



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**NÖVÉNYKÓROKOZÓ *PSEUDOMONASOK*
VIRULENCIA/PATOGENITÁS GÉNJEINEK
IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE**

Doktori értekezés tézisei

Czelleng Arnold

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete
Budapest, 2005

A doktori iskola

megnevezése: Biológiai

vezetője: Dr. Tuba Zoltán
Tanszékvezető, a biológia tudományok
doktora
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezet-
tudományi Kar,
Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezető: Dr. Klement Zoltán
Kutató Professzor (MTA rendes tagja)
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tudományos könyv, könyvfejezet, könyvszerkesztés: 1

Magyar nyelvű könyvfejezet írása: 1

Czelleng A (2005): A baktériumok változékonyságának molekuláris genetikai alapja. In: Gáborjányi R (Szerk.): Molekuláris növénykórtan. Budapest: Mezőg. Szaktudás kiadó. (megjelenés alatt)

Tudományos utánpótlás nevelés: 1

TDK konzulens: 1

Szépréti Z (2000): Módszerek tanulmányozása a zöldpaprika lágyrothadását okozó *Pseudomonas viridiflava* patogenitással kapcsolatos génjeinek azonosítására. Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Genetika Tanszék

Szatmári Á, Bozsó Z, Besenyei E, Varga GJ, Ott PG, Czelleng A and Klement Z (2004): Cloning and analysis of genes related to the early form of general defence response of plants against bacteria by subtractive hybridisation and quantitative PCR. The 14th FESPB Congress Cracow, Poland August 23-27. Book of Abstract Acta Physiologiae Plantarum 26: 265. (poszter)

Besenyei E, Ott PG, Bozsó Z, Szatmári Á, Varga GJ, Czelleng A and Klement Z (2004): Inhibition of plant defence responses by low temperatures. 7th Conference of the European Foundation for Plant Pathology and British Society for Plant Pathology Presidential Meeting University of Aberdeen, UK September 5-10. pp. 31. (poszter)

Magyar: 6

Szépréti Z, Czelleng A, Klement Z (1999): A zöldpaprika lágyrothadását okozó *Pseudomonas viridiflava* jelenléte hazánkban. Növényvédelmi napok, Keszthely, Magyarország

Klement Z, Czelleng A (2001): Növénykórokozó baktériumok új virulenciáért felelős génjeinek izolálása. MTA, Ünnepi ülés, Budapest, Magyarország

Bozsó Z, Ott P, Czelleng A, Besenyei E, Sárdi É, és Klement Z (2002): Növények általános korai védekezési reakciójával kapcsolatos, peroxidázok által jelzett folyamatok dohánylevélben. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E., Szatmári Á, Varga G, Klement Z (2003): *In planta* indukálódó baktériumgén vizsgálat a gfp és antibiotikum rezisztencia kifejeződés alapján. 49. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február. 25-26. pp. 78.

Varga GJ, Ott PG, Besenyei E, Bozsó Z, Czelleng A, Szatmári Á, Klement É, Medzihradzky KF és Klement Z (2004): Korai indukált rezisztenciához kapcsolható új kitinázok dohányban. 50. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, február 24-25. pp. 105.

Szatmári Á, Bozsó Z, Besenyei E, Varga G, Czelleng A, Klement Z (2004): Az általános nem-specifikus növényi védekezési reakció korai fázisában aktiválódó gének azonosítása. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest

A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

Az ismert baktérium genom szekvenciák gyorsan növekvő száma mellett, a gének többségének feladata kevésbé ismert. A baktériumok kórokozó képességének genetikai meghatározói szigorúan és pontosan szabályozottak, elsősorban transzkripció szinten. Ez lehetőséget ad a kórokozással összefüggő génjeik elkülönítésére, mégpedig azok specifikus *in vivo (in planta)* kifejeződése révén. Az „*in vivo* expression technology” (IVET) egy olyan promóter kereső módszer, amely baktériummutánsok szelekciója révén lehetővé teszi a promóter nélküli riportergénnel fuzionált feltételesen kifejeződő gének azonosítását. A vizsgálat végeredménye olyan baktérium gén azonosítása, melyek elsősorban *in planta* fejeződnek ki, a betegség kialakulása közben. Több közlemény ismerteti az IVET alkalmazását különböző állat-baktérium kölcsönhatásban. Ennek ellenére a növénykórokozó baktériumok kórokozó képességének vizsgálata gyakran korlátozott olyan genetikai rendszer (pl. megfelelő IVET plazmid) hiánya miatt, mely az elsősorban a baktériumok növényvel alkotott kölcsönhatása alatt kifejeződő gének azonosítására lenne alkalmas.

E Tanulmány célja olyan IVET promóter kereső plazmidok készítése volt, melyek alkalmazása a szokásos auxotróf koplementáció helyett antibiotikumos szelekción alapul. Célként szerepelt az egyik plazmid, a pIviGK használhatóságának igazolása során a lágyrothadást okozó *Pseudomonas viridiflava* olyan génjeinek elkülönítése, melyek kórokozással összefüggő faktorokat kódolnak.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Baktériumtörzsek és plazmidok

A munka során alkalmazott baktériumtörzsek: *Pseudomonas viridiflava*, *Escherichia coli* DH5 α / λ pir, *E. coli* S17.1 és *E. coli* HB101. A szelekcióhoz használt antibiotikumok: 50 μ g/ml rifampicin, 10 μ g/ml gentamicin és 50 μ g/ml kanamycin. A munka során alkalmazott plazmidok: pRK2013, pBluescriptKS, pGP704, pJQ199 és pAG408.

Rekombináns DNS technikák

A plazmid DNS és a teljes genom DNS izolálását, az *E. coli* transzformációját, az agaróz gélelektroforézist és minden enzimes kezelést ismert módszerekkel végeztünk. A DNS fragmenseket GELase (EPICENTRE, USA) alkalmazásával izoláltuk agaróz gélből, a gyártó ajánlását követve. Southern hibridizációhoz digoxigenin (DIG)-alapú jelölő és detektáló kit-et (Boringen Mannheim) használtunk, a gyártó ajánlása szerint.

Konjugatív mobilizáció

A konjugációt Czelleng és mtsi. (2006) közleménye alapján végeztük.

A pIviGK és pIviGG készítése

Először a pGP704 egy származékát, a pGPMCSII-t készítettük el, mely a *Bgl*II és *Kpn*I helyek között tartalmazza az MCSII mesterséges polilinker szekvenciát (1. ábra). A gentamicin (*accA*1) és kanamycin (*aphA*3) rezisztenciagéneket a pAG408-ból izoláltuk. Mindkét izolált fragmens túlnyúló végeit T4 polimerázzal tompává alakítottuk és az *Ssp*I – *Bst*1107I enzimekkel emésztett pGPMCSII-vel ligáltuk, eredményként a pGPMCSII:gm és pGPMCSII:km plazmidokat kaptuk. A *gfp-km* és a

Konferencia kiadvány (proceeding): 2

Nemzetközi: 2

Bozsó Z, Ott PG, Kecskés ML, Czelleng A, Klement Z (2000): Non-specific peroxidase and H₂O₂ associated reactions of tobacco leaves after infiltration with different *hrp/hrmA* mutant of *P. syringae* pv. *syringae* 61. In: Proceedings of the 10th International conference on plant pathogenic bacteria, Charlottentown, Prince Edward Island, Canada. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp. 195-198.

Klement Z, Bozsó Z, Besenyei E, Czelleng A, Ott PG (2002): Early induced resistance (EIR) is a general, symptomless plant response to bacteria. In: Iacobellis NS. et al. (Szerk.): *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp. 301-310.

Előadás, poszter bemutatás: 13

Nemzetközi: 7

Czelleng A, Szépréti Z, Klement Z (1999): Research aspects of the phytopathogen pseudomonads' virulence factors. 13 TH International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Budapest, Hungary

Czelleng A, Klement Z (1999): In vivo inducible promoters of pseudomonads. Bilateral Meeting Between the Hungarian and German Phytopathologists, Göttingen, Germany

Czelleng A, Ott PG, Bozsó Z, Kecskés M, Klement Z (2000): Research approaches in the study of the green pepper pathogen *Pseudomonas viridiflava*'s virulence factors. The 10th International Conference on the Plant Pathogenic Bacteria, Charlottentown, Canada (poszter)

Szatmári Á, Bozsó Z, Besenyei E, Czelleng A, Klement Z (2003): Isolation of genes related to general, non-specific defence reaction of plants from tobacco and *Arabidopsis*. 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, St.-Petersburg, Russia, pp. 124. (poszter)

Varga GJ, Ott PG, Besenyei E, Bozsó Z, Czelleng A, Szatmári Á, and Klement Z (2004): Novel Bacterially Induced Chitinases in Tobacco With Expression Features Defferent from Most Part of Other Known Chitinases. International Joint Workshop on PR-proteins and Induced Resistance Elsinor, Denmark, May 5-9. pp. 96. (poszter)

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

Tudományos folyóiratcikk: 7

IF, SCI folyóiratbeli cikk: 4

Klement Z, Bozsó Z, Kecskés ML, Besenyei E, Czelleng A and Ott PG (2003): Local early induced resistance (EIR) of plants as the first line of defence against bacteria. *Pest Manag. Sci.* 59:465-474. (If: 0,642)

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E, Varga GJ, Szatmári Á, Király L and Klement Z (2005): Identification of virulence-associated genes of *Pseudomonas viridiflava* activated during infection by use of a novel IVET promoter probing plasmid. *Curr. Microbiol.* (Közlésre elfogadva If: 1,075)

Ott PG, Varga GJ, Szatmári Á, Bozsó Z, Klement É, Medzihradsky FK, Besenyei E, Czelleng A and Klement Z (2005): Novel extracellular chitinases rapidly and specifically induced by general bacterial elicitors and suppressed by virulent bacteria as a marker of early basal resistance in tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (Közlésre elfogadva If: 3,580)

Bozsó Z, Ott PG, Szatmári A, Czelleng A, Varga G, Besenyei E, Sárdi É, Bányai É, and Klement Z (2005): Early detection of bacterium-induced basal resistance in tobacco leaves with diamminobenzidine and dichlorofluorescein diacetate. *J. Phytopathol.* 153:596-607. (If: 0,59)

SCI által nyilvántartott és/vagy SCI által jegyzett fórumok/orgánumok által referált folyóiratbeli cikk: 3

Bozsó Z, Besenyei E, Ott PG, Czelleng A, Klement Z (2002): Cloning and characterization of peroxidases associated with generalized defense reactions of plants against bacterial pathogens. *Proc. 7th Hungarian Congress on Plant Physiology S3-P01, Acta Biologica Szegediensis* 46:139-141.

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E, Varga GJ, Szatmári Á, Hafez YM and Klement Z (2004): Isolation of *in planta*- induced genes of *Pseudomonas viridiflava*. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 39: 361-375.

Czelleng A, Bozsó Z, Ott PG, Besenyei E, Varga GJ, Szatmári Á, Szabó E and Klement Z (2006): High frequency transposon mutagenesis following conjugation in a wide range of phytopathogenic Gram-negative bacteria. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* (Közlésre elfogadva)

gfp-gm riporter gének párokat a következő módon készítettük. Az *aphA3* és *accA1* gének promótermentes származékait (továbbiakban: *kmS/R* és *gmS/R*) nested PCR technikával állítottuk elő. A PCR termékeket *EcoRI* és *SmaI* enzimekkel hasítottuk és a pBluescriptKS plazmiddal ligáltuk, eredményként a pBKS:gmS/R és pBKS:kmS/R plazmidokat kaptuk. E plazmidokat *KpnI*-el és *EcoRI*-el hasítottuk, majd ligáltuk a pAG408-ból származó *atpE-gfp* génekhez, eredményként a pBKS:gfp-gmS/R és pBKS:gfp-kmS/R plazmidokat kaptuk. A riporter gének párokat *KpnI* és *SmaI* hasítással izoláltuk és ligáltuk a pGPMCSII:km és pGPMCSII:gm plazmidokhoz. Ezzel elkészítettük a pIviGK és pIviGG plazmidokat.

IVET fúziós könyvtár készítése

P. viridiflava tisztított genomi DNS-ét *HindIII*-mal hasítottuk és a 2000-3000 bp méretű fragmenseket izoláltuk agaróz gélből. Az izolált fragmensek 5' végeit Klenow DNS polimeráz segítségével dATP-vel és dGTP-vel részlegesen feltöltöttük. Az *XbaI*-el hasított pIviGK-t részlegesen feltöltöttük dCTP-vel, valamint dTTP-vel és a *P. viridiflava* genomi DNS fragmenseivel ligáltuk. Az összes (kb. 10⁴) *Escherichia coli* DH5 α pir transzformáns donorként szolgált egy olyan konjugációban, ahol *P. viridiflava* volt a recipiens.

Zöldpaprikatermés fertőzése

Két különböző átmérőjű dugófúróval 0,5 cm széles paprikagyűrűket vágunk ki zöldpaprikatermésből. A paprikagyűrűket vákuum alatt fertőztük *P. viridiflava* szuszpenzióval. A fertőzési folyamat 30 másodpercig tartott.

In vivo szelekció

10⁴ telepéből IVET-mutáns *P. viridiflava* pool-t készítettünk és a szuszpenziót vákuumos fertőzéshez használtuk. A fertőzés után két órával a

zöldpaprikagyűrűket 50 µg/ml töménységű kanamycin oldattal vákuum alatt infiltráltuk. 10-12 órányi inkubáció után a paprikagyűrűket homogenizáltuk, a baktériumokat szuszpendáltuk és gentamicin tartalmú szelektív LB táptalajra szélesztettük, majd 28 °C-on 48 órán keresztül inkubáltuk. A Petri csészéket UV átvilágítón rövid ideig megvilágítottuk és további elemzésre azokat a telepeket válogattuk ki, melyek nem bocsátottak ki zöld fényt. A szelektált klónok olyan géneket képviseltek, melyek csak *in planta* fejlődtek ki.

Az *ivi*-gének konjugatív klónozása és nukleotid sorrendjük meghatározása

A különböző *ivi*-géneket tartalmazó pIviGK plazmidokat retrotranszferrel *E. coli* DH5α/λ pir törzsbe juttattuk. Az *ivi*-gének bázissorrendjét a pUC/M13 (-26) szekvenáló primer segítségével határoztuk meg.

***Arabidopsis* levelek fertőzése és az *in planta* baktériumszaporodás mérése**

Az *Arabidopsis thaliana* (Col-0 ökotípus) leveleinek fecskendővel végzett fertőzését, illetve felületi beoltását csakúgy, mint a fertőző baktériumszám meghatározását, ismert módszerekkel végeztük.

Az *ivi*-gének kifejeződés dinamikájának mérése a GFP fluoreszcenciája révén

A fluoreszcens méréseket Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Franciaország) spektrofluorométerrel végeztük. A GFP-t feltételesen kifejező *P. viridiflava* sejteket 395 nm hullámhosszúságú fényvel gerjesztettük. A fluoreszcens fénykibocsátást 512 nm-nél detektáltuk. Az *Ivi*-mutáns törzseket éjszaka (kb. 16 óra) szaporítottuk 10 µg/ml töménységben gentamicint tartalmazó LB táptalajban. Centrifugálás után a baktériumüledéket desztillált vízben

promótereket képviselnek, képtelenek zöld fluoreszcens fény kibocsátására.

A pIviGK, új promóter kereső plazmid lehetővé teszi a kiválogatott indukálható promóterek nukleotid sorrendjének és kifejeződésük dinamikájának könnyű meghatározását.

A Disszertációban a *P. viridiflava* hét olyan *in planta* indukálható génjét írtuk le, melyeket a pIviGK alkalmazása révén izoláltunk. Az egyik ilyen gén az MviN feltételezett membránfehérje egy homológját kódolja. A *P. viridiflava* MviN_{pv}-re nézve hiánymutáns származékát állítottuk elő, mely mozgásképtelen volt és a vad típusú törzshöz képest csökkent virulenciát mutatott felületi beoltás esetén, de amikor a baktériumokat fecskendővel juttattuk a növény szöveti közé, nem észleltünk különbséget azok virulenciáját illetően. Ezek a vizsgálatok jelezték első ízben, hogy az *mviN* a növénykórokozó baktériumok egy virulencia faktora. Az *mviN_{pv}* *in planta* kifejeződését a vele együtt kifejeződő *gfp* riportergén vizsgálatával követtük. Ezek szerint, az *mviN_{pv}* promóterének van egy LB táptalajon is megnyilvánuló alapaktivitása, amely a fertőzést követő harmadik órára 20%-al megnő. Ezzel párhuzamosan, a pektát liáz promóterének indukcióján alapuló GFP fénykibocsátás a fertőzés után csak 1,5 órával volt mérhető.

Ezen eredmények alapján a pIviGK-t alkalmazó IVET módszer egyéb növénykórokozó baktériumok további virulencia génjeinek azonosítását is lehetővé teheti, ezzel mélyebb betekintést biztosíthat a növények baktériumos betegségeinek kórtanába.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JÖVŐBELI LEHETŐSÉGEK

Munkánk során egy új IVET promóter kereső plazmidot, a pIviGK-t és az alkalmazásához szükséges *in planta* antibiotikus szelekciós rendszert dolgoztunk ki. A módszer alkalmazása során a pIviGK felhasználásával speciális, a *P. viridiflava* genomi DNS-ét tartalmazó promóter kereső génkönyvtárat készítettünk *E. coli*-ban. A génkönyvtárban a genomi DNS fragmenseket fuzionáltuk a pIviGK plazmidon hordozott riportergén párral. A génkönyvtárat *P. viridiflava*-ba juttattuk, ahol a klónozott genomi fragmensek a velük fuzionált riportergén párral együtt, homológ rekombináció révén integrálódtak a vizsgált baktérium genomjába. Ezután zöldpaprika gazdanövényt fertőztünk a rekombináns merodiploid baktériumok csoportjával, majd egy speciális *in planta* antibiotikus (kanamycines) szelekciónak vetettük alá azokat. Azok a baktériumok, amelyek túléltek ezt a szelekciót, olyan kanamycin rezisztens törzsek, amelyek egy aktív promóterrel kifejezték a kanamycin riportergént. Ezek a túlélő baktériumok tehát, konstitutív és *in planta* indukálódó promótereket képviselnek. A pIviGK plazmid GFP-t kódoló riportergénje egy második bakteriológiai táptalajon végzett, *in vitro* szelekcióval biztosítja a konstitutív módon kifejeződő promótereket képviselő túlélő baktériumtörzsek ellen történő szelekciót. Ez azért lehetséges, mert *in vitro* körülmények között a GFP-t termelő konstitutív módon aktív promótereket képviselő baktériumtelepekkel szemben azok, melyek indukálható

szuszpendáltak és a szuszpenzióval paprikagyűrűket fertőztünk. A fertőzést követő különböző időpontokban homogenizáltuk a paprikagyűrűket és kibocsátott fluoreszcenciájukat mértük.

Az *mviN_{pv}*-re nézve funkcióvesztett PV-dm mutáns *P. viridiflava* készítése

A pIviGK::s1/6 plazmidban hordozott *mviN_{pv}*-t tartalmazó kromoszóma fragmenst PCR-el megsokszoroztuk. A PCR termék túlnyúló végeit T4 polimerázzal feltöltöttük és a pJQ199 egyedi *SmaI* helyébe ligáltuk. Az *mviN_{pv}* egyedi *SmaI* helyére kanamycin rezisztenciagént építettünk és a plazmiddal *E. coli* S17.1 törzset transzformáltunk. A *P. viridiflava* PV-dm származékát a mutáns *mviN_{pv}*-vel végzett „marker exchange” mutagenézissel készítettük, az ismert módon. A *Km^R* (*aphA3*) génkazetta genomi beépülését kolónia PCR technikával igazoltuk.

A TIS (transzlációt indító szekvencia) elemzése a hozzá kapcsolt P_{BAD} promóter indukciója révén

A D-arabinózzal indukálható P_{BAD} promóterrel és a vizsgált transzlációt erősítő szekvenciákkal fuzionált *gfp* riportergént hordozó különböző transzpozon mutáns *E. coli* HB101 törzseit éjszakán át szaporítottuk LB tápoldatban. Centrifugálás után a baktériumokat 0,2% (13,3 μM) D-arabinóz tartalmú LB tápoldatban szuszpendáltuk. A promóter indukcióját követő inkubáció első 22 órájában két óránként, majd a 48. órában vettünk mintát fluorometriás elemzésre. A vizsgálatban a gerjesztéshez és a kibocsátás detektálásához alkalmazott értékek azonosak voltak a fentebb leírtakkal.

EREDMÉNYEK

A pIviGK promóter kereső plazmid

Az újonnan készített pIviGK (1. ábra) promóter kereső plazmid különleges tulajdonságait az alábbiakban részletezzük.

Az MCSII mesterséges szekvencia középső része tartalmazza a klónozóhelyet (MCS, multiple cloning site), amelyet mindkét oldalon a ritkán hasító *PacI* restrikciós endonukleáz felismerő helyei és az M13/pUC -20 forward és -26 reverse szekvenáló primer-ek komplementerei szegélyeznek. A *PacI* felismerő hely biztosítja a klónozóhely könnyű átalakíthatóságát. Az „univerzális” M13 szekvenáló primer-ek a DNS inszert PCR-el történő megsokszorozásához és a könnyű szekvenálásához egyaránt alkalmasak.

A riportergén párból baktérium genomként csak egy van, így az optimális szelekcióhoz szükséges a riportergénekről átíródó kisszámú mRNS-ről történő hatékony transláció. Ezért a pIviGK riportergénjeit úgy készítettük, hogy azok 5' nem translálódó régiójában translációt erősítő szekvenciákat tartalmaznak. Az antibiotikum rezisztenciát kódoló riportergén 5' nem translálódó régiója az újonnan tervezett TIS-t (transzlációt indító szekvenciát, 1. ábra) tartalmazza.

Ezekon felül a pIviGK, mindkét riportergénje előtt, mindhárom leolvasási keretben translációs stop kodonokat tartalmaz (1. ábra). Ez biztosítja, hogy a genomi- és a riportergének között translációs

Új tudományos eredmények

1. A baktériumok promótereinek elemzéséhez készítettünk egy olyan új promóter kereső plazmidot, a pIviGK-t, amely lehetővé teszi az *in planta* indukálódó promóterek antibiotikum rezisztencián alapuló kiválogatását.
2. Új translációt erősítő szekvenciát (TIS, translációt indító szekvencia) terveztünk és építettünk az antibiotikum rezisztenciát kódoló riportergénhez.
3. A pIviGK felhasználásával promóter kereső génkönyvtárat készítettünk a lágyrohadást okozó *Pseudomonas viridiflava* baktériumban.
4. Az új plazmid és az alkalmazásához fejlesztett antibiotikus szelekciós rendszer használatával több *in planta* indukálódó baktériumgént különítettünk el.
5. E gének egyike a *pel*, amely a vizsgált baktérium fő virulencia faktorát, a pektát liázt kódolja. Egy másik izolált gén az *mviN_{pv}*, amelyik a *P. viridiflava* egy feltételezett membránhoz kapcsolt virulencia faktorát kódolja.
6. Az *MviN_{pv}* fehérjét kódoló gén funkcióvesztéssel járó mutációja befolyásolta a *P. viridiflava* mozgását és virulenciáját is. Az utóbbit annyiban, hogy felületi beoltás esetén a mutáns baktérium nem volt képes megfertőzni gazdanövényét.

Az MviN_{pv} fenotípusos elemzése

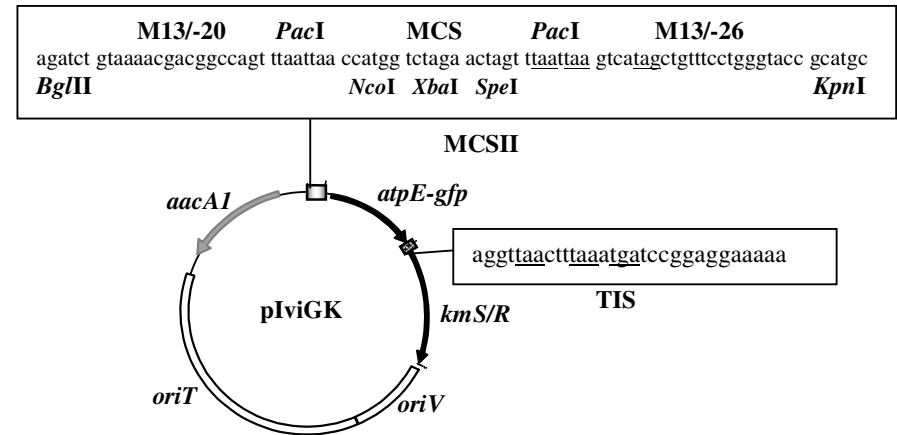
Az MviN_{pv} lehetséges feladatának meghatározásához az *mviN_{pv}* génre nézve funkcióját vesztett mutánst állítottunk elő.

A lágyagaron végzett motilitás teszt alapján az MviN_{pv} fehérje szükséges a *P. viridiflava* mozgásához. Az *mviN_{pv}* mutáns *P. viridiflava* törzsnek a kompatibilis *Arabidopsis thaliana*-ban végzett szaporodás vizsgálatával meghatároztuk a mutáció virulenciára gyakorolt hatását. Ez a vizsgálat azt mutatta, hogy a mutáns a mozgás képességének elvesztése miatt nem volt képes az *A. thaliana* levelek természetes inváziójára, ezzel szemben a mutáns *in planta* kolonizációjának és a betegség kialakításának képessége, valamint a kiváltott tünetek és a tünetek kifejlődéséhez szükséges idő változatlan maradt.

Az izolált promóterek *in planta* kifejeződés dinamikájának meghatározása

Az izolált promóterek *in planta* aktivációját az Ivi-mutánsokból a GFP riporterfehérje által kibocsátott zöld fluoreszcens fény intenzitásának mérésével határoztuk meg, paprika fertőzése után. Az eredmények azt mutatták, hogy néhány izolált promóternek (pl. az *mviN_{pv}* promóterének) komplett bakteriológiai tápoldatban is van alap aktivitása, amely azonban induktív tényezők között (pl. *in planta*) képes megnövekedni. Ezzel együtt, a promóterek többsége növényen kívül nem mutatott aktivitást.

fúzió helyett transzkripciós fúzió alakuljon ki, ellenkező esetben ugyanis feladatuk ellátására képtelen fúziós fehérjék alakulhatnak ki.



1. ábra.

A pIviGK fizikai térképe. Az *NcoI*, *XbaI* és *SpeI* restrikciós helyeket tartalmazó MCS (multiple cloning site, klónozóhely) és az azt két oldalról szegélyező *PacI* ritkán hasító endonukleáz felismerő hely, valamint a pUC/M13 szekvenáló primerek komplementer szekvenciái a felső, kiemelt keretben láthatók. A *BglII* és *KpnI* helyeket a szintetikus DNS szekvencia pGP704 plazmidba építéséhez használtuk.

A TIS (transzlációt indító szekvencia) a jobb oldali keretben van kiemelve. A három leolvasási keretben lévő transzlációs stop kodon mindkét riportergén (*gfp* és *kmS/R*, utóbbi az *aphA3* promóter mentes származéka) előtt aláhúzással van jelölve.

A pIviGK plazmidban szereplő π replikációs fehérjétől függő („suicide”) replikációs origó (*oriV*) és konjugatív transzfer origó (*oriT*) a pGP704-ből megmaradt tulajdonságok.

A TIS (transzlációt indító szekvencia) transzlációbeli hatékonyságának igazolása

A mini-Tn5Km transzpozon olyan származékait készítettük el, melyek tartalmazták a különböző transzlációt erősítő szekvenciákkal

és a P_{BAD} promóterrel fúzionált *gfp* riportergént. E promóter D-arabinóztól függő módon szabályozta a *gfp* kifejeződését. Az új TIS translációt erősítő szekvencia translációra gyakorolt hatását *E. coli* transzpozon mutagenézise után, egykópiás rendszerben, a GFP fluorometriás mérésével határoztuk meg. A P_{BAD} promóter indukcióját követő első 8 órában az új mesterséges TIS szekvencia az *atpE* translációt erősítő szekvenciához képest másfélszeres mértékben megnövelte a GFP translációját.

Az IVET fúziós könyvtár készítése és az *in vivo* antibiotikus szelekció kidolgozása

Meghatároztuk a restriktív endonukleázzal hasított *P. viridiflava* genom DNS azon molekula mérettartományát, melyben a pIviGK-plazmiddal kimutatható legtöbb konstitutívan kifejeződő promóter van. Promóter kereső könyvtárát készítettünk *E. coli*-ban, a *P. viridiflava* restriktív endonukleázzal hasított 2-3 kbp méretű genom DNS fragmensei és a pIviGK plazmid részleges feltöltésével. Southern hibridizációval igazoltuk, hogy az elkészített génekönyvtár teljes körű volt az általa képviselt genom frakcióban.

Egy továbbfejlesztett háromszülős keresztezéssel a génekönyvtárát *P. viridiflava*-ba juttattuk, ahol az inszertet tartalmazó pIviGK plazmidok homológ rekombináció útján integrálódtak a baktérium genomjába.

A promóter kereső génekönyvtárát alkotó *P. viridiflava* baktérium pool-al zöldpaprikagyűrűket fertőztünk vákuum alatt, majd

kanamycin oldattal infiltráltuk azokat. Az *in vivo* szelekciót a fertőzés után 10-12 óra alatt bonyolítottuk le.

Az elsősorban a fertőzés alatt kifejeződő baktériumgén izolálása

A pIviGK és a hozzá kapcsolódó antibiotikus szelekciós módszer kipróbálása 132 *in vivo* kanamycinnel szelektált baktériumtelep elkülönítését eredményezte. Az izolált klónok közül meghatároztuk 10 *ivi*-fúzió nukleotid sorrendjét, ezek között hét olyan nyitott leolvasási keretet (ORF, open reading frame) azonosítottunk, melyek ismert feladatot ellátó terméket kódolnak. A fehérje homológiák keresése rámutatott arra, hogy az izolált ORF-ek által kódolt fehérjék befolyással lehetnek a *P. viridiflava* kórokozó képességére olyan feladatok révén, melyek részt vesznek a fertőzésben, kolonizálásban és a tünetek kialakításában. Az egyik izolált ORF a *P. viridiflava* pektát liáz enzimét kódolja, amely a gyümölcsök és zöldségek lágyrothadásos betegségében a növényi sejtfal fő komponensét, a pektint bontja. Egy másik azonosított ORF a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 MviN membrán fehérjéjével 100% aminosav homológiát mutató fehérjét kódol. A *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 génjeivel homológ egyéb izolált ORF-ek a *P. viridiflava* kórokozó képességének néhány kevésbé meghatározó elemét kódolják. Ezek közé tartozik a deoxiguanozin-trifoszfát trifoszfahidroláz (dGTPáz, EC 3.1.5.1), egy ABC transzportert (ATP kötő/permeáz fehérjét) és egy K⁺-függő Na⁺/Ca²⁺ cserével kapcsolatos fehérjét kódoló ORF.