

TARTU ÜLIKOOL  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Eero Talts

**RIBULOOS-1,5-BISFOSFAADI KARBOKSÜLAASI –  
OKSÜGENAASI AKTIIVSUS TUBAKAS JA SELLE  
SEOS FOTOSÜSTEEMI HULGAGA**

Magistritöö

Juhendaja: Uuriija-prof. Agu Laisk

Tartu 2005

# SISUKORD

<b>LÜHENDID</b>	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS</b>	<b>5</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b>	<b>6</b>
1.1 Valgusreaktsioonid	6
1.2 Fotosüsteem I	8
1.3 Ferredoksiin ja FNR	9
1.4 Alternatiivsed elektroniülekanded	10
1.5 Calvini tsükkel	12
1.6 RuBisCO	13
1.7 RuBisCO valk	13
1.8 RuBisCO biokatalüsaatorina	14
1.9 RuBisCO aktiivsus	16
1.10 RuBisCO aktiivsust määravad tegurid	17
1.10.1. Valguse intensiivsus ja ioonid	17
1.10.2. Süsinikuühendid	17
1.10.3. Fosfaatioonid	19
1.11 RuBisCO aktivaas	19
1.11.1. ATP mõju RuBisCO aktivaasile	21
1.11.2. Ferredoksiini mõju RuBisCO aktivaasile	22
1.11.3. Temperatuuri mõju RuBisCO aktivaasile	23
1.12 Ensüümide paiknemine kloroplastis	23
<b>TÖÖ EESMÄRK</b>	<b>25</b>
<b>2. MATERJAL JA METOODIKA</b>	<b>26</b>
2.1 Taimne material	26
2.2 Mõõtmisprotseduur	26
2.3 Klorofüllü määramine	27
2.4 PSI reaktsioonitrite hulga keemiline määramine	27
2.5 Leheketta optiline neeldumine	28
2.6 Mõõte- ja alalüüsisüsteemi tehniline realiseering	28
2.7 Gasomeetria	29
2.8 Optiline mõõtesüsteem	30
2.8.1. Lehekambri valgustamine	30
2.8.2. Fluorestsentsi mõõtmine	30
2.8.3. 820nm signaali mõõtmine	31
2.8.4. Välpulsid (STF)	32

2.9 Mõõtmisprogramm	32
2.9.1.PSI redutseeriv tiitrimine	32
2.9.2.PSI oksüdeeriv tiitrimine	33
2.9.3.PCw kõver 2% O <sub>2</sub>	33
2.9.4.RuBisCO kineetika kõver	33
2.9.5.Assimilatoorlaengu määramine	34
2.9.6.Lisaprotseduurid	34
2.10 RuBisCO valgu hulga määramine elektroforeetiliselt	34
<b>3. TULEMUSED</b>	<b>36</b>
3.1 Kasutatud taimed	36
3.2 Klorofüllü määramine	37
3.3 PSI hulga keemiline määramine	39
3.4 PSI hulga optiline määramine <i>in vivo</i>	41
3.4.1.Oksüdeeriv tiitrimine	41
3.4.2.Redutseeriv tiitrimine	42
3.5 PSII hulga määramine	43
3.6 PSI määramismetoodikate võrdlus	44
3.7 Lämmastikuisalduse mõju PSI-le	46
3.8 Assimilatoorlaengu määramine	47
3.9 RuBisCO hulga densitomeetriline määramine	48
3.10 RuBisCO Km, V <sub>max</sub> ja k <sub>cat</sub> määramine	51
3.11 Lämmastikuisalduse mõju RuBisCO hulgale ja V <sub>max</sub> -le	52
3.12 RuBisCO aktiivsus	53
<b>4. ARUTELU</b>	<b>56</b>
4.1 Lämmastikuisalduse mõju PSI-le ja RuBisCO-le	56
4.2 RuBisCO aktiivsus	58
<b>5. KOKKUVÕTE</b>	<b>61</b>
<b>6. SUMMARY</b>	<b>62</b>
<b>7. KASUTATUD KIRJANDUS</b>	<b>63</b>
LISA 1.	
LISA 2.	

## LÜHENDID

A800	lehe optiline neeldumine 800 nm piirkonnas
Chla	klorofüll A
Chlb	klorofüll B
F <sub>o</sub>	lehe minimaalne fluorestsentsi kvantsaagis
F <sub>m</sub>	lehe maksimaalne fluorestsentsi kvantsaagis
F <sub>md</sub>	pimeadapteeritud lehe maksimaalne fluorestsentsi kvantsaagis
F <sub>s</sub>	stационаarseisus lehe fluorestsentsi kvantsaagis
FRL	kaugpunane valgus lainepikkusega 720 nm
FL	küllastav valgus
OD	optiline tihedus
PAD	lehes neeldunud footonvoog
PFD	footonivoo tihedus lehele langevas valguses
P700	fotosüsteem I tsentriklorofüll
PSII ja PSI	fotosüsteemid II ja I
WL	valge valgus
PQ	plastokinoon
ADP	adenosiindifosfaat
APS	ammoonium persulfaat
ATP	adenosiintrifosfaat
cyt b <sub>f</sub>	tsütokroom b <sub>6</sub> f kompleks
DTT	ditiotreitool
EDTA	etüleendiamiintetraädikhape
k <sub>cat</sub>	ensüümi katalüütiline konstant (s <sup>-1</sup> )
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menteni konstant
LSU	RuBisCO suur subühik
PGA	3-fosfoglutseraat, fosfoglutseerhape
PG-2	2-fosfoglükolaat
PVPP	polüvinüülpolüpürrolidoon
rbcL	RuBisCO suurt subühikut kodeeriv geen
rbcS	RuBisCO väikest subühikut kodeeriv geen
RuBisCO	Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas-oksügenaas
RuBP	Ribuloos-1,5-bisfosfaat
SDS	naatriumdodetsüülulfaat
SSU	RuBisCO väike subühik
TEMED	tetra-metüületüleendiamiin
TRIS	Tris(hüdroksümetüül)aminmetaan
WT	metsiktüüpi taimed

## SISSEJUHATUS

Maailma levinuimaks valguks ja suurima biomassiga ensüümiks on tituleeritud RuBisCO valk (EC 4.1.1.39) (RuBisCO), mis hõlmab taime lehe koguvalgu hulgast peaaegu poole. RuBisCO katalüüsib Calvini tsükli esimest reaktsiooni – pöördumatut Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksüleerimist, mille tulemuseks on kaks 3-fosfoglutseraadi molekuli. Saadud 3-fosfoglutseraati kasutatakse taimes edaspidi suhkrute sünteesiks.

Paraku ei ole vastselt sünteesitud ja kokkuassambleeritud RuBisCO funktsionaalne. Aktiivsuse saavutamiseks vajab ensüüm aktivaatormolekulidena CO<sub>2</sub>-te ja Mg<sup>2+</sup> ioone ning valgulise komponendina RuBisCO aktivaasi. Aktivaasil esineb kaks erinevat isovormi, millest mõlemad on võimelised aktiveerima RuBisCOt hüdroolüüsides selleks ATP-d, kuid ainult ühe aktivaasi isovormi aktiivsus on reguleeritav tioredoksiinisüsteemi poolt. Tioredoksiinisüsteemi funktsionaalsus sõltub fotosüsteem I talitlusest. H. Eichmann ja kaastöötajad on näidanud (2004), et kaselehtede RuBisCO aktiivsus on korrelatsioonis fotosüsteem I hulgaga, mis viitab tioredoksiinisüsteemi poolt aktiveeritava RuBisCO aktivaasi osalusele karboksülaasi aktiveerimisel.

Käesolevas töös keskendutakse fotosüsteem I ja RuBisCO aktiivuse omavahelise seose uurimisele türgi tubakas (*Nicotiana tabacum* L.), kus pole tuvastatud tioredoksiini poolt mõjutatavat RuBisCO aktivaasi isovormi.

Autor tänab Agu Laiska abi eest magistritöö kirjutamisel ja on tänulik ka Hillar Eichmannile, Evi Padule ning Vello Ojale, kelle juhtnöörid ja abi võimaldasid sujuvat praktiliste tööde teostamist.

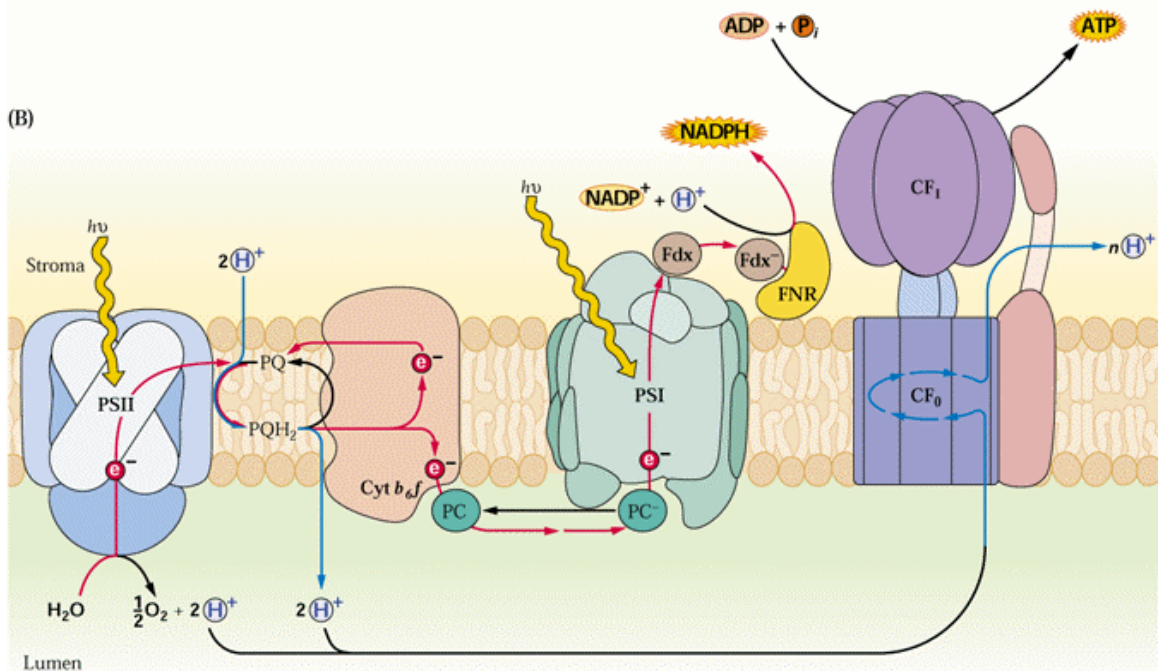
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Valgusreaktsioonid

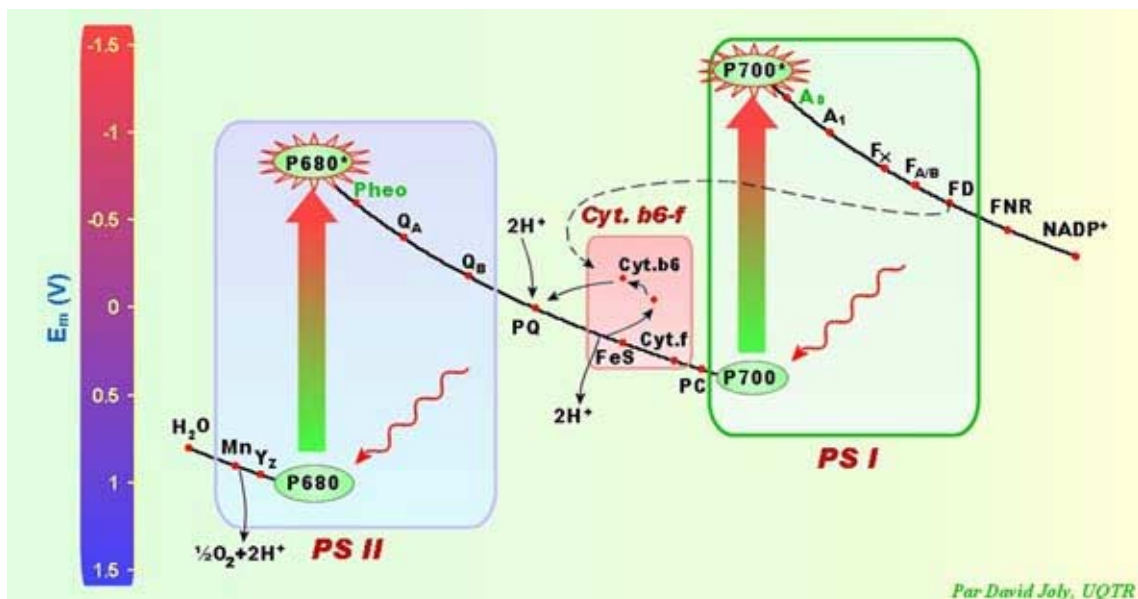
Taimedel on võime muundada Päikeselt Maale langeva nähtava kiirguse energia keemilise sideme energiaks. See realiseeritakse pigment-valk komplekside, fotosüsteemide ja keeruka CO<sub>2</sub> assimilatsiooniraja ensüümide poolt. Fotosünteesi elektronide ergastamise seisukohalt omavad võtmerolli eelkõige fotosüsteemid (PSI, PSII). Süsihappegaasi fikseerimisreaktsiooni läbiviimine sooritatakse RuBisCO nimelise valgu poolt (Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas-oksügenaas, EC 4.1.1.39).

Valgusreaktsioonide põhimõtteline skeem on esitatud Joonisel 1. Kui fotosüsteem II (PSII) tsender (P680) neelab valguskvandi, siis toimub ühe tsentriklorofüllü väliskihi elektroni ergastamine ja suunamine elektron-transportahelasse. Elektronide asendamiseks oksüdeerib PSII tülakoidide luumenis vett ja kloroplastidest eraldub molekulaaset hapnikku. PSII-st järgmine elektronikandja on lipiidides lahustuv kinoon, plastokinoon (PQ), mis võimaldab elektronidel liikuda tsütokroom b<sub>6</sub>f kompleksile (Cytb<sub>6</sub>f) nii, et viiakse üle ka prootoneid stroomast tülakoidide luumenisse. Cytb<sub>6</sub>f on Fe-S klastrit sisaldav valkkompleks, millelt osa elektrone liigub tagasi PQ-le, osa kandub üle vees lahustuvale plastotsüaniini (PC) nimelisele polüpeptiidile. PC ühendab omavahel Cytb<sub>6</sub>f ja fotosüsteemi I (PSI). PSI-s toimub järgmine elektronide ergastamine valguse poolt. Elektronid antakse valk ferredoksiini (FD) abil NADP<sup>+</sup> reduktaasile (FNR). Tülakoididesse kogunenud prootonid väljuvad transmembraanse elektrokeemilise potentsiaali jõul stroomasse läbi ATPaasi CF<sub>0</sub> valgukompleksi, kusjuures toimuvad konformatsioonilised muutused CF<sub>1</sub> subühikus, mis võimaldavad liita ADP molekulile veel ühe fosfaatiooni jäägi. Kuna sünteesitud ATP ja NADPH molekulid saavad olema nn. "assimilatoorjõuks" järgnevate pimereaktsioonide tarvis, siis peab toimima fotosüsteemide vahel tugev kooperatsioon. Elektronide ülekandeahelat veelt NADPH-le võib näidata ka energiaskaalas – arvestades ühendite redokspotentsiaale. Seda võib jälgida Joonisel 2., kus on katkendliku joonega tähistatud alternatiivne elektronide liikumine, mis võimaldab tekkida elektronide tsüklilisel transpordil. (Buchanan et al., 2000; Hall & Rao, 1999; Mohr & Schopfer, 1995).

(B)



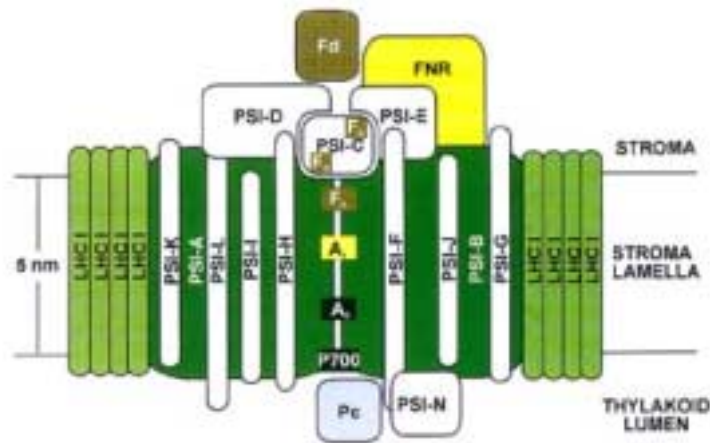
Joonis 1. Valgusreaktsioonide üldskeem. Elektronid liiguvad veelt fotosüsteemile II (PSII), plastokinoonile (PQ), tsütokroom b<sub>6</sub>f-le (Cytb<sub>6</sub>f), plastotsüaniinile (PC), fotosüsteemile I (PSI), ferredoksiinile (FD), ferredoksiin:NADP reduktaasile (FNR). Prootonid liiguvad stroomast üle plastokinooni tülakoidide lumenisse ja läbi ATP-aasi (CF<sub>0</sub>, CF<sub>1</sub>) strooma poole tagasi. Fotosüsteemid kasutavad energiaallikana valguskvanti (hv) (Buchanan et al., 2000).



Joonis 2. Valgusreaktsioonide üldskeem energiaskaalas. X-telje suunaliselt on näidatud elektronide liikumine erinevate kandjate vahel. Y-teljel redokspotentsiaal ( $E_m$ ) voltites. Katkendliku joonega on tähistatud alternatiivne elektron-transport ferredoksiinilt tsütokroom b<sub>6</sub>f-le.

## 1.2 Fotosüsteem I

Kõrgemate taimede fotosüsteem I (PSI) on tülakoidide membraanis paiknev, 17-nest erinevast polypeptiidist koosnev pigment-valkkompleks, mille võib jaotada tinglikult järgmisteks osadeks: reaktsioonitsenter (380kDa), valgust koguvad antennid (LHC, kokku 280kDa). PSI sisaldab endas ka mitmesuguseid kofaktoreid nagu Chla (96), Chlb (ainult LHC-des), ksantofüll (ainult LHC-des),  $\beta$ -karoteen (22), füllokiinon (2), Fe-S klastrid (3). Lisaks interakteerub fotosüsteem I kompleks ka mitmesuguste elektronikandjatega, nagu näiteks plastotsüaniin (PC), ferredoksiin (FD), FD:NADP oksidoreduktaas (FNR). PSI reaktsioonitsentri kompleksi valke võib näha Joonisel 3. (Nelson & Ben-Shem, 2002; Scheller et al., 1997; Hall & Rao, 1999).



Joonis 3. PSI reaktsioonitsenter kõrgemates taimedes. Keskset subühikut PSI-A (83.2kDa) ja PSI-B (82.4kDa) mille külge interakteeruvad teised valgud ja kofaktorid Chla,  $\beta$ -karoteen, P700, A0, A1, Fx. Abivalgud: PSI-C (seob FA, FB), PSI-D (FD sidumine), PSI-E (FD ja FNRi sidumine), PSI-F (PC sidumine), PSI-G, PSI-H, PSI-I, PSI-J, PSI-K, PSI-L, PSI-M, PSI-N. Valgust neelavad kompleksid LHC I (Scheller et al., 1997)

Fotosüsteem I katalüüsib valgusenergia põhinevat elektronide ülekannet tülakoidide luumenis asuvalt redutseeritud plastotsüaniinilt stroomas asuvale valgule – ferredoksiinile. Nii vaske sisaldav plastotsüaniin kui ka 2Fe-2S polypeptiid ferredoksiin on vees lahustuvad valgud, mille funktsioon seisneb elektron-transportahela realiseerimises fotosüsteem II ja NADP reduktaasi vahel. Elektronikandjaid hoitakse PSI südamiku lähedal eri valgudomäänide omavahelise elektrostaatilise vastastikmõju abil.

PSI reaktsioonitsenter koosneb kahest dimeerses Chla molekulist (P700), mis on seotud kahe suure valguahela külge (PSI-A ja PSI-B). Kui PSI antenn neelab



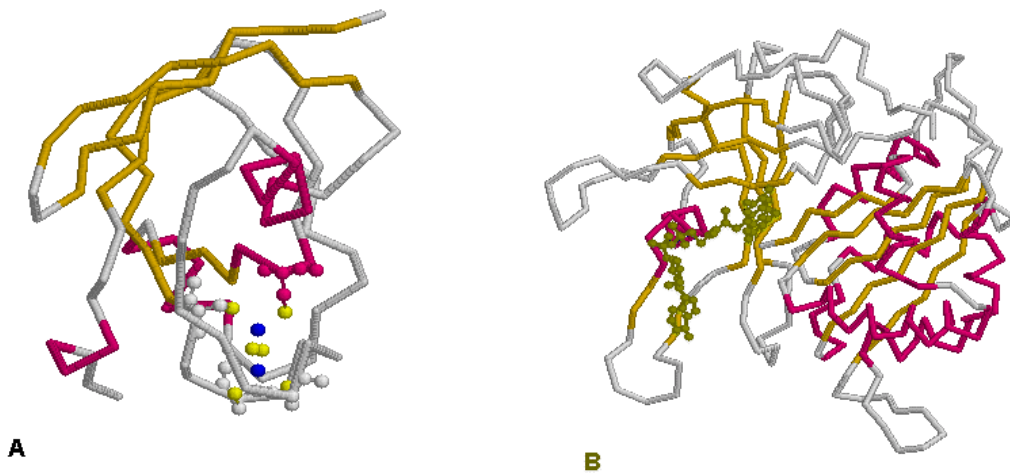
valguskvandi, siis toimub laengute lahutamine just nimelt P700 tsentriklorofüllipaaril. Laengute lahutamise reaktsioon ise vajab küllaltki palju energiat ( $\Delta G^\circ = 77\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Selle energia saab PSI reaktsioonitsenter LHC1-des (PSI spetsiifiline LHC) ja osaliselt ka LHC2-des (peamiselt PS2-ga seotud LHC) neeldunud valguskvandi energiast (Jansson, 1994; Green & Dunford, 1996; Scheller et al., 1997). Ergastatud elektron antakse üle A0 primaarsele aktseptormolekulile ja tekkinud positiivne laeng tasakaalustatakse oksüdeerides plastotsüaniini. Primaarne aktseptormolekul A0 on spetsiaalne monomeerne Chla molekul, mille absorptsioonispekter erineb veidi normaalse Chla omast. A0 klorofüllilt läheb elektron edasi sekundaarsele aktseptorile, füllokinoonipaarile A1. Järgmisena redutseerub 4Fe-S klaster Fx siis klastrid FA ja FB. Ferredoksiinile elektroni üleandmine võib toimuda nii FA kui ka FB poolt (Jung et al., 1995; Chitnis, 1996). Kuna elektronide ülekande tsentrid on väga elektronegatiivsed ( $<-530\text{mV}$  vt. Joonis 2.) ja võimelised redutseerima kloroplasti sisekeskonda, siis arvatakse PSI-I toimivat ainult reguleeritud transport.

### 1.3 Ferredoksiin ja FNR

Ferredoksiin (FD) on vees lahustuv 11kDa ilma heemita valk, mis osaleb nii lineaarses kui ka alternatiivsetes elektron-transportahelates. Redutseeritud FD kasutatakse kloroplastides põhiliselt kolmeks otstarbeks: NADPH genereerimiseks anaboolsetesse radadesse;  $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}^{2-}$  ja  $\text{SO}_3^{2-}$  redutseerimiseks, et formeerida  $-\text{NH}_3$  ja  $-\text{SH}$  grupe; glutamaadi tegemiseks glutamiinist või 2-oksoglutaraadist. Ferredoksiini elektroni ülekande aktiivsuse tagab 2Fe-2S tsenter, mis on stabiliseeritud nelja tsüsteiini tiolrühma poolt. Valgu kristallstruktuur on määratud spinatist *Spinacia oleracea* vt. Joonis 4. paneel A (Binda et al., 1998).

Ferredoksiin:NADP<sup>+</sup> oksüdüreduktaas (EC 1.18.1.2., FNR) on hüdrofiilne ühte FAD-i molekuli sisaldav ensüüm (35kDa), mis katalüüsib pöörduvat elektroni ülekannet NADP(H) ja valgulise elektronikandja (ferredoksiin) vahel. FD kannab elektrone PSI-Ilt FNR-ile üle ühekaupa, ning elektronimahutiks on Fe aatom Fe-S klastrist. Kuna FNR-i FAD-i molekulile mahub kaks elektroni, tähendab see FD kahekordset oksüdeerimist. Ferredoksiin:NADP<sup>+</sup> oksüdüreduktaas koosneb kahest u. 150 aminohappelisest domäänist: FAD-i sisaldav domään, NADP<sup>+</sup> siduv domään. FNR sünteesitakse tuuma

genoomi poolt tsütoplasmaatilise prekursorimolekulina, mis transporditakse kloroplastidesse ja kinnitatakse tihedalt tülakoidide membraani stroomapoolse osa külge. Kompleks aktiveeritakse *in vivo* valguse poolt. Valgus tekitab tülakoidide membraanis prootonite gradiendi ja see põhjustab valgu konformatsiooni muutuse, mis tõstab tugevalt ensüümi afiinsust oma bioloogilistele substraatidele (Pschorn et al., 1988). Ensüümil on näidatud produktinhibitsiooni. Struktuur on määratud paprikast *Capsicum annuum* vt. Joonis 4. paneel B (Dorowski et al., 2001; Arakaki et al., 1997; Carrillo & Ceccarelli, 2003)



Joonis 4. Ferredoksiin ja FNR. Punasena on kujutatud  $\alpha$ -heeliksid ja tumekollasena  $\beta$ -lehed peptiidiselgroot. Paneel A: Ferredoksiin. Sinisena on kujutatud raua aatomid 2Fe-2S klastris, helekollasena väävlü aatomid nii 2Fe-2S klastris kui ka tsüsteini molekulides (ball&stick) (Binda et al., 1998). Paneel B: Ferredoksiin:NADP<sup>+</sup> oksüdoreduktaas. Rohekaskollasena on kujutatud FAD-i molekul (ball&stick) (Dorowski et al., 2001).

## 1.4 Alternatiivsed elektroniülekanded

Lisaks lineaarsele elektron-transportahelale eksisteerib veel alternatiivseid (tsüklilisi) PSI poolt juhitud elektroni ülekandesüsteeme. Need on realiseeritud mitmete elektronide transpordis osalevate redoksvalkude abil (FD:NADPH reduktaas, NAD(P)H dehüdrogenaas, hüpoteetiline FD:PQ reduktaas). Protsess põhineb sellel, et elektronid juhitakse ferredoksiinilt või NAD(P)H-lt plastokinoonile. Alternatiivsed elektrontranspordi teed võimaldavad saada taimel lisa ATP-d, kuna voolu läbimine PQ fondist suurendab prootongradienti. Tsüklilise elektrontranspordi aktiivsus sõltub PSI

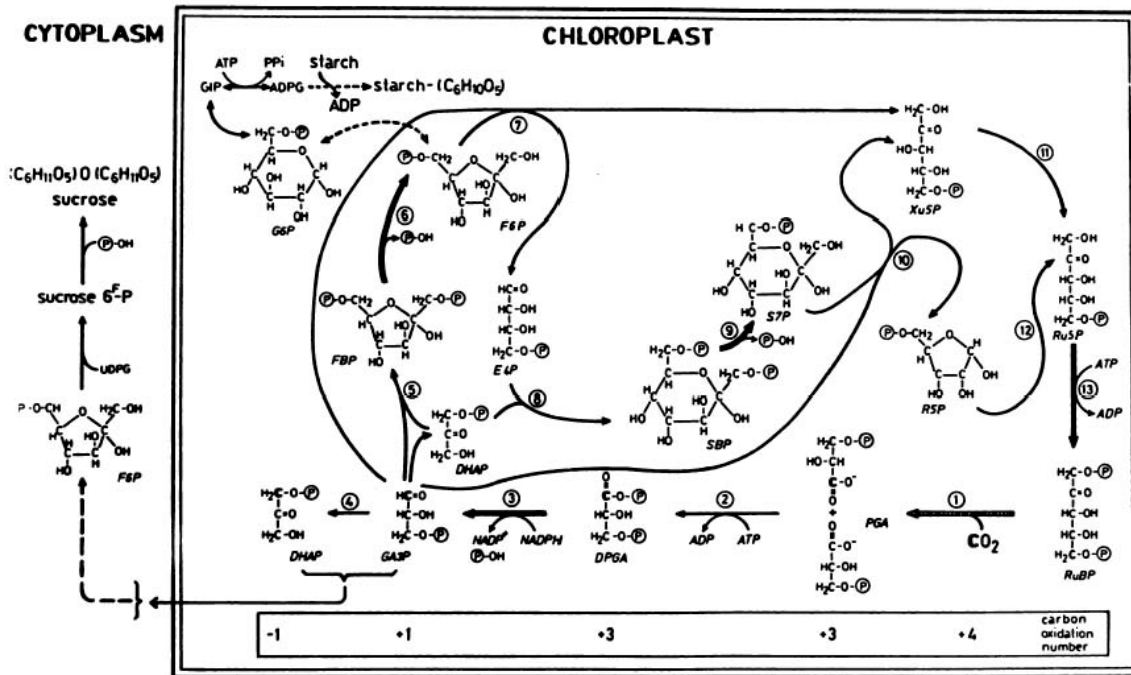
poolt neelatud kvantide hulgast võrreldes terminaalsete elektroniaktseptorite kontsentratsiooniga. Alternatiivsed tsüklid on eelistatud sellistel juhtudel, kus süsihappegaasi ja hapnikku on antud valgustingimuste juures suhteliselt vähe (Harbinson & Foyer, 1991). Tsükliline elektron-transport on mõjutatav ka temperatuuri poolt – mida kõrgem on temperatuur, seda rohkem on eelistatud lineaarne elektronide transport (Cornic et al., 2000; Clarke & Johnson, 2001).

Tsüklilise ETR-i oletatavad funktsioonid: lisa ATP süntees, PSII kaitse fotoinhibitsiooni eest. Valguse külluse korral oksüdeeritakse palju vett ning redoksvalkudele koguneb liiga palju elektrone. Vähendamaks koormust elektronikandjatel on taimedes spetsiaalne oksüdaas, mis viib läbi klororespiratsiooni, see seisneb molekulaarse hapniku redutseerimises PQH<sub>2</sub> arvelt. Klororespiratsioon on toetatud NAD(P)H dehüdrogenaasi poolt. Kuigi klororespiratsioon ei ole otseselt seotud tsüklilise ETR-iga, kasutavad mõlemad protsessid samu elektronimahuteid. (Heber & Walker, 1992; Bendall & Manasse, 1995; Joët et al., 2002; Bukhov & Carpentier, 2004).

Alternatiivsete elektroni ülekandesüsteemide hulka kuulub ka tioredoksiini süsteem. Redutseeritud FD-le võivad substraadiks olla ka valkude disulfiidsillad, mille lõhkumisel tekivad drastilised muudatused valkude tertsiaalstruktuuris ning seega ka aktiivsuses. Selline ensüümiregulatsioon ei toimu vahetult läbi FD, vaid kasutab spetsiaalselt tioredoksiin süsteemi. Tioredoksiin on väikse molekulmassiga valk, mille tsüsteiinide vaheline disulfiidsild redutseeritakse ferredoksiin-tioredoksiin reduktaasi (FTR) poolt kasutades selleks FD-l olevaid elektrone. FTR (30kDa) on 4Fe-4S klastrit sisaldav valk, kus katalüütiline aktiivsus on realiseeritud kahe tiolrühma abil (Iwadata et al., 1992). Ferredoksiin-tioredoksiini süsteem ja hiljem pikemalt käsitletav RuBisCO aktivaas (RbcA) on regulaatorid, mis liidavad omavahel valgus- ja pimedusreaktsioonid. Tioredoksiin suudab aktiveerida RbcA ja mitmeid algselt inaktiivseid Calvini tsükli ensüüme (Glütseeraldehüd-3-P dehüdrogenaas, Fruktos-1,6-bisfosfataas, Sedoheptuloos-1,7-bisfosfataas, Fosforibulokinaas), vt. Joonis 5. Oksüdeerivates tingimustes, kus on palju O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dehüdroaskorbaati, oksüdeeritud glutatiooni, toimub tioredoksiini oksüdeerimine, mis viib ensüümide inaktivatsioonile. (Wolosiuk et al., 1993; Hall & Rao, 1999).

## 1.5 Calvini tsükkel

Calvini tsükliks nimetatakse kloroplastide stroomas toimuvat CO<sub>2</sub> redutseerimisprotsesside jada. Tsükkel algab CO<sub>2</sub> fikseerimisega Ribuloos-1,5 bisfosfaadile ning lõpeb heksooside ehitamiseks vajaliku glütseeraldehüd-3-P (GA3P) ja dihidroksüatseon-fosfaadi (DHAP) tekitamisega. Calvini e. pimereaktsioonide tsükkel kasutab CO<sub>2</sub> karboksüülgrupi redutseerimiseks aldehüdgrupi tasemele valgusreaktsioonidest saadud ATP energiat ning NADPH reduktiivjõudu. Saadud trioosfosfaate GA3Pi ja DHAPi eksporditakse tsütoplasmasse, et sünteesida neist suhkrut – sahharoosi. Paralleelses rajas tekkinud tähts säilitatakse kloroplastides osmoosivaba energiavaruna terakesteks kuhjatuna.



Joonis 5. Calvini tsükkel. Atmosfääri CO<sub>2</sub> fikseerimine orgaanilistesse ühenditesse. Jämedad mustad nooled näitavad reaktsioone mis on ferredoksiin-tioreduktsiooni süsteemi poolt. Reaktsiooni 1 kontrollib RuBisCO aktiivsus. Adenosiin 5'-difosfo-glükoos (ADPG), Glütseraat 1,3-bisfosfaat (DPGA), Erütroos 4-P (E4P), Fruktos 6-P (F6P), Fruktos 1,6-bisfosfaat (FBP), Glükoos 1-P (G1P), Glükoos 6-P (G6P), Glütseeraldehüd 3-P (GA3P), Dihidroksüatseon-fosfaat (DHAP), 3-fosfoglutseraat (PGA), Pürofosfaat (PPi), Orgaaniline fosfaat (P), Ortofosfaat (P-OH), Riiboos 5-P (R5P), Ribuloos 5-P (Ru5P), Ribuloos 1,5-bisfosfaat (RBP), Sedoheptuloos 7-P (S7P), Sedoheptuloos 1,7-bisfosfaat (SBP), Uridiini 5-difosfo-glükoos (UDPG), Ksulüloos 5-P (Xu5P). 1: RuBisCO; 2: 3-fosfoglutseraadi kinaas; 3: NADP-glütseeraldehüd-3-P dehidrogenaas; 4: Trioosfosfaadi isomeraas; 5,8: Aldolaas; 6: Fruktos-1,6-bisfosfataas; 7,10: Transketolaas; 9: Sedoheptuloos-1,7-bisfosfataas; 11: Fosfoketopentoosi isomeraas; 12: Fosforiboosi isomeraas; 13: Fosforibulokinaas (Wolosiuk et al., 1993).

## 1.6 RuBisCO

Maailma levinuimaks valguks ja suurima biomassiga ensüümiks on tituleeritud Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas-oksügenaasi valk (EC 4.1.1.39) (RuBisCO), mis hõlmab taime lehe lahustuva valgu hulgast peaaegu poole. RuBisCO on suhteliselt suure molekulmassiga mitmesubühikuline ja suhteliselt aeglase katalüüsikiirusega ensüüm, mille peamiseks funktsiooniks on organismide elutegevuseks vajaliku süsiniku fikseerimine CO<sub>2</sub> näol. Anorgaaniline süsihappegaas konverteeritakse selle protsessi käigus kõigepealt orgaanilisteks suhkurfosfaatideks, millest sünteesitakse edaspidi nii sahharoosi kui ka tärklisi vt. Joonis 5. Paraku ei ole RuBisCO eriti substraadispetsiifiline ning seetõttu toimub CO<sub>2</sub> fikseerimise kõrvalt ka O<sub>2</sub> seondumine. Täpsemalt öeldes katalüüsib RuBisCO Calvini tsükli esimest reaktsiooni – pöördumatut Ribuloos-1,5-bisfosfaadi (RuBP) karboksüleerimist (kui fikseeritakse CO<sub>2</sub>)/oksügeneerimist (kui fikseeritakse O<sub>2</sub>). Reaktsiooni produktideks on kaks 3-fosfogluteraadi (PGA) molekuli karboksüleerimisprotsessi tulemusena või PGA ja 2-fosfoglükolaadi (PG-2) molekulid oksügeneerimise lõpuks. Kuna PGA on oluline ehituskivi suhkrute sünteesiks, ei saa RuBisCO tähtsust elusloodusele ülehinnata (Hall & Rao 1999).

## 1.7 RuBisCO valk

RuBisCO kogus lehtedes sõltub mitmetest kasvukeskkonna tingimustest: valguse hulgast, lämmastiku ja teiste toitainete kättesaadavusest, temperatuurist kasvuperioodil, taime geneetilisest omapärasest jne. Üldiselt on kõrgema valguse intensiivsusega kasvukohtade taimede RuBisCO kontsentratsioon kõrgem kui varjus kasvavatel taimedel. Lämmastiku kättesaadavuse tõusuga kaasneb lehtede lämmastikusisalduse ning RuBisCO kontsentratsiooni suurenemine (Gutteridge & Keys, 1985).

Kõrgematest taimedest eraldatud RuBisCO valk (550kDa) on heksadekameer, mis koosneb kaheksast suurest (LSU) ja kaheksast väikesest (SSU) subühikust. Subühikute molekulmassid on ligikaudu 55kDa (LSU, 475 AA) ja 14kDa (SSU, 123 AA) (Andersson, 1996; Hall & Rao 1999). Kloroplasti genoomis kodeeritud RuBisCO suured subühikud seonduvad tuuma DNA poolt kodeeritud ja eelvalguna kloroplasti transporditud väikeste subühikutega. Nii LSU kui ka SSU kodeeritakse prekursor-molekulidena, mida protsessitakse stroomas. Väikese subühiku eelvalgul on

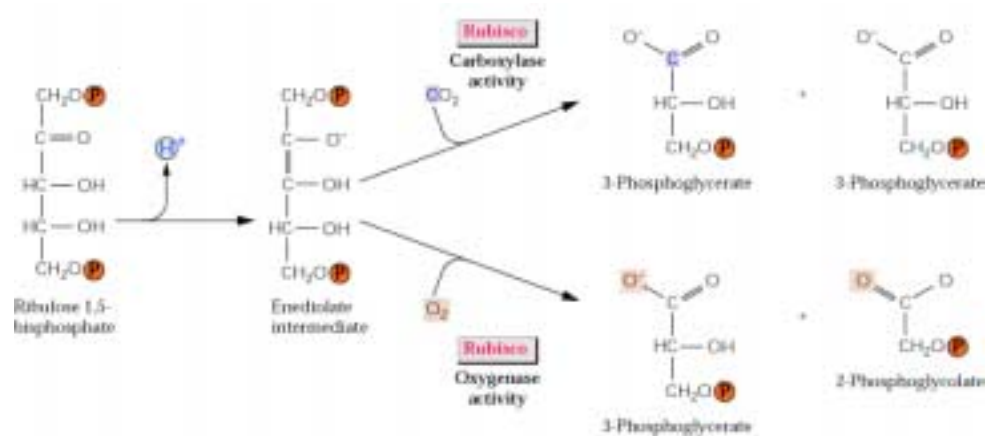
lisaks 50 aminohappeline peptiid aminoterminuses, mis lõigatakse ära kloroplasti sisenemisel. Funktsionaalse ensüümi kokkuassambleerumine ei ole spontaanne, selleks kasutatakse *chaperon*-i laadset abivalku, mis seondub kõigepealt suure subühikuga ja on tõenäoliselt seotud LSU protsessinguga (Hall & Rao 1999; Gutteridge & Keys, 1985). RuBisCO aktiivtsenter asub suure subühikus, väikese subühiku esinemine holoensüümis pole vajalik ensüümi aktiveerumiseks, kuid on vajalik aktiivsuse tagamiseks (Takabe et al., 1984). Teadaolevalt kogu RuBisCO paikneb taimedel kloroplastide stroomas, kus selle sisaldus on küllaltki kõrge,  $250\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , mistõttu ensüüm võtab enda alla ligi 70% kloroplastide strooma valgukogusest (Gutteridge & Keys, 1985; Anderson & Carol 2004)

## 1.8 RuBisCO biokatalüsaatorina

RuBisCO substraatideks on  $\text{CO}_2$ , molekulaarne  $\text{O}_2$ , RuBP ja  $\text{H}_2\text{O}$ . Süsihappegaasi kontsentratsioon, mis atmosfääris on  $340\mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $15\mu\text{M}$ ), on lehe rakuvaheruumides  $4\text{-}8\mu\text{M}$  (Eichelmann & Laisk, 1999), hapnikku ca.  $256\mu\text{M}$ , RuBP hulk lehes on vahemikus  $0.6\text{-}4\text{ mM}$  (Gutteridge & Keys, 1985). Kuna RuBisCO  $K_m(\text{RuBP})=10\text{-}46\mu\text{M}$ , siis Ribuloos-1,5-bisfosfaadi kogus pole enamasti reaktsiooni kiirust limiteeriv, kuid võib seda olla kõrge  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni puhul. Süsihappegaasi kontsentratsioon on seevastu madalam, kui oleks vajalik reaktsiooni maksimaalkiiruse saavutamiseks ( $K_m(\text{CO}_2)=12\text{-}34\mu\text{M}$ ) (Yeoh et al., 1981). Ensüümi katalüütiline konstant on keskmiselt  $3.6\text{s}^{-1}$  ( $\text{C}_3$  taimedel), või kuni  $6.8\text{s}^{-1}$  ( $\text{C}_4$  taimedel) (Evans & Seemann, 1984).

Nagu eelnevalt mainitud, katalüüsib RuBisCO süsihappegaasi molekuli liitumise kõrval ka hapniku molekuli liitumist Ribuloos-1,5-bisfosfaadile, Joonis 6. Viimane tuleneb sellest, et Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas-oksügenaasi spetsiifilisus substraadi suhtes on madal. Spetsiifilisust iseloomustatakse nn. spetsiifilisusfaktori alusel ( $\phi$ ), mis arvutatakse valemi  $\phi = V_{c,Ko}/V_{o,Kc}$  järgi, kus  $V_{c,o}$  tähistab karboksüleerimis või oksügeneerimisreaktsioonide maksimaalset kiirust ja  $K_{c,o}$  vastavate reaktsioonide  $K_m$ -i. Spetsiifilisusfaktor iseloomustab karboksüleerimiskiirust oksügeneerimiskiiruse suhtes juhul, kui  $\text{CO}_2$  ja  $\text{O}_2$  kontsentratsioonid reaktsioonikeskkonnas on võrdsed. Mida suurem on  $\phi$ , seda efektiivsemalt toimub  $\text{CO}_2$  fikseerimine  $\text{O}_2$  suhtes. Spetsiifilisusfaktor erineb liigiti, kuid kõrgematel taimedel jääb ta vahemikku 94-106. (Gutteridge & Keys, 1985;

Jordan & Ogren, 1981; Jordan et al., 1983). Kuna CO<sub>2</sub> ja O<sub>2</sub> kontsentratsioonid on kloroplastide stroomas erinevad, on karboksüleerimisprotsessi osakaal oksügeneerimise suhtes C3 taimedes 3.5-3.1.



Joonis 6. RuBisCO poolt läbiviidavad reaktsioonid. RuBisCO on nii karboksüleerivad kui ka oksügeneerivad omadused. Reaktsioon viiakse läbi ensüümi aktiivsentrilis tekkiva RuBP enoolvormiga. Reaktsiooni produktideks on kas kaks 3-fosfoglütseraadi molekuli või 3-fosfoglütseraadi ja 2-fosfoglükolaadi molekulid. (Buchanan et al., 2000)

Süsihappegaasi fikseerimise protsessi katalüüs koosneb kolmest etapist:

1) Protoni ümberpaiknemine RuBP molekuli C3 positsioonilt C2 positsioonile nii, et tekib RuBP enoolvorm.

2) RuBP enoolvormi reageerimine CO<sub>2</sub> molekuliga ning 3-keto-2-karboksü arabinitool bisfosfaadi (CABP) formeerumine. CABP on reaktsiooni kõige stabiilsem ja kõige kergemini isoleeritav vahevorm (Andersson, 1996)

3) Vee ja protoni liitumine CABP-le lõpetab reaktsiooni kahe PGA molekuli tekkega.

Oksügeneerimisreaktsiooni tulemusel tekib üks 3-fosfoglütseraadi molekul ja üks 2-fosfoglükolaat. PG-2 väljutatakse kloroplastist glükolaadi näol peroksüsoomi, kus glükolaat muundatakse glütsiiniks. Peroksüsoomist viiakse glütsiin mitokondritesse. Mitokondrites eraldatakse glütsiinist süsihappegaas, mis kloroplasti difundeerudes viiakse RuBisCO abil uuesti Calvini tsükliks (Hall & Rao 1999). Oksügeneerimis reaktsiooniga kaasneva CO<sub>2</sub> molekuli eraldumise tõttu nimetatakse fosfoglükolaadi metaboliseerumise protsessi valgushingamiseks.

## 1.9 RuBisCO aktiivsus

Lisaks RuBisCO hulgale määrab CO<sub>2</sub> sidumise taset ensüümi aktiivsus. RuBisCO aktiivse ja inaktiivse vormi hulkade omavaheline suhe ei ole veel päris selge. Arvatakse, et enamus RuBisCOst on aktiveeritud vormis, kuid see võib varieeruda. Samas, kui taim on kasvanud lämmastiku defitsiidis, siis kompenseeritakse RuBisCO hulga vähenemist ensüümi suurema aktiveerimisega (Mächler et al., 1988). Äsja kokkuassambeeritud RuBisCO ei ole funktsionaalne. Aktiivsuse saavutamiseks vajab ensüüm aktivaatormolekulidena CO<sub>2</sub>-te ja Mg<sup>2+</sup> ioone (Badger & Lorimer, 1976) ning valgulise komponendina RuBisCO Aktivaasi (RbcA). Kuigi aktivaatormolekulide seondumise järjekord ei oma tähtsust, arvatakse siiski, et esmalt seondub RuBisCO suure subühiku Lys 201 jäägile CO<sub>2</sub> (aeglane etapp), millele omakorda seotakse Mg<sup>2+</sup> (kiire etapp). Mõlemal juhul moodustub aktiivne, karbamüleeritud ensüüm (Gutteridge & Keys, 1985). On näidatud, et aktivatsioonisaht paikneb katalüütilisest saidist eemal (Heldt & Lorimer, 1978). RuBisCO aktiivsuse hindamise teeb keerukaks asjaolu, et ühe molekuli kõik kaheksa katalüütilist tsentrit ei pruugi aktiveeritud olla, samuti ei ole nende funktsioneerimine sünkroonne.

RuBisCO koguaktiivsus sõltub ka valguse intensiivsusest. Valgusega kaasneb elektronide transport membraanil ning pH muutumine kloroplastis. Tekib prootogradient, mis on vajalik ATP produtseerimiseks. RuBisCO on valges aktiivsem sellepärast, et ensüümi aktiveerumisel osalev RuBisCO aktivaas vajab funktsioneerimiseks ATP-d. Mutantsest *Ababidopsis*-est avastatud RuBisCO aktivaas multimeriseerub ning tekitab RuBisCOle seondudes sellel konformatsioonilise muutuse. Ensüümi tertsiaarstruktuuri muutumine soodustab RuBisCO aktiivtsentrisse jäänud suhkrujääkide dissotseerumist ning uue reaktsioonitsükli algust (Portis & Salvucci, 2002).



## 1.10 RuBisCO aktiivsust määravad tegurid

### 1.10.1 Valguse intensiivsus ja ioonid

Valguse intensiivsuse suurenemisega kaasneva fotosünteesi intensiivsuse tõusu põhjustavad mitu faktorit. Valguse toimetel tekib kloroplastis tülakoidi membraanidel prootongradient ning  $H^+$  ja  $Mg^{2+}$  ionide vastassuunalise transpordi tulemusena suureneb  $Mg^{2+}$  kontsentratsioon stroomas  $\sim 3\text{mM}$ -ks. Kui lisada prootongradienti vähendavat nitriidi, kaasneb sellega peaaegu täielik karboksüleerimise inhibeerimine (Heldt & Lorimer, 1978). RuBisCO koguaktiivsuse sõltuvust valguse intensiivsusest iseloomustab platooga kõver, mille lineaarses osas on kiirust piiravaks teguriks aktiivse RuBisCO hulk. Küllastava valguse ning  $CO_2$  kontsentratsiooni korral määrab ensüümi aktiivsuse ja fotosünteesi intensiivsuse RuBP regenerereerimise kiirus pimereaktsioonide kaskaadist.

Magneesiumioonide osalust  $CO_2$  sidumise intensiivsuse määramisel tõestavad katsed ionofooridega, ainetega, mis seovad ioone, kuid on samas lipofiilsed. Valgustatud kloroplastide ekstraktile ionofoori lisamisega suurendati kloroplasti välismembraani läbitavust  $Mg^{2+}$  ionidele. Selle tulemusel toimus assimilatsioonitaseme järsk vähenemine. Kui järgnevalt lisati  $5\text{mM}$   $Mg^{2+}$ , saavutati  $CO_2$  esialgne assimilatsioonitase (Heldt & Lorimer, 1978).  $Mg^{2+}$  tähtsust demonstreerib sooladest vabastatud ekstrakti ning  $19\text{mM}$   $MgCl_2$ -i sisaldava ekstrakti spetsiifiliste aktiivsuste võrdlus: vastavalt  $\sim 30\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  ja  $\sim 60\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  valgu kohta (Boyle & Keys, 1987). Arvatavasti on positiivse laenguga  $Mg^{2+}$ iooni (samuti ka  $Co^{2+}$  ja  $Ca^{2+}$  ionide) roll stabiliseerida ensüümi happelisi aminohappeid ja negatiivse laenguga karbamaati (Gutteridge et al., 1982).

### 1.10.2 Süsinikuühendid

RuBisCO aktiivsus sõltub lisaks aktivaatormolekulidele ( $CO_2$  ja  $Mg^{2+}$ ) ka substraatide kontsentratsioonidest. Näiteks kaasneb  $CO_2$  elimineerimisega lehele juhitud gaasisegust ensüümi aktiivsuse vähenemine neljandiku võrra, samas taastus esialgne aktiivsus peale  $CO_2$  keskkonda lisamist umbes 30 minuti jooksul (Boyle & Keys, 1987).

Ka suhkurfosfaatide esinemine keskkonnas mõjutab oluliselt ensüümi aktiivsust. Taimest eraldatud ning eelnevalt aktiveeritud RuBisCO inaktiveerub RuBP ja ka teiste suhkurfosfaatide füsioloogiliste kontsentratsioonide juures.  $\text{CO}_2$  ja  $\text{Mg}^{2+}$  poolt aktiveeritud RuBisCO RuBP karboksüleerimisvõime vähenemise põhjuseks peetakse substraadi tugevat seondumist ensüümile (Streusand & Portis, 1987; Lilley & Portis, 1990). Kui seondumine on toimunud aktiveerimata RuBisCOle, siis edasist karbamüleerimist ei toimu ja ensüüm jääbki inaktiivseks (Jordan & Chollet, 1983; Wolosiuk et al., 1993). In vitro tingimustes järgneb RuBP seondumisele aktiveeritud ensüümi aktiivsuse vähenemine kuni 15%-ni algsest aktiivsusest (Edmondson et al., 1990). Karbamüleeritud RuBisCO hulga muutumatus näitab, et sellise protsessiga ei kaasne aktivaatorite vabanemist ensüümilt (Edmondson et al., 1990). Nähtuse põhjustajaks peetakse RuBisCOle tugevalt seotud 5C fosfaatrühma sisaldavaid ühendeid, mis võivad tekkida enedioolvormist ensüümkatalüüsi käigus või peale katalüütilisest saidist vabanemist. Samuti võivad pimereaktsioonides moodustuda RuBP isomeerid, näiteks ksüluloos-1,5-bisfosfaat, mis konkureerib RuBP-ga seondumissaitide pärast ning võivad seonduda inaktiivsele ensüümile takistades selle karbamüleerimist (Zhu & Jensen, 1991).

Struktuurse sarnasuse tõttu toimivad ka mitmed fosfaatrühma sisaldavad suhkrud nagu fruktoos-1,6-bisfosfaat, riboos-5-fosfaat RuBP konkurentsete inhibiitoritena. RuBisCO aktiivsuse tugevaks kahjustamiseks piisab 4mM RuBP, 1mM fruktoos-1,6-bisfosfaadi või 5mM riboos-5-fosfaadi sisaldusest keskkonnas (*in vitro* 11 $\mu\text{M}$   $\text{CO}_2$ , pH 7.7). *In vivo* tingimustes on RuBP poolt tekitatud inhibitsioon ületatav RuBisCO aktivaasi abil, mis puhastab aktiivtsentri suhkurfosfaatidest. (Lilley & Portis, 1990).

Enamikul taimedel on RuBisCO spetsiifiline aktiivsus pimedas 25%-50% sellest, mis kõrge valguse intensiivsuse juures (Gutteridge et al. 1986). Valguse intensiivsuse muutusega kaasneva RuBisCO aktivatsiooni muutuse põhjustajaks peetakse RuBisCO katalüütilisse tsentrisse seonduvat fosforüleeritud suhkrut – 2–karboksüarabinitool-1-fosfaati (CA1P), kuna ensüümi aktivatsiooni tõusu ning lehe CA1P sisalduse vähenemise vahel esineb tugev korrelatsioon. Valgus mõjutab nii CA1P sünteesi kui degradatsiooni. CA1P sünteesitakse pimedas 2-karboksüarabinitoolist. Valguse käes CA1P hüdrolüüsitakse. Taimedel, kellel pole CA1P hulga suurenemine sama ulatusega kui

RuBisCO aktivatsioonitaseme vähenemine (näiteks spinat *Spinacea oleracea*), toimub RuBisCO aktiivsuse reguleerimine RuBP seondumisega inaktiivsele ensüümile (Kobza, 1989; Parry et al., 2003)

Karboksüleerimis- ja oksügeneerimisreaktsiooni esmased produktid PGA ja PG-2 on nõrgad inhibiitorid inhibitsioonikonstantidega vastavalt  $K_i(\text{PGA}) = 0.8\text{mM}$  ja  $K_i(\text{PG-2}) = 0.9\text{mM}$  (Gutteridge et al., 1986). Seega kaasneb RuBisCO algkiiruse märgatav vähenemine alles PGA füsioloogilisest (4-12mM) kõrgema kontsentratsiooniga (20mM) juhtudel. Kuna RuBisCO aktivaas PGA inhibeerivat toimet ei muuda, avaldab PGA ilmselt mõju ensüümreaktsiooni tasakaalule (produkti inhibitsioon), mitte aga otsesele RuBisCO aktiivsuse vähendamisele temale seostumise kaudu (Lilley & Portis, 1990).

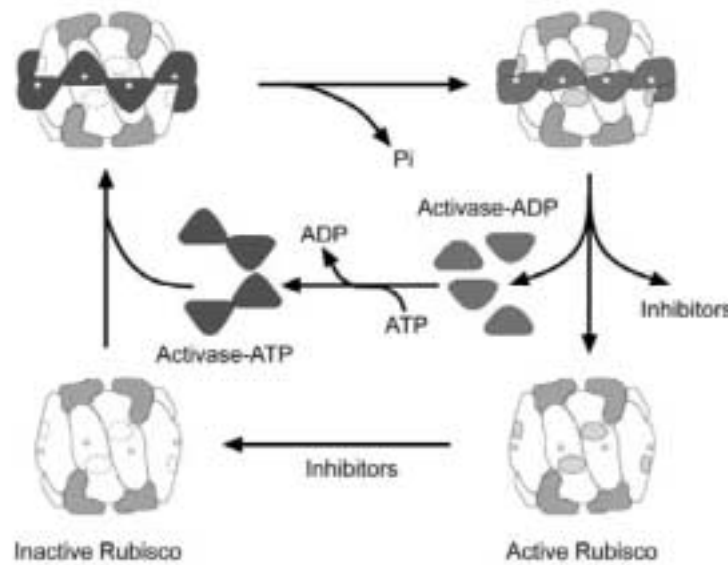
### 1.10.3 Fosfaatioonid

RuBisCO aktiivsust mõjutab ka strooma fosfaatioonide kontsentratsioon. Fosfaadi defitsiidiga kasvukeskkonnas kaasneb nii fotosünteesilise CO<sub>2</sub> sidumise määra kui ka karboksüleerimise efektiivsuse vähenemine mõjutades RuBisCO aktiivsust eelkõige RuBP regenererimise jõudluse läbi (Jacob & Lawlor, 1992). Kui lisada valgustatud kloroplastide ekstraktile ülehulgas 3-fosfoglutseraati või dihidroksüatsetoon-3-fosfaati (DHAP), järgneb sellele strooma fosfaadi kontsentratsiooni langus ja täielikult aktiveeritud RuBisCO inaktiveerumine (Heldt & Lorimer, 1978).

## 1.11 RuBisCO aktivaas

On näidatud, et RuBisCO aktiveerumiseks ja funktsioneerimiseks on vajalik CO<sub>2</sub>, Mg<sup>2+</sup>, RuBP, ATP ning ensümaatilise komponendi (RuBisCO aktivaasi) olemasolu. Valguse ning tülakoidi membraanide osalus süsteemis pole ilmtingimata vajalik. RuBisCO aktivaas (RbcA) on kloroplasti valk, mis võimaldab RuBisCO normaalset funktsioneerimist *in vivo* tingimustes, säilitab RuBisCO aktiivsust ja kohandab seda vastavaks valguse intensiivsusele (Salvucci et al., 1987). RuBisCOle seondununa muudab RbcA ATP hüdrolüüsil vabaneva energia arvel RuBisCO konformatsiooni, millega kaasneb sideme nõrgenemine RuBisCO ja temale seondunud suhkurfosfaadi vahel.

RbcA on liikide vahel laialt levinud, funktsioneerides alates vetikatest kuni kõrgemate C<sub>3</sub> ja C<sub>4</sub> taimedeni välja. Ensüüm lahustub hästi vesikeskkonnas ning esineb kahe isovormina, molekulmassidega 41-44kDa ja 45-46kDa, mis erinevad teineteisest ainult karboksü-terminuse poolest (Salvucci et al., 1985; Salvucci et al., 1987). RbcA sisaldab kahte Mg<sup>2+</sup> iooni, tarbib polümeriseerumiseks ATP energiat ja seondub RuBisCOle polümeerina vt. Joonis 7. (Salvucci & Ogren, 1996; Lilley & Portis, 1997).



Joonis 7. RuBisCO aktiveerimine aktivaasi poolt. (Portis, 2003)

Aktivaasi polüpeptiidid kodeeritakse tuuma poolt ja peale splaisingut ning posttranslatsioonilist protsessingut transporditakse kloroplasti. Valminud RbcA polüpeptiid kuulub struktuurse sarnasuse alusel makromolekulaarsete komplekside *chaperon* molekulide AAA<sup>+</sup> perekonda (*ATPases associated with diverse cellular activities*) (Portis, 2003).

RuBisCO aktiivsus sõltub nii RuBisCO kui selle aktivaasi kontsentratsioonidest (Lilley & Portis, 1990) ja toimib kui teist järku keemiline reaktsioon, sest RbcA vähendamisel transgeensetes taimedes muutub RuBisCO aktiivsus aktivaasi suhtes proportsionaalselt (Hammond et al., 1998; Portis, 2003). RuBisCO aktivaasi hulk moodustab ligikaudu 2% lehe lahustuva valguga hulgast, st. ühe RuBisCO molekuli kohta on umbes kolm aktivaasi molekuli ning taimes on enamus aktivaasist tõenäoliselt RuBisCOga seotud (Robinson et al., 1988).

RuBisCO aktiveerimine on tihedalt seotud fotosünteesi teiste reaktsioonidega. Pimedas on see takistatud madala ATP/ADP suhte tõttu, kuna RuBisCO aktivaas ei saa siis aktiveeruda ning valguses on RuBisCO aktivatsioon piiratud RuBP hulga suurenemise tagajärjel (Lilley & Portis, 1990; Portis, 2003). RbcA-i võime aktiveerida karbamüleerimata RuBisCOt põhineb sellel, et sunnib inhibiitor suhkurfosfaate aktiivsaadist dissotsieeruma. Selleks peab aktivaasi oligomeer seonduma RuBisCO katalüütilise tsentri vahetusse lähedusesse ning tekitama RuBisCO valgu konformatsioonilise muutuse (Portis, 2003). Aktivaasi oligomeeri suurus on varieeruv, olles teinekord isegi massiivsem kui RuBisCO (>550kDa). Samas väheneb oligomerisatsioon pisemagi ADP hulga juuresolekul (~340kDa) (Wang et al., 1993). Aktivatsiooni efektiivsuseks *in vivo* hinnatakse 60nmol aktiivsaite 1mg aktivaasi kohta, kus 1mol saitide aktiveerimiseks kulub 20mol-i ATP hüdrolüüsienergia (Robinson et al., 1988). RuBisCO aktiivsus aktivaasi juuresolekul on maksimaalne. Aktivatsiooni toimumine RbcA vabades tingimustes on aeglane ( $t_{1/2}$ =2-3 min), ning RuBP kontsentratsiooni 2-4 mM piiri ületamisega kaasneb RuBisCO funktsionaalsuse vähenemine (Streusand & Portis, 1987). Kuna RuBP kontsentratsioon lehe on umbes 10mM, siis ei ole RuBisCO kunagi täiesti aktiivne, vaid vajab pidevat RbcA poolset aktiveerimist.

### 1.11.1 ATP mõju RuBisCO aktivaasile

On näidatud, et nii elektron-transport läbi PSI kui ka tülakoidides tekkiv pH gradient stimuleerivad RbcA süsteemi. Põhjuseks peetakse seda, et RbcA moodustab oligomeere, mille suurus sõltub  $Mg^{2+}$  ja ATP kontsentratsioonist ning inhibeeritakse ADP poolt (Wang et al., 1993). Samas ei ole RbcA ATP-aasne aktiivsus otseses seoses RuBisCO aktiveerimisega – oligomeerid tekivad sõltumatult RuBisCO valgu olemasolust (Robinson & Portis, 1989).

Aktivaasi aktiivsus on väga tundlik ADP/ATP suhtele, mis pimedas on 1:1 ja aktivaasil on minimaalne aktiivsus. Valguse olemasolul on suhted 1:2 kuni 1:3 ja aktivaas on pooleldi aktiivne. Aktivaasi tundlikkus ADP/ATP suhtele lubab RuBisCO aktiivsust vähendada, kui taimel puuduvad  $CO_2$  fikseerimiseks vajaminevad energiaallikad. Ka

mutantsetes taimedes on uuritud ka RuBisCO aktiveeritust ADP/ATP suhte taustal. RuBisCO hulga vähendamisel kompenseeriti selle aktivatsioonitaset tõstes ADP/ATP suhet (Quick et al., 1991).

Maksimaalne aktivatsioon *in vitro* saavutati 0.5mM ATP-ga, kui kasutati lisaks ATP regenereerimissüsteemi (fosfoenoolpüruvaat ja püruvaadi kinaas). Ilma regenereerimissüsteemita oli aktiveerimine aeglasem ja sõltus lineaarselt ATP kontsentratsioonist (kuni 1.0mM) ning oli tugevalt inhibeeritud ADP poolt (Streusand & Portis, 1987).

Nagu eelnevalt mainitud, on taimedes kaks erinevat RbcA isovormi. Mõlemad isovormid on võimelised aktiveerima RuBisCOt, kuid teevad seda erineval tasemel. Suurem isovorm on tundlikum ADP poolsele inhibitsioonile, mis võimaldab suurema ulatusega aktiveerimisvõimalust (Salvucci et al., 1987; Zhang & Portis, 1999). *Arabidopsis* mutantides, kus esines ainult väike isovorm, oli RuBisCO aktiivsus küllastaval valgusel sama suur kui metsiktüüpi taimedeski, aga aktiivsust ei inhibeeritud valguse vähendamisel. Taimedes, kus oli ekspresseeritud ainult suur isovorm toimus RuBisCO aktiivsuse regulatsioon valguse abil, kuid aktivatsioon oli aeglasem ja absoluutväärtuselt väiksem kui metsiktüüpi *Arabidopsis*el. Samuti näidati, et suure isovormi modifitseerimisel – karboksüterminuses asuvate tsüsteiinide eemaldamisel – hakkas mutant käituma nagu ainult väikest isovormi sisaldav taim. (Zhang et al., 2002)

### **1.11.2 Ferredoksiini mõju RuBisCO aktivaasile**

Mitmete fotosünteesi protsessis osalevate ensüümide näiteks fruktoos-1,6-bisfosfataasi, glütseeraldehüd-3-P dehüdrogenaasi, sedoheptuloos-1,7-bisfosfataasi, malaadi dehüdrogenaasi, fosforibulokinaasi ja RuBisCO aktivaasi aktiivsus on reguleeritud valguse poolt (Wolosiuk et al., 1993). See toimub ferredoksiin-tioredoksiin süsteemi vahendusel. Valguse olemasolul hakkavad elektron-transportahela elektronid liikuma PSI elektronaktseptorile, ferredoksiinile. FD kuulub koos ferredoksiin-tioredoksiin reduktaasi (FTR) ning tioredoksiiniga ensüümsüsteemi, mis aktiveerib ensüümid redutseerides nende tsüsteiinijääkide tiolrühmasid (Hall & Rao, 1999).

Strooma redoksseisu kaudu reguleeritakse eelkõige RbcA suurt (sRcbA), 46 kDa, isovormi. Füsioloogilise ADP/ATP suhte korral on suure RbcA isovormi ATP hüdrolüüs suhteliselt väike, kui võtta võrdluseks väikese isovormi (vRbcA) aktiivsus. Mutantide analüüs on näidanud, et sRcbA redokstundlikkus on põhjustatud selle C-terminuse tsüsteiini jääkidest, mille redutseerumisel suure isovormi ADP/ATP tundlikkus väheneb ning ensüüm aktiveerub. Tugeva redutseerija (DTT) ning tioredoksiin-f lisamisega kaasneb aktivaasi aktiivsuse kümnekordne suurenemine. Oksüdeerija (oksüdeeritud glutatioon) lisamisega aktiivsus langeb (Zhang & Portis, 1999). Optimaalseimaks suure ja väikese isovormi suhteks on pakutud 1:1 suhet (Zhang et al., 2001; Shang et al., 2002).

Redoksreguleerimine ei pruugi toimuda kõikides taime liikides, osades (tubakas, mais, *Chlamydomonas*) ei leidu RbcA mõlemat isovormi, eksisteerib ainult vRbcA (Salvucci et al., 1987; Zhang & Portis 1999).

### **1.11.3 Temperatuuri mõju RuBisCO aktivaasile**

RuBisCO aktivatsiooni vähenemine kõrge temperatuuri juures on põhjustatud RuBisCO aktivaasist. Erinevalt RuBisCOst, mille aktiivsuse suurenemine temperatuuride 25-50° vahemikus on lineaarne (1-6 U mg valgu kohta), kaasneb aktivaasil temperatuuri tõusuga aktiivsuse kasv ainult 42°-ni (1-3 U mg valgu kohta) (Crafts-Brandner & Salvucci, 2000). RuBisCO aktiivsuse vähenemist kõrge temperatuuri juures põhjustavad ilmselt mitu erinevat protsessi: aktivaasi oligomeeride lagunemine ning RuBisCO poolt sünteesitud inhibeerivate ühendite moodustumise tõenäosuse suurenemine kõrgel temperatuuril (Portis, 2003).

## **1.12 Ensüümide paiknemine kloroplastis**

Nii taimede fotosünteesi, kui ka muude elusorganismides toimuvate protsesside paremaks mõistmiseks ei piisa ainult teabest valkude kontsentratsioonide, muteerituse ja aktiivsuse kohta. Oluline on teada ensüümide omavahelisest paiknemisest ruumis.

Herne kloroplastide strooma immunotsütolokalisatsiooni eksperimendid näitavad, et RbcA, karbo-anhüdraas, fosforibulokinaas ja P-glütseraadi kinaas on RuBisCOle

lähedal paiknevad ensüümid. Samuti formeerib RuBisCO stabiilseid komplekse ka muude valkudega, kaasa arvatud nendega, mis varustavad teda substraatidega (Anderson & Carol 2004).

On uuritud spinati (*Spinacea oleracea*) kloroplaste kasutades selleks immuno-elektronmikroskoopiat. Tulemustest lähtuvalt võib väita, et sellised Calvini tsükli ensüümid nagu Riboos-5-fosfaadi isomeraas (R5PI), Ribuloos-5-fosfaadi kinaas (R5PK), Ribuloos-1,5-bisfosfaadi karboksülaas (RuBisCO), Glütseeraldehüüd-3-fosfaadi dehüdrogenaas (GA3PD), Sedoheptuloos-1,7-bisfosfataas (SB) ja elektron-transport valkkompleks FNR on organiseerunud stabiilsetesse CO<sub>2</sub> fikseerivatesse multiensüümkompleksidesse, mille molekulmass küündib ca 900kDa. Kuna RuBisCOt ja tema aktivaasi on suhteliselt palju, siis paiknevad nende kahe valgu kooslused stroomas laiali. R5PK, GA3PD, SB ja terminaalne elektroniülekandja FNR on seevastu lokaliseerunud tülakoidide membraanidele. Märkatav on FNR keskne paiknemine kompleksis (Süss et al., 1993).

Ühe metaboolse raja ensüümide koondumine stabiilsetesse ensüümkompleksidesse annab aimu sellest, et elussüsteesteem funktsioneerimine ei sõltu ainult valkude olemasolust, mitteolemasolust, funktsionaalsest aktiivsusest – oluline on ka ensüümide omavaheline interaktsioon. Samuti tuleks aru saada organismi käitumisest tervikuna, sest Elu ei ole katlas keev supp, vaid osavalt üles ehitatud biomolekulide süsteem, mis realiseerib ensüüme läbivat elektronide ning anorgaaniliste ainete voogu.



## TÖÖ EESMÄRK

Nüüd, kus fotosünteesi valgusreaktsioone kui ka Calvini tsükli pimereaktsioone on eraldiseisvatena üsnagi hästi iseloomustatud pöördub tähelepanu üha enam nende kahe süsteemi omavahelisele koordineeritusele. Mis on valgusreaktsioonide tuumikuks, kas elektronivoogude sõlmpunkt PSI või hoopiski vett oksüdeeriv PSII? Mis määrab süsihappegaasi fikseerimise, kas taime üleüldine metaboliitide ja ensüümide hulk või hoopiski ensüümide peen regulatsioon? Kuidas on omavahel seotud valgus- ja pimereaktsioonid? Kui taime fotosünteesiosa energia kogujana mõjutab energiat tarbivat assimilatsiooni, siis milliste mehhanismide alusel see käib?

Eelnenud küsimustest inspireerituna seadis käesoleva töö autor endale eesmärgiks selgitada välja tegurid, mis tingivad RuBisCO erineva aktivatsioonitaseme. Töö teostamisel keskenduti siiski PSI hulga ja RuBisCO katalüüsikiiruse määramisele ning nende omavahelisele võrdlusele. Tubakat uurides üritati aru saada, kuidas reguleerivad oma RuBisCO aktiveeritust sellised taimed, kelles puudub RbcA suur isovorm.

Siiani on RuBisCO aktiivsuse mõõtmisi tehtud prepareeritud RuBisCOga *in vitro*, aga Tartu Ülikooli Taimefüsioloogia õppetooli tehniline baas võimaldab esmakordselt RuBisCo aktiivsust *in vivo* mõõta. Tänu sellele kirjeldavad saadud tulemused adekvaatsemalt elusas taimes toimuvat.

## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1 Taimne materjal

Katsetaimedena kasutati türgi tubaka (*Nicotiana tabacum* L.) metsiktüüpi W38 ja RuBisCO valgu hulga suhtes mutantseid liine SINGLE ja DOUBLE (Hudson et al., 1998).

Tubakataimi kasvatati vesikultuurina (toitelahusega kastetavates kivivillapallides) kasvukambris 70% suhtelise õhuniiskuse, õhutemperatuuri 20°päevane/17°öine ja valguse intensiivsuse 300 – 400  $\mu\text{mol kvante m}^{-2}\text{s}^{-1}$  juures ööpäevase rütmiga: 12h valgust, 12h pimedust. Toitelahusena kasutati Knopi toitelahust [  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1.0g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{KCl}$  0.125g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$  0.0125g\* $\text{l}^{-1}$  ] millele oli lisatud 1ml/l Hoaglandi mikroelementide segu [  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0.055g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{KI}$  0.028g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{KBr}$  0.028g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{TiO}_2$  0.055g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.028g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{LiCl}$  0.028g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.388g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.611g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.055g\* $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.055g\* $\text{l}^{-1}$  ]. Toitelahust vahetati iga kahe nädala tagant ning kastmine toimus automaatselt kord 4h jooksul.

Tubakaid kasvatati kahes katseseerias:

- 1) Normaalseeria – nii metsiktüüpi kui ka mutantseid tubakaid kasvatati eelpoolmainitud tingimustes.
- 2) Lämmastikugradiendi seeria – metsiküüpi taimi kasvatati erineva lämmastikusisaldusega toitelahustel. Lämmastikugradiendiks valmistati toitelahused, mis sisaldasid vastavalt 5%, 12%, 17%, 20%, 25%, 50% 100%  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  Knopis ettenähtud kogusest.

### 2.2 Mõõtmisprotseduur

Eksperimendi jaoks võeti varahommikul pimeadapteerunud taim, mille intaktsel lehel viidi läbi optilis-gasomeetrilised mõõtmised. Mõõdetud lehelt võeti 6 lehekettast (leheketta pindala 1,96cm<sup>2</sup>) PSI keemiliseks määramiseks (hõlmab ka klorofüllil määramist), 1 lehekettas lehe optilise neeldumisspektri ja RuBisCO valgu hulga määramiseks ning 1 lehekettas selle kuivkaalu määramiseks. Järgijäänud leht vabastati rootsudest, kuivatati, ning saadeti üldlämmastiku määramiseks PMÜ Taimebiokeemia

laboratooriumisse. PSI ja RuBisCO valgu hulga mõõtmise tarvis võetud lehekettad säilitati analüüsi teostamiseks vedelas lämmastikus.

### **2.3 Klorofüllü määramine**

Klorofüllü määramiseks uuritavas lehes purustati lehekettad vedelas lämmastikus ning võeti üles puhvris A [ Mes-KOH(pH 7.0) 50mM, NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, sorbitol 300mM ] arvestusega 1 leheketas 1ml puhvri kohta. Osale suspensioonist lisati atsetooni lõppkontsentratsiooniga 80% v/v ning tsentrifuugiti 12000rpm 10min. Lahuse optiline neeldumisspekter mõõdeti 80%-se atsetooni suhtes lainepikkuste vahemikus 600nm - 750nm (UV-2410PC, Shimadzu corporation, Kyoto Japan), klorofüllü sisaldus lahuses leiti (Porra et al., 1989) järgi.

### **2.4 PSI reaktsioonitsentrite hulga keemiline määramine**

PSI hulga määramiseks kasutati vedelas lämmastikus külmutatud leheketaid, mis peenestatakse uhmris. Pesemiseks lisati puhvrit A [ Mes-KOH(pH 7.0) 50mM, NaCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, sorbitol 300mM ] arvestusega 1 leheketas 1ml puhvri kohta. Saadud lahusest kasutati osa klorofüllü määramiseks, ülejäänut tsentrifuugiti 13500g juures 10min. Seejärel eemaldati supernatant ja sade, võeti üles puhver A-s (1ml 1 ketta kohta). Sademe lahusele lisati 10% Triton-X100 (0,1ml 1 ketta kohta) ja polüvinüülpolüpürrolidooni (PVPP) (20mg leheketta kohta) fenoolsete ühendite mõju kõrvaldamiseks, tehti korralik vorteks ning inkubeeriti u. 15min jääs. Suspensiooni tsentrifuugiti 3000g juures 2min PVPP, tärgliseterade ja purustamata jäänud taimeosade eemaldamiseks. Proovidega opereeriti terve protseduuri jooksul 0°C juures, et vältida võimalikku valkude lagunemist. Vahetult enne mõõtmist tõsteti 1ml tülakoidide lahust toasooja küveti. Fotosüsteem I hulga määramiseks lisati ühele osale tülakoidide lahusele (1ml) 40µl 1M Na-askorbaati, teisele osale (1ml) 40µl 1M kaaliumheksatsüanoferraat[III]. Lahuste optilised tihedused mõõdeti 700nm juures (0-punktiks optiline tihedus 715nm juures) ca. 300-500s pärast (UV-2410PC, Shimadzu corporation, Kyoto Japan). PSI hulk arvutati oksüdeeritud (kaaliumheksatsüanoferraat[III]) ja redutseeritud (Na-askorbaat) lahuste diferents-

spektrist, arvestades, et oksüdeeritud ja redutseeritud P700 ekstinktsioonikoefitsientide vahe on  $64 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Hiyama & Ke, 1972).

## 2.5 Leheketta optiline neeldumine

Leheketta optiline neeldumisspekter leiti integreeriva kera abil lainepikkuste vahemikus 400nm-800nm nii ainult pealelangevas kui ka hajusas valguses spektroradiomeetriga PC-2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) musta keha neeldumisspektri suhtes. Analüüsi programmi SPT (Tartu Ülikool), mis võimaldas arvutada valge valguse ja kaugpunase valguse neeldumise lehes.

## 2.6 Mõõte- ja analüüsisüsteemi tehniline realiseering

Kasutatud mõõteaparatuur on kombineeritud lehe optika ja gasomeetria analüsaatoritest. Kuna analüüsisüsteemi on piisavalt põhjalikult kirjeldatud artiklites (Oja et al., 2003; Laisk et al., 2002), piirdub käesolev töö ainult ülevaate ja täpsustuste andmisega. Süsteemi juhitakse kordineeritult arvuti abil eelnevalt valmiskirjutatud programmi alusel automaatselt ja kohatise operaatoripoolse manuaalse sekkumisega. CO<sub>2</sub> analüsaatorit, O<sub>2</sub> analüsaatorit, fluoromeetrit, niiskusemõõtjat (psühromeetrit) ning valgussensorite analoogsignaale digitaliseeritakse 12-bitise (4096 ühikulise resolutsiooniga) A/D muunduriga ADIO 1600 (ICS Advent, San Diego, USA). Juhtimisprogramm RECO (Tartu Ülikool) sarnaneb nelja sulega isekirjutajale, mis salvestab mõõdetud parameetrid järjest andmefaili ning võimaldab jälgida eksperimendi kulgu reaajas. CO<sub>2</sub> ja O<sub>2</sub> analüsaatori, psühromeetrite ning fluoromeetrite signaale mõõdeti iga 5ms järel, kuid nende kuvatavad väärtused keskmistati üle 200ms. Kiirete P700 redokseisundite muutumist jälgiti ostilloskoobi režiimis 50µs resolutsiooniga. Esmaseks andmetöötluseks on RECO-ga visuaalselt sarnane programm RDA (Tartu Ülikool), millega saab salvestatud katseandmeid vaadata ning arvulisi väärtuseid välja lugeda. Järgnevad arvutused tehti programmidega RDA\_OXY (hapnikupulsside analüüs), PS1TITR (FR-tiitrimiskõvera analüüs), RDA\_AC (assimilatsioonilaegu analüüs), GM2SYNTE (üldarvutused) (Tartu Ülikool), lõplik andmetöötlus toimus MS EXCEL-iga.

## 2.7 Gasomeetria

Taimede gaasivahetuse uurimiseks kasutatakse läbivooluprintsiibil töötavat, kahe analoogse kanaliga kiiretoimelist gaasisüsteemi, kus ühte kanalit kasutatakse eelkõige taime ettevalmistamiseks ja teist peamiselt gaasivahetuse mõõtmiseks. Lisas 2. on toodud välja mõõtekanali põhimõtteskeem, esimene kanal on üldjoones sama, kuid veidi lihtsama ehitusega. Gaasisegu koostis on mõlemas kanalis autonoomselt sätitav. Osa lehest suletakse lehekambrisse (diameetriga 31mm, kõrgusega 3mm), mida läbib gaasivool kiirusega  $0.5\text{mmol}\cdot\text{s}^{-1}$ . Leht fikseeriti tärglisekliistri abil ülemise poolega lehekambri termostateeritava akna külge. Kuna tubaka gaasivahetus toimub eelkõige abaksiaalse (alumise) epidermi kaudu, siis selline kliistriga fikseerimine praktiliselt gaasivahetust ei mõjuta. Fikseerimise eesmärgiks oli suurendada lehe soojusvahetust termostaadi veega (stabiilselt  $22^{\circ}\text{C}$ ), et stabiliseerida lehe temperatuuri valguse muutumise korral.

Gaasisüsteemi toidetakse  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$  ja  $\text{CO}_2$  kõrgsurveballoonidest. Magnetklappidega juhitud kapillaarsüsteemis segatakse kõigepealt kokku puhas  $\text{O}_2$  ja puhas  $\text{N}_2$  (jääkhapnikku alla 50 ppm), et saada kindla hapnikukontsentratsiooniga gaas (21% või 2%). Peale soovitud  $\text{O}_2$  kontsentratsiooniga gaasi saamist lisatakse segule ka veeauru. Selleks on gaasiüsteemi korpuses asuv, suure vee ja gaasi kokkupuutepinna ning hea soojusjuhtivusega metallkeha, mille temperatuur on  $50^{\circ}\text{C}$ . Gaasi küllastatakse niisutit läbides veeauruga ning suunatakse tagasi üldisesse gaasivoolu. Niisutisse sisenevat ja sellest mööda juhitud gaasi hulga suhet saab reguleerida vastava kraani abil. Käesolevas töös hoiti lehele siseneva gaasisegu suhteline niiskus 60%  $22^{\circ}\text{C}$  juures. Peale niisutamist lisati segule  $\text{CO}_2$ . Süsihappegaasi kontsentratsiooni reguleeritakse manostaadi abil. Manostaat kujutab endast veega täidetud anum, millesse on sukeldatud kapillaarid.  $\text{CO}_2$  osarõhku muudetakse kapillaaride üles-alla liigutamisega 0ppm – 2000ppm (atmosfääris 360ppm).

Gaasianalüsaatorid paiknevad ainult ühe kanali, mõõtekanali, väljundis.  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooni mõõdetakse infrapunaanalüsaatoriga LI-6251 (LiCor, Lincoln, NE, USA). Kuna analüsaator on tundlik nii süsihappegaasile kui veeaurule, paikneb selle ees jahuti. Jahuti kondenseerib vee  $0^{\circ}\text{C}$  juures ja analüsaatorisse jõuab ainult kuiv gaas. Niiskust mõõdetakse kuiva õhu suhtes kalibreeritud psühromeetriga (Tartu Ülikool).

Psühromeeter koosneb termopaarist, millest ühte niisutatakse spetsiaalse tahiga ja teine on kuiv. Veearu sisaldust gaasis iseloomustab temperatuurierinevus termopaaril. Hapniku kontsentratsiooni mõõdetakse tsirkoon-oksiidelemendiga hapnikanalüsaatoriga Ametek S-3A (Thermox, Pittsburgh, PA, USA).

## **2.8 Optiline mõõtesüsteem**

### **2.8.1 Lehekambri valgustamine**

Lehtekambrit pindalaga  $7.8\text{cm}^2$  valgustati fiiberoptilise süsteemi abil läbi termostateeritava akna. Taime adapdeerimiseks ja valguskeskkonna loomiseks kasutati põhivalgusallikana (WL) Schott KL 1500 lampi (Heinz Walz, Effeltrich, Saksamaa), mille ees oli soojuskiirgust peegeldav filter. Küllastava valgusvälke saamiseks fluoretsentsi mõõtmistes ja maksimaalse ETR hindamiseks kasutati teist Schott KL 1500 lampi (FL). FL intensiivsuseks oli  $11000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ning valgusvälke pikkust reguleeriti suruõhu poolt toidetava katikuga (Tartu Ülikool). Kaugpunase valguse allikaks (FRL), mis oksüdeerib PSI, aga mitte PSII, kasutati valgusdiodidest lampi kiirgusmaksimumiga 720nm ( $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

### **2.8.2 Fluoretsentsi mõõtmine**

Kuna elusas lehes fluoresteerub PSI nõrgalt ja konstantselt, siis iseloomustab fluoretsentsi mõõtmine eelkõige PSII. Selleks kasutati PAM 101 klorofüllü fluoromeetrit koos emitter-detektorseadmega 101ED (Heinz Walz, Effeltrich, Saksamaa). Operatsiooni teostamiseks vajalikud kiud olid paigutatud valgustamiseks kasutatud kiudude vahele lehekambri akna  $2\times 1\text{cm}^2$  ellipsoidsel alal. Mõõtmiseks suunati lehele kas 100kHz või 1.6kHz sagedusega moduleeritud valgusimpulsid lainepikkusega 650nm. Klorofüllü fluoretsents kiirgus lehelt sama pulsisagedusega ning see eraldati detektorosas üldisest (aktiinselt) moduleerimata valgusest. Selle tulemusena oli fluoromeetri väljundsignaal võrdeline fluoretsentsi kvantsaagisega, mitte fluoretsentsi üldintensiivsusega.

Fluoretsentsi mõõtmiseks kasutati järgmisi arvuti poolt sooritatavaid protseduure: F (klorofüllü fluoretsentsisaagis statsionaarseisus), Fm (suletud tsentritega), F0 (avatud

PSII tsentritega). Protseduuride sooritamiseks aktiveeriti PAM 101 mõõtepulsid ning registreeriti fluorentsijoont. Fm saamiseks anti mõõtepulsside ajal küllastusvälge. Välge redutseerib kõik tsentrid ja ummistab ETR-i mille tagajärjel kasvab fluorentsents maksimaalse väärtuseni. Taustvalguse intensiivsust ei muudetud. F0 mõõtmiseks asendati taustvalgus 5s-ks kaugpunase valgusega (FRL), mis mõjub ainult PSI-le oksüdeerides nii plastokinooni kui ka P700, ning tühjendab fotosüsteemide vahel funktsioneerivad elektronkandjad elektronidest. Seejärel FRL eemaldati ning anti küllastusvälge.

### **2.8.3 820nm signaali mõõtmine**

820nm signaali kasutatakse PSI redoksseisu iseloomustamiseks ja reaktsioonitenter P700-t läbiva elektrontranspordi hindamiseks. Mida oksüdeeritum on P700, seda enam neelab ta 820nm juures valgust. 820nm signaali mõõtmise eeliseks on see, et optiline tihedus 820nm juures ei ole segatud klorofüllil neeldumisspektri ega klorofüllil fluorentsentsi poolt nii palju kui 700nm juures. Mõõteseadmeks oli teine PAM 101 fluoromeeter, sensoriks ED800T emitter-detektor (Heinz Walz, Effeltrich, Saksamaa). Emitteri valgusdiodist eraldunud kiirgus juhiti optiliste kiudude abil  $1\text{cm}^2$  suurusele lehepinnale, lehekambri teiselt poolt (lehe alumiselt küljelt) juhtis teine kiukimp lehe läbinud valguse sensorini. Peale diferentsiaalsignaali sajakordset võimendamist oli fluoromeeter võimeline detekteerima 0.01%-lisi muutusi 820nm signaalis.

Arvuti poolt realiseeritavad 820nm signaali (P700 signaali) protseduurid, mis salvestavad P700 redoksseisundi muutumise ostsilloskoobi režiimis:

AltP – Kustutab WL ja FRL lambid ning salvestab P700 signaali käigu ostsilloskoobi režiimis. Seda protseduuri kasutatakse PQ kogumi redoksseisundi ja PSI reaktsioonitsentri reredutseerumiskiiruse iseloomustamiseks.

CtrlP – Erineb AltP selle poolest, et pimeduse tekitamise ajal antakse lehele lühike FL valgusvälge, mis redutseerib plastokinooni ning oksüdeerib plastotsüaniini ja PSI. Sellega määratakse oksüdeerumisevõimeliste PSI-de osa (P0). Järgnev P700 reredutseerumine pimedas toimub maksimaalse kiirusega, kus elektronid liiguvad plastokinoonilt läbi CytBF kompleksi ning plastotsüaniini P700-le. Tekkiv 820nm signaali seis määrab nivoo,

mis vastab täielikult redutseeritud PSI-le ning signaali muutumisest leitakse tsentrite redutseerumise kiiruskonstant täielikult redutseeritud PQ-pooli puhul. P700 oksüdeeritus normaalseisus (P) leiti algse 820nm signaali ja pimenivoo suhtena.

Short CtrlP – Erineb tavalisest CtrlP-st selle poolest, et FRL ei lülitata välja. Kasutatakse juhtudel, kus FRL puudumine võib fotosünteesi rivist välja lüüa.

AltV – Antakse lehele STF ning salvestatakse 820nm signaal.

AltC – Salvestab signaali muutumise FRL all.

#### **2.8.4 Välpulsid (STF)**

“Ühepöördevälkeid” (Single Turnover Flash) kasutatakse funktsionaalsete PSII ja PSI reaktsioonitsentrite hulga määramiseks (Oja & Laisk, 2000). STF andmiseks rakendati spetsiaalset impulsslampi (MVS 7060, EG&G Optoelectronics, Salem, MA, USA), välkedoosiga lehepinnal  $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ . Genereeritav välge kestusega  $3\mu\text{s}$  on piisavalt lühike, et selle jooksul jõuaks toimuda ainult üks laengute lahutamine PSII tsentris, aga samas piisavalt intensiivne, et kõikides PSII antennides saaks toimuda ühe elektroni ülekanne.

### **2.9 Mõõtmisprogramm**

Standartne mõõtmisprogramm koosnes PSI reduktiivsest tiitrimisest, PSI oksüdeerivast tiitrimisest, PCw kõverast 2% O<sub>2</sub> juuresolekul, RuBisCO kineetika kõverast, assimilatoorlaengu määramisest ning vältas sõltuvalt taime õhulõhede avanemise kiirusest 6-10h.

#### **2.9.1 PSI reduktiivse tiitrimine**

PSI reduktiivse tiitrimise programm võimaldab määrata PSI ja PSII hulga taimelehe pindala kohta (Oja et al., 2004). Enne PSI reduktiivset tiitrimist määrati pimeadapteeritud taimel Fm. Seejärel hoiti lehte atmosfääri tingimustes (21% O<sub>2</sub>, 360ppm CO<sub>2</sub>) madalal valgusel ( $72\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) seni, kuni taime õhulõhed olid piisavalt avatud hapnikupulsside mõõtmiseks. Õhulõhede seisundi üle otsustati jälgides lehe transpiratsiooni, st. gaasi niiskusesisalduse kasvu peale lehekambri läbimist. Hapnikupulsside mõõtmiseks viidi leht madala O<sub>2</sub> kontsentratsiooniga (50ppm)



mõõtekanalisse. Seejärel kustutati WL, lülitati sisse FRL ja realiseeriti järgemööda protseduurid AltV, mis tähendas lehele küllastusvälke andmist ning hapnikuanalüsaatori signaali registreerimist, AltP koos STF-ga (iseloomustamaks PSI täielikku redutseerimist) ning AltP (PSI redutseerumist pimesissevoolu tagajärjel). Selleks, et saada tiitrimiskõverat, korraldati protseduurikomplekti kolme erineva küllastusvälke intensiivsuse juures. Kuna 6% FRL kvantidest suudavad siiski ergastada ka PSII, lülitati kaugpunane valgus 50s välja. Sellest protseduurist saadi teada FRL poolt tekitatud hapnikufooni suurus.

### **2.9.2 PSI oksüdeeriv tiitrimine**

PSI oksüdeeriv tiitrimine võimaldab määrata PSI, PC, Cyt<sub>b6</sub>f hulka lehe pindalaühiku kohta (Oja et al., 2003). PSI oksüdeerivaks tiitrimiseks lastakse P700-l eelnevalt redutseeruda erineva pikkusega pimedusintervallide jooksul (0.4s, 0.6s, 1.0s, 1.6s, 2.6s, 4.6s, 8.0s, 12.6s, 18.0s, 30.0s, 50.0s) ning siis oksüdeeritakse FRL sisse lülitamisega (AltC protseduur). Tiitrimise lõppu tehakse Short CtrlP, et teada saada 820nm signaali väärtus täiesti oksüdeeritud seisus.

### **2.9.3 PCw kõver 2% O<sub>2</sub> juures**

PCw kõver iseloomustab taime assimilatsiooni erinevatel CO<sub>2</sub> kontsentratsioonidel ja madala O<sub>2</sub> juures (2%).

PCw kõver algas taime fotosünteesi ja transpiratsiooni stabiliseerimisega 2% O<sub>2</sub>, 140ppm CO<sub>2</sub>, valguse 760μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> juures. Mõõtmise toimus erinevate CO<sub>2</sub> kontsentratsioonide (140, 100, 50, 0ppm) ja valguse 760μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> juures. Enne igat seisundit viibis taim 30s 140ppm juures ja peale mõõtmiskanalisse tulekut lasti taimel u. 1min stabiliseeruda ning viidi läbi järgnev protseduuride jada: Short CtrlP, AltP, Fm.

### **2.9.4 RuBisCO kineetika kõver**

RuBisCO kineetika kõver järgnes vahetult PCw kõverale (2% O<sub>2</sub>) ja võimaldas uurida RuBisCO reaktsiooni kõrgetele CO<sub>2</sub> kontsentratsioonidele, kus fotosüntees oli

limiteeritud RuBP regenereerimise poolt. Saadud andmetest määrati RuBisCO  $V_{max}$  ja  $K_m(\text{CO}_2)$ .

Kõvera mõõtmine algas taime stabiliseerimisega 140ppm  $\text{CO}_2$ , 2%  $\text{O}_2$  ja  $760\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  valguse juures. Nende tingimuste juurest tehti hüppeid mõõtekanalisse kus oli teistsugune  $\text{CO}_2$  kontsentratsioon (2000, 1500, 1000, 600, 340ppm). Taime reaktsiooni jälgiti 12s vältel mõõtekanalis, seejärel lasti lehel 2min stabiliseeruda madala  $\text{CO}_2$  kontsentratsiooniga tingimustes.

### **2.9.5 Assimilatoorlaengu määramine**

Lehe reaktsiooniliselt vaba RuBP hulga (assimilatoorlaengu) ja spetsiifilise karboksüleerimisaktiivsuse määramiseks stabiliseeriti leht 100ppm  $\text{CO}_2$ , 2%  $\text{O}_2$  ja  $760\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  valguse juures. Seejärel kustutati valgus ning registreeriti  $\text{CO}_2$  assimileerimine pimeduses 90s jooksul.

### **2.9.6 Lisaprotseduurid**

Iga mõõtmisprogrammi lõpus toimus  $\text{CO}_2$  lahustuvuse määramine (lehte hoiti 600ppm juures ning viidi siis 0ppm juurde) ja  $\text{CO}_2$  jäägi hulga kindlaks tegemine  $\text{N}_2$  balloonis (lehekambrit mitteläbivale gaasivoole installeeriti KOH kolonn, mis fikseeris  $\text{N}_2$  oleva  $\text{CO}_2$ ).

## **2.10 RuBisCO valgu hulga määramine elektroforeetiliselt**

RuBisCO valgu hulga määramine SDS elektroforeesi teel algas proovide ettevalmistamisega. Selleks lisati vedelas lämmastikus külmutatud lehekettale  $500\mu\text{l}$  proovipuhvrit [50mM Mes-NaOH (pH 6.8), 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 50mM  $\beta$ -merkaptotoetanool, 1% Tween 80] ja uhmerdati segu algselt mahajahutatud uhmris ülessulamiseni. Proovipuhvri ja lehepudi segust lõpliku elektroforeesiproovi valmistamiseks lisati sellele loadingpuhvrit [glütserool, värv] vahekorras 1:1 ning kuumutati keeval vesivannil 5min. Valmis proov säilitati kasutamiseni  $-20^\circ\text{C}$  juures. Markerina kasutati eelnevalt TÛMRI Taimefüsioloogia õppetoolis väljapuhastatud RuBisCO valku.

SDS geelelektroforees viidi läbi vertikaalsel 1mm paksusel geelil külma kraanivee temperatuuril (Hofer SE 600, Amersham Pharmacia Biotech AB, Minnesota, San Francisco, USA). Geel valati kuuest osast lahutavast geelist [0.4 M TRIS-HCl (pH 8.8), 12% akrüülamiid, 0.3% N,N'-bisakrüülamiid, 0.1% SDS, 0.05% ammooniumpersulfaat (APS), 0.05% TEMED] ja ühest osast kontsentreerivast geelist [0.13 M TRIS-HCl (pH 6.8), 4.5% akrüülamiid, 0.12% N,N'-bisakrüülamiid, 0.1% SDS, 0.15% APS, 0.15% TEMED]. Elektroforeesi puhvrina kasutati 0.03M TRIS, 0.2M glütsiin, 0.1% SDS lahust. Algne geelelektroforeesil rakendatud voolutugevus oli 40mA, kuid kui proovid olid jõudnud lahutavasse geeli, tõsteti voolutugevus 60mA-ni. Geeli värviti üleöö Coomassie Serva BlueG lahuses [ServaBlueG 0,2%, isopropanool 25%, jää-äädikas 10% (v/v)]. Seostumata värvi eemaldamiseks kasutati segu jää-äädikas-isopropanool-vesi (2:5:13) ning geeli järgnevas säilitamiseks 7%-list jää-äädika vesilahust. Valgu kontsentratsiooni densitomeetriliseks määramiseks skaneeriti geelid UMAX skanneriga ning analüüsiti ImageQuant programmiga.

## 3. TULEMUSED

### 3.1 Kasutatud taimed

Katsetaimedena kasutati türgi tubaka (*Nicotiana tabacum* L.) metsiktüüpi W38 ja RuBisCO valgu hulga suhtes mutantseid liine SINGLE ja DOUBLE (Hudson et al., 1998). Taimede funktsionaalse RuBisCO hulka on vähendatud RuBisCO väikese subühiku (SSU) hulga vähendamisega, kasutades *antisense* tehnoloogiat. Selleks on *Agrobacterium tumefaciens*i abil viidud W38 genoomi SSU pöördkoopia, mille poolt ekspresseeritud RNA paardub komplementaarsusprintsibi järgi funktsionaalse SSU mRNA-ga, takistades nii translatsiooni. Mutant SINGLE on saadud ühe ja mutant DOUBLE kahe SSU pöördkoopia sisseviimise teel (Hudson et al., 1998). Mutandid sarnanevad fenotüübiliselt metsiktüübiga, kuid kasvavad aeglasemalt (Foto 1) (Masle et al., 1993).



Foto 1. Katses kasutatavad taimed. Metsiktüüpi W38 tubaka (W), DOUBLE mutandi (D), SINGLE mutandi (S) ühevanused taimed.

Nii Lämmastikugradiendis kui ka Normaalseerias kasvatatud tubakate koondandmeid võib näha Tabelis 1., kus on toodud taimede keskmine kuivkaal ja lämmastikusisaldus pinnaühiku kohta.

Tabel 1				
	Lämmastikugradient	Normaalseeria		
	W38	W38	SINGLE	DOUBLE
Kuivkaal ( $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$ )	30.1 – 58.2	28.6 – 65.3	19.9 – 39.3	17.9 – 18.6
Lämmastik (%)	0.77 – 5.82	1.49 – 6.24	7.28 – 8.41	3.83 – 8.05

Tugevas lämmastikudefitsiidis (5% normaal Knopi nitraadisisaldusest) kasvasid ja arenesid tubakad aeglaselt. Lämmastiku kogus lehe pinnaühiku kohta korreleerus hästi toitelahuse nitraadisisaldusega ning sõltus sellest lineaarselt vahemikus  $0.5\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  (5%) kuni  $2\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  (100%). Samas korreleerus lämmastiku kogus massiühiku kohta pigem lehe vanusega, olles vanematel lehtedel keskeltläbi 65% sellest, mis oli nooremates lehtedes. vanemate lehtede kuivkaal pinnaühiku kohta ületas nooremate lehtede kuivkaalu ca 25% võrra. Mutantsete tubakate kuivkaal oli poole võrra väiksem kui metsiktüübil.

### 3.2 Klorofüllü määramine

Klorofüllü määramiseks kasutati (Porra et al., 1989) poolt väljapakutud meetodikat ning pigmentide sisaldus arvutati valemite 1. ja 2. järgi:

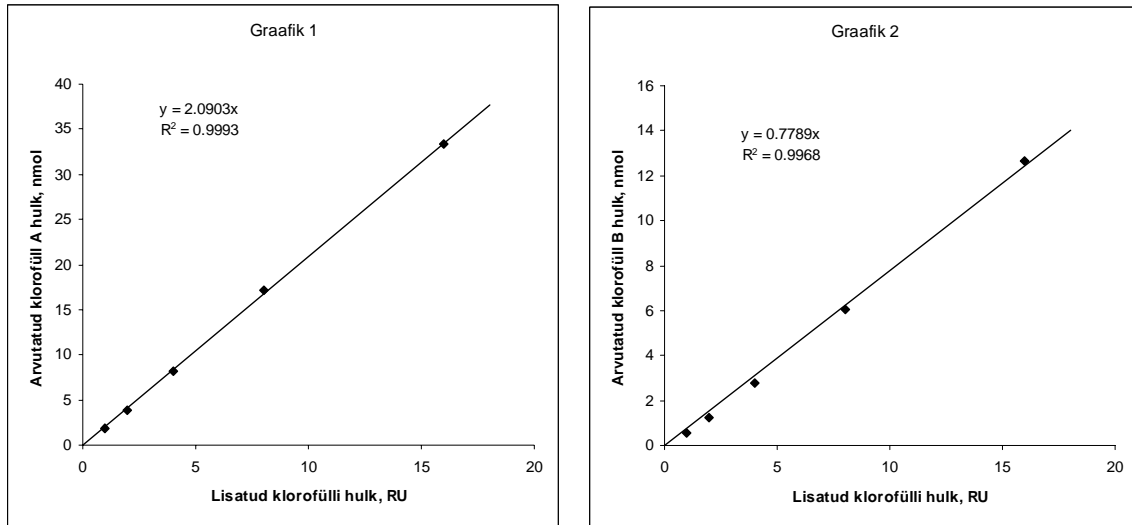
$$\text{Chla (nmol/ml)} = 13.71 \cdot \text{OD}_{663.6} - 2.85 \cdot \text{OD}_{646.6} \quad [1]$$

$$\text{Chlb (nmol/ml)} = 22.39 \cdot \text{OD}_{646.6} - 5.48 \cdot \text{OD}_{663.6} \quad [2],$$

kus Chla ja Chlb on klorofüllide a ja b kontsentratsioonid lahustes ning  $\text{OD}_{646.6}$  ja  $\text{OD}_{663.6}$  optilised tihedused lainepikkuste 663.6nm ja 646.6nm juures.

Kuna valemid on arvestatud pH 7.8 tarvis (2.1M püridiin 0.35M NaOH-s või 2,5mM Na-fosfaatpuhver) aga kasutatud puhvri pH oli 7.0, analüüsiti solventide mõju klorofüllü sisalduse hinnangule. Selleks ekstraheeriti tubakalehtedest klorofüll 100% atsetooniga. Saadud alglahusest tehti 80% atsetooni lahjenduste rida, mille klorofüllü sisaldused suhtusid nagu 1:2:4:8:16. Kontsentreerituima klorofüllü lahus oli võrreldatav 4 lehekettaga (leheketas =  $1.96\text{cm}^2$ ) 1ml segu kohta. Seega varieerus lahjendusterida 0.25:0.5:1:2:4 lehekettast 1ml solvendi kohta. Selliseid lahjendusteridasid tehti 3 seeriat:

- 1) 80% klorofüllilahus atetonis, 20% H<sub>2</sub>O
- 2) 80% klorofüllilahus atetonis, 20% 12.5mM Na-fosfaatpuhver
- 3) 80% klorofüllilahus atetonis, 20% PSI määramise puhver A



Graafikud 1. ja 2. Graafikutel on kujutatud 2.5mM Na-fosfaatpuhvrit sisaldavate klorofüllilahuste andmed. Graafikute X-teljel on lahusesse pantud klorofüllihulk suhtelistes ühikutes (RU), Y-teljel samade lahuste spektritest väljaarvutatud klorofüll (vastavalt klorofüll A ja B) hulk.

Analoogsed graafikud koostati ka kahe ülejäänud solvendi tarvis. Ühele klorofüllühikule vastavad klorofüllide A ja B hulgad on koondatud tabelisse Tabel2.

	Chla(nmol)	Chlb(nmol)	Chla+Chlb(nmol)	%A	%B	%A+B
Na-fosfaatpuhver	2.0903	0.7789	2.8692	100.0	100.0	100.0
vesi (MQ)	2.0778	0.7714	2.8492	99.4	99.0	99.3
puhver A	2.0552	0.7677	2.8229	98.3	98.6	98.4

Tabelis toodud andmetest lähtuvalt võib väita, et Na-fosfaatpuhvri asendamine veega vähendab 0.7% ja asendamine puhvriga A 1.6% näolist klorofüll koguhulka. Saadud tulemusi kasutati järgnevas töös klorofüll hulgä paranditena.

Klorofüll määramine uuritavates lehtedes toimus samaaegselt PSI reaktsioonitsentrite keemilise määramisega, kasutades selleks sama vedelas lämmastikus purustatud taimeproovi suspensiooni. Osale suspensioonist lisati atsetooni lõppkontsentratsiooniga 80% v/v. Saadud lahuse spektri saamiseks ning analüüsimiseks

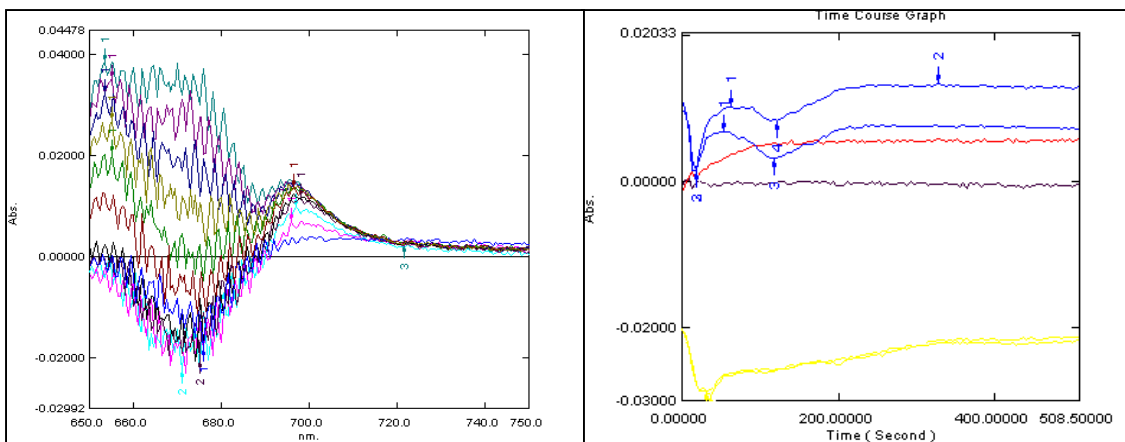
kasutati firma "Shimadzu Corporation" poolt toodetud kahekiirelist arvutiga ühilduvat spektrofotomeetrit ning selle juurde käivat tarkvara. Lehtede klorofüllisisaldus arvutati lehe pinnaühiku kohta. Katseseeriast olenevalt saadi järgmised tulemused: Normaalseerias kasvanud W38 tubakate keskmine klorofüllisisaldus oli vahemikus 4.8-18.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , klorofüllide A ja B suhe 3.3-3.8, mutantsete tubakate keskmine klorofüllisisaldus oli vahemikus 12.4-18.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , klorofüllide A ja B suhe 2.8-3.9; Lämmastiku-gradiendiseerias kasvanud taimelehtede keskmine klorofüllisisaldus oli vahemikus 2.8-14.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ , klorofüllide A ja B suhe 3.0-3.8.

### 3.3 PSI hulga keemiline määramine

PSI hulga keemiline määramine põhineb PSI tsentriklorofüllü oksüdeeritud ja redutseeritud vormi erinevatel spektritel. Osale tülakoidide lahusest lisati keemilist oksüdeerijat (kaaliumheksatsüanoferraati[III]), osale redutseerijat (Na-askorbaati). Seejärel mõõdeti nende optiliste tiheduste vahe lainepikkusel 700nm ning kirjanduses avaldatud ekstinktsioonikoefitsienti kasutades arvutati PSI hulk (Hiyama & Ke, 1972).

Peale reagentide lisamist toimus tülakoidide lahuses ulatuslik redoksseisundi muutumine ca 10min jooksul. Selleks, et triivivad spektrijooned ei häiriks optilise tiheduse jälgimist 700nm juures, mõõdeti viimast 715nm suhtes (Joonis 8. Paneel A). P700 signaal formeerus ca 200s jooksul platoole ja ei olnud mõjutatud tülakoidide lahuse redoksseisundi muutumise poolt (Joonis 8. Paneel B).

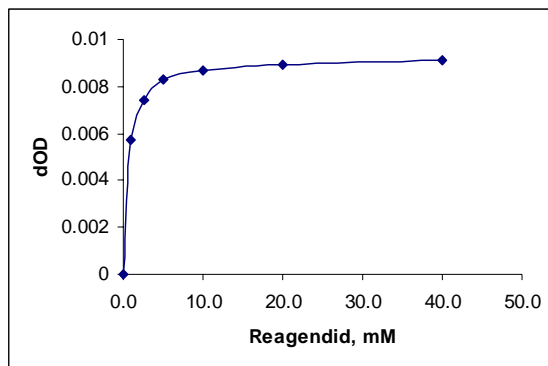
Tülakoidide lahuse tegemine koosneb mitmest sellisest etapist, kus võib tekkida taimse materjali kadu ja seega ka viga PSI hulga määramisel. Tulemuse saagise hindamiseks määrati üldklorofüllü sisaldus nii lehesuspensioonis kui ka tülakoidide lahuses. Keskmine ülekandegur oli üsna stabiilselt 90%.



Joonis 8. Paneel A. Diferentspektrite muutumine aja jooksul. Diferentspektrid võetud 0min, 2min, 4min, 6min, 8min, 10min, 15min, 20min, 25min peale reagentide lisamist.

Paneel B. Signaali teke ajas. Pruun joon – nulljoon, kui mõõdetakse reagentideta tülakoidide lahuseid, saadakse kahe kollase joone vahest. Kollased jooned – optiliste tiheduste vahe kahe tülakoidide lahuse vahel 700nm ja 715nm juures. Punane joon – P700 signaal, kui mõõdetakse reagentidega tülakoidide lahuseid, saadakse kahe sinise joone vahest. Sinised jooned – optiliste tiheduste vahe oksüdeeritud ja redutseeritud tülakoidide lahuse vahel 700nm ja 715nm juures.

Kuna juba eelnevatest meetodi katsetustest oli näha, et P700 signaali väärtus sõltus lisatud kemikaalide kontsentratsioonist, tehti lisaks ka veel vastav katse sobivate kontsentratsioonide leidmiseks. Selleks muudeti Na-askorbaadi ja kaaliumheksatsüanoferraat[III] hulkasid ühes ja samas tülakoidide lahuses iga punkti mõõtmise jaoks uut reaktsioonisegu tehes. Kuna 700nm neeldumise sõltuvust kemikaalide kontsentratsioonist iseloomustas platooga kõver, kus platoon algus varieerus suspensiooniti (10 – 20mM), siis valiti analüüside teostamise tingimusteks 40mM Na-askorbaati ja kaaliumheksatsüanoferraati (Joonis 9.).



Joonis 9. P700 signaali sõltuvus kemikaalide kontsentratsioonidest. Joonise X-teljel on kasutatud oksüdeerija ja redutseerija kontsentratsioon tülakoidide lahuses. Joonise Y-teljel mõõdetud optilise tiheduse muutus 700nm juures.



Fotosüsteem I hulk Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli 15.9-77.0nmol\*g<sup>-1</sup>, SINGLE mutantidel 55.2-75.5nmol\*g<sup>-1</sup>, DOUBLE mutantidel 38.7-75.9nmol\*g<sup>-1</sup>, Lämmastikugradiendi seeria tubakatel 6.5-56.4nmol\*g<sup>-1</sup>.

### 3.4 PSI hulga optiline määramine *in vivo*

Lehe optiline neeldumine 820nm juures iseloomustab PSI doonorpoole (reaktsioonitsentri P700) redutseeritust, mis sõltub elektronide voo bilansist läbi Cytb<sub>6</sub>f ja PSI. Mida oksüdeeritum on P700, seda enam neelab ta 820nm juures valgust. 820nm signaali mõõtmistest saadud informatsiooni kasutatakse ka PSI hulga hindamiseks. Kaugpunase valguse analüüsil põhinevate meetodite eeliseks on see, et optiline tihedus 820nm juures ei ole segatud klorofüllil neeldumisspektri ja klorofüllil fluoretsi poolt nii palju kui 700nm juures, samuti on mõõtmisi võimalik teha lehte prepareerimata.

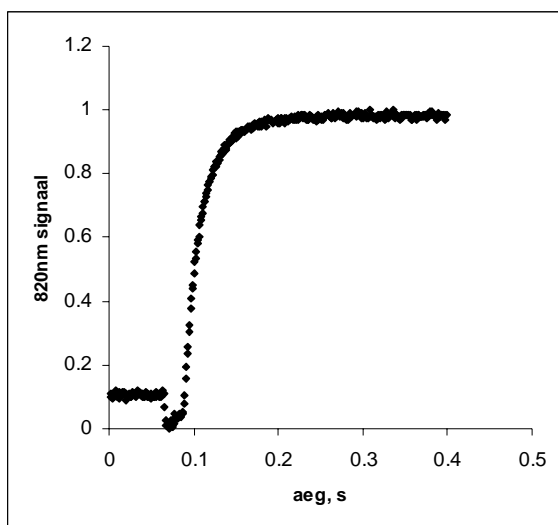
#### 3.4.1 Oksüdeeriv tiitrimine

Oksüdeeriv tiitrimine põhineb redutseeritud PSI doonorpoole oksüdeerimisel FRL-ga (720nm) ja seejuures toimuva optilise signaali muutuse analüüsil (Oja et al., 2003). Selleks lastakse P700-l pimeduses redutseeruda ning oksüdeeritakse seejärel FRL-ga. Oksüdeerumist iseloomustav neeldumine 820nm juures salvestatakse ning analüüsitakse. Kuna FRL ei oksüdeerida kõike P700, siis FRL all oksüdeerimata PSI reaktsioonitsentride osakaalu määramiseks antakse lühike valgusvälge, mis puhastab tsentrid täielikult elektronidest. Seejärel pimendatakse leht, et saada 820nm signaali väärtus redutseerunud reaktsioonitsentri korral (Joonis 10.). FRL all saadud oksüdeerumiskõvera võib jaotada kolme ossa: lineaarne algus – PC oksüdeerumine olukorras, kus CytF+FeS on täielikult redutseeritud; sigmoidne keskosa – PC oksüdeerumine olukorras, kus elektronid paiknevad nii CytF+FeS kui ka PC-l; eksponentsiaalne lõpp – P700 oksüdeerumine. Joonisel 11. on näidatud 820nm signaali muutumine PSI doonorpoole oksüdeerimisel. Kõver on modelleeritud arvestades elektronide mahutitena CytF+FeS, PC ja PSI ning signaali tekitajatena P700+, PC+. Mida vähem on P700 pinnaühiku kohta, seda kiiremini oksüdeerumine toimub. PSI hulk arvutatakse kõvera eksponentsiaalse osa ajategurist lähtuvalt valemist 3.

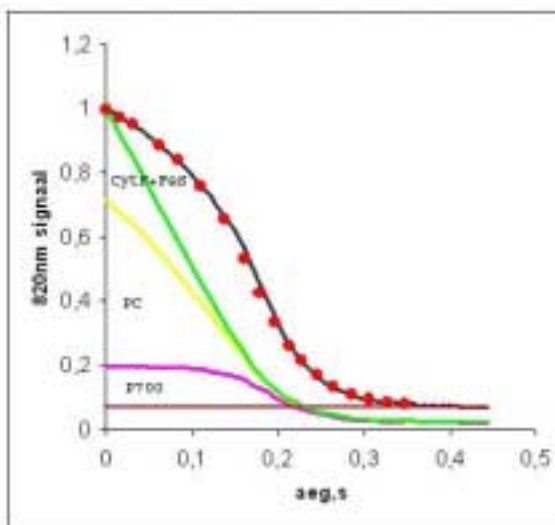
$$\text{PSI } (\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}) = I(\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}) * \tau(\text{s}) \quad [3],$$

Kus PSI on fotosüsteem I hulk, I on valguse intensiivsus,  $\tau$  on ajategur.

Lisaks leiti mudeli andmetest ka CytF+FeS ja PC hulgad (Oja et al., 2003).



Joonis 10. P700 maksimaalne oksüdeerimine välkes ja redutseerimine pimeduses. Y-teljel olev 820nm signaal on esitatud suhtelises skaalas, kus 0 väärtus on omistatud oksüdeeritud ja 1 redutseeritud seisule.



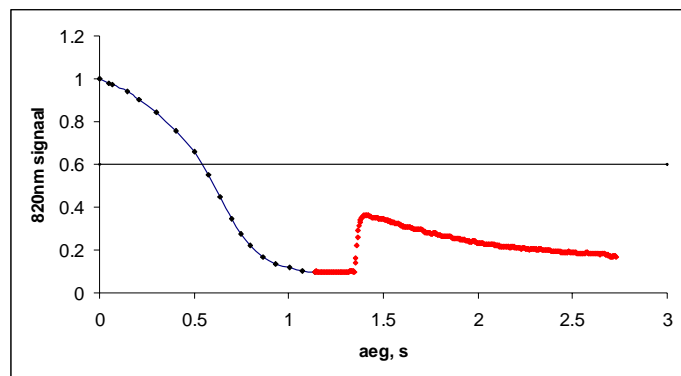
Joonis 11. 820nm signaali oksüdeerumise mudel ja selle arvutus. Punasega on tähistatud mõõtepunktid ja musta joonega on tähistatud mudeli järgi arvatud signaali muutus. Rohelise ja kollase joone vaheline ala iseloomustab CytF+FeS-I olevat elektronihulka, kollase ja lilla joone vaheline ala PC-I olevat elektronihulka, lilla ja nulljoone vaheline ala PSI-I olevat elektronihulka.

Oksüdeerivast tiitrimisest saadud fotosüsteem I hulk Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli  $10.9\text{-}38.5\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , SINGLE mutantidel  $26.3\text{-}33.8\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , DOUBLE mutantidel  $20.1\text{-}34.4\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , Lämmastikugradiendi seeria tubakatel  $4.8\text{-}25.9\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

### 3.4.2 Redutseeriv tiitrimine

Redutseeriv tiitrimine põhineb elektronide genereerimisel PSII-s ja nendest põhjustatud signaali mõõtmisel PSI-I (Oja et al., 2004). Redutseerivaks tiitrimiseks oksüdeeritakse PSI kaugpunase valgusega ning genereeritakse seejärel ksenoonlambiga ühepöörd valgusvälge, mis vabastab PSII juurest elektrone. Samal ajal salvestatakse P700 redutseerumist iseloomustav 820nm signaali muutus (Joonis 12). PSII-s genereeritud elektronide hulk arvutatakse valgusvälke tagajärjel eraldunud hapniku kogusest. Võrdluseks jälgitakse PSI reaktsioonitsentri täitumist elektronidega pimedas, kus oksüdeerumist ei toimu. Arvutustes kasutatakse P700 oksüdeerimiskõvera mudelist

saadud andmeid, kus 820nm signaal jaotatakse kaheks osaks P700+ ja PC+ poolt tekitatuks ning dekonvolueeritakse signaal ümber elektronide skaalasse. PSI hulka hinnatakse selle järgi, kui suure osa P700-st suudab mingi teadaolev elektronide hulk redutseerida. Mida rohkem elektrone PSII juurest vabastatakse, seda suurem osa P700-st redutseerub ja võib redutseerida isegi plastotsüaniini. Ühesuguste elektronidooside korral näitab väike 820nm signaal suuremat hulka PSI. Kuna P700 kogus lehe pinna kohta ei ole enne katset teada, siis tekitatakse tiitrimiseks erineva kvantdoosidega STF-e, mida saadakse välke "lahjendamisel" neutraalsete filtritega.



Joonis 12. 820nm optiline signaal tiitrimise käigus. Antud joonis on mudeli ja katse andmetest kokku kombineeritud. Sinine joon näitab P700 oksüdeerimist FRL all (mudeli andmed). Punased punktid iseloomustavad P700 seisu peale STF rakendamist (järsk hüpe 1.3s kohal). Must peenike joon näitab seisu, kus kogu PSI on redutseeritud.

Redutseerivast tiitrimisest saadud keskmine fotosüsteem I hulk Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli  $12.0\text{-}50.7\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , SINGLE mutantidel  $32.8\text{-}47.5\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , DOUBLE mutantidel  $23.6\text{-}38.9\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , Lämmastikugradiendi seeria tubakatel  $4.3\text{-}32.5\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

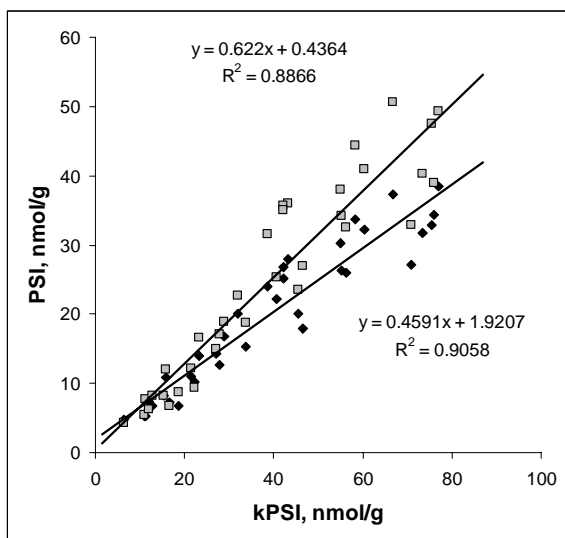
### 3.5 PSII hulga määramine

Aktiivsete PSII tsentrite hulga leidmiseks kasutati PSI redutseerivast tiitrimisest pärit andmeid (Oja et al., 2004; Oja & Laisk, 2000). Selleks leiti hapniku eraldumine valgusvälke ajal ning korrutati neljaga, sest üks  $\text{O}_2$  molekul eraldub vett oksüdeerivast kompleksist nelja elektroni loovutamise järel. PSII hulk Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli  $13.1\text{-}63.4\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , SINGLE mutantidel  $42.6\text{-}62.4\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , DOUBLE mutantidel  $35.7\text{-}49.1\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , Lämmastikugradiendi seeria tubakatel  $6.0\text{-}51.8\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

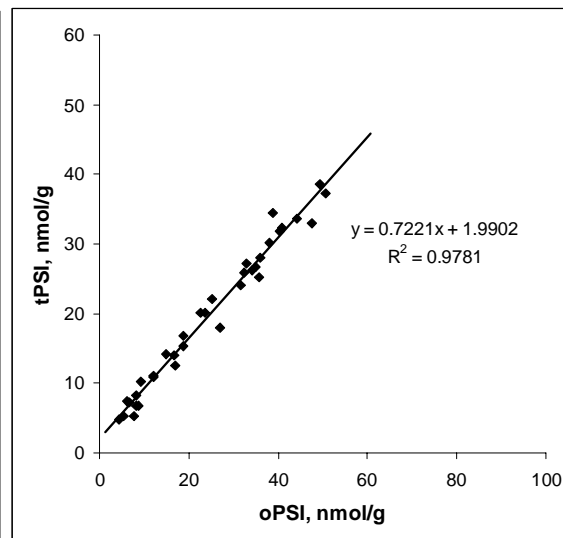
### 3.6 PSI määramismetoodikate võrdlus

Selleks, et andmetest korrektseid üldistusi teha, peavad katsetulemused olema piisavalt kvaliteetsed. Määramatus andmetes on eelkõige põhjustatud nii mõõtmise korrektsusest kui ka kasutatava meetodi olemuslikest eripäradest. Erinevalt PSII, mille määramismetoodika üksikasjades on rahvusvaheline teadlaste üldsus üsna ühel meelel, on PSI korral olukord oluliselt ebamäärasem. Käesoleva töö raames analüüsiti taimede lehti kolme erineva mõõtmisprotokolli alusel: 700nm signaali põhisel, kus tülakoidide lahuse oksüdeerimine ja redutseerimine toimus kemikaalidega (kPSI) ; 820nm signaali põhisel, mis jälgis intaktse lehe tsentrite redutseerumist valgusvälke tagajärjel (oPSI) ja 820nm signaali põhisel, mis jälgis intaktse lehe tsentrite oksüdeerumiskiirust FRL toimel (tPSI).

Kõigi kolme meetodi omavaheline võrdlus on toodud välja Joonistel 13. ja 14. Joonisel 13. on keemilist meetodit võrreldud 820nm signaalil põhinevate meetoditega. Regressioonisirgete erinevusest järeldeb, et keemiline meetod hindab PSI hulka 1.6 korda suuremaks kui redutseeriv tiitrimine hapnikupulsside järgi ja 2.2 korda suuremaks kui oksüdeeriv tiitrimine FRL-ga, kusjuures punktide hajuvus kasvab PSI hulga suurenemisel. Mõlema 820nm signaali meetodi vahel on tugev lineaarne korelatsioon. Redutseeriva tiitrimise andmed on 1.4 korda suuremad kui oksüdeerival tiitrimisel ning oksüdeerivast tiitrimisest saadud andmed tekitavad kahe ülejäänud meetodiga võrreldes märgatava telglõigu.

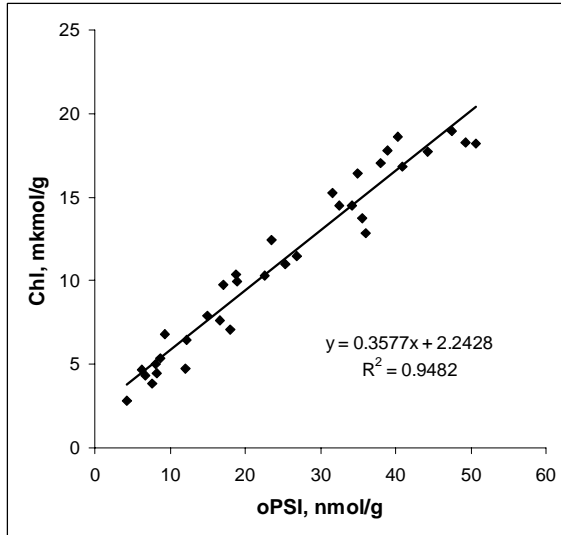


Joonis 13. Keemilise meetodi (kPSI) võrdlus oksüdeeriva tiitrimise (mustad tärimid) ja hapnikupulsside meetodiga (hallid ruudud).

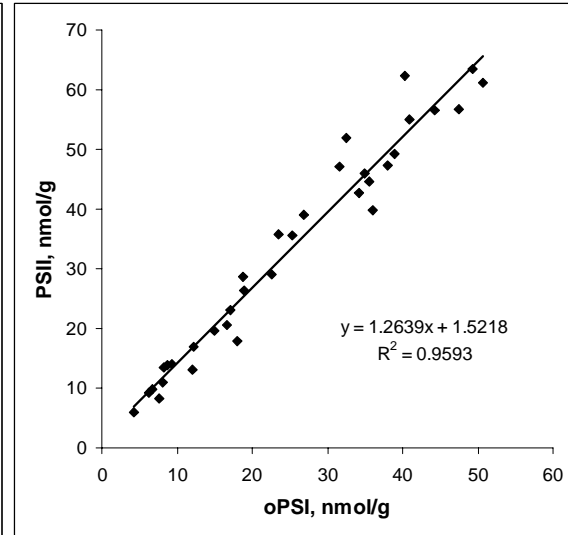


Joonis 14. Hapnikupulsside (oPSI) meetodi võrdlus oksüdeeriva tiitrimise (tPSI) andmetega.

PSI kompleks ei ole tülakoidide membraanis "asi iseenesest", ta on vahepeatuseks PSII-lt saabuvatelt elektronidelt ning mõlemad fotosüsteemid on lisaks füüsiliselt seotud ka LHC-dega. Järelikult võiks oletada, et P700-l on tugev korrelatsioon nii PSII kui ka klorofülliga. Eelnev oletus saigi kinnitust vastavate andmete võrdlemisel, nii klorofülliga kui ka PSII hulga korreleerusid kõik meetodid võrdselt hästi ( $R^2 \sim 0.92 - 0.96$ ) ja regressioonisirgete suhtelised telglõigud ei erinenud üksteisest palju. PSII reaktsioonitsentreid oli P700 kohta kPSI andmetel 0.84, oPSI puhul 1.28, tPSI puhul 1.75. Klorofülliga molekul oli P700 kohta kPSI andmetel 238, oPSI puhul 363, tPSI puhul 495. Saadud tulemustest reaalseimaks võib lugeda redutseeriva tiitrimise poolt pakutavaid andmeid, mida võib näha Joonistel 15. ja 16. Kui PSII ja PSI vahelist regressioonisirget võib lugeda praktiliselt kordinaatide alguspunkte läbivaks, siis klorofülliga puhul moodustab algordinaat Y-teljel klorofülliga maksimaalsest väärtusest 12%. Klorofülliga suhteliselt suurt hulka vähest fotosüsteemidega taimes selgitaks olukord, kus klorofülliga oleks seotud sensorkompleksidesse, mis püüaksid valgust ja initsieeriks signaaliraja fotosünteesiks vajalike valkude sünteesiks.



Joonis 15. Klorofüllü summaarse hulga võrdlus PSI hulgaga.



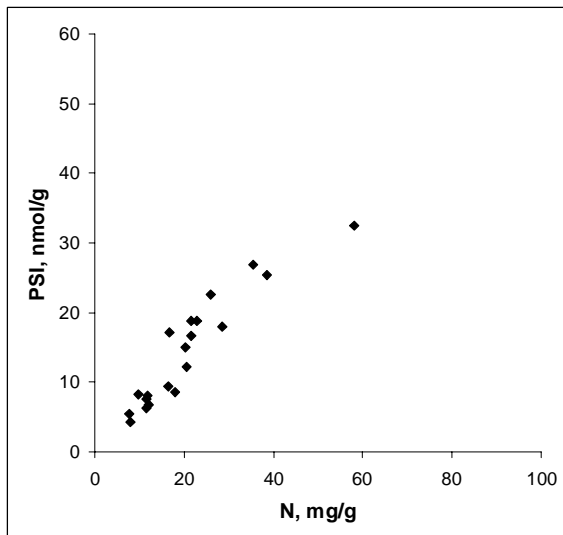
Joonis 16. PSII hulga võrdlus PSI hulgaga.

Erinevate mõõtmisprotokollide omadused on järgmised: keemiline meetod – destruktiivne, PSI hulk arvutatakse oksüdeeritud ja redutseeritud tsentri diferentspektrist, sõltub tugevalt kemikaalide kontsentratsioonidest ja temperatuurist ; oksüdeeriv tiitrimine – mõõtmine intaktsel lehel, PSI hulk arvutatakse oksüdeerumiskiiruse järgi, P700 signaali muutumise ajategur sõltub tsentri eelneva redutseerituse tasemest ; redutseeriv tiitrimine – mõõtmine intaktsel lehel, PSI hulk arvutatakse PSII suhtes, tundlik õhulõhede seisundile.

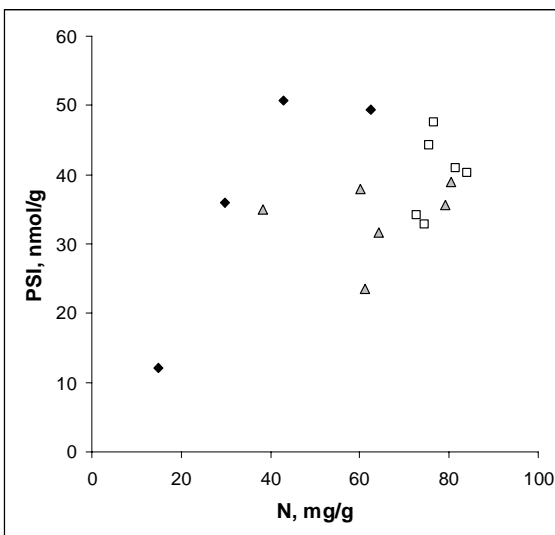
Kuna redutseeriv tiitrimine on tugevalt seotud PSII määramismetoodikaga, mis on üldsuse poolt üheselt aktsepteeritud, ja annab ka klorofüllü hulgaga võrreldes kõige mõistlikumaid tulemusi, siis kasutatakse järgnevates analüüsides just selle meetodiga saadavaid tulemusi.

### 3.7 Lämmastikusisalduse mõju PSI-le

Lämmastiku hulga mõju PSI-le on näha Joonistelt 17. ja 18. Tingimustel kus lämmastiku kontsentratsioon lehes on limiteeriv, konverteeritakse proportsionaalne osa lämmastikust PSI reaktsioonitsentri koostisesse (1.5 mg N / nmol PSI). Nii Joonistel 17. kui ka 18. on näha, et PSI hulk metsiktüüpi tubaka lehtedes läheb suuremate lämmastiku kontsentratsioonide juures platoole. Mutantide PSI sõltuvus taimekudede lämmastikusisaldusest on ebamäärane ning varieerub W38-ga võrreldes vähem.



Joonis 17. PSI hulga sõltuvus lämmastiku hulgast. Lämmastikugradiendi tubakate andmed. N – lämmastiku kontsentratsioon lehekettas ; PSI – PSI aktiivsenteerite hulk redutseeriva tiitrimise järgi.



Joonis 18. PSI hulga sõltuvus lämmastiku hulgast. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk). N – lämmastiku kontsentratsioon lehekettas ; PSI – PSI aktiivsenteerite hulk redutseeriva tiitrimise järgi.

### 3.8 Assimilatoorlaengu määramine

Assimilatoorlaengu (AC) määramine põhineb taime lühiajalises võimes fikseerida süsihappegaasi ka pimeduses. CO<sub>2</sub> neeldumise ulatus ja kestus sõltub RuBP hulgast pimendamise hetkel. AC määramiseks stabiliseeriti leht 760 μmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> valguse juures, et konverteerida enamus Calvin tsükli metaboliitidest RuBPks (Eichelmann & Laisk, 1999; Laisk et al., 2002; Eichelmann et al., 2004). Seejärel kustutati valgus ning registreeriti CO<sub>2</sub> sidumine. Katse viidi läbi O<sub>2</sub> vabas gaasisegus, et vältida segavat oksügenaaset aktiivsust. Limiteerivat CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni kasutati selleks, et maha suruda PEPi karboksüleerimist, kuna viimane suureneb CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni tõusmisel. AC iseloomustab Calvin tsükli metaboliitide varu hulka. Kuigi tegemist ei ole otsese metaboliitide määramise meetodiga, iseloomustab AC siiski üsna hästi madalamolekulaarsete süsinikühendite hulka kloroplastides ning seda on võimalik mõõta korduvalt ja lehte kahjustamata. Assimilatoorlaengu suurus Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli 2111-4924 nmol\*g<sup>-1</sup>, SINGLE mutantidel 4730-5914 nmol\*g<sup>-1</sup>, DOUBLE mutantidel 3628-4934 nmol\*g<sup>-1</sup>, Lämmastikugradiendi seeria tubakatel 1197-4217 nmol\*g<sup>-1</sup>.

### 3.9 RuBisCO hulga densitomeetriline määramine

RuBisCO valgu hulk määrati densitomeetriliselt LSU bändi järgi akrüülamiidgeelilt. Selleks viidi läbi proovide elektroforees ning värvitud geel skaneeriti, salvestades tulemuse \*.tiff formaadi järgi pildifaili. Pildifail konverteeriti ümber programmiga Tiffike2.exe ning analüüsiti programmiga ImageQuant.

TIFF formaati kasutati antud töös sellepärast, et nimetatud protokoll võimaldab säilitada iga pildipunkti algse kokkupakkimata väärtuse ning analüüsiks kasutatav programm ImageQuant aktsepteerib "võõrastest" formaatidest ainult \*.tiff-i 8 bitist (256 astmeline) mustvalget versiooni. Paraku tekib skanneri poolt otse saadud faili analüüsil probleeme, sest skanneri poolt väljastatud ja faili talletatud informatsioon iga pildipunkti kohta on transmissiooni lineaarses skaalas. See tähendab, et skanner mõõdab igas punktis geeli läbipaistvuse protsentides ning konverteerib viimase pildipunkti väärtuseks lineaarselt (255 =100% ja 0=0%). Samas toimub analüüs ImageQuant-is pildipunktide lihtsa kokkuliitmise teel. Ainehulga ja tema poolt neelatava valguse (optilise tiheduse, OD) vahel on logaritmiline seos, mida iseloomustab Beer-Lambert'i seadus:

$$OD_{\lambda} = -\log(T_{\lambda}) = E_{\lambda}(\text{mol}^{-1} \cdot \text{m}^2) \cdot B(\text{m}) \cdot C(\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}) \quad [4];$$

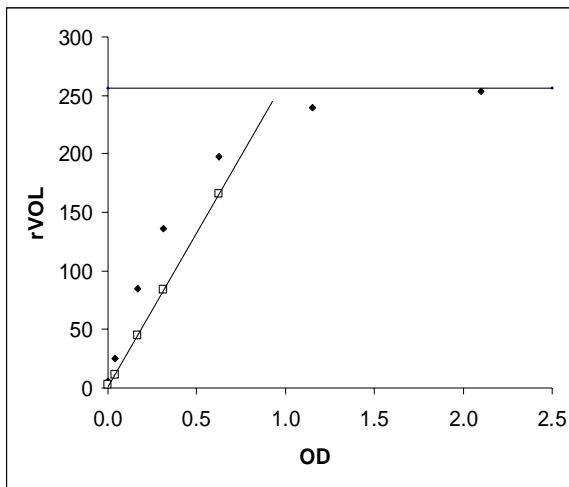
Kus T on aine läbipaistvus lainepikkusel  $\lambda$ , E – ainele spetsiifiline kordaja lainepikkuse  $\lambda$  juures, B – ainekihi valguskiire suunaline paksus, C – aine kontsentratsioon ainekihis.

Kuna logaritmilise skaala ja lineaarse skaala erinevus on suhteliselt väike kõrgete läbipaistvuste juures kuid suureneb tugevalt madalate läbipaistvuste juures, siis on määramise täpsust üsna raske hinnata (Graafik 3.). Kuigi täpsuse hindamise tarvis on välja töötatud mitmeid tabeleid ning hoolikalt valitud markeri, proovide kontsentratsioonide ja tausta värvitustamisega võib vea viia miinimumini, ei aktsepteeritud käesoleva töö raames seda ideoloogiat. Meetodi vea hindamine asendati vea vältimisega. Arvutuse logaritmiliseks viimine toimus skanneri pildifaili ümberkonverteerimisega. Selle tarvis kirjutati C++ programmeerimiskeeles ja Bloodshed Dev-C++ (GNU General Public License) keskkonnas vastav tarkvara, programm Tiffike2. Programmi tööpõhimõte on üldjoontes järgmine: failist loetakse pildipunkti väärtus, teisendatakse see valem 4. järgi optiliseks tiheduseks, korrutatakse tulemust konstandiga K ning kirjutatakse saadud väärtus uude \*.tiff faili. Konstandiga korrutamise mõte on viia optiliste tiheduste väärtused (tavaliselt 0 – 1) TIFF formaadi ja ImageQuanti

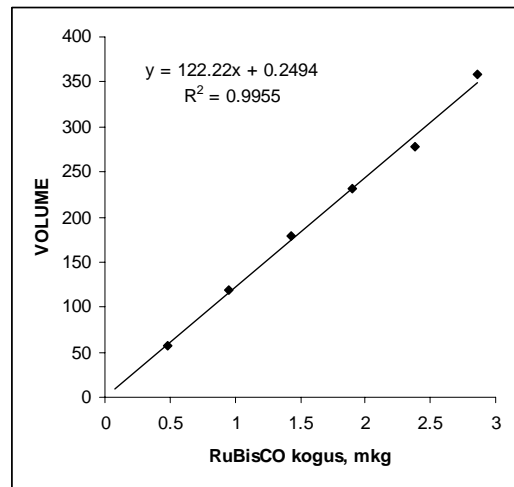


poolt kasutatavate valgustihedustega (0 – 255) samasse suurusjärku. Programmi on võimalik käivitada kahes moodis, mis erinevad ainult kasutatava konstandi K poolest. Esimesel juhul on K orienteeritud "valgemates" pildipunktides oleva informatsiooni täielikuks ärakasutamiseks st. optimeeritud heledamatele geelidele. Teisel juhul on programm optimeeritud rohkem värvunud geelidele ja K on valitud nii, et pildipunkt  $T=10\%$  ( $OD = 1$ ) konverteeritakse väärtuseks 230 (ca 10% 256-st). Programmi lähtekood on esitatud Lisas 2.

Logaritmiva algoritmi tuntavaks eeliseks on see, et geeli kvantifitseerimisel saadud väärtused on lineaarses seoses geeli optilise tihedusega ja seega ka pealekantud aine hulgaga. Geeli tausta väärtus avaldub ühesuurusega mõõtealade korral sirge telglõiguna ning värvimise intensiivsus sirge tõusuga. Demonstreerimaks meetodi täpsusklassi ja geelide seisukorda on Joonisel 19. esitatud ühe elektroforeesi kaliiberrea andmestik.

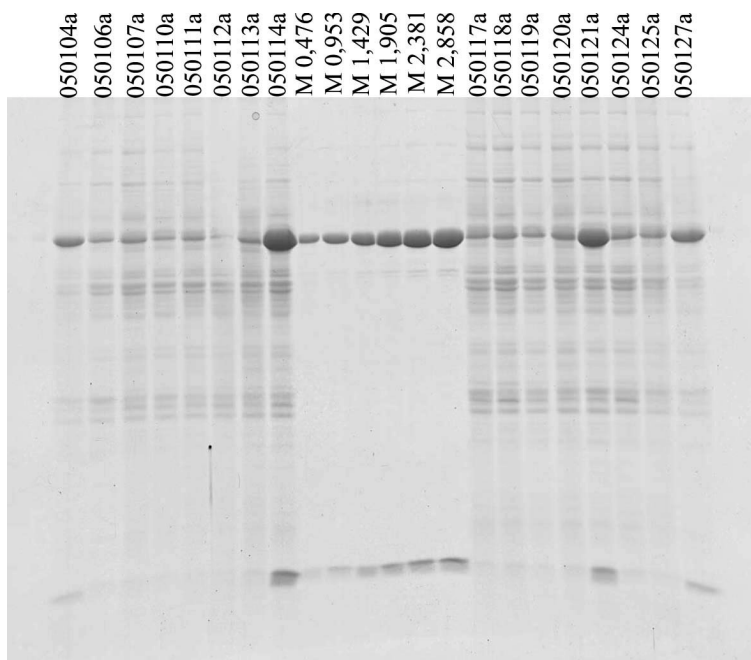


Graafik 3. Linearse ja logaritmiva algoritmi erinevus. X-teljel testkeha optiline tihedus. Y-teljel näiv pildipunkti väärtus (0-256). Linearse algoritmi poolt saadud väärtused on esitatud mustade täimidega, logaritmiva algoritmi poolt saadud valgete ruutudega.

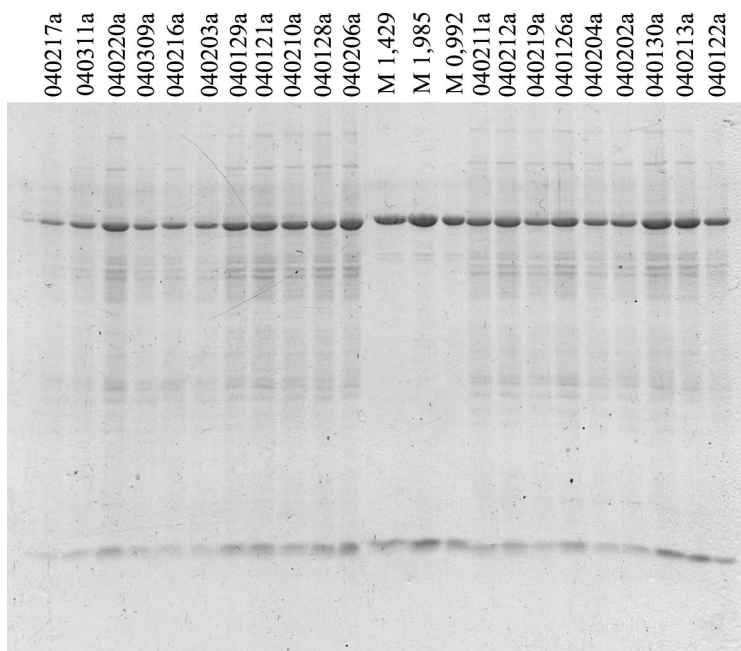


Joonis 19. RuBisCO kaliibergraafik. X-teljel geelile kantud RuBisCO markeri kogus ( $\mu\text{g}$ ). Y-teljel mõõdetud bändi maht suhtelistes ühikutes.

Järgnevatel geelipiltidel (Joonised 20. ja 21.) on iga raja peale kantud võrdselt maksimaalne võimalik kogus (15 $\mu\text{l}$  proovi), ning vastavad hulgad RuBisCO markerit. RuBisCO densitomeetriliseks määramiseks lahjendati kangemad proovid samasse suurusjärku, mis lahjemadki. RuBisCO sisaldus proovides määrati kolme geeli LSU intensiivsuste aritmeetilisest keskmisest.



Joonis 20. Normaalseeria RuBisCO proovide elektroforees. RuBisCO markerid ( $\mu\text{g}$  valku) on tähistatud M tähega. W38 proovid 050104a, 050114a, 050121a, 050127a ; SINGLE proovid 050117a, 050118a, 050119a, 050120a, 050124a, 050125a ; DOUBLE proovid 050106a, 050107a, 050110a, 050111a, 050112a, 050113a.



Joonis 21. Lämmastikugradiendi RuBisCO proovide elektroforees. RuBisCO markerid ( $\mu\text{g}$  valku) on tähistatud M tähega. Kõik taimed on W38 genotüübiga ja kasvatatud erineva lämmastikusisaldusega Knopil. 50% taimede proovid 040126a, 040122a, 040121a; 25% taimede proovid 040130a, 040128a, 040129a; 20% taimede proovid 040204a, 040202a, 040203a; 17% taimede proovid 040212a, 040210a, 040211a; 12% taimede proovid 040219a, 040216a, 040217a; 5% taimede proovid 040311a, 040309a; 100% taimede proovid 040220a, 040213a, 040206a.

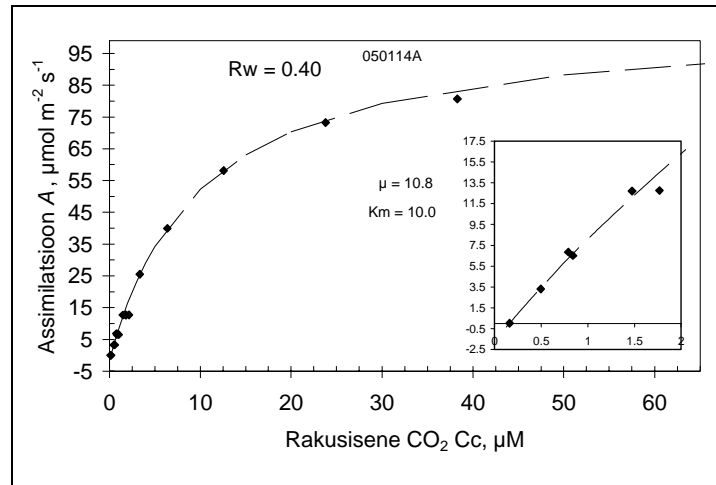
RuBisCO valgu analüüsi täpsust rikub valgu lagunemine prepareerimise ajal. Nimelt laguneb RuBisCO suur subühik hapniku vabade radikaalide toimel kaheks fragmendiks, mille molekulmassid on 34kDa ja 16kDa, kuid degradatsiooniks on tõenäoliselt vajalik korrektse RuBisCO struktuuri olemasolu. Kui lisada SDS-i (0.1%), siis eralduvad ensüümi subühikud teineteisest ja fragmente ei teki (Ishida et al., 1999). Samuti põhjustavad RuBisCO lagundamist vakuoolides paiknevad proteaasid nii, et moodustub RuBisCO suurest subühikust 50kDa fragment (Miyadai et al., 1990). Ka seda fakti on analüüsil arvestatud ning proteaaside aktiivsuse vähendamiseks lisati proovipuhvrise  $\beta$ -merkaptopetanoli ning purustatud proovi sulatati üles koos puhvriga jääkastil.

RuBisCO aktiivtsentrite hulk Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli 115-1390nmol\*g<sup>-1</sup>, SINGLE mutantidel 116-173nmol\*g<sup>-1</sup>, DOUBLE mutantidel 85-147nmol\*g<sup>-1</sup>, Lämmastikugradiendi seeria tubakatel 87-1099nmol\*g<sup>-1</sup>.

### 3.10 RuBisCO Km, Vmax ja k<sub>cat</sub> määramine

RuBisCO poolt katalüüsitava reaktsiooni Km ja maksimaalne kiirus leiti Michaelis-Menteni tüüpi graafikult (Joonis 22.), kus ühel teljel on CO<sub>2</sub> kui substraadi kontsentratsioon, teisel aga CO<sub>2</sub> tarbimise kiirus. Vmax-i mõõtmiseks stabiliseeriti fotosünteesi tase 140ppm CO<sub>2</sub>, 2% O<sub>2</sub> 760µmol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> valguse juures, et regenereerida RuBP-d. Seejärel eksponeeriti lehte 12s jooksul kõrgendatud süsihappegaasi kontsentratsioonidele (2000, 1500, 1000, 600 ja 340ppm). Kuna RuBP regenereerimise kiirus limiteerib karboksüleerimisreaktsiooni suurte CO<sub>2</sub> kontsentratsioonide korral, võeti RuBisCO CO<sub>2</sub> sidumise intensiivsuse väärtuseks CO<sub>2</sub> pealepanemise hetkel mõõdetud tulemus. Tegelik süsihappegaasi sidumise intensiivsuse leidmiseks lahutati maha CO<sub>2</sub> lahustumisest tulenev efekt, mis määrati CO<sub>2</sub> eraldumise mõõtmisel pimedas 0ppm CO<sub>2</sub> juures. Süsihappegaasi sidumise intensiivsuse ja vastava rakusisese CO<sub>2</sub> kontsentratsiooni alusel koostati Michaelis-Menteni tüüpi graafik, millelt leiti Km (9.2-10.2M) ning Vmax väärtused. Ensüümi maksimaalkiiruse (Vmax, mol\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup>) lisahinnanguna kasutati 2% O<sub>2</sub> PCw kõvera alg tõusu (mesofüllil juhtivus, m\*s<sup>-1</sup>) ja Km (mol\*m<sup>-3</sup>) korrutist (Eichelmann & Laisk, 1999; Laisk et al. 2002). RuBisCO

maksimaalkiirus Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel oli  $470\text{-}3780\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , SINGLE mutantidel  $534\text{-}875\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , DOUBLE mutantidel  $542\text{-}766\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , Lämmastikugradiendi seeria tubakatel  $258\text{-}3055\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .



Joonis 22. Assimilatsiooni sõltuvus CO<sub>2</sub> kontsentratsioonist kloroplastides. Lineaarse algusosa punktid on saadakse PCw kõvera protseduurist. Neli viimast, platool olevat, punkti saadakse RuBisCO kineetika protseduurist, kus hüpatakse madalalt süsihappegaasilt kõrgele. Kuna RuBP kontsentratsioon limiteerib kõrgete süsihappegaasi hulkade juures, siis saavutaks tegelik kineetikakõver ainult kolmandiku joonisel demonstreeritud väärtustest.

RuBisCO näiliste katalüütiliste konstantide väärtused erinevates lehtedes leiti vastavalt valemile 5. :

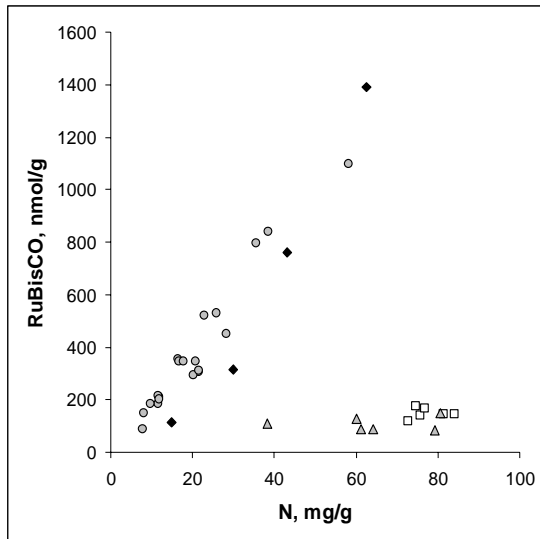
$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/E_{\text{t}}, \quad [5.]$$

kus  $V_{\text{max}}$  on RuBisCO maksimaalne kiirus ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) ja  $E_{\text{t}}$  RuBisCO aktiivtsentrite arv ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Katalüütilise konstandi arvutamiseks vajalik RuBisCO aktiivtsentrite arv ( $E_{\text{t}}$ ) leiti RuBisCO densitomeetrilisest määramisest, arvestades ensüümi molekulmassiks  $550\text{kDa}$  ning kaheksa aktiivtsentrit ensüümimolekuli kohta.  $k_{\text{cat}}$  varieerus Normaalseeria metsiktüüpi tubakatel  $2.7\text{-}4.1\text{s}^{-1}$ , SINGLE mutantidel  $4.3\text{-}6.1\text{s}^{-1}$ , DOUBLE mutantidel  $4.9\text{-}7.0\text{s}^{-1}$ , Lämmastikugradiendi seeria tubakatel  $1.9\text{-}3.0\text{s}^{-1}$ .

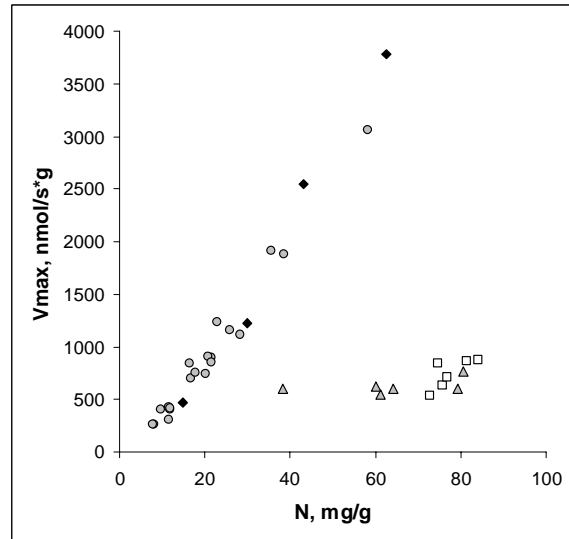
### 3.11 Lämmastikusisalduse mõju RuBisCO hulga ja $V_{\text{max}}$ -le

Metsiktüüpi tubakas on taimsete kudede lämmastikusisalduse ja RuBisCO hulga vahel tugev lineaarne korrelatsioon ( $2.5\text{ nmol RuBisCO valku/mg N}$ ) ning suur varieeruvus (Joonised 22. ja 23.). Mutantides seevastu on RuBisCO tase geneetiliste manipulatsioonide tulemusel tugevalt langenud, kuid samas on lämmastikuprotsent

ebaproportsionaalselt suur, erinedes W38-st isegi kuni kaksteist korda (0.2 nmol RuBisCO valku/mg N). Lämmastikuisalduse mõju RuBisCO maksimaalkiirusele on analoogne mõjuga RuBisCO hulgale. WT tubakates võimaldab iga mg lämmastikku  $V_{max}$  tõusu  $60\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$  võrra. Mutantide karboksüleerimiskiirus tõuseb lehe lämmastikuisalduse kasvades vähe.



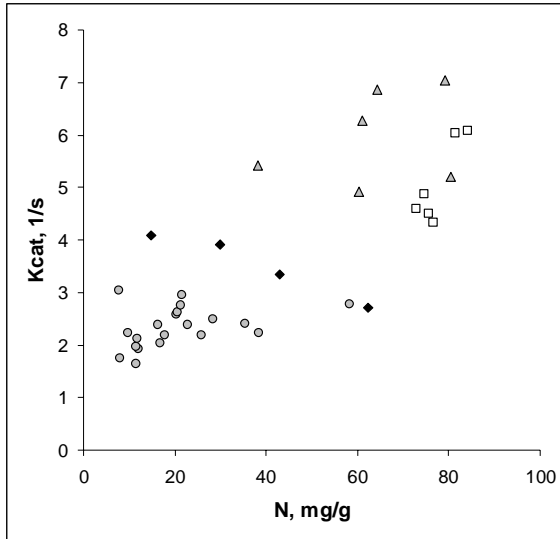
Joonis 22. RuBisCO valgu hulga sõltuvus lämmastiku hulgast. N – lämmastiku kontsentratsioon lehekettas ; RuBisCO – RuBisCO aktiivsenteite hulk. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).



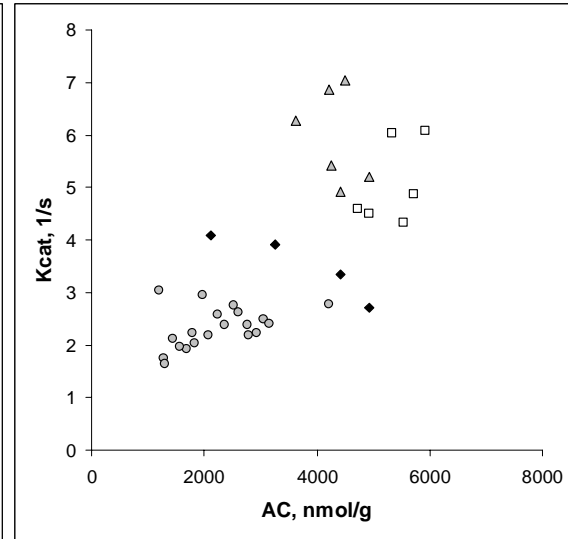
Joonis 23. RuBisCO maksimaalkiiruse sõltuvus lämmastiku hulgast. N – lämmastiku kontsentratsioon lehekettas; RuBisCO – RuBisCO aktiivsenteite hulk. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

### 3.12 RuBisCO aktiivsus

Katalüütilise konstandi võrdlemisel nii assimilatoorlaengu kui ka lämmastikuisaldusega moodustavad erinevate taimeseeriade andmed eraldiasuvaid ja üsna lokaliseeritud punktipilvi (Joonised 24. ja 25.). Mõlema parameetriga võrreldes ei ole näha head korrelatsiooni erinevate mõõteseriade sees, vaid on märgatav üldine positiivne tendents. Mida suuremad on lehe lämmastiku ja metaboliitide varud, seda suurem on ka  $k_{cat}$ . Samas ei saa välistada ka vastupidist interaktsiooni, kus suurema  $k_{cat}$ -i korral on taimel võimalik tekitada suurem assimilatoorlaeng ja seetõttu intensiivistatakse nitraadi transporti taimede kudedesse.

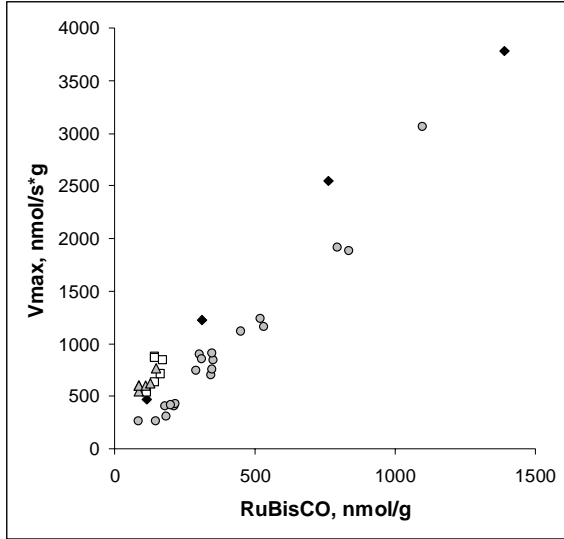


Joonis 24.  $K_{cat}$ -i sõltuvus lämmastiku hulgast (N). Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

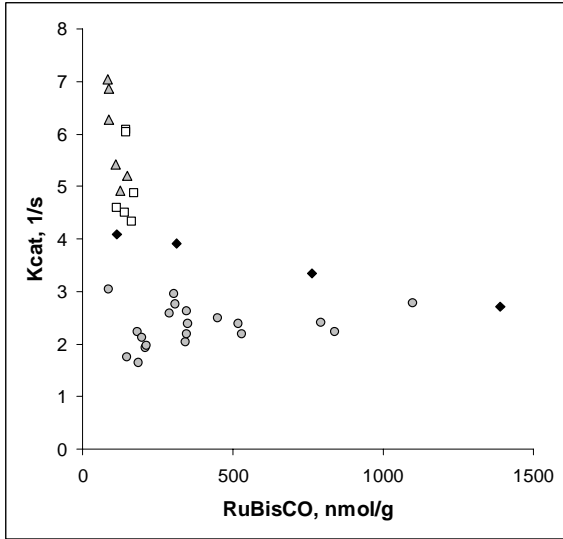


Joonis 25.  $K_{cat}$ -i sõltuvus assimilooraengust (AC). Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

Maksimaalne karboksüleerimise aktiivsus sõltub praktiliselt lineaarselt RuBisCO reaktsioonitsentrite hulgast, kus ühe reaktsioonitsentri kohta tuleb keskmiselt 2.7 katalüüsitsüklit sekundis (Joonis 26.). Samas on näha, et RuBisCO aktiveeritus on erinevates taimeseriates erinev (Joonis 27.). Lämmastikugradiendi taimedes on  $k_{cat}$  omandanud üsna stabiilse seisundi (keskmiselt  $2.4s^{-1}$ ) erinevate RuBisCO hulkade korral. Samuti on lugu ka Normaalseeria metsiktüüpi taimedega. DOUBLE mutantide keskmine  $k_{cat}$  ligineb  $7s^{-1}$ -le, ületades nii SINGLE mutante (keskmiselt  $5.0s^{-1}$ ). Mutantide katalüüsikiirused on kaks kuni kolm korda suuremad kui WT tubakatel.

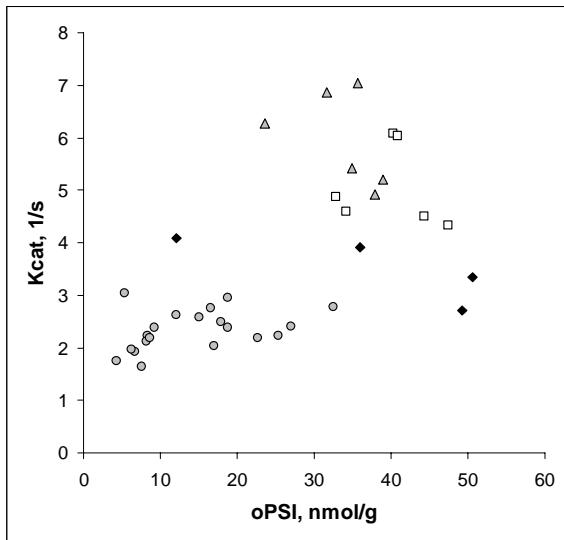


Joonis 26.  $V_{max}$ -i sõltuvus RuBisCO aktiivsenteerite hulgast. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

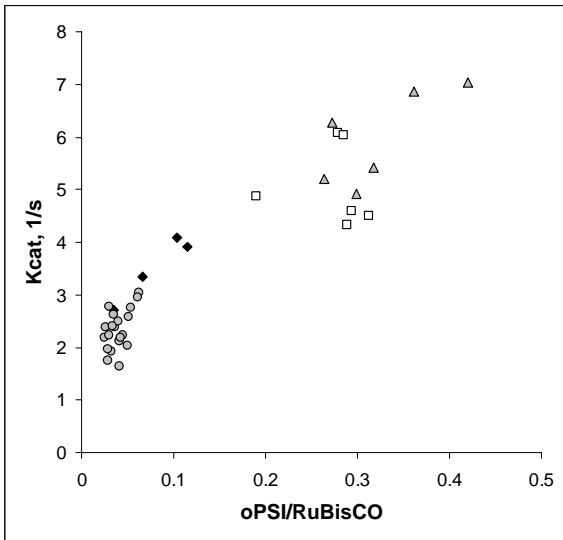


Joonis 27.  $K_{cat}$ -i sõltuvus RuBisCO aktiivsenteerite hulgast. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

RuBisCO aktiivsuse sõltuvust PSI reaktsioonitsentritest iseloomustab ebamäärane punkttilv (Joonis 28.), millest on väga raske üldistusi teha. Kui võrrelda katalüüsikonstandi väärtusi suhtelise PSI hulga (PSI reaktsioonitsentrite arv ühe RuBisCO reaktsioonitsentri kohta), saame suhteliselt hästi korreleeruva ning platoole mineva kõvera (Joonis 29). Kõvera algusesse on koondunud WT tubakad ja lõppu mutandid.



Joonis 28.  $K_{cat}$ -i sõltuvus PSI hulgast. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).



Joonis 29.  $K_{cat}$ -i sõltuvus suhtelisest PSI hulgast. Joonise X-telje väärtused näitavad PSI hulka ühe RuBisCO aktiivsenteerite kohta. Normaalseeria W38 tubakad (must tärn), SINGLE mutandid (valge ruut), DOUBLE mutandid (hall kolmnurk), Lämmastikugradiendi taimed (hall ring).

## 4. ARUTELU

Käesolevas uurimuses kasutati nii metsiktüüpi kui ka RuBisCO valgu suhtes mutantseid tubakaid. Lisaks on mõningad metsiktüüpi isendid kasvatatud erineva ulatusega lämmastikudefitsiidis. Taimedes määrati fotosünteesi ja füsioloogilist seisundit iseloomustavaid parameetreid eesmärgiga välja selgitada võimalikke seoseid PSI hulga ja RuBisCO aktiivsuse vahel.

### 4.1 Lämmastikusisalduse mõju PSI-le ja RuBisCO-le

Fotosünteesi iseloomustavad parameetrid sõltuvad energiat püüdvatest ja assimilatsiooni realiseerivatest ensüümidest, need omakorda keskkonna resurssidest. Lehtede lämmastikusisaldust määrati antud töös sellepärast, et see arvati iseloomustavat valgu osakaalu kuivaines. Näiteks kaasneb lämmastiku defitsiidiga RuBisCO hulga vähenemine (Makino et al., 1997). Samuti on lämmastik taime elutegevuseks oluline komponent, kuna sellest sõltub valgusüntees. Valgusüntees määrab ensüümatalüüsitud reaktsioonide toimumise efektiivsuse ning struktuursete komponentide rohkuse. Tugevas lämmastikudefitsiidis (5%) kasvasid ja arenesid tubakad aeglaselt. Lämmastiku kogus lehe pinnaühiku kohta korreleerus hästi toitelahuse nitraadisisaldusega ning sõltus sellest lineaarselt vahemikus  $0.5\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  (5%) kuni  $2\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$  (100%). Seevastu lämmastiku kogus massiühiku kohta korreleerus pigem lehe vanusega, olles vanematel lehtedel keskeltläbi 65% sellest, mis oli nooremates lehtedes. Niisugust olukorda võib interpreteerida lämmastikuühendite transpordiga noortesse lehtedesse, et suurendada nende ensümaatilist aktiivsust. Samas võib detekteeritud efekt olla põhjustatud hoopiski suhkru baseerivate biopolümeeride või metaboliitide suhtelise hulga suurenemisega lehe vananedes. Kuigi üks variant ei välista teist, räägib viimase hüpoteesi kasuks fakt, et vanemate lehtede kuivkaal pinnaühiku kohta ületab nooremate lehtede kuivkaalu ca 25% võrra. Mutantsete tubakate kuivkaal oli poole võrra väiksem kui metsiktüübil, mis võis olla põhjustatud just puudulikust assimilatsioonist. SSU mutantidel ei kaasnud RuBisCO sisalduse vähenemisega proportsionaalset kogu valgu koguse vähenemist (Joonis 20.). Seega võib



arvata, et RuBisCO valgu ja kogu valgu hulka reguleeritakse taimes paralleelsete radade vahendusel ja RuBisCO hulga geneetiline vähendamine ei mõjuta otseselt teiste valkude sünteesi.

Kuidas mõjutab lämmastiku hulk fotosünteetiliselt oluliste valkude hulka? Olukorras, kus lämmastik on limiteeriv, konverteeritakse proportsionaalne osa sellest nii PSI kui ka RuBisCO valgu koosseisu (Joonis 17. ja 22.). Teisisõnu, taim suunab proportsionaalse osa oma mineraalide ressursidest fotosünteesiensüümide tootmisse.

Metsiktüübis on võimalik sünteesida piiramatult RuBisCOt (Joonis 22.), kuid mutantides mitte, seal konverteeritakse üleliigselt neeldunud nitraat ensümaatiliste valkude koosseisu, et suurendada fotosünteesi ja assimilatsiooni efektiivsust. Kuid säilib võimalus, et osa toitelahuse liigsest nitraadist viiakse muutmata kujul vakuoolidesse varuks. Nii Joonistel 17. kui ka 18. on näha, et PSI hulk metsiktüüpi tubaka lehtedes läheb suuremate lämmastiku kontsentratsioonide juures platoole. Seda võib seletada olukorraga, kus keskkonnatingimused PSI suhtes ei ole limiteerivad ning fotosüsteem I hulga määrab lehe füsioloogiline seisukord, st. tylakoidide pind, ning LHC, membraanivalkude ja fotosüsteemide hulkade suhteline vahekord. Erinevalt RuBisCOst pole PSI hulga kahanemine mutantides märgatav ning lehtede fotosüsteemide hulk varieerub üsna vähe. Ilmselt on nähtus põhjustatud sellest, et kuna RuBisCOt kui põhilist lämmastikuneelajat sünteesiti napilt, siis sünteesiti PSI kompleksi valke alati maksimaalsel võimalikul tasemel. Samas käiakse valgusünteesi substraatidega kokkuhoidlikult ringi, sest RuBisCO suurt subühikut ei sünteesita ebaproportsionaalselt rohkem kui väikest. Olukorrale on selgituseks see, et SSU *antisense* mutantidel on täheldatud efekti, mille puhul taimes kohandatakse RuBisCO suure ja väikese subühiku koguseid (Jiang & Rodermel, 1995). SSU ja LSU omavaheline suhe määratakse tõenäoliselt posttranskriptsioonilise regulatsiooni alusel, kus üleliigset komponenti degradeeritakse.

## 4.2 RuBisCO aktiivsus

RuBisCO aktiivsus on SINGLE mutandil 30%-50% ja DOUBLE-l 13%-18% võrreldes metsiktüüpi W38 tubakaga (Masle et al., 1993). Antud töös saadud katseandmed näitavad, et RuBisCO aktiivsused SINGLE mutantide puhul ei erine märgatavalt DOUBLE mutantidest, varieerudes 15%-25% ulatuses W38 lehtedes mõõdetud maksimaalväärtusest. Karboksülaasi üldaktiivsus on heas lineaarses korrelatsioonis RuBisCO aktiivtsentrite hulga (Joonis 26.).

Paraku ei iseloomusta karboksülaasi üldaktiivsus adekvaatselt RuBisCO seisundit taimes, kuna RuBisCO hulk taimes võib sama üldaktiivsuse juures varieeruda. Karboksülaasi eriaktiivsuse iseloomustamiseks kasutatakse näiva  $k_{cat}$ -i mõistet, mis iseloomustab ühe ensüümi reaktsioonitsentri poolt läbiviidavate reaktsioonitsüklite arvu ajaühikus. Kirjanduses on pakutud karboksülaasile mitmeid erinevaid eriaktiivsuseid: alates kaselehtedes saadud  $k_{cat}$ -idest  $1.35\text{-}2.24\text{s}^{-1}$  (Eichelmann et al., 2004),  $3.4\text{-}4.1\text{s}^{-1}$  kartulis (Sage, 2001),  $5\text{-}6\text{s}^{-1}$  nisus (Evans & Seemann, 1984) kuni  $8.1\text{s}^{-1}$  päevalilleni (Eichelmann & Laisk, 1999). Kui eeldada, et RuBisCO eriaktiivsus ei ole väga liigispetsiifiline, võib arvata, et tegu on erineva aktivatsioonitasemega. Välja pakutud näivate katalüütiliste konstantide spekter oli täies vahemikus nähtav erinevatel tubakataimeseeriatel (Joonis 27.). Lämmastikugradiendi taimedes on  $k_{cat}$  omandanud üsna stabiilse seisundi erinevate RuBisCO hulkade korral. See tähendab, et karboksülaasi kogunemisel on aktiveeritud iga kord teatud osahulk RuBisCOt. Kui kasvatada metsiktüüpi tubakat tingimustes, kus lämmastik ei ole limiteeriv, siis RuBisCO näiline aktiivsus langeb. Tõenäoliselt ei ole see tingitud sellest, et RuBisCO hulga suurenemine mõjutaks karboksülaasi aktiivsust, vaid mingist keskkonna või taime sisemisest tegurist, mis nivelleerib aktiveeritud karboksülaasi hulga nii, et RuBisCO biomassi suurenemine ei anna fotosünteesil lisaefekti. Seda, et RuBisCO eriaktiivsus võib muutuda tundmatuseni ainuüksi liigisiselt, tõestavad mutantsete tubakate andmed, kus  $k_{cat}$  võib olla sama karboksülaasikoguse juures isegi kolm korda suurem kui metsiktüübil.

Millest siis sõltub RuBisCO aktiivsus? RuBisCO aktiivsus sõltub RbcA-st, mis omakorda on aktiveeritav ferredoksiin-tioeredoksiin süsteemilt lähtuva elektrontranspordi poolt (Ning & Portis, 1999). Kuidas sõltub RuBisCO aktiivsus? Miyazawa ja Terashima

(2001) on oma töös oletanud, et kogu RuBisCO on täielikult aktiivne. Kuid Fukayama (1996) on näidanud, et RuBisCO aktiivus muutub koos lehe vananemisega. On võimalik, et noortes lehtedes toimub RuBisCO akumulatsioon ning kuna aktiveerimine on nii energiat kui ka valguressurssi nõudev protsess, siis karboksülaasi algne aktiivus on väike (Fukayama et al., 1996). Analoogseid tulemusi on saadud ka RuBisCO aktiveerituse uuringutes, mis on teostatud erinevas kasvujärgus kaselehtedel (Eichelmann et al., 2004). Eichelmann ja kaastöötajad näitasid, et RuBisCO ei ole taimes täielikult aktiveeritud ning karboksülaasi aktiivus suurenes PSI hulga kasvades. Seetõttu pakuti välja hüpotees, kus RuBisCOt aktiveeriva aktivaasi aktiivus sõltus otseselt PSI-st lähtuvast elektrontransportahelast. See tähendab, et PSI hulga suurenemisel suurenes aktiivse RuBisCO aktivaasi hulk, mis omakorda suurendas aktiveeritud RuBisCO suhtelist hulka. Samuti tähtsustati PSI osalust taime üldisesse arengusse, sest lehe arengu käigus jõudis funktsionaalse fotosüsteemi I hulk varem platoole kui PSII.

Kuigi RuBisCO eriaktiivsust kaselehtedes iseloomustab hästi PSI kogus, ei saa seda teadmist rakendada tubakataimedest saadud andmete seletamiseks (Joonis 28.), sest  $k_{cat}$ -i sõltuvust PSI reaktsioonitsentritest iseloomustab ebamäärane punktiplek. Kui võtta aluseks (Zhang & Portis, 1999) poolt pakutud väide, et osades taimedes, näiteks tubakas ja maisis ei leidu RbcA mõlemat isovormi, vaid eksisteerib ainult redoksreguleerimisele mittevastuvõtlik  $vRbcA$  isovorm. Kas siis võib arvata, et tubaka RuBisCO  $k_{cat}$  ei peakski sõltuma PSI hulgast? Samas peab karboksülaasi aktiivsuse muutmine ikkagi toimuma, sest mutantsetes taimedes, kus RuBisCO valgus hulk on geneetiliselt maha surutud, on karboksülaasi eriaktiivsus märgatavalt kõrgem kui W38-s. Võib-olla on SSU defitsiitsetel taimede kõrge karboksülaasi eriaktiivsus sellepärast, et RbcA funktsioneerimise efektiivsus on suurem? Kuna RuBisCO SSU antisense mutantide RuBisCO aktivaasi kogus on sama kõrge kui WT taimedes, siis oleks RbcA osahulk RuBisCO valgus kohta suhteliselt suur (Jiang & Rodermel, 1995).

Järgmised RuBisCO aktiivsust potentsiaalselt mõjutavad parameetrid oleksid lämmastikusisaldus ja assimilatoorlaeng, mille puhul ei ole näha head korrelatsiooni mõõteseria sees, kuid on märgatav üldine positiivne tendents (Joonised 24. ja 25.). Mida suuremad on lehe lämmastiku ja metaboliitide varu, seda suurem on  $k_{cat}$ . Kuid samas ei saa välistada ka vastupidist interaktsiooni, kus suurema  $k_{cat}$ -i korral on taimel võimalik

tekitada suurem assimilatoorlaeng ja seetõttu intensiivistatakse nitraadi transporti taime kudedesse.

Saadud tulemustest lähtuvalt võib öelda, et tubakas toimub RuBisCO aktiivsuse regulatsioon, mis ei sõltu siiski otseselt PSI hulgast, kuid sellega kaasneb assimilatoorlaengu ja nitraatse lämmastiku taseme tõus. Samas, kui mutantidel on RuBisCOt vähe, siis lineaarne elektron-transport on piiratud ja tõenäolisemaks muutuvad alternatiivsed elektroniülekanded eelkõige PSI-st lähtuvalt – sealhulgas aktiveerub tsükliline elektron-transport, mis võimaldab taimel sünteesida lisa ATP-d kui RuBisCO võimekus on piiratud. Kuna RbcA seondub RuBisCOle polümeerina ja tarbib aktiveerimiseks ATP energiat (Lilley & Portis, 1997), siis peaks iga suhkrute sünteesist järgi jäänud ATP molekul võimaldama RuBisCO aktiveerimist. RuBisCO aktiivtsenter vajab aktivaasi abi ca. iga saja karboksüleerimistsükli järel, seega kulub ATP-d RuBisCO aktiveerimiseks pidevalt. ATP suhteliselt suurem hulk on võimalik sellistel puhkudel, kus PSI-d on iga RuBisCO molekuli kohta rohkem. Joonisel 29. on esitatud RuBisCO näiv katalüütiline konstant võrrelduna suhtelise PSI hulgaga (RuBisCO aktiivtsentri kohta). Seda sõltuvust iseloomustab suhteliselt hästi korreleeruv lineaarselt algav ning platoole minev kõver. Platoo väärtus  $\sim 7s^{-1}$  on ilmselt RuBisCO  $k_{cat}$ -i reaalne väärtus, sellest väiksemad punktid iseloomustavad ainult karboksülaasi aktiveerituse taset.

Siiani on arvatud, et kogu taimes leiduv karboksülaas on aktiveeritud ja inaktiivset RuBisCOt taimedes ei ole. Miks peaks taim sünteesima üleliigset valku? Põhjus võib peituda organismide vajaduses ressursi varuda. Üleliigne energia ning süsinik konverteeritakse suhkrupolümeeridesse. Lämmastiku ja aminohapete reservuaarina toimivad osades liikides (näiteks sojauba) spetsiaalsed varuvalgud. Kuid taimeliikides, kus selliseid varuvalke pole, oleks ainukeseks võimaluseks aminohappeid ladustada inaktiivsete ensüümidena.

Türgi tubakas (*Nicotiana tabacum* L.), kus pole tuvastatud tioredoksiini poolt mõjutatavat RuBisCO aktivaasi isovormi määrab RuBisCO aktivatsiooni taseme tõenäoliselt nii RbcA kui ka PSI suhteline hulk RuBisCO aktiivtsentri kohta. Siiski ei saa ferredoksiini-tioredoksiini süsteemi tubaka karboksülaasi reguleerijana eitada, kuna vastavaid mutante ei ole veel loodud ning ferredoksiini-tioredoksiini süsteemi füsioloogiline tähtsus RbcA reguleerijana on ebaselge.

## 5. KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida fotosüsteem I hulga mõju RuBisCO valgu aktiveeritusele türgi tubakas (*Nicotiana tabacum* L.).

Katsetaimedena kasutati metsiktüüpi tubaka W38 ja RuBisCO valgu hulga suhtes mutantseid liine SINGLE ja DOUBLE. Lisaks kasvatati metsiküüpi taimi erineva lämmastikusisaldusega toitelahustel. Tubakalehtedes mõõdeti lämmastiku, klorofüll, PSII kompleksi, PSI kompleksi ja RuBisCO valgu hulgad ning määrati assimilatoorlaeng ja RuBisCO katalüütiline konstant. Töö raames uuriti erinevaid PSI määramise meetodikaid ning täiustati RuBisCO valgu densitomeetrilise määramise algoritmi.

RuBisCO mutantsete liinide karboksülaasivaegust kompenseeris viimaste suhteliselt suur näivaktiivus võrreldes metsiktüübiga. Saadud tulemused näitasid, et RuBisCO näiv katalüütiline konstant sõltus PSI hulgast RuBisCO aktiivsentri kohta ja oli positiivses korrelatsioonis lehe üldlämmastiku sisalduse ning assimilatoorlaengu suurusega.

Taimedes on enamus RuBisCOst inaktiivses seisundis ning türgi tubakas (*Nicotiana tabacum* L.), kus pole tuvastatud tioredoksiini poolt mõjutatavat RuBisCO aktivaasi isovormi määrab RuBisCO aktivatsiooni taseme PSI suhteline hulk RuBisCO aktiivsentri kohta.

## 6. SUMMARY

### RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE – OXYGENASE, ITS ACTIVITY IN INTACT TOBACCO LEAVES AND ITS RELATION TO PHOTOSYSTEM I.

Eero Talts

Ribulosebiphosphate carboxylase-oxygenase (EC 4.1.1.39, RuBisCO) forms about a half of the leaf soluble protein and is sometimes claimed to be the most abundant protein in the Universe. The enzyme catalyses the irreversible carboxylation and oxygenation of ribulosebiphosphate, the first reaction in the Calvin cycle of carbon reduction in photosynthesis.

However, the newly synthesized RuBisCO molecule is not active but needs cofactors, - such as CO<sub>2</sub> and Mg<sup>2+</sup> -, and a protein - Rubisco activase - for activation. One isoform of the activase is itself activated by the thioredoxin system, which is the general redox control system for photosynthetic enzymes. Since the thioredoxin system is directly dependent on electron transport through photosystem I (PSI) and since the activase needs ATP for its function, one may ask, how much these cofactors actually influence rubisco activity in intact leaves. The question has principle importance for understanding the interrelationships between the amount and enzymic activity of proteins in cells.

In this work we focussed on the investigation of Rubisco actual activity in intact tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves, where the thioredoxin-activated isoform of Rubisco is absent. We used wild type tobacco W38, grown under different N supply, and Rubisco-deficient transgenic forms, with an aim to obtain wide variation of Rubisco expression in leaves. Rubisco activity was measured in intact leaves from its CO<sub>2</sub> dependent kinetic curve. The results showed that the actual average  $k_{cat}$  was not constant, but varied dependent on the Rubisco concentration. In the mutant lines the very low Rubisco concentration was compensated by its high activation state, while in leaves where Rubisco was abundant, its average  $k_{cat}$  was very low. Proceeding from the notion that Rubisco activase is itself activated by PSI –related factors (electron transport, ATP synthesis) we measured PSI density in parallel with Rubisco amount and activity. It appeared, the average  $k_{cat}$  was the higher the higher was the ratio of PSI/Rubisco amounts. We conclude that in wild type intact leaves most of the Rubisco protein is inactive and the portion of its activated sites is determined by factors directly related to PSI. The result shows how important are relationships between the structural components of the cell for understanding their actual metabolic activities.

## 7. KASUTATUD KIRJANDUS

1. Anderson, L.E., Carol, A.A. (2004) "Enzyme co-localization with Rubisco in pea leaf chloroplasts." *Photosynthesis Research* Vol. 82, 49-58.
2. Andersson, I. (1996) "Large structures at high resolution: the 1.6 angstrom crystal structure of spinach ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase complexed with 2-carboxyarabinitol bisphosphate." *Journal of Molecular Biology* Vol. 259, 160-174.
3. Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A., Carrillo, N. (1997) "Plant-type Ferredoxin-NADP+ Reductases: A Basal Structural Framework and a Multiplicity of Functions." *FASEB Journal* Vol. 11, 133-140.
4. Badger, M. R. & Lorimer, G. H. (1976) "Activation of ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase. The role of Mg<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub>, and pH." *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 175, 723-729.
5. Bendall, D. S. & Manasse, R. (1995). "Cyclic phosphorylation and electron transport." *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1229, 23-38.
6. Binda, C. A., Coda, A., Aliverti, G., Zanetti, A., Mattevi. (1998) "Structure of the Mutant E92K of [2Fe-2S] Ferredoxin I from *Spinacia oleracea* at 1.7 Å Resolution" *Acta Crystallographica* Vol. 54, 1353-1358.
7. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2000) "Biochemistry & Molecular Biology of Plants." American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
8. Boyle, F. A. & Keys, A. J. (1987) "The state of activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in wheat leaves." *Photosynth. Res.* Vol. 11, 97-108.
9. Bukhov, N. & Carpentier, R. (2004) "Alternative Photosystem I-driven electron transport routes: Mechanisms and functions." *Photosynth. Res.* Vol. 82, 17-33.
10. Chitnis, P. (1996) "Photosystem I." *Plant Physiology* Vol. 111, 661-669.
11. Clarke, J. E. & Johnson, G. N. (2001) "In vivo temperature dependence of cyclic and pseudocyclic electron transport in barley." *Planta* Vol. 212, 808-816.
12. Cornic, G., Bukhov, N. G., Wiese, C., Bigny, R. & Heber, U. (2000) "Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C<sub>3</sub> plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping." *Planta* Vol. 210, 468-477.
13. Crafts-Brandner, S.J. & Salvucci, M.E. (2000) Rubisco activase constrains the photosynthetic potential of leaves at high temperature and CO<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Science USA* Vol. 97: 13430-13435.
14. Dorowski, A., Hofmann, A., Steegborn, C., Boicu, M., Huber, R. (2001) "Crystal structure of paprika ferredoxin-NADP+ reductase - implications for the electron transfer pathway." *Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, 9253-9263.
15. Edmondson, D. L., Badger, M. R. & Andrews T. J. (1990) "A kinetic characterization of slow inactivation of ribulosebisphosphate carboxylase during catalysis." *Plant Physiol.* Vol. 93, 1376-1382.

16. Edmondson, D. L., Badger, M. R. & Andrews, T. J. (1990) "Slow inactivation of ribulosebiphosphate carboxylase during catalysis is caused by accumulation of a slow, tight-binding inhibitor at the catalytic site." *Plant Physiol.* Vol. 93, 1390-1397.
17. Eichelmann, H. & Laisk, A. (1999) "Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge and mesophyll conductance in leaves." *Plant Physiol.* Vol. 119, 179-189.
18. Eichelmann, H., Oja, V., Rasulov, B., Padu, E., Bichele, I., Pettai, H., Niinemets, Ü. & Laisk, A. (2004) "Development of leaf photosynthetic parameters in *Betula pendula* Roth leaves: correlations with photosystem I density." *Plant Biology* Vol. 6, 307-318.
19. Evans, J. R. & Seemann, J. R. (1984) "Differences between wheat genotypes in specific activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and relationship to photosynthesis." *Plant Physiol.* Vol. 74, 759-764.
20. Fukayama, H. , Uchida, N., Azuma, T. & Yasuda, T. (1996) "Relationships between photosynthetic activity and the amounts of Rubisco activase and Rubisco in rice leaves from emergence through senescence." *Jap. J. Crop Sci.* Vol. 65, 296-302.
21. Green, B. R. & Dunford, D. G. (1996) "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis." *Annual Reviews in Plant Physiology* Vol. 47, 685–714.
23. Gutteridge, S., Keys, A.J. (1985) "The Significance of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in Determining the Effects of the Environment on Photosynthesis and Photorespiration" In: J.Barber, N.R.Baker (Ed-s) "Photosynthethic Mechanisms and the Environment", Elsevier Science Publishers B.V., pp.259-285.
24. Gutteridge, S., Parry, M. A. J., Burton, S., Keys, A. J., Mudd, A., Feeney, J., Servaites, J. C. & Pierce, J. (1986) "A nocturnal inhibitor of carboxylation in leaves." *Nature* Vol. 324, 274-276.
25. Gutteridge, S., Parry, M.A.J., Schmidt, C.N.G. (1982) "The reactions between active and inactive forms of wheat ribulose bisphosphate carboxylase and effectors." *European Journal of Biochemistry*, pp. 597-602.
26. Hall, D., Rao, K. (1999) "Photosynthesis" Cambridge University Press, United Kingdom.
27. Hammond, E. T., Andrews, T. J. & Woodrow, I. E. (1998) "Regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by carbamylation and 2-carboxyarabinitol 1-phosphate in tobacco: insights from studies of antisense plants containing reduced amounts of Rubisco activase." *Plant Physiol.* Vol. 118, 1463-1471.
28. Hammond, E.T., Andrews, T.J., Mott, K.A. and Woodrow, I.E. (1998) "Regulation of Rubisco activation in antisense plants of tobacco containing reduced levels of Rubisco activase." *Plant J* Vol. 14, 101–110.
29. Harbinson, J. & Foyer, C. H. (1991)"Relationships between the efficiencies of photosystems I and II and stromal redox state in CO<sub>2</sub>-free air. Evidence for cyclic electron flow in vivo." *Plant Physiol.* Vol. 97, 41-49.



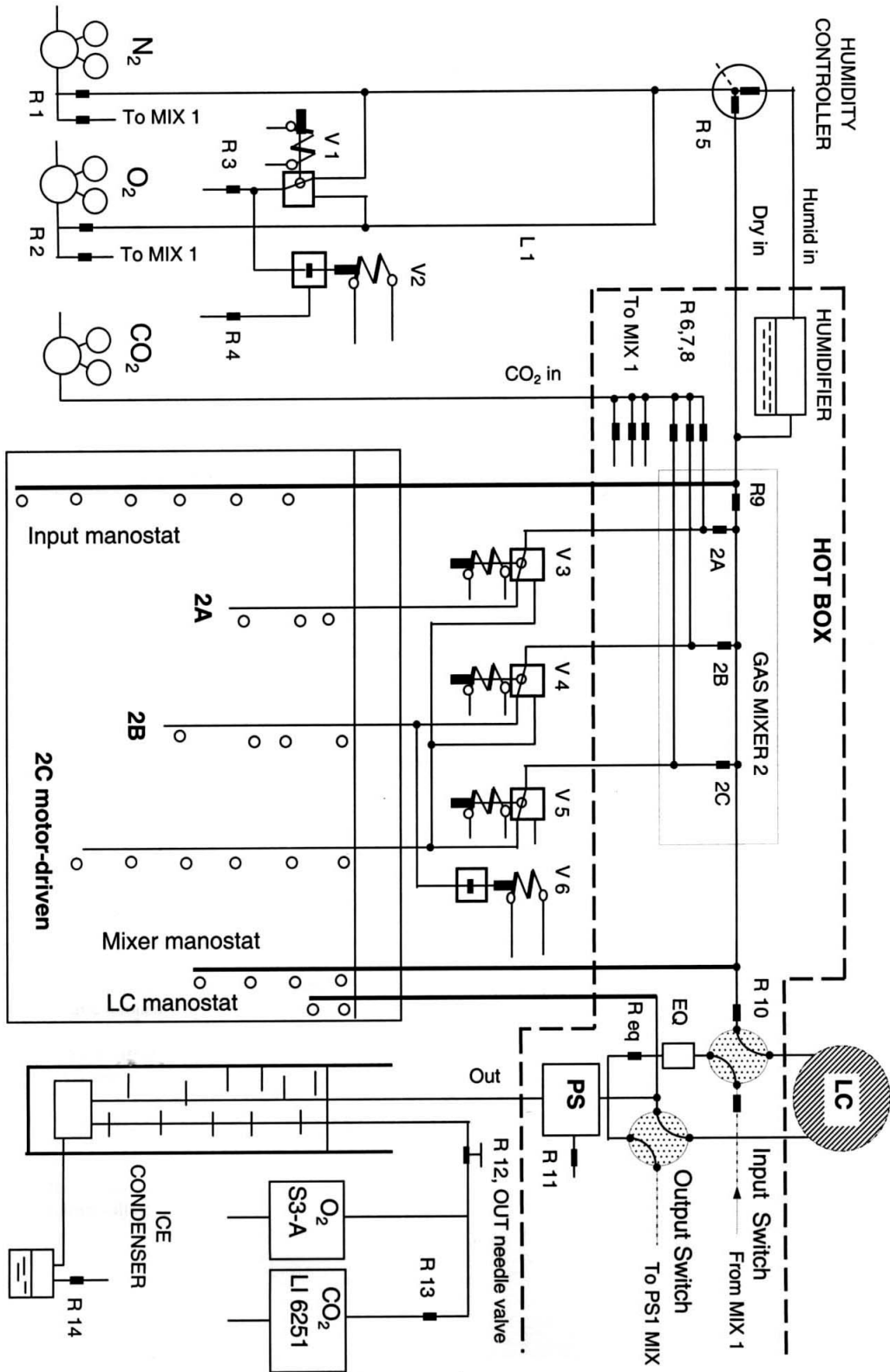
30. Heber, U. & Walker, D. (1992) "Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves." *Plant Physiology* Vol. 100, 1621-1626.
31. Heldt, H. W. & Lorimer, G. H. (1978) "Phosphate requirement for the light activation of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase in intact spinach chloroplasts." *FEBS Letters* Vol. 92 (2), 234-240.
32. Hiyama, T. & Ke, B. (1972) "Difference spectra and extinction coefficients of P700\*." *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 267, 160-171.
33. Hudson, G.S., Evans, J.R., von Caemmerer S., Arvidsson, Y.B.C., Andrews, J.T. (1992) "Reduction of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Content by Antisense RNA Reduces Photosynthesis in Transgenic Tobacco Plants". *Plant Physiology*, Vol. 98, 294-302.
34. Ishida, H., Makino, A., Mae, T. (1999) "Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species occurs near gly-329" *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 5222-5226.
35. Iwadate, H., Yano, K., Aso, A., Kamo, M., Gardet-Salvi, L., Schiirrmann, P., Tsugita, A. (1992) "Structure of spinach ferredoxin-thioredoxin reductase" *Research in Photosynthesis* Vol. 2:, 7539-7542.
36. Jacob, J. & Lawlor, D. W. (1992) "Dependence of Photosynthesis of Sunflower and Maize Leaves on Phosphate Supply, Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activity, and Ribulose-1,5-Bisphosphate Pool Size." *Plant Physiol.* Vol. 98, 801-807.
37. Jansson, S. (1994) "The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins" *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1184, 1-19.
38. Jiang, C.-Z. & Rodermel, S. R. (1995) "Regulation of photosynthesis during leaf development in RbcS antisense DNA mutants of tobacco." *Plant Physiol.* Vol. 107, 215-224.
39. Joët, T., Cournac, L., Peltier, G. & Havaux, M. (2002) "Cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex." *Plant Physiology* Vol. 128, 760-769.
40. Jordan, D. B., Chollet, R. & Ogren, W. L. (1983) "Binding of phosphorylated effectors by active and inactive forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase." *Biochemistry* Vol. 22, 3410-3418.
41. Jordan, D.B. & Chollet, R. (1983) "Inhibition of ribulose bisphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate." *Journal of Biological Chemistry* Vol. 258, 13752–13758.
42. Jordan, D. B. & Ogren, W. L. (1981) "Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase." *Nature* Vol. 291, 513-515.
43. Jung, Y. S., Yu, L., Golbeck, J. H. (1995) "Reconstitution of iron-sulfur center FA results in complete restoration of NADP(+) photoreduction in Hg-treated photosystem I complexes from *Synechococcus* sp PCC 6301." *Photosynthesis Research* Vol. 46, 249-255.
44. Kobza, J., Seemann, J.R. (1989) "Light-Dependent Kinetics of 2-Carboxyarabinitol 1-Phosphate Metabolism and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Activity in Vivo." *Plant Physiology*, Vol. 89, 174-179.

45. Laisk, A., Oja, V., Rasulov, B., Rämama, H., Eichelmann, H., Kasparova, I., Pettai, H., Padu, E. & Vapaavuori, E. (2002) "A computer-operated routine of gas exchange and optical measurements to diagnose photosynthetic apparatus in leaves." *Plant Cell Env.* Vol. 25, 923-943.
46. Lilley, R.M. & Portis, A.R. (1990) "Activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by rubisco activase." *Plant physiol.* Vol. 94, 245-250.
47. Lilley, R.M. and Portis, A.R. Jr (1997) "ATP hydrolysis activity and polymerization state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase activase: do the effects of Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, and activase concentrations indicate a functional similarity to actin?" *Plant Physiol* Vol. 114: 606–613.
48. Makino, A., Nakano, H., Mae, T. (1997) "The Effect of Elevated Partial Pressures of CO<sub>2</sub> on the Relationship between Photosynthetic Capacity and N Content in Rice Leaves" *Plant Physiology*, Vol. 115, 191-198.
49. Masle, J., Hudson, G. S. & Badger, M. R. (1993) "Effects of ambient CO<sub>2</sub> concentration on growth and nitrogen use in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants transformed with an antisense gene to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase." *Plant Physiol.* Vol. 103, 1075-1088.
50. Miyadai, K., Mae, T., Makino, A., Ojima, K. (1990) "Characteristics of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Degradation by Lysates of Mechanically Isolated Chloroplasts from Wheat Leaves." *Plant Physiology*, Vol 92, 1215-1219.
51. Miyazawa, S.I. and Terashima, I. (2001) "Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate." *Plant Cell Env.* Vol.24, 279-291.
52. Mächler, F., Oberson, A., Grub, A., Nösberger, J. (1988) "Regulation of Photosynthesis in Nitrogen Deficient Wheat." *Plant Physiology* Vol. 87, 46-49
53. Nelson, N., Ben-Shem, A., (2002) "Photosystem I reaction center: past and future." *Photosynthesis Research* Vol. 73, 193–206.
54. Ning, Z. & Portis, A. R. (1999) "Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform reductive activation by thioredoxin f." *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 96, 9438-9444.
55. Néstor, C., Ceccarelli, E.A., (2003) "Open questions in ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase catalytic mechanism." *European Journal of Biochemistry* Vol. 270, 1900-1915.
56. Oja, V., Bichele, I., Hüve, K., Rasulov, B. & Laisk, A. (2004) "Reductive titration of photosystem I and differential extinction coefficient of P700<sup>+</sup> at 810-950 nm in leaves." *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1658, 225-234.
57. Oja, V., Eichelmann, H., Peterson, R. B., Rasulov, B. & Laisk, A. (2003) "Decyphering the 820 nm signal: redox state of donor side and quantum yield of photosystem I in leaves." *Photosynth. Res.* Vol. 78, 1-15.

58. Oja, V. & Laisk, A. (2000) "Oxygen yield from single turnover flashes in leaves: non-photochemical excitation quenching and the number of active PSII." *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1460, 291-301.
59. Parry M. A. J., Andralojc, P. J., Mitchell, R. A. C., Madgwick, P. J. and Keys, A. J. (2003) "Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation." *Journal of Experimental Botany* Vol. 54, 1321-1333.
60. Portis, A.R. (2003) "Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone." *Photosynthesis Research* Vol. 75, 11-27.
61. Portis, A.R., & Salvucci, M.A., (2002) "The discovery of Rubisco activase - yet another story of serendipity." *Photosynthesis Research* Vol. 73, 257-264.
62. Pschorn, R., Rühle, W., Wild, A (1988) "Structure and function of ferredoxin-NADP +-oxidoreductase." *Photosynthesis Research* Vol. 17, 217-229.
63. Quick, W.P., Schurr, U., Scheibe R., Schulze, E.D., Rodermeil S.R., Bogorad L. and Stitt, M. (1991) "Decreased ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS: I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions." *Planta* Vol. 183, 542-554.
64. Robinson, S.P. & Portis, A.R. (1989) "Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein prevents the in vitro decline in activity of ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase." *Plant Physiol.* Vol. 90, 968-971.
65. Robinson, S. P., Streusand, V. J., Chatfield, J. M. & Portis, Jr. A. R. (1988) "Purification and Assay of Rubisco Activase from Leaves." *Plant Physiol.* Vol. 88, 1008-1014.
66. Sage, R.F. (2002) "Variation in the Kcat of Rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature." *J. Ex. Bot.* Vol. 53, 609-620.
67. Salvucci, M.E. & Ogren, W. L. (1996) "The mechanism of Rubisco activase: insights from studies of the properties and structure of the enzyme." *Photosynth. Res.* Vol. 47, 1-11.
68. Salvucci, M.E., Werneke, J.M., Ogren, W.L. & Portis, A.R. (1987) "Purification and Species Distribution of Rubisco Activase." *Plant Physiol.* Vol. 84, 930-936.
62. Scheller, H.V., Naver, H., Moller, B.L. (1997) "Molecular aspects of photosystem I." *Physiologia Plantarum* Vol. 100, 842-851.
69. Streusand, V.J. & Portis, A.R. (1987) "Rubisco activase mediates ATP-dependent activation of ribulose bisphosphate carboxylase." *Plant physiol* Vol. 85, 152-154.
70. Süß, K.H., Arkona, C., Manteuffel, R. & Adler, K. (1993) "Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90, 5514-5518.
71. Takabe, T., Incharoensadki, A., Akazawa, T. (1984) "Essentiality of the Small Subunit (B) in the Catalysis of RuBP Carboxylase/Oxygenase is not Related to Substrate-binding in the Large Subunit (A)." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 122, 763-769.

72. Wang, Z.Y., Ramage, R.T. and Portis, A.R. Jr. (1993) "Mg<sup>2+</sup> and ATP or adenosine 5'-[γ -thio]-triphosphate (ATPγ S) enhances intrinsic fluorescence and induces aggregation which increases the activity of spinach Rubisco activase." *Biochim Biophys Acta* Vol. 1202, 47–55.
73. Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A., Hagelin, K. (1993) "The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation: enzyme modulation." *The FASEB Journal* Vol. 7, 622-637.
74. Yeoh, H.H., Badger, M.R. & Watson, L. (1981) "Variation in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase among plants." *Plant Physiol.* Vol. 67, 1151.
75. Zhang, N., Portis, A.R. Jr. (1999) "Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f." *Proc. Natl. Acad. Sci* Vol. 96, 9438-9443.
76. Zhang, N., Kallis, R.P., Ewy, R.G. and Portis, A.R.Jr. (2002) " Light modulation of Rubisco in Arabidopsis requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform." *PNAS* Vol. 99, 3330–3334.
77. Zhu, G. & Jensen, R.G. (1991) "Fallover of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity." *Plant Physiol.* Vol. 97, 1354-1358.

# LISA 1.



## LISA 2.

```
#include <iostream.h>
#include <math.h>
#include <stdio.h>

const long double VALGE= 255;
const double BITT = log(VALGE/((double)(254)));
long PIKKUS;
long algus = 0;
long lopp = 0;
char MOOD;

unsigned char logaritm(unsigned char x);
long aadress(FILE *sisend,long koht,int nihe);
void orient(FILE *sisend);
void vahetus(FILE *sisend,FILE *valjund);

int main(int argc, char *argv[])
{
    char failike[100];
    std::cout << "\nSisesta faili nimi: ";
    std::cin >> failike ;
    FILE *sisse, *valja ;
    sisse = fopen(failike,"rb");
    if (!sisse){ std::cout << "Faili avamine ebaonnustus\n"; return 1 ; }
    std::cout << "\nKümnendlogaritmi põhise moodi valikuks vajutada [a]: ";
    MOOD = getchar();

    if ((MOOD == 'a') || (MOOD == 'A'))
    {
        std::cout << "Kümnendlogaritmi mood aktiveeritud\n";
        valja = fopen("OD_logaritmitud.tif","wb");

        orient(sisse);
        vahetus(sisse,valja);

        std::cout << (" Muundatud failiks: OD_logaritmitud.tif !\n");
    }
    else
    {
        std::cout << "Tavalogaritmimine\n";
        valja = fopen("logaritmitud.tif","wb");

        orient(sisse);
        vahetus(sisse,valja);

        std::cout << (" Muundatud failiks: logaritmitud.tif !\n");
    }

    fclose(sisse);
    fclose(valja);
}
```

```

    return 0;

} //main

/*
Arvutab biti ymber TRM-iks, TRM-i ln-ib ja teeb esimese biti taisbitiks
*/
unsigned char logaritm(unsigned char x)
{
    // maksimaalne heledate bittide arakasutus
    double labiv = log(VALGE/(double)(x))/BITT;

    // teeb OD1.0 255-ks
    if ((MOOD == 'a') || (MOOD == 'A')) labiv = 255*log10(VALGE/(double)(x));

    unsigned char spad = (unsigned char)(labiv) ;

    if ((labiv - (double)((int)labiv)) > 0.5) spad = (unsigned char)(labiv)+1 ;

    if ( labiv > 254) return (unsigned char)(255) ;

    return spad ;
} //logaritm

/*
Arvutab väljade väärtusi
*/
long aadress(FILE *sisend,long koht,int nihe)
{
    long vaartus = 0, v[4];
    fseek(sisend,koht,SEEK_SET);
    int i=0; while (i<nihe){ v[i]=(long)(getc(sisend)); i++; }

    i=nihe--;
    while (1)
    {
        vaartus += v[nihe];
        if (!nihe) break ;
        vaartus = 0x100*vaartus;
        nihe--;
    } //while

    return vaartus ;
} //aadress

/*
Leiab failist pikslite alguse ja lopu aadressid
*/
void orient(FILE *sisend)
{
    // char kirje[5], kontroll[5];
    long DIRE, KIRJEID, SUURUS, vaartus;

    //leitakse faili pikkus

```

```

fseek(sisend,0L,SEEK_END);
PIKKUS = ftell(sisend);
std::cout << "Faili pikkus: " << PIKKUS << "\n" ;

//kontrollitakse tiffiks olemist
vaartus = aadress(sisend,0,4);
if (!(vaartus==2771273)){ std::cout << "Pole TIFF\n"; return; }

//leitakse directori asukoht
DIRE = aadress(sisend,4,4);
std::cout << "directory asub: " << DIRE << "\n" ;
if (DIRE > PIKKUS){ std::cout << "Jama1 fail\n"; return; }

//director kirjete arv, uue directori kontroll
KIRJEID = aadress(sisend,DIRE,2);
std::cout << "directory kirjeid: " << KIRJEID << "\n" ;
vaartus = DIRE + 2 + 12*KIRJEID ;
if ((vaartus+3) > PIKKUS){ std::cout << "Jama2 fail\n"; return; }
vaartus = aadress(sisend,vaartus,4);
if (!(vaartus==0)){ std::cout << "Ebasobiv formaat\n"; return; }
else std::cout << "uus directory: " << vaartus << "\n" ;

//otsitakse andmete algus ja hulk
int i = 0;
while (i<KIRJEID)
{
    vaartus = DIRE + 2 + 12*i ;

    if (aadress(sisend,vaartus,2)==273)
    {
        algus = aadress(sisend,(vaartus+8),4);
        std::cout << "algus: " << algus << "\n" ;
    }//if algus

    if (aadress(sisend,vaartus,2)==279)
    {
        SUURUS = aadress(sisend,(vaartus+8),4);
        std::cout << "suurus: " << SUURUS << "\n" ;
    }//if pikslite massiivi suurus

    i++;
} //while

lopp = algus + SUURUS;
std::cout << "lopp: " << lopp << "\n" ;

return ;

} //orient

/*
Loeb andmed ymber nii, et pikslid logaritmitakse
*/
void vahetus(FILE *sisend,FILE *valjund)
{
    unsigned char bitt ;

```



```

long i=0 ;

if(algus==lopp){ std::cout << "vigased aadressid\n" ; return ;}
if (lopp > PIKKUS){ std::cout << "Jama3 fail\n"; return; }
if (algus > PIKKUS){ std::cout << "Jama4 fail\n"; return; }

fseek(sisend,0L,SEEK_SET);
while(PIKKUS-i)
{
    bitt=getc(sisend);
    if(!(i<algus) && i<lopp) bitt = logaritm(bitt);
    putc(bitt, valjund);
    i++;
} //while

return ;

} //vahetus

```