

**OTKA nyilvántartási szám: T 043444**

**Iktatószám: KO 2709/2003**

**1. A téma megnevezése:** A fotoszintetikus aktivitás és szénhidrátmetabolizmus módosítása egy szignálmolekulát (fruktóz-2,6-biszfoszfát) endogén koncentrációjának megváltoztatásával

**2. Témavezető:** dr. Toldi Ottó tudományos munkatárs

**3. A munka kezdete és befejezése:** 2003. február 1 – 2006. december 31.

**4. A kutatási program eredményeinek részletes ismertetése**

#### *4.1. Bevezetés és célkitűzés*

A szignálmolekulák nemcsak szimpla génextpressziós és enzimaktivitási szintet determinálnak, hanem komplex anyagcsereutakat szabályoznak és szinkronizálnak. Ezért endogén koncentrációjuk megváltoztatásával elvileg több esély nyílik egy adott anyagcserefolyamat alapvető és gazdasági célzatú megváltoztatására, mint a szensz-antiszensz technika alkalmazása révén. A fruktóz-2,6-difoszfát (Fru-2,6-P<sub>2</sub>) szignálmolekulát növényi szénhidrátmetabolizmusra gyakorolt hatásának vizsgálatára alternatív módszert fejlesztettek ki a pályázó és munkatársai. Növényi rendszerben a Fru-2,6-P<sub>2</sub> gátolja a szacharóz szintézis egyik kulcsenzimét a citoszolikus fruktóz-1,6-difoszfátáz (citFBPáz) és alloszterikusan aktiválja a Pi-függő fruktóz-6-foszfát kináz (FPF), ami a glikolízisben tölt be fontos szerepet. Emellett indirekt módon serkenti a keményítőszintézisben reguláló szereppel bíró plaztisz ADP-glükóz pirofoszforiláz (AGPáz). A Fru-2,6-P<sub>2</sub> citoszolikus koncentrációjának növelésével tehát elvben gátolható a szacharóz szintézis, ugyanakkor serkenthető a keményítő akkumuláció. Értelemszerűen, alacsonyabb Fru-2,6-P<sub>2</sub> koncentrációval csökkenthető a keményítő felhalmozódás a plaztiszban és növelhető a szacharóz szintézis volumene a citoplazmában. A Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintéziséért és lebontásáért egyaránt egy homodimer bifunkcionális enzim, a 6-foszfofrukto-2-kináz/fruktóz-2,6-difoszfátáz (6-PF-2-K / Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz) a felelős. A kináz és a difoszfátáz aktivitások szétválasztásával sikerült olyan transzgenikus dohány növényeket előállítanunk előkísérleteinkben, ahol a difoszfátáz konstrukciót expresszáló növények 20-30%-al több szacharózt szintetizáltak, a kináz konstrukciót expresszáló pedig átlagosan 200%-al több keményítőt akkumuláltak a fényperiódus első 4 órájában. Hipotézisünk szerint a fenti eredmények két fő okra vezethetők vissza. Az egyik, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> az intracelluláris cukormetabolizmus három fontos enzimére hat egyszerre. Ezek a hatások pedig nem kioltják egymást, hanem szinergisztikusan erősítik. Ennek elvi jelentősége van. A másik feltételezett ok, hogy az általunk használt patkánymáj eredetű 6-PF-2-K/Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz és a növények bifunkcionális enzime között alacsony (51%-os) az aminosav szintű homológia. Emiatt a 'feedback' gátlás esélye és az alternatív anyagcsereutak kiegyenlítő hatása kisebb lehet heterológ növényi rendszerben.

A pályázat tárgyát képező munkánk révén bizonyítani szeretnénk, hogy a kináz konstrukcióval transzformált Fru-2,6-P<sub>2</sub>-t túltermelő modellnövényeink retardált növekedést és lassú szénhidrátmetabolizmust mutatnak majd. A Fru-2,6-P<sub>2</sub>-deficiens difoszfátáz konstrukciót expresszáló növények esetében pedig azt várjuk, hogy a

megnövelt szacharóz szintézis fokozott szacharózexportot és növekedési rátát fog eredményezni, hiszen a PFP és az AGPáz gátlása miatt relatíve kevesebb monomer szubsztrát használódik el a glikolízisben és a keményítőszintézisben. A megváltoztatott szénhidrátmetabolizmus azonban nem csak a növények növekedési paramétereire, hanem várhatóan az abiotikus környezeti stresszorokkal szembeni védekezőmechanizmusok hatékonyságára is hatással lesz. A szacharóz, mint ozmotikusan aktív diszacharid, sok szárazságtűrő növénynél része az ún. 'osmolyte' rendszernek, amely képes a citoplazma víz visszatartó képességének növelésére stresszhelyzetben. Miután az abiotikus stressztípusok jelentős részének (vízhiány, sófelhalmozódás, túl alacsony, vagy túl magas hőmérséklet) van ozmotikus komponense, valószínű, hogy a szacharózt túltermelő transzgénikus növényeink a vadtipushoz képest fokozott toleranciával rendelkeznek majd a fenti stresszorokkal szemben. Az eredmények gyakorlati alkalmazhatósága abban rejlik, hogy módszerünk alternatívát jelenthet a növényi cukoranyagcsere gazdasági irányú befolyásolása terén eddig alkalmazott eljárásokkal szemben. Lehetőség nyílhat az eltarthatóság, a növekedési paraméterek és a tápérték pozitív irányú módosítására új módszer kifejlesztésével.

Kísérleteink fő modellnövényeül a burgonyát (*Solanum tuberosum* L. cv Désirée) választottuk azért, mert a növényi szénhidrátmetabolizmus vizsgálatának általánosan elfogadott kísérleti növényeként, eredményeinket összehasonlíthatóvá teszi az alternatív módszerek szakirodalmi adataival. A részkérdések megválaszolása érdekében azonban más növényekben is módosítottuk a Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolizmust a burgonyával megegyező módon. A növekedési paraméterek befolyásolásának lehetőségét földieperben és szegfűben is vizsgáltuk, mely fajok inda-klón rendszere (földieper), illetve internodális növekedése (szegfű) szoros korellációt mutat az importálható szacharóz mennyiségével. A Pi-függő fruktóz-6-foszfát kináz (PFP) stresszválaszban betöltött szerepét pedig a burgonya mellett földieperben és sárgarépában is vizsgáltuk annak érdekében, hogy általános érvényű következtetésekre juthassunk.

#### 4.2. A kísérleti munka időbeli tervezése

2003. január 1 – 2003. december 31.:

- A kináz és difoszfátáz domaint expresszáló géneket burgonya gumó-specifikusan expresszáló konstrukciók elkészítése.
- A Désirée burgonya növények transzformációja mind a konstitutív promóterrel, mind a gumó-specifikus promóterrel vezérelt konstrukciókkal.

2004. január 1 – 2004. december 31.:

- Transzgénikus burgonya vonalak szelektálása antibiotikum rezisztencia marker segítségével.
- Az antibiotikum rezisztens regeneránsok PCR technikával, Southern és northern hibridizációkkal történő jellemzése

2005. január 1 – 2005. december 31.:

- A szelektált vonalak felszaporítása előbb *in vitro*, majd üvegházi körülmények között.
- A transzgénikus burgonya növények expressziós és élettani analízise: metabolit koncentráció és enzimaktivitás meghatározások

2006. január 1 – 2006. december 31.:

- A transzgenikus és kontroll növények fotoszintetikus aktivitásának és respirációjának mérése.
- A transzgenikus és kontroll növények üvegházi és klimakamra-beli tesztelése a különféle ozmotikus stresszekkel (vizhiány, sófelhalmozódás, túl alacsony, vagy túl magas hőmérséklet) szemben mutatott tolerancia fokának meghatározása

#### 4.3. Eredmények

##### 4.3.1. A transzformációra használt génkonstrukciók elkészítésének főbb lépései

Az eredeti transzformációs kazetta tartalmazta a karfiol mozaik vírus 35S promóterét a hasznos génhez képest 5' irányban, amely az eredeti patkánymáj 6-PF-2-K/Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz bifunkcionális enzimének vagy 6-foszfofrukto-2-kináz (6-PF-2-K) aktivitású, vagy fruktóz-2,6-difoszfátáz (Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz) aktivitású modifikációja. Ezekből a konstrukciókból *Hind*III restrikciós enzimmel történő hasítás után megkaptuk a 1400 bp hosszúságú hasznos géneket, amelyeket pBluescriptII KS(+) vektorba ligáltunk *Hind*III helyre. Mivel a klónozás nem irányítottan történt így a gének kétféle orientációba épülhettek be. Mi azokat a klónokat választottuk ki (pGK1, pGK3), ahonnan a géneket később *Bam*HI-*Kpn*I enzimekkel történő restrikciós emésztés után a promóterhez képest szensz orientációban tudtuk a végső vektorba beépíteni. A StMCPI promótert a pMK2 vektorból *Xba*I-*Bam*HI restrikciós enzimekkel izoláltuk majd a pMK1-es vektorba *Xba*I-*Bam*HI helyre ligáltuk. Ez a plazmid a pGK5 nevet kapta. Ezután történt a hasznos génnek beépítése szensz orientációban. Mind a két gént *Bam*HI-*Kpn*I restrikciós enzimekkel vágtuk ki és *Bam*HI-*Kpn*I helyre építettük be a pGK5 plazmidba, amely már tartalmazta a gumóspecifikus expressziót lehetővé tevő StMCPI promótert. A pGK5 + 6-PF-2-K konstrukció a pGK6, a pGK5 + Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukció pedig a pGK7 nevet kapta. Ezután az így elkészített plazmidokat (pGK6, pGK7) és az eredeti pCaMV35S::6-PF-2-K, pCaMV35S::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciókat a pGV2260-as plazmidot hordozó C58C1-es *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe háromszülős keresztezéssel juttattuk be és használtuk fel a növény- transzformációs kísérletekben. A négy eltérő plazmid konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium* törzset 100 ml-es Erlenmeyer lombikban, 25 ml 100 mg/l rifampicint és 25 mg/l kanamicint tartalmazó YEB (0.1% élesztő kivonat/ 0.5% húskivonat/ 0.5% kazein hidrolizátum/ 0.5% szacharóz/ 0.49 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O/ pH 7,2) táptalajban növesztettük egy éjszakán keresztül 28°C-on folyamatos rázatás mellett., OD<sub>600</sub> 0.8-1.0-ig. Ezután a baktérium kultúrákból 1-1 ml-t lecentrifugáltunk (10 perc 6000 rpm), majd a pelletált sejteket 1-1 ml folyékony MS2 táptalajban felszuszpendáltuk és ezt használtuk a transzformáció során.

##### 4.3.2. Transzgenikus burgonya növények (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) előállítása

A transzformációhoz *Solanum tuberosum* L. cv Désirée növényeket használtunk fel. Steril körülmények között nevelt hajtások csúcsait levágtuk és 2% szacharózt tartalmazó MS2 táptalajon (Murashige and Skoog 1962) neveltük őket 24°C-on, hosszúnappalos megvilágítást alkalmazva (16h fény/8h sötét).

A transzgenikus Désirée növényeket levéltranszformációval állítottuk elő. Szövettenyészetben fentartott 4-6 hetes növények középső részéről levágott leveleket (5-

6 db) használtuk a transzformációhoz. A levelek fonáki részén a főerre merőlegesen 3-4 párhuzamos vágást ejtettünk majd a levélalapot levágva a leveleket 25 ml folyékony MS2 táptalajba helyeztük figyelve arra, hogy a transzformáció során a levelek végig fonákkal felfelé maradjanak. Miután a leveleket bemetszettük és fonákkal felfelé behelyeztük őket négy darab, egyenként 25 ml MS2-t tartalmazó Petri csészébe, a folyékony MS2-ben felszuszpendált *Agrobacterium* szuszpenziókból 50-50 µl-t adtunk hozzá. (Minden Petri csészébe más-más plazmidot tartalmazó *Agrobacterium*-ot tettünk.) Ezután 2 napig sötétben együtt tenyésztettük a transzformálandó növényi explantumokat a baktérium vektorokkal. Két nap elteltével fonákkal felfelé kallusz indukciós táptalajra helyeztük a leveleket a megfelelő szelekciós ágenseket a táptalajhoz hozzáadva (250 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamicin). A leveleket 7 napig tartottuk ezen a táptalajon fényre helyezve. Ezután hajtásindukáló táptalajra (SIM) passzáltuk őket a megfelelő szelekciós ágensek hozzáadásával (250 mg/l cefotaxim, 50 mg/l kanamicin). A leveleket hetente friss SIM táptalajra raktuk, végig fonákkal felfelé tartva őket. A regenerálódó hajtásokat 2% szacharózt, 250 mg/l cefotaximot és 50 mg/l kanamicint tartalmazó RM táptalajon kémcsőben neveltük tovább steril körülmények között. Azokat a hajtásokat tartottuk fenn további vizsgálatra, amelyek az *in vitro* szelekciós körülmények között meggyökeresedtek. A transzformációs kísérletek elvégzése után 34 db pMCPI::6-PF-2-K, 35 db pMCPI::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz, 38 db pCaMV35S::6-PF-2-K és 42 db pCaMV35S::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz fúziót hordozó feltételezeten transzgenikus Désirée vonalunk volt, melyek közül a megfelelő expressziót mutatókat Northern hibridizációval válogattuk ki.

#### 4.3.3. A magas expressziót mutató transzgenikus növények szelekciója molekuláris biológiai módszerekkel

A CaMV35S promótert tartalmazó konstrukciókkal transzformált növények közül a transzgént megfelelő szinten expresszáló növényeket Northern hibridizációval válogattuk ki, míg a gumóspecifikus MCPI promótert tartalmazó növények molekuláris szintű szelekciójára RT-PCR-t alkalmaztunk, melyhez az mRNS-t minigumókból izoláltuk. Pozitív kontrollként plazmid DNS-t és pozitív, a gént expresszáló CaMV35S promótert tartalmazó növényt használtunk. Az RT-PCR reakció termékeit 1%-os agaróz gélen szétválasztottuk, a gélt Hybond N+ membránra blottoltuk, majd a Northern hibridizációnál használt módon jelöltük. Végül a membránt röntgenfilmre exponáltuk. Azért, hogy megbizonyosodjunk a gumóspecifikus expresszióról, a pozitív növények leveléből is izoláltunk mRNS-t és RT-PCR-rel vizsgáltuk levélben a transzgén expresszióját. A levél RT-PCR kiértékelésénél a gumó RT-PCR-rel azonosan jártunk el. A kiindulási növényanyag molekuláris biológiai módszerekkel történt vizsgálata után sikerült kiválogatnunk a pCaMV35S::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót tartalmazó növényekből 18 db-ot, a pCaMV35S::6-PF-2-K konstrukciót tartalmazó növényekből 6 db-ot, amelyek magas szinten expresszálták a transzgént.

A pMCPI::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz- és az pMCPI::6-PF-2-K konstrukciókat tartalmazó növényekből 3-3 vonalat választottunk ki, amelyeknél a gumóspecifikus expresszió nagyságrendileg magasabb volt a levélben tapasztalt – a detektálási határon levő – expresszióval. A fenti vonalakat további előszelekciónak vetettük alá azon az alapon, hogy a megváltoztatni kívánt metabolitokból (szacharóz, keményítő) mennyit szintetizálnak, illetve bontanak le egy átlagos 12 óra fény (150.0 µmol PAR m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) / 12 óra sötét napi ciklus során. Ezen

előszelekció után konstrukciónként két-két növényvonalon folytattuk tovább a részletes vizsgálatokat. A konstitutív promóterrel vezérelt difoszfataz konstrukciót hordozó vonalakat pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényeknek neveztük, melyek közül egy gyenge- és egy erős expressziójú vonalat vizsgáltunk. Ennek mintájára a kináz konstrukciót hordozó növényeket pCaMV::6-PF-2-K jelöléssel láttuk el, melyek közül itt is egy gyenge- és egy erős expressziót mutató vonalat választottunk ki. Először arra a két kérdésre kerestünk magyarázatot, hogy egyrészt mi lehet az oka a transzgenikus növényekben mért jelentős expressziós különbségeknek, másrészt, hogy ez az expressziós-szintű különbség vajon megmutatkozik-e a transzgenek által kódolt fehérjék aktivitásának szintjén is? Azaz, mérhető-e különbség a kimérikus fehérjék (6-PF-2-K, Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz) aktivitásában az expresszióbeli különbségeknek megfelelően? Ezért olyan Southern hibridizációkat végeztünk, amelyek alapján következtetni lehetett a növényi genomba integrálódott transzgenek kópiaszámára, a kópiaszám és a transzgen expresszió közti összefüggés feltárására RT-PCR-t végeztünk, majd végül az expressziós szint és a kimérikus fehérjék aktivitása közti összefüggést is vizsgáltuk. Az alapvető cukormetabolitok mellett megmértük a legfontosabb hexózok és foszforilált intermedierek koncentrációit is (glükóz, fruktóz, glükóz-6-foszfát, glükóz-1-foszfát, fruktóz-6-foszfát, 3-foszfoglicerinsav, dihidroxiaceton foszfát).

#### *4.3.4. A legfontosabb cukormetabolitok diurnális ciklusa a transzgenikus növények leveleiben*

##### *4.3.4.1. Konstitutív promóterrel vezérelt 6-PF-2-K, illetve Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz esetén*

A vad típusú növény leveleiben mért Fru-2,6-P<sub>2</sub> szinthez képest 12%-90%-os csökkenést figyeltünk meg a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények leveleiben, amit valószínűleg a 1,4-4,9-szeres Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz aktivitás növekedés okozott. Általában fordított korrelációt figyelhettünk meg a Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz aktivitás és az átlagos (steady-state) Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint között.

A megvilágítás első 1 órája alatt a Fru-2,6-P<sub>2</sub> mennyisége a kontroll és a gyengén expresszáló pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényekben drámaian lecsökkent. A megvilágítás közepén a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint visszatért majdnem azonos szintre, mint amit a sötét szakasz alatt mértünk. Az erősen expresszáló pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények leveleiben a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint alacsony maradt az egész diurnális ciklus alatt. A megvilágítás kezdetén a szacharóz mennyisége megemelkedett a vad típusú és a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények leveleiben. Azonban a szacharóz gyorsabban halmozódott fel az erősen expresszáló vonalban és jelentősen nagyobb mennyiséget ért el, mint a vad típusban vagy a gyenge expressziójú vonalban. Általánosságban elmondható, hogy a glükóz és a fruktóz a szacharózhoz hasonló napi mintázatot követett és a megvilágítás ideje alatt mindkét vonalban magasabb volt a hexózok mennyisége, mint a vad típusú kontroll növényekben. Ezek a különbségek eltűntek a diurnális ciklus sötét szakasza alatt. A gyenge expressziójú pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz vonalban a keményítő mennyisége mindvégig kissé a kontroll alatt maradt, míg az erősen expresszáló pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz vonalnál ez az érték szignifikánsan alacsonyabb volt (Student *t*-teszt,  $P < 0,05$ ) a vad típusú növények leveleiben mért értékeknél. A maltóz koncentrációban nem volt jelentős különbség a vad típus és a transzgenikus növények között. A megvilágítás ideje alatt állandóan alacsony

koncentrációt mutatott, míg a sötét szakasz alatt a szintje fokozatosan emelkedett. A fruktóz-6-P, glükóz-6-P és a glükóz-1-P szintje a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz vonalakban hasonló mintázatot követett a diurnális ciklus alatt. Az erősen expresszázó pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényekben azonban koncentrációjuk jelentősen magasabb volt a megvilágított szakasz első felében, mint a gyengén expresszázó és a vad típusú kontroll növények esetében. A sötét periódus alatt a dihidroxiaceton foszfát (DHAP) és a 3-foszfoglicerinsav (3PGA) tartalom hasonlóan alacsony volt a vad típusban és a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz vonalakban, de a megvilágítás végére trióz-foszfát akkumulációt figyeltünk meg mindegyik vonalnál. Mivel ez a felhalmozódás gyorsabb volt a vad típusú növény leveleiben, itt jelentősen magasabb szintet értek el a trióz-foszfátok, mint a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényeknél.

A szénhidrát allokációban bekövetkezett lényegi átrendeződés indokolta tette, hogy nyomon kövessük a Fru-2,6-P<sub>2</sub> ismert és potenciális cél-enzimeinek az aktivitását (citFBPáz, SPS, PFP, AGPáz) a metabolit mérésekhez hasonlóan az egész diurnális ciklus alatt. Nem találtunk statisztikai alapon értékelhető különbséget a transzgenikus és a kontroll növények között, kivéve egy nagyon fontos esetet. Az erősen expresszázó pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz vonalnál a citFBPáz és SPS aktivitása jelentősen magasabb volt a megvilágítás első 8 órája alatt, mint a vad típusban vagy az alacsonyan expresszázó vonalban. Ezen kívül, a szacharóz szintetizáló enzimek aktivitás növekedése kiegészült egy csekély, de statisztikailag szignifikáns AGPáz aktivitás csökkenéssel ugyanebben az időintervallumban.

A transzgenikus pCaMV::6-PF-2-K növények leveleiben a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint jelentősen magasabb volt, mint a vad típusú növényekben. A 6-PF-2-K aktivitás 1,1-5,0-szörös növekedése a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint 120%-os emelkedését okozta a gyengén expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növényekben, míg az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K vonalban ez egészen 510%-ig emelkedett. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a magasabb 6-PF-2-K aktivitás együtt járt a Fru-2,6-P<sub>2</sub> steady-state koncentrációjának arányos növekedésével a pCaMV::6-PF-2-K növények leveleiben. Kezdeti visszaesés után a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint jelentős emelkedést mutatott a megvilágítás második órája alatt a gyengén expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növényeknél a vad típushoz képest. Ez a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint azonban fokozatosan csökkenni kezdett a megvilágítás harmadik órájától a megvilágított periódus végéig és ekkorra elérte a kontroll növényekre jellemző értékeket. Ezzel ellentétben az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K vonalban a diurnális periódus alatt végig magas maradt a Fru-2,6-P<sub>2</sub> koncentráció. Ennek eredményeként a fotoperiódus első 2 órájáig tapasztalt átmeneti szacharóz akkumuláció a gyengén expresszázó pCaMV::6-PF-2-K vonalban a vad típusban mérttel közel azonos szinten maradt és csak mérsékelten csökkent a megvilágítás végéig. Ezzel szemben az erősen expresszázó vonalban a „steady-state” szacharózkoncentráció az egész fotoperiódus alatt jelentősen alacsonyabb maradt a vad típushoz és a gyengén expresszázó vonalhoz képest is. A glükóz és a fruktóz hasonló diurnális mintázatot követett, mint a szacharóz, azaz a megvilágítás alatt kevesebb volt belőlük a gyengén expresszázó vonalban, mint a vad típusban. Az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K vonalban még drasztikusabb különbségek adódtak; csak minimális mennyiségű glükózt és fruktózt tudtunk mérni a nap folyamán egy rövid ideig tartó felhalmozó periódus után. A gyengén expresszázó vonalban keményítőakkumuláció volt megfigyelhető a vad típushoz viszonyítva, főleg a megvilágítás első négy órájában. Ezzel szemben az erősen expresszázó vonalban a keményítőakkumuláció folyamatosnak

bizonyult, nemcsak a diurnális ciklus fény szakaszában, hanem a sötét periódus alatt is. Az egyformán alacsony maltóz szint az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növényekben azt mutatta, hogy a burgonya plasztiszokban a tranziens keményítő bomlása során nem a maltóz a szénhidráttranszport fő formája. A hexóz foszfát (fruktóz-6-P, glükóz-6-P, glükóz-1-P) szintek napi ciklusa egyforma értékeket mutatott a gyengén expresszázó és vad típusú növények leveleiben. Az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növényekben viszont alig volt mérhető szinten a koncentrációjuk és ez igaz volt a diurnális ciklus teljes hosszára. A megvilágítás kezdetén a 3-PGA és a DHAP koncentrációja viszonylag alacsony volt, mind a vad típusú, mind pedig a gyengén expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növényekben, ezzel szemben az erősen expresszázó vonalban az egész diurnális ciklus során szignifikánsan magasabb értékeket mértünk. A  $P_i$  pont fordítva viselkedett, a megvilágítás első négy órájában egyenletesen alacsony értékeket mutatott, melyet fokozatos emelkedés követett a fényperiódus hátralevő részében. Érdekes módon nem volt jelentős különbség a transzgenikus és a vad típusú növények között, a  $P_i$  szintje magas volt mindegyik vonalban a sötét periódus alatt.

A Fru-2,6- $P_2$  ismert és potenciális cél enzimeinek (citFBPáz, SPS, PFP, AGPáz) aktivitásának mérése mellett megmértük további enzimek aktivitását a pCaMV::6-PF-2-K és vad típusú növényekben, hogy megtaláljuk az erősen expresszázó vonalban mért folyamatosan magas keményítő tartalom lehetséges magyarázatát. Ezek a plasztisz enzimek részt vesznek az elsődleges keményítő szemcsék hidrolitikus ( $\alpha$ -amiláz,  $\beta$ -amiláz) vagy a foszforilitikus (foszfoglukán víz dikináz, keményítő foszforiláz) degradációjában, ezáltal pedig a tranziens keményítő re-mobilizációjában. Az esetek legnagyobb részében nem találtunk szignifikáns különbséget ezen enzimek aktivitásában a különböző növényvonalak között. Azonban az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K vonalnál az AGPáz aktivitás jelentősen magasabb volt nem csak a megvilágított periódusban, hanem a diurnális ciklus sötét szakasza alatt is.

#### 4.3.4.2. Gumóspecifikus promóterrel vezérelt 6-PF-2-K, illetve Fru-2,6- $P_2$ áz esetén

Megmérve a fenti metabolitok koncentrációit és az előzőleg már vizsgált enzimek aktivitását a transzgenikus és a vad típusú kontroll növények leveleiben, nem találtunk szignifikáns különbséget az adatokban függetlenül attól, hogy a transzgenikus növények a pMCPI::6-PF-2-K, vagy a pMCPI::Fru-2,6- $P_2$ áz konstrukciót hordozták.

#### 4.3.5. A legfontosabb cukormetabolitok diurnális ciklusa a transzgenikus növények gumóiban

##### 4.3.5.1. Konstitutív promóterrel vezérelt 6-PF-2-K, illetve Fru-2,6- $P_2$ áz esetén

Méréseink szerint a burgonyagumóban – más heterotróf táplálkozású szövetekhez hasonlóan - a Fru-2,6- $P_2$  szint konstitutív megváltoztatása a trióz-foszfát/hexóz-foszfát arányok szignifikáns megváltozását eredményezte, de a két agronómiailag fontos összetevő, a szacharóz és a keményítő koncentrációja változatlan maradt. Be kell azonban kalkulálnunk azt a tényt, hogy eközben a fotoszintetizáló levelekben a szénhidrát allokáció lényegi megváltozását sikerült elérni, amely magába foglalta a szacharóz- és a keményítőmetabolizmus átprogramozását is.

#### 4.3.5.2. *Gumóspecifikus promóterrel vezérelt 6-PF-2-K, illetve Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz esetén*

A fentiekből okulva a gumóspecifikus promóterrel való transzformációval éppen a fotoszintetizáló levelek eltérő szacharóz exportjától való függést szerettük volna kiküszöbölni ráadásul abban a helyzetben, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szinteket csak a gumóban változtatjuk meg. Mint a 4.3.4.2. alfejezetben bemutattuk, a gumóspecifikus MCPI promóterrel transzformált növények fotoszintetizáló levelei nem mutattak eltérést szénhidrátmetabolizmusuk mért paramétereiben a kontroll növényekhez képest. Az érett, sötétben tárolt gumók azonban lényegesen eltérő tulajdonságokkal rendelkeztek elsősorban a csirázási képesség terén. A cukormetabolit profilok statisztikai szempontból – elsősorban a nagyon magas szórás miatt – nem mutattak kiértékelhető különbséget a trióz-foszfát/hexóz-foszfát arányok szignifikáns megváltozását leszámítva. A csirázási erély tekintetében viszont azt tapasztaltuk, hogy a pMCPI::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót hordozó növények gumói nyugalmi állapot nélkül nagyarányú csirázásba kezdtek, míg a pMCPI::6-PF-2-K növényeknél még induktív körülmények közepette is ritkán következett be csirázás. A cukormetabolit profilok szacharózt és keményítőt is érintő megváltozását abban az esetben figyeltünk meg, ha a gumókat 3 hétig folyamatos erős fényben tároltuk. Míg a bezöldült gumók felszín-közeli szövetrészeiben a fotoszintetizáló levelekhez hasonló cukormetabolit profilokat kaptunk, közeledve a gumó belsejéhez ez a hasonlóság fokozatosan eltűnt és a metabolitprofilok a kontroll sötétben tartott gumókra jellemző értékeket mutatták.

#### 4.3.6. *A megváltoztatott Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolizmusú transzgénikus növények hideg- és szárazságtűrése*

A szakirodalomból ismert, hogy a növények egyik eszköze az ozmotikus stressz elleni védekezésben az ún. ozmolitok – például prolin, glicin-betain, szorbitol, szacharóz - akkumulációja. Miután a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót erősen expresszáló burgonya vonalak szignifikánsan több szacharózt akkumulálnak mint a vad típusú kontroll, a pCaMV::6-PF-2-K vonalak pedig lényegesen kevesebbet, adódott egy kísérleti rendszer, amiben a többlet szacharóz, illetve a szacharóz defficiencia hatását lehetett vizsgálni szárazság- és hidegstressz alatt. Ráadásul arra is van szakirodalmi adat, hogy bizonyos keményítőakkumuláló *Arabidopsis* mutánsok is szárazságtűrőbbnek bizonyultak vad típusú társaiknál annak köszönhetően, hogy egy plasztiszban aktív, szárazságindukálható  $\beta$ -amiláz a keményítőtől egy lépésben transzportálható maltózt állít elő. A maltóz hatékonyabb ozmoprotektáns, mint a szacharóz és ozmotikus stressz esetén lényegesen megnő a citoplazmatikus koncentrációja. Tehát elvileg a transzgénikus növények mindkét típusa rendelkezhetett volna a vad típusétól eltérő stressz-toleranciával. A szárazságot úgy modelleztük, hogy hosszúnappalos megvilágítási ciklus mellett, szobahőmérsékleten 12 napig nem locsoltuk a növényeket. A mintákat a 13. napon délben gyűjtöttük. A fiziológiai méréseknél a minták szárazanyag értékére normáltuk az eredményeket ebben az esetben a növényanyag folyamatos vízvesztése miatt. A hidegkezelést 10°C-os hidegszobában hosszúnappalos fényviszonyokat biztosítva és normál öntözés mellett valósítottuk meg. Mintákat a hidegkezelés tizedik, harmincadik és negyvenötödik napján gyűjtöttünk szintén délben.



Az eredmények lényege az volt, hogy legnagyobb meglepetésünkre a szacharóz túltermelő pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények esetén volt legmagasabb a mortalitási ráta, a vad típusú kontroll növények köztes helyzetet foglaltak el, míg az erősen expresszázó pCaMV::6-PF-2-K növények közül mindegyik túlélte a 12 napos szárazságot és a 45 napos hidegkezelés után is volt 40%-nyi túlélő közöttük. A szárazság kezelést a vad típusú növények 60%-a élte túl, míg a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények közül egy túlélő sem akadt. A hidegkezelést egy vad típusú és pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növény sem élte túl. A fotoszintézissel és a növények stressz alatti gázcseréjével kapcsolatos méréseink érdekes eredményt adtak. A szacharóz túltermelő pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények sztómáinak nyitottsága (a sztóma konduktancia alapján) a sötét periódusban és a stresszkezelések előrehaladtától függetlenül a fény periódusban is egyenletesen magas értékeket mutatott. Ezzel egyidejűleg a fotoszintetikus CO<sub>2</sub> fixáció csökkenése lényegesen hamarabb indult meg ebben a vonalban a stresszkezelések során, mint a kontroll és a pCaMV::6-PF-2-K növényekben. Ez utóbbi növények esetén a sztóma konduktancia egyenletesen alacsony értékeket mutatott a diurnális ciklus fény és sötét szakaszában (érdekes eredmény, hogy a sztómák este is nyitottak voltak, ha csak kismértékben is) és ez a stresszkezelések előrehaladtával sem változott. Ezek a növények a fotoszintetikus CO<sub>2</sub> fixálás terén is ilyen kiegyensúlyozott eredményeket produkáltak. Kedvező körülmények között is alacsonyabb volt a CO<sub>2</sub> fixáció mértéke mint a vad típusban, vagy a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényekben, de a stresszkezelés előrehaladtával sem csökkent lényegesen a túlélő egyedekben. A vad típusú sztómakonduktancia értékei követték a szokványos diurnális menetet és érzékenyen reagáltak a stresszkezelésekre, hasonlóan a fotoszintetikus CO<sub>2</sub> fixáció volumenéhez. Véleményünk szerint a sztómakonduktancia ilyen markáns különbségei lényegesen hozzájárultak a pCaMV::6-PF-2-K növények fokozott- és a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények csökkent stressz toleranciájához. Elképzelhető, hogy a szacharóztúltermelés olyan magas turgor nyomást eredményezett a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények sztóma zárósejtjeiben, hogy azok képtelenek voltak ellátni funkciójukat. A pCaMV::6-PF-2-K növények esetében kizártuk annak a lehetőségét, hogy a plazmából a maltóztranszportereken keresztül beáramló tranziens keményítő eredetű maltóznak szerepe lenne a fokozott stressz toleranciában. Sem  $\beta$ -amiláz aktivitás növekedést, sem maltóz akkumulációt nem tudtunk kimutatni a stresszkezelések alatt. Amit viszont feltűnőnek találtunk ezekben a stressz-toleráns növényekben, az a foszfoenol piruvát karboxiláz (PEPC) fokozott aktivitása volt, ami nagyságrendi szintig emelkedett a sötét periódus végén és a fény periódus első órájában. A PEPC mellett a PFP aktivitása is lényegesen magasabb volt, de ezek az értékek nem mutattak diurnális ingadozást. Ezzel kapcsolatos elképzelésünk erősen spekulatív de köze lehet a valósághoz. A stressz-toleráns pCaMV::6-PF-2-K növényekben intracelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció növekedést mértünk a napi ciklus azon szakaszaiban, ahol a PEPC aktivitása nem volt magasabb, mint a kontroll növényekben. Ugyanakkor ha a PEPC aktivitása emelkedett az intracelluláris CO<sub>2</sub> koncentráció szintje a vad típus szintjére csökkent. Mivel a PEPC a C4-es és a CAM növényekben szerepet játszik a CO<sub>2</sub> fixációban, azt feltételezzük, hogy a PEPC-nek szerepe lehet a zárt sztómák miatt felhalmozódó respirációs CO<sub>2</sub> refixációjában a C3-as növényekben is. (Erre más összefüggésben – a C3-as növények raktározószerveiben a szemianaerob helyzetben akkumulálódó respirációs CO<sub>2</sub> refixációjánál – vannak szakirodalmi utalások.) A PFP esetében is érdekes anomáliára

figyeltünk fel. Az enzim által katalizált reakció közel equilibrium normál fiziológiai körülmények között, azaz egyenlő arányban járul hozzá a glükoneogenezishez és a glikolízishez. Eredményeink szerint stresszhelyzetben egyértelműen a glükoneogenetikus út dominál a raktározószervekben, míg a fotoszintetizáló szervekben tartós marad az equilibrium állapot. Ez azt jelenti, hogy a PFP regulációja szervspecifikus és stressz esetén részt vesz a tartalékolt keményítő remobilizációjában.

#### *4.3.7. A projektben vizsgált egyéb növényeken (földieper, sárgarépa, szekfű) elért eredmények*

Földieperben és szekfűben igazoltuk, hogy lehetséges agronómiailag értékelhető fenotipikus különbségeket létrehozni olyan növény rendszerben, ahol az egyedfejlődés teljes időtartama alatt funkcionál egy olyan erős szacharóz importáló szerv, mint a földiepernél az inda-klón rendszer, vagy a szekfűnél a száraz folyamatos internodális növekedése. Földieperben a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények biomassa produkciója elérte a vadtypushoz viszonyított 183%-ot, az anyanövényenkénti indaszám a 330%-ot és az anyanövényenként klónszám az 545%-ot a 18 hetes növekedési periódus végére. Ezen növényeknél az inda-klón rendszer képes volt a többlet szacharóz folyamatos felvételére, így nem valósult meg a fotoszintetikus teljesítmény többlet szacharóz általi szupresszója, ami jellemző volt az indáiktól folyamatosan megfosztott pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növényekre. A szekfű esetében (az SZIE Genetikai és Növénynevelési Tanszékével együttműködve) azt kaptuk, hogy a szacharóz túltermelő pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz növények internodális hossznövekedése elérte a vadtypus 400%-át alacsony fényintenzitáson és az idősebb levelek különböző lánchosszúságú fruktánokat akkumuláltak a mezofillumsejtek vakuólumaiban. A pCaMV::6-PF-2-K vonalak esetében ezzel szemben gyakran előfordultak törpe növények és virágfejlődésbeli rendellenességek (atipikus szíromlevélszám, aberrált formájú bibeszálak és steril porzók). Meg kell jegyezzük azonban, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolizmus módosításával kiváltott fenotípusok kialakulása mögött mélyebb genetikai magyarázatot is találnunk kell a jövőben, hiszen a transzgenikus dohány és burgonya növényekben semmilyen fenotipikus különbséget nem tapasztaltunk a kontrollhoz képest. A transzgenikus sárgarépa növényeket abból a célból állítottuk elő, hogy a stresszelt burgonyagumóban mért eltérő PEPC és a PFP aktivitási adatokat általánosabb szintre hozzuk. Ennek a célnak meg is feleltek ezek a kísérletek, miután sikerült velük alátámasztani a burgonyánál elért eredményeket.

#### *4.4. Eredmények megvitatása*

Hosszú ideje a nemesítési és az agronómiai gyakorlat egyik célkitűzése a növények termőképességének maximalizálása a fotoszintézis hatékonyságának növelésén keresztül. A terméshozam ugyanis szoros korrelációt mutat a vegetációs periódus alatt biokémiai energiává konvertált fényenergia mennyiségével, azaz a fotoszintézis hatékonyságával. A legújabb adatok szerint hatékony eszköz lehet a fenti cél elérésében a fotoszintetikus szénhidrátmetabolizmus szignálmolekulák segítségével történő módosítása. A szignálmolekulák módosításának nagy előnye az ún. „kulcsenzim” stratégiával szemben az, hogy nem egyetlen lépést tudunk módosítani egy-egy anyagcsereúton belül, hanem elviekben komplett anyagcsereutakat tudunk szinkronizálni

és szabályozni (Paul et al. 2001). Napjaink konszenzusa, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> a magasabb rendű növények fotoszintetikus szénhidrát metabolizmusának egyik fontos regulátora (Stitt 1990). A fotoszintézis fény szakaszában ez a szignál metabolit részt vesz a CO<sub>2</sub> fixáció és a szacharóz szintézis koordinálásában, valamint szabályozza a megkötött szén szacharóz és keményítő közötti megoszlását (Stitt et al. 1987). Mivel a szénhidrátok legfőbb transzport formája a szacharóz, a szintézisében résztvevő enzimek különösen fontosak a termés hozam befolyásolását illetően. Ezek közül a citoszolikus fruktóz-1,6-difoszfátáznak (citFBPáz) és a szacharóz-foszfát szintáznak (SPS) van meghatározó szerepe a szacharózflux volumene szempontjából (Zrenner et al. 1996) és mindkettő negatív effektora a Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Ebből következően az endogén Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint csökkenésekor a citFBPáz felszabadul a gátlás alól, ami koncentrációnövekedést idéz elő a hexóz-foszfátok esetében. Ismert, hogy a hexóz-foszfátok közül a glükóz-6-P az SPS potens pozitív regulátora. A citFBPáz serkentése így SPS aktivitás növekedést is eredményez és ennek köszönhetően fotoszintát flux a tranziens keményítő rovására a szacharóz irányába tevődik át (Stitt et al. 1984). A Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint növekedése értelemszerűen gátolja a citoplazmatikus szacharóz szintézist ezért a plazmában felhalmozódnak a trióz-foszfátok (3-PGA, DHAP) ami együtt jár a 3PGA:Pi arány emelkedésével. A 3PGA:Pi arány növekedése aktiválja az AGPáz-t, így a fotoszintátok áramlása a szacharóz rovására a keményítő felé irányul (Stitt 1990, Kruger and Scott 1995). A csökkentett és megnövelt Fru-2,6-P<sub>2</sub> tartalmú transzgenikus növények analízise alátámasztotta fenti hipotézis helyességét. Az alacsony Fru-2,6-P<sub>2</sub>-t szint a szacharóz szintézist serkentette, míg a magas Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint keményítőakkumulációt idézett elő (Scott et al. 1995, Truesdale et al. 1999, Scott et al. 2000). Annak ellenére, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> koncentrációk megváltoztatása a szénhidrát allokáció lényegi átrendeződését eredményezte, fenotipikus változásokat nem észleltek (Nielsen et al. 2004). Ez azért is elgondolkodtató, mert ha a Fru-2,6-P<sub>2</sub> által szabályozott enzimek (citFBPáz, SPS, AGPáz) aktivitását egymástól függetlenül befolyásolták antiszensz vagy szensz mRNS technikával, számos fenotípusos változást kaptak (Müller-Röber et al. 1992, Zrenner et al. 1996). Feltételeztük, hogy ennek az ellentmondásnak a tudományos feloldása közelebb vihet bennünket a Fru-2,6-P<sub>2</sub> funkciójának feltárásához. Transzgenikus növényekben a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint mérsékelt csökkenése vagy emelkedése a szacharóz és keményítő szintézis rátáját csak a megvilágítás korai szakaszában befolyásolta (Scott et al. 1995, Truesdale et al. 1999, Scott et al. 2000). Transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növények vizsgálata bebizonyította, hogy a vad típusú kontroll növények steady-state Fru-2,6-P<sub>2</sub> koncentrációját 100%-nak tekintve, az 5%-ra való csökkentés szükséges ahhoz, hogy a szacharóz szintézis rátáját folyamatosan befolyásolni tudjuk az egész fotoperiódus alatt (Draborg et al. 2001).

Így az első elvárás egy ideális modellnövényvel szemben a transzgenének magas szintű expressziója, ami egyenes korrelációt mutat a befolyásolni kívánt fiziológiai tulajdonság módosításának szintjével. Ez előfeltétele a Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolizmus konstitutív és szignifikáns megváltoztatásának. Azonban, ahogy azt a fentiekben már láttuk, még a 20-30%-os szacharóz koncentráció emelkedést előidéző 95%-os Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint csökkenés sem volt elég ahhoz, hogy eltérő fenotípust eredményezzen.

Bizonyított, hogy a CO<sub>2</sub> fixáció hatékonysága alacsonyabb a csökkentett Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintű szacharóz túltermelő transzgenikus növényekben (Scott et al. 2000). Amikor a szacharóz szintézis meghaladja a levélből történő export sebességét, olyan cukor

intermedierek halmozódnak fel, amelyek represszálják a fotoszintézis kulcsenzimeit abból a célból, hogy helyreállítsák a CO<sub>2</sub> fixáció és a fotoszintát produkció közötti egyensúlyi helyzetet (Stitt et al. 1991, Pego et al. 2000). Ezért a csökkentett Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintű ideális modellnövénynek folyamatosan magas szacharóz felvevő kapacitással kell rendelkeznie. Ez biztosíthatja a feleslegben lévő szacharóz folyamatos transzportját és felhasználását, ami máskülönben gátolni tudná a fotoszintetikus CO<sub>2</sub> fixációt és így kompenzálná a csökkentett Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint várt hatását. Azt feltételezzük, hogy a fent említett negatív effektorok eltávolítása a fotoszintetikus teljesítményt konstitutív növekedését válthatja ki (Stitt et al. 1984, Kruger and Scott 1995), ami fenotípusos változásokat eredményezhet a csökkentett Fru-2,6-P<sub>2</sub> szinttel rendelkező transzgenikus növényeknél.

Transzgenikus burgonya növényekben a citFBPáz aktivitás antiszensz gátlásával a kontroll növények adatait 100%-nak véve 80%-os aktivitás csökkenést értek el, ami a trióz-foszfát, a fruktóz-1,6-difoszfát és a keményítő szint emelkedéséhez vezetett. Annak ellenére, hogy a szacharóz szintézis volumene 53-65%-kal lecsökkent, a steady-state szacharóz koncentráció változatlan maradt, mert a többlet keményítő mobilizációja visszapótolta a hiányzó intermediereket a citoplazmába (Zrenner et al. 1996). Ezért a megnövelt Fru-2,6-P<sub>2</sub> szinttel rendelkező ideális modellnövénynek egyidejűleg kell többlet keményítőt akkumulálni és keményítő-mobilizáció defficiensnek lenni. Így meghiúsulhat a citoszol feltöltése a szacharóz szintézishez szükséges intermedierekkel, ami szintén eredményezhet fenotípusos eltéréseket a megnövelt Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintű növényekben.

Munkánk során olyan transzgenikus növényeket állítottunk elő, amelyek erősen expresszálták vagy a pCaMV35S::6-PF-2-K konstrukciót - ami fokozott Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintézist eredményezett - vagy a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót, ami a Fru-2,6-P<sub>2</sub> fokozott degradációjához vezetett. Ezek a változtatások olyan vonalakat eredményeztek minden vizsgált növényfaj esetében, melyekben a Fru-2,6-P<sub>2</sub> tartalom a vad típusban mért szint 10-15%-ára csökkent vagy 450-510%-ra emelkedett. Így azt a következtetést vontuk le, hogy a létrehozott kísérleti növényanyag alkalmas a fiziológiai mérések elkezdésére minden modellnövényünk (burgonya, földieper, szegfű, sárgarépa) esetében. A Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint konstitutív megváltoztatása a szénhidrátprofilok lényegi átrendeződését eredményezte a fotoszintetizáló levelekben az összes átalunk vizsgált növényfaj esetében. A pCaMV35S::6-PF-2-K konstrukciót erősen expresszáló növényekben szignifikáns keményítőakkumulációt tapasztaltunk, melyet csökkent szacharóz tartalom egészített ki, míg a pCaMV::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót erősen expresszáló növényekben a magasabb szacharóz koncentráció a keményítőszintézis rovására valósult meg. Ebben semmi új nincs, a növényi Fru-2,6-P<sub>2</sub> metabolizmussal foglalkozó laboratóriumok többsége – ha különböző módon is de - eljutott ezekhez az eredményekhez (Scott et al. 1995, Truesdale et al. 1999, Scott et al. 2000, Draborg et al. 2001, Nielsen et al. 2004). Mi két dologban tudtunk új eredményt felmutatni. Az egyik, hogy sikerült bizonyítanunk, hogy léteznek olyan növényi modellek (pl. eper és szegfű), melyekben az endogén Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint csökkentésével és növelésével is lehet lényeges és reprodukálható fenotípusos eltéréseket generálni. A másik, hogy azt is sikerült bizonyítanunk, hogy a megemelt Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint a növényi rendszerben is előnyt jelent a stresszadaptációban az állati rendszerhez hasonlóan. Hipotézisünk szerint a fokozott szárazság- és hidegtolerancia a PEPC CO<sub>2</sub> refixációs aktivitásán, a PFP

energiamobilizációban való – növényekben eddig nem ismert – szerepvállalásán és a sztómák vízvesztést minimalizáló működésén alapszik.

A Fru-2,6-P<sub>2</sub> tartalom megváltoztatása a heterotróf mem-fotoszintetizáló szövetekben - mint amilyen a burgonya gumó, vagy a sárgarépa répatest - a trióz-foszfát:hexóz-foszfát arány lényegi megváltozását eredményezte, de a két agronómiailag fontos összetevő, a szacharóz és a keményítő koncentrációja változatlan maradt a konstitutív promóterrel vezérelt 6-PF-2-K-t, illetve Fru-2,6-P<sub>2</sub>ázt expresszáló, sötétben tárolt gumókban. Ez az eredményünk sem jelentett új ismeretet, hiszen a burgonyában egyrészt megelőztek bennünket (Rung et al. 2004), másrészt heterotróf táplálkozású dohány kalluszenyészetekben is ugyanezt az eredményt kapták (Ferne et al. 2001). Mi is felismertük, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szabályozó szerepe nem olyan meghatározó heterotróf szövetekben, mint a fotoszintetizáló szövetekben. Amiben újat tudtunk mondani ezen a területen az az, hogy ugyan a szénhidrátprofil nem tudtuk átütöbben megváltoztatni gumóspecifikus promóter (pMCPI) alkalmazásával, de mégis lényegi eltérést kaptunk a transzgénikus gumók csirázási paramétereit tekintve. A pMCPI::Fru-2,6-P<sub>2</sub>áz konstrukciót hordozó növények gumói nyugalmi állapot nélkül nagyarányú csirázásba kezdtek, míg a pMCPI::6-PF-2-K növényeknél még induktív körülmények közepette is ritkán következett be csirázás. A cukormetabolit profilok szacharózt és keményítőt is érintő megváltozását abban az esetben figyeltünk meg, ha a gumókat 3 hétig erős fényben tároltuk. Míg a bezöldült gumók felszín-közeli szövetrészeiben a fotoszintetizáló levelekhez hasonló cukormetabolit profilokat kaptunk, közeledve a gumó belsejéhez ez a hasonlóság fokozatosan eltűnt és a metabolitprofilok a kontroll sötétben tartott gumókra jellemző értékeket mutatták. További új eredményeink a raktározószerv metabolizmus terén a PFP növényi stresszválaszban betöltött szerepét világították meg. A PFP élettani szerepét mindig is homály fedte, hiszen ambiens élettani viszonyok közepette equilibrium reverzibilis reakciót katalizál (a fruktóz-6-foszfát és a fruktóz-1,6-difoszfát interkonverziót, mind a glikolitikus, mind a glükoneogenetikus irányban). Ráadásul a funkciója nem egyedi, mert a foszfofrukto-1-kináz (PFK1) ugyanezt a reakciót katalizálja igaz, hogy csak a glikolitikus irányban. A legfontosabb különbség a két enzim között az, hogy a PFK ATP-t használ foszforil donorként, a PFP viszont Pi-t. Elképzelhető, hogy stresszhelyzetben az „energiatakarékos” PFP nagyobb szerephez jut, mint az ATP fogyasztó PFK. Erre van is indikáció, mert humán rendszerben ismert, hogy a szívinfarktus okozta stressz ideje alatt a PFP ténylegesen átveszi a PFK szerepét a sérült szívizom-szövetben. Eredményeink szerint a növényekben a tartalék poliszacharidok (elsősorban a keményítő) stressz-függő remobilizációjában van fontos szerepe.

#### *4.5. Új tudományos eredmények, elkészült és tervezett publikációk*

A projekt végrehajtása során számtalan új és izgalmas kérdéssel kerültünk szembe, melyet meg kellett válaszolnunk a továbblépés érdekében. Ezért nemhogy a projektet, de még a manuális munkát sem tudtuk 2006. december 31-ig befejezni. (A labormunka valószínűleg ez év március 30-án fejeződik majd be.) A viszonylagos késés az is magyarázat, hogy élettani kísérletek révén, mindig meg kellett várjuk, míg a növények elértek egy adott fejlettségi szintet. Ezért a projekt eredményeinek publikálása csak ezután fog nagyobb lendületet venni. A továbbiakban a 80-100%-os készültségi

szintű kéziratok tükrében röviden összefoglalom azokat az eredményeinket, amelyek ténylegesen új információt jelentenek a Fru-2,6-P<sub>2</sub> funkciójával kapcsolatban.

- A legfontosabb eredményünk, hogy a világon elsőként igazoltuk, hogy a Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint csökkentésével és növelésével is lehet agronómiaailag értékelhető és reprodukálható fenotípusos eltéréseket létrehozni. Az ezzel kapcsolatos kéziratunk gyakorlatilag 100%-os készültségi állapotban van, már csak az egyik külföldi szerzőtárs javításai hiányoznak a beküldéshez.

Kovács G, Sorvari S, Scott P, Kruger NJ and Toldi O (2007) A plant model in which both up regulation and down regulation of the endogenous fructose-2,6-bisphosphate levels can result in distinct phenotypes. **Plant Physiology** (in preparation) IF (2005): 6,114

- Új eredmény, hogy a megnövelt Fru-2,6-P<sub>2</sub> szint a növényeknél is adaptív előnyt jelent szárazság- és hidegstressz esetén az állati rendszerhez hasonlóan és ez a PEPC CO<sub>2</sub> refixációs aktivitásán, a PFP energiamobilizációban való – növényekben eddig nem ismert – szerepvállalásán és a sztómák vízvesztést minimalizáló működésén alapszik. Igazoltuk, hogy a kontroll szignifikánsan alacsonyabb Fru-2,6-P<sub>2</sub> szintje nem váltja ki a fenti folyamatokat. Az ebből a témából készülő kéziratunk kb. 80%-os készültségi szinten van, az Eredmények fejezet még kiegészítésre szorul.

Kovács G, Nagy Z, Sorvari S, Scott P, Kruger NJ, Tuba Z and Toldi O (2007) Switching over to C3/CAM-intermediate photosynthesis and anaerobic glycolysis results in tolerance to drought and cold in fructose-2,6-bisphosphate up regulated plants. **Plant Physiology** (in preparation) IF (2005): 6,114

- A Fru-2,6-P<sub>2</sub> gumóspecifikus megváltoztatása a csirázási paraméterek megváltozását eredményezte hagyományos, sötétben való tárolás esetén, lényegi metabolikus átrendeződés nélkül. A cukormetabolit profilok szacharózt és keményítőt is érintő megváltozását abban az esetben figyeltünk meg, ha a gumókat 3 hétig erős fényben tároltuk. Míg a bezöldült gumók felszín-közeli szövetrészeiben a fotoszintetizáló levelekhez hasonló cukormetabolit profilokat kaptunk, közeledve a gumó belsejéhez ez a hasonlóság fokozatosan eltűnt és a metabolitprofilok a kontroll sötétben tartott gumókra jellemző értékeket mutatták.

Kovács G, Sorvari S, Scott P, Kruger NJ and Toldi O (2007) Tuber-specific up regulation and down regulation of the endogenous fructose-2,6-bisphosphate levels result in severe rearrangement of the carbohydrate profile when tubers are stored under continuous illumination. **Planta** (in preparation) IF (2005): 3,1

- További új eredményeink a PFP növényi stresszválaszban betöltött szerepét világították meg. Adataink szerint a PFP részt vesz a tartalék poliszacharidok (elsősorban a keményítő) stressz-függő remobilizációjában.

Kovács G, Sorvari S, Scott P and Toldi O (2006) Pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase operates in net gluconeogenic direction in taproots of cold and

drought stressed carrot plants. **Acta Biologica Szegediensis** 50(1-2): 25-30

Kovács G, Sorvari S, Scott P and Toldi O (2007) Pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase is involved in mobilization of sugar reserves in taproots of cold and drought stressed carrot plants. **Acta Agronomica Hungarica** (in press)

(Ebben a témában még tervezünk egy nemzetközi publikációt, mert a fenti közleményekben még csak részeredményeket közöltünk.)

#### 4.6. Irodalom

DRABORG H., VILLADSEN D. and NIELSEN T.H. (2001): Transgenic *Arabidopsis* plants with decreased activity of fructose-6-phosphate-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase have altered carbon partitioning. *Plant Physiology* 126:750-758

FERNIE A.R., ROSCHER A., RATCLIFFE R.G. and KRUGER N.J. (2001): Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta*, 212:250-263

KRUGER N.J. and SCOTT P. (1995): Manipulation of fructose-2,6-bisphosphate levels in transgenic plants. *Biochemical Society Transactions* 22:904-909

MURASHIGE T. and SKOOG F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

MÜLLER-RÖBER B., SONNEWALD U. and WILLMITZER L. (1992): Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal* 11:1229-1238

NIELSEN T.H., RUNG J.H. and VILLADSEN D. (2004): Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science* 9:556-563

PAUL M.J., PELLNY T. and GODDIJN O. (2001): Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends in Plant Science* 6:197-200

PEGO J.V., KORTSTEE A.J., HUIJSER C. and SMEEKENS S.C.M. (2000): Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 51:407-416

RUNG J.H., DRABORG H.H., JØRGENSEN K. and NIELSEN T.H. (2004): Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Physiologia Plantarum* 121:204-214

SCOTT P., LANGE A.J., PILKIS S.J. and KRUGER N.J. (1995): Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose 2,6-bisphosphate levels. *The Plant Journal* 7:461-469

SCOTT P., LANGE A.J. and KRUGER N.J. (2000): Photosynthetic carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing decreased amounts of fructose 2,6-bisphosphatase. *Planta* 211:864-873

STITT M., GERHARDT R., WILKE I. and HELDT H.W. (1987): The contribution of fructose-2,6-bisphosphate to the regulation of sucrose synthesis during photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 69:377-386

STITT M. (1990): Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:153-185

STITT M., KURZEL B. and HELDT H.W. (1984): Control of photosynthetic sucrose synthesis by fructose-2,6-bisphosphate. *Plant Physiology* 75:554-560

STITT M., VON SCHAEWEN A. and WILLMITZER L. (1991): 'Sink' regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease in Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. *Planta* 183:40-50

THEODOROU M.E. and KRUGER N.J. (2001): Physiological relevance of fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of spinach leaf pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. *Planta* 213:147-157

TRUESDALE M., TOLDI O. and SCOTT P. (1999): The effect of elevated concentrations of fructose 2,6-bisphosphate on carbon metabolism during deacidification in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Physiology* 121:957-964

ZRENNER R., KRAUSE K-P., APEL P. and SONNEWALD U. (1996): Reduction of the cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants limits photosynthetic sucrose biosynthesis with no impact on plant growth and tuber yield. *The Plant Journal* 9:671-681