



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

Doktori értekezés tézisei

Czelleng Arnold

MTA Növényvédelmi Kutatóintézet  
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 14<sup>th</sup> 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. 7<sup>th</sup> 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 transzkripciós 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 $\alpha$ / $\lambda$  pir, *E. coli* S17.1 és *E. coli* HB101. A szelekcióhoz használt antibiotikumok: 50  $\mu$ g/ml rifampicin, 10  $\mu$ g/ml gentamicin és 50  $\mu$ 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*I) 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associated reactions of tobacco leaves after infiltration with different *hrp/hrmA* mutant of *P. syringae* pv. *syringae* 61. In: Proceedings of the 10<sup>th</sup> 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 10<sup>th</sup> 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*. 11<sup>th</sup> 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. 7<sup>th</sup> 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* riportergén 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* génkazettához, eredményként a pBKS:gfp-gmS/R és pBKS:gfp-kmS/R plazmidokat kaptuk. A riportergén 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. 10<sup>4</sup>) *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  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

10<sup>4</sup> telepből 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) spektrofluorometerrel 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<sub>pv</sub>-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 szövetei közé, nem észleltünk különbséget azok virulenciáját illetően. Ezek a vizsgálatok jelezték első ízben, hogy az *mviN* a növénykórokozó baktériumok egy virulencia faktora. Az *mviN*<sub>pv</sub> *in planta* kifejeződését a vele együtt kifejeződő *gfp* riportergén vizsgálatával követtük. Ezek szerint, az *mviN*<sub>pv</sub> 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<sub>pv</sub>*-re nézve funkcióvesztett PV-dm mutáns *P. viridiflava* készítése

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

### A TIS (transzlációt indító szekvencia) elemzése a hozzá kapcsolt P<sub>BAD</sub> promóter indukciója révén

A D-arabinózzal indukálható P<sub>BAD</sub> 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.

Ezen 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<sub>pv</sub>*, amelyik a *P. viridiflava* egy feltételezett membránhoz kapcsolt virulencia faktorát kódolja.
6. Az *MviN<sub>pv</sub>* 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 gazdanövényt.



### Az MviN<sub>pv</sub> fenotípusos elemzése

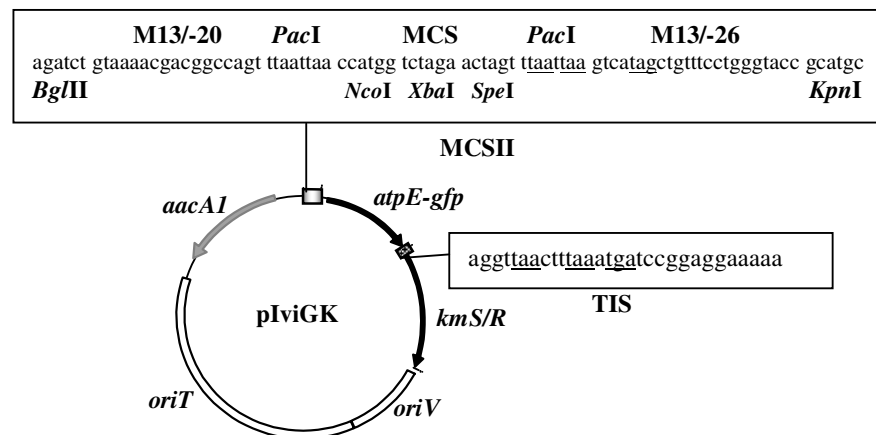
Az MviN<sub>pv</sub> lehetséges feladatának meghatározásához az *mviN<sub>pv</sub>* génre nézve funkcióját vesztett mutánst állítottunk elő.

A lágyagaron végzett motilitás teszt alapján az MviN<sub>pv</sub> fehérje szükséges a *P. viridiflava* mozgásához. Az *mviN<sub>pv</sub>* 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<sub>pv</sub>* 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 szekvenál 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  $\pi$  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* genomi DNS azon molekula mérettartományát, melyben a pIviGK-plazmiddal kimutatható legtöbb konstitutívan kifejeződő promóter van. Promóter kereső könyvtárat készítettünk *E. coli*-ban, a *P. viridiflava* restriktív endonukleázzal hasított 2-3 kbp méretű genomi DNS fragmensei és a pIviGK plazmid részleges feltöltésével. Southern hibridizációval igazoltuk, hogy az elkészített génkönyvtár teljes körű volt az általa képviselt genomi frakcióban.

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

A promóter kereső génkönyvtárat 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  $Na^+/Ca^{2+}$  cserével kapcsolatos fehérjét kódoló ORF.