



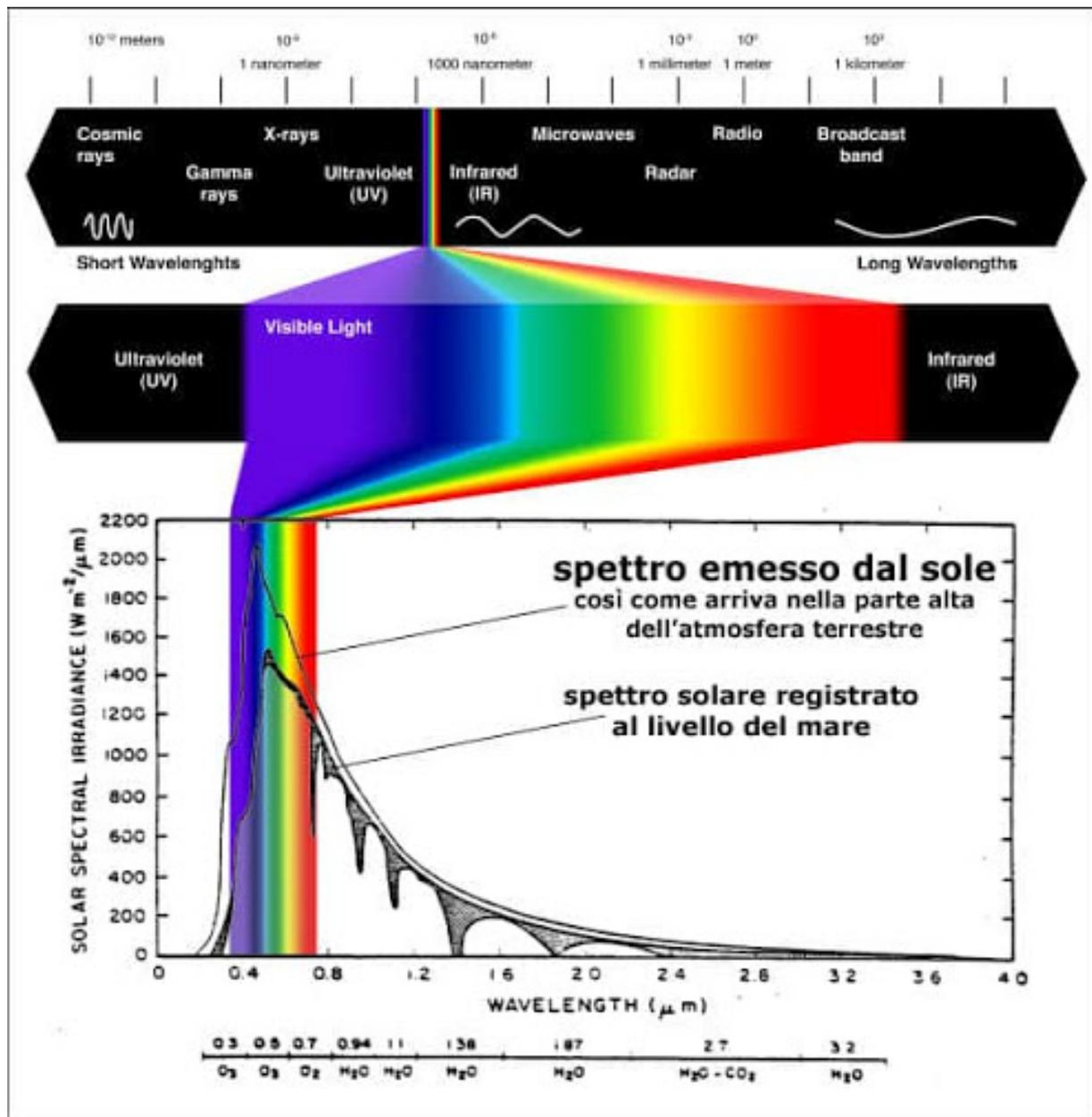
FOTOSINTESI

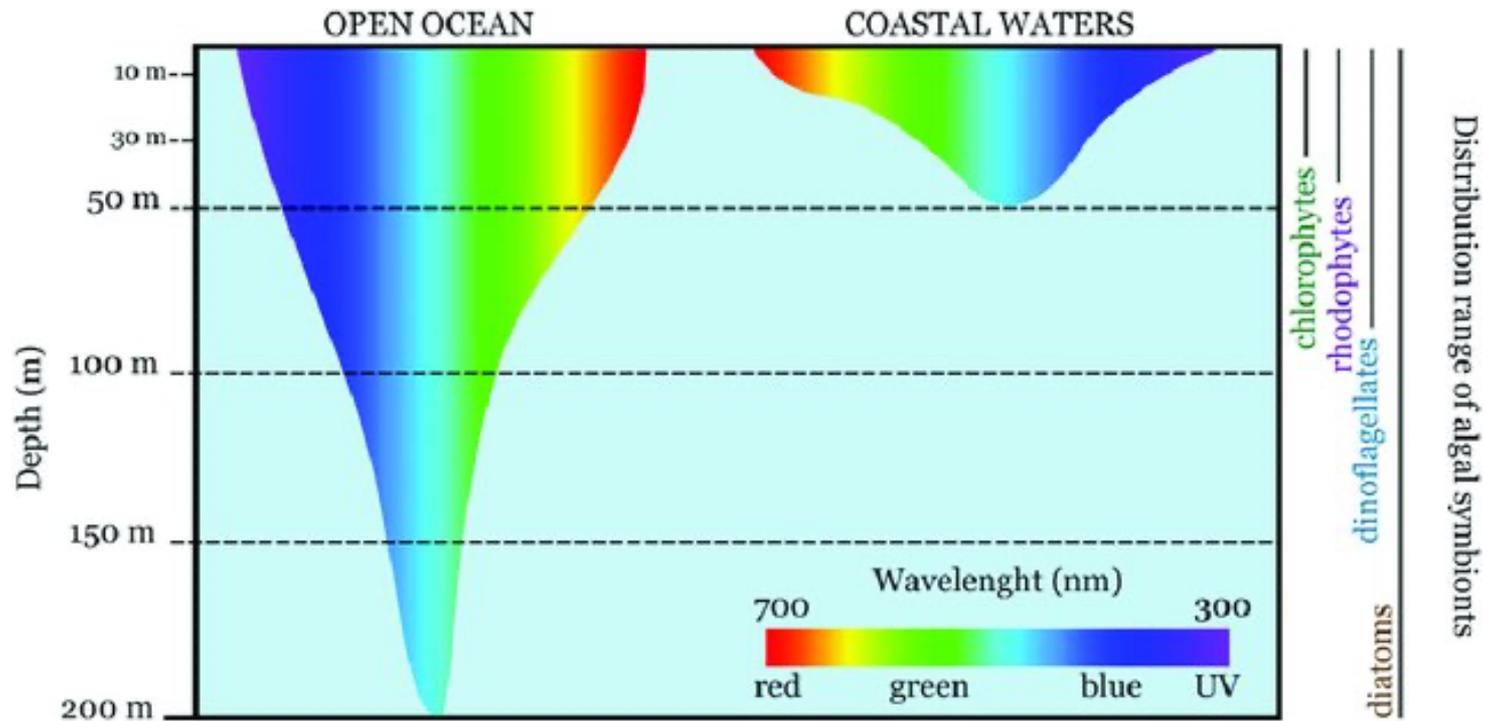


Perché queste lunghezze d'onda?

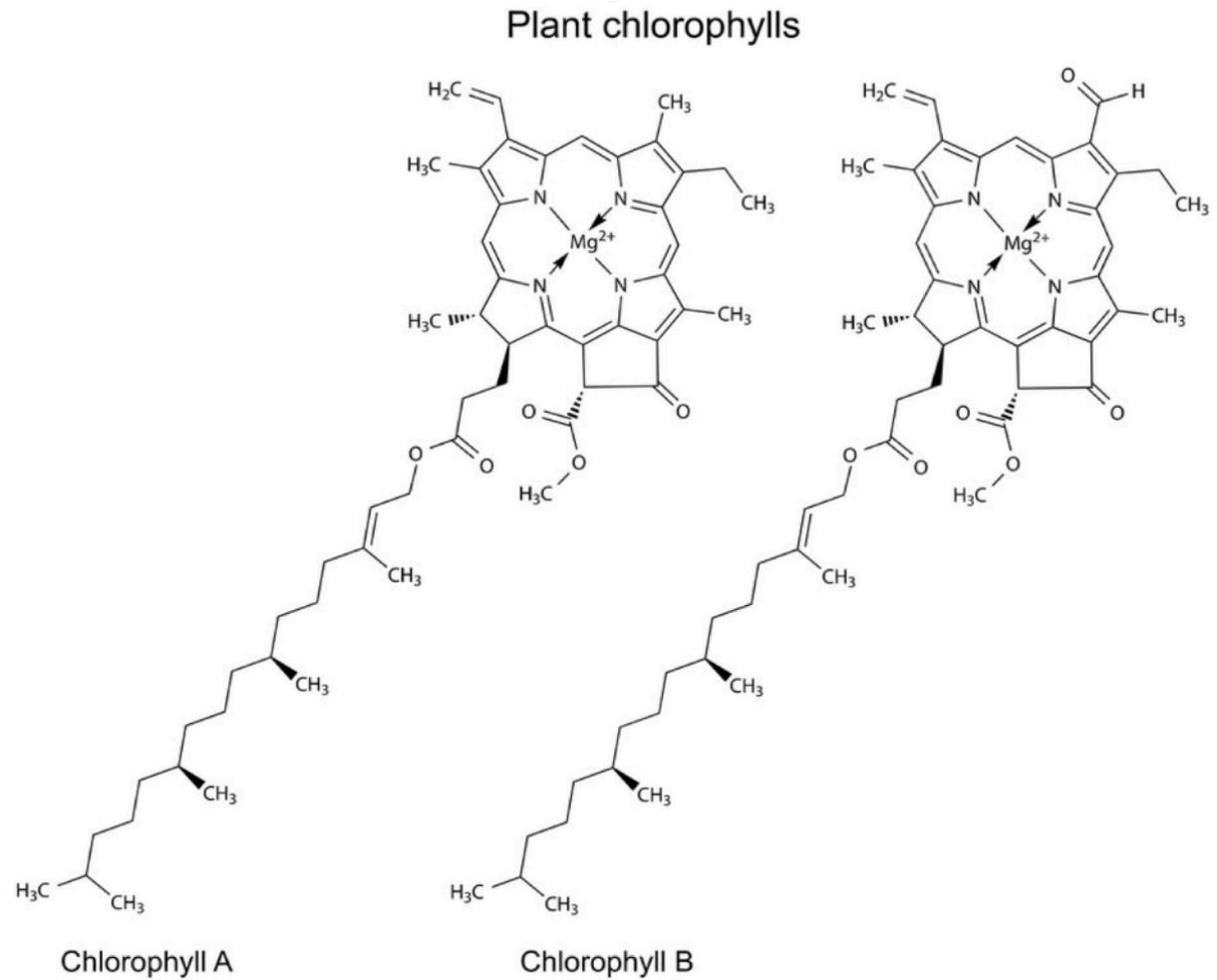
Perché la fotosintesi si è evoluta per sfruttare proprio queste, e non altre, magari più ricche di energia?





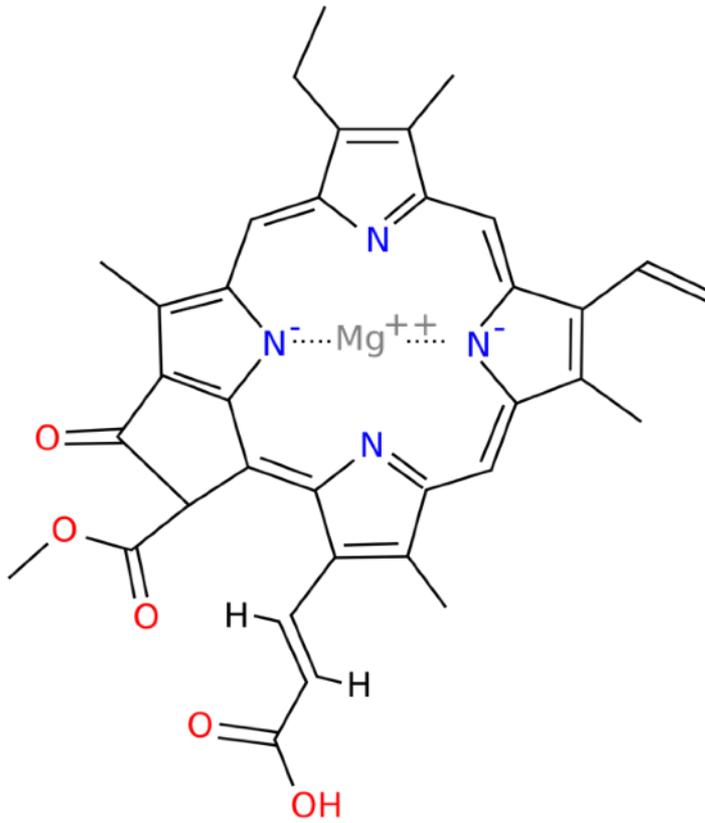


Tuttavia, come detto, non esiste solo la clorofilla a....

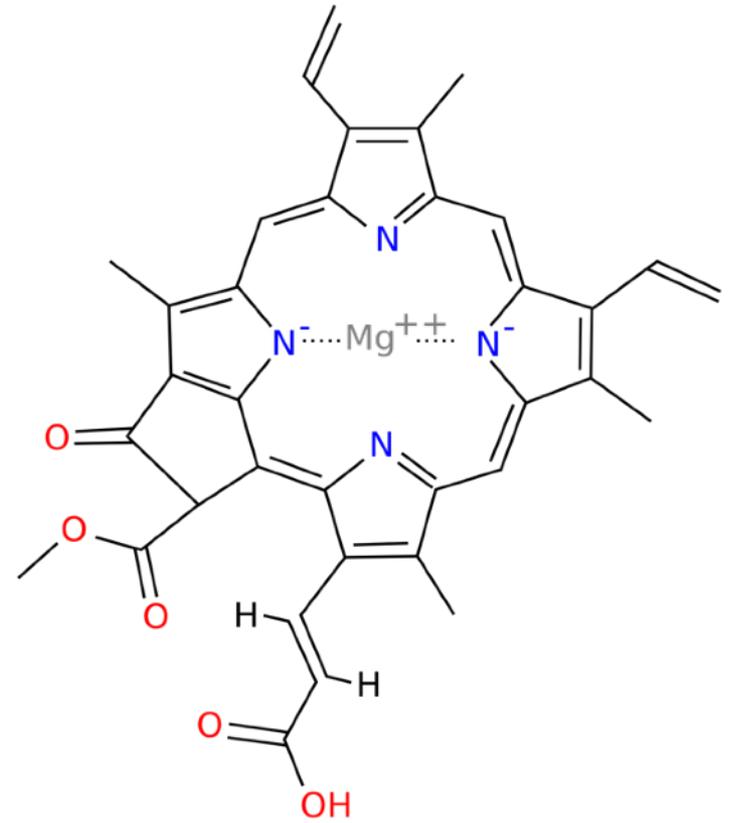


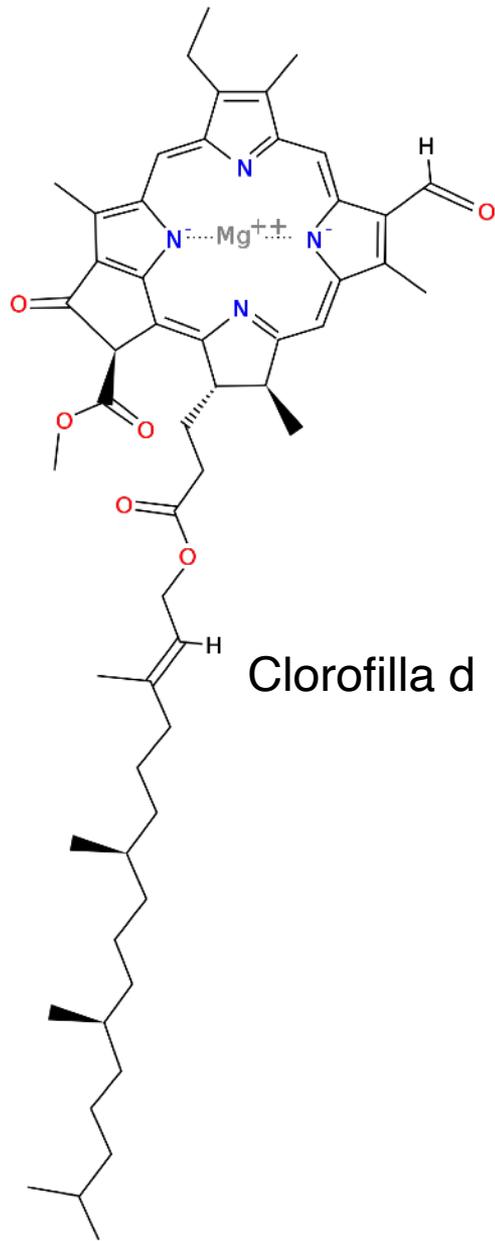


Clorofilla c1

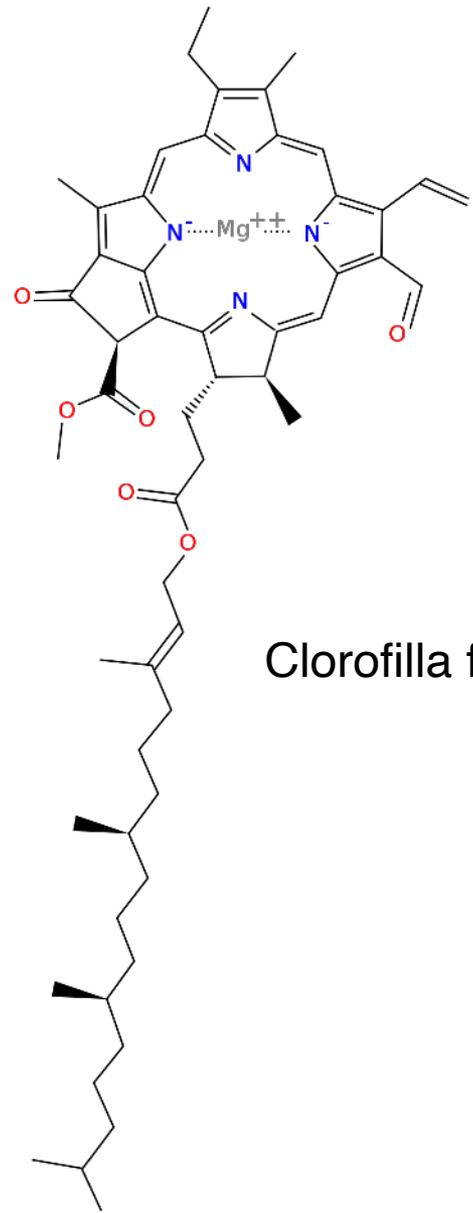


Clorofilla c2





Clorofilla d



Clorofilla f





La clorofilla a è universale, presente in tutti gli organismi fotosintetizzanti. Le altre invece sono limitate a alcuni gruppi di organismi. La clorofilla b è presente principalmente nelle piante, mentre le c sono presenti nelle alghe. Le clorofille d e f sono presenti solo nei cianobatteri.

Lo special pair del centro di reazione è normalmente composto da una coppia di molecole di clorofilla a, tranne in alcuni casi come il già citato cianobatterio *Acaryochloris marina*.

Oltre alle clorofille, ci sono poi altri pigmenti accessori, che sono i carotenoidi e le ficobiline. Questi hanno il ruolo aiutare le clorofille a intercettare diverse lunghezze d'onda, ampliando il range di assorbimento dei sistemi antenna dei fotosistemi.

I carotenoidi hanno però anche un ruolo fondamentale nel prevenire danni fotossidativi alle molecole di clorofilla.

Nei cloroplasti sono presenti normalmente due tipi di carotenoidi: i caroteni e le xantofille.

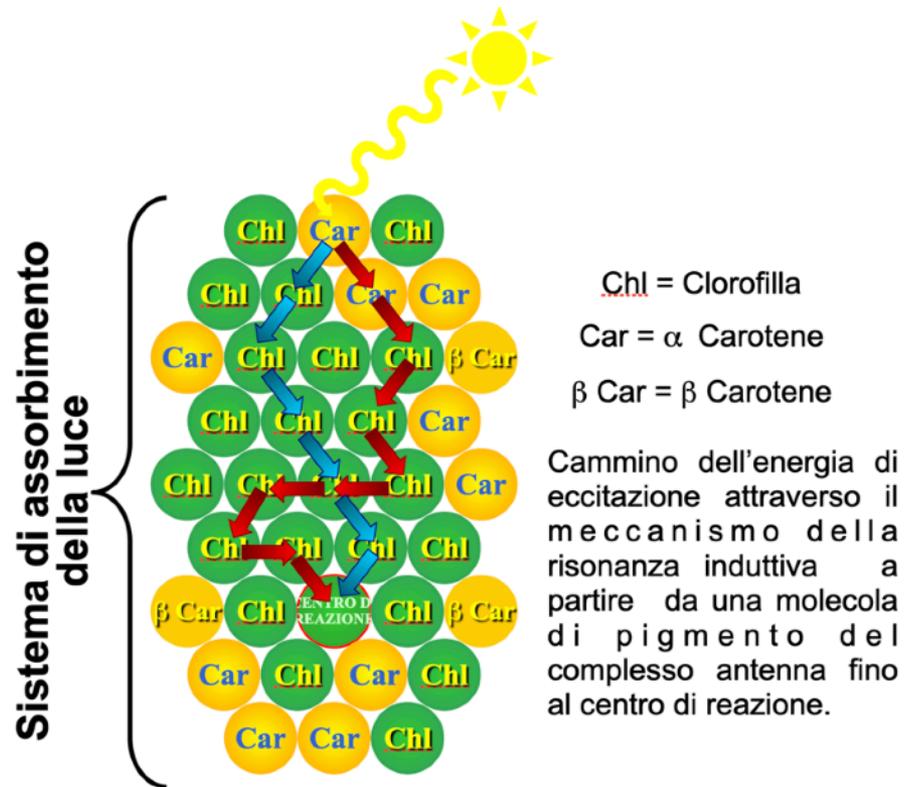




Il beta carotene è la principale fonte di vitamina A, o retinolo, necessaria per l'uomo e per molti altri animali.

Nelle foglie il colore dei carotenoidi è di solito mascherato alle clorofille, fuorché nelle caducifoglie in autunno, quando la degradazione delle clorofille lascia che questo divenga evidente.

Le ficobiline non sono universalmente presenti, ma si trovano solo in cianobatteri e alghe rosse.





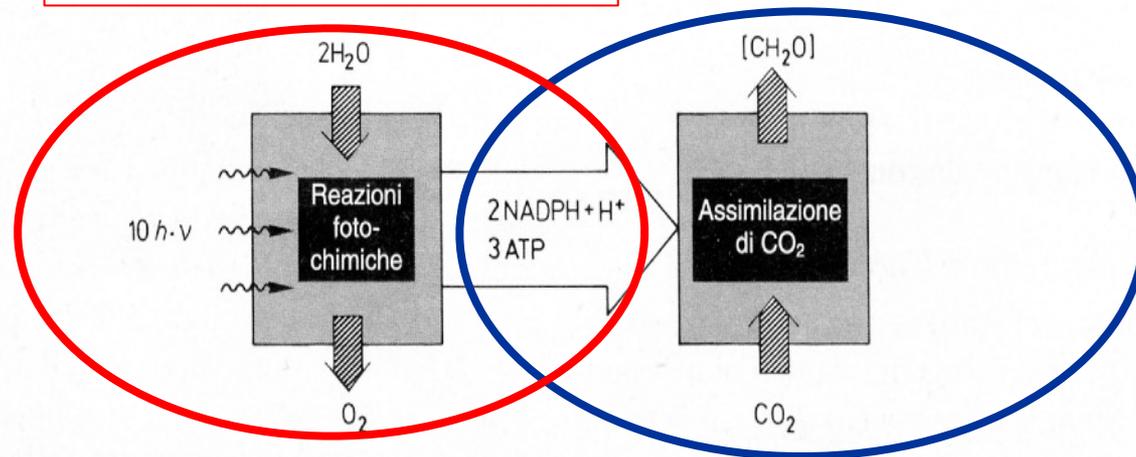
Fotosintesi: la fase “luminosa”





FASE LUMINOSA

FASE OSCURA

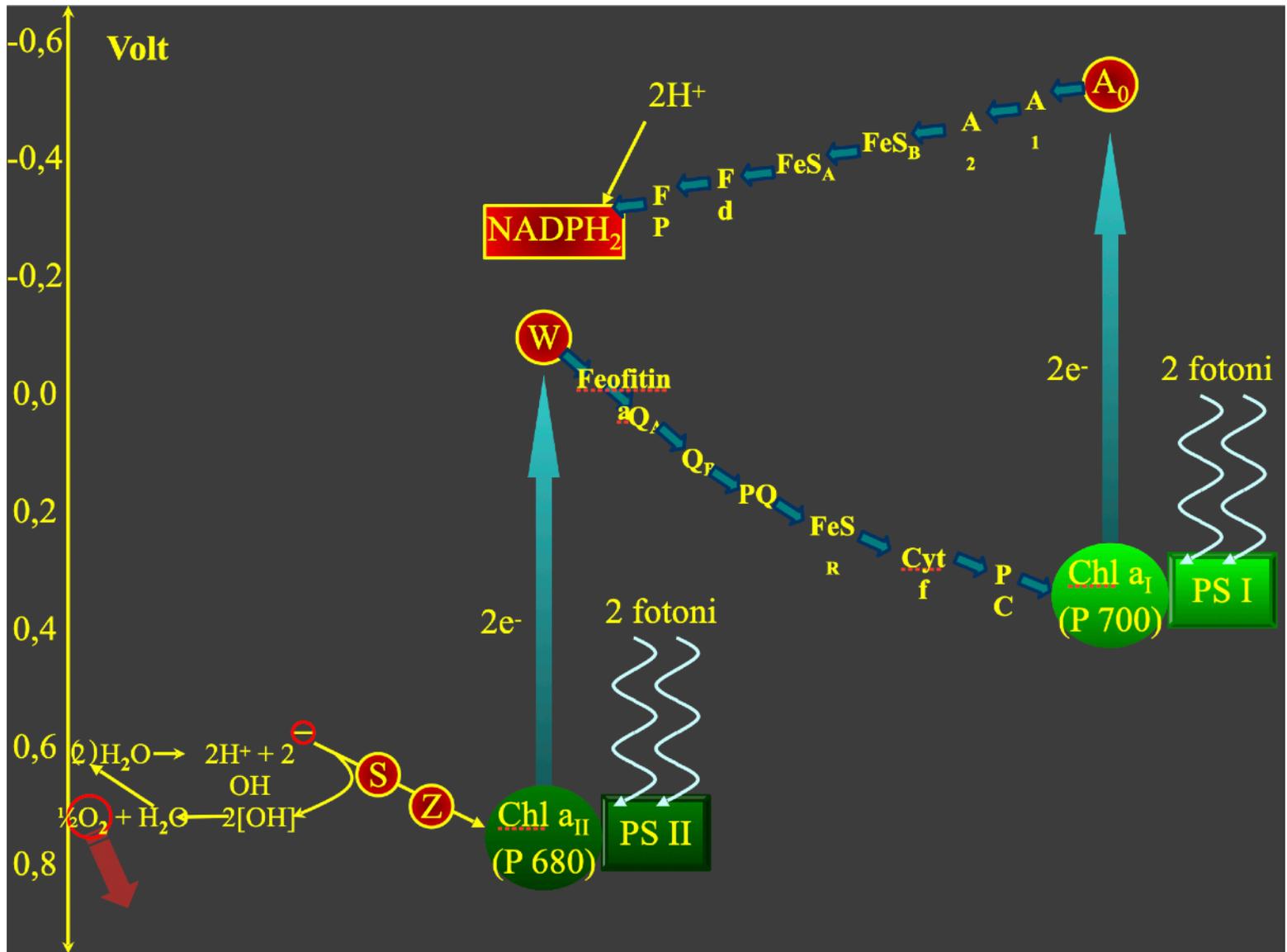


Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consu-

mo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di $2\text{NADPH} + \text{H}^+$ e di 2 ATP attraverso il trasporto non cicli-

co di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.







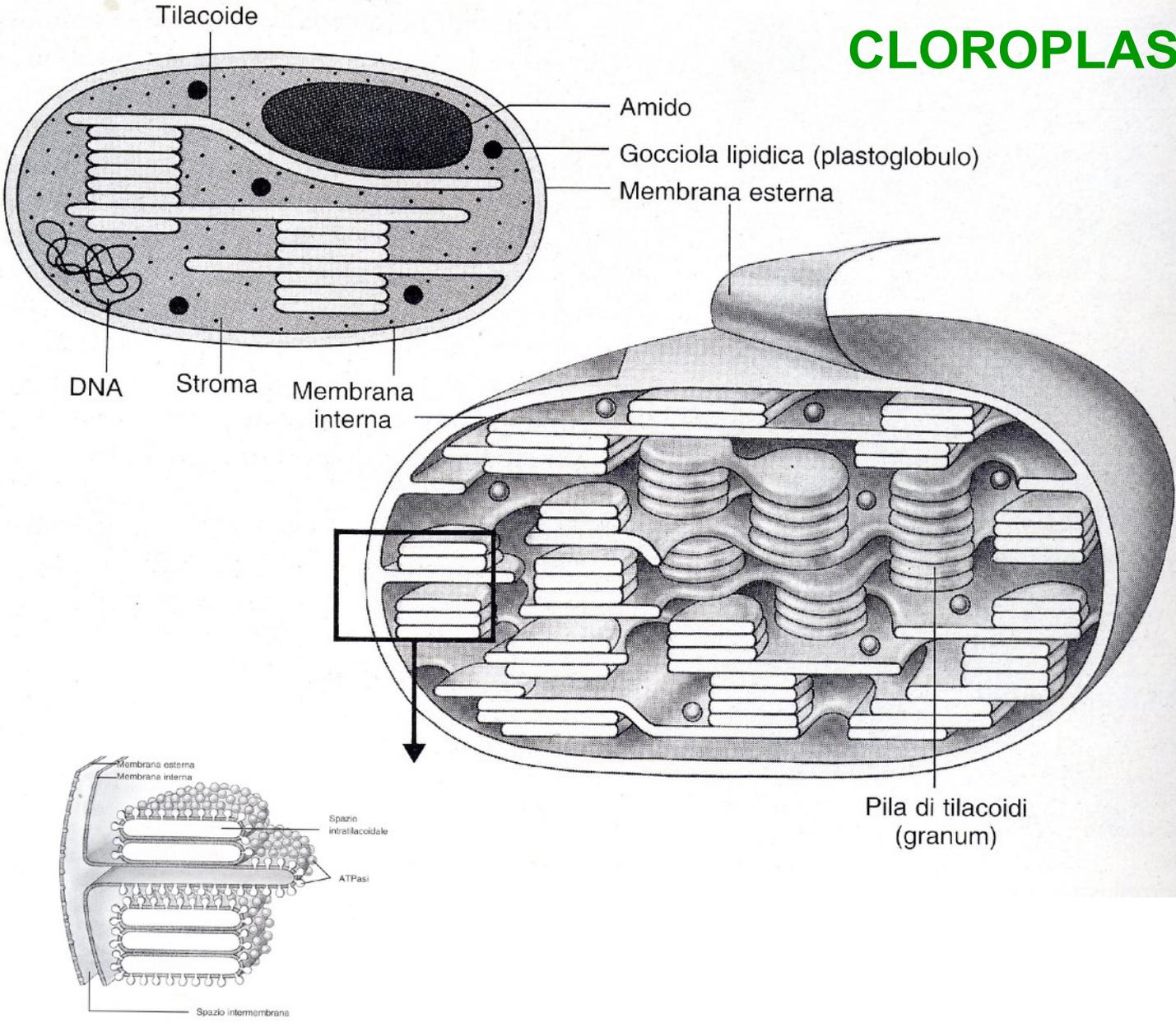
Dove avvengono questi fenomeni?

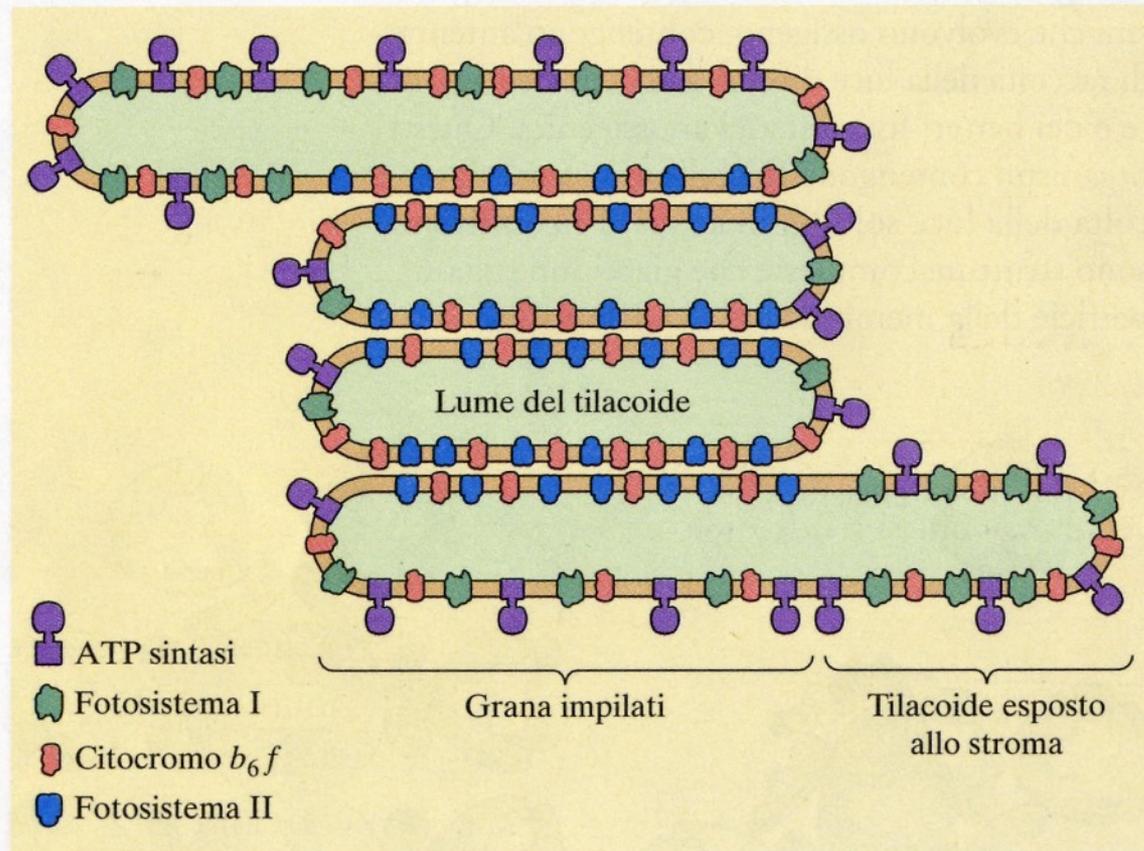
- Riduzione del NADP^+ : a livello dello stroma
- Le catene REDOX e i fotosistemi che assorbono l'energia luminosa sono parti integranti delle membrane tilacoidali
- FOTOLISI dell'ACQUA: negli spazi intratilacoidali (“dentro i tilacoidi”)





CLOROPLASTI

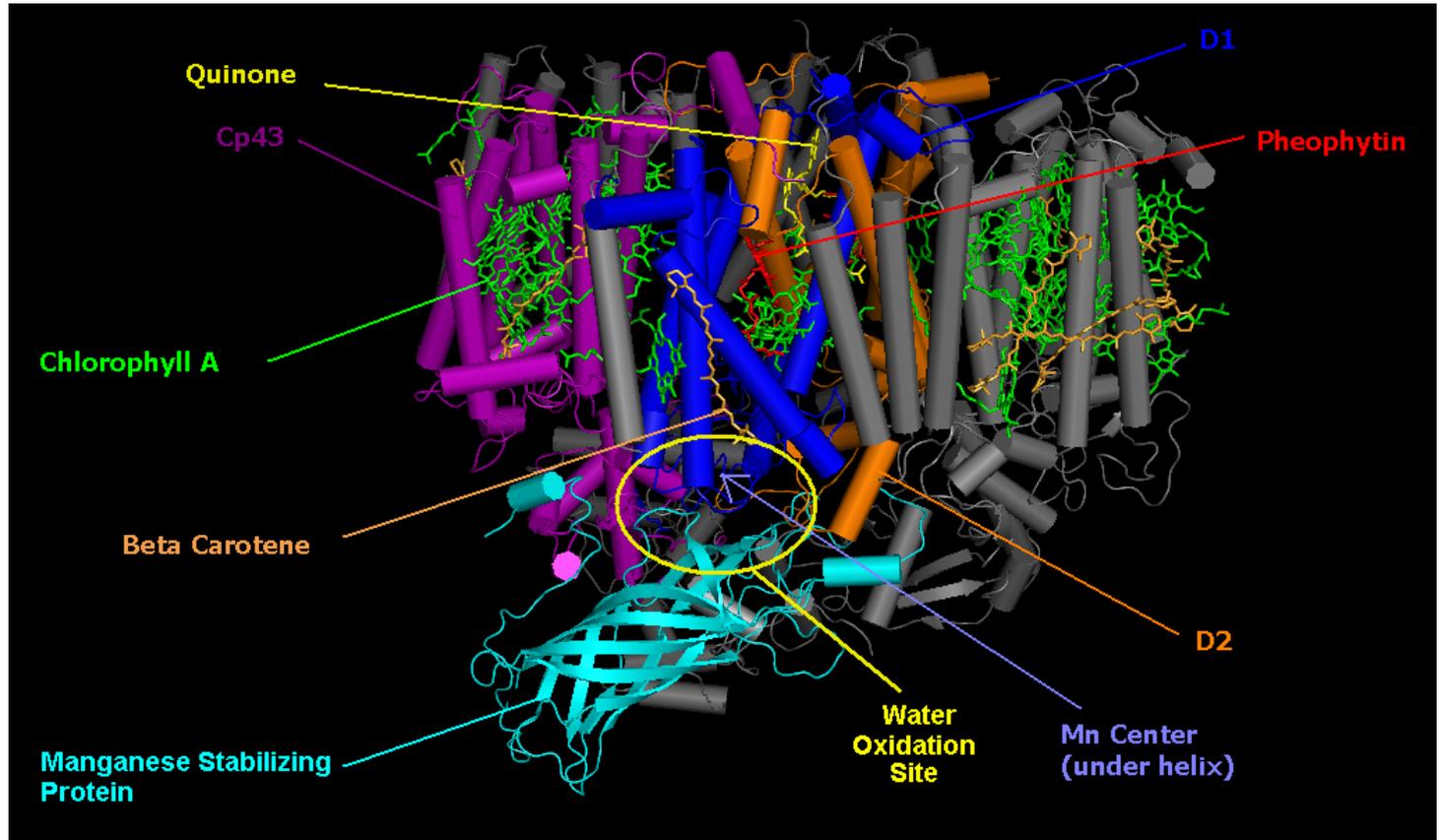




L'eterogeneità laterale dei complessi della membrana del cloroplasto. Il PSII è localizzato soprattutto nelle regioni impilate delle membrane tilacoidali, mentre il PSI e l'ATPasi sono localizzate quasi esclusivamente nelle membrane non impilate. Il complesso del citocromo b_6f è distribuito equamente attraverso le due regioni. La separazione dei fotosistemi necessita di trasportatori elettronici mobili come il plastochinone e la plastocianina, che trasportano gli elettroni tra i complessi della membrana separati spazialmente.



Fotosistema II





Il fotosistema II è il solo capace di ossidare l'ossigeno dell'acqua (fotolisi), e quindi di estrarre da essa elettroni, che poi verranno usati anche dal fotosistema I, fino a ridurre il NADP⁺ a NADPH.

Il nome è dovuto al fatto che è stato il secondo fotosistema a essere scoperto.

Nel suo centro di reazione, formato da un omodimero di clorofilla a, la carica positiva dovuta alla perdita di un elettrone è spostata principalmente su una delle due molecole, e non ripartita equamente su tutti e due. Di conseguenza il potenziale ossidativo di questa molecola è molto elevato, e sembra sia questo che permette l'ossidazione dell'ossigeno.

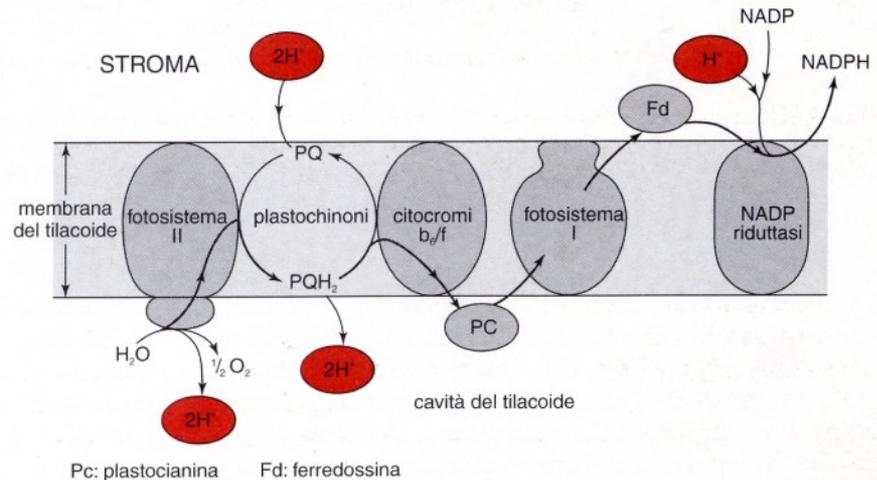
Il complesso di evoluzione dell'ossigeno (*oxygen evolving complex*) non è ancora stato chiarito in tutte le sue parti, per cui il meccanismo esatto è ancora in parte sconosciuto.



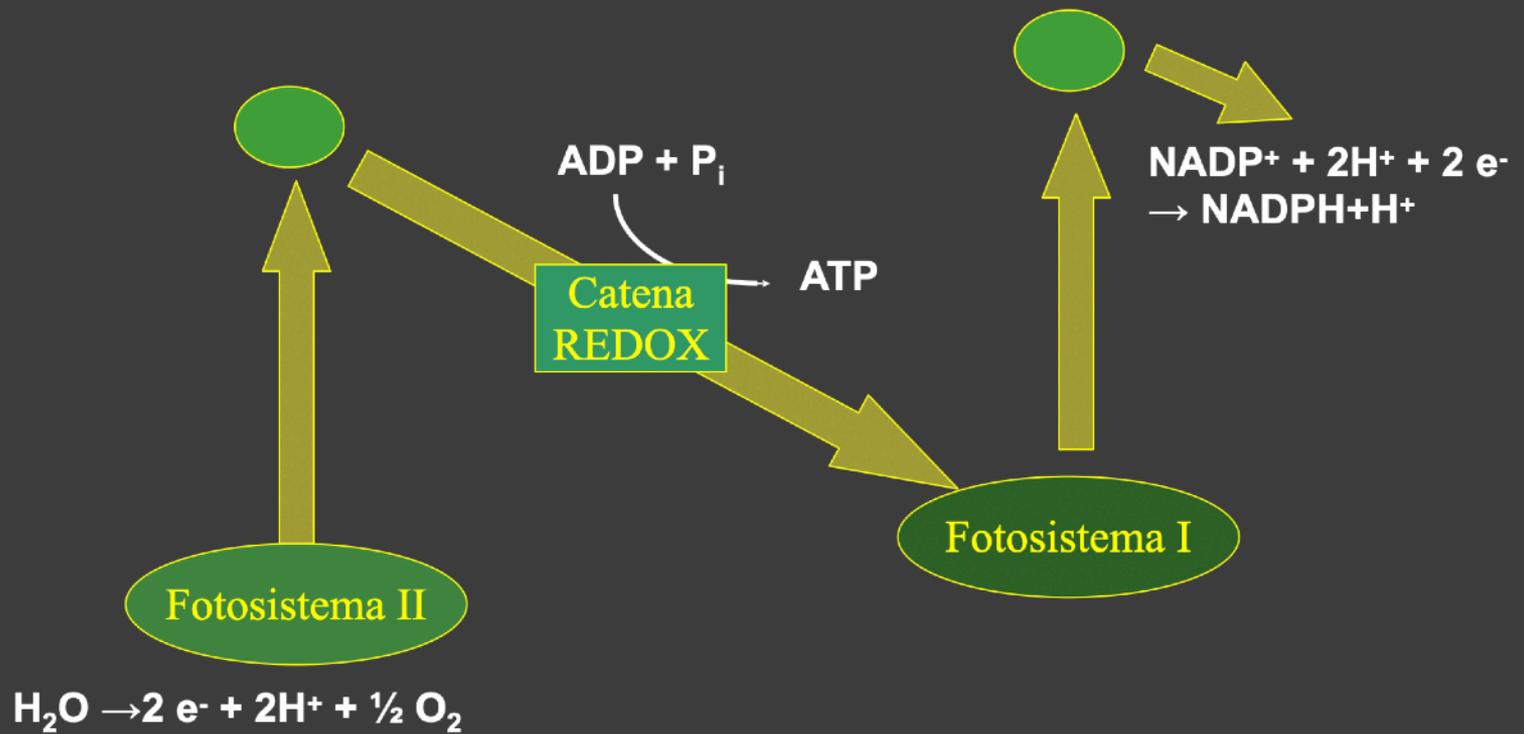


Il fotosistema II trasferisce quindi gli elettroni al fotosistema I tramite una cascata di accettori, il primo dei quali è la feofitina. Gli elettroni vengono poi trasferiti a dei plastochinoni, alla ferridossina, transitano per il complesso del Citocromo b/f, pompando protoni all'interno del lume tilacoidale, per poi fluire alla Plastocianina, e quindi diventare disponibili per il fotosistema I. Il trasporto degli elettroni è necessario perché fotosistema II e I non sono attigui nella membrana tilacoidale.

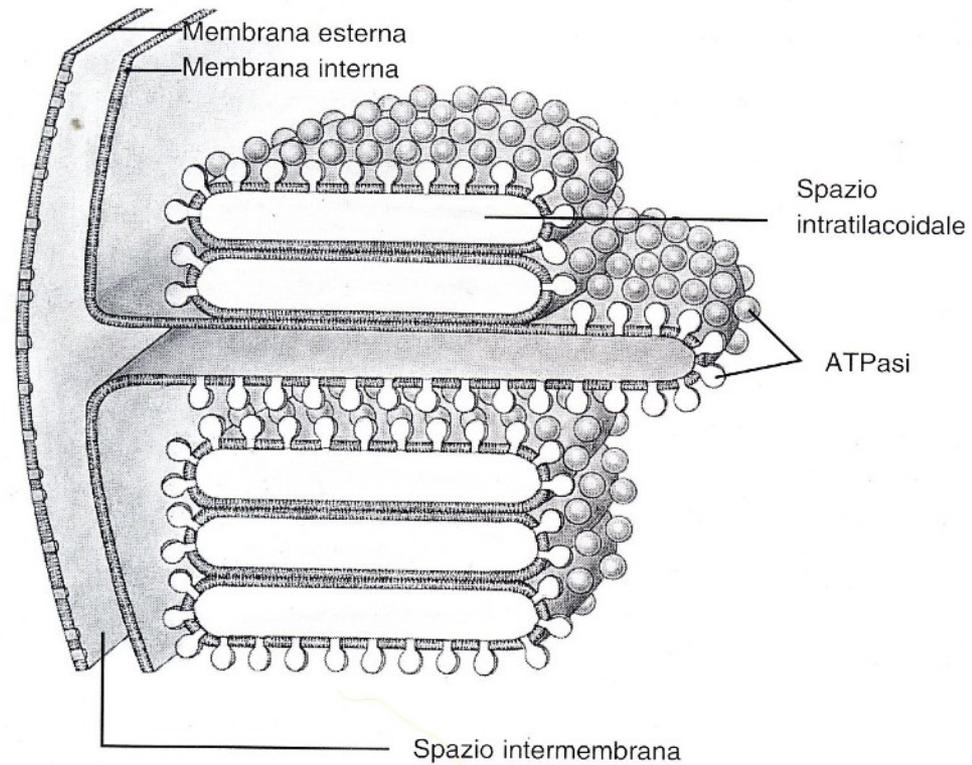
Fig. 13.22 • Questo schema mostra la disposizione delle molecole che partecipano alla fase luminosa (fotosistemi e trasportatori di elettroni) nello spessore della membrana del tilacoide. Esso illustra anche come si genera il gradiente di pH (di protoni) fra esterno e interno del tilacoide. La reazione di ossidoriduzione dei chinoni comporta assorbimento e rilascio di protoni: i protoni vengono assorbiti sulla faccia della membrana che guarda verso lo stroma e rilasciati da quella che guarda verso la cavità del tilacoide. Protoni vengono inoltre consumati per la riduzione del NADP dalla parte dello stroma mentre vengono generati in seguito all'ossidazione dell'acqua dalla parte della cavità.
(Da Taiz-Zeiger «Plant Physiology», modificato).



ATP??

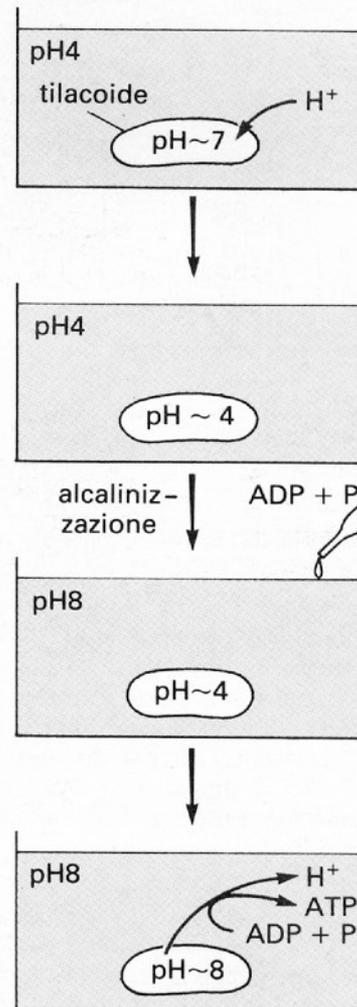


Formazione dell'ATP





Ipotesi “chemio- osmotica”



Tilacoidi isolati di spinacio vengono sospesi in una soluzione tamponata a pH 4.

Dopo qualche minuto il pH della cavità interna dei tilacoidi si è equilibrato con quello della soluzione esterna.

La soluzione esterna viene alcalinizzata in modo da portare rapidamente il suo pH a 8. Contemporaneamente si aggiungono ADP e fosfato inorganico. In questo modo si crea artificialmente un gradiente di pH fra tilacoidi e soluzione.

Il pH interno dei tilacoidi si riequilibra con quello della soluzione esterna. Il gradiente di pH si annulla e a sue spese viene formato ATP.

Fig. 13.21 • Questa esperienza fatta dall'americano Jagendorf nel 1966 ha dato sostegno all'ipotesi che la produzione di ATP nei cloroplasti sia mediata da un gradiente di H^+ . Normalmente il gradiente si genera tra lo spazio interno dei tilacoidi e lo stroma del cloroplasto a spese di energia luminosa. Se si impone ai tilacoidi un gradiente di pH artificiale come in questa esperienza è possibile avere sintesi di ATP al buio.



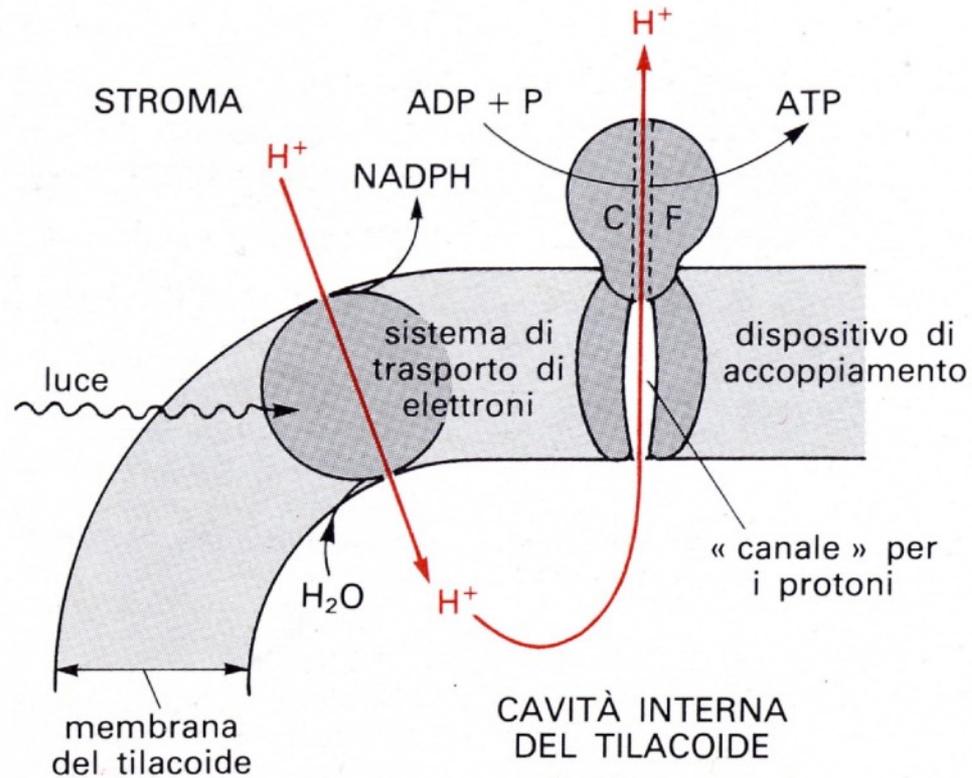


Fig. 13.23 • Nelle membrane dei tilacoidi è contenuta l'ATP sintasi, una «macchina» molecolare per accoppiare il gradiente di protoni alla sintesi di ATP. Di questa «macchina» fa parte un grosso complesso di proteine chiamato CF₁ che sporge sulla faccia esterna della membrana. Questo complesso isolato in provetta catalizza l'idrolisi dell'ATP, ma inserito nel tilacoide illuminato ne catalizza la sintesi. (Per l'accoppiamento fra gradiente di protoni e sintesi di ATP vedi anche la fig. 5-17).





La formazione dell'ATP è quindi legata all'instaurarsi di un gradiente protonico tra le vescicole tilacoidali chiuse e lo stroma.

Fino a quando il gradiente sussiste, le ATP-sintasi di membrana, usando il flusso di protoni in uscita, possono formare ATP che si concentra a livello stromatico.

Cosa genera il gradiente? Sono tre fenomeni spesso concomitanti.

- (1) la fotolisi dell'acqua all'interno dello spazio intratilacoidale, che genera H^+ ;
- (2) la riduzione dell' $NADP^+$ nello stroma, che si accompagna ad una riduzione di H^+ presenti a livello stromatico;
- (3) il trasporto attivo di H^+ dallo stroma verso l'interno dello spazio intratilacoidale per opera dei PQ (PLASTOCHINONI).





La produzione dell'**ATP** non è quindi un processo ossidoriduttivo, ma è comunque legato ai fenomeni ossidoriduttivi precedentemente descritti.

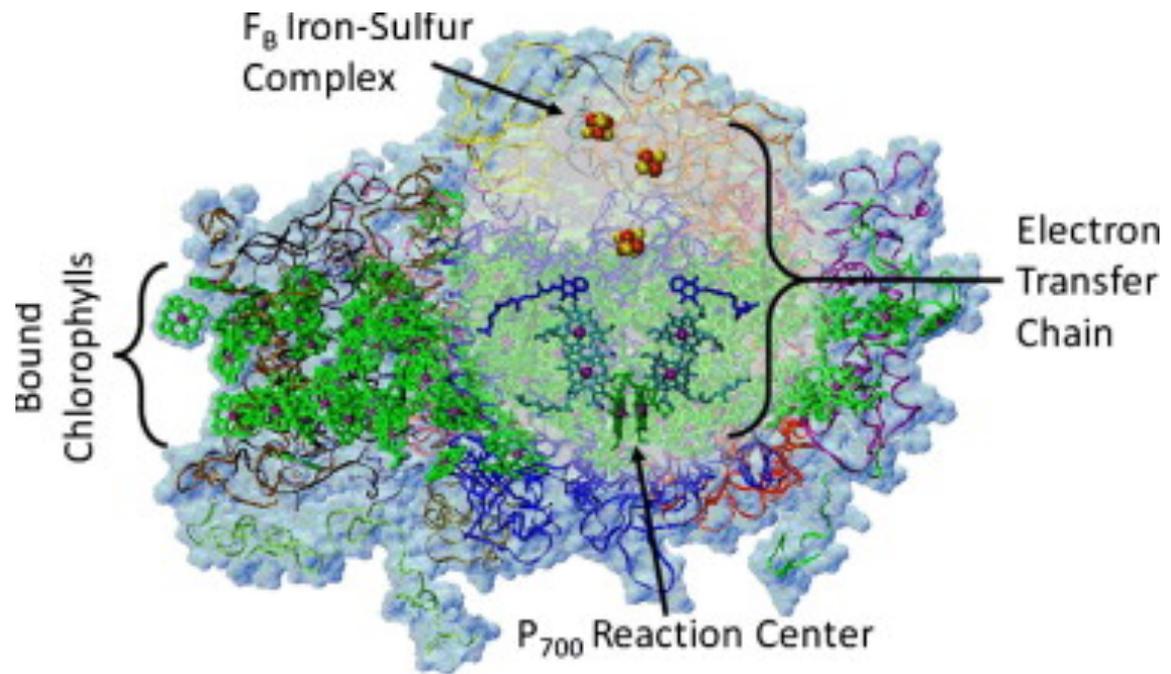
Per avvenire deve essere creato un gradiente di concentrazione di protoni $[H^+]$ tra spazio intratilacoidale e stroma.

Tutto ciò che crea tale gradiente permette il funzionamento delle ATP-sintasi di membrana, che producono ATP a partire da ADP e P_i usando un efflusso di protoni in uscita dallo spazio intratilacoidale.

Va rimarcato che la fotofosforillazione non ciclica da sola non è in grado di produrre tutti i materiali necessari a supportare le reazioni della fase oscura.



Fotosistema I





Il fotosistema I non svolge la fotolisi dell'acqua.

Quindi, nella **fotofosforillazione non ciclica**, gli elettroni che le clorofille del centro di reazione passano alla catena che conduce alla riduzione del NADP⁺ devono provenire da qualche altra parte. Nel caso dell'accoppiamento con il fotosistema II, ovviamente, gli elettroni sono prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Tuttavia, il fotosistema I è anche in grado di produrre ATP in un processo definito **fotofosforillazione ciclica**, che prevede un "riciclo" degli elettroni, senza la necessità di attingere a quelli prodotti dalla fotolisi dell'acqua.

Il fotosistema I è composto, come il II, da proteine strutturali, un complesso antenna, e un centro di reazione. Manca ovviamente il centro di ossidazione dell'acqua.

Il complesso antenna contiene clorofille e carotenoidi, che trasferiscono l'energia, andando a eccitare le clorofille del centro di reazione. Queste trasferiscono elettroni a un accettore primario, che in questo caso è una molecola modificata di Chl a, detta a₀, mentre nel PS II era la feofitina.



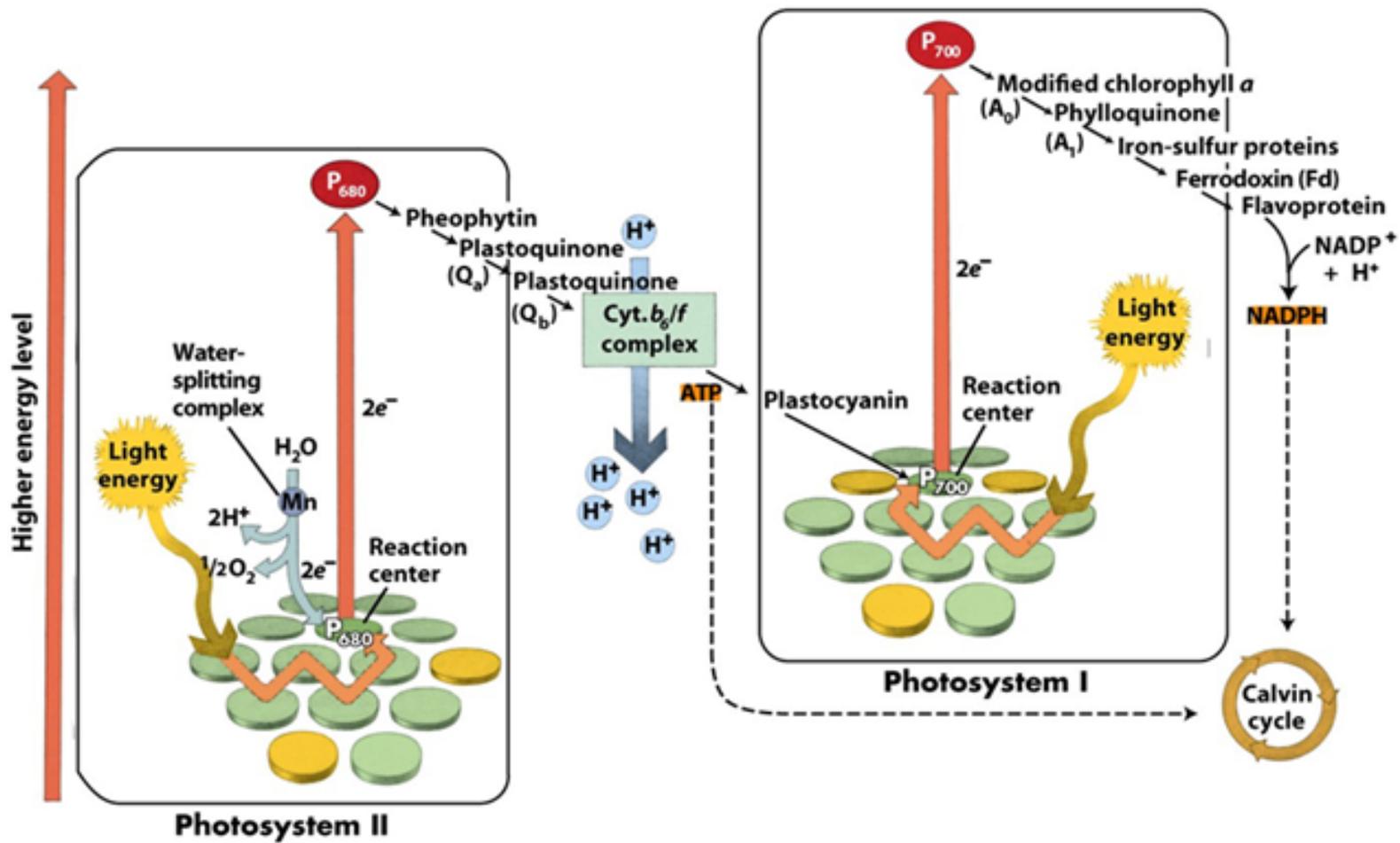


Il centro di reazione del PS I è formato da due molecole di Chl a con massimo di assorbimento a 700 nanometri. Ogni fotone proveniente dal complesso antenna eccita un elettrone. Gli elettroni vengono trasferiti alle molecole di accettore primario in coppia.

Il secondo accettore di elettroni della cascata che conduce alla riduzione del NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ è il fillochinone A1, noto anche come vitamina K1. Questo ossida la Chl a0, rendendola disponibile a accettare altri elettroni dal centro di reazione. Passa poi gli elettroni a una cascata di centri di reazione ferro-zolfo, che li incanalano poi alla ferrodossina.

La funzione principale della ferrodossina è quindi quella di trasportare un elettrone dai centri di reazione ferro-zolfo a un enzima, la ferridossina- NADP^+ riduttasi, che, come dice il nome, riduce il NADP^+ .







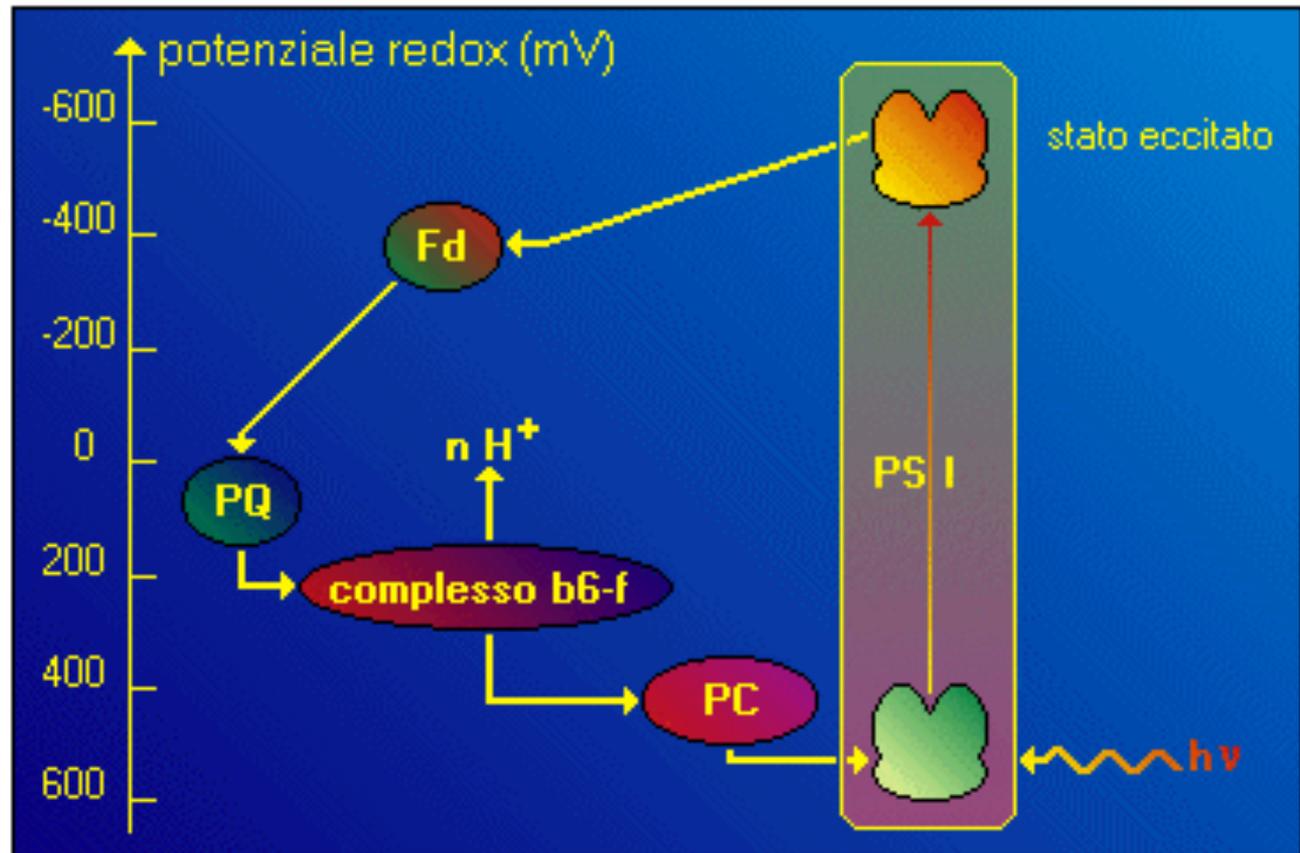
Esiste una via alternativa alla **via Z**, per gli elettroni che arrivano dal centro di reazione **P700** del **fotosistema I**, che aumenta la versatilità della fotosintesi.

L'elettrone ad alto potenziale della **ferrodossina Fd** può essere trasferito al **citocromo bf** (invece che a **NADP⁺**) e ritornare alla forma ossidata del **P700** attraverso la **plastocianina PC**.

Il flusso di elettroni determina solo il trasferimento di **H⁺** nel lume tilacoide da parte del citocromo. In questo processo viene generato **ATP** senza la formazione contemporanea di **NADP**.

Il **fotosistema II** non partecipa alla fotofosforilazione ciclica; questa avviene quando non vi è più **NADP⁺** per accettare elettroni dalla ferrodossina ridotta.





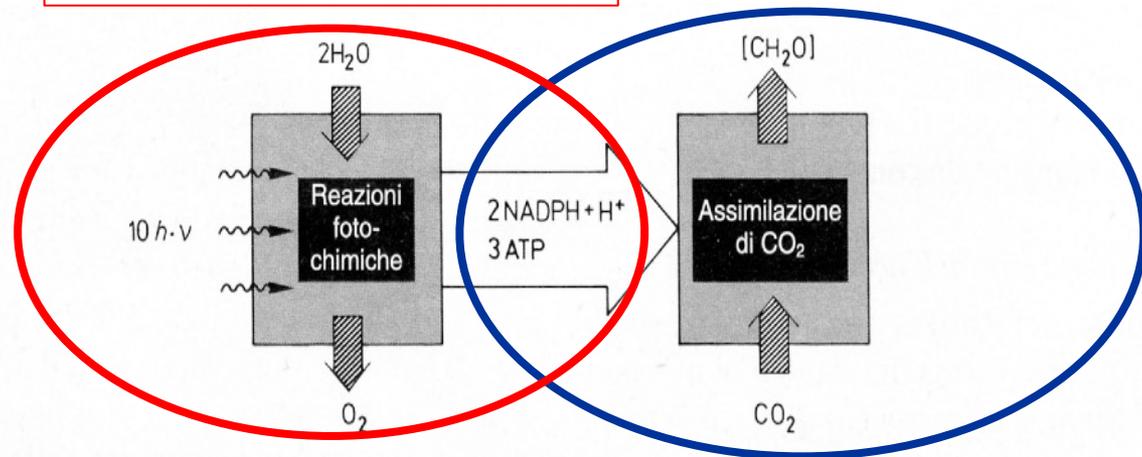


La fotofosforillazione ciclica produce il quantitativo di ATP “mancante” dalla fotofosforillazione non ciclica per alimentare la fase oscura.

Come visto, questa richiede 2 NADPH e 3 ATP per ridurre un atomo di carbonio, mentre la sola fotofosforillazione non ciclica produce 2 NADPH e 2 ATP.

FASE LUMINOSA

FASE OSCURA



Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO_2 dall'apporto di NADPH + H^+ e di ATP a partire da reazioni fotochimiche. Il consu-

mo di 10 fotoni si spiega per il fatto che 8 fotoni vengono impiegati per la produzione di 2 NADPH + H^+ e di 2 ATP attraverso il trasporto non cicli-

co di elettroni, e che 2 fotoni ancora sono impiegati per produrre 1 ATP attraverso il trasporto ciclico degli elettroni.





Fase “oscura”





Nella fase oscura sono predominanti reazioni biochimiche, catalizzate da enzimi.

Queste sono temperatura – sensibili, e vengono a cessare sopra i 45°C a causa della denaturazione degli stessi.

Alcuni di questi enzimi devono essere attivati dalla luce (al buio non funzionano!).

Il processo continua fino a quando ci sono a disposizione i vari substrati: la CO_2 , l'ATP e il $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e un substrato organico «energizzato» da gruppi fosfato.

Il tutto avviene nello STROMA, dove i prodotti finali si accumulano se i processi di “esportazione” sono più lenti di quelli di produzione.



Il cuore dalla fase oscura è un ciclo detto, dal nome del suo scopritore, **Melvin Calvin**, premio nobel nel 1961, **ciclo di Calvin**.

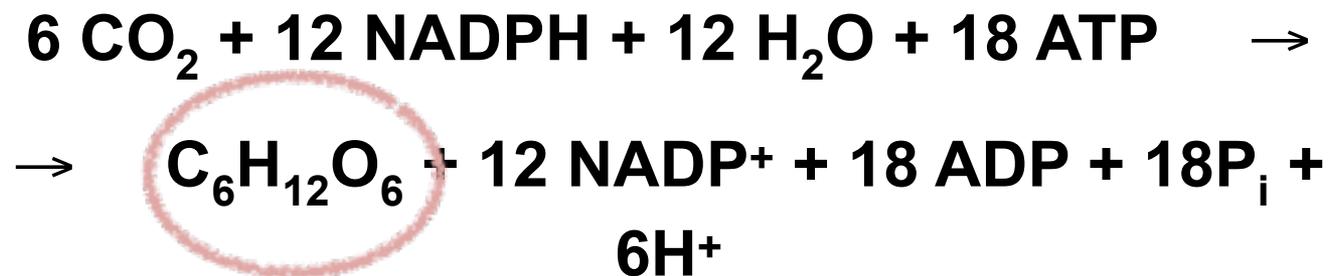




Le reazioni della fase oscura portano alla riduzione biochimica della CO_2 a carboidrati.

Il processo, noto come "**fissazione**" od "**organizzazione della CO_2** ", è fondamentale per la biosfera: piante verdi e alghe producono ogni anno enormi quantità di sostanza organica (**produttività primaria**).

Le reazioni possono essere così riassunte:



Carboidrato ridotto: viene in genere indicato un esoso, intendendo il glucosio (perché viene polimerizzato nell'amido primario)

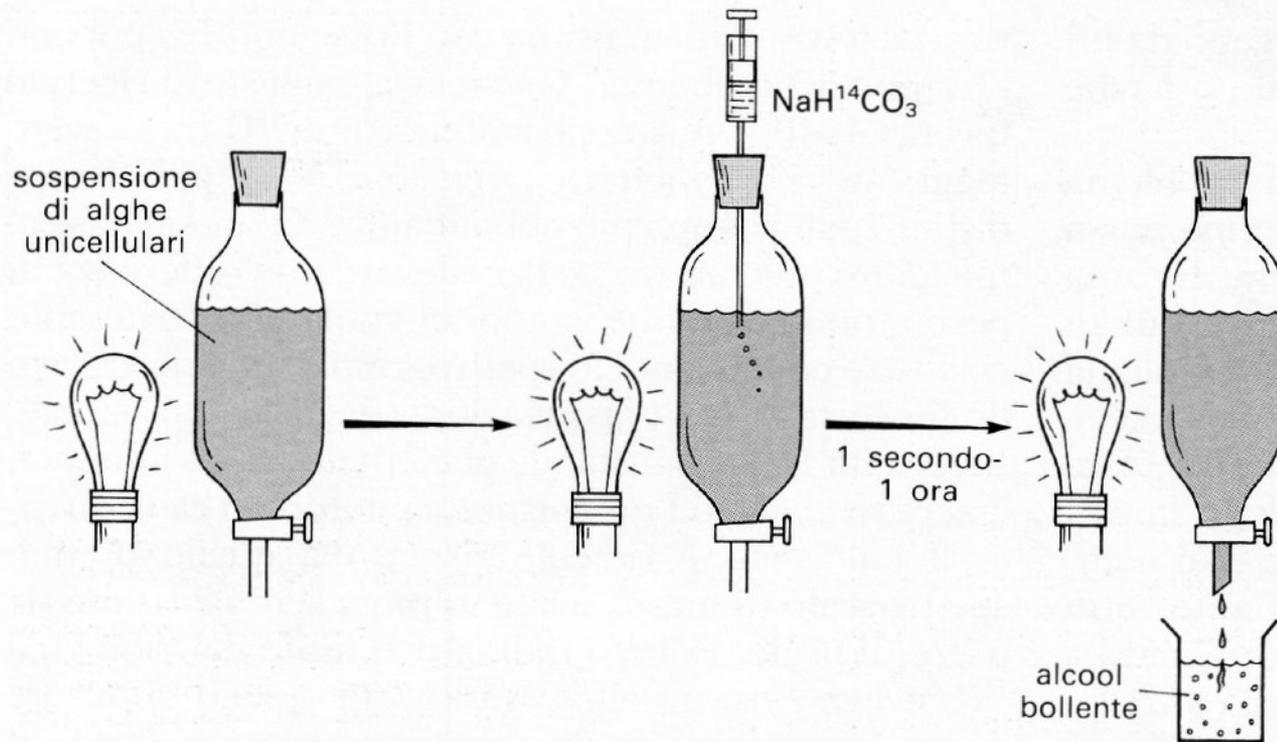




La caratterizzazione delle reazioni e la determinazione delle varie tappe, ciò che viene oggi indicato con il nome di Ciclo di Calvin (-Benson), è il risultato di un enorme lavoro di equipe di un gruppo di 300 scienziati americani che aveva al suo interno i migliori specialisti dei diversi campi, che poterono usare tecnologie allora di assoluta avanguardia.

Siamo negli anni '50, la II guerra mondiale è terminata da poco e ha messo a disposizione i radioisotopi, grazie allo studio dell'atomo.



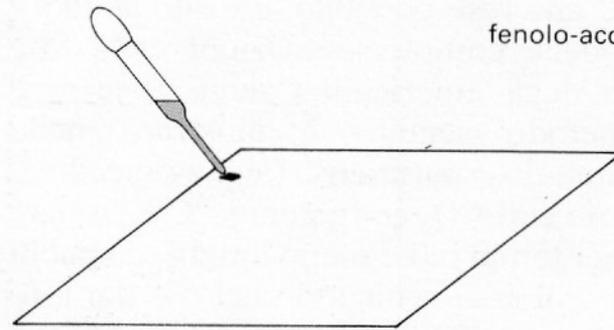


1 - Il recipiente contiene una sospensione di alghe verdi le quali fotosintetizzano usando la CO_2 atmosferica non radioattiva sciolta nell'acqua.

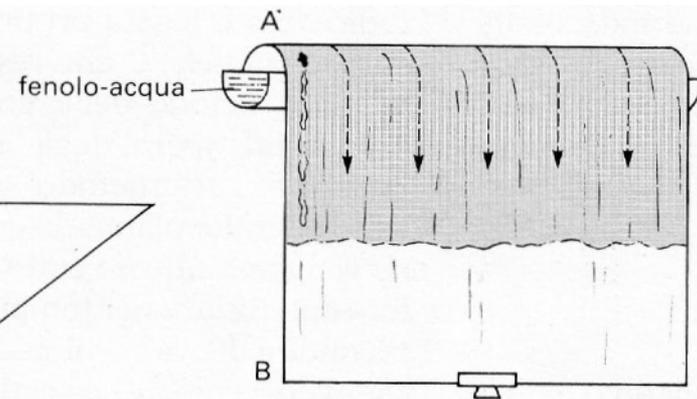
2 - Si immette nel recipiente una certa quantità di CO_2 radioattiva (sotto forma di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$).

3 - Passato un certo intervallo dalla somministrazione di CO_2 radioattiva si apre il rubinetto. Una parte della sospensione cade nell'alcool bollente. I composti a piccola molecola contenuti nelle cellule (zuccheri, amminoacidi, ecc.) passano in soluzione nell'alcool. L'operazione viene ripetuta varie volte a diversi intervalli di tempo.

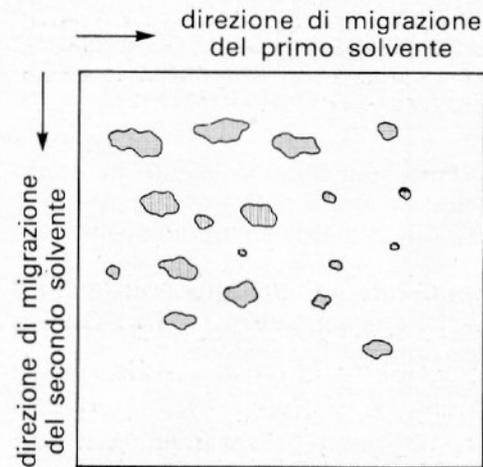




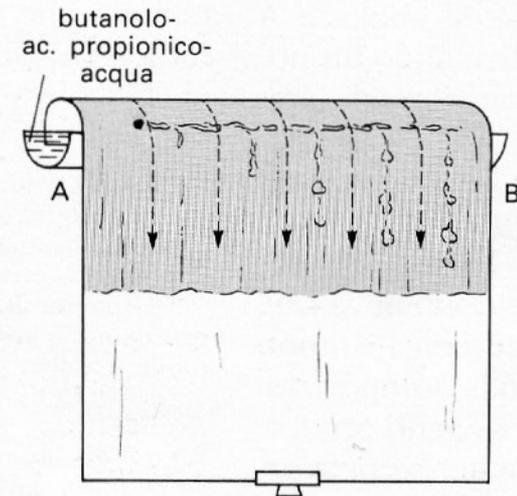
4 – Una piccola quantità dell'estratto alcoolico di alghe viene applicata vicino a un angolo di un foglio di carta cromatografica.



5 – Un lato del foglio pesca in una vaschetta contenente un solvente il quale migra lungo la carta trascinandosi dietro per diverse distanze le varie sostanze contenute nell'estratto, le quali in questo modo vengono parzialmente separate.

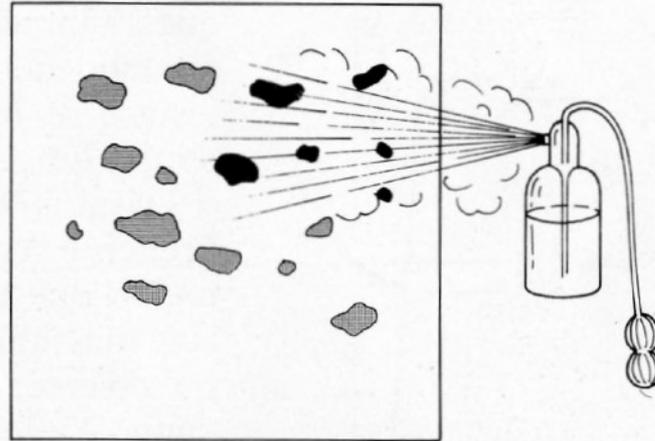


7 – Terminata la separazione cromatografica a ogni sostanza contenuta nell'estratto corrisponde una macchia in una determinata posizione. Ma tutte queste macchie sono praticamente invisibili.

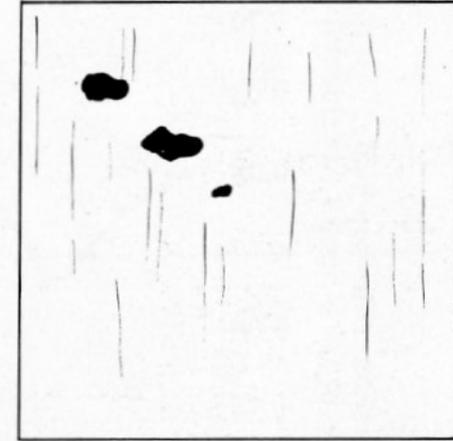


6 – La separazione diventa totale con una seconda cromatografia in direzione perpendicolare alla prima. Il foglio, ruotato di 90°, pesca in un solvente diverso.





8 – Le macchie possono essere messe in evidenza spruzzando la carta con soluzioni di particolari sostanze che reagiscono con i vari tipi di composti dando origine a prodotti colorati. Le macchie vengono identificate cromatografando sostanze note nelle stesse condizioni sperimentali. In questo modo si possono identificare praticamente tutti i composti separati.



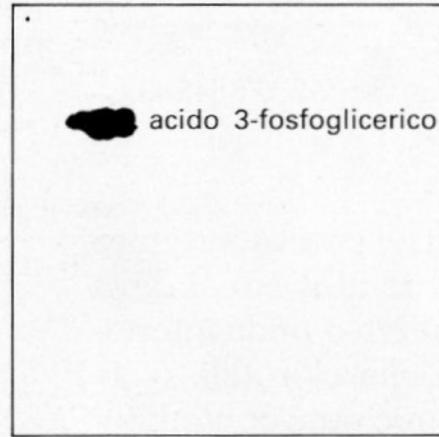
9 – Alternativamente il foglio di carta cromatografica viene coperto con una lastra fotografica e lasciato al buio per alcune settimane. Le radiazioni emesse dal ^{14}C incorporato nei vari composti impressionano la lastra che viene poi sviluppata. In questo modo vengono messe in evidenza solo le sostanze che sono state sintetizzate DOPO l'immissione di CO_2 radioattiva.

I composti marcati con il ^{14}C vennero quindi separati e identificati a seconda della posizione che raggiungono in una cromatografia bidimensionale su carta. In questo modo, vennero identificati come intermedi del processo della fissazione numerosi acidi e zuccheri fosfati.



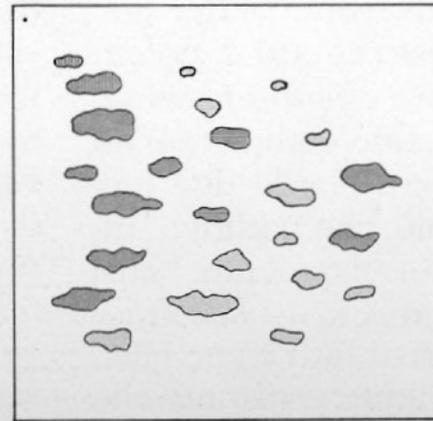


identificazione delle
sostanze radioattive
attraverso l'autoradiografia

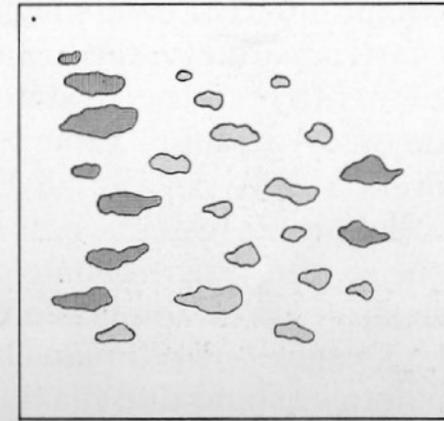


Esponendo le cellule alla $^{14}\text{CO}_2$ per periodi di tempo via via sempre più brevi, Calvin fu in grado di identificare come primo composto intermedio stabile l'acido 3-fosfoglicerico.

identificazione delle
sostanze attraverso
reazioni chimiche che
generano composti colorati



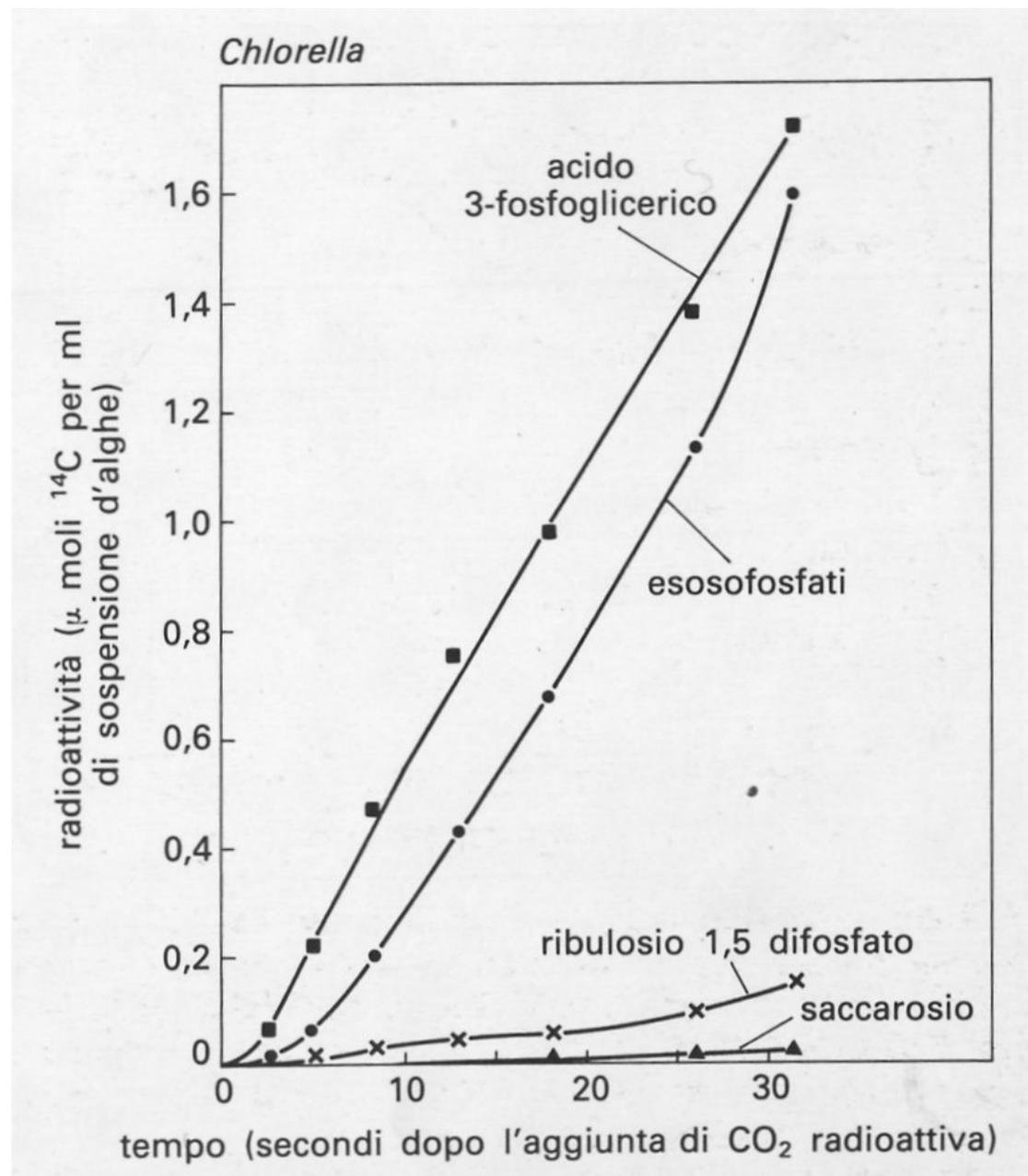
1" dopo l'immissione
di CO_2 radioattiva



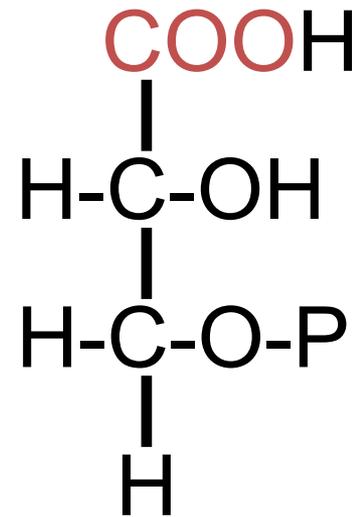
10" dopo l'immissione
di CO_2 radioattiva

A questo punto furono progressivamente ridotti i tempi di esposizione





I risultati dimostrarono che l'acido 3-fosfoglicerico era marcato principalmente nel gruppo carbossilico.



Questo suggerì che l'accettore iniziale della CO_2 fosse un composto a 2 atomi di C, generando una estenuante, futile ricerca di questo composto.



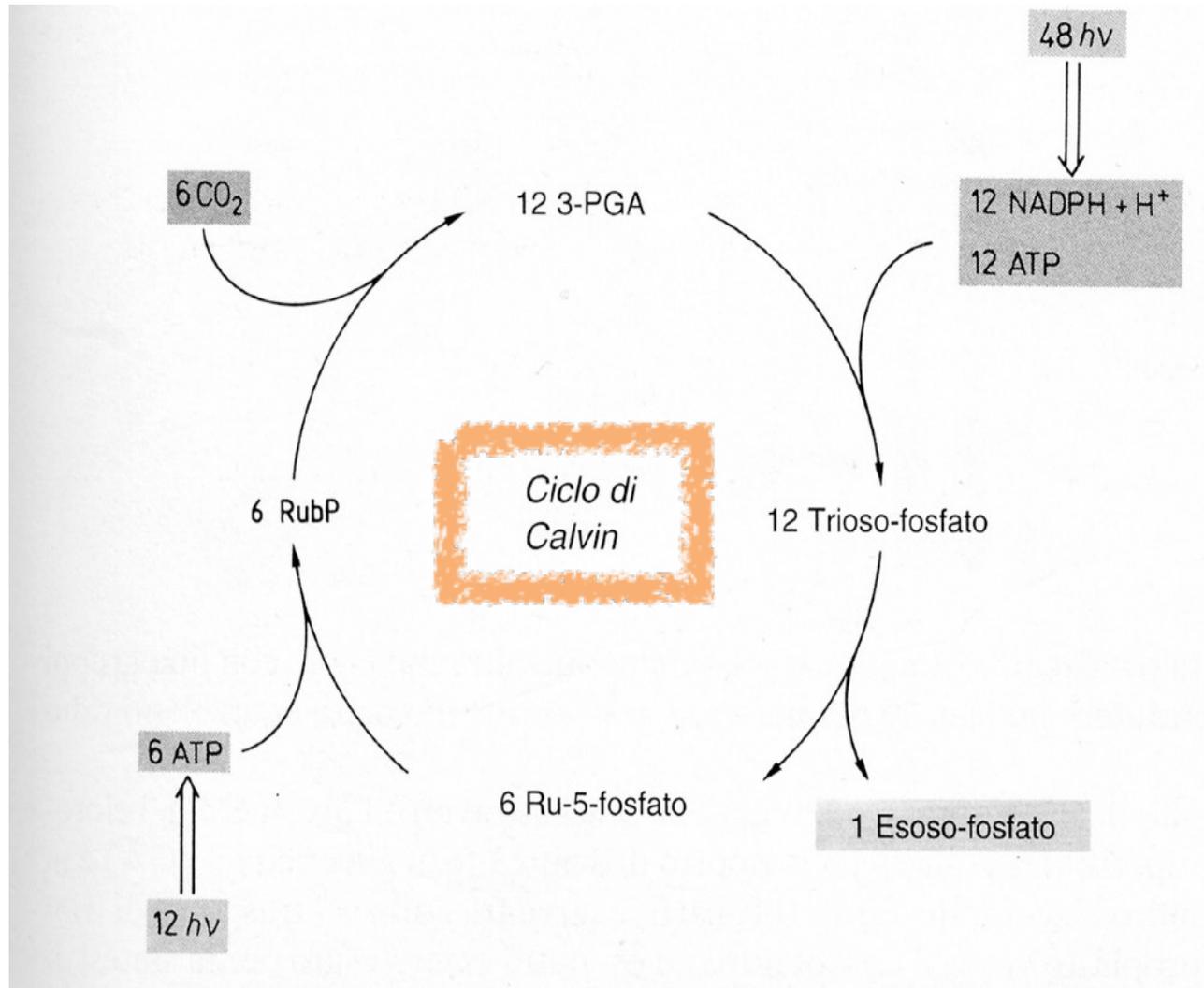


La seguente scoperta che i pentosi monofosfati partecipano al ciclo suggerì la possibilità che l'accettore iniziale della CO₂ fosse un composto a 5 atomi di C che, dopo aver reagito con la CO₂, generava 2 molecole di acido 3-fosfoglicerico.



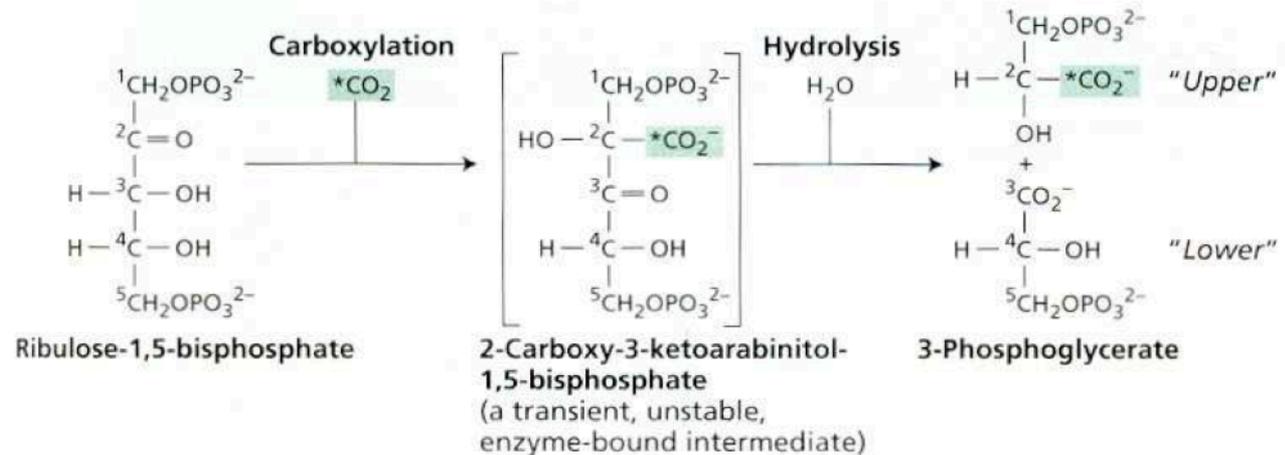
Questo sconvolgimento concettuale portò rapidamente all'identificazione del **ribulosio 1,5-difosfato** (un pentoso) come l'accettore della CO₂ e alla formulazione completa del ciclo.





Fase di carbossilazione

La prima reazione è una fissazione di CO_2 su un accettore organico, il **pentoso ribulosio 1,5-difosfato (RuDP)**. Si forma così un intermedio esoso fosfato instabile, che si decompone quasi istantaneamente per idrolisi dando due molecole di **acido 3-fosfoglicerico (PGA)**.



$$\Delta G = -51 \text{ kJ mol}^{-1}$$





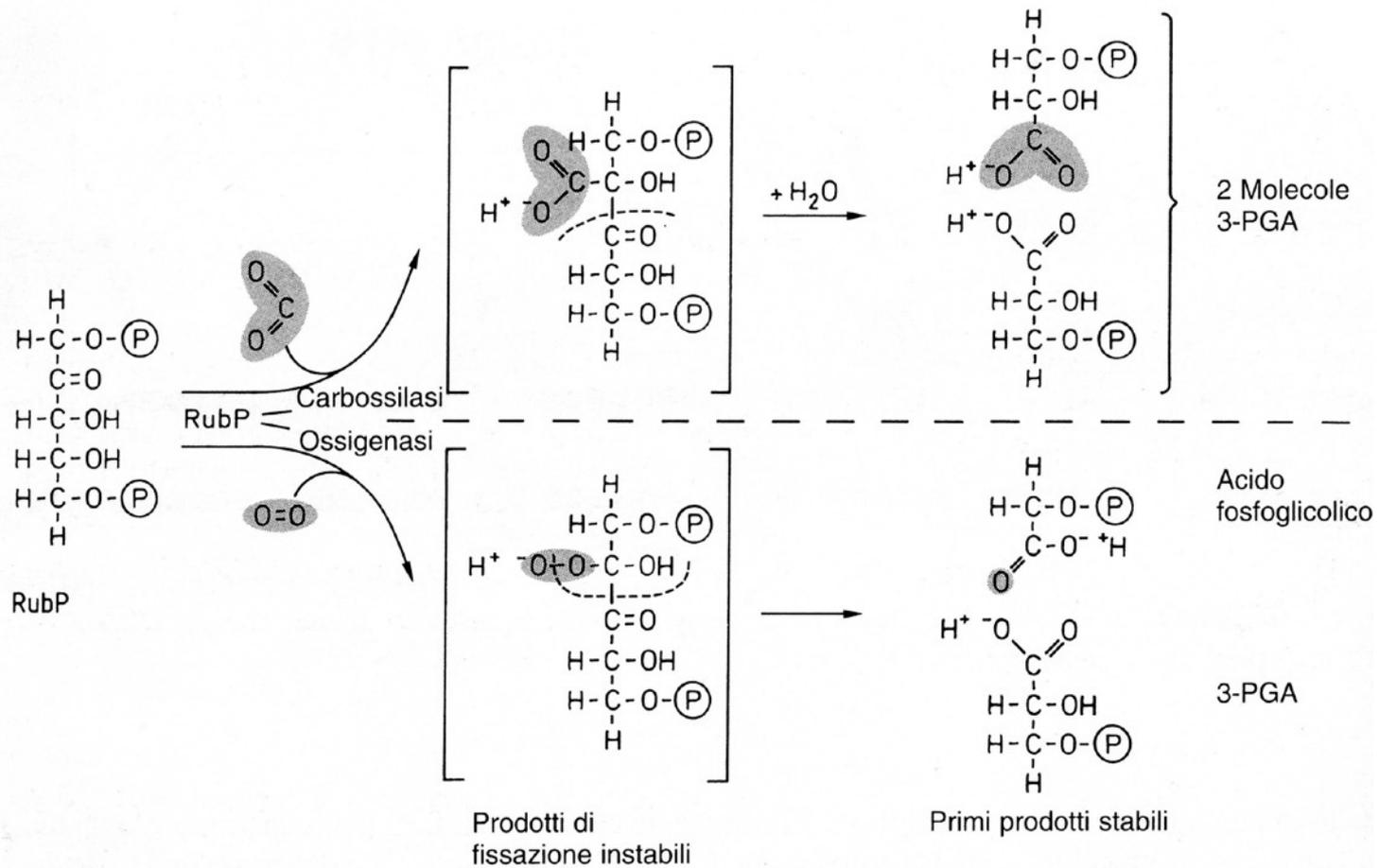
Una piccola parte delle molecole di PGA sono destinate alla **conversione del PGA in glucosio**, la grande maggioranza alla **rigenerazione del RuDP**, in **un rapporto 1:5**.

Catalizzatore della carbossilazione è l'enzima Ribuloso bifosfato carbossilasi-ossigenasi, detto anche **RUBISCO**, l'enzima più abbondante in natura.

In molti cloroplasti esso costituisce infatti anche il 50% delle proteine totali e, nella biosfera, fino al 20% di tutte le proteine presenti.

La caratteristica più particolare di questo enzima multi-catena sta nel fatto che esso lega al substrato sia CO_2 che O_2 , a seconda della concentrazione dei due gas.







Gli stadi del processo che portano da **PGA** a **glucosio** , e quindi a **saccarosio** e **amido** sono esattamente opposti a quelli della glicolisi.

Infatti il **PGA**, oltre a formarsi nella fotosintesi è anche un intermedio nella **glicolisi**, dato che le principali vie metaboliche possono essere percorse nei due sensi: in questo caso, se è possibile ottenere **PGA** da **glucosio** sarà anche possibile ottenere **glucosio** da **PGA**.

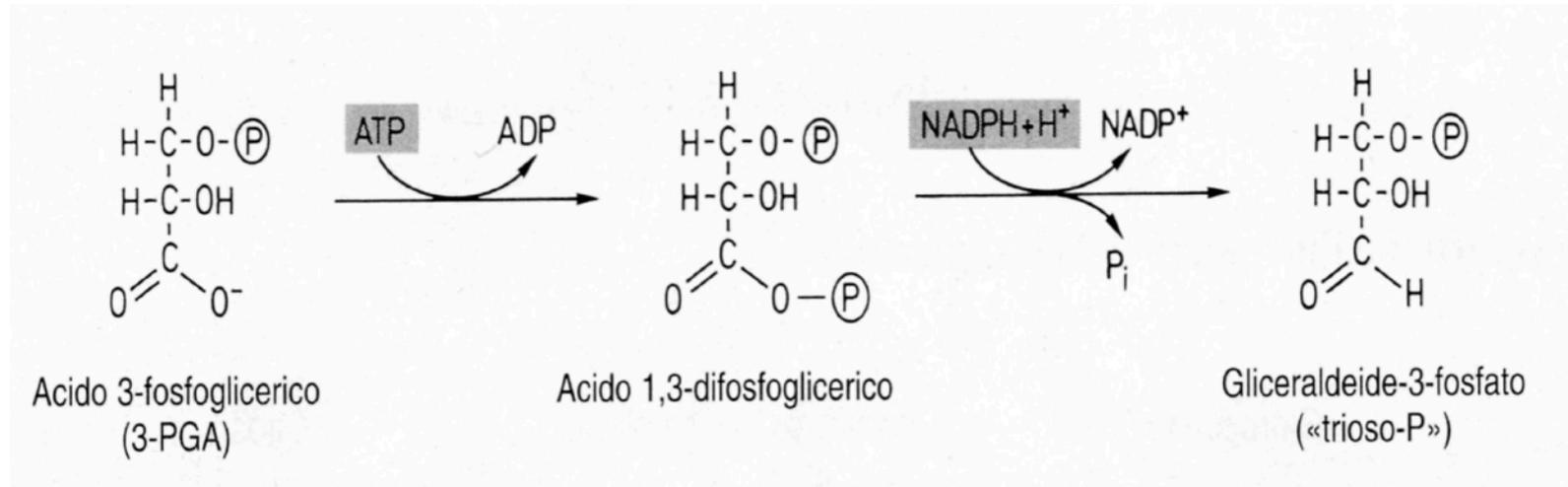
L'unica diversità tra i due opposti processi consiste nel **coenzima riducente**, che nel caso della fotosintesi è l'**NADPH**, nel caso della glicolisi l'**NAD**.

Questo conferma la regola secondo la quale **NAD** è il tipico coenzima delle vie metaboliche degradative in cui prevalgono le ossidazioni, mentre **NADP** è il tipico coenzima delle vie biosintetiche in cui prevalgono le riduzioni.

Le **reazioni di riduzione del PGA** possono essere sintetizzate in un semplice schema.



Riduzione del PGA



Il **PGA** deve essere ridotto, con spesa di energia (ATP+NADPH). Il **PGA** viene dapprima attivato dall'**ATP**, che gli dona il gruppo **fosfato**, quindi ridotto a GLICERALDEIDE-3-P (**GP3**) dall'**NADPH**.





Quale è quindi il destino della G3P?

In linea teorica, ogni due molecole di trioso fosfato potrebbe essere prodotto un glucosio, che potrebbe entrare nelle vie di biosintesi del saccarosio o dell'amido.

Tuttavia, se ciò avvenisse, sarebbe al contempo necessario trovare un modo per rigenerare il ribulosio 1-5 difosfato per vie esterne al ciclo di Calvin. Ma il ciclo di Calvin, è, appunto, un **ciclo**. Questo vuol dire che gli intermedi di reazione, alla fine del ciclo, si riformano.

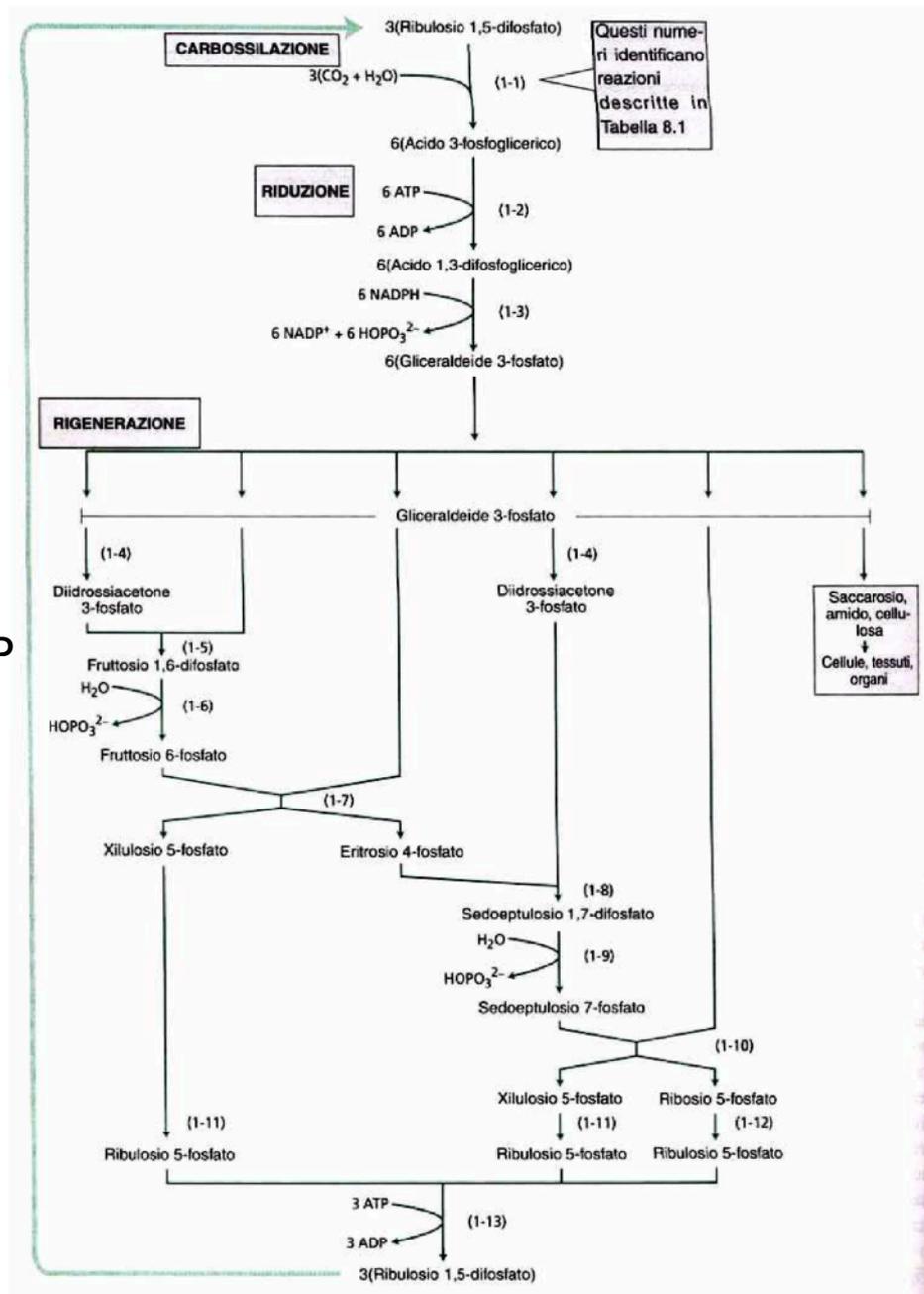
Questo accade anche per il ribulosio 1-5 difosfato. Le vie metaboliche che portano alla sua rigenerazione sono complesse, e coinvolgono zuccheri fosfati a 4, 5, 6, 7 atomi di C, oltre al consumo di un ATP per molecola rigenerata.

All fine, ogni tre "giri" del ciclo di Calvin, viene liberata una molecola di G3P.





Rigenerazione del RuDP



Conversione della GP3 in esosi

La **GP3** prodotta nella fase oscura della fotosintesi viene poi trasformata in zuccheri esosi.

La **GP3** ha già il numero di ossidazione di uno zucchero e quindi la sua successiva trasformazione non richiede altre tappe riduttive endoergoniche (con spesa di energia).

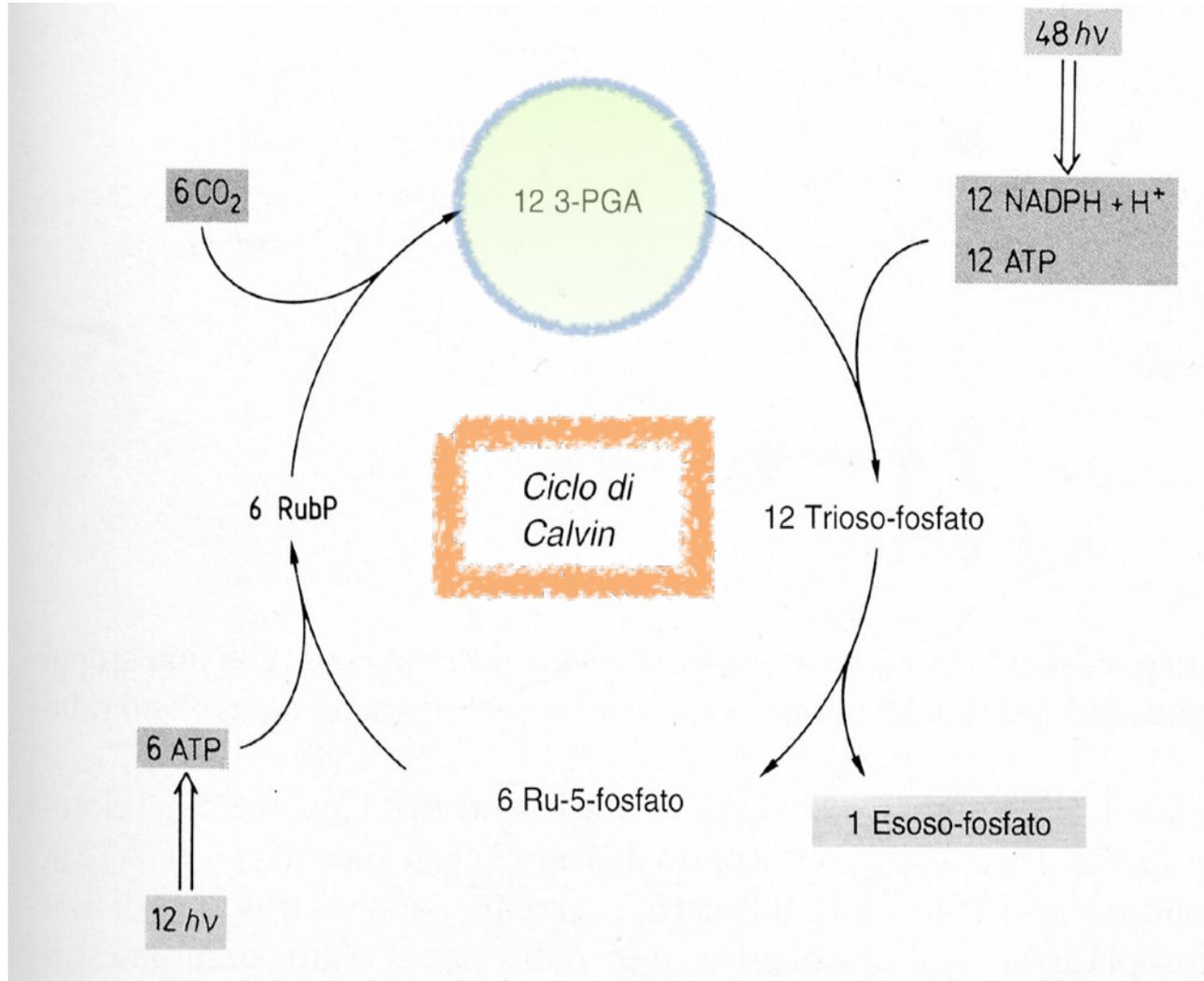
Nel processo bilanciato di costruzione di una molecola di **esoso** (glucosio), 6 molecole di **CO₂** si combinano con 6 di **RuDP** per formarne 12 di **PGA**.

Solo 2 molecole di **GP3** sono destinate alla sintesi di esosi, mentre le altre dieci (!!!) possono proseguire il ciclo per diventare, alla fine, 6 molecole di **RuDP**, pronte ad essere utilizzate di nuovo («rigenerazione del substrato»).

I conti tornano: 10 **GP3** significano 30 atomi di C ($10 \times 3 = 30$), così come 6 RuDP ($6 \times 5 = 30$).



METABOLISMO C3 o delle piante C3





La **RibUlosio BlfoSfato Carbossilasi - Ossigenasi**, come dice il nome, ha la capacità di catalizzare l'unione del **RuDP** sia a una molecola di anidride carbonica, che a una molecola di ossigeno. Questa sua mancanza di specificità è probabilmente dovuta al fatto che questo enzima si è evoluto quando sul pianeta la quantità di ossigeno in atmosfera era molto bassa, e quella di anidride carbonica al contrario molto alta. Di conseguenza, questa sua mancanza di specificità non era un problema.

Tuttavia, le condizioni in cui l'enzima si trova a operare fanno sì che spesso il problema della ossigenazione del RuDP sia molto importante.

Perché è un problema? Perché l'ossigenazione del RuDP produce non due molecole di **3-fosfoglicerato**, ma una di 3-fosfoglicerato, e una di **2-fosfoglicolato** ($C_2O_3H_2$). Di conseguenza, il quantitativo di triosi prodotto è 1, e non 2. Questo ha ovvie conseguenze a cascata sui passaggi successivi, e in particolare impedisce la rigenerazione del RuDP, che deve essere prodotto per altre vie, con conseguente "spesa" in termini di energia.



