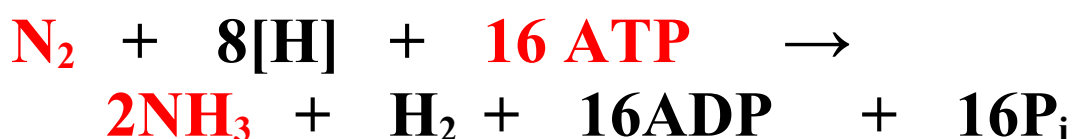


1. Fixace N₂ v širším kontextu

Biologická fixace vzdušného dusíku představuje z hlediska globální bilance N₂ důležitý proces jímž je plynný dusík asimilován do živé biomasy. Z povahy vazby mezi atomy dusíku (vysoce stabilní trojná vazba) vyplývá, že se jedná o energeticky náročný proces (ze stechiometrie je patrné, že na jednu redukci N₂ je spotřebováno 16 ATP). Pouze u omezené skupiny organismů (jedná se výhradně o prokaryota), se v procesu evoluce vyvinul mechanismus, jímž je molekula N₂ štěpena a asimilováno přímo do organické hmoty. V dnešní době je známo několik desítek prokaryotních rodů (aerobních či anaerobních, fototrofních či heterotrofních) vlastníci tento unikátní enzymatický systém zvaný nitrogenáza. Řada z nich žije volně v půdě či na jiných substrátech (např. rod *Azobacter*), jiné vstoupily v procesu evoluce do symbiotických spojení (nejznámější bakterie *Rhizobium* s rostlinami čeledi Fabaceae či aktinomycety rodu *Frankia* s olší). Mezi pozoruhodnou skupinu fixátorů patří též sinice (*Cyanobacteria*).

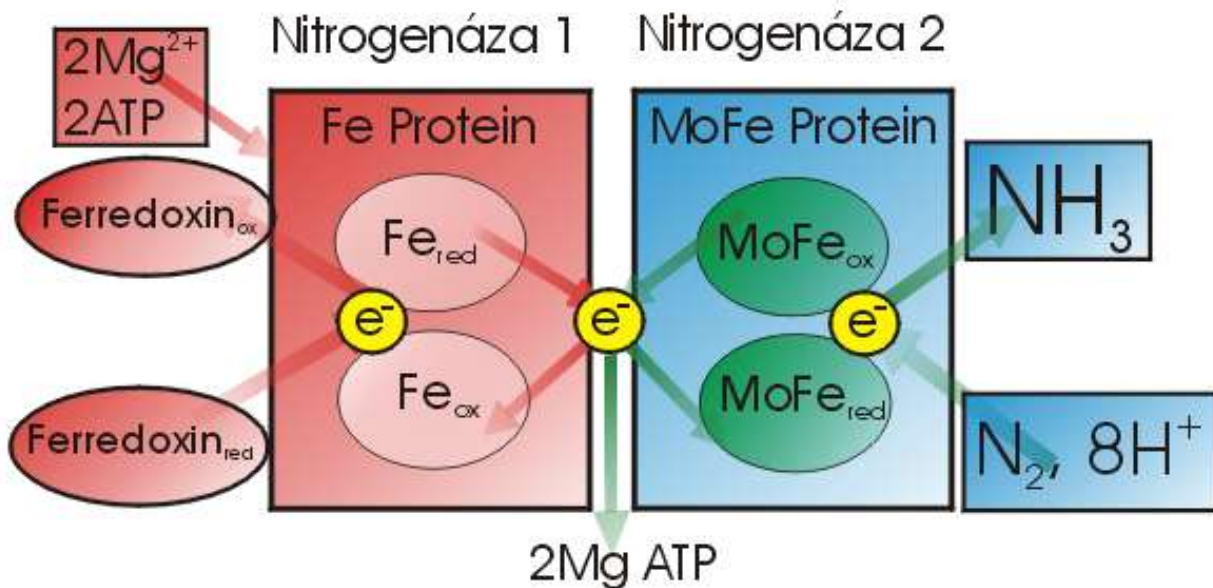


Stechiomertie procesu

2. Něco málo o nitrogenáze

Jak již bylo zmíněno, nitrogenáza je unikátní a pravděpodobně prastarý enzym, jenž se vyvíjel ještě v období kdy byla zemská atmosféra bezkyslíkatá. Skládá se ze dvou proteinů, jenž od sebe mohou volně disociovat:

- **MoFe protein (nitrogenase 2, dinitrogen reductase)** – hlavní protein provádějící vlastní redukci, obsahuje v aktivním centru molekuly **molybdenu nebo vanadu** (takzvané alternativní nitrogenázy)
- **Fe protein (nitrogenase 1, nitrogenase reductase)** – přenášejíci elektrony z ferredoxinu na hlavní protein, tato podjednotka je extrémě citlivá k molekulám O₂ jenž ji inhibují. (viz obr. 1)



Obr.1: Nitrogenáza – enzymatický komplex složený z MoFe a Fe proteinu.

V průběhu vývoje zemské atmosféry však v dávné minulosti nastal důležitý zvrát a to v době, kdy se v zemské atmosféře začal objevovat kyslík. Organismy musely svůj vnitřní metabolismus přizpůsobit pro fungování nitrogenázy tak, aby pro ni zajistily **mikroaerobní podmínky**.

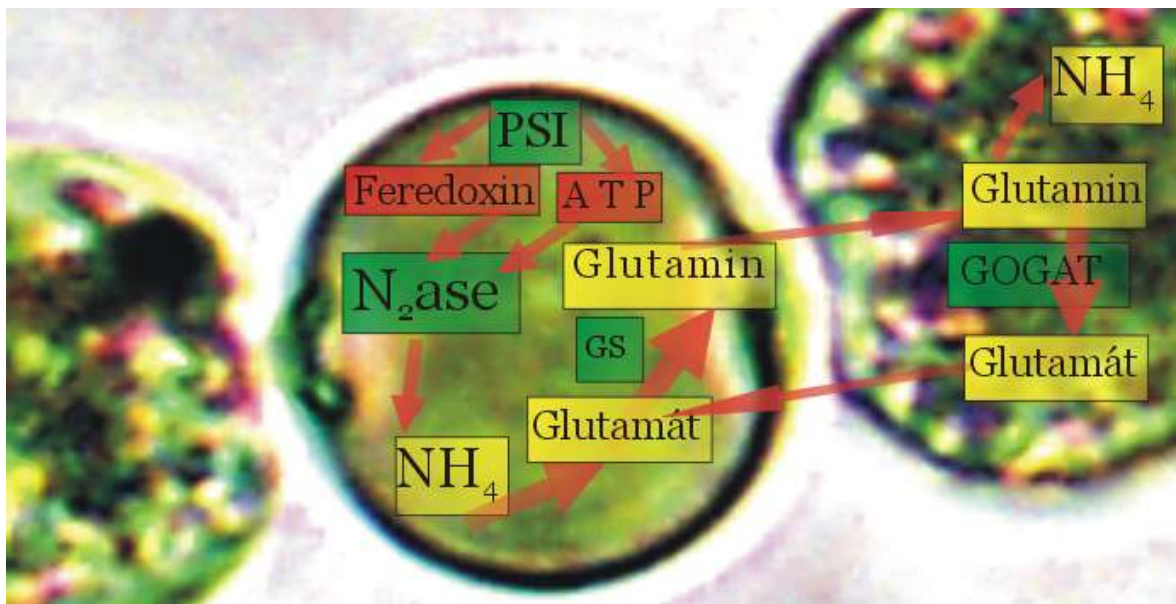
3. Fixace N_2 u sinic

U sinic se střetávají dva zdánlivě neslučitelné procesy. Ve všech vegetativních buňkách probíhá fotosyntéza, která vede k uvolňování molekul kyslíku. Ty jsou však toxické pro nitrogenázu. Z tohoto důvodu se u sinic vyvinuly strategie **prostorové a časové separace fotosyntézy a fixace N_2** . U vláknitých sinic řádu Nostocales a Stigonematales dochází při nedostatku dusíkatých sloučenin k diferenciaci buněk specializovaných na fixaci – **heterocyt**.

3.1. Heterocyty (Heterocysty)

V průběhu přetváření vegetativní buňky na heterocyt dochází k celé sekvenci hlubokých změn ve struktuře i funkci buňky. Jako první se ukládá trojvrstevná stěna vně původní buněčné stěny. Vrstva je tvořena vnitřní glykolipidovou, prostřední polysacharidovou a vnější vrstvou tvořenou nekompaktními vlákny téhož polysacharidu (proces je řízen pro glykolipid hgl C,D,E,K a devABC geny, a pro

polysacharid hep A,B,C,K – viz obr.3). Tento krok je na buňce patrný již po 6-12 hodinách od započetí diferenciace. Výsledkem je metabolicky ještě vegetativní bňka se silnou buněčnou stěnou – toto stádium nazýváme **proheterocyt**. Následuje řada biochemických změn - systém thylakoidů je uvnitř buňky zcela přestavěn v nový membránový systém, zcela mizí fotosystém II s OEC (centrem pro štěpení vody a uvolňování kyslíku), zatímco Fotosystém I (PSI) a cytochromální komplexy jsou zachovány. PSI uskutečňuje cyklický transport vedoucí ke generaci ATP, na cytochomech probíhá dýchací řetězec (jeden z ochranných prostředků heterocyty vedoucí ke snížení hladiny O₂). Dále pak mizí z buňky RuBisCo. Posledním krokem je syntéza vlastních enzymů provádějících reakci. Kromě nitrogenázy (většinou se u sinic vyskytuje nitrogenáza s MoFe proteinem, byly však nalezeny kmeny např. Anabaena s alternativní V-Nitrogenázou) jsou syntetizovány enzymy mající za úkol přenesení vzniklého amonného iontu na glutamát - **GS-glutamin syntetáza**, ale též enzym zajišťující regeneraci glutamátu ve vegetativních buňkách (**GOGAT**). Transportní sloučeninou je tedy glutamát, ten prochází do okolních veg. buněk, zatímco glutamát se vrací zpět do heterocyty.

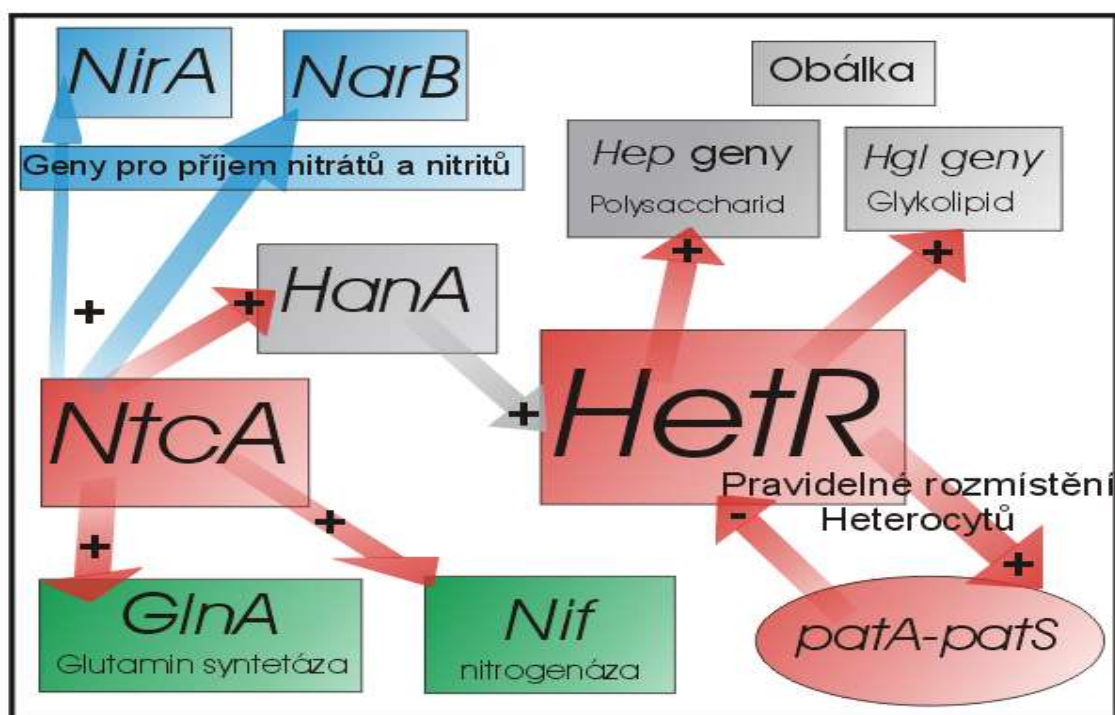


Obr.2: Transport glutaminu ven z heterocyty

Celý proces diferenciace je striktně regulován a trvá cca 12-20 hodin. Zralý heterocyt komunikuje se sousedními vegetativními buňkami přes **polární noduly** (septa v místě styku s vegetativními buňkami). Jedná se o složitě strukturovaný pór který je perforovaný několika desítkami **mikroplasmodesmat**, jimiž mimo zmíněný

transport dusíkatých sloučenin dodávají okolní buňky nutné redukční ekvivalenty NADH. Z tohoto důvodu dochází u heterocytózních sinic v noci ke značnému snížení účinnosti fixace (fotosyntéza v okolních buňkách se zastavuje a tak nejsou schopny dodávat NADH). Z výše uvedených informací vyplývá nutnost striktní regulace celého procesu.

Na regulaci celého procesu diferenciaci se účastní celá kaskáda zahrnující cca 60 genů a jejich produktů (zjednodušeně viz Obr3). V podmínkách, kdy se sníží koncentrace dusíkatých sloučenin dochází k expresi genu *NtcA* (globálního regulátoru příjmu dusíku). Jeho produkt se váže jako regulátor před řadu genů a způsobuje jejich expresi (zejména genů enzymů sloužících na příjem nitrátů a nitritů). Pokud však žádné dusíkaté sloučeniny nejsou přítomny, způsobí *Ntc* expresi *HetR* (gen pro započítání dif. heterocyt). *HetR* má za úkol započítání celé kaskády přeměn (viz obr.3). Pravděpodobně nejzajímavější je však řízení pravidelného rozestupu mezi heterocyty. Heterocyty se vyvíjejí na vláknech (alespoň u modelových sinic) v pravidelných rozestupech 15-20 buněk (ono to tak bez výjimky neplatí ani u modelových sinic) Předpokládá se, že vyvíjející se heterocyt produkuje do okolních buněk inhibitor diferenciaci. Adeptem na tuto funkci je malý pentapeptid *PatS*, ten je produkován již od ranného stádia diferenciaci a inhibuje účinek *HetR*. Navíc inaktivací genu *patS* vzniknou mutanti se zcela chaotickým rozložením heterocyt.



Obr.3: Vztah mezi hlavními regulačními geny při diferenciaci heterocytu

3.2. Trichodesmium a diazocyty, aneb jak se fixuje v moři

Obdobný systém prostorové separace fotosyntézy a fixace je uplatňován ještě u několika sinic. Nejznámějším zástupcem u nějž se vyskytuje způsob jakési primitivní buněčné diferenciaci je mořský rod vláknitých sinic Trichodesmium. Tyto sinice tvoří dlouhá vlákna vegetativních buněk uskupená do kulovitých či svazečkovitých kolonií. Dříve panoval názor, že k fixaci dochází uvnitř kolonie, byl však záhy popřen novými poznatky. Na vlákně dochází k primitivní diferenciaci, která není patrná v optickém mikroskopu a odehrává se výhradně na biochemické úrovni. Na vlákně se vyčlení krátký úsek cca 5 vegetativních buněk v nichž přestává fungovat fotosyntetický systém a probíhá pouze

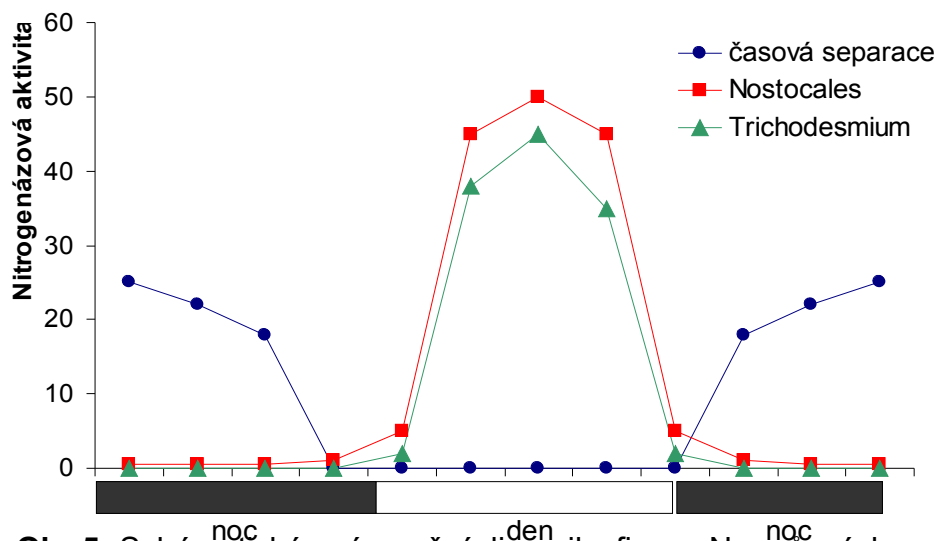
dýchání. Následkem snížení koncentrace kyslíku a dochází k expresi genů pro nitrogenázu. Tyto primitivně diferenciované buňky nazýváme **diazocyty**. Nutno říci, že ačkoliv je pravděpodobně tento způsob fixace méně efektivní než u heterocytu, z ekologického hlediska tvoří rod Trichodesmium nesmírně důležité fixující společenstvo tropických a subtropických moří.



Obr.4: Rod Trichodesmium
www.who/edu/science/B/people/ewebb/Trich.html

3.3. Časová separace

Heterocyty a diazocyty jsou typickým příkladem prostorové separace dvou dějů. U sinic se však vyvinulo též časové oddělení obou dějů. U řady vláknitých či kokálních typů (viz Tab. 1) dochází během dne ve vegetativních buňkách k fotosyntéze, což vede k získání energie potřebné pro růst a akumulaci NADP a ATP.



Obr.5: Schématické znázornění dynamiky fixace N₂ u různých typů sinic.

V noci pak dochází v důsledku dýchání ke snížení hladiny O₂ uvnitř buňky a je nastartován proces fixace (dynamika procesu je ukázána na obr. 5). Tento způsob byl několikrát spolehlivě prokázán (např. *Plectonema boryanum*, *Aphanothece*).

Tab.1: přehled rodů u nichž byla prokázána časová separace fixace a fotosyntézy

rod sinice	počet pozitivních kmenů (2)	
	aerobní fixace	anaerobní fixace
kokální		
<i>Synechococcus</i> sp.	1	2
<i>Synechocystis</i> sp.	1	1
<i>Cyanothece</i> sp.	1	1
<i>Aphanothece</i> sp.	1	0
<i>Gleothece</i> sp.	5	0
<i>Gleocapsa</i> sp.	1	1
vláknité		
<i>Oscillatoria</i> sp.	1	6
<i>Plectonema</i> sp.	1	0

