

Acqua e temperatura

• Piante C3

- Le piante C3 sono attive di giorno. Di notte chiudono gli stomi e diventano consumatrici di ossigeno.
 - Le piante C3 fissano la CO₂ efficientemente solo a temperature moderate (20°C) poiché, essendo gli stomi aperti di giorno, una temperatura eccessiva induce un aumento della traspirazione di acqua dalle foglie.

• Piante CAM (Crassulacean Acid Metabolism)

- Separazione **temporale** tra fotofosforilazione e fotosintesi.
- Adattamento a climi aridi.
 - Consente lo svolgimento della fotosintesi anche con gli stomi chiusi per minimizzare la perdita di acqua durante il giorno nelle piante CAM, (*Crassulaceae*, *Cactaceae* e in alcune specie di altre famiglie: *Ananas*, *Agave*, *Sedum*, ecc.).
 - Avviene coinvolgendo compartimenti cellulari diversi (Citoplasma, cloroplasti, mitocondri e vacuoli).

• Piante C4

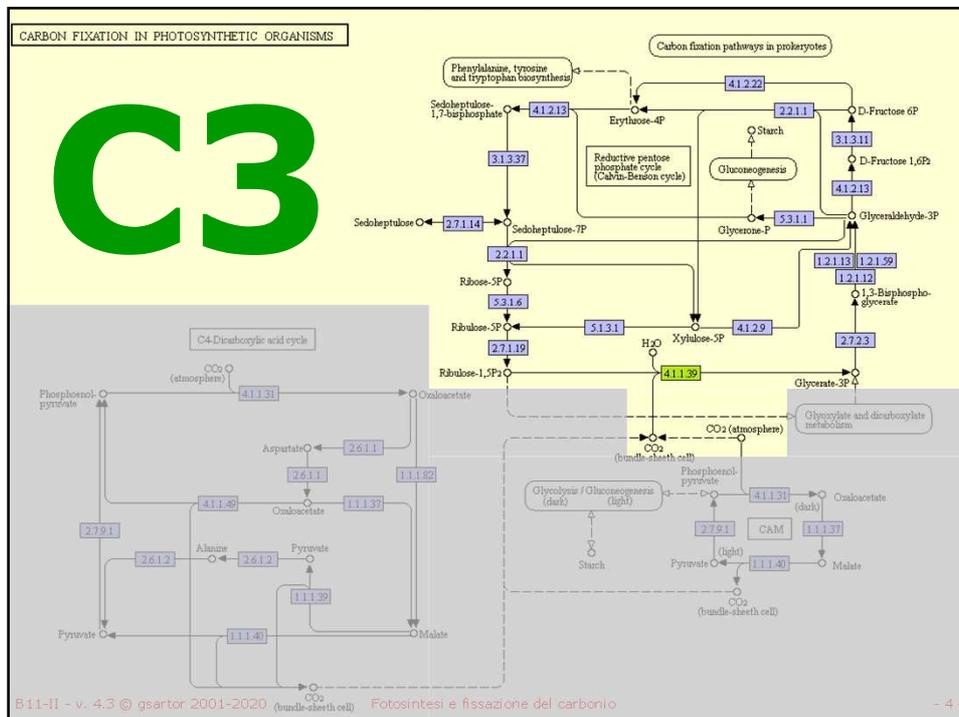
- Separazione **fisica** tra fotofosforilazione e fotosintesi.
 - Specie di piante dei climi caldi con disponibilità idrica (mais, sorgo, canna da zucchero, ecc.).
 - Queste piante hanno sviluppato una via alternativa al ciclo di Calvin, organizzata sulla presenza di due tipi di cellule funzionalmente e morfologicamente diverse, le cellule del mesofillo e quelle della guaina del fascio.
 - La CO₂ viene convogliata tra i vari compartimenti come molecole a quattro atomi di carbonio.

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 3 -

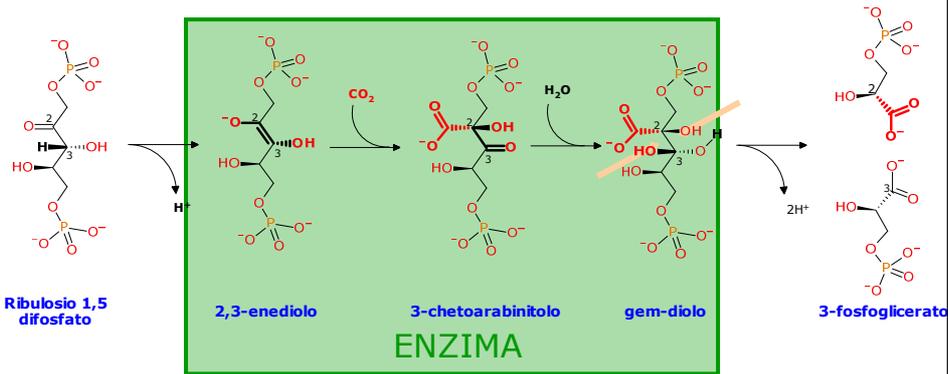
3



4

Fissazione della CO₂

- Solo gli organismi fototrofi possono fissare la CO₂, gli animali, pur potendo legare la CO₂ in molecole più complesse, non sono in grado di accumulare composti organici da CO₂.
- Nelle piante e nei batteri fotosintetici la CO₂ viene convertita, in prima istanza, in 3-fosfoglicerato.



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

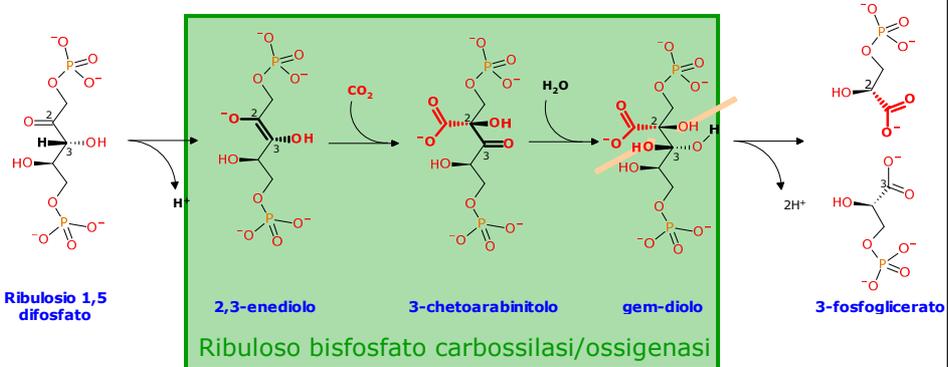
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 5 -

5

Fissazione della CO₂

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



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 6 -

6

RuBisCO (EC 4.1.1.39)

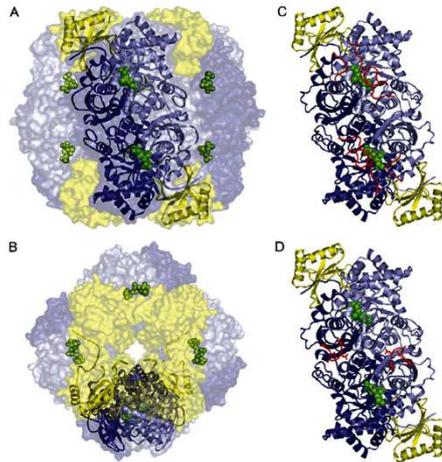


Fig. 1. The most common form of Rubisco from plants, cyanobacteria, and green algae is a hexadecamer of eight large and eight small subunits. (A) The L₈S₈ hexadecamer from spinach viewed along the 2-fold symmetry axis. Large subunits are blue, small subunits are yellow, and the substrate mimic (2CABP) is displayed as green spheres. The fold of one L₂S₂ unit is highlighted. (B) View of the hexadecamer along the 4-fold axis. This view is obtained from (A) by a 90° rotation around the z-axis. (C) The L₂S₂ unit in (A) with mobile elements (amino-terminal loop, loop 6, carboxy-terminus) highlighted in red. (D) The L₂S₂ unit with the βC-βD loop highlighted in red. Residues in the βC-βD loop are implicated to interact with Rubisco activase.

Catalysis and regulation in Rubisco
Inger Andersson
Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 7, pp. 1555–1568, 2008

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

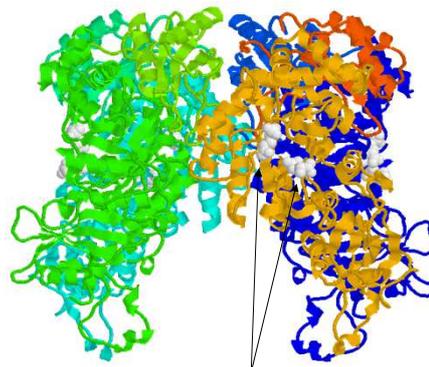
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 7 -

7

Fissazione della CO₂

- Queste reazioni sono catalizzate dall'enzima:
D-ribuloso 1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi (EC 4.1.1.39), RuBisCO
- Si ritiene che sia l'enzima maggiormente presente sulla terra.
–40% delle proteine solubili delle foglie
- Responsabile della selezione isotopica.



3-fosfoglicerato

L₈S₈

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

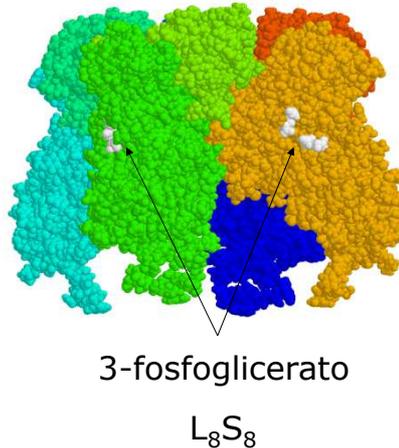
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 8 -

8

RuBisCO (EC 4.1.1.39)

- Un enzima stromale dal peso molecolare di 550kD ($\alpha_8\beta_8$).
- Due tipi di subunità:
 - Subunità grande (**LSU**), 58 kDa, codificata da *rbcL* nel cloroplasto, contiene il sito catalitico;
 - Subunità piccola (**SSU**), 14.4 kDa, codificata da *rbcS* nel nucleo, con funzioni strutturali
- In alcuni batteri fotosintetici e in alghe dinoflagellate l'enzima è formato da una sola subunità (LSU);
- L'attività enzimatica risiede nelle subunità **LSU** dove si lega il substrato (ribuloso 1,5-bisfosfato).



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

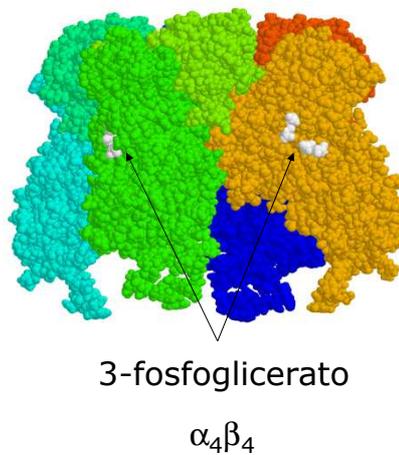
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 9 -

9

RuBisCO (EC 4.1.1.39)

- Ioni Magnesio (Mg^{2+}) sono necessari per l'attività enzimatica;
- La corretta posizione dello ione Mg^{2+} nel sito attivo è gestita da una molecola di CO_2 che forma un legame carbammato con la Lys 201
- La reazione è favorita dall'aumento di pH nello stroma (Esterno) a causa del trasporto di H^+ verso lo spazio tilacoideo (Interno).



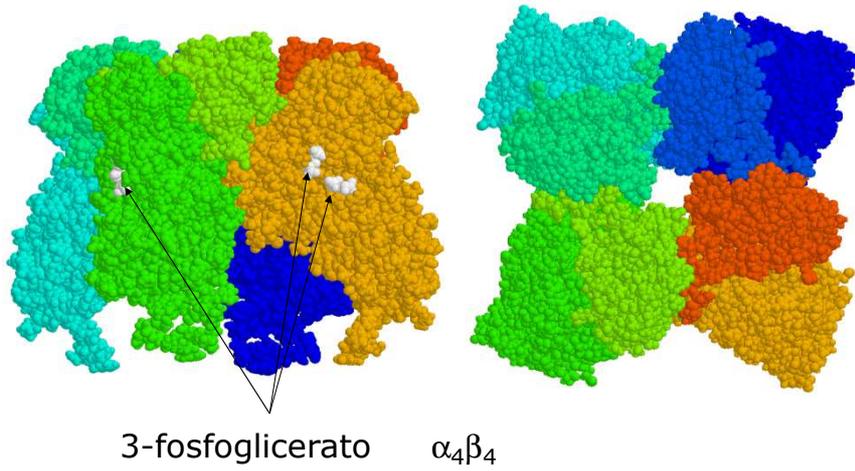
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 10 -

10

RuBisCO (EC 4.1.1.39)



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 11 -

11

Ciclo di Calvin-Benson

"for his research on the carbon dioxide assimilation in plants"



Melvin Calvin

The Nobel Prize in Chemistry 1961

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 12 -

12

QUI

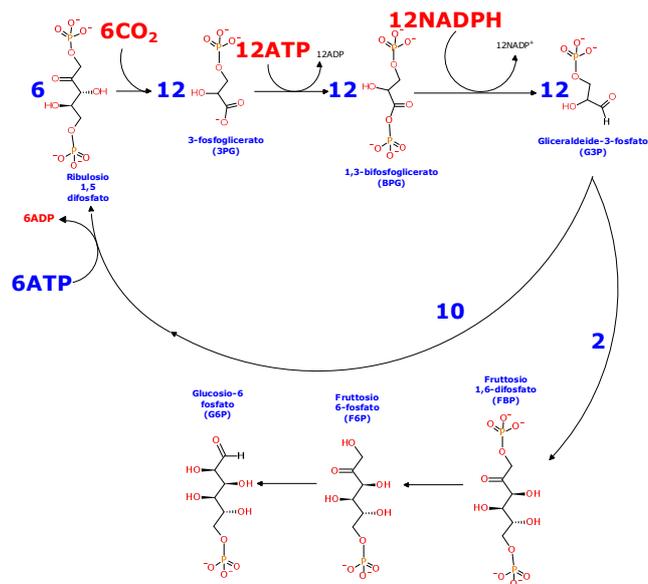
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 13 -

13

Ciclo di Calvin-Benson

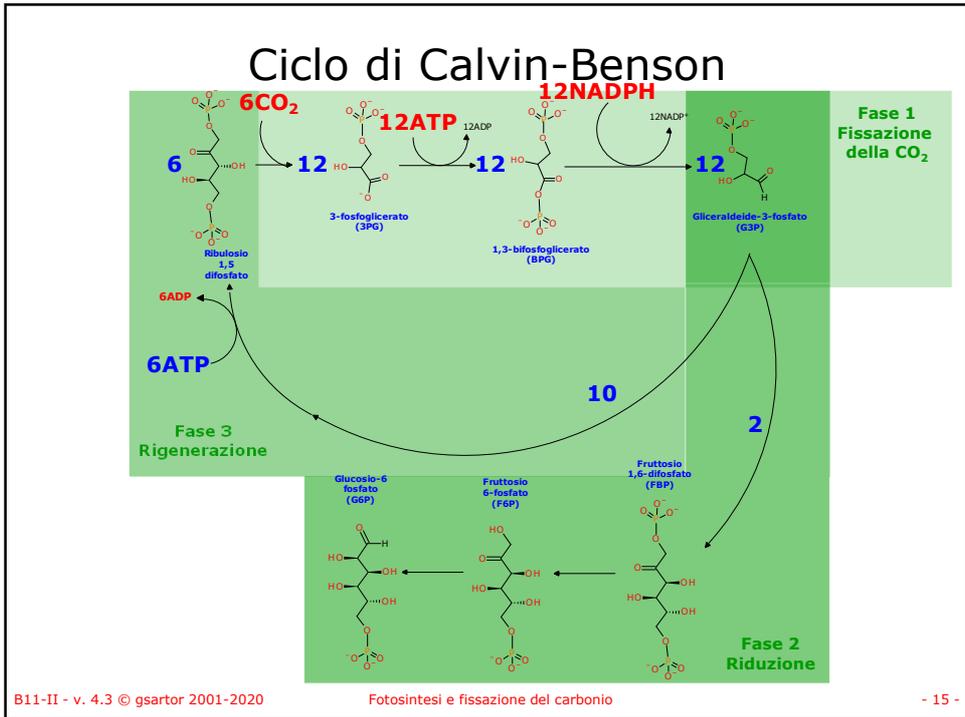


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 14 -

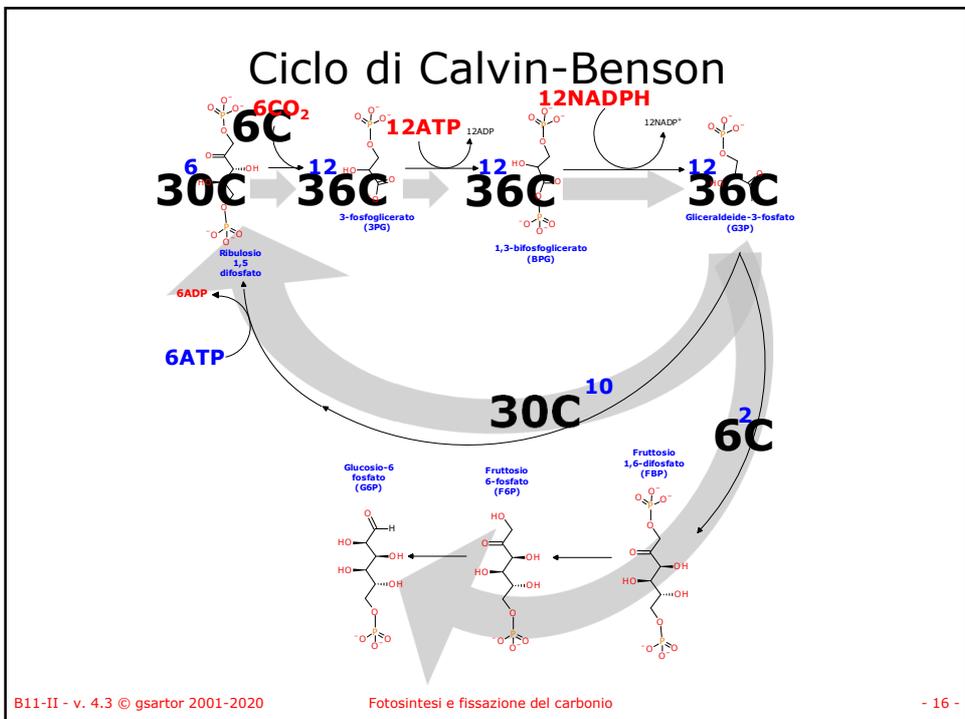
14



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

- 15 -

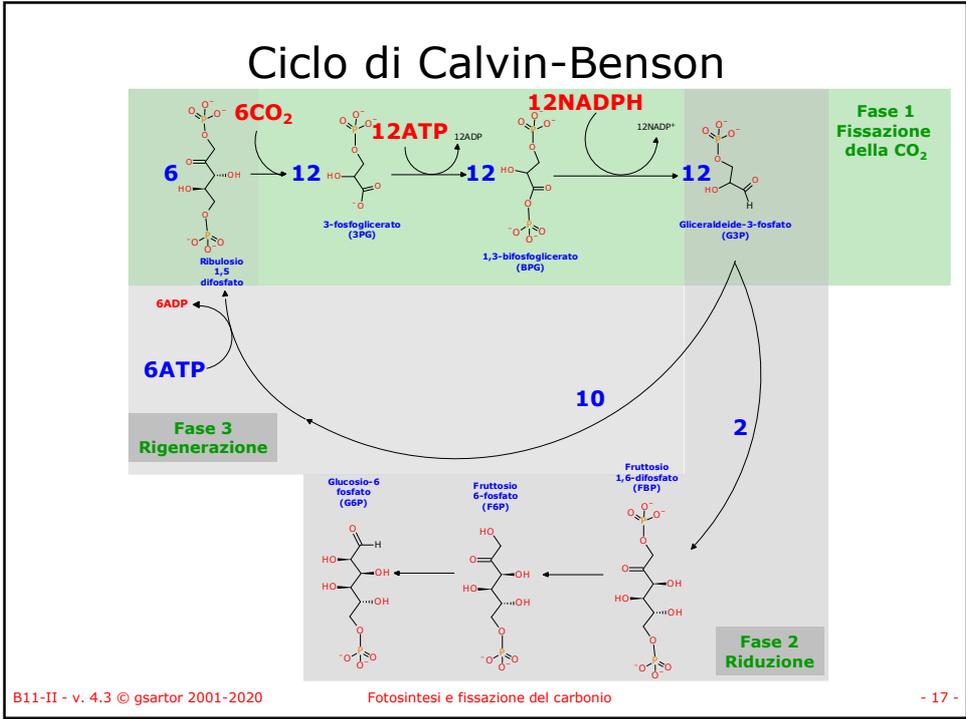
15



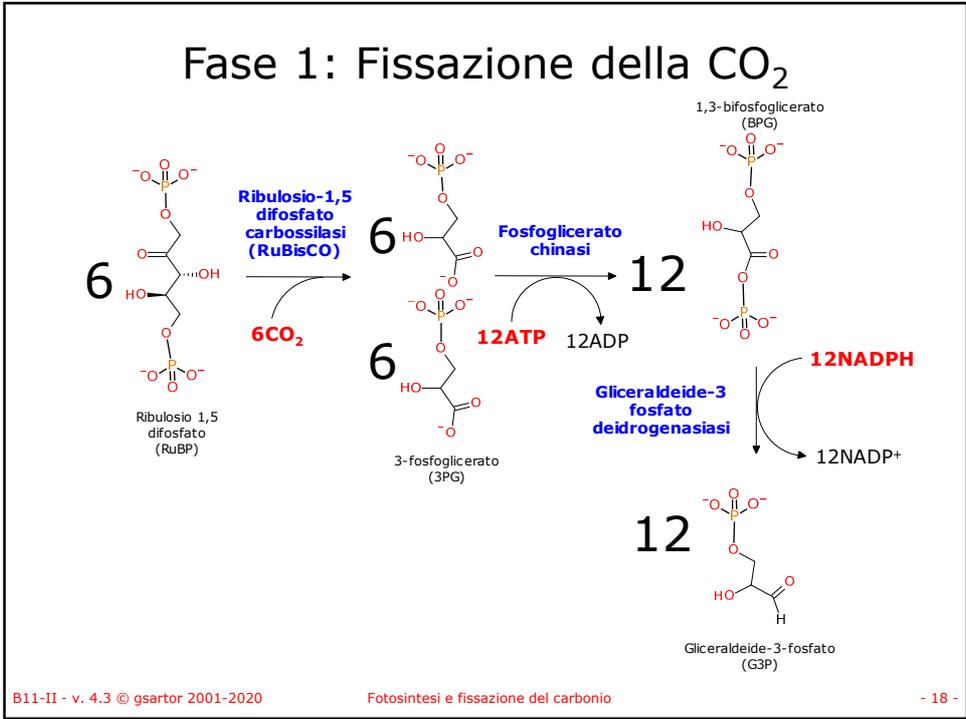
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

- 16 -

16

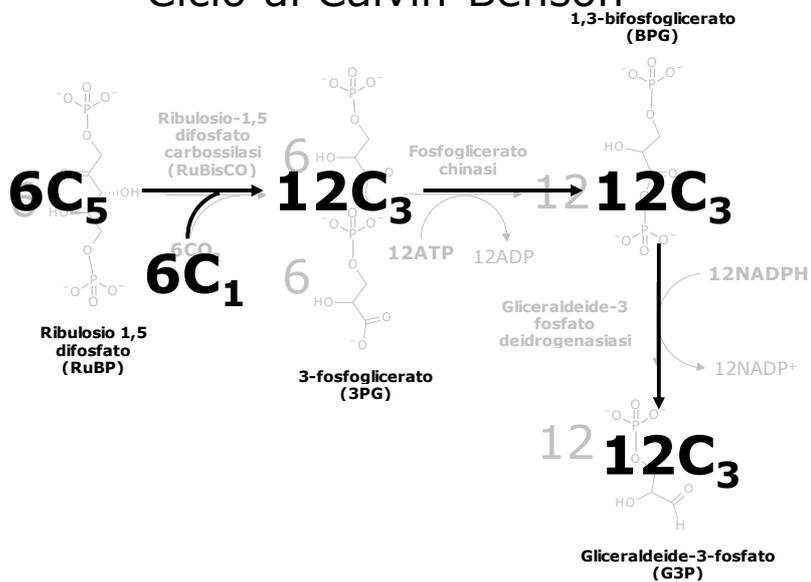


17



18

Ciclo di Calvin-Benson



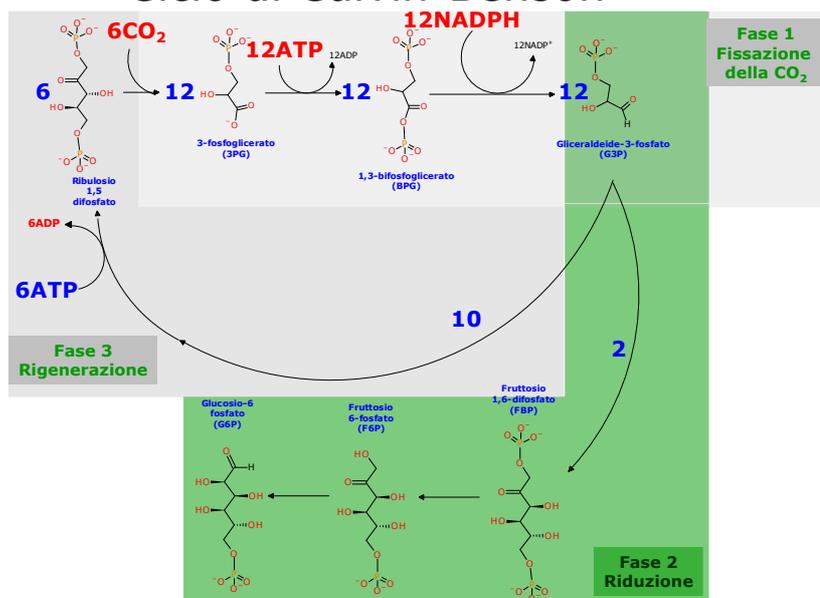
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 19 -

19

Ciclo di Calvin-Benson



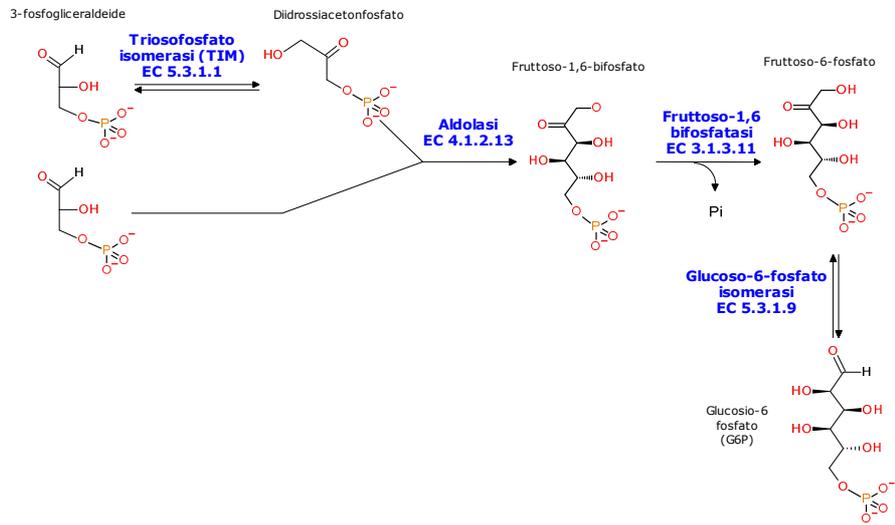
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 20 -

20

Fase 2: Riduzione



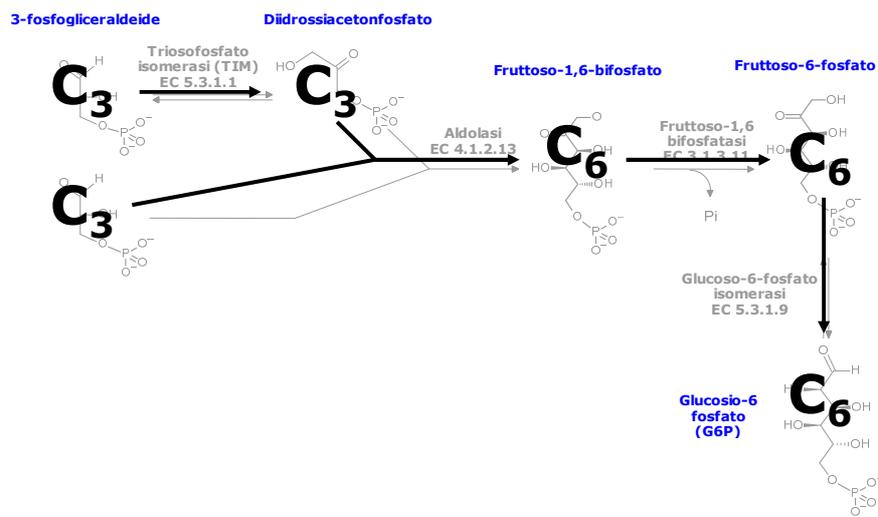
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 21 -

21

Fase 2: Riduzione

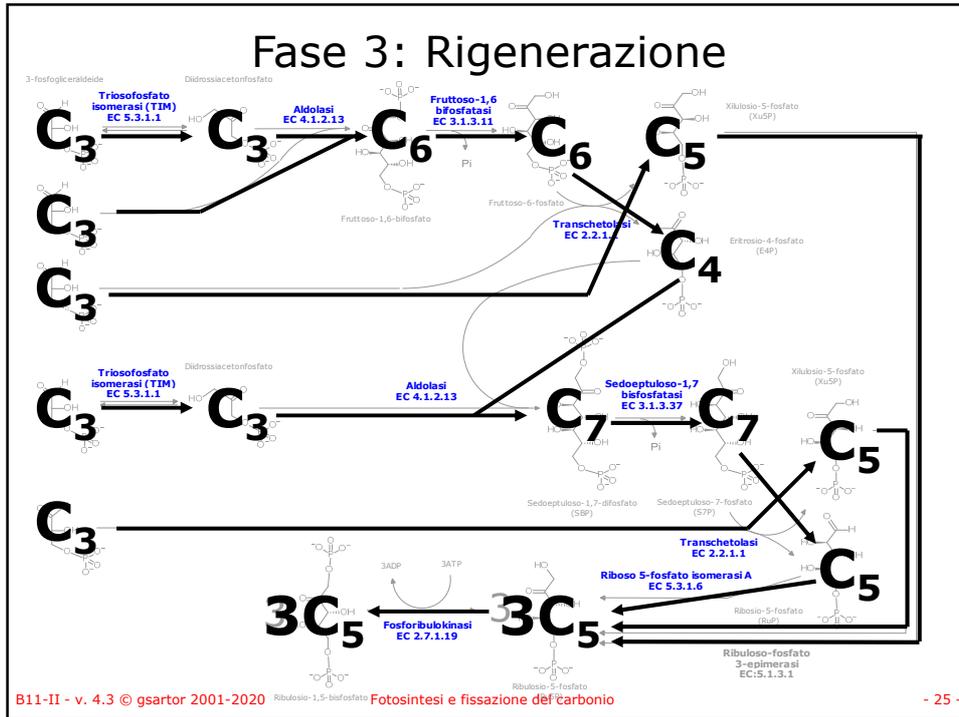


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

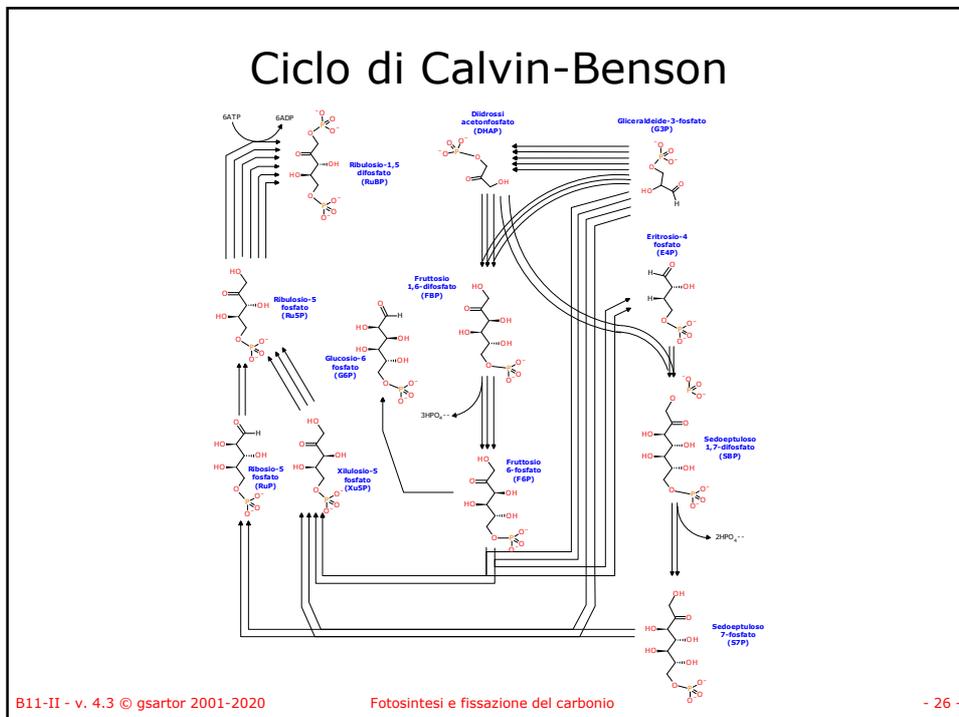
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 22 -

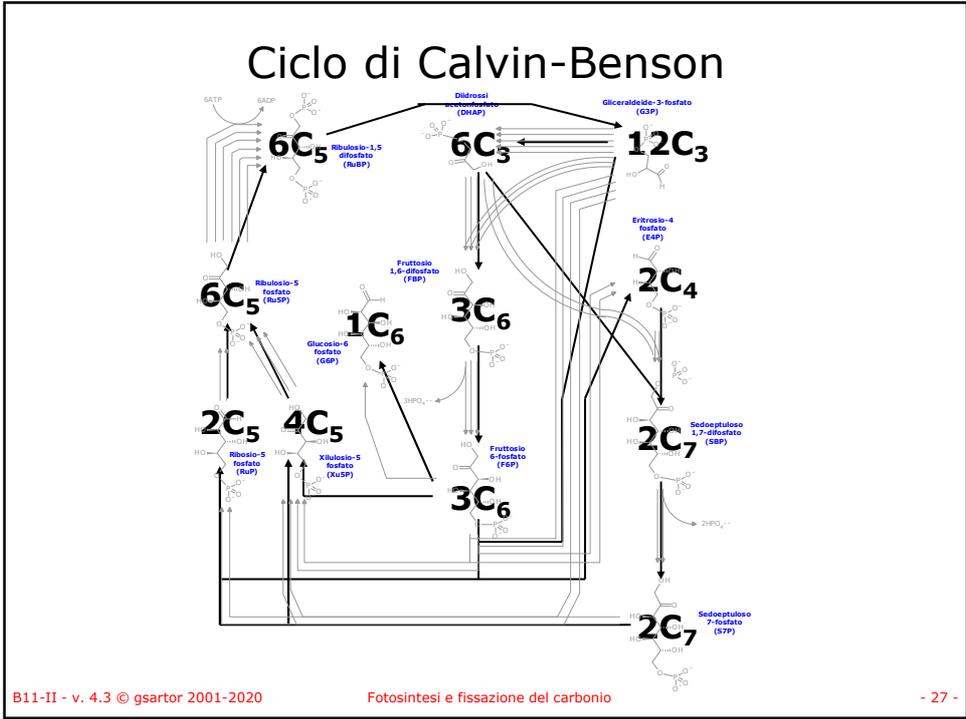
22



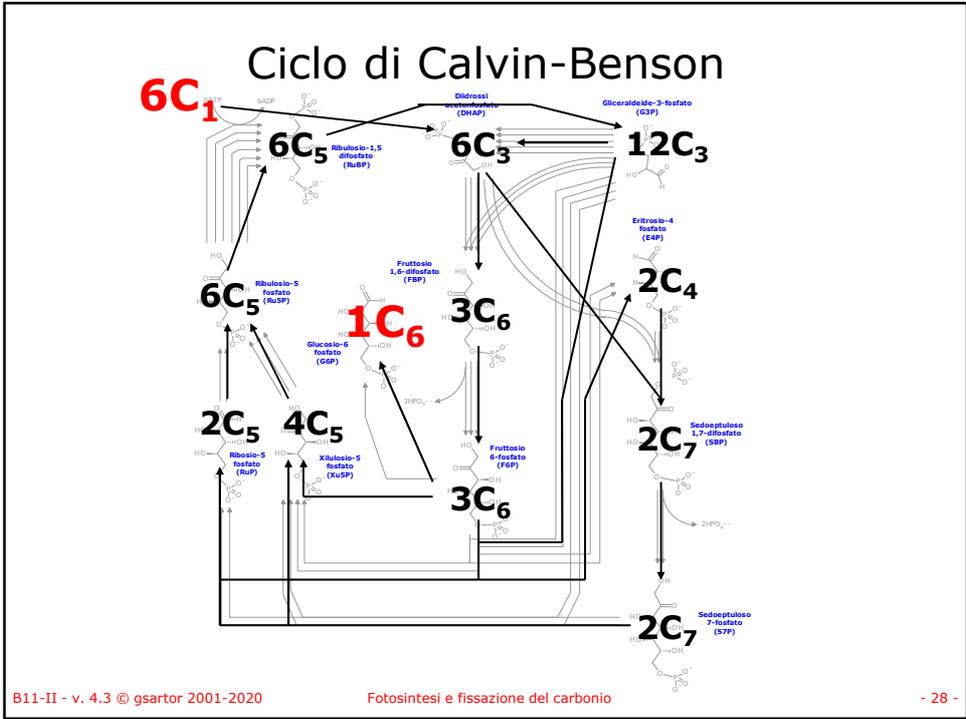
25



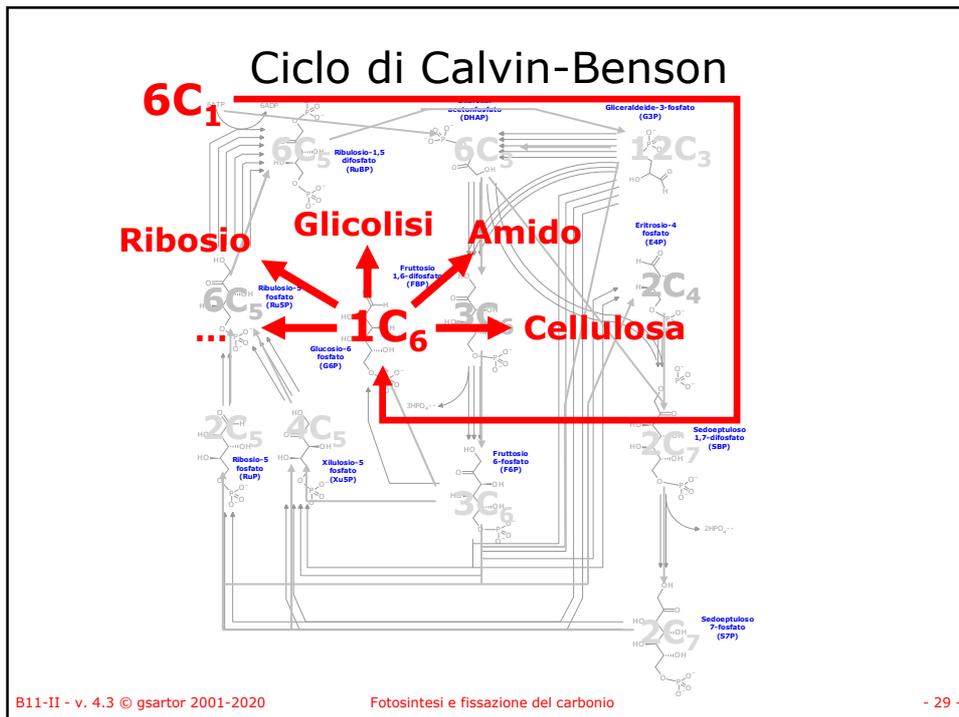
26



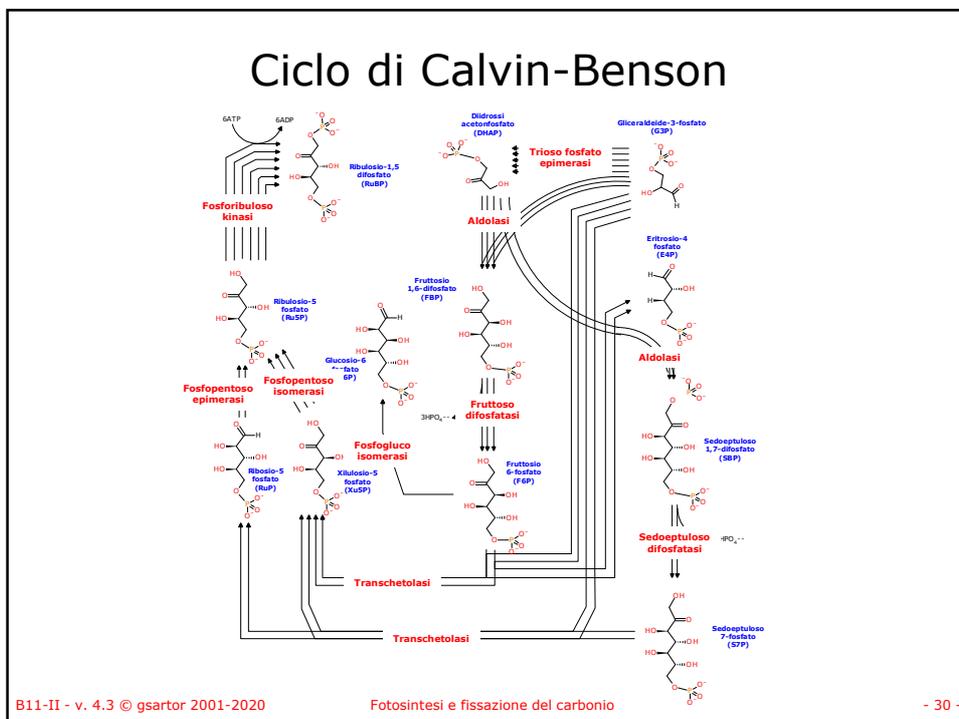
27



28



29



30

Bilancio

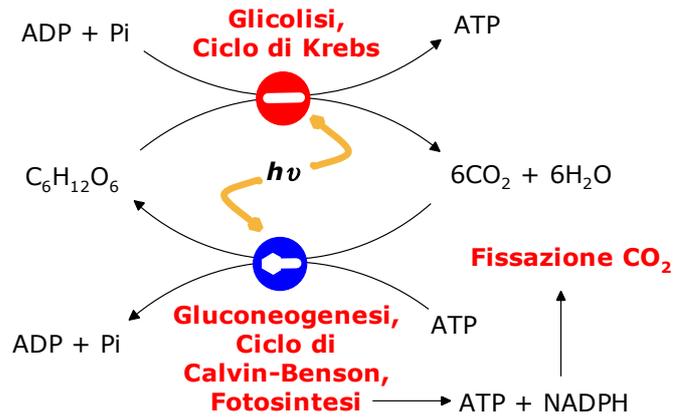
- Delle 18 molecole di ATP 12 sono usate per la fosforilazione 12 (6x2) molecole di 3PG e 6 per ricostituire 6 molecole di RuBP.
- Le 12 molecole di NADPH servono per ridurre il BPG a G3P.
- Quasi tutti gli enzimi del ciclo di Calvin-Benson sono comuni con la glicolisi e con il ciclo dei pentosi, una differenza è che la **gliceraldeide -3-fosfato deidrogenasi** è **NADPH specifica** mentre nella glicolisi è NAD⁺ dipendente.

Bilancio

- Da un punto di vista termodinamico il ciclo di Calvin-Benson è una reazione favorita.
- La reazione aldolasica nella glicolisi ha un $\Delta G'_{\circ}$ di +24 kJ·mole⁻¹, nel ciclo di Calvin-Benson avviene in senso opposto.
- Nella fase buia avvengono anche la glicolisi, il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa per produrre energia.

Bilancio e regolazione

- Non è un ciclo futile.
- Gli enzimi del ciclo di Calvin-Benson rispondono indirettamente alla luce: sono attivati quando le cellule sono illuminate.



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

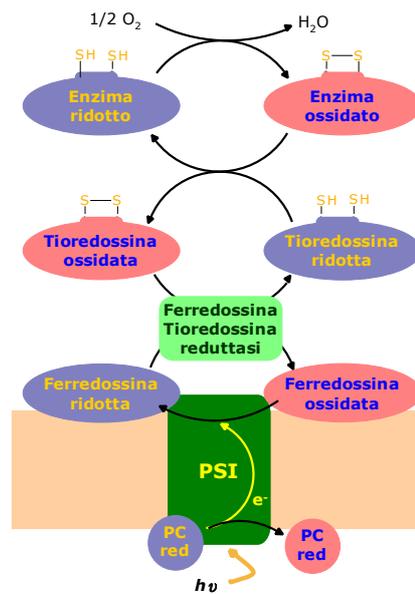
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 33 -

33

Regolazione

- Enzimi regolati dalla luce
 - Gliceraleide 3-fosfato deidrogenasi
 - Fruttosio 1,6-bisfosfatasi
 - Sedoeptuloso 1,7-bisfosfatasi
 - Rubisco attivasi



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 34 -

34

RuBisCO: Regolazione ionica

- A seguito dell'illuminazione il pH dello stroma passa da 7.0 a 8.0 a causa del trasporto ionico di protoni che genera il gradiente attraverso la membrana del tilacoide;
- Nello stesso tempo lo ione Mg^{2+} si muove fuori dal tilacoide la concentrazione nello stroma passa da 1-3 mM a 3-6 mM;

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

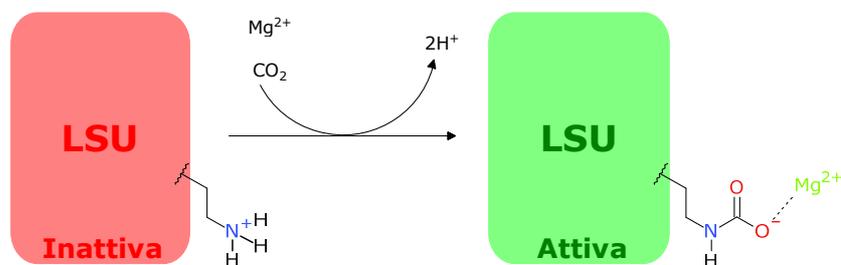
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 35 -

35

RuBisCO: Attivazione da CO_2

- Una molecola di CO_2 reagisce con la Lys201 per formare un carbammato;
- La reazione è favorita dalla concentrazione di Mg^{2+} e dal pH più basico;
- La reazione è sfavorita dalla presenza di RuBP (o altri inibitori fosforilati) nel sito di carbamilazione.



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

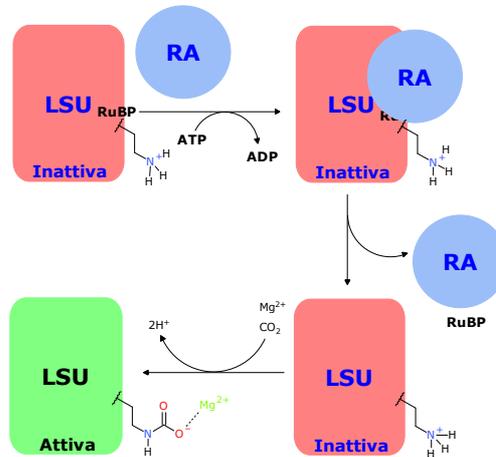
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 36 -

36

RuBisCO Attivasi

- Nelle piante e in alcune alghe è necessaria la presenza di un altro enzima: RuBisCO Attivasi (RA) che permette la formazione del carbammato al sito attivo di RuBisCO;
- Il substrato (Ribuloso 1,5-bisfosfato - RuBP) si lega fortemente al sito attivo quando non c'è il carbammato e ciò provoca il blocco di RuBisCO;
- Alla luce RA promuove il rilascio degli inibitori (o immagazzinamento di RuBP) dai siti catalitici;



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

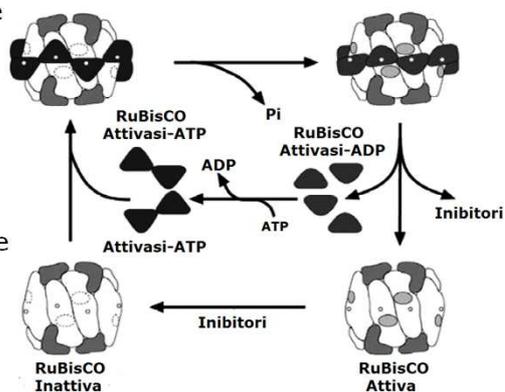
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 37 -

37

RuBisCO Attivasi

- RA è richiesta in alcune piante (Tabacco, fagioli, ecc.) la cui attività di RUBisCO è inibita al buio (per proteggerla dall'idrolisi) da un inibitore competitivo sintetizzato da queste piante: un analogo del substrato (2-carbossi-D-arabitol-1-fosfato, CA1P) che blocca in sito di carbamilazione;
- Alla luce CA1P viene rilasciato da RA e viene rapidamente defosforilato da una CA1P fosfatasi attivata dalla luce.



Da: Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone
Archie R. Portis, Jr.
Photosynthesis Research 75: 11-27, 2003

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 38 -

38

Regolazione da ATP/ADP

- La rimozione degli inibitori (RuBP, CA1P e altri analoghi dei substrati) da RA richiede ATP;
- La reazione è inibita da ADP e quindi l'attività di RA dipende dal rapporto ATP/ADP nello stroma;
- In molte piante la sensibilità di RA al rapporto ATP/ADP è modificata dallo stato redox dello stroma attraverso la tioredossina.

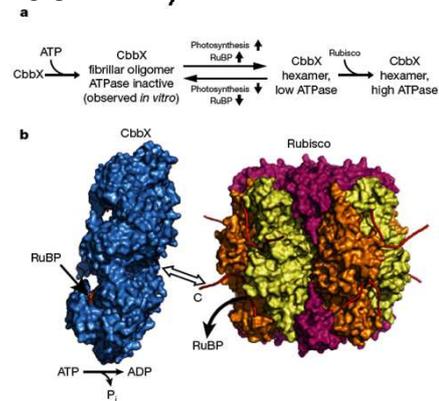


Figure 5 | Model of Rubisco activation by CbbX. a, Conformational and functional regulation of CbbX by RuBP and Rubisco (see the text). b, Proposed mechanism of Rubisco remodeling by CbbX. The surface-accessible C-terminal peptide of the RbcL subunit is transiently pulled into the central pore of CbbX, mediated by the CbbX ATPase, resulting in the release of inhibitory RuBP.

Structure and function of the AAA+ protein CbbX, a red-type Rubisco activase
 Oliver Mueller-Cajar, Mathias Stotz, Petra Wendler, F. Ulrich Hartl, Andreas Bracher & Manajit Hayer-Hartl
 NATURE - VOL 479 - 10 NOVEMBER 2011

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 39 -

39

Regolazione da fosfato

- Nei cianobatteri il fosfato inorganico partecipa alla regolazione della fotosintesi
- Il fosfato si lega al sito attivo di RuBisCO nel LSU dove influenza la transizione tra la conformazione attiva e quella meno attiva.
- L'attivazione della RuBisCO batterica è particolarmente sensibile al livello del fosfato che funziona come la RuBisCO attivasi nelle piante superiori.

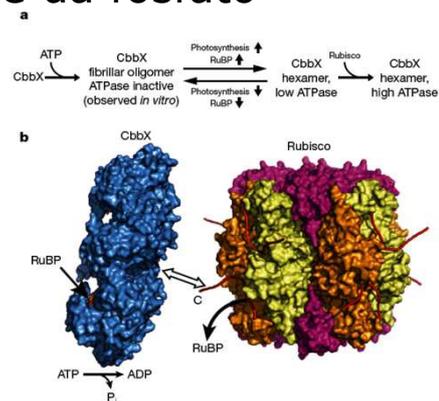


Figure 5 | Model of Rubisco activation by CbbX. a, Conformational and functional regulation of CbbX by RuBP and Rubisco (see the text). b, Proposed mechanism of Rubisco remodeling by CbbX. The surface-accessible C-terminal peptide of the RbcL subunit is transiently pulled into the central pore of CbbX, mediated by the CbbX ATPase, resulting in the release of inhibitory RuBP.

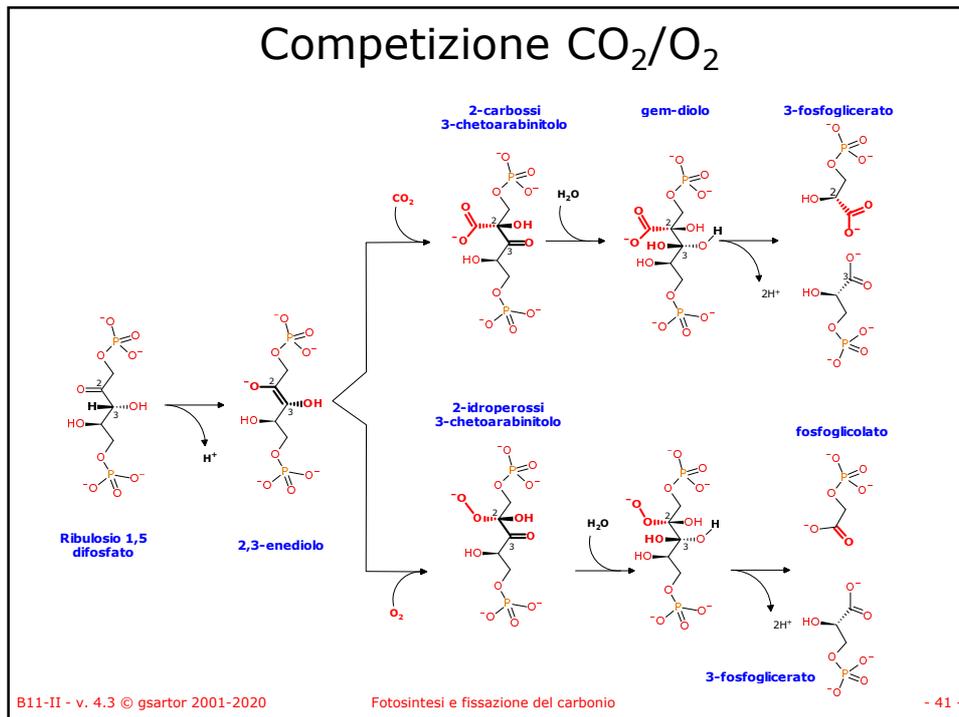
Structure and function of the AAA+ protein CbbX, a red-type Rubisco activase
 Oliver Mueller-Cajar, Mathias Stotz, Petra Wendler, F. Ulrich Hartl, Andreas Bracher & Manajit Hayer-Hartl
 NATURE - VOL 479 - 10 NOVEMBER 2011

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 40 -

40



41

Competizione CO₂/O₂

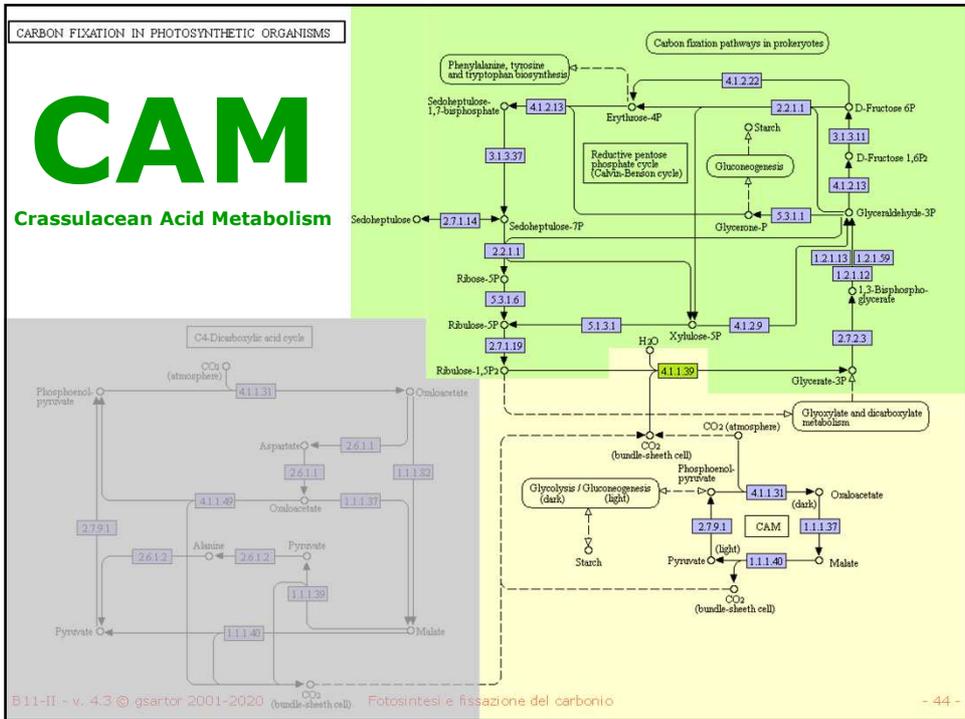
- O₂ e CO₂ competono per il sito attivo della RuBisCO quindi la fissazione della CO₂ può essere aumentata aumentandone la concentrazione in prossimità dello stroma del cloroplasto.
- Alcuni meccanismi si sono evoluti per aumentare la concentrazione di CO₂ nello stroma (piante C4).
- Il fatto che anche O₂ sia substrato di RuBisCO pone l'interrogativo della presenza di un ciclo futile ma può essere considerato un meccanismo di controllo per prevenire il sovraccarico durante periodi di alto flusso di luce.
- Questa debolezza di RuBisCO è causa della **fotorespirazione** che, in una pianta sana in ambiente luminoso, porta alla fissazione di O₂ invece di CO₂.
- Questo fenomeno è temperatura dipendente: ad alta temperatura diminuisce la solubilità di CO₂ nell'acqua in prossimità delle foglie; poiché le foglie vengono raffreddate dall'evaporazione la mancanza di acqua porta ad un aumento locale della temperatura.

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020 Fotosintesi e fissazione del carbonio - 42 -

42



43



44

CAM

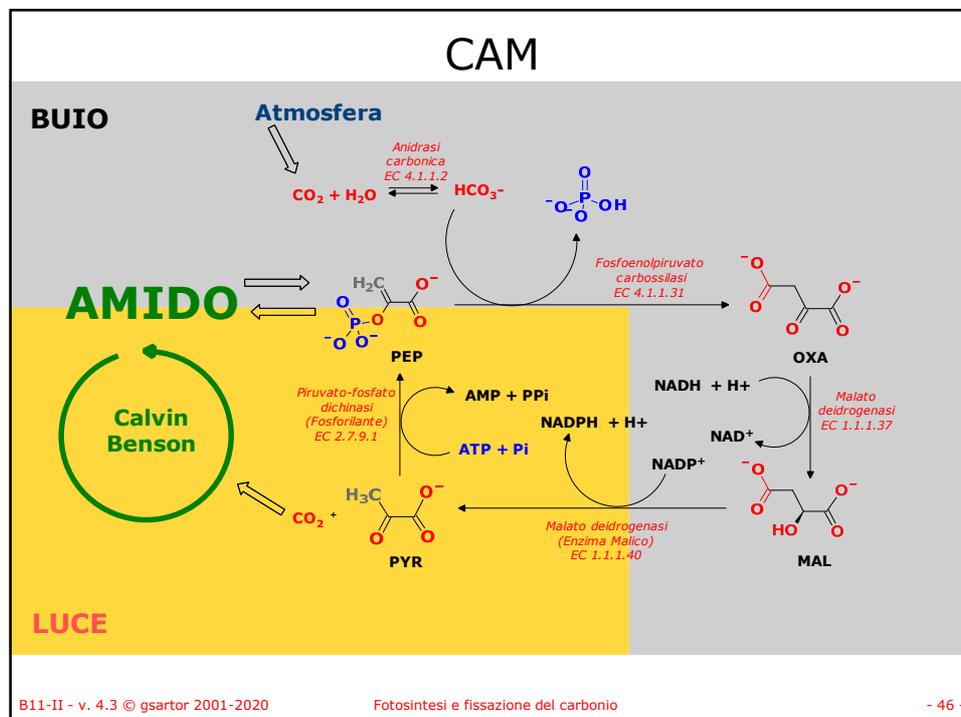
- Le piante CAM mantengono i loro stomi (sulla pagina inferiore della foglia) chiusi durante il giorno prevenendo l'evaporazione anche attraverso uno strato di cera;
- Questa strategia impedisce gli scambi gassosi durante il giorno e, quindi, la fissazione della CO₂.
- La CO₂ viene "conservata" nei vacuoli come acido malico.
- L'efficienza fotosintetica è bassa, tuttavia, lo svolgimento della fotosintesi in condizioni ambientali proibitive (clima arido).
- Pur avendo una base genetica, il meccanismo del metabolismo CAM è innescato dalle condizioni ambientali: la fotosintesi CAM si svolge infatti in condizioni di clima arido, ma in occasione di giornate umide (dopo un temporale) le piante CAM svolgono il ciclo di Calvin secondo il meccanismo delle piante C₃.
- Non vi è separazione tissutale degli eventi.

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 45 -

45



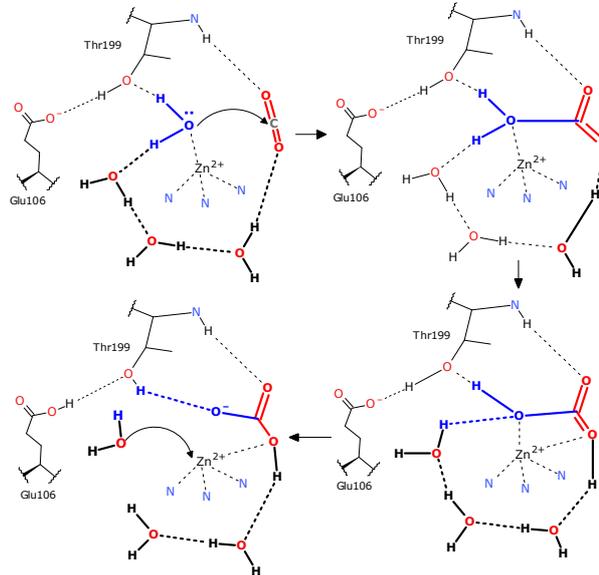
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 46 -

46

Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)



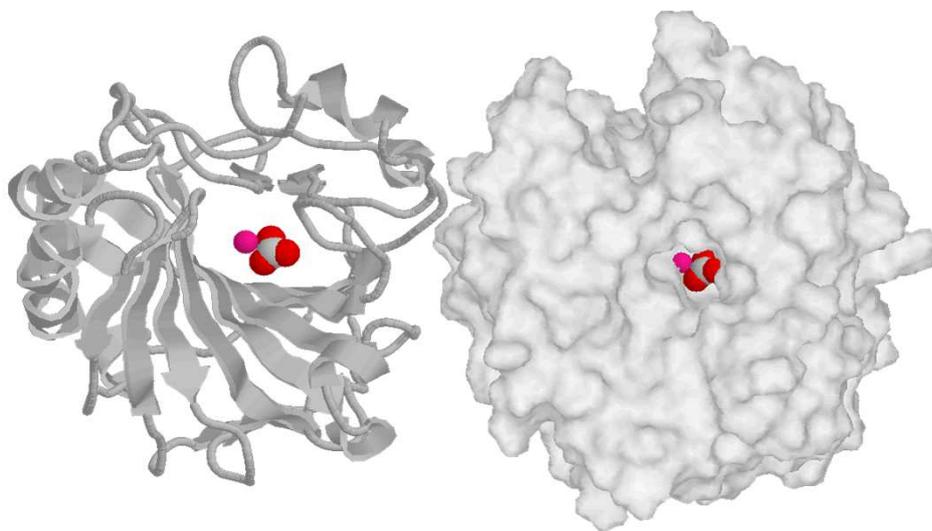
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 49 -

49

Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)



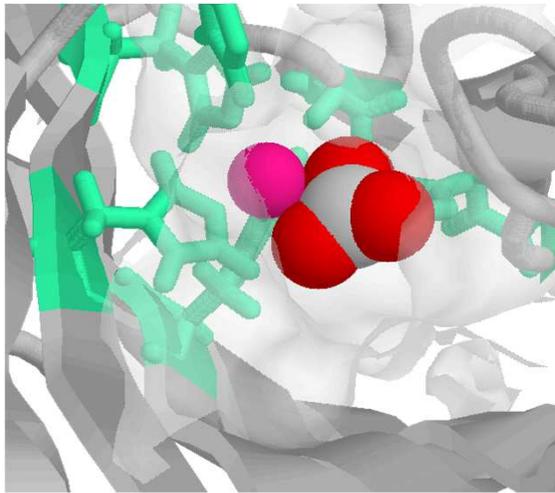
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 50 -

50

Anidrasi carbonica (EC 4.2.1.1)

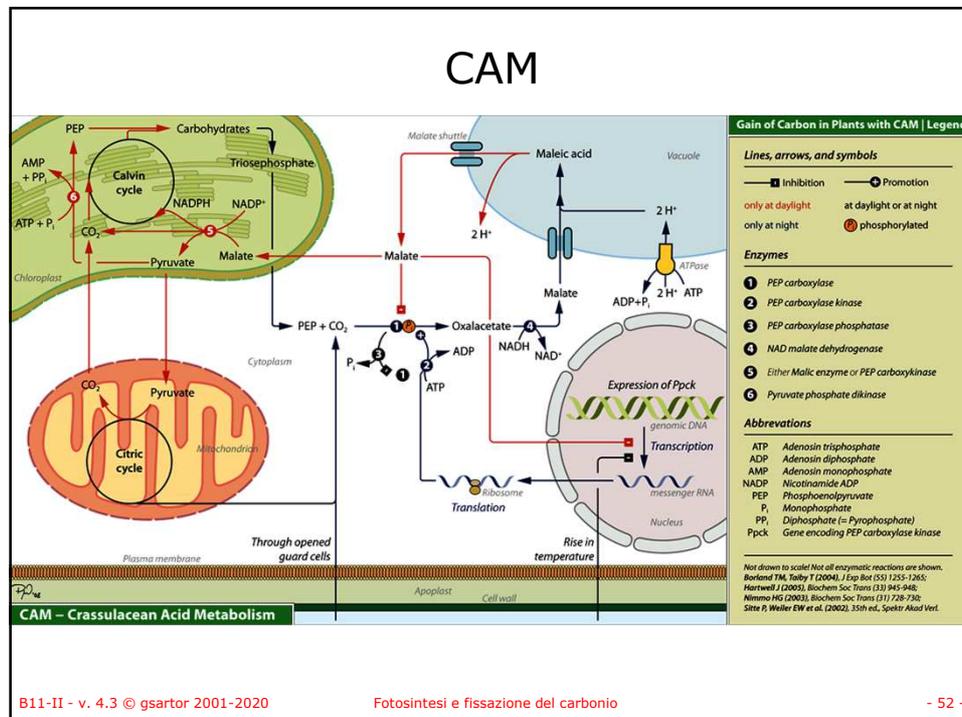


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 51 -

51



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 52 -

52



53

Piante C4 e competizione CO_2/O_2

- La competizione tra O_2 e CO_2 per RuBisCO porta alla **fotorespirazione**;
- Le piante C4 utilizzano, inizialmente, la PEP carbossilasi che possiede una maggiore affinità per la CO_2 ;
- Si produce un intermedio a quattro atomi di carbonio (**C4**) che è trasportato nel sito della fissazione del carbonio e decarbossilato rilasciando CO_2 .
- Questo processo coinvolge due tipi di cellule funzionalmente e morfologicamente diverse, le **cellule del mesofillo** e le **cellule della guaina del fascio**.

54

Piante C4 e competizione CO₂/O₂

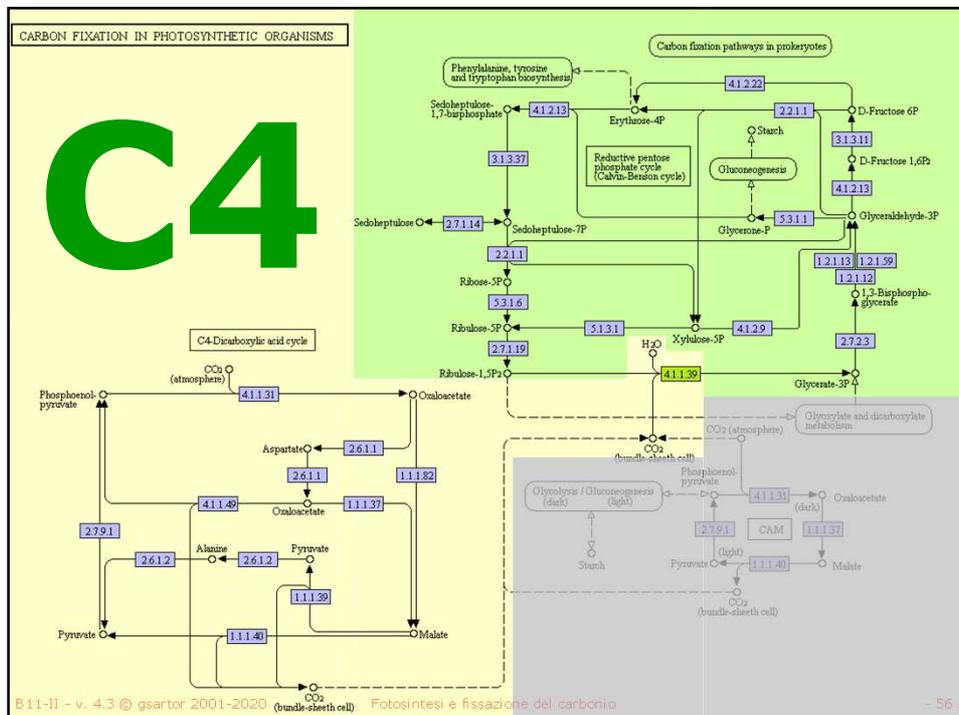
- Un'evoluzione del processo coinvolge gli aminoacidi con un rilascio ancora maggiore di CO₂ a livello dei cloroplasti.
- Questi cloroplasti sono modificati con scarsa grana tilacoidea.
- Questo meccanismo permette un migliore controllo del processo ad alte temperature.
- Ci sono diverse varianti:
 - L'acido C4 può essere trasportato dalle cellule del mesofillo alle cellule del fascio come malato o come aspartato.
 - L'acido C3 trasportato dalle cellule del fascio alle cellule del mesofillo può essere piruvato o alanina.
- L'enzima che catalizza la decarbossilazione nelle cellule del fascio è diverso a seconda delle specie:
 - Nel mais e nella canna da zucchero è l'enzima malico NAD⁺ dipendente;
 - Nel miglio è l'enzima malico NADP⁺ dipendente;
 - Nel *Panicum maximum* è PEP carbossichinasi.

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

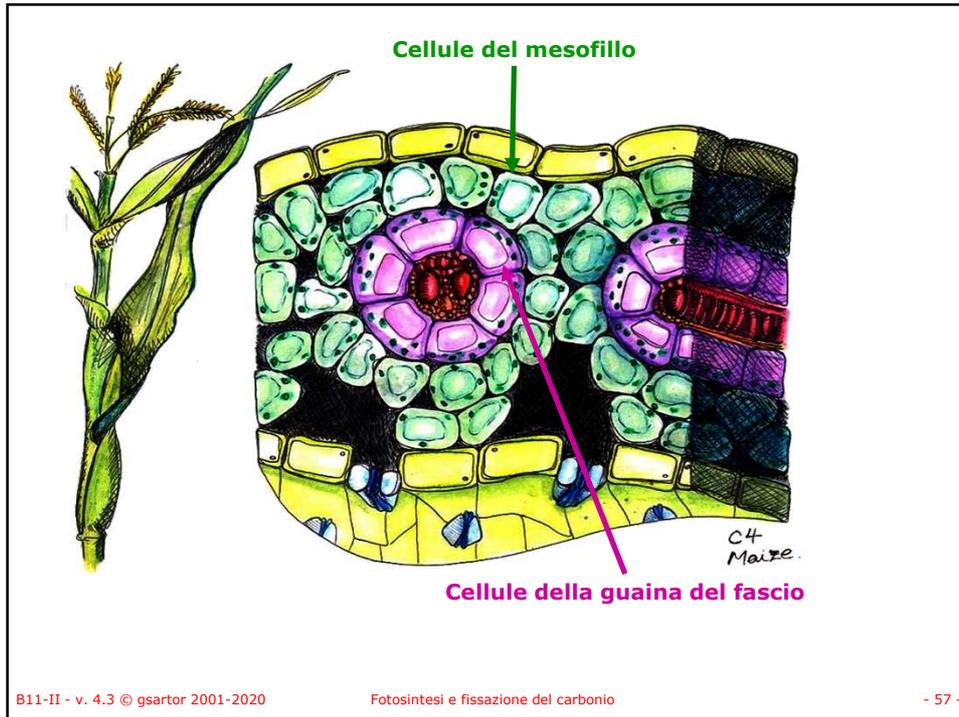
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 55 -

55



56

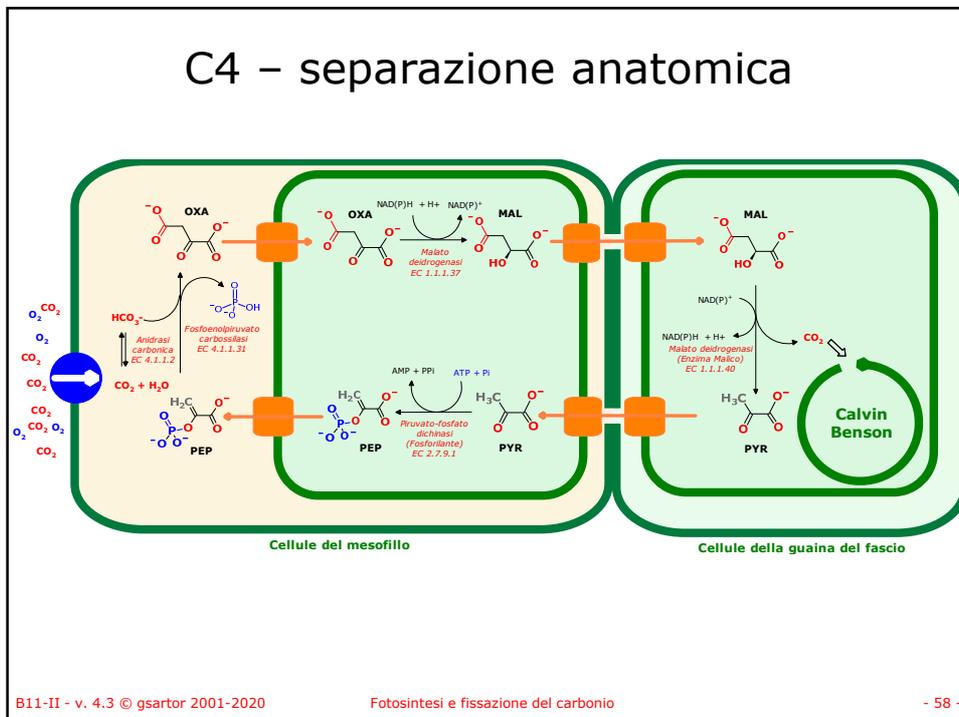


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 57 -

57



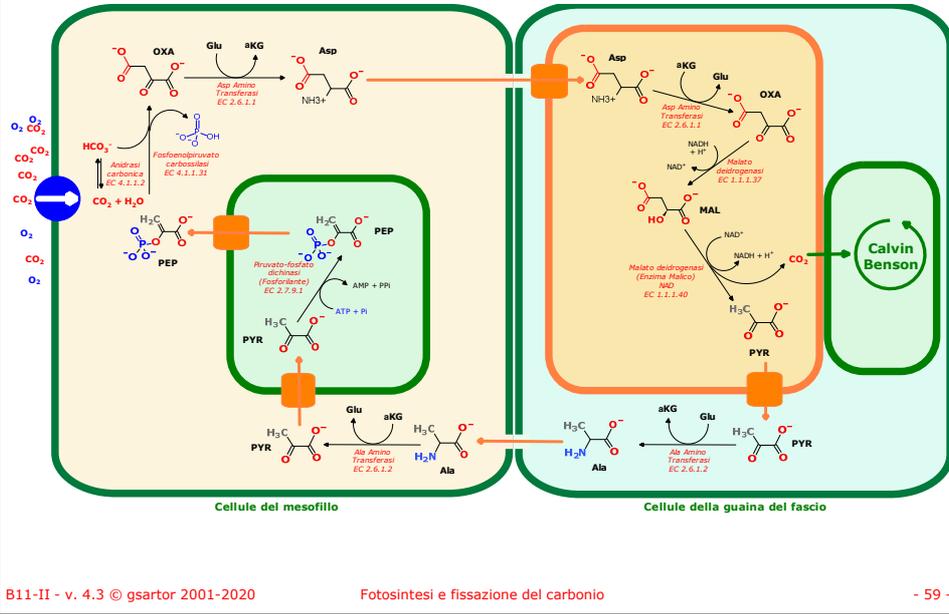
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 58 -

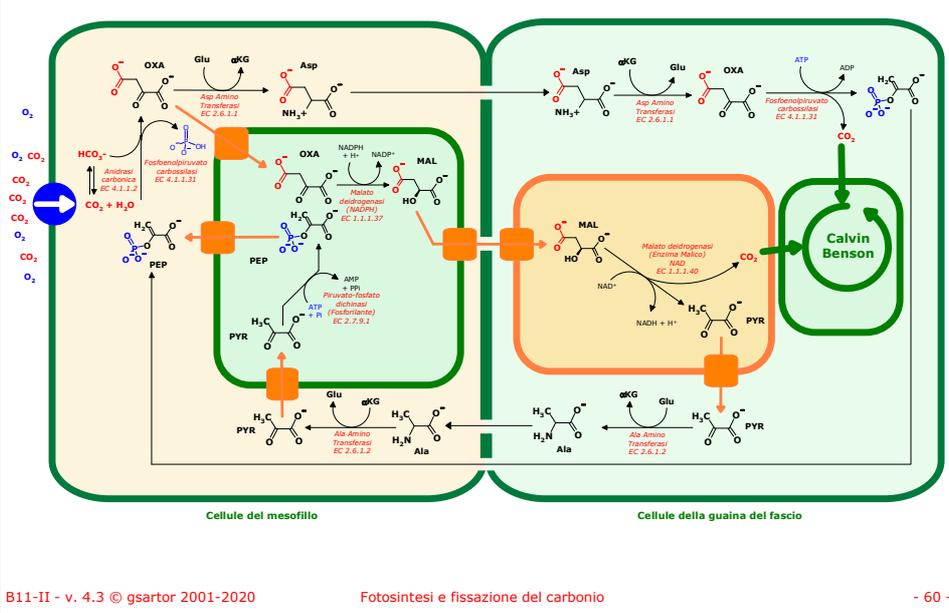
58

C4 – separazione anatomica

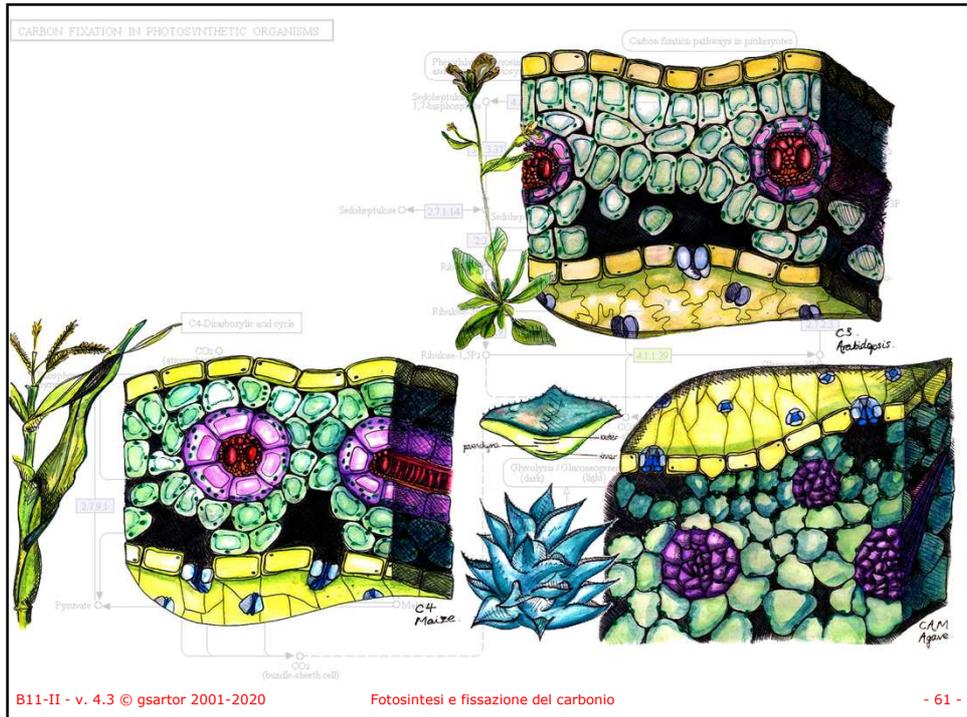


59

C4 – separazione anatomica



60

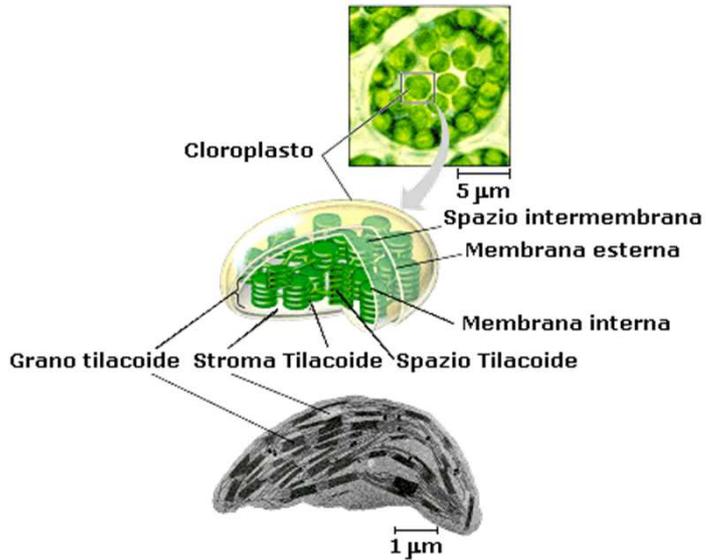


61



62

Cloroplasti

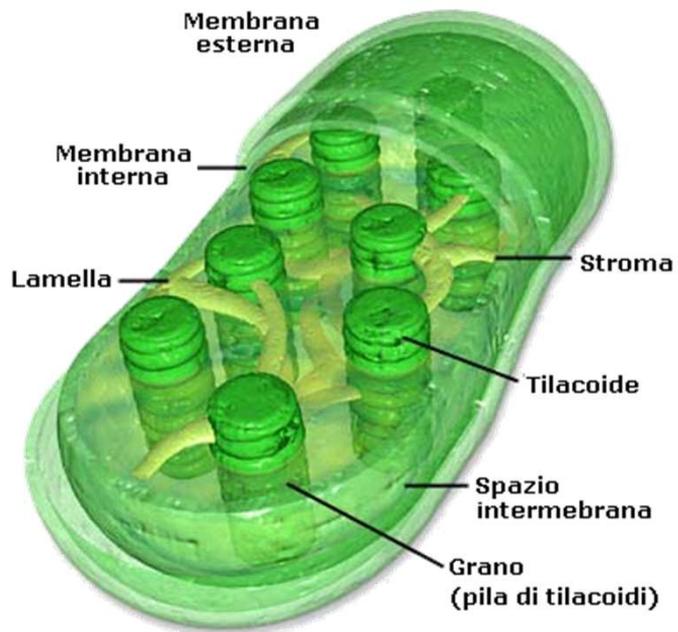


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 63 -

63

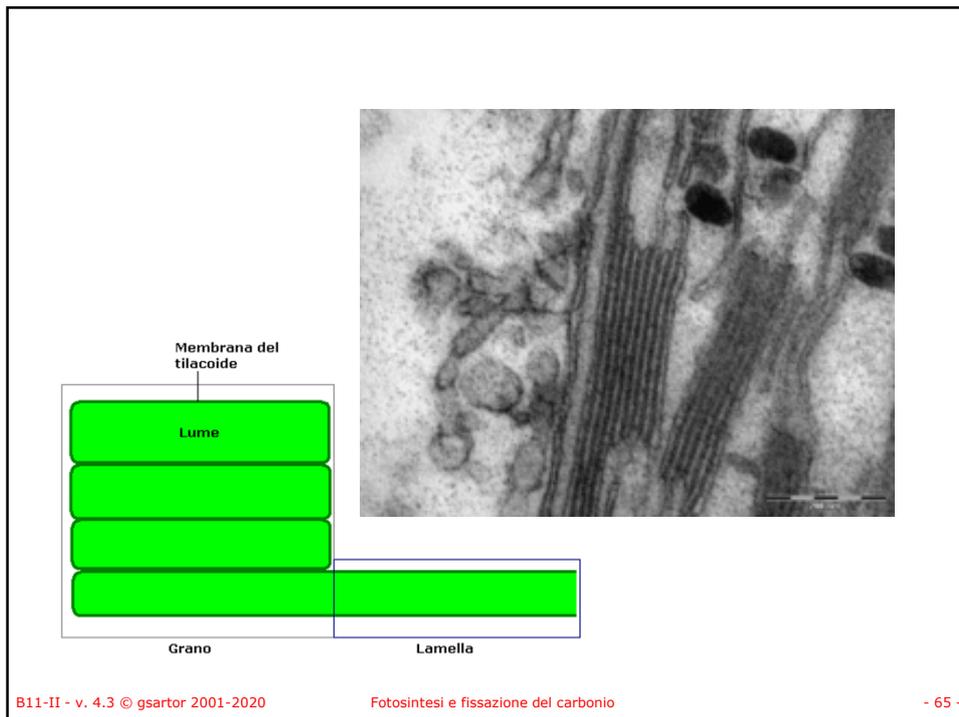


B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 64 -

64

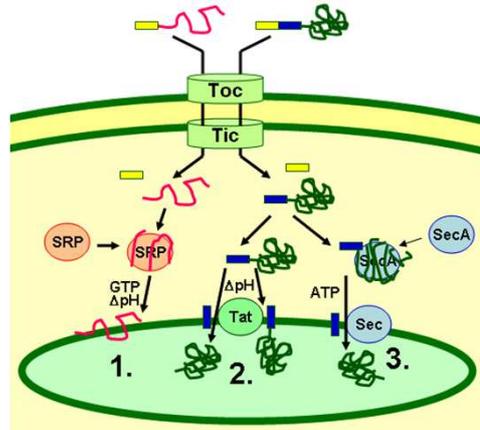


65



66

- Le proteine del tilacoide sono etichettate al loro bersaglio da un peptide segnale e da una via secretoria nel cloroplasto.
- Molte delle proteine del tilacoide sono codificate dal genoma nucleare e necessitano di due segnali per raggiungere il bersaglio: un **segnale N-terminale** e un **segnale per il bersaglio** all'interno del tilacoide.



B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

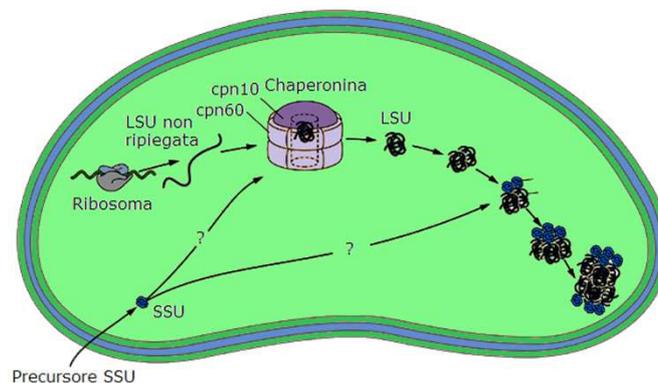
Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 67 -

67

RuBisCO

- Le due subunità di RuBisCO sono codificate da due genomi diversi:
- La subunità più grande (LSU) dal genoma del cloroplasto;
- La subunità più piccola (SSU) dal genoma nucleare.



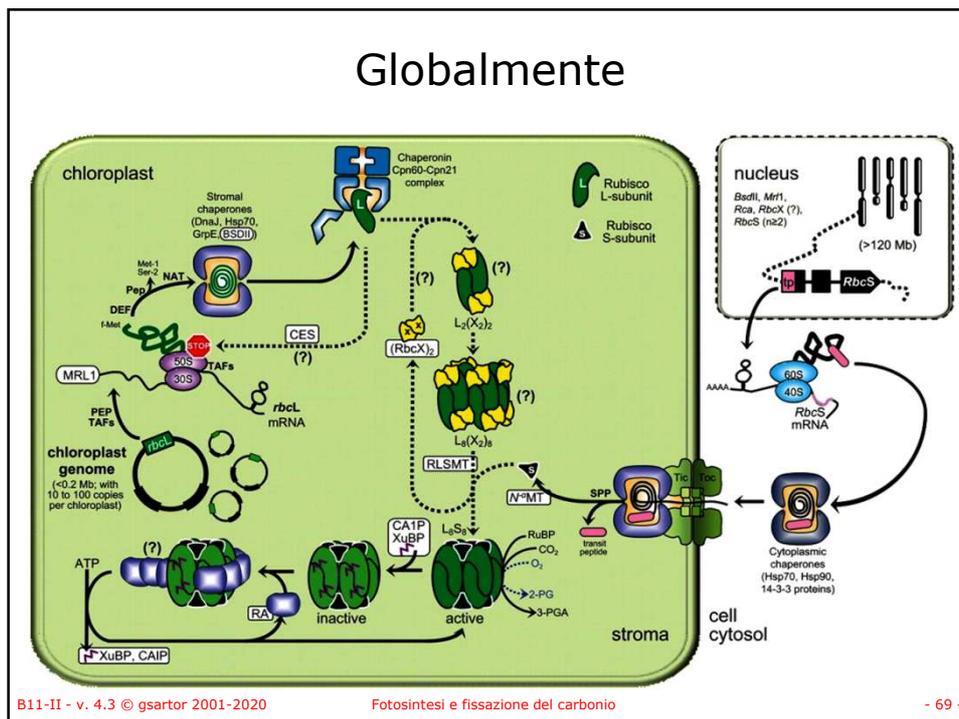
B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 68 -

68

Globalmente



69

Referenze sul WEB

- Vie metaboliche
 - KEGG: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Degradazione degli xenobiotici: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01196.html>
- Struttura delle proteine:
 - Protein data bank (Brookhaven): <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Hexpasy
 - Expert Protein Analysis System: <http://us.expasy.org/sprot/>
 - Prosite (protein families and domains): <http://www.expasy.org/prosite/>
 - Enzyme (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
 - Scop (famiglie strutturali): <http://scop.berkeley.edu/>
- Enzimi:
 - Nomenclatura - IUBMB: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/>
 - Proprietà - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Expasy (Enzyme nomenclature database): <http://www.expasy.org/enzyme/>
- Database di biocatalisi e biodegradazione: <http://umbdb.ahc.umn.edu/>
- Citocromo P450: <http://www.icgeb.org/~p450srv/>
- Metallotioneine: <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- Tossicità degli xenobiotici: Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov>

B11-II - v. 4.3 © gsartor 2001-2020

Fotosintesi e fissazione del carbonio

- 70 -

70

Crediti e autorizzazioni all'utilizzo

- Questo materiale è stato assemblato da informazioni raccolte dai seguenti testi di Biochimica:
 - CHAMPE Pamela , HARVEY Richard , FERRIER Denise R. LE BASI DELLA BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-17030-9] - Zanichelli
 - NELSON David L. , COX Michael M. I PRINCIPI DI BIOCHIMICA DI LEHNINGER - Zanichelli
 - GARRETT Reginald H., GRISHAM Charles M. BIOCHIMICA con aspetti molecolari della Biologia cellulare - Zanichelli
 - VOET Donald , VOET Judith G , PRATT Charlotte W FONDAMENTI DI BIOCHIMICA [ISBN 978-8808-06879-8] - Zanichelli
- E dalla consultazione di svariate risorse in rete, tra le quali:
 - Kegg: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
 - Brenda: <http://www.brenda.uni-koeln.de/>
 - Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>
 - Rensselaer Polytechnic Institute: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/MB1index.html>
- Il materiale è stato inoltre rivisto e corretto dalla **Prof. Giancarla Orlandini** dell'Università di Parma alla quale va il mio sentito ringraziamento.

Questo ed altro materiale può essere reperito a partire da: <http://www.gsartor.org/pro>

- Il materiale di questa presentazione è di libero uso per didattica e ricerca e può essere usato senza limitazione, purché venga riconosciuto l'autore usando questa frase:

Materiale ottenuto dal Prof. Giorgio Sartor
Università di Bologna

Giorgio Sartor
Ufficiale: giorgio.sartor@unibo.it
Personale: giorgio.sartor@gmail.com

Aggiornato il 28/04/2020 10:33:49