

Biologia funcional

Textos de apoio

Ribulose bifosfato carboxilase

Catabolism of ribulose biphosphate carboxylase from higher plants

Ricardo Boavida Ferreira^{1,2*}, Maria da Glória Esquivel², and Artur Ricardo Teixeira²

¹Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Apartado 127, 2781-901 Oeiras, Portugal. ²Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 1349-017 Lisboa, Portugal

ABSTRACT

Plant ribulose biphosphate carboxylase (RuBP carboxylase, EC 4.1.1.39) displays several physiological and nutritional roles. Indeed, the fundamental importance of this enzyme derives not only from its role on photosynthesis, where it catalyses the initial reaction of the Calvin cycle, but also because it exhibits two important, inevitable chemical constraints that are inherent properties of the enzyme molecule: (i) the ability to catalyse the initial reaction of photorespiration, generally regarded as the main metabolic constriction on plant productivity. (ii) The extremely low rate of catalysis; to grow at convenient rates, plants need to synthesize huge amounts of the enzyme, making it the most abundant protein in nature. Nevertheless, when the strategy is survival rather than growth, plants may use the RuBP carboxylase pool as a foliar storage of carbon, nitrogen and sulphur.

The concentration of RuBP carboxylase, as of proteins in general, is determined by the controlled balance between synthesis and degradation. A considerable amount of information has accumulated in what concerns its mechanism of synthesis. However, fundamental gaps still exist in the knowledge about the catabolism of this enzyme.

The molecular mechanism responsible for RuBP carboxylase catabolism remains largely unknown. Recent reports suggest that the enzyme is first oxidised into a catalytically inactive form and polymerized into

very large molecular mass aggregates. Interaction with a membrane and subsequent proteolysis complete the turnover cycle of the enzyme.

The conditions that trigger the degradation of RuBP carboxylase are now relatively well known. Under normal metabolic conditions, RuBP carboxylase is apparently subjected to continuous turnover at rates that differ widely with the species considered. The metabolic fates of RuBP carboxylase may be tentatively grouped into four categories depending on the plant species under study and the physiological conditions considered: (i) stress situations that do not induce degradation or structural changes in the enzyme molecule; (ii) stress situations that cause non-disulphide oxidation followed by polymerization of the enzyme; (iii) stress situations that produce enzyme degradation in a process leading to plant death; (iv) stress situations that originate "reversible" enzyme proteolysis in a process that does not lead to plant death.

ABBREVIATIONS

CA1-P : 2-Carboxy-D-arabinitol 1-phosphate

LSU : Large subunit of RuBP carboxylase

RuBP : D-Ribulose 1,5-bisphosphate

SSU : Small subunit of RuBP carboxylase

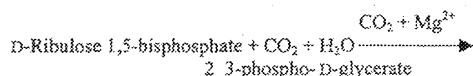
INTRODUCTION

Terms and definitions

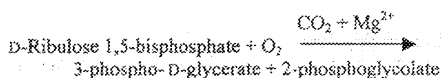
Ribulose biphosphate carboxylase was given the code number EC 4.1.1.39. It is a lyase, with the systematic name 3-phospho-D-glycerate carboxy-lyase

*Author to whom correspondence should be addressed: Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, 1349-017 Lisboa, Portugal
E-mail: rbferrera@isa.utl.pt

(dimerizing), that catalyses the first reaction of the Calvin cycle:



In the presence of oxygen, the enzyme will also inevitably catalyse, both *in vivo* and *in vitro*, the oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) [1], the first reaction of photorespiration:



For this reason, the enzyme is also commonly termed ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. Old designations include fraction I protein and carboxydismutase. Three shorter versions are currently widely used in the scientific literature – Rubisco, RuBPCase and RuBP carboxylase. In this review, we have adopted RuBP carboxylase because it follows closer the general guidelines used to form enzyme trivial names.

Arias and coauthors pointed out in 1969 that a certain confusion exists in the literature concerning the use of the terms turnover and degradation [2]. Subsequently, Davies [3] reported several definitions of turnover that are often encountered in the literature, such as “the process of renewal of a given substance”, “the flux of amino acids through protein”, or “the hydrolysis of intracellular proteins to their component amino acids”. Interestingly, a private pool indicated that, to most biochemists, the term turnover implied the degradative process more than the synthetic process, regardless of which is the larger. Therefore, protein turnover is often used to denote protein degradation, particularly in studies concerning plants and bacteria. In this review, “turnover” is used to denote the continuous and simultaneous occurrence of protein synthesis and degradation. In this context, degradation is defined as the hydrolysis of proteins with the corresponding release of their component amino acids.

Distribution

RuBP carboxylase is found in chemoautotrophic bacteria and in almost all photosynthetic organisms, including photosynthetic bacteria, cyanobacteria, algae and plants. A number of special cases are known, reflecting the huge diversity of life forms that occur in nature. Some primitive bacteria (*e.g.* *Halobacterium*

halobium) are photosynthetic in the sense that they obtain energy and reducing power from the sunlight but they do not fix carbon dioxide by the Calvin cycle (in other words, they do not possess RuBP carboxylase), depending on the consumption of organic compounds from the surrounding medium. On the other hand, the chemolithotrophic bacteria are not photosynthetic (they obtain energy from the oxidation of inorganic compounds) but use RuBP carboxylase and the Calvin cycle to fix carbon dioxide [4]. RuBP carboxylase is present, for example, in nonchlorophytic eukaryotes, as is the case of the chromophyte *Olisthodiscus luteus*, and in the unusual prokaryotic green algae, *Prochloron*, which grows symbiotically with the coral-reef ascidian, *Lissoclinum patellum* [5, 6].

In the photosynthetic tissues of higher plants, RuBP carboxylase occurs in extraordinary abundance as a major soluble protein that is localized in the chloroplast stroma. It is reported to comprise 25 to 65% of the soluble leaf protein in C₃ plants [7, 8, 9] and between 8 and 23% in C₄ plants [10]. The concentration of the enzyme in the chloroplast stroma has been estimated as approximately 0.5 mM or 270 mg/mL [11, 12]. This concentration is identical to that observed in some crystals of pure RuBP carboxylase – type I crystals, for example, contain 266 mg protein per mL [13]. The enzyme also comprises a major fraction of the total protein in photosynthetic and autotrophic prokaryotes, with values as high as 40% being reported for *Rhodospirillum rubrum* [14]. Because of the dominance of plants in the environment and the high concentration of the enzyme in chloroplasts, RuBP carboxylase is believed to be the most abundant protein in nature [12].

MOLECULAR PROPERTIES OF RuBP CARBOXYLASE

Molecular structure and other physicochemical properties

In photosynthetic eukaryotic cells (including all plants and algae) and most photosynthetic prokaryotes (including cyanobacteria), the RuBP carboxylase holoenzyme is a hexadecamer, composed of eight large (51–58 kDa, LSU) and eight small (12–18 kDa, SSU) subunits (L₈S₈; form I RuBP carboxylase). The enzyme exhibits a native molecular mass of 500–550 kDa. However, not all RuBP carboxylase enzymes are composed of large and small subunits, – some eubacteria and dinoflagellates lack small subunits and contain RuBP carboxylase holoenzymes comprised of large subunit dimers (L₂; form II RuBP carboxylase)

[15, 16]; it is the case, for example, of the enzyme from *Rhodospirillum rubrum*. Some bacteria (e.g., *Rhodobacter sphaeroides*) possess the two forms of RuBP carboxylase. Therefore, photosynthetic prokaryotes may contain plant-type hexadecameric holoenzymes, homodimeric enzymes comprised of LSU homologues or both [17].

In form I RuBP carboxylase, LSUs construct an eight subunit core organized as a tetramer of dimers distributed around a four-fold axis of symmetry. Four SSUs are located close to each pole of the axis, making extensive interactions with the LSU dimers to stabilize the L_2 core. Although there are two active sites per LSU dimer, each active site is shared between elements of both subunits of the dimer [18]. Therefore, each active site is formed by the C-terminal barrel domain of one LSU of the dimer with the N-terminal domain of the other.

Large subunits share no amino acid sequence homology with the small subunits. LSUs from different species show considerable homology with one another. For example, they are about 90% identical in crop plants, and those residues that interact with the transition state analog carboxyarabinitol 1,5-biphosphate are 100% conserved [12, 19]. Among the 499 sequences of the LSU of seed plants assembled by Chase *et al.* [20], of the 476 amino acid residues, 105 (22%) do not show any variation at all. An additional 110 residues have been modified in only one of the 499 species included in the database [15]. Even comparing the sequence of the evolutionarily most distant eukaryotic LSU (*Chlamydomonas* versus *Zea mays*) reveals greater than 85% homology in a total of 475 residues [21]. However, the homology between the LSU from form I and form II RuBP carboxylases is approximately 25-30% [22]. In contrast to large subunits, small subunits are quite divergent - crop-plant SSUs share about 70% sequence identity [12, 19].

RuBP carboxylase contains no detectable carbohydrate residues, prosthetic groups or any cations other than magnesium ions [12]. However, covalent posttranslational modifications, including acetylation, N-methylation, phosphorylation and possibly transglutamination, have been described for plant and cyanobacterial RuBP carboxylases, but a correlation of these modifications with enzyme function or stability has yet to be demonstrated [23].

LSUs from some plant species (e.g., *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Lycopersicon esculentum*, *Glycine max* and *Solanum tuberosum*) are trimethylated at Lys-14, whereas others (like those of *Spinacea*

oleracea, *Triticum aestivum* and *Chlamydomonas*) are not [24, 25]. The responsible methyltransferase has been purified from *Pisum sativum* and *Nicotiana tabacum* and its gene cloned and sequenced. Furthermore, *Spinacea oleracea* RuBP carboxylase, not normally methylated at Lys-14, can be specifically and efficiently methylated at Lys-14 by the purified *Pisum sativum* or *Nicotiana tabacum* methyltransferase, although the biochemical significance of such methylation remains to be elucidated [19]. Other known covalent modifications of RuBP carboxylase include acetylation of LSU at Pro-3 and methylation of SSU at Met-1 [24-26].

Other physicochemical properties of plant RuBP carboxylase include the isoelectric point, for which values varying from 4.5 to 7.0 (holoenzyme), 5.2 to 6.9 (LSU), and 4.5 to 7.5 (SSU) have been reported [27]. The extinction coefficient ($E_{280}^{1\%}$) of the enzyme has been indicated as 15.4 for *Lemna minor*, 14.4 for *Triticum aestivum*, 21.5 for *Zea mays* (unpublished data), and 14.1 to 18.2 for *Spinacea oleracea*, 14.3 to 17.0 for *Medicago sativa*, 14.3 for *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* and *Gossypium hirsutum*, and 16.7 for *Citrus sinensis* [27]. Sedimentation coefficients (S_{20w}^0) varying from 17.6 to 21.0 have been estimated for the enzyme from several plant species, with partial specific volumes of approximately 0.73 mL/g [27].

Role of subunits

The observation that *Rhodospirillum rubrum* RuBP carboxylase, which lacks SSUs, undergoes activation by CO_2 and catalyses both carboxylation and oxygenation, demonstrates that none of these processes is absolutely dependent on the presence of SSU [21]. Furthermore, the effects of certain sugar phosphates on the L_2 enzyme are similar to those on higher plant enzymes [28]. Also, SSU can be separated from the octamer of LSUs, and the enzyme is still able to bind CO_2 and O_2 but with much reduced efficiency [29]. The large subunit core of *Anacystis nidulans*, for example, catalyses both the carboxylase and oxygenase reactions, but at about 0.6% of the rate of the holoenzyme, possibly reflecting an intrinsic, but very low, catalytic potential of the LSUs by themselves. However, the specificity factor (τ , defined below, indicates the ratio of carboxylation to oxygenation) remains unchanged [30]. It follows that the presence of SSU does not affect the value of τ , which is determined solely by LSU. Therefore, the LSU of the form I enzyme contains the site of activation by CO_2 and Mg^{2+} , the binding site for

RuBP and other sugar phosphates, and the catalytic site for both the carboxylase and oxygenase reactions. In addition, a region has been identified in LSU that interacts with RuBP carboxylase activase (see below) [31].

No specific role has yet been assigned to the SSU, whose precise function remains unclear. Possible roles initially suggested include a regulatory function and a role in maintaining the holoenzyme in a stable conformation capable of being activated to the catalytically competent form [21].

Studies on the role of SSU have been hampered by the inability to dismantle the quaternary structure of plant RuBP carboxylases and separate LSU and SSU without denaturing the enzyme irreversibly. LSUs isolated from the plant enzyme are highly insoluble in the absence of added detergents or denaturants. Therefore, after dissociation into monomers by denaturing conditions, the separated subunits will not renature or reassociate even after removal of the denaturing agent [32]. The same occurs with LSUs synthesized from plant LSU genes expressed in *Escherichia coli*. However, LSU octamers isolated from prokaryotic RuBP carboxylase exhibit solubility, albeit limited, after removal of the SSUs. For this reason, it has been suggested that SSUs may help maintaining the solubility of the hexadecameric complex in plant RuBP carboxylases.

Experiments performed with a cyanobacterial RuBP carboxylase from a *Synechococcus* species involved the gradual removal of SSUs from the holoenzyme to obtain LSU octamers depleted of SSUs. These experiments showed that the resulting catalytic activity was directly proportional to the degree of saturation with SSU — implying the requirement of SSU for catalysis. Reconstitution was always accompanied by return of catalytic competence [33]. Undersaturation with SSUs does not affect the τ parameter, as partially stripped preparations of RuBP carboxylase always exhibited the same carboxylase/oxygenase activity ratio as the undissociated enzyme.

The construction of subunit hybrid RuBP carboxylases has provided further insights into the functions of the enzyme subunits. Hybrids constructed with LSUs and SSUs from *Synechococcus*, *Prochloron*, and *Aphanothece*, in all possible senses, produced active holoenzymes [5, 34]. An identical result was obtained for the RuBP carboxylase subunit hybrid constructed between *Synechococcus* LSUs and *Spinacea oleracea* SSUs [35]. In all cases, foreign SSUs bound less tightly and promoted lower V_{\max}

activities. Interestingly, the τ parameter of the hybrid (prokaryotic/eukaryotic) enzyme is the same as that of the native *Synechococcus* enzyme [35], indicating that partitioning between carboxylase and oxygenase functions are determined entirely by LSU. Furthermore, expression of a cyanobacterial LSU gene in *Escherichia coli* produces a cyanobacterial LSU-octamer unit which exhibits very little catalytic activity but a τ value identical to the wild-type enzyme [35].

It seems now well established that the presence of SSU does not affect the value of τ but sharply increases the catalytic rates of the reactions catalysed at the active site (an L_3 core displays inevitably a residual catalytic activity of only <1 to 3% of that of the holoenzyme). Even though SSU does not contribute to the structure of the active site directly, the construction of chimeric RuBP carboxylase enzymes and mutagenesis studies have shown that SSU is capable of shifting the conformation of the active site enough to affect substrate specificity and the catalytic efficiency of the molecule [15]. Therefore, it is assumed that the enhancement of catalytic rate by SSU can only be mediated through induced conformational changes in LSU [15, 18, 23].

Inspection of the τ values of RuBP carboxylase from a wide range of organisms provides an explanation of why two types of subunits are usually required in the enzyme when one would clearly do, at least in some circumstances. The values of τ of the form II RuBP carboxylase (<20) are much lower than those of the form I enzymes (>50). Perhaps, SSUs have allowed RuBP carboxylase to evolve in ways that have increased its amount, activity, or specificity in CO_2 -poor or O_2 -rich environments or, in other words, as LSU evolved to maximize τ , it may have become dependent on the presence of SSU [19, 36]. In this sense, the SSU may enable a more effective discrimination against O_2 .

KINETIC AND CATALYTIC PROPERTIES OF RuBP CARBOXYLASE

Activation

Experiments performed *in vitro* with purified RuBP carboxylase established that carbamylation of a specific lysyl residue on the LSU is an essential requirement for catalytic competence [37, 38]. This reaction occurs spontaneously when the enzyme is incubated in the presence of CO_2 and Mg^{2+} . The activation process involves formation of a carbamate, by reaction of a CO_2 molecule with the ϵ -amino group of an evolutionarily

conserved lysine residue (Lys-201) in the active site of each LSU. This activating CO_2 is distinct from the CO_2 substrate and remains bound to the enzyme through multiple catalytic cycles. A Mg^{2+} ion (or other divalent cation) is subsequently coordinated with the carbamate and stabilized by Asp-203 and Glu-204 [15], to form the catalytically active, ternary complex, capable of catalysing both the carboxylation and oxygenation of RuBP [39, 40]. Formation of the carbamylated complex is accompanied by a change in the conformation of the enzyme. The divalent metal ion coordinated lysyl carbamate plays the role of a cofactor [41].

Activation by CO_2 and Mg^{2+} is a property common to all RuBP carboxylases regardless of their taxonomic origin. Indeed, the CO_2 activator binds to a highly conserved region of the LSU polypeptide [21]. Form II RuBP carboxylase can accommodate Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} or Gd^{3+} as activating metal ions. Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{2+} and Ca^{2+} have all been reported to activate form I RuBP carboxylase [32]. Substitution of Mg^{2+} for other cations is known to alter the specificity factor, τ (see below).

It is well known that leaf illumination leads to a high activation state of RuBP carboxylase. This irradiance response of the enzyme activation state was initially attributed to the effects of stromal pH and Mg^{2+} concentration on the spontaneous carbamylation reaction [42]. However, major discrepancies occur between the carbamylation requirements of the enzyme *in vitro* and the high activation state achieved *in vivo*. Furthermore, the decarbamylated form of RuBP carboxylase exhibits a very high affinity for RuBP ($K_i \sim 10$ nM) [43]. The preferential binding of RuBP to the decarbamylated form of the enzyme makes a significant degree of spontaneous enzyme carbamylation in the light (i.e. in the presence of RuBP) nearly impossible [44].

A major breakthrough toward explaining this discrepancy was provided by studying an *Arabidopsis thaliana* mutant (termed *rca*) that is seriously defective with respect to activation of RuBP carboxylase. The mutant requires CO_2 supplementation for growth. In the mutant, a stromal chloroplast protein is not expressed. This protein, termed RuBP carboxylase activase (or, more often, Rubisco activase), was discovered by Ogren and his colleagues [45]. It occurs in concentrations (~ 0.04 mM) that are several-fold less than the concentration of RuBP carboxylase (~ 4 mM in active sites) and promotes RuBP carboxylase activation *in vivo* or *in vitro* at physiological conditions

in a reaction mixture containing buffer, Mg^{2+} , CO_2 , ATP, RuBP, RuBP carboxylase and the activase protein.

The activase is coded for in the nuclear genome, synthesized as a precursor on cytosolic ribosomes, imported into the chloroplast and processed into the mature protein [23]. It appears ubiquitous among higher plants and occurs in algae as well; activase genes have also been detected in some, but not all, cyanobacteria [23].

RuBP carboxylase activase appears to function as a chaperonin, changing the conformation of the enzyme, to remove, via ATP hydrolysis, the RuBP that binds tightly to unactivated RuBP carboxylase active sites, thereby freeing these sites for spontaneous activation by CO_2 and Mg^{2+} [46, 47]. The activase is also responsible for removing the natural-occurring, transition-state analog 2-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate (CA1-P; see below) and possibly other inhibitors (such as D-xilulose 1,5-bisphosphate (XuBP) and 3-keto-D-arabinitol 1,5-bisphosphate formed as side reactions of RuBP carboxylase [48]) that bind to carbamylated RuBP carboxylase active sites [46]. Thus, the activase facilitates the release of inhibitors that impede carbamylation or catalysis [48]. In this way, the activase is a regulatory protein which not only facilitates RuBP carboxylase activation *in vivo* (by accelerating the rate and extent of activation of initially inactive RuBP carboxylase - RuBP complexes as well as by preventing inactivation of carbamylated RuBP carboxylase), but also regulates enzyme activity in response to irradiance and other factors [44].

A model has been proposed for the *in vivo* regulation of RuBP carboxylase by RuBP carboxylase activase [49], according to which the activase shifts the preferential binding of RuBP from deactivated to activated RuBP carboxylase. In the dark, RuBP binds tightly to deactivated RuBP carboxylase. Upon illumination, the activase (strongly inhibited by ADP in the dark) is activated (presumably by an increased level of ATP) and destabilizes the enzyme - RuBP complex, promoting the release of RuBP. The free enzyme can subsequently undergo carbamylation and be stabilized by the binding of RuBP.

In the eighties, experiments performed *in vitro* showed that the RuBP carboxylase activity obtained with extracts of darkened leaves was systematically and considerably lower than that predicted from the enzyme concentration. However, when the leaves were illuminated before extraction, no such disparity was found. This anomaly led to the discovery of the

nocturnal inhibitor CA1-P [50, 51]. CA1-P is a structural analog of the RuBP carboxylase reaction intermediate [52]. It inhibits RuBP carboxylase activity by binding tightly (a K_d of 32 nM) to carbamylated sites on the enzyme, thereby blocking RuBP binding [44]. The concentration of CA1-P in the chloroplasts is negatively correlated with irradiance, photosynthetic rate and RuBP carboxylase activation state. It is slowly synthesized over a period of hours in the dark or under low irradiance, and rapidly and completely degraded by dephosphorylation to 2-carboxy-D-arabinitol within a few minutes of exposure to high irradiance [44, 51].

CA1-P occurs in chloroplasts in concentrations that vary with the species, with no obvious taxonomic pattern. Some plants, including *Glycine max*, *Solanum tuberosum* and *Nicotiana tabacum*, possess enough inhibitor in the dark to block 50% of RuBP carboxylase active sites. Other plants, such as *Phaseolus vulgaris*, produce exceptionally high levels of CA1-P (with the concentration of inhibitor exceeding the concentration of RuBP carboxylase active sites), whereas others, like *Spinacea oleracea*, *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*, are apparently incapable of synthesizing significant quantities of the inhibitor [44, 53].

Interestingly, CA1-P may be considered a positive effector of activation because it stabilizes the carbamylated enzyme. However, the net consequence is inhibition of catalysis because it physically occupies the active site of the enzyme. The inhibitor may function primarily as a regulator of metabolite binding in the dark rather than a modulator of RuBP carboxylase activity in the light [44] (see below, under metabolite buffer role for RuBP carboxylase).

A number of studies have shown a decrease in the activation state of RuBP carboxylase under photorespiratory conditions. The data obtained suggest that glycolate, glyoxylate or glycine may be the factors responsible for enzyme deactivation, although the mechanisms involved remain unclear [54]. A decrease in the activation state of the enzyme decreases its catalytic activity by reducing both photosynthesis and photorespiration (and so decreasing the flux through the photorespiratory pathway), rather than by affecting the value of τ .

Catalysis

RuBP carboxylase catalyses four chemical reactions, all of which occur at the same active site and have the same initial steps, i.e. the binding of RuBP and the generation of the enediolate intermediate. Two of the reactions exhibit great biological significance: the

carboxylation of RuBP and the oxygenation of RuBP. The other two are side reactions that produce D-xylulose 1,5-bisphosphate or 3-keto-D-arabinitol 1,5-bisphosphate [55]. These compounds are by-products and tight-binding inhibitors of RuBP carboxylase and their release *in vivo* requires the presence of RuBP carboxylase activase [56].

The two main reactions catalysed by RuBP carboxylase are shown in Figure 1. In the carboxylase reaction, the enzyme catalyses the combination of a carbon atom from atmospheric CO_2 with the five-carbon sugar ribulose 1,5-bisphosphate. The unstable six-carbon compound thus formed, breaks down immediately to produce two molecules of 3-phosphoglycerate. It is the first reaction of the Calvin cycle, being responsible for virtually all life on earth.

In the oxygenase reaction, the enzyme catalyses the combination of one atom of oxygen from O_2 with the sugar bisphosphate, leading to one molecule of 3-phosphoglycerate and one of 2-phosphoglycolate. 3-Phosphoglycerate proceeds through the Calvin cycle. However, 2-phosphoglycolate, the toxic product of the oxygenase reaction (2-phosphoglycolate is a fairly potent inhibitor of the Calvin cycle enzyme triosephosphate isomerase), cannot be utilized in the Calvin cycle and is salvaged, albeit inefficiently, in the photorespiratory pathway (see below). This reaction is a side-effect of an oxygenated atmosphere, itself reflecting the biological success of photosynthetic organisms [15].

A decline in RuBP carboxylase activity detected *in vitro* during the course of the assay is apparently observed with all higher-plant enzymes. This decline, termed fallover [57], is due to the accumulation of inhibitors that result from enediolate-derived side reactions, producing either the stabilization of the non-carbamylated enzyme or the inhibition of the catalytically competent enzyme [23, 58].

Misprotonation of the enediolate at C-3, which occurs about once per 400 catalytic cycles, originates D-xylulose 1,5-bisphosphate (XuBP), a potent inhibitor of the enzyme. The inhibitor accumulates because its rate of synthesis is higher than its utilization as substrate [55, 59]. Protonation of the enediolate at C-2 produces 3-keto-D-arabinitol 1,5-bisphosphate, another inhibitor that binds tightly to RuBP carboxylase [55, 58].

A number of points about the reactions catalysed by RuBP carboxylase deserve a special mention. The binding of RuBP to the active site residues of an activated LSU (Lys-175, Arg-295, His-298, His-327, Lys-334, Gly-403, Gly-404) and its

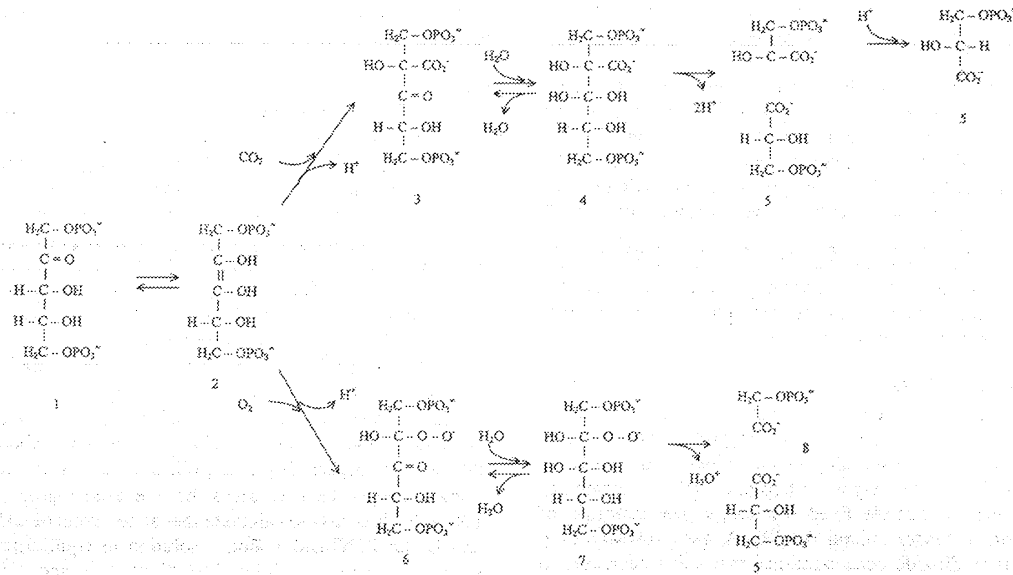


Figure 1. Proposed biochemical mechanisms for the reactions catalysed by RuBP carboxylase. After binding of RuBP to the activated form of LSU, the enzyme mediates the formation of an enediol intermediate. This can react with either CO_2 to form two molecules of phosphoglycerate or with O_2 to produce one molecule of phosphoglycerate and one of phosphoglycolate [36].

1— Ribulose 1,5-bisphosphate; 2 — *cis*-2,3-Enediolate form of ribulose 1,5-bisphosphate; 3 — 2-Carboxy-3-keto-D-arabinitol 1,5-bisphosphate; 4 — 2-Carboxy-D-arabinitol 1,5-bisphosphate; 5 — 3-Phospho-D-glycerate; 6 — 2-Phosphoglycerate; 7 — 2-Peroxi-D-arabinitol 1,5-bisphosphate; 8 — 2-Phosphoglycolate.

enolization are common steps in both reactions that occur before the interaction of the enzyme-enediol complex with the gaseous substrates. Indeed, a proton is abstracted from the bound sugar to form the 2,3-enediolate of RuBP; unbound CO_2 and O_2 then compete for this substrate. On the other hand, the six-carbon intermediate of the carboxylase reaction and the peroxi intermediate of the oxygenase reaction do not exhibit the tendency to revert to enolate and gaseous substrate, i.e. once the enediolate has reacted with either of the gases, the enzyme is committed to form products. Therefore, it may be concluded that the specificity of the enzyme for CO_2 and O_2 , i.e. the "decision" in each instant for the enzyme to work as a carboxylase or as an oxygenase is determined at the stage of reaction of the enzyme-enediol complex with the gaseous substrates [36]. Moreover, the CO_2 and O_2 appear to react directly with the enzyme-bound enediolate intermediate since no formal binding sites for CO_2 and O_2 have been

identified on the protein [56].

The idea that the oxygenase activity of RuBP carboxylase is simply an unavoidable consequence of the chemical nature of RuBP carboxylation is now widely accepted [36, 60]. The enzyme-enediol complex, an obligatory intermediate of the carboxylase reaction, is unavoidably susceptible to oxidation by molecular oxygen [61, 62]. In other words, phosphoglycolate is formed as an inevitable by-product of the carboxylation reaction as long as O_2 is present (in this sense, the oxygenation of RuBP is just a chemical consequence of the existence of oxygen in the atmosphere). This attractive proposal, though impossible to prove, is supported by a number of observations [36]: (i) There is no obvious function for the oxygenase activity despite its ubiquitous expression by all RuBP carboxylases. Indeed, all RuBP carboxylases exhibit oxygenase activity if placed in contact with molecular oxygen, regardless of their

taxonomic origin. Even the enzyme extracted from photosynthetic anaerobes possess a high oxygenase activity, even though this activity has no physiological role because molecular oxygen is never present in their natural habitats. (ii) C_3 plants evolved the rather complex and multicompartmented pathway of photorespiration to metabolize rapidly and salvage 75% of the carbon of 2-phosphoglycolate, the toxic product of the oxygenase reaction (see below). (iii) RuBP carboxylase from C_4 plants, algae and cyanobacteria, which evolved mechanisms for transporting and concentrating CO_2 in the vicinity of the enzyme, exhibit very low levels of oxygenase activity under normal atmospheric concentrations of oxygen.

Sluggish catalyst

One fundamental intrinsic feature of RuBP carboxylase is that it is a sluggish catalyst. Under conditions of saturating carbon dioxide, the catalytic activity of the enzyme is approximately 15 molecules of carbon dioxide fixed per second per molecule of protein. Under natural conditions, with sub-saturating carbon dioxide concentrations, that value decreases to about 3. A similar low rate of catalytic activity has been reported for the enzyme from prokaryotes [12]. Probably, an unknown chemical constraint has prevented even prokaryotic cells, which are subjected to severe selective pressure, from evolving a better catalyst.

The specificity factor (τ)

As mentioned before, the ratio of RuBP carboxylase carboxylation to oxygenation (v_c/v_o) varies with CO_2 and O_2 concentrations. In a series of studies, Jordan and Ogren [63, 64] showed how the enzyme's relative substrate specificity is simply related to the kinetic constants of the enzyme, i.e.

$$\frac{v_c}{v_o} = \frac{V_{\max}^c \cdot K_m(O_2)}{V_{\max}^o \cdot K_m(CO_2)} \cdot \frac{[CO_2]}{[O_2]} = \tau \cdot \frac{[CO_2]}{[O_2]}$$

The proportionality constant, τ , commonly termed specificity factor or relative substrate specificity, represents the partitioning ratio between carboxylation and oxygenation that occurs at equal concentrations of CO_2 and O_2 [36] or, in other words, the ratio of the kinetic properties of the two activities. The higher the value of τ , the higher the carboxylase efficiency and the higher the relative specificity for CO_2 .

The ratio of carboxylations to oxygenations at equal $[CO_2]$ and $[O_2]$ is constant for a given enzyme and is

highly dependent on both the nature of the activating metal ion and the source of the enzyme [65].

Replacement of the active-site Mg^{2+} of RuBP carboxylase with redox-active metals with greater affinities for oxygen or hydroperoxide, such as Mn^{2+} or Co^{2+} , enhances the specificity of the enzyme for oxygenation [23]. Thus, substitution of Mg^{2+} as the activating metal ion for Mn^{2+} drops the value of τ from 80 to 3 for the *Spinacea oleracea* enzyme and from 15 to 1.5 for the *Rhodospirillum rubrum* enzyme [64]. The transition metals Co^{2+} and Ni^{2+} produce similar responses [66]. Interestingly, *R. rubrum* RuBP carboxylase activated with Co^{2+} functions as an oxygenase but not as a carboxylase [32].

RuBP carboxylases from different sources exhibit intrinsically distinct values of τ , ranging from a minimum value of 9 to 15 for certain photosynthetic bacteria, to about 50 for cyanobacteria and up to about 80 for many higher C_3 plants [67]. Several eukaryotic, nongreen algae have τ values that are even higher (~100) [68]. It is easy to calculate that at air levels of CO_2 and O_2 (at 25°C and 1 atm, a solution in equilibrium with a gas phase containing 0.033% v/v CO_2 and 21% v/v O_2 comprises about 10 μM CO_2 and 250 μM O_2), RuBP carboxylases with τ values of 10 and 80 spend approximately 71.5% and 23.8% of their time functioning as oxygenases, respectively. Therefore, if a photosynthetic bacteria with a specificity factor of 10 is incubated at air levels of CO_2 and O_2 the rate of CO_2 release will be higher than gross CO_2 fixation. Such a negative carbon balance is, of course, inconsistent with life under present-day atmospheric conditions, totally justifying the organism's anaerobic lifestyle [32]. Cyanobacteria ($\tau \sim 50$), exhibiting an aerobic lifestyle, would not be able to fix carbon dioxide efficiently if it were not for the adaptive ability to fix the gas internally [69]. Within higher plants, the highest values of τ are observed in C_3 species, where τ has been clearly subject to evolutionary variation [64], although natural selection for the specificity factor may still be under way. Nevertheless, the *in vivo* ratio of carboxylation (v_c) to oxygenation (v_o) for a typical C_3 plant is 3:1 to 4:1 [70]. Consequently, the oxygenase activity of RuBP carboxylase decreases substantially the overall rate of photosynthesis and hence, plant productivity [21].

The ratio of carboxylation to oxygenation is also dependent on temperature. Under natural conditions, temperature, through its direct and indirect effects on CO_2 and O_2 concentrations, is one of the main factors influencing the rate of oxygenation and hence of

photorespiration. The biochemical basis for the observed decrease in the ratio carboxylation/oxygenation with increasing temperature is due in part to the kinetic properties of RuBP carboxylase (τ decreases with increasing temperature) and in part to changes in the relative solubilities of CO₂ and O₂ [60]. Indeed, the [O₂]/[CO₂] ratio of a solution in equilibrium with air increases with increasing temperature because the temperature coefficients of the solubilities of the two gases differ [71, 72]. The ratio of photosynthesis to photorespiration in air is approximately 10 at 10°C, 3.3 at 40°C or even lower for low intracellular concentrations of CO₂, as may occur, for example, during a dry, hot summer day [54].

Engineering a better RuBP carboxylase?

It is surprising that a single enzyme should catalyse the primary steps of two major, but diametrically opposing, metabolic pathways [21]. Indeed, the relative fluxes of carbon through the competing pathways of photosynthesis and photorespiration are determined by the kinetic properties of RuBP carboxylase. The mutual competition of CO₂ and O₂ at the active site of RuBP carboxylase and the intrinsic low rate of catalysis makes this enzyme a major target for biotechnological manipulation, in an attempt to develop a mutant protein with improved catalytic properties, i.e. a mutant that produces an increase in net CO₂ fixation at the CO₂, O₂ and RuBP concentrations encountered by the enzyme *in vivo*. However, the aim of increasing CO₂ assimilation rates in leaves of C₃ plants *in vivo* must be achieved without further increases in the amount of the already abundant RuBP carboxylase protein. Because the carboxylation and oxygenation transition states are assumed to be quite similar, eliminating oxygenase would likely eliminate carboxylase as well [19]. Ideally, a mutant enzyme with an increased affinity towards CO₂/decreased affinity towards O₂ would prove of great value. However, in the strategy followed to modify RuBP carboxylase, it is important that any increase in specificity factor is not achieved at the expense of a decrease in catalytic rate.

A large number of RuBP carboxylase mutants, both from prokaryotes and eukaryotes, either naturally occurring or produced by site-directed mutagenesis, has been obtained and studied. Mutants have been produced with altered K_m and V_{max} values for RuBP, CO₂ and O₂ and with altered affinities towards inhibitors. However, attempts to increase the specificity of the enzyme have generally not worked. Most mutants exhibit either no catalytic activity at all or have shifted the specificity in

favor of oxygenation. Some authors have altered LSUs in *Anacystis nidulans* and *Synechococcus* sp. by substituting residues found in higher plants and obtained the few recorded cases of increased CO₂ specificity (which are only slight increases), without always adversely decreasing the rate of catalysis. However, in no case has specificity of a low- τ (bacterial) enzyme attained that of a high- τ (higher plant) enzyme, nor has the specificity of any angiosperm RuBP carboxylase been increased [15, 23]. Several LSU amino acid residues have already been identified that influence the specificity factor of the plant enzyme. For example, a mutation of Val-331 to Ala in RuBP carboxylase from the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* reduce the enzyme specificity factor by almost 40% [73]. Changes in Ala-340 or Thr-342 also decrease significantly the value of τ relative to the unaltered, wild-type enzyme [56].

Genetic engineering of higher plant RuBP carboxylase would be facilitated by its expression in a suitable organism, such as *Escherichia coli*. However, despite the progress with prokaryotic enzymes, all attempts to obtain active cloned RuBP carboxylase using LSU genes from eukaryotic organisms have been unsuccessful. This is surprising considering the high degree of homology between higher plant and cyanobacteria LSUs and the observation that cyanobacterial LSUs can assemble with higher plant SSUs in *Escherichia coli* [67]. A possible explanation may be given by the involvement of chaperonin 60 in the assembly of higher plant RuBP carboxylase (see below under synthesis of RuBP carboxylase). The hybrid RuBP carboxylase, composed of cyanobacterial LSUs and higher plant SSUs exhibits the same specificity value as the cyanobacterial holoenzyme [35].

The specificity factor is not immutable, as observed in the natural variation in the enzyme from species to species and in the altered specificities effected by replacement of the active-site metal, random and site-directed mutagenesis, chemical modification, and hybridization of heterologous subunits [23]. In fact, natural selection for the specificity factor may still be continuing. It is reasonable to suppose that an optimal chemical structure of the active site that maximizes the value of τ may be designed or discovered or, alternatively, may already have been attained by natural evolution. It has been suggested that the improvement in specificity that has been obtained with natural selection has been achieved at some cost since there appears to be a negative correlation between specificity

factor and maximum carboxylation rate V_{\max}^c [56]. Indeed, further increases in τ are not beneficial if they occur at the expense of a significant decrease in V_{\max}^c or $V_{\max}^c/K_m(\text{CO}_2)$ [74]. In other words, carboxylation rate and τ must both be considered in the design of a better catalyst [75].

Based on current knowledge, no theoretical limit to τ is known. On the other hand, τ and $V_{\max}^c/K_m(\text{CO}_2)$ are not necessarily inversely related. Admitting that the optimal compromise between these two parameters has not yet been reached, it may be possible to improve the enzyme from C_3 plants [32]. However, if we consider that RuBP carboxylase has been under selection for about 3.5×10^9 years, it seems unlikely that further improvements may result from single amino acid changes, which would presumably already have evolved naturally. Further improvements from present-day RuBP carboxylase may require more extensive changes, perhaps involving the simultaneous (with any single alteration being possibly harmful) alteration of multiple residues in both types of subunits. If this is the case, the development of a better enzyme may be extremely improbable either by natural evolution or by genetic engineering.

Because the world food supply depends almost entirely on carbon fixation by RuBP carboxylase in a limited number of crop plants, even slight improvements in CO_2 affinity could originate substantial increases in plant productivity [76]. However, if there is a limit to the specificity factor, other possible improvements are still possible - τ is only one measure for catalytic efficiency. For example, an increase in CO_2 affinity for the enzyme to operate at a greater percentage of its maximal velocity, even if τ remains constant, should still be advantageous [66]. Alternatively, the evolution of a different mechanism of CO_2 fixation may improve the carbon balance of the plant. Indeed, further increases in the efficiency of carbon dioxide fixation were achieved by the natural evolution of different variants of photosynthetic metabolisms that led to increased concentrations of CO_2 in the vicinity of RuBP carboxylase active sites - it is the case, for example, of the energy-driven accumulation of CO_2 in C_4 plants and the energy costly, inorganic carbon concentrating mechanism found in unicellular algae that result in the virtually complete suppression of RuBP oxygenation.

C_4 plants are able to suppress the oxygenase reaction by increasing CO_2 concentration in the vicinity of RuBP carboxylase. The C_4 pathway is rather elaborate, requiring differentiation of chloroplasts in two cell

types with both metabolic and morphological differences that no molecular biologist would dare to engineer. It may be supposed that if there were an easier way to eliminate the oxygenation of RuBP plants would have selected it rather than evolving the complex C_4 pathway [67]. Of course, natural selection is not obliged to obey our rules - otherwise, it would seem far simpler for C_4 plants to forget all about RuBP carboxylase, with all its intricate and complex problems, and just fix CO_2 into organic acids by the far simpler phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase, rather than going through the apparently useless cycle of decarboxylation and refixing by RuBP carboxylase.

Algae use a different strategy to concentrate inorganic carbon in their cells [77]. Mutants of *Chlamydomonas* deficient in this mechanism excrete large amounts of glycolate [67].

The energy costs of these pathways and the temperature dependence of the carboxylation/oxygenation ratio (see above) may have prevented these CO_2 -accumulation mechanisms from becoming universally accepted in nature [32].

Some authors argue that CO_2 concentrating mechanisms evolved because no further beneficial changes in RuBP carboxylase were possible [19]. Present evidence and evolutionary considerations do not support the hope that the selectivity of RuBP carboxylase can be improved. It is tempting to speculate that engineering a better RuBP carboxylase may be an impossible task, since nature may have reached the maximum possible value of τ . If this is true, there are chemical restrictions that prevent the development of a better catalyst, the nature of which remain unknown.

In Andrews and Lorimer's [32] words "How can it be that an enzyme that must have been subject to the most intense kind of selection for catalytic specificity and turnover rate is unable to distinguish between the substrate of photosynthesis, CO_2 , and its product, O_2 , and is such a slow catalyst that photosynthetic cells must invest one quarter or more of their precious nitrogen budget in this one enzyme? The dubious distinction of being the world's most abundant protein is simply a consequence of its catalytic ineffectiveness."

PHYSIOLOGICAL ROLES OF PLANT RuBP CARBOXYLASE

Catalytic role in photosynthesis

The major reason for the huge effort centered on

RuBP carboxylase research stems from the fact that this enzyme may be regarded as the starting point for two major metabolic pathways in green plant tissues: photosynthetic CO_2 assimilation and photorespiration. The enzyme catalyses the first reaction of the Calvin cycle, the rate-limiting step of photosynthesis, and therefore, the metabolic route that accounts for the vast majority of the carbon input into the biosphere [23, 78]. RuBP carboxylase in C_3 plants is clearly a yield-limiting factor of major importance in agriculture. Photosynthesis in those plants increases when ambient CO_2 is increased at high light intensities. Increased photosynthesis achieved by CO_2 enrichment led, in *Glycine max* under field conditions, to an increased yield of 98% [66].

RuBP carboxylase constitutes the only quantitatively significant link between the pools of inorganic and organic carbon in the biosphere, allowing the net biosynthesis of carbohydrates from atmospheric carbon dioxide [23]. Every year, about 10^{17} g of carbon dioxide are converted to organic material by the process of photosynthesis. Essentially, all of the carbon in the human body as well as that present in food, fuel and the clothes we wear has passed, at one time or another, through the active sites of RuBP carboxylase [41].

Catalytic role in photorespiration

Oxygenation of RuBP leads to the consumption of energy and reducing power and the loss of fixed CO_2 and NH_3 through the seemingly energy-wasteful biodegradative oxidation of RuBP — the photorespiratory pathway. This reaction compromises the efficiency of the photosynthetic carbon assimilation that would otherwise prevail, reducing the normal net rate of photosynthesis by 30 to 50% in most plants [79, 80]. Therefore, photorespiration, considered as the light-dependent uptake of O_2 and evolution of CO_2 and NH_3 by plants associated with the metabolism of 2-phosphoglycolate, so called because CO_2 is released by the breakdown of phosphoglycolate, is regarded by many plant physiologists as the most important metabolic constraint on plant productivity [81]. The physiological costs of photorespiration are related to the reduced efficiencies in the use of energy, water and nitrogen, and to the CO_2 lost from organic compounds. As expected, the reducing equivalents and ATP consumed during photorespiration affect negatively the energetic efficiency of photosynthesis. On the other hand, a RuBP carboxylase with a higher affinity towards CO_2 would permit an adequate CO_2 -fixation rate at lower intercellular CO_2 concentrations (i.e. with

smaller stomatal apertures, as observed in C_4 plants) and an improved efficiency of nitrogen use (by allowing a smaller investment of nitrogen in this protein).

If photorespiration is a wasteful process leading to reduced rates of photosynthesis, how could it have evolved and still exist in a world where natural selection is constantly shaping life forms and eliminating unfit organisms?

It seems plausible that RuBP carboxylase arose only once in the evolution of life, presumably appearing with the first chemolithotrophs, more than 3.5×10^9 years ago (before the genesis of even the oldest rocks on earth) [82]. In this context, it is reasonable to assume that the Calvin cycle evolved shortly after the origin of life, when the supply of organic compounds became insufficient for the needs of an increasing biomass of primitive fermentative bacteria [60]. Most probably, RuBP carboxylase exhibited the capacity to catalyse the oxygenase reaction right from its first appearance during evolution. However, in those days the atmosphere is thought to contain no oxygen and high concentrations of CO_2 [82], so that, although potentially capable of reacting with both CO_2 and O_2 , RuBP carboxylase expressed exclusively its carboxylase activity in this primitive anaerobic environment. In other words, RuBP carboxylase did not evolve its oxygenase activity to fulfil any biological role. With the advent of oxygenic photosynthesis and the spread of these organisms throughout the aquatic habitats of the earth, CO_2 concentrations declined and oxygen was gradually released and started to accumulate in the atmosphere. Three major consequences for the subsequent evolution of life on earth followed: (i) the build up of an ozone layer which, due to its strong capacity to absorb solar UV-B and UV-C radiation, allowed life forms to spread from water habitats to land environments; (ii) The evolution of aerobic metabolic pathways, most notably the citric acid cycle and the mitochondrial electron transport chain, characterized by a higher level of oxidation of their end-products, and hence by an increased efficiency in extracting free energy from the fermentative substrates; (iii) The ratio of atmospheric $[\text{O}_2]/[\text{CO}_2]$ started to increase, from a value close to zero, to the present-day value of 630. It is conceivable to assume that, at some stage along this process, RuBP carboxylase started to function as an oxygenase, forming the potent inhibitor 2-phosphoglycolate, a compound that may be regarded as the result of an enzyme malfunction. The positive carbon balance of

photosynthesis was probably threatened with the RuBP carboxylase τ values that are thought to have occurred in those days. The simplest way to overcome this major constraint was to inhibit 2-phosphoglycolate production by selecting anaerobic environments. Indeed, by living under anaerobic conditions, photosynthetic bacteria had no need to improve the value of τ of their enzymes, and this is probably the reason why they exhibit the lowest present-day values for the specificity factor. However, for all those organisms exposed to oxygen, ways of disposing of the waste product evolved. As a first approach, simple dephosphorylation and excretion may have sufficed, so that this capability is still retained by certain present-day algae [60]. However, the loss of reduced carbon associated with this mechanism drastically reduced the efficiency of the CO₂-fixing process.

It is thought that the complex and multicompartmented pathway of photorespiration evolved specifically in plants to rapidly metabolize 2-phosphoglycolate and simultaneously to salvage 75% of its carbon (in the form of 3-phosphoglycerate) back to the Calvin cycle. The carbon dioxide released results in the loss of one-quarter of the carbon from 2-phosphoglycolate and decreases the efficiency of photosynthesis.

Simultaneously, it is believed that evolutionary changes started to occur naturally in the structure of RuBP carboxylase so as to gradually increase its value of τ . The appearance of SSU may have enabled a large increase in τ . This long-term evolution of RuBP carboxylase results from its adaptation to an increasing [O₂]/[CO₂] atmospheric ratio that it, itself, has largely caused. High values of τ are observed in the enzyme from C₃ plants, which possess no means of reducing the [O₂]/[CO₂] ratio in the vicinity of RuBP carboxylase. The more recent evolution of CO₂ concentrating mechanisms (as observed in C₄ plants) as a way to suppress the oxygenase reaction under present-day atmospheric conditions abolished the pressure to increase the value of τ of their RuBP carboxylases. These organisms, which exhibit intermediate values of τ , may be improving certain kinetic parameters, such as V_{max}^c , at the expense of the not so important τ .

It is generally considered that RuBP carboxylase was remarkably unresponsive to this extreme selective pressure. The evolution of τ values, while enormously significant at the physiological level, is very limited when compared to the extraordinarily selectivity of many other enzymes [32]. Tyrosyl-tRNA synthetase,

for example, exhibits a relative specificity for tyrosine, as compared to phenylalanine, in excess of 10⁵ [83]. The only difference between the two substrates is a hydroxyl group and it is its absence that the enzyme recognizes. Rather than a dramatic change in RuBP carboxylase, adaptations appear to have occurred in the enzyme metabolic environment, such as the development of photorespiration and the evolution of CO₂ concentrating mechanisms.

The remaining steps in the photorespiratory pathway offer no advantage to the plant. Therefore, photorespiration occurs as a salvage mechanism that only partly compensates for the oxygenation of RuBP, itself an unavoidable chemical consequence of the existence of oxygen in the atmosphere. In this context, photorespiration must be regarded exclusively as an adaptative response to RuBP oxygenation under current atmospheric conditions [32].

It is significant that all known natural mechanisms for the suppression or inhibition of photorespiration achieve their effect by decreasing the ratio [O₂]/[CO₂] in the proximity of RuBP carboxylase. All known substances that reduce phosphoglycolate synthesis inhibit photosynthesis as well. The only effective method known to man to reduce photorespiration is to reduce the ratio of the gases in enclosed growing areas, in the air surrounding the plants so as to inhibit phosphoglycolate synthesis. CO₂-enrichment of greenhouses by burning wood or coal was widely practiced long before the photorespiratory process was known. This CO₂ effect was then attributed to the provision of additional substrate for photosynthesis. A five-fold reduction in the normal [O₂]/[CO₂] ratio of the atmosphere eliminates the bulk of photorespiration and brings about maximal increases in the rate of photosynthetic dry matter accumulation [80].

For a number of years, the debate about the function of photorespiration revolved around the fundamental question of whether the process is essential or merely unavoidable [60]. It appears now that photorespiration is both essential and unavoidable, but only when oxygen is present — unavoidable because RuBP carboxylase catalyses inevitably the oxygenation of RuBP in the presence of oxygen; the process becomes essential only after the reaction of O₂ with RuBP. Photosynthetic anaerobes lack this pathway whereas C₄ plants, with low levels of photorespiration and of photorespiratory enzymes, grow better than C₃ plants under appropriate conditions. Furthermore, no deleterious effects on plant growth are observed when C₃ plants are incubated under [O₂]/[CO₂] conditions

inhibitory for phosphoglycolate synthesis, as they occur naturally in C_4 and algae species. For these reasons, photorespiration is neither unavoidable nor essential in the absence of oxygen.

After establishing clearly the reasons why photorespiration evolved in plants, scientists have looked for possible additional metabolic roles for this pathway. The capacity of photorespiratory mutants to grow normally as long as photorespiration is suppressed by high CO_2 and/or low O_2 levels further suggests that there is no essential secondary role for photorespiration. An interesting mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting low levels of phosphoglycolate phosphatase activity (the photorespiratory enzyme responsible for converting 2-phosphoglycolate into glycolate) was produced [84]. The mutant displays stunted growth and subsequent death as a result of the inhibition of carbon metabolism caused by high levels of 2-phosphoglycolate. The O_2 sensitivity, which exacerbates the deleterious effects of the oxygenase activity of RuBP carboxylase, can be overcome by incubating the mutant under an atmosphere enriched in CO_2 . The growth of the mutant is indistinguishable from the wild-type when grown at 1% (v/v) CO_2 , when the oxygenase activity is almost completely suppressed. These experiments indicate that photorespiration is essential only to process the 2-phosphoglycolate produced in the oxygenase reaction. Therefore, the photorespiratory pathway is necessary only if the oxygenase reaction occurs, but is dispensable in its absence.

The evidence presented above suggests that photorespiration consumes energy for no apparent useful purpose and may be considered a wasteful process. The lack of an obvious function for photorespiration has proved to be one of the most enduring enigmas encountered in the course of plant research. Its continued existence and the reason why RuBP oxygenation was not eliminated during natural evolution remains a mystery.

Nevertheless, some authors still argue that photorespiration (and therefore RuBP oxygenation) may fulfil secondary roles in plant metabolism. However, few of them, if any, seem to be valuable enough to justify the elaborate machinery of the photorespiratory process and the reduction in photosynthesis which it causes [80].

The proposed role that has attracted more attention in recent years suggests that photorespiration may act as a "safety valve" to dispose the surplus photosynthetic energy generated under certain

environmental conditions. The efficient consumption of ATP and reducing equivalents by photorespiration may allow it to protect against photoinhibition [85, 86]. Indeed, in the absence of photorespiration, the accumulation of excessive photochemical energy may lead to dissipation reactions that damage the photosynthetic apparatus and reduce the photosynthetic capacity. This may be particular evident under conditions of hot and dry weather, as may occur frequently during a summer day. Under these conditions, the development of a severe water deficit may induce daytime stomatal closure which limits the intracellular availability of CO_2 . In addition, the energy costs of photorespiration increase with temperature for the two main reasons already mentioned. With stomata closed, the operation of photorespiration can provide a sink for the electron transport pathway, not only because it consumes ATP and NADPH but also because the liberated CO_2 may be refixed by RuBP carboxylase, allowing the continuing function of the photosynthetic apparatus [87].

Obviously, the proposed role of photorespiration as an energy-dissipating mechanism for the relief of photoinhibition in C_3 plants is not at all an adequate explanation for its evolution and continued existence, since this motive does not cover the whole range of organisms that exhibit photorespiration [60]. Therefore, the hypothesis that photorespiration has evolved to protect plants against photoinhibition is not acceptable for various reasons [60]: (i) As mentioned above, no deleterious effects on plant growth are detected (on the contrary, the plants grow better) when C_3 plants are grown under $[O_2]/[CO_2]$ conditions that totally inhibit photorespiration. (ii) Photosynthetic eukaryotes possessing CO_2 concentrating mechanisms, including C_4 plants and photosynthetic algae, exhibit low levels of photorespiration and of photorespiratory enzymes but are apparently no more susceptible to photoinhibition under natural conditions than C_3 plants. (iii) RuBP carboxylase cannot have arisen its inherent oxygenase activity in response to selection pressure for an adaptation to photoinhibition because it occurs in photosynthetic (which live in the absence of oxygen) and in some non-photosynthetic bacteria (which obtain energy from the oxidation of inorganic compounds). In these organisms, the presence of oxygenase activity is of no value in protecting them from O_2 damage under conditions of high light intensity and low CO_2 concentrations.

Photorespiration may play a role in other metabolic processes [54]. It may lead to the synthesis of important

photosynthetic end products [60]; however, no photorespiratory intermediates are known to be major branch points. Photorespiration may generate ATP outside the chloroplast. Although the chloroplast envelope is not permeable to ATP, the glycine to serine conversion in the mitochondria could be regarded as an indirect way of exporting ATP from the chloroplast. However, this is not an efficient way of energy-transfer across a membrane, since the plant needs to expend reducing power and several ATP molecules for each ATP molecule exported from the chloroplast [80]. Photorespiration could function as a way of exporting fixed carbon from the chloroplasts or to synthesize glycine and serine in the cytoplasm [60]. However, cells possess more efficient mechanisms to export organic carbon from chloroplasts that are not light-dependent [80].

For many years, photorespiration was considered almost exclusively in terms of carbon metabolism. It is now known that the rate of NH_3 release in photorespiration equals the rate of CO_2 release, which makes it a major pathway in plant nitrogen metabolism [87, 88]. Photorespiratory NH_3 is subsequently efficiently refixed through the photorespiratory nitrogen cycle [88]. The rate of CO_2 release in photorespiration is about five times the rate of normal tricarboxylic acid cycle activity [54]. On the other hand, glutamine synthetase and glutamate synthase refix the NH_3 released by photorespiration at rates up to ten times higher than primary NH_3 assimilation [54]. Therefore, the photorespiratory pathway may be envisaged as a way by which plants interrelate their two most important metabolisms – those of carbon and nitrogen.

As pointed out by Roy [67], it should be kept in mind that attempts to diminish photorespiration by modifying RuBP carboxylase might run up against regulatory mechanisms that are adapted to maintaining a certain metabolic flux through this pathway. Furthermore, present knowledge about plant biochemistry and metabolism may be insufficient to predict accurately the consequences of RuBP carboxylase genetic manipulation. In this respect, the rates of photorespiration are known to be dynamic, changing with light, CO_2 and temperature, and many of its metabolites are shared with other metabolic processes. There is evidence that the pathway functions in a flexible way, allowing the use of amino acids from the cycle or the diversion of carbon into other organic acids. These diversions of carbon out of the photorespiratory cycle are probably quite minor [54].

Also, the photorespiratory nitrogen cycle was originally portrayed as being completely self-contained, i.e. without any necessary interaction of the cycle metabolic components with the general nitrogen metabolism of cells. More recently, however, it was suggested that photorespiratory nitrogen cycle interacts not only with the general soluble nitrogen metabolism of the cell, but also with the oxidative mitochondrial processes of dark respiration [89]. It has also been suggested that certain photorespiratory intermediates (glyoxylate, glycine and oxalate) may play a role in regulating succinate metabolism [90].

Non-catalytic role as a storage protein

The quantity of RuBP carboxylase present in the leaf tissues of plants accounts for its other non-catalytic functions.

The primary function of RuBP carboxylase is no doubt the catalysis of the initial reaction of the photosynthetic pathway. It is now well established that plants possess huge amounts of RuBP carboxylase to compensate for the intrinsic low catalytic activity of the enzyme and the oxygenase activity. To grow at appropriate rates, plants need to invest heavily in RuBP carboxylase to sustain high rates of photosynthetic carbon assimilation. If the enzyme operates *in vivo* at suboptimal levels because its CO_2 affinity is limiting, and if the chloroplasts are capable of supplying RuBP at an adequate rate, then more RuBP carboxylase per chloroplast (or reaction center) should result in more photosynthesis [66]. Therefore, the synthesis of RuBP carboxylase represents a significant part of the nitrogen budget of the plant and a large investment in carbon, nitrogen and sulphur. The enzyme accounts for up to 30% of the total nitrogen in a typical C_3 leaf grown with adequate nitrogen [56]. On the other hand, the enzyme constitutes a large pool of carbon, nitrogen and sulphur. Its specific degradation and the consequent reutilization of these elements through the turnover of the enzyme and the mobilization of its amino acids during leaf senescence or stress-induced hydrolysis plays a fundamental role in the nutritional balance of plants [54]. In this sense, understanding the catabolic mechanism of RuBP carboxylase and knowing the conditions that trigger the enzyme for degradation are required to establish an optimal use of leaf nitrogen as the major amino acid source for the build up of nitrogenous reserves essential in the beginning of the next cycle of growth – either in seeds (in crops such as cereals and legumes) or in the bark of perennial plants. The exceptional amount of nitrogen (a scarce and

growth-limiting element for most autotrophs; [91]) "stored" in this enzyme is eventually re-utilized whenever there is a physiological demand for nutrients that cannot be satisfied by other means, specially if the photosynthetic apparatus becomes non-functional or superfluous. This happens, for instance, during leaf senescence. Approximately, half of the nitrogen which eventually is used in synthesis of grain proteins in *Glycine max* is first stored in the leaf predominantly as RuBP carboxylase and subsequently transferred to the developing beans during leaf senescence [92]. It has been calculated that more than 90% of the nitrogen used for spring growth in *Malus pumila* trees derives from the RuBP carboxylase mobilized (and stored as amino acids) in the bark tissues during autumnal leaf fall [93]. For these reasons, RuBP carboxylase turnover assumes significant physiological and economical importance in cultivated crops.

When the plant is faced with an adverse condition, the strategy to follow is survival rather than growth or reproduction. In this situation, the plant may degrade part of its RuBP carboxylase pool and utilize this huge reservoir of carbon, nitrogen and sulphur for the rapid synthesis of an enzyme complement or other compounds essential to overcome the stress. In this sense, RuBP carboxylase may be considered as a luxury protein every time the plant faces a heavy stress. In other words, the enzyme may fulfil a secondary function as a leaf storage protein.

The enzyme exhibits some characteristics that fit well into its classification as a storage polymer. It occurs in very large amounts in photosynthetic tissues, particularly in the case of C_3 plants. In times of need, the enzyme can provide the plant with amino acids (its amino acid composition is well balanced; [7]), carbon skeletons, nitrogen and/or sulphur. The number of cysteine+methionine residues, which equals the number of sulphur atoms, in the RuBP carboxylase molecule has been reported to be around 200: 290 in *Chlamydomonas reinhardtii*, 208 in *Zea mays* and 176 in *Nicotiana tabacum* [94, 95]. Considering an RuBP carboxylase concentration of 0.5 mM in the chloroplast stroma, it is easy to calculate that this enzyme alone is responsible for an approximate 100 mM concentration of sulphur inside the chloroplasts, and far more carbon and nitrogen. Chloroplasts contain 70 to 80% of the cell nitrogen and RuBP carboxylase is the most abundant protein in this organelle [96]. It has also been reported a close correlation between the level of nitrogen supplied to the plants and their RuBP carboxylase content [97, 98]. However, in the case of *Triticum aestivum*, no such

correlation was found [99, 100].

Initial studies performed in the seventies related the (i) high concentration of RuBP carboxylase in leaves of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* (both C_3 plants) with (ii) its high stability prior to senescence and with (iii) its rapid proteolysis during senescence. These observations led several authors to classify RuBP carboxylase as a leaf storage protein [101, 102, 103]. However, this hypothesis was based on studies using single labelling techniques, has been tested only for a limited number of species and was based on experiments involving senescing leaves, a process that leads to cell death.

The three postulates initially considered by Huffaker and coauthors to propose RuBP carboxylase as a leaf storage protein [101, 102, 103] may now be analysed with a deeper understanding of the factors that trigger the enzyme for degradation. (i) The presence of high concentrations of this enzyme in the leaf tissues of plants (and of C_3 in particular) for catalytic reasons is certainly useful if the enzyme is to be considered a storage protein. However, many examples are known of proteins that are present in low concentrations and fulfil storage roles (γ -conglutin from *Lupinus albus* seeds, for example; [104]) and of proteins that occur in large amounts and do not exhibit a storage function (e.g., the histones, DNA-binding proteins in eukaryotes; [105]).

(ii) The high stability exhibited by RuBP carboxylase prior to senescence of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* leaves observed by Huffaker and co-authors may be attributed to the single labelling techniques utilized in their experiments. Degradation rates could well have been "masked" and therefore grossly underestimated by the occurrence of amino acid recycling [106, 107]. More recent work has shown that the catabolism of this enzyme under normal metabolic conditions appears to be species specific. Thus, while *Lemna minor* and *Oryza sativa* do not degrade the enzyme as it is being synthesized [108-110], other species are continuously degrading the enzyme (*Triticum aestivum*, *Zea mays* and *Sorghum bicolor*) [111-113].

Using [3 H]acetic anhydride and tritiated water to measure protein turnover, degradation of RuBP carboxylase in *Zea mays* (C_4) leaves was detected while the enzyme was being synthesized [111, 112]. The synthesis and degradation of RuBP carboxylase were determined in *Oryza sativa* (C_3) leaves from the changes in 15 N content; this study failed to detect degradation of the enzyme in the young expanding leaves [108, 109]. More recently, using a double-

labelling method to measure protein turnover, it was found that under normal metabolic conditions, the degradation characteristics of RuBP carboxylase are species specific in a way suggesting that they do not depend on the type of photosynthetic metabolism of the species considered (C₃ or C₄) [113]. In this study, *Zea mays* (C₄) showed a faster rate of RuBP carboxylase degradation than of the total soluble protein, whereas *Triticum aestivum* (C₃) and *Sorghum bicolor* (C₄) showed similar rates. Interestingly, the *Lemna minor* (C₃) enzyme appears to undergo no degradation when studied by an identical methodology, while exhibiting a measurable rate of total soluble protein degradation [110].

(iii) The rapid proteolysis of RuBP carboxylase during senescence observed by Huffaker's group has been confirmed by a number of other workers, such as the work reported by Ferreira and Davies [114] in *Lemna minor*. However, senescence is a programmed physiological process that leads to cell death. Of course, the enzyme could function as a storage form to face total nutrient starvation conditions. Nevertheless, being particularly rich in essential elements like nitrogen and sulphur, it seems likely to admit that if the enzyme is to perform a storage function, then it must be preferentially degraded (i.e. exhibit a higher rate of degradation than the total soluble protein) if deprived of each of such nutrients.

A dramatic increase in proteolysis has been widely reported for RuBP carboxylase during senescence, involving rapid and preferential (i.e. at a faster rate than other proteins of the chloroplast) degradation of the enzyme [92, 93, 102, 115-117].

Lemna minor, a C₃ plant, rapidly and preferentially degrades its RuBP carboxylase when deprived of sulphur [118], but does not seem to degrade the enzyme at all when submitted to nitrogen deficiency [114]. Furthermore, the enzyme exhibits a remarkable stability when *Lemna* fronds are deprived of some macronutrients (besides nitrogen, also phosphorous, potassium and magnesium), probably reflecting that this aquatic plant had to evolve in a way to cope with frequent shortages of such elements [114, 118]. *Triticum aestivum*, another C₃ plant, enhances the degradation of RuBP carboxylase when deprived of nitrogen and particularly of sulphur, but only slightly above the degradation of the total soluble protein [119]. *Zea mays* and *Sorghum bicolor*, both C₄ plants, exhibit a different response. When deprived of sulphur, the degradation rate of the total soluble protein is enhanced but not that of RuBP carboxylase [119]. It may be

considered strange that under conditions of sulphur deprivation, *Zea mays* and *Sorghum bicolor* degrade their RuBP carboxylase at a rate slower than that of the total soluble protein. Considering the high content of RuBP carboxylase in sulphur, the relatively lower abundance of the enzyme in C₄ plants when compared to C₃ plants, and the essential nature of the enzyme for plant growth, this result may be tentatively explained if the strategy of the C₄ plants is to protect their RuBP carboxylase, and so ensure plant growth, under conditions of sulphur deficiency. Under conditions of nitrogen starvation, the degradation of *Zea mays* and *Sorghum bicolor* RuBP carboxylase parallels that of the total soluble protein [119].

Using a new and accurate method to quantify RuBP carboxylase, a study was undertaken in our laboratory to determine the amount of enzyme present in the leaves of *Triticum aestivum* subjected to nitrogen, sulphur, magnesium, phosphorous or calcium starvation. The results obtained indicate an increase in enzyme catabolism in all cases (especially during sulphur deprivation). However, whereas sulphur and magnesium starvation induced a strong preferential degradation of the enzyme, phosphorous and calcium deprivation produced mild preferential degradation and nitrogen did not induce any preferential degradation - indeed, although the enzyme is intensely degraded during nitrogen starvation, the total soluble protein is degraded at an even higher rate (unpublished results).

Garcia-Ferris and Moreno [120] suggested that RuBP carboxylase acts as a nitrogen storage in *Euglena gracilis*. These authors observed that the enzyme is rapidly and selectively degraded under conditions of nitrogen deprivation. After 12h of starvation, when the amount of RuBP carboxylase is reduced to 40%, the proteolysis of the enzyme slows down while degradation of other proteins starts at a similar pace.

In summary, two basic non-catalytic, storage roles may be assigned to RuBP carboxylase. It is generally accepted that during senescence or stress-induced senescence (a physiological process that leads to leaf cell death) the enzyme undergoes hydrolysis to provide amino acids for the build up of storage proteins elsewhere, to be used in the next cycle of growth. However, the studies performed to date question if RuBP carboxylase can indeed be considered a general leaf storage protein in those physiological conditions that do not lead to leaf death - in other words, it is not known whether the enzyme is selectively or preferentially degraded to supply a missing nutrient or to liberate amino acids required for the local synthesis

of a new enzyme complement essential for survival. Furthermore, currently, there is no evidence that RuBP carboxylase plays the same storage role in all photosynthetic eukaryotes.

Consider two aquatic, eukaryote photosynthetic organisms, *Lemna minor* (a higher plant) and the protist *Euglena gracilis* (a unicellular flagellate green alga). They both reduce photosynthetic activity if a convenient carbon source (e.g., sucrose or pyruvate for *Lemna* or *Euglena*, respectively) is present in the growth medium and they both survive after losing all chlorophyll when grown for several generations in the dark. Therefore, they may be considered facultative autotrophs. Nitrogen starvation induces a very rapid and preferential degradation of RuBP carboxylase in *Euglena* but not in *Lemna* [114, 120].

A particular pattern appears to emerge from the data reported in a comparative study on the degradation characteristics of RuBP carboxylase in C_3 and C_4 species – sulphur starvation seems to exert a much stronger effect on C_3 RuBP carboxylase degradation than nitrogen deficiency, with the opposite being true for C_4 plants [113, 119].

Overall, the available evidence seems to indicate that RuBP carboxylase may fulfil a storage role under conditions that do not lead to leaf death but only in some plant species or under specific physiologic or pathologic conditions (e.g. sulphur starvation in C_3 plants or nitrogen deprivation in *Euglena* and in C_4 plants).

Non-catalytic role as metabolite buffer

The active sites of RuBP carboxylase are present in the chloroplasts in concentrations ($\sim 0.5 \text{ mM} \times 8 = \sim 4 \text{ mM}$) that far exceed those of their substrates – carbon dioxide is present at $\sim 10 \mu\text{M}$ whereas RuBP levels normally range from 0.2 to 4 mM depending on experimental conditions [121]. This is unusual since conditions normally assumed for enzymatic catalysis involve substrate concentrations in excess of the enzyme concentration.

It has long been known that many of the components of the Calvin cycle, including sugar phosphates, adenosine phosphates and NADPH, bind to RuBP carboxylase at the RuBP binding site. Because the enzyme affinity for its substrate is higher than for most other metabolites, RuBP occupies the vast majority of the available sites *in vivo*, in the light. However, in the dark, *in vivo*, the concentration of RuBP is much lower and the binding of metabolites to RuBP carboxylase may assume physiological significance. The possible

allosteric regulation of the enzyme by metabolites such as fructose 1,6-bisphosphate, sedoheptulose 1,7-bisphosphate and NADPH (which bind to the active site of RuBP carboxylase) is also rendered difficult because the concentration of the enzyme active sites is significantly greater than the concentration of the proposed effectors [11, 39]. Thus, if all the fructose 1,6-bisphosphate of the chloroplast ($\sim 0.4 \text{ mM}$) was bound to RuBP carboxylase active sites, most of the enzyme molecules would still not be affected.

Rather than being modulated by a number of metabolites, Ashton [122] reasoned that RuBP carboxylase could modulate the concentrations of the effectors. This proposed role for RuBP carboxylase was subsequently corroborated by Furbank and colleagues [123]. Considering that those metabolites exert profound effects on the photosynthetic cell metabolism, Ashton [122] postulated the influence of RuBP carboxylase upon the metabolism of the effectors and proposed a role for RuBP carboxylase as a metabolite buffer. Indeed, the enzyme can potentially bind a large proportion of the total chloroplast fructose 1,6-bisphosphate, sedoheptulose 1,7-bisphosphate and NADPH, which would effectively reduce the free concentration of the metabolites by a factor greater than 10. In this way, RuBP carboxylase can modulate the photosynthetic metabolism, maintaining steady-state metabolite levels and fluxes during transient perturbations to photosynthesis. It can be calculated that in the absence of RuBP, 98.9% of fructose 1,6-bisphosphate ($K_D 40 \mu\text{M}$; $400 \mu\text{M}$ in stroma), 97.6% of sedoheptulose 1,7-bisphosphate ($K_D 85 \mu\text{M}$; 1 mM in stroma) or 97.7% of NADPH ($K_D 70 \mu\text{M}$; $\sim 1 \text{ mM}$ in stroma) may be bound to RuBP carboxylase. Considering the simultaneous interactions of other metabolites in chloroplasts, those values decline to 82.0% (fructose 1,6-bisphosphate), 70.7% (sedoheptulose 1,7-bisphosphate) and 72.1% (NADPH), in the continued absence of RuBP [122].

However, RuBP can effectively displace the other metabolites from the active sites – increasing the substrate concentration progressively increases the free concentrations of the other ligands so that when the concentration of the substrate matches the concentration of active sites, the free pool of the other metabolites is $\geq 90\%$ of the total metabolite pool [122]. In other words, the capacity of RuBP carboxylase to act as metabolite buffer, and hence to modulate the free concentration of those metabolites is strongly negatively correlated with the concentration of RuBP. Of course, this buffering capacity is also dependent on

the K_D value – the higher the K_D , the less metabolite buffering is expected to occur.

In this hypothesis, the RuBP produced after illumination of a leaf will displace the sequestered fructose 1,6-bisphosphate and sedoheptulose 1,7-bisphosphate. Therefore, the metabolite buffer capacity of RuBP carboxylase may be largely abolished after illumination of intact leaves [122].

Apart from fructose 1,6-bisphosphate, sedoheptulose 1,7-bisphosphate, and NADPH, RuBP carboxylase is known to bind a number of other compounds, including 6-phosphogluconate, ribose 5-phosphate and fructose 6-phosphate [124-126], the significance of which remains to be elucidated. All these metabolites seem to bind at the RuBP binding site in the active center, which may exhibit different affinities for each ligand, depending on the activation state.

CA1-P may play a role in the proposed metabolite buffer function suggested for RuBP carboxylase. In the dark or under low irradiances, when RuBP levels are low, LSU sites are free to sequester chloroplast metabolites unless CA1-P is present to occupy the site. It is conceivable that some plant species may synthesize CA1-P in the dark to prevent RuBP carboxylase from sequestering metabolites needed for metabolic activities in the chloroplast [44].

Other compounds, such as the auxins, have been reported to bind to RuBP carboxylase at a site distinct from the RuBP binding site. It was subsequently proposed that the enzyme may play a role in sequestering these plant hormones [127, 128].

Importance in animal nutrition

Due to its natural abundance, RuBP carboxylase is the main protein source for cattle and a relevant component in the human diet. As the major protein constituent in leaf tissues, it becomes the major protein in forage crops and for grazing livestock [66]. The amino acid composition of the protein is generally well-balanced, with amounts of essential amino acids which equal or exceed FAO recommendations [7]. This proportion of essential amino acids is more favorable from the nutritive point of view than that of many other foods. Research has been undertaken on RuBP carboxylase for its use as a human food supplement, with some patents already issued [66]. With intense cultivation of crops like *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*, *Glycine max* or *Beta vulgaris*, an ha of land can yield over 500 kg of the tasteless, odourless RuBP carboxylase if the leaves are harvested while young. In Douillard and Mathan [27] words, if leaf protein and,

more generally speaking, leaf cracking have a future, RuBP carboxylase is part of this future. A large number of studies have been published on food technology of RuBP carboxylase. Methods for the preparation of leaf protein concentrate and the subsequent extraction of the enzyme have been described. In addition, the functional properties of the native or modified protein have been analysed, especially in what concerns drying and redissolving, water- and fat-binding capacities, foaming, emulsification properties and gelation [27].

TURNOVER OF RuBP CARBOXYLASE

Most cellular proteins are in a continuous state of turnover. Steady-state levels of different proteins represent a balance between their synthesis and assembly on the one hand, and their degradation on the other. Mechanisms of synthesis, assembly and catalytic activities of RuBP carboxylase have been extensively studied [21, 129], but only limited information is available on the triggering mechanisms that cause RuBP carboxylase degradation in plants.

An understanding of the catabolic mechanism(s) of RuBP carboxylase during senescence and a variety of stress situations is important not only to determine the nutritive value of green vegetables, but also to establish the optimal use of leaf nitrogen as the major amino acid source of bark and seed storage proteins, all of which are physiologically fundamental for the onset of the next cycle of growth.

Initial studies performed on leaf RuBP carboxylase turnover suggested that the bulk of synthesis and degradation may occur not simultaneously, as with most other proteins, but essentially separated in time. The pattern of RuBP carboxylase turnover in plant leaves has been shown to depend on the physiological state of the leaf. Under normal metabolic conditions, the enzyme is predominantly synthesized during leaf growth and expansion and reaches its maximum concentration soon after full expansion. Thereafter, during leaf senescence, RuBP carboxylase is predominantly and gradually degraded in leaves and its nitrogen is remobilized and translocated into growing organs. Therefore, the catabolism of RuBP carboxylase during leaf senescence parallels the changes in photosynthetic capacity and is closely involved in the nitrogen economy of the plant. Alternatively, the catabolism of the enzyme may be induced by a number of environmental stresses, with the protein amino acids being utilized for the adaptation or survival of the plant to the damage imposed by the stress.

SYNTHESIS AND ASSEMBLY OF RuBP CARBOXYLASE

Prokaryotes have either a single *rbcL* gene (for the form II enzyme) or they have acquired an *RbcS* gene to form an *rbcL/RbcS* operon (for the form I enzyme) [130]. The genes for LSU and SSU from prokaryotic form I RuBP carboxylases occur consecutively on the chromosome and constitute a single operon [32]. No post-translational processing or assembly mechanisms have been reported for the prokaryotic enzymes. In addition, synthesis and assembly of both L_2 and L_3S_2 RuBP carboxylases from prokaryotes and rhodophytic algae are cytosolic events [23].

On the contrary, the synthesis and assembly of eukaryotic RuBP carboxylase is extraordinarily complex, involving the coordinated participation of both the nuclear and the chloroplastic genomes. Both subunits have an amino-terminal fragment removed at some stage in the assembly process [32].

There have been reports that both LSU and SSU are encoded by chloroplast DNA in some non-chlorophytic, eukaryotic algae, although the two are not co-translated [6, 131-134]. For example, both LSU and SSU genes from the chromophytic eukaryote *Olisthodiscus luteus* are located on the chloroplast genome, in the same tandem array as seen in prokaryotes [6]. This observation supports the polyphyletic hypothesis for the origin of the chloroplasts from some plants, which might have arisen through a second symbiosis in which a photosynthetic eukaryote served as the plastid source [135].

In plants, the *rbcL* gene is present as a single copy per circular chloroplast DNA molecule. However, a typical higher plant mesophyll cell may contain up to tens of thousands of copies of the gene because each cell possesses many chloroplasts, each of which contains many DNA molecules [21]. LSU is homogeneous because it is the product of a single gene. For this reason, large subunits from different species exhibit a high degree of homology. With rare exceptions, *rbcL* does not contain introns and encodes approximately 475 amino acids [18]. The *Euglena* gene is unusual in that it is interrupted by nine introns [136]. The *rbcL* gene encoding the 55 kDa LSU was the first gene cloned from chloroplast DNA [137]. Today, there are over one thousand sequences available for the RuBP carboxylase LSU [19].

In contrast to large subunits, small subunits are quite divergent. This is the result of SSU being inherited biparentally and being coded for in the nuclear DNA by

a small multigene family (*RbcS*) of from two to nearly twenty members, depending on the species [138]. However, these copies are not identical. Although considerable divergence occurs at the nucleotide level, little or no difference at all is observed in SSU amino acid sequence. Small subunits within a family can differ from each other by no more than about five residues. *Chlamydomonas*, for example, has as few as two *RbcS* genes, whereas *Triticum aestivum* has as many as twelve [19]. Many of these genes are closely linked and may have arisen from multiple gene duplications [18]. *RbcS* genes contain one to three introns and encode mature proteins of approximately 120 amino acids. Within each multigene family, the introns vary in length and number, as well as in sequence. The *RbcS* gene family, which encodes the 15 kDa RuBP carboxylase SSU, was the first group of plant nuclear genes cloned, sequenced, and studied for expression [139].

The synthesis of SSU is primarily regulated at the level of *RbcS* transcription. This type of regulation occurs via signal transduction mechanisms in response to exogenous (e.g., light) and endogenous signals (e.g., hormones, developmental factors) and by feedback from the chloroplast via a plastid signal [130]. The expression of *RbcS* is mediated by both phytochrome and blue light photoreceptors [18]. In contrast, LSU biosynthesis is regulated at a number of different steps, including gene dosage (plastid DNA copy number), gene silencing, transcription, transcript abundance, *rbcL* transcript stability and translation [140, 141].

It is well established that protein subunits or apoproteins typically do not accumulate in cells when unable to assemble with their cofactor or other protein subunits. These unassembled subunits appear to be degraded selectively [142]. Overproduction of LSU or SSU polypeptides is not generally observed and the pool sizes of unassembled subunits is usually non-existent or very small. On the other hand, the *RbcS* and *rbcL* transcript levels often change in parallel during development, and these changes are matched by corresponding alterations in LSU and SSU abundance. It is interesting to recall the vast disparity in copy number between *RbcS* and *rbcL* [130]. A tight-coordinated control of the biosynthesis of SSU and LSU was initially proposed for the enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii* - the subunits are synthesized in synchrony with each other, with the rates of synthesis and of degradation of both subunits similar to that of the assembled enzyme [143]. The coordination of *rbcL* and *RbcS* expression appears to be

made by the adjustment of subunit stoichiometries in response to the abundance of unassembled subunits. Thus, when SSU accumulation is limiting, the amount of LSU is primarily adjusted to that of SSU at the level of *rbcL* mRNA translation initiation [144]. When LSU accumulation is limiting, the amount of SSU is adjusted to that of the LSU at the level of protein degradation [130]. It is not yet known whether these mechanisms apply when LSU or SSU concentrations exceed wild-type levels.

The great complexity of the plant enzyme is evidenced by the fact that LSU is synthesized as a precursor in chloroplastic 70S ribosomes. Posttranslational processing involves cleavage of a 1 to 2 kDa peptide from its amino-terminal [32]. The functional role of this processing remains unknown. SSU is synthesized as a 20 kDa precursor (P20) on cytoplasmic, 80S ribosomes. The precursor enters the chloroplast posttranslationally via an ATP-dependent transporter on the envelope [32]. A stromal metalloendopeptidase cleaves the amino-terminal transit peptide [145, 146], converting it into the mature SSU [147].

Assembly of LSU and SSU into the plant L_3S_2 holoenzyme is mediated by a large (> 600 kDa) oligomeric protein, termed chaperonin 60 (cpn60; initially designated by RuBP carboxylase large subunit binding protein). This abundant chloroplast protein is composed of two types of 60 kDa subunits. The binding subunits are encoded in the nuclear genome, synthesized as slightly larger precursors (P62) in the cytoplasmic, 80S ribosomes and transported into the chloroplast. Nascent or newly synthesized LSUs are specifically and reversibly associated with cpn60 in such a way that cpn60.LSU binary complex is an obligatory intermediate in the assembly of RuBP carboxylase [18]. It was suggested that cpn60 keeps LSUs soluble in the chloroplasts until they can interact with SSUs. The binding protein may therefore compensate for the amino acid differences observed between cyanobacterial and higher plant LSUs [67]. Release of the chaperonin-bound LSU also requires another chloroplast protein, a cochaperonin (cpn21), and MgATP [15]. Working with isolated *Pisum sativum* chloroplasts, Gatenby and coworkers [148] fused LSU from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* to *Glycine max* chloroplast transit peptides and, after import, observed that the protein interacted with plastid cpn60. Similar studies performed in the presence of chloramphenicol indicated that active protein synthesis is not required for the interaction of imported LSU with

cpn60 and its subsequent transfer into holoenzyme [18]. Imported SSU has also been shown to interact and form stable complexes with cpn60.

CATABOLISM OF RuBP CARBOXYLASE

Proteolysis in chloroplasts

It is now known that chloroplasts contain proteases that can degrade their own protein constituents [149, 150]. *Avena sativa* chloroplasts, for example, contain at least four proteolytic activities [151], but the level of one, a thylakoid-associated endopeptidase, increases when plastids are subjected to strong irradiation or to treatment with active oxygen in darkness [151, 152]. However, despite the multitude of proteolytic reactions in these organelles, very little is known about the mechanisms involved. The information available is also scarce in relation to the proteases involved. The D1 polypeptide of the photosystem II reaction center constitutes an exception. Exhibiting one of the highest rates of turnover in the chloroplast, it has been reported to possess autoproteolytic activity [153, 154]. Under high light intensity, the D1 protein is damaged and its rapid degradation is an essential step in the repair mechanism which allows its substitution by a newly synthesized protein [155].

Despite some initial controversy concerning the presence of ubiquitin in chloroplasts, it seems now that these organelles do not possess the ubiquitin-mediated proteolytic pathway [156, 157]. Nevertheless, a number of proteases have been described in chloroplasts.

It has been suggested that components of the proteolytic machinery in chloroplasts may resemble those of prokaryotic organisms. Clp is an ATP-dependent protease that has been well characterized in *Escherichia coli*. It is composed of two subunits: the proteolytic subunit ClpP, a 21 kDa serine protease capable of degrading short peptides, and the regulatory subunit ClpA, a 83 kDa ATPase which enables ClpP to degrade large proteins [158]. Since ATP is not needed for the actual cleavage of the peptide bond, it is assumed that the regulatory subunit, which has been shown to possess chaperone activity, is involved in the unfolding of the protein substrate and presenting it to the proteolytic subunit [159]. Genes encoding the proteolytic subunit (ClpP) and the regulatory subunit (designated ClpC in plants) were found in the chloroplast and nuclear genomes of higher plants, respectively. Furthermore, the products of the plant genes were shown to accumulate constitutively in the chloroplast stroma from green and etiolated leaves but

not in roots [160]. PrcA, an ATP-independent protease, similar to the cyanobacterial Ca^{2+} -stimulated PrcA protease, was also detected in plastids from green leaves but not from etiolated leaves or roots [161].

A number of years has passed since ATP stimulated proteolytic activity was first demonstrated in chloroplasts [162-164]. Liu and Jaggendorf [162] and Malek *et al.* [163] showed in 1984, independently, that newly synthesized proteins in isolated chloroplasts are prone to proteolysis and that this degradation is stimulated by either light or ATP. This was the first clear indication of the existence of ATP-dependent proteases within the chloroplast. Energy-dependent proteases [161, 165] and ATP-dependent degradation of specific proteins [166-168] in chloroplasts was subsequently further reported.

Mistargeted proteins (i.e. proteins targeted to the wrong compartment) in chloroplasts are assumed to undergo catabolism [160]. An ATP-dependent, serine-type, stromal protease was recently demonstrated to be involved in the degradation of intentionally mistargeted OEE33, a component of the luminal oxygen-evolving enzyme [169]. This degradation, observed in intact as well as broken chloroplasts, was suggested to be carried out by ClpP protease [160].

Another homologue of a bacterial ATP-dependent protease was identified in chloroplasts. The FtsH protein from *Escherichia coli* is a membrane-bound ATP-dependent metalloprotease [170]. Using antibodies generated against a highly conserved sequence of FtsH, a homologous protein was identified in the thylakoid membranes. Its expression is induced by light and is inhibited by cycloheximide, indicating that it is synthesized in the cytosol [160].

Other chloroplast proteases have been studied which do not depend on ATP hydrolysis [160]. It is the case, for example, of EP1, a stromal Zn^{2+} -requiring metalloprotease which was purified from *Pisum sativum* chloroplasts [171]. EP1 cleaves between Ala-Ala or Gly-Gly, and was shown to be capable of acting on LSU and, perhaps, also on SSU [171]. *In vitro*, EP1 degrades LSU to a smaller polypeptide of 36 kDa, suggesting that RuBP carboxylase may constitute an *in vivo* substrate of this proteinase. Other proteases include a prolyl endopeptidase, purified from PSII particles, that specifically cleaves the 18 kDa subunit of PSII [172], and a 43 kDa peptidase, also isolated from PSII particles, capable of cleaving subunits of the oxygen-evolving complex (OEE) [173]. Peptidases capable of hydrolysing exclusively short peptides have also been isolated from chloroplasts. It has been

suggested that such peptidases may participate in hydrolysis of products of protein degradation by other proteases down to the level of free amino acids [160].

Despite the number of chloroplast proteases described, their physiological relevance and regulation are still largely unknown. Furthermore, it is not known whether any of these enzymes is responsible for the selective degradation of RuBP carboxylase *in vivo*. Presumably, proteolysis in chloroplasts is not so much controlled by changes in the activity or abundance of proteases as by structural changes in the substrate proteins that alter and/or regulate their stability *in vivo* and therefore their susceptibility to proteolytic attack.

Intracellular location of the proteolytic system: chloroplast versus vacuole

Two basic models have been considered for the catabolic mechanism of RuBP carboxylase: the vacuole may be the major site responsible for the degradation of the enzyme or RuBP carboxylase may be hydrolysed by proteolytic enzymes inside the chloroplasts, in an ATP-dependent or independent manner.

A role for the vacuole in RuBP carboxylase catabolism is based on the observation that this compartment contains a number of acid hydrolases and exhibits functions similar to the animal lysosome [174]. According to this model, it is possible to consider non-selective (assuming that chloroplasts are engulfed and digested by the vacuoles and that the individual chloroplast proteins exhibit identical susceptibilities to the vacuolar proteases) or selective degradation of the chloroplast proteins (assuming, for example, that individual proteins are exported from the chloroplast and transported into the vacuole or that, after engulfing of the chloroplasts by the vacuole, the vacuolar proteases show some sort of selectivity towards the protein substrates).

To evaluate the two models of RuBP carboxylase degradation, a number of studies were undertaken on the relationship between changes in chloroplast size and number on one hand and changes in RuBP carboxylase content and photosynthetic activity on the other, during leaf senescence of *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare* and *Glycine max* mesophyll cells [175-181]. However, the results of these studies were frequently not consistent, producing in some cases conflicting conclusions. In a recent study performed with senescent leaves of *Triticum aestivum*, Ono and colleagues [182] obtained evidence suggesting that chloroplast proteins were degraded by both intraorganelle catabolism and a reduction in chloroplast

number.

Indirect evidence supporting a role for the vacuole comes from a number of reports which demonstrated the presence of RuBP carboxylase degrading enzymes in the vacuoles. This has been shown, for example, for mesophyll protoplasts of *Triticum aestivum* and *Zea mays* leaves [183]. The two major endoproteases (termed EPI and EP2), which constitute over 99% of the total endoproteolytic activity of *Hordeum vulgare* leaves, are located exclusively in the vacuole and are capable of hydrolysing RuBP carboxylase *in vitro* [184, 185]. The incubation of RuBP carboxylase with lysed vacuoles from *Triticum aestivum* leaves produced three polypeptides of 50-52 kDa as the major degradation products of LSU [186]. The incubation of the enzyme with lysed vacuoles from senescing *Phaseolus vulgaris* leaves degraded LSU (but not SSU) to a 41 kDa polypeptide, through three intermediates of 50, 48 and 42 kDa, in a way suggesting the involvement of two types of proteases [187].

Direct evidence comes from the observation that in isolated protoplasts from senescing *Triticum aestivum* leaf cells, chloroplasts appeared to move into invaginations of the vacuole or to be taken up by the vacuole [175].

Several chloroplast proteins have been suggested to be involved in RuBP carboxylase catabolism. A proteolytic activity capable of degrading LSU was isolated from *Glycine max* chloroplasts [149]. The incubation of intact *Pisum sativum* chloroplasts produced a 37 kDa polypeptide and other degradation products derived from LSU, with the pattern of degradation depending on the composition of the incubation medium [188]. A zinc protease capable of hydrolysing LSU to a smaller polypeptide of about 36 kDa was purified from the stroma of *Pisum sativum* chloroplasts [171]. Many other proteases have been found and characterized in chloroplasts [145, 146, 172, 189-191]. However, the physiological role of these proteases in what concerns the degradation of RuBP carboxylase *in vivo* has not been directly demonstrated.

The two models proposed are not mutually exclusive in the sense that they may complement each other or become active only under different metabolic, physiologic or pathologic conditions. Alternatively, they may both function continuously and simultaneously but, depending on the plant metabolic or physiologic state, only one assumes a predominant role under a particular set of conditions. By following the changes in the number and size of chloroplasts during senescence of *Triticum aestivum* leaves, it was

observed that the organelle proteins are mobilized in two distinct ways —by a gradual degradation of the proteins inside the chloroplasts, and by the successive disappearance of a small population of whole chloroplasts [182]. A considerable proportion of the studies performed on the catabolism of RuBP carboxylase involved the use of senescing leaves, a physiological condition that leads to cell death. It is tempting to speculate that the vacuole may play a dominant role in the degradation of the enzyme during senescence or other conditions that lead to cell death (such as, for example, total nutrient starvation), whereas under normal metabolic conditions, the chloroplast proteolytic mechanisms may take over the control of RuBP carboxylase hydrolysis. Evidence has been presented that, at least under normal metabolic conditions, total, soluble or thylakoid chloroplast proteins from *Lemna minor* are degraded at widely different rates [192]. In addition, it seems increasingly assumed that the first steps of RuBP carboxylase degradation in senescent leaves must occur within the intact chloroplasts [193, 194], because the amount of enzyme decreases much faster than the decrease in the number of these organelles in *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* and *Pisum sativum* leaves [176-178, 188].

The abrupt change in catabolic rate observed under such conditions may be due to the synthesis of new proteolytic activities in the compartment and/or to sensitization of the protein to preexisting proteases by selective labelling. One of the ways by which the latter process might be accomplished is by oxidative modification of critical residues [195, 196]. Since the preferential degradation of RuBP carboxylase seems to take place before chloroplast dismantling, it may be assumed that both the oxidative and proteolytic activities responsible are present inside the organelles. The vacuolar proteolytic machinery may subsequently take over and be responsible for the non-selective proteolysis observed thereafter, concomitant with chloroplast disassembly.

In favor of this hypothesis is the study performed by Moreno's group with *Euglena gracilis*. These authors defined several stages concerning RuBP carboxylase degradation, when *Euglena* is subjected to nitrogen starvation [120]. During the first 4 h of stress, no stress-enhanced degradation of the enzyme is observed. However, between 4 and 15 h after the onset of nitrogen deprivation *Euglena* sustains a high rate of growth at the expense of its nitrogen reserves (cell division occurs at a rate that is similar to the control).

During this period, there occurs a rapid and preferential degradation of RuBP carboxylase, chlorophyll levels remain constant and the amount of soluble proteins other than RuBP carboxylase does not change significantly – probably, the nitrogen needed for growth is provided mainly by the selective proteolysis of RuBP carboxylase, which acts as a nitrogen reservoir. The quantity of RuBP carboxylase available for mobilization under these conditions is certainly limited by the amount of enzyme in excess of that needed to sustain the basal rate of light-dependent CO₂ fixation. After 15 h of nitrogen deprivation, *Euglena* growth rate decreases sharply, with the cell division rate dropping to zero if the adverse condition persists. During this period, there is still RuBP carboxylase proteolysis, but other soluble proteins are also degraded at the same rate. In addition, chlorophyll content also decreases markedly, indicating chloroplast disassembly. It is reasonable to assume that during this phase the strategy of *Euglena* is ultimately to survive, which may be done at the expense of the entire photosynthetic apparatus.

It is most conceivable that distinct proteolytic mechanisms are underway in the different stages that occur during the response of an organism to a given physiological condition. The available information may be interpreted to mean that under normal metabolic conditions or during the initial, reversible stages of any other physiological conditions (senescence included), the selective degradation of RuBP carboxylase may occur within chloroplasts and by the action of chloroplast proteases, serving as a source of amino acids for the metabolic needs of the cell or of the organism as a whole. During prolonged exposure to the adverse physiological conditions, when irreversible damage is imposed by the stress, the vacuolar proteolytic machinery may gradually take over, causing non-selective RuBP carboxylase degradation in a process that will lead to cell death. In this case, total cell proteins will provide a source of amino acids for the organism as a whole.

Metabolic fates of RuBP carboxylase

Most chloroplast proteins are very stable once they have been properly assembled, and there is little turnover of most photosynthetic proteins [160]. The D1 protein of the photosystem II (PSII) reaction center is certainly an exception, exhibiting one of the highest rates of turnover in the chloroplast [155]. However, massive protein degradation may be observed in the transition of plastids from one phase to another, under certain stress situations and in the final deterioration of

chloroplasts during senescence [160].

The mechanism responsible for the catabolism of RuBP carboxylase or the signal(s) that trigger the enzyme for degradation remain largely to be elucidated. It is possible that several mechanisms exist that degrade the enzyme under specific conditions. For example, a protease may be responsible for the degradation of the enzyme under normal metabolic conditions, but a distinct proteolytic system may come into action under specific conditions that are known to preferentially degrade the enzyme. Other situations have been described where the enzyme is hydrolysed during a process that leads to cell death – under these conditions, it is likely that vacuolar proteases may play an important role. Thus, the enzyme may be degraded by unspecific vacuolar proteases, by proteases specific for RuBP carboxylase [197-199], or even by proteases that exhibit a higher affinity for the oxidised or polymerized forms of RuBP carboxylase – a proteolytic system has recently been detected in leaf extracts prepared from *Triticum aestivum* subjected to nitrogen deprivation that degrades preferentially the oxidised and polymerized forms of RuBP carboxylase (unpublished results).

RuBP carboxylase of most species shows a negligible catabolic rate in mature organs [110, 200]. However, this situation changes dramatically during natural or stress-induced senescence, in which the enzyme is usually degraded initially at a fast rate and in a selective manner [93, 116, 117, 120]. In fact, proteolysis of RuBP carboxylase constitutes a prominent feature of senescence and in the stress responses of plants and algae. Therefore, synthesis and degradation of RuBP carboxylase seem to occur separated in time in the leaves of many plants – synthesis appears to be most prominent early in leaf development (or during post-stress conditions), and degradation ensues following full leaf expansion (or during stress situations).

The metabolic fates of RuBP carboxylase may be tentatively grouped into four categories depending on the plant species under study and the physiological condition considered. (i) RuBP carboxylase is neither degraded nor does it suffer structural changes. This metabolic fate has been reported for *Lemna minor* and *Oryza sativa* grown under normal metabolic conditions [108-110] and in *Lemna minor* subjected to nitrogen, phosphorous, potassium or magnesium starvation [114, 118].

(ii) RuBP carboxylase undergoes non-disulphide oxidation followed by polymerization of the enzyme subunits into very large molecular mass aggregates.

Under these conditions, P65, a dimer formed by the covalent, non-disulphide linkage of one LSU with one SSU, accumulates as an intermediate of the polymerization process. P65 formation has been reported in many plant species, either under normal metabolic conditions [201] or after exposure to ultraviolet radiation [202-204]. In addition, P65 and the polymerization process have been observed in *Lemna minor* subjected to osmotic shock [205], calcium starvation [118], darkness, CO₂ deprivation, ethanol treatment, filipin treatment and, apparently, all other conditions that cause membrane damage [206].

(iii) RuBP carboxylase is degraded in a process that leads to cell death. This fate of the enzyme is generally observed during natural or stress-induced senescence of cereal leaves [102, 103, 176-178], as well as with total nutrient starvation of *Lemna minor*, either in the light or dark [114]. Degradation of RuBP carboxylase was also detected in *Vigna unguiculata* leaves during senescence [207]. Yoshida and Minamikawa [187] detected degradation of RuBP carboxylase in detached primary leaves of *Phaseolus vulgaris* during senescence under the light or in darkness. Cercós *et al.* [208] observed that senescence-specific proteolysis was the operating mechanism controlling RuBP carboxylase levels during ovary senescence in *Pisum sativum*. The most striking effect of jasmonic acid and its methyl ester is the induction of leaf senescence. After the hormone treatment, synthesis of RuBP carboxylase ceases, but its degradation is induced down to less than 5% of untreated leaves after a 3-day incubation [209, 210].

During natural senescence, RuBP carboxylase is one of the early proteins that are broken down, therefore affecting photosynthesis and nitrogen economy in plants. This degradation occurs over a prolonged period of many days, until very little protein remains at the time of leaf abscission [211]. Exposure of plants to ozone (O₃; a strong oxidant) generally causes accelerated foliar senescence as characterized by premature leaf yellowing and abscission [212]. The O₃-induced accelerated senescence is accompanied by a premature decrease in the quantity of RuBP carboxylase. This effect has been observed in *Triticum aestivum* [213], *Solanum tuberosum* [214], *Raphanus sativus* [215] and *Populus maximowizii* x *trichocarpa* [215]. Interestingly, ozone induces degradation of RuBP carboxylase in mature, but not in immature leaves of *Solanum tuberosum* [216]. In a subsequent study, Brendley and Pell [217] exposed *Populus maximowizii* x *trichocarpa* to O₃ and observed degradation of RuBP carboxylase in the lower leaves of

the canopy associated with an increase in this protein in the younger leaves higher in the canopy.

(iv) RuBP carboxylase is degraded in a reversible process that does not lead to cell death. The growth of many plants under normal metabolic conditions produces a steady but measurable rate of RuBP carboxylase degradation, that varies with the species considered. This has been observed for *Triticum aestivum*, *Zea mays* and *Sorghum bicolor* [111-113]. In *Chlamydomonas reinhardtii* there is a slow but detectable rate of synthesis of RuBP carboxylase and of its subunits in the dark and a similarly slow rate of degradation in the dark, following a light period [143]. This slow turnover of the enzyme in the dark accounts for the steady levels of RuBP carboxylase protein. A number of stress conditions, nutritive deficiencies in particular, have been reported to produce a preferential and reversible degradation of RuBP carboxylase. It is the case, for example, of *Lemna minor* subjected to sulphur starvation [118], and of *Triticum aestivum*, *Zea mays* and *Sorghum bicolor* deprived of nitrogen or of sulphur [119]. In recent experiments performed in our laboratories, it was observed that the incubation of *Triticum aestivum* under conditions of nitrogen, sulphur, magnesium, phosphorous or calcium starvation induce an intense degradation of RuBP carboxylase, particularly notorious in the case of sulphur (unpublished results). Garcia-Ferris and Moreno [120] observed rapid and preferential degradation of RuBP carboxylase in *Euglena gracilis* subjected to nitrogen starvation. RuBP carboxylase degradation was detected in *Vigna unguiculata* leaves exposed to drought stress [207].

It must be taken into account that each stress considered may produce differential effects on RuBP carboxylase depending on its intensity and duration. Take leaf senescence, for example; the very initial stages may cause reversible catabolism of RuBP carboxylase, whilst later on in senescence, the degradative process of the enzyme may become irreversible. As mentioned above, distinct proteolytic systems are probably responsible for the catabolism of the enzyme during those different stages. A decrease in RuBP carboxylase amount may determine the point at which a leaf ceases to be an effective source of photoassimilate, setting into action the irreversible events (as, for example, the vacuolar proteolytic machinery) that lead to the breakdown and remobilization of the leaf components, i.e. triggering foliar senescence.

Evidence has been presented suggesting that binding

of specific ligands to RuBP carboxylase may affect its susceptibility to proteolytic attack. The binding of the reaction-intermediate analogue carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate to the *Spinacea oleracea* enzyme reduces the number of trypsin sensitive sites [218].

One approach used to try to elucidate the mechanism of RuBP carboxylase degradation is to examine what happens to one type of enzyme subunit in the absence of the other. As referred above, when SSU accumulation is limiting, LSU accumulation is regulated by SSU polypeptide abundance at the translational level [130]. It has been suggested that LSU is stable when present in excess of the SSU [219]. However, when LSU synthesis is limiting, SSU accumulation is regulated by turnover in response to LSU abundance, so that excess SSU is degraded to match the levels of LSU. It has been suggested that in some cases, this occurs after holoenzyme assembly [130]. This has been shown by experiments involving the use of *Chlamydomonas* or higher plant mutants specifically perturbed in *rbcL* biosynthesis [e.g., 220, 221], inhibitors of plastid transcription or translation [e.g., 222], *Secale cereale* seedlings lacking plastid ribosomes [e.g., 223], and mutants of *Chlamydomonas* and higher plants deficient in plastid ribosomes [e.g., 224, 225]. When the synthesis of chloroplast proteins in *Chlamydomonas* (including LSU) is inhibited by chloramphenicol, the nuclear encoded SSU is synthesized and imported into the plastid, but rapidly degraded. This degradation is carried out by a constitutive mechanism, probably by a nuclear-encoded protease, since degradation also occurs in cells deficient in chloroplast ribosomes [224].

Oxidative modification of RuBP carboxylase

Upon exposure of a living tissue to ionizing radiation, including ultraviolet radiation, most of the energy is absorbed by water, resulting in the production of highly reactive oxygen radicals which can directly inactivate and modify proteins in diverse biological systems or *in vitro*, causing non-enzymatic fragmentation, oxidative modification and both inter and intramolecular cross-links, leading to the formation of dimers, trimers or higher-order molecular aggregates [226-229]. In most cases, the cross-linking appears to be due to the formation of disulphide bridges, as shown by the radioprotective effect of dithiothreitol, 2-mercaptoethanol and other antioxidants against cross-linking, or by the observation that blockage of the exposed sulfhydryl groups by means of Ellman's reagent prevents the aggregation process. In some

cases, the altered proteins become more susceptible to proteolytic digestion [226, 230-232]. Their involvement in the inactivation and degradation of chloroplastic proteins has also been reported, as is the case of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose 1,6-bisphosphatase, D1 protein, *psaB* gene product, and superoxide dismutase [233-239]. Oxygen and hydroxyl radicals have been shown to be involved in initiating the degradation of a number of unidentified proteins in isolated chloroplasts [151, 152, 231].

In illuminated chloroplasts, in which light energy is harvested and converted to chemical energy, formation of reactive oxygen species occurs as unavoidable by-products of the photosynthetic electron transport chain, particularly under light or oxidative stress conditions [233, 240], that are known to cause degradation of RuBP carboxylase [151, 188, 231, 241-244]. Under these conditions, O₂ becomes an alternative acceptor of photosynthetically transported electrons and is transformed into H₂O₂, O₂⁻, OH or ¹O₂ [234, 245]. During foliar senescence or under unfavorable environmental conditions, the concentration of active oxygen radicals can rise to toxic levels, causing cellular injuries such as lipid peroxidation, inactivation/denaturation of enzymes, and DNA damage.

A large number of studies have shown an enhanced degradation of RuBP carboxylase by illumination or oxidative stress conditions in leaves and isolated chloroplasts [120, 151, 188, 231, 241, 242]. The enhanced degradation of RuBP carboxylase, and of other chloroplast proteins, observed upon illumination of isolated chloroplasts is widely assumed to be due to the light-generation of reactive oxygen species. In favor of this hypothesis is the observation that in isolated *Avena sativa* or *Hordeum vulgare* chloroplasts, the degradation of several proteins is accelerated by increasing light intensity or oxygen concentration [151]. Furthermore, the formation of activated oxygen species, by adding a hydroxyl-generating system to the medium, promotes protein catabolism both in the light and in the dark [231, 243]. These authors examined intact chloroplasts isolated from *Avena sativa* exposed to light or incubated in darkness in the absence or presence of a hydroxyl-generating system composed of ascorbic acid, FeCl₃ and H₂O₂. Light or treated chloroplasts in darkness enhanced the rate of proteolysis in a similar manner, while proteolysis was almost negligible in darkness in the absence of additives. The studies performed by Casano *et al.* [231]

and Desimone *et al.* [243] suggest that light promotes proteolysis by increasing the production of active oxygen species, which may modify proteins in a way that they become more susceptible to proteolytic attack. A thylakoid-bound endopeptidase was subsequently found whose activity increased under photooxidative environmental conditions or treatment with a hydroxyl-generating system.

Reactive oxygen species may constitute one means by which RuBP carboxylase degradation is triggered. However, reactive oxygen species may trigger the enzyme degradation by activating proteases or by increasing the susceptibility of the enzyme to proteolytic attack. Using stromal extracts prepared from *Hordeum vulgare* chloroplasts, it was observed that ¹⁴C-labelled RuBP carboxylase was degraded only after treatment with the oxygen radicals [198]. These results support the view that reactive oxygen radicals modify RuBP carboxylase into a substrate for stromal protease(s), rather than activating the proteases. Interestingly, the authors noted that degradation required ATP hydrolysis.

Several distinct types of oxidative modification have been described in the literature for RuBP carboxylase. These may include covalent, non-disulphide or disulphide bonds, and may be enzyme catalysed or not. (i) Non-enzymatic fragmentation of the polypeptide chain. LSU is split into a 37 kDa N-terminal side fragment and a 16 kDa C-terminal side fragment by reactive oxygen radicals in lysates of or intact illuminated chloroplasts from *Triticum aestivum* leaves. The same effect is obtained when purified RuBP carboxylase is exposed to a hydroxyl radical-generating system [246]. The C-terminus of the 37 kDa fragment is Ser-328 and the N-terminus of the 16 kDa fragment is Thr-330. Gly-329, which links the two fragments in the native enzyme, is missing [246-248]. This fragmentation of RuBP carboxylase is completely inhibited in the presence of metal chelators, catalase or hydroxyl radical scavengers, but not in the presence of protease inhibitors. The site specific cleavage of the LSU strongly depends on the structural and conformational status of the catalytic site. Thus, for example, the binding of the reaction intermediate analogue carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate to the active form of RuBP carboxylase completely protects the enzyme from the fragmentation [248]. Production of activated oxygen species by increased light intensities, elevated oxygen concentrations or by the addition of the herbicide methyl viologen causes fragmentation of LSU in isolated *Hordeum vulgare*

chloroplasts [243].

(ii) Enzymatic, non-disulphide oxidation of RuBP carboxylase. A number of stress situations were found to induce non-disulphide oxidation of the enzyme in *Lemna minor*, leading to the catalytic inactivation of RuBP carboxylase. It is the case, for example, of incubation in the dark and CO₂ deprivation, ethanol treatment and filipin treatment [206, 249].

(iii) Non-disulphide, covalent dimerization of LSU and SSU, followed by further polymerization. The exposure of pure RuBP carboxylase or plant leaves (*Lemna minor*, *Arum italicum*, *Brassica oleracea*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* and *Phaseolus vulgaris*) to ultraviolet radiation (UV-A, UV-B or UV-C) induces the accumulation of a 65 kDa polypeptide (P65), formed by the covalent, non-disulphide linkage of one SSU with one LSU within the holoenzyme. The rate of P65 accumulation correlates well with the energy of the UV radiation utilized. Prolonged exposure to the UV radiation results in the formation of very high molecular mass aggregates of RuBP carboxylase in a way indicating that P65 is a stable intermediate in the aggregation process [203]. The UV-dependent accumulation of P65 and the subsequent formation of large RuBP carboxylase aggregates is not affected by inhibitors of stress-induced oxidase systems or membrane stabilizing compounds, indicating that these processes are not produced enzymatically by the oxidase system described below.

Other stress situations have been reported to produce *in vivo* P65 and the non-disulphide very high molecular mass RuBP carboxylase aggregates. Indeed, when *Lemna minor* is subjected to osmotic stress, calcium starvation and apparently all conditions that are known to damage cellular membranes, RuBP carboxylase is first oxidised by an oxidase system into a catalytically inactive form, with a measurable reduction in the number of free -SH groups. Prolonged exposure to the stress leads to the intermediate accumulation of P65 and the subsequent formation of the very large, non-disulphide covalent macromolecular aggregates, in a gradual process accompanied by further reductions in the number of sulphhydryl groups [118, 205, 206, 249]. Therefore, formation of P65 and the large aggregates under these circumstances involves the action of an oxidase system that is induced by the stress. The oxidised form of the enzyme, and particularly the polymerized form are more susceptible to proteolytic attack *in vitro* than the native enzyme [205]. However, the physiological significance of the RuBP carboxylase

aggregates remains to be established.

Formation of P65 is also achieved simply by *in vitro* incubation, in the dark, of crude leaf extracts for suitable lengths of time [203]. A similar 66 kDa UV-photoproduct was described to be formed *in vivo* or *in vitro* by the action of UV-B radiation on plant (*Brassica napus*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* and *Pisum sativum*) leaves or pure RuBP carboxylase [202, 204]. In this work, a tryptophan photolysis step was reported to be involved in the mechanism of photoproduct formation. All these studies suggest that P65 formation (and subsequent accumulation of higher order aggregates of RuBP carboxylase) may constitute a universal response of plants to UV radiation. The 65 or 66 kDa RuBP carboxylase photoproduct appears only after incorporation of LSU and SSU into the native holoenzyme [202, 203]. Indeed, P65 did not accumulate in a *Nicotiana tabacum* mutant that synthesizes LSU and SSU but is unable to assemble them into normal holoenzyme complexes [202].

While purifying enzymes involved in lipid biosynthesis from the microsomes of the green algae *Botryococcus braunii* (grown under non-stressed conditions), Wang and Kolattukudy [201] detected a 66 kDa polypeptide that contains both SSU and LSU. Reverse transcription-PCR failed to detect transcripts that encoded both subunits, leading to the conclusion that the two subunits are covalently attached in the cell but not co-translated. Using anti-LSU and anti-SSU antibodies, P65 was recently detected in *Lemna minor* grown under normal metabolic conditions (unpublished results).

(iv) Proteolysis of RuBP carboxylase. Treatment of *Phaseolus vulgaris* leaves with dimethyl sulfoxide and Tween 80 considerably promotes senescence and proteolysis of RuBP carboxylase [187]. Desimone *et al.* [243] observed that oxidative treatment stimulates partial proteolysis of LSU in isolated *Hordeum vulgare* chloroplasts. Recently, these authors [198] reported that reactive oxygen species first modify RuBP carboxylase which then makes it susceptible to proteolysis by the action of a protease in a stromal fraction in an ATP-dependent manner. These studies indicate that light stress induces reactive oxygen-mediated denaturation of RuBP carboxylase followed by proteolytic degradation of LSU in chloroplasts [243] or its lysates [198].

(v) Disulphide, cross-linking of RuBP carboxylase subunits. The cysteinyl sulphur atom of Cys-247 of LSU from cyanobacteria and *Spinacea oleracea* RuBP

carboxylases can be selectively oxidised, with the formation of large subunit dimers (LSU₂) within the LSU₈ core of the enzyme and without the formation of higher order aggregates. The disulphide bond between LSU-LSU is readily reduced with either dithiothreitol or 2-mercaptoethanol once the protein is denatured with SDS [250, 251]. Other authors have reported the formation *in vivo* of higher order aggregates of RuBP carboxylase due to disulphide cross-linking of the enzyme subunits [120, 241, 252, 253]. Working with *Spirodela oligorrhiza* and *Triticum aestivum*, Mehta *et al.* [241] showed that Cu²⁺-induced oxidative stress caused intermolecular cross-linking of LSUs via disulphide bonds within the holoenzyme, followed by proteolysis.

(vi) Other types of oxidation on RuBP carboxylase. Oxidative inactivation of *Solanum tuberosum* RuBP carboxylase by O₃ is associated with the formation of carbonyl derivatives on amino acid side chains of the LSU [254]. Enzyme inactivation by carbonyl formation has been reported as a marker for proteolysis in animal and bacterial systems [255].

The increased susceptibility of oxidised enzymes to proteolysis is well documented, and is considered a physiological mechanism to regulate protein turnover [256]. Dalling [211] suggested that oxidative modification may target RuBP carboxylase for recognition by chloroplast proteases. Oxidative stress may be expected to enhance or accelerate this process. Several proteins are known for which cysteine oxidation triggers proteolytic susceptibility. In the case of RuBP carboxylase, it has been proposed that both the enzymatic activity and proteolytic susceptibility of the enzyme may be regulated by a redox mechanism involving critical cysteine residues on the protein [196, 230, 253]. Similar mechanisms of oxidative labelling of enzymes for proteolysis are well known in animal cells [195].

If formation of disulphide bonds is considered, only three pairs of cysteine residues are close enough within the RuBP carboxylase molecule to exhibit the potential to establish -S-S- links. Formation of disulphide bonds between residues Cys-247 of two adjacent LSUs or between residues Cys-172 and Cys-192 of one LSU are possible because the residues are conserved among eukaryotic RuBP carboxylases. However, formation of an -S-S- linkage between Cys-449 and Cys-459 is possible in the *Nicotiana tabacum* and *Chlamydomonas* enzymes but not in the *Spinacea oleracea* enzyme (which contains Thr-449). In addition, Cys-172 and Cys-192 have been reported to participate in a covalent

bond in unactivated *Nicotiana tabacum* RuBP carboxylase, but in a Van der Waals bond in the activated form of the enzyme [257-259].

This hypothesis is supported by a number of reports. (i) Several studies performed *in vitro* have shown the existence of a linkage between oxidative modification of RuBP carboxylase and enhanced susceptibility to proteolytic attack. RuBP carboxylase subjected to oxidative stress *in vitro* or *in vivo* loses its catalytic activity and becomes susceptible to either exogenous or endogenous proteases, respectively [230, 241]. Working with *Citrus sinensis* leaves, Peñarrubia and Moreno [230] used aged solutions of pure RuBP carboxylase (which leads to spontaneous oxidation of cysteines) or exposed the enzyme to several compounds (H_2O_2 , $CuSO_4$, $K_3Fe(CN)_6$, dimethyl sulfoxide, iodine) which are known to promote cysteine oxidation. In all cases, the oxidised form of the enzyme exhibited enhanced susceptibility *in vitro* to the action of exogenous proteases (trypsin, chymotrypsin, proteinase K and papain). In other words, it was demonstrated that the oxidation of RuBP carboxylase increases markedly its susceptibility to exogenous proteases [205, 230].

Dann and Pell [214] showed that treatment of purified RuBP carboxylase from *Solanum tuberosum* with O_3 increased its sensitivity to chymotrypsin action. Treatment of the inactive, oxidised enzyme with dithiothreitol resulted in partial recovery of both catalytic activity and resistance to proteolysis. In *Lemna minor*, an oxidised form of RuBP carboxylase extracted from osmotically stressed fronds exhibited an increased susceptibility to exogenously added proteases *in vitro* [205, 249]. More recently, a proteolytic activity was detected in *Triticum aestivum* leaves subjected to nitrogen starvation that exhibited preferential *in vitro* activity towards oxidised RuBP carboxylase (unpublished results).

(ii) Modification of sulfhydryl groups is known to inactivate RuBP carboxylase [260-263]. The enzymatic activity of RuBP carboxylase can be modulated *in vitro* by redox effectors acting on sulfhydryl groups of cysteine residues [263, 264], suggesting that the enzyme may be subjected to redox regulation *in vivo*.

(iii) The presence of oxidised forms of RuBP carboxylase *in vivo* has been confirmed by a number of authors, in organisms ranging from protists and unicellular algae to higher plants under oxidative [241] or nutritional [120] stresses. *In vivo* formation of disulphide bonds in LSU has been detected in *Secale cereale* leaves under low temperature stress [265]. Strong oxidative conditions occur in senescent

chloroplasts [266] or other stress situations that are known to lead to RuBP carboxylase catabolism. RuBP carboxylase has been shown to exist in an oxidised, non-disulphide, and highly cross-linked form in the fronds of *Lemna minor* subjected to osmotic stress [205, 249], calcium starvation, darkness, CO_2 deficiency and apparently all conditions that lead to membrane damage [206]. In *Euglena gracilis* subjected to nitrogen deprivation, oxidative aggregation of RuBP carboxylase was observed [120].

RuBP carboxylase was selected to explain the differential chilling sensitivities of two lines of *Lycopersicon* - a chilling-sensitive, cultivated tomato (*L. esculentum*) and a chilling-tolerant, high-altitude line (*L. peruvianum*) [267]. During long-term chilling under non-photoinhibitory conditions, a substantial reduction in the number of RuBP carboxylase titrable sulfhydryl groups, concomitant with an increase in the content of disulphide bonds, was observed in the chilling sensitive line but not in the chilling-tolerant line. Working on frost tolerance of *Secale cereale* and *Solanum tuberosum*, Huner and coworkers suggested that the mechanism of low-temperature tolerance in these plants could be explained by the protection of RuBP carboxylase from induced thiol oxidation that was conferred by a conformational change (e.g. shifting cysteine residues into hydrophobic niches inside the enzyme molecule) [268, 269].

Several studies have shown that RuBP carboxylase is oxidatively modified prior to its degradation [120, 241, 243, 249, 254, 267]. Formation of mixed disulphide derivatives of cysteine residues has been identified as a marker for proteolytic degradation [270]. Due to the natural abundance of the sulfhydryl residues and the absence of disulphide bonds in native RuBP carboxylase, the enzyme may be particularly susceptible to mixed -SH oxidation under conditions of oxidative stress [205, 253].

The oxidation of critical cysteine residues *in vitro* has been proposed to switch RuBP carboxylase from a protease resistant to a sensitive form [196, 230, 253]. The critical residues have not yet been identified, but, because oxidative modification of RuBP carboxylase is widespread among species, it is likely that these residues are conserved. Oxidative modification of cysteine residues was found to sensitize RuBP carboxylase to *in vitro* proteolysis [230]. On the other hand, some stress situations have been reported to induce the *in vivo* oxidation of RuBP carboxylase cysteine residues [120, 249]. These observations led to the suggestion that cysteine oxidation may signal the

enzyme for *in vivo* catabolism during senescence or stress conditions [196]. However, a direct connection between cysteine oxidation and *in vivo* RuBP carboxylase hydrolysis has proved difficult to establish.

In an elegant experiment, directed mutagenesis and chloroplast transformation were employed to create a Cys-172 to Ser substitution in *Chlamydomonas reinhardtii* LSU [271]. The mutant enzyme is more resistant to sodium arsenite (which reacts with vicinal dithiols), the effect of which is assumed to be directed to the Cys-172/192 pair that is present in the wild-type enzyme but absent from the mutant enzyme. The mutant form is also more resistant to *in vitro* proteolysis and to *in vivo* stress-induced degradation under conditions of oxidative or osmotic stress [271]. The absence of Cys-172 in the *Chlamydomonas* mutant enzyme shifts the critical redox potential for RuBP carboxylase to more oxidative conditions and protects the enzyme from degradation under stress conditions [271]. The same authors observed that the Cys-172 substitution does not completely block induced RuBP carboxylase degradation, highlighting that other signal(s) (another Cys residue?) may contribute to the regulation of RuBP carboxylase catabolism.

Effect of endogenous proteases on RuBP carboxylase. Detection of putative intermediates of proteolysis

Proteolytic activities in chloroplasts able to act more or less specifically on RuBP carboxylase *in vivo* or *in vitro* have been reported by several authors [171, 189, 272, 273]. However, the physiological relevance and the regulation of these proteases remains largely unknown. In addition, in many cases, RuBP carboxylase degradation *in vivo* does not correlate well with the levels of proteolytic activity measured *in vitro*. On the other hand, measurement of RuBP carboxylase degradation by incubating the enzyme with a total cell extract does not necessarily have a physiological meaning because the protease involved and RuBP carboxylase may simply occur *in vivo* in different compartments. Nevertheless, they may come into contact under certain metabolic or physiological conditions. The incubation of RuBP carboxylase with total extracts or vacuolar lysates prepared from senescing *Phaseolus vulgaris* leaves induces the degradation of LSU, but not of SSU, to a 41 kDa polypeptide through three intermediates of 50 kDa, 48 kDa and 42 kDa [187]. The results obtained by these authors indicated that each proteolytic step occurs by the removal of a small N-terminal peptide and suggests the consecutive action of two types of proteases.

RuBP carboxylase degradation has also been detected in isolated chloroplasts [150, 272, 274]. However, Miyadai *et al.* [275] noted that part or all of this proteolytic activity in mechanically isolated chloroplasts may be due to a contamination of the organelles with vacuolar proteases. Previous treatment of the isolated chloroplasts with a suitable protease (*e.g.*, thermolysin) may therefore be advisable, although the use of this protease may prove undesirable in protein degradation studies. In isolated *Pisum sativum* chloroplasts exposed to light, rapid degradation of RuBP carboxylase is observed, whereas in the dark the protein remains stable for several hours [188, 244, 276]. LSU from *Glycine max* and *Festuca pratensis* was degraded during the incubation of isolated chloroplasts [149].

A number of degradation products of LSU have been detected in the illuminated chloroplasts. Degradation of LSU in isolated *Pisum sativum* chloroplasts leads to the accumulation of a 37 kDa polypeptide (in the light) or 45, 42, 37 and 32 kDa polypeptides (in the dark) [188]. Oxidative treatment of chloroplasts isolated from *Hordeum vulgare* promotes partial proteolysis of LSU, with the accumulation of a prominent breakdown product with an apparent molecular mass of 36 kDa [243]. The incubation in the light of lysates or of intact chloroplasts from *Triticum aestivum* leaves leads to the cleavage of LSU into a 37 kDa N-terminal fragment and a 16 kDa C-terminal fragment [246-248].

The detection of intermediates formed during the *in vivo* catabolism of proteins is generally difficult due to the usually very high rates at which these polymers are degraded. For example, Yoshida and Minamikawa [187] observed catabolism of RuBP carboxylase in detached primary leaves of *Phaseolus vulgaris* during natural or induced senescence, but were unable to detect proteolytic products. Garcia-Ferris and Moreno [120] failed to detect any breakdown products during the rapid and selective degradation of RuBP carboxylase observed in *Euglena gracilis* subjected to nitrogen deprivation. However, experiments have been performed which allowed the detection/accumulation of RuBP carboxylase products, either fragments of lower molecular mass or enzyme aggregates of varying degrees of polymerization. In each case, the physiological roles of the intermediates in the proteolytic process or the reason why the intermediates accumulate are not known.

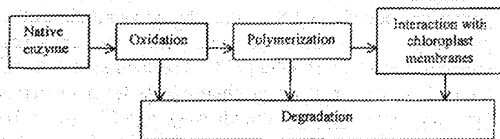
RuBP carboxylase cleavage fragments of 52 and 30 kDa were detected in crude extracts prepared from

senescent ovaries of *Pisum sativum* [208]. In a recent study, the accumulation of a 49 kDa polypeptide derived from LSU was detected during the *in vivo* degradation of RuBP carboxylase in the leaves of *Triticum aestivum* subjected to nitrogen, sulphur or magnesium starvation (unpublished results).

It is important to mention that loss or appearance of typical polypeptides under oxidative stress (as detected by SDS-PAGE or immunoblotting with anti-RuBP carboxylase antibodies) does not necessarily indicate proteolysis, since proteins exposed to active oxygen radicals can form highly insoluble aggregates or undergo nonenzymatic fragmentation [203, 277].

Model for the selective degradation of RuBP carboxylase

Although it seems likely that more than one pathway exists for RuBP carboxylase degradation, current knowledge suggests that, at least under some circumstances, one mechanism for the selective degradation of the enzyme involves the following sequence of events:



This model is based on a number of observations.

Different lines of evidence, derived from both *in vivo* and *in vitro* experiments, suggest that the signal(s) that trigger the enzyme for catabolism may be related to the oxidation of sulphydryl groups from critical cysteine residues, whose oxidation increases the enzyme sensitivity to proteolytic attack [196]. This process may be controlled by the redox state of the cell. Redox regulation by oxidation/reduction of cysteine thiol groups has been demonstrated for other chloroplast proteins, including carbohydrate metabolism enzymes, ATP synthase, components of photosynthetic membrane complexes and translation factors [278-282]. Studies performed *in vitro* indicated that the susceptibility of RuBP carboxylase to exogenous (proteolytic) enzymes increases markedly upon oxidation of certain cysteine residues by different oxidative agents [230, 253]. Evidence for oxidative modification of RuBP carboxylase *in vivo* has been reported in senescing processes induced by oxidative stress [241, 242] or by other physiological conditions or stress situations that are not intrinsically oxidative, such

as cold hardening [265], osmotic shock [249], nitrogen deprivation [120], and other nutritive stresses [118], in different species which are not phylogenetically related. Furthermore, oxidised RuBP carboxylase is also detected, though in much smaller amounts, in control cultures of *Euglena gracilis* [120]. The presence of oxidised forms of RuBP carboxylase in non-stressed conditions had already been reported [230, 241, 253]. This suggests that oxidative labelling of RuBP carboxylase under control conditions may also be an essential prerequisite step for regulating the slow degradation of the enzyme. Therefore, it may be suggested that RuBP carboxylase degradation is subjected to redox control and is triggered by oxidative conditions developed in the chloroplast either under normal metabolic conditions or during senescence or different kinds of stresses.

It seems clear that oxidative stress induces structural modifications in the RuBP carboxylase molecule that increase its susceptibility to proteolysis. In illuminated chloroplasts, in which light energy is harvested and converted to chemical energy, production of reactive oxygen species occurs as an unavoidable event, particularly under light or oxidative stress conditions [234, 240]. These conditions have been widely reported to induce RuBP carboxylase degradation [151, 188, 231, 241-243]. Oxidation of RuBP carboxylase, either by reactive oxygen species or by the action of a stress-induced oxidase system may mark the enzyme for catabolism. Light stress induces reactive oxygen mediated denaturation of RuBP carboxylase followed by proteolytic degradation of the large subunits [198, 243].

The induction of plants (*Triticum aestivum* and *Spirodela oligorrhiza*) and algae (*Chlamydomonas*) to senesce under oxidative conditions leads to intermolecular cross-linking of LSU and the subsequent association of RuBP carboxylase with chloroplast membranes, prior to proteolysis [241]. Although the translocation of cross-linked LSU to membranes was suggested to be a necessary step in its degradation [241], it could well be that this apparent association has no physiological significance, and merely results from aggregation of cross-linked LSU leading to co-precipitation with membranes [160]. In *Euglena gracilis* subjected to nitrogen deprivation, oxidative aggregation of RuBP carboxylase and association of the enzyme to membranes increased with time of nitrogen-starvation concomitant with the stress-enhanced proteolysis of the enzyme [120]. Working with chloroplasts isolated from *Hordeum vulgare*, Desimone

et al. [243] found evidence that oxidative treatment of the organelles stimulated association of RuBP carboxylase with the insoluble fraction of chloroplasts.

A number of stress conditions, including osmotic shock, calcium starvation, CO₂ deficiency, darkness and apparently all conditions that affect membrane integrity [118], have been shown to induce an oxidase system in *Lemma minor* that is capable of converting *in vivo* and *in vitro* RuBP carboxylase to a catalytically inactive and oxidised form [205, 249]. *In vitro*, the catalytic effect of the oxidase system on RuBP carboxylase is inhibited by EDTA, KCN and reducing agents, requires the presence of an unidentified low molecular mass factor, involves formation of non-disulphide, intersubunit and intermolecular covalent links and increases the susceptibility of the enzyme to proteolytic attack [205, 249]. However, these studies have not demonstrated the nature of the physiological oxidant *in vivo*, although the unidentified low molecular mass compound present in extracts of both stressed and unstressed fronds, is needed to oxidise RuBP carboxylase *in vitro*. Prolonged exposure to the stress leads to the accumulation of high order aggregates of RuBP carboxylase. This observation may be tentatively explained if the damage imposed on the membranes by the stress prevents the binding/association of the polymerized enzyme, blocking its degradation and leading to the accumulation of the intermediates. The detection of P65, the stable intermediate in the formation of high order aggregates of RuBP carboxylase, under normal metabolic conditions [201] further supports the view that the catabolism of RuBP carboxylase may involve oxidation followed by polymerization before proteolysis.

Treatment of leaf extracts or intact chloroplasts isolated from *Populus maximowitzi* x *trichocarpa* with O₃ accelerated both the loss of LSU and the accumulation of high molecular mass LSU aggregates without the occurrence of detectable RuBP carboxylase degradation [242]. Extrachloroplastic factors required for proteolysis may have been missing or present in sub-optimal quantities in the isolated organelles or the aggregation process may cause the protein to be resistant to proteolytic degradation. Alternatively, the presence of an intact membrane system, as it occurs *in vivo*, may be an essential requirement for RuBP carboxylase breakdown. In intact chloroplasts isolated from *Pisum sativum* leaves, the catabolism of RuBP carboxylase is strongly accelerated by illumination. The observation that this light-induced degradation is

markedly reduced following lysis of the organelles [244] may suggest the requirement of an intact membrane system.

Membrane-bound cysteine oxidases have been shown to be present in different photoautotrophs as diverse as photosynthetic bacteria, algae and higher plants [283]. Proteolytic activities associated to chloroplast membranes have also been reported [189, 272], some of them being activated by oxidative conditions [190].

Even if the survival strategies of the different species are distinct or if the stress conditions considered are different, a similar or identical proteolytic mechanism may be induced to specifically degrade RuBP carboxylase which may be the result of triggering an ancient response that is shared by all photosynthetic eukaryotes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the Fundação para a Ciência e Tecnologia (under contract no. PRAXIS XXI/PCNA/C/BIA/107/96) for continued research support.

REFERENCES

- [001] Bowes, G., Ogren, W.L., and Hageman, R.H. 1971, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 716.
- [002] Arias, I.M., Doyle, D., and Schimke, R.T. 1969, *J. Biol. Chem.*, 244, 3303.
- [003] Davies, D.D. 1980, *Adv. Bot. Res.*, 8, 65.
- [004] Bowien, B., Mayer, F., Codd, G.A., and Schlegel, H.G. 1976, *Arch. Microbiol.*, 110, 157.
- [005] Andrews, T.J., Greenwood, D.M., and Yellowlees, D. 1984, *Arch. Biochem. Biophys.*, 234, 313.
- [006] Reith, M., and Cattolico, R.A. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8599.
- [007] Kawashima, N., and Wildman, S.G. 1970, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 21, 325.
- [008] Kung, S.D. 1976, *Science*, 191, 429.
- [009] Tingey, S.V., and Andersen, W.R. 1986, *J. Exp. Bot.*, 37, 625.
- [010] Ku, M.S.B., Schmitt, M.R., and Edwards, G.E. 1979, *J. Exp. Bot.*, 30, 89.
- [011] Jensen, R.G., and Bahr, J.T. 1977, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28, 379.
- [012] Ellis, R.J. 1979, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 241.
- [013] Baker, T.S., Suh, S.W., and Eisenberg, D. 1977,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1037.
- [014] McFadden, B.A., and Purohit, K. 1978, *Photosynthetic Carbon Assimilation*, H.W. Siegelman and G. Hind (Eds.), Plenum Press, New York, 179.
- [015] Kellogg, E.A., and Juliano, N.D. 1997, *Am. J. Bot.*, 84, 413.
- [016] Tabita, F.R. 2000, *Photos. Res.*, In press.
- [017] Watson, G.M.F., and Tabita, F.R. 1997, *FEMS Lett.*, 146, 13.
- [018] Gutteridge, S., and Gatenby, A.A. 1995, *Plant Cell*, 7, 809.
- [019] Spreitzer, R.J. 1999, *Photos. Res.*, 60, 29.
- [020] Chase, M.W., et al. 1993, *Annals Missouri Botanical Garden*, 80, 528.
- [021] Mizioro, H.M., and Lorimer, G.H. 1983, *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 507.
- [022] Morden, C.W., Delwiche, C.F., Kuhsel, M., and Palmer, J.D. 1992, *Bio Systems*, 28, 75.
- [023] Hartman, F.C., and Harpel, M.R. 1994, *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 197.
- [024] Houtz, R.L., Stults, J.T., Mulligan, R.M., and Tolbert, N.E. 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1855.
- [025] Houtz, R.L., Poncleit, L., Jones, S.B., Royer, M., and Stults, J.T. 1992, *Plant Physiol.*, 98, 1170.
- [026] Grimm, R., Grimm, M., Eckerskorn, C., Pohlmeier, K., Pohl, T., and Soll, J. 1997, *FEBS Lett.*, 408, 350.
- [027] Douillard, R., and Mathan, O. 1994, *New and Developing Sources of Food Proteins*, B.J.F. Hudson (Ed.), Chapman & Hall, London, 307.
- [028] Whitman, W.B., Martin, M.N., and Tabita, F.R. 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 10184.
- [029] Andrews, T.J. 1988, *J. Biol. Chem.*, 263, 12213.
- [030] Gutteridge, S. 1990, *J. Biol. Chem.*, 266, 7359.
- [031] Larson, E.M., O'Brien, C.M., Zhu, G., Spreitzer, R.J., and Portis, A.R. Jr. 1997, *J. Biol. Chem.* 272, 17033.
- [032] Andrews, T.J., and Lorimer, G.H. 1987, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 10, M.D. Hatch and N.K. Boardman (Eds.), Academic Press, Inc., New York, 131.
- [033] Andrews, T.J., and Ballment, B. 1983, *J. Biol. Chem.*, 258, 7514.
- [034] Incharoensakdi, A., Takabe, T., and Akazawa, T. 1985, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 698.
- [035] Andrews, T.J., and Lorimer, G.H. 1985, *J. Biol. Chem.*, 260, 4632.
- [036] Pierce, J. 1988, *Physiol. Plant.*, 72, 690.
- [037] Laing, W.A., and Christeller, J.T. 1976, *Biochem. J.*, 159, 563.
- [038] Lorimer, G.H., Badger, M.R., and Andrews, J.T. 1976, *Biochemistry*, 15, 529.
- [039] Lorimer, G.H., Badger, N.R., and Heldt, H.W. 1978, *Photosynthetic Carbon Assimilation*, H.W. Siegelman and G. Hind (Eds.), Plenum Press, New York, 283.
- [040] Lorimer, G.H. 1981, *Biochemistry*, 20, 1236.
- [041] Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C., and Lorimer, G.H. 1998, *Chem. Rev.*, 98, 549.
- [042] Mott, K.A., and Berry, J.A. 1986, *Plant Physiol.*, 82, 77.
- [043] Jordan, D.B., and Chollet, R. 1983, *J. Biol. Chem.*, 258, 13752.
- [044] Salvucci, M.E. 1989, *Physiol. Plant.*, 77, 164.
- [045] Somerville, C.R., Portis, A.R., and Ogren, W.L. 1982, *Plant Physiol.*, 70, 381.
- [046] Portis, A.R. Jr. 1995, *J. Exp. Bot.*, 46, 1285.
- [047] Salvucci, M.E., and Ogren, W.L. 1996, *Photos. Res.*, 47, 1.
- [048] Portis, A.R. Jr. 1992, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 415.
- [049] Mott, K.A., and Woodrow, I.E. 1993, *Plant Physiol.*, 102, 859.
- [050] Vu, J.C.V., Allen, L.H., and Bowes, G. 1983, *Plant Physiol.*, 73, 729.
- [051] Seemann, J.R., Berry, J.A., Freas, S.M., and Krump, M.A. 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8024.
- [052] Berry, J.A., Lorimer, G.H., Pierce, J., Seemann, J.R., Meek, J., and Freas, S. 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 734.
- [053] Vu, C.V., Allen, L.H., and Bowes, G. 1984, *Plant Physiol.*, 76, 843.
- [054] Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D., and Häusler, R.E. 1995, 46, 1397.
- [055] Edmondson, D.L., Kane, H.J., and Andrews, T.J. 1990, *FEBS Lett.*, 260, 62.
- [056] Bainbridge, G., Madgwick, P., Parnan, S., Mitchell, R., Paul, M., Pitts, J., Keys, A.J., and Parry, M.A.J. 1995, *J. Exp. Bot.*, 46, 1269.
- [057] Edmondson, D.L., Badger, M.R., and Andrews, T.J. 1990, *Plant Physiol.*, 93, 1376.
- [058] Zhu, G., and Jensen, R.G. 1991, *Plant Physiol.*, 97, 1354.
- [059] McCurry, S.D., and Tolbert, N.E. 1977, *J. Biol. Chem.*, 252, 8344.
- [060] Lorimer, G.H., and Andrews, T.J. 1981, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 8, Photosynthesis,

- M.D. Hatch, and N.K. Boardman (Eds.), Academic Press, New York, 329.
- [061] Lorimer, G.H., and Andrews, T.J. 1973, *Nature*, 243, 359.
- [062] Andrews, T.J., and Lorimer, G.H. 1978, *FEBS Lett.*, 90, 1.
- [063] Jordan, D.B., and Ogren, W.L. 1981, *Nature*, 291, 513.
- [064] Jordan, D.B., and Ogren, W.L. 1983, *Arch. Biochem. Biophys.*, 227, 425.
- [065] Pierce, J. 1986, *Plant Physiol.*, 81, 943.
- [066] Bahr, J.T. 1985, *Biochemical Basis of Plant Breeding*, C.A. Neyra (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, 59.
- [067] Roy, H. 1989, *Plant Biotechnology*, S. Kung and C.J. Arntzen (Eds.), Butterworths, Boston, 337.
- [068] Read, B.A., and Tabita, F.R. 1994, *Arch. Biochem. Biophys.*, 312, 210.
- [069] Lucas, W.J., and Berry, J.A. 1985, *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms*, Waverly Press, Baltimore.
- [070] Farquhar, G.D., Caemmerer, S., and Berry, J.A. 1980, *Planta*, 149, 78.
- [071] Ku, S.B., and Edwards, G.E. 1978, *Planta*, 140, 1.
- [072] Jordan, D.B., and Ogren, W.L. 1984, *Planta*, 161, 308.
- [073] Chen, Z., and Spreitzer, R.J. 1989, *J. Biol. Chem.*, 264, 3051.
- [074] Laing, W.A., Ogren, W.L., and Hageman, R.H. 1974, *Plant Physiol.*, 54, 678.
- [075] Spreitzer, R.J. 1998, *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, J.D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant (Eds.), Kluwer Academic Publishers, 515.
- [076] Walker, D.A., Leegood, R.C., and Sivak, M.N. 1986, *Phylos. Trans. Royal Soc. London, Series B, Biology*, 313, 305.
- [077] Moroney, J.V., Tolbert, N.E., and Sears, B.B. 1986, *Mol. Gen. Genet.*, 204, 199.
- [078] Weissbach, A., Horecker, B.L., and Hurwitz, J. 1956, *J. Biol. Chem.*, 218, 795.
- [079] Zelitch, I. 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 579.
- [080] Goldworthy, A. 1976, *Photorespiration*, Carolina Biology Readers, Burlington.
- [081] Hardy, R.W.F., Haveika, U.D., and Quebedeaux, B. 1978, *Photosynthetic Carbon Assimilation*, H.W. Siegelman and G. Hind (Eds.), Plenum Press, New York, 165.
- [082] Broda, E. 1975, *The Evolution of the Bioenergetic Processes*, Pergamon, Oxford.
- [083] Fersht, A.R., Shi, J.P., Knill-Jones, J., Lowe, D.M., Wilkinson, A.J., Blow, P., Carter, P., Waye, M.M.Y., and Winter, G. 1985, *Nature*, 314, 235.
- [084] Somerville, C.R., and Ogren, W.L. 1979, *Nature*, 280, 833.
- [085] Osmond, C.B. 1981, *Biochim. Biophys. Acta*, 639, 77.
- [086] Heber, U., Schreiber, U., Siebke, K., and Dietz, K.J. 1990, *Perspectives in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis*, I. Zelitch (Ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, 17.
- [087] Ogren, W.L. 1984, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 415.
- [088] Keys, A.J., Bird, I.F., Cornelius, M.J., Lea, P.J., Wallsgrave, R.M., and Mifflin, B.J. 1978, *Nature*, 275, 741.
- [089] Givan, C.V., Joy, K.W., and Kleczkowski, A. 1988, *Trends Biochem. Sci.*, 13, 433.
- [090] Igamberdiev, A.U. 1992, *Fiziol. Rastenii*, 39, 126.
- [091] Field, C., and Mooney, H.A. 1986, *On the Economy of Plant Form and Function*, T.J. Givinish (Ed.), Cambridge University Press, London, 25.
- [092] Wittenbach, V.A. 1978, *Plant Physiol.*, 62, 604.
- [093] Kang, S.M., and Titus, J.S. 1980, *Physiol. Plant.*, 50, 285.
- [094] Reger, B.Y., Ku, M.S.B., Potter, J.W., and Evans, J.E. 1983, *Phytochemistry*, 22, 1127.
- [095] Viale, A.V., Kobayashi, H., and Akazawa, T. 1989, *J. Bacteriol.*, 171, 2391.
- [096] Makino, A., and Osmond, B. 1991, *Plant Physiol.*, 96, 355.
- [097] Lawlor, D.W., Kontturi, M., and Young, A.T. 1989, *J. Exp. Bot.*, 40, 43.
- [098] Quick, W.P., Fichtner, K., Schulze, E.D., Wendler, R., Leegood, R.C., Mooney, H., Rodermeol, S.R., Bogorad, L., and Stitt, M. 1992, *Planta*, 188, 522.
- [099] Evans, J.R., and Terashima, N. 1987, *Aust. J. Plant Physiol.*, 14, 59.
- [100] Evans, J.R. 1988, *Aust. J. Plant Physiol.*, 15, 93.
- [101] Kleinkopf, G.E., Huffaker, R.C., and Matheson, A. 1970, *Plant Physiol.*, 46, 416.
- [102] Peterson, L.W., and Huffaker, R.C. 1975, *Plant Physiol.*, 55, 1009.
- [103] Huffaker, R.C., and Miller, B.L. 1978, *Photosynthetic Carbon Assimilation*, H.W. Siegelman and G. Hind (Eds.), Plenum Press, New York, 139.
- [104] Melo, T.S., Ferreira, R.B., and Teixeira, A.R.

- 1994, *Phytochemistry*, 37, 641.
- [105] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1983, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc., New York.
- [106] Zak, R., Martin, A.F., Prior, G., and Rabinowitz, M. 1977, *J. Biol. Chem.*, 252, 3430.
- [107] Davies, D.D., and Humphrey, T.J. 1978, *Plant Physiol.*, 61, 54.
- [108] Mae, T., Makino, A., and Ohira, K. 1983, *Plant Cell Physiol.*, 24, 1079.
- [109] Makino, A., Mae, E., and Ohira, K. 1984, *Plant Cell Physiol.*, 25, 429.
- [110] Ferreira, R.B., and Davies, D.D. 1987, *Plant Physiol.*, 83, 869.
- [111] Simpson, E. 1978, *Photosynthetic Carbon Assimilation*, H.W. Siegelman and G. Hind (Eds.), Plenum Press, New York, 113.
- [112] Simpson, E., Cooke, R.J., and Davies, D.D. 1981, *Plant Physiol.*, 67, 1214.
- [113] Esquivel, M.G., Ferreira, R.B., and Teixeira, A.R. 1998, *J. Exp. Bot.*, 49, 807.
- [114] Ferreira, R.B., and Davies, D.D. 1987, *Plant Physiol.*, 83, 878.
- [115] Moreno, J., and Garcia-Martinez, J.L. 1984, *Physiol. Plant.*, 61, 429.
- [116] Shurtz-Swirski, R., and Gepstein, S. 1985, *Plant Physiol.*, 78, 121.
- [117] Crafts-Brandner, S.J., Salvucci, M.E., and Egli, D.E. 1990, *Photosynth. Res.*, 23, 223.
- [118] Ferreira, R.M.B., and Teixeira, A.R.N. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 7253.
- [119] Esquivel, M.G., Ferreira, R.B., and Teixeira, A.R. 2000, *Plant Sci.* In Press.
- [120] Garcia-Ferris, C., and Moreno, J. 1994, *Planta*, 193, 208.
- [121] Sicher, R.C., and Jensen, R.G. 1979, *Plant Physiol.*, 64, 880.
- [122] Ashton, A.R. 1982, *FEBS Lett.*, 145, 1.
- [123] Furbank, R.T., Foyer, C.H. and Walker, D.A. 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 894, 165.
- [124] Buchanan, B.B., and Schurmann, P. 1973, *J. Biol. Chem.*, 248, 4956.
- [125] Badger, M.R., and Lorimer, G.H. 1981, *Biochemistry*, 20, 2219.
- [126] McCurry, S.D., Pierce, J., Tolbert, N.E., and Orme-Johnson, W.H. 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 6623.
- [127] Wardrop, A.J., and Polya, G.M. 1980, *Plant Physiology*, 66, 105.
- [128] Wardrop, A.J., and Polya, G.M. 1980, *Plant Physiology*, 66, 112.
- [129] Ellis, R.J. 1985, *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus*, K.E. Steinback, S. Bonitz, C.J. Arntzen, and L. Bogorad (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 339.
- [130] Rodermeier, S. 1999, *Photos. Res.*, 59, 105.
- [131] Hwang, S.R., and Tabita, F.R. 1989, *Plant Mol. Biol.*, 13, 69.
- [132] Hwang, S.R., and Tabita, F.R. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 6271.
- [133] Valentin, K., and Zeische, K. 1989, *Curr. Genet.*, 16, 203.
- [134] Fujiwara, S., Iwahashi, H., Somega, J., Nishikawa, S., and Minaka, N. 1993, *J. Phycol.*, 29, 347.
- [135] Whatley, J.M. 1983, *Int. Ver. Cytol.*, 14, 329.
- [136] Gingrich, J.C., and Hallick, R.B. 1985, *J. Biol. Chem.*, 260, 16162.
- [137] McIntosh, L., Poulsen, C., and Bogorad, L. 1980, *Nature*, 288, 556.
- [138] Manzara, T., and Gruijssem, W. 1988, *Photos. Res.*, 16, 117.
- [139] Dean, C., Pichersky, E., and Dunsmuir, P. 1989, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 415.
- [140] Mayfield, S.P., Yohn, C.B., Cohen, A., and Danon, A. 1995, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 147.
- [141] Danon, A. 1997, *Plant Physiol.*, 115, 1293.
- [142] Callis, J. 1995, *Plant Cell*, 7, 845.
- [143] Iwanij, V., Chua, N.H., and Siekevitz, P. 1975, *J. Cell Biol.*, 64, 572.
- [144] Rodermeier, S. 1998, *Meth. Enzymol.*, 297, 209.
- [145] Robinson, C., and Ellis, R.J. 1984, *Eur. J. Biochem.*, 142, 337.
- [146] Robinson, C., and Ellis, R.J. 1984, *Eur. J. Biochem.*, 142, 343.
- [147] Ostrem, J.A., Ramage, R.T., Bohner, H.J., and Wasmann, C.C. 1989, *J. Biol. Chem.*, 264, 3662.
- [148] Gatenby, A.A., Lubben, T.H., Ahlquist, P., and Keegstra, K. 1988, *EMBO J.*, 7, 1307.
- [149] Ragster, L., and Chrispeels, M.J. 1981, *Plant Physiol.*, 67, 104.
- [150] Dalling, M.J., Tang, A.B., and Huffaker, R.C. 1983, *Z. Pflanzenphysiol.*, 111, 311.
- [151] Casano, L.M., Gómez, L.D., and Trippi, V.S. 1990, *Plant Cell Physiol.*, 31, 377.
- [152] Casano, L.M., and Trippi, V.S. 1992, *Plant Cell Physiol.*, 33, 329.
- [153] Misra, A.N., Hall, S.G., and Barber, J. 1991, *Biochim. Biophys. Acta*, 1059, 239.
- [154] Shipton, C.A., and Barber, J. 1991, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA, 88, 6691.
- [155] Mattoo, A.K., Marder, J.B., and Edelman, M. 1989, *Cell*, 56, 241.
- [156] Beers, E.P., Moreno, T.N., and Callis, J. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 15432.
- [157] Ramos, P.C.R., Cordeiro, A.C.F., Ferreira, R.M.B., Ricardo, C.P.P., and Teixeira, A.R.N. 1995, *Aust. J. Plant Physiol.*, 22, 893.
- [158] Gottesman, S., and Maurizi, M.R. 1992, *Microbiol. Rev.*, 56, 592.
- [159] Wickner, S., Gottesman, S., Skowrya, D., Hoskins, J., McKenney, K., and Maurizi, M.R. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12218.
- [160] Adam, Z. 1996, *Plant Mol. Biol.*, 32, 773.
- [161] Osterseizer, O., Tabak, S., Yarden, O., Shapira, P., and Adam, Z. 1996, *Eur. J. Biochem.*, 236, 932.
- [162] Liu, X.Q., and Jagendorf, A.T. 1984, *FEBS Lett.*, 166, 248.
- [163] Malek, L., Bogorad, L., Ayers, A., and Goldberg, A.L. 1984, *FEBS Lett.*, 166, 253.
- [164] Thayer, S.S., and Huffaker, R.C. 1985, *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.*, 4, 223.
- [165] Shanklin, J., De Witt, N.D., and Flanagan, J.M. 1995, *Plant Cell*, 7, 1713.
- [166] Lindahl, M., Yang, D.H., and Andersson, B. 1995, *Eur. J. Biochem.*, 231, 503.
- [167] Reinbothe, C., Apel, K., and Reinbothe, S. 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6206.
- [168] Schröder, S., Altenfeld, U., and Johanningmeier, U. 1995, *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Vol. IV, P. Matthis (Ed.), Kluwer Academic Publis., Dordrecht, 263.
- [169] Halperin, T., and Adam, Z. 1996, *Plant Mol. Biol.*, 30, 925.
- [170] Tomoyasu, T., Garner, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H., Hiraga, S., and Ogura, T. 1995, *EMBO J.*, 14, 2551.
- [171] Bushnell, T.P., Bushnell, D., and Jagendorf, A.T. 1993, *Plant Physiol.*, 103, 585.
- [172] Kuwabara, T. 1992, *FEBS Lett.*, 300, 127.
- [173] Zhang, L.X., Wang, J., Wen, J.Q., Liang, H.G., and Du, L.F. 1995, *Physiol. Plant.*, 95, 591.
- [174] Matile, P. 1978, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29, 193.
- [175] Wittenbach, V.A., Lin, W., and Habert, R.R. 1982, *Plant Physiol.*, 69, 98.
- [176] Martinoia, E., Heck, U., Dalling, M.J., and Matile, P.H. 1983, *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 178, 147.
- [177] Mae, T., Kai, N., Majino, A., and Ohira, K. 1984, *Plant Cell Physiol.*, 24, 333.
- [178] Wardley, T.M., Bhalla, P.L., and Dalling, M.J. 1984, *Plant Physiol.*, 75, 421.
- [179] Ford, D.M., and Shibles, R. 1988, *Plant Physiol.*, 86, 108.
- [180] Hashimoto, H., Kura-Hotta, M., and Katoh, S. 1989, *Plant Cell Physiol.*, 30, 707.
- [181] Kura-Hotta, M., Hashimoto, H., Satoh, K., and Katoh, S. 1990, *Plant Cell Physiol.*, 31, 33.
- [182] Ono, K., Hashimoto, H., and Katoh, S. 1995, *Plant Cell Physiol.*, 36, 9.
- [183] Lin, W., and Wittenbach, V.A. 1981, *Plant Physiol.*, 67, 969.
- [184] Miller, B.L., and Huffaker, R.C. 1982, *Plant Physiol.*, 69, 58.
- [185] Thayer, S.S., and Huffaker, R.C. 1984, *Plant Physiol.*, 75, 70.
- [186] Bhalla, P.L., and Dalling, M.J. 1986, *J. Plant Physiol.*, 122, 289.
- [187] Yoshida, T., and Minamikava, T. 1996, *Eur. J. Biochem.*, 238, 317.
- [188] Mitsuhashi, W., Crafts-Brandner, S.J., and Feller, V. 1992, *J. Plant Physiol.*, 139, 653.
- [189] Musgrove, J.E., Elderfield, P.D., and Robinson, C. 1989, *Plant Physiol.*, 90, 1616.
- [190] Kuwabara, T., and Hashimoto, Y. 1990, *Plant Cell Physiol.*, 31, 581.
- [191] Oblong, J.E., and Lampra, G.K. 1992, *EMBO J.*, 11, 4401.
- [192] Ferreira, R.B., and Davies, D.D. 1986, *Planta*, 169, 278.
- [193] Huffaker, R.C. 1990, *New Phytol.*, 116, 199.
- [194] Vierstra, R.D. 1993, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 44, 385.
- [195] Stadtman, E.R. 1990, *Biochemistry*, 29, 6323.
- [196] Moreno, J., Peñarrubia, L., and Garcia-Ferris, C. 1995, *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 121.
- [197] Crafts-Brandner, S.J., Klein, R.R., Klein, P., Holzer, R., and Feller, U. 1996, *Planta*, 200, 312.
- [198] Desimone, M., Wagner, E., and Johanningmeier, U. 1998, *Planta*, 205, 459.
- [199] Roulin, S., and Feller, U. 1998, *Planta*, 205, 297.
- [200] Peterson, L.W., Kleinkopf, G.E., and Huffaker, R.C. 1973, *Plant Physiol.*, 51, 1042.
- [201] Wang, X., and Kollatukudy, P.E. 1996, *Plant Physiol.*, 111, 441.
- [202] Wilson, M.I., Ghosh, S., Gerhardt, K.E., Holland, N., Babu, T.S., Edelman, M., Dumbroff, E.B., and Greenberg, B.M. 1995, *Plant Physiol.*, 109, 221.

- [203] Ferreira, R.M.B., Franco, E., and Teixeira, A.R.N. 1996, *Biochem. J.*, 318, 227.
- [204] Gerhardt, K.E., Wilson, M.E., and Greenberg, B.M. 1999, *Photochem. Photobiol.*, 70, 49.
- [205] Ferreira, R.B., and Shaw, N.M. 1989, *Planta*, 179, 456.
- [206] Franco, E., Ferreira, R.B., and Teixeira, A.N. 1992, *Aust. J. Plant Physiol.*, 19, 297.
- [207] Khanna-Chopra, R., Srivalli, B., and Ahlawat, Y.S. 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 324.
- [208] Cercós, M., Carrasco, P., Granell, A., and Carbonell, J. 1992, *Physiol. Plant.*, 85, 476.
- [209] Müller-Urli, F., Parthier, B., and Nover, L. 1988, *Planta*, 176, 241.
- [210] Roloff, A., Parthier, B., and Wasternack, C. 1994, *J. Plant Physiol.*, 143, 39.
- [211] Dalling, M.J. 1987, *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*, W.W. Thomson, E.A. Nothnagel and R.C. Huffaker (Eds.), The American Society of Plant Physiologists, Rockville, 54.
- [212] Pell, E.J., and Dann, M.S. 1991, *Integrated Response of Plants to Stress*, H.A. Mooney, W.E. Winner and E.J. Pell (Eds.), Academic Press, San Diego, 189.
- [213] Lehnher, B., Grandjean, A., Mächler, F., and Fuhrer, J. 1987, *J. Plant Physiol.*, 130, 189.
- [214] Dann, M.S., and Pell, E.J. 1989, *Plant Physiol.*, 91, 427.
- [215] Pell, E.J., Eckardt, N.A., and Enyedi, A.J. 1992, *New Phytol.*, 120, 397.
- [216] Eckardt, N.A., and Pell, E.J. 1994, *New Phytol.*, 127, 741.
- [217] Brendley, B.W., and Pell, E.J. 1998, *Tree Physiol.*, 18, 81.
- [218] Mulligan, R.M., Houtz, R.L., and Tolbert, N.E. 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1513.
- [219] Khrebtukova, I., and Spreitzer, R.J. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13689.
- [220] Thow, G., Zhu, G., and Spreitzer, R.J. 1994, *Biochemistry*, 33, 5109.
- [221] Shikanai, T., Foyer, C., Dulieu, H., Parry, M.A.J., and Yokota, A. 1996, *Plant Mol. Biol.*, 31, 399.
- [222] Radetzky, R., and Zetsche, K. 1987, *Planta*, 172, 38.
- [223] Biekmann, S., and Feierabend, J. 1985, *Eur. J. Biochem.*, 152, 529.
- [224] Schmidt, G.W., and Mishkind, M.L. 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 2632.
- [225] Hess, W.R., Hübschmann, T., and Börner, T. 1993, *Endocytobiosis and Cell Res.*, 10, 65.
- [226] Davies, K.J.A. 1987, *J. Biol. Chem.*, 262, 9895.
- [227] Davies, K.J.A., Delsignore, M.E., and Liu, S.W. 1987, *J. Biol. Chem.*, 262, 9902.
- [228] Kiefer, J. 1990, *Biological Radiation Effects*, Springer-Verlag, Berlin.
- [229] Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 20313.
- [230] Peñarrubia, L., and Moreno, J. 1990, *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 319.
- [231] Casano, L.M., Lascano, H.R., and Trippi, V.S. 1994, *Plant Cell Physiol.*, 35, 145.
- [232] Lascano, H.R., Gómez, L.D., Casano, L.M., and Trippi, V.S. 1998, *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 321.
- [233] Asada, K., and Takahashi, M. 1987, *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, J.G. Scandalios (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 173.
- [234] Asada, K., and Takahashi, M. 1987, *Photoinhibition*, D.J. Kyle, C.B. Osmond, and C.J. Arntzen (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 227.
- [235] Aro, E.M., Virgin, I., and Andersson, B. 1993, *Biochim. Biophys. Acta*, 1143, 113.
- [236] Miyao, M. 1994, *Biochemistry*, 33, 9722.
- [237] Miyao, M., Ikeuchi, M., Yamamoto, N., and Ono, T. 1995, *Biochemistry*, 34, 10019.
- [238] Sonoike, K. 1996, *Plant Sci.*, 115, 157.
- [239] Casano, L.M., Gómez, L.D., Lascano, H.R., González, C.A., and Trippi, V.S. 1997, *Plant Cell Physiol.*, 38, 433.
- [240] Jakob, B., and Heber, U. 1996, *Plant Cell Physiol.*, 37, 629.
- [241] Mehta, R.A., Fawcett, T.W., Porath, D., and Mattoo, A.K. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 2810.
- [242] Landry, L.G., and Pell, E.J. 1993, *Plant Physiol.*, 101, 1355.
- [243] Desimone, M., Henke, A., and Wagner, E. 1996, *Plant Physiol.*, 111, 789.
- [244] Roulin, S., and Feller, U. 1997, *Plant Sc.*, 128, 31.
- [245] Robinson, J.M. 1988, *Physiol. Plant.*, 72, 660.
- [246] Ishida, H., Nishimori, Y., Sugisawa, M., Makimo, A., and Mae, T. 1997, *Plant Cell Physiol.*, 38, 471.
- [247] Ishida, H., Shimizu, S., Makimo, A., and Mae, T. 1998, *Planta*, 204, 305.
- [248] Ishida, H., Makino, A., and Mae, T. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 5222.
- [249] Ferreira, R.B., and Davies, D.D. 1989, *Planta*, 179, 448.
- [250] Newman, J., and Gutteridge, S. 1990, *J. Biol.*

- Chem., 265, 15154.
- [251] Ranty, B., Lorimer, J., and Gutteridge, S. 1991, *Eur. J. Biochem.*, 200, 353.
- [252] Knight, S., Anderson, I., and Brändén, C.I. 1990, *J. Mol. Biol.*, 215, 113.
- [253] García-Ferris, C., and Moreno, J. 1993, *Photosynth. Res.*, 35, 55.
- [254] Eckardt, N.A., and Pell, E.J. 1995, *Plant Physiol. Biochem.*, 33, 273.
- [255] Stadtman, E.R. 1992, *Science*, 257, 1220.
- [256] Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J., and Stadtman, E.R. 1983, *J. Biol. Chem.*, 80, 1521.
- [257] Curmi, P.M.G., Cascio, D., Sweet, R.M., Eisenberg, D., and Schreuder, H.A. 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 16980.
- [258] Schreuder, H.A., Knight, S., Curmi, P.M.G., Andersson, I., Cascio, D., Sweet, R.M., Branden, C.I., and Eisenberg, D. 1993, *Protein Sci.*, 2, 1136.
- [259] Andersson, I. 1996, *J. Mol. Biol.*, 259, 160.
- [260] Rabin, B.R., and Trown, P.W. 1964, *Nature*, 202, 1290.
- [261] Schloss, J.V., Stringer, C.D., and Hartman, F.C. 1978, *J. Biol. Chem.*, 253, 5707.
- [262] Barnard, G., Roy, H., and Myer, Y.P. 1983, *Biochemistry*, 22, 2697.
- [263] Tenaud, M., and Jacquot, J.P. 1987, *J. Plant Physiol.*, 130, 315.
- [264] Peñarrubia, L., and Moreno, J. 1987, *Biochim. Biophys. Acta*, 916, 227.
- [265] Huner, N.P.A., Carter, J.V., and Wold, F. 1982, *Z. Pflanzenphysiol.*, 106, 69.
- [266] McRae, D.G., and Thompson, J.E. 1983, *Planta*, 158, 185.
- [267] Brüggemann, W. 1995, *Plant Cell Physiol.*, 36, 733.
- [268] Huner, N.P.A., and Macdowall, F.D.H. 1978, *Can. J. Biochem.*, 56, 1154.
- [269] Huner, N.P.A., Palta, J.P., Li, P.H., and Carter, J.V. 1981, *Can. J. Biochem.*, 59, 280.
- [270] Offerman, M.K. 1984, *J. Biol. Chem.*, 259, 8886.
- [271] Moreno, J., and Spreitzer, R.J. 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 26789.
- [272] Nettleton, A.M., Bhalla, P.L., and Dalling, M.J. 1985, *J. Plant Physiol.*, 119, 35.
- [273] Otto, S., and Feierabend, J. 1994, *J. Plant Physiol.*, 144, 26.
- [274] Mae, T., Kamei, C., Funaki, K., Miyadai, K., Makino, A., Ohira, K., and Ojima, K. 1989, *Plant Cell Physiol.*, 30, 193.
- [275] Miyadai, K., Mae, T., Makino, A., and Ojima, K. 1990, *Plant Physiol.*, 92, 1215.
- [276] Stieger, P.A., and Feller, U. 1997, *J. Exp. Bot.*, 48, 1639.
- [277] Stadtman, E.R. 1993, *Annu. Rev. Biochem.*, 62, 797.
- [278] Buchanan, B.B. 1980, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, 341.
- [279] Nalin, C.M., and McCarty, R.E. 1984, *J. Biol. Chem.*, 259, 7275.
- [280] Ketcham, S.R., Davenport, J.W., Warncke, K., and McCarty, R.E. 1984, *J. Biol. Chem.*, 259, 7286.
- [281] Tanaka, S., and Wada, K. 1988, *Photosynth. Res.*, 17, 255.
- [282] Danon, A., and Mayfield, S.P. 1994, *Science*, 266, 1717.
- [283] Schmidt, A., and Krämer, E. 1984, *Advances in Photosynthesis Research*, Vol. III, C. Sybesma (Ed.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, 525.

Biologia funcional

Textos de apoio

Fotossíntese

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

FOTOSSÍNTESE

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

FOTOSSÍNTESE

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Ricardo B. Ferreira
Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

I - INTRODUÇÃO

A fotossíntese consiste, essencialmente, na conversão endergónica de substratos oxidados, de baixa energia, em produtos reduzidos, ricos em energia livre. A modificação do estado energético da matéria no sentido do aumento da sua energia livre ($\Delta G > 0$) exige, de acordo com as leis da termodinâmica, um fornecimento de energia. A fonte permanente de energia utilizada pelos organismos fotossintéticos é a luz solar.

A energia solar atinge o nosso planeta sob a forma de radiação electromagnética, a qual não é directamente utilizável pela célula viva na promoção das suas reacções endergónicas. Para que tal aconteça, a energia luminosa tem de ser convertida em energia química, um processo de "transdução" de energia que não é realizado por qualquer célula viva. Só as células referidas por fotossintéticas têm a capacidade de absorver e de canalizar a energia luminosa no sentido desta poder ser utilizada como força motriz de reacções químicas termodinamicamente desfavoráveis. Esta faculdade é conferida pela presença, nas referidas células, de estruturas membranosas, altamente organizadas e especializadas, às quais estão associados certos tipos de pigmentos; estas estruturas constituem, no seu conjunto, o denominado "aparelho fotossintético". Estes sistemas permitem a captação da energia do espectro visível da radiação electromagnética - a chamada "radiação fotossinteticamente activa", frequentemente referida por PAR (do inglês, "photosynthetic active radiation"), a qual abrange, em termos gerais, comprimentos de onda entre 400 e 700 nm - e a sua conversão em energia química na forma de ATP e de NADPH.

O potencial assimilatório (energia na forma de ATP e potencial redutor na forma do NADPH), obtido através das reacções fotoquímicas da fotossíntese, é utilizado pelas plantas verdes na assimilação do CO_2 e de

outros compostos inorgânicos como, por exemplo, o azoto e o enxofre.

A energia da radiação solar que atinge as camadas superiores da atmosfera é da ordem de $5,2 \times 10^{24}$ joules (J) por ano, valor este calculado a partir da "constante solar" cujo valor médio padrão é de $4781 \text{ KJ.m}^{-2} \cdot \text{hora}^{-1}$. Apenas uma porção desta energia (cerca de 50%) chega à superfície da Terra e desta só cerca de 30% vai incidir sobre as plantas. Mas nem toda a energia luminosa que incide sobre as plantas é utilizada na fotossíntese pois só cerca de 50% dessa radiação é fotossinteticamente activa*. Considerando que uma porção desta radiação ainda é reflectida pelas folhas e que nem todos os fotões absorvidos pelos pigmentos fotossintéticos são utilizados nas reacções fotoquímicas, estima-se que apenas 1 a 2% de energia que incide sobre as plantas é utilizada na fotossíntese.

A produção primária total estima-se em cerca de 2×10^{11} t de matéria orgânica por ano, isto é, a energia "capturada" nas moléculas orgânicas é da ordem de 3×10^{18} J/ano, o que corresponde a cerca de 0,1% da radiação fotossinteticamente activa que chega à superfície da Terra. Pouco menos de metade desta produção fotossintética tem lugar em organismos aquáticos.

* Tomando em consideração a absorção de luz ultravioleta pela camada de ozono e da luz infra-vermelha pelo CO₂ e pelo vapor de água, a distribuição do espectro da radiação solar à superfície da terra tem a seguinte composição aproximada: 2 a 5% de luz ultravioleta, 45 a 55% de luz visível e 40 a 53% de luz infra-vermelha.

FOTOSSÍNTESE

CAPÍTULO II

REACÇÕES FOTOQUÍMICAS

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

II. REACÇÕES FOTOQUÍMICAS

PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

O processo fotossintético envolve um certo número de acontecimentos fundamentais, o primeiro dos quais é a absorção da luz. A capacidade exibida pelos organismos fotossintéticos de absorver a energia luminosa, é conferida pela presença de pigmentos fotossensibilizáveis específicos. Estes pigmentos estão sempre associados a complexos de proteína localizados nas membranas lipoproteicas que constituem o aparelho fotossintético. O grau de complexidade deste sistema membranoso varia com o estado de evolução do ser, sendo mais elaborado nos eucariotas (onde se encontra em organelos altamente especializados denominados cloroplastos) do que nos procariotas. Três grandes grupos de pigmentos podem participar na fotossíntese: os pigmentos clorofilinos, os carotenóides e as ficobilinas.

PIGMENTOS CLOROFILINOS

Os pigmentos clorofilinos (clorofilas e bacterioclorofilas) são os pigmentos fundamentais de todos os organismos fotossintéticos. Porém, das diferentes formas químicas de pigmentos clorofilinos (clorofilas a, b, c e d ou bacterioclorofilas a, b, c e d) apenas a forma a participa na promoção do acto fotoquímico primário, isto é, na emissão de electrões energéticos que vão reduzir o NADP⁺ a NADPH originando, no seu percurso, a síntese de ATP a partir de ADP e de fosfato inorgânico (Pi). Por tal razão, a clorofila a (e a bacterioclorofila a) é considerado o "pigmento primário ou fundamental" da fotossíntese. Todos os outros pigmentos (clorofilas b, c e d, carotenóides e ficobilinas) quando fotossensibilizados transferem a sua energia de excitação para a clorofila

a, sendo designados "pigmentos acessórios" (Tabela II.1).

Tabela II.1 - Pigmentos dos organismos fotossintéticos. Os pigmentos primários participam directamente no acto fotoquímico, os acessórios actuando apenas na captação de energia luminosa.

| Organismo | Pigmento primário | Pigmentos acessórios |
|---------------------------------------|-------------------|--|
| EUCARIOTAS | | |
| Plantas superiores e algas verdes | clor <u>a</u> | clor <u>b</u> / carotenóides |
| Algas castanhas | clor <u>a</u> | clor <u>c</u> / carotenóides |
| Algas vermelhas | clor <u>a</u> | clor <u>d</u> / ficobilinas |
| PROCARIOTAS | | |
| Bactérias purpúreas | baclor <u>a</u> | baclor <u>b</u> /carotenóides |
| Bactérias sulfurosas verdes | baclor <u>a</u> | baclor <u>c, d e e</u> Carotenóides |
| Cianobactérias (algas verde-azuladas) | clor <u>a</u> | ficobilinas |

Do ponto de vista químico, os pigmentos clorofilinos diferem entre si no tipo de certo número de radicais que se ligam ao anel tetrapirrólico (porfirínico) e no número de duplas ligações (ver Fig. II.1).

Embora, em rigor, as clorofilas absorvam luz em todos os comprimentos de onde do espectro visível, a absorção é muito reduzida na região do verde (entre 500 e 580 nm), exibindo máximos nas regiões do azul violeta e do vermelho. Mais precisamente, quando dissolvidas em éter, a clorofila a tem picos de absorção a 440 e a 660 nm e a clorofila b a 450 e a 640 nm (Fig. II.2).

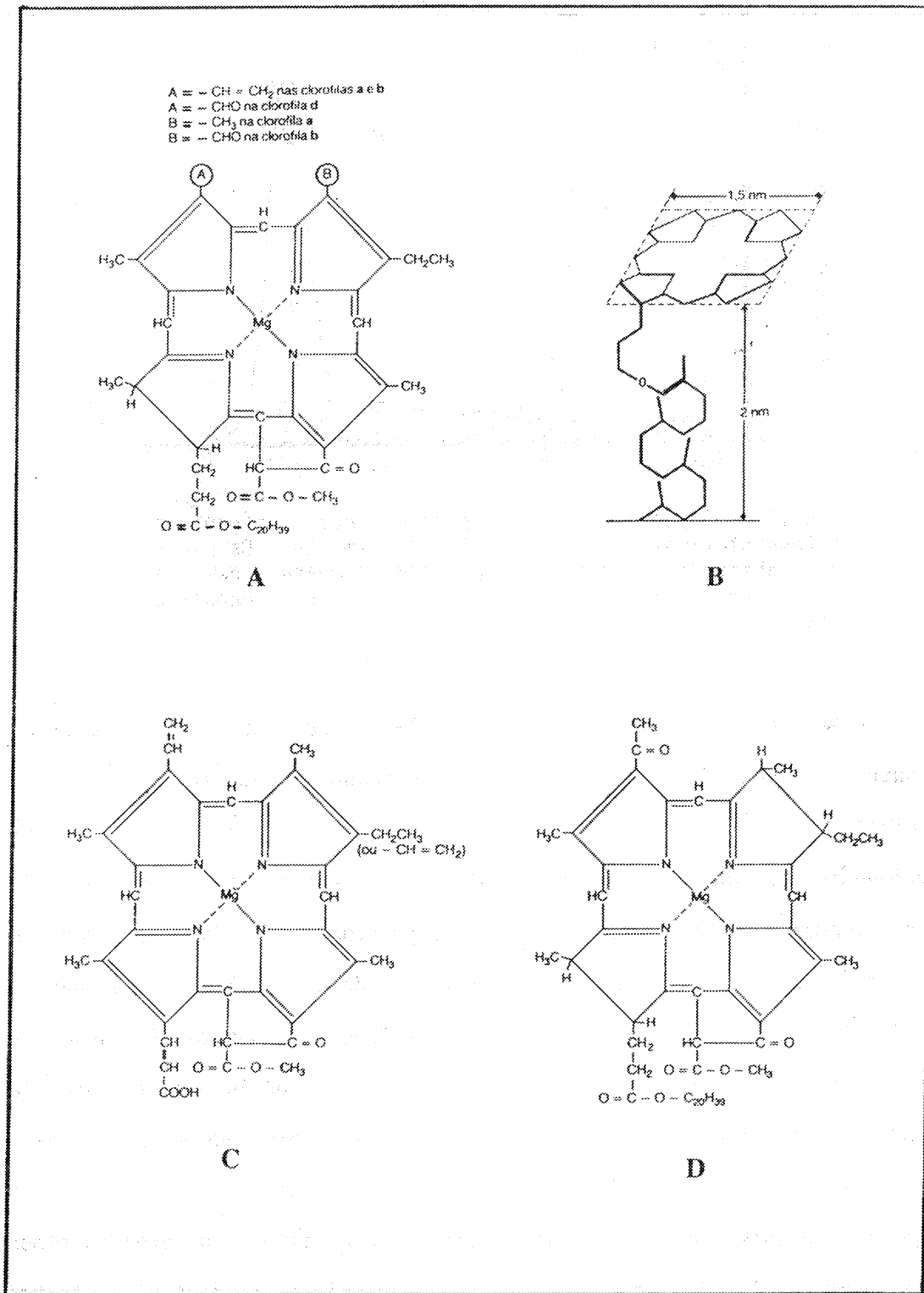


Fig.11.1A) Estrutura das moléculas de clorofila a, b e d. B) Esquema da molécula de clorofila a mostrando o plano do anel porfirínico perpendicular ao plano da molécula de fitol. C) Estrutura da molécula de clorofila c. D) Estrutura da molécula de bacterioclorofila a.

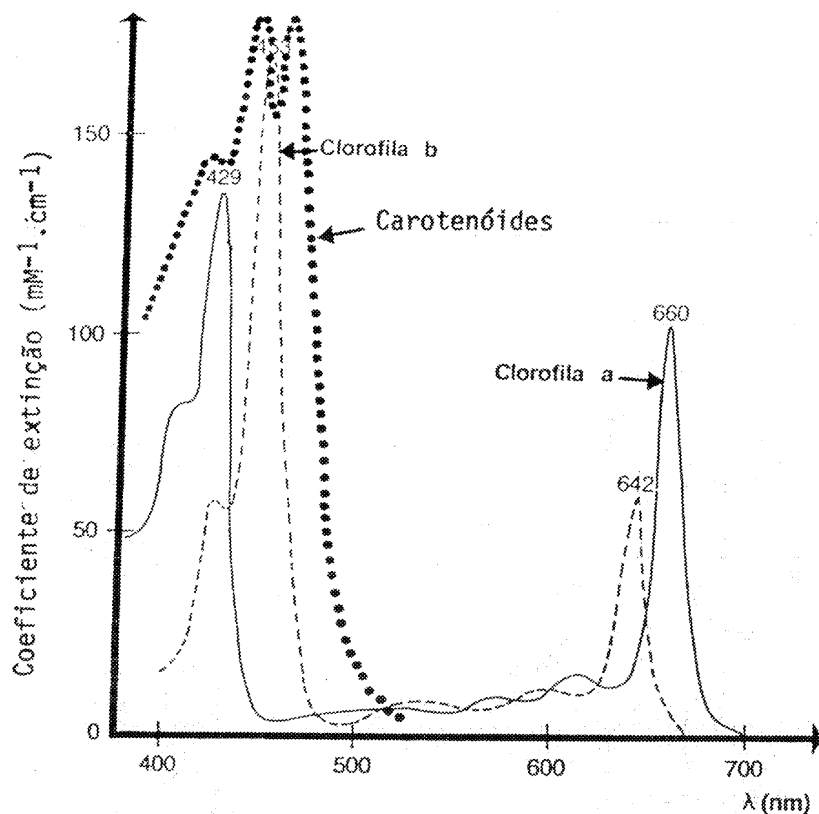


Fig.II.2- Espectros de absorção dos pigmentos fotossintéticos quando solubilizados em éter. Os picos de absorção podem variar ligeiramente com a polaridade do meio em que os pigmentos se encontram dissolvidos.

Nas condições *in vivo* as clorofilas estão associadas a proteínas (e outras moléculas), constituindo os chamados "complexos clorofila-proteína", o que provoca um deslocamento dos picos de absorção para comprimentos de onda mais longos. Quando as características de absorção são examinadas *in vivo*, isto é, com os pigmentos integrados nas membranas tilacóides, não só o espectro de absorção da clorofila se estende a comprimentos de onda em que as soluções diluídas do pigmento não absorvem mas ainda se observa um maior número de bandas de absorção para a clorofila a, que se distribuem entre 660 e 720 nm. Esta diversidade é atribuída a interações entre a clorofila e a proteína e lípidos da membrana dando origem a diferentes formas físicas de clorofila a (isto é diferentes tipos de agregados clorofila-proteína) e não à existência de distintas formas químicas de clorofila a. Das diferentes formas de clorofila a detectadas,

as mais abundantes nas plantas superiores exibem picos de absorção a 662, 670, 677 e 684 nm.

CAROTENÓIDES E FICOBILINAS

Os carotenóides constituem um grupo de pigmentos muito diversificados, de ocorrência frequente tanto no reino vegetal como no reino animal, onde desempenham funções várias, por vezes mal esclarecidas. Encontram-se associados aos pigmentos clorofilinos, em praticamente todos os organismos fotossintéticos, ampliando a gama de comprimentos de onda da luz visível utilizável na fotossíntese. Uma outra função dos carotenóides é a de proteger a clorofila da fotoxidação que pode ocorrer quando as intensidades luminosas são elevadas.

Os carotenóides são hidrocarbonetos isoméricos formados por uma cadeia central isoprénica com duplas ligações conjugadas e dois anéis ionónicos terminais. Quando constituídos exclusivamente por carbono e hidrogénio denominam-se carotenos; quando possuem um ou mais átomos de oxigénio nas suas moléculas são designados xantofilas.

Os principais carotenóides presentes nos tecidos verdes são o β -caroteno, a luteína, a violaxantina e a neoxantina. Nos cloroplastos das plantas superiores, as xantofilas são mais abundantes que os carotenos, a luteína podendo constituir quase 50% dos carotenóides totais.

A acção fitotóxica de certos herbicidas (por exemplo, as piridazinonas) resulta da sua acção inibidora da síntese dos carotenóides; na ausência destes, as clorofilas são destruídas por fotoxidação.

A designação de ficobilinas engloba três grupos de pigmentos acessórios (ficocianinas, ficoeritrinas e alo-ficocianinas), presentes nas algas vermelhas e nas cianobactérias. Estes organismos, em contraste com as plantas superiores e as algas verdes, exibem bandas de absorção que

cobrem de maneira apreciável a região do verde (entre 498 e 600 nm), o que permite que alguns deles vivam em regiões profundas dos oceanos não atingidas pela luz vermelha.

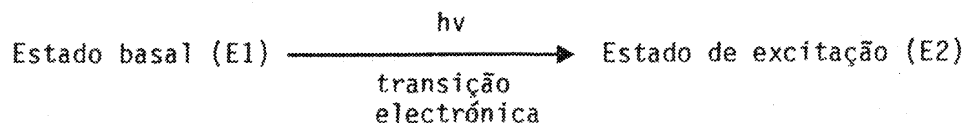
ABSORÇÃO, TRANSFERENCIA E DISSIPACÃO DA ENERGIA LUMINOSA

Para pôr fim ao conflito gerado em torno dos modelos ondulatório e corpuscular da radiação electromagnética, muito contribuíram os trabalhos de Planck. Os dois conceitos foram, de certo modo, compatibilizados pela proposta de que a luz se comporta como pequenas partículas (ditas "virtuais" por não possuírem massa quando em repouso) indivisíveis denominadas fotões. A quantidade de energia possuída por um fotão denomina-se quantum (ou quanta), a qual varia inversamente com o comprimento de onda da luz.

ABSORÇÃO DA LUZ E EXCITAÇÃO ELECTRÓNICA

Em termos simplistas pode dizer-se que a luz tem características ondulatórias quando se propaga através do espaço, assumindo a sua natureza corpuscular quando interacciona com a matéria podendo, então, promover reacções fotoquímicas. Segundo o "princípio de equivalência fotoquímica" (lei de Stark-Einstein) um quantum, quando absorvido por uma substância só pode activar, no máximo, uma molécula (ou átomo) dessa substância, independentemente da energia do quantum. Por outro lado, os processos de absorção da luz são sempre "quantizados", isto é, a energia de um fotão, sendo indivisível, só pode ser capturada na sua totalidade, o que implica que só possa ser utilizada quando o seu valor for exactamente igual ao da energia requerida pela transição electrónica que tem lugar na molécula absorvente. Por outras palavras, as transições moleculares provocadas pela

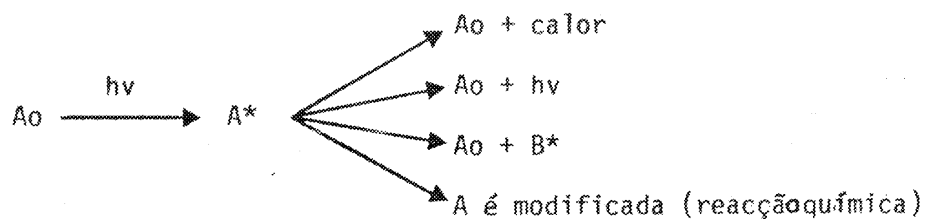
luz envolvem um "salto" ou transição de electrões de orbitais de menor energia (E_1) para orbitais mais energéticas (E_2); esta transição só ocorre se a energia do quantum ($h\nu$) for igual a $E_2 - E_1$:



$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$$

DISSIPACÃO E MIGRAÇÃO DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO

O estado de excitação electrónica é, normalmente, muito instável. O tempo de excitação (tempo médio que uma população de moléculas leva a retomar o seu estado basal (não excitado) é muito curto, frequentemente da ordem de 10^{-12} a 10^{-5} segundos. Mas o processo de desexcitação pode ter lugar através de diferentes mecanismos: quando os electrões "energizados" retomam os seus níveis de energia normais, isto é, quando a molécula excitada retorna ao seu estado basal, a energia de excitação pode ser dissipada por libertação de calor ou pela emissão de radiação, pode ser transferida a outra molécula que é, por sua vez, excitada ou pode ser utilizada na promoção duma reacção química:



É frequente uma molécula poder atingir, por excitação, diferentes níveis de energia consoante a energia do fotão. Quanto mais

elevado for o nível de energia atingido pela molécula, maior a sua instabilidade e menor o seu tempo de excitação. Quando o tempo médio do estado excitado é da ordem de 10^{-12} a 10^{-11} s, a molécula passa muito rapidamente a um estado intermédio de energia, libertando calor; este estado intermédio é, normalmente, o estado de excitação de mais baixa energia que a molécula pode alcançar. Só quando a molécula permanece excitada durante tempos superiores a 10^{-9} s, pode o processo de desexcitação dar origem a outros fenómenos, distintos da libertação de calor.

Quando a molécula dissipa a energia de excitação por emissão de radiação (fluorescência) o comprimento de onda da radiação emitida é sempre superior ao da radiação absorvida. Isto é, o espectro de fluorescência vem deslocado para o lado do vermelho, relativamente ao espectro de absorção (fenómeno conhecido por "desvio de Stokes").

A molécula excitada pode transferir a energia que excede a do estado basal a uma outra molécula. Esta transferência de energia processa-se através dum mecanismo particulae, complexo e não totalmente esclarecido, que se denomina "ressonância indutiva". A transferência de energia por ressonância indutiva só pode ocorrer quando as moléculas envolvidas no processo satisfazem certo número de requisitos, entre os quais se destacam: as moléculas têm de estar a uma distância adequada umas das outras (5 a 10 nm) e os seus espectros de absorção têm de se sobrepor, pelo menos parcialmente.

A energia da molécula excitada pode promover uma reacção química. As reacções fotoquímicas podem alterar as moléculas que nelas participam em maior ou menor extensão, consoante a energia dos fotões. Porém, a luz visível só actua ao nível dos electrões não conduzindo, normalmente, a alterações profundas na estrutura das moléculas. Na fotossíntese, as moléculas de pigmentos promovem, quando excitadas, a emissão de electrões

a partir de moléculas especiais de clorofila a constituintes dos chamados "centros de reacção". Isto é, as alterações químicas promovidas pela luz, que vão dar origem ao início da fotossíntese, envolvem essencialmente reacções de oxidação-redução.

ABSORÇÃO DA LUZ PELAS MOLECULAS DE CLOROFILA

Por acção da luz, a molécula de clorofila a pode alcançar diferentes níveis de energia (Fig.II.3).

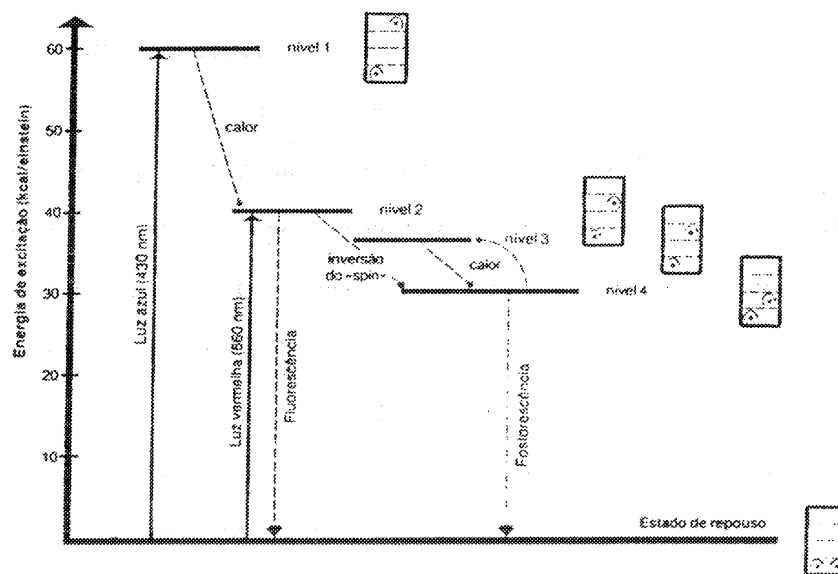


Fig.II.3- Níveis de energia correspondentes a diferentes estados de excitação da clorofila a.

A absorção de um quantum de luz azul conduz a um estado de excitação (designado "segundo estado singlete de excitação") mais energético do que o resultante da absorção de um quantum de luz vermelha

(primeiro estado singlete de excitação). Todavia, a luz vermelha, embora mais energética, não é mais eficiente na promoção da fotossíntese porque a molécula de clorofila a permanece muito pouco tempo (cerca de 10^{-11} s) no segundo estado singlete de excitação; quando passar ao primeiro estado de excitação, menos instável, liberta a energia extra sob a forma de calor. Isto é, quando a molécula de clorofila absorve luz azul, sofre sempre um processo de "relaxação" passando rapidamente ao estado de excitação de mais baixa energia antes de participar no acto fotoquímico. Isto equivale a dizer que os quanta de luz azul têm a mesma eficácia dos quanta de luz vermelha na promoção das reacções fotoquímicas da fotossíntese.

Um electrão no estado singlete de excitação pode inverter o seu "spín" passando a um estado triplete de excitação, perdendo alguma energia (sob a forma de calor) no processo dado que a inversão do "spín" envolve sempre qualquer tipo de interacção com o meio ambiente.

As moléculas permanecem excitadas durante mais tempo nos estados tripletos do que nos correspondentes estados singlete (dada a inversão do spín ter uma baixa probabilidade de ocorrência) o que confere mais reactividade aos tripletos. Porém, nas condições in vivo, a concentração de tripletos de clorofila é negligível. Nos cloroplastos, a transferência de energia entre moléculas de pigmentos e a sua utilização no acto fotoquímico (processos que envolvem estados singletos de excitação) processam-se a taxas muito mais rápidas do que a taxa de passagem dos estados singlete a triplete. Nas condições in vivo, as reacções fotoquímicas competem eficazmente quer com a formação de tripletos quer com a emissão de fluorescência. Uma fotossíntese eficiente exige que o aparelho fotossintético esteja organizado de maneira a que a transferência de energia por ressonância se realize com alto rendimento, assegurando que uma quantidade máxima da energia recebida seja canalizada para as reacções fotoquímicas.

CADEIA FOTOSSINTÉTICA DE TRANSPORTE DE ELECTROES

UNIDADES FOTOSSINTÉTICAS E FOTOSSISTEMAS

Cada acto fotoquímico (emissão de um electrão) é realizado por um grupo de moléculas de clorofila e de outros pigmentos (por vezes denominados "pigmentos antena") que captam e transferem a energia de um fotão até ao "centro de reacção" (uma forma física especial de clorofila a) que lhes está associado, promovendo neste a libertação de um electrão. Este conjunto de pigmentos captadores de luz e respectivo centro de reacção tem a designação genérica de "unidade fotossintética".

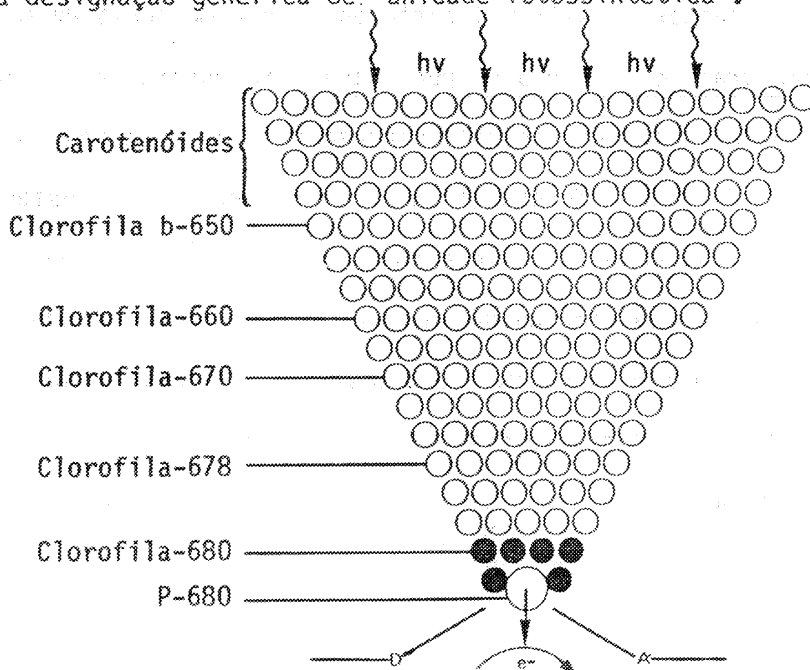
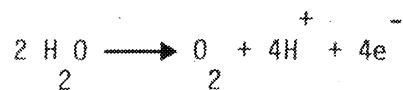


Fig.II.4- Representação esquemática de uma unidade fotossintética.

O conceito de unidade fotossintética desenvolveu-se, nos anos 30, a partir dos estudos de Emerson e Arnold sobre a produção ou eficiência quântica (produção de $\frac{1}{2}$ O_2 por fotão absorvido) de algas verdes. Estes trabalhos mostraram que a libertação de uma molécula de $\frac{1}{2}$ O_2 envolve a absorção da energia de 8 fotões por cerca de 2400 moléculas de clorofila.

Foi então sugerida a cooperação de 2400 moléculas de clorofila numa mesma "unidade" libertadora de O_2 , de maneira que 8 quanta absorvidos por quaisquer moléculas pertencentes ao conjunto das 2400 clorofilas podem, colectivamente, promover a libertação de 1 molécula de O_2 , $4e^-$ e $4H^+$ a partir de 2 moléculas de água:

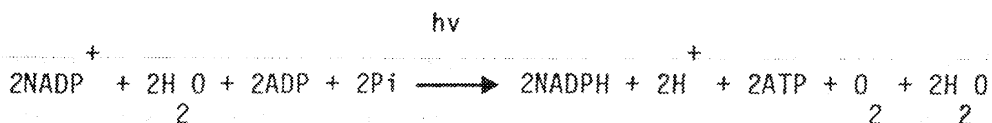


Foi a este conjunto de clorofilas que foi dada a designação de unidade fotossintética. Mas, como se verificou mais tarde, neste processo participam dois fotossistemas (fotossistema I e fotossistema II) cada um deles constituído por pigmentos captadores de luz (pigmentos antena) e respectivo centro colector. Assim a libertação de uma molécula de O_2 está associada à captura de 4 fotões por cada fotossistema. Embora, usualmente, o conceito de unidade fotossintética se associe aos complexos clorofila-proteína de cada fotossistema, alguns autores consideram a unidade fotossintética como o complexo funcional constituído pelos dois fotossistemas (o que faz sentido na medida em que a energia captada por um dos fotossistemas pode ser parcialmente transferida a outro fotossistema, fenómeno conhecido por "spill-over", o que implica não serem os dois fotossistemas totalmente distintos do ponto de vista funcional).

NECESSIDADE DE DOIS ACTOS FOTOQUÍMICOS NA FOTOSSÍNTESE OXIGÉNICA

A reacção fotoquímica global característica da fotossíntese oxigénica (que utiliza a H_2O como fonte de electrões, libertando O_2 no processo) resulta de uma sequência não-cíclica de reacções que conduz à formação de ATP, de NADPH - o potencial assimilatório utilizado na fixação

do CO_2 e de outros compostos inorgânicos em compostos orgânicos:



As plantas precisam, no mínimo, de 4 quanta por cada molécula de NADP^+ reduzida e de 8 quanta por molécula de O_2 libertada. Estes requisitos são satisfeitos por dois centros de reacção (P_{680} e P_{700}) associados a dois fotossistemas distintos (PSI e PSII) ligados, em série, por uma cadeia de transporte de electrões (ver Fig. II.5).

A necessidade da cooperação de dois actos fotoquímicos, promovidos por dois fotossistemas, foi posta em evidência, nos anos 40, em resultados dos trabalhos de Emerson e colaboradores. A observação de que a eficiência quântica da fotossíntese desce abruptamente quando o tecido fotossintético é iluminado com luz de comprimento de onda na região do vermelho longínquo (ligeiramente acima de 680 nm) - a chamada "queda no vermelho" - foi inesperada em virtude de ter lugar dentro da banda de absorção da clorofila a. Investigações subsequentes mostraram que a aplicação simultânea de luz vermelha ineficiente ($\lambda > 680$ nm) e de luz de comprimento de onda mais curto dava origem a uma taxa fotossintética superior à soma das taxas correspondentes a cada um dos feixes luminosos quando aplicados separadamente. Este efeito sinérgico, conhecido por "efeito cumulativo de Emerson", resulta da necessidade de ambos os fotossistemas serem igualmente excitados para que a eficiência fotossintética seja elevada, o que não é assegurado pela aplicação dum único comprimento de onda dado os fotossistemas terem diferente composição em pigmentos. Ambas as reacções fotoquímicas, uma promovida pelo PSI e a outra pelo PSII, são necessárias para reduzir o NADP^+ pelos electrões libertados da H_2O . Quando a luz tem comprimentos de onda que são

absorvidos apenas, ou predominantemente, pelos pigmentos do PSI, como acontece com a luz vermelho longínqua, diminui a eficiência da conversão da energia. Esta luz pode ser absorvida pelo PSI (que contém as formas de clor. a que absorvem os comprimentos de onda mais longos) mas não pelo PSII (que contém as formas de clor a que absorvem os menores comprimentos de onda e a maior parte da clor b e dos carotenóides).

TRANSPORTE DE ELECTROES, FOTOFOSFORILAÇÃO E FOTORREDUÇÃO

Os electrões "energetizados" emitidos pelos centros de reacção vão percorrer uma cadeia de transporte de electrões, percurso este que vai permitir a síntese de ATP (fotofosforilação) e a redução do NADP⁺ (fotorredução).

Os componentes da cadeia de transporte de electrões têm um arranjo anisotrópico no interior da membrana tilacóide, isto é, as reacções que se desenrolam na membrana são processos vectoriais.

CADEIA DE TRANSPORTE DE ELECTROES

Em 1960, Hill e Bendall elaboraram uma representação esquemática da cadeia de transporte de electrões, na qual os fotossistemas (dispostos em série) e os transportadores secundários estão ordenados de acordo com os seus potenciais redox. Este modelo, conhecido por esquema em Z, mantém-se actual nas suas linhas gerais; a Fig. II.5 ilustra a sua versão actualizada.

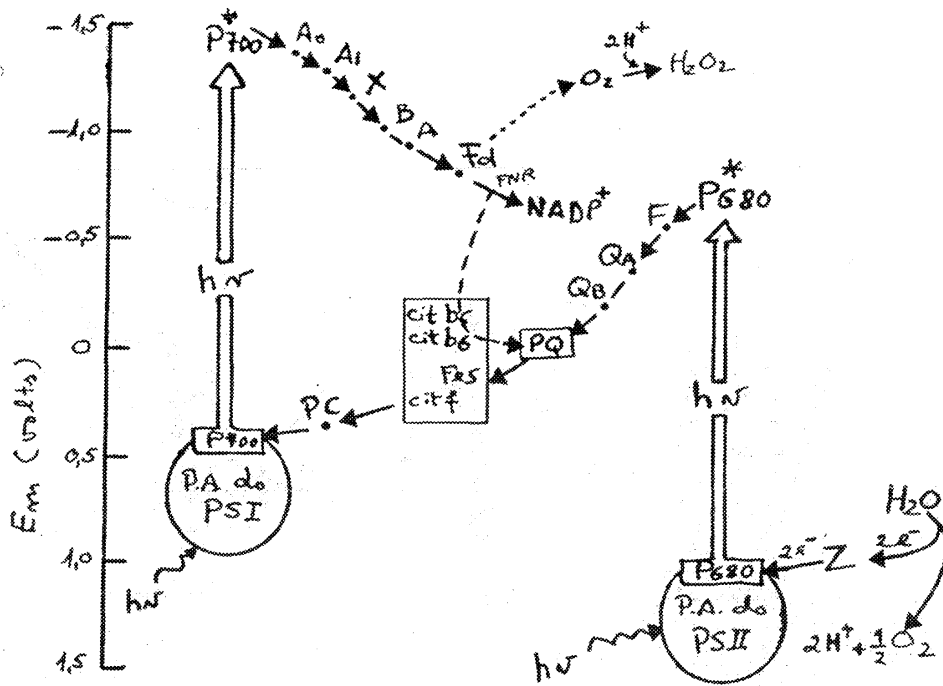


Fig.II.5- Esquema em Z do transporte fotossintético de electrões. PA, pigmentos antena; F, feofitina (clorofila a desprovida de Mg; QA e QB, semi-quinonas; PQ, plastoquinona; Fe-S, ferrosulfoproteína de Rieske; b, citocromo b563; f, citocromo f; PC, plastocianina; A₀ e A₁, moléculas especiais de clor a; F_x, F_b e F_a, ferrossulfoproteínas do tipo da ferredoxina; F_d, ferredoxina; FNR, ferredoxina-NADP⁺ redutase; P700 e P680, centros de reacção do PSI e do PSII, respectivamente.

A organização dos complexos proteicos e suas relações espaciais nas membranas tilacóides só agora começam a ser compreendidas. O recente isolamento de complexos activos permitiu concluir que a maioria dos componentes da cadeia está organizada em três complexos supramoleculares, cada um deles estendendo-se através de toda a membrana, designados: complexo PSII, complexo citocromos b-f e complexo PSI (Fig.II.6).

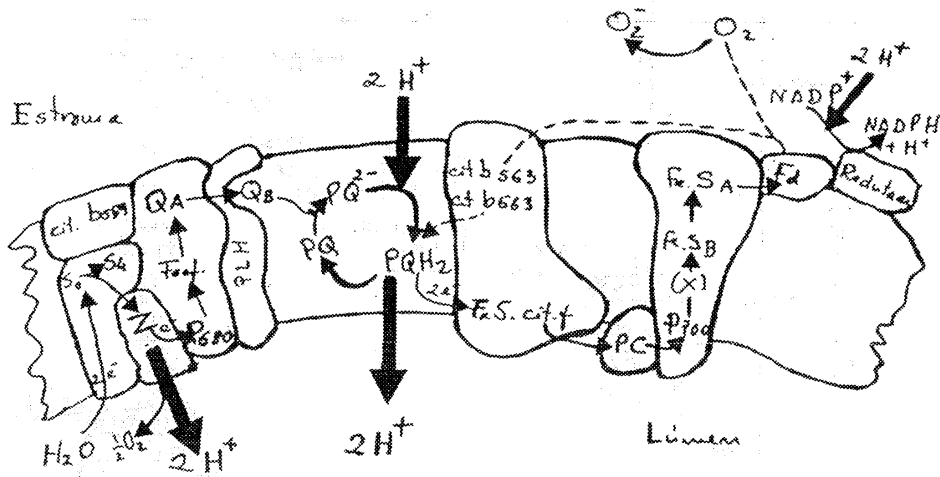


Fig.II.6- Sequência do transporte de electrões nas membranas tilacóides ilustrativa das principais relações entre os complexos proteicos supramoleculares e outros componentes da cadeia.

Estes três complexos não interactivam directamente entre si mas através de outras moléculas transportadoras de electrões. A plastoquinona (PQ) liga o complexo PSII ao complexo cit b-f e a plastocianina (PC) liga o complexo cit b-f ao complexo PSI. A ferredoxina medeia a transferência de electrões do complexo PSI à ferredoxina-NADP⁺ redutase (que se encontra na face da membrana do lado do estroma) e, possivelmente, ao complexo cit b-f no transporte cíclico de electrões. A "pool" de plastoquinona abrange toda a largura da membrana e transfere electrões do aceitador primário do PSII (Q) à ferrosulfoproteína de Rieske (Fe-S) que faz parte do complexo cit b-f. As moléculas de plastoquinona, cujo teor é mais elevado que o de qualquer outro componente da cadeia, exibem alta mobilidade na plano lateral da membrana, transferindo rapidamente protões através da membrana (do estroma para o lúmen do tilacoíde), simultaneamente com o transporte de electrões. Desta maneira, as cadeias de transporte de electrões funcionam

como "pontes" que atravessam toda a membrana tilacoide, permitindo que os electrões "extraídos" da água (no lado do lúmen do tilacoide) passem, ao longo da espessura da membrana, a ferredoxina (que se encontra na face da membrana do lado do estroma) As moléculas de PQ depois de reduzidas pelos electrões (PQ⁻) ligam-se a protões provenientes do estroma (PQH⁺); estes são transportados para o lado do lúmen (onde são libertados) e os electrões transferidos à ferrosulfoproteína de Rieske, ficando a plastoquinona oxidada. Isto é, o transporte de electrões está acoplado a um "ciclo da plastoquinona" que "bombeia" protões do estroma para o interior do tilacoide no sentido inverso ao do transporte de electrões, aumentando a concentração de H⁺ no lúmen do tilacoide e contribuindo, assim, para o estabelecimento do gradiente de pH que, de acordo com a teoria quimiosmótica, gera a força motriz que vai ser utilizada na síntese de ATP.

Complexo PSII - A energia absorvida pelos pigmentos antena do PSII é transferida ao respectivo centro de reacção (P₆₈₀) induzindo neste a emissão de um electrão que vai ser recebido por um aceitador intermediário, a feofitina a (molécula de clorofila desprovida de Mg). Da feofitina, os electrões são rapidamente transferidos ao primeiro aceitador "estável" dos electrões do P₆₈₀, designado por Q_A que, tal como Q_B, é uma molécula especial de plastoquinona (plastosemi-quinona). Q_A e Q_B, quando reduzidas, transferem os electrões para a "pool" de plastoquinona.

Muitos herbicidas utilizados em agricultura actuam por inibição de reacções primárias da fotossíntese. Exemplos típicos são certos compostos derivados da ureia (como o diuron) e a atrazina. A acção inibitória destes herbicidas resulta da sua ligação ao centro Q_B do complexo PSII, interrompendo o transporte de electrões na cadeia.

Complexo citocromo b-f - É um complexo proteico integral constituído por um polipéptido de citocromo f, um polipéptido contendo dois citocromos b (b₆) e pela ferrosulfoproteína de Rieske.
6 563

Complexo PSI - Os electrões excitados do centro de reacção do PSI (P₇₀₀) são transferidos à "pool" de ferredoxina através duma série de transportadores: Ao, A1 (formas especiais de clorofila a), FX, FB e FA (ferrosulfoproteínas do tipo da ferredoxina). O centro FA reduzido transfere os electrões à "pool" de ferredoxina; esta, que não é considerada componente do complexo PSI, é por vezes denominada "ferredoxina solúvel" por se encontrar frouxamente ligada à membrana tilacóide (ao contrário do que acontece com as ferredoxinas Fx, FA e FB, que estão fortemente ligadas à membrana).

Da ferredoxina, os electrões são transferidos ao NADP⁺ por acção da enzima ferredoxina-NADP⁺ redutase que se localiza na face do tilacóide voltada para o estroma. Esta enzima também pode reciclar os electrões da ferredoxina reduzida para a "pool" de plastoquinona (via citocromo b₅₅₉), dando assim origem a um fluxo cíclico de electrões em torno do PSI (ver Figs II.5 e II.6).

Fluxos Cíclico e Pseudo-Cíclico de Electrões - O transporte de electrões da água ao NADP⁺ denomina-se fluxo não-cíclico ou acíclico de electrões. Mas o PSI pode mediar um transporte cíclico de electrões no qual participa o complexo cit b-f. No fluxo cíclico, a Fd reduzida transfere electrões à "pool" de PQ, via cit b₅₅₆, e não ao NADP⁺ (ver Figs. II.5 e II.6). Das moléculas de PQ, os electrões seguem para o P₇₀₀ através do complexo cit b-f e da PC. Desta maneira, o transporte cíclico funciona em circuito fechado; não reduz o NADP⁺ mas permite a

síntese de ATP.

Pensa-se que o fluxo cíclico é regulado pela razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, isto é, que só opera a uma taxa significativa quando a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ desce abaixo de determinado valor crítico. Nas situações em que o fluxo acíclico não gere ATP em quantidades suficientes para satisfazer a assimilação do CO_2 e outras necessidades energéticas do cloroplasto, então a insuficiência de ATP vai limitar a taxa a que se oxida o NADPH. Nestas condições, o NADPH tende a acumular-se com a consequente diminuição do teor de NADP^+ . Não havendo NADP^+ para aceitar os electrões, estes são desviados para a via cíclica (e pseudo-cíclica), o que permite um aumento dos níveis de ATP sem formação de NADPH.

Mehler observou, no princípio dos anos 50, que a iluminação de tilacóides isolados conduz a uma lenta redução do O_2 quando o meio de incubação se encontra desprovido de qualquer substância aceitadora de electrões. Esta reacção, na qual o O_2 é simultaneamente libertado e consumido em resultado de acções promovidas pela cadeia de transporte de electrões, é conhecida por "reacção de Mehler" e está associada ao chamado fluxo pseudocíclico de electrões (ver Fig.II.5). Este fluxo é facilmente demonstrado, em cloroplastos isolados, por adição de determinados aceptadores artificiais de electrões como, por exemplo, o metil-viologénio. Este composto é reduzido pelos electrões provenientes das ferredoxinas do complexo PSI, mas transfere rapidamente os equivalentes redutores ao O_2 , dando origem à formação do radical superóxido (O_2^-), o qual é convertido em H_2O_2 por acção da superóxido dismutase, uma enzima abundante no cloroplasto.

A reacção de Mehler produz, além de H_2O_2 , um certo número de radicais de oxigénio altamente tóxicos. Em condições normais, a célula possui mecanismos que permitem anular os efeitos de tais substâncias. Mas

quando a reacção de Mehler é activada pela presença de metil-viologénio, os referidos radicais vão oxidar vários componentes da membrana, tais como pigmentos e lípidos, danificando a célula. É nesta base que se fundamenta a utilização do metil-viologénio (comercialmente conhecido por "Paraquat") como herbicida.

Embora o NADP^+ tenha uma afinidade para os electrões muito maior que o O_2 , a fotorredução directa do O_2 pela cadeia de transporte de electrões é inevitável nos organismos cuja fotossíntese é oxigénica. O O_2 libertado na fotossíntese acabará por competir com o NADP^+ em relação aos equivalentes redutores, o transporte para o O_2 sendo estimulado quando a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ é baixa. Foi sugerido que o transporte pseudo-cíclico, na medida em que permite o fluxo de electrões a partir da água, estabiliza os potenciais redox dos transportadores da cadeia de maneira a permitir a ocorrência do fluxo cíclico. Para que o fluxo cíclico se manifeste, o fornecimento de electrões pelo PSII não pode ser totalmente anulado pois se o fosse o fluxo cíclico não disporia de electrões; um fluxo lento de electrões, do PSII para o PSI, é necessário para manter um equilíbrio dos potenciais redox dos transportadores de maneira a permitir o movimento dos electrões.

FOTOFOSFORILAÇÃO

A síntese de ATP requer uma fonte de energia e uma enzima específica (a ATP sintetase ou factor de acoplamento). A passagem dos electrões através dos transportadores, cujos potenciais redox vão sendo sucessivamente menos negativos, fornece a energia necessária ao processo de fosforilação do ADP. A ATP sintetase encontra-se em todas as membranas transdutoras de energia (cloroplastos e mitocôndrios). De acordo com a teoria quimiosmótica, o arranjo vectorial e assimétrico dos componentes da

cadeia de transporte de electrões no interior da membrana (que não permite o transporte passivo de H^+) vai promover a entrada de protões no lado da membrana virado para o estroma e a saída de protões na face oposta da membrana (ver Fig.II.7). O fluxo de protões do estroma para o espaço intratilacóide vai dar origem a um gradiente de pH (ΔpH) criando, simultaneamente, um gradiente de potencial eléctrico ($\Delta \Psi$) em resultado da separação de cargas. Isto é, na síntese de ATP é utilizada uma força motriz protónica (FMP ou Δp) que tem duas componentes: ΔpH , que reflecte a diferença de concentração hidrogeniónica nos dois lados da membrana e $\Delta \Psi$ resultante da diferença de potencial eléctrico que se estabelece em resultado do movimento unidireccional das cargas dos protões.

A luz, o valor de pH através das membranas tilacóides é cerca de 3 unidades de pH. Na maioria das situações, $\Delta \Psi$ é grandemente neutralizado por um influxo de iões de cloro e um efluxo de iões de magnésio, o que implica uma baixa contribuição de $\Delta \Psi$ para a magnitude de Δp (ao contrário do que acontece nos mitocôndrios).

A membrana, que acopla o transporte de electrões à síntese de ATP, possui "regiões" onde o movimento de protões ao longo do gradiente electroquímico vai promover a síntese de ATP, na medida em que contribui para o fluxo de protões (do estroma para o interior dos tilacóides). Estas regiões são conhecidas por "centros transdutores de energia", frequentemente designados, embora inadequadamente, por "centros de fosforilação".

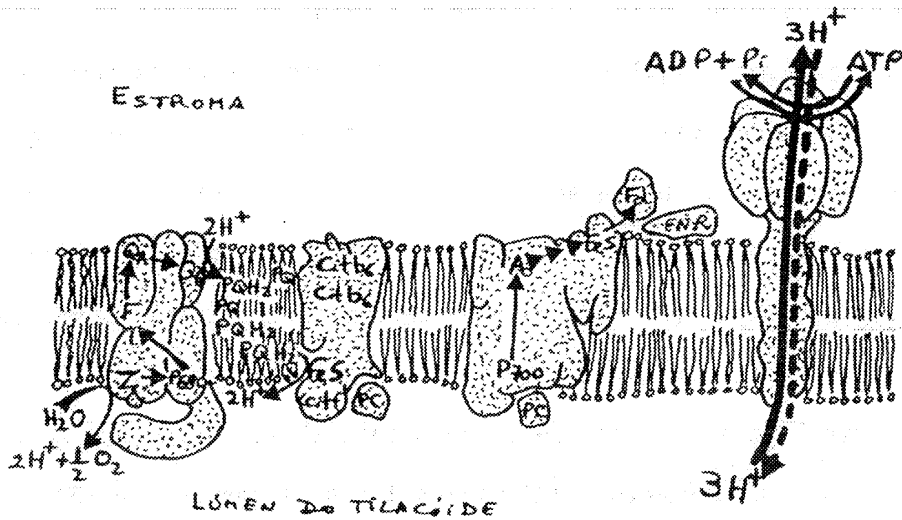


Fig.II.7 - Representação esquemática das relações entre o transporte de electrões promovido pela luz, a acumulação de protões no lúmen do tilacóide e a síntese do ATP pela ATP sintetase (complexo CFo-CF1 ou factor de acoplamento). A energia dos electrões activados pela luz é conservada através dum acoplamento do transporte de electrões nas membranas tilacóides ao transporte de protões do estroma para o lúmen.

A captura de 4 fotões pelos fotossistemas (2 pelo PSII e 2 pelo PSI) conduz à acumulação de $4H^+$ no lúmen do tilacóide, dois provenientes da oxidação de 1 molécula de H_2O , os outros dois sendo transportados do estroma para o lúmen pela "bomba" de plastoquinona (ver Fig.II.7). A acumulação de H^+ no lúmen do tilacóide gera a força motriz protónica que tende a "empurrar" os protões para o estroma através da ATP sintetase. Embora a teoria quimiosmótica explique o mecanismo que acopla o transporte de electrões à produção de ATP, ainda não esclarece bem o mecanismo molecular da transdução de energia a nível da ATP sintetase.

Existe evidência experimental indicativa de que a síntese de 1 molécula de ATP requer a passagem de $3H^+$ através do factor de acoplamento, mas este número é incerto dado existir um fluxo basal de H^+ que não é

fosforilativo, o que sugere que a razão H^+ / ATP pode ser inferior a 3. Para o transporte não-cíclico de electrões considera-se que o valor da razão $H^+ / 2e^-$ (número de prótons acumulados no lúmen por par de electrões transportados na cadeia) é igual a 4. Considerando que a síntese de 1 ATP requer $3H^+$, o valor da razão $ATP / 2e^-$ (ou $P_i / 2e^-$, isto é, o número de moléculas de ATP sintetizadas por par de electrões transportados na cadeia) será 1,33. Razões H^+ / ATP inferiores a 3 conduzirão a valores de $ATP / 2e^-$ superiores a 1,33. As determinações experimentais da razão $ATP / 2e^-$ para a fotofosforilação acíclica dão valores entre 1,5 e 2.

RELAÇÕES ESTEQUIMÉTRICAS E CONTROLOS FISIOLÓGICOS

A assimilação de 1 molécula de CO_2 requer 3 moléculas de ATP (nas plantas C_3) e 2 moléculas de NADPH. Assim, admitindo que este ATP é fornecido pela fotofosforilação acíclica, uma estequiometria correcta exige que durante o transporte de 4 electrões (necessários para reduzir 2 moléculas de $NADP^+$) sejam sintetizadas 3 moléculas de ATP ou seja, o valor mínimo da razão $ATP / 4e^-$ deverá ser igual a 3, o que equivale a $ATP / 2e^- = 1,5$.

As opiniões sobre a participação da fotofosforilação cíclica na assimilação do CO_2 são contraditórias. Certos cientistas defendem o ponto de vista de que a maior parte do ATP utilizado na assimilação do carbono é produzido pela fotofosforilação acíclica. De acordo com este ponto de vista, as fotofosforilações cíclica e pseudocíclica só desempenhariam funções relevantes em condições que restringissem apreciavelmente a taxa de fluxo acíclico de electrões.

A complexidade do processo fotossintético reflecte-se nos mecanismos da sua regulação, os quais se exercem a diferentes níveis e de maneiras raramente bem compreendidas. Reconhece-se, porém, a importância

das taxas relativas de formação do ATP e do NADPH e das disponibilidades em CO_2 , fosfato inorgânico e outros metabolitos, no controlo da fotossíntese. Em condições de fraca luminosidade, o fluxo não-cíclico de electrões é lento, o que se reflecte numa diminuição da taxa a que o ATP é sintetizado mesmo quando há disponibilidades de NADP⁺. Quantidades limitantes de ATP conduzem a uma acumulação de NADPH e a um aumento do fluxo cíclico de electrões e da correspondente fotofosforilação cíclica. Quando a intensidade luminosa é elevada, o fluxo de electrões é essencialmente acíclico na presença de NADP⁺ e quando o fornecimento de CO_2 e de outros substratos é adequado; nestas condições, a síntese de ATP promovida pela fotofosforilação não-cíclica poderá satisfazer as necessidades metabólicas. Mas quando a luz é abundante mas a concentração de CO_2 é limitante (quando, por exemplo, os estomas fecham a meio dos dias quentes de verão), o NADPH acumula-se, o fluxo não-cíclico é retardado e aumenta a taxa do fluxo cíclico. O fluxo pseudo-cíclico de electrões também permite a síntese de ATP quando o NADP⁺ está indisponível, particularmente em situações de forte intensidade luminosa. Em qualquer situação, um baixo consumo de ATP pela célula leva a uma diminuição das taxas a que o ADP e o fosfato inorgânico são fornecidos à ATP sintetase e a uma inibição de qualquer tipo de fosforilação.

A verificação de que a redução do CO_2 requer uma razão ATP/2e⁻ de, pelo menos, 1,5 (nas plantas C₃, pois este valor é maior nas plantas C₄) está longe de reflectir as necessidades do cloroplasto em energia, uma vez que o ATP formado pela fotofosforilação não é utilizada exclusivamente na assimilação do CO_2 . Além de poder ser "exportado" do cloroplasto para o citoplasma, o ATP é consumido no transporte activo de iões e de outras substâncias, em várias reacções biossintéticas (designadamente na síntese de proteínas) e no metabolismo do azoto. Desta maneira parece pouco provável que as necessidades do cloroplasto em ATP possam ser totalmente

preenchidas pela fotofosforilação não-cíclica (cujos valores experimentais da razão $\text{ATP}/2e^-$ variam de 1,5 a 2). As duas vias capazes de formar ATP extra são os fluxos cíclico e pseudo-cíclico. Embora se reconheça a importância da razão ATP/NADPH na regulação do desvio dos electrões do fluxo não-cíclico para os fluxos cíclico e pseudo-cíclico, pouco se sabe sobre este assunto.

FOTOSSÍNTESE

CAPÍTULO III

REAÇÕES DE ASSIMILAÇÃO DO CO₂

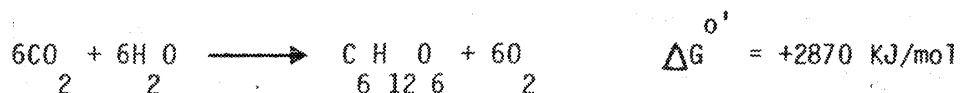
Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

III - REACÇÕES DE ASSIMILAÇÃO DO CO₂

Através da fotossíntese, as plantas produzem fundamentalmente hidratos de carbono e oxigénio molecular, a partir de dióxido de carbono, água, ATP e NADPH (Fig.III.1). A equação global da fotossíntese nas plantas pode então representar-se pela seguinte equação:



Tratando-se de um processo fortemente endergónico, a energia e o potencial redutor necessários à síntese dos hidratos de carbono são fornecidos, respectivamente, pelo ATP e NADPH produzidos nas reacções fotoquímicas da fotossíntese. São, portanto, o ATP e o NADPH que estabelecem, a nível bioquímico, a ligação entre as membranas dos tilacóides (onde ocorrem as reacções luminosas) e o estroma do cloroplasto (onde se processam as reacções não-luminosas).

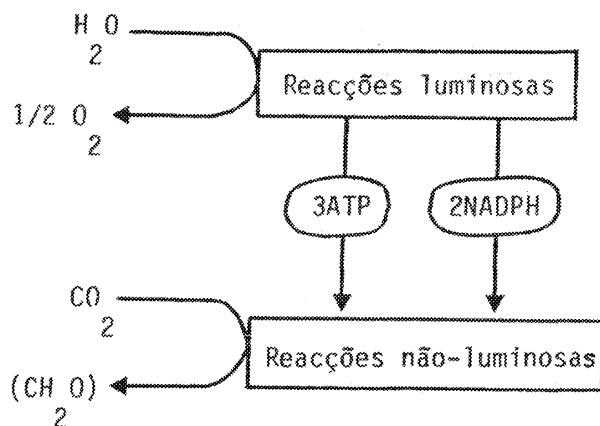


Fig.III.1 - Esquema geral da fotossíntese

O CICLO DE CALVIN

Na assimilação fotossintética do carbono, o CO₂ liga-se a uma molécula aceitadora de modo a originar a formação de um novo grupo carboxílico. Para que este processo possa continuar torna-se necessária a regeneração desse aceitador e, para que a planta possa crescer, é preciso que a quantidade do aceitador aumente. O ciclo de reacções responsável por este processo foi elucidado por Calvin e colaboradores, recebendo por isso as designações de ciclo de Calvin, ciclo de Calvin-Benson, ciclo de Calvin-Benson-Bassham, ciclo redutor dos fosfatos de pentose ou ciclo da redução fotossintética do carbono.

Este ciclo ocorre no estroma dos cloroplastos, envolvendo essencialmente apenas uma nova reacção: a carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato. As restantes reacções são idênticas às reacções citosólicas da glicólise ou da via dos fosfatos de pentose. É conveniente a divisão do ciclo em fases (Fig.III.2 e Tabela III.1): fase I - reacção de carboxilação; fase II - redução do 3-fosfoglicerato; fase III - regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato. Exteriormente ao ciclo de Calvin pode ainda considerar-se a fase IV, da síntese dos produtos da fotossíntese.

ESTEQUIOMETRIA DO CICLO DE CALVIN

A carboxilação de 3 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato (com 5 átomos de C cada) produz 6 moléculas de 3-fosfoglicerato (com 3 átomos de C cada), com um total de 18 átomos de C. Destes 18 átomos, apenas 15 são necessários para regenerar as 3 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato. Os restantes 3 átomos de C correspondentes a uma molécula de 3-fosfoglicerato

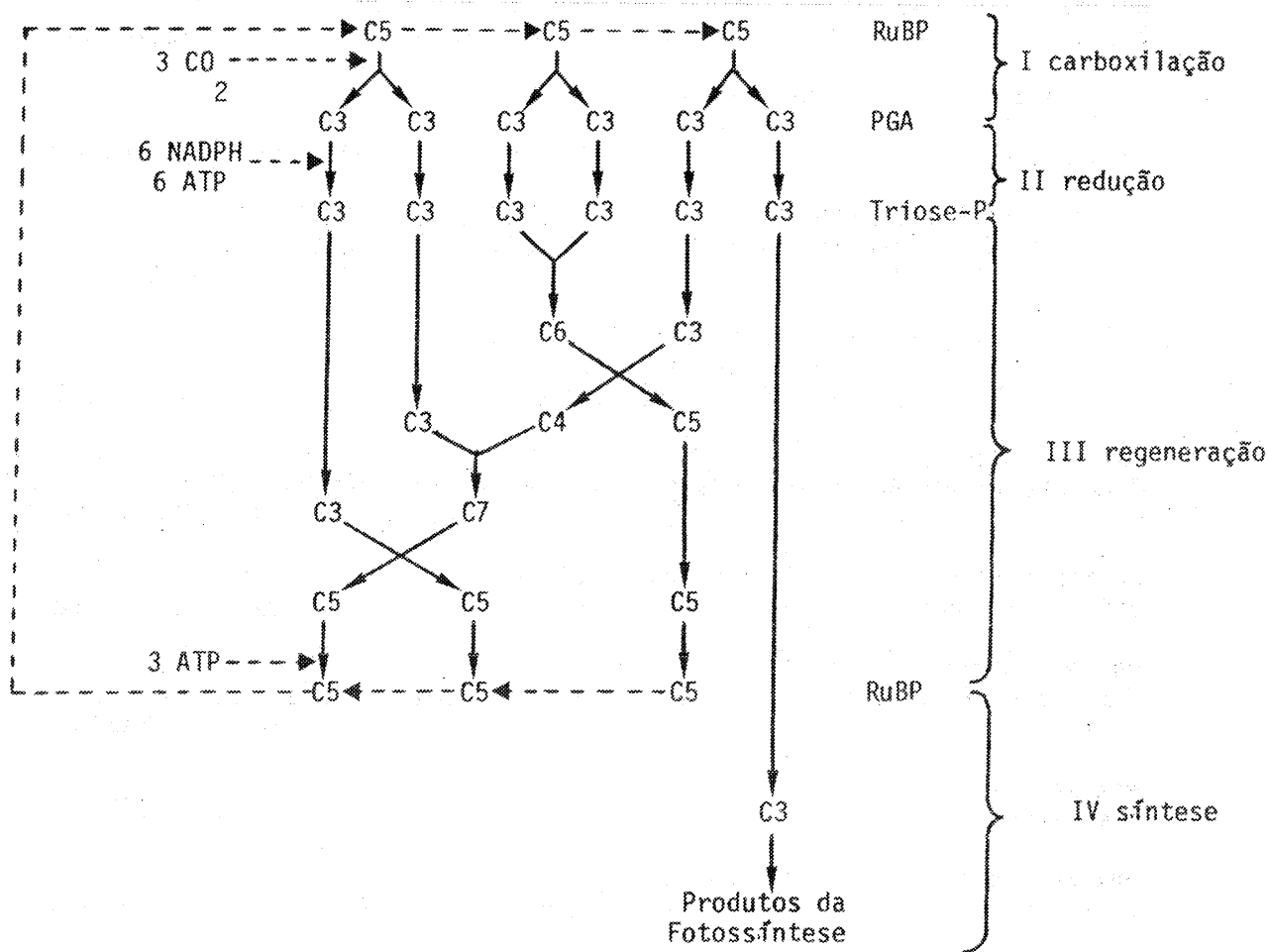


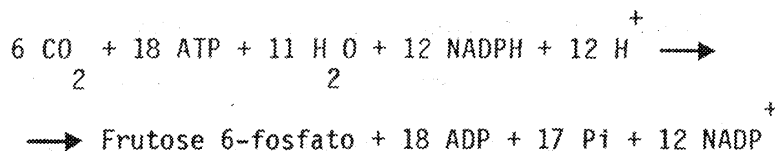
Fig.III.2 - Esquema simplificado do ciclo de Calvin ilustrando a estequiometria envolvida. Três moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) reagem com três moléculas de CO₂ para originarem seis moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA). Estas são convertidas em trioses-fosfato (triose-P), com o consumo de ATP e NADPH. Cinco destas moléculas são rearranjadas de modo a regenerarem as três moléculas iniciais de RuBP, com o consumo de mais ATP. A sexta molécula de triose-P é utilizada em reacções de síntese.

Tabela III.1 - Enzimas e reações envolvidas no ciclo de Calvin

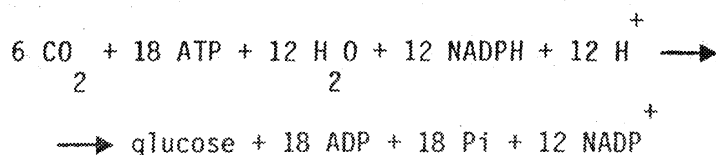
| | |
|---|--|
| Fase I : Reacção de carboxilação | |
| enzima : ribulose bisfosfato carboxilase, EC.4.1.1.39 | |
| 6 ribulose 1,5-bisP+6CO ₂ +6H ₂ O → 12 3-Pglicerato | $\Delta G^{0'} = -35,1 \text{ KJ/mol}$ |
| Fase II : Redução do 3-fosfoglicerato | |
| enzima : fosfoglicerato cinase, EC.2.7.2.3 | |
| 12 3-Pglicerato+12 ATP → 12 1,3-bisPglicerato+12 ADP | $\Delta G^{0'} = -18,8 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : NADP-gliceraldefdo 3-fosfato desidrogenase, EC.1.2.1.13 | |
| 12 1,3-bisPglicerato+12NADPH+12H ₊ → 12 gliceraldefdo 3-P+ +12NADP++12Pi | $\Delta G^{0'} = -6,3 \text{ KJ/mol}$ |
| Fase III : Regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato | |
| enzima : triose fosfato isomerase, EC.5.3.1.1 | |
| 5 gliceraldefdo 3-P ↔ 5 dihidroxiacetona-P | $\Delta G^{0'} = -7,5 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : aldolase, EC.4.1.2.13 | |
| 3 gliceraldefdo 3-P+3 dihidroxiacetona-P ↔ 3 frutose 1,6-bisP | $\Delta G^{0'} = +23,0 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : frutose bisfosfatase, EC.3.1.3.11 | |
| 3 frutose 1,6-bisP+3 H ₂ O → 3 frutose 6-P+3 Pi | $\Delta G^{0'} = -16,7 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : transcetolase, EC.2.2.1.1 | |
| 2 frutose 6-P+2 gliceraldefdo 3-P ↔ 2 xilulose 5-P+2 eritrose 4-P | $\Delta G^{0'} = +6,2 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : aldolase, EC.4.1.2.13 | |
| 2 eritrose 4-P+2 hidroxiacetona-P ↔ 2 sedoheptulose 1,7-bisP | $\Delta G^{0'} = ?$ |
| enzima : sedoheptulose bisfosfatase, EC.3.1.3.37 | |
| 2 sedoheptulose 1,7-bis-P+2H ₂ O → 2 sedoheptulose 7-P+2 Pi | $\Delta G^{0'} = -16,7 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : transcetolase, EC.2.2.1.1 | |
| 2 sedoheptulose 7-P+2 gliceraldefdo 3-P ↔ 2 ribose 5-P+2 xilulose 5-P | $\Delta G^{0'} = ?$ |
| enzima : ribose fosfato isomerase, EC.5.3.1.6 | |
| 2 ribose 5-P ↔ 2 ribulose 5-P | $\Delta G^{0'} = +2,7 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : ribulose fosfato epimerase, EC.5.1.3.1 | |
| 4 xilulose 5-P ↔ 4 ribulose 5-P | $\Delta G^{0'} = -0,5 \text{ KJ/mol}$ |
| enzima : fosforibulocinase, EC.2.7.1.19 | |
| 6 ribulose 5-P+6ATP → 6 ribulose 1,5-bisP+6ADP | $\Delta G^{0'} = -21,8 \text{ KJ/mol}$ |
| SOMA: 6 CO ₂ + 18 ATP + 11 H ₂ O + 12 NADPH + 12 H ⁺ → | |
| → Frutose 6-P + 18 ADP + 17 Pi + 12 NADP ⁺ | |

podem ser utilizados na síntese da sacarose ou do amido, os produtos finais da fotossíntese (Fig.III.2).

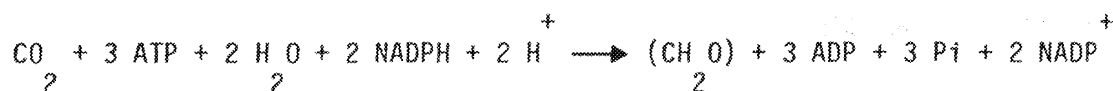
A soma das reacções do ciclo de Calvin origina a seguinte equação química (Tabela III.1):



Atendendo a que a frutose 6-fosfato assim produzida pode ser convertida em glucose por acção de enzimas glicolíticas, com o consumo de uma molécula de água e a produção de uma molécula de ácido fosfórico, a equação do ciclo de Calvin poderá então escrever-se



Dividindo esta equação por 6 obtém-se:



Esta equação mostra que a fotossíntese requiere 3 moles de ATP e 2 moles de NADPH para converter 1 mole de CO_2 a hidrato de carbono.

REACÇÃO DE CARBOXILAÇÃO

Foi sempre considerado muito pouco provável que o dióxido de carbono pudesse ser directamente reduzido, admitindo-se que ele se ligaria a um receptor orgânico então desconhecido. Após a identificação do 3-fosfoglicerato (PGA) como o primeiro composto formado na fotossíntese, foi sugerido que o receptor deveria conter 2 átomos de C. Foram dispendidos 5 anos de pesquisas infrutíferas até se reconhecer que o receptor de CO_2

poderia conter 5 átomos de C em vez de 2. Assim, se após a carboxilação de um composto com 5 átomos de C (originando uma molécula com 6 átomos de C) este se decompor, produzir-se-ão duas moléculas com 3 átomos de C cada.

A Fig.III.3 mostra que, na presença de enzima ribulose bisfosfato carboxilase (RuBPCase), o dióxido de carbono reage com a forma enediol da ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) para originar um β -cetoácido instável, o qual sofre uma quebra hidrolítica para formar 2 moléculas de PGA. A variação de energia livre padrão (ΔG°) da reacção de síntese do PGA é de -35,1 KJ/mol, o que indica uma baixa tendência para a ocorrência da reacção inversa. Assim, a reacção de carboxilação catalisada pela RuBPCase envolve além da carboxilação e da cisão hidrolítica da cadeia de 6 átomos de C em duas metades, também uma dismutação que permite a formação de um segundo grupo carboxílico. Por este motivo, a RuBPCase tem sido também designada por carboxidismutase.

REDUÇÃO DO 3-FOSFOGLICERATO

O PGA formado é um ácido orgânico, tendo por isso um nível energético inferior ao de um hidrato de carbono. A redução do PGA a açúcar, envolvendo a conversão do seu grupo carboxílico no grupo aldeído da triose fosfato, ocorre em duas fases (Tabela III.1): (i) a fosforilação do PGA pelo ATP, catalisada pela enzima fosfoglicerato cinase e (ii) a sua posterior redução pelo NADPH, catalisada pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. E nestas duas reacções que são utilizados todo o NADPH e 2/3 do ATP necessários ao funcionamento do ciclo de Calvin.

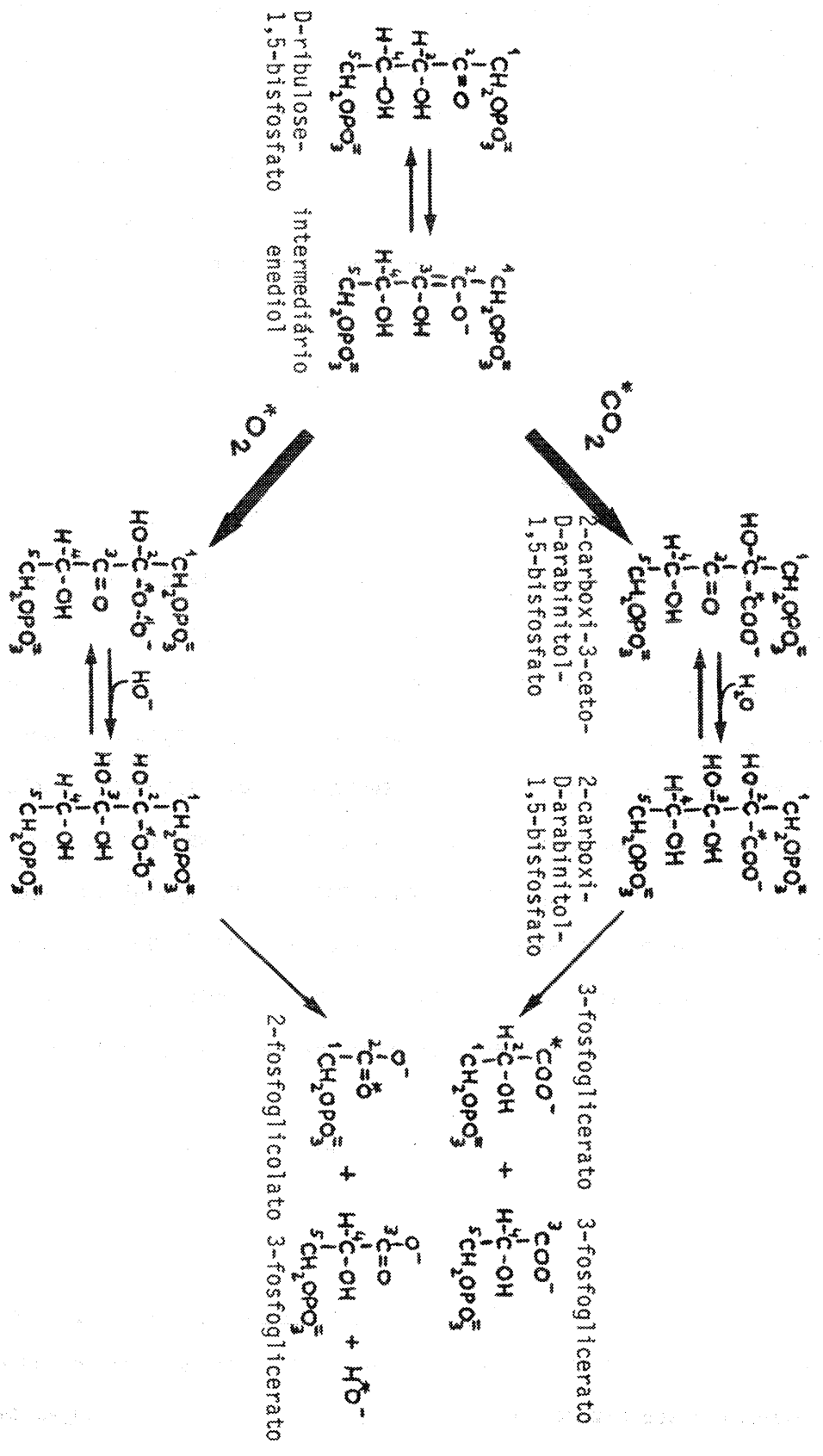


Fig. III.3 - Mecanismos propostos para as reacções catalisadas pela enzima ribulose bisfosfato carboxilase.

Como referido anteriormente, $1/6$ da triose fosfato assim formada é utilizada em reacções de síntese, sendo os restantes $5/6$ utilizados na regeneração da RuBP, de modo a fechar o ciclo (Fig.III.2).

REGENERAÇÃO DA RIBULOSE 1,5-BISFOSFATO

A regeneração da RuBP é um processo complexo, dado que utiliza $5/6$ da triose fosfato formada. Contudo, este processo engloba um baixo consumo energético, uma vez que envolve uma série de transformações enzimáticas entre compostos com o mesmo nível de redução.

A regeneração da RuBP dá-se através de uma elaborada série de reacções, esquematicamente representadas na Fig.III.2 e Tabela III.1. Nestas conversões, o cofactor tiamina pirofosfato (um derivado da vitamina B₁) desempenha um papel importante, pois transfere grupos com 2 átomos de C entre dois açúcares. A última reacção do ciclo, a fosforilação da ribulose 5-fosfato pelo ATP, regenerando a RuBP, consome $1/3$ do ATP utilizado no ciclo de Calvin.

OS PRODUTOS DA FOTOSSÍNTESE

Os primeiros hidratos de carbono a serem formados pela fixação fotossintética do CO₂ são o gliceraldeído 3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato, os produtos do ciclo de Calvin. Através de um sistema de transporte específico localizado na membrana interna do cloroplasto, as trioses fosfato (ou o PGA) podem ser trocadas por fosfato inorgânico, de modo a permitir a exportação de carbono recentemente fixado para o citoplasma, mantendo constante a concentração cloroplástica de fósforo.

A formação de hexoses fosfato a partir das trioses fosfato envolve uma série de reacções enzimáticas sem necessidade do fornecimento de energia, incluindo as enzimas aldolase, frutose bisfosfatase e glucose 6-fosfato isomerase para a produção de frutose 1,6-bisfosfato, frutose 6-fosfato e glucose 6-fosfato, respectivamente.

Quando é fornecido dióxido de carbono marcado com o isótopo ¹⁴C a uma planta a fotossintetizar, a radioactividade aparece em vários compostos, entre os quais hidratos de carbono, ácidos gordos, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A proporção relativa destes compostos parece variar com a intensidade luminosa e as concentrações de CO₂ e de O₂. Contudo, os principais produtos finais da fotossíntese nas plantas são a sacarose e o amido.

A sacarose é a principal forma de carbono translocada das folhas adultas para os órgãos em desenvolvimento e de reserva. Embora tenham persistido durante vários anos dúvidas sobre a localização intracelular da síntese da sacarose, sabe-se hoje que a síntese deste dissacárido ocorre no citoplasma, à custa dos fosfatos de triose exportados do cloroplasto. O amido é o principal polissacárido de reserva nas plantas, sendo sintetizado exclusivamente nos cloroplastos. Foi recentemente descoberto o papel importante desempenhado pela frutose 2,6-bisfosfato na partição do carbono fixado entre a síntese da sacarose e a do amido.

A RIBULOSE BISFOSFATO CARBOXILASE

A ribulose bisfosfato carboxilase, classificada pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica com o número de código EC.4.1.1.39, é frequentemente designada de modo abreviado por RuBPCase ou Rubisco. Esta enzima ocorre no estroma dos cloroplastos, onde catalisa

duas reacções de consequências opostas (Fig.III.3): (i) uma reacção de carboxilação, a reacção inicial de fixação do CO_2 da fotossíntese e (ii) uma reacção de monoxigenação, a reacção inicial de fixação do O_2 da fotorrespiração (ver secção IV). Por isso, esta enzima é também frequentemente designada por ribulose bisfosfato carboxilase/oxigenase.

A RuBPCase é talvez a enzima mais importante da biosfera : (i) pelo seu papel central na fotossíntese, é a enzima da qual depende praticamente toda a vida na Terra; (ii) pelo seu papel na fotorrespiração, é considerada como a constricção metabólica mais importante à produtividade vegetal. Nas condições naturais, admite-se que a razão carboxilação/oxigenação seja de 3:1 a 4:1. É realmente curioso que uma só enzima catalise os primeiros passos de duas vias metabólicas opostas.

Para ser activa, a enzima inactiva reage lentamente com uma molécula de CO_2 , com a formação de um carbamato com o grupo ϵ -amina da lisina 201 da subunidade L (ver adiante), o qual reage depois rapidamente com o ião Mg^{2+} para formar o complexo ternário cataliticamente activo. A discrepância entre as taxas de activação observadas *in vivo* e *in vitro* levou recentemente à descoberta de uma enzima responsável pela activação da RuBPCase - a RuBPCase activase. A molécula de CO_2 que participa na activação não é a mesma da que é fixada durante a reacção de carboxilação, o que sugere ser o centro de activação distinto do centro catalítico.

O CO_2 e o O_2 competem um com o outro durante a catálise de uma maneira competitiva linear, sugerindo que actuam no mesmo centro activo. Assim, o CO_2 funciona como (i) substrato da carboxilação, (ii) inibidor competitivo da oxigenação e (iii) activador da carboxilação e da oxigenação, enquanto que o O_2 funciona como (i) substrato da oxigenação e (ii) inibidor competitivo da carboxilação. Um aumento na eficiência com que o CO_2 compete com o O_2 para o centro activo da RuBPCase melhoraria a

taxa fotossintética em relação à taxa fotorrespiratória, podendo aumentar a produtividade numa grande variedade de culturas comercialmente importantes. Na realidade, sabe-se, por exemplo, que se pode aumentar em 50 a 100% a produção de leguminosas para grão se se aumentar 5 vezes a concentração atmosférica de CO₂.

A RuBPCase de plantas superiores tem um peso molecular de ca. 550.000, sendo constituída por 8 subunidades grandes, com ca. 55.000 cada (designadas por L de "Large"), e por 8 subunidades pequenas, com cerca de 14.000 cada (designadas por S de "Small"). A estrutura desta enzima é pois do tipo L₈ S₈.

A biossíntese da RuBPCase envolve transcrição e tradução em locais distintos da célula. A subunidade L, com cerca de 475 aminoácidos, é codificada no genoma do cloroplasto e sintetizada nos ribossomas deste organito, sob a forma de um precursor com cerca de 2KDa mais do que a sua forma final. No cloroplasto, as subunidades L são agregadas por uma proteína recentemente descoberta e denominada "proteína de ligação das subunidades L da RuBPCase", a qual é codificada no genoma do núcleo e sintetizada nos ribossomas do citoplasma, sob a forma de um precursor. Subunidades L de espécies diferentes são bastante homólogas, pois o gene que as codifica deve ter sido bastante conservado ao longo da evolução. Esta subunidade contém o centro de ligação do activador CO₂ assim como o centro catalítico, sendo cataliticamente activa mesmo na ausência da subunidade S.

A subunidade S, com cerca de 123 aminoácidos, é codificada no genoma do núcleo, sendo sintetizada nos ribossomas do citoplasma (tal como acontece com as outras enzimas do ciclo de Calvin), sob a forma de um precursor com cerca de 20 KDa. Este precursor é introduzido no cloroplasto por um mecanismo de pós-tradução, "cortado" por uma peptidase de trânsito e incorporado na holoenzima. A análise genética da subunidade

S é mais complexa do que a da L, pois ela é herdada de 2 progenitores. Tal deve ter originado grande variabilidade genética na sua sequência de aminoácidos ao longo da evolução, o que é ilustrado pelo facto de subunidades S de espécies diferentes serem bastante diferentes entre si. A função da subunidade S permanece um grande mistério, embora se admita que possa ter uma função reguladora - pensa-se que possa ajudar a manter a proteína numa conformação estável, capaz de ser activada para a forma cataliticamente activa.

A RuBPCase é um alvo importante da engenharia genética devido ao seu significado na produtividade vegetal. Contudo, ainda não foi conseguido qualquer meio prático de estimular a actividade carboxilásica ou inibir a oxigenásica à escala da agricultura. Tem sido sugerido que a actividade oxigenásica é uma consequência inevitável da química do centro activo da RuBPCase. Estão em curso trabalhos com vista à expressão na bactéria *Escherichia coli* das subunidades L e S da RuBPCase de plantas superiores (o que já foi conseguido), assim como da "proteína de ligação das subunidades L da RuBPCase". Pensa-se deste modo conseguir a produção de RuBPCase activa de plantas na bactéria, o que permitirá o início de estudos de mutagénese com vista à obtenção de formas mutantes da enzima.

A RuBPCase é a proteína mais abundante da biosfera. Assim, ela constitui normalmente mais de 50% da proteína solúvel das folhas das plantas, onde a sua concentração é da ordem dos 1 a 10 mg por g de peso fresco. Se admitirmos que a quantidade de carbono fixado anualmente pelas plantas terrestres é de 5×10^{16} g, pode calcular-se que a quantidade de RuBPCase necessária para tal é de 4×10^{13} g, ou seja, 10 kg por cada homem, mulher e criança.

São frequentemente referidas duas hipóteses que tentam explicar a razão de tão grande abundância desta enzima: (1) na maioria das plantas, e ao contrário do que acontece com a quase totalidade das enzimas, a RuBPCase

não se degrada enquanto está a ser sintetizada. Assim, a grande quantidade desta enzima nas folhas, a sua estabilidade face à degradação antes da senescência, e a sua rápida degradação no início da senescência foliar levou à sua classificação como proteína de reserva de C e N, a que a folha recorreria em resposta a uma carência nutritiva. (2) Outra possível explicação resulta desta enzima ser um catalisador muito lento quando comparado com a grande maioria das enzimas. Assim, nas condições naturais, estima-se que a sua velocidade de catálise seja apenas de 200 moléculas de CO₂ fixadas por molécula de RuBPCase por minuto.

²
Do ponto de vista alimentar, a composição em aminoácidos desta enzima é muito equilibrada, com uma proporção de aminoácidos essenciais que iguala ou excede a que é recomendada pela FAO. Sendo a proteína mais abundante das folhas, será portanto o principal componente proteico para o gado e importante para o homem. Estão mesmo decorrendo vários projectos de investigação com vista à utilização da RuBPCase como suplemento proteico na alimentação humana.

FOTOSSÍNTESE

CAPÍTULO IV

FOTORRESPIRAÇÃO

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

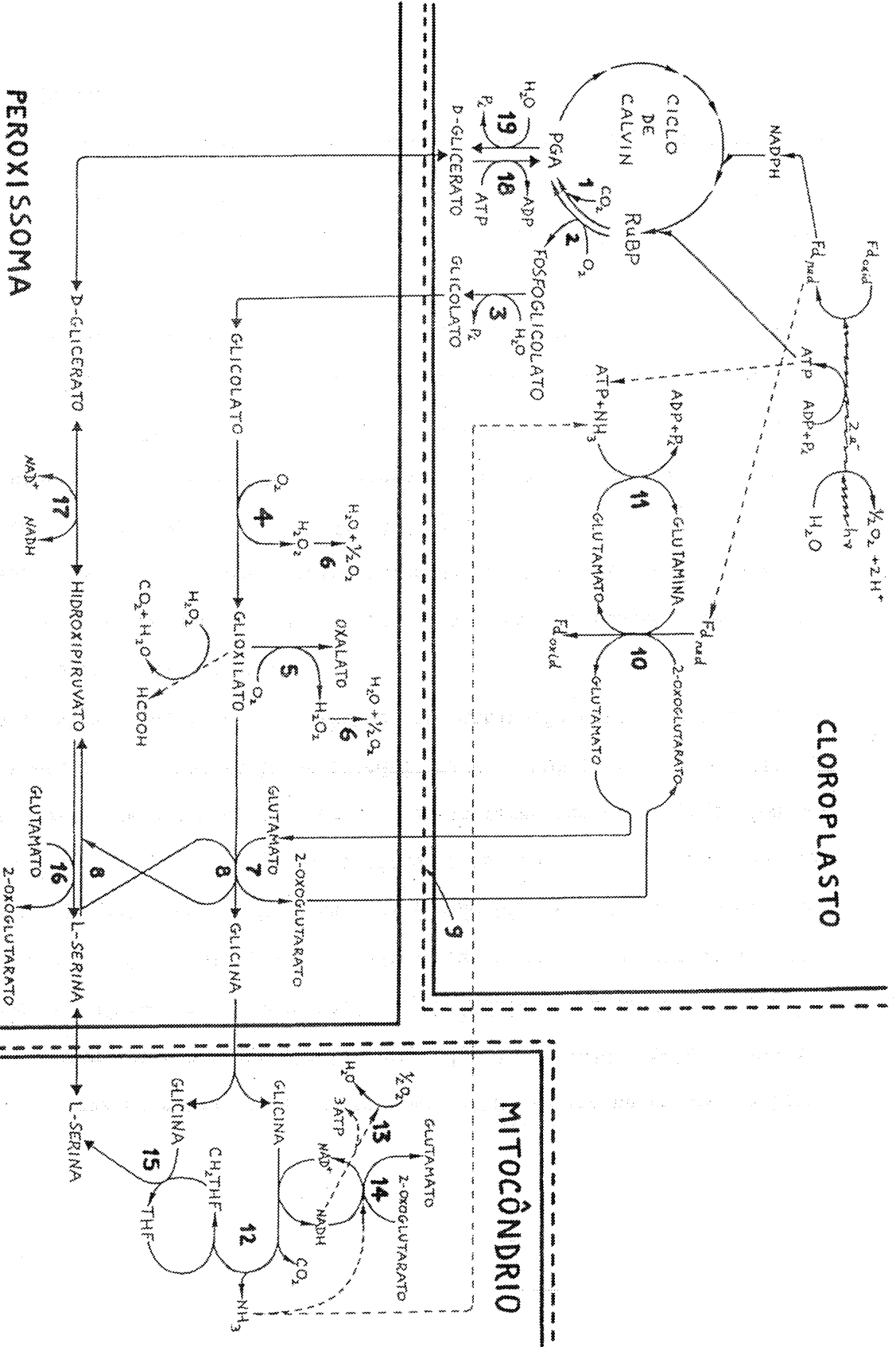
IV - FOTORRESPIRAÇÃO

INTRODUÇÃO

A taxa de produção de CO_2 por uma folha mantida no escuro, muitas vezes designada por "respiração às escuras", é inibida pelo cianeto, atingindo o máximo para concentrações de oxigénio de cerca de 2% (v/v). Contudo, apesar da respiração mitocondrial ser normalmente inibida à luz, as taxas de absorção de O_2 e de produção de CO_2 nestas condições são frequentemente muito superiores às obtidas no escuro. Ao contrário do que se passa com a "respiração às escuras", estas taxas aumentam gradualmente com o aumento da concentração de oxigénio de 0 a 100% (v/v); além disso, não são sensíveis aos inibidores típicos da respiração mitocondrial, sendo mesmo estimuladas pelo cianeto.

A via metabólica responsável pelo aumento dependente da luz da taxa respiratória é frequentemente designada por fotorrespiração, via do glicolato, biossíntese e metabolismo do glicolato, via em C_2 ou ciclo fotorrespiratório de oxidação do carbono, ocorrendo sequencialmente em 3 organitos: cloroplasto, peroxissoma e mitocôndrio. Embora não contenha reacções fotoquímicas, a fotorrespiração ocorre apenas à luz em consequência de depender do consumo de ATP e NADPH produzidos nas reacções luminosas da fotossíntese.

A fotorrespiração é uma via metabólica complexa, podendo ser dividida em 5 fases (Fig.IV.1): síntese do glicolato, conversão do glicolato a glicina, conversão da glicina a serina, via do glicerato e ciclo de Calvin.



PEROXISSOMA

Fig. IV.1 - Ciclo fotossintético de oxidação do carbono. Enzimas: (1) Actividade carboxilática da RubbCase; (2) Actividade oxigenásica da RubbCase; (3) Fosfoglicolato fosfatase (EC.3.1.3.18); (4 e 5) Glicolato oxidase (EC.1.1.3.11); (6) Catalase (EC.1.11.1.6); (7) Glicina aminotransferase ou glutamato-glioxilato aminotransferase (EC.2.6.1.4); (8) Serina-glioxilato aminotransferase (EC.2.6.1.45); (9) Transportador de ácidos dicarboxílicos do cloroplasto; (10) Glutamato sintase (EC.1.4.7.1); (11) Glutamina sintetase (EC.5.3.1.2); (12) Complexo enzimático responsável por desaminação e descarboxilação; (13) Cadena de transporte de electrões do mitocôndrio; (14) Glutamato desidrogenase (EC.1.4.1.2); (15) Serina hidroximetil transferase (EC.2.1.2.1); (16) aminotransferase(s) para a conversão hidroxi-piruvato → serina; (17) NADH - hidroxi-piruvato redutase (EC.1.1.1.81) ou glicolato desidrogenase (EC.1.1.1.29); (18) glicerato cínase (EC.2.7.1.31); (19) fosfoglicerato fosfatase (EC.3.1.3.29).

SÍNTESE DO GLICOLATO NO CLOROPLASTO

A fotorrespiração é iniciada pela actividade oxigenásica da enzima ribulose bisfosfato carboxilase (reacção 2), a qual origina a formação de 2-fosfoglicolato a partir dos átomos de carbono 1 e 2 da ribulose 1,5-bisfosfato (ver Fig.III.3). O 2-fosfoglicolato é em seguida rapidamente hidrolisado por uma fosfatase cloroplástica (a fosfoglicolato fosfatase, reacção 3), e o glicolato assim produzido é excretado do cloroplasto. A rapidez desta reacção é fisiologicamente importante pois o 2-fosfoglicolato é um forte inibidor da enzima do ciclo de Calvin triose fosfato isomerase. O glicolato não se acumula nos tecidos foliares expostos à luz, o que indica que a taxa fotorrespiratória é determinada pela sua taxa de síntese.

CONVERSAO DO GLICOLATO A GLICINA NO PEROXISSOMA

Trata-se de uma fase irreversível do metabolismo do glicolato, envolvendo as enzimas glicolato oxidase (reacção 4), catalase (reacção 6), glutamato-glioxilato aminotransferase (reacção 7) e serina-glioxilato aminotransferase (reacção 8). A glicolato oxidase (por vezes também denominada α -hidroxiácido oxidase) é uma enzima chave da fotorrespiração, cuja função primária é a oxidação do glicolato pelo O , com a produção de glioxilato e H_2O . Contudo, esta enzima catalisa também a oxidação de parte do glioxilato formado a oxalato (reacção 5), embora a uma taxa inferior à utilização de glicolato - o K_m da glicolato oxidase para o glioxilato é cerca de 10 vezes superior ao do glicolato. No entanto, nas folhas de algumas espécies (ex: espinafre) as concentrações de oxalato podem ser bastante elevadas.

O peróxido de hidrogénio produzido é extremamente tóxico para a célula pois constitui um forte agente oxidante. Para impedir os seus efeitos desastrosos as células possuem elevadas actividades da enzima catalase (reacção 6), a qual é um catalisador muito eficiente quando na presença de elevadas concentrações de H_2O_2 - nestas condições, cada molécula de catalase pode transformar 4×10^7 moléculas de H_2O_2 por segundo. Contudo, trata-se de um catalisador muito pouco eficiente quando na presença de baixas concentrações de H_2O_2 - a transformação do H_2O_2 pela catalase requiere a ligação de duas moléculas de H_2O_2 no mesmo centro activo de uma molécula de catalase, de tal modo que uma elevada razão catalase/ H_2O_2 torna o processo menos eficiente. Deste modo, a catalase apresenta baixa afinidade para o H_2O_2 , como é ilustrado pelos valores de K_m da ordem de 0,05 a 1,1 M. Por isso, outras reacções podem competir com a catalase para o H_2O_2 disponível.

O glioxilato pode também ser oxidado não-enzimaticamente pelo H_2O_2 , originando CO_2 e ácido fórmico (Fig.IV.1). Contudo, o fluxo principal de carbono através da via do glicolato nos peroxissomas baseia-se na formação de glicina em quantidades aproximadamente iguais à produção de glicolato.

Duas aminotransferases estão envolvidas na conversão irreversível do glioxilato a glicina. A serina-glioxilato aminotransferase (reacção 8), que acopla o fluxo de carbono do glioxilado para a glicina com a parte da via da serina para o hidroxipiruvato. No entanto, é necessária a presença de uma segunda aminotransferase (reacção 7), pois a formação de uma serina requiere a conversão de duas moléculas de glioxilato a duas de glicina.

CONVERSAO DA GLICINA A SERINA NO MITOCONDRIO

Esta conversão processa-se em 2 passos: (i) a oxidação descarboxilativa da glicina (reacção 12), catalisada pela acção combinada de um complexo multi-enzimático (por vezes, incorrectamente designado por glicina descarboxilase ou glicina oxidase), produzindo CO_2 , NH_3 e 5,10-metileno-ácido tetrahidrofólico (C_1 -ATHF). Esta reacção está acoplada à redução do NAD^+ , sendo responsável pela grande maioria do CO_2 produzido pela fotorrespiração e por uma quantidade idêntica de NH_3 . Alguns CO_2 podem também ser produzidos em reacções laterais envolvendo o glioxilato e a oxidação do formato. A reacção 12 está associada à cadeia mitocondrial de transporte de electrões, sendo o NADH oxidado com uma razão P/2e próxima de 3, e duas moles de glicina descarboxiladas por mole de oxigénio consumido. Embora as reacções 12 e 15 sejam teoricamente reversíveis, a ligação entre a descarboxilação da glicina e a cadeia de transporte de electrões impede tal reversibilidade de tal modo que se forma muito pouca glicina quando se fornece serina a folhas iluminadas. Mitocôndrios de tecidos vegetais estiolados ou não-fotossintéticos apresentam uma capacidade muito baixa para descarboxilar a glicina. No entanto, a oxidação do NADH pode também estar ligada à redução do amónio pela enzima glutamato desidrogenase (reacção 14; ver secção "ciclo fotorrespiratório do azoto), e/ou à conversão do hidroxipiruvato em glicerato (reacção 17).

(ii) A condensação do C_1 -ATHF formado a partir de uma molécula de glicina com uma segunda molécula deste aminoácido para formar L-serina, numa reacção catalisada pela enzima hidroximetiltransferase (reacção 15).

VIA DO GLICERATO NOS PEROXISSOMAS E CLOROPLASTOS

A interconversão entre o 3-fosfoglicerato e a serina, frequentemente designada por via do glicerato, é uma via reversível que pode desempenhar duas funções distintas: (i) no sentido serina \rightarrow 3-fosfoglicerato participa no processo fotorrespiratório; (ii) no sentido inverso funciona como uma via metabólica para a síntese de serina.

A serina formada durante a fotorrespiração é convertida em hidroxipiruvato, numa reacção catalisada pela enzima serina-glioxilato aminotransferase (reacção 8), acoplada à conversão do glioxilato em glicina. Uma vez que a reacção catalisada por esta aminotransferase é irreversível admite-se que deverá existir outra aminotransferase (reacção 16) que permita a reversibilidade da via do glicerato. A interconversão reversível entre hidroxipiruvato e glicerato é catalisada por uma desidrogenase dependente do NAD (reacção 17), a qual funciona como NADH-hidroxipiruvato redutase durante a fotorrespiração, e como NAD⁺-glicerato desidrogenase durante a síntese de serina. O glicerato produzido na fotorrespiração é finalmente fosforilado a 3-fosfoglicerato pela enzima glicerato cinase (reacção 18), com o consumo de ATP. A reacção inversa, i.e., a reacção inicial da via do glicerato para a síntese de serina é catalisada pela enzima fosfoglicerato fosfatase (reacção 19).

CICLO DE CALVIN NO CLOROPLASTO

O 3-fosfoglicerato entra então no ciclo de Calvin, fechando o ciclo fotorrespiratório com a regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato. Alternativamente, o 3-fosfoglicerato poderá ser utilizado na síntese de sacarose ou amido. O ciclo da redução fotossintética do carbono é também,

por isso, uma parte essencial da fotorrespiração, consumindo energia quando não está a ser utilizado para a fixação de CO_2 , razão pela qual o esquema apresentado na Fig.IV.1 pode ser encarado como o ciclo de oxidação fotossintética do carbono.

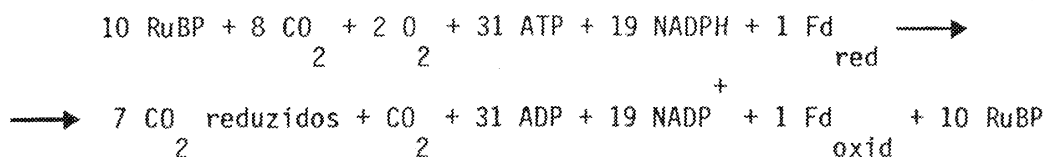
FUNÇÃO FISIOLÓGICA DA FOTORRESPIRAÇÃO

Não se conhece qual a função fisiológica da fotorrespiração. Uma questão fundamental é determinar se se trata de um processo essencial, inevitável, ou essencial e inevitável. Têm sido sugeridas várias hipóteses que visam explicar a ocorrência deste processo.

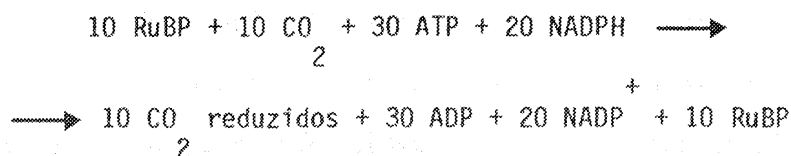
Poderá especular-se que a fotorrespiração funciona como um meio de: (i) exportar carbono fixado do cloroplasto, sob a forma de glicolato; (ii) exportar ATP do cloroplasto, pois a descarboxilação da glicina pode estar ligada à cadeia mitocondrial de transporte de electrões; (iii) sintetizar glicina e serina no citoplasma. Contudo, conhecem-se outras vias mais eficientes pelas quais estes processos ocorrem nas folhas.

Tem sido sugerido que a fotorrespiração serve para dissipar a energia fotoquímica excedentária gerada nos cloroplastos quando as folhas são expostas a elevadas intensidades luminosas, evitando danos irreversíveis nas membranas em consequência da formação de radicais de oxigénio. Esta consideração requiere, no entanto, um exame mais detalhado. Na presença de fotorrespiração, em termos da quantidade de carbono fixado, é necessária uma quantidade de energia consideravelmente maior para reduzir uma dada quantidade de CO_2 do que na sua ausência. Contudo, quando expressa em termos da utilização e regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato ("RuBP turnover") o processo fotorrespiratório leva a conclusões diferentes. Assim, assumindo que na presença de concentrações atmosféricas

normais de CO_2 e de O_2 a 25°C a razão carboxilação/oxigenação é de cerca de 4:1, a estequiometria da utilização e regeneração de 10 moléculas de RuBP será :



Na ausência de O_2 , a referida estequiometria será :



Uma vez que o NADPH é energeticamente equivalente à ferredoxina reduzida, as diferenças devidas à ocorrência de fotorrespiração são: (i) o consumo de apenas 1 ATP a mais, o qual pode ainda ser encarado como necessário para refixar o NH_3 produzido na oxidação da glicina; (ii) menos 3 CO_2 reduzidos. É curioso notar que, quando expresso deste modo, não há diferença na utilização de potencial redutor, considerado como o substrato dissipador de energia da fotorrespiração.

Uma função de processo dissipador de energia mais específico proposto para a fotorrespiração é o que ocorre quando as folhas são expostas a elevadas temperatura e intensidade luminosa, tal como ocorre com frequência num dia de Verão. O desenvolvimento de um défice hídrico provoca o fecho dos estomas, o qual origina um abaixamento da concentração de CO_2 nas células da folha. A fotorrespiração funcionaria então como uma "sink" para a energia produzida nas reacções luminosas da fotossíntese, através da actividade oxigenásica da RuBPCase e da refixação do CO_2 liberto pela descarboxilação da glicina. Esta hipótese é suportada pela observada perda de capacidade fotossintética (fotoinibição) que ocorre quando as folhas são iluminadas na ausência de CO_2 e de O_2 . Duas objecções fundamentais impedem que a existência da fotorrespiração seja explicada

apenas pela sua acção protectora contra a fotoinibição: (i) alguns grupos de plantas (e.g. plantas C₄) apresentam níveis das enzimas fotorrespiratórias bastante mais baixos, sem no entanto serem mais susceptíveis à fotoinibição; (ii) parece evidente que, ao longo da evolução, a RuBPCase não pode ter desenvolvido uma adaptação específica de protecção contra a fotoinibição, uma vez que esta enzima também ocorre em bactérias quimiolitotróficas, as quais fixam CO₂ pelo ciclo de Calvin e obtêm energia a partir da oxidação de compostos inorgânicos. Como estes organismos vivem em meio anaeróbio, a presença da RuBPCase com capacidade de actividade oxigenásica não tem qualquer significado na protecção destes organismos contra a fotoinibição.

É possível que a fotorrespiração não tenha uma função definida. Se tal acontecer, e sendo a fotorrespiração um processo que conduz a taxas reduzidas de fotossíntese, pode perguntar-se como é que ele pode ter sido originado num ambiente em que a selecção natural parece eliminar constantemente os organismos menos bem adaptados.

O ciclo de Calvin deve ter surgido pouco tempo após a origem da vida, quando a disponibilidade de compostos orgânicos no meio se tornou insuficiente para as necessidades de uma crescente biomassa de organismos fermentativos. Apesar da sua antiguidade, pensa-se que este ciclo foi originado pela adição de apenas duas novas enzimas (a fosforribulocinase e a RuBPCase) à já existente via dos fosfatos de pentose. Admitindo que a actividade oxigenásica é uma consequência inevitável da química do centro activo da RuBPCase (a reacção de carboxilação pode envolver a formação de um intermediário obrigatório que possa reagir tanto com o O₂ como com o CO₂), então é de esperar que esta enzima tenha tido capacidade potencial para a reacção de oxigenação desde o seu aparecimento. A observação de que a RuBPCase apresenta actividade oxigenásica independentemente da sua origem taxonómica (mesmo quando extraída de bactérias anaeróbias) suporta esta

hipótese. Contudo, essa actividade não seria inicialmente expressa, uma vez que se admite que a atmosfera nessa altura era muito rica em CO_2 e não continha oxigénio, condições que inibiriam completamente a actividade oxigenásica da enzima. Com o desenvolvimento generalizado da fotossíntese, a razão $(\text{O}_2)/(\text{CO}_2)$ da atmosfera terá começado a aumentar até ao seu presente valor de 630:1. Pode imaginar-se que algures durante este processo se começou a formar fosfoglicolato como um produto secundário inevitável da reacção de carboxilação. Como o fosfoglicolato é um inibidor do ciclo de Calvin, os organismos fotossintéticos devem ter tido necessidade de um meio de se livrarem deste composto. Inicialmente, a simples desfosforilação e excreção devem ter bastado, de tal modo que esta capacidade ainda se verifica hoje nalguns organismos. Contudo, a perda de carbono fixado originado por este mecanismo tornou altamente ineficiente o processo fotossintético. A fotorrespiração pode então ter surgido como meio de evitar a acumulação do fosfoglicolato, reciclando, sob a forma de glicerato, 75% do seu carbono de volta ao ciclo de Calvin. Esta explicação está de acordo com a observação de que não há efeitos nocivos para a planta quando a fotorrespiração é reprimida por elevadas concentrações de CO_2 ou baixas de O_2 . Pelo contrário, as plantas fotossintetizam mais eficientemente e crescem melhor em condições inibidoras da fotorrespiração. Estudos levados a cabo com mutantes mostraram que o funcionamento da fotorrespiração é apenas necessário nas condições em que ocorre reacção de oxigenação da RuBPCase, sendo dispensável na sua ausência.

Pode parecer surpreendente que a natureza não tenha conseguido modificar a RuBPCase de modo a torná-la mais específica para o CO_2 , reduzindo a sua afinidade para o O_2 . Se esta hipótese estiver correcta, ela representa um exemplo de uma constrição química básica imposta à evolução da vida no nosso planeta. Reduções na taxa de síntese do glicolato foram conseguidas nas plantas C e CAM (ver adiante), mais

recentes do ponto de vista evolutivo, as quais mantiveram a sua RuBPCase mas melhoraram a eficiência da sua actividade carboxilásica pelo desenvolvimento de mecanismos capazes de diminuir a razão $(O_2)/(CO_2)$ na proximidade do seu centro activo.

A fotorrespiração foi durante muitos anos considerada quase exclusivamente em termos do metabolismo do carbono. A observação de que o processo fotorrespiratório liberta NH_3 à mesma taxa que CO_2 levou a encarar a fotorrespiração como uma via principal no metabolismo do azoto (ver secção "ciclo fotorrespiratório do azoto"). A fotorrespiração pode assim exercer um papel muito importante na célula como processo de controlo e de interligação entre os metabolismos do carbono e do azoto.

IMPORTANCIA DA FOTORRESPIRAÇÃO

A grande importância económica da fotorrespiração resulta deste processo constituir hoje a constrição metabólica mais importante à produtividade vegetal. Sob condições inibitórias para a fotorrespiração, é frequente obter aumentos de 30 a 50% na produção agrícola, embora hajam referências de incrementos superiores a 100%. Até ao presente, o único método prático de inibir a fotorrespiração é o que consiste em reduzir a razão $(O_2)/(CO_2)$ do ar à volta da planta de modo a inibir a reacção de oxigenação da RuBPCase. Uma redução de 5 vezes na razão atmosférica normal de $(O_2)/(CO_2)$ elimina praticamente a fotorrespiração, originando um aumento máximo na taxa fotossintética de acumulação de matéria seca. O único processo economicamente viável de conseguir tal objectivo consiste em aumentar 5 vezes a concentração de CO_2 no interior de estufas. Aliás, o enriquecimento artificial de CO_2 em estufas tornou-se uma prática corrente muito antes da compreensão do seu efeito na fotorrespiração.

FOTOSSINTESE

CAPITULO V

METABOLISMO C₄

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

INTRODUÇÃO

A grande maioria das plantas de interesse agrícola possui o ciclo de Calvin como a única via de fixação do CO_2 . Estas plantas são referidas por "plantas C₃" pois o primeiro produto estável formado após a fixação do CO_2 é um ácido com 3 átomos de carbono (o PGA). Contudo, nalgumas plantas, designadas por "plantas C₄", o CO_2 é primeiramente fixado num ácido orgânico com 4 átomos de carbono (malato, aspartato ou oxaloacetato). Estes compostos são depois transportados para uma região diferente da folha onde são descarboxilados, libertando CO_2 que é posteriormente refixado pelo Ciclo de Calvin. Esta via, originalmente denominada "via dos ácidos dicarboxílicos em C₄", é também conhecida por "via em C₄", "ciclo em C₄" ou "via HSK" (Hatch-Slack-Kortschak), em homenagem a alguns dos principais cientistas que mais contribuíram para a sua elucidação.

Nas folhas das plantas C₄ uma pequena percentagem do CO_2 fixado (<5%) é incorporado em ácidos C₃. A formação deste malato pode ocorrer através de uma segunda carboxilação após a acção da RuBPCase, ou a partir do fosfoenolpiruvato (PEP) originado na glicólise.

DISTRIBUIÇÃO

As espécies C₄ estão presentes em pelo menos 16 famílias de plantas, incluindo mono e dicotiledóneas (ver Tabela V.1). Só têm sido identificadas plantas C₄ pertencentes às angiospérmicas. A fotossíntese em C₄ deve ter surgido em várias ocasiões ao longo da evolução pois não há

nenhuma família de plantas contendo apenas espécies C⁴. Contudo, pode acontecer que dentro de uma família, um determinado gênero, tribo ou subfamília seja constituído exclusivamente por espécies C⁴. Por outro lado, alguns gêneros (e.g. Atriplex) contêm espécies C³ e C⁴ enquanto que outros (e.g. Euphorbia) contêm espécies de plantas dos tipos C³, C⁴ e CAM. As espécies C⁴ são particularmente abundantes nas famílias das gramíneas, ciperáceas e quenopodiáceas.

É curioso notar que a maioria das infestantes de maior importância econômica são espécies C⁴ (Tabela V.2), enquanto que a quase totalidade das culturas agrícolas são C³. As espécies C⁴ mais importantes na agricultura são o milho, o sorgo, a cana-do-açúcar e algumas pastagens.

TABELA V.1 - Alguns exemplos de plantas C₃, C₄ e CAM

| C ₃ | C ₄ | CAM |
|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Agrostis alba</i> | <i>Amaranthus albus</i> | <i>Agave sisalana</i> |
| <i>Arachis hypogea</i> | <i>Amaranthus retroflexus</i> | <i>Aloe arborescens</i> |
| <i>Atriplex hastata</i> | <i>Aristida purpurea</i> | <i>Aloe saponarea</i> |
| <i>Avena sativa</i> | <i>Atriplex rosea</i> | <i>Ananas comosus</i> |
| <i>Beta vulgaris</i> | <i>Atriplex semibaccata</i> | <i>Bryophyllum calycinum</i> |
| <i>Brassica nigra</i> | <i>Bouteloua curtipendula</i> | <i>Bryophyllum fedtschenkoi</i> |
| <i>Chenopodium album</i> | <i>Chloris gayana</i> | <i>Bryophyllum pinnatum</i> |
| <i>Dactylis glomerata</i> | <i>Cynodon dactylon</i> | <i>Bryophyllum tubiflorum</i> |
| <i>Datura stramonium</i> | <i>Cyperus esculentus</i> | <i>Carnegia gigantea</i> |
| <i>Daucus carota</i> | <i>Cyperus rotundus</i> | <i>Crassula lycopodioides</i> |
| <i>Festuca arundinacea</i> | <i>Digitaria sanguinalis</i> | <i>Hoya carnosae</i> |
| <i>Glycine max</i> | <i>Echinochloa crus-galli</i> | <i>Isoetes howellii</i> |
| <i>Gossypium hirsutum</i> | <i>Euphorbia maculata</i> | <i>Kalanchoe blossfeldiana</i> |
| <i>Helianthus annuus</i> | <i>Kochia childsii</i> | <i>Kalanchoe daigremontiana</i> |
| <i>Hordeum vulgare</i> | <i>Panicum antidotale</i> | <i>Kalanchoe tubiflora</i> |
| <i>Lactuca sativa</i> | <i>Panicum capillare</i> | <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> |
| <i>Lolium multiflorum</i> | <i>Paspalum notatum</i> | <i>Nopalea dejecta</i> |
| <i>Oryza sativa</i> | <i>Portulaca oleracea</i> | <i>Opuntia ficus-indica</i> |
| <i>Panicum commutatum</i> | <i>Saccharum officinarum</i> | <i>Opuntia inermis</i> |
| <i>Phalaris canariensis</i> | <i>Salsola kali</i> | <i>Opuntia polyantha</i> |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>Setaria italica</i> | <i>Pereskia grandifolia</i> |
| <i>Poa pratensis</i> | <i>Setaria lutescens</i> | <i>Sedum praealtum</i> |
| <i>Spinacea oleracea</i> | <i>Sorghum bicolor</i> | <i>Sedum telephium</i> |
| <i>Triticum aestivum</i> | <i>Sorghum sudanense</i> | <i>Stapelia gigantea</i> |
| <i>Xanthium strumarium</i> | <i>Zea mays</i> | <i>Welwitschia mirabilis</i> |

TABELA V.2 - Ocorrência de espécies C⁴ entre as 20 infestantes de maior importância econômica à escala mundial

| Espécie | Classificação |
|------------------------|--------------------------|
| Amaranthus hybridus | C ⁴ |
| Amaranthus spinosus | C ⁴ |
| Avena fatua | C ³ |
| Chenopodium album | C ³ |
| Convolvulus arvensis | C ³ |
| Cynodon dactylon | C (NAD-ME) ⁴ |
| Cyperus esculentus | C ⁴ |
| Cyperus rotundus | C (NADP-ME) ⁴ |
| Digitaria sanguinalis | C ⁴ |
| Echinochloa colonum | C ⁴ |
| Echinochloa crus-galli | C (NADP-ME) ⁴ |
| Eichhornia crassipes | C ³ |
| Eleusine indica | C (NAD-ME) ⁴ |
| Imperata cylindrica | C ⁴ |
| Lantana camara | C ³ |
| Panicum maximum | C (PEP-CK) ⁴ |
| Paspalum conjugatum | C ⁴ |
| Portulaca oleracea | C ⁴ |
| Rottboellia exaltata | C ⁴ |
| Sorghum halepense | C (NADP-ME) ⁴ |

CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS PLANTAS C₄

4

As plantas C₄ diferem das plantas C₃ em vários aspectos, nomeadamente:

- aspectos anatômicos e citológicos;
- aspectos fisiológicos e bioquímicos

Aspectos anatômicos e citológicos

Nas folhas das plantas C₄ os cloroplastos encontram-se distribuídos entre dois tipos distintos de células. Estas células encontram-se normalmente dispostas em camadas concêntricas em torno dos feixes vasculares (Fig.V.1). A camada mais interna é formada por células grandes, alongadas, ricas em citoplasma, com paredes celulares espessas e atravessadas por numerosos plasmodesmata, contendo muitos e desenvolvidos cloroplastos, as quais constituem como que uma "bainha" que envolve o feixe vascular - por tal razão, são denominadas "células da bainha dos feixes". Este conjunto, por sua vez, encontra-se envolvido por camadas mais ou menos concêntricas de "células do mesófilo", também ricas em cloroplastos. Quando observado em corte transversal, este arranjo das células fotossintéticas em torno dos feixes vasculares tem o aspecto de uma coroa, razão pela qual este tipo de anatomia foliar é conhecida por "estrutura do tipo kranz" (do alemão "coroa"). É hoje conhecida uma grande variabilidade na anatomia kranz em diferentes espécies. As plantas C₃ podem também ter uma camada de células à volta do tecido vascular, as quais são, no entanto, nitidamente diferentes das células kranz.

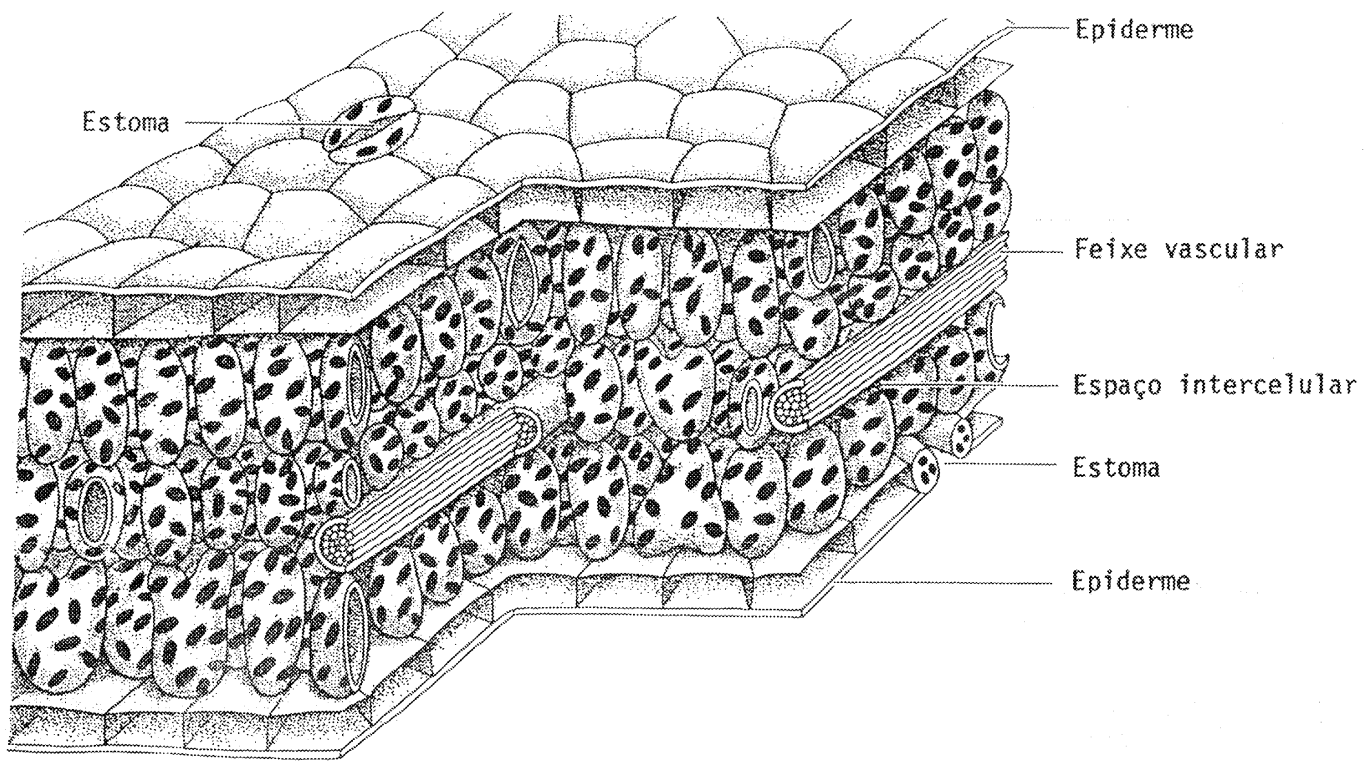


Fig.V.1A - Esquema da estrutura anatômica das folhas das plantas do tipo C₃.

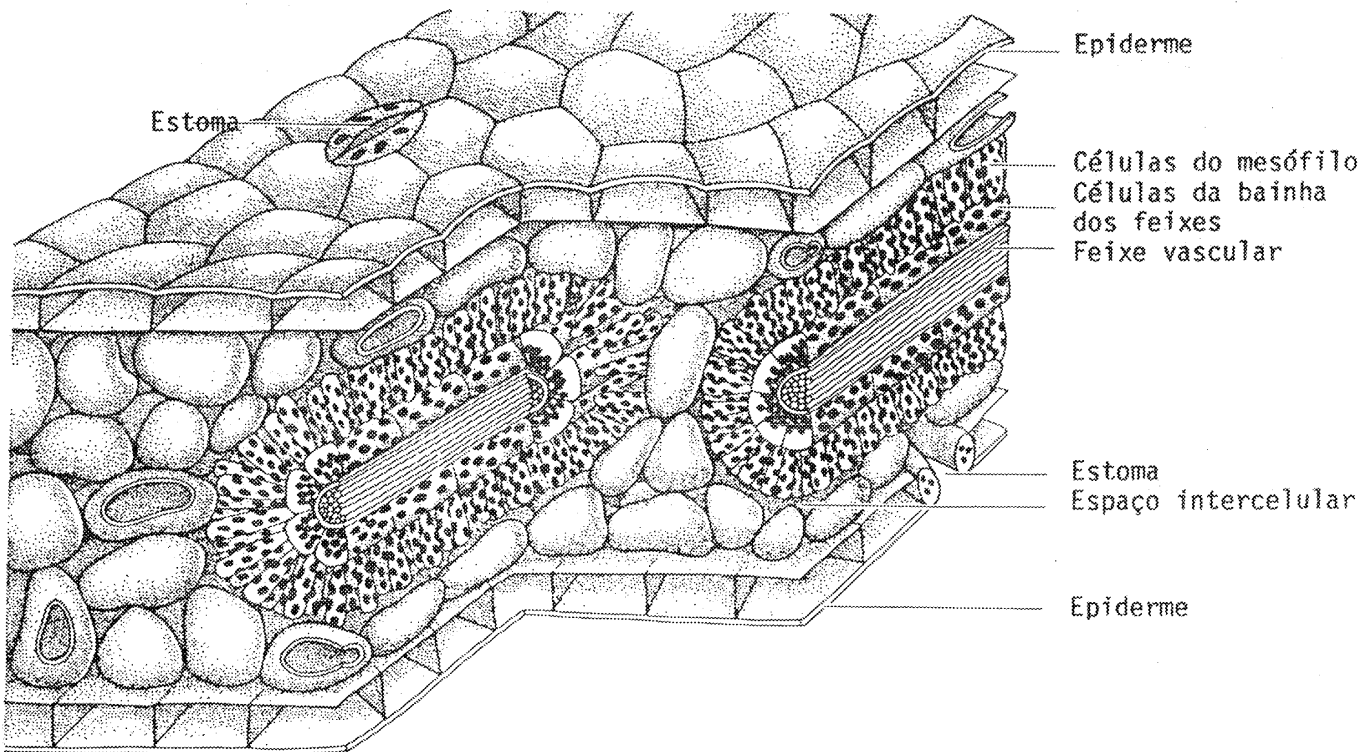


Fig.V.1B - Esquema da estrutura anatômica das folhas das plantas do tipo C₄.

Aspectos fisiológicos e bioquímicos

A tabela V.3 mostra algumas características fisiológicas e bioquímicas que distinguem as plantas C₄ das plantas C₃ e CAM.

Uma das características apresentadas na tabela V.3 é o ponto de compensação para o CO₂, definido como a concentração de CO₂ para a qual a fotossíntese ocorre a uma taxa que equilibra a taxa a que o CO₂ é liberto da folha, de tal modo que não há ganho nem perda líquida de CO₂ pela planta. A 25°C e a 21% (v/v) de O₂, as folhas das plantas C₃ têm pontos de compensação para o CO₂ da ordem dos 40-60 ppm (podendo atingir valores de 150 ppm), ao passo que os das folhas das plantas C₄ são muito mais baixos, frequentemente próximos de zero. Assim sendo, as folhas das plantas C₄ podem fixar CO₂ a concentrações atmosféricas de CO₂ muito mais baixas do que as das plantas C₃.

TABELA V.3 - Algumas características fisiológicas e bioquímicas que distinguem as plantas C₄ das plantas C₃ e CAM

| Características | Plantas tipo C ₃ | Plantas tipo C ₄ | Plantas tipo CAM |
|--|--|---|--|
| Via de fixação do CO ₂ | Ciclo de Calvin | Via em C ₄ seguida do ciclo de Calvin | Via em C ₄ e ciclo de Calvin |
| Ponto de compensação para o CO ₂ | 40 a 150 ppm | 0 a 10 ppm | 0 a 5 ppm às escuras 0 a 200 ppm à luz |
| Fotorrespiração | Elevada e fácil de detectar | Muito baixa e difícil de detectar | Muito variável com as cond. ambientais |
| Taxa de fotossíntese aparente com luz solar intensa | 15 a 35mg de CO ₂ por dm ² de área foliar por hora | 40 a 80 mg de CO ₂ por dm ² de área foliar por hora | 1 a 10 mg de CO ₂ por dm ² de área foliar por hora |
| Resposta da fotossíntese aparente ao aumento da intensidade luminosa | A saturação é atingida com baixas intensidades luminosas | A saturação é difícil de atingir, mesmo com luz solar intensa | Intermédia em relação às anteriores |
| Temperatura óptima para a fotossíntese | 10 a 25°C | 30 a 45°C | ~ 35°C |
| Abertura estomática à luz | Grande | Fraca | Nula ou quase nula |
| Taxa transpiratória (g H ₂ O por g matéria seca) | 450 a 950 | 250 a 350 | 50 a 55 |

DEFINIÇÃO DE PLANTA C₄

Considera-se hoje que uma dada espécie é uma planta C₄ quando apresenta as seguintes características:

- Os produtos iniciais primários da fotossíntese são os ácidos dicarboxílicos em C₄ oxaloacetato, malato e aspartato;
- O CO₂ inicialmente fixado nos ácidos em C₄ é fornecido ao ciclo de Calvin (o átomo de carbono 4 do ácido em C₄ vai para a posição 1 do PGA);
- Este processo ocorre na presença de luz, ao contrário do que sucede com as plantas CAM;
- Existem normalmente 2 tipos de células fotossintéticas: as do mesófilo e as da bainha dos feixes.

Tem sido questionado ser a anatomia kranz absolutamente essencial para a via em C₄. Até à data, todas as espécies identificadas como C₄ apresentam anatomia kranz. É curioso notar que culturas de tecidos fotossintéticos de espécies C₄ (e.g. *Amaranthus retroflexus*, *Froelichia gracilis*, *Portulaca oleracea*) não apresentam anatomia kranz, embora apresentem baixos níveis de fotorrespiração e os ácidos em C₄ sejam os principais produtos iniciais da fixação de CO₂. Contudo, desconhece-se se se trata da via em C₄ a funcionar de modo eficiente na ausência da anatomia kranz. Assim, por exemplo, a presença de sacarose no meio de cultura daqueles tecidos poderá explicar, por acção da enzima PEP carboxilase, a formação de um ácido em C₄ a partir do PEP produzido na glicólise.

BIOQUÍMICA DA FIXAÇÃO DO CO₂ NAS PLANTAS C₃ C₄

A via em C₄ pode ser subdividida em duas fases: uma fase de carboxilação, que ocorre nas células do mesófilo, e uma fase de descarboxilação, que ocorre nas células da bainha dos feixes (Fig.V.2). A localização intracelular das enzimas que participam nestas duas fases está indicada na Tabela V.4. Destas enzimas, apenas a piruvato ortofosfato dicinase é exclusiva das plantas C₄. Todas as outras ocorrem nas plantas C₃, embora as suas actividades sejam normalmente muito baixas. Em relação às enzimas que estão na base da subdivisão das plantas C₃ C₄ (ver adiante), a sua actividade é muito maior nas plantas desse subgrupo do que nas plantas dos outros subgrupos ou nas plantas C₃. As actividades das enzimas do ciclo de Calvin são semelhantes nas plantas C₃ e C₄.

TABELA V.4 - Localização intracelular das enzimas que participam na via em C₄

| ENZIMA | LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR |
|-------------------------------------|---|
| CÉLULAS DO MESÓFILO | |
| PEP carboxilase | Citoplasma |
| Anidrase carbónica | Citoplasma |
| Alanina aminotransferase | Citoplasma |
| Aspartato aminotransferase | Cloroplasto (NADP-ME); Citoplasma (NAD-ME, PEP-CK) |
| Piruvato ortofosfato dicinase | Cloroplasto |
| Pirofosfatase inorgânica | Cloroplasto |
| Adenilato cinase | Cloroplasto |
| Malato desidrogenase (NADP+) | Cloroplasto |
| CÉLULAS DA BAINHA DOS FEIXES | |
| Alanina aminotransferase | Citoplasma |
| Aspartato aminotransferase | Mitocôndrio |
| Malato desidrogenase | Cloroplasto |
| Enzima málica (NAD+) | Mitocôndrio |
| Enzima málica (NADP+) | Cloroplasto |
| PEP carboxicinas | Citoplasma |

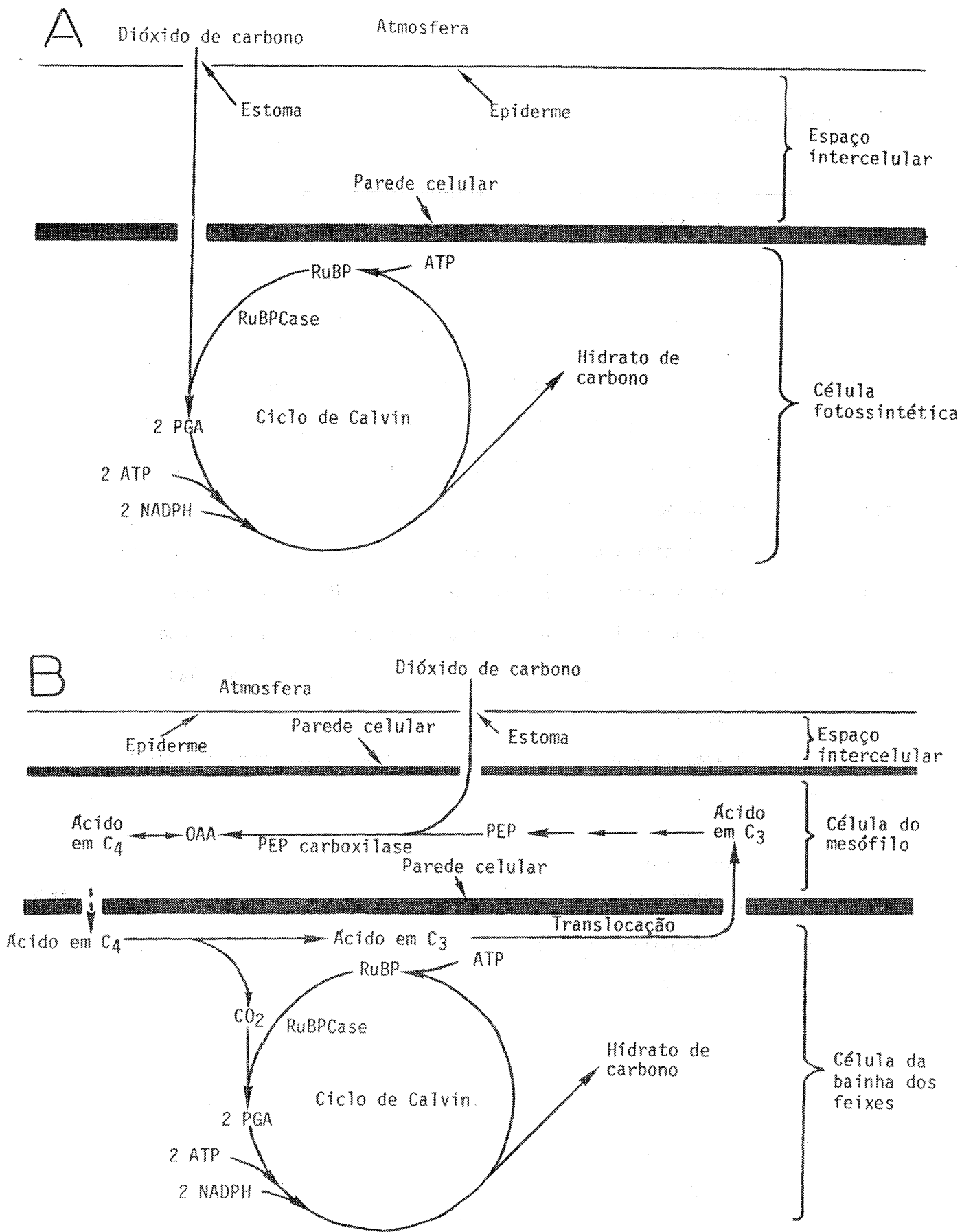


Fig.V.2 - (A) Esquema simplificado da via em C₃. (B) Esquema simplificado da via em C₄.

FASE DE CARBOXILAÇÃO

Esta fase ocorre nas células do mesófilo das plantas C₄ e consiste na conversão de precursores em C₃ + CO₂ atmosférico em ácidos em C₄ através da acção da enzima PEP carboxilase. A reacção catalisada por esta enzima é comum a todas as plantas C₄. A PEP carboxilase é uma enzima citoplasmática, apresentando uma elevada afinidade para o HCO₃⁻, o qual é o seu substrato (e não o CO₂). Contudo, o citoplasma das células do mesófilo contém uma elevada actividade da enzima anidrase carbónica, a qual permite uma rápida conversão do CO₂ dissolvido a HCO₃⁻.

A PEP carboxilase está presente nas folhas das plantas C₄ em quantidades muito superiores às encontradas nas folhas das plantas C₃ (Tabela V.7). Por outro lado, enquanto que a RuBPCase está presente em maior quantidade nas células da bainha dos feixes, a PEP carboxilase é mais abundante nas células do mesófilo.

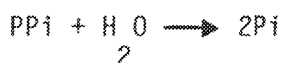
Há 3 vias alternativas na fase de carboxilação comuns à maioria das espécies C₄, embora seja variável a proporção em que funcionam:

- a) A conversão de piruvato e CO₂ a malato, envolvendo 6 enzimas, com o consumo de 2 ATP e 1 NADPH por CO₂ fixado:

Piruvato ortofosfato dicinase, EC 2.7.9.1



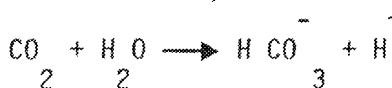
Pirofosfatase inorgânica, EC 3.6.1.1



Adenilato cinase, EC 2.7.4.3



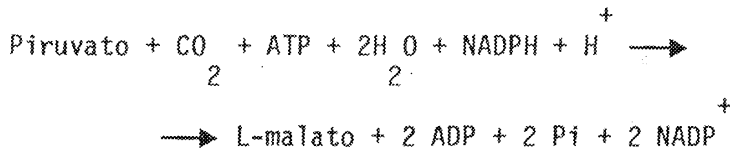
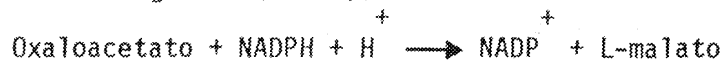
Anidrase carbónica, EC 4.2.1.1



PEP carboxilase, EC 4.1.1.31

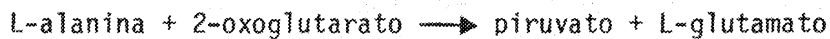


Malato desidrogenase (NADP⁺), EC 1.1.1.82

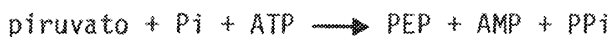


- b) A conversão de alanina e CO₂ a aspartato, envolvendo 7 enzimas, com o consumo de 2 ATP por CO₂ fixado:

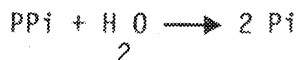
Alanina aminotransferase, EC 2.6.1.2



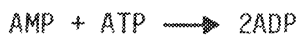
Piruvato ortofosfato dicinase, EC 2.7.9.1



Pirofosfatase inorgânica, EC 3.6.1.1



Adenilato cinase, EC 2.7.4.3



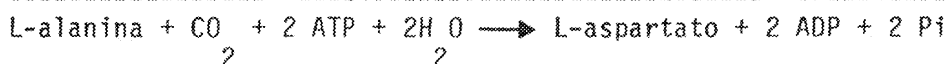
Anidrase carbónica, EC 4.2.1.1



PEP carboxilase, EC 4.1.1.31



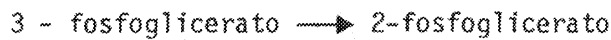
Aspartato aminotransferase, EC 2.6.1.1



O glutamato e o 2-oxoglutarato são reciclados pelo acoplamento das reacções catalisadas pelas duas aminotransferases.

c) A conversão de PGA e CO₂ a malato e Pi, envolvendo 5 enzimas, com o consumo de 1 NADPH por CO₂ fixado:

Fosfoglicerato fosfomutase, EC 5.4.2.1



Enolase, EC 4.2.1.11



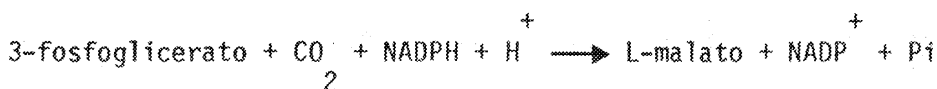
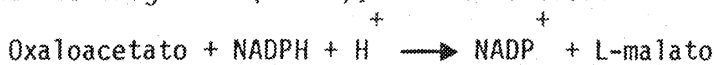
Anidrase carbónica, EC 4.2.1.1



PEP carboxilase, EC 4.1.1.31



Malato desidrogenase (NADP⁺), EC 1.1.1.82



É, portanto, necessária energia em qualquer das alternativas da fase de carboxilação da via em C₄, podendo qualquer dos 3 metabolitos, piruvato, alanina e PGA, servir de precursor nesta fase. A quantidade de ATP e NADPH requerida por CO₂ fixado em ácidos C₄ dependerá das taxas relativas de fixação pelas 3 vias alternativas de carboxilação.

FASE DE DESCARBOXILAÇÃO

Esta fase ocorre nas células da bainha dos feixes das espécies C₄. Estas plantas podem ser divididas em 3 sub-grupos de acordo com o mecanismo responsável pela descarboxilação dos ácidos em C₄ (Tabela V.5): NADP-enzima málica (NADP-ME), NAD-enzima málica (NAD-ME) e PEP carboxicínase (PEP-CK).

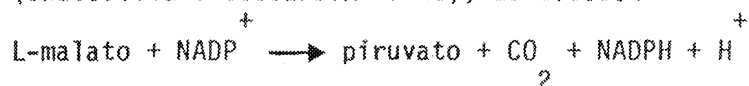
Tabela V.5 - Subgrupos de plantas C₄

| Subgrupo | Exemplos | Enzima fixadora do CO ₂ no mesófilo | Forma de translocação do CO ₂ do mesófilo para a bainha dos feixes | Enzima responsável pela produção de CO ₂ na bainha dos feixes | Composto translocado para o mesófilo |
|----------|---|--|---|--|--------------------------------------|
| NADP-ME | <i>Digitaria sanguinalis</i> | | | | |
| | <i>Saccharum officinarum</i> | PEP carboxilase | L-malato | enzima málica (NADP ⁺) | piruvato |
| | <i>Setaria tutescens</i> | | | | |
| | <i>Sorghum sudanense</i> <i>Zea mays</i> | | | | |
| NAD-ME | <i>Amaranthus edulis</i> | | | | |
| | <i>Amaranthus retroflexus</i> | | | | |
| | <i>Atriplex spongiosa</i> | PEP carboxilase | L-aspartato | enzima málica (NAD ⁺) | alanina |
| | <i>Panicum millaceum</i> <i>Portulaca oleracea</i> | | | | |
| PEP-CK | <i>Chloris gayana</i> | | | | |
| | <i>Panicum maximum</i> | PEP carboxilase | L-aspartato | PEP carboxicinas | PEP |
| | <i>Sporobolus fimbriatus</i> | | | | |

a) NADP-ME

Nas espécies NADP-ME, por vezes também denominadas "plantas C₄ formadoras de malato", o malato e o piruvato são os principais metabolitos transportados entre as células do mesófilo e as da bainha dos feixes.

O malato produzido nas células do mesófilo é translocado para os cloroplastos das células da bainha dos feixes, onde é descarboxilado por acção da enzima málica (NADP⁺), mais correctamente designada por malato desidrogenase (oxaloacetato descarboxilante), EC 1.1.1.40:



O CO₂ assim produzido é refixado no ciclo de Calvin pela RuBPCase. A descarboxilação do malato e o ciclo de Calvin estão acoplados de modo que a descarboxilação do malato fornece CO₂ ao ciclo de Calvin, enquanto que este reoxida o NADPH. O piruvato produzido retorna aos cloroplastos das células do mesófilo onde é convertido em PEP.

Embora o malato seja o principal composto marcado radioactivamente quando se fornece ¹⁴CO₂ a folhas de espécies NADP-ME, estas plantas fixam também quantidades significativas de CO₂ na forma de aspartato. Um processo idêntico ocorre nas espécies NAD-ME e PEP-CK.

b) NAD-ME

Nas espécies NAD-ME, por vezes também denominadas "plantas C₄ formadoras de aspartato do tipo 2", o aspartato e a alanina parecem ser os principais metabolitos transportados entre as células do mesófilo e as da bainha dos feixes.

A enzima responsável pela reacção de descarboxilação é a enzima málica (NAD⁺), mais correctamente denominada malato desidrogenase (descarboxilante), EC 1.1.1.39, localizada nos abundantes mitocôndrios das

células da bainha dos feixes. Estas plantas possuem baixas actividades da enzima málica (NADP⁺) e da PEP carboxicínase, mas elevadas actividades das enzimas aspartato e alanina aminotransferases, tanto nas células do mesófilo como nas da bainha dos feixes.

A fase de descarboxilação nas espécies NAD-ME envolve 4 enzimas:

Aspartato aminotransferase, EC 2.6.1.1

L-aspartato + 2-oxoglutarato → oxaloacetato + L-glutamato

Malato desidrogenase, EC 1.1.1.37

Oxaloacetato + NADH + H⁺ → L-malato + NAD⁺

Enzima málica (NAD⁺), EC 1.1.1.39

L-malato + NAD⁺ → piruvato + CO₂ + NADH + H⁺

Alanina aminotransferase, EC 2.6.1.2

piruvato + L-glutamato → L-alanina + 2-oxoglutarato

L-aspartato → L-alanina + CO₂

Notar que não ocorreu variação líquida de energia ou potencial redutor nesta sequência de reacções. O CO₂ assim produzido é refixado no ciclo de Calvin pela RuBPCase, enquanto que a alanina é transportada para as células do mesófilo.

c) PEP-CK

Nas espécies PEP-CK, por vezes também denominadas "plantas C₄ formadoras de aspartato do tipo 1", o aspartato e o PEP são os principais metabolitos transportados entre as células do mesófilo e as da bainha dos feixes.

A enzima responsável pela reacção de descarboxilação é a PEP carboxicínase, EC 4.1.1.49, localizada no citoplasma das células da bainha

dos feixes. Estas plantas possuem baixas actividades da enzima málica (NADP⁺), mas elevadas actividades das enzimas PEP carboxicinase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.

A fase de descarboxilação nas espécies PEP-CK envolve 2 enzimas:

Aspartato aminotransferase, EC 2.6.1.1

L-aspartato + 2-oxoglutarato → oxaloacetato + L-glutamato

PEP carboxicinase, EC 4.1.1.49

Oxaloacetato + ATP → PEP + CO₂ + ADP

L-aspartato + 2-oxoglutarato + ATP → PEP + L-glutamato + CO₂ + ADP

O CO₂ assim produzido é refixado no ciclo de Calvin pela RuBPCase. Não se conhece bem o destino do PEP, embora se admita que ele seja transportado de volta às células do mesófilo. As espécies PEP-CK devem possuir um "shuttle" piruvato-alanina ou 2-oxoglutarato-glutamato para transferência de azoto das células da bainha dos feixes de volta às células do mesófilo, de modo a permitirem um funcionamento contínuo das transaminases.

NECESSIDADES ENERGÉTICAS DA VIA EM C₄

A energia necessária para a fixação do CO₂ pelo ciclo de Calvin é idêntica nos 3 sub-grupos de plantas C₄. Contudo, a energia adicional necessária para o funcionamento da via em C₄ varia consoante o sub-grupo de plantas C₄ considerado (Tabela V.6).

Várias razões contribuem para que os valores apresentados na Tabela V.6 não devam ser considerados em termos absolutos. (i) Qualquer espécie C₄ utiliza preferencialmente uma das 3 vias alternativas de descarboxilação, mas não exclusivamente. Do mesmo modo, é muito provável

que tanto o malato como o aspartato sejam transportados das células do mesófilo para as da bainha dos feixes, embora numa proporção variável consoante a espécie considerada. (ii) Após a reacção de descarboxilação dos ácidos em C_4 nas células da bainha dos feixes, o CO_2 libertado é refixado pela RuBPCase. Contudo, o PGA assim produzido pode ser reduzido no local de síntese (cloroplastos das células da bainha dos feixes) ou ser transportado para os cloroplastos das células do mesófilo para aí ser reduzido.

Algumas diferenças fotoquímicas nos cloroplastos dos diferentes sub-grupos de plantas C_4 permitem explicar as diferentes necessidades energéticas da fixação do CO_2 naquelas plantas (Tabela V.6). Nas espécies NADP-ME, 70 a 100% do potencial redutor é produzido nos cloroplastos das células do mesófilo. Os cloroplastos das células da bainha dos feixes apresentam uma deficiência na actividade do fotossistema II, apresentando uma estrutura variável desde conterem grana rudimentar (caso do milho) a serem completamente agranares (casos do sorgo e cana-do-açúcar). Por isso, os cloroplastos das células da bainha dos feixes nas espécies NADP-ME produzem muito pouco potencial redutor, o sorgo e a cana-do-açúcar representando casos extremos (0-5%). Assim, a fixação de um CO_2 por acção da RuBPCase nos cloroplastos das células da bainha dos feixes origina 2 moléculas de PGA. Num caso extremo, após uma volta do ciclo em C_4 , um NADPH é transferido dos cloroplastos das células do mesófilo para os das células da bainha dos feixes (o malato produzido nas células do mesófilo é descarboxilado nas células da bainha dos feixes com a produção de 1 NADPH) para aí reduzir uma molécula de PGA. O outro PGA poderá ser transferido para os cloroplastos das células do mesófilo e ser aí reduzido, de tal modo que, neste caso, a fase redutiva da assimilação do CO_2 funcionará a taxas iguais nos 2 tipos de células, com todo o potencial redutor a ser produzido nos cloroplastos do mesófilo.

TABELA V.6 - Necessidades energéticas do ciclo em C₄ e do ciclo de Calvin por CO₂ fixado para cada um dos sub-grupos de plantas C₄.

| Sub-grupo | Fonte de energia | Necessidades do ciclo em C ₄ | | Necessidades do ciclo de Calvin | Necessidades energéticas totais por CO ₂ fixado |
|-----------|------------------|---|------------------------------|---------------------------------|--|
| | | Células do mesófilo | Células da bainha dos feixes | | |
| NADP-ME | ATP | 2 | 0 | 3 | 5 |
| | NADPH | 1 | 0 | 1* | 2 |
| NAD-ME | ATP | 2 | 0 | 3 | 5 |
| | NADPH | 0 | 0 | 2 | 2 |
| PEP-CK | ATP | 0 | 1 | 3 | 4 |
| | NADPH | 0 | 0 | 2 | 2 |

* Forma-se um NADPH na reacção de descarboxilação catalisada pela enzima malato desidrogenase (oxaloacetato descarboxilante) (NADP+).

As espécies NAD-ME e PEP-CK, ao contrário das NADP-ME, contém grana tanto nos cloroplastos das células do mesófilo como nos das células da bainha dos feixes, necessitando apenas do consumo de ATP para o funcionamento da via em C₄ (Tabela V.6).

ASSIMILAÇÃO DO AZOTO NAS FOLHAS DAS PLANTAS C₄

Não é conhecida qualquer ligação directa entre a assimilação do azoto e a via em C₄. Contudo, as células do mesófilo são encaradas como o principal local de assimilação do azoto nas folhas das plantas C₄ por várias razões: (i) As plantas C₄ contêm mais de 80% da actividade enzimática de redução do nitrato a amónio (enzimas nitrato redutase e nitrito redutase) localizada nas células do mesófilo. (ii) Em relação às

enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, enquanto que alguns estudos indicam estarem principalmente localizadas nas células do mesófilo, outros indicam uma distribuição mais uniforme pelos 2 tipos de células. Assim, o potencial redutor gerado nas células do mesófilo poderá ser utilizado na síntese de malato, redução do PGA transportado das células da bainha dos feixes e assimilação do azoto. O potencial redutor gerado nas células da bainha dos feixes pelas reacções fotoquímicas e/ou pela descarboxilação do malato será usado preferencialmente no ciclo de Calvin.

Nas folhas das plantas C_4 , cerca de 80% da actividade da enzima glutamato desidrogenase está localizada nos mitocóndrios das células da bainha dos feixes. Uma vez que ocorre fotorrespiração nestas células, o amónio libertado na reacção de descarboxilação da glicina poderá ser reassimilado no mitocóndrio pela glutamato desidrogenase ou no cloroplasto pela acção conjunta das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase.

FUNÇÃO DA VIA EM C_4

Poderá perguntar-se qual a função da via em C_4 , i.e., porque é que as plantas fixam CO_2 em ácidos orgânicos com 4 átomos de carbono (com gasto de energia), para depois o libertarem e refixarem por acção da enzima RuBPCase. A resposta é dada por observação dos pontos de compensação para o CO_2 das plantas C_2 e C_4 . Para concentrações baixas de CO_2 as plantas C_4 conseguem fixar muito mais CO_2 do que as plantas C_3 , apresentando por isso vantagem selectiva. Tal é devido ao baixo K_m da PEP carboxilase para o HCO_3^- . Em contrapartida, a saturação luminosa não é atingida nas plantas C_4 mesmo quando a luz é muito intensa. Tal resulta provavelmente de o factor limitante da fotossíntese nas plantas C_4 deixar de ser o CO_2 para passar a ser o próprio aparelho fotoquímico. As plantas C_4

apresentam-se assim em grande vantagem em relação às C_3 em condições de elevadas temperatura e intensidade luminosa (quando a concentração de CO_2 dentro da célula decresce devido ao fecho dos estomas), não só devido ao mais baixo ponto de compensação para o CO_2 como à menor taxa fotorrespiratória (Tabela V.3). Em condições moderadas de temperatura e luz, a vantagem das plantas C_4 em relação às C_3 é menos marcante ou mesmo ausente. Na realidade, para baixas intensidades luminosas, enquanto que a taxa de fotorrespiração é baixa nas plantas C_3 , a energia adicional requerida pelas plantas C_4 para fixar o CO_2 poderá resultar numa eficiência fotossintética mais baixa do que nas plantas C_3 . Para intensidades luminosas elevadas, em que há excesso de energia fotossintética mas o CO_2 é limitante, as plantas C_4 podem usar esse excesso de energia na via em C_4 , enquanto que nas plantas C_3 tal resulta numa maior taxa de fotorrespiração.

A via em C_4 actua como um mecanismo de concentrar CO_2 (Fig.V.3), i.e., a descarboxilação do aspartato ou malato nas células da bainha dos feixes aumenta a razão $(CO_2)/(O_2)$ na vizinhança da RuBPCase, o que tem 2 efeitos: um aumento da taxa de fixação de CO_2 devido ao relativamente elevado K_m da RuBPCase para o CO_2 ; uma redução na taxa da fotorrespiração por aumentar a razão das actividades carboxilásica/oxigenásica.

Tem também sido sugerido que as plantas C_4 utilizam o azoto do solo de modo mais eficiente que as plantas C_3 , uma vez que necessitam de sintetizar muito menos RuBPCase que as plantas C_3 para a fixação de uma dada quantidade de CO_2 .

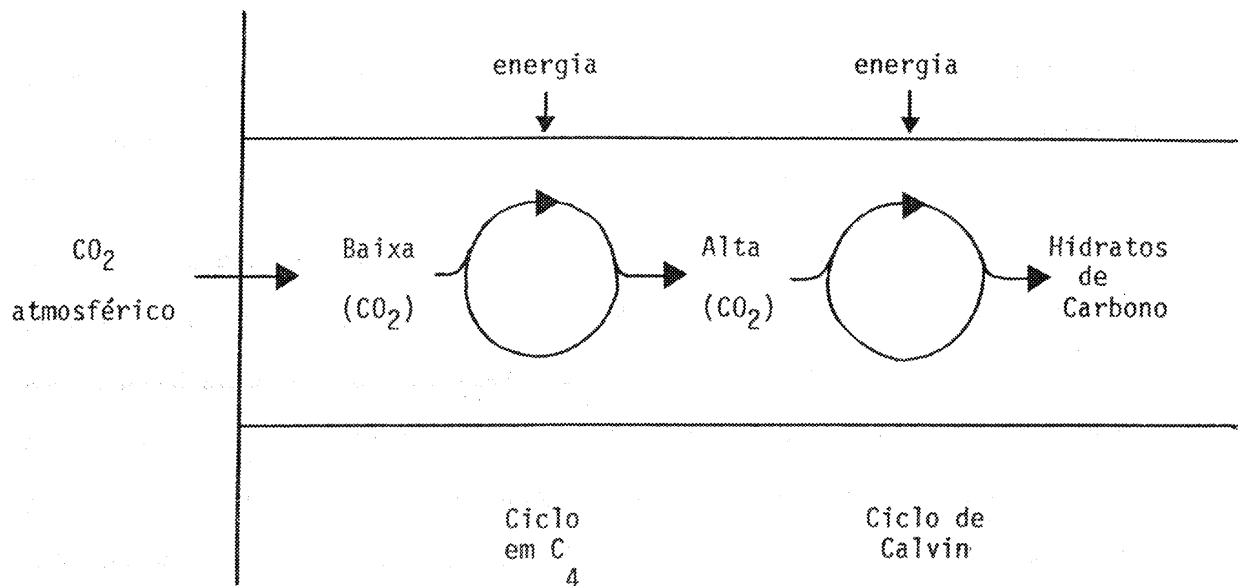


Fig. V.3 - Fotossíntese em C₄.

Algumas plantas desenvolveram uma bomba metabólica de CO₂, movida por compostos ricos em energia, a qual capta o CO₂ atmosférico numa camada exterior de células fotossintéticas (mesófilo), enviando-o para uma camada mais interna (bainha dos feixes) onde é assimilado.

FOTORRESPIRAÇÃO NAS PLANTAS C₄

Contrariamente ao que se observa nas plantas C₃, os sintomas externos da fotorrespiração estão ausentes nas plantas C₄, i.e., (i) a sua taxa fotossintética não é aumentada pela redução da concentração atmosférica de O₂, (ii) o seu ponto de compensação para o CO₂ é próximo de zero, e (iii) não libertam CO₂, nem mesmo quando expostas a uma atmosfera sem CO₂ na presença de luz. Contudo, as folhas das plantas C₄ contêm todas as enzimas da fotorrespiração, as quais estão predominantemente localizadas nas células da bainha dos feixes, apresentando níveis de fotorrespiração

mais baixos do que os das plantas C₃. Uma folha de milho, por exemplo, apresenta uma taxa de fotorrespiração da ordem dos 20% da observada numa planta C₃ típica.

Três razões fundamentais contribuem para as reduzidas taxas de fotorrespiração e de libertação de CO₂ observadas nas folhas das plantas C₄: (i) As actividades das enzimas fotorrespiratórias são mais baixas nas folhas das plantas C₄ do que nas das C₃. (ii) A via em C₄, aumentando a razão de actividades carboxilação/oxigenação da enzima RuBPCase, reduz drasticamente a taxa de fotorrespiração nestas plantas. (iii) Algum CO₂ que escape do processo fotorrespiratório nas células da bainha dos feixes é provavelmente apanhado e reciclado ao passar pelas células do mesófilo ricas em PEP carboxilase.

PLANTAS INTERMEDIAS C₃-C₄

Algumas espécies não podem ser classificadas nem como C₃ nem como C₄ por apresentarem algumas características de ambos os grupos (Tabela V.7). Têm também sido referidos casos de plantas em que as folhas mais jovens se comportam como C₃ enquanto que as mais velhas se comportam como C₄ (ex: *Mollugo nudicaulis*). Poderá especular-se que as plantas C₃ ou C₄ puras constituem casos extremos de um espectro contínuo.

Devido às melhores taxas de crescimento das plantas C₄ em dadas condições foi sugerida a introdução, por hibridação, das características C₄ em plantas C₃ de importância agrícola. Assim, observou-se que alguns híbridos obtidos experimentalmente entre espécies C₃ e C₄ do género *Atriplex* produziam gerações com uma gama de actividades da PEP carboxilase e vários graus de anatomia tipo Kranz. Experiências realizadas com estes híbridos mostraram que metade do CO₂ era fixado em ácidos em C₄, enquanto

que a outra metade aparecia no PGA. Contudo, a maioria do carbono fixado pela PEP carboxilase era libertado na zona errada da folha, de tal modo que não era refixado pelo RuBPCase. Tal resultou provavelmente de uma anatomia foliar intermédia entre a das plantas C₃ e C₄, pois o ponto de compensação para o CO₂ do híbrido era idêntico ao da planta C₃.

O género *Mollugo* contém naturalmente espécies C₃, C₄ e espécies intermédias. Assim, por exemplo, os diferentes ecótipos de *Mollugo verticillata* apresentam graus variáveis de plantas intermédias C₃-C₄. Outros exemplos de espécies intermédias C₃-C₄ são *Panicum milioides* (Tabela V.7) e *Moricandia arvensis*. Contudo, estas plantas não apresentam a compartimentação diferencial da PEP carboxilase e RuBPCase entre os diferentes tipos de células fotossintéticas característica das plantas C₄. Tem sido sugerido que, nestas plantas, em condições atmosféricas normais, a taxa de fixação do CO₂ externo através da PEP carboxilase é relativamente pequena em relação à da fixação através da RuBPCase.

TABELA V.7 - Características fotossintéticas intermédias entre C₃ e C₄ de *Panicum milioides*

| Característica | Planta C ₃ típica | P. <i>milioides</i> | Planta C ₄ típica |
|---|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Ponto de compensação para o CO ₂ (ppm) | 40-60 | 16 | 0-5 |
| Inibição da fotossíntese pelo oxigénio (21% versus 2%(v/v)) | 30% | 15-20% | 0% |
| Actividade relativa da PEP carboxilase | 27 | 147 | >1000 |
| Anatomia foliar | não-kranz | intermédia | kranz |

FOTOSSINTESE

CAPITULO VI

METABOLISMO CAM

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

VI - METABOLISMO CAM

CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS PLANTAS DO TIPO CAM

O metabolismo ácido das Crassuláceas é um processo fotossintético, nomeado a partir da família das Crassuláceas, onde se observou pela primeira vez uma propriedade característica deste processo: a acumulação nocturna de ácido málico. A sigla correspondente em português é a da MAC, embora seja talvez preferível utilizar a sigla do inglês CAM por ser de utilização praticamente universal.

O CAM pode ser definido como uma flutuação diária massiva de acidez titulável, provocada pelo ácido málico. Embora o ácido cítrico e outros ácidos possam também contribuir para tal flutuação, existem muito poucos estudos sobre estes.

Numa planta CAM típica, a flutuação diária nos níveis de ácidos orgânicos com 4 átomos de carbono (predominantemente o ácido málico) resulta de:

Durante a noite

- fixação nocturna de CO_2 , numa reacção catalisada pela enzima PEP carboxilase, consumindo PEP para produzir oxaloacetato;

- o oxaloacetato assim produzido é rapidamente reduzido a malato pela enzima malato desidrogenase;

- o malato é então transportado para os grandes vacúolos das células das folhas, que acumulam o malato sob a forma de ácido málico;

- observa-se, por isso, uma diminuição do pH do suco vacuolar durante a noite.

Durante o dia

- No período de iluminação subsequente o ácido málico sai do vacúolo, processo este acompanhado por um aumento do pH do conteúdo vacuolar;

- fora do vacúolo, o malato é descarboxilado, produzindo CO_2 e um fragmento com 3 átomos de carbono (o piruvato ou o PEP);

- O CO_2 assim libertado é fixado fotossinteticamente pelas enzimas do ciclo de Calvin;

- os fragmentos com 3 átomos de carbono são utilizados na síntese de hidratos de carbono de reserva.

Esta alternância na concentração de ácidos orgânicos é acompanhada por uma alternância na abertura e fecho dos estomas e na quantidade de hidratos de carbono de reserva. Contrariamente ao que se observa na maioria das plantas, nas plantas do tipo CAM os estomas estão abertos durante a noite (permitindo a entrada de CO_2) e fechados durante as horas da luz (durante a fase de descarboxilação e fixação fotossintética). O comportamento estomático das plantas CAM terá assim vantagens do ponto de vista de economia de água, pois o fecho dos estomas durante as horas de maior calor reduzirá a taxa transpiratória.

O metabolismo CAM envolve uma fixação de CO_2 às escuras de natureza não-autotrófica, envolvendo reacções e enzimas de ocorrência praticamente universal, incluindo as células animais. A sua inclusão no metabolismo fotossintético deve-se à assimilação do CO_2 ser feita, em última análise, pelo ciclo de Calvin.

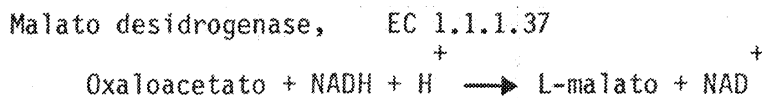
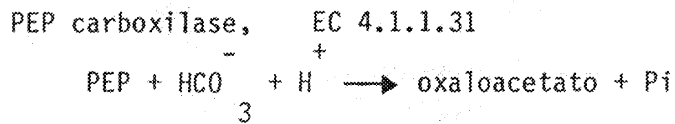
Critério utilizado na definição de uma planta CAM:

- flutuação diária no nível de ácidos orgânicos;
- flutuação diária recíproca no nível de hidratos de carbono de reserva;
- actividades elevadas da enzima PEP carboxilase e de uma descarboxilase activa;

- grandes vacúolos de reserva, localizados em algumas células com cloroplastos;
- plantas tipo suculento;
- trocas gasosas nocturnas.

FIXAÇÃO DO CO₂ E SÍNTESE DO MALATO

Duas reacções participam na fixação do CO₂ e síntese do malato nas plantas tipo CAM:



O PEP é sintetizado através das reacções da glicólise, a partir da mobilização do amido e outros hidratos de carbono de reserva (Fig.VI.1). A redução do oxaloacetato pode ser acoplada à reacção catalisada pela enzima glicolítica gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, de tal modo que a produção de ácido málico a partir do amido será auto-suficiente do ponto de vista energético.

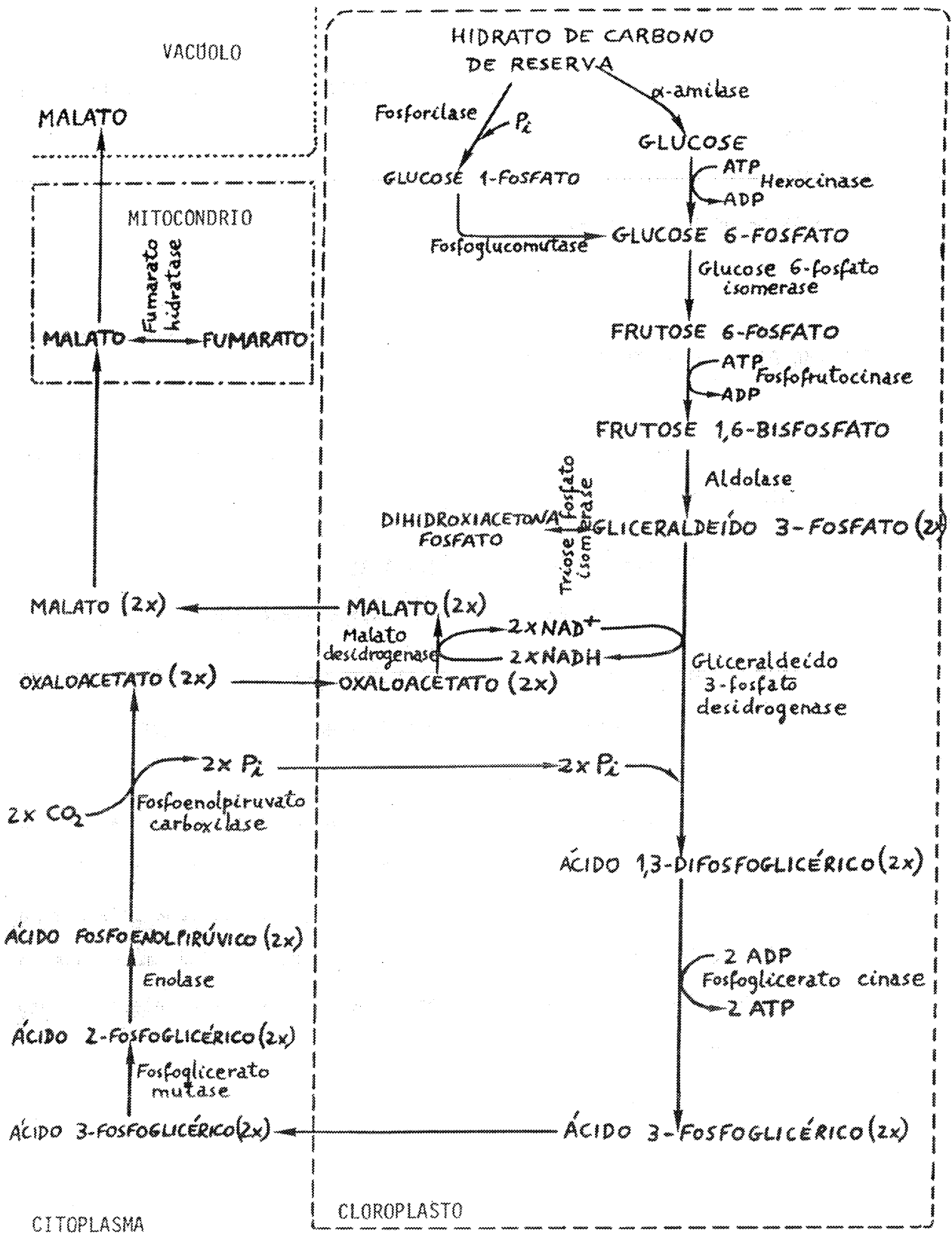


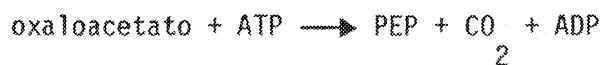
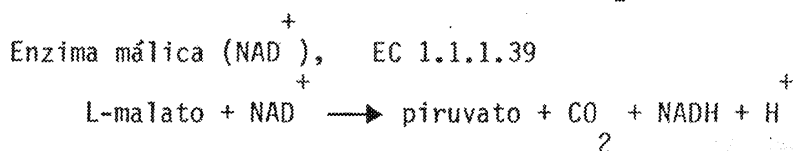
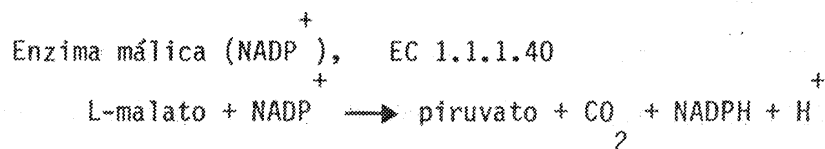
Fig.VI.1 - Diagrama do metabolismo do carbono em células de plantas CAM às escuras

DESCARBOXILAÇÃO DO MALATO E ASSIMILAÇÃO FOTOSSINTÉTICA DO CO₂

2

A inversão do transporte do ácido málico de "para dentro do vacúolo" para "para fora do vacúolo" marca a passagem da fase de produção de malato para a fase de consumo de malato.

A semelhança do que se passa com as plantas C₄, as plantas tipo CAM possuem 3 enzimas responsáveis pela descarboxilação dos ácidos em C₄:



A actividade destas enzimas em diferentes plantas CAM depende da espécie taxonómica, de modo que se pode subdividir as plantas CAM em dois grupos com base nas enzimas responsáveis pela descarboxilação:

- O grupo da enzima málica, ME-CAM. Estas plantas contêm elevadas actividades da enzima málica (NADP⁺) e/ou da enzima málica (NAD⁺), não possuindo actividade da PEP carboxicinase; exemplos: *Bryophyllum pinnatum*, *Bryophyllum tubiflorum*, *Kalanchoe daigremontiana*;

- o grupo da PEP-carboxicinase, PEPCK-CAM. Estas plantas contêm uma elevada actividade desta enzima, apresentando uma actividade das enzimas málicas menor que 15% da actividade da PEP carboxicinase; exemplos: *Aloe arborescens*, *Hoya carnosa*, *Stapelia gigantea*.

Tanto as plantas ME-CAM como as PEPCK-CAM contêm suficiente actividade da RuBPCase que permita uma fotossíntese activa tipo C₃.

3

Contudo, a taxa de descarboxilação do malato é maior do que a taxa de carboxilação pela RuBPCase, uma vez que a concentração intracelular de CO_2 aumenta durante a descarboxilação do malato.

Todos os átomos de carbono do malato parecem ser convertidos em hidratos de carbono de reserva. Assim, o CO_2 liberto por acção das enzimas de descarboxilação é assimilado em hidratos de carbono pelo ciclo de Calvin. O fragmento em C_3 resultante da descarboxilação dos ácidos em C_4 é utilizado na síntese de hidratos de carbono, a qual pode ocorrer (i) através da sua conversão em PGA, o qual pode ser posteriormente incorporado no ciclo de Calvin ou (ii) através da gluconeogénese, a partir do piruvato.

DISTRIBUIÇÃO

O metabolismo ácido das Crassuláceas expressa-se de maneira extraordinariamente flexível, o que cria dificuldades e ambiguidades sobre a qualificação de certo número de espécies, particularmente aquelas em que as características CAM se podem ou não manifestar consoante as condições do meio em que se desenvolvem.

Conhecem-se cerca de 25 a 30 famílias de plantas que possuem espécies tipo CAM. Nalgumas famílias o CAM é quase exclusivo (ex: crassuláceas, cactáceas), enquanto que noutras a maioria das espécies são do tipo C_3 (ex: compostas, vitáceas, liliáceas). As 10000 ou mais espécies de angiospérmicas que apresentam CAM incluem mais de 1000 espécies da família das bromeliáceas e vários milhares da família das orquidáceas. A literatura refere apenas uma única espécie gimnospérmica tipo CAM: a planta do deserto de Moçâmedes *Welwitschia mirabilis*. Também tem sido encontrado metabolismo CAM nalgumas plantas inferiores como os fetos *Drymoglossum* e *Pyrrhosia*. A tabela V.1 apresenta uma série de exemplos de

espécies tipo CAM, incluindo duas espécies economicamente importantes - o ananás e o sisal.

DIVERSIDADE DO METABOLISMO CAM

a) O CAM como adaptação à falta de água

As plantas CAM são geralmente oriundas de regiões semi-áridas e tropicais, estando normalmente adaptadas a condições desérticas, com regimes hídricos irregulares e períodos de seca frequentes e prolongados. O CAM é considerado como uma importante adaptação bioquímica e fisiológica do metabolismo fotossintético do carbono aos défices de água.

Durante os períodos de intensa iluminação e temperaturas elevadas as plantas CAM conseguem reduzir as suas taxas transpiratórias ao mínimo. Por um lado, o fecho dos estomas durante o dia reduz drasticamente as trocas gasosas entre a planta e a atmosfera ambiente. Por outro lado, a frequente suculência dos órgãos fotossintéticos não só diminui a relação área/volume como permite o armazenamento de água. Reciclando o CO_2 respiratório através da fixação de CO_2 às escuras e da fotossíntese, as plantas CAM evitam a fotoinibição, retêm água e mantêm o sistema fotossintético numa forma activa na ausência de trocas de CO_2 com o exterior. Mantêm assim uma actividade fotossintética normal em condições que provocariam a morte dos tecidos fotossintéticos de outras plantas.

O facto de a via CAM se encontrar normalmente associada a órgãos suculentos não significa que todas as plantas suculentas sejam do tipo CAM ou que esta via não se encontre em órgãos fotossintéticos desprovidos de suculência. Já foi descrito o caso de uma planta cujo caule suculento

apresenta a via CAM, mas cujas folhas, também suculentas, assimilam CO_2 pela via normal em C_3 .

b) O CAM como adaptação à falta de CO_2

Algumas observações indicam que é necessário cuidado na interpretação do CAM como uma adaptação a ambientes áridos.

Plantas do género Isoetes apresentam aspectos de CAM. Estas plantas crescem frequentemente em meios aquáticos com deficiência de CO_2 (ou bicarbonato) durante o dia, altura em que ocorre uma fotossíntese activa dentro de água. Assim, estas plantas captam o CO_2 e/ou o bicarbonato durante a noite e armazenam-no sob a forma de ácido málico pela via CAM. No dia seguinte, com os níveis de HCO_3^- baixos na água, estas plantas utilizam o CO_2 interno proveniente da descarboxilação do malato e assimilam-no fotossinteticamente pelo ciclo de Calvin. Assim, nos Isoetes, o CAM não é uma adaptação a ambientes com falta de água, mas sim uma adaptação a um ambiente com deficiência de CO_2 .

c) "Shift" CAM-C₃

Algumas espécies de plantas suculentas mudam de fotossíntese C_3 para CAM em determinadas condições.

A *Mesembryanthemum crystallinum* e outras espécies da família das aizoáceas são induzidas de metabolismo C_3 para CAM quando regadas com água com sais ou quando submetidas a uma défice hídrico. Quando funcionam como C_3 , os níveis de ácido málico e das enzimas relacionadas com o CAM são baixos; as plantas apresentam-se pouco suculentas. Quando o CAM é induzido, os níveis de malato começam a flutuar, aumentando a actividade da PEP carboxilase, enzima málica e outras enzimas.

O ananás (uma bromeliácea), a planta CAM mais importante do ponto de vista comercial, tem fotossíntese C_3 quando em presença de abundância de água. Quando submetida a um déficit hídrico o seu metabolismo muda para CAM.

A mudança de metabolismo de C_3 para CAM em resposta a alterações nas condições ambientais parece estar também relacionada com a idade das folhas. Independentemente do fotoperíodo, as folhas mais velhas tendem a apresentar CAM. Por outro lado, os dias curtos induzem CAM nas folhas novas.

d) "CAM - cycling"

Por definição, no "CAM-cycling" há trocas gasosas tipo C_3 (as trocas de CO_2 e H_2O ocorrem durante o dia), mas ocorre também uma flutuação diária de ácidos orgânicos à semelhança do CAM, i.e., ocorre flutuação diária de ácidos orgânicos com pequena ou nenhuma fixação noturna de CO_2 exógeno.

Tem sido sugerido que a evolução ocorreu de (i) plantas 100% C_3 sem flutuação diária de ácidos orgânicos, para (ii) plantas 100% C_3 com flutuação diária de ácidos orgânicos (CAM-cycling), para (iii) plantas 100% CAM.

Apresentam CAM-cycling algumas espécies das famílias das crassuláceas, bromeliáceas, orquídeas. A planta *Welwitschia mirabilis*, uma gimnospérmica nativa do deserto de Moçâmedes, é um caso especial de uma planta variável, podendo funcionar como planta C_3 , CAM-cycling ou CAM.

O significado biológico do CAM-cycling é desconhecido. Uma vez que nos ambientes em que estas plantas ocorrem elas podem ser completamente hidratadas e secas no mesmo dia, do ponto de vista ecofisiológico o CAM-cycling pode manter as plantas preparadas para o metabolismo CAM se surgir

um período de seca. Assim, quando uma planta com CAM-cycling é submetida a seca, ela muda para CAM ou "CAM-idling". Quando a água se torna de novo abundante, as plantas passam a C_3 , mantendo a flutuação diária de ácidos orgânicos.

e) "CAM - Idling"

Quando certas plantas são privadas de água, há uma baixa e prolongada flutuação diária de ácidos orgânicos, mas não há ocorrência de trocas gasosas. Estas plantas estão a reciclar o CO_2 libertado pela respiração através da via CAM. Este fenómeno, denominado "CAM-idling", tem sido observado em muitas plantas, nomeadamente dos géneros *Opuntia* e *Kalanchoe*.

Tem sido sugerido que o "CAM-idling" mantém a fotossíntese intacta e evita a fotooxidação em condições de luminosidade intensa, uma vez que o CO_2 , como aceitador terminal de electrões, é produzido por descarboxilação do malato. O "CAM-idling" aparece assim como uma modificação do CAM, como um processo de sobrevivência em condições extremas de secura. Quando a água se torna de novo disponível, as plantas respondem imediatamente com CAM normal.

f) Conclusão

Em conclusão, pode dizer-se que, nas plantas com capacidade de CAM, o funcionamento desta via pode ser obrigatório ou facultativo. É obrigatório naquelas plantas em que o mecanismo CAM é constitutivo e que, portanto, o manifestam sempre, sejam quais forem as condições ambientais. É facultativo quando a via CAM é induzida em resposta a determinadas condições externas, tais como o fotoperíodo ou o défice hídrico.

E difícil assegurar que a via CAM nunca se manifesta em determinada planta seja qual for a situação em que esta se encontre. A actividade da via CAM pode ser mais ou menos intensa consoante as condições ambientais. Além disso, as plantas podem apresentar diferentes graus de CAM.

FOTORRESPIRAÇÃO NAS PLANTAS CAM

A fotorrespiração nas plantas CAM tem sido pouco estudada quando comparada com as plantas C_3 ou C_4 . Contudo sabe-se que elas contêm as enzimas do processo fotorrespiratório. Potencialmente, as plantas CAM devem conseguir reduzir bastante a actividade oxigenásica da RuBPCase e, conseqüentemente, a fotorrespiração, uma vez que o metabolismo CAM concentra CO_2 na vizinhança daquela enzima. Na realidade, a bioquímica da fotossíntese CAM é muito semelhante à bioquímica da fotossíntese C_4 . A principal diferença é que, no metabolismo CAM, a separação entre a síntese e a descarboxilação dos ácidos em C_4 é temporal, enquanto que no metabolismo C_4 é espacial. Para um aumento da concentração de CO_2 junto da RuBPCase nas plantas CAM contribuem ainda os factos de que (i) a descarboxilação ocorre durante o dia, enquanto os estomas estão fechados e (ii) a taxa de descarboxilação do malato é maior do que a taxa de carboxilação pela RuBPCase.

Muitas plantas CAM, tanto no início da fase luminosa do dia (quando se esgotaram os hidratos de carbono de reserva necessários à produção de PEP, o substrato da carboxilação), como no final da fase luminosa do dia (quando todo o ácido málico armazenado na noite anterior nos vacúolos foi descarboxilado), apresentam fotossíntese C_3 , com a RuBPCase a fixar directamente CO_2 externo. É de esperar que nestas alturas a taxa fotorrespiratória seja considerável.

FOTOSSÍNTESE

CAPÍTULO VII

METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DO AZOTO

Ricardo B. Ferreira

Artur R. Teixeira

LISBOA, 1989

VII - METABOLISMO FOTOSSINTETICO DO AZOTO

INTRODUÇÃO

As reacções fotoquímicas da fotossíntese foram, durante muitos anos, exclusivamente associadas ao metabolismo do carbono. Isto é, o termo "fotossíntese" era utilizado praticamente como sinónimo de "fixação de CO₂". Está actualmente bem demonstrado que o "potencial assimilatório" na forma de ATP e de NADPH, não é exclusivamente utilizado na assimilação do CO₂, sendo de destacar a sua indispensável participação no metabolismo do azoto. Os cloroplastos têm a capacidade de sintetizar aminoácidos, clorofila, lípidos, ácidos nucleicos e proteína através de reacções promovidas pela força motriz gerada pelos processos fotoquímicos da fotossíntese. Neste capítulo serão apenas abordados os aspectos mais salientes da incorporação do azoto inorgânico do nitrato (NO₃⁻) em compostos orgânicos.

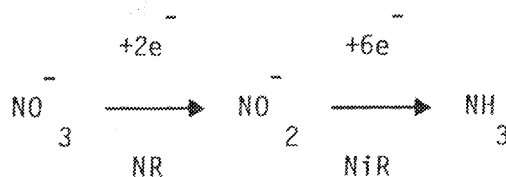
A maioria das plantas obtém o azoto (N) necessário ao seu metabolismo na solução do solo. O N presente no solo provém de várias actividades biológicas, mas a sua fonte primária é o azoto molecular ou dinitrogénio (N₂) presente na atmosfera. Mas o N₂ é, do ponto de vista químico, bastante inerte, o que explica a situação "paradoxal" da produtividade das plantas terrestres, apesar de envolvidas por uma atmosfera que contém cerca de 80% de N₂, ser frequentemente limitado por deficiência de N no solo. Na realidade, a enorme reserva de N₂ da atmosfera não pode ser utilizada pelas plantas, excepto quando estas se encontram simbioticamente associadas a bactérias fixadoras do azoto. Assim, um passo crucial na utilização de N pelas plantas é a conversão do

N₂ em formas mais reactivas - usualmente a forma altamente oxidada de nitrato (NO₃⁻) ou a forma altamente reduzida de amoníaco (NH₃). Esta conversão é assegurada por microorganismos fixadores de N₂ e pela ocorrência duma série de processos interrelacionados que, no seu conjunto, constituem o chamado ciclo biológico do azoto, o qual assegura uma reciclagem do azoto da biosfera nas suas formas orgânicas e inorgânicas.

Embora se reconheça a existência, no solo, de várias fracções azotadas e que as plantas podem absorver o N sob várias formas, está bem estabelecido que as principais fontes de N para as plantas são o nitrato e o amoníaco (NH₃). Porém, na maioria dos solos, a forma mais abundante é o NO₃⁻ pois o NH₃ é rápida e eficientemente oxidado a NO₃⁻ através dos processos de nitrificação.

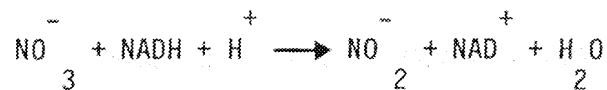
ENZIMAS DO SISTEMA REDUTOR DO NITRATO

O NO₃⁻ absorvido pelas raízes das plantas tem de ser reduzido a NH₃ antes que o seu N possa ser incorporado no material orgânico da planta. Esta redução envolve a participação de duas enzimas - a nitrato redutase (NR) e a nitrito redutase (NiR) - e a transferência de 8 electrões:

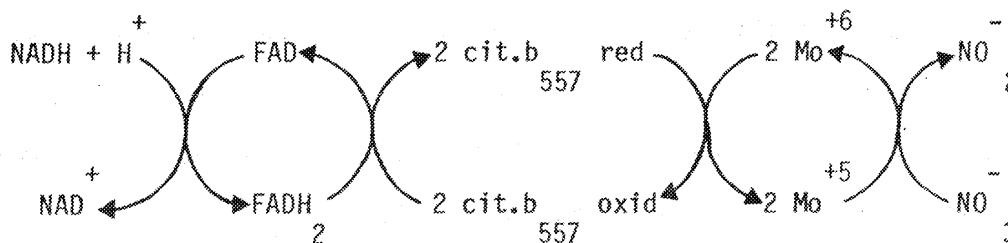


Propriedades da Nitrato Redutase

A NR presente nas plantas superiores é uma enzima citoplasmática que catalisa a redução do NO₃⁻ e NO₂⁻, utilizando o NADH como fonte de potencial redutor:



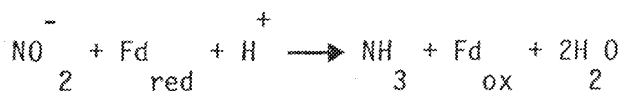
Esta reacção global, virtualmente irreversível em condições fisiológicas, envolve a participação de outros cofactores que actuam como transportadores de electrões do NADH ao NO_3^- , designadamente a flavina adenina dinucleótido (FAD), o citocromo b₅₅₇ e o molibdénio:



A NR é uma enzima muito complexa no que respeita quer à sua estrutura quer ao seu mecanismo de acção incluindo os mecanismos de regulação da sua actividade.

Propriedades do Nitrito Redutase

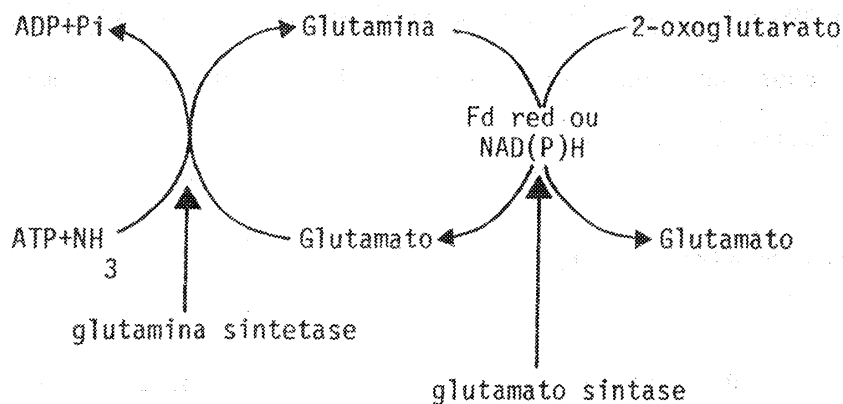
A redução do NO_2^- a NH_3 , embora envolvendo uma transferência de 6 electrões, é catalisada por uma única enzima - a nitrito redutase - que utiliza a ferredoxina reduzida como fonte de potencial redutor. Nos tecidos verdes, a NiR está localizada nos cloroplastos, onde a ferredoxina (Fd) é reduzida fotoquimicamente; nas raízes, a ferredoxina (ou uma substância de estrutura semelhante) é reduzida por equivalentes redutores transferidos do NAD(P)H para a Fd oxidada por acção duma NAD(P)H ferredoxina redutase:



INCORPORAÇÃO DO AZOTO AMONÍACAL EM COMPOSTOS ORGÂNICOS

Glutamina sintetase/glutamato sintase

A principal via de assimilação do NH_3 nas plantas é através do ciclo da glutamato sintase, o qual envolve uma sequência de duas reacções catalisadas por duas enzimas: a glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase. Esta via é de natureza cíclica porque o glutamato funciona como aceitador de NH_3 e como produto da assimilação do NH_3 :

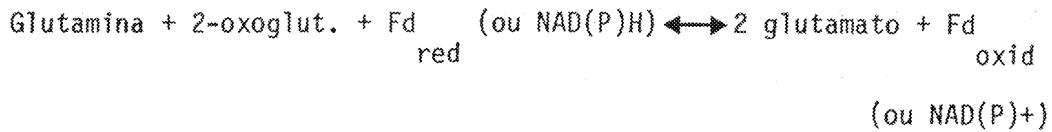


A glutamina sintetase incorpora o NH_3 na posição amídica da glutamina numa reacção que consome ATP:



Nas folhas de muitas espécies vegetais a glutamina sintetase encontra-se presente em duas formas (isozimas) distintas - uma localizada no citoplasma (GS₁) e outra no cloroplasto (GS₂) - embora em certo número de plantas apenas se detecte actividade de GS no cloroplasto.

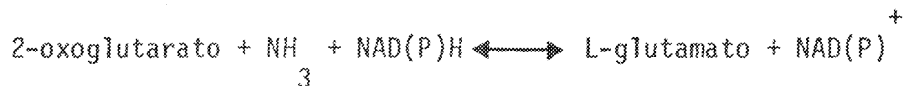
A glutamato sintase catalisa a transferência do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato na presença de um agente redutor:



Nas folhas, a glutamato sintase localiza-se no cloroplasto e utiliza a Fd reduzida como fornecedor de equivalentes redutores. Nas raízes, a enzima encontra-se no interior de plastídeos e pode utilizar a Fd_{red}, o NADH ou o NADPH como fonte de potencial redutor.

Glutamato desidrogenase

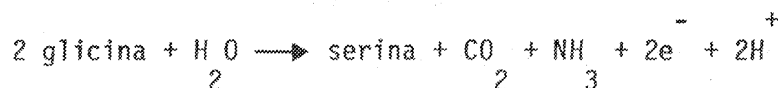
Uma outra via potencial de incorporação do NH₃ em combinação orgânica está associada à actividade da glutamato desidrogenase (GDH). Esta enzima catalisa a aminação redutora do 2-oxoglutarato de acordo com a seguinte equação:



Dada a baixa afinidade da GDH para o NH₃, a reacção de assimilação do NH₃ só se processa a uma taxa metabolicamente significativa quando a concentração de NH₃ no tecido é elevada. Dados os efeitos tóxicos que resultam da acumulação do NH₃ nas células tem sido atribuída à GDH uma função desintoxicante em situações que, por uma razão ou outra, conduzam à presença de concentrações excessivas de NH₃. Este ponto de vista é apoiado por observações que mostram aumentos consideráveis dos níveis de GDH nos tecidos de várias espécies vegetais (particularmente nas raízes) quando estas se desenvolvem em meios contendo elevadas concentrações de NH₃.

CICLO FOTORRESPIRATÓRIO DO AZOTO

Sabe-se que ocorrem, nos tecidos vegetais, várias reacções susceptíveis de libertar NH_3 por desaminação de compostos orgânicos. De todo os casos referidos na literatura, o que tem sido mais estudado, dada a sua magnitude potencial, é a libertação de NH_3 que tem lugar na fotorrespiração (ver capítulo IV, Fig. IV.1), quando a glicina é convertida em serina:



Foi demonstrado que, em condições normais de crescimento, a taxa a que se liberta o NH_3 na fotorrespiração excede apreciavelmente a taxa de assimilação primária do NH_3 (isto é a taxa a que o NH_3 absorvido do meio exterior ou resultante da redução do NO_3^- está a ser produzido e assimilado). Nestas condições, é fundamental que o azoto libertado na fotorrespiração seja reassimilado, caso contrário todo o azoto orgânico da planta rapidamente se esgotaria.

Como o NH_3 fotorrespirado se liberta no mitocôndrio é possível que uma porção se fixe ao 2-oxoglutarato por acção da GDH (que é uma enzima predominantemente mitocondrial). Porém, os dados experimentais indicam que a maior parte do NH_3 libertado no mitocôndrio não é retido neste organito, passando rapidamente ao citoplasma e ao cloroplasto onde é refixado no glutamato por acção da GS, dando origem à formação de glutamina. Também no cloroplasto e por acção da glutamato sintase na presença de Fd reduzida, uma molécula de glutamina dá origem a duas moléculas de glutamato. Uma destas moléculas de glutamato vai servir como aceitadora do NH_3 libertado na fotorrespiração e a outra vai fornecer o grupo amínico utilizado na transaminação do glioxilato a glicina,

regenerando 2-oxoglutarato. Esta sequência constitui o chamado "ciclo fotorrespiratório do azoto", tal como foi proposto por Key e colaboradores em 1978 e confirmado por Wallsgrave em 1980 (ver Fig. IV.1).

É actualmente reconhecida a ocorrência, nas plantas, de perdas de azoto gasoso para a atmosfera. Estas perdas incluem a libertação de NH_3 , particularmente durante a senescência das folhas, o que pode ser resultante duma perda de eficiência da reassimilação do NH_3 durante o ciclo fotorrespiratório.