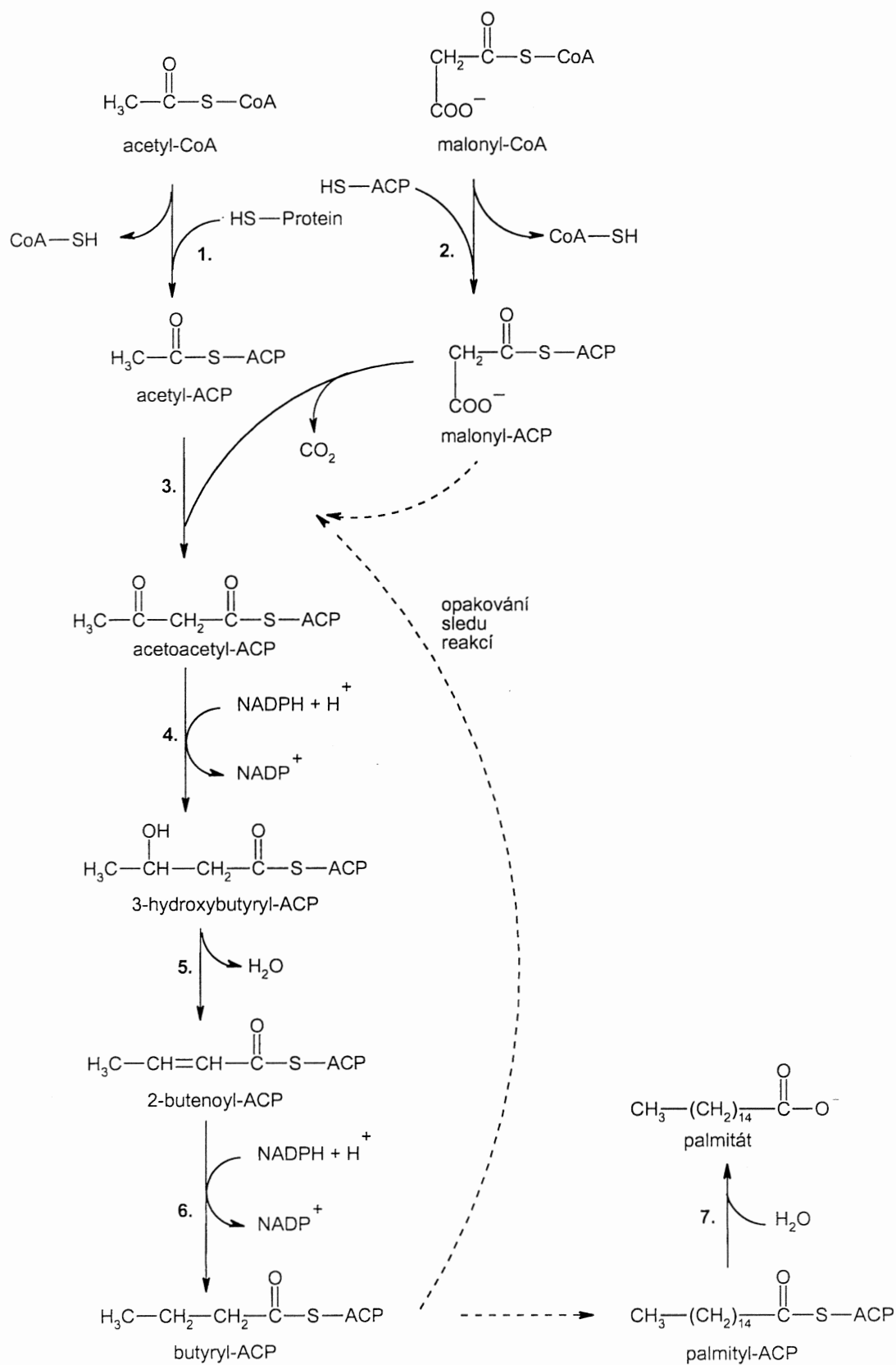
Obr. 31 Vznik malonyl-CoA

Vlastní syntéza mastných kyselin, hlavně kyseliny palmitové, z acetyl-CoA a malonyl-CoA zahrnuje sedm enzymových reakcí, které probíhají cyklicky. Metabolické schéma syntézy je uvedeno na obrázku 32. Jednotlivé enzymy jsou v následující tabulce:

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	acetyltransferasa	
2.	malonyltransferasa	
3.	acyl-malonyl-ACP kondenzační enzym	probíhá za současné dekarboxylace
4.	3-oxoacyl-ACP-reduktasa	spotřeba prvního $\text{NADPH} + \text{H}^+$
5.	3-hydroxyacyl-ACP dehydratasa	
6.	2-enoyl-ACP reduktasa	spotřeba druhého $\text{NADPH} + \text{H}^+$
7.	acyltransferasa	opakování první reakce

Po skončení prvního cyklu je na ACP znovu navázána malonylová skupina a následuje další cyklus, ve kterém je rostoucí mastná kyselina opět prodloužena o jednotku C_2 . Tento děj proběhne při tvorbě palmityl-ACP celkem sedmkrát. Thioesterová vazba je potom hydrolyzována palmitylthioesterasou za vzniku palmitátu.

Jednotlivých redukčních reakcí se účastní kofaktor $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Tato redukovaná forma kofaktoru se tvoří v pentosovém cyklu. Proto je syntéza mastných kyselin podmíněna i intenzivním průběhem tohoto metabolického děje.

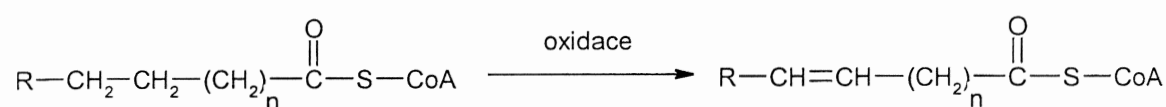


Obr. 32 Syntéza mastných kyselin

Elongace a desaturace

Palmitát, který obvykle vzniká jako první produkt syntézy mastných kyselin, je také prekurzorem dalších nasycených i nenasycených mastných kyselin. Tyto kyseliny vznikají působením enzymů elongas a desaturas. Elongace v endoplasmatickém retikulu probíhá mechanismem postupné kondenzace malonyl-CoA s acyl-CoA podobně jako při syntéze mastných kyselin. Jediný rozdíl je v tom, že mastná kyselina je prodlužována ve formě acyl-CoA, nikoli vázaná na ACP.

Nenasycené mastné kyseliny jsou produkovány terminálními desaturasami. Tyto enzymy, obsahující železo, katalyzují obecnou reakci :



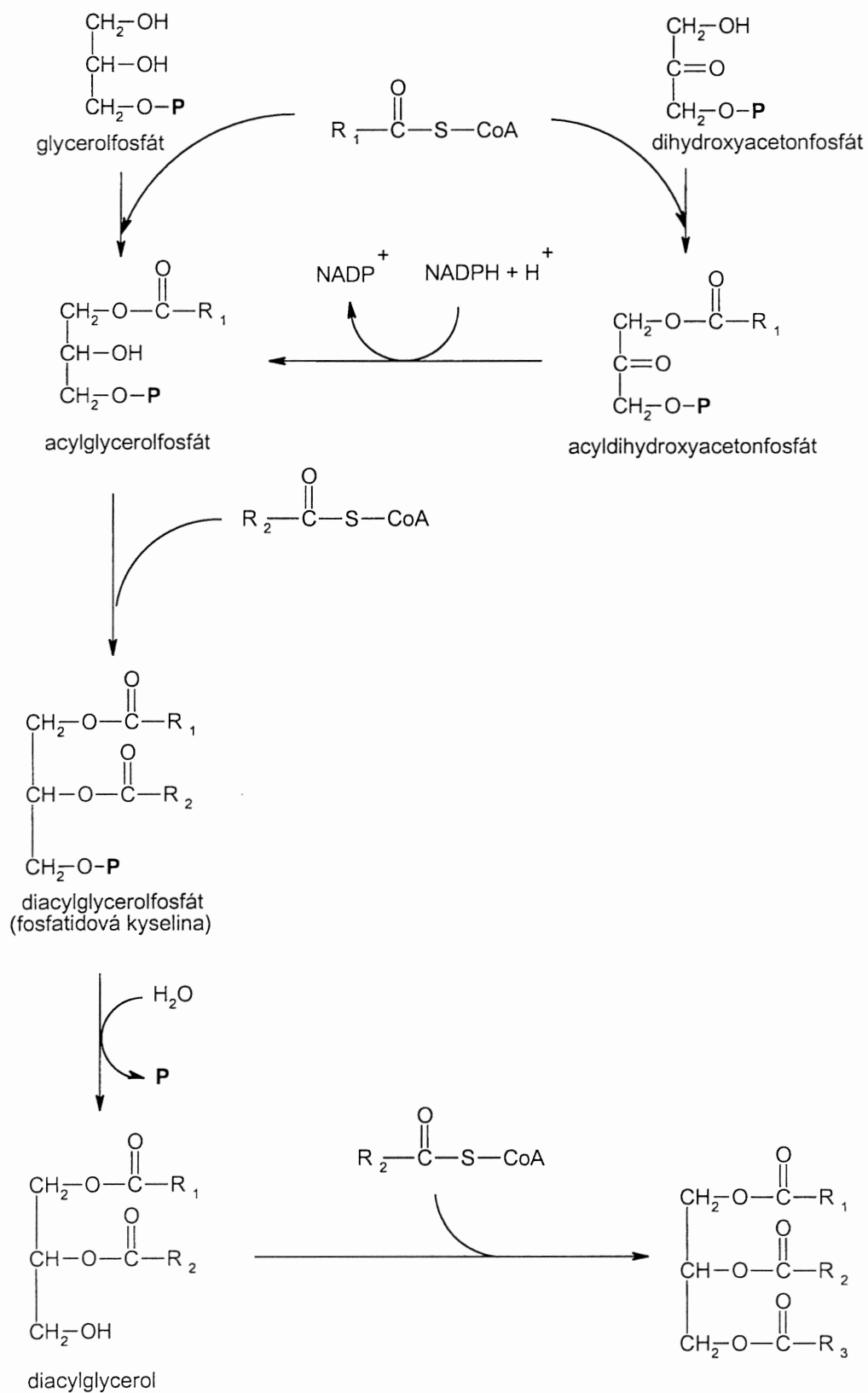
Různými kombinacemi prodlužování řetězce a vytváření dvojných vazeb může být syntetizována celá řada nenasycených mastných kyselin. Protože ale savčí organismy nemají všechny potřebné typy desaturas, nemohou syntetizovat všechny nenasycené kyseliny. Některé jsou proto pro ně esenciální (např. linolová nebo linolenová kyselina).

6.2.2. Syntéza triacylglycerolů a glycerolfosfatidů

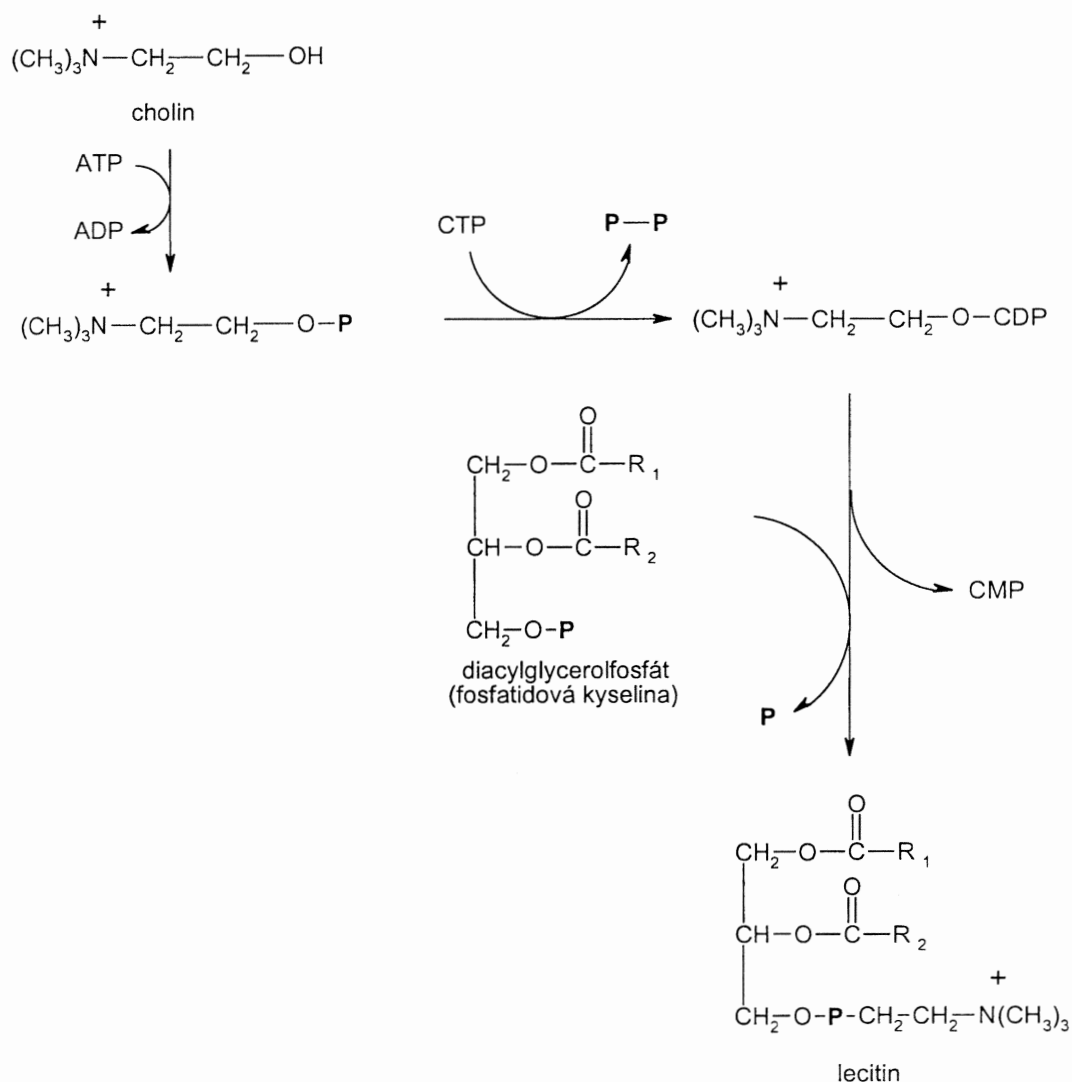
Triacylglyceroly jsou syntetizovány z acyl-CoA a z glycerol-1-fosfátu (Obr. 33).

Jeden z meziproduktů tohoto děje (fosfatidová kyselina) může sloužit pro syntézu glycerolfosfatidů.

Součástí molekuly glycerolfosfatidů jsou i různé dusíkaté sloučeniny, zejména aminoalkoholy. Aminoalkohol (např. cholin u lecithinů) je před vlastním přenosem na fosfatidovou kyselinu aktivován vazbou na CTP za vzniku CDP-cholinu. Metabolické schema syntézy lecithinů je uvedeno na obrázku 34.



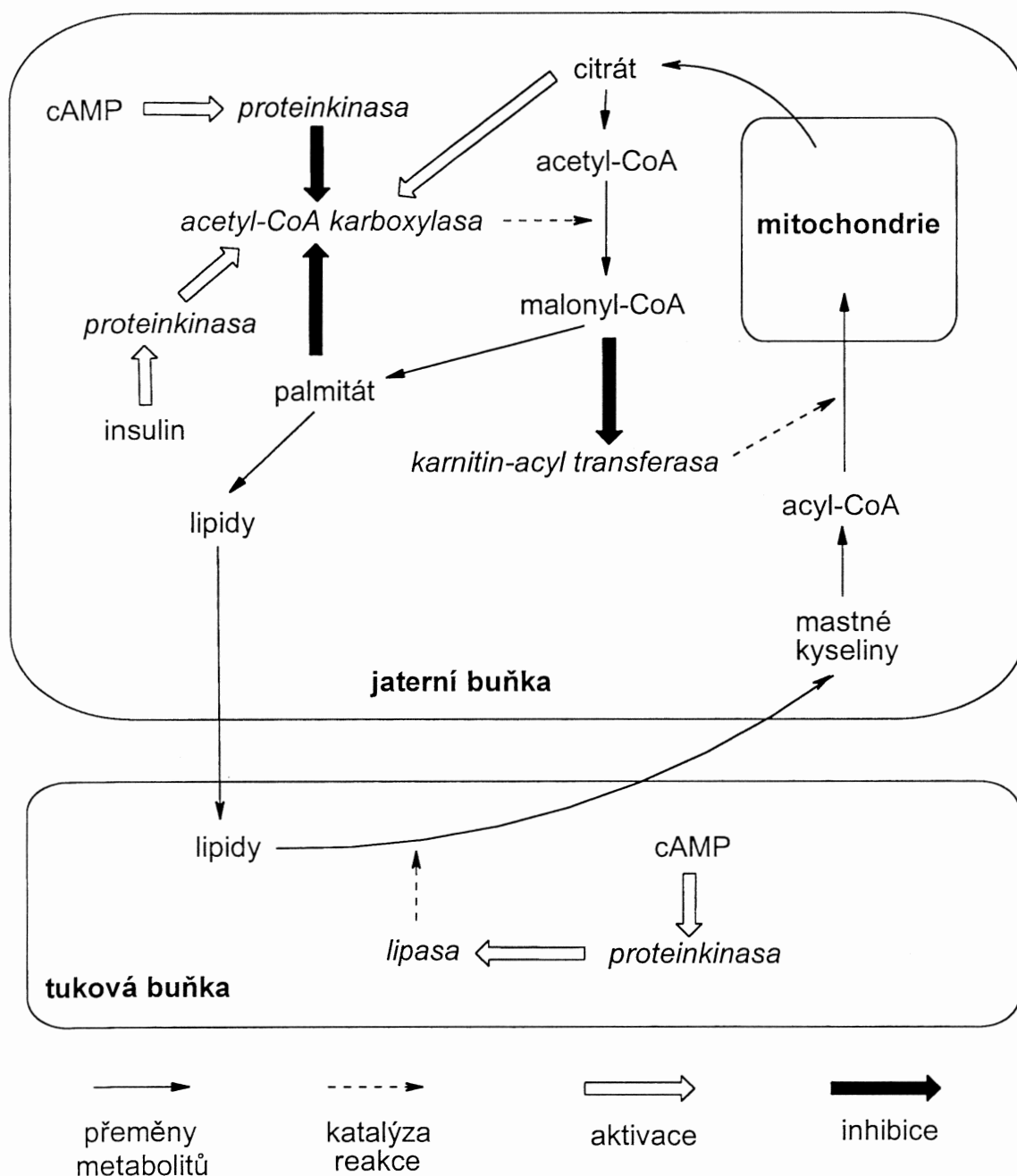
Obr. 33 Syntéza triacylglycerolů



Obr. 34 Syntéza lecithinů

Regulace metabolismu lipidů

Na obrázku 35 je uvedeno celkové schema metabolismu lipidů. Jednotlivé metabolické dráhy probíhají v různých buňkách nebo organelách buněk a jsou tedy ovlivňovány také transportními procesy. Hlavními regulačními mechanismy jsou allosterická regulace a kovalentní modulace (fosforylace) enzymů. Metabolismus lipidů je u živočichů primárně řízen hormonálně a jejich prostřednictvím těsně spjat s metabolismem jiných látek, zejména sacharidů. Hlavními hormony, které se zde uplatňují, jsou glukagon nebo adrenalin, které ovlivňují zejména koncentraci cAMP. Ten působí jako allosterický aktivátor cAMP-dependentních proteinkinás (na cAMP závislých). Jiným významným hormonem je inzulin, který ovlivňuje aktivitu AMP-independentních proteinkinás (na cAMP nezávislých). Proteinasy pak aktivují nebo deaktivují klíčové enzymy.



Obr. 35 Schema regulace metabolismu lipidů

Oxidace mastných kyselin je z velké části regulována koncentrací mastných kyselin v krvi. Ta je dána rychlostí hydrolýzy triacylglycerolu v tukové tkáni. Reakci katalyzuje triacylglycerollipasa. Enzym je aktivován fosforylací, kterou katalyzuje cAMP-dependentní proteinkinasa. Zvýšení koncentrace cAMP působí adrenalin, noradrenalin a glukagon. Insulin zde působí snížením koncentrace cAMP. To vede k defosforylaci a tedy inaktivaci triacylglycerollipasy.

Rychlost syntézy mastných kyselin určuje zejména acetyl-CoA-karboxylasa (vytváří malonyl-CoA). Tento enzym je inhibován fosforylací cAMP-dependentní proteinkinasy, takže fosforylace závislá na cAMP zároveň stimuluje oxidaci mastných kyselin a inhibuje jejich syntézu. Insulin působí opačně. Stimuluje aktivitu cAMP-independentní proteinkinasy, která fosforyluje proteiny na jiných místech než cAMP-dependentní proteinkinasa. Acetyl-CoA-karboxylasa je touto cAMP-independentní (insulin dependentní) fosforylací aktivována. Tento enzym je kromě toho allostericky regulován citrátem a palmityl-CoA. Citrát acetyl-CoA-karboxylázu aktivuje, zatímco palmityl-CoA inhibuje.

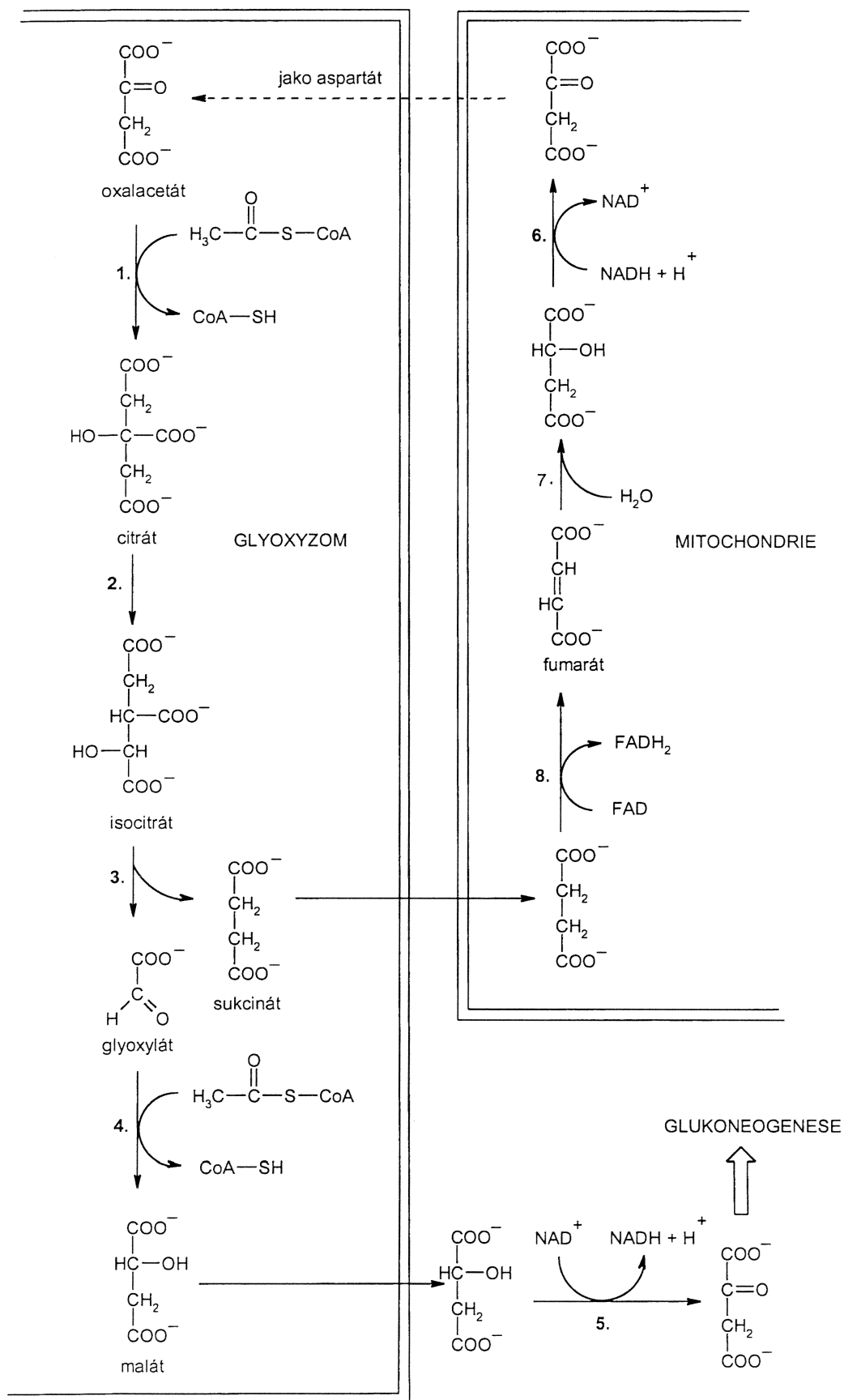
Dalším kontrolním bodem, který inhibuje oxidaci mastných kyselin (je-li stimulována jejich syntéza), je inhibice karnitin-acyltransferasy působením malonyl-CoA. Díky této inhibici zůstávají nově syntetizované mastné kyseliny vně mitochondrie a tedy mimo dosah systému β -oxidace.

Popsaný mechanismus funguje u živočišných organismů. U prokaryot je acetyl-CoA-karboxylasa regulována prostřednictvím guaninových nukleotidů, protože mastné kyseliny jsou zde syntetizovány v souvislosti s buněčným růstem. Je tomu tak proto, že v těchto organismech mastné kyseliny nejsou ukládány jako tuky, ale fungují převážně jako prekursory fosfolipidů.

6.3. Glyoxylátová dráha

Rostliny mají, na rozdíl od živočichů, enzymy, které převádějí acetyl-CoA na oxalacetát a tak umožňují využití mastných kyselin pro syntézu sacharidů. Tento proces se nazývá glyoxylátová dráha. (Obr.36). Celý děj probíhá částečně v mitochondriích a zejména v glyoxysomech. Enzymy jsou uvedeny v tabulce:

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	citrátsynthasa	obdobu reakce citrátového cyklu
2.	akonitasa	obdobu reakce citrátového cyklu
3.	isocitrátlyasa	první klíčový enzym glyoxylátového cyklu
4. a 7.	malátsynthasa	druhý klíčový enzym glyoxylátového cyklu
5. a 6.	malátdehydrogenasa	v cytosolu
8.	sukcinátdehydrogenasa	



Obr. 36 Schema glyoxylátové dráhy

V glyoxylátové dráze tedy vzniká ze dvou molekul acetyl-CoA oxalacetát, který je využíván v glukoneogenezi pro syntezu glukosy. Isocitrátlyasa a malátsynthasa, jediné enzymy glyoxylátové dráhy obsažené pouze v rostlinách, umožňují klíčícím semenům rostlin převádět jejich zásobní triacylglyceroly přes acetyl-CoA na glukosu a jiné metabolity.

6.4. Metabolismus lipidních látek

Acetyl-CoA je významnou vstupní látkou pro syntézu řady tzv. lipidních, ale i mnoha jiných, biochemicky velmi významných, látek. Za mnohé lze uvést syntézu isoprenoidních látek (terpeny, steroidy).

V biosyntéze izoprenoidů vystupuje jako významný meziprodukt geranyldifosfát (prekurzor monoterpenů). Jeho následnými přeměnami vzniká např. skvalen (prekurzor sterolů) nebo fytoen (prekurzor karotenoidů).



7. METABOLISMUS SLOUČENIN DUSÍKU

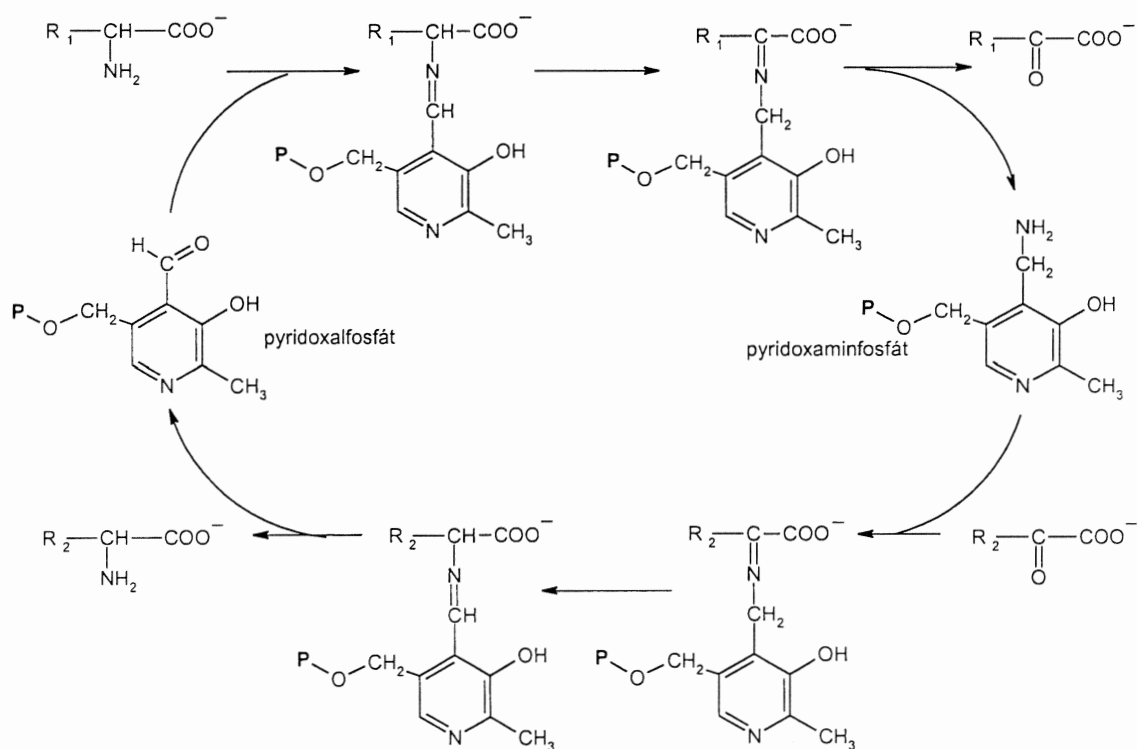
Úloha α -aminokyselin nespočívá pouze v jejich účasti na stavbě proteinů. Jsou i významnými metabolity využitelnými v energetice buňky a také prekursory mnoha dalších důležitých dusíkatých sloučenin (hem, fyziologicky aktivní aminy a peptidy, nukleotidy a nukleotidové koenzymy).

Metabolické přeměny jednotlivých aminokyselin jsou velmi rozmanité. V dalším textu jsou proto uvedeny jen obecnější principy těchto procesů.

7.1. Katabolismus aminokyselin

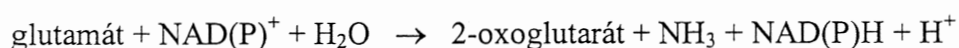
Katabolismus aminokyselin lze v principu rozdělit na dva kroky. Prvním je téměř vždy odštěpení α -aminoskupiny. Tím je umožněno odstranění nadbytečného dusíku z organismu. Ve druhém kroku je dále štěpena zbývající uhlíková kostra.

K odstranění α -aminoskupiny u většiny aminokyselin dochází při deaminační reakci zvané transaminace. Při ní se aminoskupina přenáší z aminokyseliny na 2-oxokyselinu. Vzniká tak 2-oxokyselina z původní aminokyseliny a nová aminokyselina z původní oxokyseliny. Transaminace je nejvýznamnější reakcí aminokyselin. Reakce jsou katalyzovány aminotransferasami (transaminasami). Ty využívají specifický kofaktor, který se vyskytuje ve dvou formách – pyridoxalfosfát a pyridoxaminfosfát.

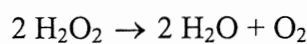
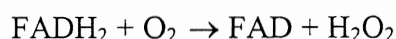
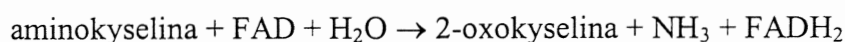


Převažujícím akceptorem aminoskupiny je 2-oxoglutarát, který se mění na glutamát. Při transaminaci tak nedochází ke kvantitativní deaminaci, jde pouze o přenos aminoskupin.

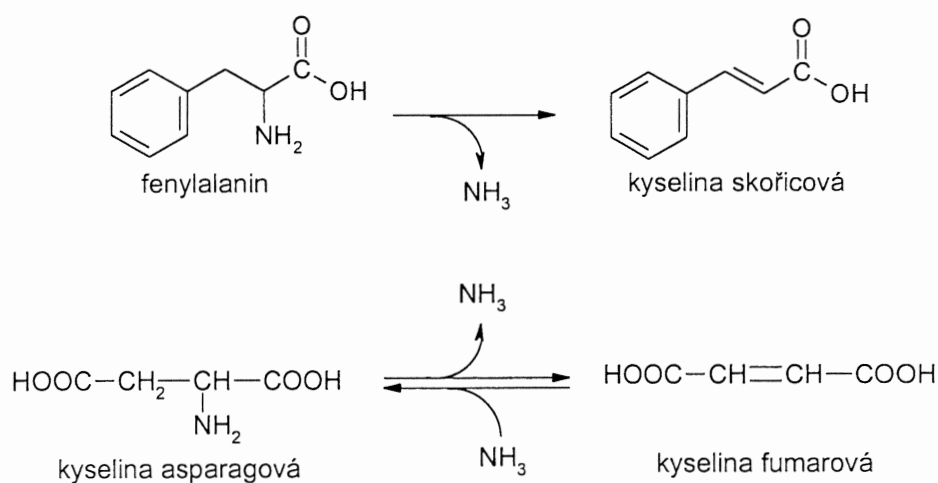
K deaminaci dochází převážně během oxidace (oxidační deaminace) glutamátu glutamátdehydrogenasou, při níž se uvolňuje amoniak. Tato reakce, kdy se vznikající 2-oxoglutarát využívá zejména pro další transaminace, vyžaduje jako oxidační činidlo NAD^+ nebo NADP^+ :



Méně významná oxidační deaminace probíhá za účasti FAD při oxidaci různých L- i D-aminokyselin. Výsledný FADH_2 je znovu oxidován kyslíkem a vznikající H_2O_2 je rozkládán katalasou.

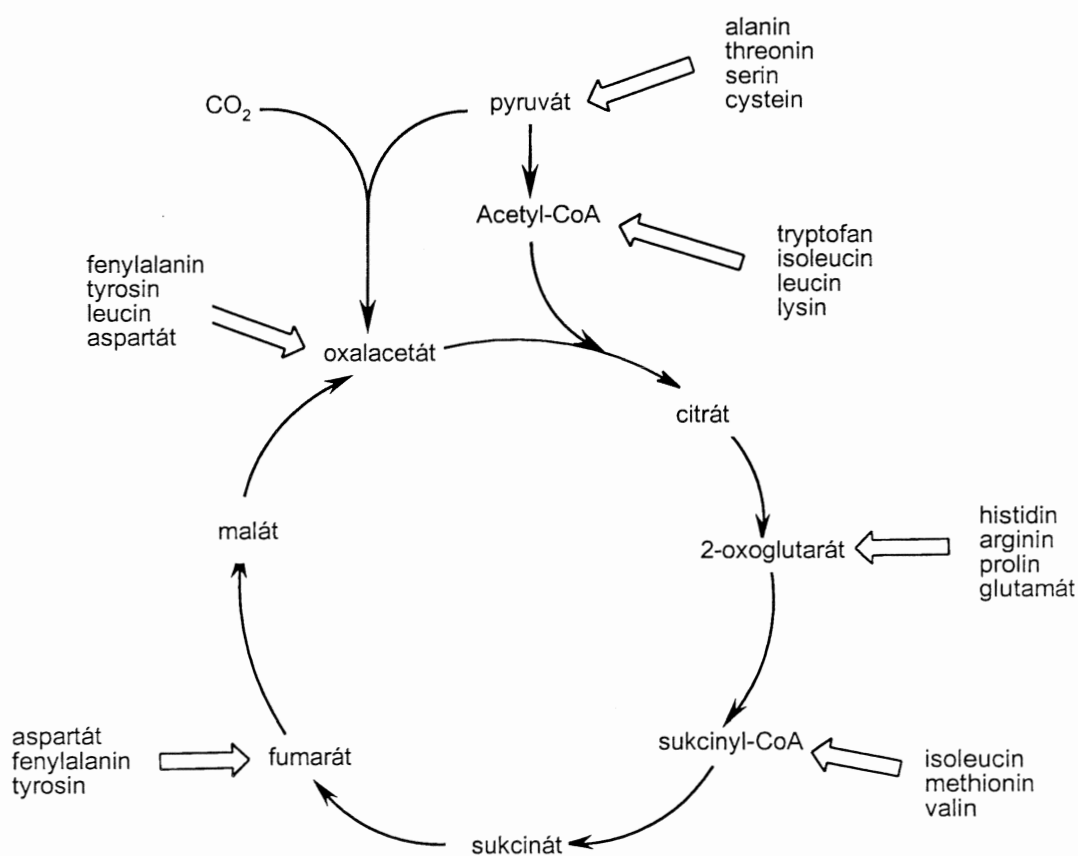


Třetí deaminační reakcí je tzv. lyasová deaminace. Reakce je charakteristická zejména pro kyselinu asparagovou, ale podléhají jí i jiné aminokyseliny, zejména aromatické. Z fenylalaninu tak vzniká kyselina skořicová. Tato kyselina (a její deriváty) slouží v rostlinách pro syntézu ligninu a flavonoidů.



Deaminací se aminokyseliny přeměňují na meziproducty citrátového cyklu nebo jejich prekursory a mohou tak být metabolisovány až na CO_2 a H_2O nebo využity v glukoneogenezi. Všechny základní aminokyseliny jsou degradovány na jeden z následujících sedmi metabolitů : pyruvát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát, oxalacetát, acetyl-CoA a acetoacetát. Podle toho mohou být rozděleny (u živočichů) do dvou skupin.

- Glukogenní aminokyseliny, jejichž uhlíkaté kostry jsou degradovány na prekursory glukosy: pyruvát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát nebo oxalacetát.
- Ketogenní aminokyseliny, jejichž uhlíkaté kostry jsou rozloženy na acetyl-CoA a acetoacetát, které se posléze přeměňují na mastné kyseliny a ketolátky.



Jak je vidět, mohou mnohé aminokyseliny vystupovat v obou skupinách. Jedinou čistě ketogenní aminokyselinou je leucin.

7.1.1. Ornithinový cyklus

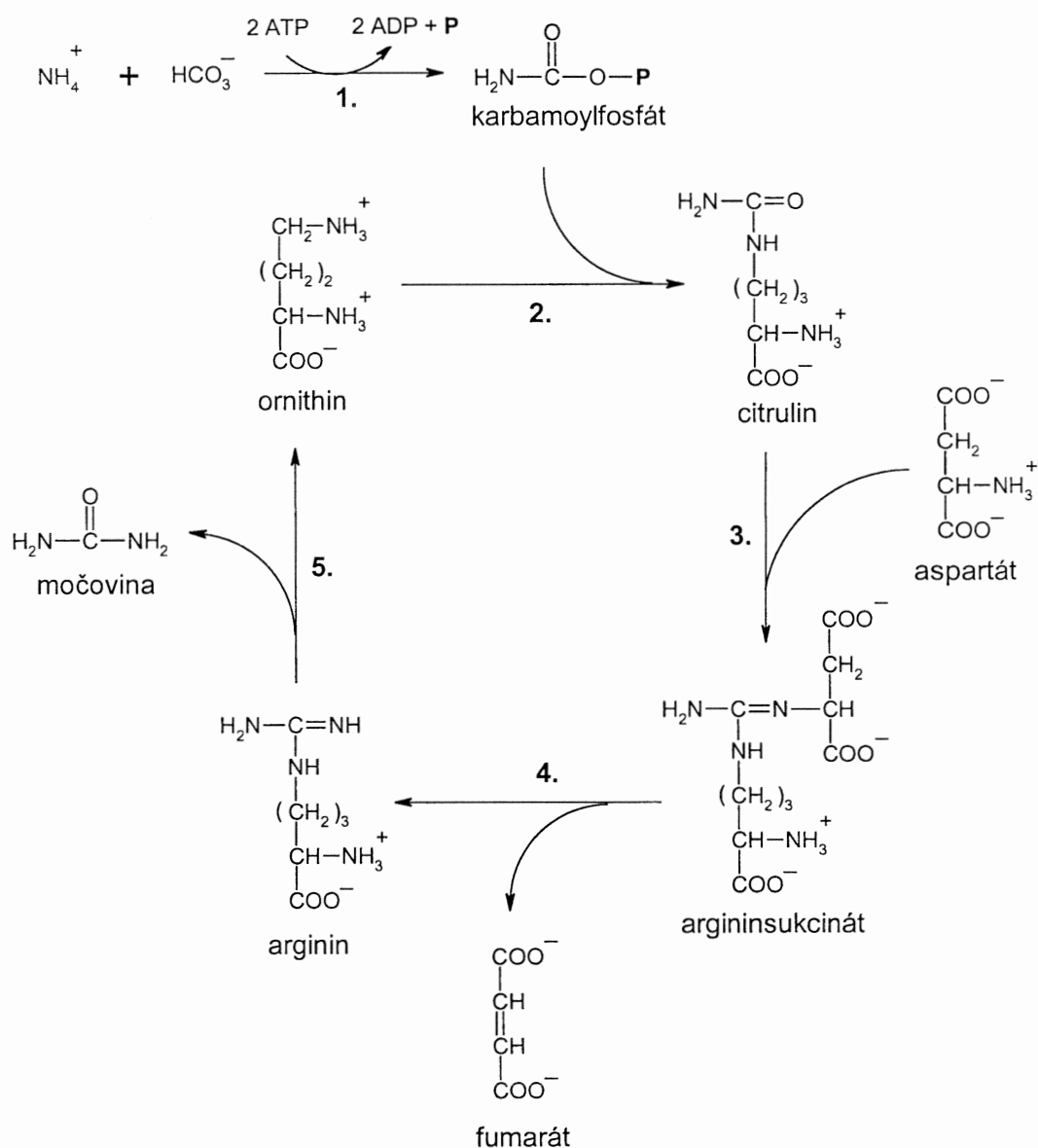
Amoniak je pro buňky toxický. Mnoho vodních živočichů je schopno amoniak jednoduše přímo vylučovat. Tam, kde není vody dostatek, bylo nutno během evoluce vytvořit systém přeměňující amoniak na méně toxické odpadní produkty, jejichž vylučování nevyžaduje velké množství vody. Jednou z těchto odpadních látek je močovina, kterou vylučuje většina suchozemských obratlovců. Další je močová kyselina, kterou vylučují ptáci a suchozemští plazi. Podle způsobu vylučování nadbytečného dusíku se živočichové dělí na amonotelní (vylučující amoniak), ureotelní (vylučující močovinu) a urikotelní (vylučující kyselinu močovou). Některé organismy mohou svůj vylučovací mechanismus při nedostatku vody přepnout z amonotelního na ureotelní nebo urikotelní.

Močovina se syntetizuje v játrech za pomoci enzymů ornithinového (močovinového, malého Krebsova) cyklu, poté se krevním oběhem dostává do ledvin a nakonec se vylučuje z organismu močí. Význam ornithinové cyklu spočívá, vedle detoxikace amoniaku, i v biosyntéze argininu.

Ornithinový cyklus byl zhruba objasněn Hansem Krebsem a Kurtem Henseleitem v roce 1932 jako první ze všech metabolických cyklů (cyklus kyseliny citronové Krebs popsal až v roce 1937). Jednotlivé reakce cyklu byly později podrobně popsány Sarah Ratnerovou a Philipem Cohenem.

Metabolická dráha močovinového cyklu je uvedena na obrázku 37 a jednotlivé enzymy v následující tabulce.

Reakce	Enzym	Poznámka
1.	karbamoylfosfátsynthetasa	mitochondrie
2.	ornithin-karbamoyltransferasa	mitochondrie
3.	argininsukcinátsynthasa	cytosol
4.	argininsukcinátlyasa	cytosol
5.	arginasa	cytosol



Obr. 37 Schema ornithinového cyklu

Dva atomy dusíku v močovině pocházejí z amoniaku a aspartátu, zatímco uhlík je poskytován hydrogenkarbonátem. Ornithin a citrulin jsou mitochondriální membránou přenášeny specifickými transportními mechanismy.

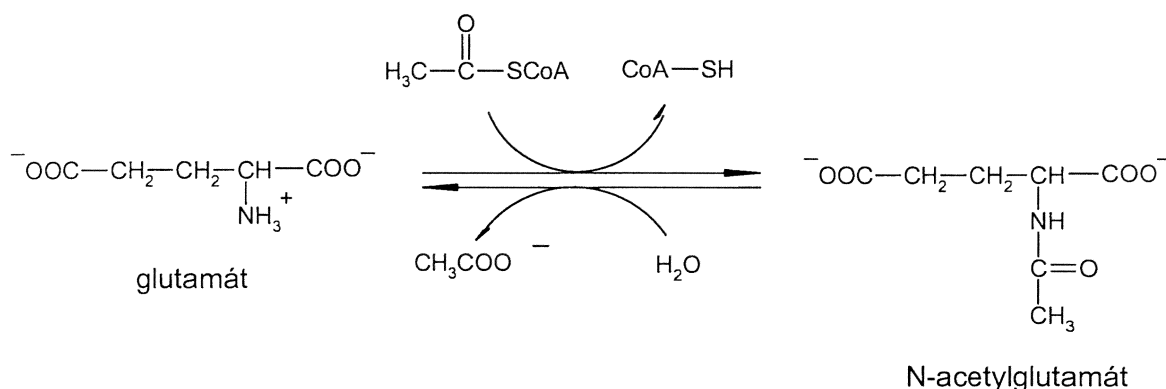
Karbamoylfosfátsynthetasa (CPS) není účastníkem ornithinového cyklu. Katalyzuje kondenzaci a aktivaci NH_4^+ a HCO_3^- . Při tom za spotřeby dvou ATP vzniká karbamoylfosfát, který je substrátem cyklu. U eukaryot se vyskytují dva typy CPS:

- Mitochondriální CPS I, která využívá jako donor dusíku amoniak a účastní se biosyntézy močoviny.

- Cytosolová CPS II používá jako donor dusíku glutamin a podílí se na biosyntéze pyrimidinů

Regulace ornithinového cyklu

Cyklus je u živočichů regulován zejména enzymem karbamoylfosfátsynthetasa I. Ten je allostericky aktivován N-acetylglutamátem. Tento metabolit je syntetizován N-acetylglutamátsynthasou z glutamátu a acetyl-CoA a hydrolyzován je specifickou hydrolasou.



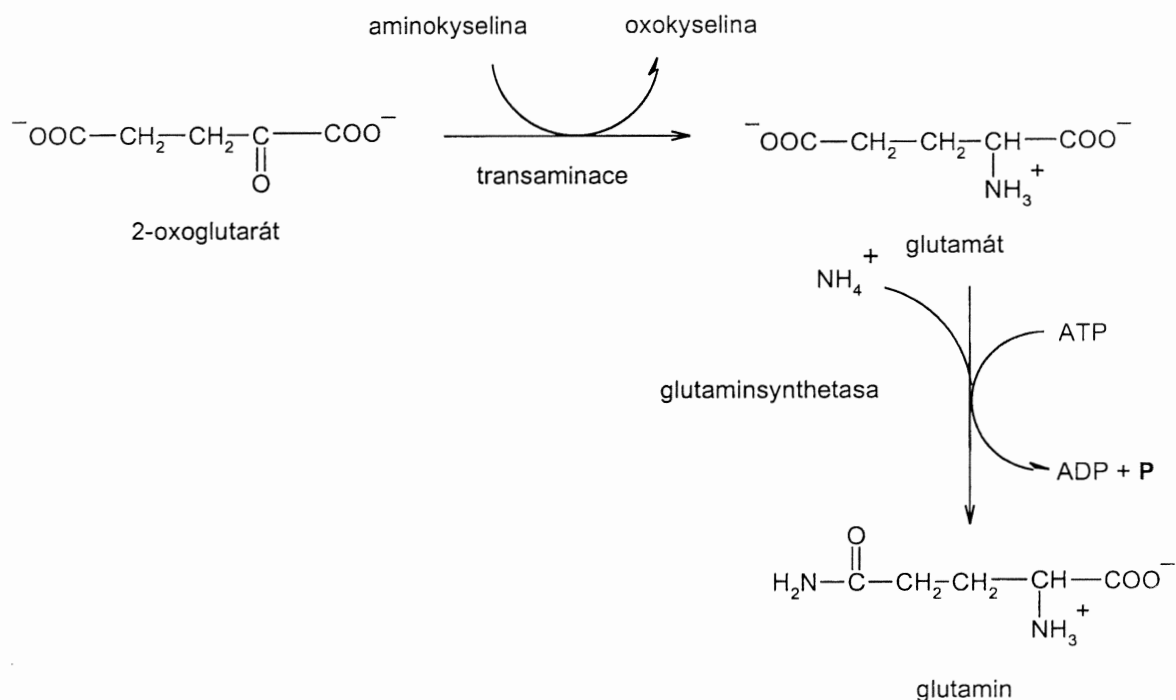
Vzestup degradace aminokyselin vede ke zvýšení koncentrace glutamátu vznikajícího v transaminasových reakcích. Současně se tvoří nadbytek amoniaku, který musí být odstraněn zrychlením tvorby močoviny. Při zvýšené koncentraci glutamátu dochází k vyšší syntéze N-acetylglutamátu, ten stimuluje karbamoylfosfátsynthetasu I a tím celý močovinový cyklus. Aktivita ostatních enzymů v cyklu je regulována koncentrací jejich substrátů.

7.2. Biosyntéza aminokyselin

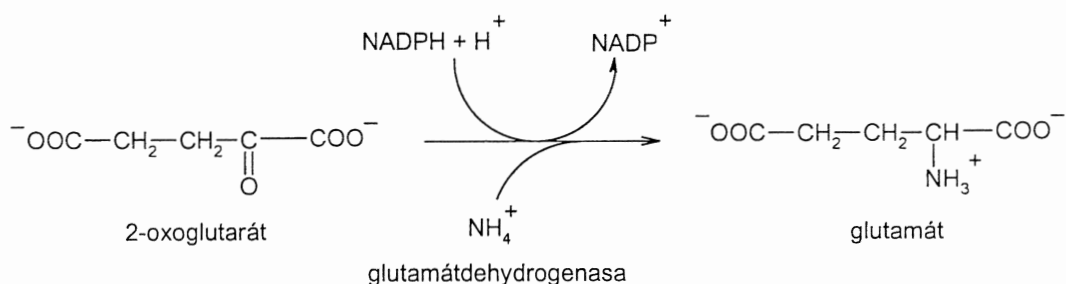
Syntéza některých aminokyselin probíhá pouze v rostlinách a mikroorganismech. Tyto aminokyseliny se nazývají esenciální (nezbytné), protože je živočichové mohou získat pouze potravou. Ostatní aminokyseliny, které mohou živočichové syntetizovat z běžných metabolitů, se nazývají neesenciální. Biosyntéza všech neesenciálních aminokyselin (s výjimkou tyrosinu) probíhá poměrně jednoduše a vychází ze čtyř běžných metabolických intermediátů: pyruvátu, oxalacetátu, 2-oxoglutarátu a 3-fosfoglycerátu. Všechny tyto intermediáty jsou (nebo mohou tvořit) oxokyseliny a jejich

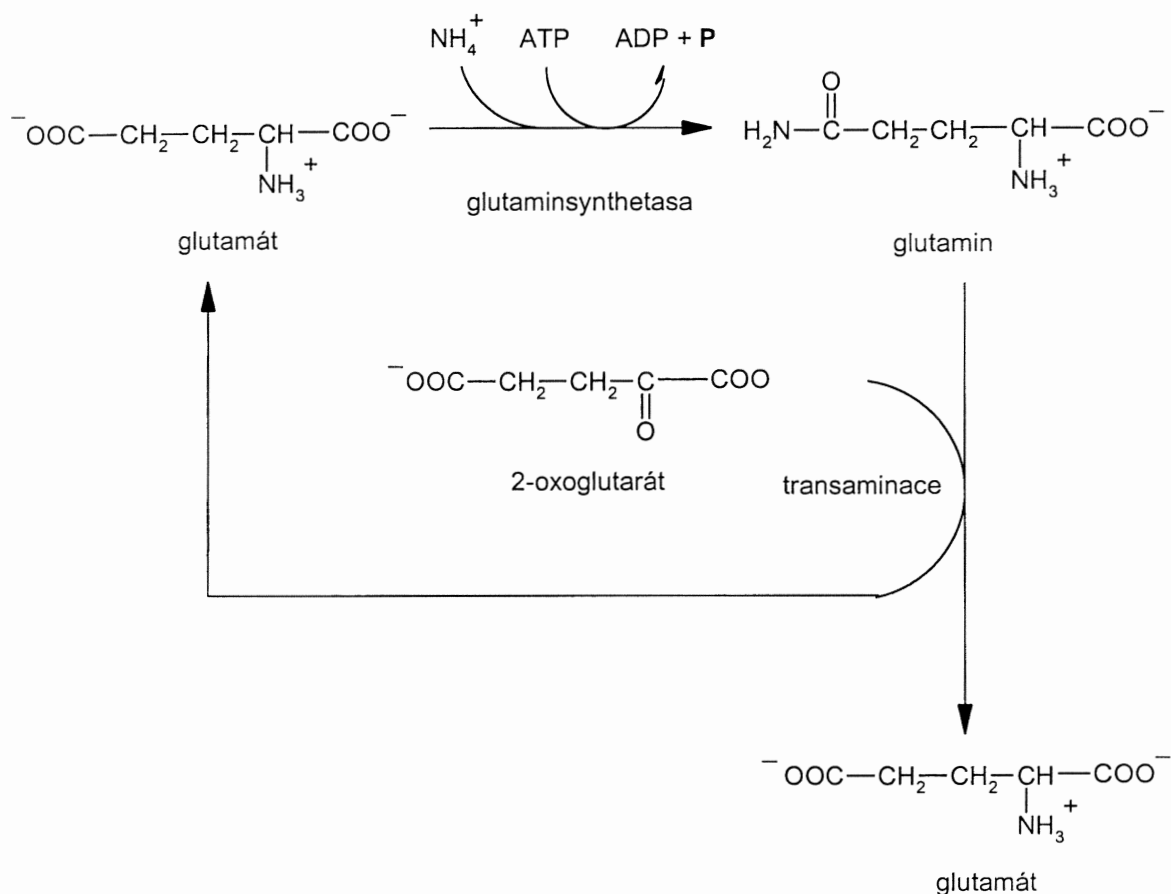
přeměna na aminokyseliny probíhá mechanismem transaminace. Jako primární zdroj aminodusíku zde slouží zejména glutamát nebo glutamin.

Ústředním bodem regulace metabolismu dusíku u živočichů je právě syntéza glutaminu, katalyzovaná glutaminsynthetasou. Tento enzym je u savců aktivován 2-oxoglutarátem.



Protože živočišné organismy využívají jako primární zdroj aminodusíku organické dusíkaté látky (glutamát, glutamin), musí tyto organické látky vznikat primárně v autotrofních organismech (roślinách, některých bakteriích) z anorganických forem dusíku, což je zejména N_2 , NO_3^- a NH_4^+ . Pro syntézu glutamátu a glutaminu je bezprostředně využíván NH_4^+ , který je rostlinou přijímán přímo nebo syntetizován z N_2 a NO_3^- . Glutamát a glutamin jsou syntetizovány dvěma alternativními reakcemi.

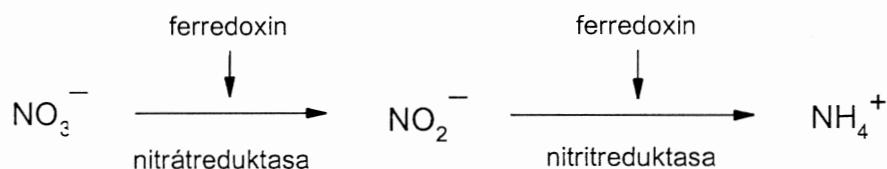




7.2.1. Fixace anorganických forem dusíku

Dusík a nitráty jsou redukovány na NH_4^+ biochemickými procesy, které se mohou lišit podle druhu organismu, který je uskutečňuje. Obecný mechanismus těchto dějů je následující:

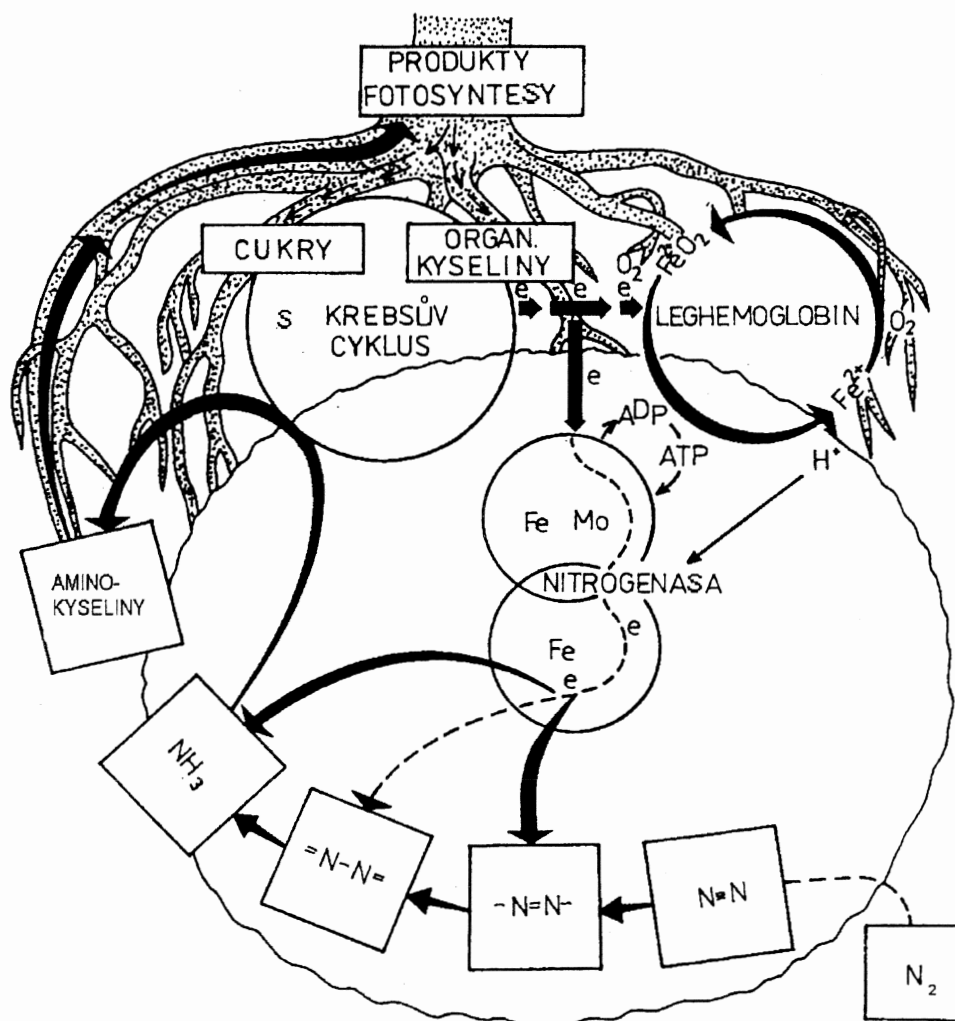
Nitrát se na NH_4^+ redukuje ve dvou stupních. Prvním stupněm je redukce NO_3^- na NO_2^- , kterou katalyzuje nitrátreduktasa. Druhý stupeň uskutečňuje tzv. nitritreduktasa. Zdrojem elektronů pro tyto enzymy jsou různé redukované kofaktory ($NADPH+H^+$, ferredoxin).



Fixace molekulárního dusíku

Redukce molekulární formy dusíku (N_2) na NH_4^+ je energeticky velmi náročný pochod, který uskutečňuje pouze několik druhů bakterií. Nejvýznamnější z nich jsou bakterie rodu *Rhizobium*, žijící v symbióze s kořínky některých rostlin (např. fazole, jetel,

vojtěška), které přeměňují dusík na NH_4^+ přes řadu meziproduktů. Elektrony pro tento redukční proces jsou, podle druhu organismu, dodávány buď oxidačními procesy nebo z fotosyntézy. Vlastní redukci N_2 katalyzuje enzym nitrogenasa, která se skládá z několika proteinů, obsahujících ionty Fe a Mo.



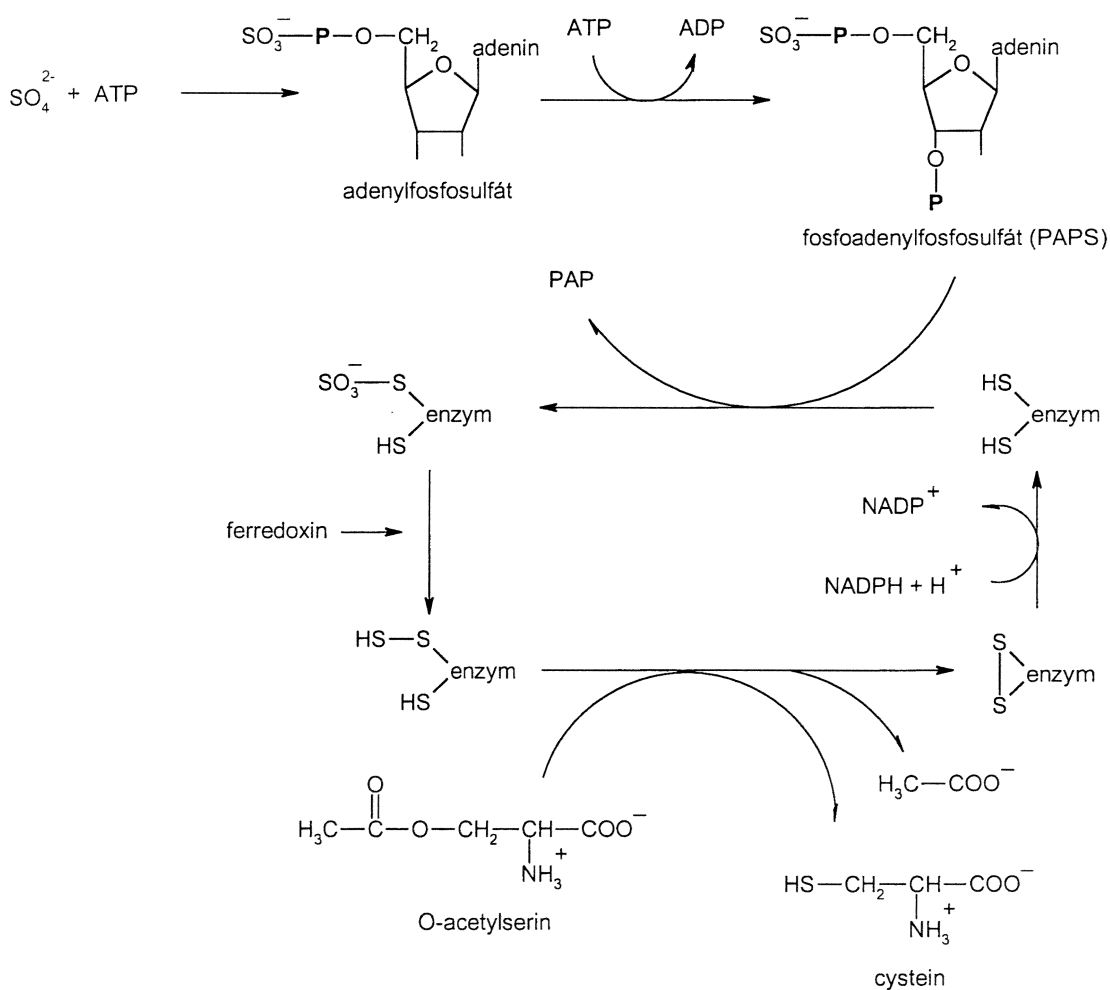
Vznikající amoniak může být zabudován buď do glutamátu (glutamátdehydrogenasa) nebo do glutaminu (glutaminsynthetasa). Při tomto typu fixace se tvoří mnohem více metabolicky využitelné formy dusíku než potřebují rostliny. Nadbytečný NH_4^+ je uvolňován do půdy.

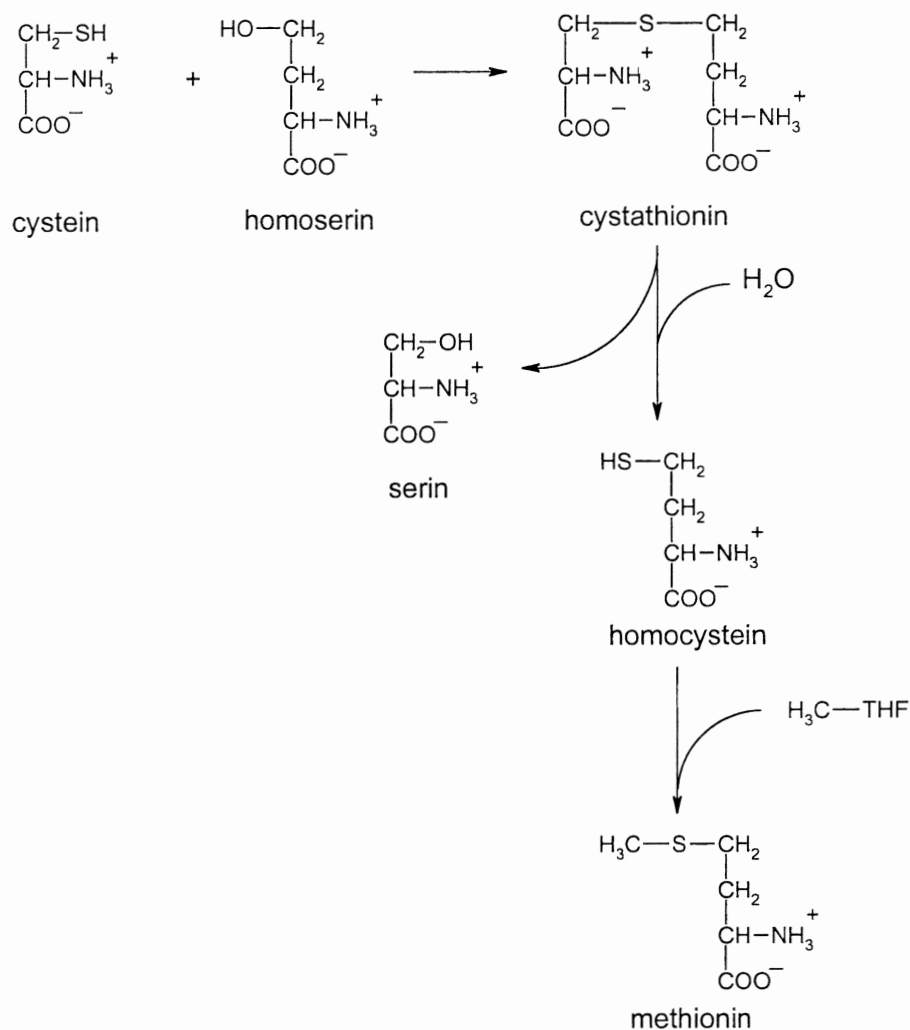
Nitrogenasa je rychle inaktivována kyslíkem. Proto je v kořenových hlízkách ochrana před kyslíkem zajištěna leghemoglobinem, což je protein funkčně podobný hemoglobinu.

7.2.2. Metabolismus sirných aminokyselin

Významným biogenním prvkem je síra. Tento prvek se vyskytuje v řadě významných bioorganických látek. (cystein, methionin, CoA apod.) Prvními organickými sloučeninami síry, které vznikají v autotrofních organismech, jsou sirné aminokyseliny. Ostatní organismy musí síru získávat právě v podobě těchto aminokyselin. Jako zdroj síry je autotrofními organismy využíván zejména sulfát (SO_4^{2-}).

Biochemické schéma přeměny sulfátu na sirné aminokyseliny je následující:



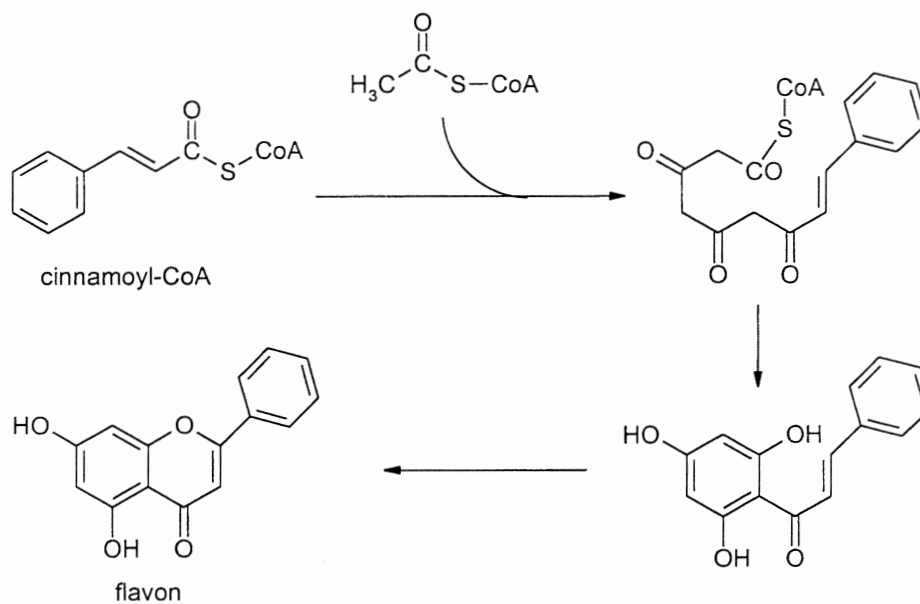


Živočichové nedovedou syntetizovat cystein nebo homocystein ze sulfátu, ale tvoří cystein z methioninu přes homocystein (v podstatě „obrácením“ některých reakcí ve schématu).

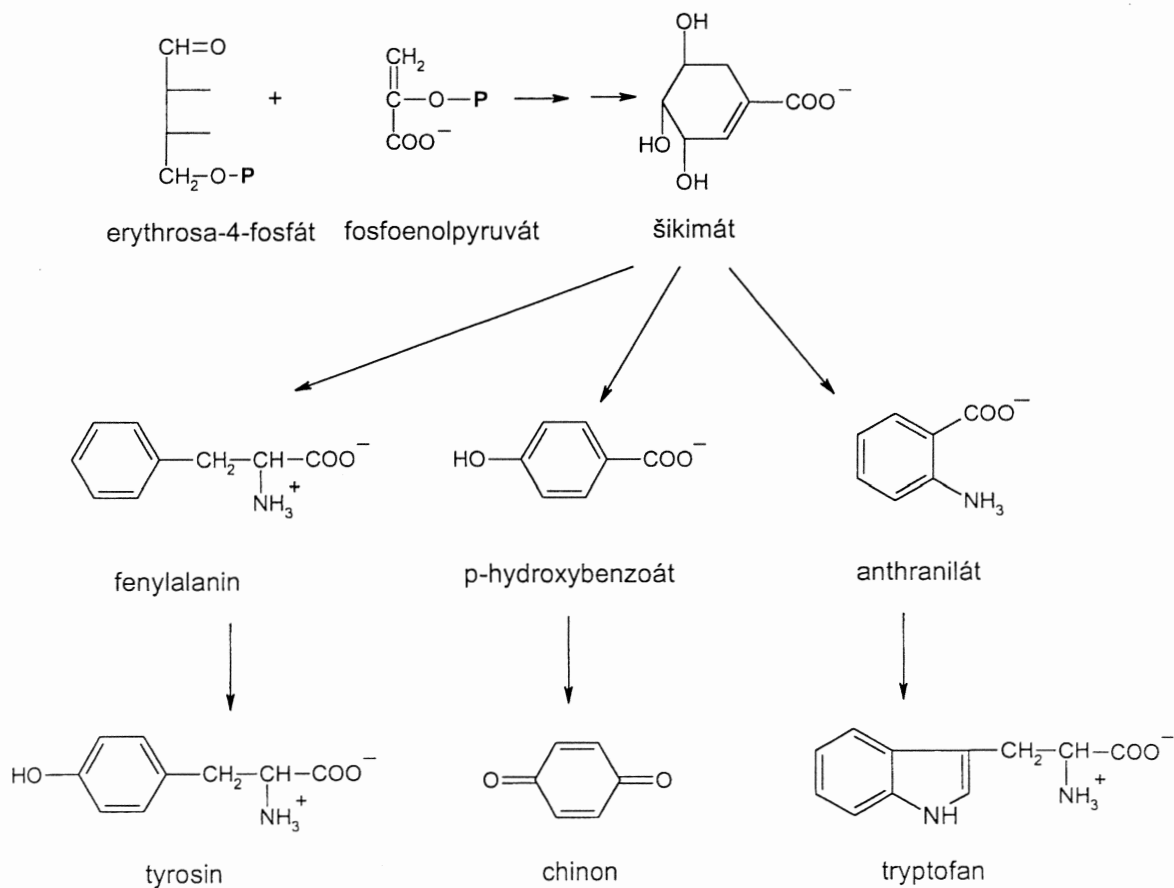
Cystein, jako primární sirná organická látka, se účastní celé řady biochemických procesů. Z meziproductů je významná kyselina cysteová, která slouží k syntéze sulfolipidů nebo taurin, který se u živočišných organismů účastní syntézy žlučových kyselin.

Při vylučování síry z živočišných organismů je patrně nejvýznamnější přeměna kyseliny cysteinsulfínové až na sírany. Ty jsou pak obvykle vylučovány ve formě esterů s oligosacharidy nebo fenolickými látkami.

Tímto mechanismem probíhá biosyntéza některých antibiotik (tetracyklin) a dalších látek, např. flavonoidů (z aktivované kyseliny skořicové a acetyl CoA).



Většina autotrofních organismů ale syntetizuje aromáty v tzv. šikimátové dráze, nazvané podle významného meziproductu - kyseliny šikimové (šikimátu).

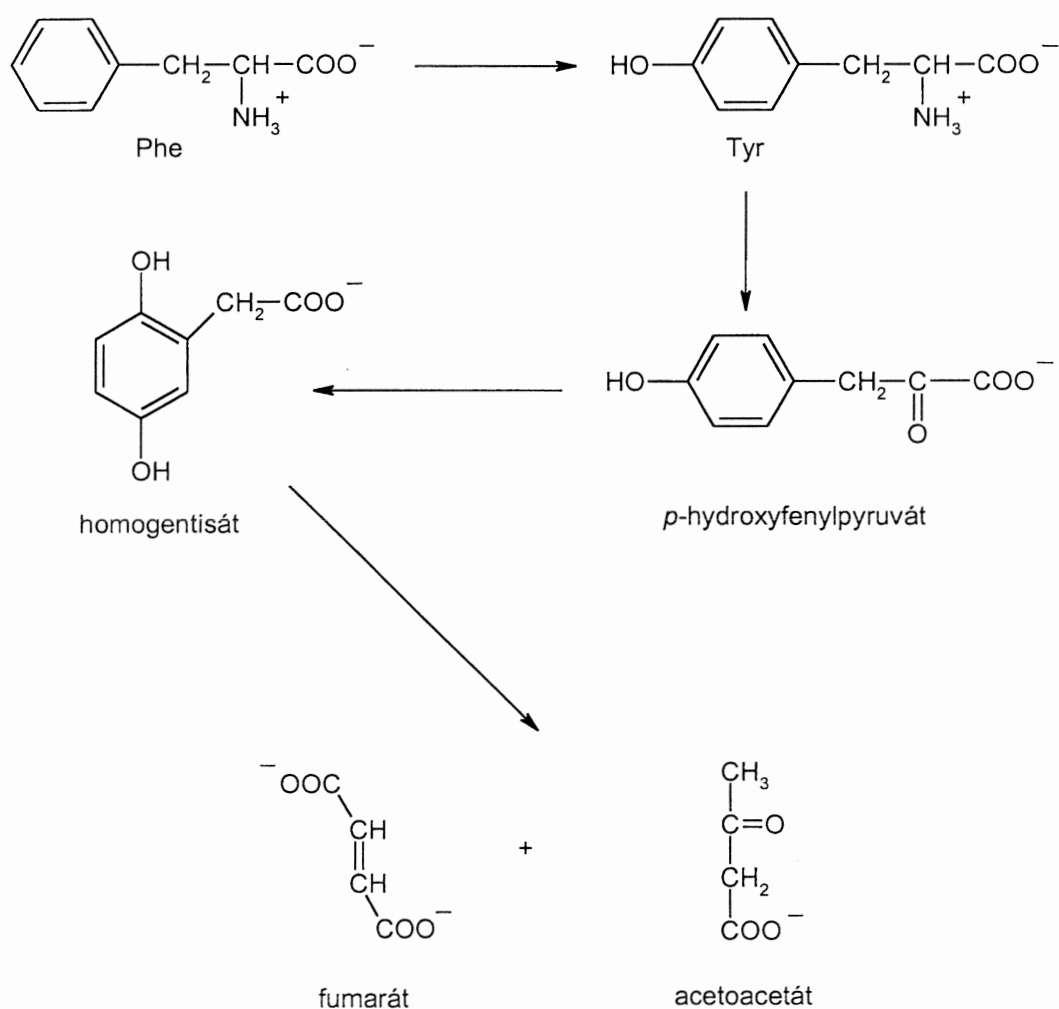


Výchozími látkami pro tuto dráhu jsou erythrosa-4-fosfát a fosfoenolpyruvát. Syntéza vede k tvorbě aromatických aminokyselin (Phe, Tyr, Trp) a některých dalších látek.

Katabolismus aromatů

Biochemické přeměny aromatických aminokyselin vedou k řadě významných látek. Za mnohé lze uvést hormony adrenalin nebo thyroxin, které vznikají přeměnou tyrosinu.

Z biodegradačních drah aromatických látek u živočichů je významná následující přeměna.



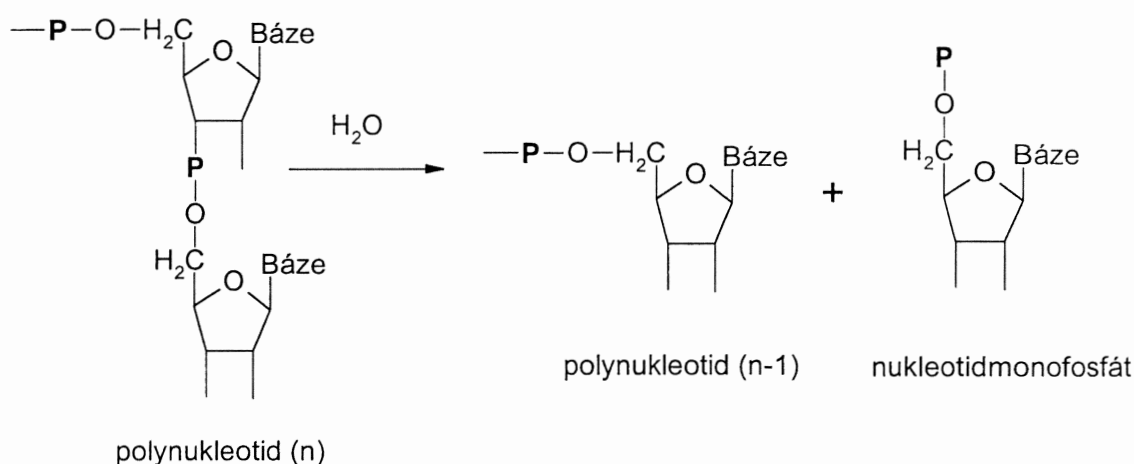
Produkty této přeměny pak mohou vstupovat do jiných metabolických procesů, např. citrátového cyklu.

7.3. Metabolismus nukleotidů

Nukleotidy mají v živých organismech řadu funkcí. Jsou stavebními prvky nukleových kyselin a účastní se také řady enzymových reakcí jako kofaktory.

7.3.1. Katabolismus nukleotidů

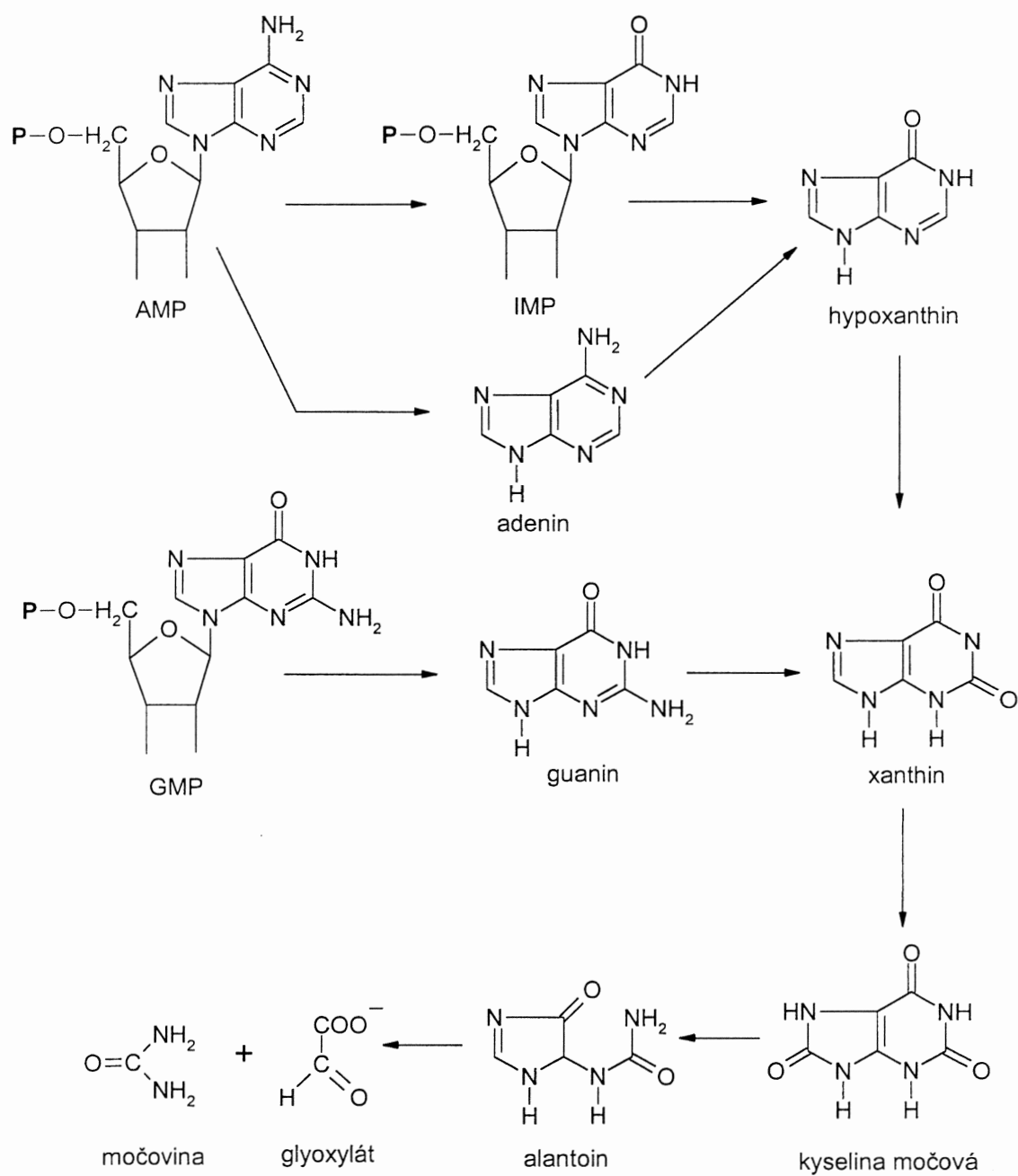
Z nukleových kyselin se nukleotidy uvolňují působením hydrolytických enzymů – nukleas. Ty štěpí fosfodiesterové vazby polynukleotidů.



Uvolněné nukleotidy se dále katabolizují samostatnými metabolickými drahami podle jejich typu.

Katabolismus purinových nukleotidů.

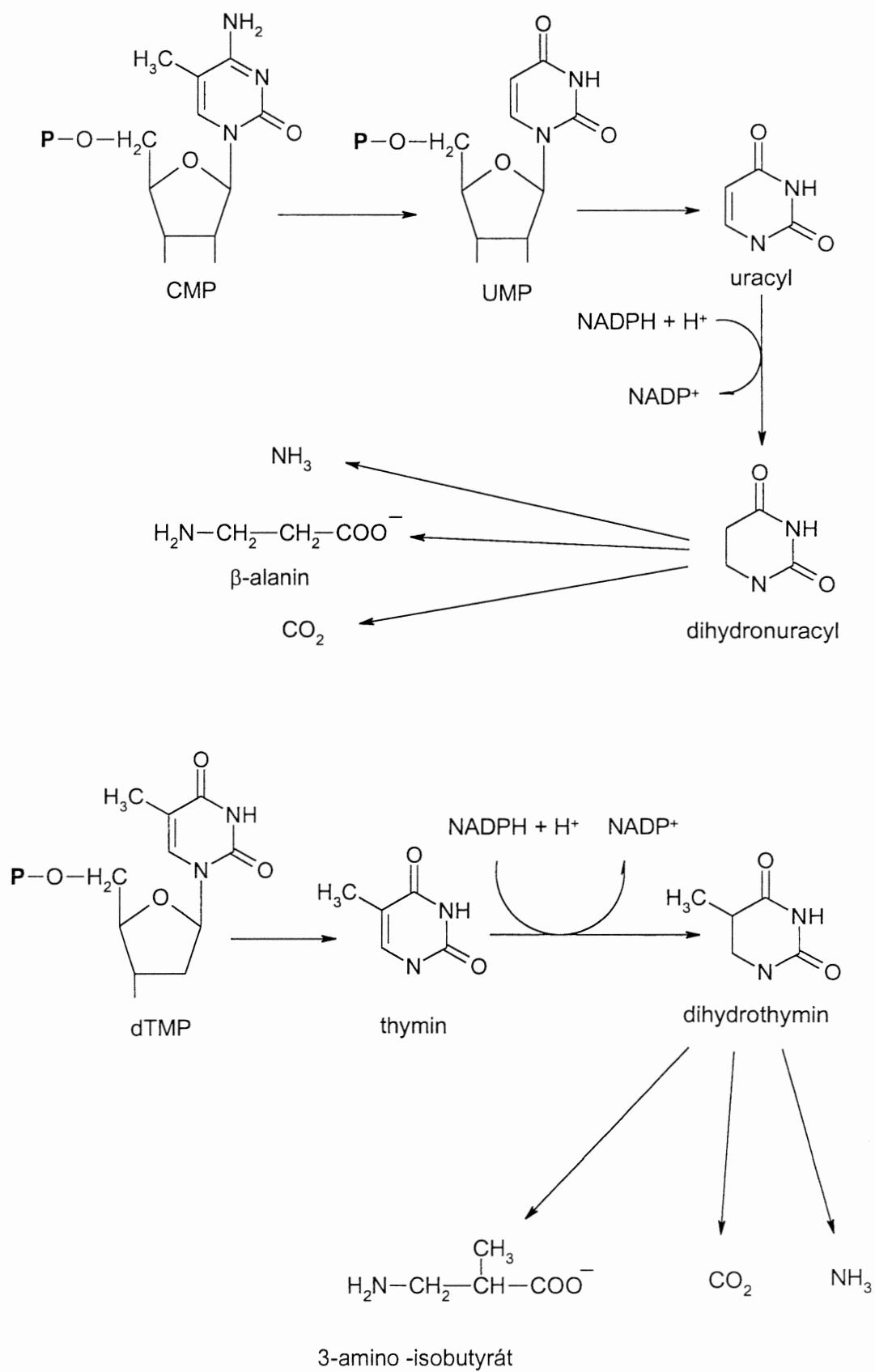
Zjednodušené schema katabolismu purinových nukleotidů je uvedeno na obrázku 38. Konečný produkt rozkladu purinových nukleotidů se u jednotlivých druhů organismů liší. Urikotelní organismy (plazi, ptáci) vylučují kyselinu močovou všeobecně jako hlavní formu vylučovaného dusíku a nevyužívají k tomuto účelu ornithinový cyklus. Primáti vylučují kyselinu močovou jako produkt rozkladu purinových nukleotidů, hlavní formou vylučovaného dusíku je však u nich močovina. Savci (kromě primátů) rozkládají kyselinu močovou až na alantoin



Obr. 38 Schema katabolismu purinových nukleotidů

Katabolismus pyrimidinových nukleotidů

Katabolismus pyrimidinových nukleotidů vychází z nukleosidmonofosfátů. Zjednodušené schema je uvedeno na obrázku 39.

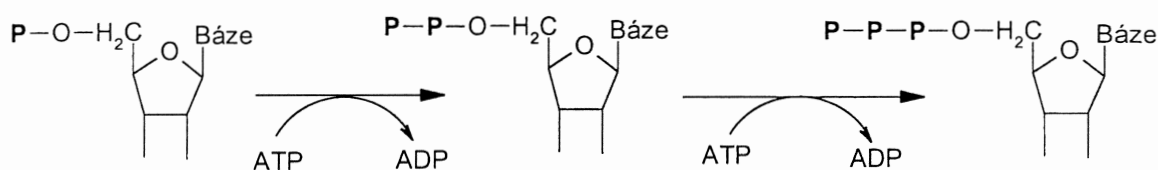


Obr. 39 Schema katabolismu pyrimidinových nukleotidů

Koncovými produkty jsou většinou β -alanin a 3-aminoisobutyřát, které se vylučují močí. Může dojít až k rozštěpení na CO_2 a NH_3 (drahou přes malonyl- nebo methylmalonyl-CoA).

7.3.2. Anabolismus nukleotidů

Nukleotidy vstupují do metabolických drah ve formě nukleosidtrifosfátů. Velká část se tvoří z nukleosidmonofosfátů (vznikajících zejména štěpením nukleových kyselin) tzv. záchrannými reakcemi:

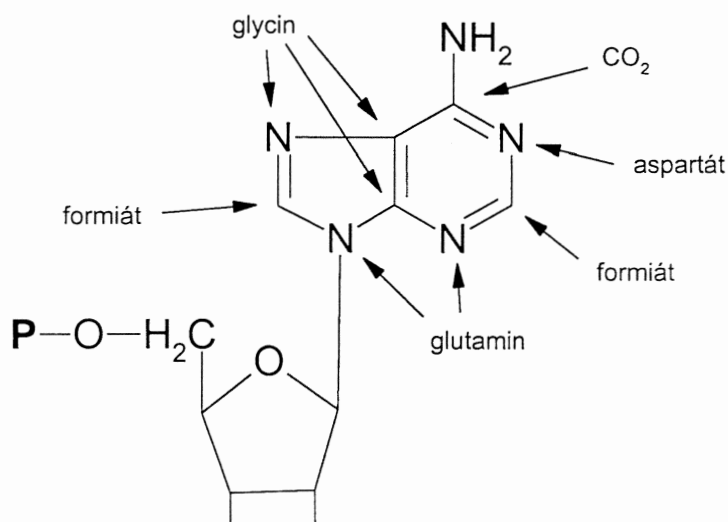


Výjimkou je vznik ATP, který probíhá zvláštními procesy (fosforylace na substrátové úrovni, aerobní fosforylace).

Metabolický úbytek nukleotidů je převážně pouze doplňován specifickými metabolickými drahami. Vyjimkou jsou tzv. urikotelní organismy (plazi, ptáci), kde je syntéza purinových nukleotidů hlavní cestou vylučování přebytečného dusíku.

Anabolismus purinových nukleotidů

Puriny jsou syntetizovány přímo ve formě nukleotidů. Syntéza vychází z 5-fosforibosyl-1-difosfátu, na kterém je postupně budováno purinové jádro. Původ jednotlivých částí jádra je následující:

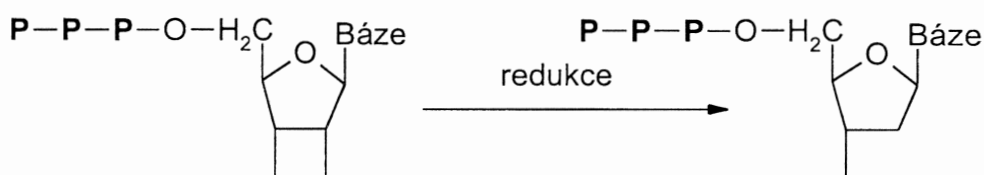


Jako první nukleotid se vytvoří inosinmonofosfát (IMP) a z něj dále vzniká AMP a GMP.

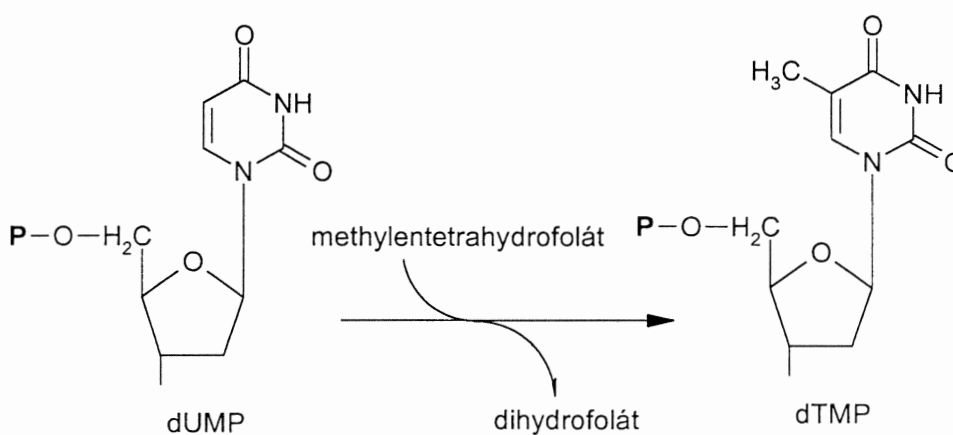
Anabolismus pyrimidinových nukleotidů

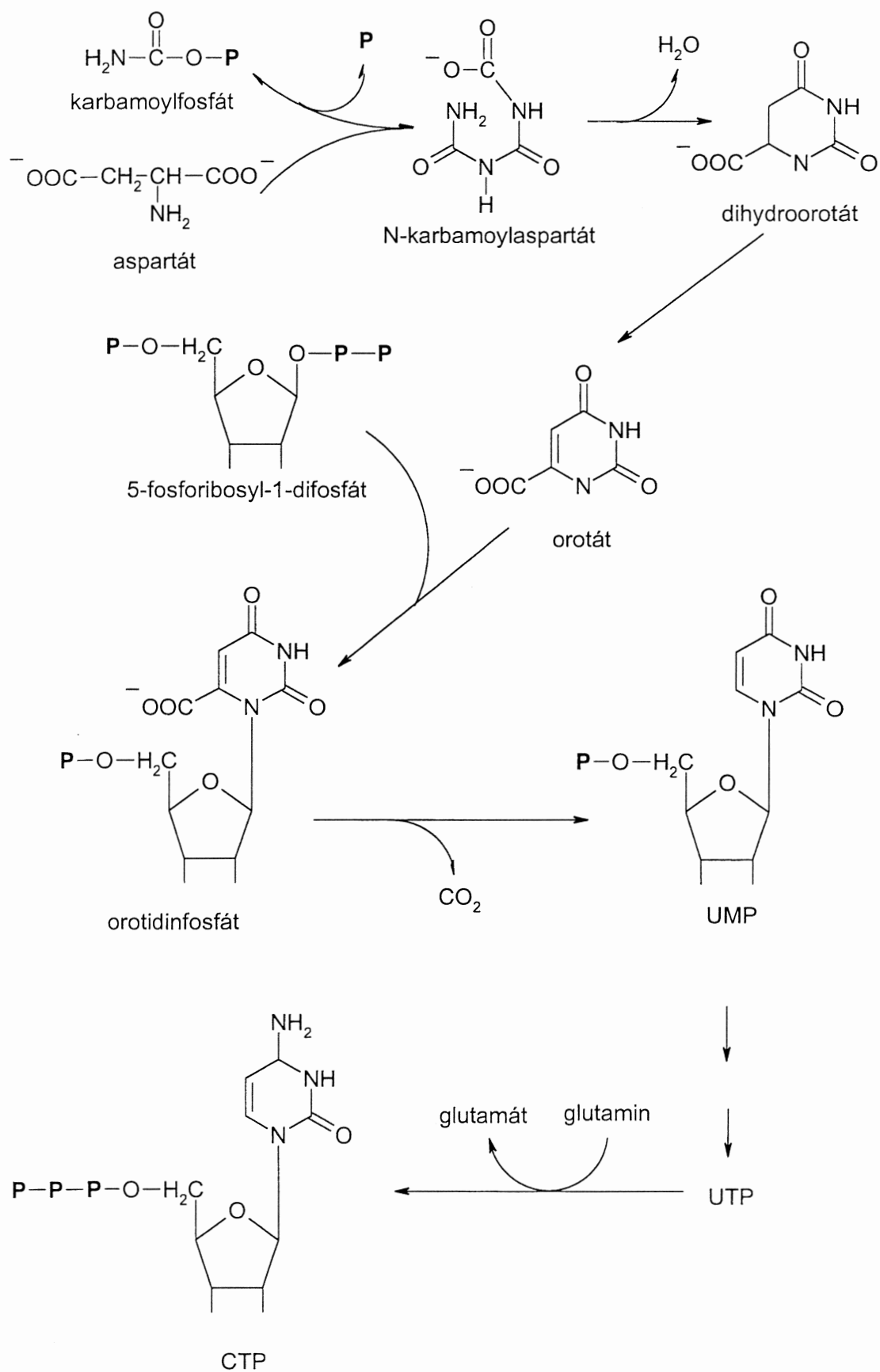
Při syntéze pyrimidinových nukleotidů se nejprve vytváří pyrimidinové jádro. Metabolická dráha vychází z karbamoylfosfátu a aspartátu (karbamoylfosfátsynthetasa je v tomto případě odlišná od podobného enzymu u ornithinového cyklu - využívá jako zdroj dusíku glutamin a je odlišně regulována). Syntetizované heterocyklické jádro (orotát) pak reaguje s 5-fosforibosyl-1-difosfátem za vzniku prvního nukleotidu – orotidinmonofosfátu. Celkové schema je na obrázku 40.

Deoxynukleotidy, potřebné pro syntézu DNA, jsou tvořeny z ribonukleotidů působením enzymů ribonukleotidreduktas podle schematu:



Thyminový nukleotid (dTMP) se tvoří až methylací dUMP





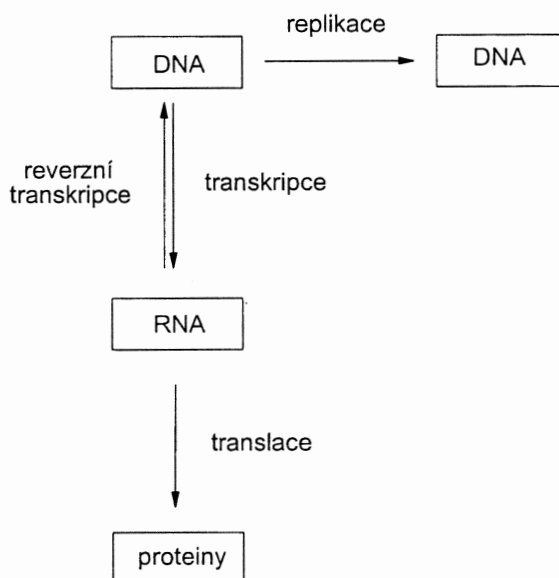
Obr. 40 Schema anabolismu pyrimidinových nukleotidů

8. METABOLISMUS NUKLEOVÝCH KYSELIN A SYNTÉZA BÍLKOVIN

Jednou ze základních vlastností živých organismů je schopnost uchovávat soubor dědičných informací a předávat je svým potomkům.

Objasňování biochemické podstaty dědičnosti prochází dlouhým vývojem od objevu genetické aktivity DNA Oswaldem Averym a spolupracovníky v roce 1944, přes způsob kodování syntézy proteinů objasněný po roce 1960 mj. v pracích Severo Ochoy. Základní principy regulace genové aktivity byly popsány v roce 1961 Francoisem Jacobem a Jacquesem Monodem.

Tok informace v buňce vyjadřuje tzv. ústřední genetické dogma, které formuloval v roce 1958 Francis Crick.



Ze schematu vyplývá, že všechny děje v organismu jsou dány přítomností specifických proteinů a struktura těchto proteinů je primárně zapsána ve struktuře DNA.

Přenos genetické informace na potomky vyžaduje vytvořit pro každou z dvojice vznikajících buněk celou sumu genetické informace. To se děje zdvojením molekuly DNA procesem zvaným replikace.

Syntéza proteinů vyžaduje přítomnost molekul RNA. Proces tvorby RNA, tedy přepis částí struktury DNA do RNA, se nazývá transkripce. Je známa i obrácená (reverzní) transkripce, charakteristická pro tzv RNA-viry (tento proces v původním Crickově schematu není).

Translace je vlastní proces syntézy proteinů podle matrice mRNA.

8.1. Struktura a funkce nukleových kyselin

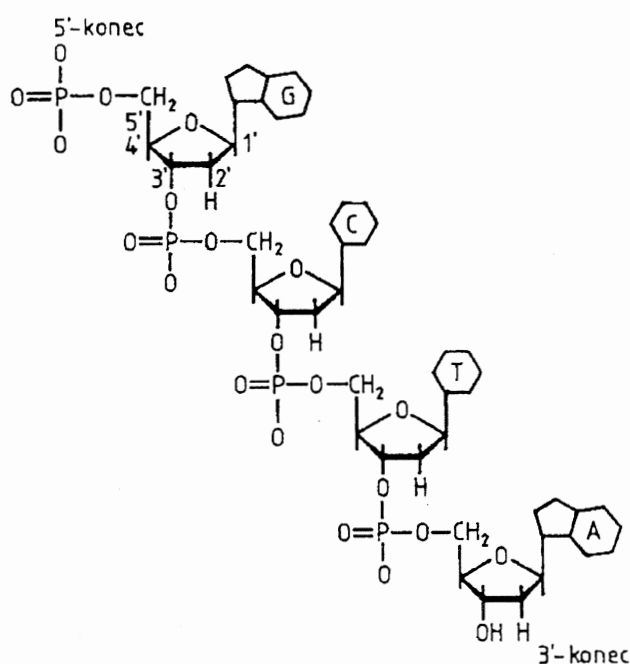
Nukleové kyseliny izoloval poprvé Friedrich Miescher v roce 1869 ve formě nukleoproteinů. Nebílkovinnou složku označil roku 1889 Sid Altman jako nukleovou kyselinu (NA).

Studium struktury NA postupovalo poměrně pomalu. Objasnění struktury DNA se v podstatě podařilo až v roce 1953, kdy James Watson a Francis Crick publikovali svůj proslulý model, za který obdrželi Nobelovu cenu.

Základem pro objasnění struktury DNA byla Chargaffova pravidla, která Erwin Chargaff publikoval v roce 1947, a dále rentgenové krystalografické studie provedené Rosalind Franklinovou v letech 1950-1952.

Základní strukturu NA tvoří polynukleotidové řetězce. Podle sacharidové složky nukleotidů se NA rozděluje na ribonukleové kyseliny (RNA) obsahující ribosu a deoxyribonukleové kyseliny (DNA) obsahující deoxyribosu. V NA se vyskytuje pět druhů nukleotidů s tzv. majoritními bázemi adeninem (A), guaninem (G), cytosinem (C), uracilem (U) a thyminem (T). V DNA se vyskytuje A, G, C a T, v RNA A, G, C a U. Kromě těchto majoritních bází lze, zejména v některých druzích RNA, nalézt i tzv. minoritní báze (methylyluracil, hypoxanthin apod.).

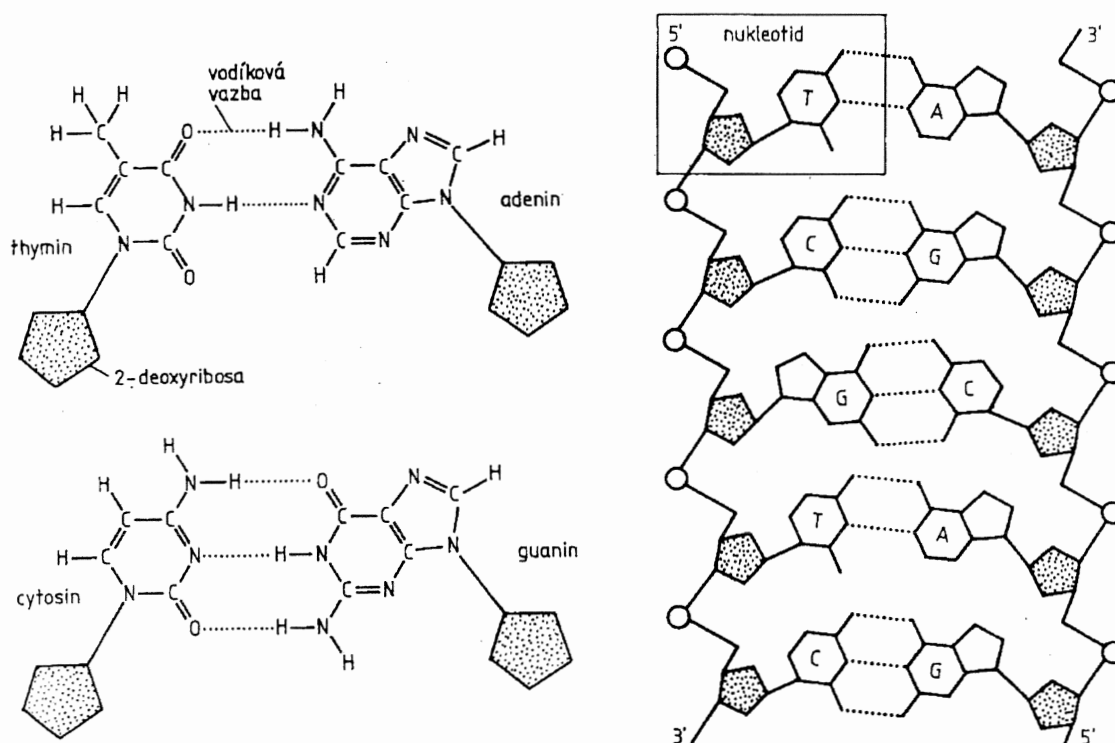
Jednotlivé nukleotidy jsou spojeny fosfodiesterovými vazbami mezi 3' a 5' uhlíkovými atomy sacharidů.



Pořadí nukleotidů v řetězci tvoří primární strukturu NA. Vyšší typy struktur se již u DNA a RNA výrazně liší.

8.1.1. Struktura a funkce DNA

Molekula DNA je tvořena dvěma antiparalelně orientovanými polynukleotidovými řetězci. Obě vlákna jsou spojena vodíkovými můstky mezi bázemi jednotlivých nukleotidů. Báze jsou spárovány na principu komplementarity, tj. vždy se spojuje adenin (A) s thyminem (T) a cytosin (C) s guaninem (G). Tuto skutečnost potvrzují Chargaffova pravidla, tj. molární poměr $A/T = C/G = 1$.

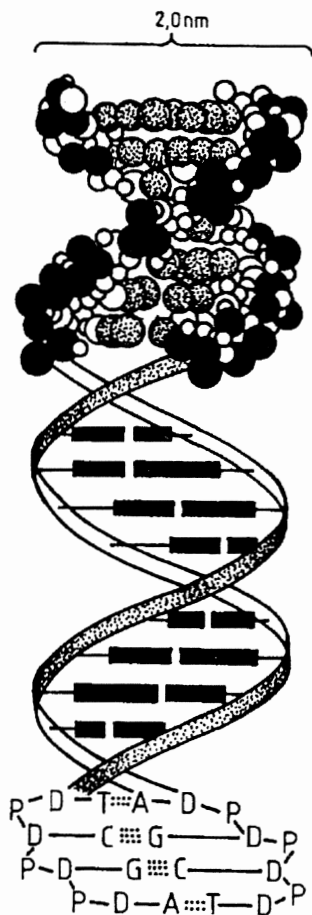


Dvojice vláken je stočena do dvoušroubovice (dvojitý helix). Rozeznáváme tři typy dvoušroubovic – pravotočivé A a B a levotočivou Z. Základní je zřejmě typ B, který je ve vodním prostředí nejstabilnější (Obr. 41).

Některé druhy DNA mají polynukleotidové řetězce spojené do kruhu a tvoří tzv. cirkulární DNA. U některých fágů byla zaznamenána i jednovláknová DNA.

Dvojitý helix DNA vytváří i další vyšší struktury. Zvláště u cirkulární DNA se vyskytuje tzv. superhelix, kdy je dvoušroubovice ještě jednou stočena do spirály.

DNA se v buňkách nevyskytuje volná, ale tvoří komplex s různými proteiny – chromatin. Hlavním typem bílkovin jsou bazické histony, ale je zde i řada dalších, nehistonových proteinů.



Obr. 41 Dvoušroubovice DNA typu B

Struktura bílkovin je v molekule DNA zapsána v úsecích řetězce nazývaných strukturní geny. V každém takovém genu je zapsána struktura jednoho polypeptidového řetězce. Jednotlivé aminokyseliny polypeptidu jsou zde zapsány pomocí trojic nukleotidů – tripletů. Kromě strukturních genů obsahuje řetězec DNA regulační geny. Ty nekódují polypeptidové řetězce, ale podílí se na regulaci transkripce.

8.1.2. Struktura RNA

U RNA rozeznáváme několik typů s rozdílnou strukturou i funkcí. Primární struktura je tvořena řetězcem ribonukleotidů s majoritními bázemi A, G, C, U. Vyšší struktury se již výrazně liší podle typu RNA.

Hlavní druhy RNA jsou:

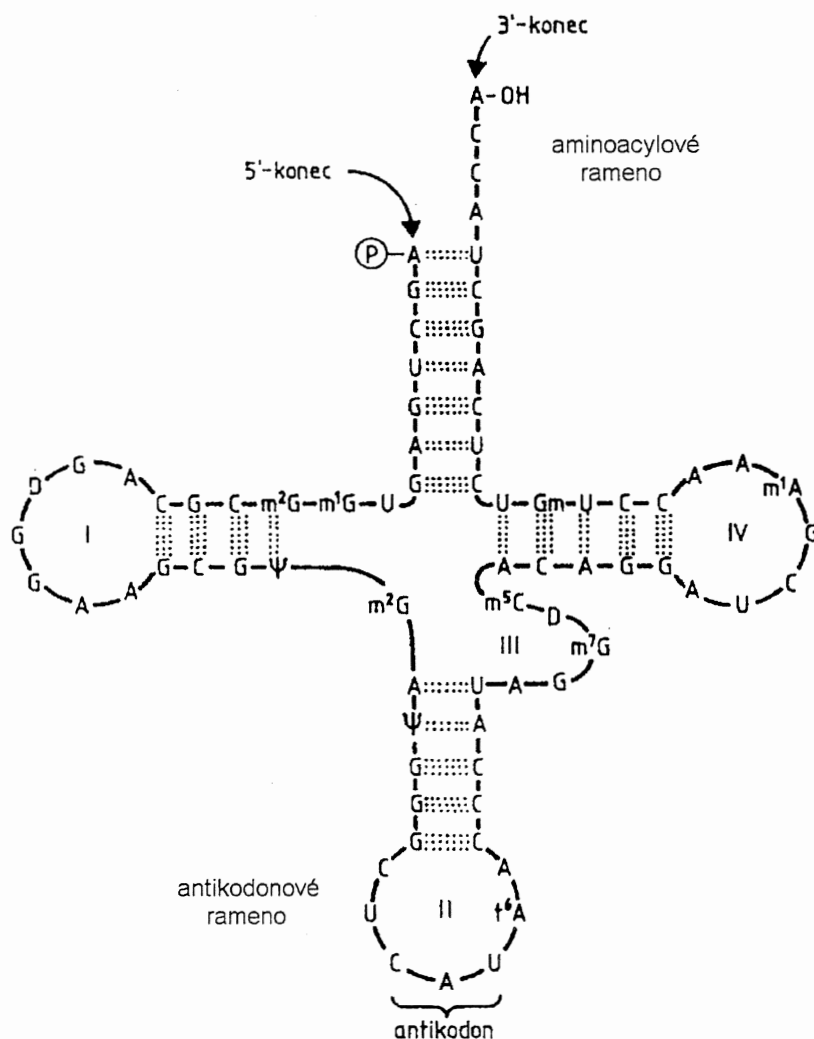
- mediátorová – mRNA
- ribosomální – rRNA
- transferová – tRNA

Mimoto existují ještě další druhy, např. malá jaderná RNA (snRNA) nebo virová RNA (vRNA).

mRNA je tvořena jedním polynukleotidovým vláknem a zřejmě nemá pevné vyšší formy struktury. Slouží jako vlastní matrice pro syntézu proteinů. Tripletům bází (kodonům) jsou přiřazeny jednotlivé aminokyseliny podle genetického kódu. Čtyři báze mohou být v tripletech uspořádány 64 způsoby. Protože kódují pouze 20 aminokyselin, mohou mít jednotlivé aminokyseliny (mimo Met a Trp) až čtyři kodony (kód je degenerovaný). Některé kodony nemají přiřazenu žádnou aminokyselinu. Označují se „stop kodony“, dříve také „nonsens (nesmyslné) kodony“. Označují konec polypeptidového řetězce.

První báze od 5' konce	Druhá báze				Třetí báze
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

tRNA je ze všech typů nejmenší. Řetězec obsahuje jen asi 80 nukleotidů. Její struktura rozvinutá do roviny je známa pod názvem jetelový list.

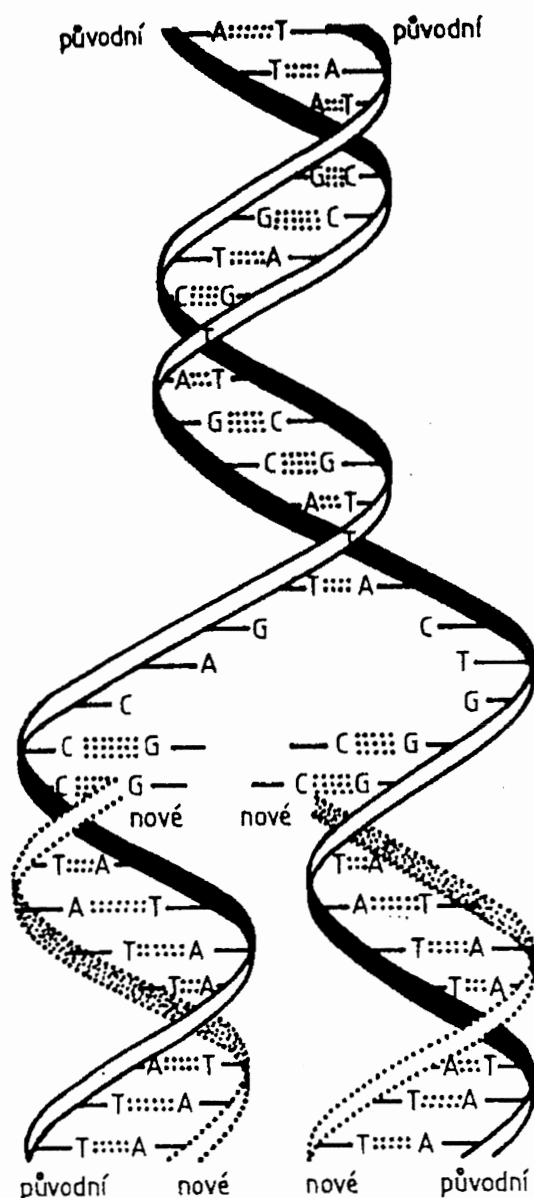


8.2. Replikace

122

potřebná předloha (matrice, templát), tj. původní vlákno DNA, podle které je nové vlákno syntetizováno. Celý proces je katalyzován řadou enzymů.

Vlastní proces replikace probíhá tzv. semikonzervativním mechanismem, tj. ke každému vláknu původní DNA vzniká doplňkové vlákno. Nové molekuly DNA se tedy skládají z původního a nového vlákna.



Semikonzervativní průběh replikace prokázali v roce 1958 Matthew Meselson a Franklin Stahl.

Mechanismus replikace je velmi složitý a dosud ne zcela prozkoumaný. V detailech existují rozdíly mezi prokaryoty a eukaryoty, ale základní principy jsou stejné.

Replikace vlákna DNA začíná v tzv replikačním „očku“ („bublině“). To se vytváří rozpletením dvouvlákna DNA, které je katalyzováno celou řadou enzymů zvaných obecně topoisomerasy. Tyto enzymy přerušují jedno nebo obě vlákna DNA a opět je spojují. Do dvoušroubovice jsou tak zaváděny negativní závity, které umožňují její rozplétání. Bod rozplétání v replikačním očku se nazývá replikační vidlice. Každé očko má tedy dvě replikační vidlice.

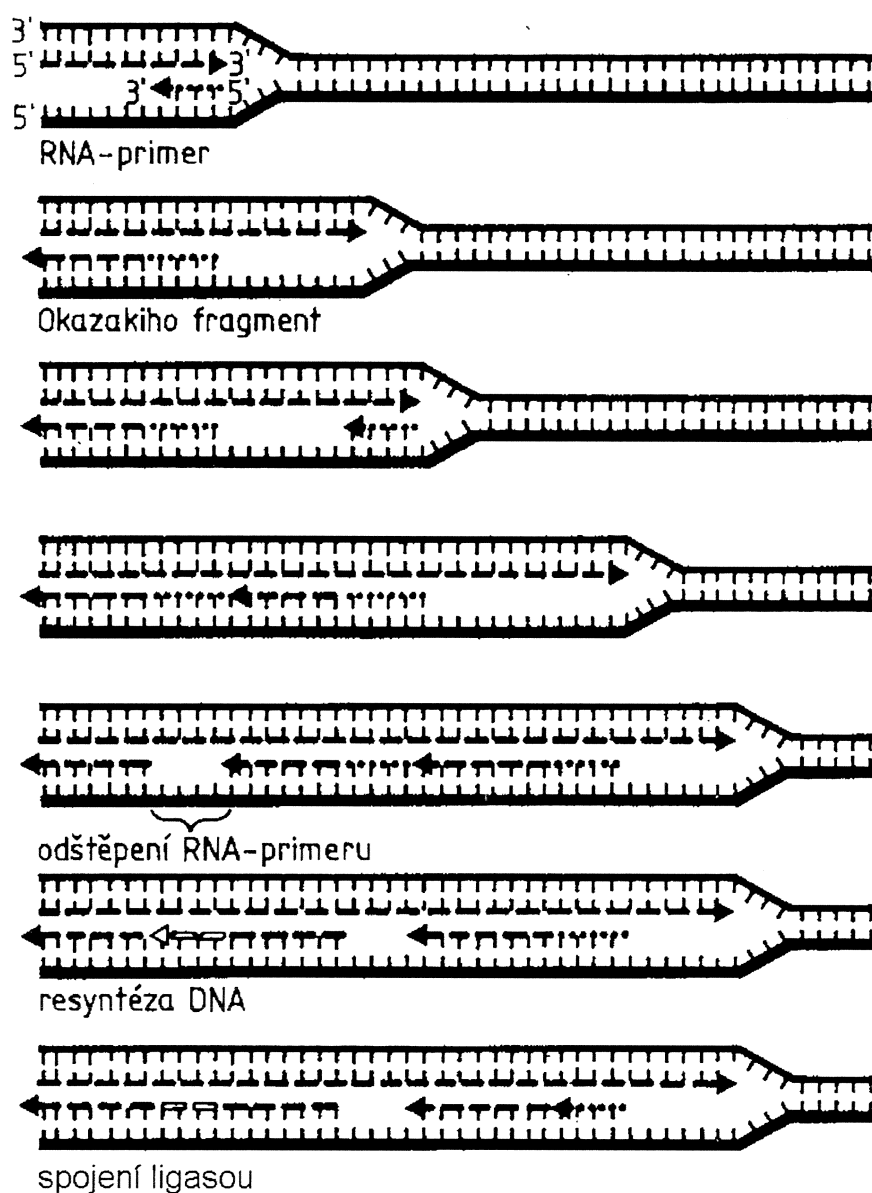
Syntézu nového řetězce katalyzují DNA-polymerasy (u prokaryot jsou označovány I, II, III a u eukaryot α , β , γ , δ). DNA-polymerasa postupně navazuje na rostoucí nové vlákno DNA jednotlivé nukleotidy podle matrice původního vlákna a to na principu komplementarity.

Všechny známé DNA-polymerasy prodlužují vlákno DNA vždy ve směru $5' \rightarrow 3'$, tj. nový nukleotid se váže vždy na $3'$ -konec polynukleotidového řetězce.

Protože jsou obě vlákna DNA ve dvoušroubovici orientována protisměrně, je ve směru postupující replikační vidlice jedno vlákno syntetizováno kontinuálně (vedoucí vlákno) a druhé po postupných úsecích (opoždující se vlákno). Tyto úseky se označují Okazakiho fragmenty (podle Reiji Okazakiho, který tento mechanismus v roce 1968 objasnil).

DNA-polymerasy vyžadují pro navázání nového nukleotidu vždy přítomnost volného $3'$ -konce. Nejsou proto schopny syntézu řetězce zahájit. Syntézu zahajují enzymy RNA-polymerasa a primasa, které syntetizují na vlákně DNA krátké úseky RNA (tzv. primerové řetězce) o délce až několika desítek nukleotidů. Ty pak poskytnou potřebné $3'$ -konce pro DNA-polymerasu. Hotové vlákno DNA však žádné úseky RNA neobsahuje. Jsou totiž v průběhu replikace postupně odštěpovány postupující DNA-polymerasou. Vznikají tak úseky vlákna DNA, které na sebe těsně navazují, ale nejsou kovalentně spojeny. Při odštěpení RNA úseku není na $5'$ -konci řetězce DNA přítomna trifosfátová skupina a DNA-polymerasa nemůže oba konce z energetických důvodů spojit. Spojení obou konců zajišťuje enzym DNA-ligasa za spotřeby ATP (u prokaryot NAD^+).

Schematické znázornění procesu je uvedeno na obrázku 42.



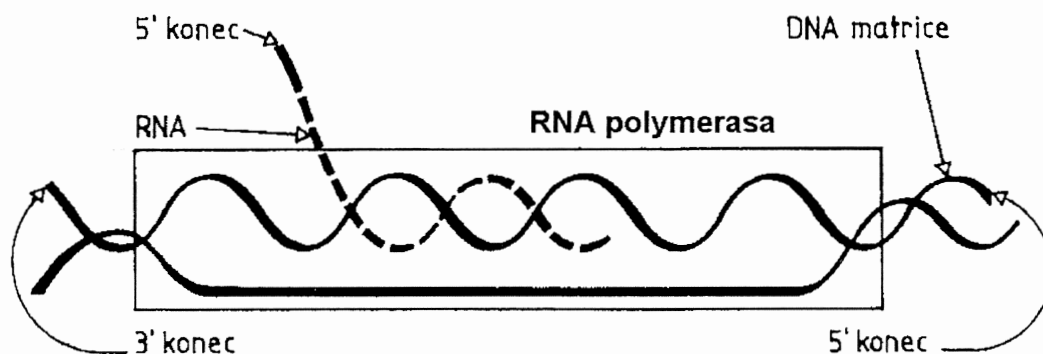
Obr. 42 Průběh replikace

8.3. Transkripce

Transkripci katalyzují enzymy zvané RNA-polymerasy. U prokaryotních organismů je to jeden enzym odpovědný za syntézu všech typů RNA, u eukaryot čtyři až pět enzymů, které syntetizují jednotlivé druhy RNA.

Syntéza vlákna RNA je zahajována na specifickém místě vlákna DNA zvaného promotor. Na tento úsek se váže RNA-polymerasa, která postupuje po vlákně DNA a

postupně navazuje nové nukleotidy (na principu komplementarity) na 3'-konec rostoucího polynukleotidu. Transkripce je ukončena na terminačním úseku, což je opět specifická sekvence nukleotidů vlákna DNA.



8.3.1. Posttranskripční úprava

Bezprostřední produkty transkripce často nejsou funkčními jednotkami. K získání biologické aktivity jsou nutné specifické úpravy. Ty se liší podle typu RNA a jsou odlišné pro prokaryotní a eukaryotní organismy. Primární transkripty jsou štěpeny endo a exonukleasami (např. u rRNA), dochází i k modifikaci (např. methylaci) některých bází (zvláště u tRNA).

Transkript mRNA u prokaryot je obvykle zcela funkční mRNA. K zahájení translace zde dochází ještě před dokončením transkripce. Eukaryotní mRNA prochází naproti tomu řadou modifikací. Jsou to:

- Syntéza „čepičky“
- Syntéza poly(A)-konce
- Sestřih

Syntéza čepičky je proces, při kterém se na 5'-konec řetězce mRNA váže, často methylovaný, guaninový nukleotid.

Při syntéze poly(A) konce se na 3'-konec řetězce mRNA navazuje sekvence až několika set adeninových nukleotidů. Tato sekvence má zřejmě ochranou funkci.

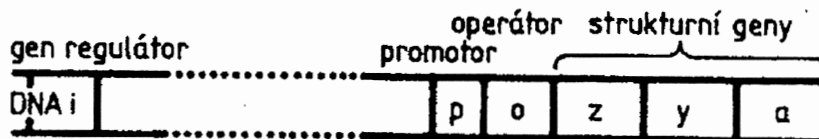
Výraznou vlastností eukaryotních genů je přítomnost nekodujících úseků (intronů). Tyto úseky jsou v průběhu sestřihu (splicing) vyštěpeny a kodující úseky (exony) jsou spojeny do souvislého řetězce mRNA.

8.3.2. Regulace transkripce

V molekule DNA je zakodováno množství proteinů s velmi rozmanitou funkcí. Některé z nich jsou nutné pro základní funkce buňky a jsou proto syntetizovány víceméně stálou rychlostí. Jejich struktura je zapsána v tzv. konstitutivních genech. Potřeba jiných proteinů se mění podle okamžitých podmínek buňky. Jejich struktura je zapsána v tzv. adaptivních (induktivních) genech. Přepis těchto genů podléhá proto regulaci na úrovni transkripce.

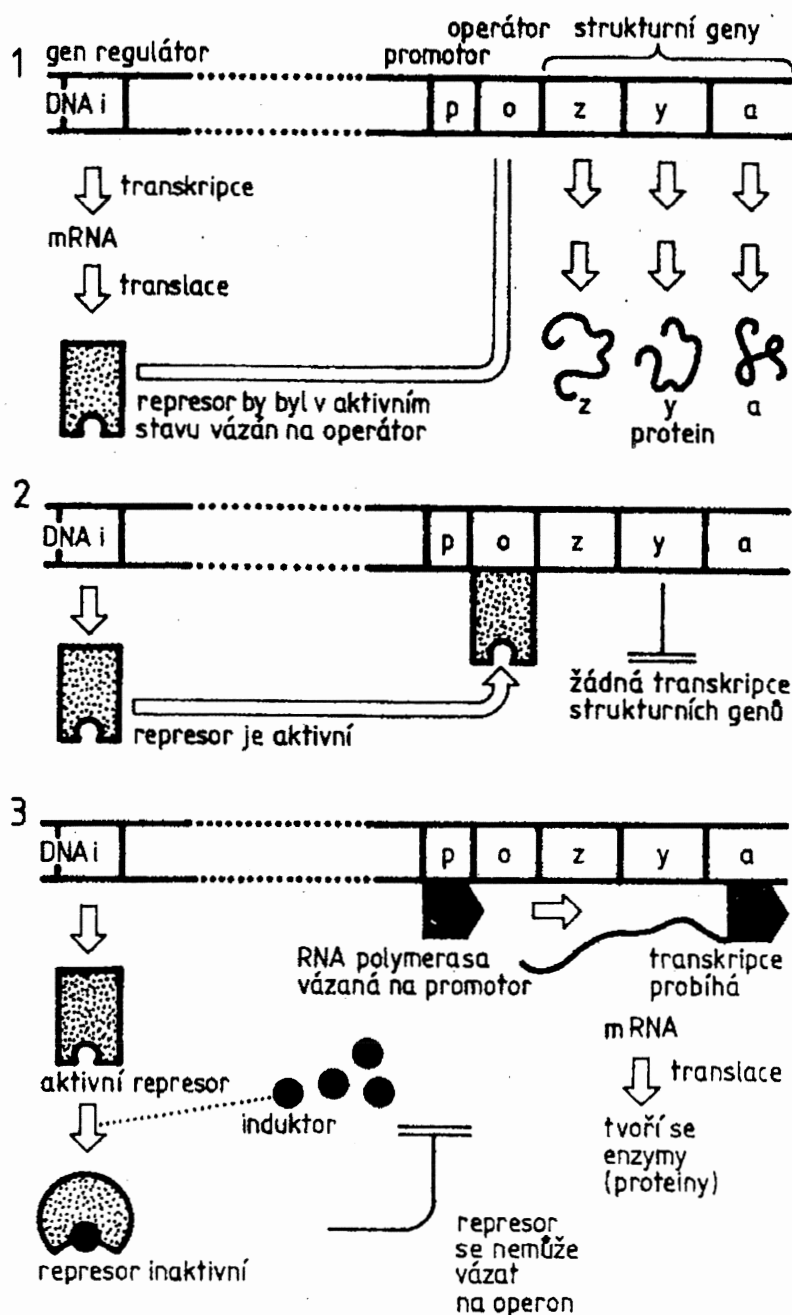
Je známa řada mechanismů regulace transkripce. Pro obecné objasnění lze použít tzv. operonový model, který formulovali v roce 1961 Jacob a Monod pro enzymy, které katalyzují počátek metabolismu laktosy (tzv. *lac*-operon). Později byla popsána struktura i dalších operonů.

Operon je úsek na DNA, který se skládá z oblasti strukturních a z oblasti regulačních genů. Oblast regulačních genů se do RNA nepřepisuje. Strukturní geny operonu kodují enzymy, které se zpravidla vyskytují v jedné metabolické dráze. Je tak zajištěno, že syntéza klíčových enzymů, potřebných pro přeměny jednoho substrátu, je regulována současně jediným zásahem.



Produktem genu *i* (nemusí být součástí operonu) je regulační protein. Tento protein se může vázat na úsek promotoru nebo operátoru. Vazba vyvolá změnu konformace řetězce DNA a to umožní navázání RNA-polymerasy (v případě vazby na promotor) nebo toto navázání znemožní (v případě vazby na operátor). Vlastní vazba regulačního proteinu je ovlivňována nízkomolekulárním efektem, to znamená, že jeho vazba na regulační geny (promotor a operátor) je navázáním efektoru umožněna nebo naopak znemožněna (pozitivní a negativní regulace).

U tzv. *lac*-operonu se produkt genu *i* (tzv. represor) váže na operátor a tím znemožní transkripci. Je-li v prostředí přítomna laktosa, váže se tento sacharid (induktor) na represor. Tím je vazba represoru na operátor znemožněna a transkripce může probíhat.



Aby k transkripci došlo je nutná aktivace promotoru. Tu vyvolá další regulační protein, tzv. CAP (katabolitový aktivační protein). Tento protein se váže na promotor a tím umožní vazbu RNA–polymerasy a zahájení transkripce. Samotný CAP se však na promotor neváže. Vyžaduje k tomu přítomnost cAMP. Při zvýšené koncentraci glukosy (její snadná dostupnost) je koncentrace cAMP v buňce snížena, CAP není aktivován, nemůže se vázat na promotor *lac*-operonu a transkripce nemůže být zahájena ani v přítomnosti vysoké koncentrace laktosy. (Uvedený příklad je pouze ilustrativní. Při popisu různých mechanismů regulace se v literatuře objevují odlišné termíny, např.

laktosa potlačuje represi a označuje se pak jako derepresor, cAMP umožňuje zahájení transkripce a označuje se jako induktor.)

8.4. Translace

Při translaci se podle matrice mRNA syntetizují z jednotlivých aminokyselin polypeptidové řetězce. Celý proces probíhá na ribosomech. Syntéza proteinů probíhá v několika stupních.

1. aktivace aminokyselin
2. iniciace
3. elongace
4. terminace

1. aktivace aminokyselin

Aktivace aminokyselin probíhá v cytosolu. Je při ní nutná přítomnost aminoacyl-tRNA-synthetas, které katalyzují reakci na obrázku 43. Aminokyselina je vázána na -OH skupinu na 3'-konci tRNA.

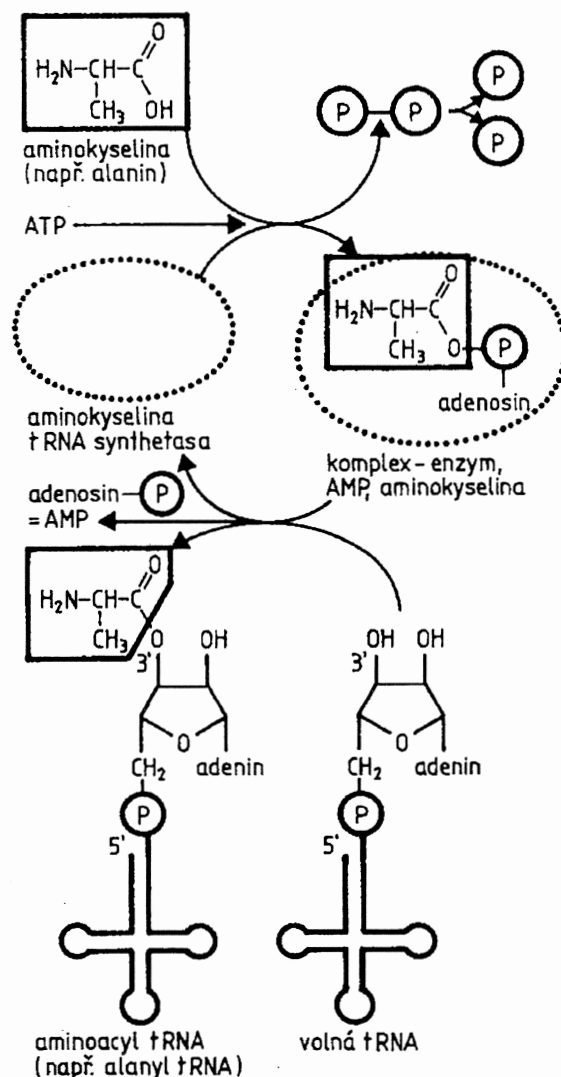
2. iniciace

K iniciaci je nutná přítomnost mRNA, aktivované aminokyseliny methionyl-tRNA (u prokaryot formylmethionyl-tRNA), disociovaných ribosomů a specializovaných proteinů, tzv. iniciačních faktorů (IF). Startovací Met-tRNA je vázána v tzv. P-místě ribozomu a v A-místě je další, zatím volný, kodon mRNA

3. elongace

Elongací se rozumí postupné prodlužování peptidového řetězce vždy o jednu aminokyselinu, která odpovídá příslušnému kodonu na řetězci mRNA. Podobně jako u iniciace jsou i zde potřebné specializované proteiny – elongační faktory (EF).

Nejprve se za spotřeby GTP naváže nový aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) na odpovídající kodon v A-místě, který sousedí s již obsazeným kodonem v P-místě ribosomu. Aminokyselina (v dalších fázích peptidový řetězec) se přenesse na novou aminokyselinu. Proces katalyzuje peptidyltransferasa, která je součástí ribosomu.



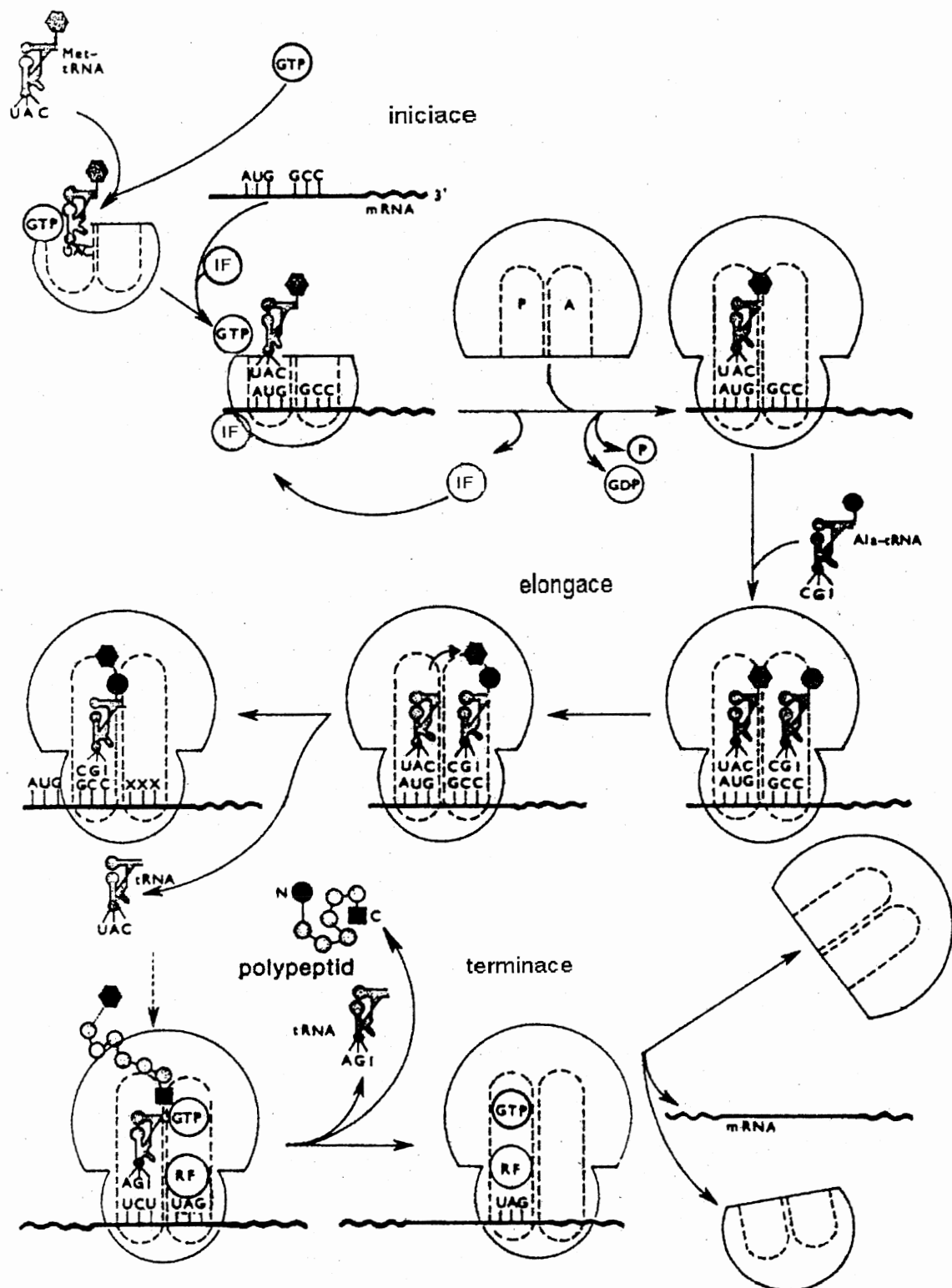
Obr. 43 Aktivace aminokyselin

Dalším krokem je posun ribosomu po vlákne mRNA o jeden kodon. Tím dojde k přesunu peptidu z A-místa do P-místa, deacylovaná tRNA se uvolní a do A-místa se dostane další kodon. Posun vyžaduje GTP a je katalyzován translokasou, což je jeden z EF. Celý proces se cyklicky opakuje a peptidový řetězec se postupně prodlužuje.

4. terminace

Prodlužování peptidového řetězce pokračuje tak dlouho, až se do A místa dostane jeden z terminačních kotonů (UAA, UAG, UGA). Tuto situaci rozpoznají specializované proteiny – uvolňovací faktory (RF). Přitom dojde k uvolnění peptidového řetězce z t-RNA a k rozpadu celého komplexu.

Celkové schema translace je znázorněno na následujícím obrázku 44.



Obr. 44 Schema translace

8.4.1. Posttranslační úprava bílkovin

Polypeptidové řetězce, které vznikají v procesu translace, obvykle nejsou v biologicky aktivní formě. K tomu je potřebný další proces označovaný jako posttranslační modifikace.

V zásadě existují tři procesy posttranslační modifikace

- kovalentní modifikace základního řetězce
- kovalentní modifikace postraních řetězců aminokyselin
- nekovalentní interakce

Při kovalentní modifikaci základního řetězce dochází ke štěpení přesně definovaných peptidových vazeb. Tento proces se také označuje jako limitovaná proteolýza. Odštěpení části řetězce umožní zbytku molekuly zaujmout potřebnou prostorovou konformaci.

Při kovalentní modifikaci postraních řetězců aminokyselin dochází k tvorbě nových funkčních skupin a tím je opět umožněno, aby bílkovinný řetězec zaujal potřebné prostorové uspořádání. K nejvýznamnějším změnám tohoto typu patří hydroxylace (vznik hydroxyprolinu), vznik disulfidických můstků nebo glykosylace, tj. tvorba bočních oligosacharidových řetězců.

Prostorové uspořádání proteinového řetězce je primárně dáno sekvencí aminokyselin (primární struktura). To je dáno snahou molekul zaujmout v daném prostředí termodynamicky nejvýhodnější uspořádání. Řada proteinů však vyžaduje k tomuto „svnutí“ přítomnost dalších specializovaných proteinů. Teprve jejich působení umožní vznik biologicky aktivních struktur.

9. BIOCHEMICKÁ REGULACE ORGANISMŮ

V každém živém organismu musí být zajišťována koordinace dílčích biochemických dějů v čase a prostoru. Tato regulace zajišťuje jednak udržení vnitřního prostředí (homeostázu), jednak potřebné reakce na změny okolí.

Každý regulační proces je založen na zjištění odchylky od okamžitého stavu a následném spuštění procesu, který tuto odchylku kompenzuje. V živých organismech jsou takové mechanismy zajišťovány změnou vlastností biochemicky aktivních proteinů a to vlivem signálu, který může mít povahu chemickou, mechanickou nebo světelnou.

Regulace živých organismů probíhá ve dvou stupních organizace:

- u všech organismů na úrovni buňky
- u vícebuněčných organismů navíc na úrovni celého organismu

Molekulární mechanismy obou stupňů jsou obdobné. Na buněčné úrovni dochází k metabolickým změnám v reakci na změny v bezprostředním okolí buňky. Reakcí na tuto změnu (signál) je změna rychlosti (případně spuštění) metabolických procesů. K tomu dojde změnou aktivity enzymů, případně jejich novou syntézou. Hlavními procesy jsou tu allosterická a kovalentní modulace enzymové aktivity a regulace proteosyntézy na úrovni transkripce. Tyto regulační mechanismy byly probrány v příslušných kapitolách. U vícebuněčných organismů existuje vzájemná komunikace mezi buňkami jednotlivých tkání. Podle charakteru komunikačních signálů lze regulaci rozdělit na :

Regulační proces	Základní princip regulace
humorální	chemický
nervový	elektrochemický
imunochemický	buněčný

9.1. Humorální regulace

Humorální (také hormonální) regulace je v principu založena na produkci chemických látek – hormonů, které zprostředkují komunikaci mezi buňkami v rámci jednoho organismu. Hormony lze rozdělit z několika hledisek:

A) podle chemické povahy

1. steroidní hormony (např. kortikoidy)
2. peptidové a proteinové hormony (např. insulin, hormony hypofýzy)

3. fenolické hormony (např. adrenalin, thyroxin)

4. jiné (např. prostaglandiny)

B) podle vzdálenosti, na kterou působí

1. autokrinní hormony - působí na stejné buňky, které je produkují (např. interleukin-2 stimulující množení T-lymfocytů)

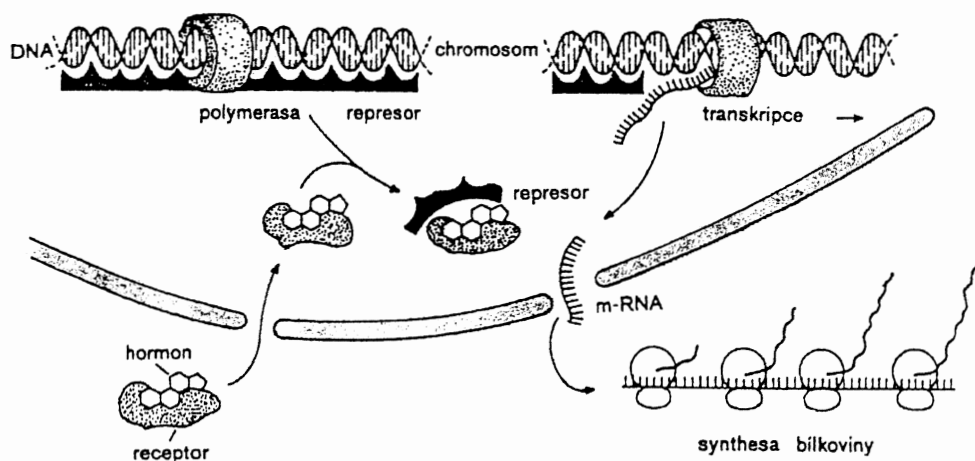
2. parakrinní hormony - působí na buňky v bezprostřední blízkosti produkujících buněk (např. prostaglandiny, hormony trávicího traktu)

3. endokrinní hormony - působí na vzdálené buňky (insulin, adrenalin). Jsou produkovány specializovanými orgány (žlázami s vnitřní sekrecí).

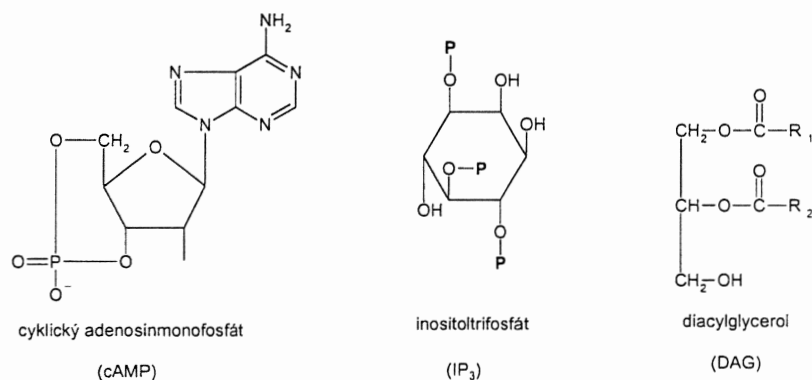
9.1.1. Mechanismus působení hormonů

Na daný hormon reagují pouze ty buňky, které pro něj mají specifický receptor. Hormonální signály jsou tedy velmi přesně adresovány. Základní mechanismy funkce hormonů lze rozdělit do tří typů podle povahy receptorů.

Prvním typem jsou receptory, které se nacházejí uvnitř buňky. Jsou to cytoplasmatické a jaderné bílkoviny, které po navázání odpovídajícího hormonu regulují syntézu určité bílkoviny (enzymu) na úrovni transkripce. Tak působí např. steroidní hormony.

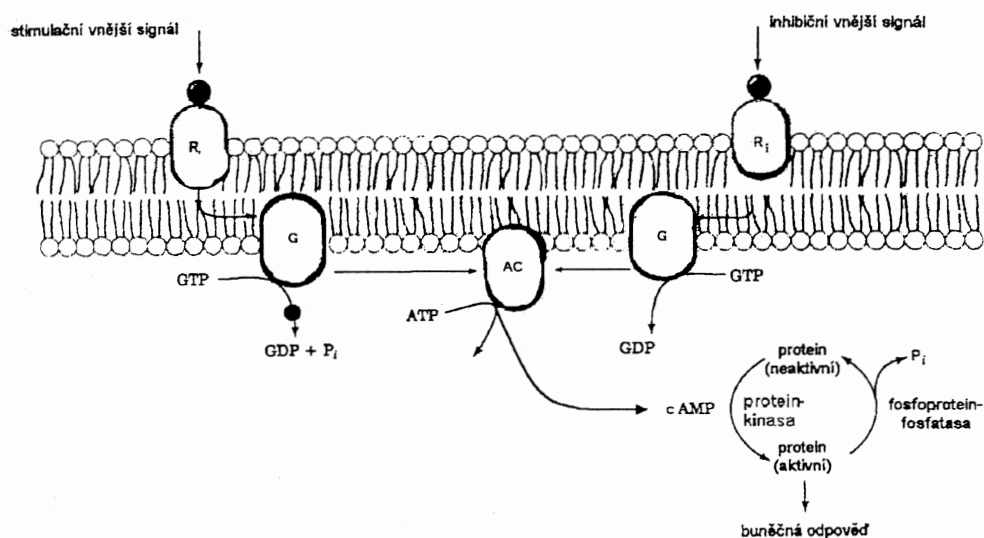


Druhým typem jsou receptory, umístěné v buněčné membráně. Jsou to proteiny, které po navázání hormonu na vnější straně membrány podněcují na vnitřní straně syntézu specifických látek, tzv. druhých posílů. Tyto látky pak ovlivňují metabolické děje v buňce, obvykle jako allosterické efektoři enzymů. Jako druzí poslové vystupují v buňkách zejména cAMP, Ca^{2+} , inositoltrifosfát a diacylglycerol.



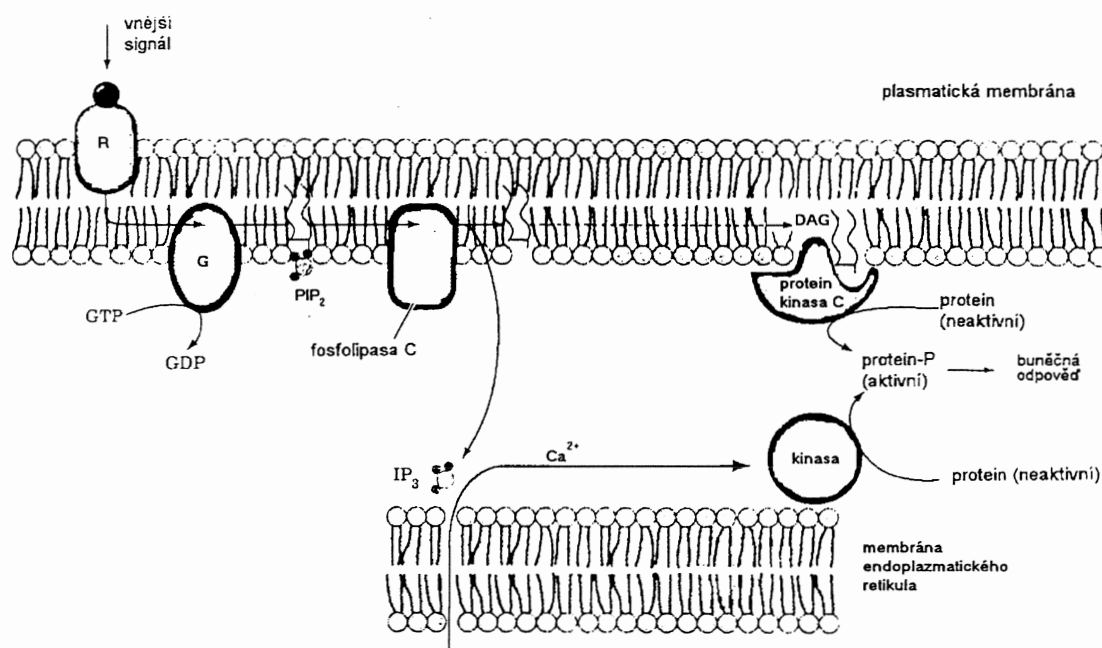
Většina adrenoreceptorů a receptorů polypeptidových hormonů zprostředkuje tvorbu cAMP jako druhého posla uvnitř buňky. Receptor, na nějž se navázal hormon, aktivuje v membráně zakotvené G-proteiny s navázaným GDP. Při aktivaci se GDP v komplexu vymění za GTP a takto pozměněný komplex má schopnost aktivovat enzym adenylátcyklasu (AC) na vnitřní straně membrány. G-protein se sám inaktivuje hydrolyzou vázaného GTP opět na GDP, takže doba aktivace komplexu je krátká. Přesto dojde k významnému zesílení hormonálního signálu, protože každý komplex receptoru s hormonem za dobu své existence aktivuje mnoho G-proteinů a každý komplex G-proteinu s GTP a s adenylátcyklasou nasyntetizuje mnoho molekul cAMP. Receptory některých hormonů adenylátcyklasu nestimulují, ale inhibují. Patří k nim např. α_2 - adrenoreceptor a některé další.

Syntetizovaný cAMP působí v buňkách jako allosterický efektor různých proteinkinas, které fosforylací mění aktivitu různých enzymů.



Inositoltrifosfát, diacylglycerol a Ca^{2+} vznikají v tzv. fosfoinositidové kaskádě. Navázáním hormonu na receptor dojde k aktivaci membránové fosfolipasy C prostřednictvím G-proteinu. Fosfolipasa C hydrolyzuje fosfatidylinositoldifosfát (PIP_2) na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG).

Uvolněný IP_3 difunduje k endoplazmatickému retikulu, z něhož uvolní do cytoplasmy Ca^{2+} a to, patrně, působením na přenašeč Ca^{2+} vázaný v membráně endoplazmatického retikula. Ca^{2+} stimuluje řadu buněčných pochodů ve spojení s proteinem kalmodulinem. Nepolární DAG zůstává v plasmatické membráně a zde aktivuje proteinkinasu C. Tento enzym vázaný na membránu (ve skutečnosti jde o celou skupinu enzymů) mění fosforylací aktivitu různých enzymů. Patří mezi ně např. glykogensynthasa.



Třetím typem receptorů je insulinový receptor. Tento receptor je glykoprotein, který prostupuje membránou. Po navázání inzulinu dojde k aktivaci subjednotek receptoru na vnitřním povrchu membrány. To vede k autofosforylaci tyrosinových zbytků těchto podjednotek. Další články řetězce insulinové signální dráhy jsou nejasné. Zdá se, že fosforylace tyrosinu aktivuje různé fosfatasy a tím se defosforyluje celá řada buněčných enzymů (glykogenfosforylasa, pyruvátdehydrogenasa, triacylglycerollipasa). Insulin však současně vyvolává i fosforylaci mnoha jiných buněčných bílkovin a to, patrně, aktivací proteinkinasy C z fosfoinositidové dráhy.

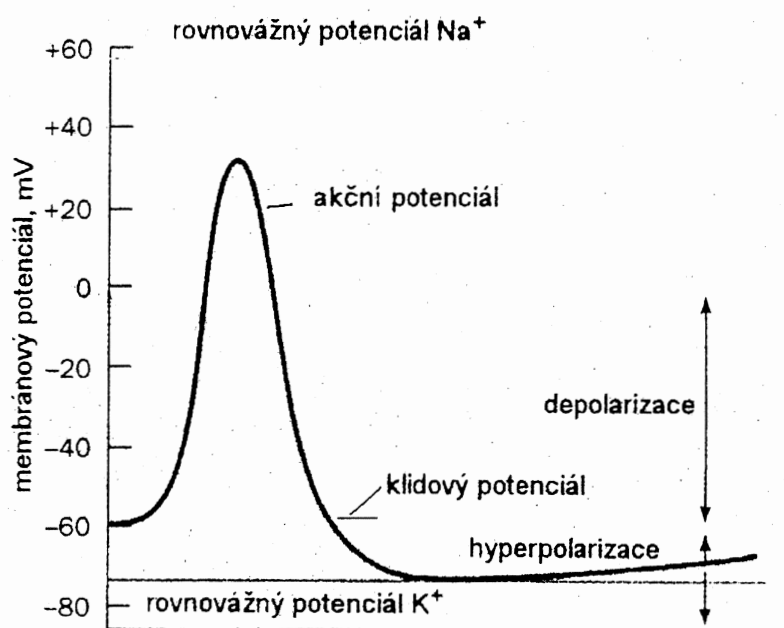
9.2. Nervová regulace

9.2.1. Dráždivost buněk

Membrána buněk je, jak už bylo řečeno dříve, v podstatě nepropustná pro většinu látek. K transportu těchto látek membránou slouží řada specifických řízených procesů. Díky těmto procesům se na membráně vytváří nerovnováha iontů, která způsobuje vznik elektrochemického potenciálu. Hlavní podíl na vzniku tohoto potenciálu mají ionty K^+ , Na^+ , Cl^- a různé organické anionty. Koncentrace těchto iontů u savčích buněk v klidovém stavu jsou uvedeny v tabulce.

Ion	Koncentrace (mmol/l)	
	uvnitř buňky	vně buňky
K^+	139	4
Na^+	12	145
Cl^-	4	116
Organické anionty	138	9

Samovolný pohyb těchto iontů membránou je velmi malý, ale u malých iontů není nulový. Postupně by proto došlo k vyrovnání potenciálu na obou stranách membrány. O zachování nerovnováhy se stará tzv. Na^+ , K^+ - ATPasa (sodno-draselná pumpa). To je v membráně vázaný enzym, který za spotřeby ATP neustále čerpá Na^+ ionty z buňky ven a současně K^+ ionty do buňky. V klidovém stavu je na vnitřní straně membrány převaha záporných iontů. Vyrovnat tento rozdíl by mohly Cl^- nebo K^+ ionty. Ty by však musely proudit proti svému koncentračnímu spádu a jejich pohyb je tak omezen. Naproti tomu Na^+ ionty by proudily ve směru koncentračního spádu. Jinak řečeno vektor chemického a elektrického potenciálu je u Na^+ iontu shodný. Proto mají Na^+ ionty rozhodující podíl na změnách potenciálu na membráně. Vzruch, který zapůsobí na buňku vyvolá krátkodobé otevření kanálků pro Na^+ ionty. Ty vlivem vysokého elektrochemického potenciálu vniknou rychle do buňky a vyvolají krátkodobou depolarizaci membrány. Zpětné odčerpání Na^+ iontu pak rychle obnoví klidový stav.



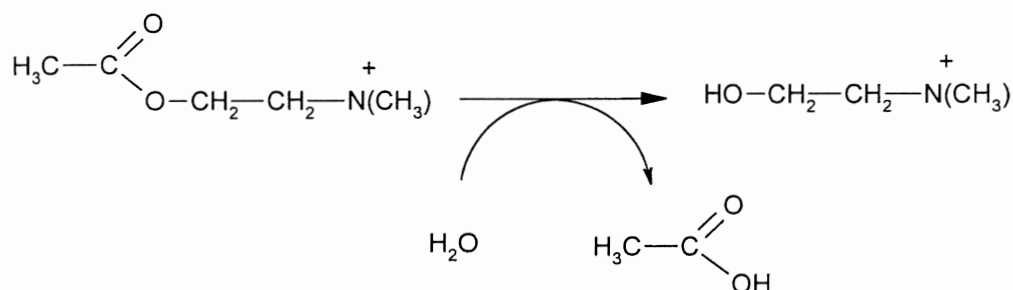
Změny potenciálu na membráně vyvolávají zejména konformační změny různých proteinů. Tím dochází ke změnám aktivit enzymů a k příslušné odezvě buňky na signál (podráždění).

9.2.2. Nervová regulace

U vyšších živočichů je nejrychlejší a nejsložitější komunikace mezi buňkami zprostředkována nervovými impulsy. Neurony (nervové buňky) přenášejí tyto signály po celé své délce (u větších živočichů je to i přes 1 m) jako šířící se vlny iontových proudů. Mezi jednotlivými neurony a mezi neurony a jinými buňkami zprostředkují přenos signálu chemické přenašeče – nervové mediátory – neurotransmitery.

Podobně jako jiné buňky vytvářejí i neurony rozdíly v koncentracích iontů na obou stranách buněčné membrány. Nervový impuls tvoří vlna přechodné depolarizace membrány nazývaná akční potenciál, která postupuje podél nervové buňky. Po této depolarizaci proběhne přibližně stejně rychlá repolarizace, která překmitne až do hyperpolarizace, tj. do kladných hodnot membránového potenciálu, a pak se pomaleji vrací ke klidovému potenciálu. Akční potenciál se šíří axonem (dlouhým výběžkem neuronu) tak, že vzrůst potenciálu v jednom okrsku membrány axonu spustí akční potenciál v sousedním okrsku membrány a ten zase v dalším atd.

Většina ACh se ukládá do tzv. synaptických váčků. Příchod akčního potenciálu na presynaptickou membránu způsobí otevření kanálů v membráně endoplazmatického retikula pro ionty Ca^{2+} . Uvolněné ionty Ca^{2+} podnítí exocytozu synaptických váčků, čímž se ACh dostane do synaptické štěrbin. Uvolněný ACh se difuzí šíří synaptickou štěrbinou k následnému neuronu a zde se váže na acetylcholinový receptor. Tím dojde k otevření kanálků pro Na^+ ionty a vzruch se pak šíří následným neuronem. ACh se po 1 až 2 ms z receptoru uvolní a kanálek se uzavře. Molekula ACh, která se účastnila přenosu daného nervového impulzu, se musí rozložit během několika milisekund, nežli přijde další nervový impuls. Tuto důležitou úlohu plní velmi rychle pracující enzym acetylcholinesterasa.



Produkty štěpení acetát a cholin se vrátí do presynaptického zakončení, kde se z nich opět syntetizuje ACh.

Rychlý rozklad je nezbytný pro všechny neurotransmitery. Zajišťují ho různé enzymy. Známým příkladem takového rychlého enzymu, který rozkládá aminové neurotransmitery, je monoaminoxidasa (MAO).

9.3. Imunochemická regulace

Pojem imunochemie zavedl švédský chemik Svante A. Arrhenius, který ho použil v roce 1907. Charakterizoval imunochemii jako nauku „o chemických reakcích látek, které vznikají po infekci cizích látek do krve zvířat, čili po jejich imunizaci. Produkty imunizace reagují s těmito cizími látkami podobně jako proteiny nebo enzymy, tj. podle svých chemických vlastností“. Tato definice v podstatě vystihuje i současné pojetí imunochemie.

Imunitní systém je speciální „difuzní“ orgán, který pozorujeme plně rozvinutý až u obratlovců. Skládá se ze souboru specializovaných buněk, které zajišťují obranu organismu zejména před napadením bakteriemi, parazity nebo viry.

Imunochemická obranná reakce se v podstatě skládá ze dvou kroků. Prvním je rozpoznání cizí buňky nebo látky a druhým spuštění souboru reakcí, při nichž dojde k likvidaci rozpoznaného agens. Jako cizí rozpoznává imunitní systém takové buňky, které mají na svém povrchu určité prostorové uspořádání látek, označované antigen. Je to vlastně chemická sloučenina (protein, polysacharid, glykoprotein, glykolipid), který není pro určitého jedince vlastní. Může se tedy jednat i o pozmeněné vlastní buňky. Antigen může být rozpoznán i volný, tedy nevázaný na buňku. K rozpoznání dojde vazbou specifických receptorů, které se vyskytují na jednotlivých složkách imunitního systému. Receptory se váží s přesně daným místem molekuly antigenu, tzv. determinantem.

Po rozpoznání následuje tzv. imunitní odpověď. Jejím výsledkem je likvidace cizího objektu buďto porušením membrány cizí buňky a tím vyvolaným rozpadem nebo jeho pohlcením (fagocytózou) a následným rozložením uvnitř specializované buňky.

Nespecifická imunita

Nespecifická (také přirozená) imunita, je proces, který zajišťuje odolnost proti infekčním zárodkům (viry, bakterie, plísně apod.) nebo jiným cizím buňkám. Tento typ imunity nevyžaduje předchozí setkání organismu s antigenem. Hlavní složky systému nespecifické imunity je glykoproteinový komplex, tzv. komplement a druh bílých krvinek, tzv. fagocyty. Činnost komplementu může být aktivována přímo antigeny, což mohou být různé toxiny nebo povrchové struktury bakteriálních buněk (alternativní cesta) nebo dojde k aktivaci ve spolupráci se systémem specifické imunity, tj. po označení cizích buněk specifickými proteiny - imunoglobuliny (klasická cesta).

Aktivovaný komplement se váže na determinanty cílové buňky a postupným sledem reakcí „propíchně“ její membránu a tak ji zničí.

Fagocyty obvykle rozeznají cizí buňku podle nepřítomnosti znaků, které jsou charakteristické pro vlastní buňky organismu (tzv. histokompatibilitní komplex). Takové buňky jsou pak fagocyty pohlceny a zničeny.

Specifická imunita

Specifická imunita je vývojově mladší. Její složky nacházíme až u vývojově vyšších organismů, v rozvinuté podobě až u vyšších obratlovců. Složkami systému specifické imunity jsou jednak tzv. protilátky (imunoglobuliny) a dále specializované lymfatické buňky (lymfocyty).

Imunoglobuliny jsou velmi specializované glykoproteiny, které jsou schopny se vázat vždy na jeden určitý antigen. Tím vlastně dojde k označení částice, která antigen obsahuje. Imunoglobuliny produkují B-lymfocyty. Tyto buňky mají na svém povrchu receptory, což jsou vlastně molekuly imunoglobulinů. Jednotlivé B-lymfocyty obsahují receptory vždy pro jeden antigen. Po navázání antigenu na B-lymfocyt dojde k rozmnožování tohoto druhu (klonu) buněk a ty pak produkují pro ně charakteristickou protilátku. Tím se značně zvýší koncentrace protilátky, charakteristické pro určitý antigen.

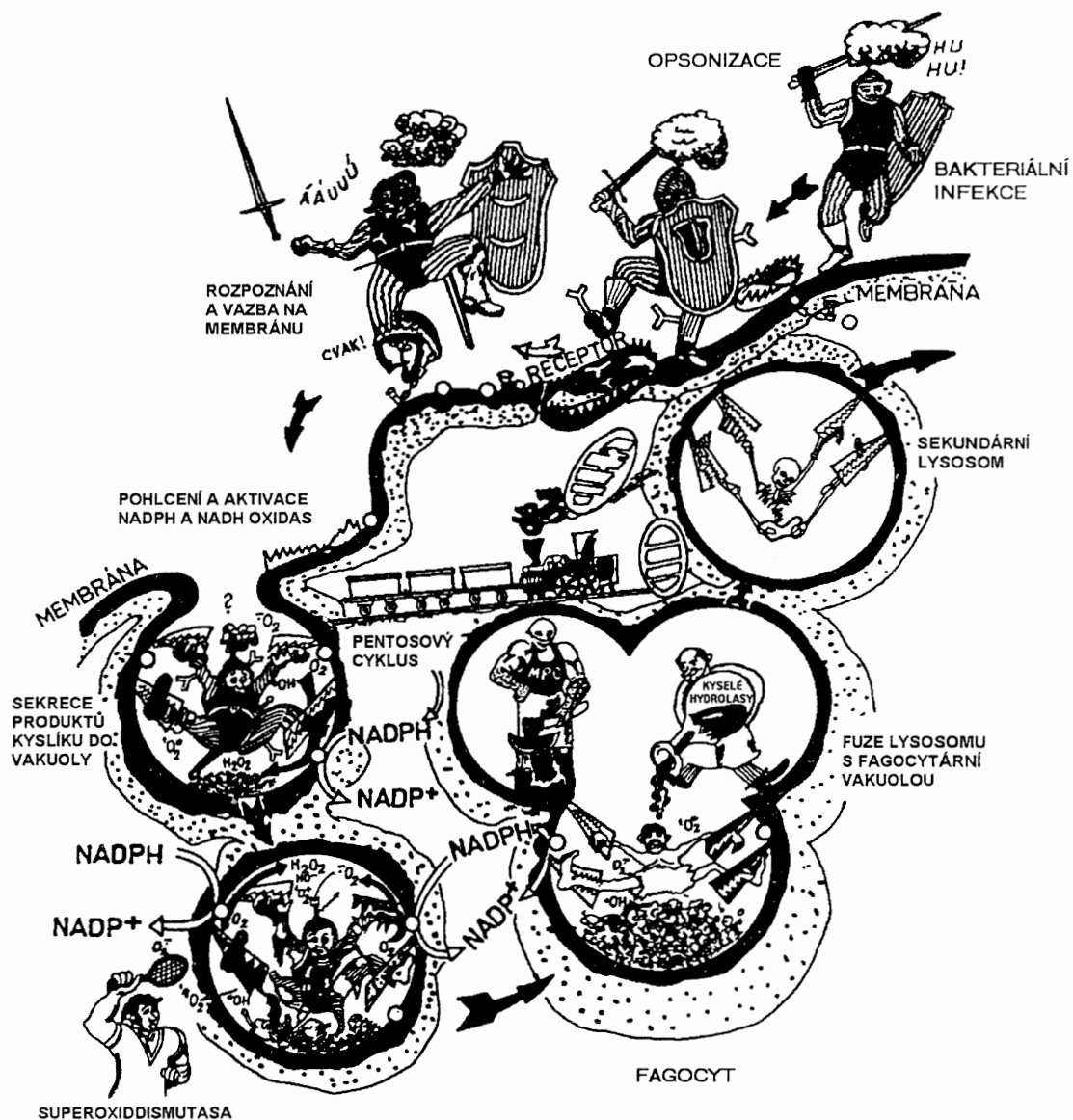
Další složkou systému specifické imunity jsou T-lymfocyty. I tyto buňky mají obdobné antigenové receptory jako B-lymfocyty, ale kromě nich ještě zvláštní receptory pro vlastní znaky (tzv. histokompatibilní komplex) buněk organismu. To jim umožňuje poznat vlastní buňky, které pak nejsou napadány. Vazba antigenu na T-lymfocyt vede, podobně jako u B-lymfocytů, k rozmnožení určité řady těchto buněk. Některé z nich (tzv. zabíjecké buňky) se váží s příslušnou cizí buňkou a vyloučí do ní exocytosou hydrolytické enzymy. Ty rozloží vnitřní obsah cizí buňky a tak ji zničí.

Fagocytoza

Fagocytoza je všeobecný biologický jev. Prakticky všechny eukaryotní buňky jsou schopny pohlcovat cizí buňky, na kterých nerozeznají vlastní znaky. Specializované buňky obratlovců mají kromě tohoto negativního systému ještě pozitivní systém rozpoznávání cizích znaků (antigenů), jak již bylo uvedeno.

Fagocytosa je velmi složitý proces, který se skládá z celé řady následných stupňů. Zjednodušeně ji lze popsat následujícím mechanismem.

Cizí buňka je označena navázáním protilátek (opsonizace). Takto označená buňka se váže na fagocyt a tím dojde k prudké aktivaci celého souboru metabolických dějů ve fagocytu. V první fázi se mění tvar membrány fagocytu, dojde k pohlcení cizí buňky a jejímu uzavření do tzv. fagosomu. Fagosomy se spojují s lysosomy za vzniku fagolysosomu. V metabolismu fagocytu se aktivují zejména dráhy oxidace glukosy (hlavně pentosový cyklus) a vznikající redukované kofaktory $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a $\text{NADH} + \text{H}^+$ jsou oxidovány ze spotřeby kyslíku (respirační vzplanutí). Při tomto procesu se tvoří řada velmi agresivních látek jako peroxidy, hydroxidové a superoxidové radikály apod. Ty napadají struktury pohlcené buňky a ve spolupráci s hydrolytickými enzymy lysosomů ji usmrtí a rozloží.



Celý systém imunitní odpovědi je velmi složitý a vyžaduje těsnou spolupráci mnoha různých buněk. Ty mezi sebou komunikují pomocí chemických signálů, tzv. imunohormonů (interleukiny, interferon a další).

10. BIOCHEMICKÁ PODSTATA FYZIOLOGICKÝCH FUNKCÍ

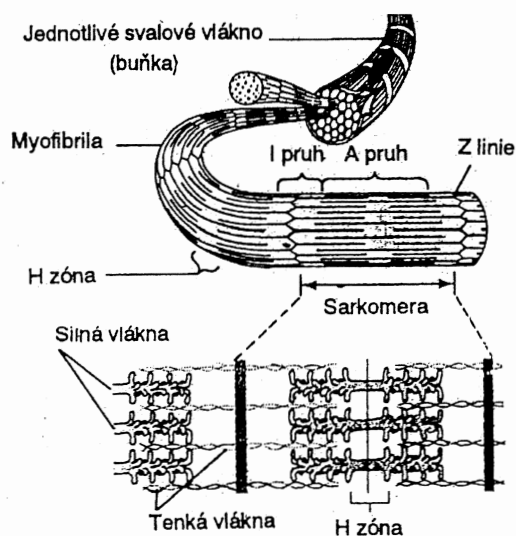
Každá funkce organismu má svou biochemickou (molekulární) podstatu. Znamená to, že každý takový proces (pohyb, zrakové vjemy, trávení, vylučování atd.) lze na molekulární úrovni popsat jako přesně sladěný soubor chemických reakcí. Touto biochemickou podstatou fyziologických funkcí se zabývá tzv. funkční biochemie nebo také molekulární fyziologie. V dalším budou uvedeny dva příklady fyziologických funkcí, které jsou spojeny s přeměnou forem energie. Je to biochemie svalové tkáně, což je vlastně přeměna energie chemické na mechanickou, a biochemie vidění, která je přeměnou energie elektromagnetického záření (světla) na energii elektrochemickou.

10.1. Biochemie svalové kontrakce

Schopnost vykonávat spořádané pohyby je jednou z velmi pozoruhodných vlastností živých organismů. Setkáváme se s ní na všech strukturních úrovních, ať již jde o aktivní transport membránami, posouvání DNA-polymerasy po vlákně DNA, pohyb buněčných kompartmentů, pohyb bičíků a řasinek nebo konečně stah svalu. Je známa řada molekulárních mechanismů pohybu. Dále bude uveden molekulární mechanismus stahu u příčně pruhovaných svalů.

10.1.1. Mechanismus svalového stahu

Příčně pruhované svaly sestávají z dlouhých snopečků svalových vláken. Svalová vlákna jsou složena ze svazků myofibril, které mohou mít délku svalového vlákna. Jednotka, která se v myofibrile pravidelně opakuje, se nazývá sarkomera. Při svalovém stahu se sarkomera zkracuje.

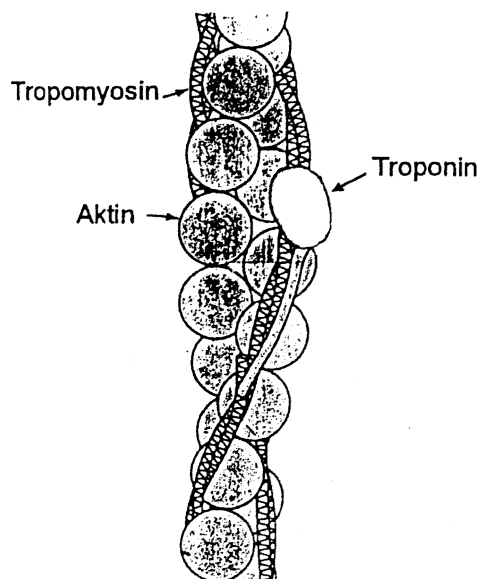


Hlavní součástí myofibril jsou kontraktilní proteiny, které zajišťují vlastní pohyb, dále regulační proteiny, které se podílí na koordinaci svalového stahu, a další pomocné proteiny. Hlavní kontraktivní proteiny jsou myosin, aktin a tropomyosin.

Myosin se skládá ze dvou vláken, zakončených na jednom konci „hlavičkou“. Svazky těchto dvou vláken jsou spojeny do myosinových filament. Jsou protisměrně orientovány, takže „hlavičky“ se vyskytují vždy na koncích filamentu.



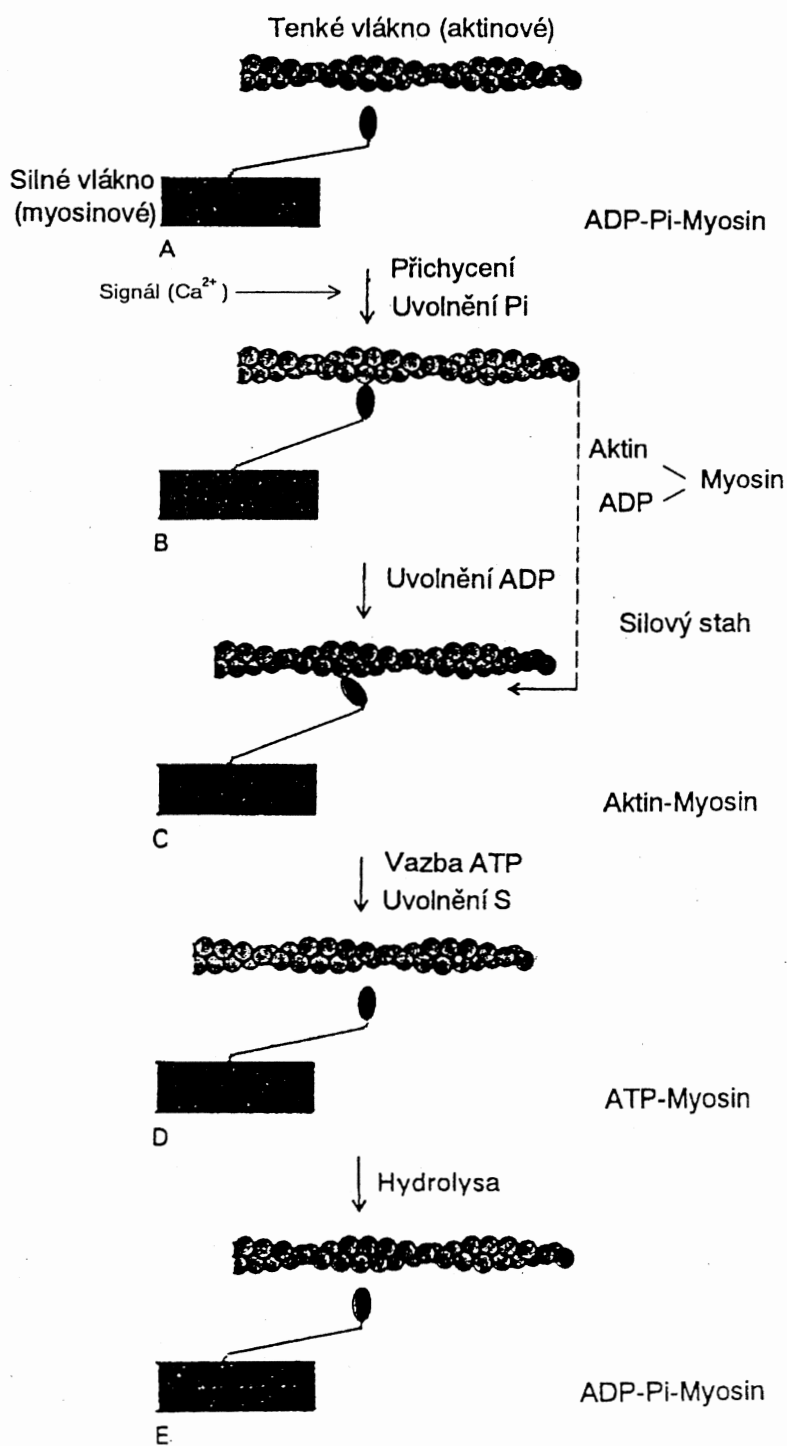
Druhou hlavní část svalového vlákna tvoří komplex aktinu a tropomyosinu. V tomto komplexu jsou globulární jednotky aktinu obtočeny kolem lineárních řetězců tropomyosinu. V komplexu jsou dále zapojeny jednotky troponinu, což je regulační protein.



Myosin tvoří tlustá filamenta, komplex aktinu a tropomyosinu tenká. Zkrácení svalu při pohybu je důsledkem zkrácení sarkomer. Tlustá i tenká filamenta však zůstávají stále stejně dlouhá. V roce 1954 vysvětlili tato pozorování nezávisle na sobě Hugh Huxley a Jean Hanson, Andrew Huxley a R. Niedergerke. Navrhli tzv. model klouzajících filament :

Síla, která stahuje sval, vzniká tím, že po sobě kloužou sady prstovitě se prostupujících tlustých a tenkých filament. Vlastní mechanismus svalového stavu je založen na tvorbě

a zániku aktomyosinového komplexu, při kterém dochází ke spojení a rozpojení tenkých a silných filament, a dále na konformačních změnách myosinu, které jsou spojeny se „sklápěním“ a opětným „narovnáním“ hlaviček. Hnací silou těchto změn je hydrolýza ATP. Tu vyvolávají hlavičky myosinu, které mají ATP-azovou aktivitu. Pohyb svalu vysvětluje tzv. „veslicový“ model stahu:



1. Vazba ATP na hlavičku tlustého filamenta způsobí, že se hlavička oddělí od aktinového monomeru na sousedním tenkém filamentu (D). Hydrolýzou ATP se myosin dostane do konformačního stavu, v němž je delší osa hlavičky přibližně kolmá k tlustému filamentu (E, A)
2. Když sval dostane podnět ke stahu (viz dále), zachytí se komplex myosinová hlavička–ADP-fosfát, na sousední aktinové jednotce (B)
3. Spojení aktinu s myosinem spustí pochody, kterými se postupně uvolní fosfát a ADP z hlavičky myosinu, která přitom přejde do konformace, v níž je skloněna nazad k tlustému filamentu (C). Tato konformační změna je vlastním silovým momentem svalového stahu. Při něm se popotáhne tenké filamentum vzhledem k tlustému filamentu. Hlavička se tím vrátí do svého původního stavu a je připravena na další stahový cyklus.

Na každém tlustém filamentu je přibližně 500 hlaviček a ty procházejí, během silného svalového stahu, popsáním cyklem reakcí nesynchronně, každá asi pětkrát za vteřinu. Hlavičky přitom „veslují“ a tak „kráčejí“ po sousedních tenkých filamentech, čímž se sval stahuje.

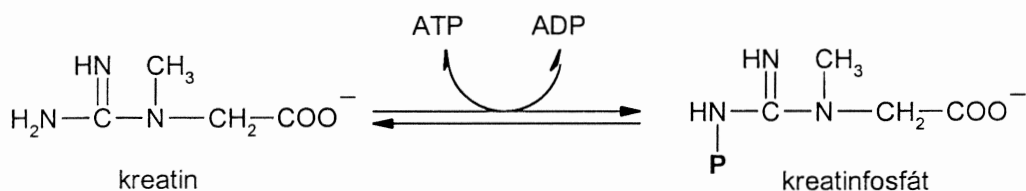
10.1.2. Řízení svalové kontrakce

Tvorba aktomyosinového komplexu je v klidové stavu blokována troponinem. To způsobuje, že i při dostatku ATP nedojde ke vzniku tohoto komplexu a sval je uvolněný. Signál pro svalový stah přichází nervovými vlákny. Ve svalových buňkách tím dojde k uvolnění Ca^{2+} iontu ze sarkoplazmatického retikula, které obaluje myofibrily. Uvolněný Ca^{2+} se váže allostericky na troponin a tím je teprve umožněna tvorba aktomyosinového komplexu a dojde ke svalovému stahu. Pro uvolnění svalu je nutné snížit koncentraci Ca^{2+} iontů. To zajišťuje Ca^{2+} -pumpa, která neustále odčerpává Ca^{2+} zpět do sarkoplazmatického retikula za spotřeby ATP.

10.1.3. Energetika svalové kontrakce

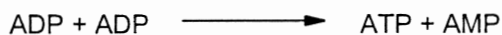
Primárním zdrojem energie pro svalový stah je ATP. Ten je spotřebováván jednak při vlastním stahu a dále je potřebný k „pohonu“ Ca^{2+} -pumpy. Spotřeba ATP při práci svalů je vysoká. Nemůže být kryta pouze ze zásob ATP, ale je nutné jeho neustálé doplňování. Hlavní zdroj pro syntézu ATP je glukosa, uvolněná buďto ze svalového glykogenu nebo přivedená krví. ATP je syntetizován v řetězci glykolýza – citrátový cyklus – aerobní fosforylace. Tento řetězec vyžaduje k úplnému průběhu dostatek

kyslíku. Pohotovostní zásoba kyslíku je ve svalu vázána na myoglobin. Po vyčerpání zásob kyslíku sice pokračuje glykolýza (koncentrace ATP je stále nízká), ale z pyruvátu se tvoří laktát. Při tomto anaerobním procesu je tvorba ATP nedostatečná a jeho koncentrace ve svalu nízká. Zdá se, že nízká koncentrace ATP ve svaích způsobuje zeslabení přenosu nervových signálů do svalu a tím dochází k tzv. svalové únavě. Tvorba ATP v řetězci glykolýza – cytrátový cyklus – aerobní fosforylace je příliš pomalá a nestačila by krýt okamžitou vysokou spotřebu svalu. Ve svalových buňkách proto existují další pomocné mechanismy, které umožňují rychlé doplňování ATP. Prvním je tvorba a zpětné štěpení kreatinfosfátu.



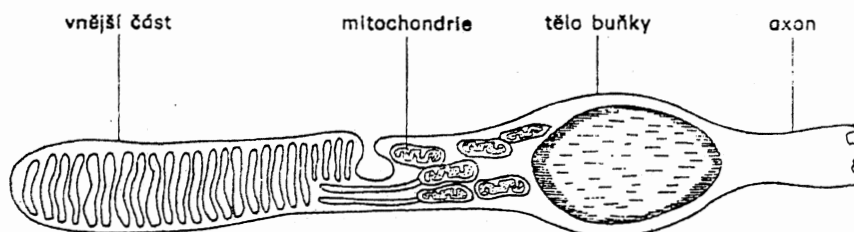
V klidu je za spotřeby ATP syntetizován kreatinfosfát, zatímco při zvýšené spotřebě ATP probíhá reakce v opačném směru.

Druhým mechanismem je přímá tvorba ATP z ADP. Reakci katalyzuje enzym myokinasa.

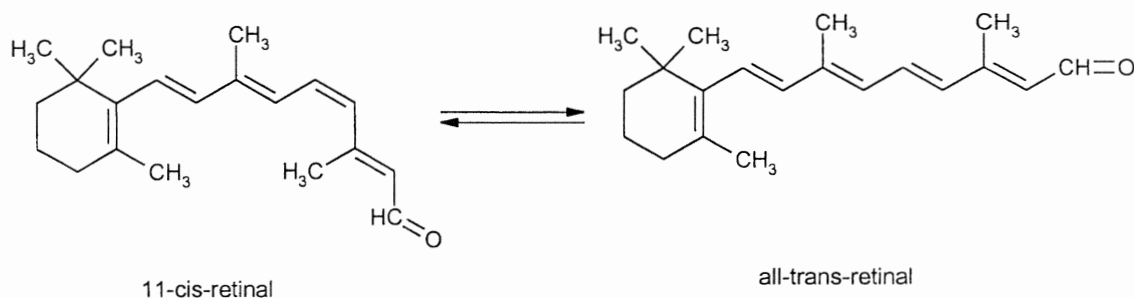


10.2. Biochemie vidění

Biochemický základ fyziologických mechanismů vidění spočívá především v existenci na světlo extrémně citlivých receptorů v sítnici oka a v chemických procesech, které vedou k rozkladu a opětné syntéze pigmentu sítnice - rhodopsinu. Sítnice lidského oka obsahuje receptorové buňky dvou základních typů: tyčinky a čípky. Receptorová část tyčinek obsahuje okolo 500 disků, obalených dvojitou membránou.

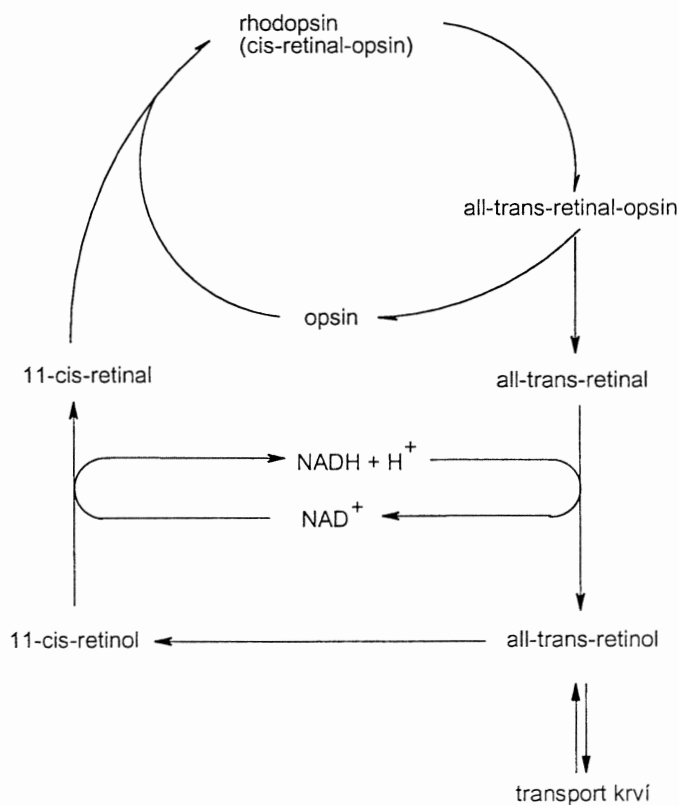


Základní složkou těchto membrán jsou lipoproteiny. Přitom 80% bílkovin v membránách disků je tvořeno rhodopsinem, složenou bílkovinou, jejíž nebílkovinná část absorbuje světlo. Vlastním chromoforem je v rhodopsinu 11-cis-retinal, který se váže na bílkovinnou část (opsin). Účinkem světla se 11-cis-retinal mění přes řadu meziproduktů (lumirhodopsin, metarhodopsiny) na all-trans-retinal.



Změna konfigurace retinalu způsobí otevření kanálku pro Ca^{2+} ionty v membráně disků. Ca^{2+} ionty, kterých je uvnitř disků vysoká koncentrace, tak proudí až k membráně tyčinky. Zde patrně blokují kanálky pro Na^+ ionty a tím způsobí hyperpolarizaci membrány. Takto vzniklý signál je přenášen do nervových buněk.

Světelný vjem ovšem musí být spojen s rychlou obnovou původního stavu. Rovnováhu Na^+ a Ca^{2+} iontu obnovují příslušné membránové „pumpy“. Zpětná přeměna izomerů retinalu se uskutečňuje v tzv. Waldově cyklu



All-trans-retinal, vzniklý pro dopadu světelného kvanta, se odštěpí od bílkovinné části rhodopsinu a dehydrogenasa s $\text{NADH} + \text{H}^+$ ho redukuje na all-trans-retinol (vitamín A). All-trans-retinol se dehydrogenasou oxiduje na all-trans-retinal, který se izomerasou mění zpět na 11-cis-retinal. Pak dojde k resyntéze rhodopsinu. Případný úbytek all-trans-retinolu je doplňován z pohyblivé zásoby vitamínu A v játrech.

Čípky se podobají tyčinkám. Rozdíl spočívá zejména ve složení fotoreceptorů. Ty vždy obsahují retinal, ale liší se přítomným proteinem. To způsobuje odlišnou citlivost jednotlivých čípků k různým barvám spektra. Primáti mají patrně tři druhy čípků, ptáci až pět. Kombinace fotoreceptorů citlivých k různým barvám světla umožňuje barevný vjem.

Název:	Biochemie
Autor:	doc. Ing. Jiří Špička, CSc.
Vydavatel:	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta
Nakladatel:	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta
Vydání:	1. vydání, 2004
Počet stran:	150
AA:	9,38
Náklad:	100 výtisků
Tisk:	DTP Č. Budějovice

Tato publikace neprošla jazykovou úpravou v redakci nakladatelství.

Za věcnou a jazykovou správnost díla odpovídají jednotliví autoři.

ISBN 80-7040-683-6



