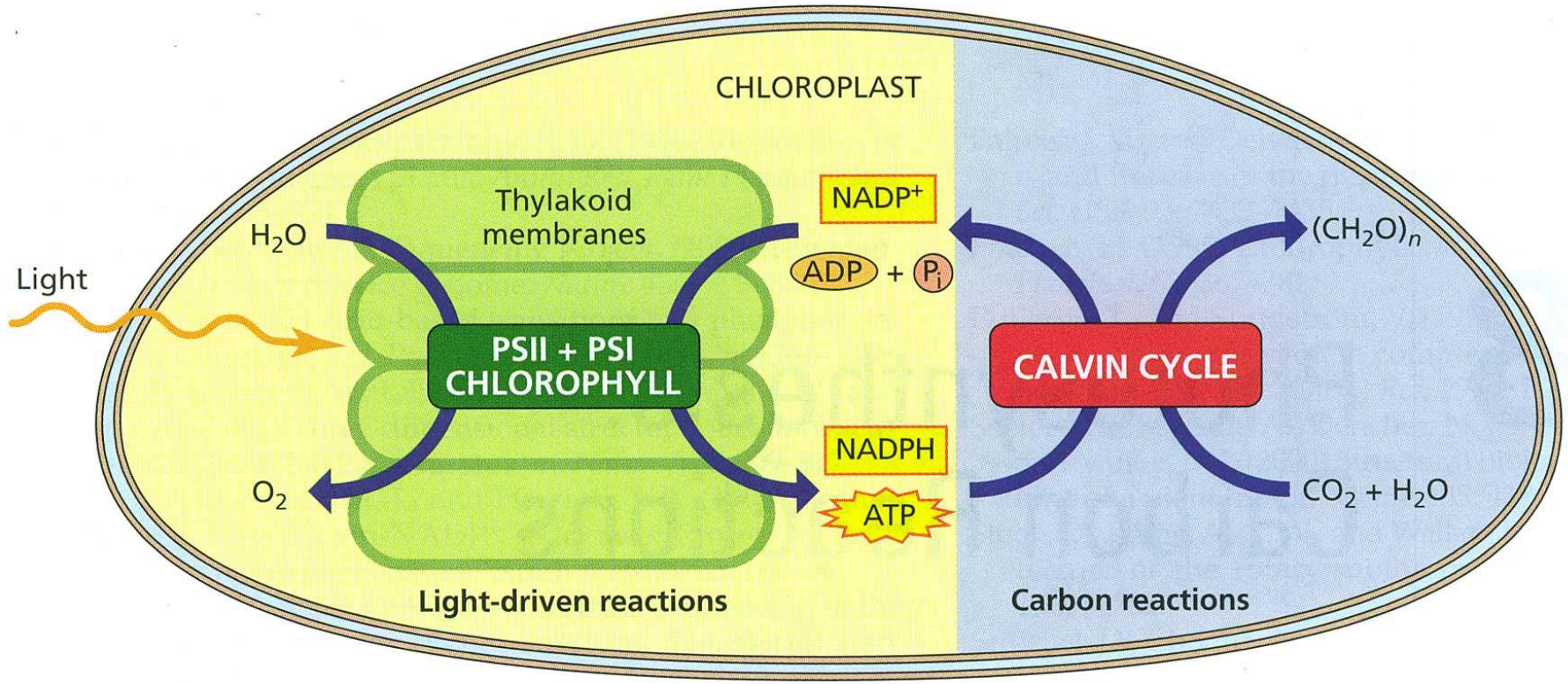
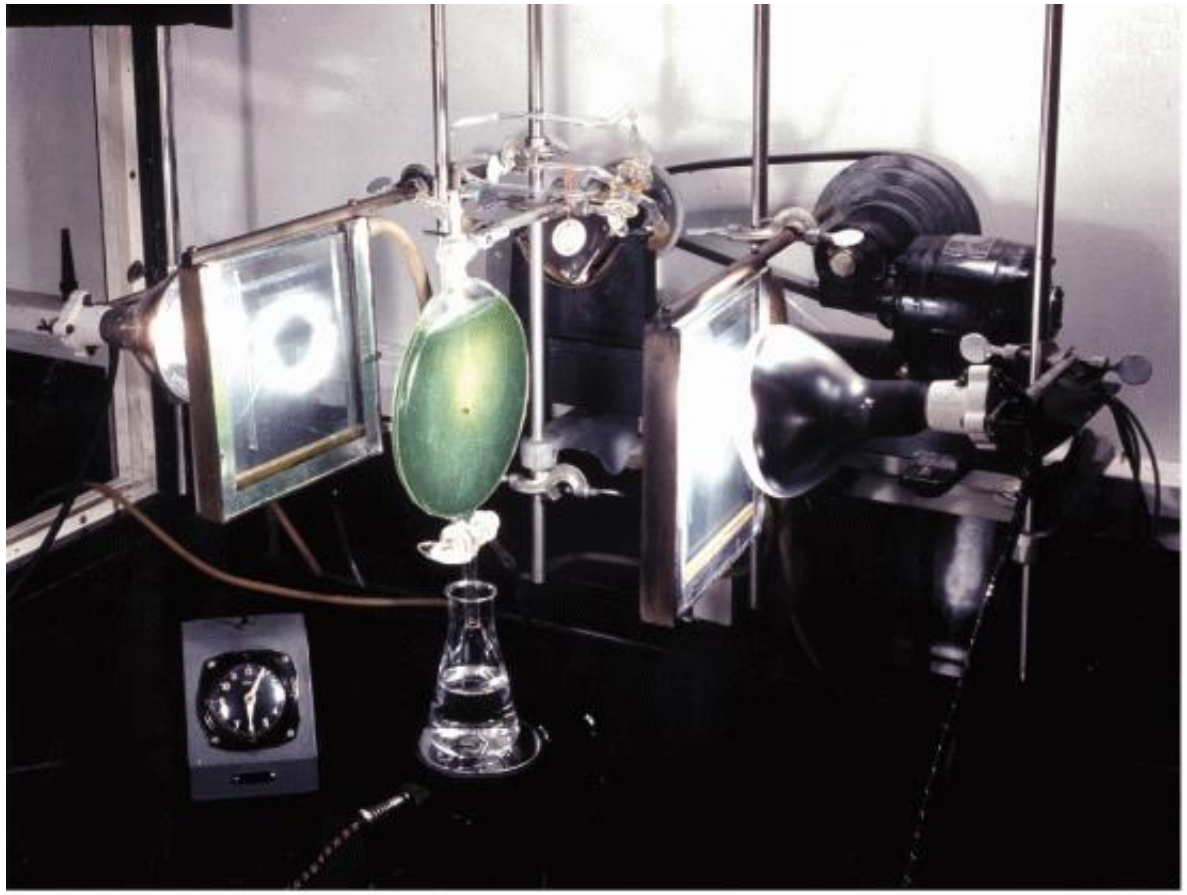
LE REAZIONI DI FISSAZIONE DEL CARBONIO



Energia della luce → Energia biochimica → Organicazione del carbonio

CICLO DI CALVIN-BENSON

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



Nobel 1961

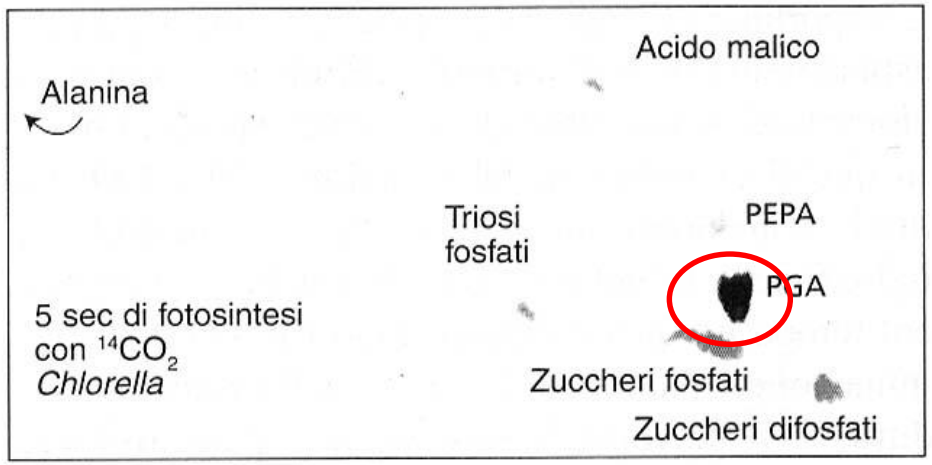
$^{14}CO_2$

↓

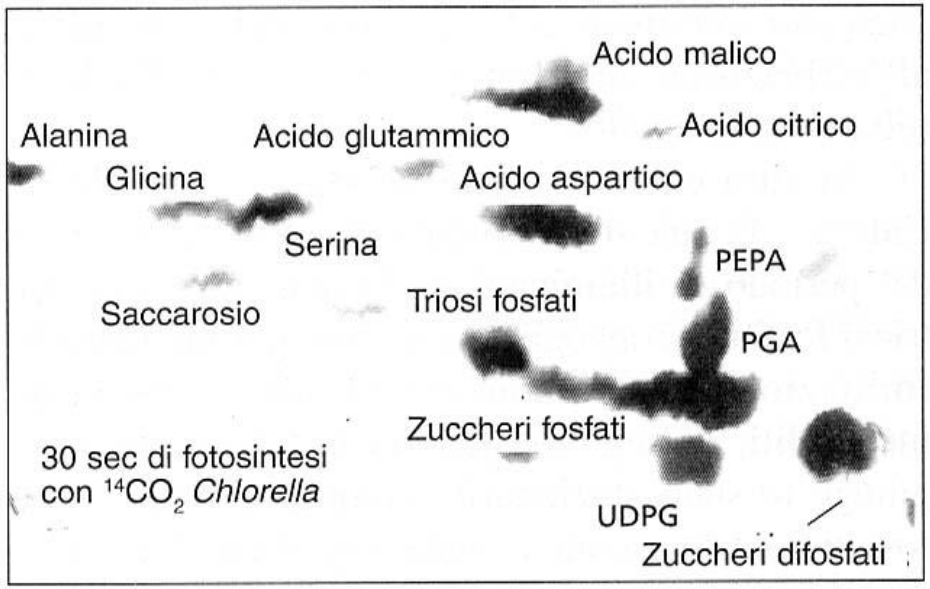
Chlorella

↓

Analisi intermedi marcati



dopo 5 s



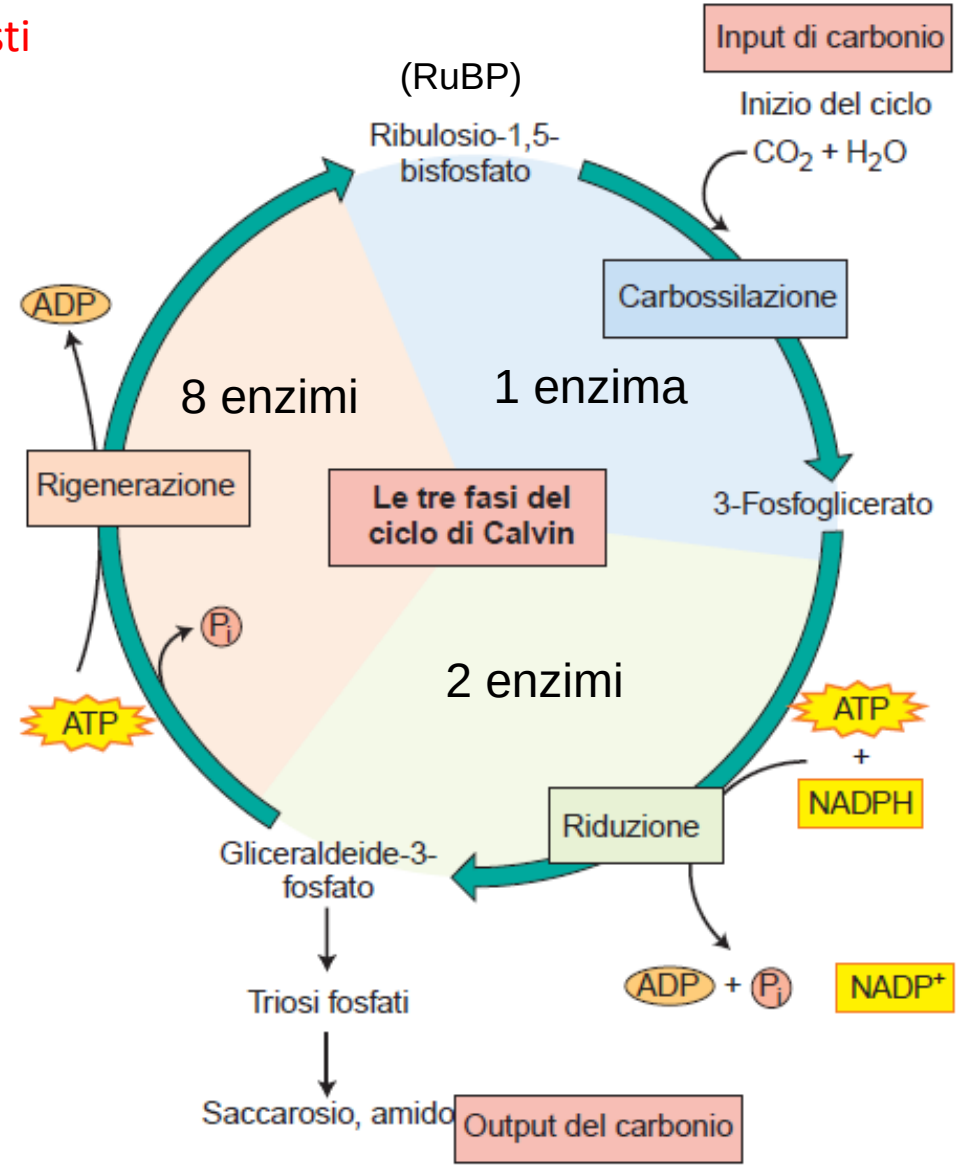
dopo 30 s

Stechiometria generale

6 CO_2 + 11 H_2O + **18** ATP + **12** NADPH $\rightarrow$ fruttosio 6-P + 12 $NADP^+$ + 6 H^+ + 18 ADP +17 P_i

Il ciclo di Calvin consuma 3 ATP e 2 NADPH per ogni molecola di CO_2 fissata

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

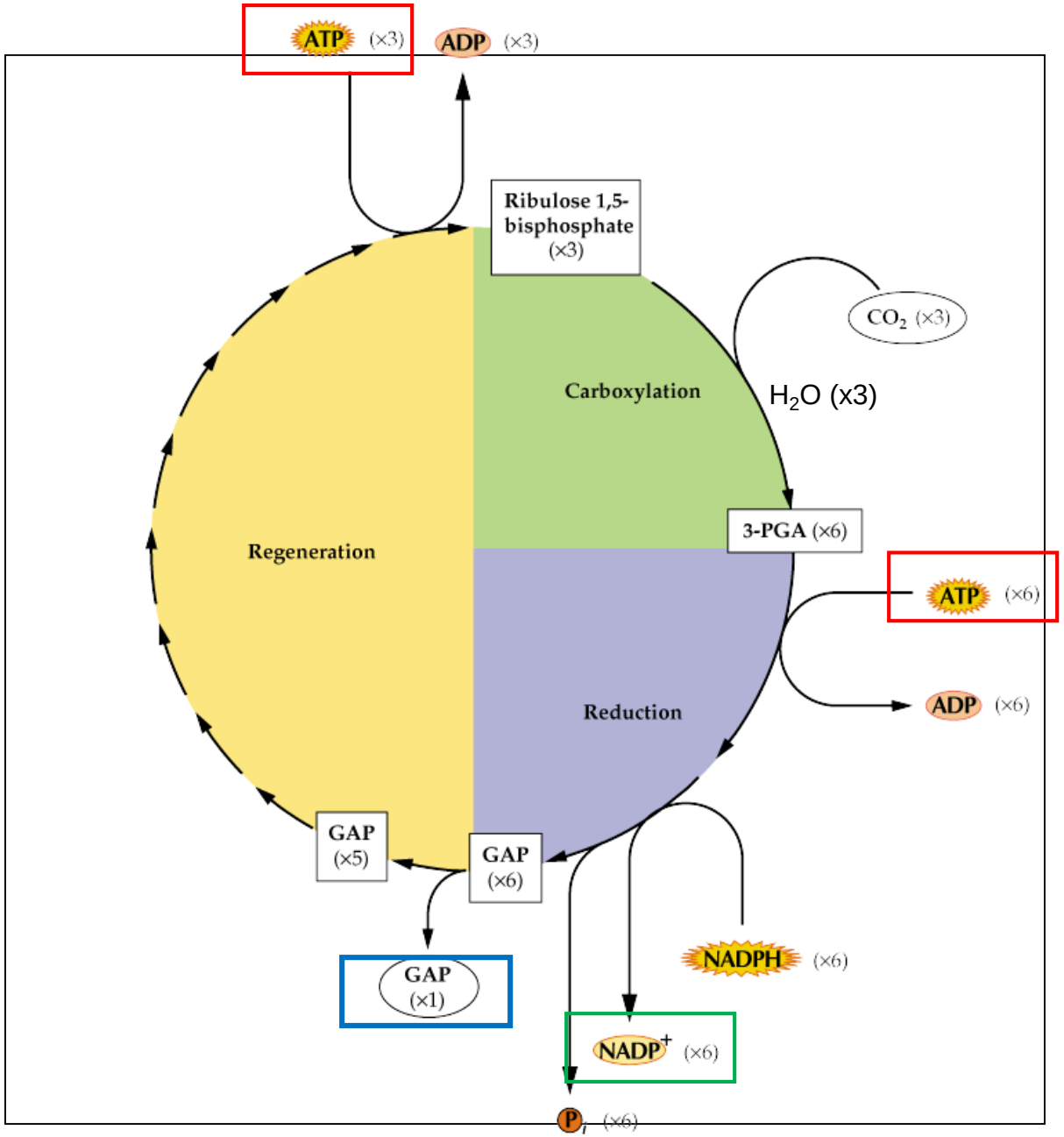


Per un guadagno netto di **1 GAP** (gliceraldeide-3-P):

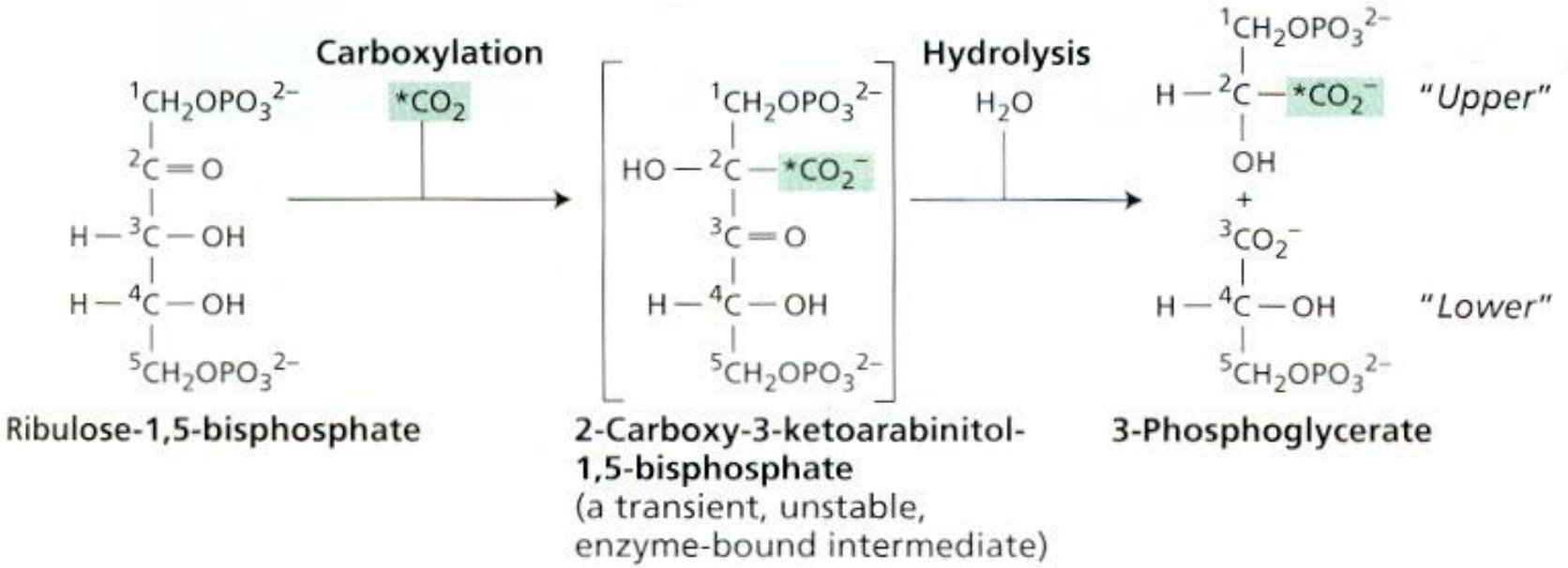
3 CO_2 fissati

9 (6+3) ATP

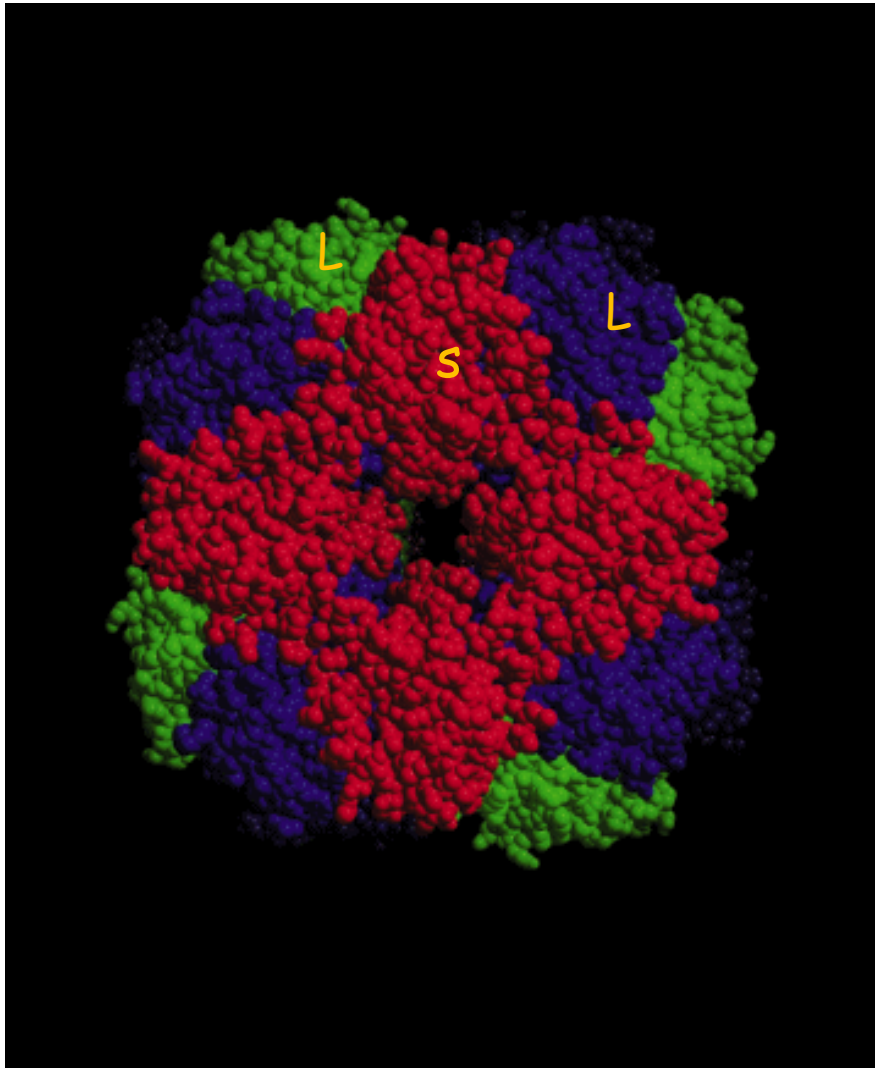
6 NADPH



La reazione di carbossilazione



Rubisco: Ribulosio 1,5 bifosfato carbossilasi/ossigenasi



Enzima multimerico: L_8S_8

560 kDa

8 subunità grandi (55 kDa)

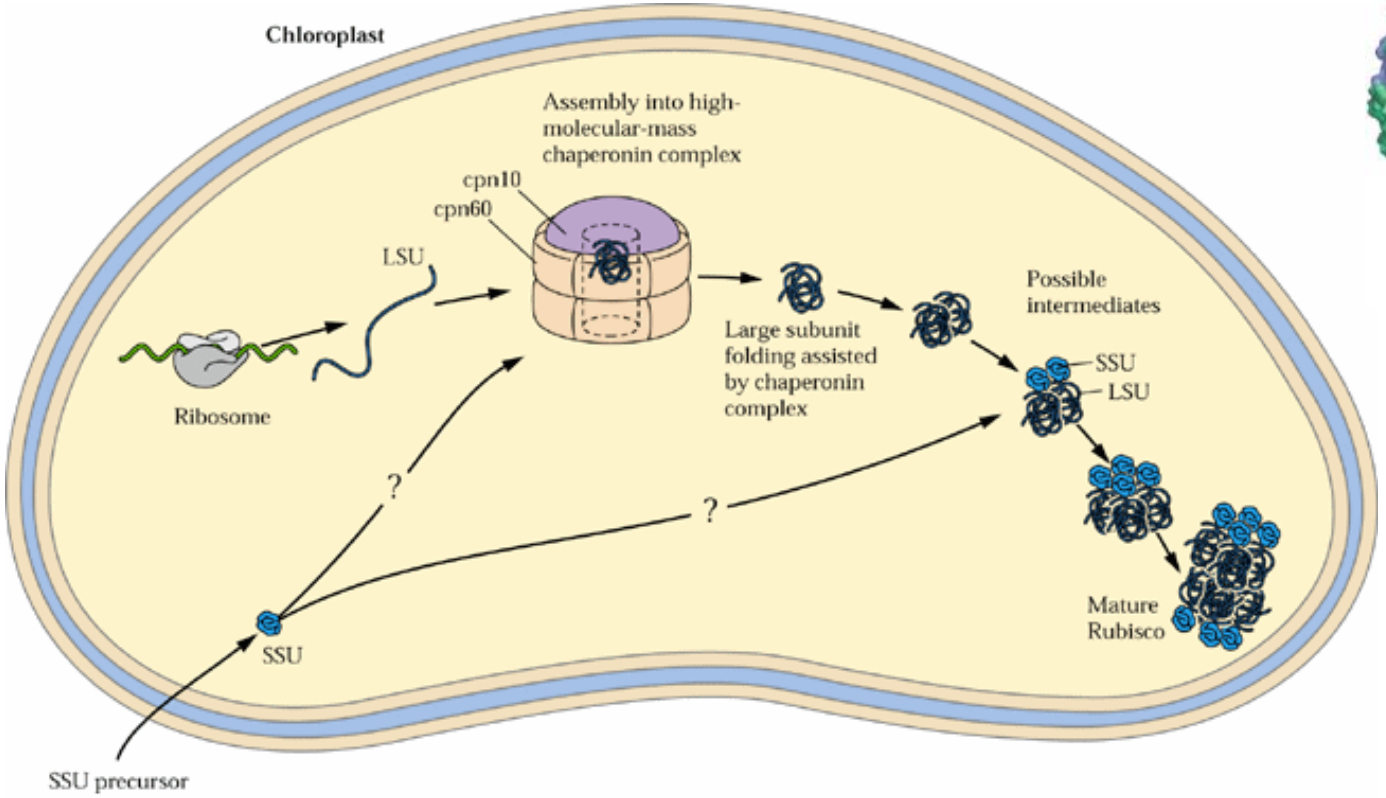
8 subunità piccole (14 kDa)

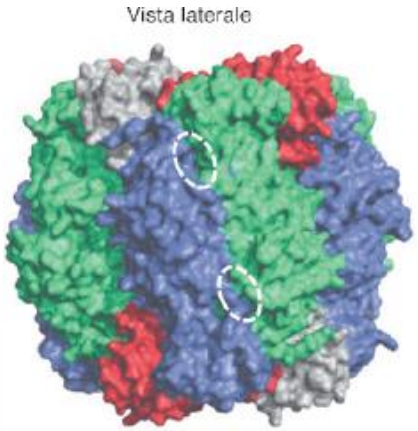
In alcuni batteri fotosintetici = L_2

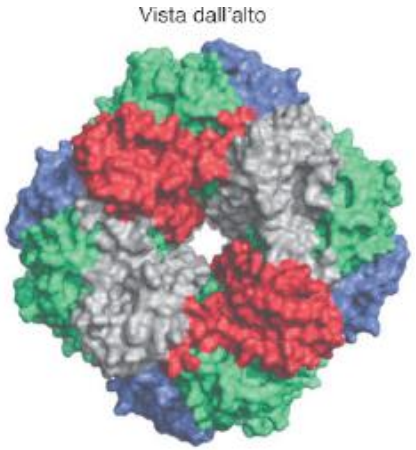
Luce

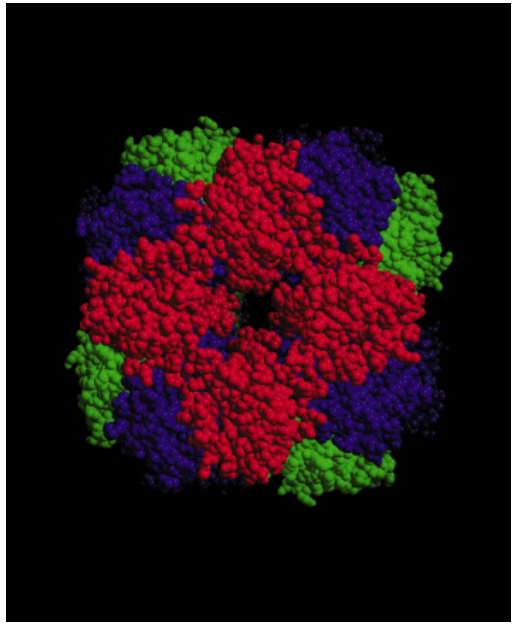
Genoma nucleo → rbcS (precursore subunità piccola)

Genoma cloroplasto → rbcL (subunità grande)









Costanti cinetiche della RUBISCO (a 25 °C)

K_m (CO_2) = 8-25 μM

K_m (O_2) = 360-650 μM

CO_2 in aria (0.04%) = CO_2 in soluzione (~12 μM)
O_2 in aria (21%) = O_2 in soluzione (~265 μM)

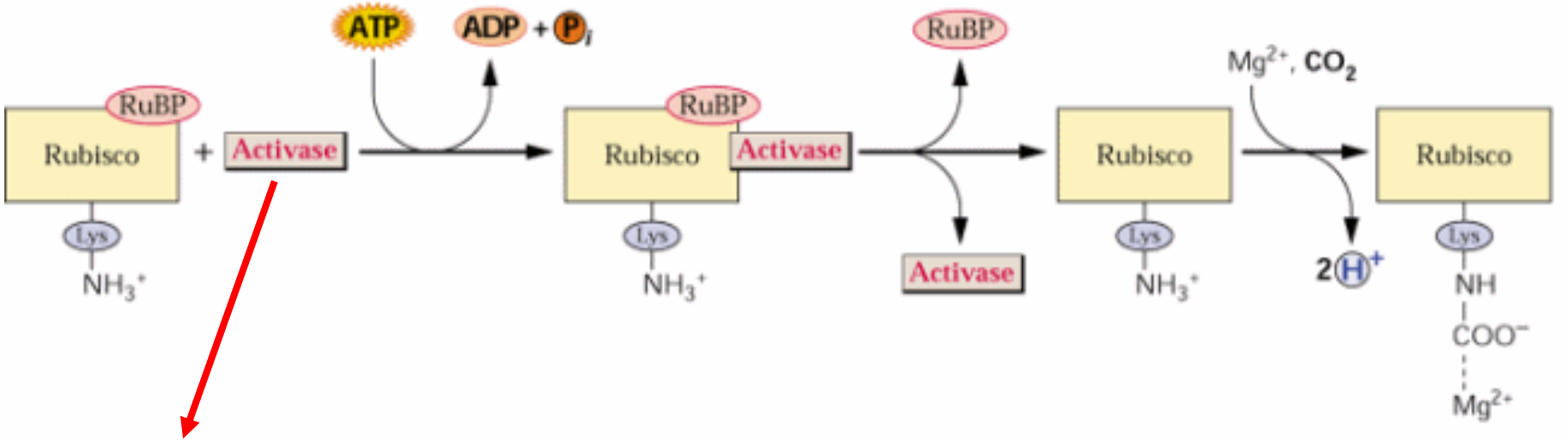
La Rubisco è un enzima poco efficiente dal punto di vista catalitico:

- poco selettiva nei confronti del substrato

- è molto lenta: carbossila solo 3 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



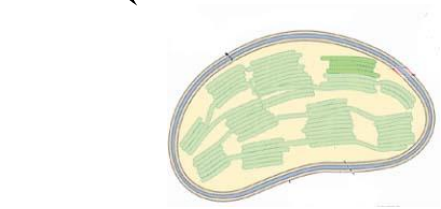
Rubisco attivasi: membro di una famiglia di proteine che mostrano attività ATPasica associata a funzioni di chaperone molecolare

→ Da 14 a 16 polipeptidi si associano alla Rubisco
→ idrolisi ATP e induzione di modificazioni conformazionali che portano al rilascio degli zuccheri fosfati
→ carbammilazione: a seguito dell'azione della Rubisco attivasi, una molecola di CO_2 reagisce con la Lys 201 nel sito attivo, con la fomazione di un gruppo carbammile che viene stabilizzato dal legame con Mg^{2+} → enzima attivo

Reazione di carbammilazione favorita dall'aumento di pH e da aumento di concentrazione di Mg^{2+}

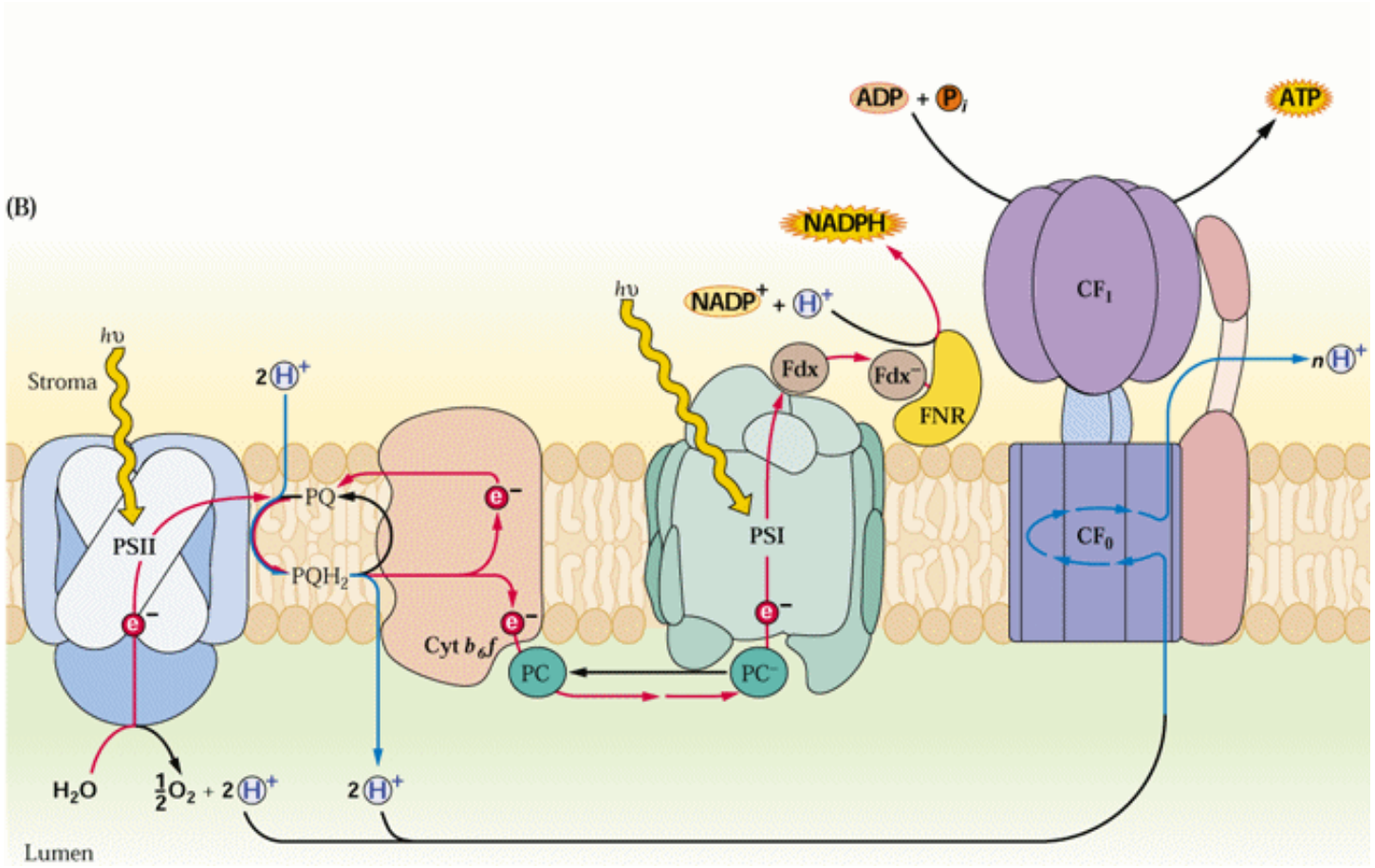
Elevate T inducono: decarbammilazione spontanea della Rubisco + termoinstabilità della R-attivasi

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



pH 7 → 8
[Mg^{2+}] 1-3 mM → 3-6 mM

→ Carbammilazione della Rubisco



Le reazioni del ciclo di Calvin

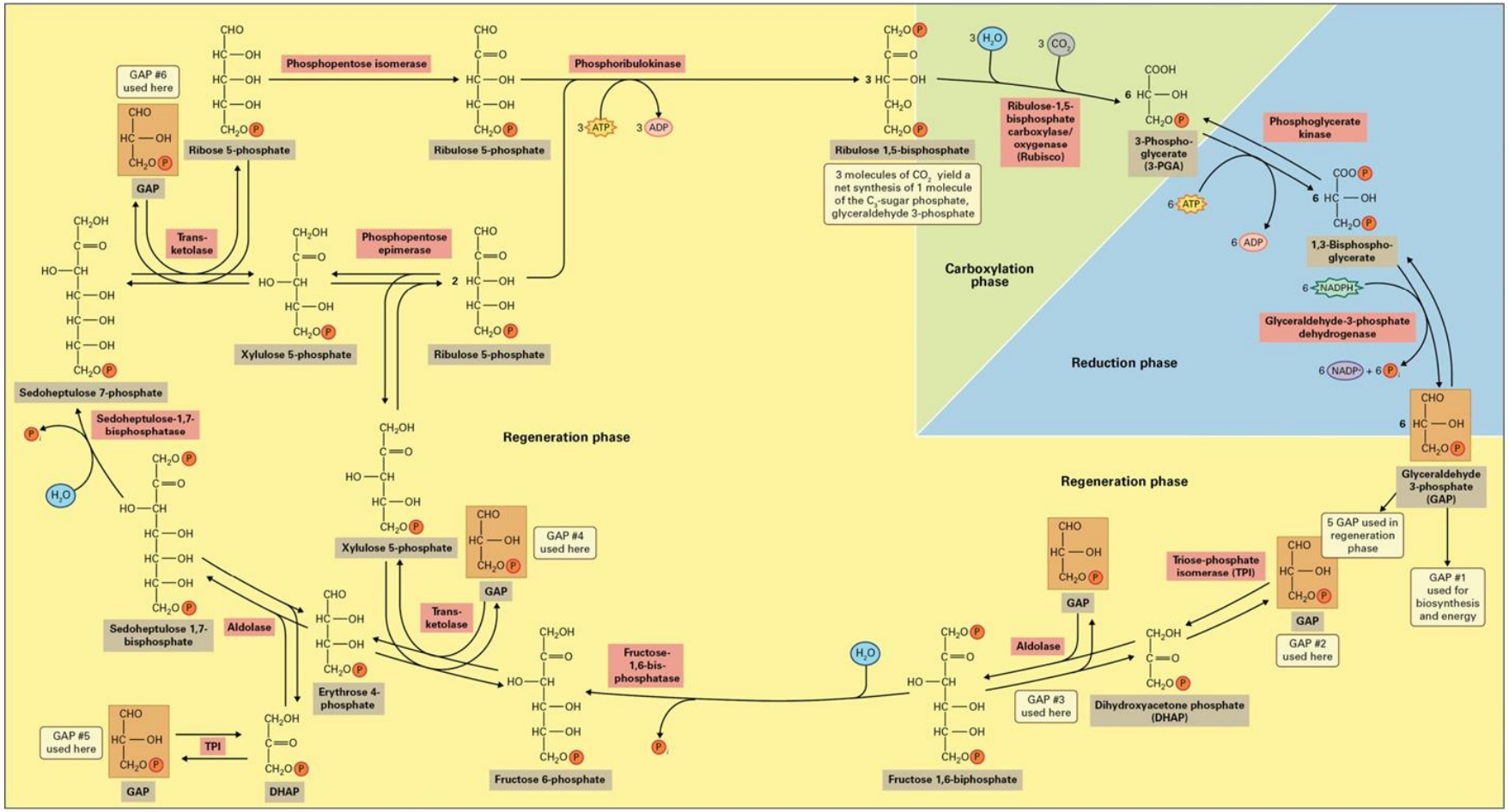
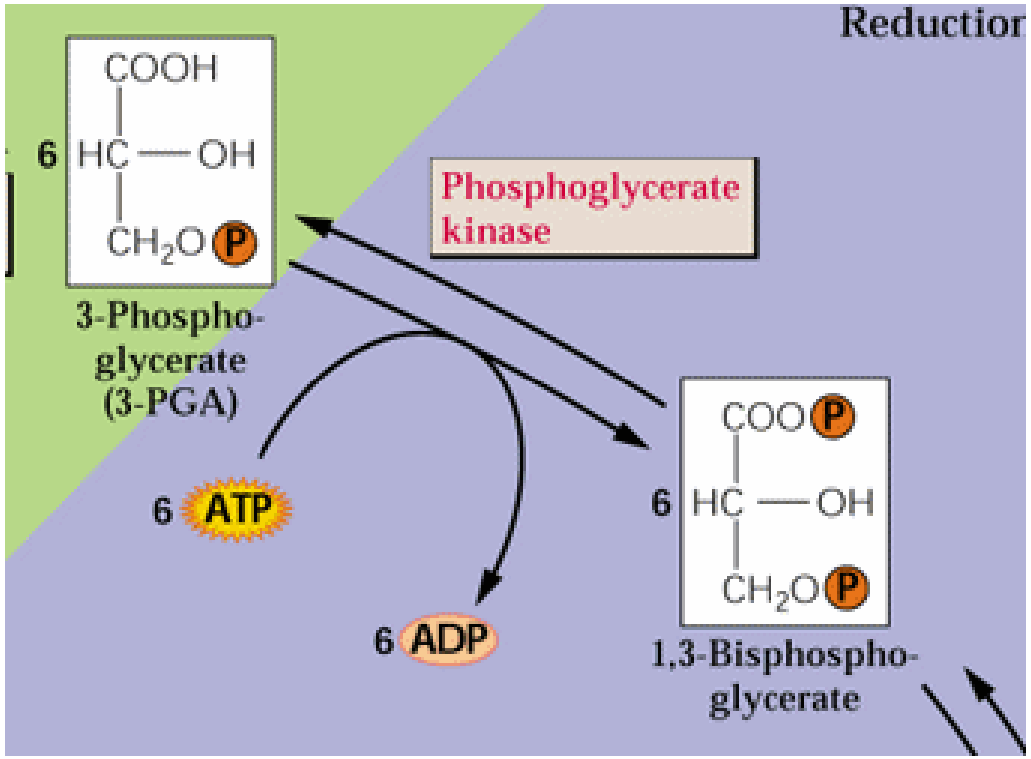


FIGURE 12.35 *Individual reactions of the Calvin–Benson cycle.*

Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Second Edition. Edited by Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, and Russell L. Jones.
© 2015 John Wiley & Sons, Ltd. Published 2015 by John Wiley & Sons, Ltd.
Companion website: www.wiley.com/go/buchanan/biochem

WILEY Blackwell

RIDUZIONE

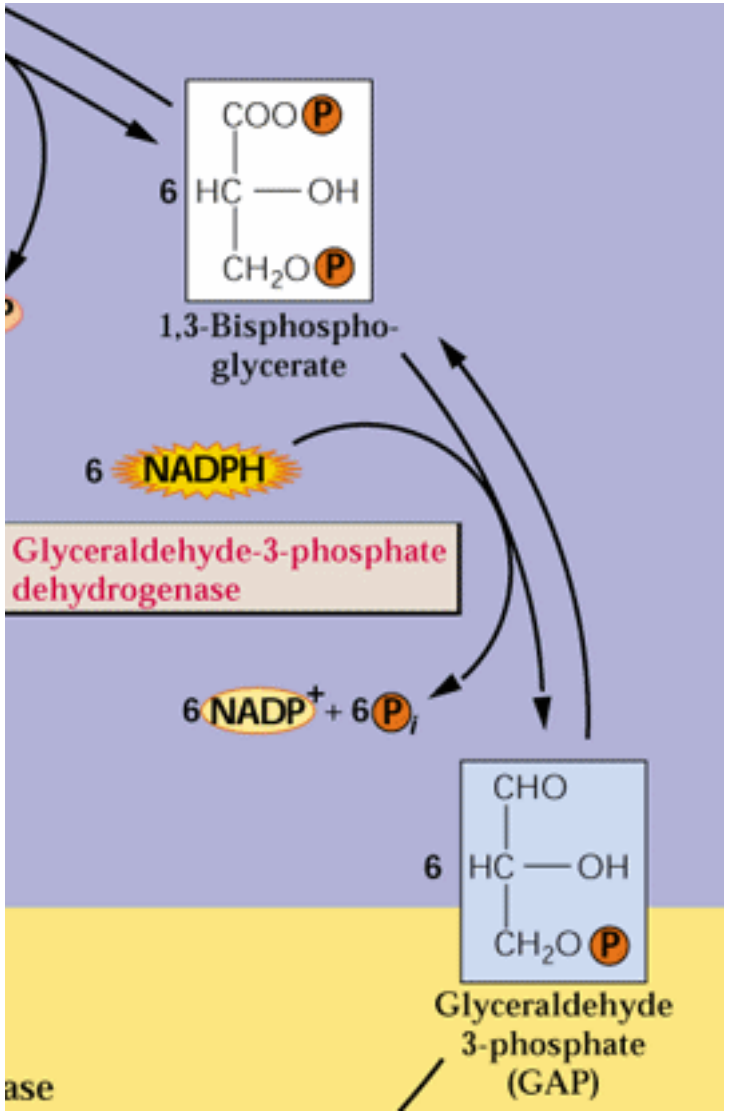


La fosfoglicerato chinasi fosforila il 3-fosfoglicerato consumando ATP
Produzione di 1,3-bifosfoglicerato

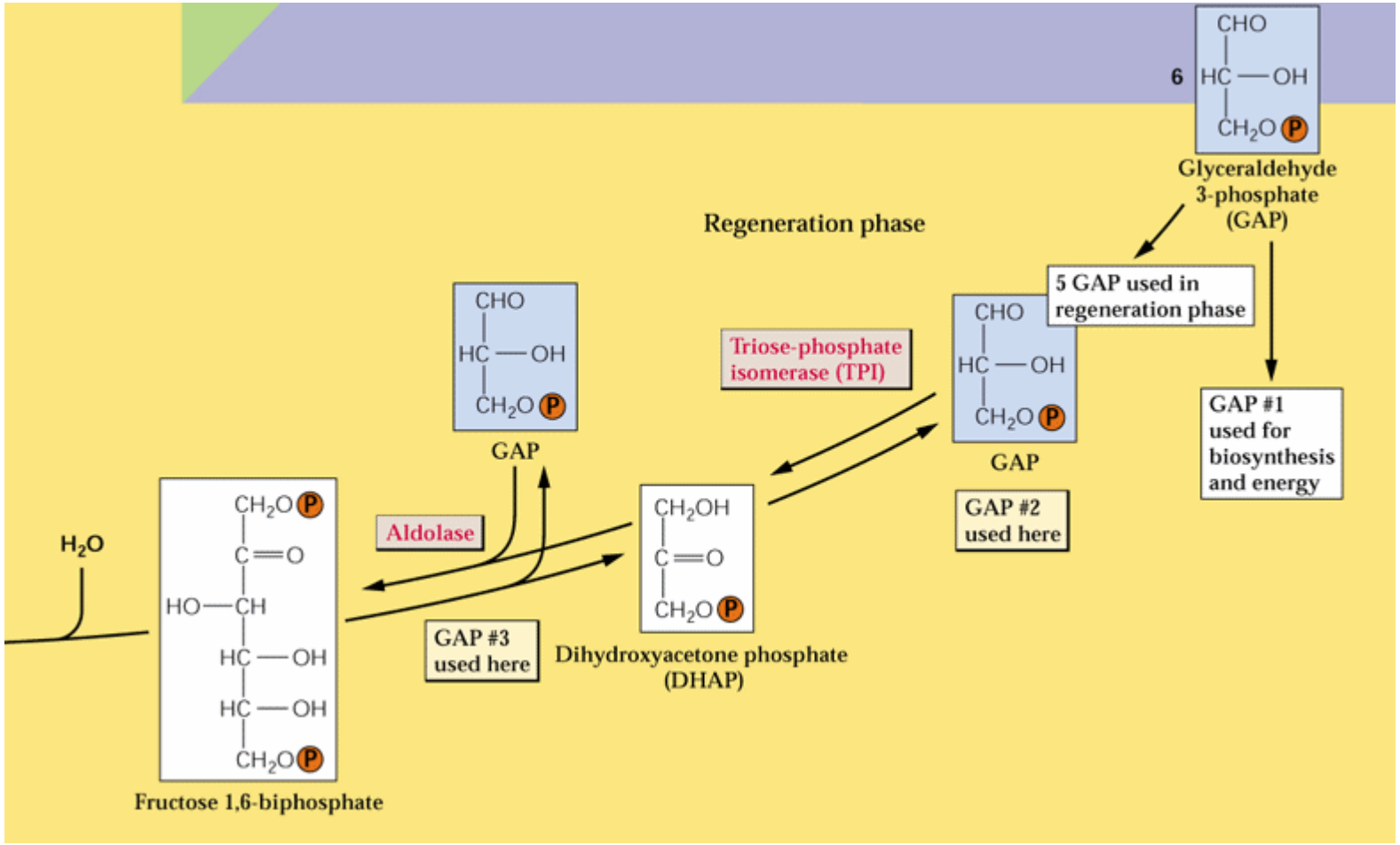
RIDUZIONE

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

Produzione di gliceraldeide 3-fosfato

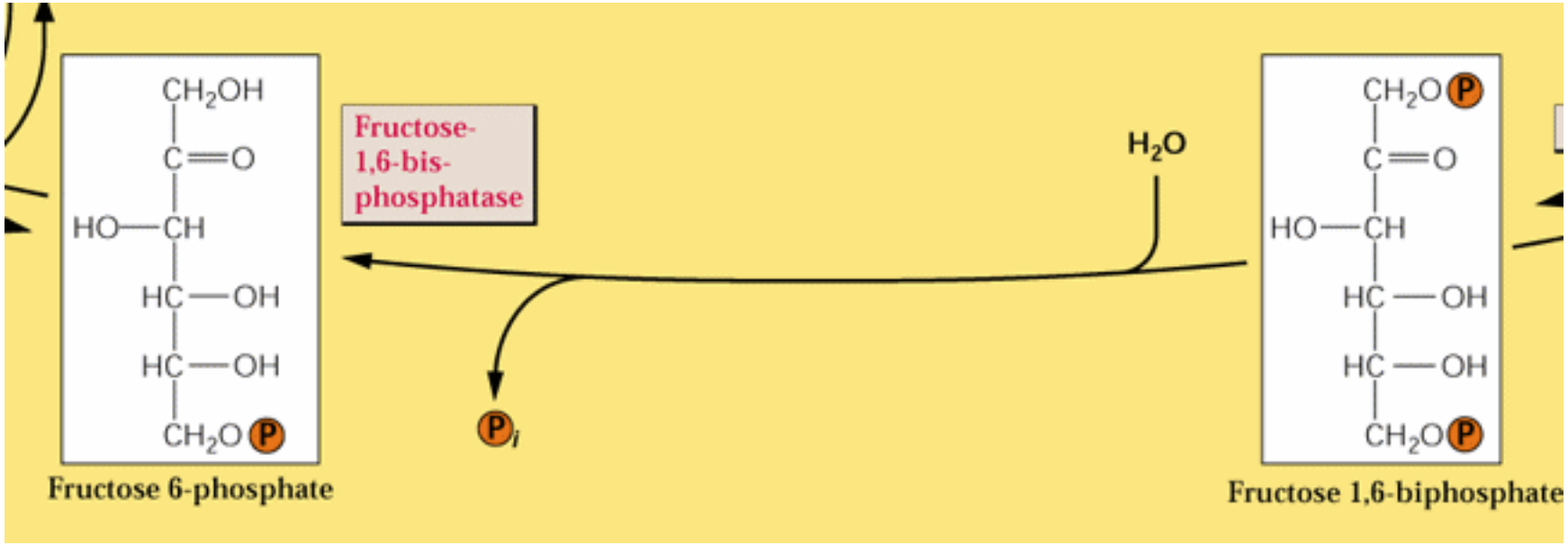


RIGENERAZIONE



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

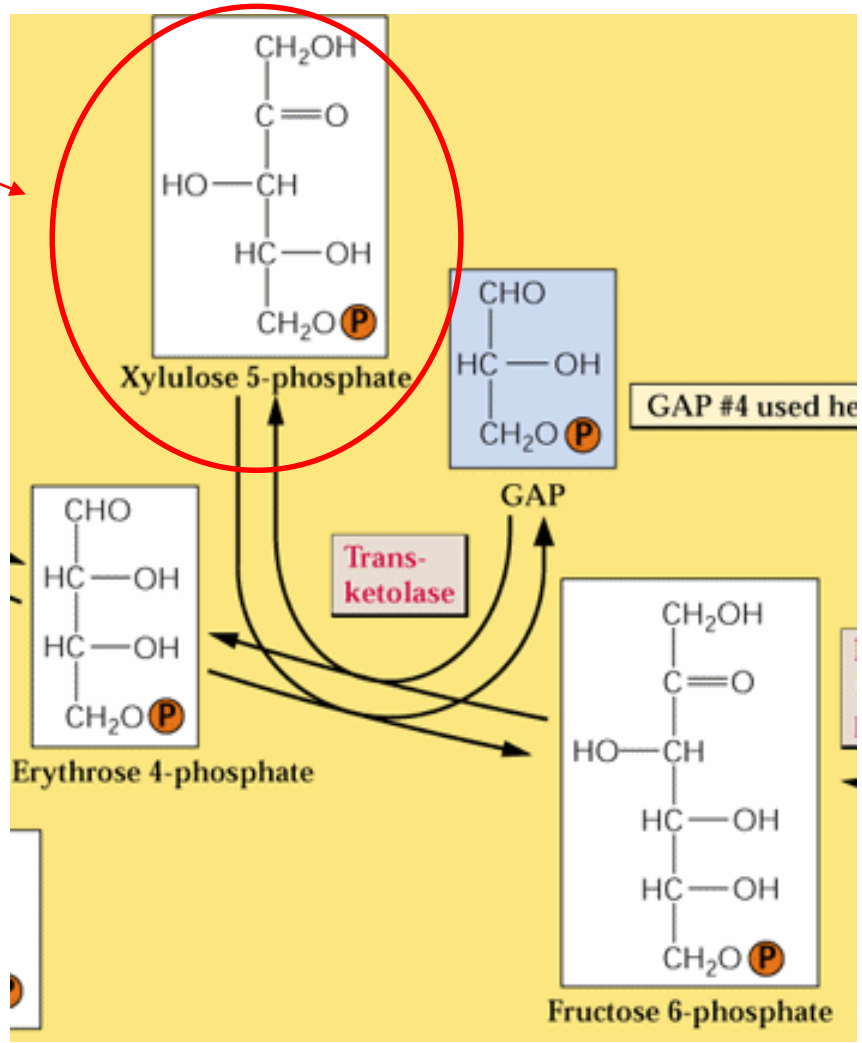
RIGENERAZIONE



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

RIGENERAZIONE

1° pentoso

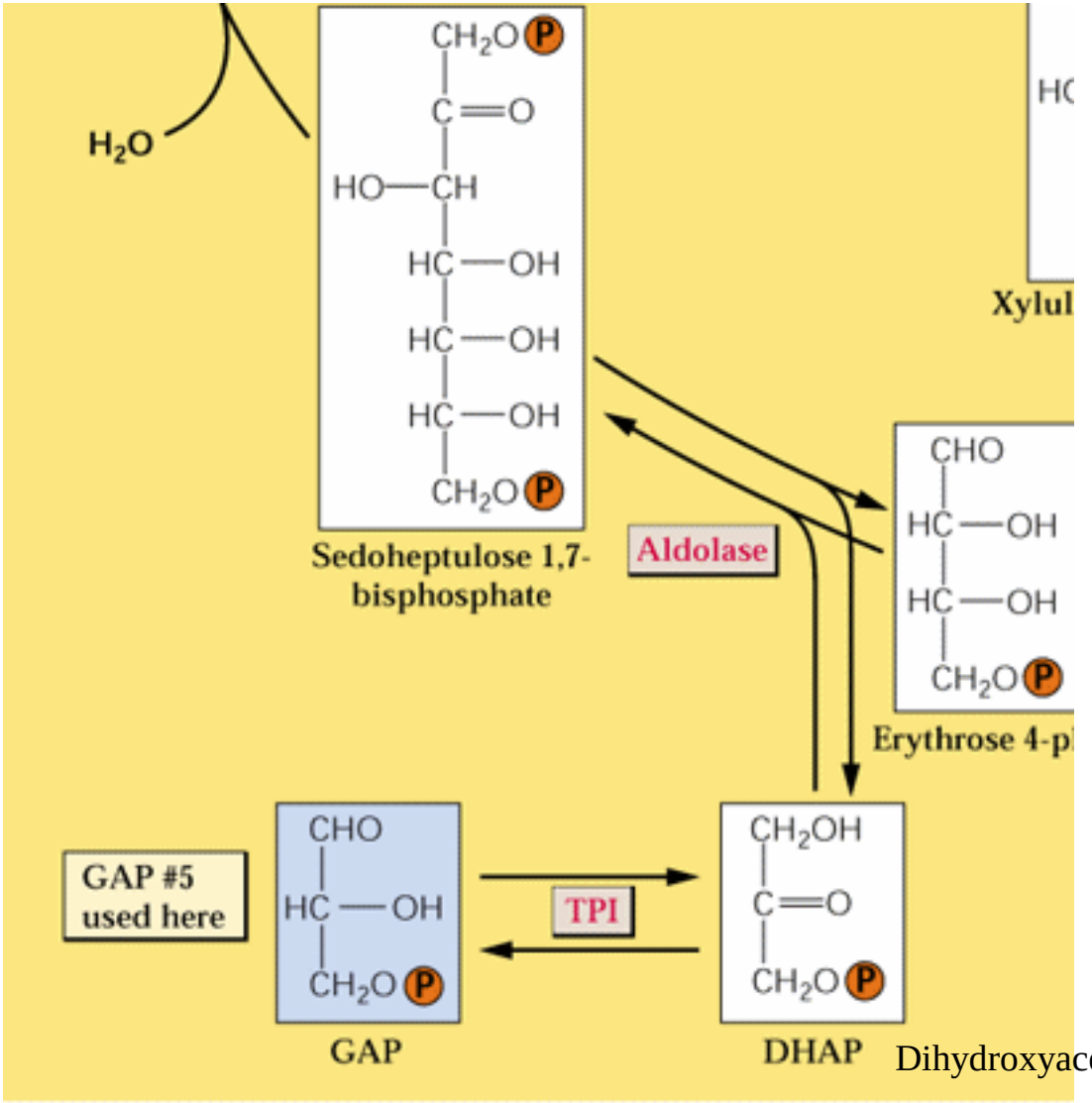


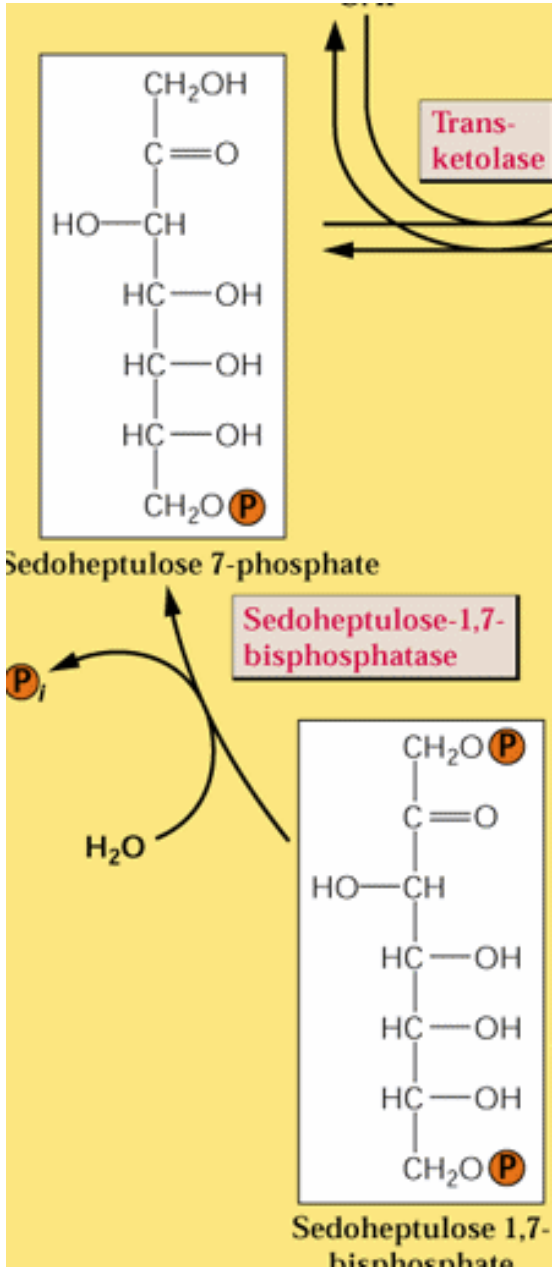
Il fruttosio 6-fosfato e un'altra molecola di gliceraldeide 3-P si combinano: reazione catalizzata dalla transchetolasi
Produzione di Eritrosio 4-fosfato e xilulosio 5-fosfato

RIGENERAZIONE

Condensazione aldolica tra eritrosio 4-P e un'altra molecola di gliceraldeide3-P: aldolasi.

Produzione di sedoeptulosio 1,7-bifosfato

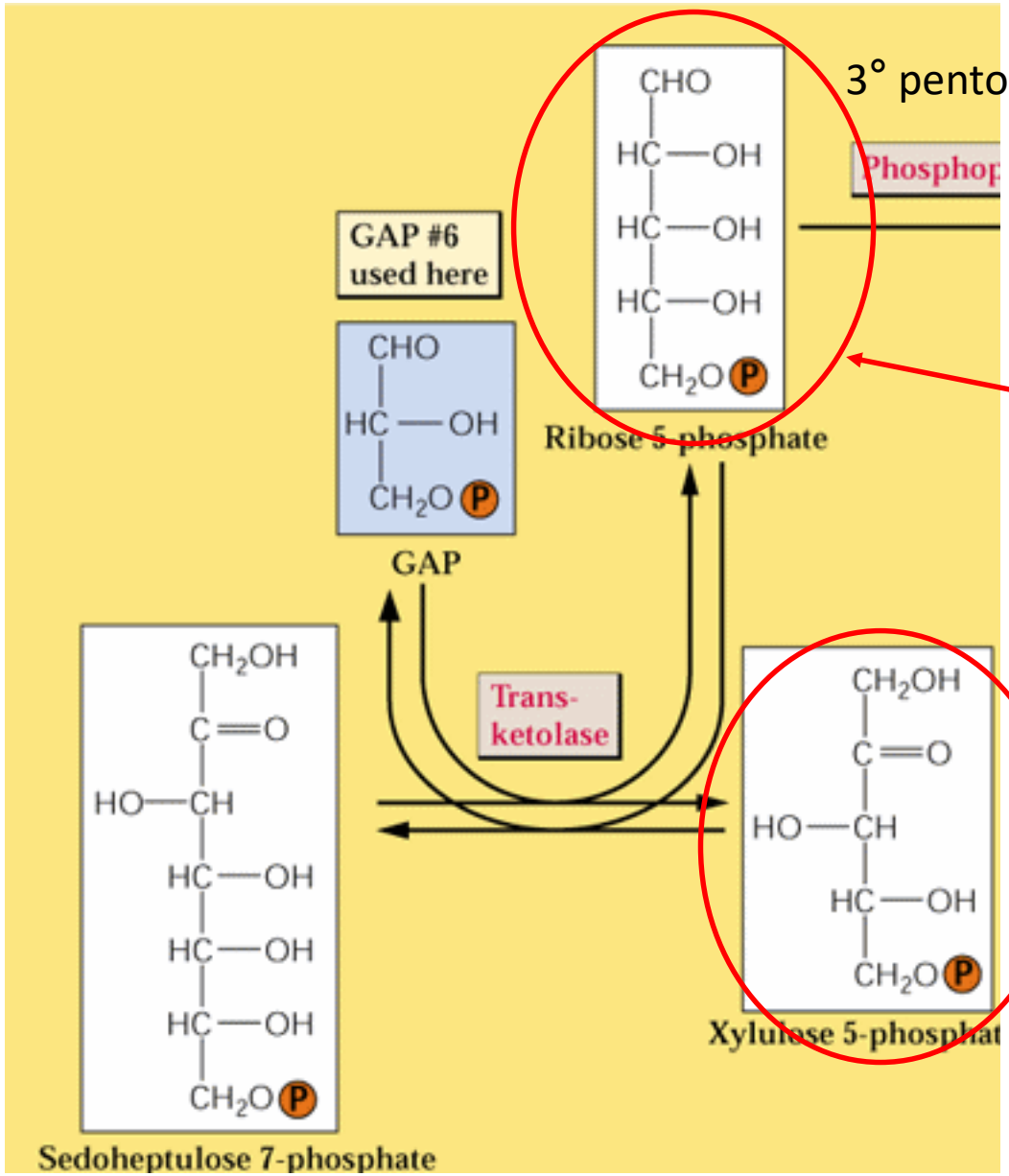




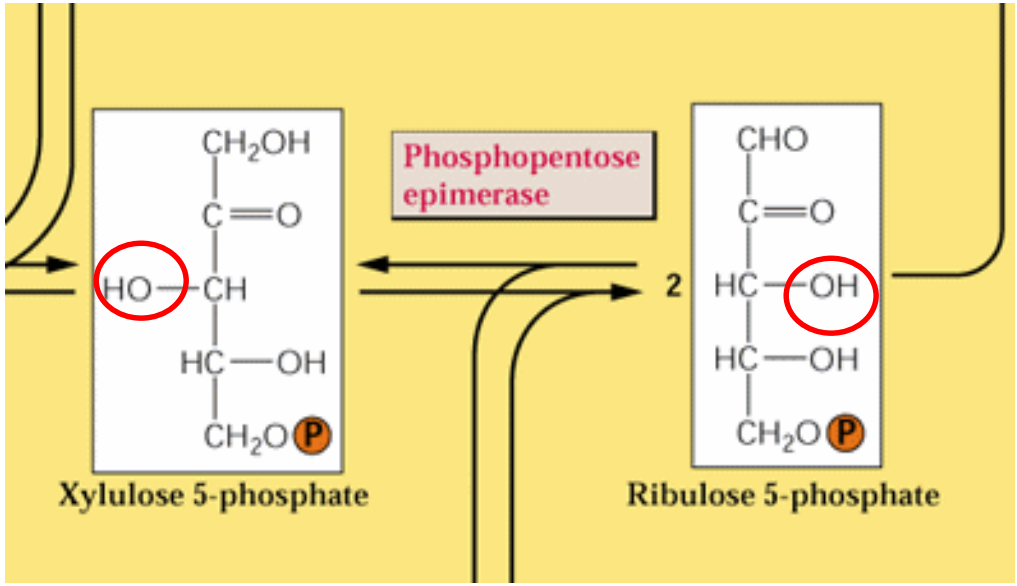
Il sedoeptulosio 1,7 bifosfato
viene defosforilato:
sedoeptulosio 1,7 bifosfatasi
Produzione di sedoeptulosio 7-fosfato

Il sedoeptulosio 7-fosfato reagisce con l'ultima molecola di GA3-P formando 2 pentosi: transchetolasi.

Produzione di xilulosio 5-fosfato e ribosio 5-fosfato

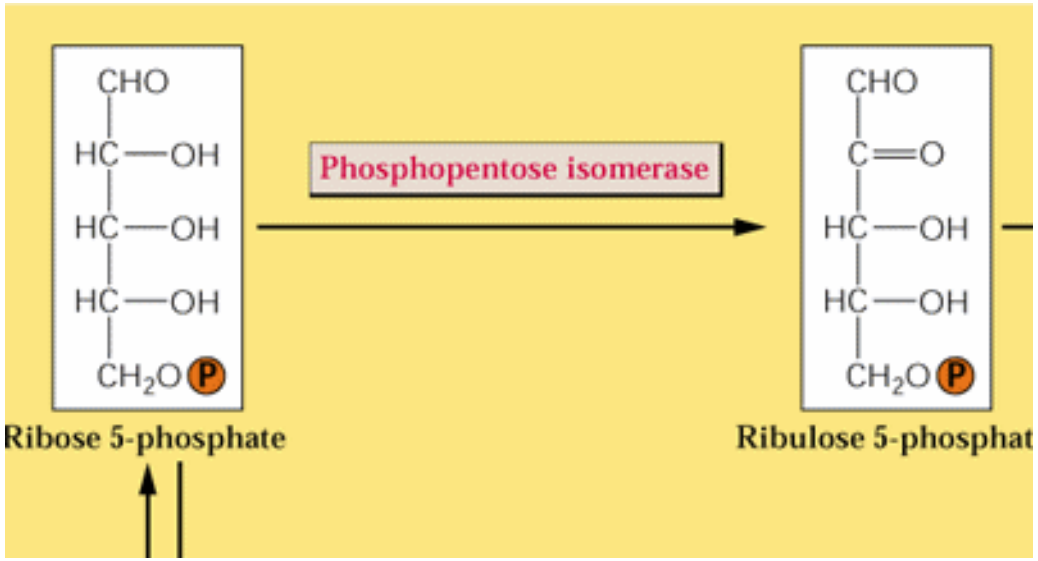


2x



Epimerasi

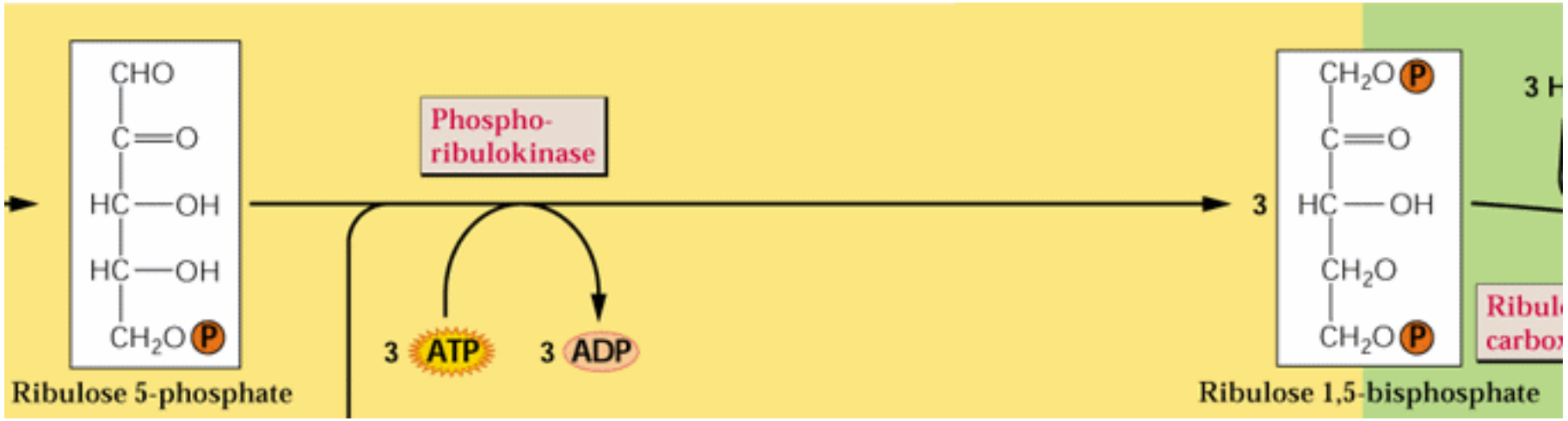
1x



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_2 servono 2 NADPH e 3 ATP

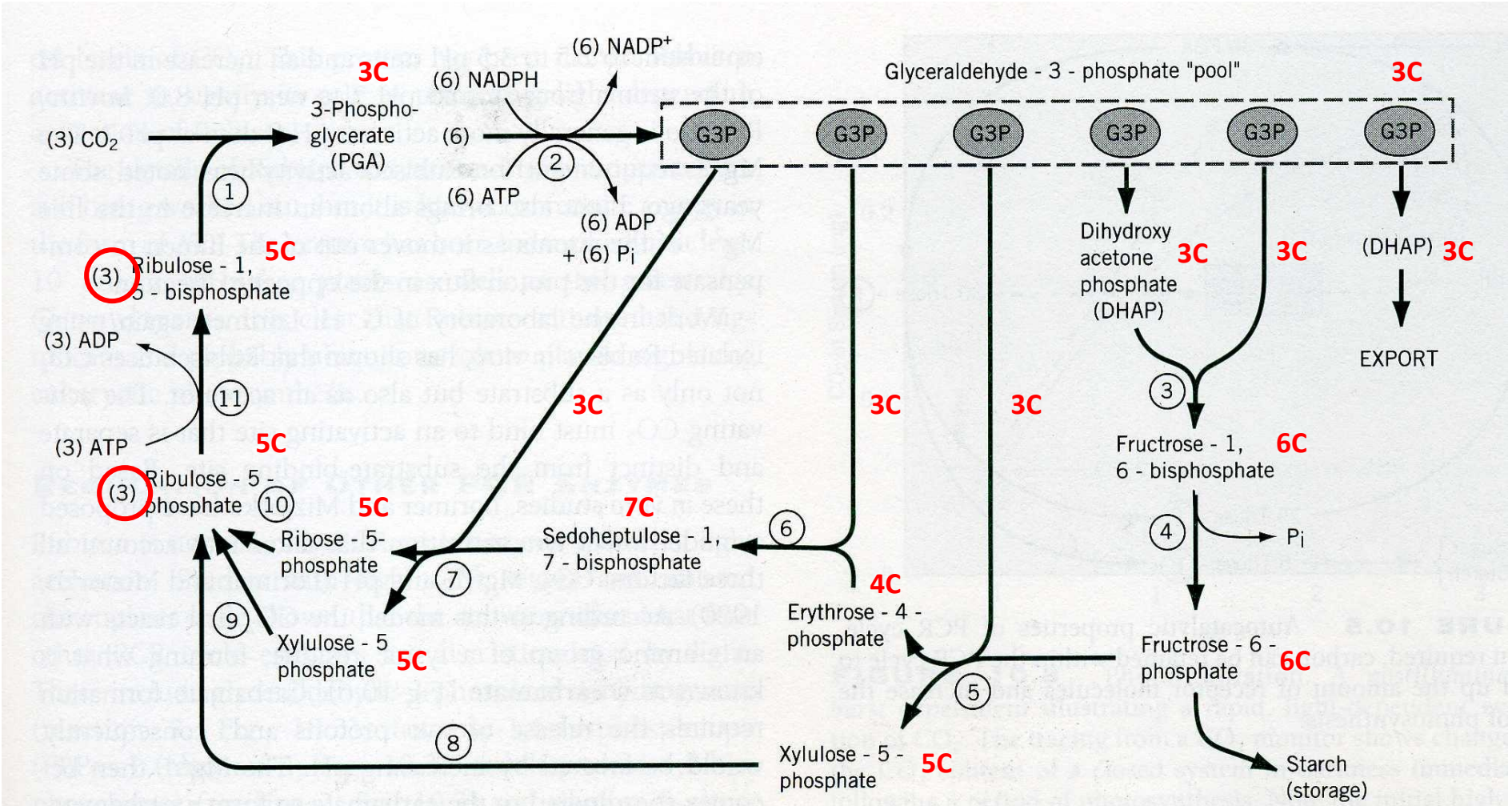


FIGURE 10.3 The photosynthetic carbon reduction (PCR) cycle. Numbers in brackets indicate stoichiometry. Enzymes, indicated by circled numbers are: (1) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco); (2) 3-phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; (3) aldolase; (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

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

Fosforibulochinasi

Rubisco attivasi

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

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

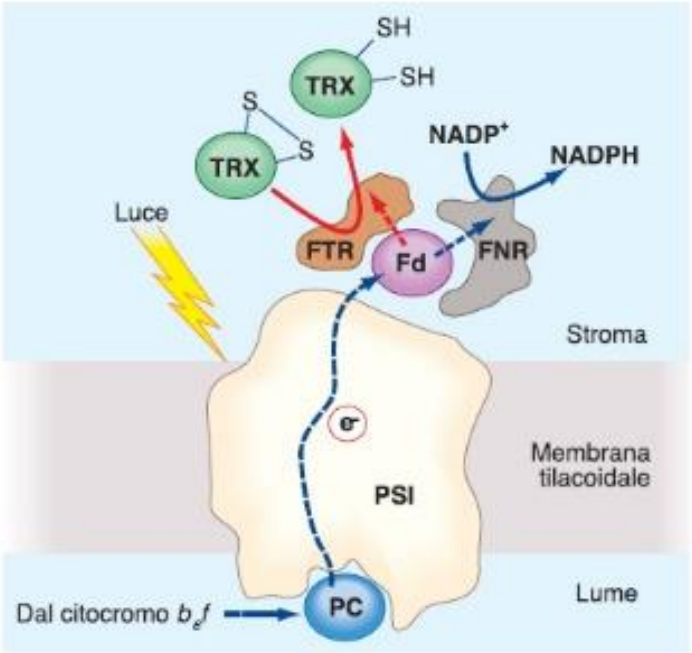
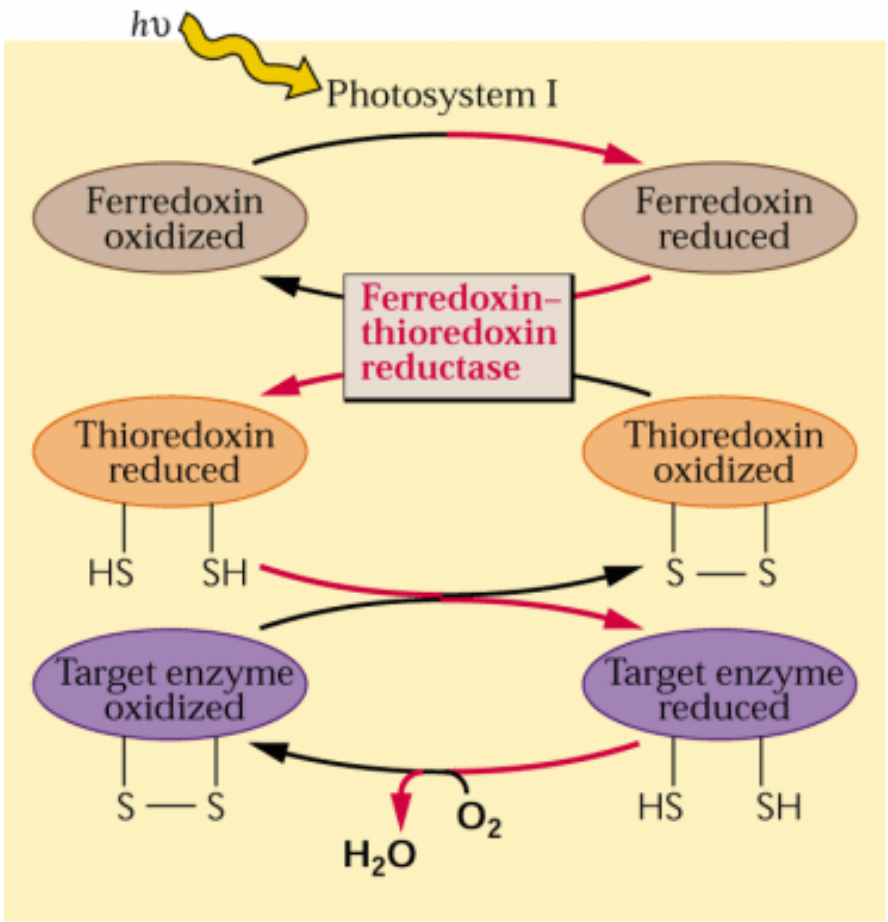


FIGURA 5.9 Le tioredossine (TRX) nei cloroplasti sono ridotte alla luce dalla ferredossina-tioredossina riduttasi (FTR). La figura mostra che la ferredossina (Fd), ridotta dal fotosistema I (PSI), può trasferire elettroni alternativamente alla ferredossina-NADP riduttasi (FNR) o alla FTR. (PC = plastocianina).

N. Rascio
Elementi di Fisiologia Vegetale, III ed.
EdiSES Edizioni



LA FOTORESPIRAZIONE

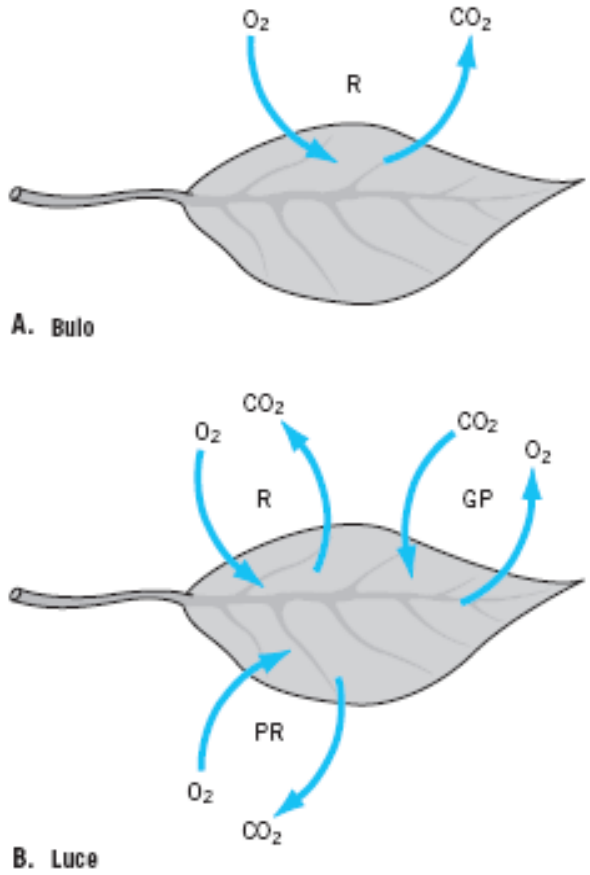


FIGURA 5.16 Scambi gassosi in una foglia C3 al buio (*A*) e alla luce (*B*). GP, fotosintesi lorda; PR, fotorespirazione; R, respirazione mitocondriale.

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**

Fotosintesi netta = GP – (R + PR)

LA FOTORESPIRAZIONE

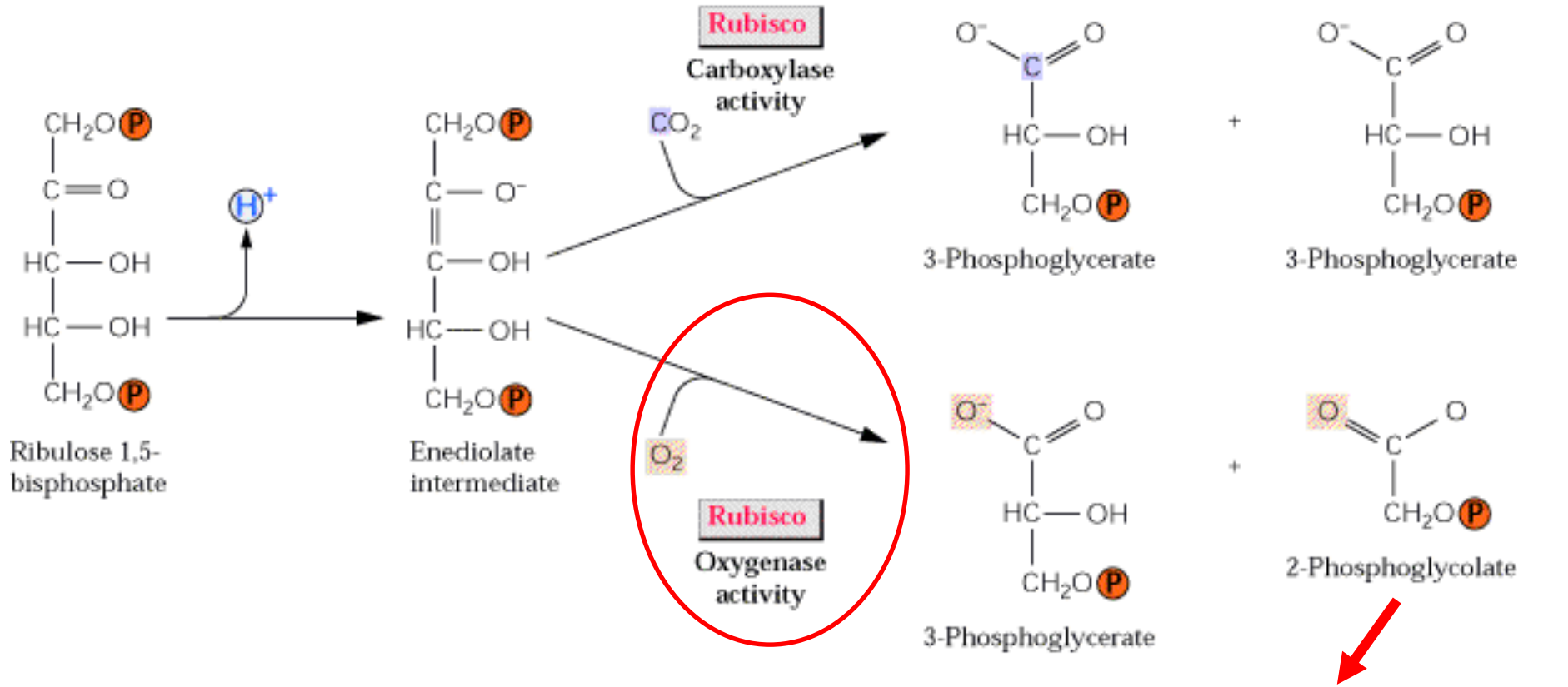
$[O_2]$ 21% → 42% → **-50% velocità fotosintesi**

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

L'ossigeno molecolare inibisce la fotosintesi

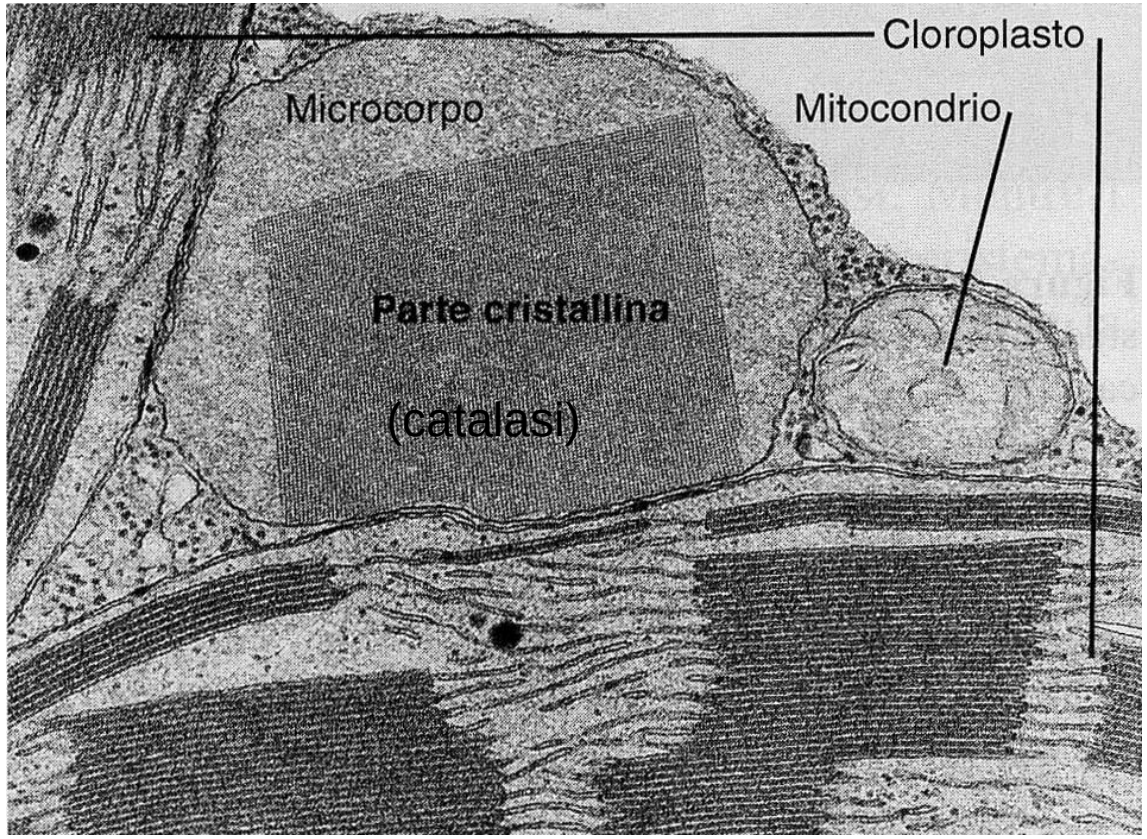
La Rubisco reagisce anche con l'ossigeno

(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



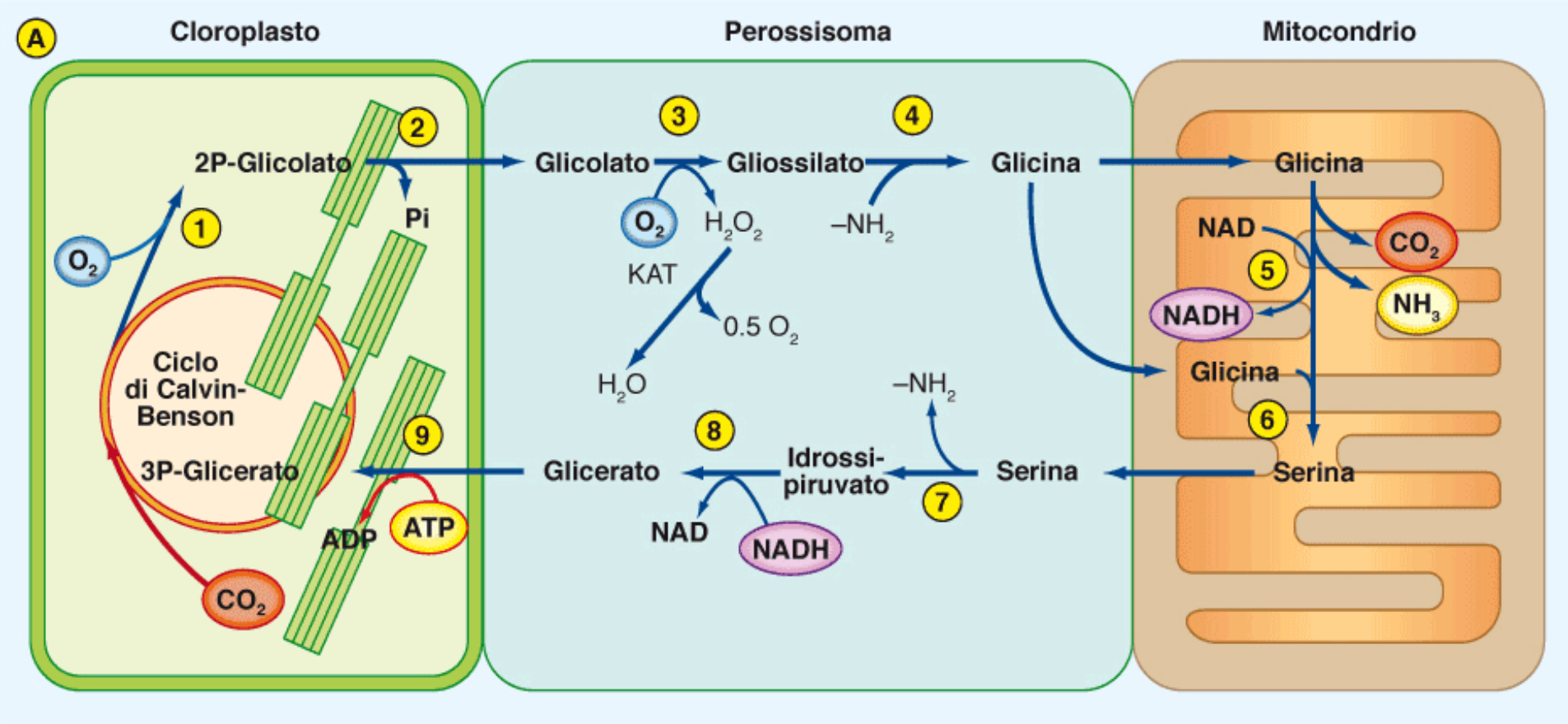
Nel complesso:

Da 2 molecole di fosfoglicolato (4 C totali) si forma una molecola di 3-fosfoglicerato (3 C) mentre una molecola di CO_2 viene persa

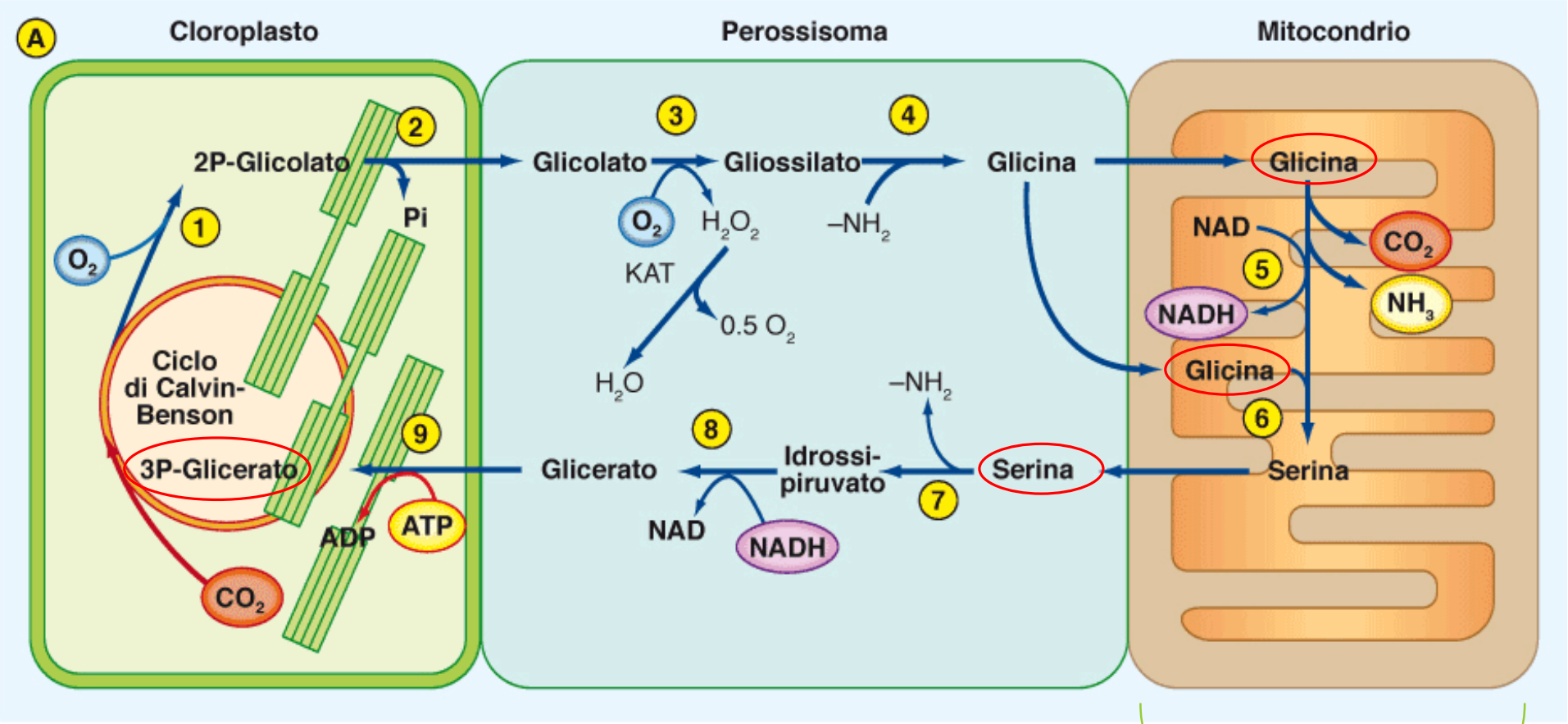
Il ciclo PCO recupera il 75% del C

che andrebbe perso a causa dell'attività ossigenasica della Rubisco

LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)



LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)



Nel **mitocondrio** 2 molecole di **Glicina** (2C x 2 = 4C) vengono convertite in

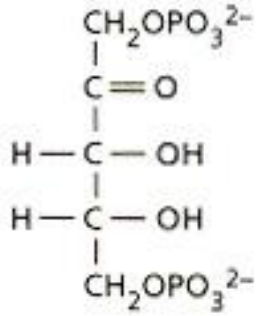
1 molecola di **Serina** (3C)
+
CO_2, NH_3, NADH

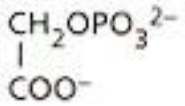
Nel cloroplasto:
3-fosfoglicerato

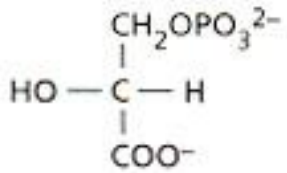
LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

Nel cloroplasto:

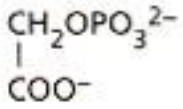
1. *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (chloroplast)*
   Ribulose-1,5-bisphosphate + O_2 → 2-phosphoglycolate + 3-phosphoglycerate + 2 H^+

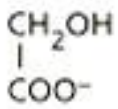






2. *Phosphoglycolate phosphatase (chloroplast)*
   Phosphoglycolate + H_2O → glycolate + $HOPO_3^{2-}$

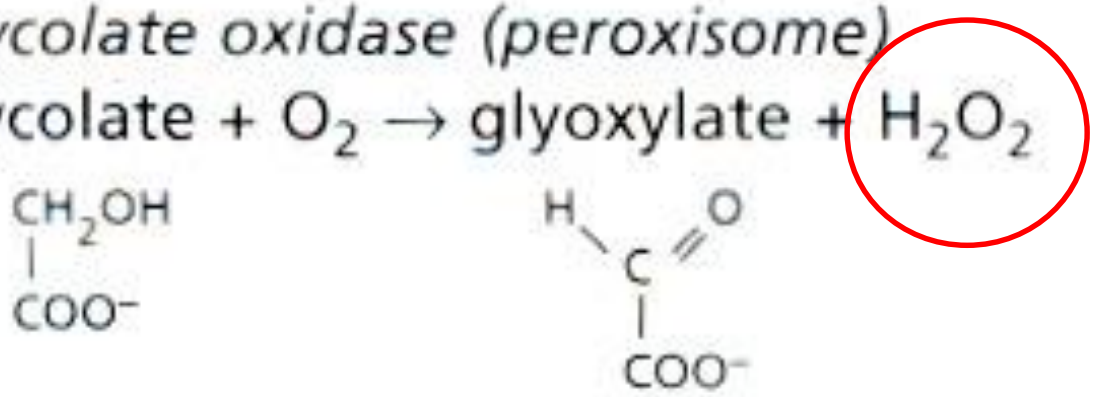




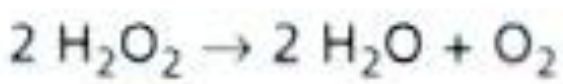
Il glicolato esce dal cloroplasto ed entra nel perossisoma tramite un traslocatore di antiporto glicolato/glicerato

Nel perossisoma:

3. *Glycolate oxidase (peroxisome)*



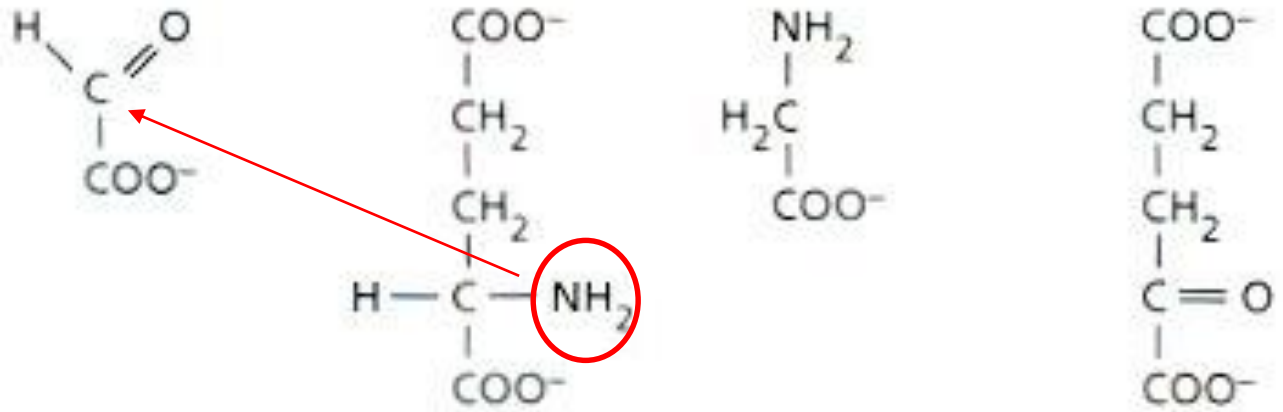
4. *Catalase (peroxisome)*



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

Nel perossisoma:

5. *Glyoxylate:glutamate aminotransferase (peroxisome)*
   Glyoxylate + glutamate → glycine + α-ketoglutarate



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

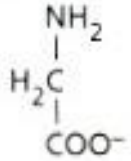
La glicina passa nei mitocondri

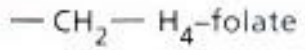
Nel mitocondrio:

6. *Glycine decarboxylase (mitochondrion)*

Glycine + NAD^+ + H_4-folate → NADH + H^+ + CO_2 + NH_3 + methylene-H_4-folate

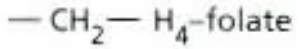
Metilentetraidrofolato

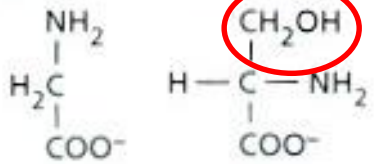




7. *Serine hydroxymethyltransferase (mitochondrion)*

Methylene-H_4-folate + H_2O + glycine → serine + H_4-folate





Nei mitocondri da due molecole di glicina (2x2 = 4 atomi di C) si forma una molecola di serina (3 atomi di C)

2 glicina

↓

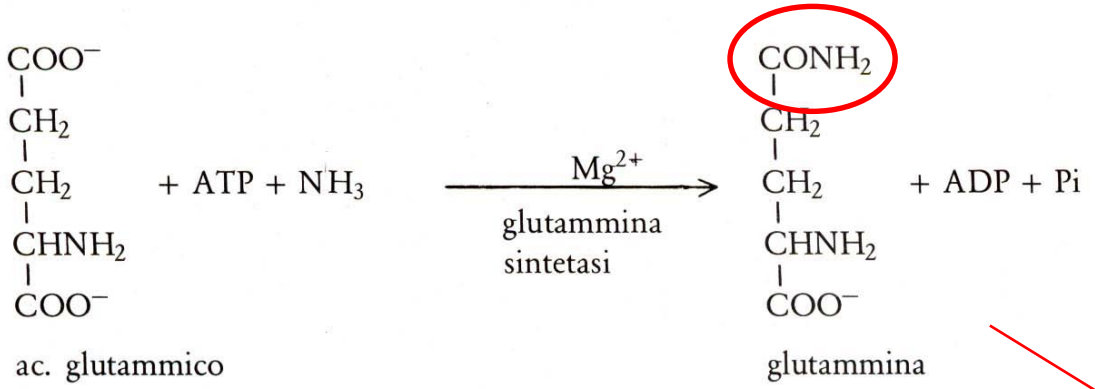
serina, CO_2, NH_3, NADH

↓

CO_2 FOTORESPIRATORIA

LE REAZIONI DEL CICLO PCO (C2)

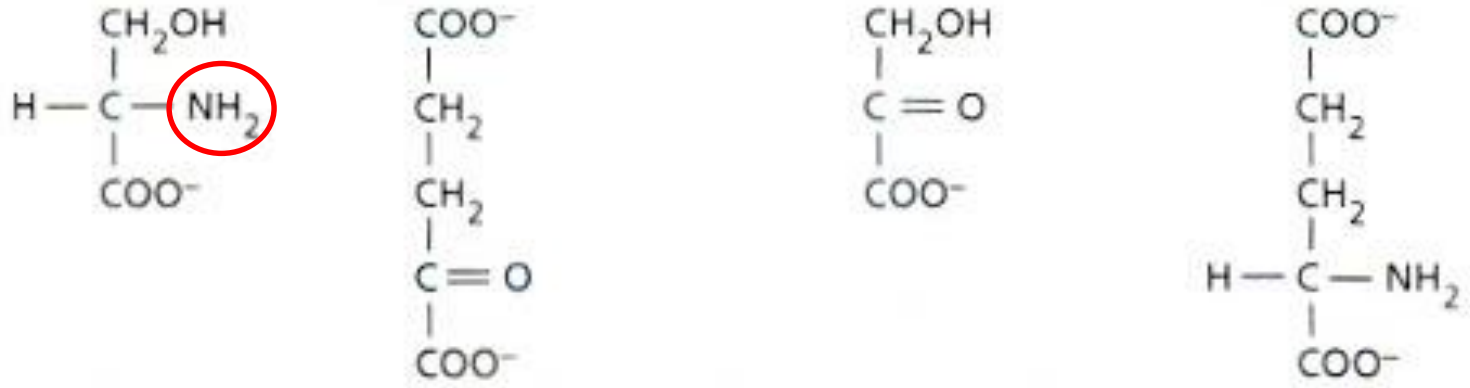
NH_3 diffonde nei cloroplasti dove viene organicato dalla **glutammina sintetasi**



Ciclo GS-GOGAT

Nel perossisoma:

8. *Serine aminotransferase (peroxisome)*
   Serine + α-ketoglutarate → hydroxypyruvate + glutamate



Nel perossisoma la serina viene deamminata a idrossipiruvato

L'accettore dell'NH_2 è l'acido α-chetoglutarico

Nel perossisoma:

9. *Hydroxypyruvate reductase (peroxisome)*

Hydroxypyruvate + NADH + H^+ → glycerate + NAD^+



L'idrossipiruvato è ridotto a glicerato

Il glicerato passa nel cloroplasto

10. *Glycerate kinase (chloroplast)*

Glycerate + ATP → 3-phosphoglycerate + ADP + H^+



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

NEL COMPLESSO:

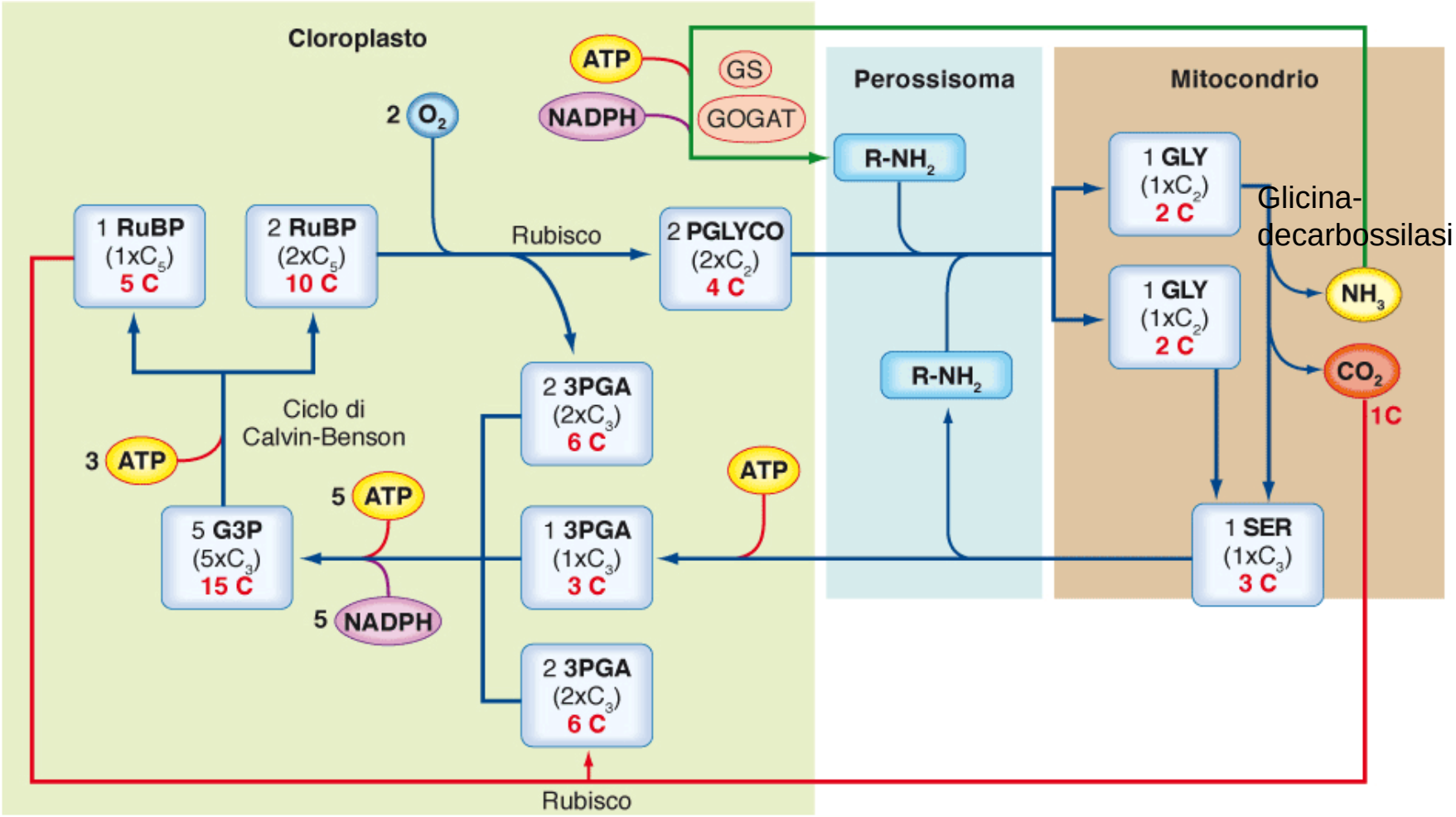
da 2 molecole di fosfoglicolato (4C) si forma 1 molecola di 3-fosfoglicerato (3C)

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

1/4 viene perso come CO_2

Mutanti Arabidopsis privi di enzimi chiave del ciclo fotorespiratorio:

Crescita stentata nella normale atmosfera (0.04% CO_2)
Normali in atmosfera arricchita (0.4%) di CO_2



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**

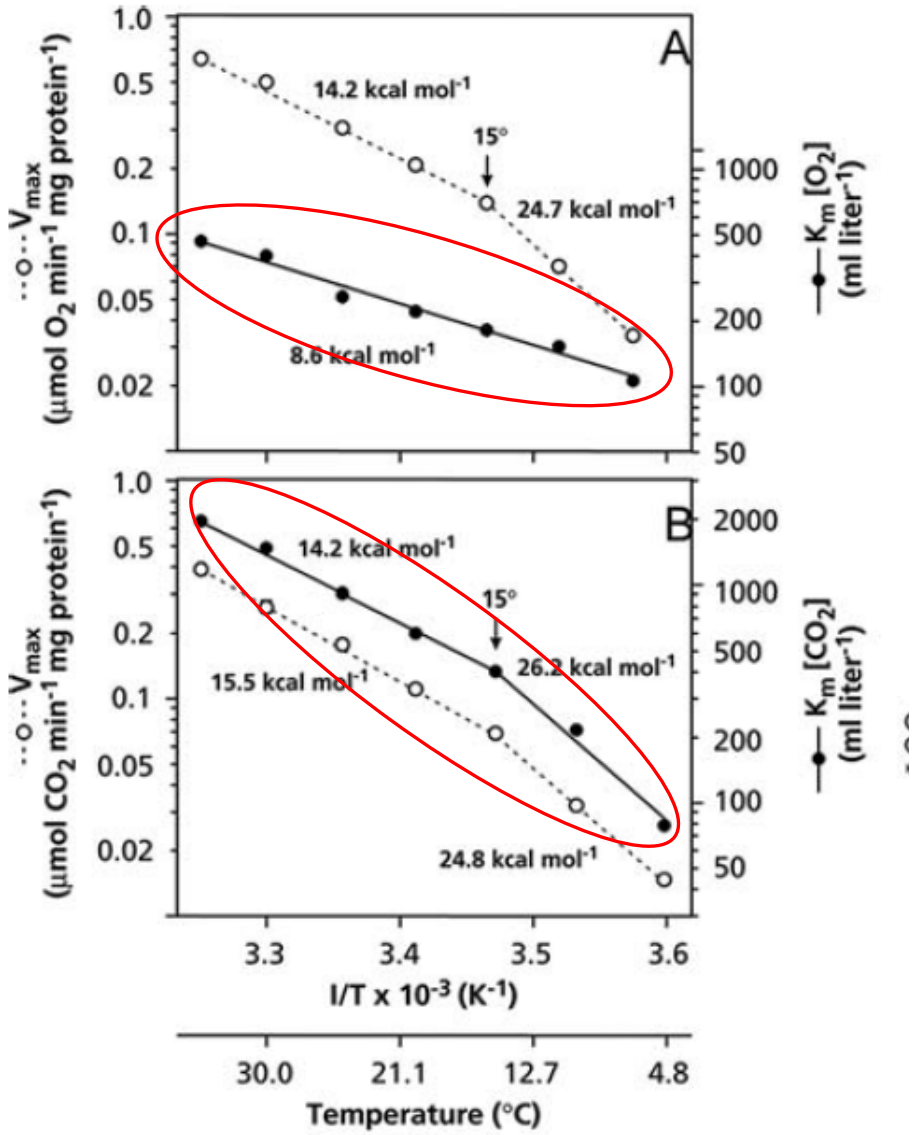
Rubisco: attività carbossilasica e ossigenasica

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_2 e 21% O_2) e a T = 30 °C:
V_c/V_o = 3.2, cioè V_o/V_c = 0.31

1- Effetto della temperatura sulla cinetica della Rubisco



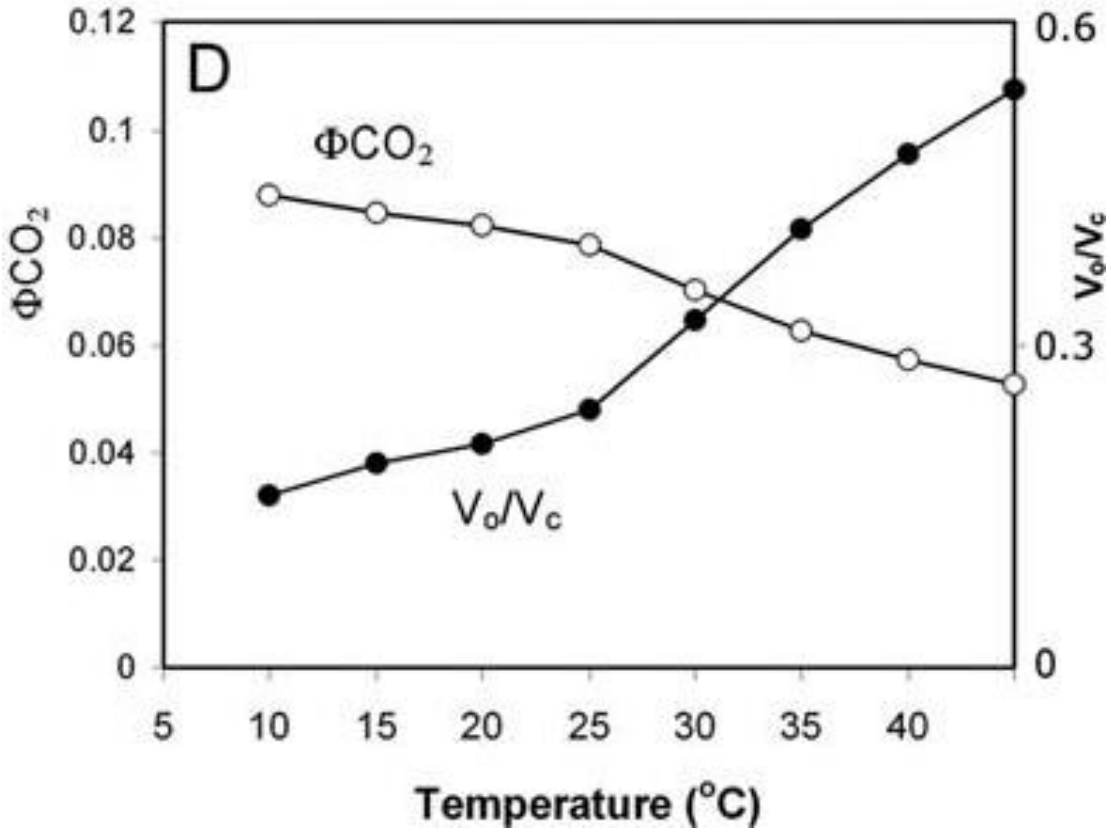
All'aumentare di T, aumenta K_m sia per CO_2 che per O_2

Ma K_m aumenta più rapidamente per CO_2 che per O_2

Cioè l'affinità della Rubisco per la CO_2 diminuisce più rapidamente di quella per O_2

Esempio:
Passando da 5 a 30 °C
K_m per O_2 aumenta di 3 volte
K_m per CO_2 aumenta di 15 volte

1- Effetto della temperatura sulla cinetica della Rubisco



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

2- Effetto della temperatura sulla solubilità di CO_2 e O_2

Legge di Henry

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

Temperature (°C)	α (CO_2)	$[CO_2]$ (μM in solution)	α (O_2)	$[O_2]$ (μM in solution)	$\frac{[CO_2]}{[O_2]}$
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 -58%	9.11	0.0244 -43%	228.2	0.0376 V_o/V_c = 0.6-1.0

A 35° Carbossilazione/Ossigenazione = 1:1

Quindi…. effetto combinato della temperatura su:

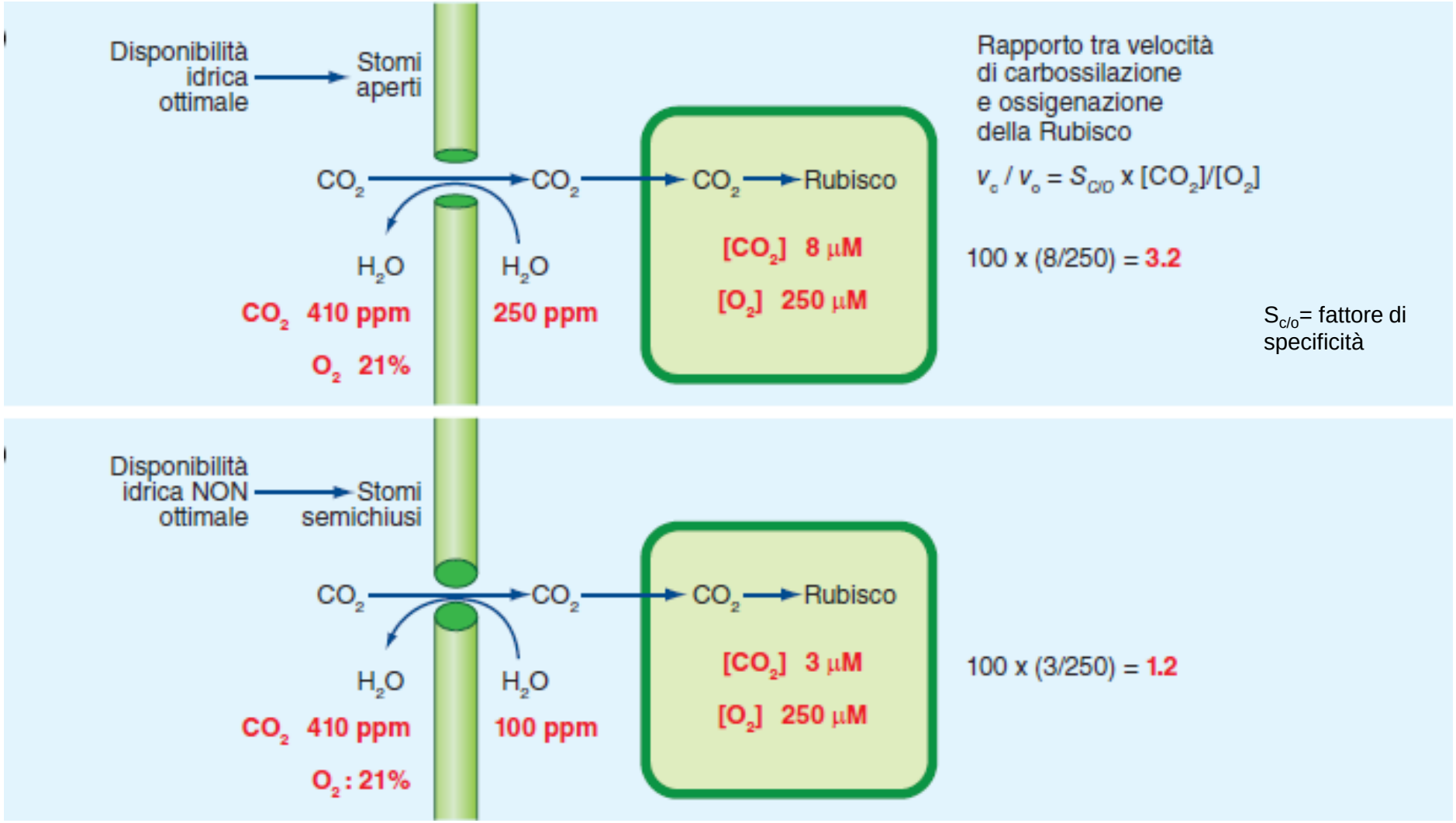
- Cinetica della Rubisco
- Solubilità di CO_2 e O_2

= all'aumentare della temperatura aumenta rapporto ossigenazione/carbossilazione

-> LA FOTORESPIRAZIONE AUMENTA ALL'AUMENTARE DELLA TEMPERATURA AMBIENTALE

A 35 °C la fotosintesi netta [cioè GP – (R + 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



TEMPERATURE ELEVATE e/o STRESS IDRICO
AUMENTANO LA FOTORESPIRAZIONE



Evoluzione di sistemi per concentrare CO_2
in prossimità della Rubisco:

Piante C_4
Piante CAM