

Dal **flusso lineare di elettroni**, ogni 4 elettroni trasferiti da H<sub>2</sub>O verso NADP<sup>+</sup> si ottengono 2 NADPH e 2.6 ATP Quindi **ATP/NADPH = 1.3**

La **fissazione di una molecola di CO<sub>2</sub>** nel Ciclo di Calvin richiede 3 ATP e 2 NADPH, con un rapporto **ATP/NADPH = 1.5**

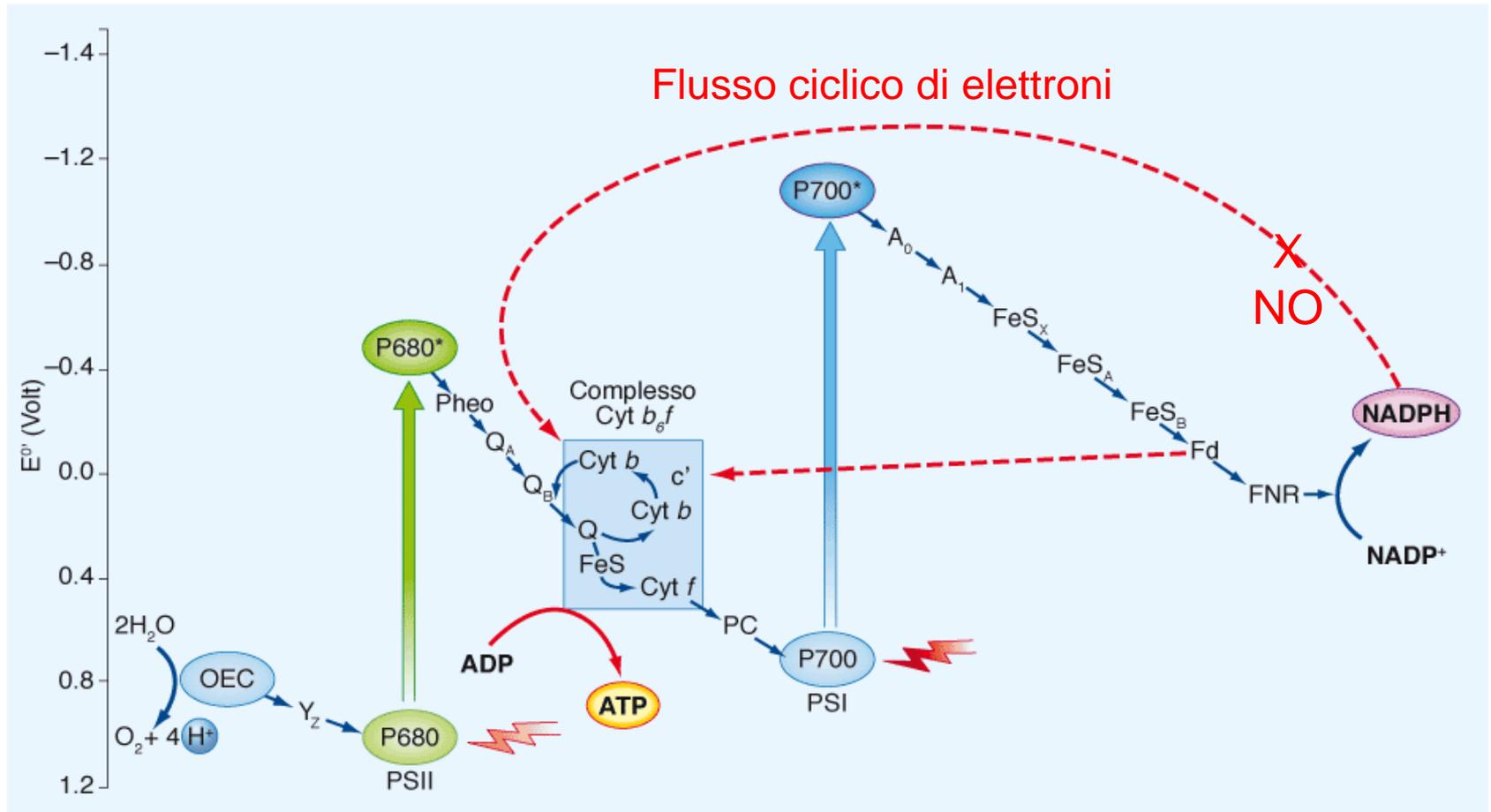
Il flusso lineare di elettroni è **insufficiente a sostenere il fabbisogno** del Ciclo di Calvin

**Necessario un meccanismo per soddisfare il maggior fabbisogno di ATP**

## Flusso lineare vs flusso ciclico di elettroni

**Flusso lineare:** schema a Z (trasferimento vettoriale di  $e^-$ ), 2 fotosistemi, libera  $O_2$ , produce NADPH e ATP, fotofosforilazione lineare

**Flusso ciclico:** trasferimento ciclico di  $e^-$ , solo PSI, produce solo ATP, fotofosforilazione ciclica

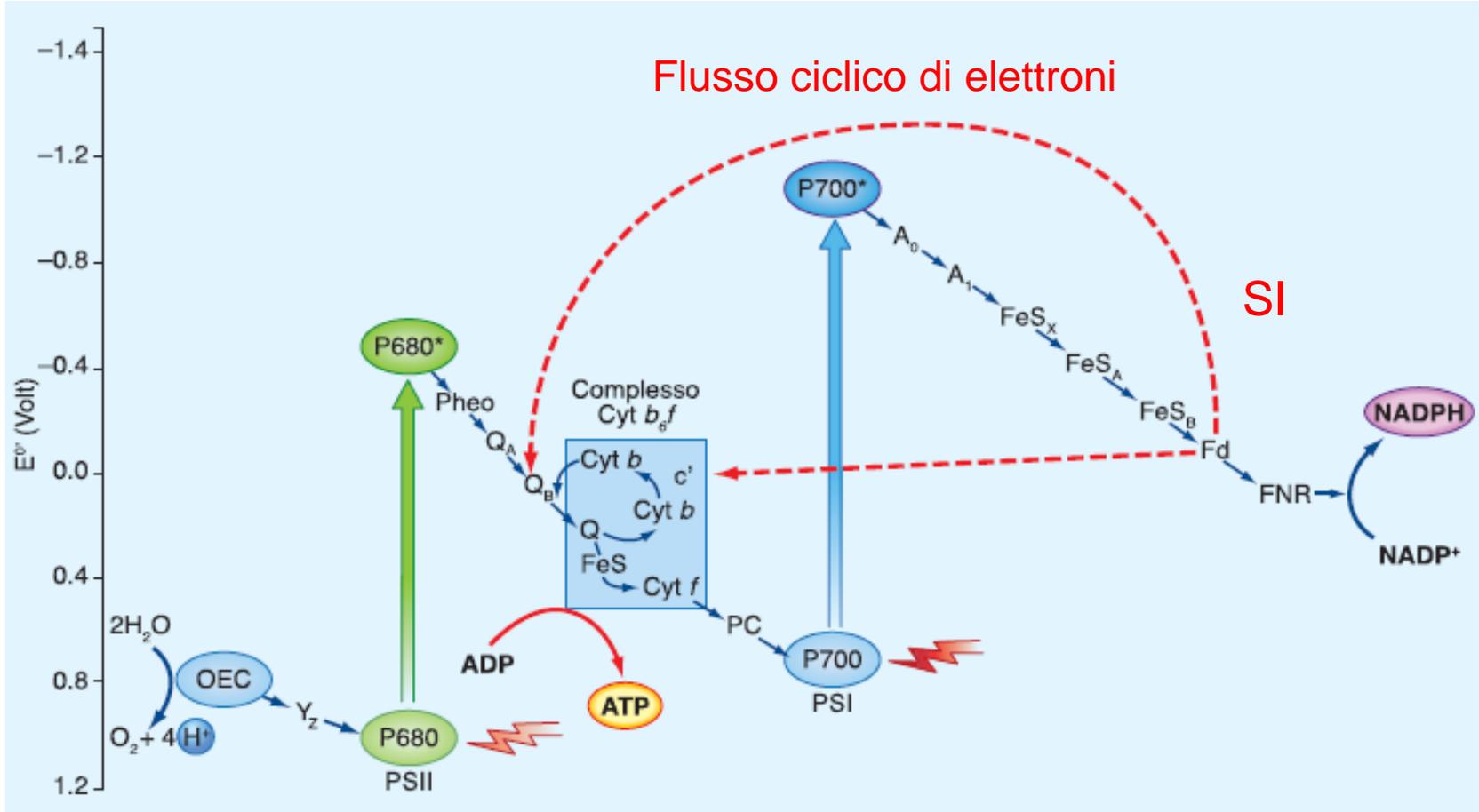


**Figura 4.21** • Schema Z dettagliato del flusso lineare di elettroni dall' $H_2O$  al  $NADP^+$ . Le linee tratteggiate rosse rappresentano le vie di immissione degli elettroni nel flusso ciclico di elettroni, attorno al PSI.

## Flusso lineare vs flusso ciclico di elettroni

**Flusso lineare:** schema a Z (trasferimento vettoriale di  $e^-$ ), 2 fotosistemi, libera  $O_2$ , produce NADPH e ATP, fotofosforilazione lineare

**Flusso ciclico:** trasferimento ciclico di  $e^-$ , solo PSI, produce solo ATP, fotofosforilazione ciclica

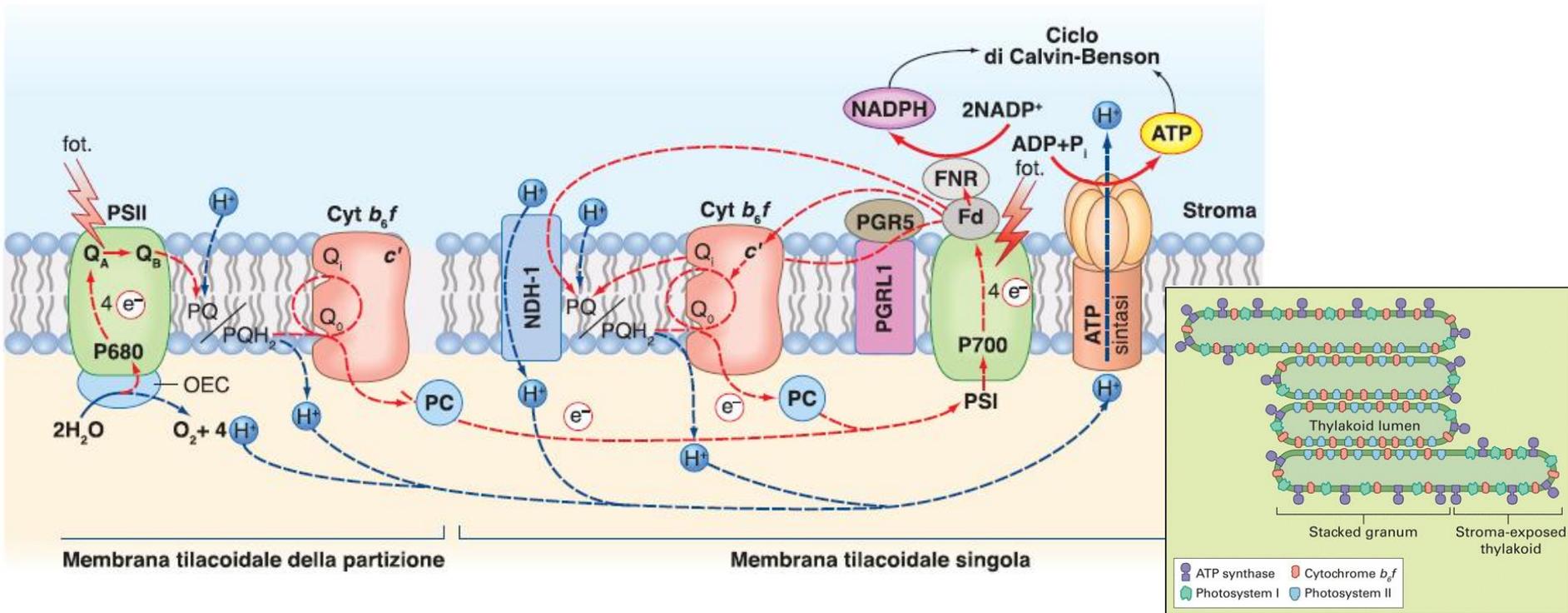


# Flusso ciclico di elettroni dal PSI al Cyt $b_6f$ e di nuovo al PSI

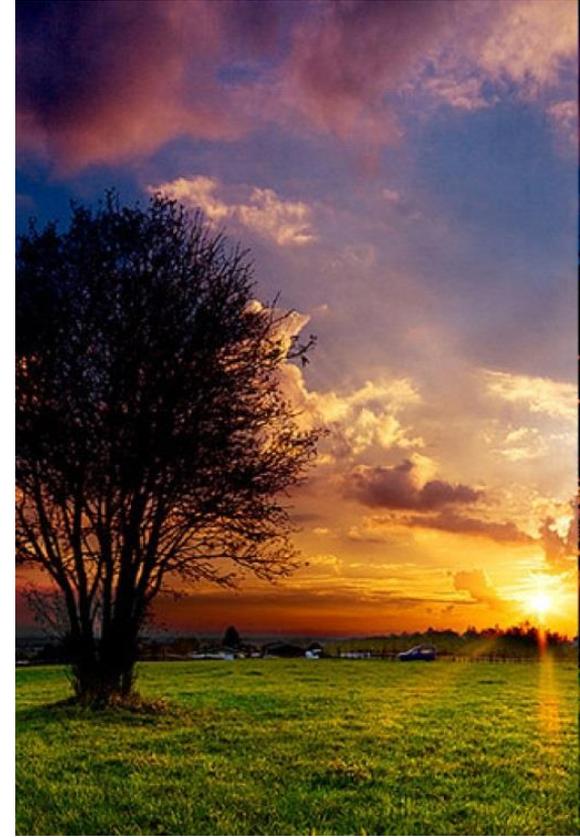
Accoppiato alla traslocazione di protoni nel lumen

Sintesi di ATP senza ossidazione dell'acqua e riduzione di NADP<sup>+</sup>

## FOTOFOSFORILAZIONE CICLICA



**FIGURA 4.22** Vie di immissione di elettroni nel flusso ciclico attorno al PSI. (Le linee tratteggiate rosse indicano i flussi di elettroni, quelle tratteggiate blu i flussi di protoni). (Cyt  $b_6f$  = complesso citocromico  $b_6f$ , Fd = ferredossina, FNR = ferredossina-NADP<sup>+</sup> riduttasi, fot = fotoni, NDH-1 = complesso enzimatico operante come Fd-PQ ossidoriduttasi, PC = plastocianina, PGR5 = *Proton Gradient Regulation 5*, PGRL1 = *PGR5-Like 1*, PQ = plastochinone, PQH<sub>2</sub> = plastochinolo). (PGR5-PGRL1 e NDH-1, che per chiarezza grafica sono distanziati dal PSI, *in vivo* sono associati al fotosistema). (Per una spiegazione più dettagliata si veda il testo).

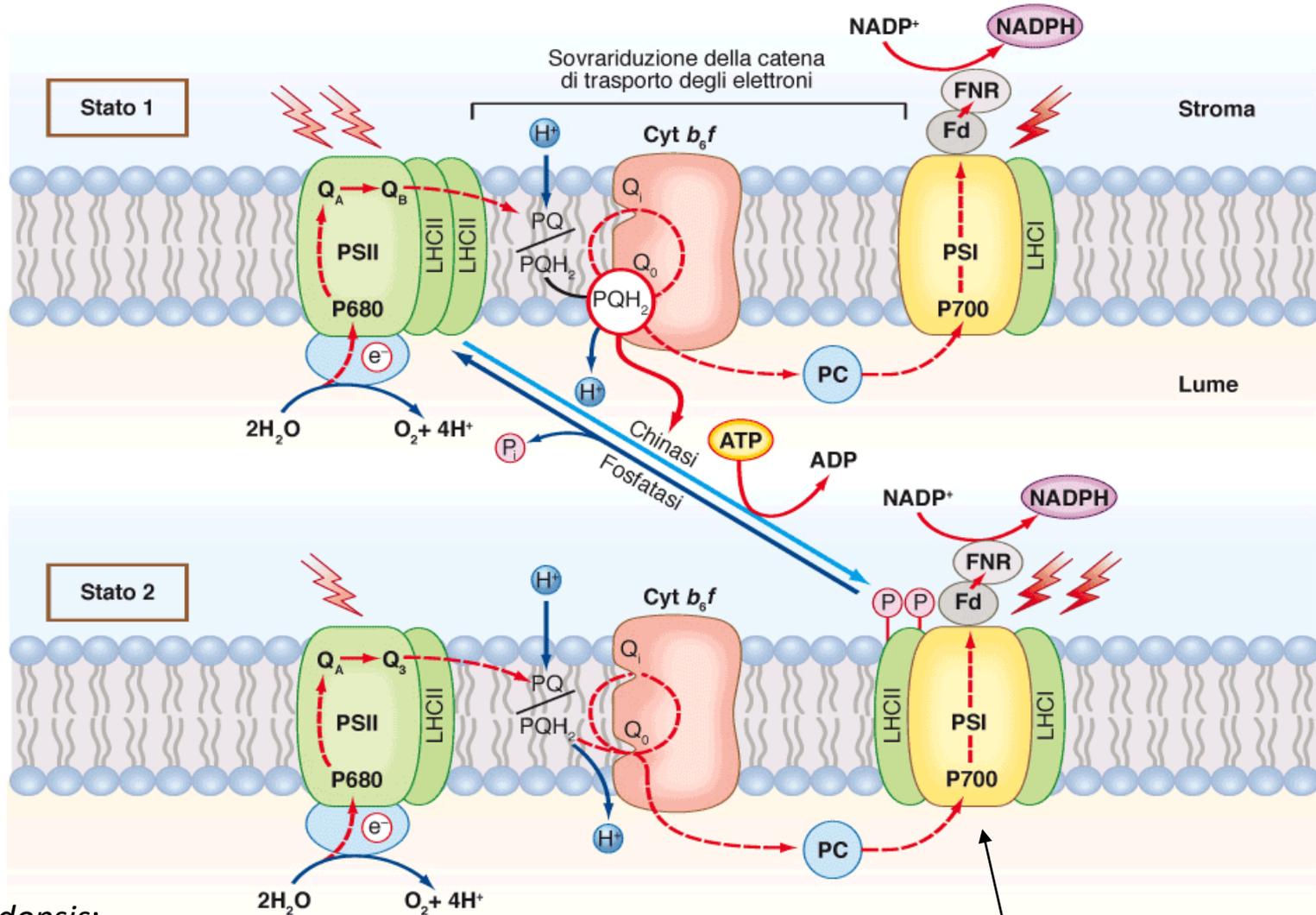


**Cambiamenti dello spettro dell'energia radiante («qualità» della luce):**

Portano a disequilibrio tra i due fotosistemi nell'energia assorbita

Esporrebbero il PSII al fotodanno (a causa della formazione di  $^1\text{O}_2$ )

Il mantenimento (ottimizzazione) dell'equilibrio nella distribuzione dell'energia tra i due fotosistemi avviene tramite **le transizioni di stato**

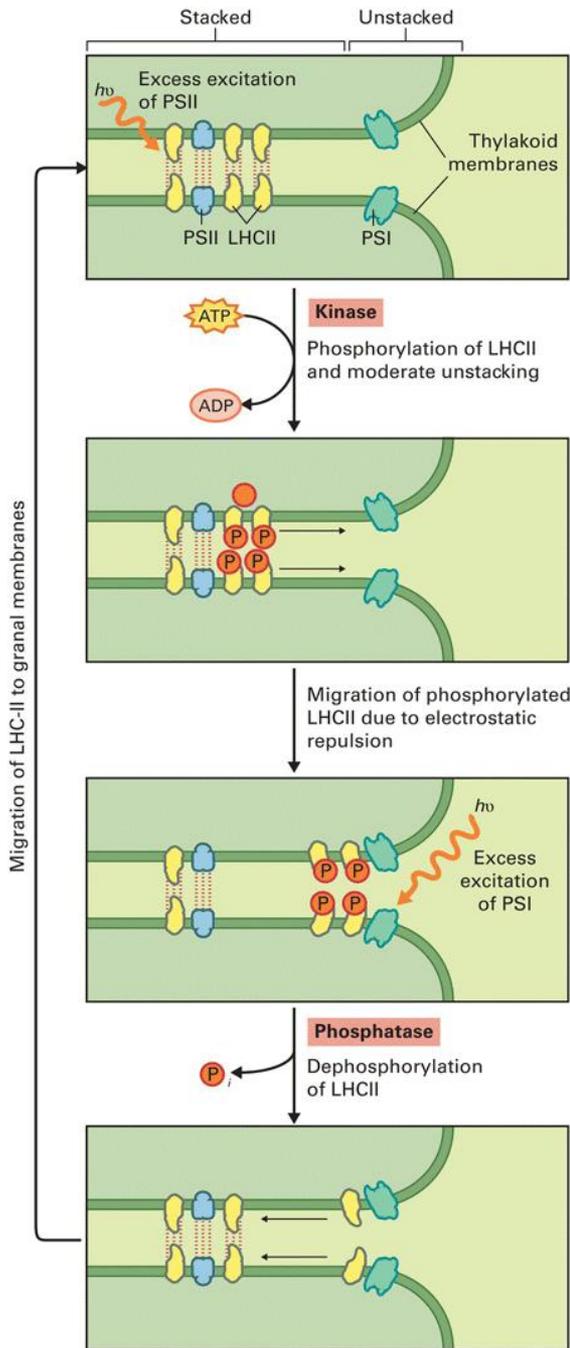


In *Arabidopsis*:

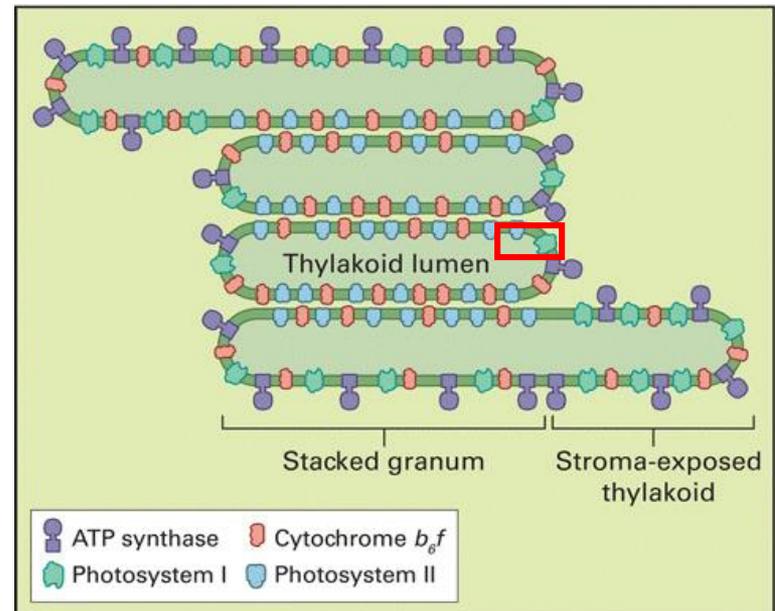
La proteina **chinasi** è **STN7**

La proteina **fosfatasi** è **TAP38**

Supercomplessi PSI-LHCI-LHCII



## Transizioni di stato rappresentazione spaziale



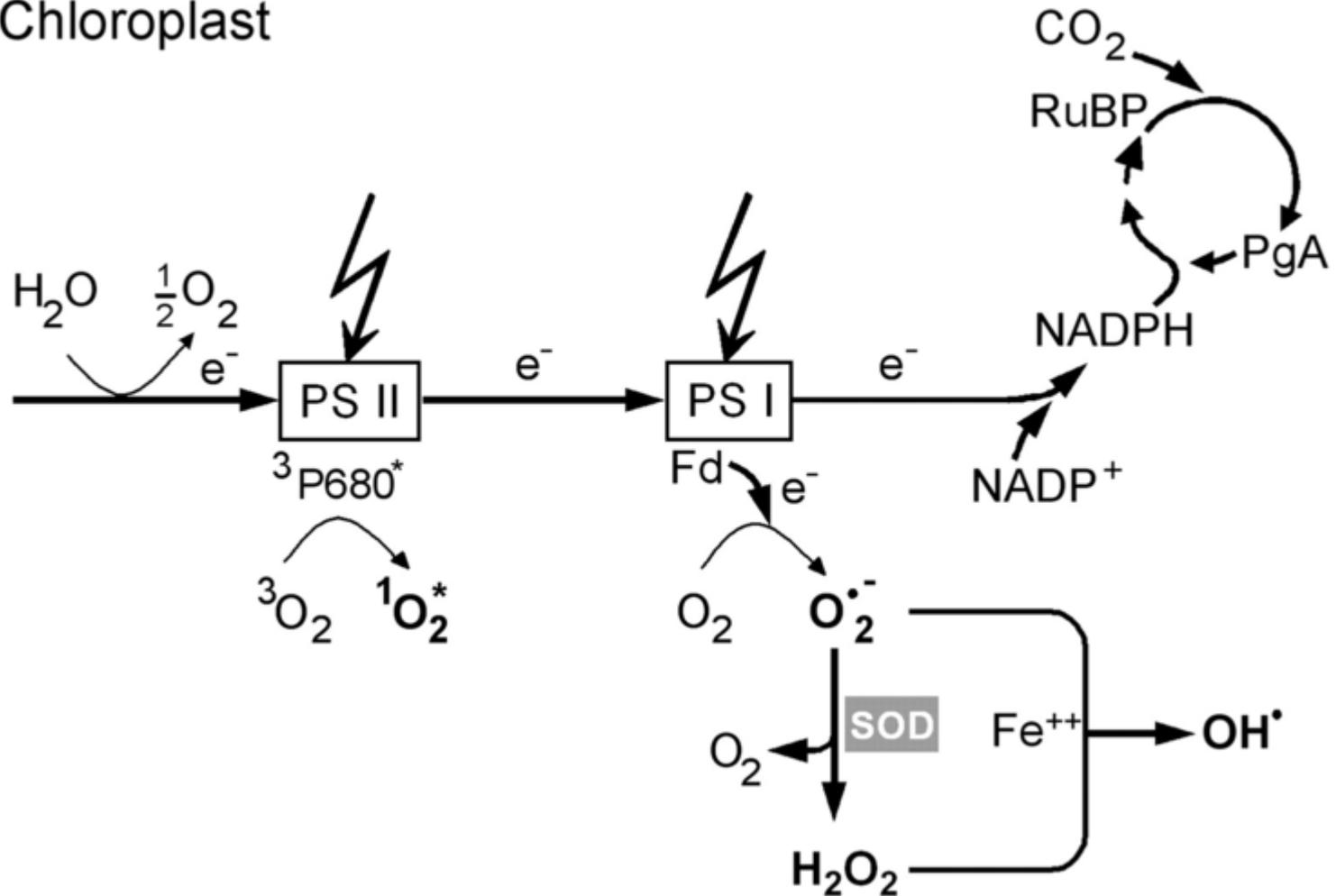
# **Meccanismi fotoprotettivi**

contro l'eccesso di energia radiante

- Contrasto formazione di  $^1\text{O}_2$  nel centro di reazione sovraeccitato
- Riduzione dell'assorbimento di radiazione luminosa
- Dissipazione dell'energia in eccesso

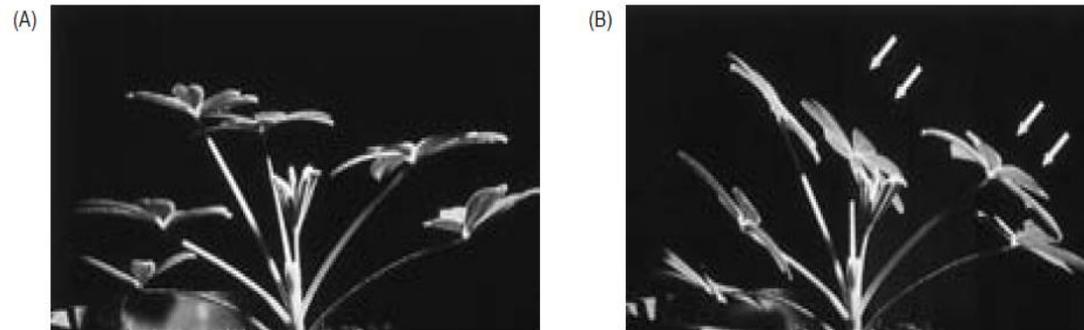
# FOTOINIBIZIONE

Chloroplast

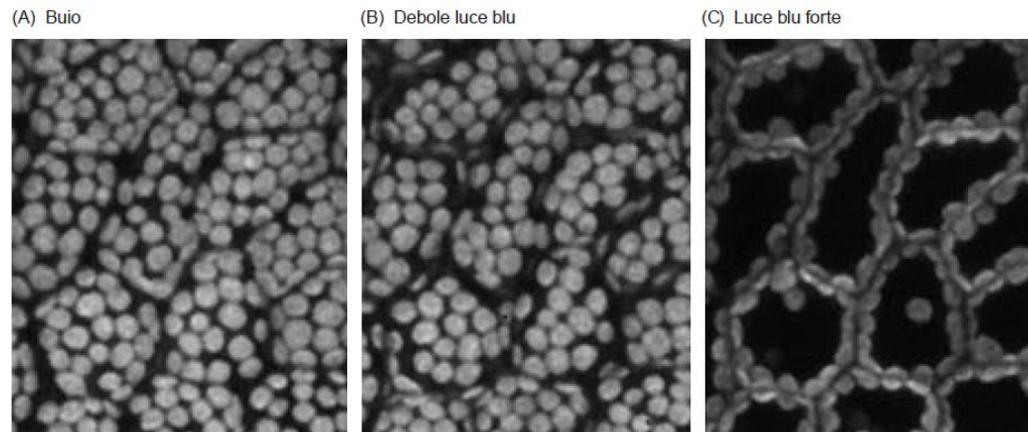


# MECCANISMI FOTOPROTETTIVI PER LA RIDUZIONE DELL'ASSORBIMENTO DELLA LUCE:

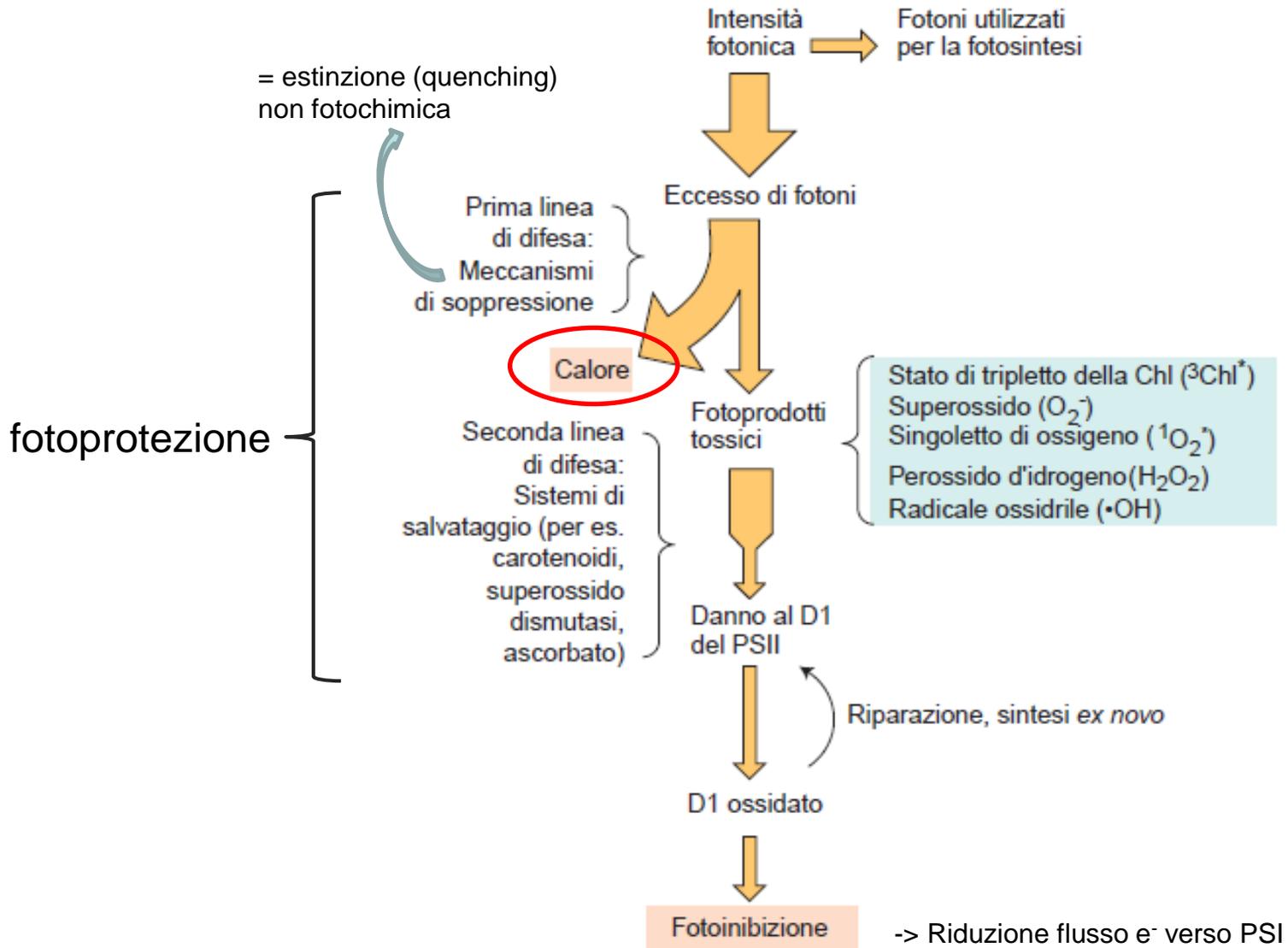
**MOVIMENTI FOGLIARI:** variazione dell'angolo di incidenza della luce



## MOVIMENTI DEI CLOROPLASTI



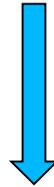
# Meccanismi di protezione dal e riparazione del danno da eccesso di fotoni



Regola il trasferimento di energia di  
eccitazione al centro di reazione

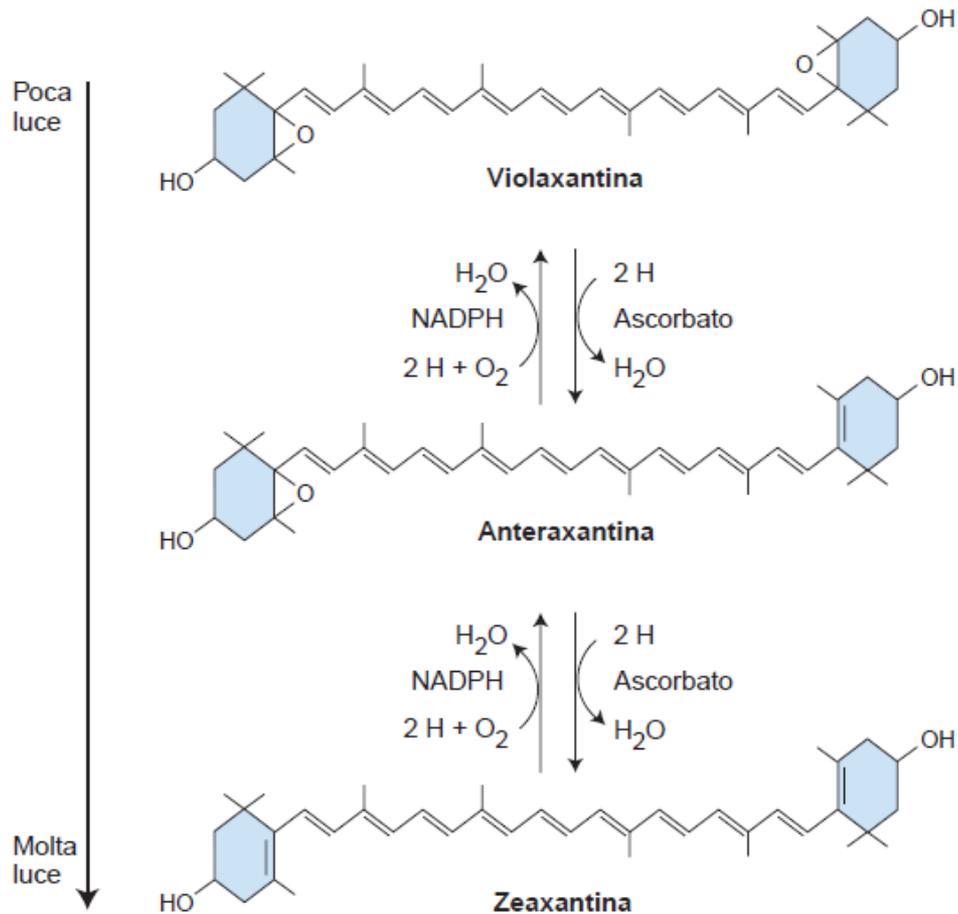
(NPQ = Non-Photochemical Quenching)

**Estinzione non fotochimica:** conversione di energia in eccesso  
in calore



**Ciclo delle xantofille**

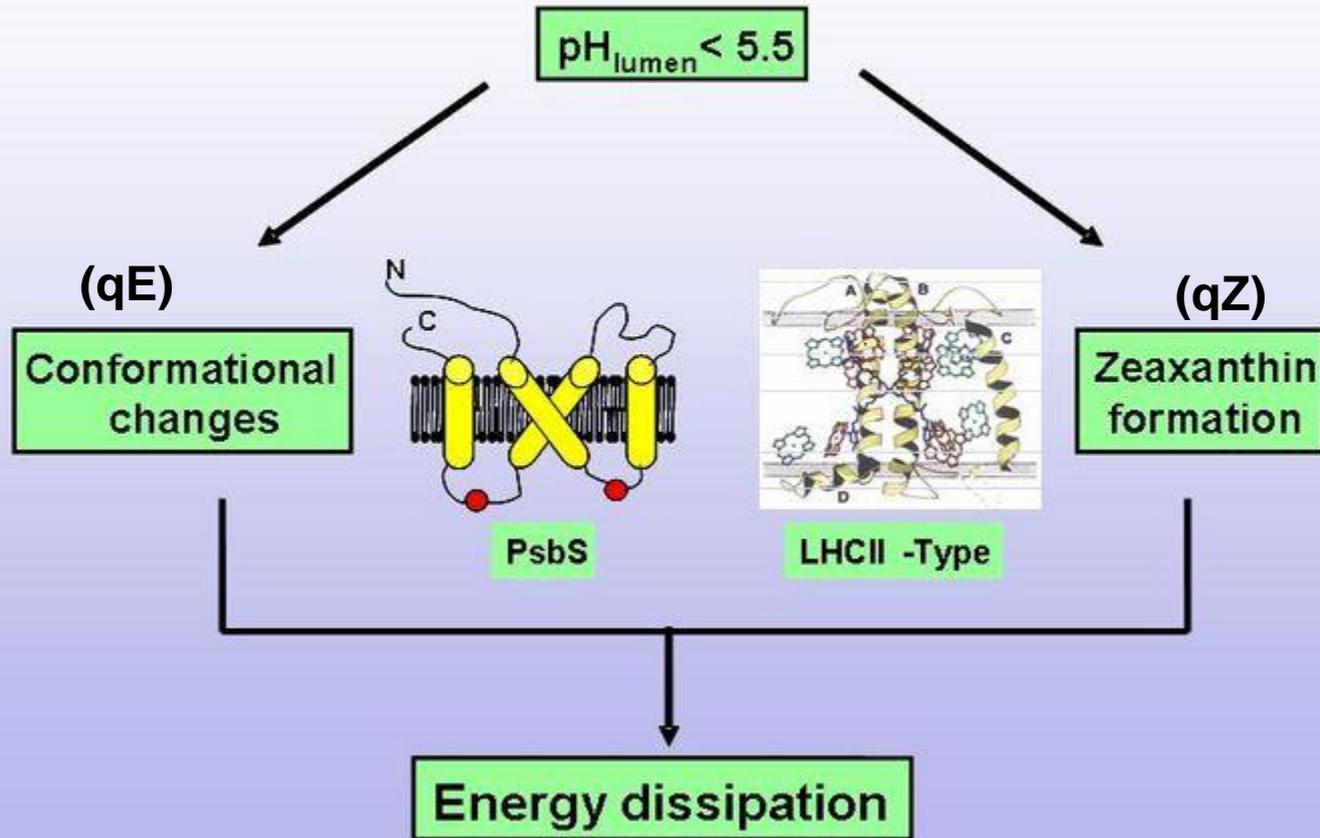
# Ciclo delle xantofille

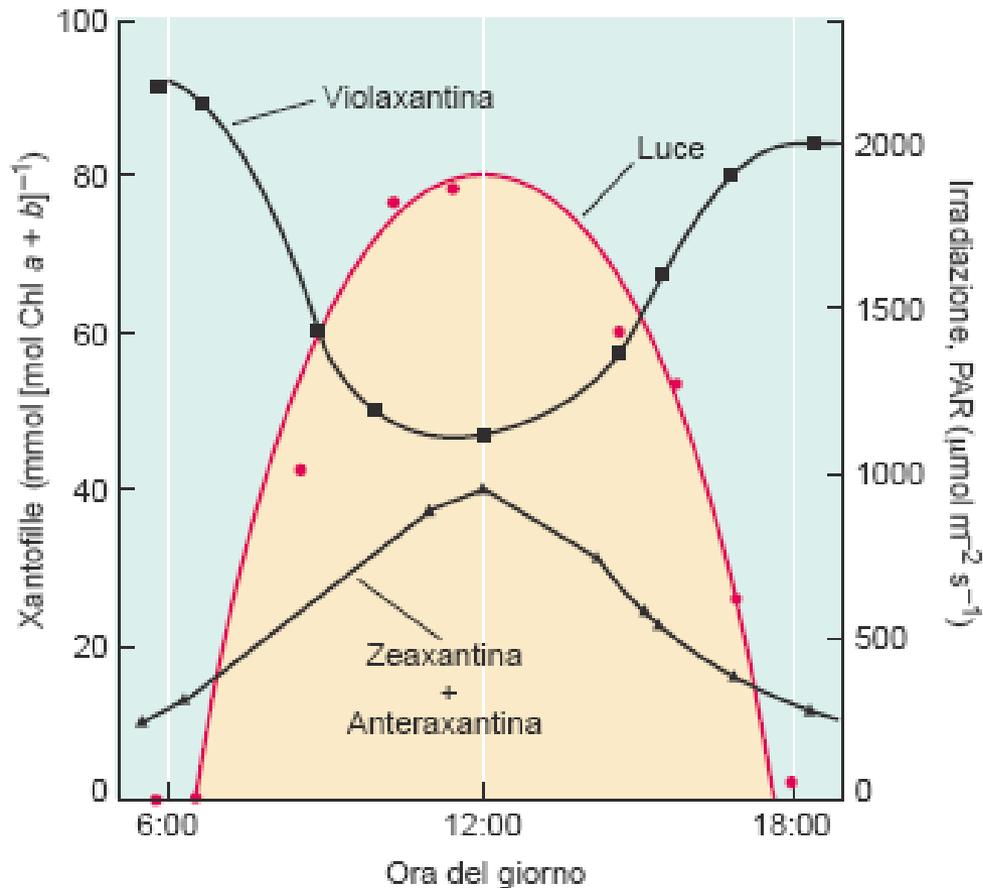


Reazioni di de-epossidazione

L'elevato stato di **estinzione del PSII** è associato alla zeaxantina

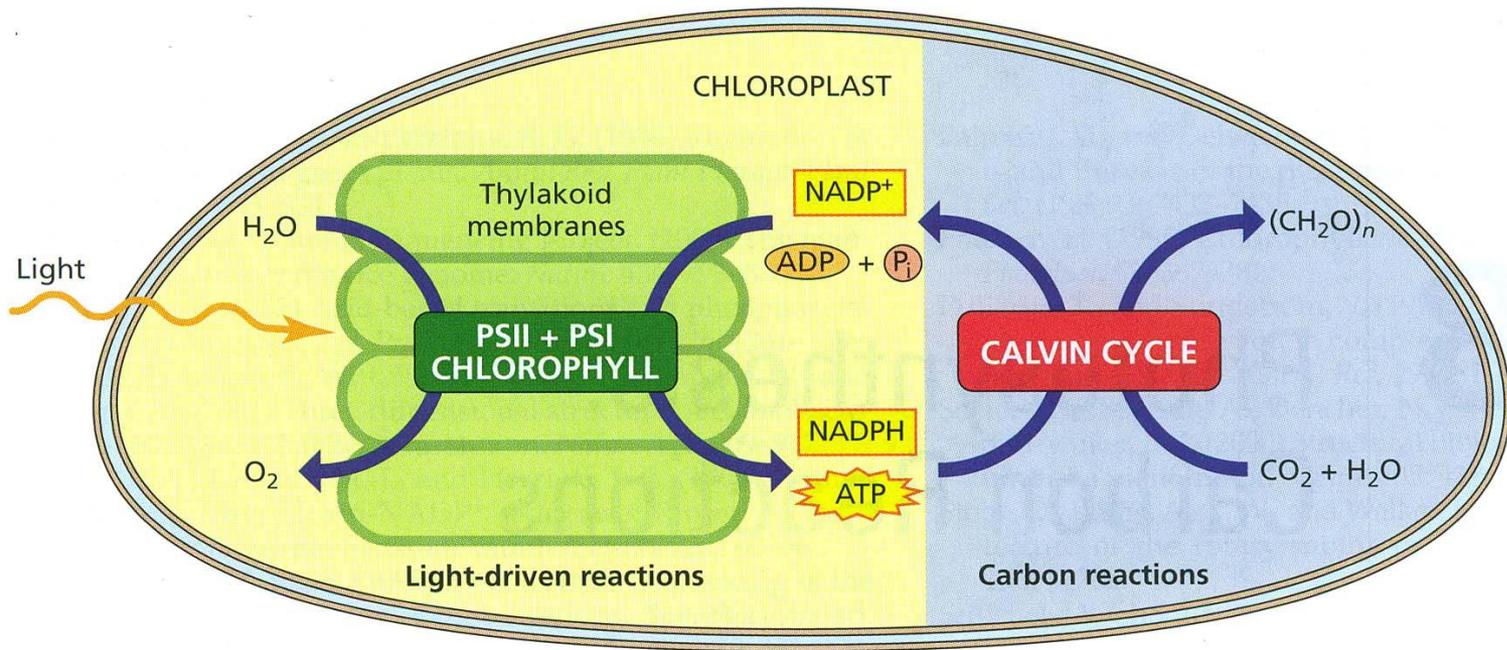
# The pH-regulated mechanism of energy dissipation





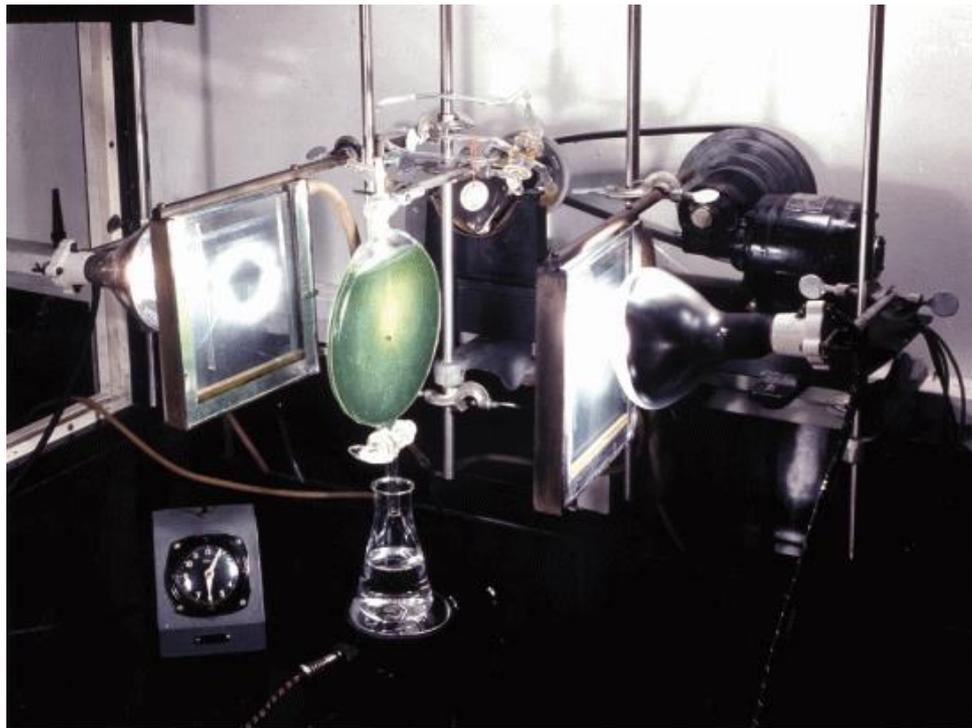
**Figura 9.13** Variazioni giornaliere nel girasole (*Helianthus annuus*) nella composizione delle xantofille come risposta a cambiamenti di luce. Come aumenta la quantità di luce che cade su una foglia, una proporzione crescente di violaxantina è convertita ad antheraxantina e zeaxantina, dissipando quindi l'eccesso di energia di eccitazione e proteggendo l'apparato fotosintetico. (Da Demmig-Adams e Adams 1996).

# LE REAZIONI DI FISSAZIONE DEL CARBONIO

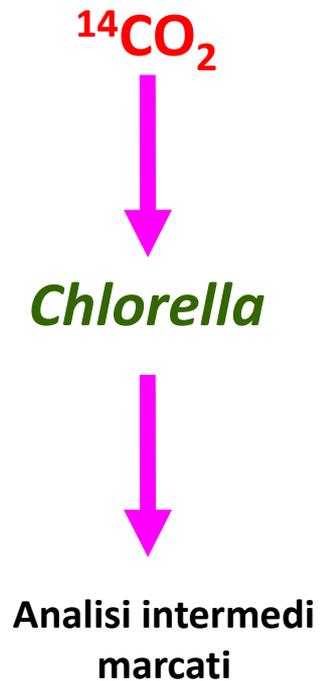


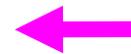
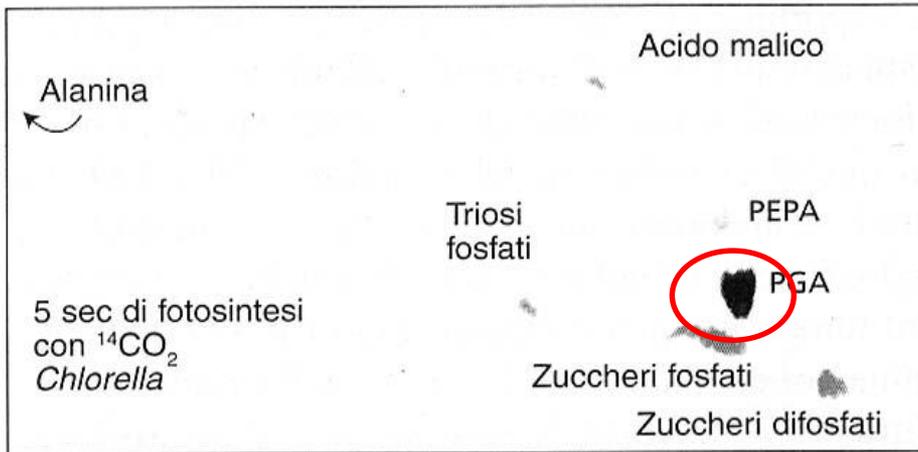
# CICLO DI CALVIN-BENSON

Ciclo riduttivo dei pentosi fosfati, RPP  
Riduzione fotosintetica del carbonio, PCR

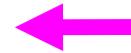
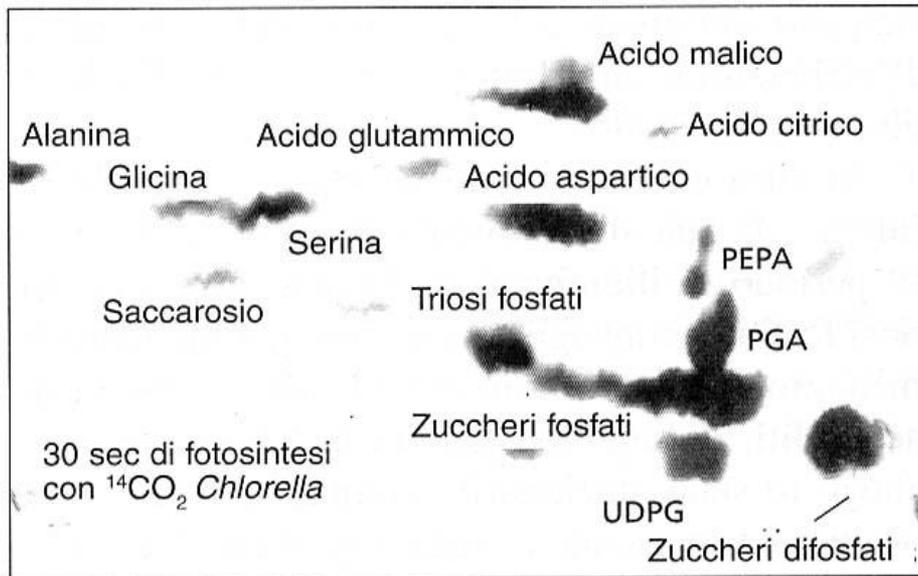


Nobel 1961





dopo 5 s



dopo 30 s

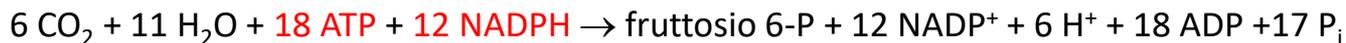
## Stechiometria generale



**Il ciclo di Calvin consuma 3 ATP e 2 NADPH per ogni molecola di CO<sub>2</sub> fissata**

# Efficienza del Ciclo di Calvin

- La completa ossidazione di 1 mole di fruttosio libera **2804 kJ**, che è quindi la minima energia richiesta per la sua sintesi



- La sintesi di 1 mole di fruttosio-6-fosfato da 6 moli di  $\text{CO}_2$  consuma 12 moli di NADPH e 18 moli di ATP, pari a **3126 kJ**

Dunque, l'efficienza termodinamica del Ciclo di Calvin è:

$$(2804/3126) \times 100 = \mathbf{89.7\%}$$

E l'efficienza della fotosintesi in rapporto al contenuto energetico della luce?

- Necessarie **8 moli di fotoni di luce rossa** per **ogni mole di CO<sub>2</sub> fissata**. **Una mole** di fotoni di luce rossa ha un'energia di **175 kJ**

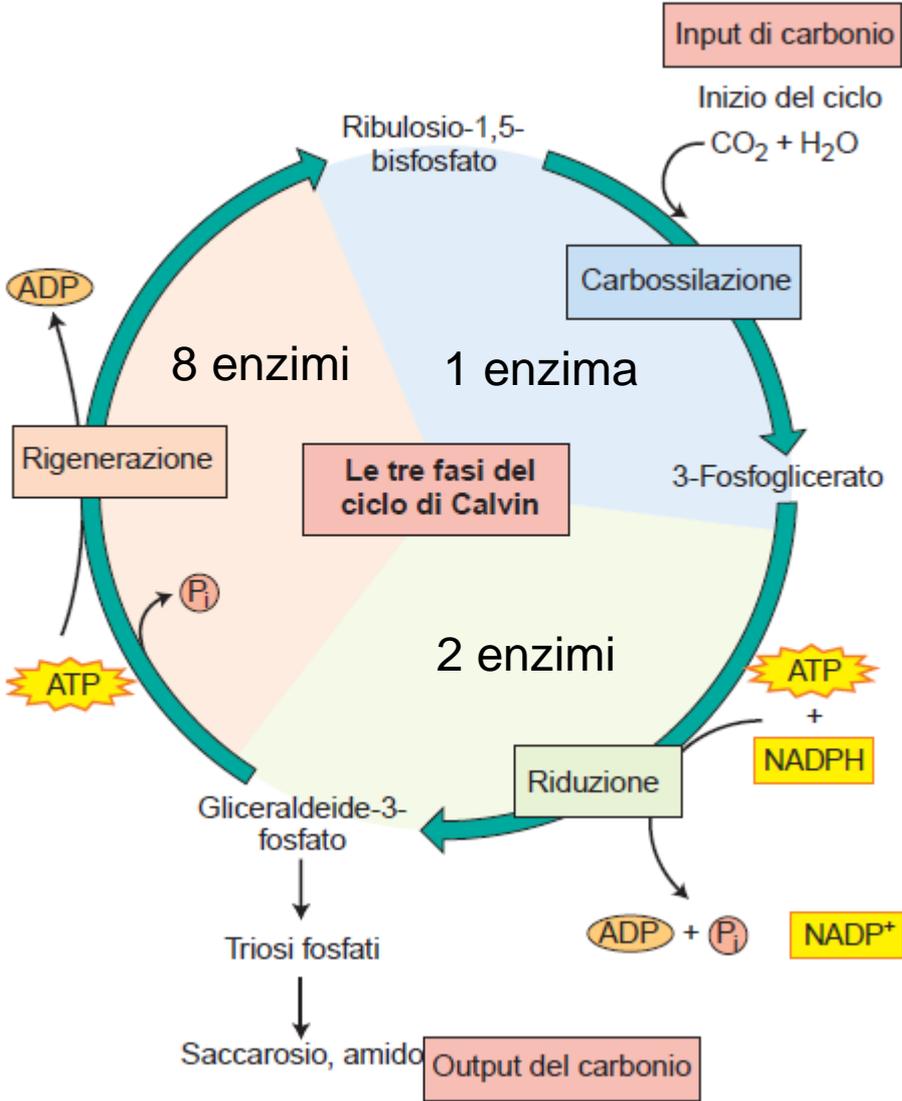
- Quindi, per fissare **6 moli di CO<sub>2</sub>**, servono  $6 \times 8 \times 175 = 8400$  kJ

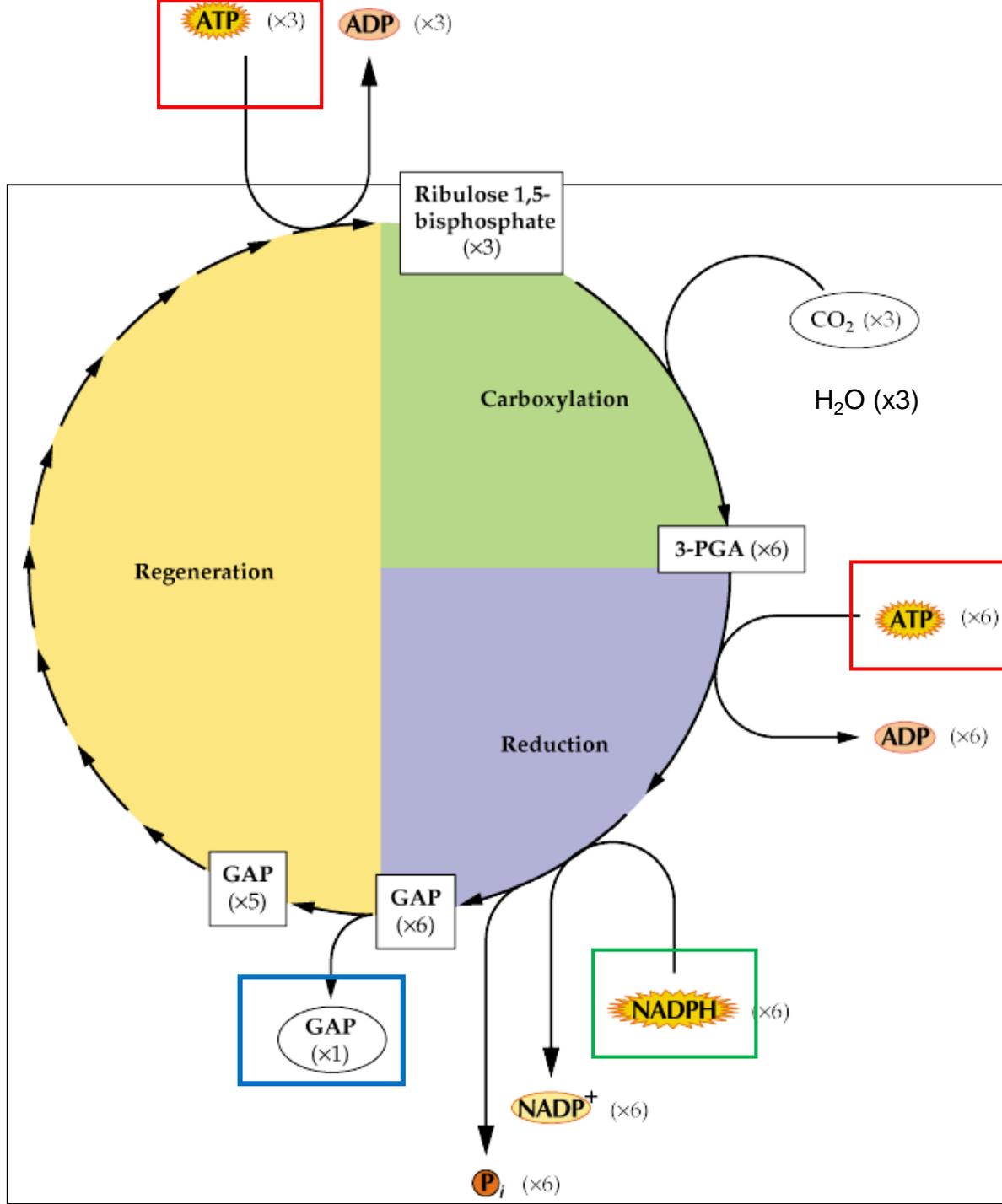
- Dunque, **l'efficienza teorica** è pari a  $(2804/8400) \times 100 = 33.8\%$

-> Gran parte dell'energia della luce viene 'sprecata' durante la fase tilacoidale della fotosintesi, per la generazione di ATP e NADPH

**L'efficienza reale** (in termini di conversione in biomassa) è ancora più bassa di quella teorica e si aggira tra **0.2 e 2%**

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





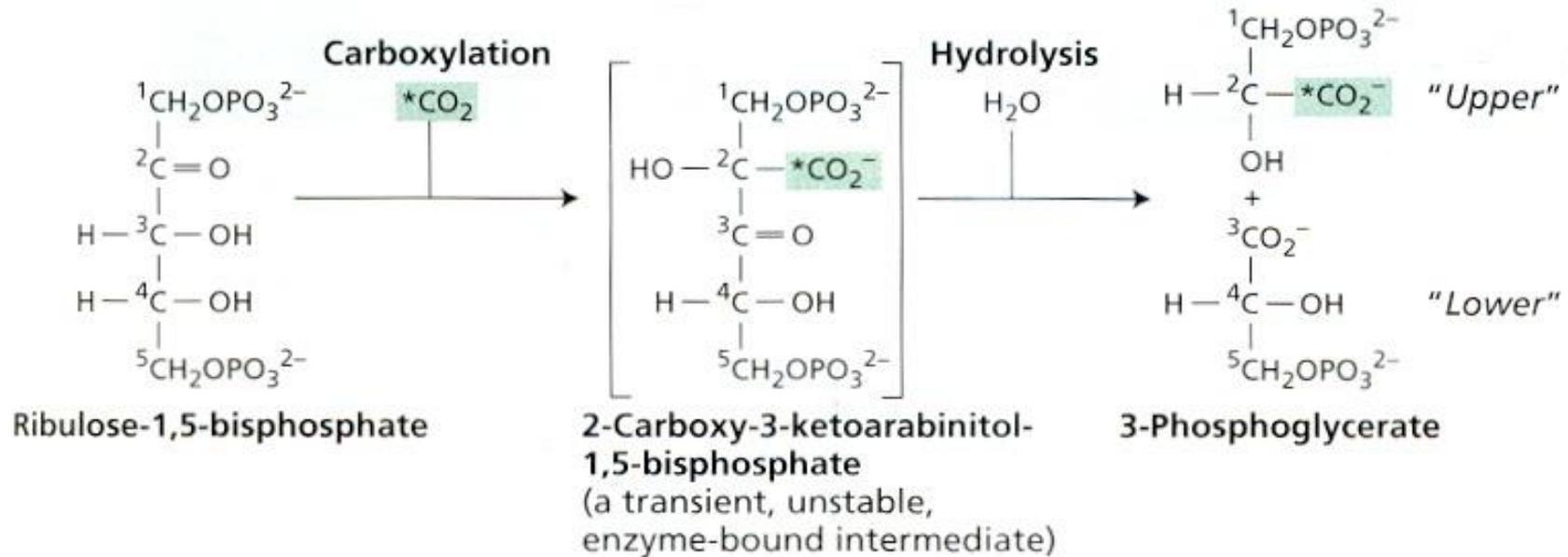
Per un guadagno netto di **1 GAP** (gliceraldeide-3-P):

3 CO<sub>2</sub> fissati

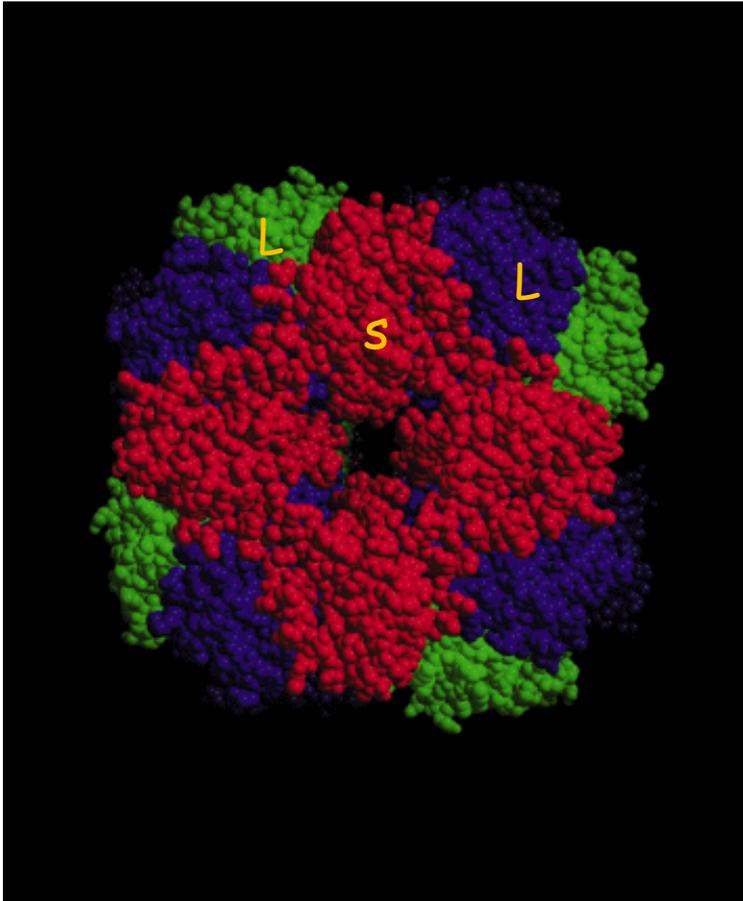
9 (6+3) ATP

6 NADPH

## La reazione di carbossilazione



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



Enzima multimerico:  $L_8S_8$

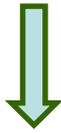
560 kDa

8 subunità grandi (55 kDa)

8 subunità piccole (14 kDa)

In alcuni batteri fotosintetici =  $L_2$

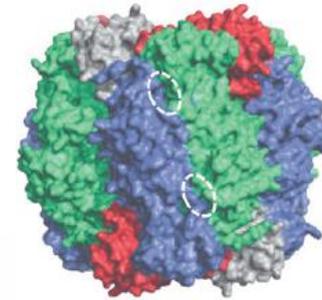
Luce



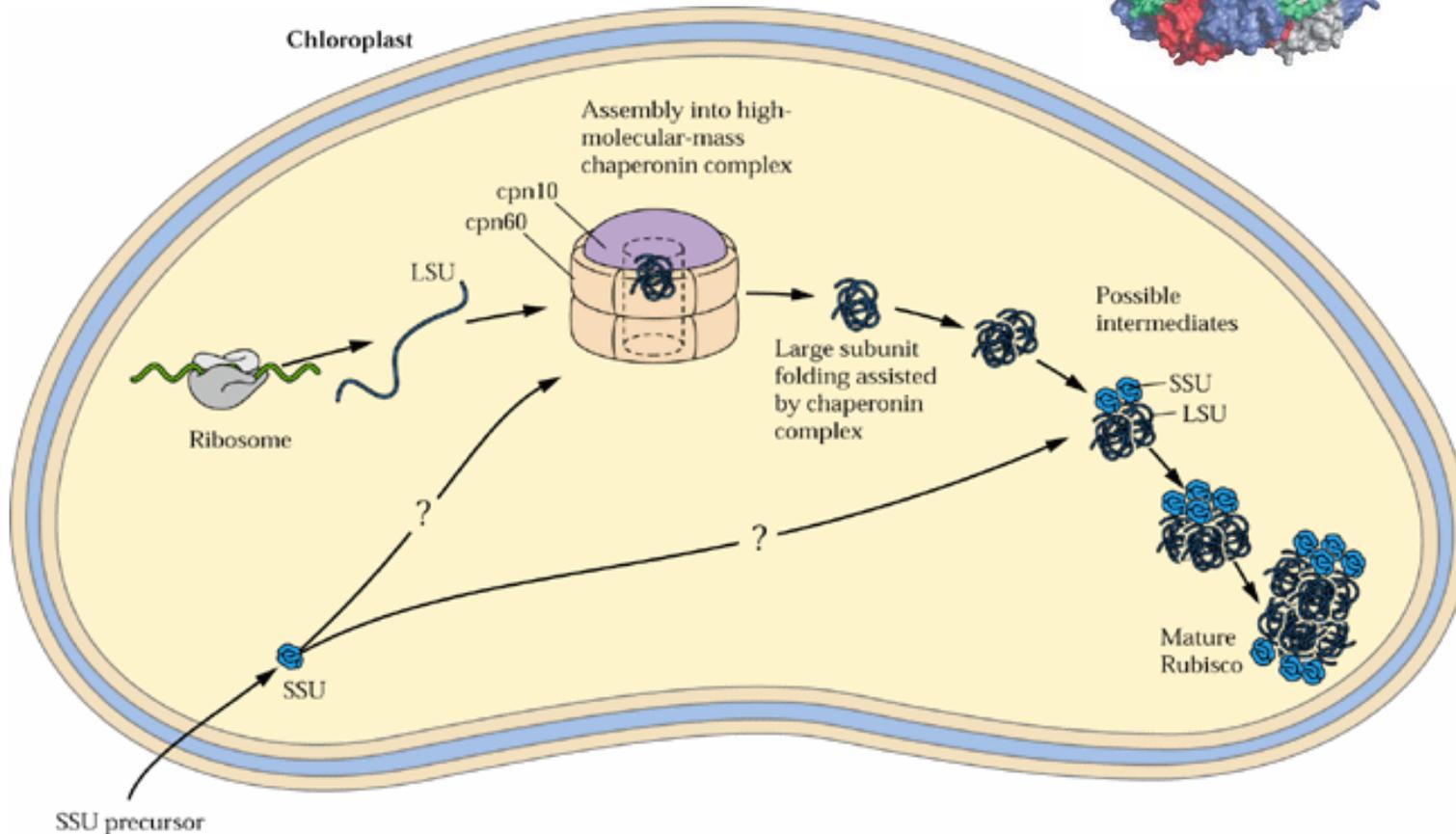
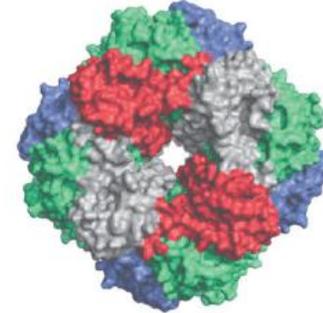
Genoma nucleo → rbcS (precursore subunità piccola)

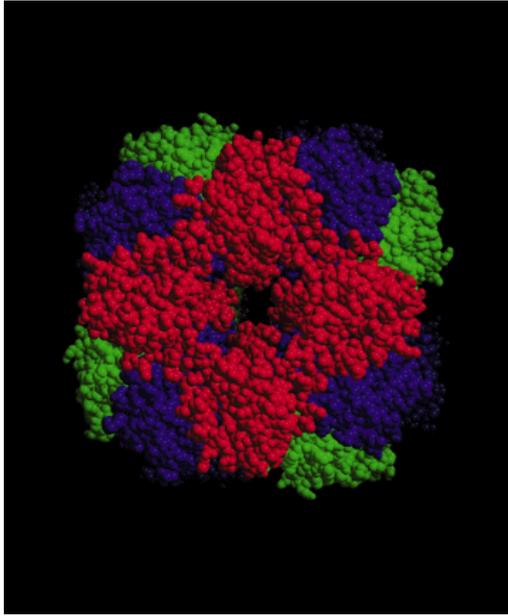
Genoma cloroplasto → rbcL (subunità grande)

Vista laterale



Vista dall'alto





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 (~12  $\mu\text{M}$ )

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

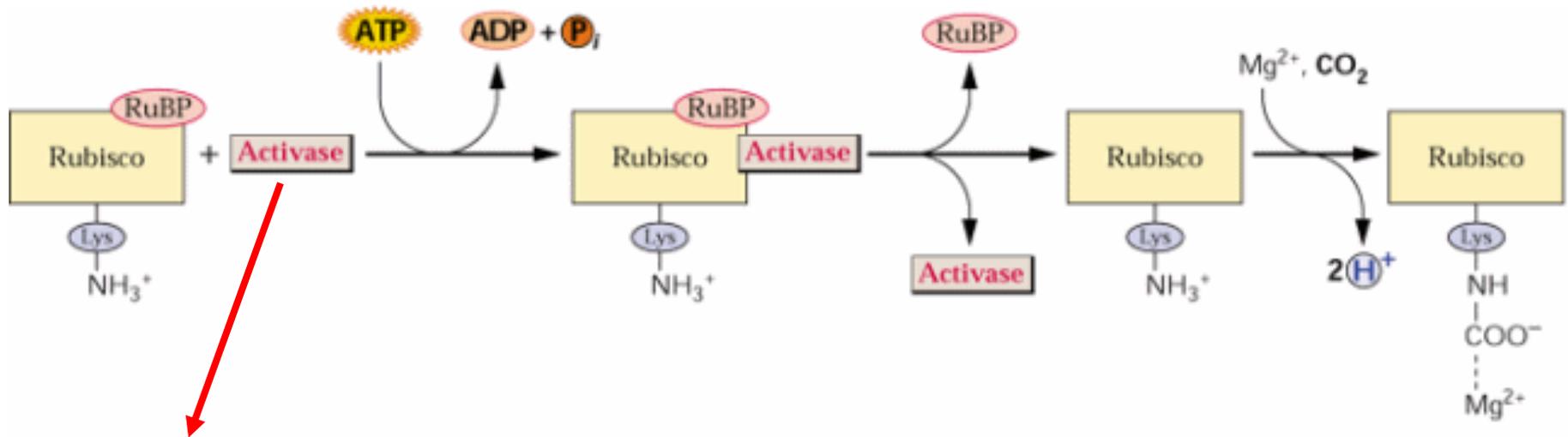
La Rubisco è un enzima poco efficiente dal punto di vista catalitico:

- poco selettiva nei confronti del substrato

- è molto lenta: carbossila solo 3  $\text{CO}_2$  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

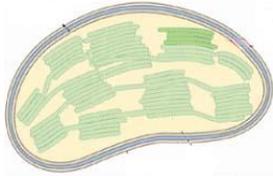
Da 14 a 16 polipeptidi si associano alla Rubisco → idrolisi ATP e induzione di modificazioni conformazionali che portano al rilascio degli zuccheri fosfati → carbammilazione → enzima attivo

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

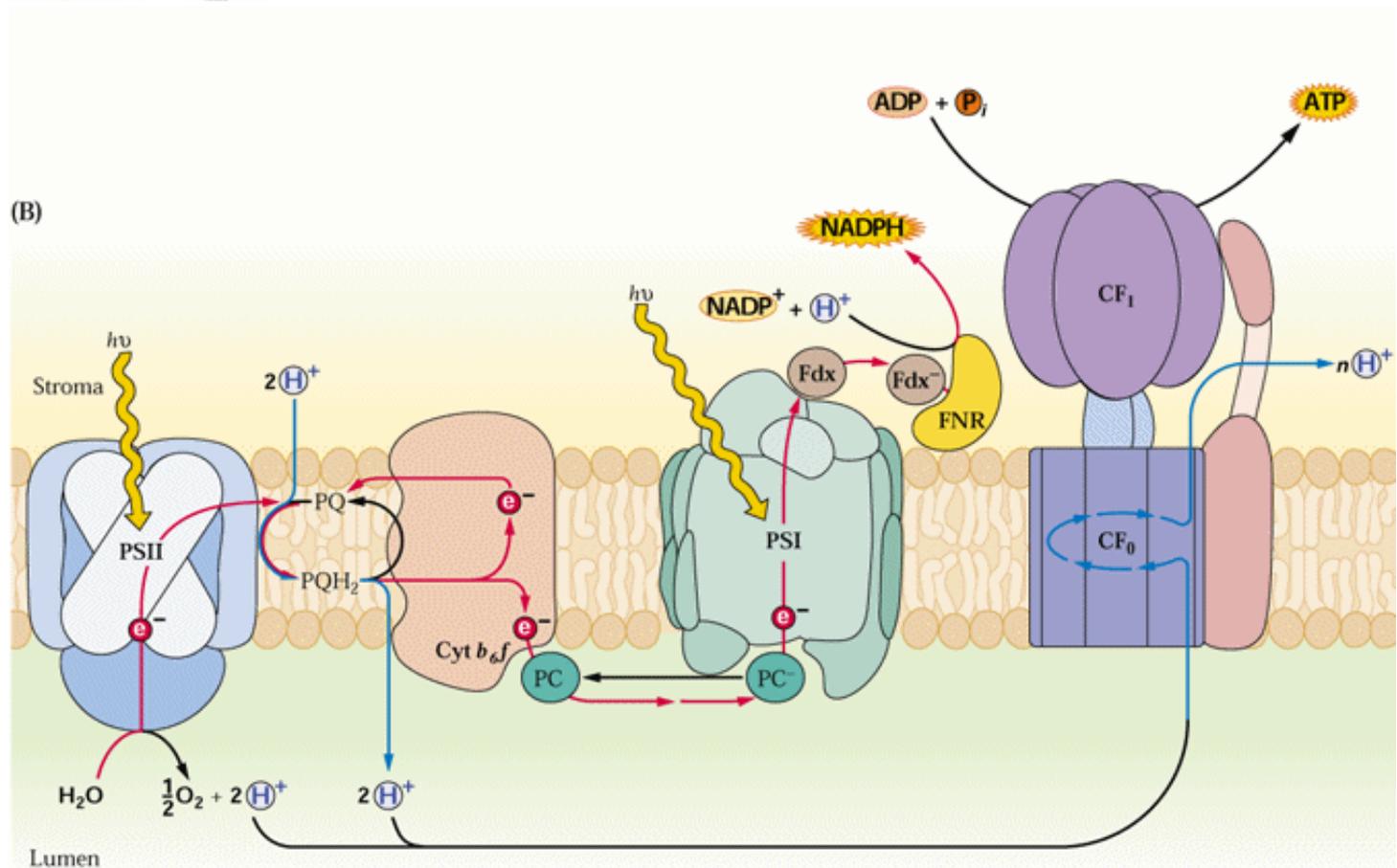
A seguito dell'azione della Rubisco attivasi, una molecola di CO<sub>2</sub> reagisce con la Lys 201 nel sito attivo, con la formazione di un gruppo carbammile che viene stabilizzato dal legame con Mg<sup>2+</sup>

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

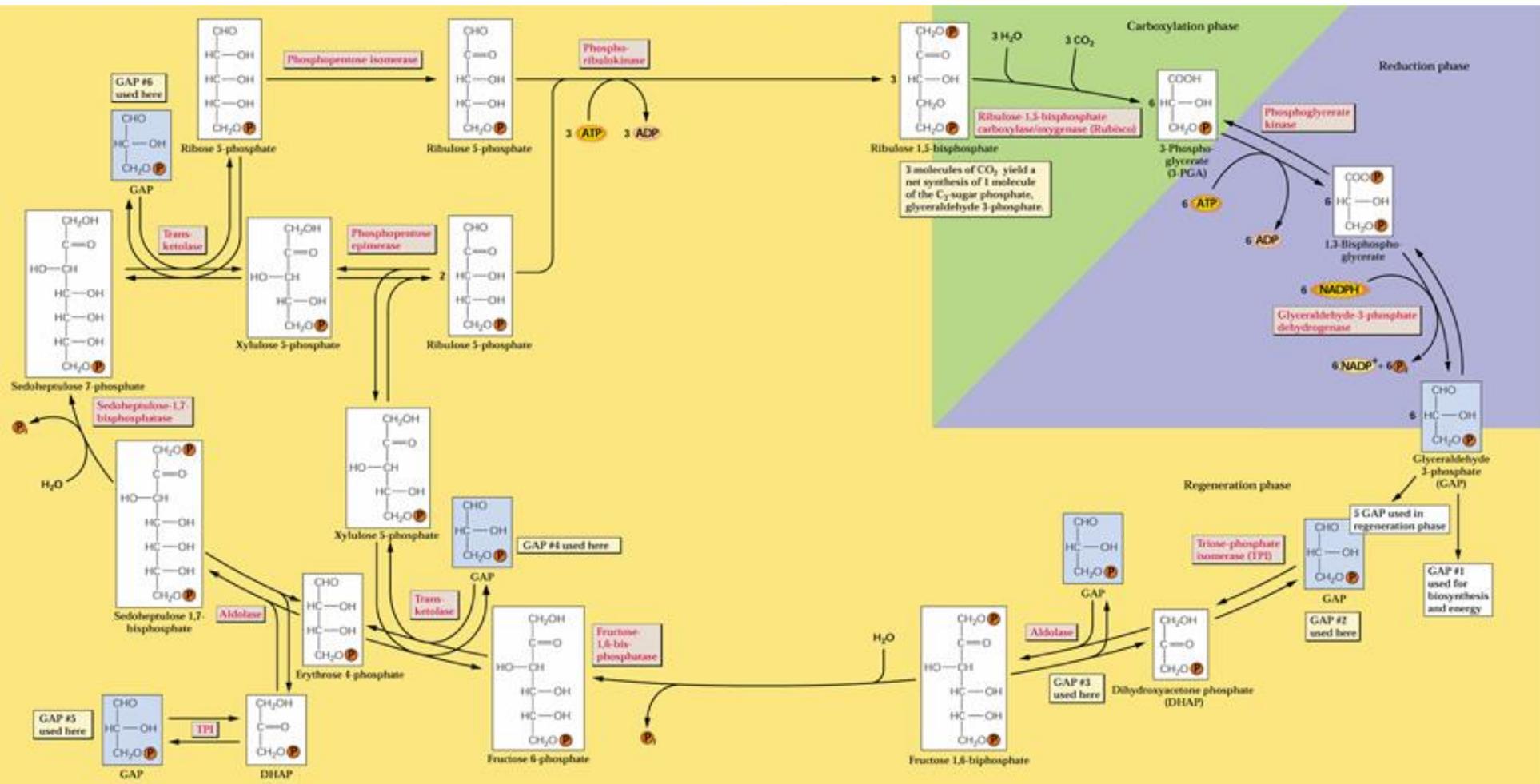
Decarbammilazione spontanea ad elevate T



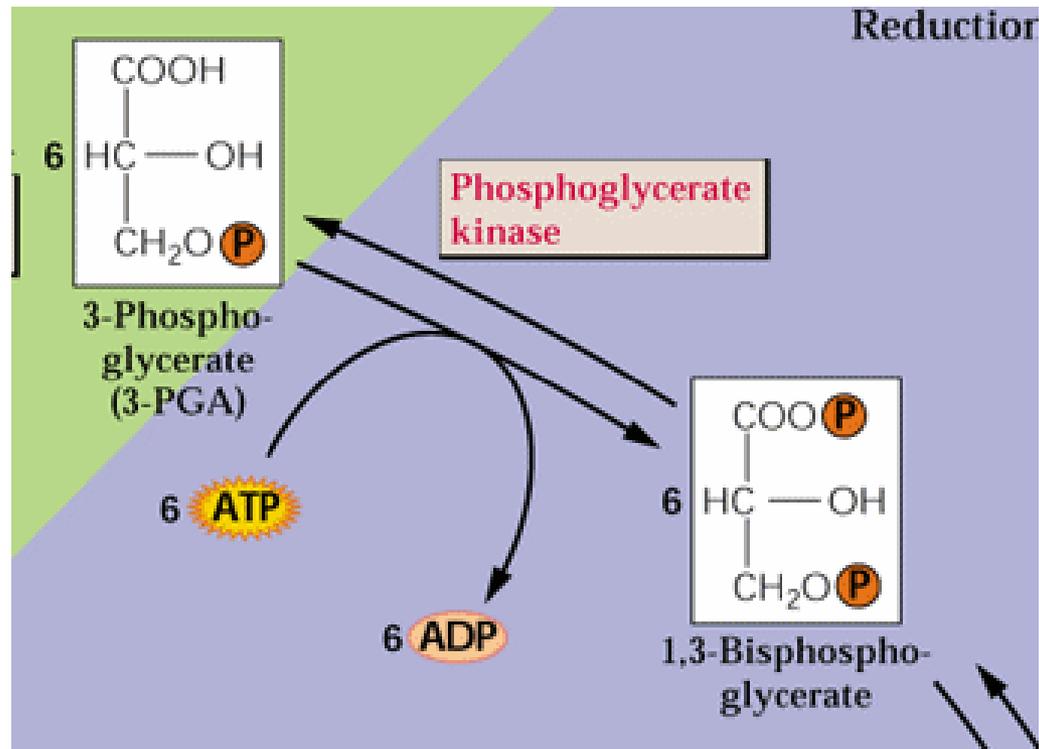
pH 7  $\rightarrow$  8  
[Mg<sup>2+</sup>] 1-3 mM  $\rightarrow$  3-6 mM



# Le reazioni del ciclo di Calvin



## RIDUZIONE

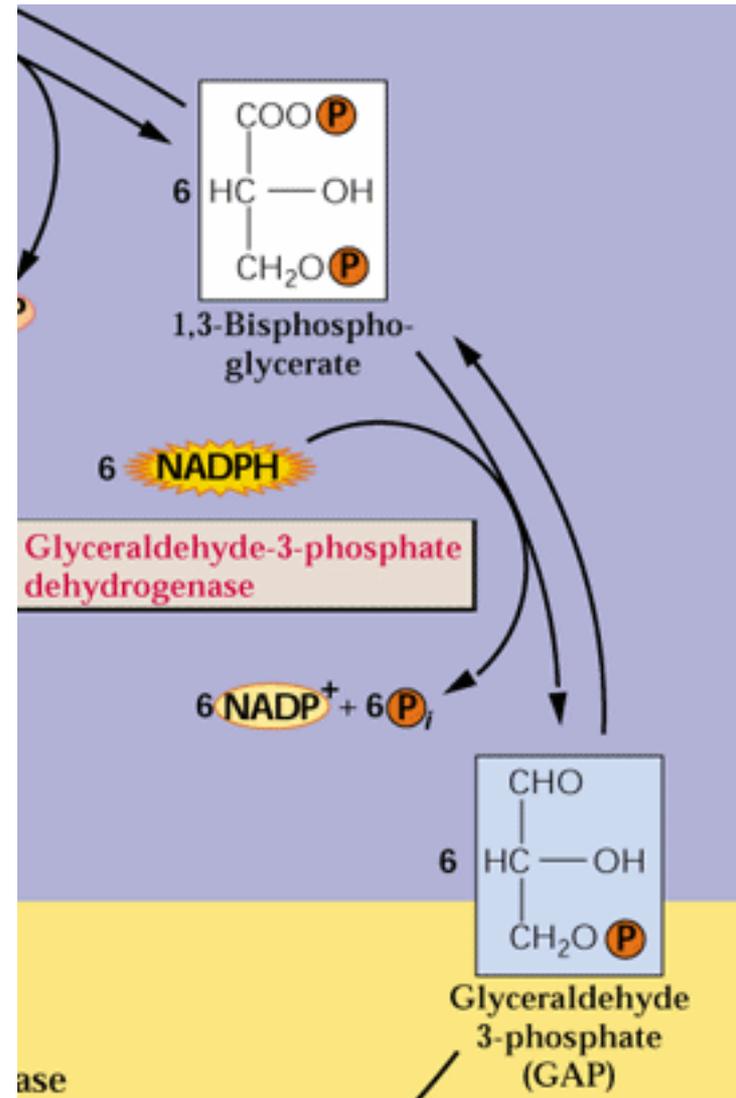


La **fosfoglicerato chinasi** fosforila il 3-fosfoglicerato consumando ATP  
Produzione di 1,3-bifosfoglicerato

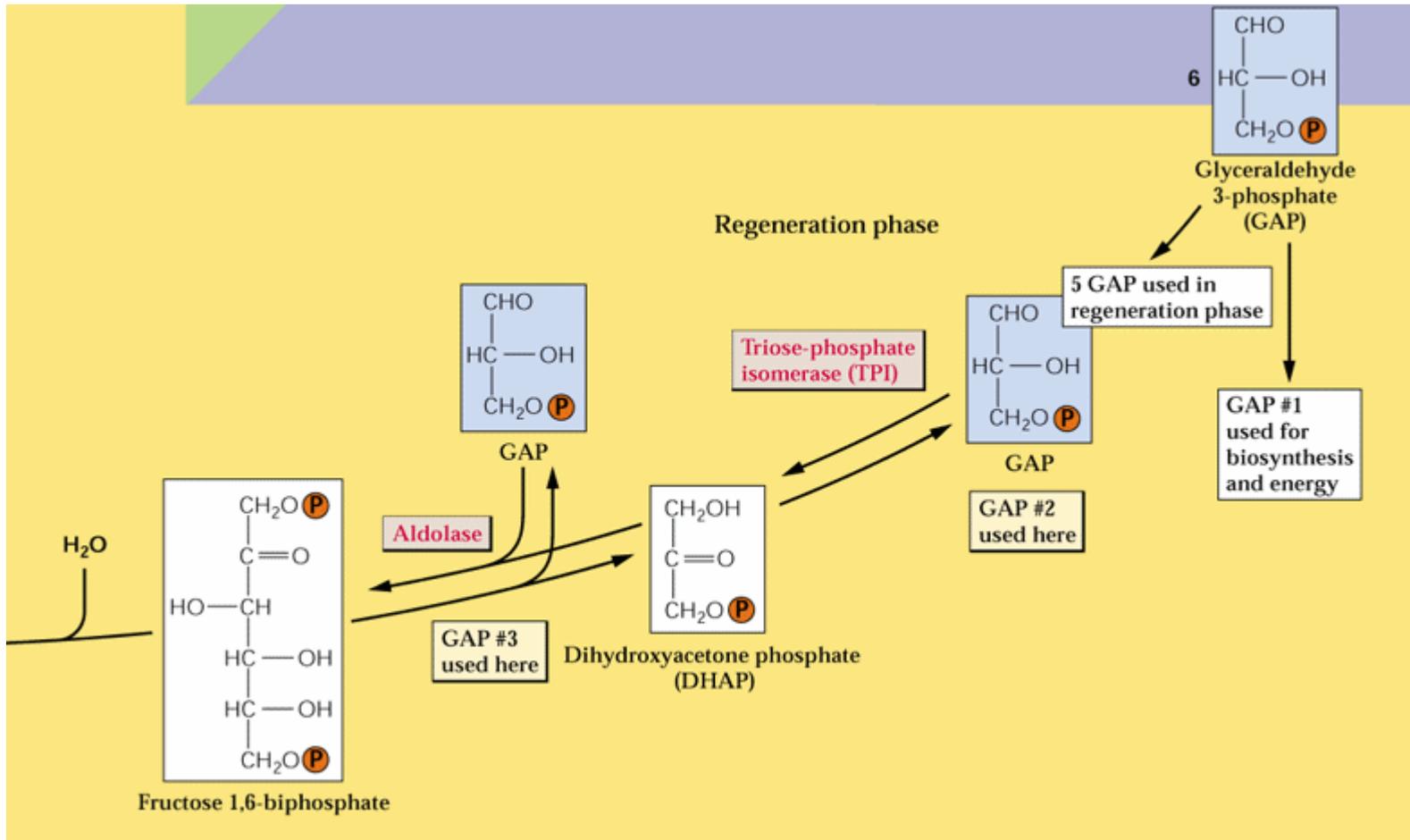
# RIDUZIONE

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

Produzione di gliceraldeide 3-fosfato

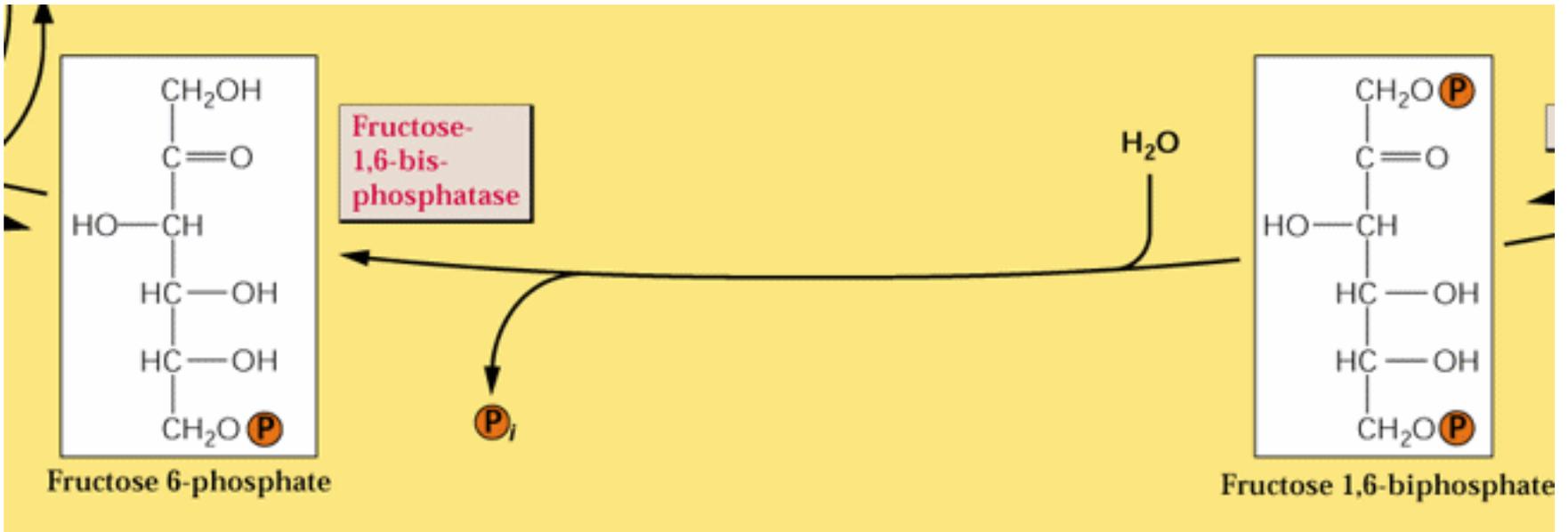


# RIGENERAZIONE



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

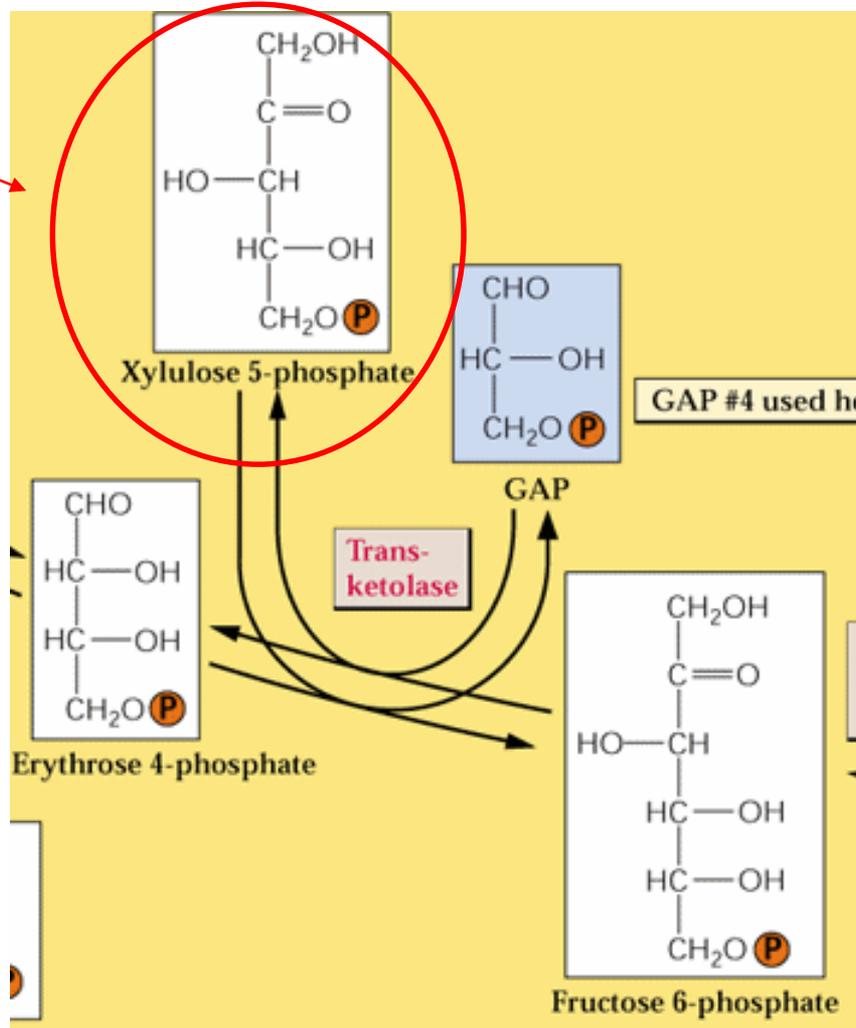
## RIGENERAZIONE



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

## RIGENERAZIONE

1° pentoso

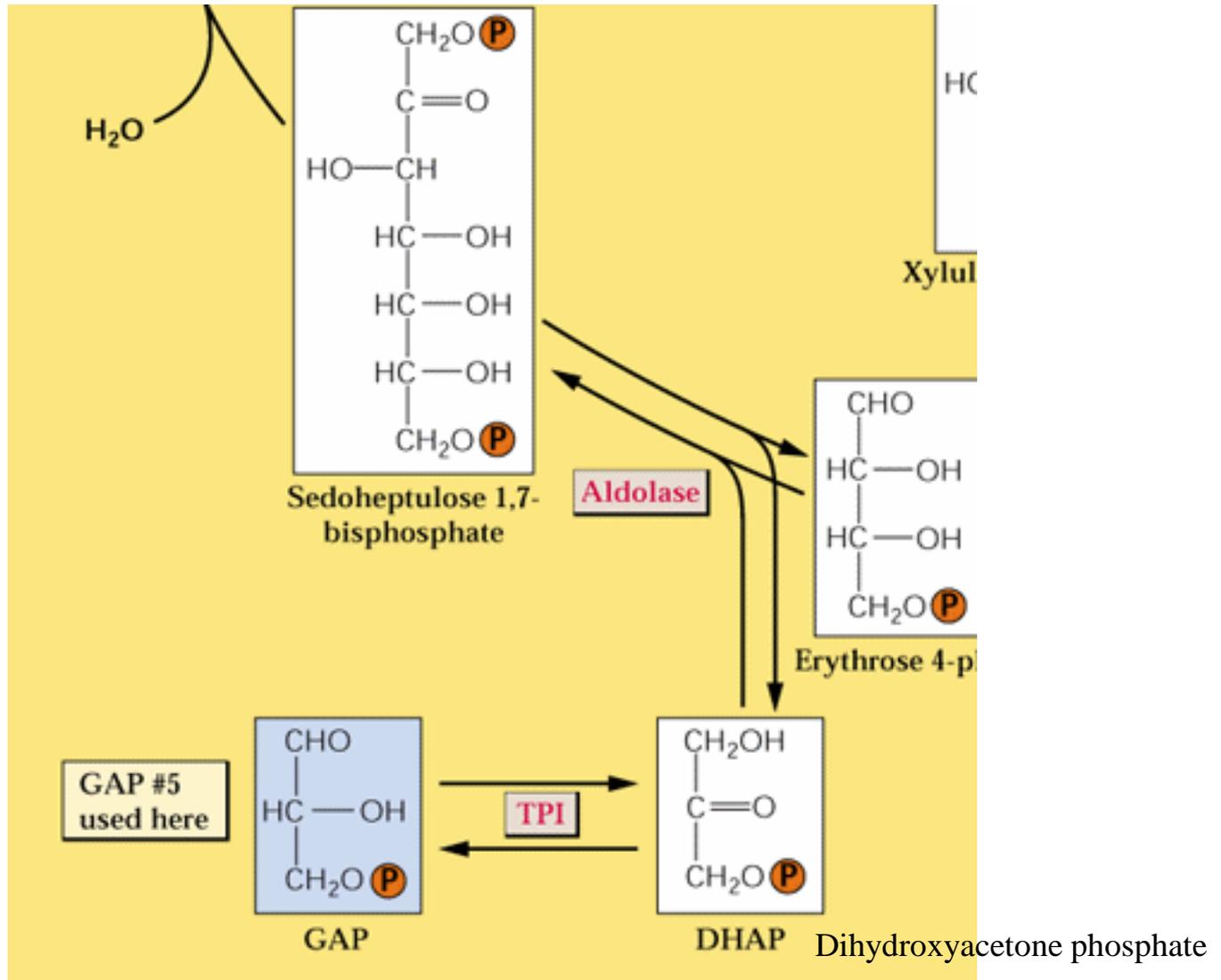


Il fruttosio 6-fosfato e un'altra molecola di gliceraldeide 3-P si combinano:

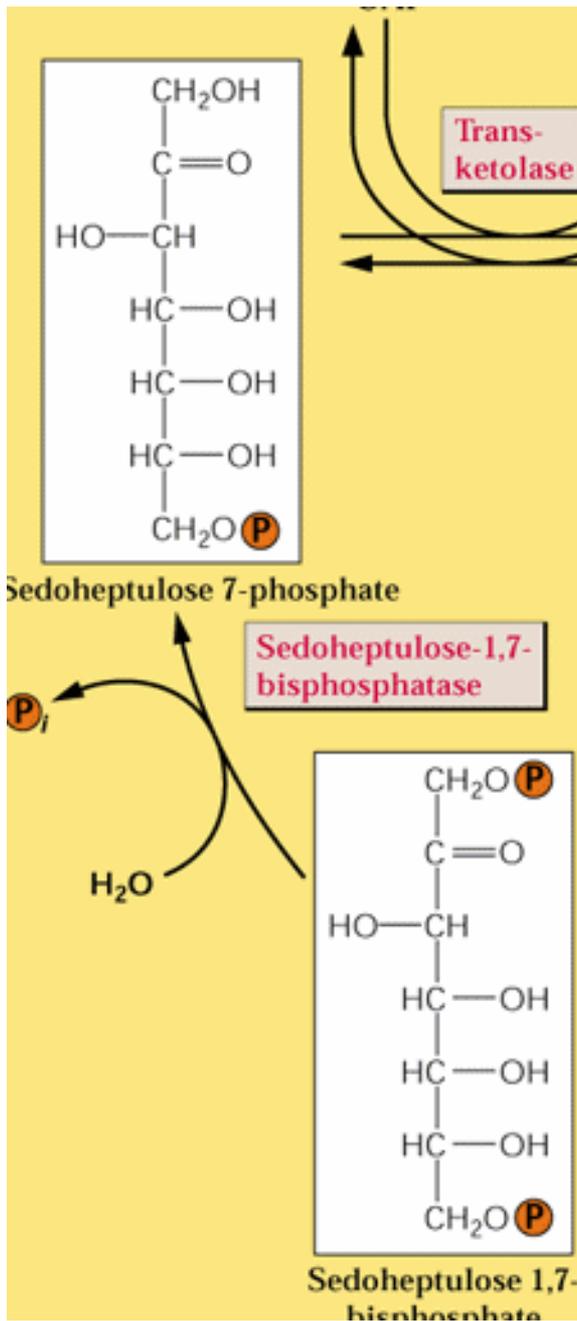
reazione catalizzata dalla **transchetolasi**

Produzione di Eritrosio 4-fosfato e xilulosio 5-fosfato

# RIGENERAZIONE



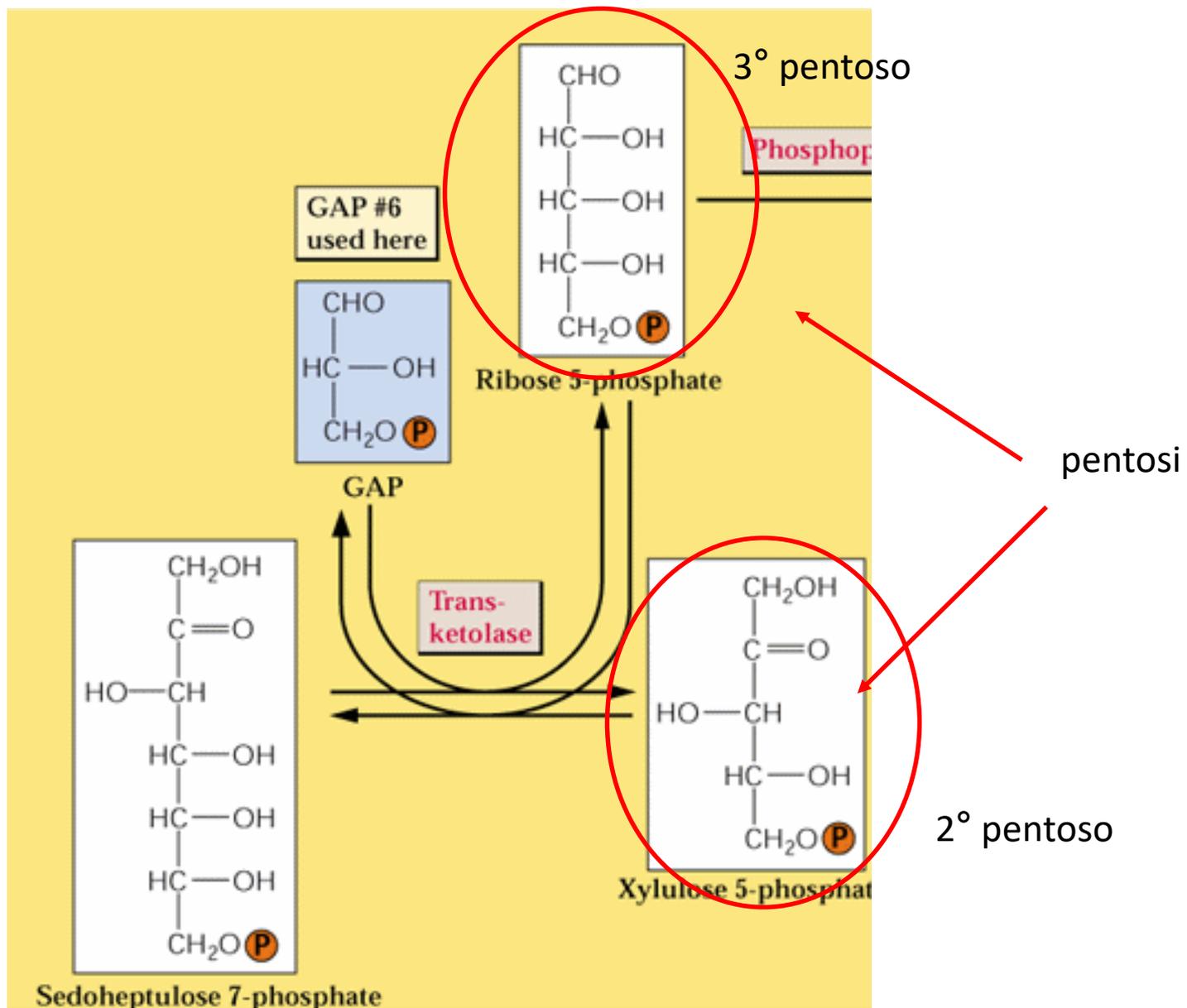
Condensazione aldolica tra eritrosio 4-P e un'altra molecola di gliceraldeide3-P: **aldolasi**.  
Produzione di sedoheptulosio 1,7-bifosfato



Il sedoepulosio 1,7 bifosfato viene defosforilato:

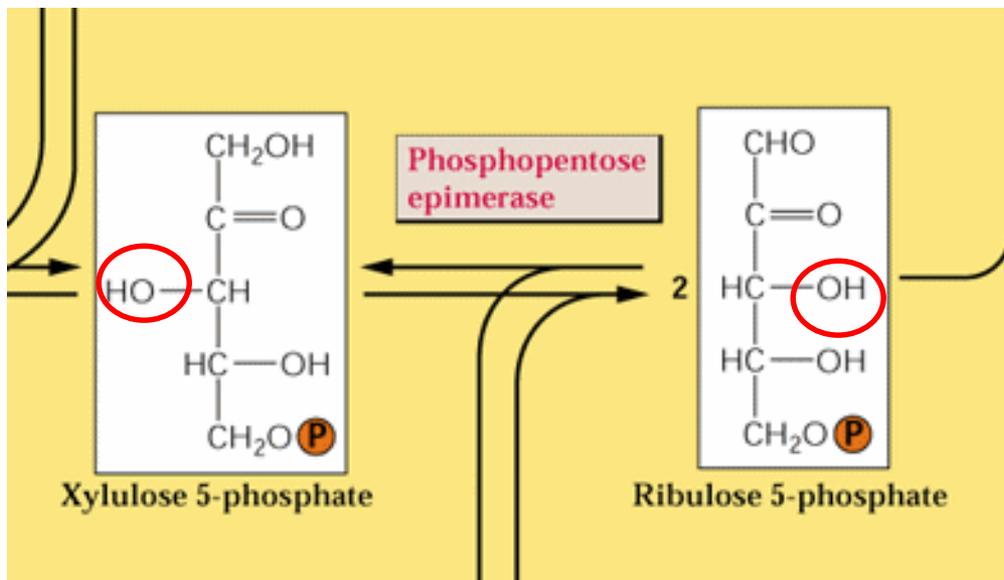
**sedoepulosio 1,7 bifosfatasi**

Produzione di sedoepulosio 7-fosfato



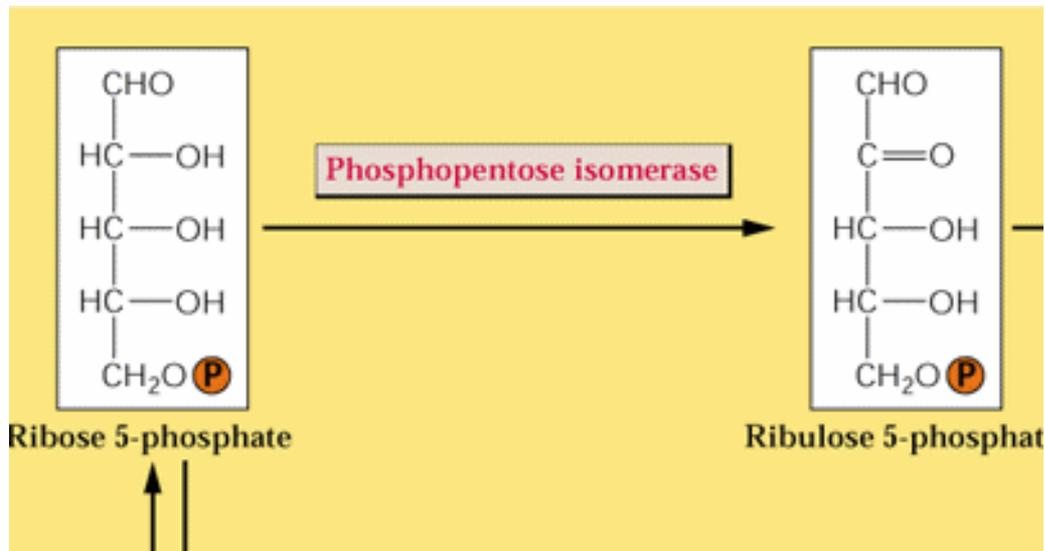
Il sedoheptulosio 7-fosfato reagisce con l'ultima molecola di GA3-P formando 2 pentosi: **transchetolasi**. Produzione di xilulosio 5-fosfato e ribosio 5-fosfato

2x



Epimerasi

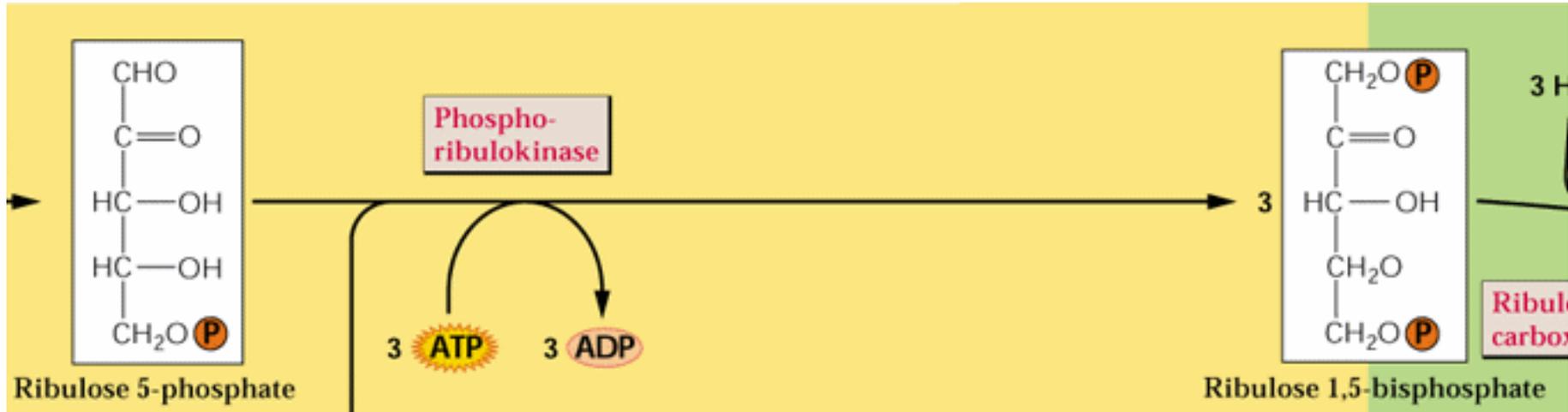
1x



Isomerasi

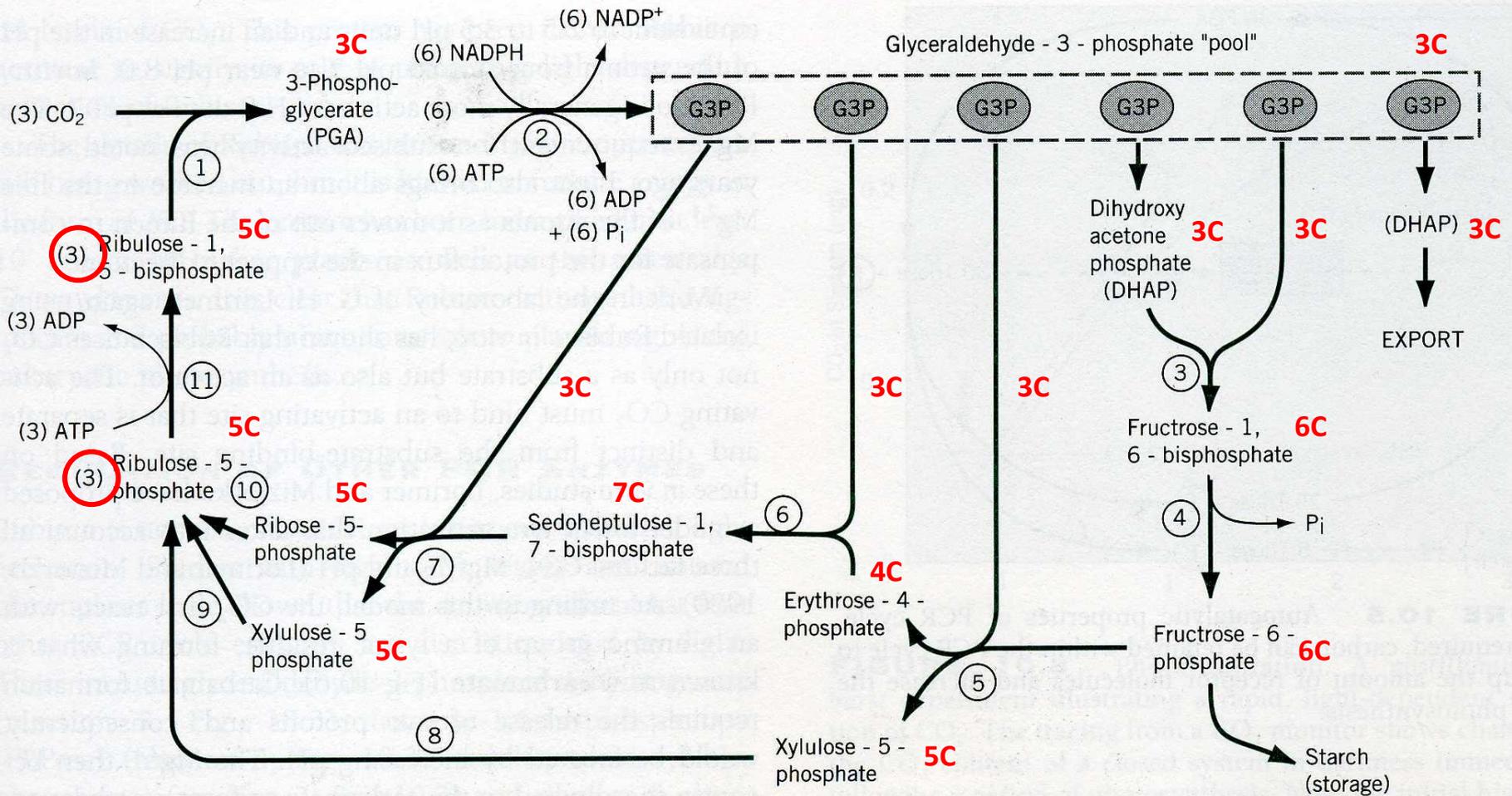
I pentoso-P vengono convertiti in Ribulosio 5-P

3x



La **fosforibulochinasi** rigenera l'acceptore (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.

## Sistemi di regolazione del ciclo di Calvin con la fase tilacoidale della fotosintesi

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

Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi

Fruttosio 1,6-bifosfatasi

Sedoeptulosio 1,7-bifosfatasi

Fosfo-ribulo-chinasi

Rubisco attivasi

# Sistemi di regolazione del ciclo di Calvin con la fase tilacoidale della fotosintesi

## 2- Sistema redox basato sulle tioredossine



**TIOREDOSSINA (12 kDa)**

**5 tipi**

Sito attivo con due cisteine:

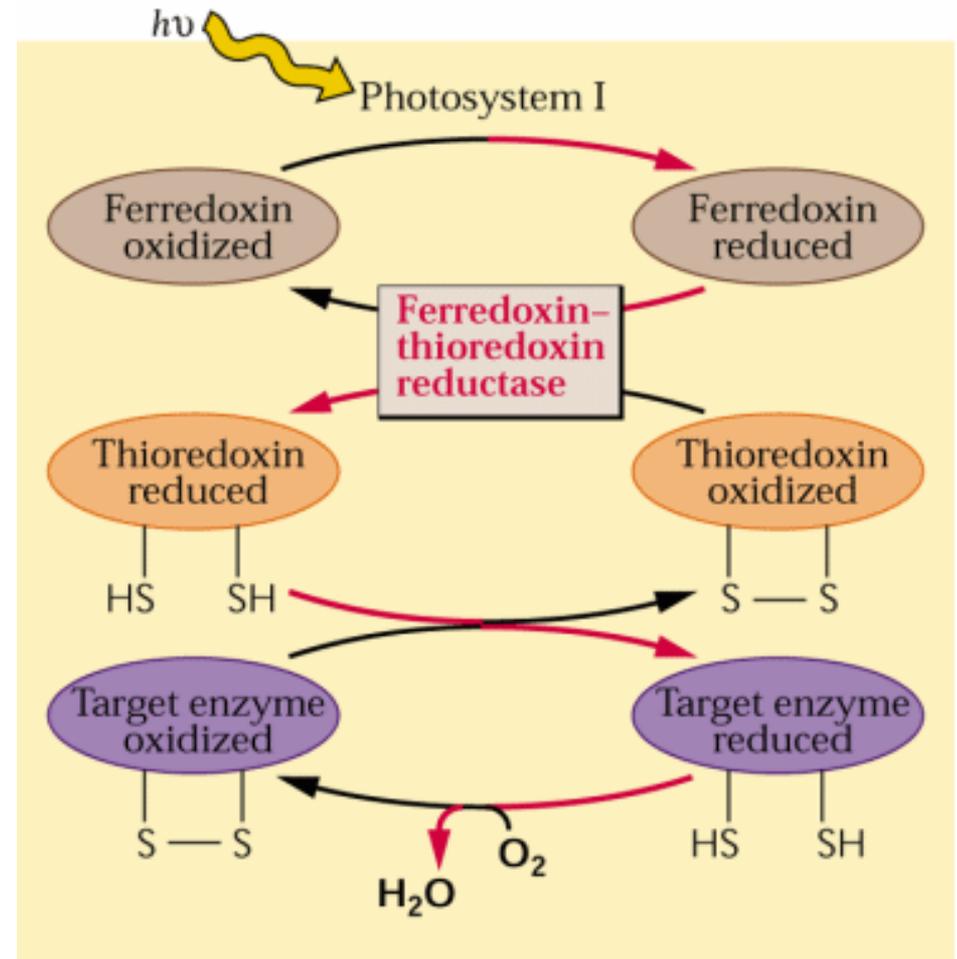
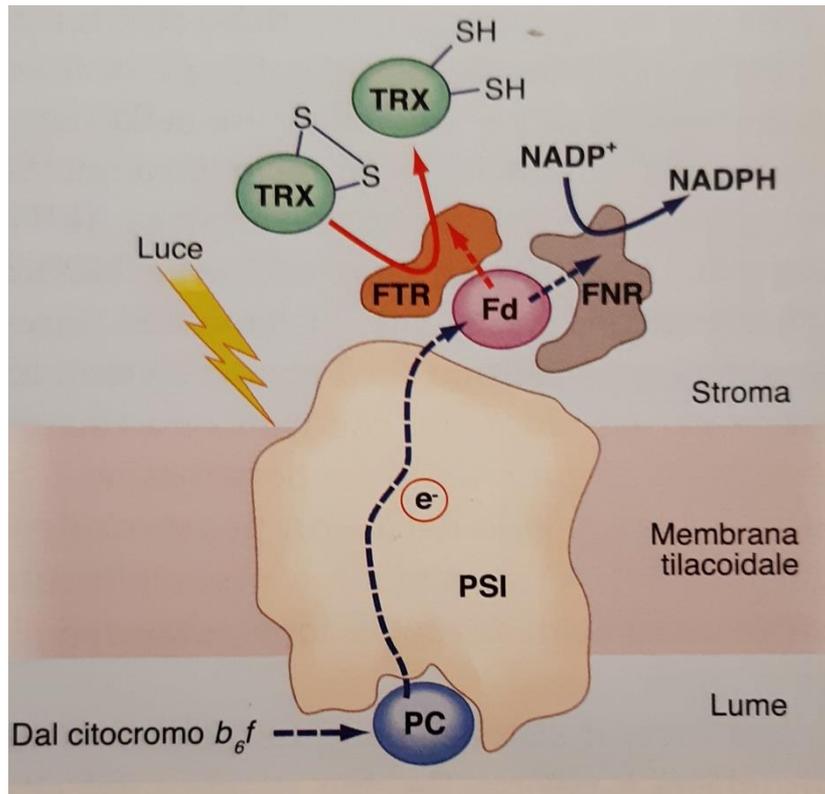
Al buio:

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

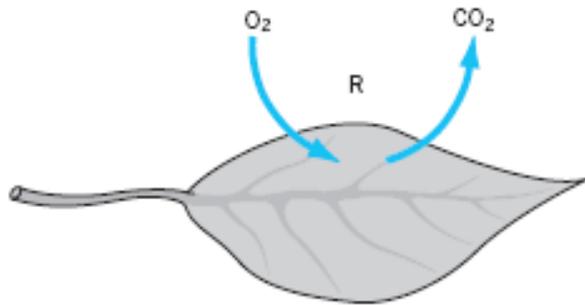
Alla luce:

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

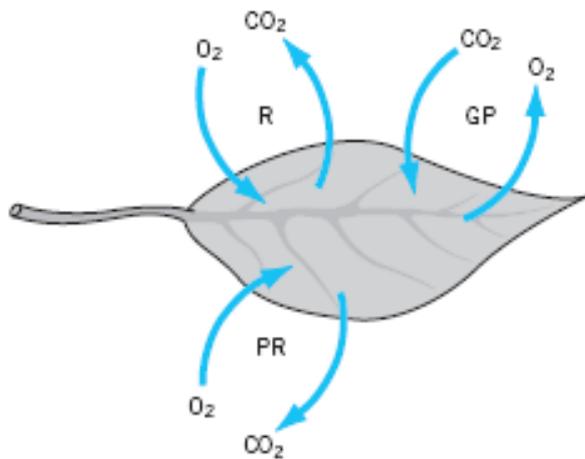
# SISTEMA FERREDOSSINA-TIOREDOSSINA



# LA FOTORESPIRAZIONE



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.

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

Esperimenti con isotopi del carbonio:  
aumento significativo della quantità di  
 $CO_2$  rilasciata durante il giorno

Fenomeno che prende il nome di  
**fotorespirazione**

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

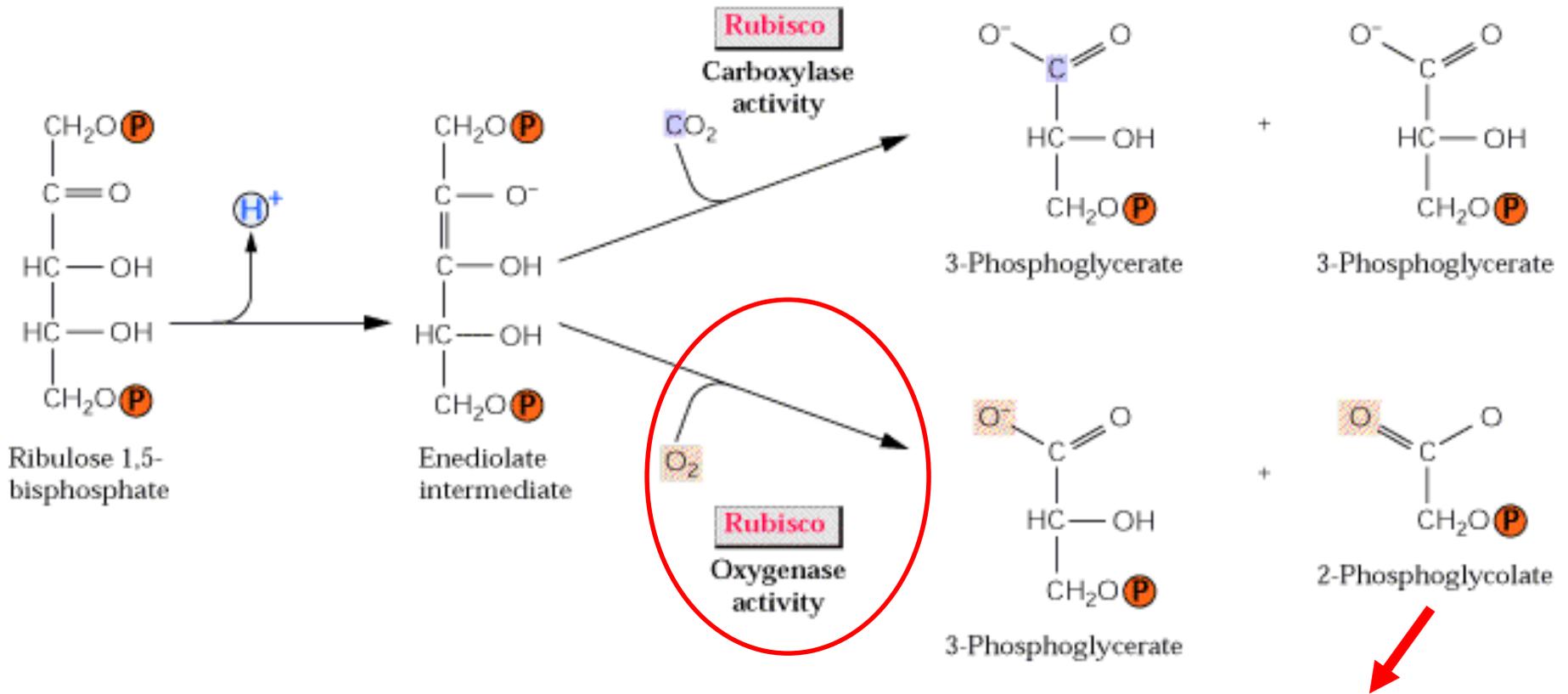
## LA FOTORESPIRAZIONE

[O<sub>2</sub>] 21% → 42% → -50% velocità fotosintesi

[O<sub>2</sub>] 21% → 2% → +100% velocità fotosintesi

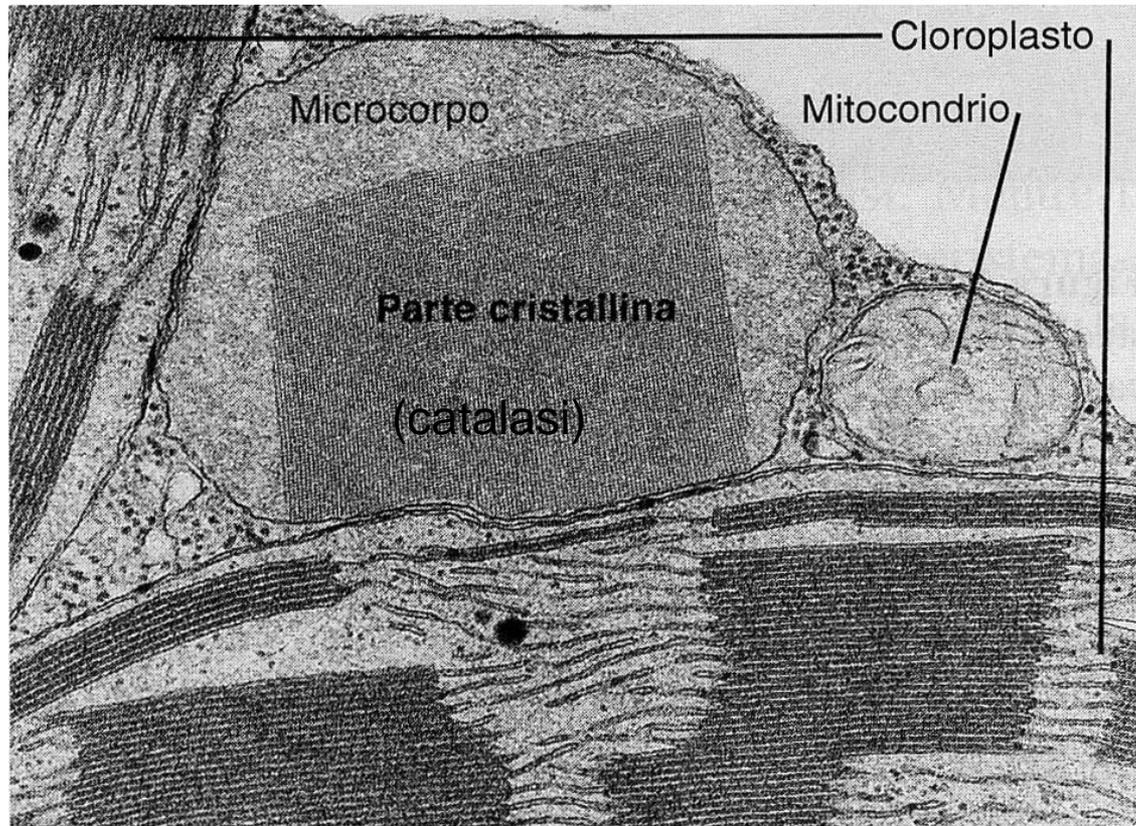
L'ossigeno molecolare inibisce la fotosintesi

# 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**

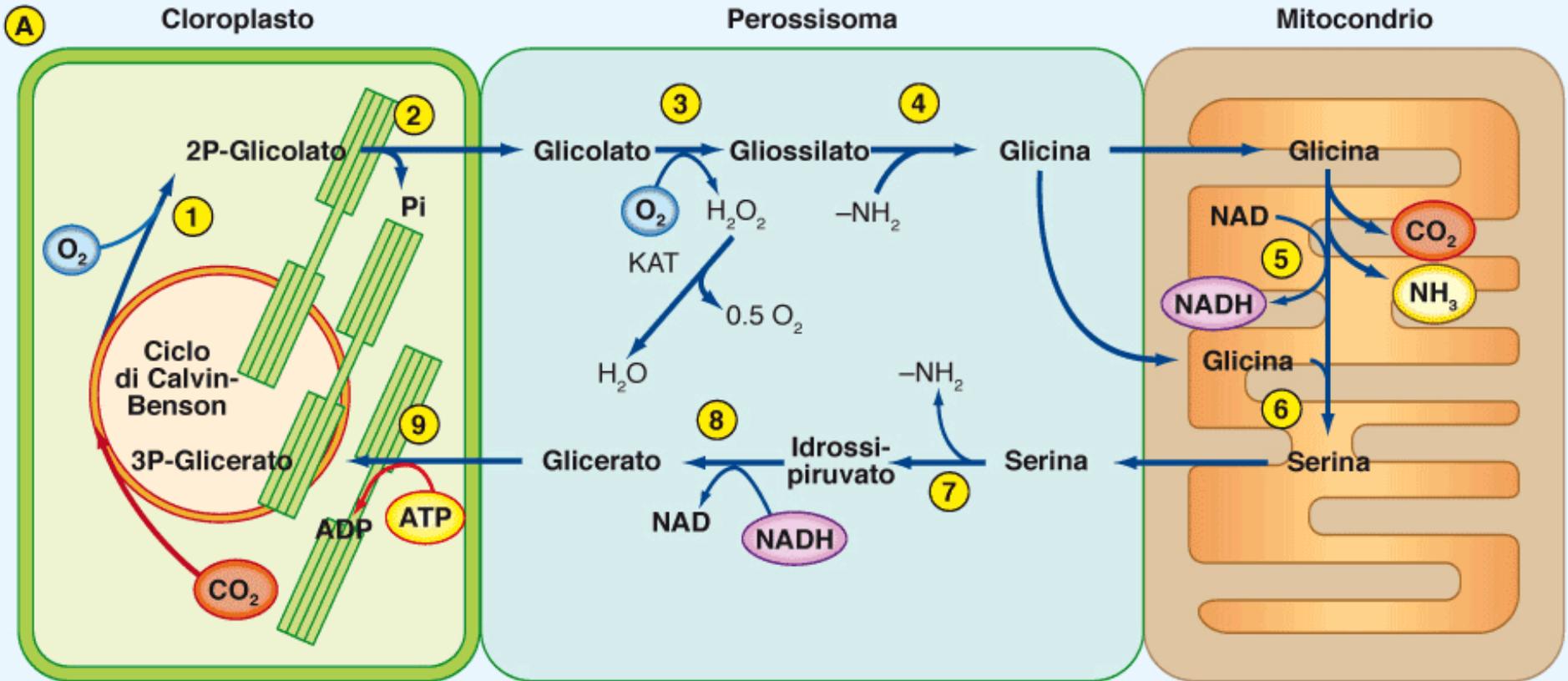
Nel complesso:

Da 2 molecole di fosfoglicolato (4 C totali) si forma una molecola di 3-fosfoglicerato (3 C) mentre una molecola di CO<sub>2</sub> viene persa

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

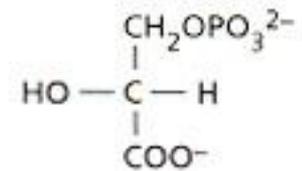
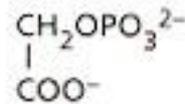
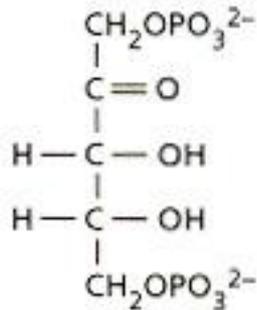
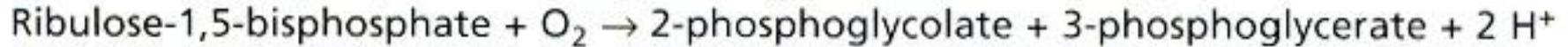
che andrebbe perso a causa dell'attività ossigenasica della Rubisco

# LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

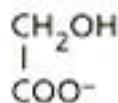
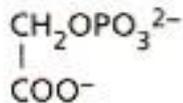
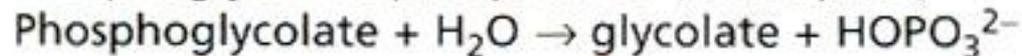


## LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

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

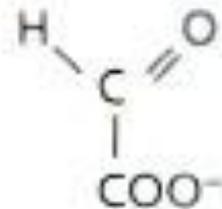
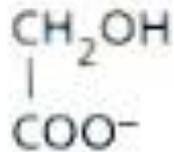
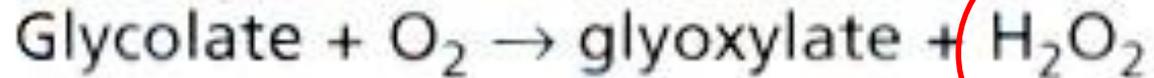


### 2. *Phosphoglycolate phosphatase (chloroplast)*

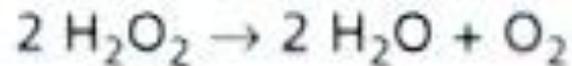


Il glicolato esce dal cloroplasto ed entra nel perossisoma tramite un traslocatore di antiporto glicolato/glicerato

3. *Glycolate oxidase (peroxisome)*

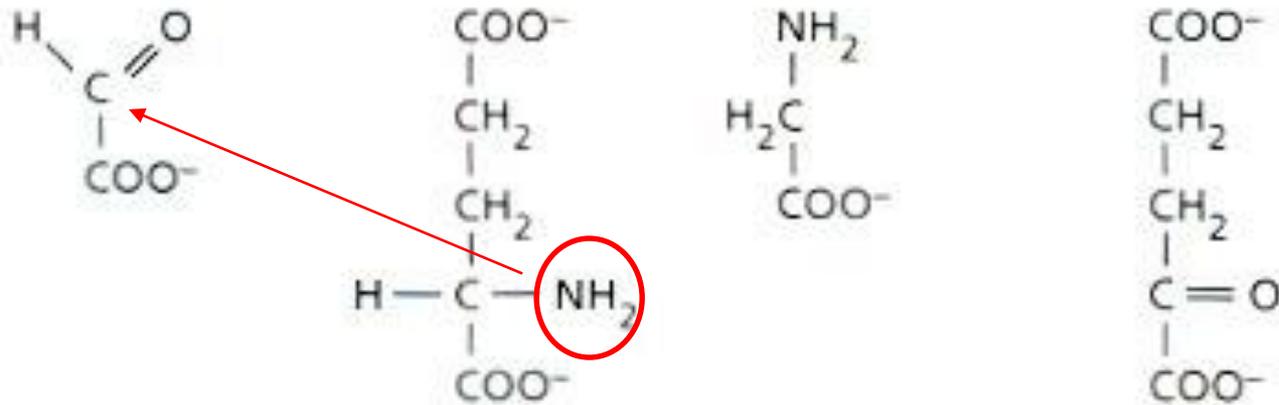


4. *Catalase (peroxisome)*



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

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

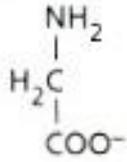
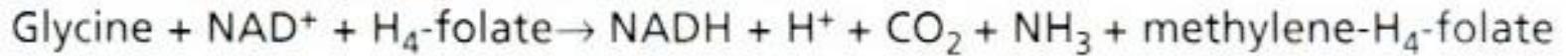


Nei perossisomi il gliossilato viene transaminato a glicina; il donatore del gruppo amminico è il glutammato.

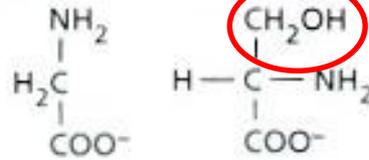
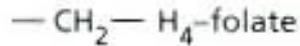
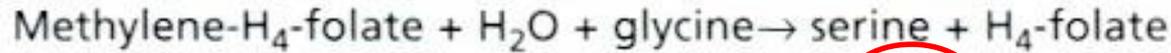
La glicina passa nei mitocondri

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**

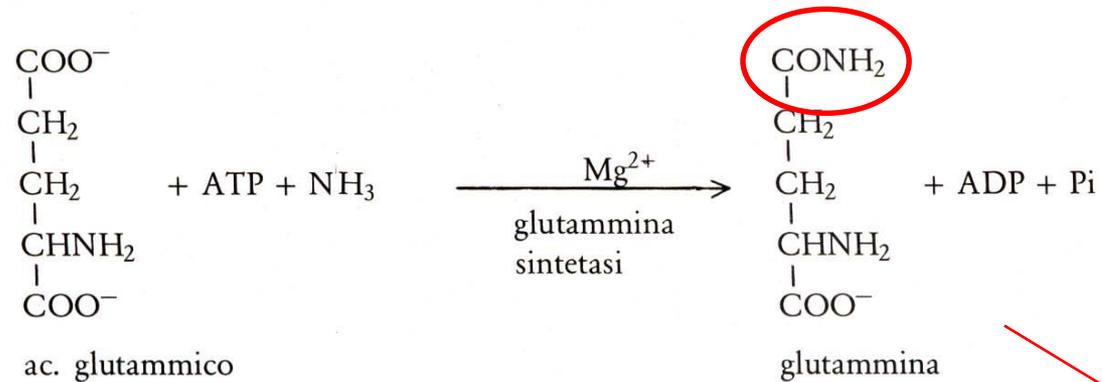


**serina, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NADH**



CO<sub>2</sub> FOTORESPIRATORIA

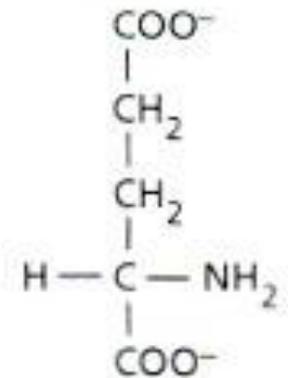
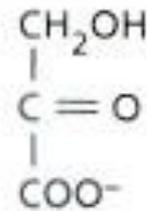
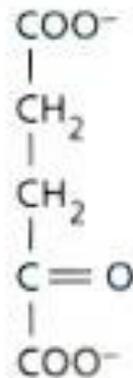
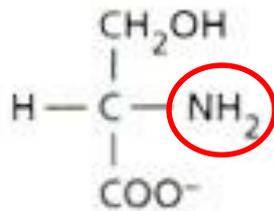
NH<sub>3</sub> diffonde nei cloroplasti dove viene organizzato dalla glutammina sintetasi



Ciclo GS-GOGAT

8. *Serine aminotransferase (peroxisome)*

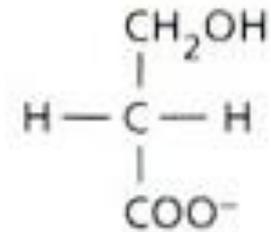
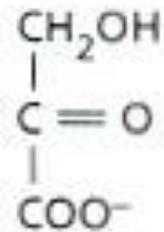
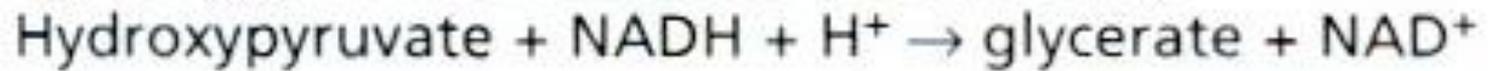
Serine +  $\alpha$ -ketoglutarate  $\rightarrow$  hydroxypyruvate + glutamate



Nel perossisoma la serina viene deamminata a idrossipiruvato

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

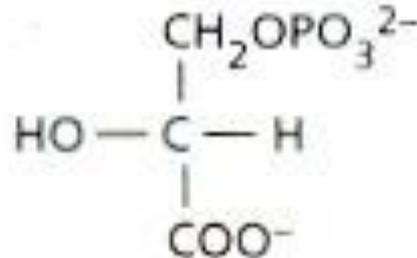
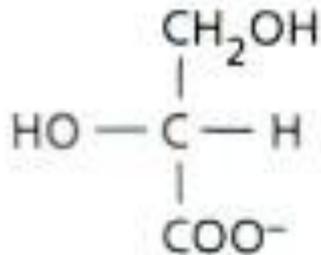
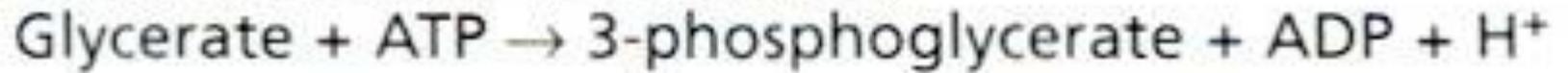
9. *Hydroxypyruvate reductase (peroxisome)*



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)**

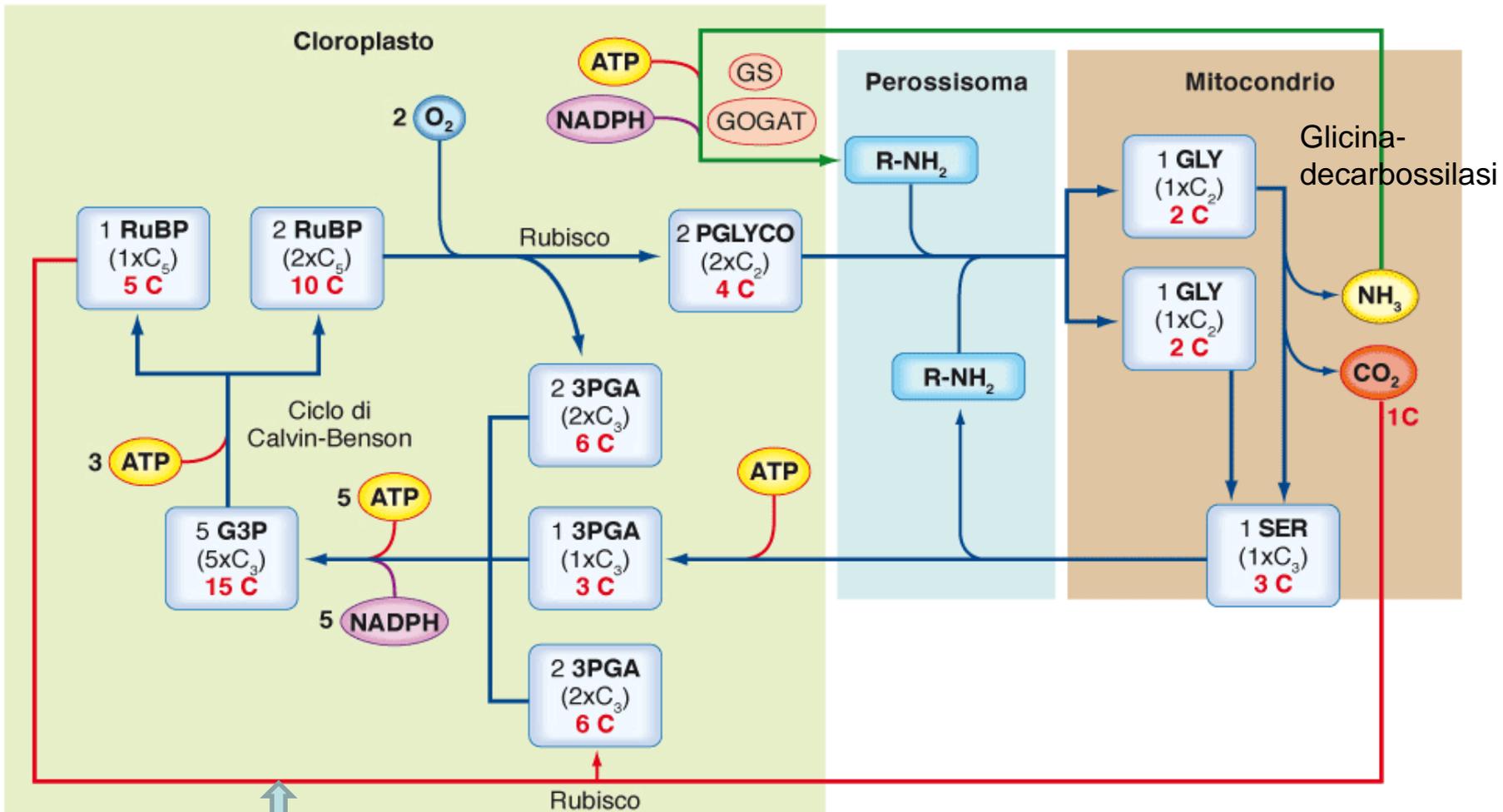
**cioè si recuperano i 3/4 del carbonio dissipato dalla  
attività ossigenasica della Rubisco**

**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

Costo energetico di ogni singola reazione ossigenasica della Rubisco:

**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:

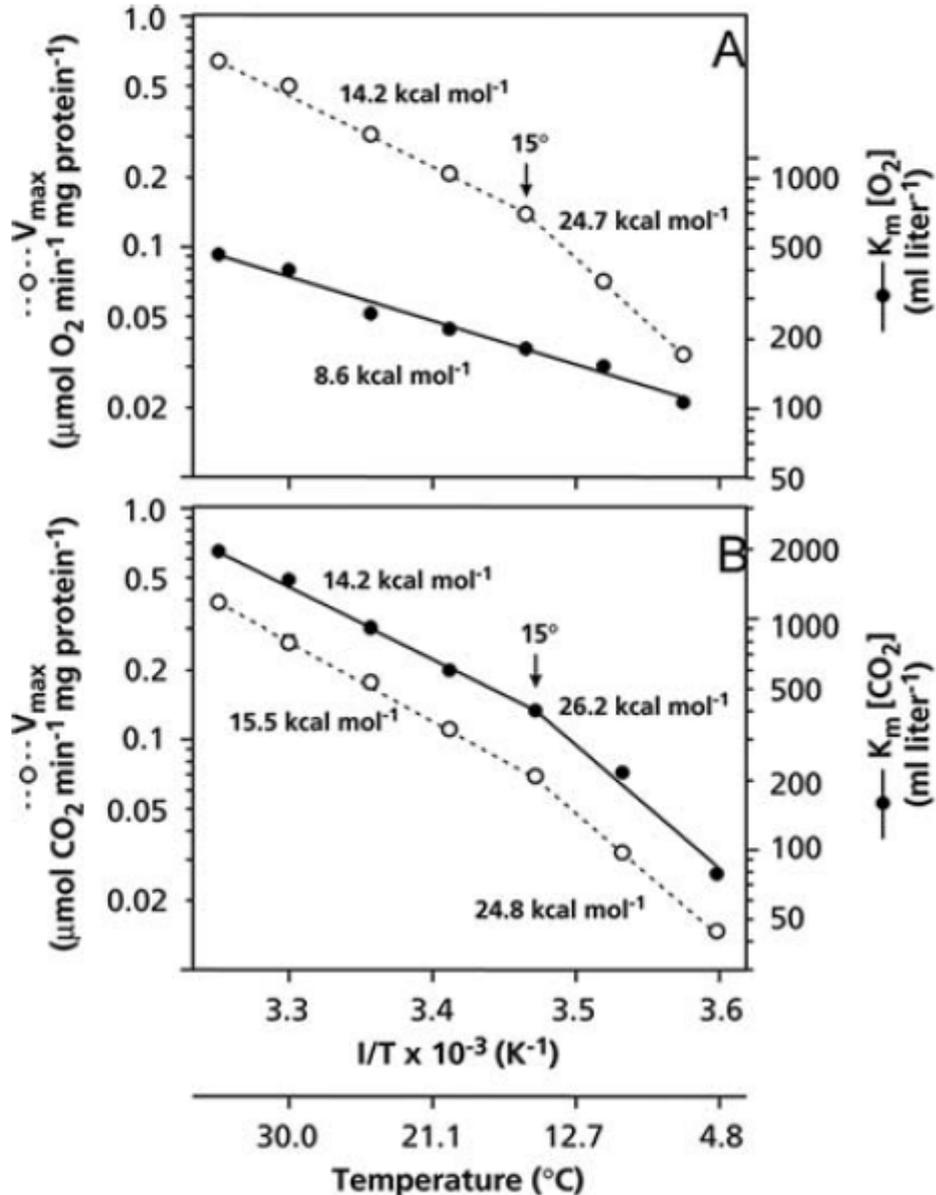
velocità della reazione enzimatica=f(conc. substrato)

**Fattore di specificità  $S_{c/o}$**  (rapporto tra  $V_c$  e  $V_o$  se la concentrazione dei substrati fosse la stessa) nelle piante superiori 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  $V_o/V_c = 0.31$

# Effetto della temperatura sulla cinetica della Rubisco



All'aumentare di T, aumenta  $K_m$  sia per  $\text{CO}_2$  che per  $\text{O}_2$

Ma  $K_m$  aumenta più rapidamente per  $\text{CO}_2$  che per  $\text{O}_2$

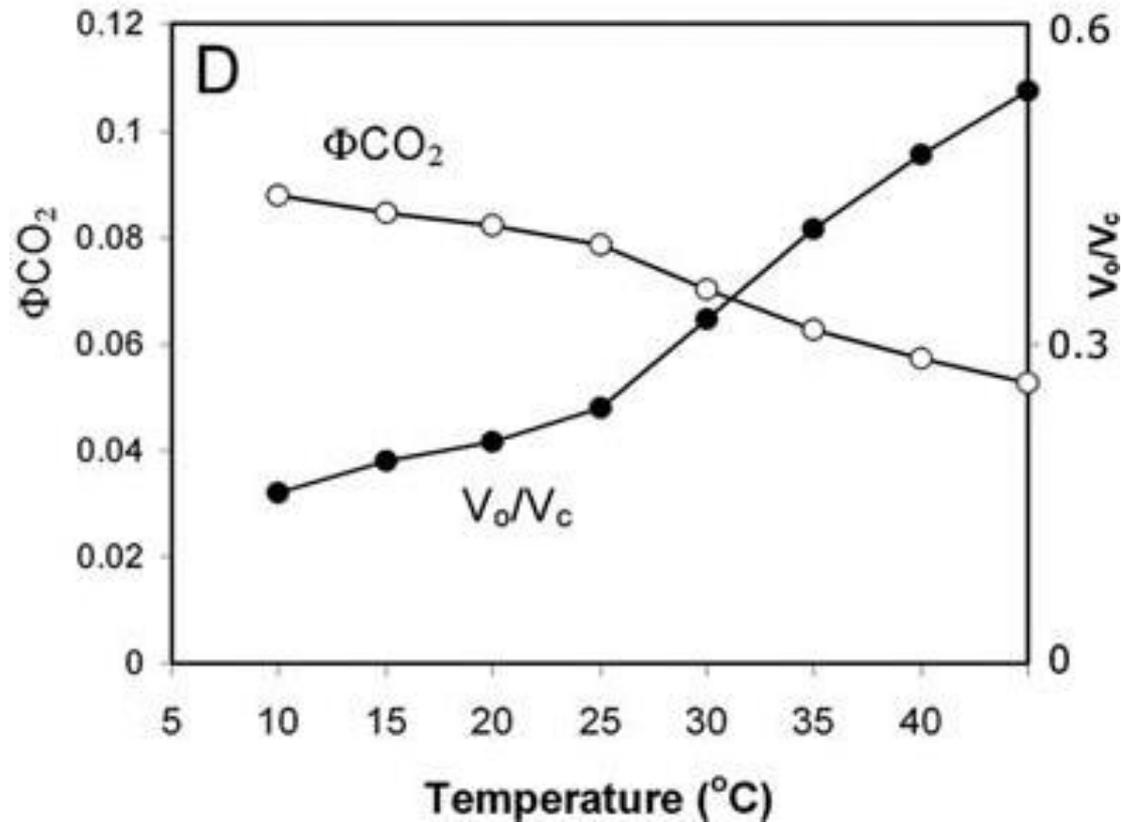
Cioè l'affinità della Rubisco per la  $\text{CO}_2$  diminuisce più rapidamente di quella per  $\text{O}_2$

Esempio:

Passando da 5 a 30 °C

$K_m$  per  $\text{O}_2$  aumenta di 3 volte

$K_m$  per  $\text{CO}_2$  aumenta di 15 volte



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

## Effetto della temperatura sulla solubilità di CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>

### 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 <b>-58%</b>	9.11	0.0244 <b>-43%</b>	228.2	0.0376 $V_o/V_c = 0.6-1.0$

A 35° Carbossilazione/Ossigenazione = 1:1

Quindi.... effetto combinato della temperatura su:

- Cinetica della Rubisco
- Solubilità di  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$

= all'aumentare della temperatura aumenta rapporto ossigenazione/carbossilazione

**-> LA FOTORESPIRAZIONE AUMENTA ALL'AUMENTARE DELLA TEMPERATURA AMBIENTALE**

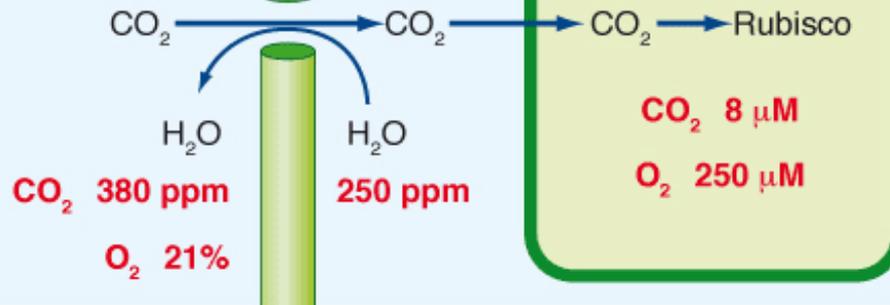
A 35 °C la fotosintesi netta [cioè  $\text{GP} - (\text{R} + \text{PR})$ ] è circa il 30% inferiore a quella che si avrebbe in assenza di attività ossigenasica della Rubisco

# LA FOTORESPIRAZIONE AUMENTA IN CONDIZIONI DI STRESS IDRICO

**A**

Disponibilità idrica ottimale

Stomi aperti



Rapporto tra velocità di carbossilazione e ossigenazione della Rubisco

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

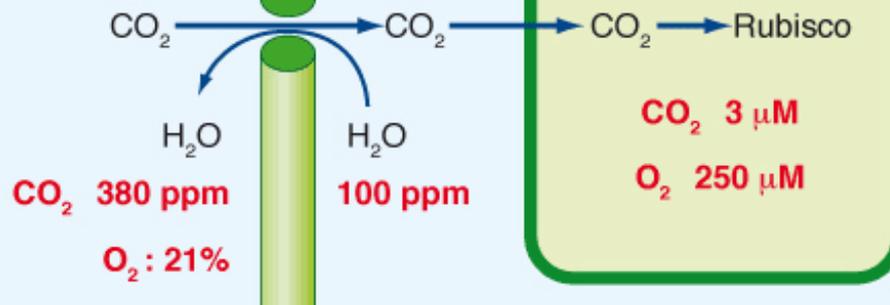
$$100 \times (8/250) = 3.2$$

FS= fattore di specificità

**B**

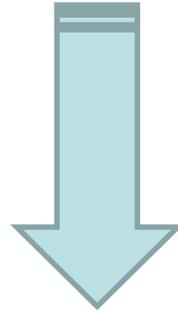
Disponibilità idrica NON ottimale

Stomi semichiusi



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

TEMPERATURE ELEVATE e/o STRESS IDRICO  
AUMENTANO LA FOTORESPIRAZIONE



Evoluzione di sistemi per concentrare  $\text{CO}_2$   
in prossimità della Rubisco:

**Piante  $\text{C}_4$**   
**Piante CAM**