

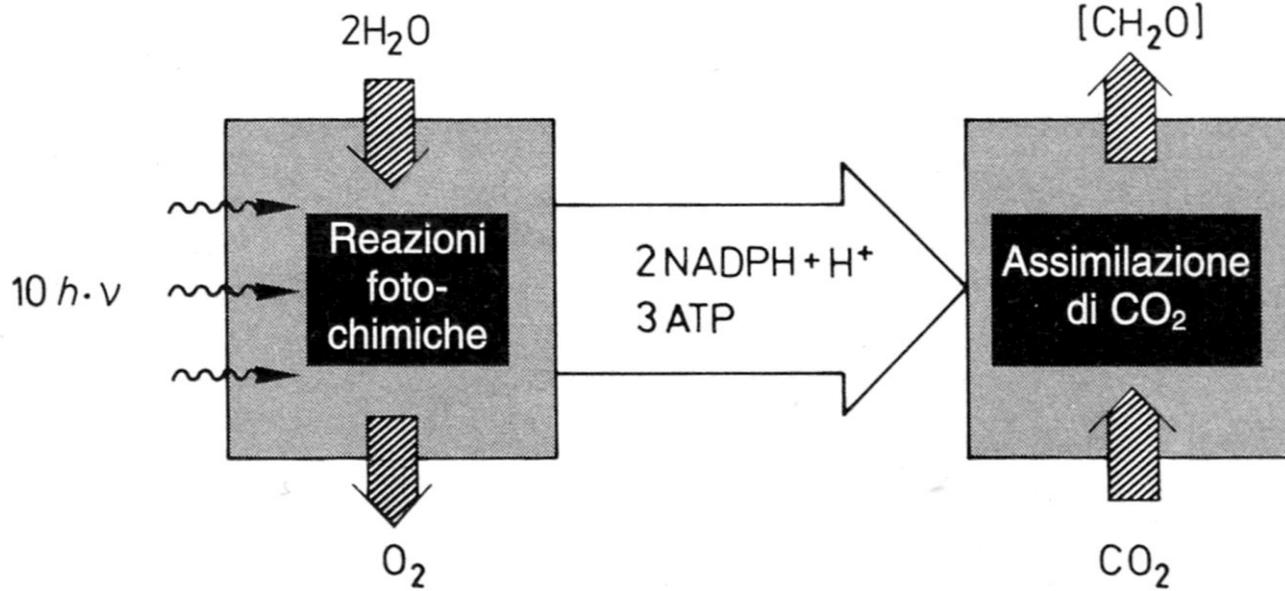


FOTOSINTESI



FASE LUMINOSA

FASE OSCURA



Stato di ossidazione del carbonio: **0**



Stato di ossidazione del carbonio: **+4**

DIPENDENTE DALLA LUCE

DIPENDENTE DAI PRODOTTI DELLA FASE PRECEDENTE

Membrane tilacoidali;
Spazi intratilacoidali

Stroma



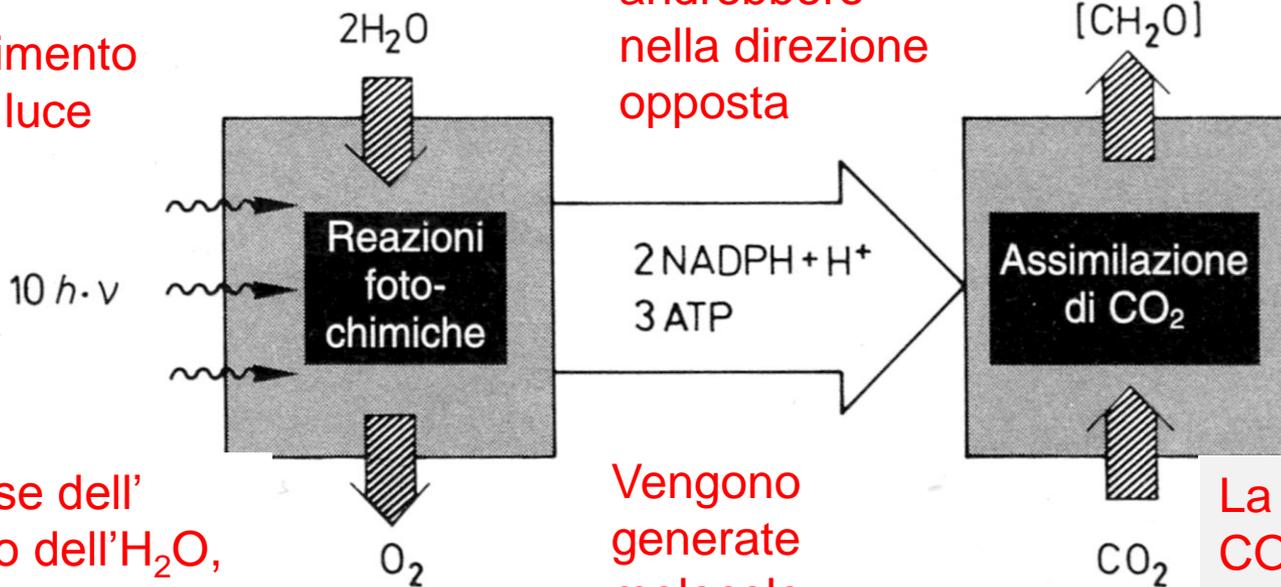


FASE LUMINOSA

L'energia assorbita permette delle reazioni che altrimenti andrebbero nella direzione opposta

FASE OSCURA

Assorbimento della luce



...a spese dell'ossigeno dell' H_2O , che viene ossidato. L' O_2 è un prodotto di scarto

Vengono generate molecole spendibili per reazioni di riduzione e di «energicizzazione» molecolare

La molecola della CO_2 viene legata, quindi il suo C ridotto

DIPENDENTE DALLA LUCE

DIPENDENTE DAI PRODOTTI DELLA FASE PRECEDENTE



Riduzione del NADP^+ a NADPH_2

Il potenziale riducente è rappresentato da una molecola per cui esistono almeno due grafie alternative:

$\text{NADPH}+\text{H}^+$ (Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato)

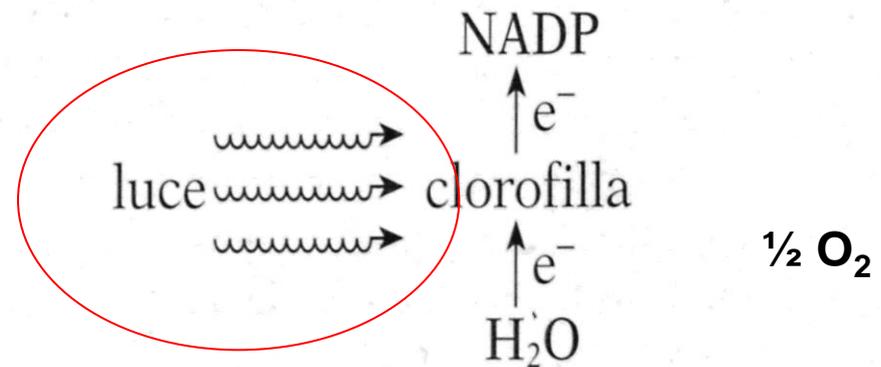
NADPH_2

La forma ridotta ($\text{NADPH}+\text{H}^+$) deriva per riduzione della forma ossidata, l' NADP^+ , che richiede due elettroni e due protoni (acquisiti dall'ambiente circostante). Gli elettroni derivano direttamente dall'ossidazione dell'ossigeno ricavato da una molecola di acqua che è stata scissa nel processo di fotolisi.

Accettore finale di elettroni sarà il NADP^+ (nello stroma dei cloroplasti), mentre la sorgente di elettroni sarà la molecola di acqua, il cui ossigeno si ossiderà (nei tilacoidi):



Un sistema ossidoriduttivo avente un potenziale fortemente negativo ($\text{NADPH} + \text{H}^+ / \text{NADP}^+$: $E'_0 = -0,32 \text{ V}$) è di fatto ridotto ad opera di un sistema ossidoriduttivo con potenziale estremamente positivo ($\text{H}_2\text{O} / \frac{1}{2}\text{O}_2$: $E'_0 = +0,82 \text{ V}$), e quindi richiede energia per avvenire.



La produzione dell'**NADPH+H⁺** è in ultima analisi un processo ossido-riduttivo che avviene grazie al cambiamento di stato dei centri di reazione: questi diventano “generosi” quando sono eccitati, cedendo un elettrone ad un accettore, che si riduce, l'ultimo dei quali è l'**NADP⁺**.

Il salto energetico tra la coppia **H₂O/NADPH+H⁺** è così elevato (**+1,14 V**), che abbiamo bisogno di due cambiamenti di *status* ossidoriduttivo, e quindi di due fotosistemi, perché altrimenti l'energia luminosa assorbita da uno solo dei due fotosistemi sarebbe insufficiente.

Come lavorano in serie i due fotosistemi?

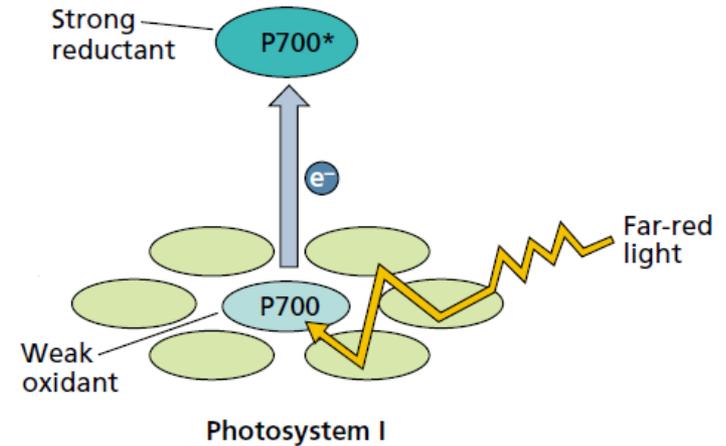
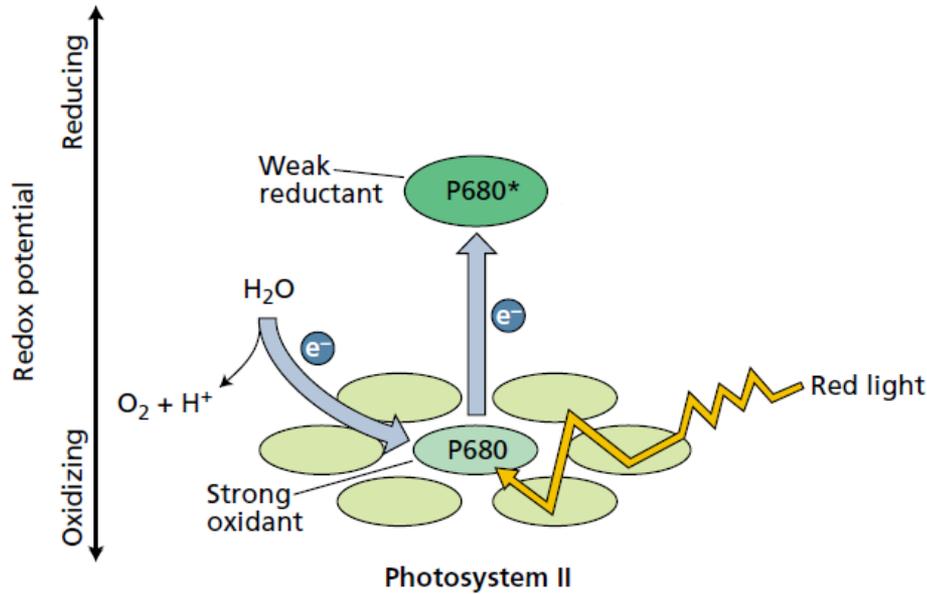


FIGURE 7.14 Z scheme of photosynthesis. Red light absorbed by photosystem II (PSII) produces a strong oxidant and a weak reductant. Far-red light absorbed by photosystem I (PSI) produces a weak oxidant and a strong reductant. The strong oxidant generated by PSII oxidizes water, while the strong reductant produced by PSI reduces NADP⁺. This scheme is basic to an understanding of photosynthetic electron transport. P680 and P700 refer to the wavelengths of maximum absorption of the reaction center chlorophylls in PSII and PSI, respectively.

Come lavorano in serie i due fotosistemi?

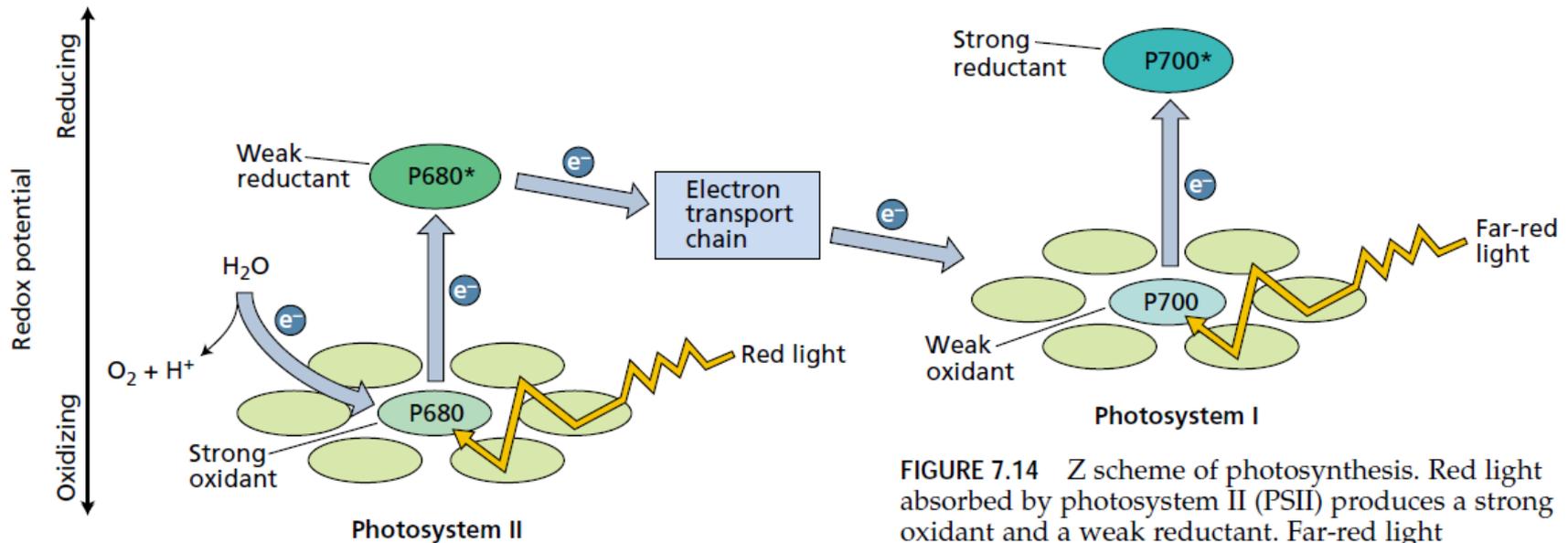
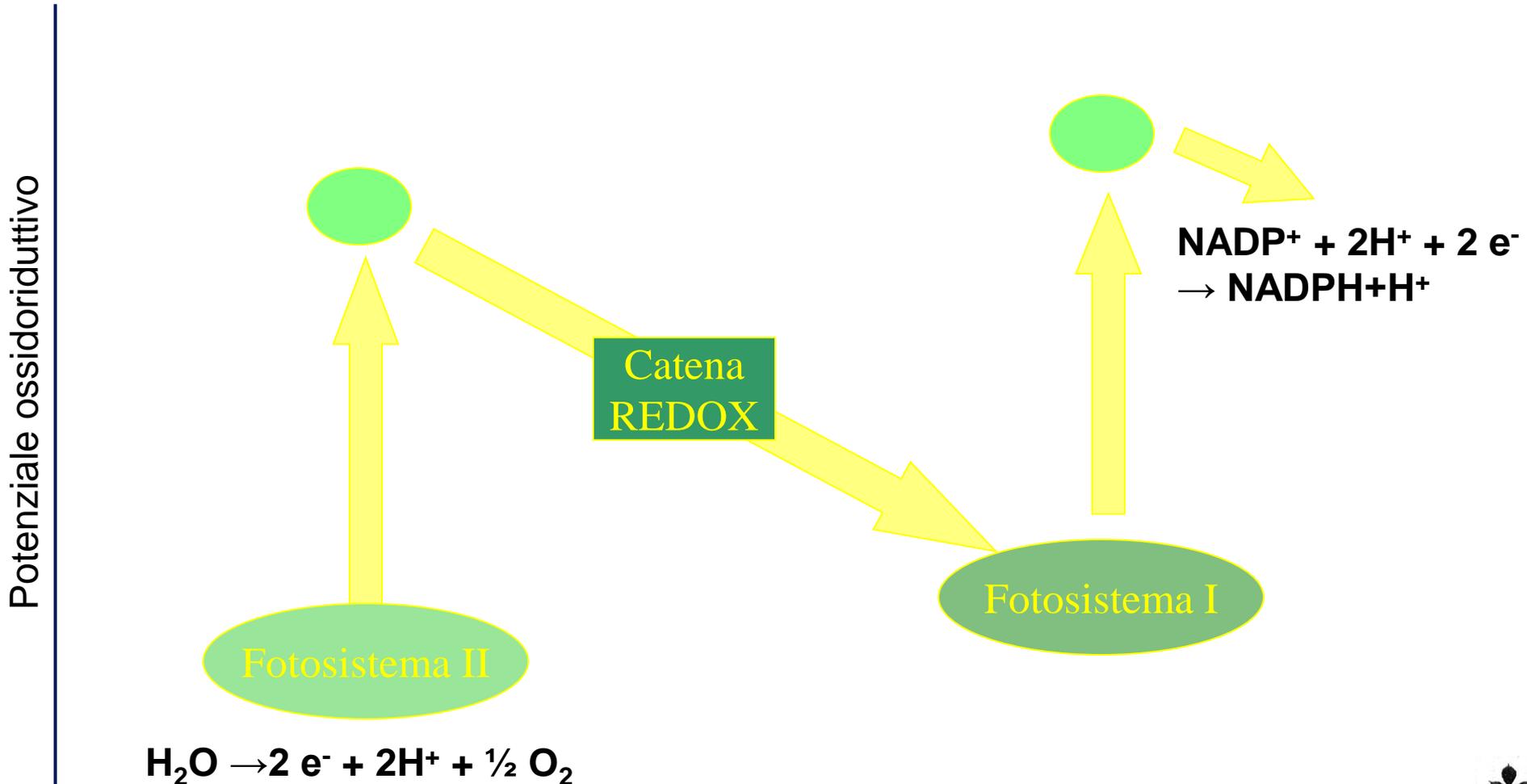
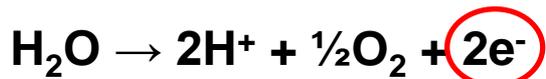
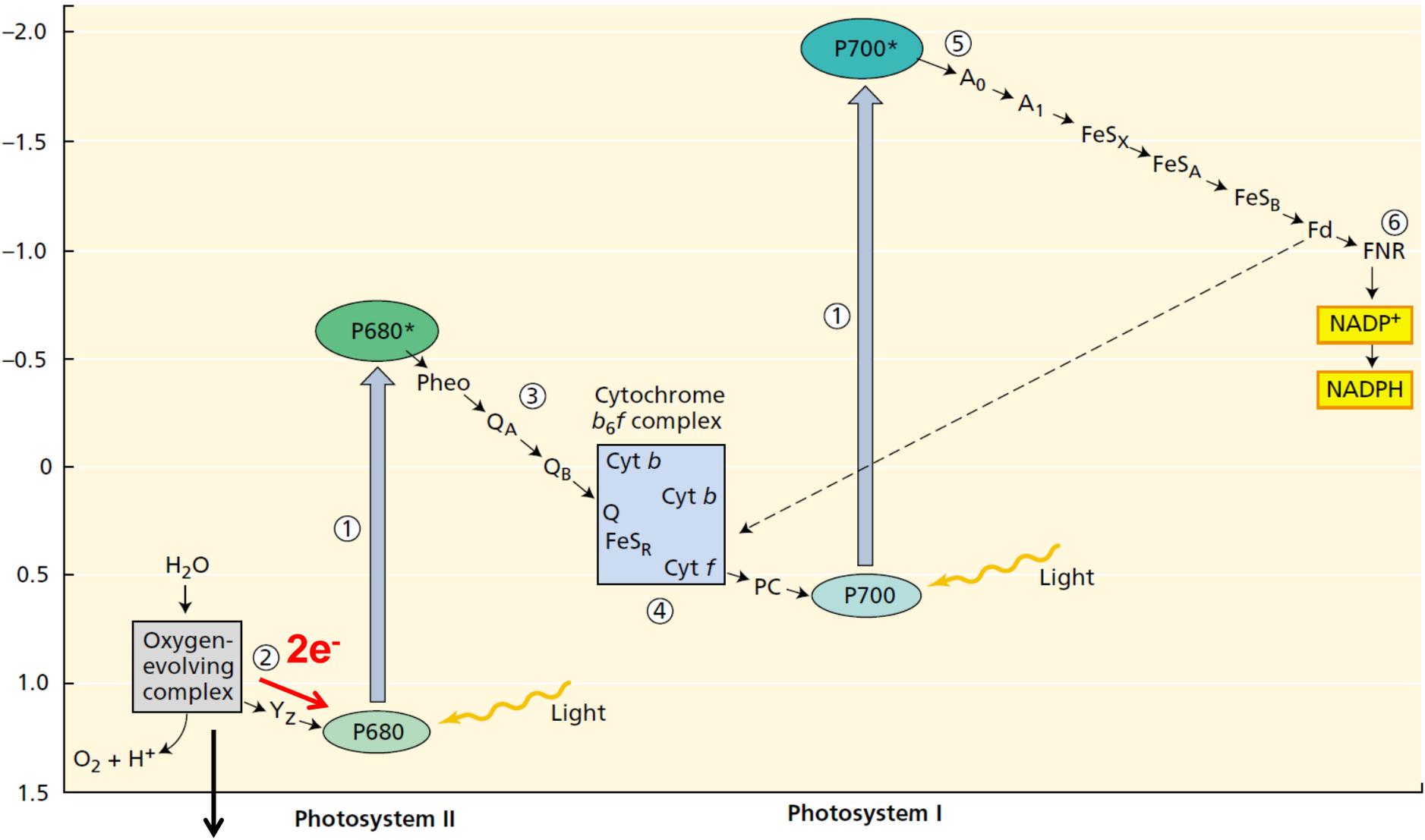


FIGURE 7.14 Z scheme of photosynthesis. Red light absorbed by photosystem II (PSII) produces a strong oxidant and a weak reductant. Far-red light absorbed by photosystem I (PSI) produces a weak oxidant and a strong reductant. The strong oxidant generated by PSII oxidizes water, while the strong reductant produced by PSI reduces $NADP^+$. This scheme is basic to an understanding of photosynthetic electron transport. P680 and P700 refer to the wavelengths of maximum absorption of the reaction center chlorophylls in PSII and PSI, respectively.

Schema a Z del trasporto di elettroni proposto per la prima volta da **Hill & Bendall** nel **1959**.



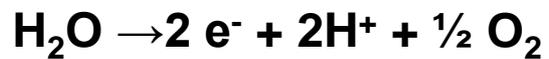
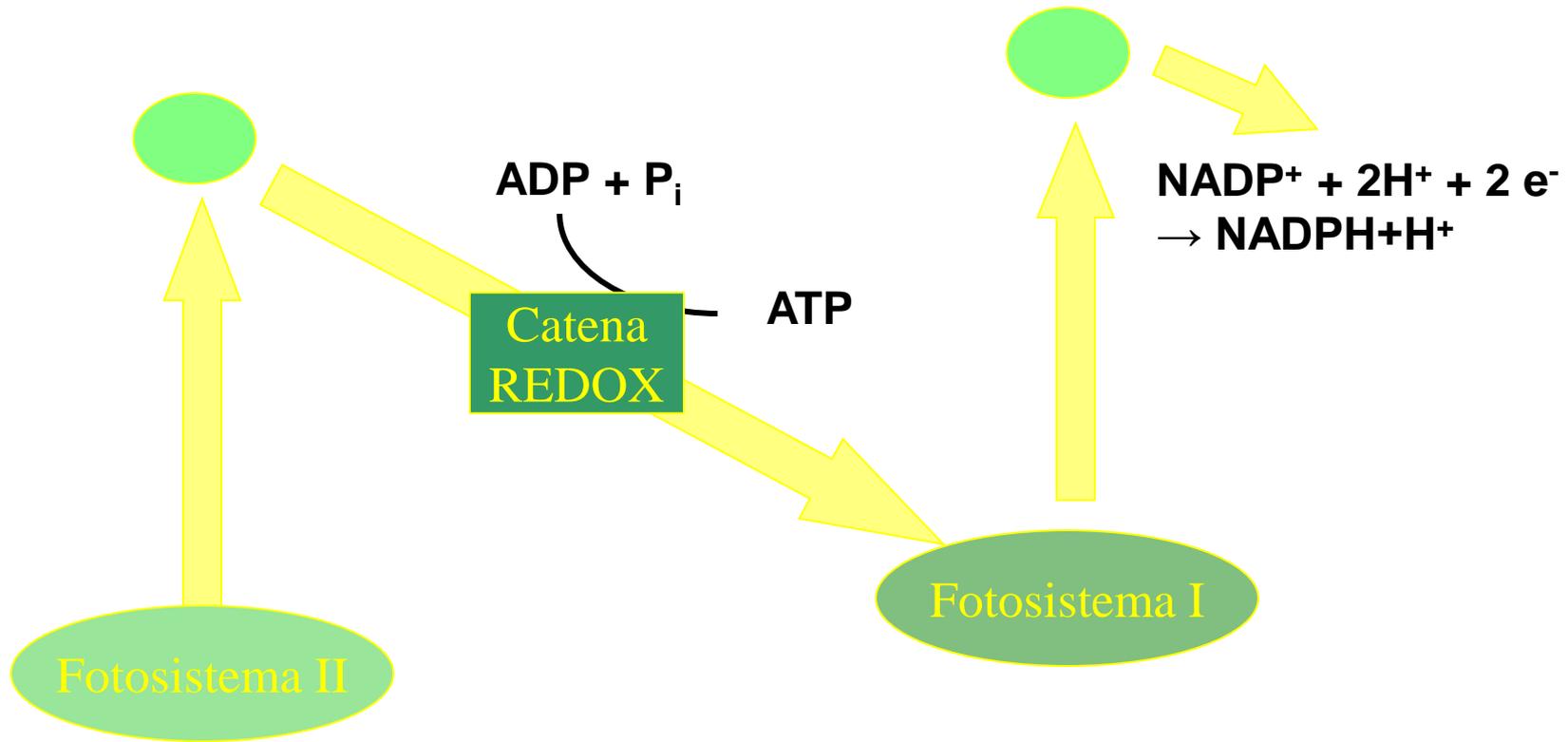
Formazione della forma ridotta dell'NADP⁺



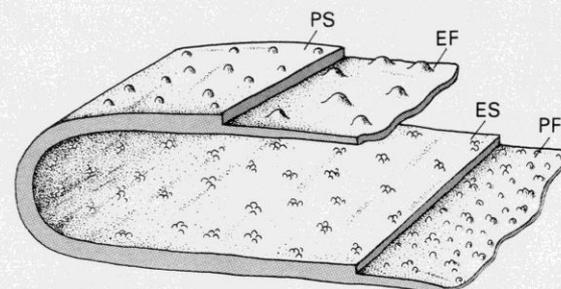
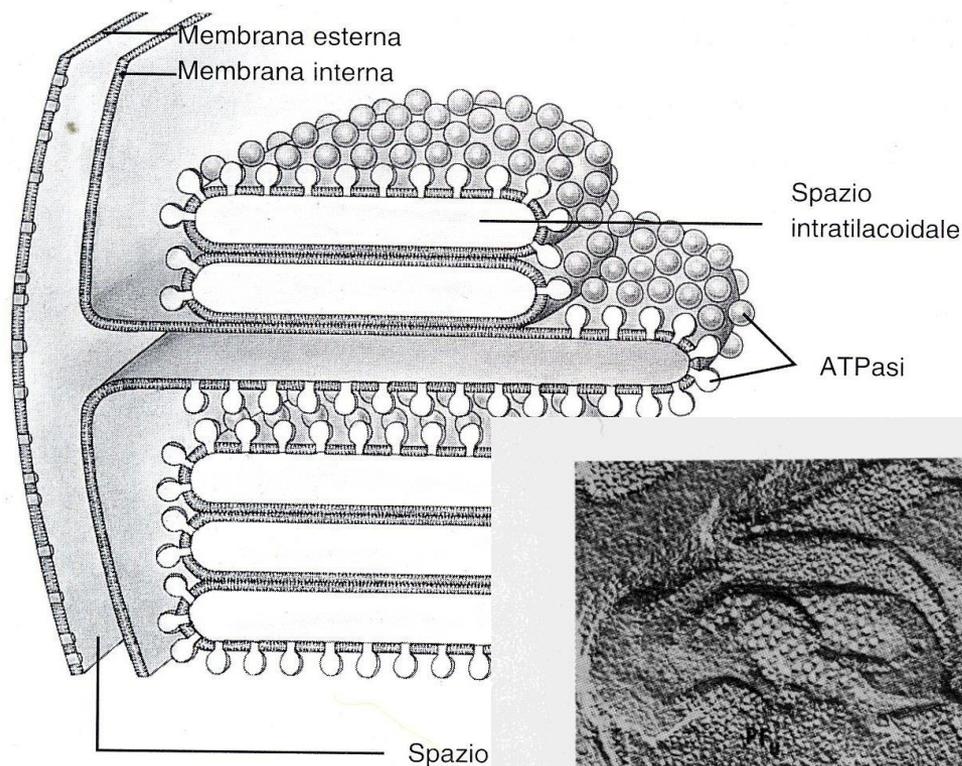
Dove avvengono questi fenomeni?

- Riduzione dell'**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”)

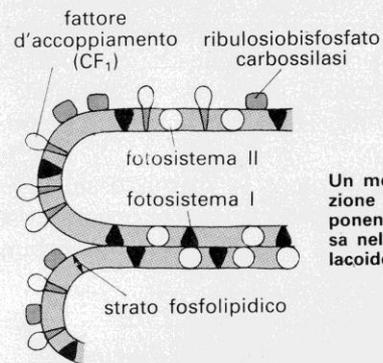
ATP??



Formazione dell'ATP?



Le diverse superfici della membrana del tilacoide che si possono osservare col criodecapaggio.



Un modello della disposizione dei principali componenti della fase luminosa nella membrana del tilacoide.

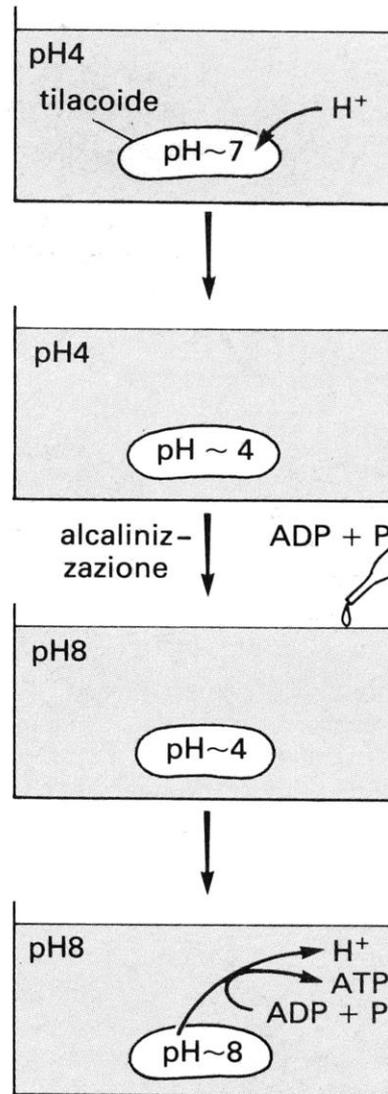
Fig. 13.25 • La struttura delle membrane dei tilacoide è stata intensamente studiata con varie tecniche. Una delle più usate è quella del criodecapaggio (freeze-etching; v. cap. 4). La foto mostra un preparato ottenuto con questa tecnica da tilacoide di pisello (ingrandimento, 125.000 volte). Le sigle indicano le diverse superfici osservabili (si tratta sia di superfici esterne che di superfici interne dello spessore della membrana). Queste superfici appaiono costellate di particelle che variano da una superficie all'altra come dimensioni e disposizione. Con altri metodi, specialmente immunologici, è possibile identificare queste particelle. Combinando i dati del criodecapaggio con quelli ottenuti mediante altri metodi si può tentare di ricostruire la posizione dei componenti della fase luminosa nella membrana del tilacoide. Simili ricostruzioni sono importanti per spiegare il meccanismo di accoppiamento fra trasporto di elettroni e sintesi di ATP.



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.



Formazione dell'ATP

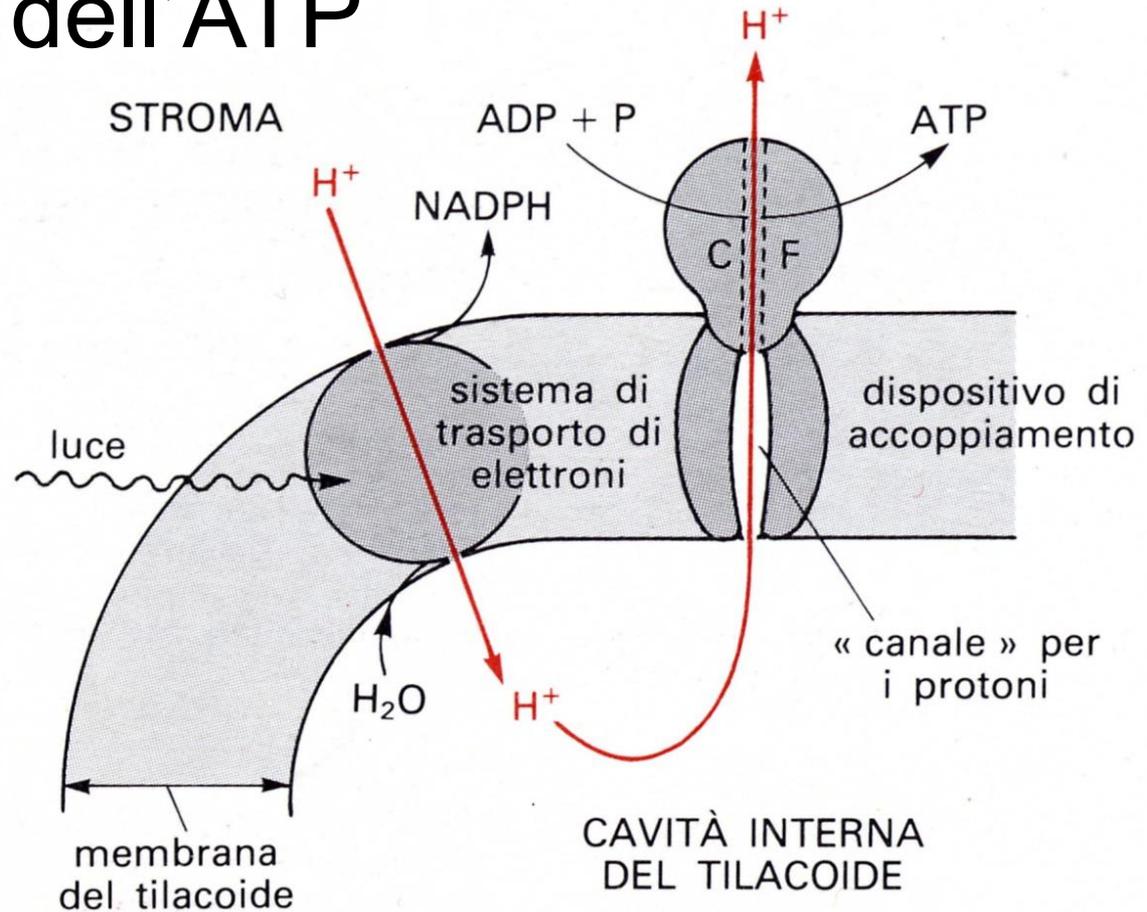


Fig. 13.23 • Nelle membrane dei tilacoidi è contenuta l'ATP sintasi, una «macchina» molecolare per accoppiare il gradiente di protoni alla sintesi di ATP. Di questa «macchina» fa parte un grosso complesso di proteine chiamato CF_1 che sporge sulla faccia esterna della membrana. Questo complesso isolato 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).



Formazione dell'ATP

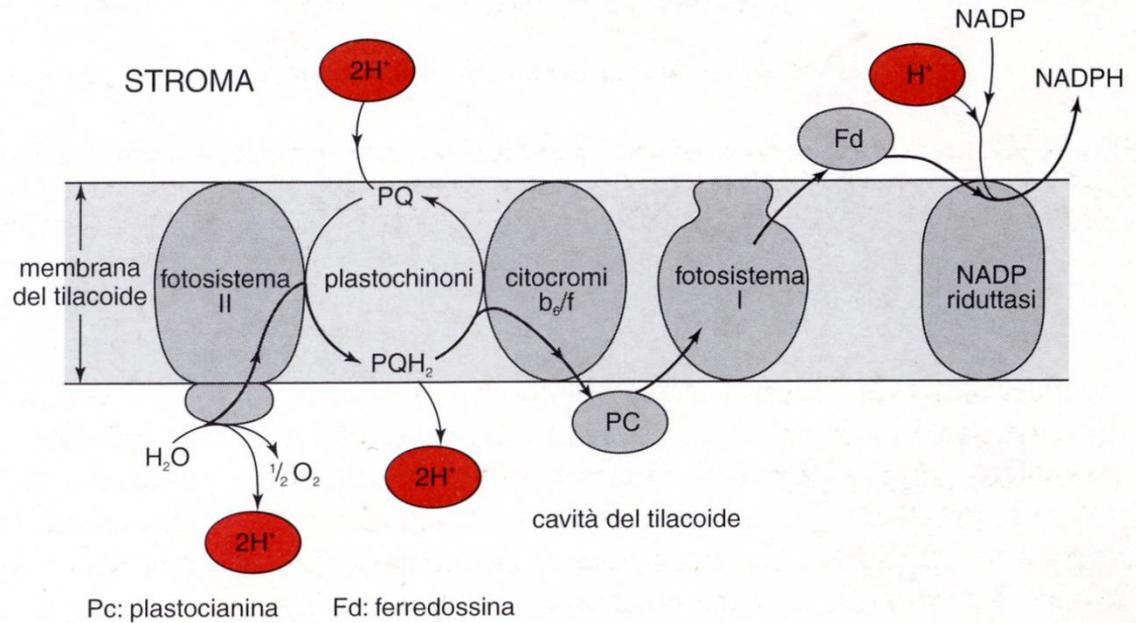
La formazione dell'ATP è quindi legata all'instaurarsi di un gradiente protonico tra le vescicole tilacoidali chiuse e lo stroma.

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.

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).



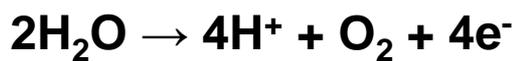
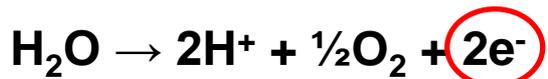
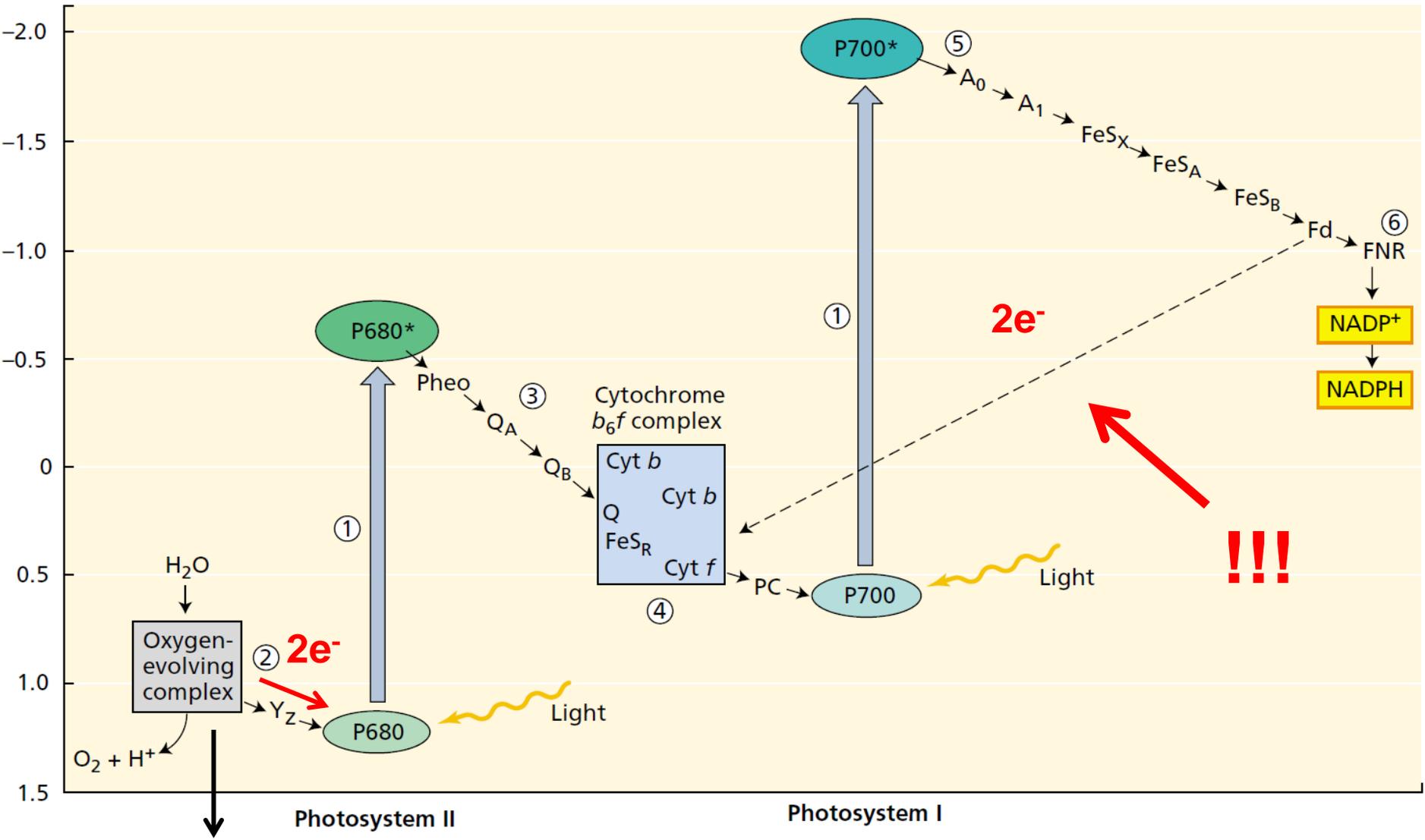
- (1) **la fotolisi dell'acqua** all'interno dello spazio intratilacoide, che genera H^+ ;
- (2) **la riduzione dell' $NADP^+$ nello stroma**, che si accompagna ad una riduzione di H^+ presenti a livello stromatico;
- (3) **il trasporto attivo di H^+ dallo stroma verso l'interno dello spazio intratilacoide**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

La produzione dell'**ATP** non è quindi un processo ossidoriduttivo, ma è comunque legato ai fenomeni di cui sopra.

Per avvenire deve essere creato un gradiente di concentrazione di protoni [**H⁺**] tra spazio intratilacoidale e lo 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.

FOTOFOSFORILAZIONE CICLICA



Trasporto ciclico degli elettroni

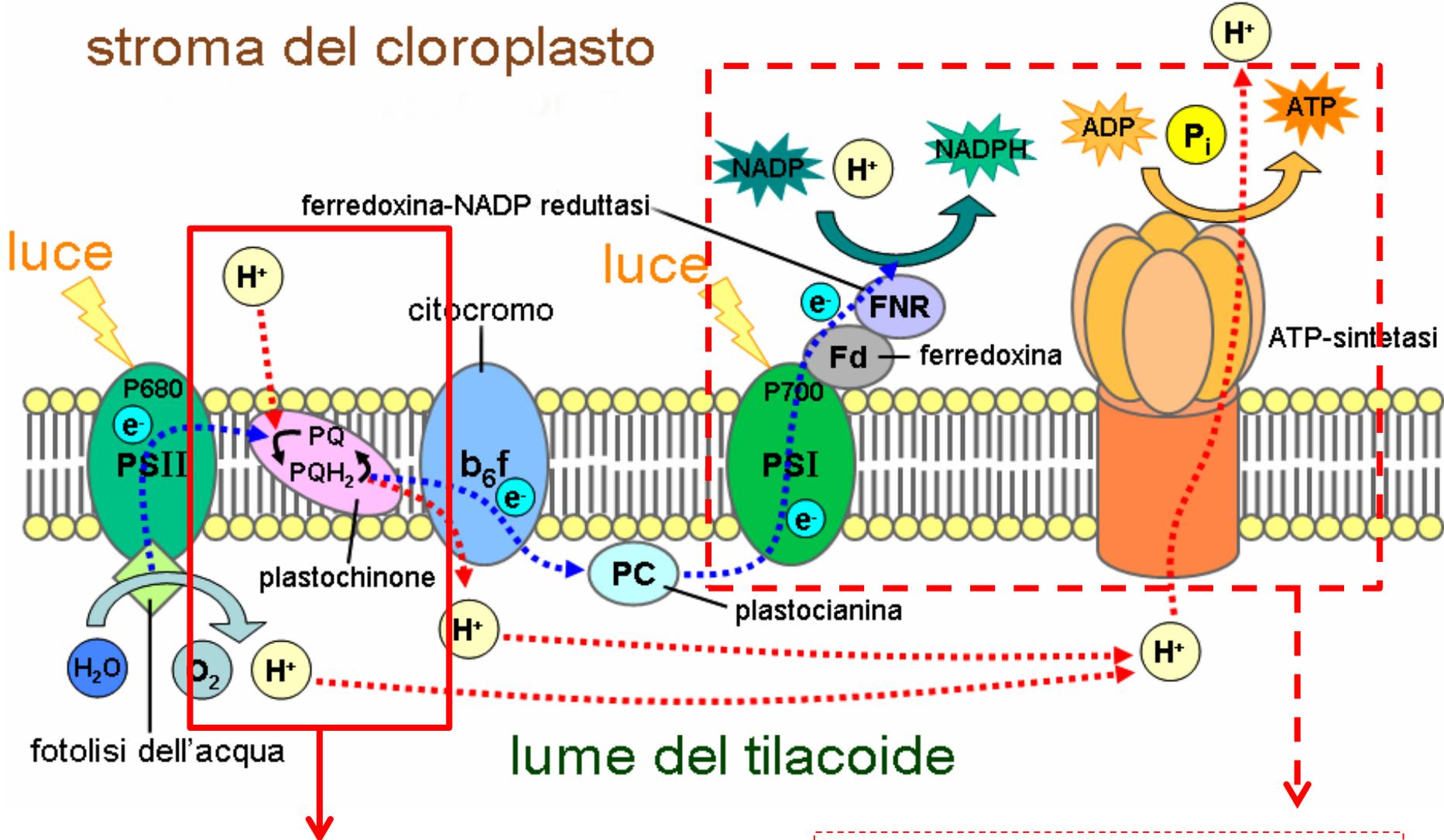
“FOTOFOSFORILAZIONE CICLICA”

La ferrodossina ridotta può tornare a ridurre, invece del NADP^+ , lo stesso P700 con l'intermediazione del complesso Citocromo bf e della plastocianina.

Il trasporto ciclico entra in scena soprattutto quando è elevato il rapporto $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (cioè è molto più presente NADPH), e di conseguenza la Fd-NADP^+ ossidoreduttasi ha difficoltà a ridurre il NADP^+ .

Questo trasporto ciclico induce un accumulo di protoni sul lato luminale della membrana per azione del complesso citocromico. Il gradiente così prodotto può servire a sintetizzare **ATP** da ADP e P_i (“fosforilazione ciclica”). Pertanto l'unico prodotto di queste reazioni è l'**ATP**; ad esse partecipa il solo fotosistema I e non si nota alcun effetto Emerson.

stroma del cloroplasto

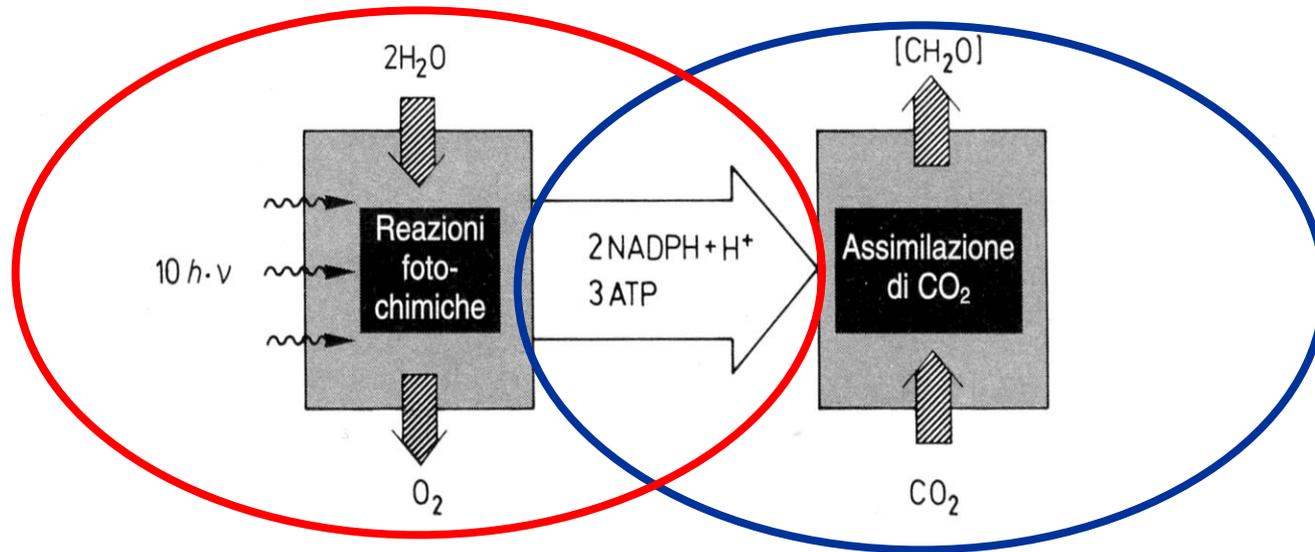


Catena di trasporto e^- , perdita di energia \rightarrow livello energetico inferiore
Energia persa \rightarrow pompaggio H^+ da stroma a lume (contro gradiente!) = gradiente H^+

gradiente H^+ sfruttato da ATP-synthase ($ADP \rightarrow ATP$, ogni 2 e^-)

FASE LUMINOSA

FASE OSCURA



Dipendenza dell'assimilazione fotosintetica di CO₂ 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

Vi predominano 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.

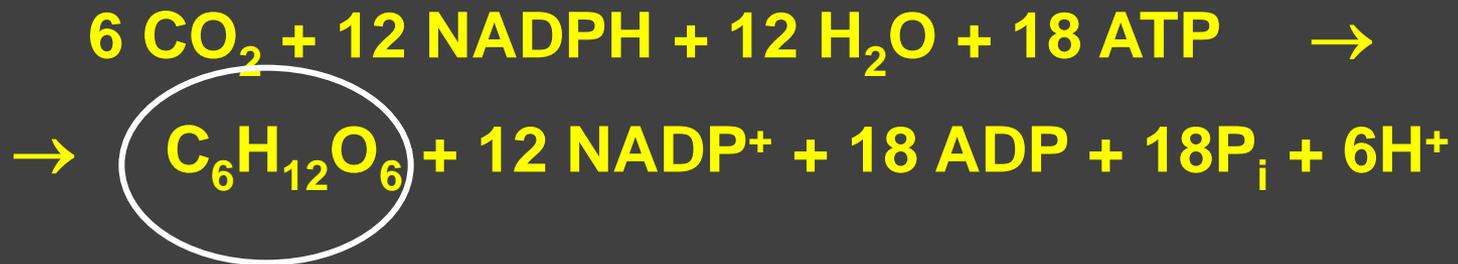
Il tutto avviene nello STROMA, dove i prodotti finali si accumulano se i processi di “esportazione” sono più lenti di quelli di produzione.



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

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

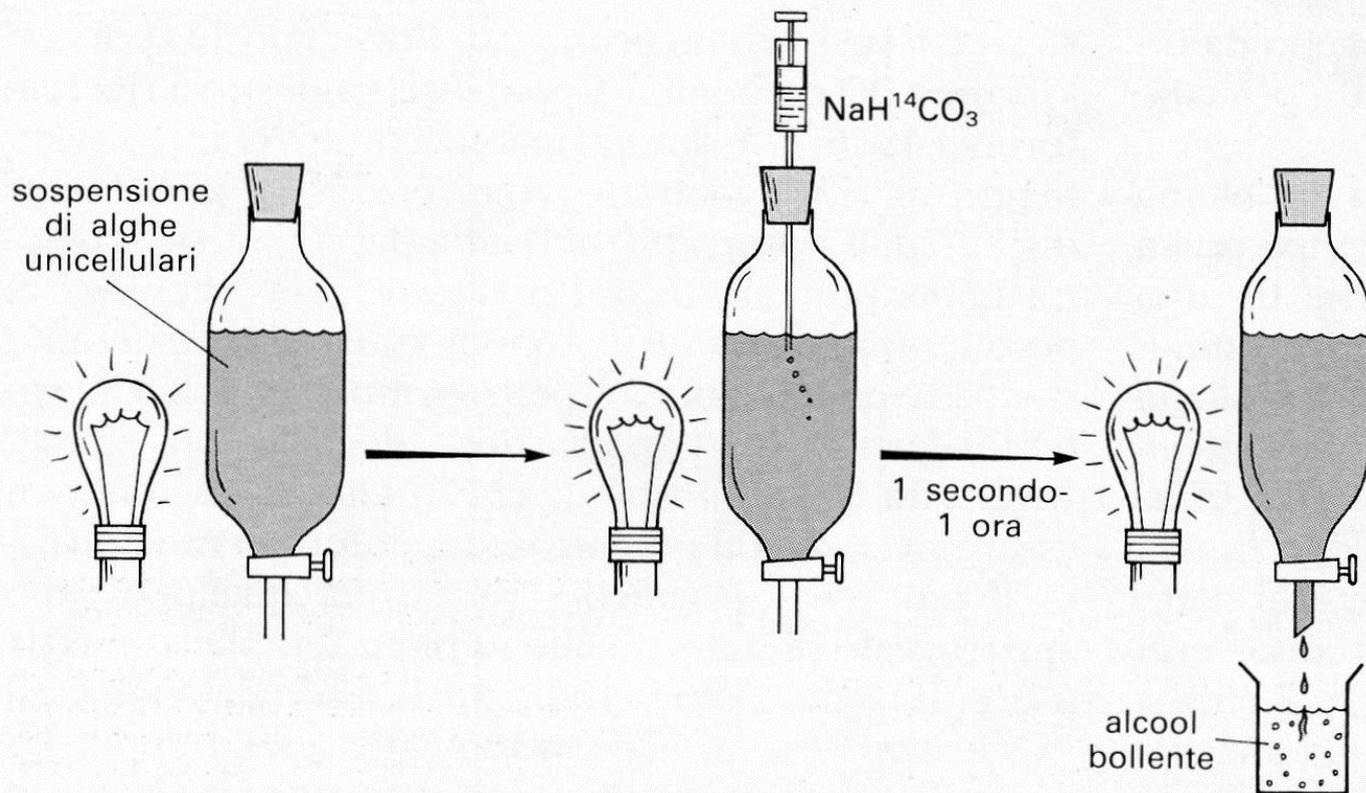
Le reazioni possono essere così riassunte:



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.

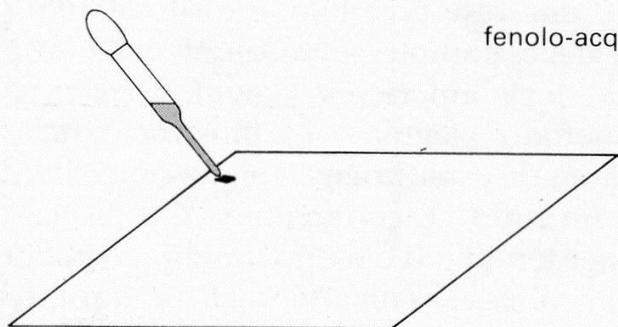
Siamo negli anni '50, la II guerra mondiale è terminata da poco e ha messo a disposizione i radioisotopi, grazie allo studio dell'atomo.



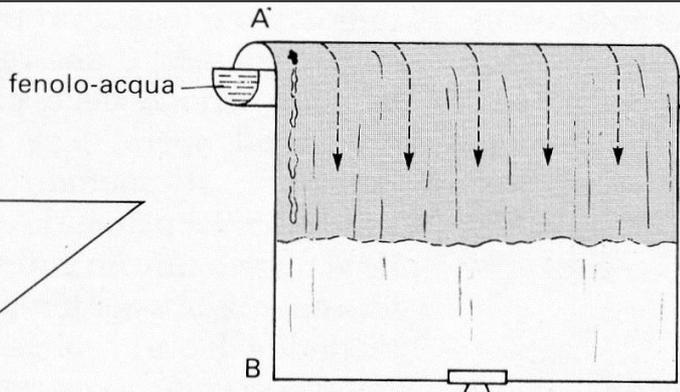
1 - Il recipiente contiene una sospensione di alghe verdi le quali fotosintetizzano usando la CO_2 atmosferica non radioattiva sciolta nell'acqua.

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

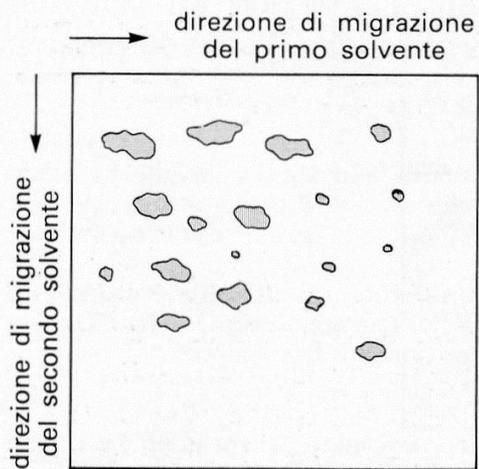
3 - Passato un certo intervallo dalla somministrazione di CO_2 radioattiva si apre il rubinetto. Una parte della sospensione cade nell'alcool bollente. I composti a piccola molecola contenuti nelle cellule (zuccheri, amminoacidi, ecc.) passano in soluzione nell'alcool. L'operazione viene ripetuta varie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



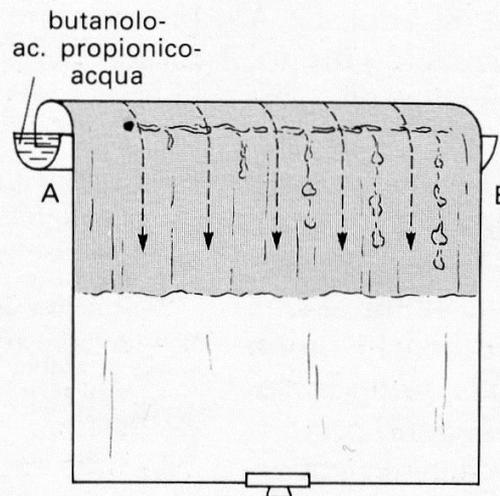
4 - Una piccola quantità dell'estratto alcoolico di alghe viene applicata vicino a un angolo di un foglio di carta cromatografica.



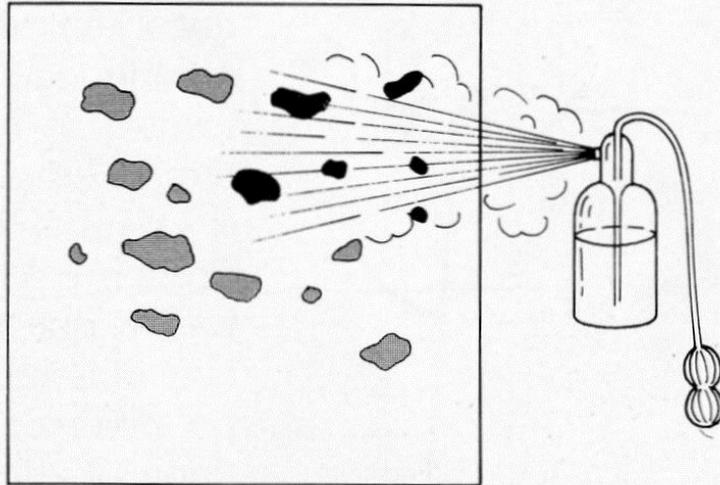
5 - Un lato del foglio pesca in una vaschetta contenente un solvente il quale migra lungo la carta trascinandosi dietro per diverse distanze le varie sostanze contenute nell'estratto, le quali in questo modo vengono parzialmente separate.



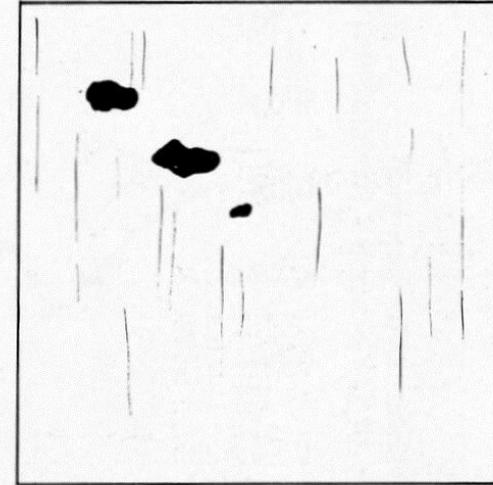
7 - Terminata la separazione cromatografica a ogni sostanza contenuta nell'estratto corrisponde una macchia in una determinata posizione. Ma tutte queste macchie sono praticamente invisibili.



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.

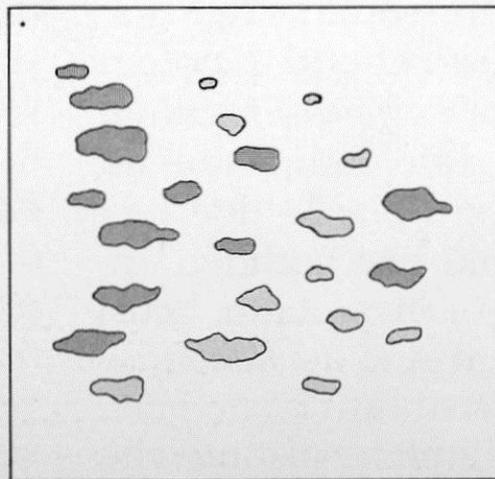


9 – Alternativamente il foglio di carta cromatografica viene coperto con una lastra fotografica e lasciato al buio per alcune settimane. Le radiazioni emesse dal ^{14}C incorporato nei vari composti impressionano la lastra che viene poi sviluppata. In questo modo vengono messe in evidenza solo le sostanze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

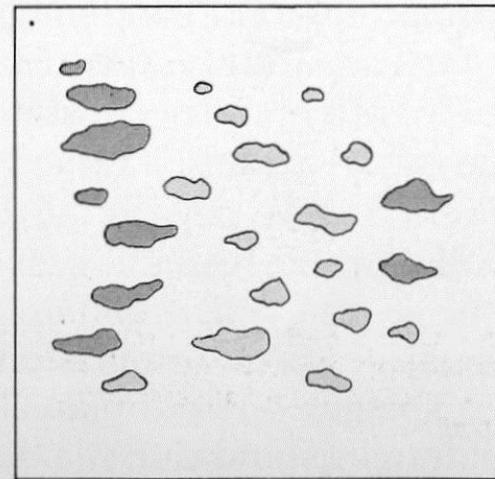
I composti marcati con il ^{14}C vennero quindi separati e identificati a seconda della posizione che raggiungono in una cromatografia bidimensionale su carta. In questo modo, vennero identificati come intermedi del processo della fissazione numerosi acidi e zuccheri fosfati.



identificazione delle
sostanze attraverso
reazioni chimiche che
generano composti colorati



1" dopo l'immissione
di CO₂ radioattiva

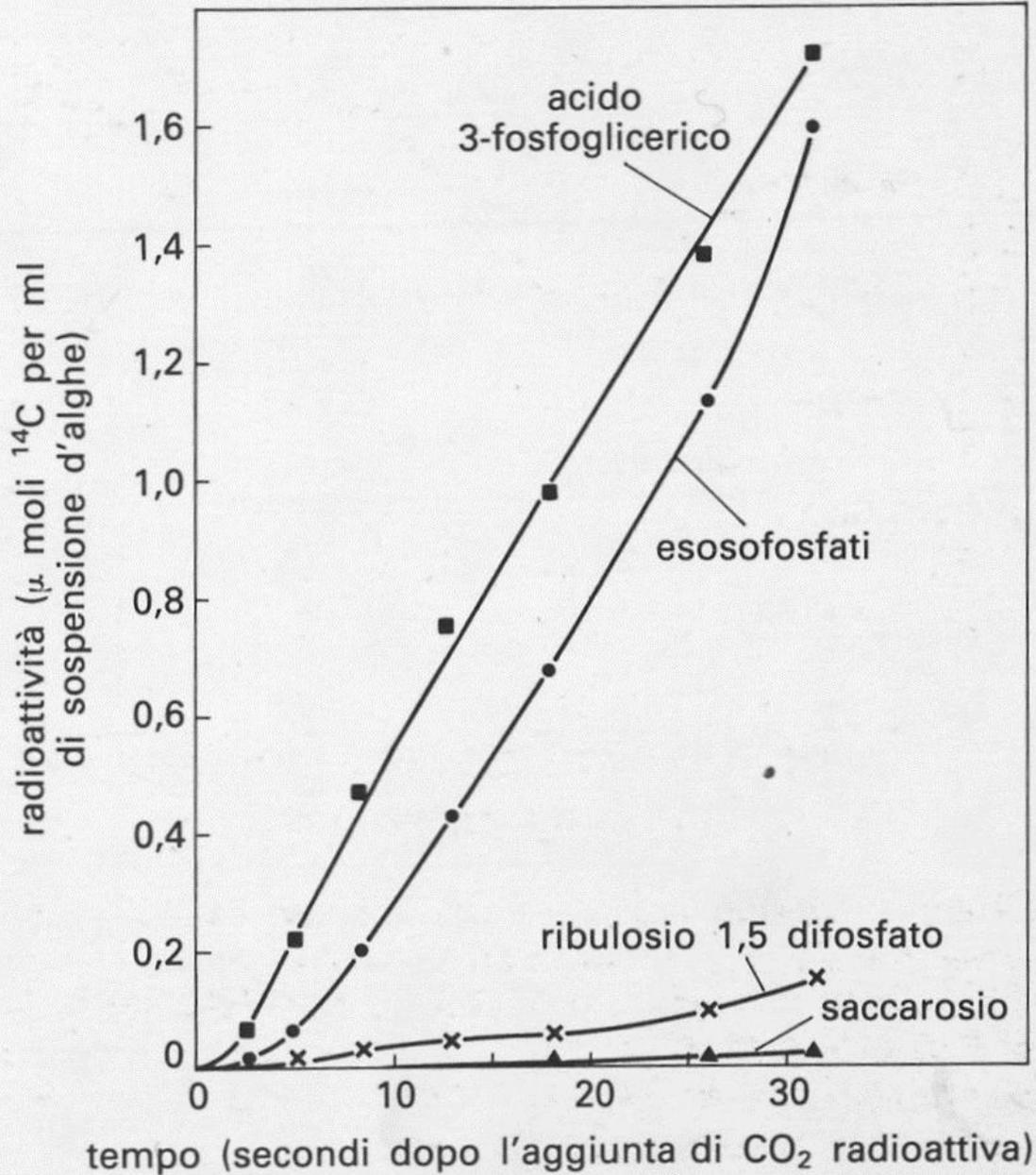


10" dopo l'immissione
di CO₂ radioattiva

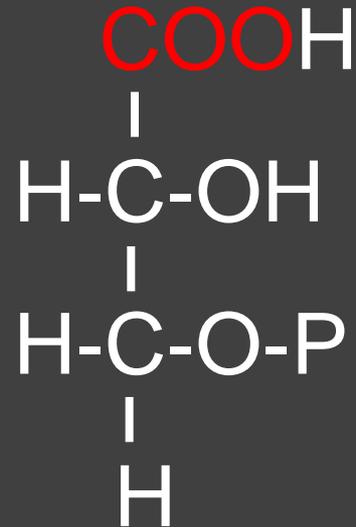
A questo punto furono progressivamente ridotti i
tempi di esposizione



Chlorella



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.

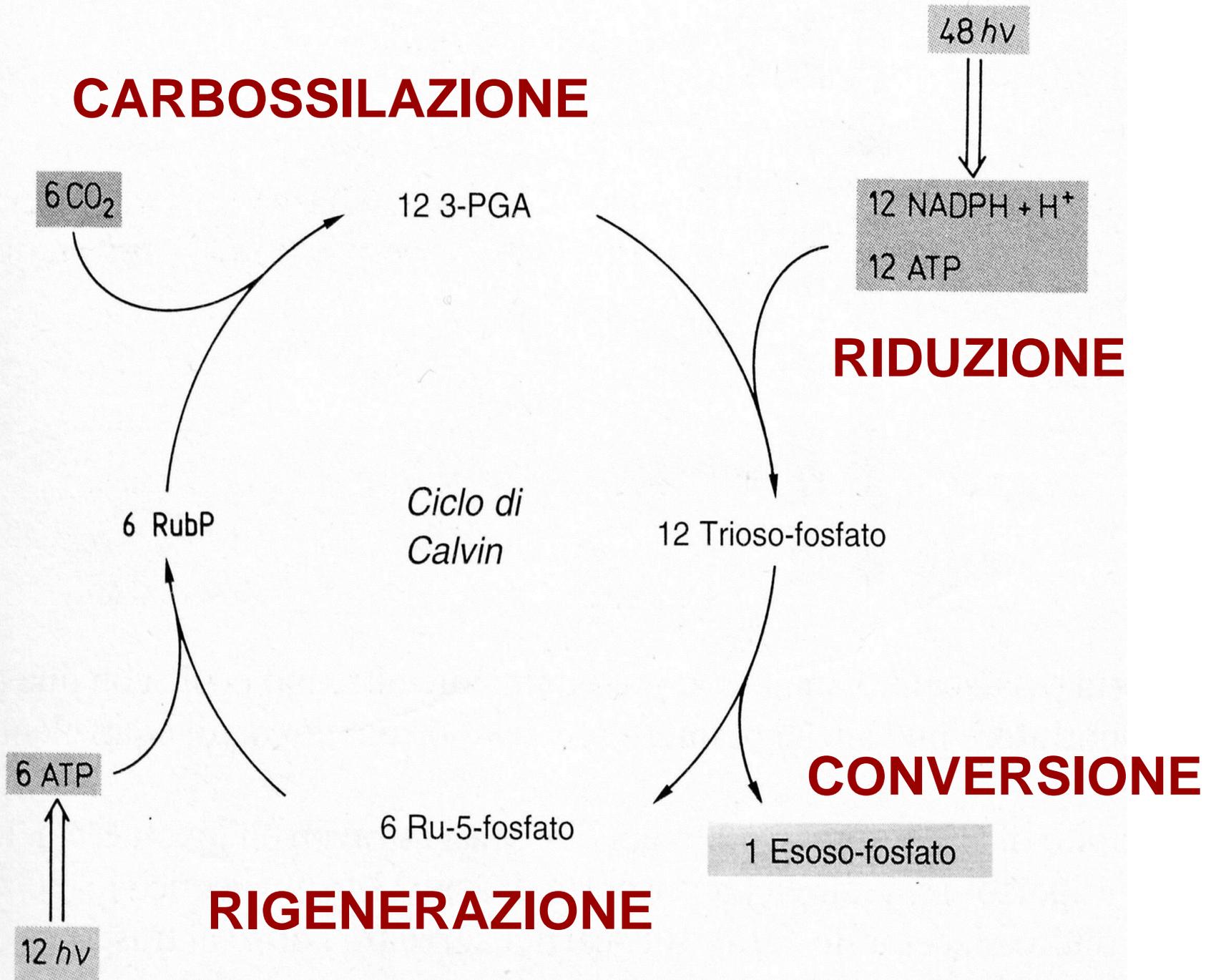


La susseguente scoperta che i pentosi monofosfati partecipassero al ciclo suggerì la possibilità che l'accettore iniziale della CO₂ fosse un composto a 5 atomi di C che, dopo aver reagito con la CO₂, generava 2 molecole di acido 3-fosfoglicerico.



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.

CARBOSSILAZIONE



RIDUZIONE

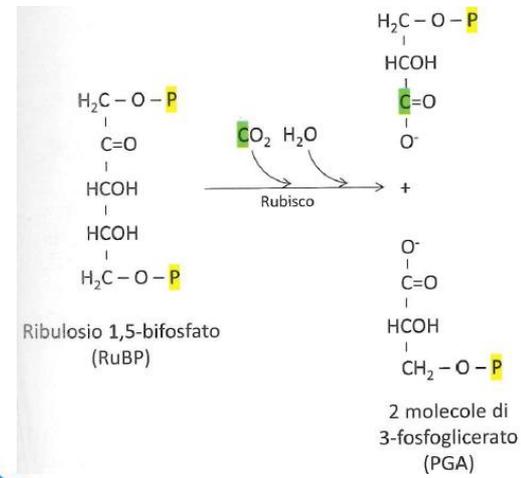
CONVERSIONE

RIGENERAZIONE

Ciclo di Calvin

Ciclo di Calvin – ciclo C3

CARBOSSILAZIONE



3 x CO₂ → 3 x intermedio instabile (6C)

3 x Ribulosio 1,5-bifosfato (5C)

6 x 3-Fosfoglicerato (3C)

Ciclo di Calvin

6 ATP → 6 ADP + Pi

6 x 1,3-Bifosfoglicerato (3C)

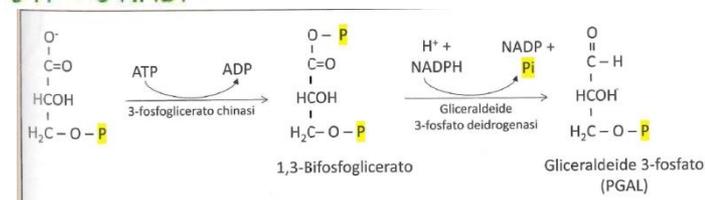
RIDUZIONE

6 NADPH → 6 H⁺ + 6 NADP⁺

6 x Glicer aldeide 3-fosfato (3C)

CONVERSIONE

Zuccheri e altri metaboliti



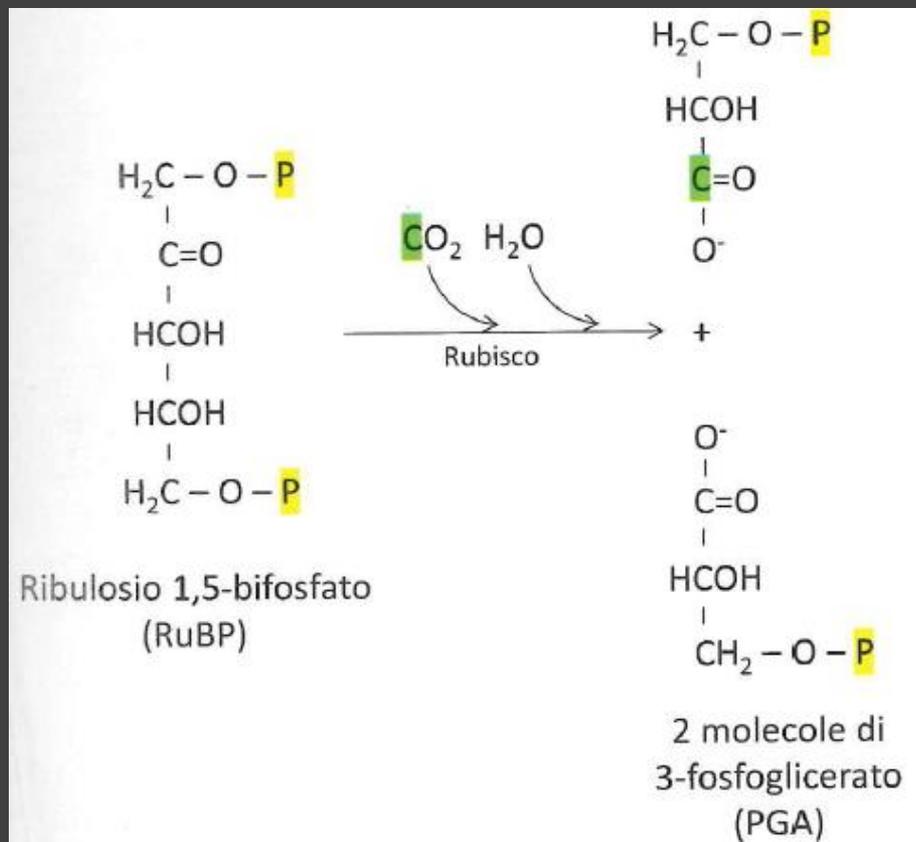
RIGENERAZIONE

3 ADP + Pi → 3 ATP

5 molecole di glicer aldeide 3-fosfato vengono impiegate per rigenerare ribulosio 1,5-bifosfato, mentre una molecola è utilizzata per sintetizzare zuccheri ed altri metaboliti

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 instabile, che si decompone quasi istantaneamente per idrolisi dando due molecole di **acido 3-fosfoglicerico (PGA)**.



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.

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.

PRIMI EVENTI DELLA FASE OSCURA: la riduzione del PGA

Gli stadi del processo che portano da **PGA** a **glucosio** 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**.

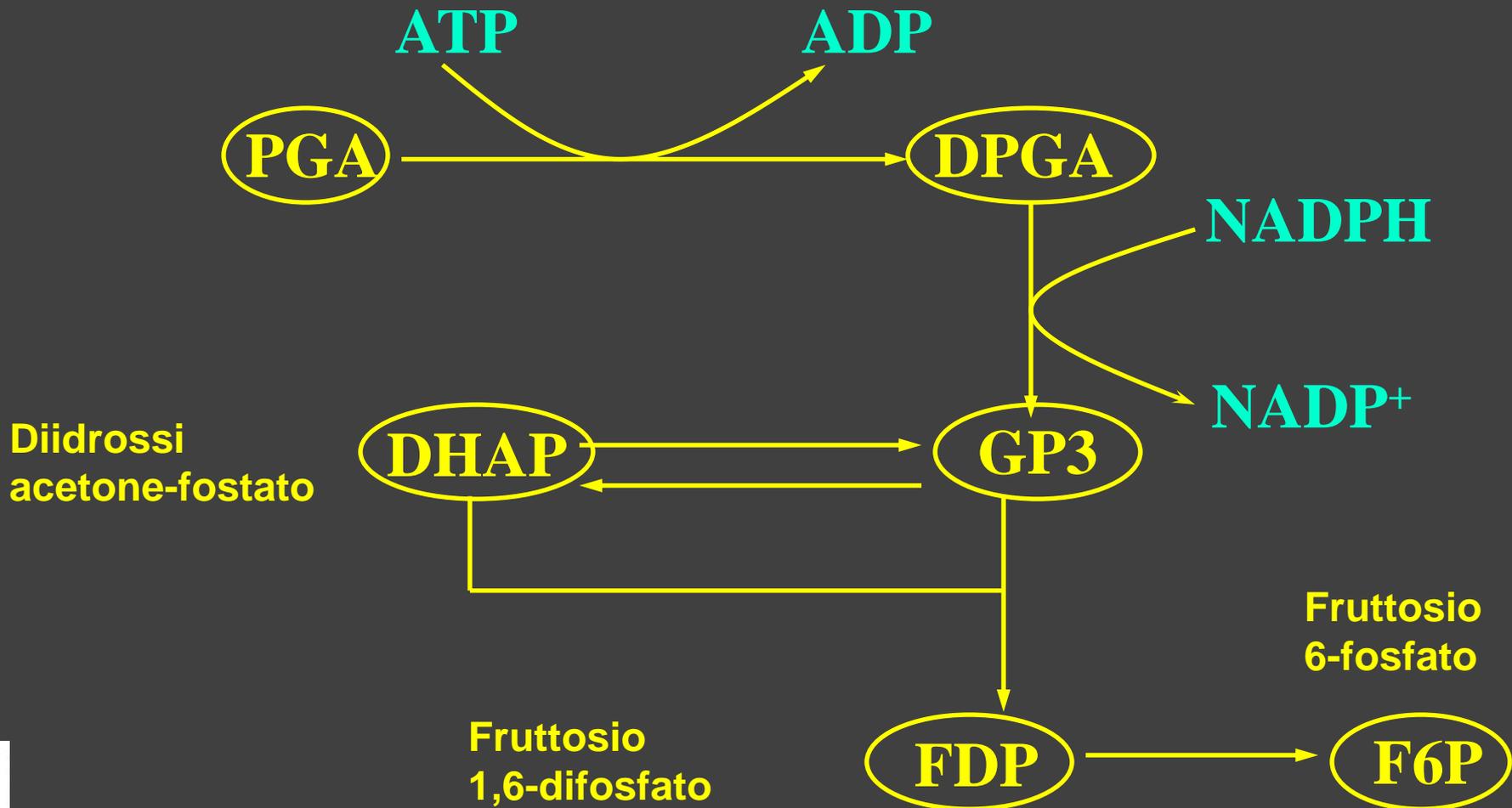
Questo conferma la regola secondo la quale **NAD** è il tipico coenzima delle vie metaboliche degradative in cui prevalgono le ossidazioni, mentre **NADP** è il tipico coenzima delle vie biosintetiche in cui prevalgono le riduzioni.

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



Reazioni di 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**.



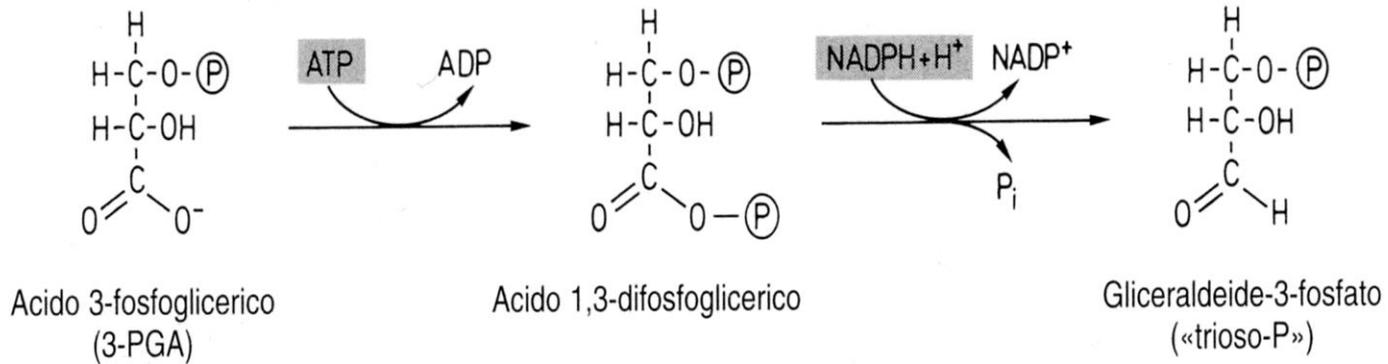


Figura 8.13 Riduzione dell'acido 3-fosfoglicerico a gliceraldeide-3-fosfato nel *ciclo di CALVIN*. La sequenza di reazione corrisponde alla reazione inversa della gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi, rappresentata nella Figura 6.6. Nel *ciclo di CALVIN*, tuttavia, il cofattore utilizzato è il NADP^+ in luogo del NAD^+ .

Conversione della GP3 in glucosio

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

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 **glucosio**, 6 molecole di **CO₂** si combinano con 6 di **RuDP** per formarne 12 di **PGA**.

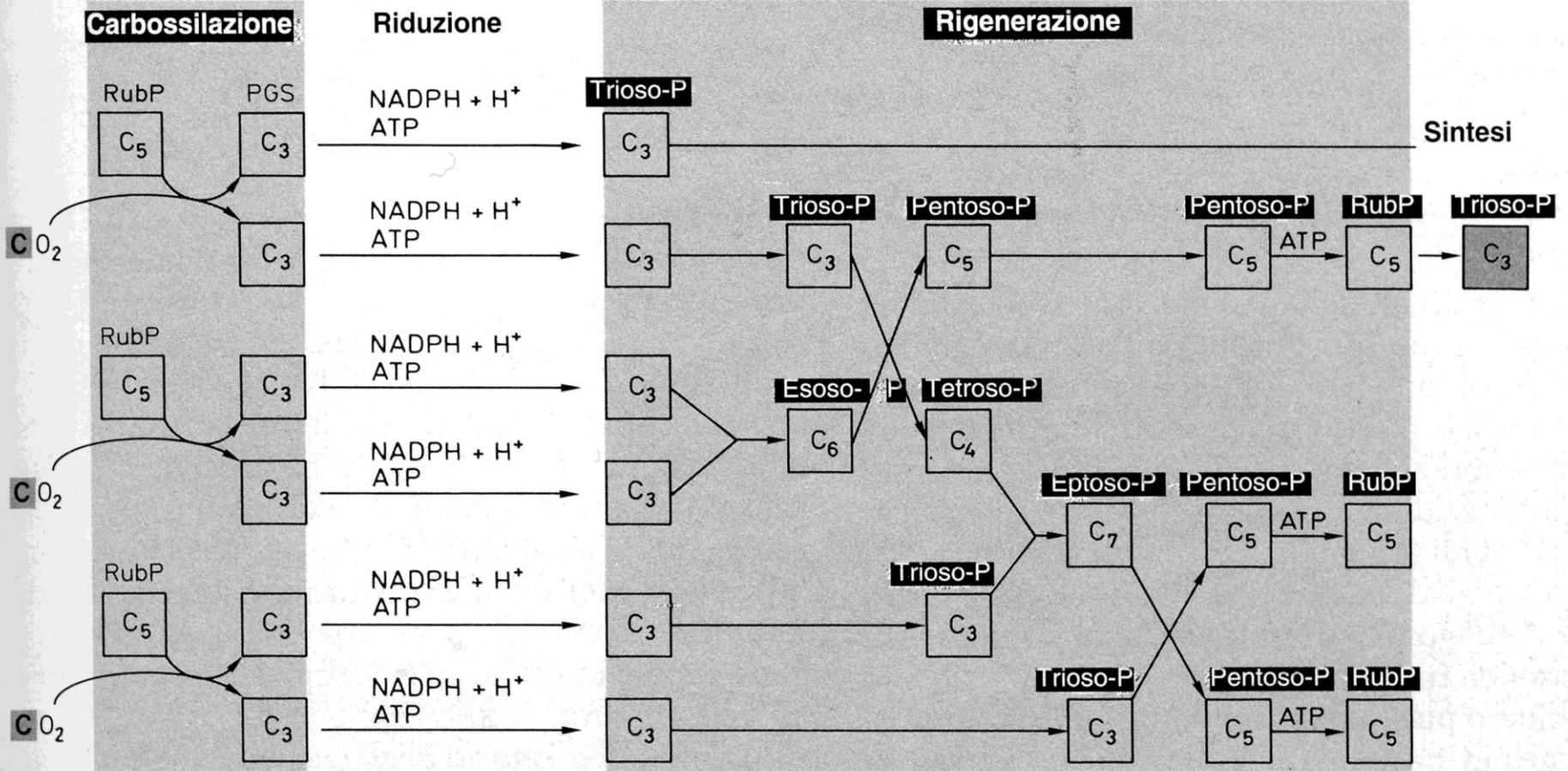
Le 12 molecole di **GP3** potrebbero formare 6 molecole di glucosio; in questo caso però il processo non sarebbe ciclico e si arresterebbe appena la scorta di **RuDP** fosse esaurita.

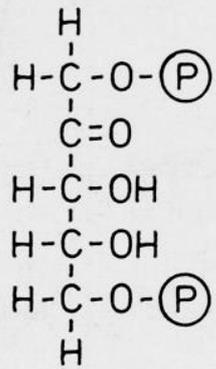
Solo 2 molecole di **GP3** sono destinate alla sintesi del glucosio, mentre le altre dieci (!!!) possono proseguire il ciclo per diventare, alla fine, 6 molecole di **RuDP**, pronte ad essere utilizzate di nuovo («rigenerazione del substrato»).

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

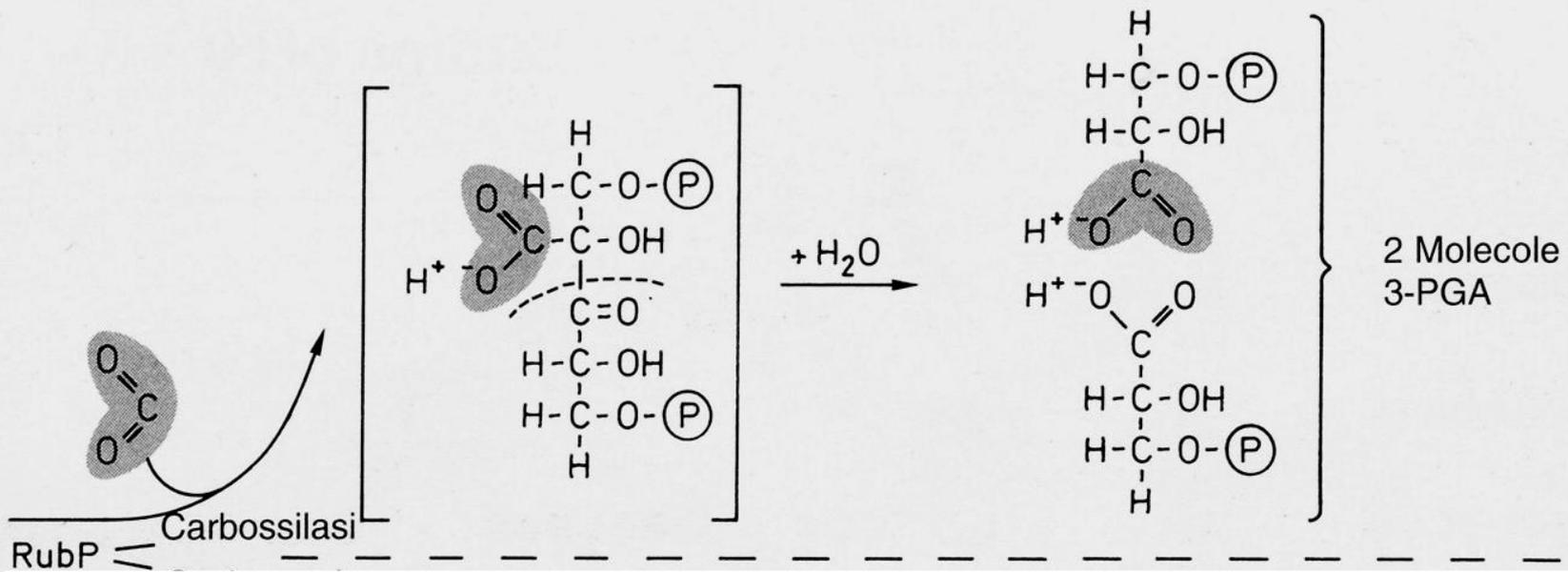
Rigenerazione del RuDP

Le reazioni di rigenerazione di RuDP comprendono alcuni passaggi relativamente complessi che coinvolgono zuccheri fosfati a 4, 5, 6, 7 atomi di C.

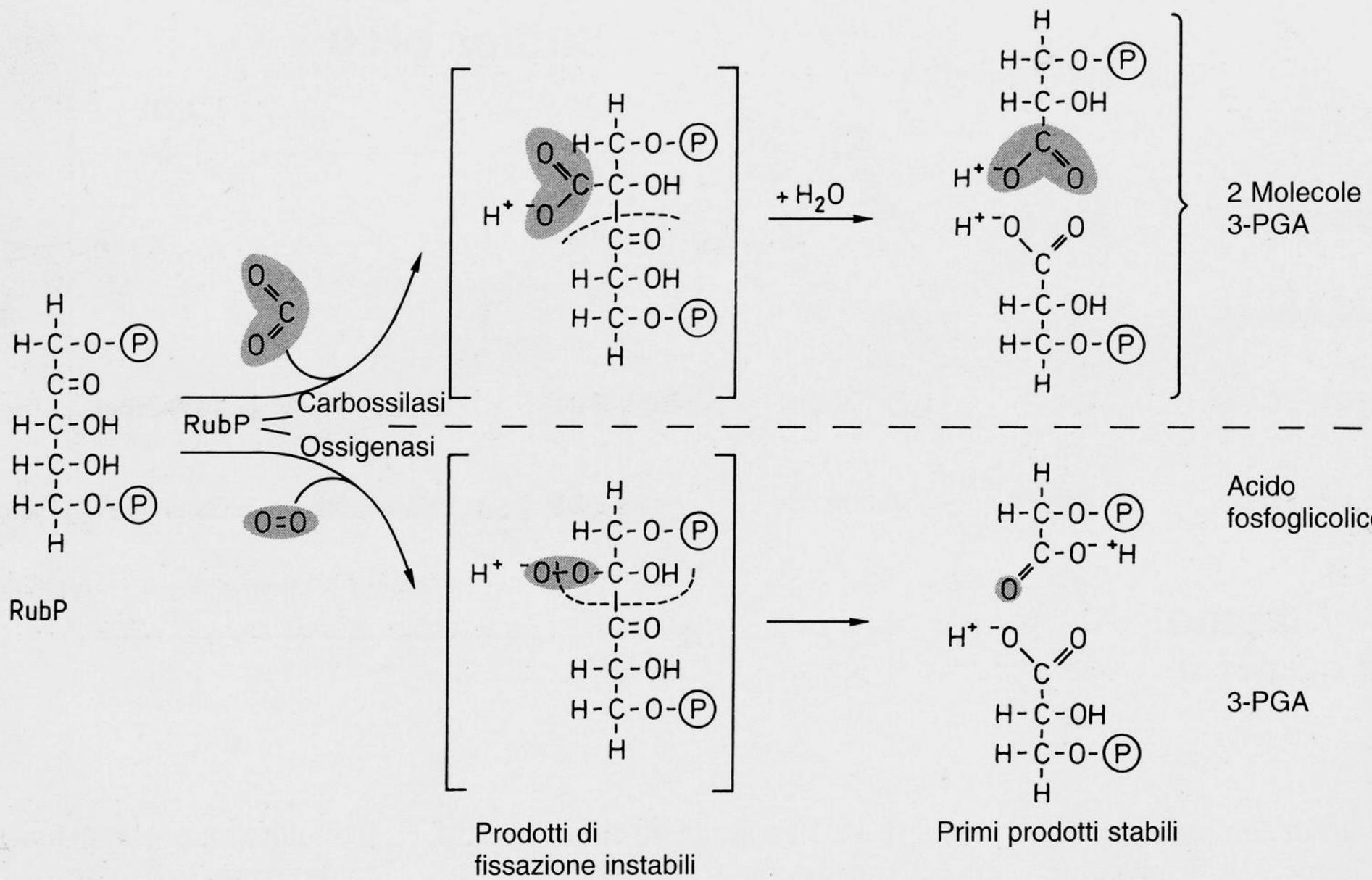




RubP

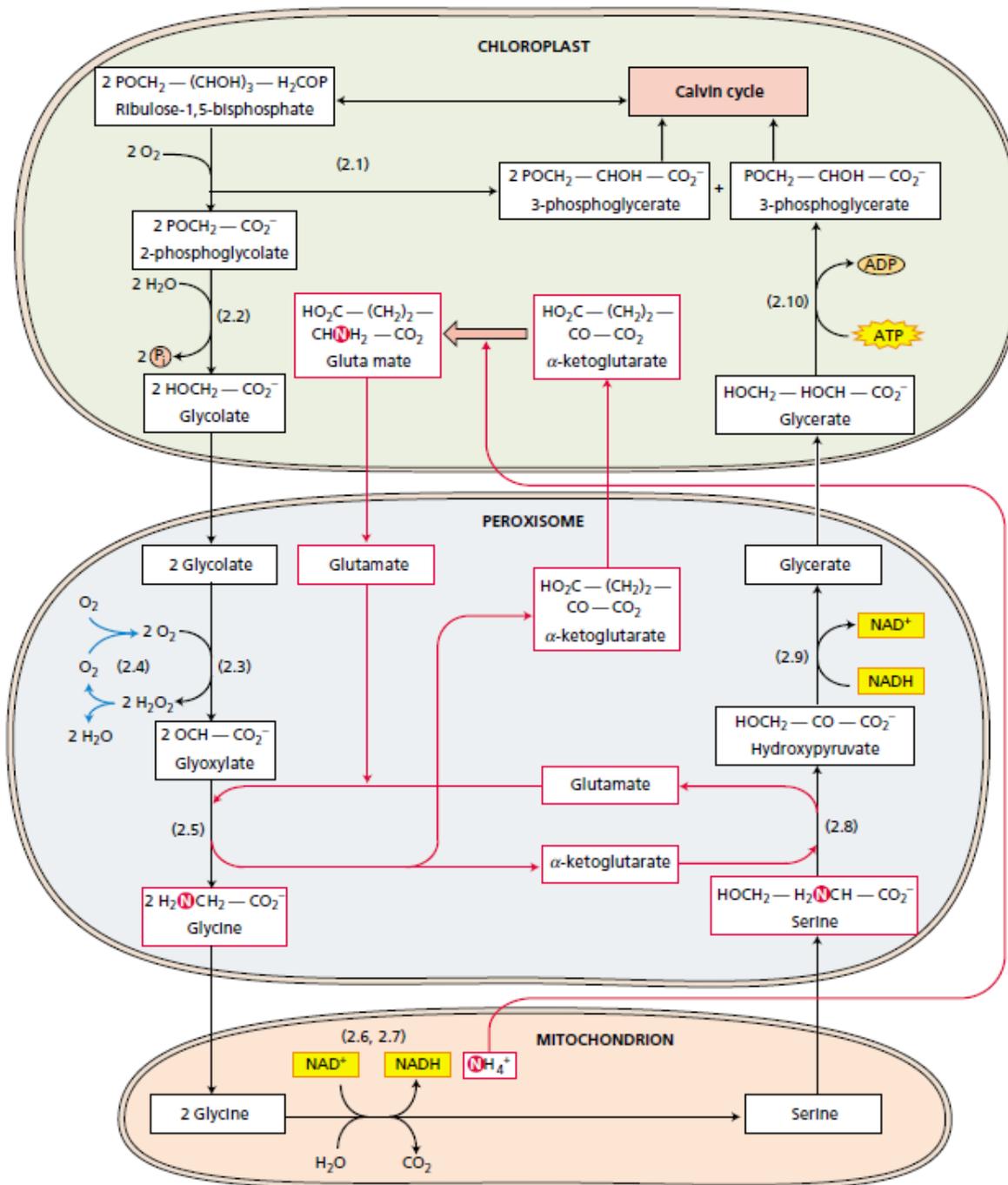


FOTORESPIRAZIONE...



La capacità di catalizzare l'ossigenazione del ribulosio-1,5-bisfosfato è una proprietà di tutte le Rubisco, indipendentemente dall'origine tassonomica. Anche la Rubisco da batteri anaerobici autotrofi catalizza la reazione dell'ossigenasi quando esposta all'ossigeno.

Come substrati alternativi per la Rubisco, CO₂ e O₂ competono per la reazione con ribulosio-1,5-bisfosfato perché all'interno dello stesso avvengono la carbossilazione e l'ossigenazione del sito attivo dell'enzima. Offrendo uguali concentrazioni di CO₂ e O₂ in provetta, le Rubisco delle angiosperme fissano la CO₂ circa **80 volte** più velocemente di quanto si ossigenano. Tuttavia, in una soluzione acquosa in equilibrio con l'aria a 25°C ha un rapporto CO₂:O₂ di 0,0416. A queste concentrazioni, la carbossilazione nell'aria supera l'ossigenazione con uno scarso tre a uno.



Pertanto, nel complesso, due molecole di fosfoglicolato (quattro atomi di carbonio), persi dal ciclo di Calvin per ossigenazione di RuBP, vengono convertiti in una molecola di 3-fosfoglicerato (tre atomi di carbonio) e uno di CO₂. In altre parole, 75% del carbonio perso dall'ossigenazione del ribulosio-1,5-bifosfato viene recuperato dalla fotosintetica ossidativa C₂ ciclo del carbonio e ritornò al ciclo di Calvin (Lorimer 1981).