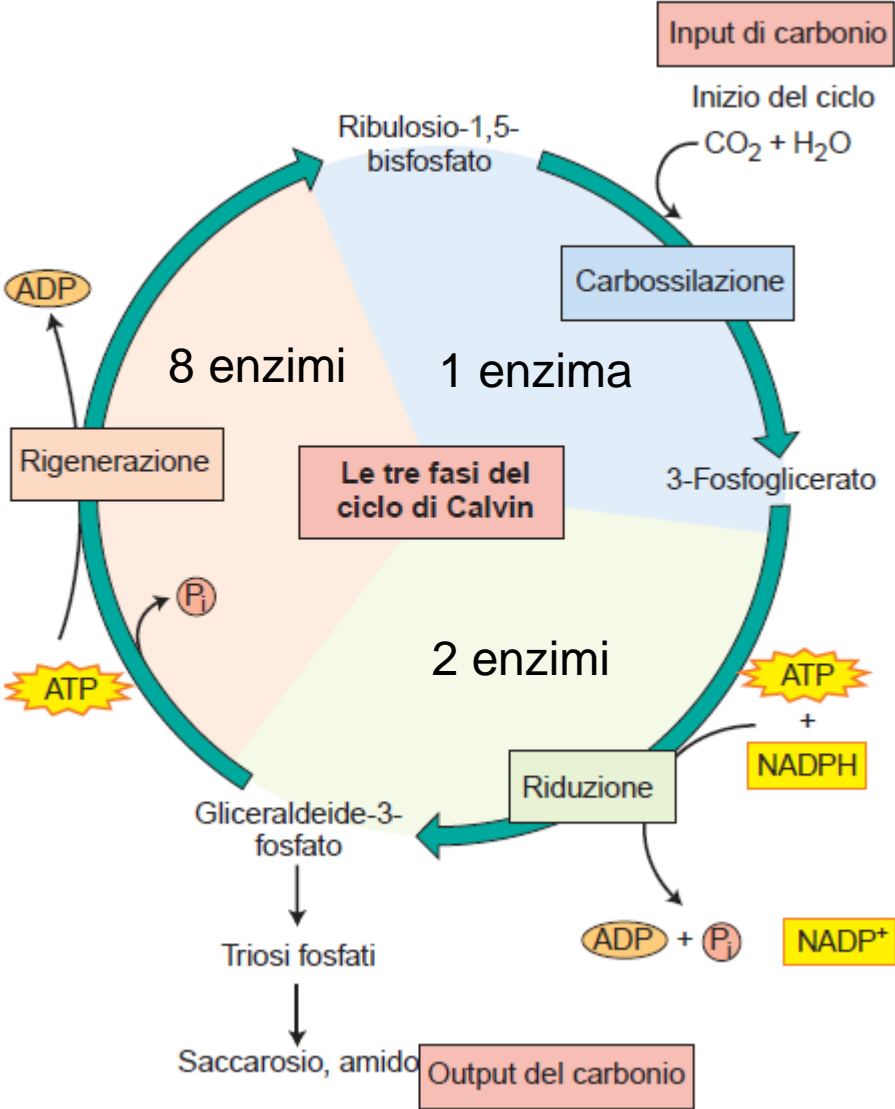
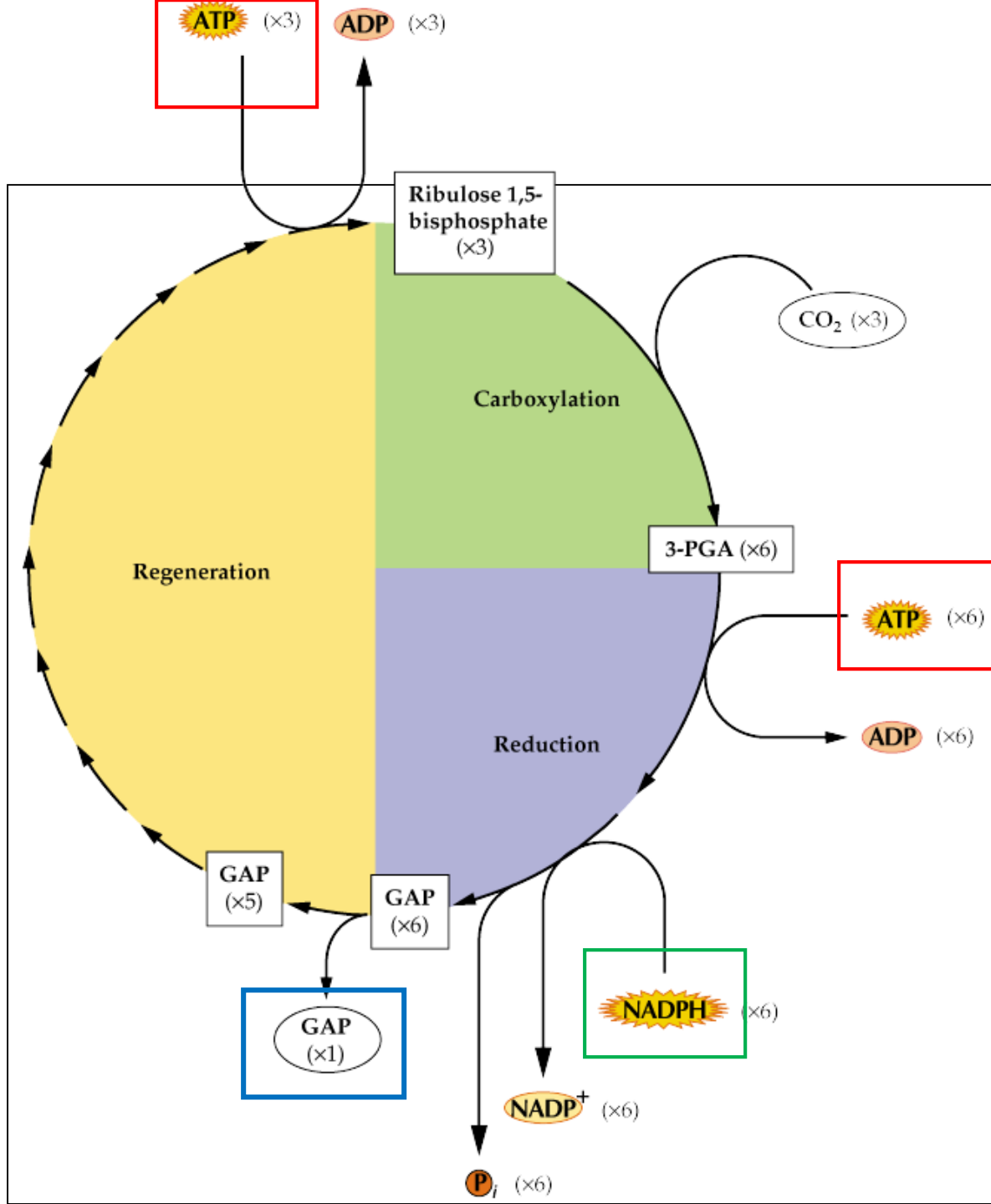


Gli enzimi del ciclo di Calvin sono proteine solubili che si trovano nello stroma dei cloroplasti





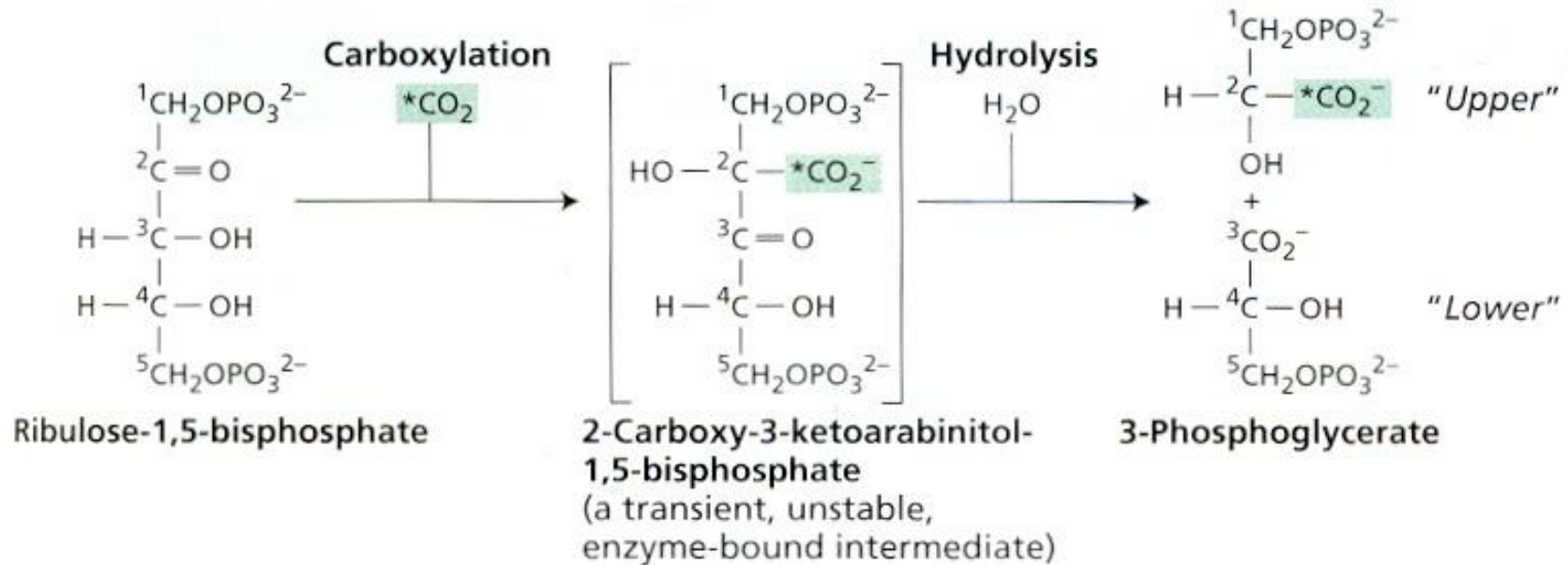
Per un guadagno netto di **1 GAP** (gliceraldeide-3-P):

3 CO<sub>2</sub> fissati

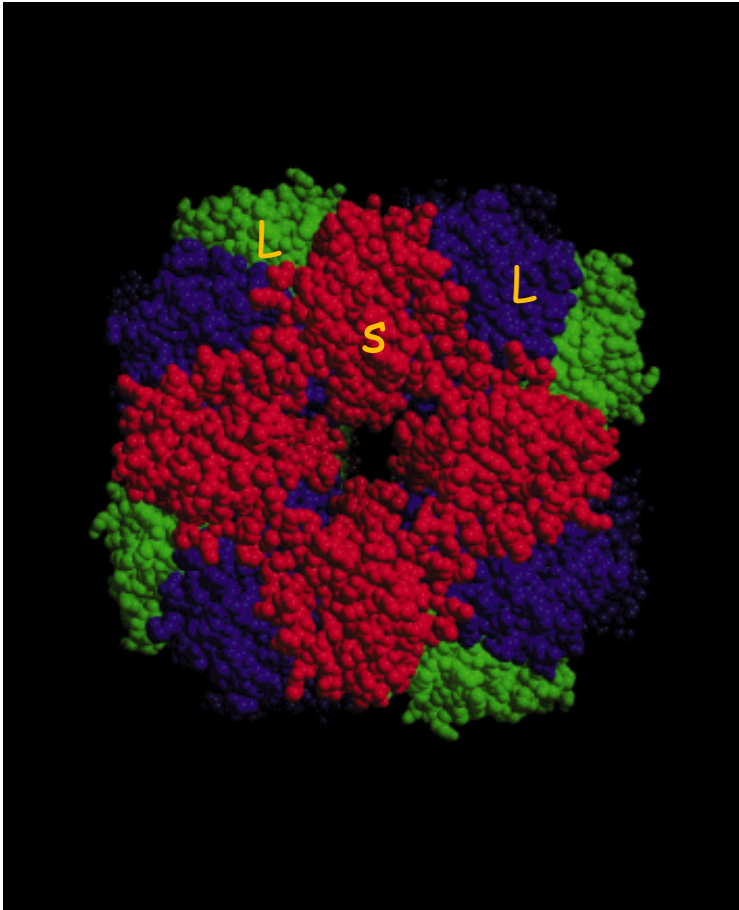
9 (6+3) ATP

6 NADPH

## La reazione di carbossilazione



## Rubisco: Ribulosio 1,5 bifosfato carbossilasi/ossigenasi



Enzima multimerico:  $L_8S_8$

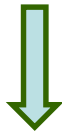
560 kDa

8 subunità grandi (55 kDa)

8 subunità piccole (14 kDa)

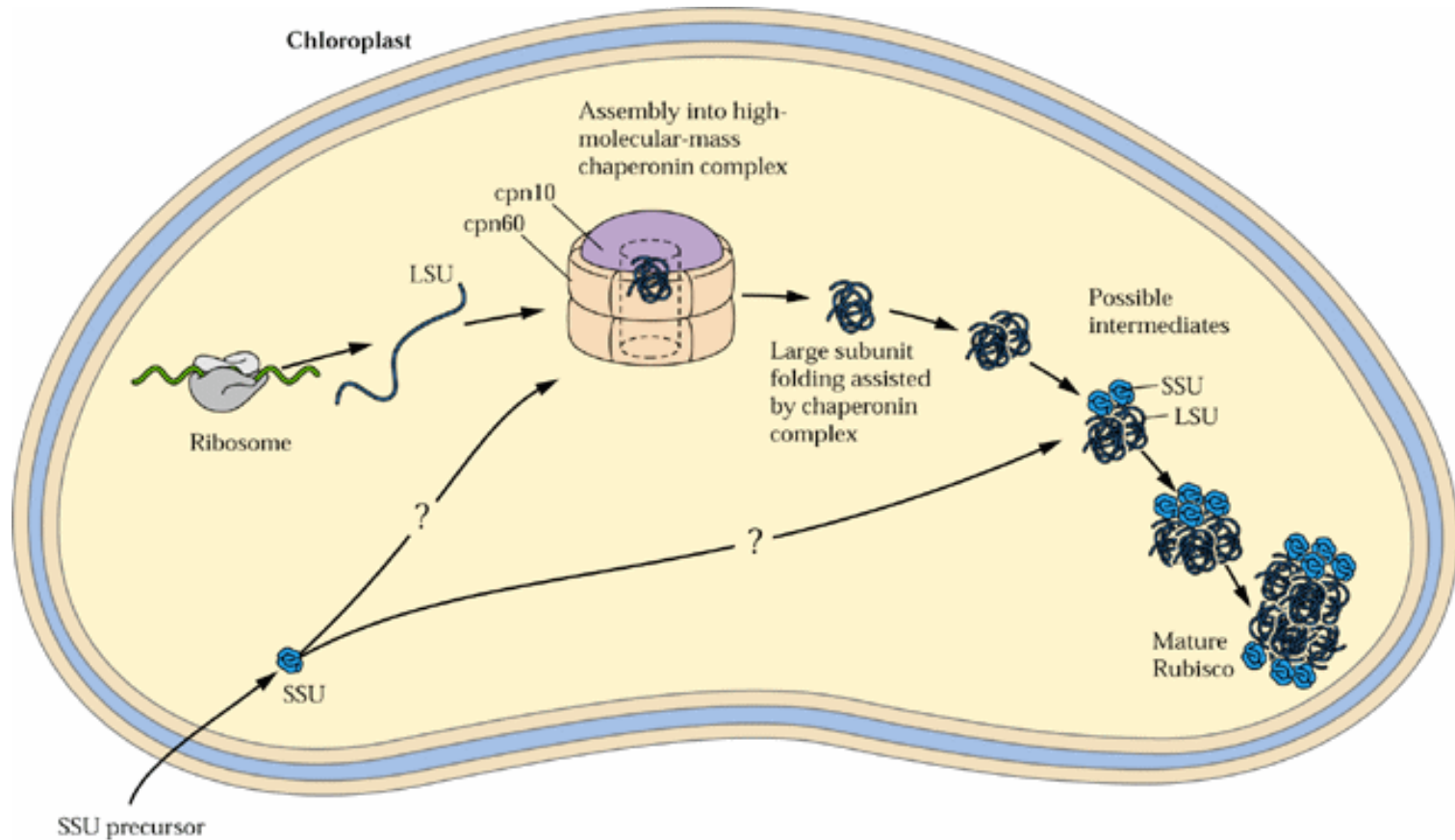
In alcuni batteri fotosintetici =  $L_2$

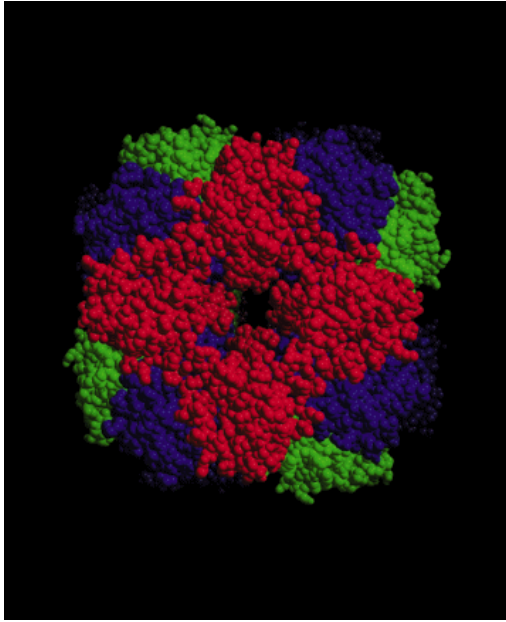
Luce



Genoma nucleo → rbcS (precursore subunità piccola)

Genoma cloroplasto → rbcL (subunità grande)





Costanti cinetiche della RUBISCO (a 25 °C)

$$K_m (\text{CO}_2) = 8\text{-}25 \mu\text{M}$$

$$K_m (\text{O}_2) = 360\text{-}650 \mu\text{M}$$

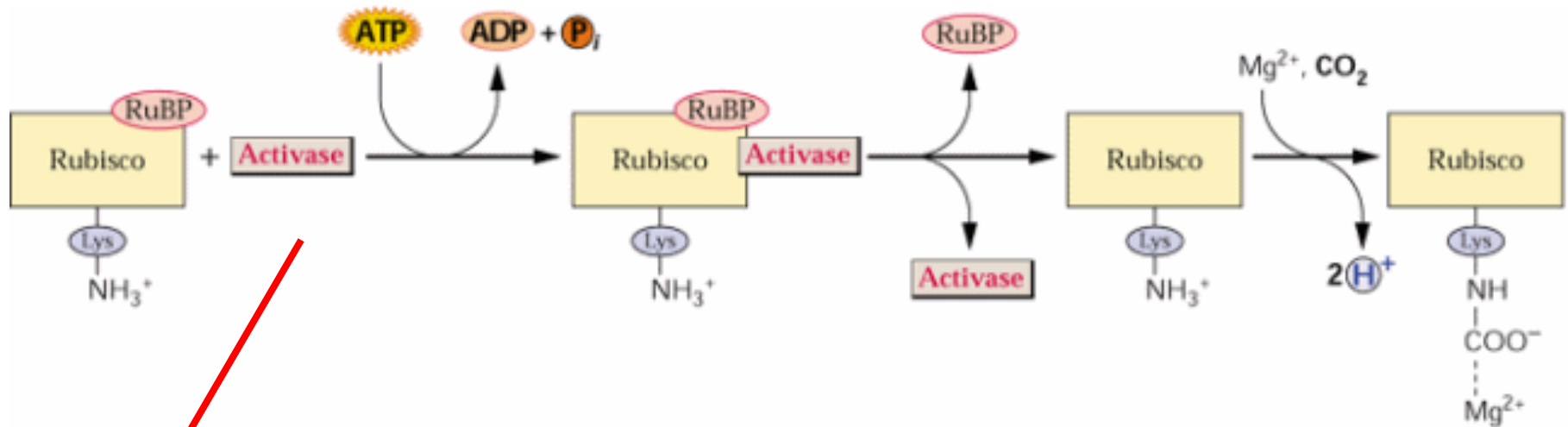
$\text{CO}_2$  in aria (0.04%) =  $\text{CO}_2$  in soluzione ( $\sim 12 \mu\text{M}$ )

$\text{O}_2$  in aria (21%) =  $\text{O}_2$  in soluzione ( $\sim 265 \mu\text{M}$ )

La Rubisco è un enzima molto lento: carbossila solo tre molecole al secondo!

La cellula supplisce a ciò aumentando le copie di enzima: concentrazione nello stroma da 4 a 10 mM (fino al 50% del totale delle proteine della foglia)

## Meccanismo di attivazione della Rubisco



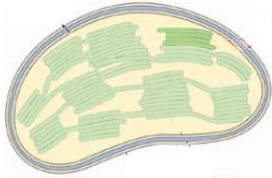
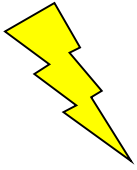
**Rubisco attivasi:** membro di una famiglia di proteine che mostrano attività ATPasica associata a funzioni di chaperone molecolare

Da 14 a 16 polipeptidi si associano alla Rubisco → idrolisi ATP e induzione di modificazioni conformazionali che portano al rilascio degli zuccheri fosfati → carbammilazione → enzima attivo

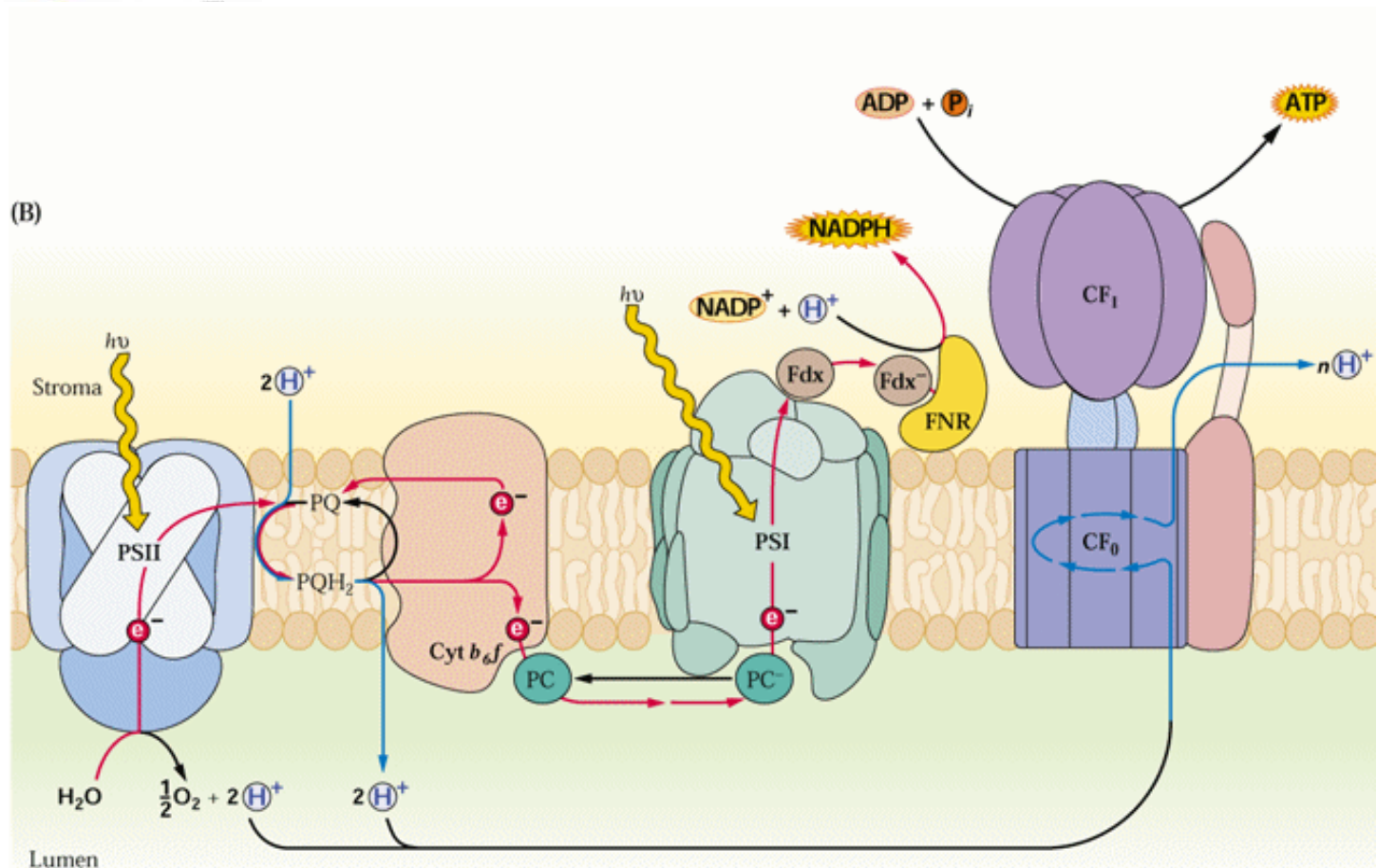
A sua volta, la Rubisco attivasi viene attivata dalla luce!

A seguito dell'azione della Rubisco attivasi, una molecola di CO<sub>2</sub> reagisce con la Lys 201 nel sito attivo, con la formazione di un gruppo carbammile che viene stabilizzato dal legame con Mg<sup>2+</sup>

**Reazione favorita dall'aumento di pH e da aumento di concentrazione di Mg<sup>2+</sup>**

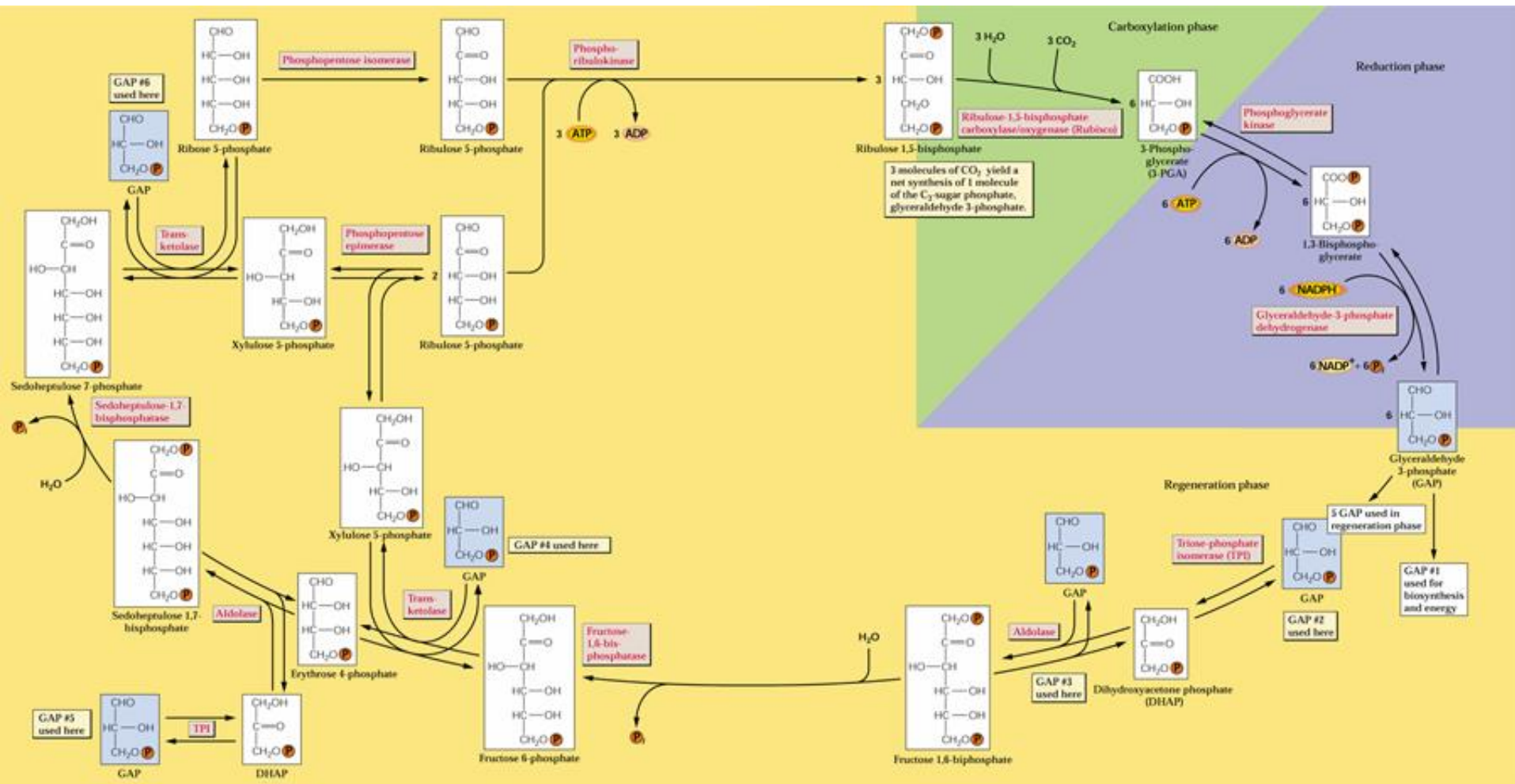


pH 7  $\rightarrow$  8  
[Mg<sup>2+</sup>] 1-3 mM  $\rightarrow$  3-6 mM

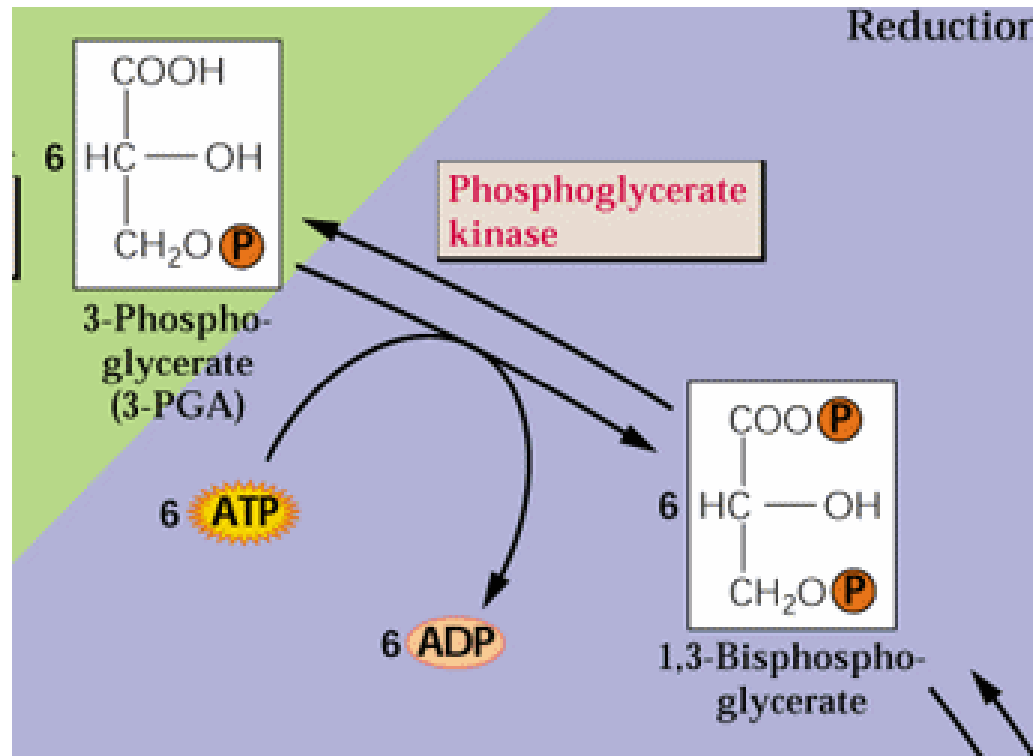




# Le reazioni del ciclo di Calvin



## RIDUZIONE

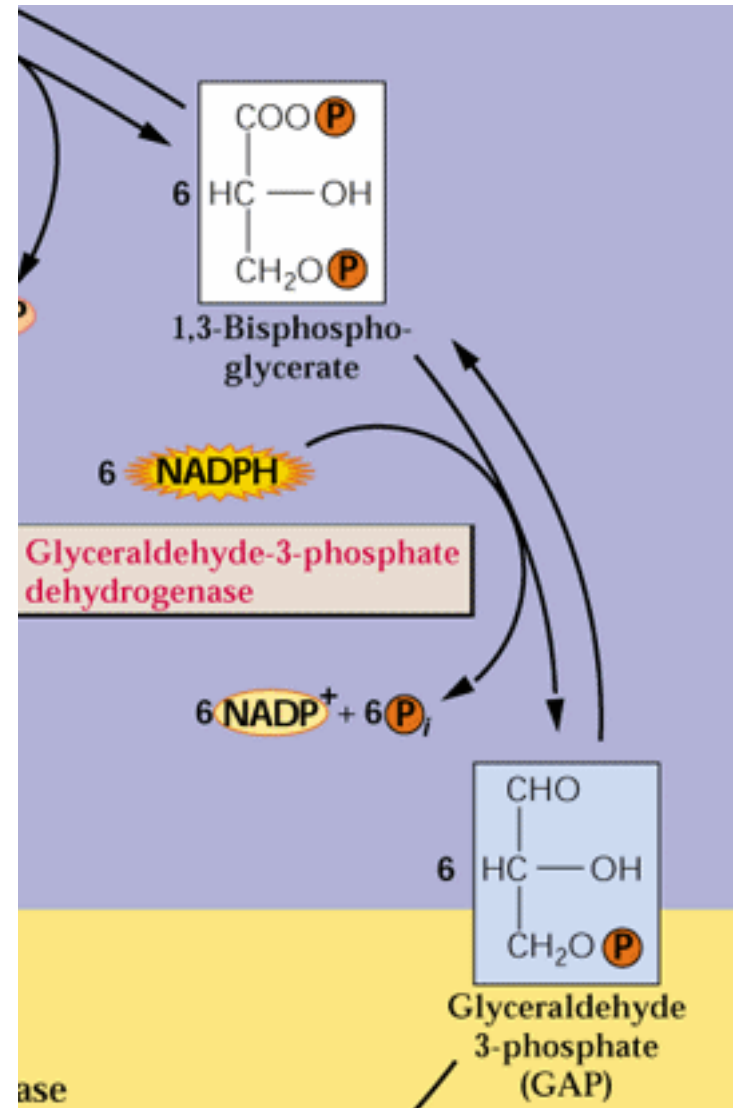


La **fosfoglicerato chinasi** fosforila il 3-fosfoglicerato consumando ATP  
Produzione di 1,3-bifosfoglicerato

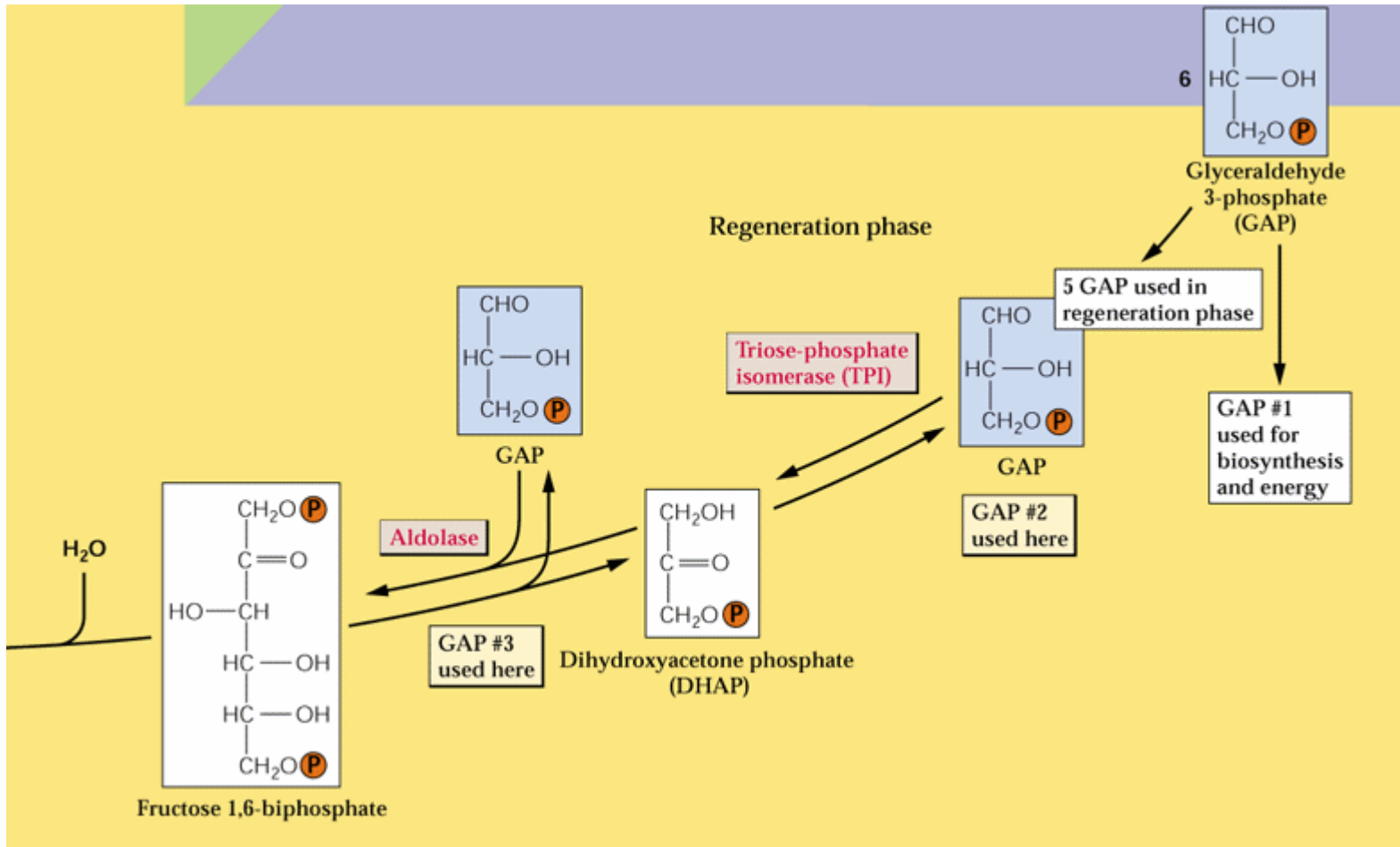
## RIDUZIONE

La **Gliceraldeide 3-P deidrogenasi** riduce  
1,3 bisfosfoglicerato consumando NADPH

Produzione di gliceraldeide 3-fosfato

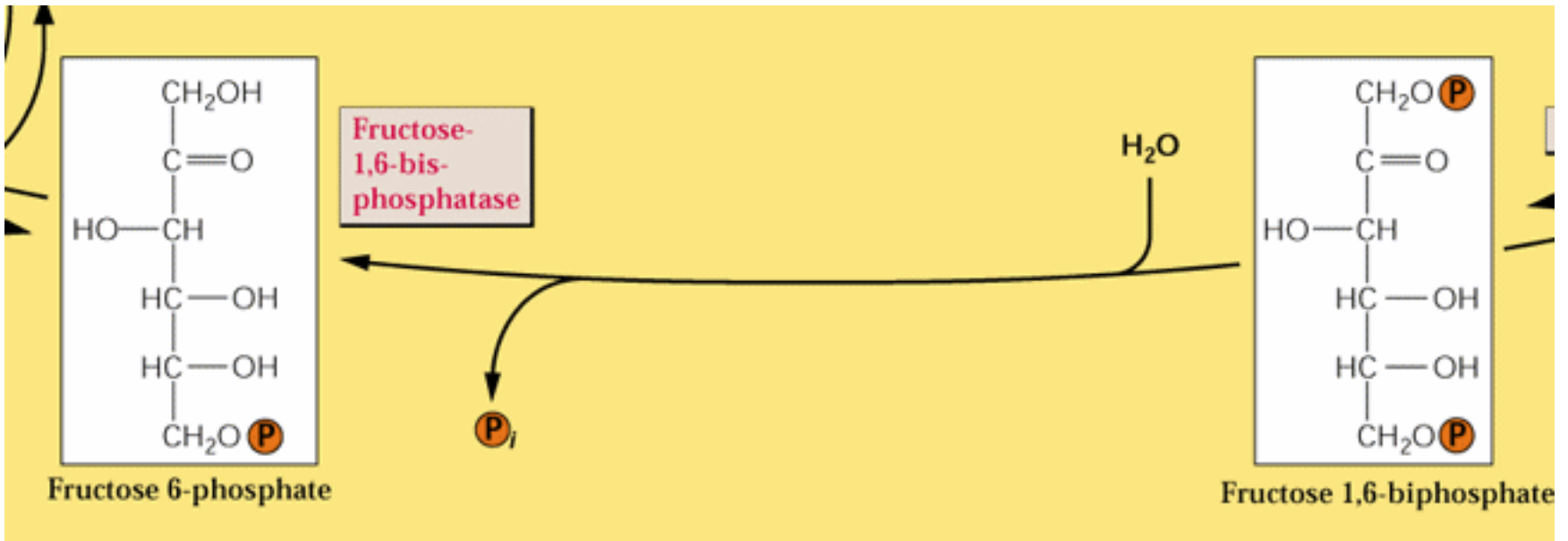


# RIGENERAZIONE



Il diidrossiacetone-P e la gliceraldeide 3-P vanno incontro a condensazione aldolica catalizzata dall'**aldolasi**  
Produzione di fruttosio 1,6-bisfosfato

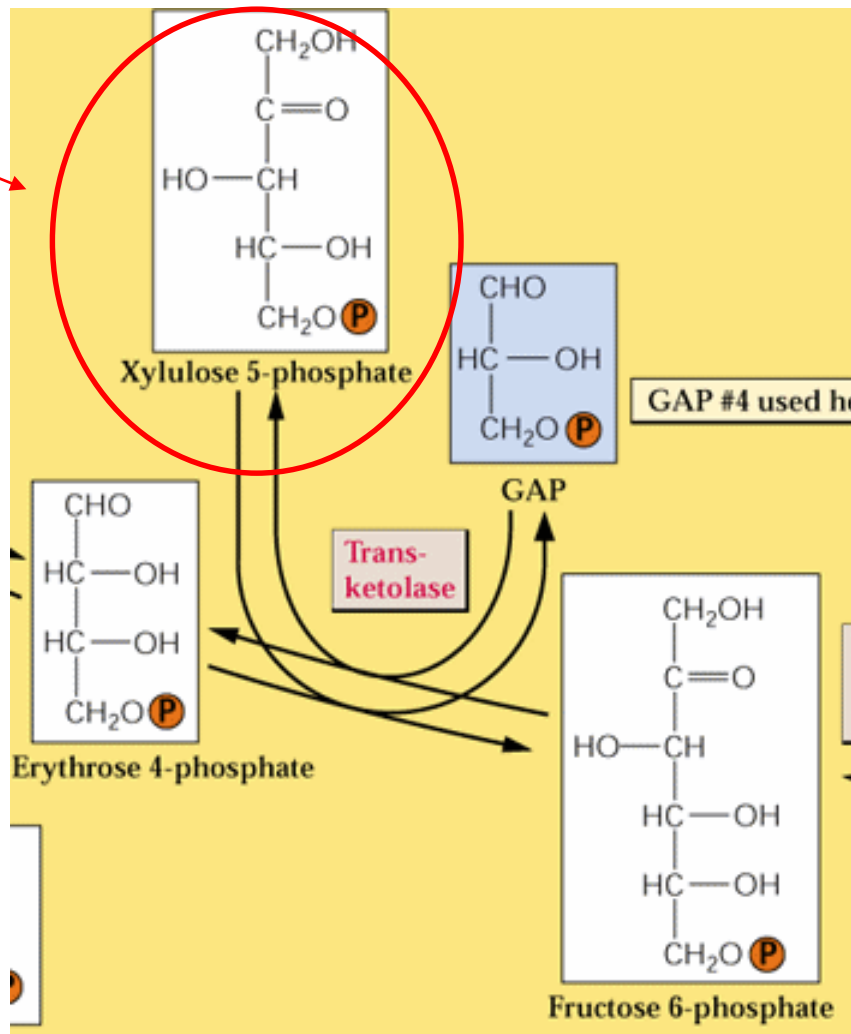
## RIGENERAZIONE



Il fruttosio 1,6 bifosfato viene defosforilato: **fruttosio 1,6 bifosfatasi**  
Produzione di fruttosio 6-fosfato

# RIGENERAZIONE

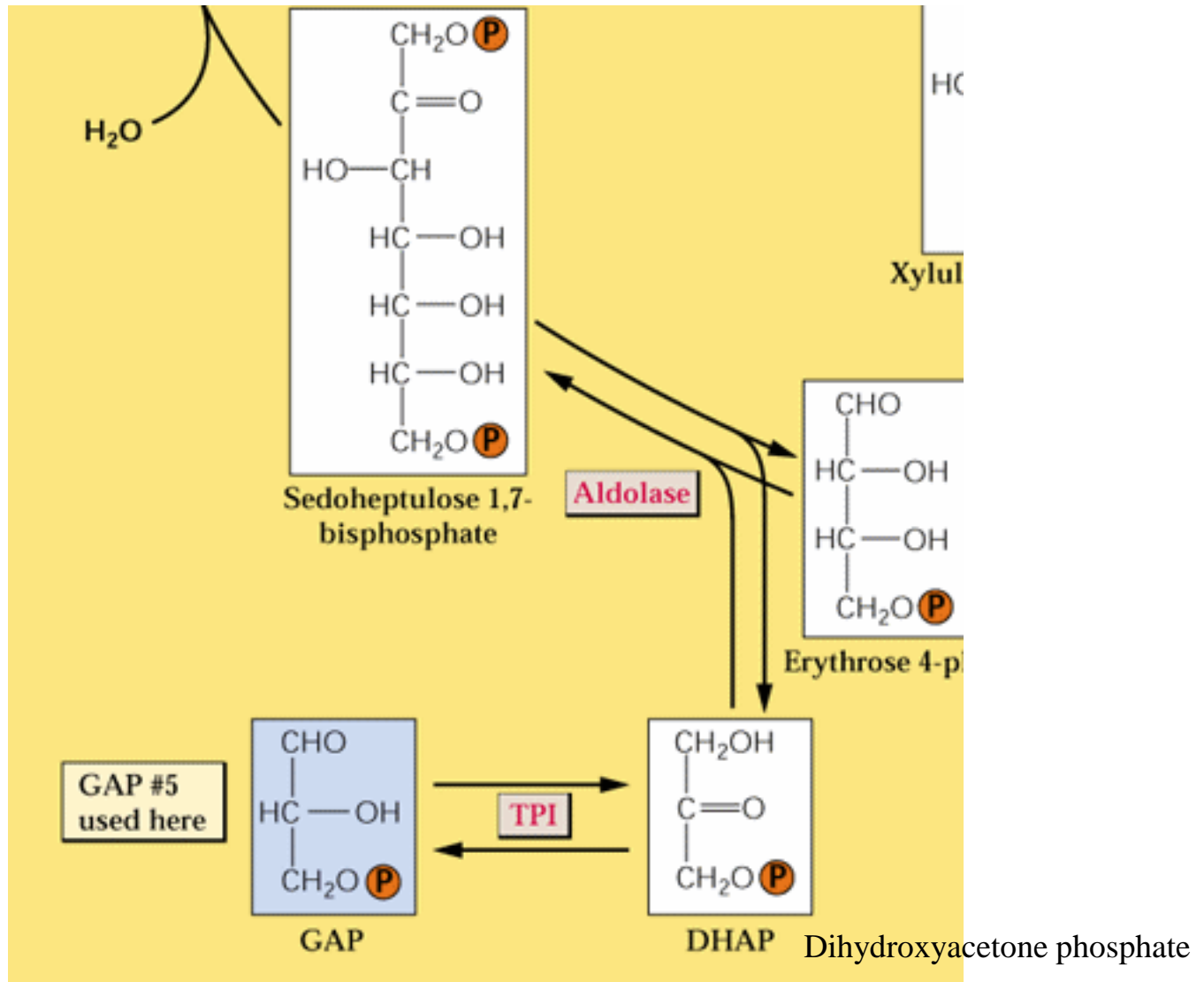
1° pentoso



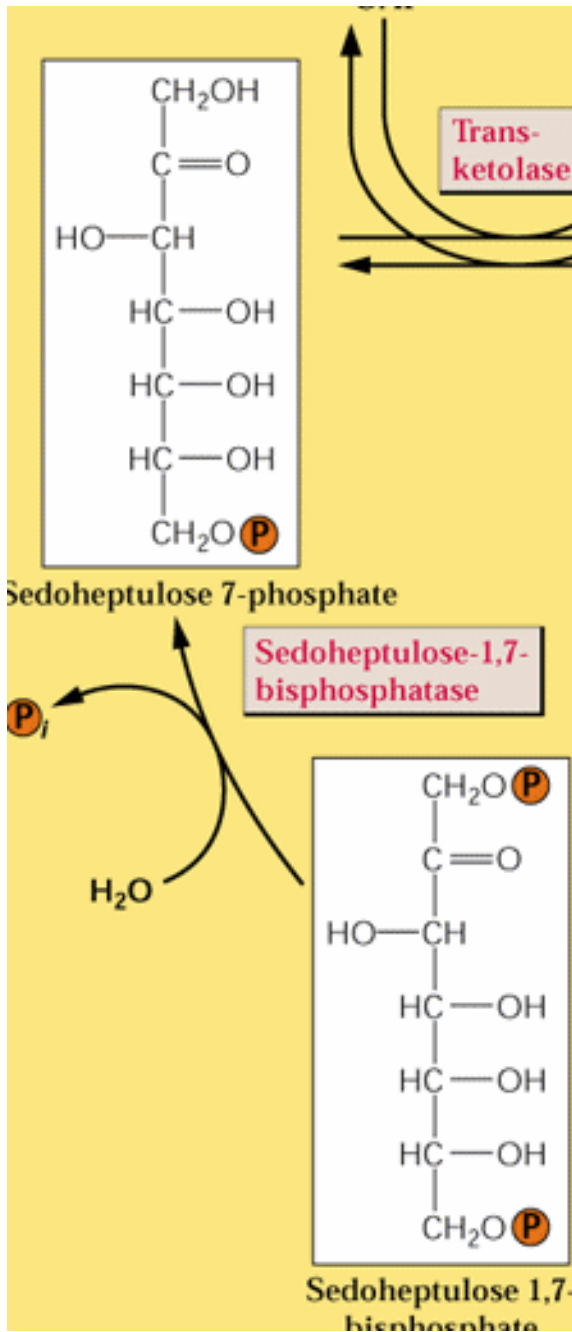
Il fruttosio 6-fosfato e un'altra molecola di gliceraldeide 3-P si combinano:  
reazione catalizzata dalla **transchetolasi**

Produzione di Eritrosio 4-fosfato e xilulosio 5-fosfato

# RIGENERAZIONE



Condensazione aldolica tra eritrosio 4-P e un'altra molecola di gliceraldeide3-P: **aldolasi**.  
Produzione di sedoeptulosio 1,7-bifosfato

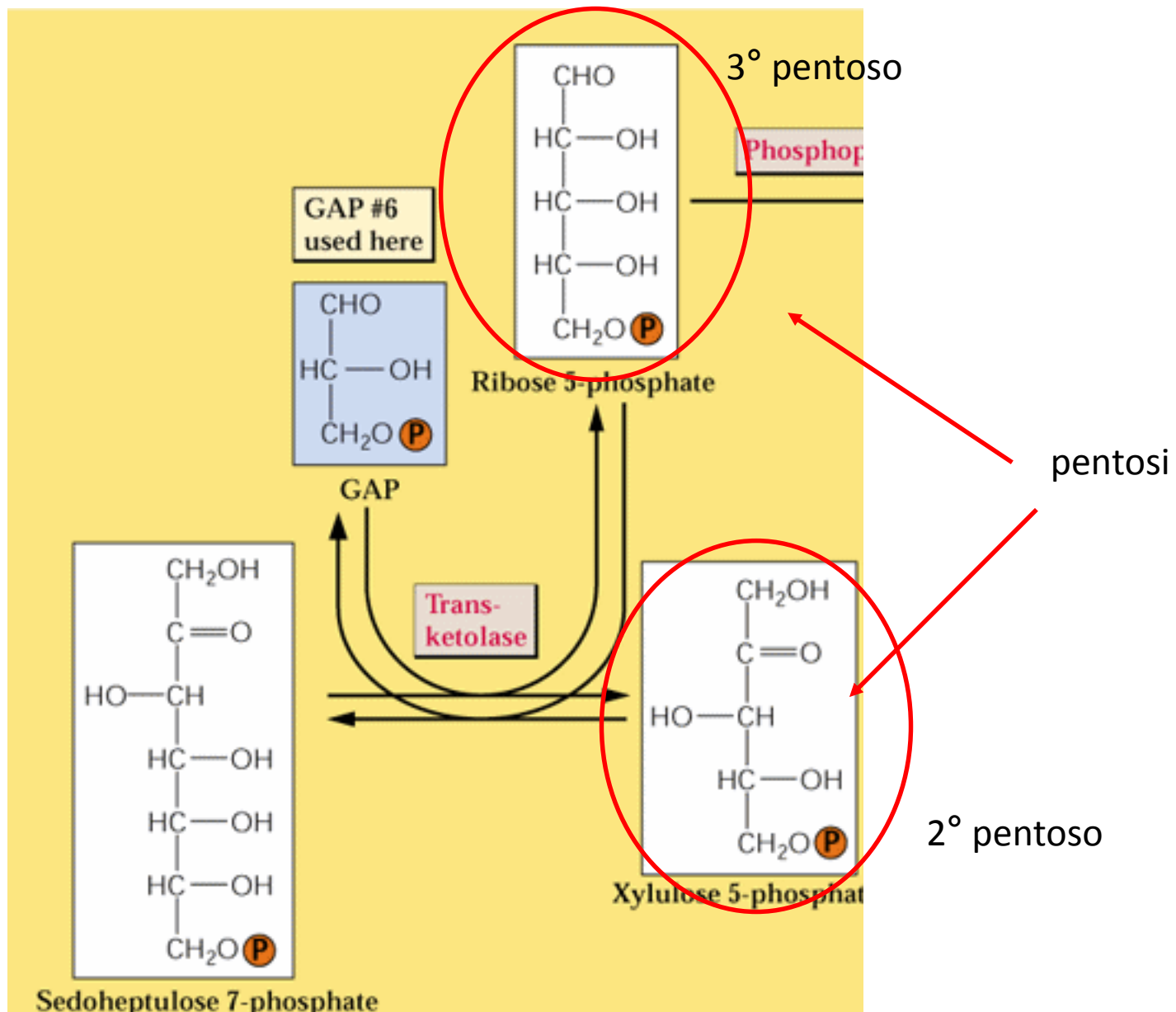


Il sedoepulosio 1,7 bifosfato viene defosforilato:

**sedoepulosio 1,7 bifosfatasi**

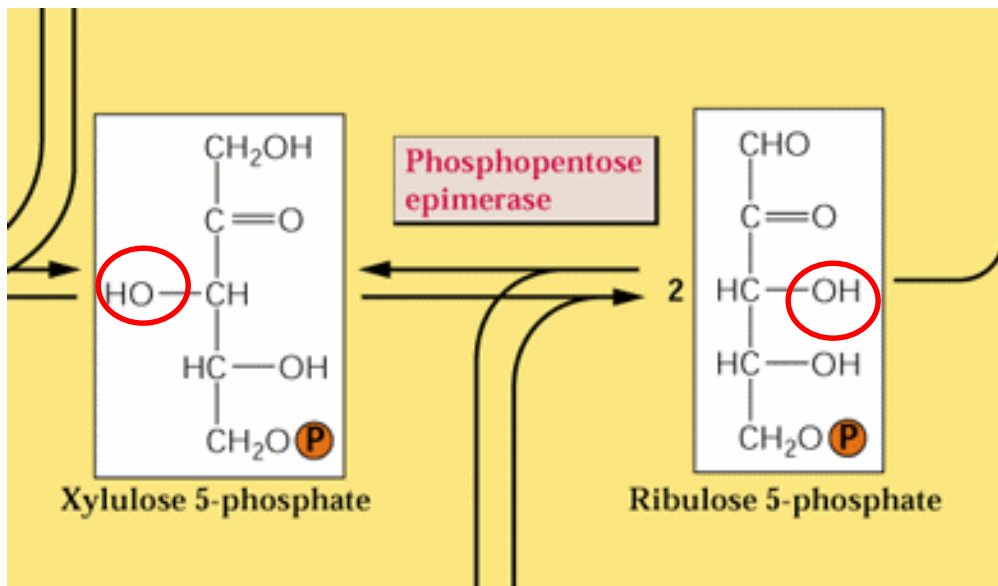
Produzione di sedoepulosio 7-fosfato





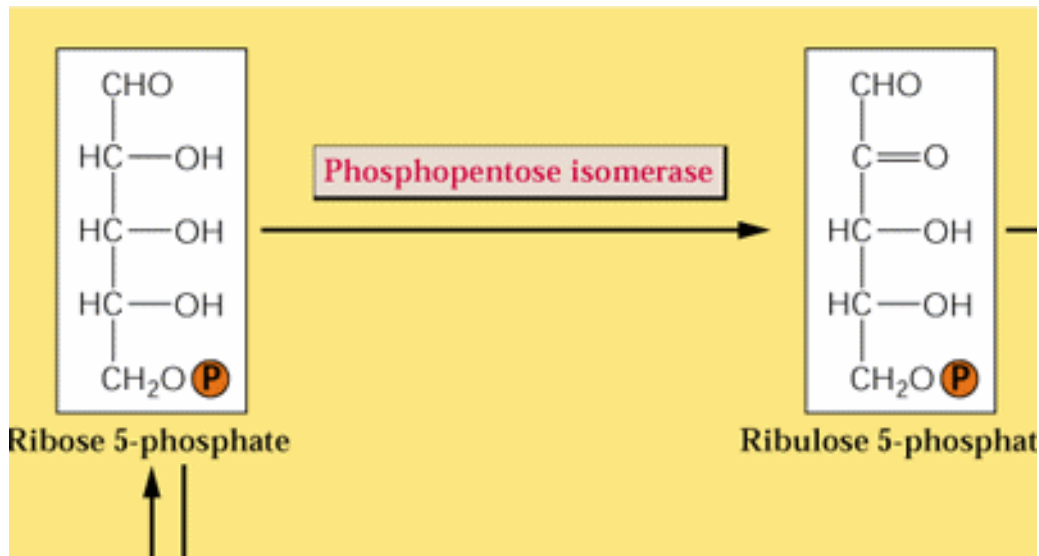
Il sedoheptulosio 7-fosfato reagisce con l'ultima molecola di GA3-P formando 2 pentosi: **transchetolasi**. Produzione di xilulosio 5-fosfato e ribosio 5-fosfato

2x



Epimerasi

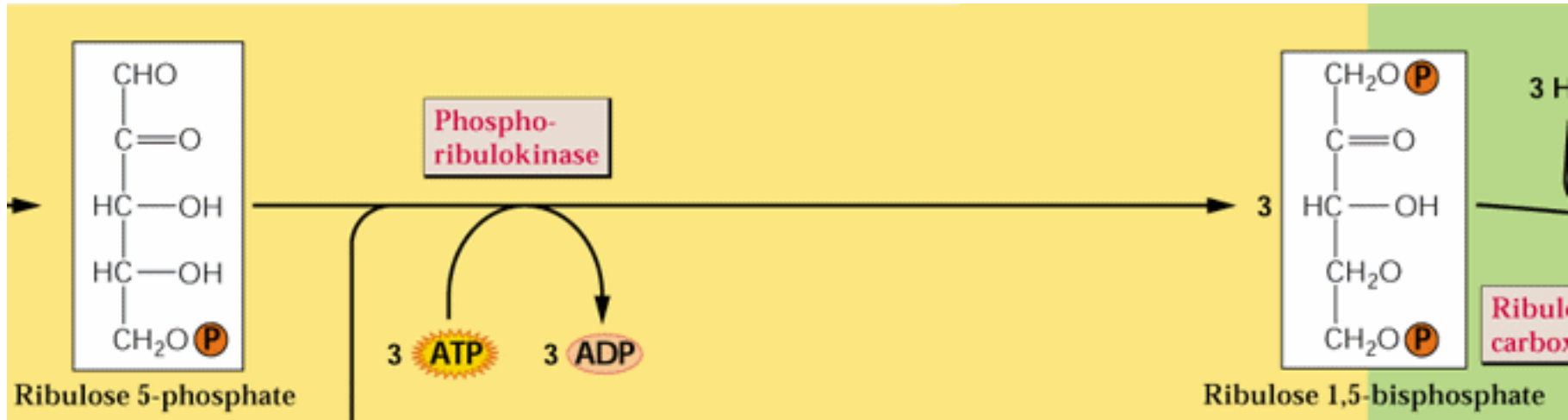
1x



Isomerasi

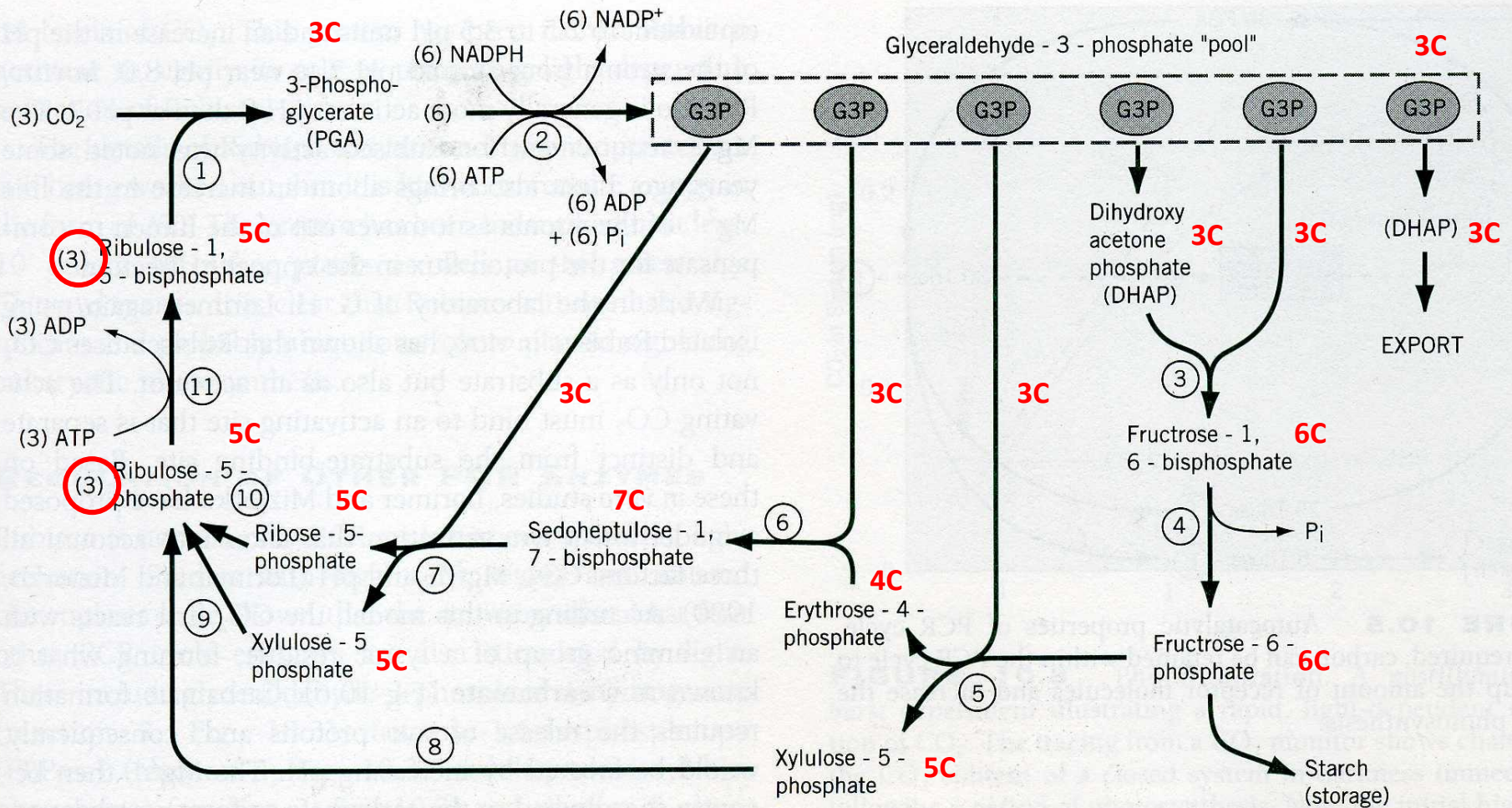
I pentoso-P vengono convertiti in Ribulosio 5-P

3x



La fosforibulochinasi rigenera l'accettore (Ribulosio 1,5 bisfosfato) consumando ATP

Per la fissazione di 1 CO<sub>2</sub> servono 2 NADPH e 3 ATP



**FIGURE 10.3** The photosynthetic carbon reduction (PCR) cycle. Numbers in brackets indicate stoichiometry. Enzymes, indicated by circled numbers are: (1) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco); (2) 3-phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; (3) aldolase; (4) fructose-1,6-bisphosphatase; (5) transketolase; (6) aldolase; (7) sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; (8, 9) ribulose-5-phosphate epimerase; (10) ribose-5-phosphate isomerase; (11) ribulose-5-phosphate kinase.

Alcuni enzimi del ciclo di Calvin (oltre a Rubisco)  
sono attivi solo alla luce (aumento pH e  $Mg^{2+}$ ):

Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi

Fruttosio 1,6-bifosfatasi

Sedoeptulosio 1,7-bifosfatasi

Fosfo-ribulo-chinasi

**Rubisco attivasi**

## TIOREDOSSINA (12 kDa)



Sito attivo con due cisteine:

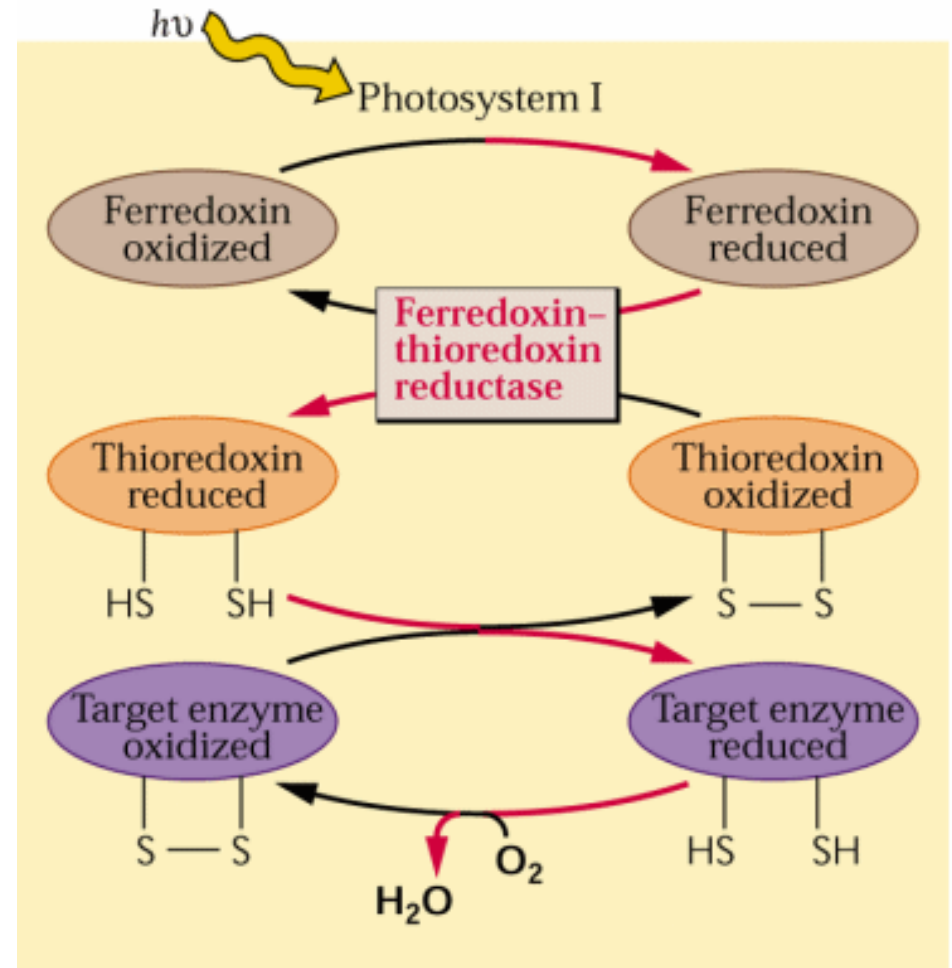
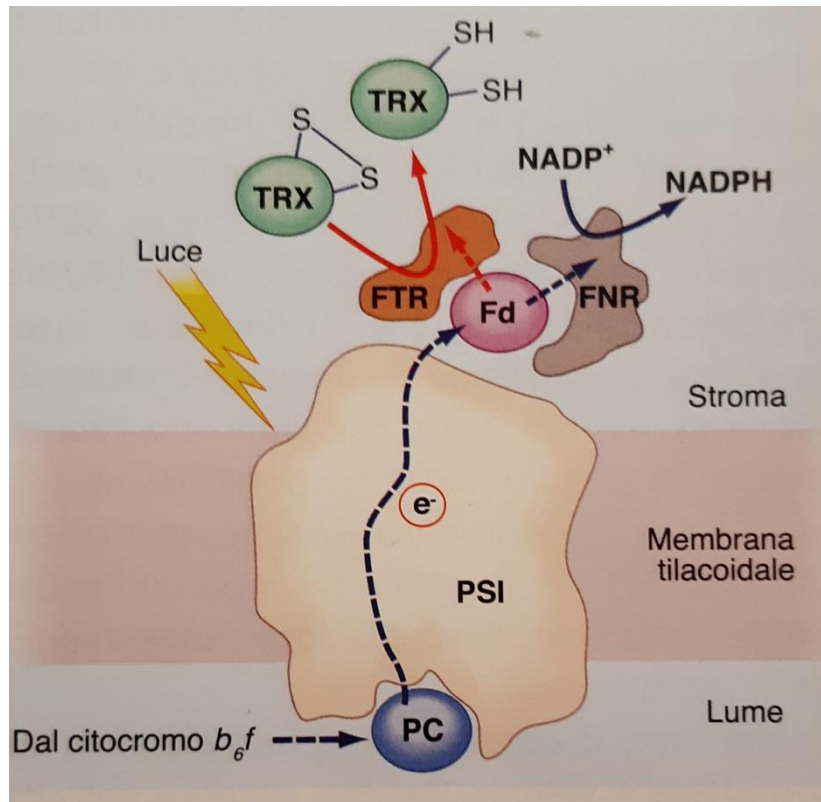
Al buio:

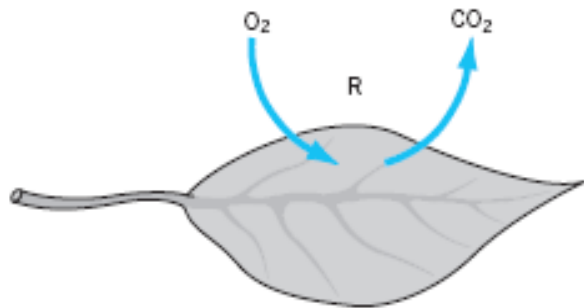
Ponte disolfuro (-S-S-) -> forma ossidata

Alla luce:

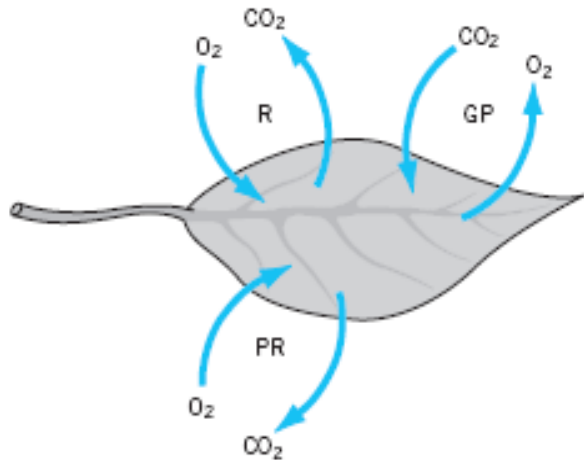
Forma tiolica (-SH HS-) -> forma ridotta

# SISTEMA FERREDOSSINA-TIOREDOSSINA





A. Buio



B. Luce

**FIGURA 5.16** Scambi gassosi in una foglia C3 al buio (A) e alla luce (B). GP, fotosintesi lorda; PR, fotorespirazione; R, respirazione mitocondriale.

$$\text{Fotosintesi netta} = \text{GP} - \text{R}$$

Esperimenti con isotopi del carbonio:  
aumento significativo della quantità di CO<sub>2</sub>  
rilasciata durante il giorno

Fenomeno che prende il nome di  
**fotorespirazione**

$$\text{Fotosintesi netta} = \text{GP} - (\text{R} + \text{PR})$$



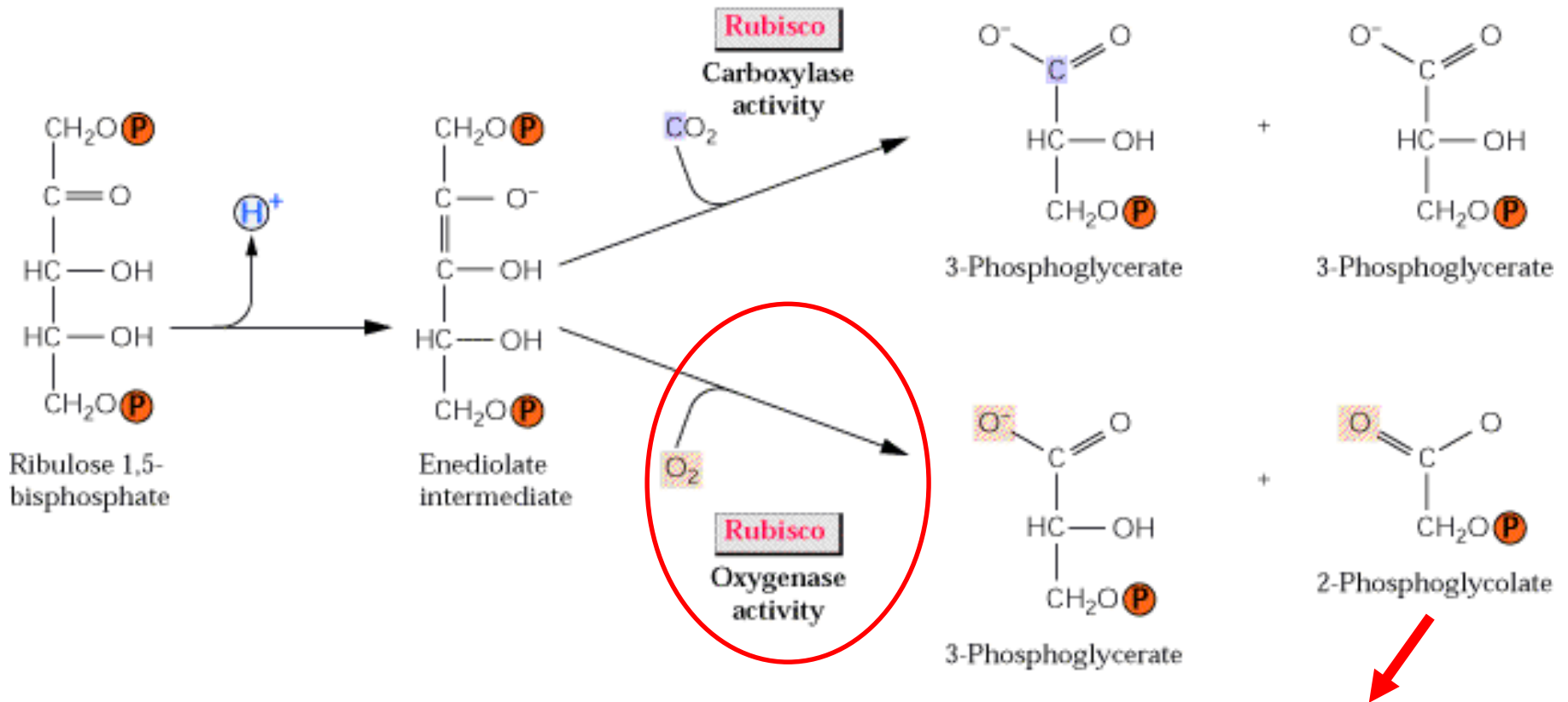
## LA FOTORESPIRAZIONE

L'ossigeno molecolare inibisce la fotosintesi

$[O_2]$  21% → 42%        -50% velocità fotosintesi

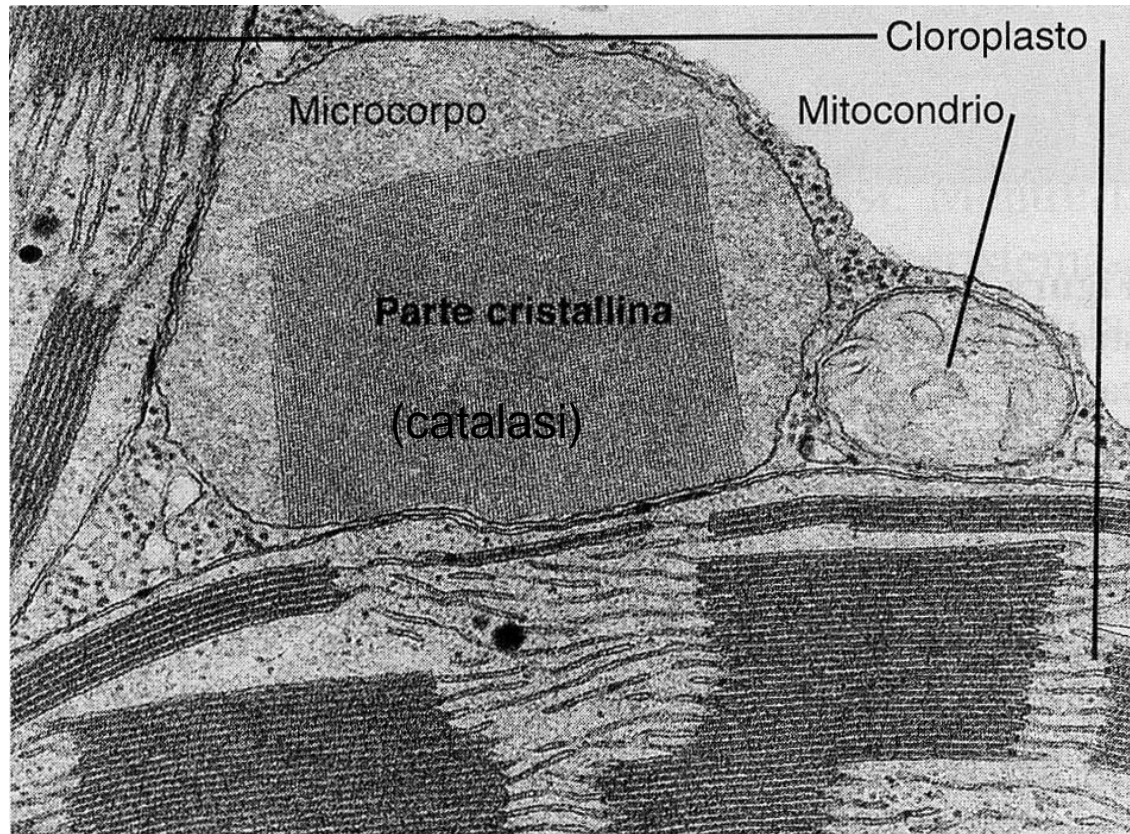
$[O_2]$  21% → 2%        +100% velocità fotosintesi

# La Rubisco reagisce anche con l'ossigeno (anche la Rubisco di batteri fotosintetici anaerobi...)



**Perdita di 40% del C della molecola di ribulosio 1,5-bifosfato!**

Il ciclo PCO (photorespiratory carbon oxidation) recupera parte del carbonio perduto nella reazione di ossigenazione del ribulosio 1,5-bisfosfato



**Nel mitocondrio 2 molecole di Glicina ( $2C \times 2 = 4C$ )  
vengono convertite in 1 molecola di Serina (3C)**

**2 glicina**



**serina,  $CO_2$ ,  $NH_3$ , NADH**

**Si forma un composto a 3 atomi di C**



**3-fosfoglicerato**

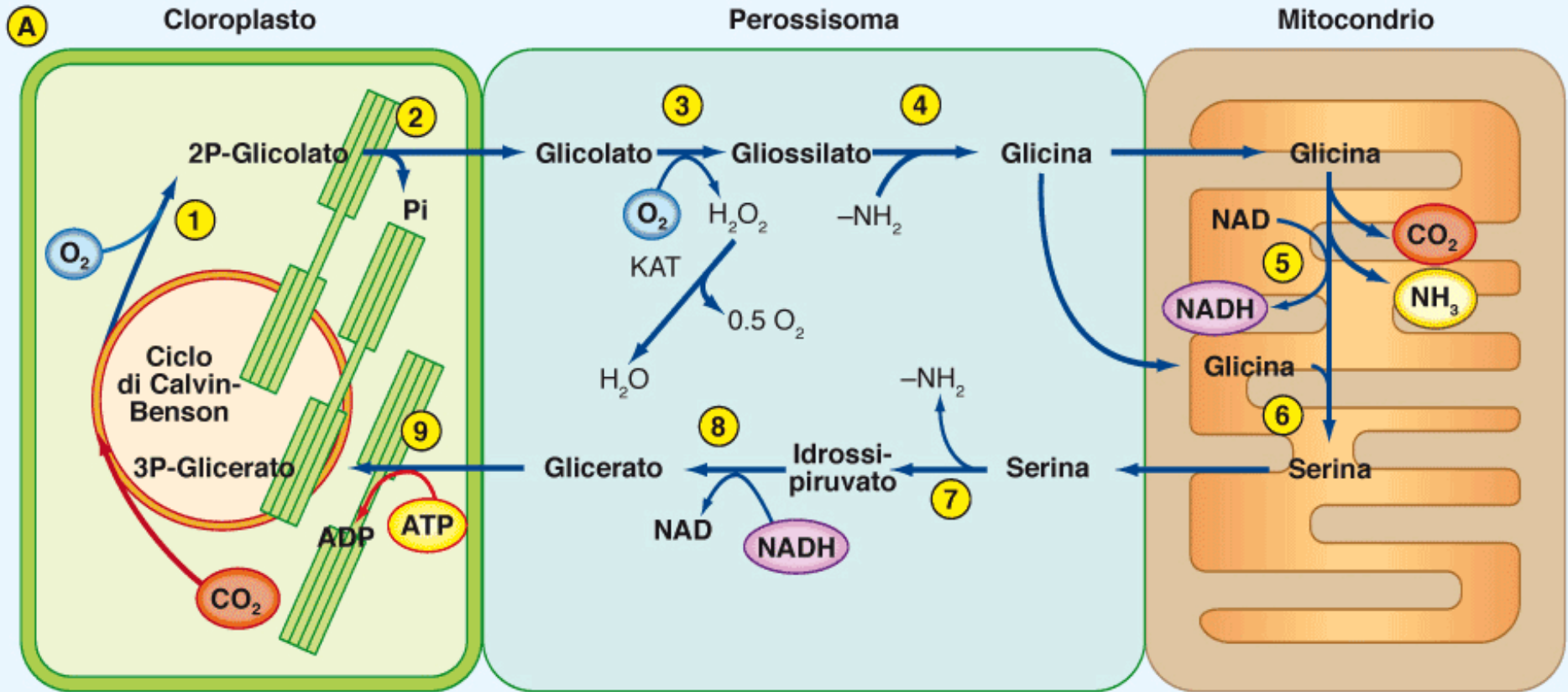
Nel complesso:

Da 2 molecole di fosfoglicolato (4 C totali) si forma una molecola di 3-fosfoglicerato (3 C) mentre una molecola di  $\text{CO}_2$  viene persa

**Il ciclo PCO recupera il 75% del C**

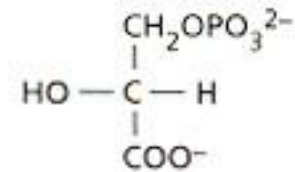
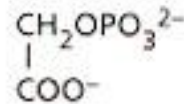
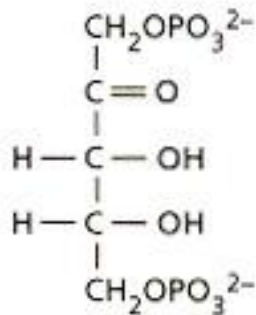
che andrebbe perso a causa dell'attività ossigenasica della Rubisco

# LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

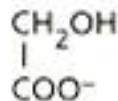
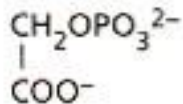
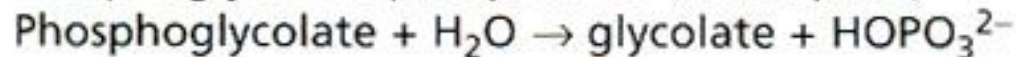


## LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

### 1. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (chloroplast)

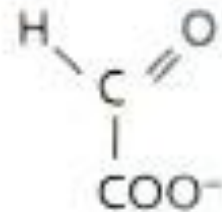
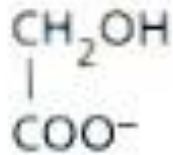


### 2. Phosphoglycolate phosphatase (chloroplast)

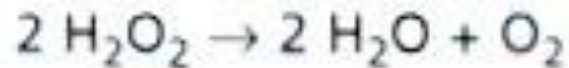


Il glicolato esce dal cloroplasto ed entra nel perossisoma tramite un traslocatore di antiporto glicolato/glicerato

3. *Glycolate oxidase (peroxisome)*



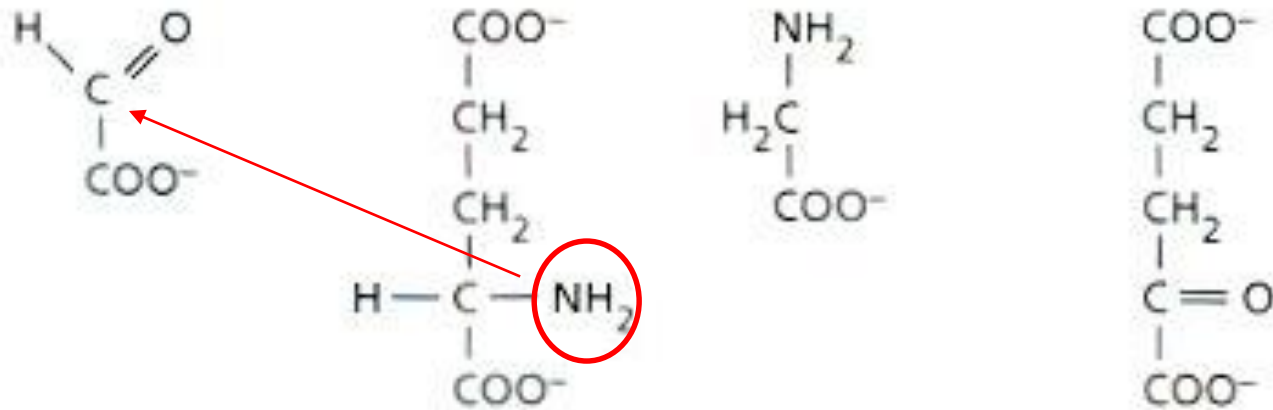
4. *Catalase (peroxisome)*



Nei perossisomi il glicolato viene ossidato a gliossilato, con produzione di perossido di idrogeno



5. *Glyoxylate:glutamate aminotransferase (peroxisome)*  
Glyoxylate + glutamate → glycine +  $\alpha$ -ketoglutarate

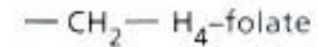
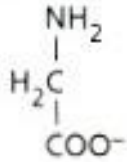
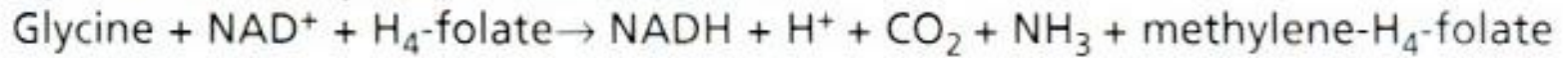


Nei perossisomi il gliossilato viene transaminato a glicina; il donatore del gruppo amminico è il glutammato.

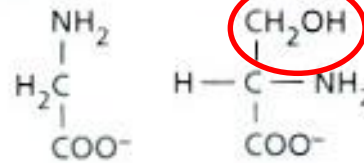
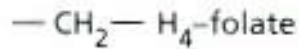
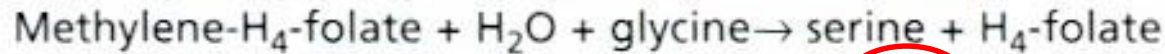
La glicina passa nei mitocondri

6. *Glycine decarboxylase (mitochondrion)*

Metilentetraidrofolato



7. *Serine hydroxymethyltransferase (mitochondrion)*



Nei mitocondri da due molecole di glicina  
( $2 \times 2 = 4$  atomi di C) si forma una molecola di  
serina (3 atomi di C)

**2 glicina**

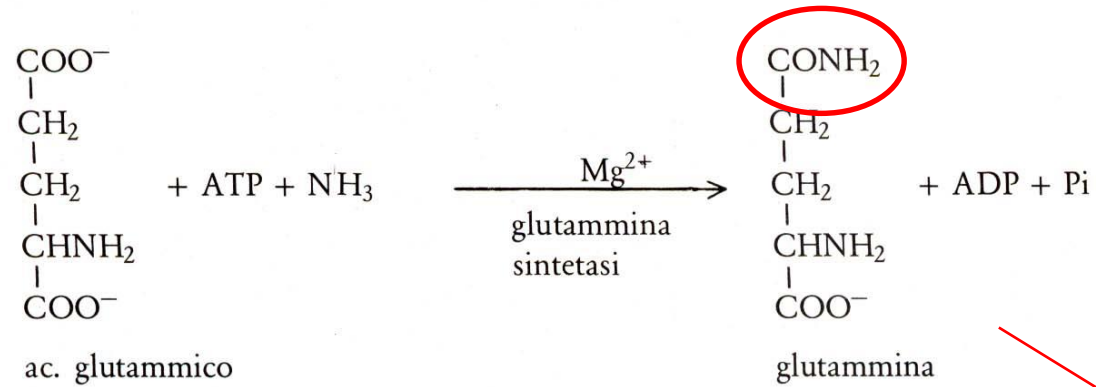


**serina, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NADH**



CO<sub>2</sub> FOTORESPIRATORIA

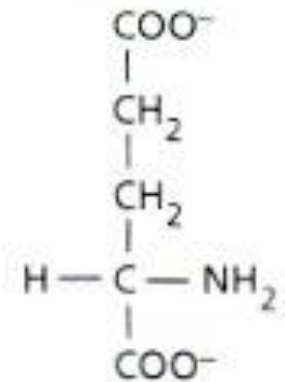
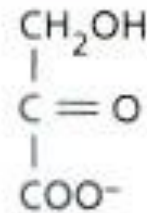
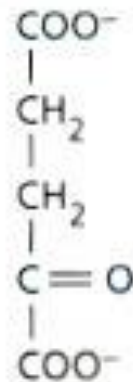
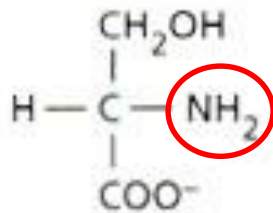
NH<sub>3</sub> diffonde nei cloroplasti dove viene organizzato dalla glutammina sintetasi



Ciclo GS-GOGAT

8. *Serine aminotransferase (peroxisome)*

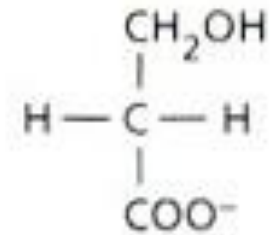
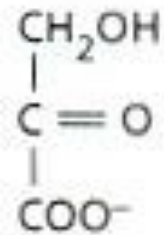
Serine +  $\alpha$ -ketoglutarate  $\rightarrow$  hydroxypyruvate + glutamate



Nel perossisoma la serina viene deamminata a idrossipiruvato

L'accettore dell' $\text{NH}_2$  è l'acido  $\alpha$ -chetoglutarico

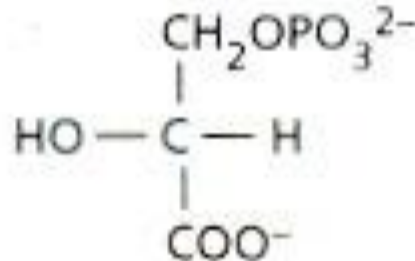
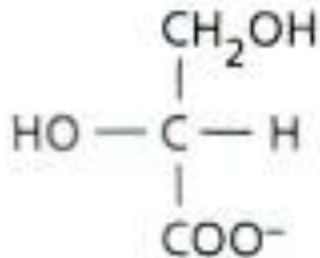
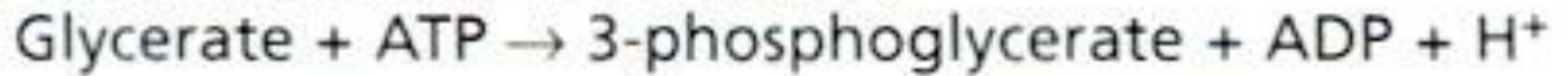
9. *Hydroxypyruvate reductase (peroxisome)*



L'idrossipiruvato è ridotto a glicerato

Il glicerato passa nel cloroplasto

## 10. *Glycerate kinase (chloroplast)*



**Ciclo di Calvin**

Il glicerato è fosforilato dalla glicerato chinasi a 3-fosfoglicerato che entra nel ciclo di Calvin

## **NEL COMPLESSO:**

**da 2 molecole di fosfoglicolato (4C) si forma  
1 molecola di 3-fosfoglicerato (3C)**

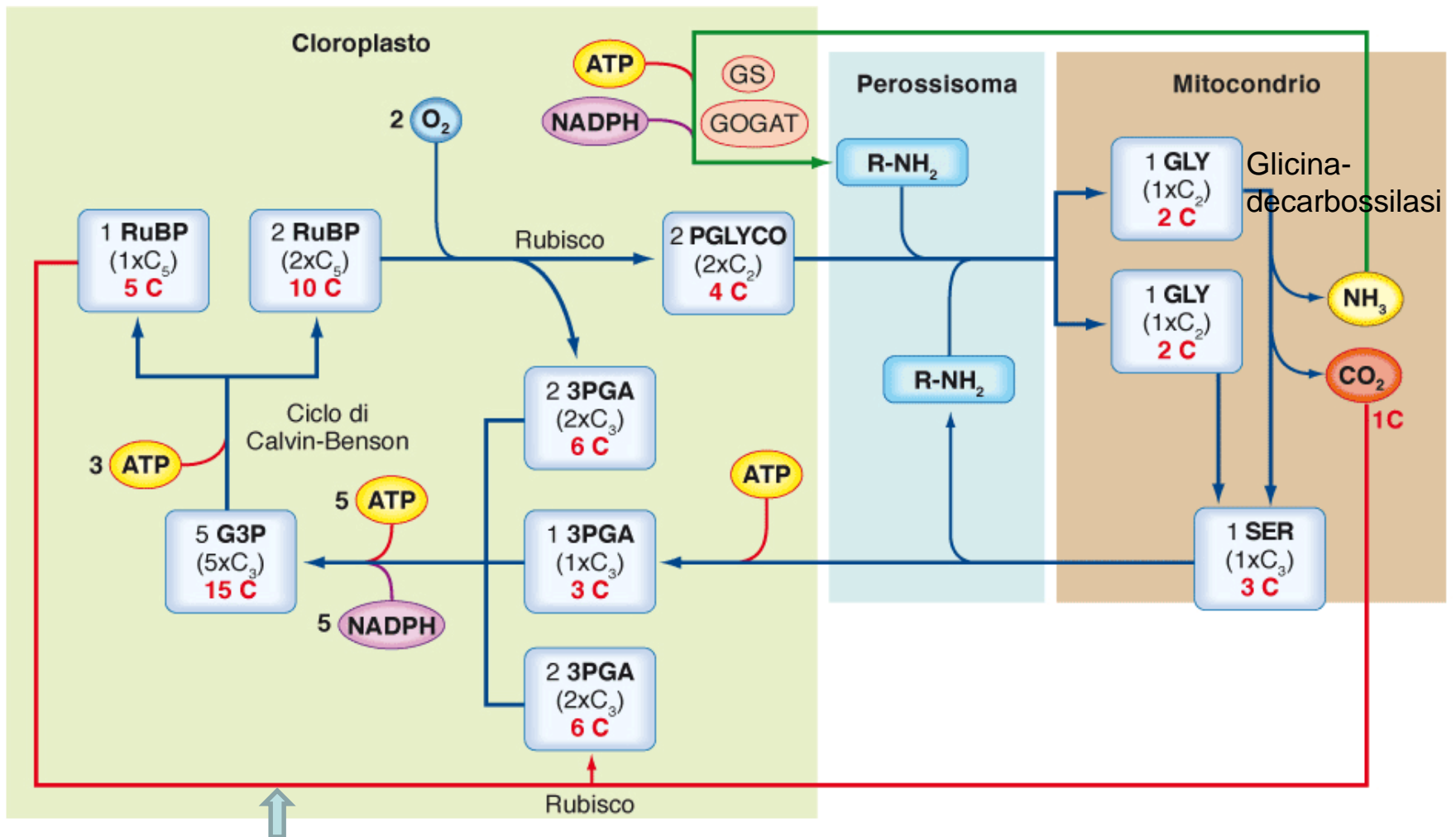
**cioè si recuperano i 3/4 del carbonio dissipato dalla  
attività ossigenasica della Rubisco**

**1/4 viene perso come CO<sub>2</sub>**

**Mutanti Arabidopsis privi di enzimi chiave del ciclo fotorespiratorio:**

**Crescita stentata nella normale atmosfera (0.04% CO<sub>2</sub>)**

**Normali in atmosfera arricchita (0.4%) di CO<sub>2</sub>**



Ogni 2 molecole di 2-fosfoglicolato, 10 ATP e 6 NADPH

Il costo energetico di ogni singola reazione ossigenasica della Rubisco è pari a:

**5 ATP e 3 NADPH**

In qualunque condizione che favorisca la fotorespirazione, questa spesa aggiuntiva determina una **riduzione della resa fotosintetica e quindi della crescita della pianta**



## Rubisco: attività carbossilasica e ossigenasica

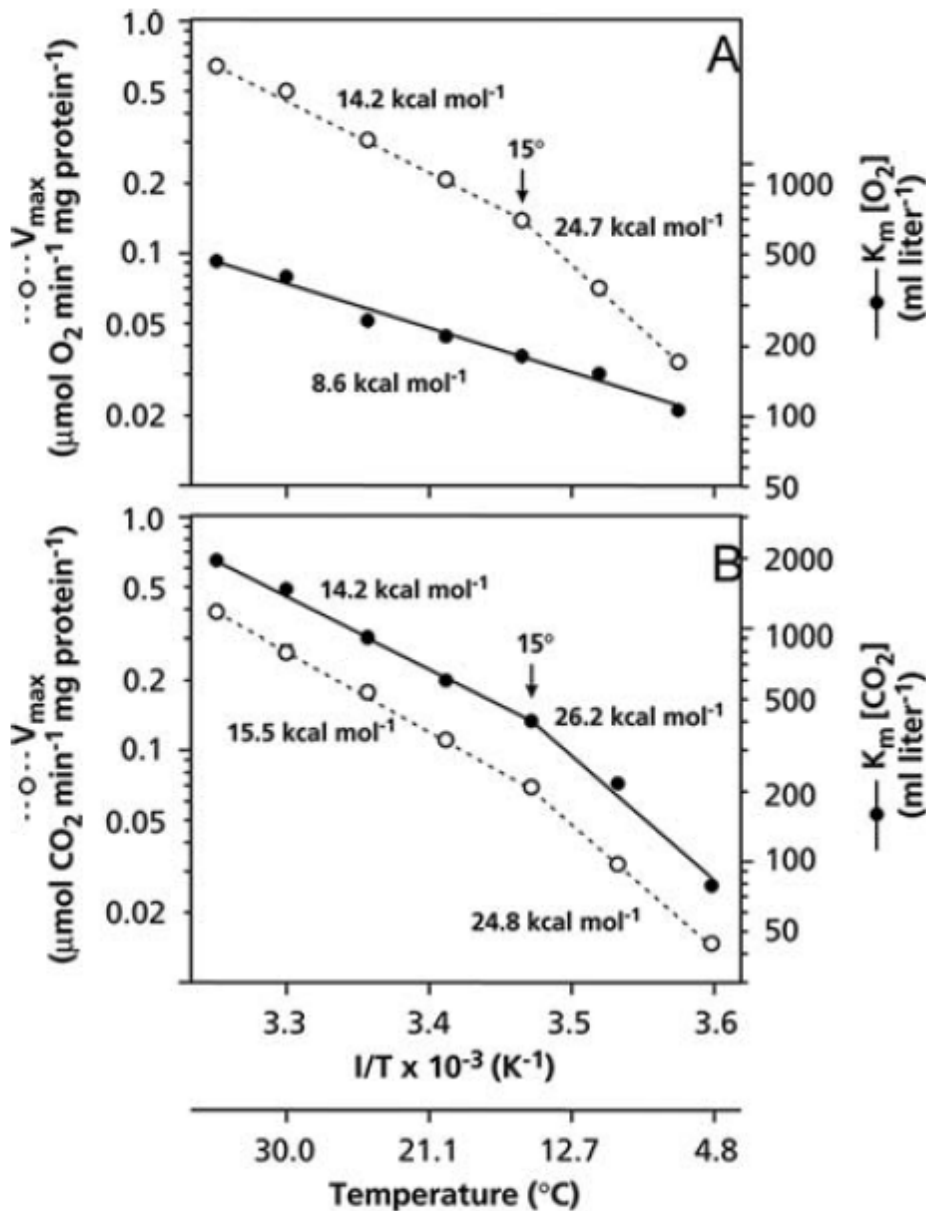
Equazione di Michaelis-Menten:

velocità della reazione enzimatica=f(conc. substrato)

**Fattore di specificità  $S_{c/o}$**  (rapporto tra  $V_c$  e  $V_o$  se la concentrazione dei substrati fosse la stessa) è pari a 100 (da 80 a 130)

Nelle condizioni dell'atmosfera attuale (0.04% CO<sub>2</sub> e 21% O<sub>2</sub>) e a T = 30 °C

$V_c/V_o = 3.2$ , cioè  $V_o/V_c = 0.31$



All'aumentare di T, aumenta K<sub>m</sub> sia per CO<sub>2</sub> che per O<sub>2</sub>

Ma K<sub>m</sub> aumenta più rapidamente per CO<sub>2</sub> che per O<sub>2</sub>

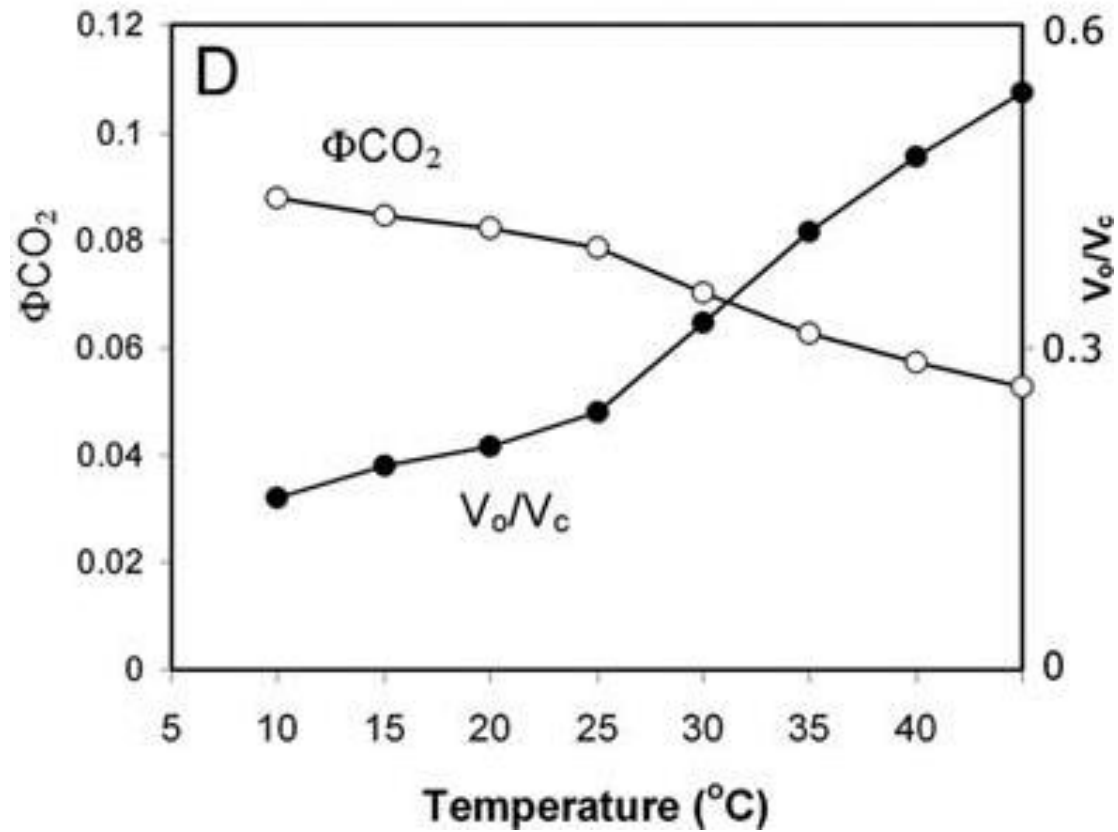
Cioè l'affinità della Rubisco per la CO<sub>2</sub> diminuisce più rapidamente di quella per O<sub>2</sub>

Esempio:

Passando da 5 a 30 °C

K<sub>m</sub> per O<sub>2</sub> aumenta di 3 volte

K<sub>m</sub> per CO<sub>2</sub> aumenta di 15 volte



All'aumentare della temperatura aumenta il rapporto  $V_o/V_c$   
(= diminuisce il rapporto  $V_c/V_o$ )

## Legge di Henry

$$[\text{gas}] \mu\text{M} = P_{\text{gas}} \times \alpha$$

Temperature (°C)	$\alpha$ (CO <sub>2</sub> )	[CO <sub>2</sub> ] ( $\mu\text{M}$ in solution)	$\alpha$ (O <sub>2</sub> )	[O <sub>2</sub> ] ( $\mu\text{M}$ in solution)	$\frac{[\text{CO}_2]}{[\text{O}_2]}$
5	1.424	21.93	0.0429	401.2	0.0515
15	1.019	15.69	0.0342	319.8	0.0462 $V_o/V_c = 0.2-0.3$
25	0.759	11.68	0.0283	264.6	0.0416
35	0.592 <span style="background-color: red; color: black;">-58%</span>	9.11	0.0244 <span style="background-color: red; color: black;">-43%</span>	228.2	0.0376 $V_o/V_c = 0.6-1.0$

A 35° Carbossilazione/Ossigenazione = 1:1

## LA FOTORESPIRAZIONE AUMENTA ALL'AUMENTARE DELLA TEMPERATURA AMBIENTALE

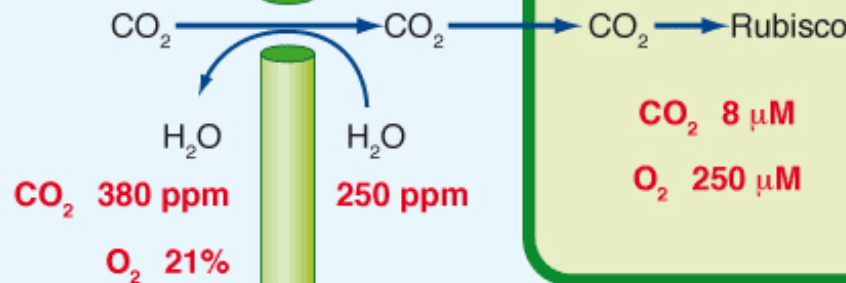
A 35 °C la fotosintesi netta è circa il 30% inferiore a quella che si avrebbe in assenza di attività ossigenasica della Rubisco

# LA FOTORESPIRAZIONE AUMENTA IN CONDIZIONI DI STRESS IDRICO

**A**

Disponibilità idrica ottimale

Stomi aperti



Rapporto tra velocità di carbossilazione e ossigenazione della Rubisco

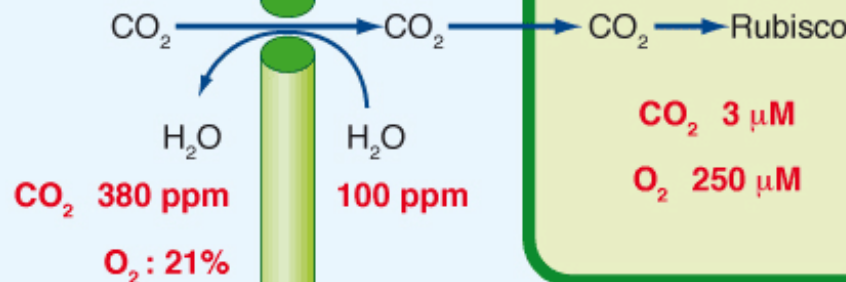
$$v_c / v_o = FS \times [CO_2] / [O_2]$$

$$100 \times (8/250) = 3.2$$

**B**

Disponibilità idrica NON ottimale

Stomi semichiusi



$$100 \times (3/250) = 1.2$$