SZENT ISTVÁN EGYETEM

NÖVÉNYKÓROKOZÓ *PSEUDOMONAS*OK VIRULENCIA/PATOGENITÁS GÉNJEINEK IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE

Doktori értekezés

Készítette: Czelleng Arnold

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete
Budapest, 2005

A doktori iskola

megnevezése: Biológiai

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

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

....

Az iskolavezető jóváhagyása A témavezető jóváhagyása

Rékinek, Pankának

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 6

1. BEVEZETÉS 7

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

2.1 A növények védekező rendszerei 8
2.1.1. Preformált állandó rezisztencia 9
2.1.2. Indukált általános, nem specifikus, tünetmentes, alap rezisztencia 9
2.1.3. Indukált nem fajta specifikus hiperszenzitív rezisztencia, nem-gazda rezisztencia 10
2.1.4. Indukált fajta specifikus hiperszenzitív rezisztencia 11
2.2 A kórokozók gazda specifitásának genetikai háttere, a gazdanövénykört befolyásoló tényezők 12
2.3 A gén génnel szemben elmélet 12
2.4 A III. típusú fehérje szekréciós rendszer 14
2.5 A *hrp* gének 15
2.6 Az extracelluláris Hrp proteinek 16
2.7 Az Avr proteinek és szerepük a gazda-kórokozó kölcsönhatásban 17
2.8 A *hrp* és *avr* gének szabályozása 19
2.9 Virulencia faktorok 20
2.10 A kórokozás genetikájának vizsgálati módszerei 21
2.10.1 *In vivo* expression technology 22

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 26

3.1 Baktériumtörzsek és plazmidok 26
3.2 Felhasznált oligonukleotidok 27
3.3 Anyagok és forrásaik 27
3.4 Táptalajok, tápoldatok 27
3.4.1 *E. coli* tenyésztéséhez, szaporításához használt táptalajok és tápoldatok 27
3.4.2 *Pseudomonas* törzsek tenyésztéséhez, szaporításához használt tápoldatok, táptalajok 27
3.5 Módszerek 28
3.5.1 Baktérium törzsek fenntartása és szaporítása 28
3.5.2 Rekombináns DNS technikák 28
3.5.3 A konjugáció kivitelezése, háromszülős keresztezés 29
3.5.4 Promóter kereső (IVET) génkönyvtár előállítása 30
3.5.5 Zöldpaprikatermés fertőzése 30
3.5.6 *In vivo* szelekció 30
3.5.7 Az *ivi*-gének konjugatív klónozása és bázisösszetételük vizsgálata 31
3.5.8 *Arabidopsis* fertőzése és a baktériumok szaporodásának mérése 31
3.5.9 Az *ivi*-gének kifejeződés-dinamikájának mérése fluoreszcens spektroszkópiával 31
3.5.10 Az *ivi*-gének kifejeződésének vizsgálata minimál táptalajon 32
3.5.11 TIS vizsgálata P_{BAD} indukcióval 32

4. EREDMÉNYEK 33

4.1 Promóter kereső IVET plazmidok (pIviGK, pIviGG és pIviGKIII) készítése 33
4.1.1 Riportergének előállítása 33
4.1.2 TIS hatékonyság igazolása 35
4.1.3 MCSII szintézise 38
4.1.4 pIviGK és pIviGG összeállítása 38

4.1.5 pIviGKIII készítése ... 40
4.2 pIviGK alkalmazása ... 40
4.2.1 Promóter kereső génkönyvtár készítése ... 40
4.2.2 Paprikatermés fertőzési eljárásának kidolgozása ... 44
4.3 *In planta* indukálódó gének ... 46
4.3.1 IviPV-s1/1: dGTPáz ... 48
4.3.2 IviPV-s1/2: ABC transzporter ... 48
4.3.3 IviPv-s1/3: szerin érzékelő receptor fehérje ... 48
4.3.4 IviPV-s1/4: DmpE ... 49
4.3.5 IviPV-s1/5: Na^+/Ca^{2+} antiporter fehérje ... 49
4.3.6 IviPV-s1/6: $MviN_{pv}$ ... 49
4.3.7 IviPV-s1/7 és IviPV-s1/8: Pel ... 50
4.4 Abiotikus stressz által szabályozott promóterek ... 50
4.4.1 Riportergén kifejezése minimál táptalajon ... 51
4.4.2 Az *mviN*$_{pv}$ promóterének in silico elemzése ... 52
4.5 Fluoreszcencia vizsgálatok ... 53
4.5.1 *ivi*-promóterek *in vivo* elemzése: génkifejeződés vizsgálata epifluoreszcens mikroszkópiával ... 54
4.5.2 *ivi*-promóterek *in vivo* elemzése: génkifejeződés dinamikájának meghatározása spektrofluorometerrel ... 55
4.6 Az $MviN_{pv}$ funkcionális elemzése ... 56
4.6.1 Funkció-vesztett mutáns készítése ... 56
4.6.2 A funkció-vesztett mutáns *in vitro* és *in vivo* vizsgálata ... 57
4.7 Új tudományos eredmények ... 60

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA ... 61

5.1 Új promóter kereső plazmidok ... 62
5.2 Izolált *ivi*-gének ... 66

6. ÖSSZEFOGLALÁS ... 71

SUMMARY ... 72

7. MELLÉKLETEK ... 73

7.1 Irodalomjegyzék ... 73
7.2 DNS nukleotid sorrendek ... 87

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ... 94

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

atpE	Adenozin-trifoszfát szintáz E alegysége
avr	avirulencia gén
Avr	avirulencia fehérje
bp	bázispár
c-AMP	ciklikus-adenozin-monofoszfát
cfu	colony forming unit (telepképző egység)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (borjúbél alkalikus foszfatáz)
gfp	„Green Fluorescent Protein”-t (zöld fluoreszcens fehérjét) kódoló gén
GFP	Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
Gm	Gentamicin
HR	Hiperszenzitív Reakció
hrp	„hiperszenzitív reakció és patogenitás” gének
IC	Intercellular (sejtközötti)
IVET	*In Vivo* Expression Technology (*in vivo* kifejeződés módszer)
KB	King’s Broth (King táptalaja)
kbp	Kilobázispár
Km	Kanamycin
LB	Luria Broth (Luria táptalaj)
LPS	Lipopoliszacharid
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (mitogén által aktivált protein kináz)
MCS	Multiple Cloning Site (klónozóhely)
NCAIM	National Collection of Agriculturally Important Microorganisms (Agronómiailag Fontos Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye)
ORF	Open Reading Frame (nyitott leolvasási keret)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns (kórokozóhoz kötött molekuláris mintázat)
P_{BAD}	arabinózzal indukálható araBAD promóter
PCD	Programmed Cell Death (programozott sejthalál)
PIP-box	Plant Inducible Promoter box (növény által indukált promóter boksz)
pir	π fehérje génje
PR fehérjék	„Pathogenesis Related” (kófolyamattal kapcsolatos) fehérjék
pv.	patovarietas (kórtani csoport)
R	növényi rezisztencia gén
RBS	Ribosome Binding Site (riboszóma kötőhely)
Rf	Rifampicin
ROS	Reactive Oxigen Species (reaktív oxigén formák)
rpm	runs per minute (percenkénti fordulatszám)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase (rák alkalikus foszfatáz)
SAR	Systemic Aquired Resistance
SOD	Superoxid Dismutase (szuperoxid dizmutáz)
TIS	Transzlációt Indító Szekvencia
Tn	Transzpozon
TPS	Translation-initiation Promoting Site (transzláció-indítást kezdeményező hely)
TTSS	Type III Secretion System (hármas típusú kiválasztó rendszer)
UV	Ultraviolet (ultraibolya)

1. BEVEZETÉS

Gazdasági növényeinket rendszeresen károsítják a különböző kórokozó mikrobák: vírusok, baktériumok, gombák. Amellett, hogy a vírusos és baktériumos betegségek kezelésére nincsenek forgalomban valóban hatásos növényvédő szerek, az agrotechnikában alkalmazott vegyszerek környezetkárosító hatása használatuk csökkentését kívánja meg. Ezek miatt a kórokozókra rezisztens növények előállítása, nemesítése fontos, szinte az egyedüli útja lehet a hatásos védekezésnek. A kórokozó virulenciájának és a gazda rezisztenciájának molekuláris biológiai szinten történő megismerése nemcsak, hogy a növényi immunitás kutatások érdekes tárgyát képzik, de e tulajdonságok jobb megismerése egyúttal a betegség rezisztencia fejlesztését szolgáló molekuláris stratégiák (Morgues et al. 1998) tervezését is eredményezhetik.

Molekuláris genetikai módszerrel megközelítve – kórokozás során aktiválódó baktériumgének izolálásával – alapvető információkat nyerhetünk a kórokozó stratégiájáról, a növényi fogékonyság és ellenállóság okairól. A növénykórokozó baktériumok kórokozó képességének genetikai vizsgálata az 1980-as évek közepén vette kezdetét (Niepold et al., 1985) és napjainkban is folyik. Általában a rekombináns DNS technikával készített mutáns baktériumokkal történő fertőzési kísérletekben a betegségtünetek elmaradása, illetve a növényi ellenállás (HR, hiperszenzitív reakció, Klement et al., 1964) megjelenése vagy éppen annak elmaradása alapján történik a kórokozásban résztvevő baktériumgének kiválogatása. Érdekes módon csak az elmúlt években kerültek alkalmazásba azok a módszerek, melyek a baktérium géneket ennél teljesebb körben teszik vizsgálhatóvá, azok környezettől függő kifejeződése alapján (Shelburne és Musser, 2004, Chiang et al., 1999).

A növénykórokozó baktériumok kórokozó képességének genetikai tanulmányozása gyakran ütközik akadályokba olyan gének azonosításánál, melyek elsősorban a növényekkel alkotott kölcsönhatásuk során aktiválódnak. Az „*In Vivo* Expression Technology" (IVET, Mahan et al., 1993) egy olyan genetikai vizsgálati módszer, amelynek növénykórtanbeli felhasználását csak az elmúlt évek eredményei tükrözik (Preston et al., 2001, Brown és Collmer, 2004). A fentiek miatt célul tűztem ki az IVET módszerhez a baktériumok széles körében alkalmazható genetikai rendszer kidolgozását, valamint annak felhasználását a kompatibilis kórokozó baktérium betegségokozó képességével összefüggő génjeinek azonosításához. A cél megvalósításához a zöldpaprikatermés – *Pseudomonas viridiflava* modellrendszert (Klement, 1956) választottuk

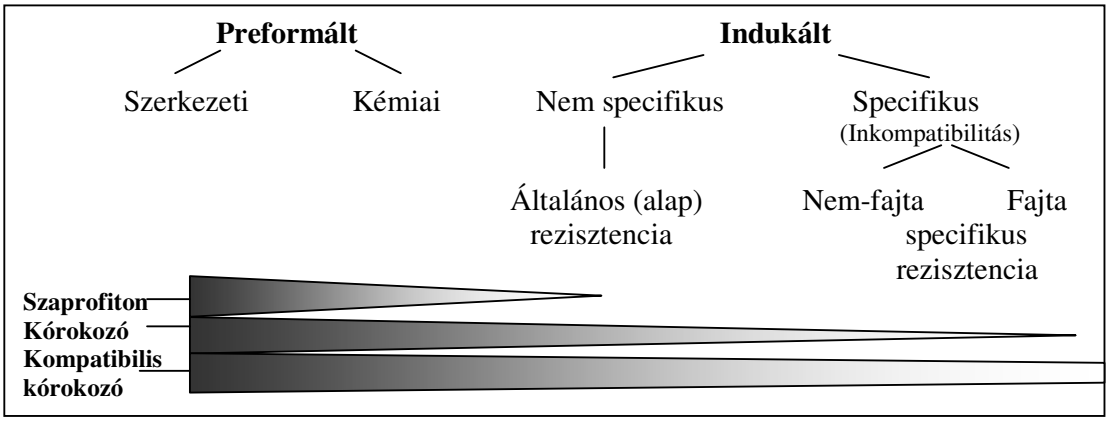
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A növények védekező rendszerei

A természetben a növények általában egészségesek, vagyis a betegség kifejlődése inkább a kivétel, mint a szabály. Mi van ennek a látszólag egyszerű kijelentésnek a hátterében?

Az összes élőlény, így a növények is folytonosan különböző kórokozók lehetséges támadásának vannak kitéve. A körülbelül 450 millió éves evolúciójuk során a növények különböző passzív és aktív védekező rendszereket fejlesztettek ki, amelyekkel képesek elkerülni a legtöbb fertőzést (Woods, 2000). A XX. század elején Chester (1933) írta le először a növényeknek a fertőzéssel szembeni ellenálló képességét, a betegség utáni regenerációját és ezt a „vakcinálást" követő újbóli fertőzés sikeres elkerülését.

Bár a növények védekező rendszerein kevés kórokozó jut át, növénykórokozó mikrobák mégis vannak. Jellemző rájuk viszont a szűk gazdakör. Gyakran egy-egy kórokozó csak a gazdanövények egy nemzetségét képes megfertőzni, a többi lehetséges gazdanövényben az úgynevezett általános, nem specifikus, tünetmentes, alap rezisztencia (Heath, 2001, Thordal-Christensen, 2003) következtében képtelen betegséget kialakítani. Ez az általános rezisztencia biztosítja azt, hogy a növény szövetei által nyújtott gazdag tápanyagforrást a legtöbb mikroorganizmus nem tudja kiaknázni. Amelyek mégis képesek áttörni e védelmi vonalakat, azok olyan kórokozók, amelyek gazdakörét tovább szűkíti a specifikus rezisztencia (Thompson és Burbon, 1992), amely a kórokozó gomba/ baktérium - növény kölcsönhatást egészen a rassz/patovarietas-cultivarietas/fajta mélységéig juttatja (1. ábra).



1. ábra

A növények védekezési reakciói és az azokat áttörő baktériumok szűkülő faji spektrumai.

A védekezés rendszerét bonyolítja, hogy a növény helyi illetve szisztemizált (SAR, systemic aquired resistance, Schneider et al., 1996) reakciót fejt ki a fertőzés következtében, illetve,

hogy ez a válasz időben mikor jelentkezik és meddig tart? A fenti védekezési formák mögött olyan fizikai és kémiai védelmi vonalak állnak, amelyek állandó és induktív elemei bonyolult rendszert alkotnak.

2.1.1. Preformált állandó rezisztencia

Az általános rezisztencia állandó szerkezeti (fizikai) komponensei a kórokozók bejutását akadályozzák meg. Ilyenek a levelek nedvességfilm keletkezését megakadályozó állása, a szűk légcsere nyílások, a viaszos kutikula, vagy a növényi sejtfal (Cassab és Varner, 1988). Az általános védekező rendszer állandó kémiai elemei a vegyületek széles körét ölelik fel (Dennis et al., 1997). Közéjük tartoznak különböző terpenoidok, cianogén glükozidok, fenol vegyületek (kumarinok, flavonoidok, tanninok, ligninek), alkaloidok és peptidek illetve fehérjék (pl. defenzinek), melyek nemcsak antimikrobiális hatást fejtenek ki, de a vírus vektor ízeltlábúak ellen is hatékony védelmet biztosítanak (Bell, 1981).

2.1.2. Indukált általános, nem specifikus, tünetmentes, alap rezisztencia

Az előbbi állandó védekezési rendszereken átjutó kórokozók úgynevezett általános elicitoraikkal további, immáron induktív fizikai és kémiai, de még mindig általános védekezési válaszokat váltanak ki a növényből (Ellis et al., 2000). Az általános elicitorok a kórokozók és nem –kórokozók olyan, általában, de nem kizárólagosan (Felix és Boller, 2003) felületi molekulái (epotópjai), illetve képletei, együttesen az úgynevezett „patogénhez-kötött molekuláris mintázatok” (PAMP, pathogen-asszociated molecular patterns, Parker, 2003), melyeket a növény felismer és amelyek helyi védekezési reakciókat váltanak ki. Ilyen nem specifikus elicitor például a baktériumok flagellumának építőeleme, a flagellin (Felix, 1999), vagy a kórokozó sejtfalának hidrolíziséből származó oligomerek (kitin, glukán, Tarchevsky, 2001) illetve a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid burka (LPS, DeWilt, 1997). Ezeket a nem specifikus elicitorokat a növénysejt különböző felületi receptorai érzékelik, mint amilyen például a flagellint érzékelő FLS2 (Bauer et al., 2001). A jelfogást követő szignál transzdukció folyamán egyrészt mitogén aktivált fehérje kináz (MAPK, mitogen activated protein kinase, Ligterink és Hirt, 2001) foszforilációs kaszkádja aktiválódik, amely védekezési géneket aktiváló transzkripciós faktorokat indukál. A jeltovábbítás másik útvonala mentén szintén foszforilációval aktiválódnak különböző ion csatornák (pl. kalcium csatorna), illetve NADPH oxidáz komplex, amely szuperoxid dizmutázzal (SOD) együtt H_2O_2 felszabadulást eredményez (Gómez-Gómez és Boller, 2002). A beáramló Ca^{2+} és a keletkező H_2O_2 (Laloi, 2004) a jázmonsavval (Reymond et al., 2000), etilénnel (Sivasankar et al., 2000) és szalicilsavval (Delaney et al., 1994, Lu et al., 2001) együtt másodlagos jelátvivő szerepűek.

Mindezek – egymással hálózatos szabályozási rendszert alkotva - egyrészt a növény szerkezeti, másrészt a kémiai védekező elemeinek indukcióját eredményezik. Példa az indukált szerkezeti változásokra a növényi sejtfal megerősödései, a papillák képzése a kórokozó baktérium-növénysejt kapcsolatának helyén (Ott et al., 1998).

Az általános elicitorok az indukált kémiai védekezés sokrétű formáját váltják ki, ezek közé tartozik a sejtmembránban helyileg (Bozsó et al., 1999) és szisztemizáltan történő oxidatív robbanás (Bell és Charlwood, 1980), mely során H_2O_2 mellett szuperoxid szabadgyökök szabadulnak fel. Ezek a reaktív oxigén fajták (ROS, reactive oxigen species) egyrészt közvetlenül károsítják a kórokozókat, másrészt keresztkötések kialakításával erősítik a növényi sejtfalat (Imlay, 2003), illetve jelátvivő szerepük is van. A jelátvivő molekulák hatására egyéb kórokozással összefüggő rezisztenciát adó faktorokat kódoló gének aktiválódnak, melyek termékei pl. az ún. „pathogenesis related" (PR) fehérjék (Ryals et al., 1994), a sejtfalbontást végző 1,3-β-glükanáz, illetve endokitinázok; továbbá proteináz inhibitorok, RN-ázok, α-amiláz, poligalakturonáz. A nem enzimatikus hatású vegyületek döntően növényi defenzinek (Kitajima és Sato, 1999). Az általános, indukált kémiai védekezés egyéb helyi és szisztemizált szereplői közé tartoznak a több, mint 300 féle eltérő szerkezetű kis molekulatömegű vegyületek, a fitoallexinek, amelyek antibiotikus hatásukon túl egyéb védekezési reakciók megindításáért is felelősek lehetnek (Hammerschmidt, 1999). A szaponinok, tanninok, alkaloidok, nitrogén-oxid (NO), flavonoidok szintén az indukált helyi és szisztemizált kémiai védekezés vegyületei (Bell és Charlwood, 1980, Schneider et al., 1996). Érdekes, hogy néhány növény, mint amilyen a dohány is, illékony metil-szalicilát kibocsátással a környezetében lévő fajtársait felkészíti a növénykórokozók „támadására" (Shualev et al., 1997). A helyi védekezési válaszokkal párhuzamosan a növényben indukált szisztemikus - vagyis hosszantartó, és nem csak az indukáló kórokozó által fertőzött szövetekben jelentkező - válaszban a helyi védekezési reakcióban résztvevőkhöz hasonló, elsősorban enzimatikus tulajdonságú fehérjék vesznek részt, mint a glükanázok, kitinázok, RNázok.

2.1.3. Indukált nem fajta specifikus hiperszenzitív rezisztencia, nem-gazda rezisztencia

Azok a kórokozók, amelyek sikeresen elkerülték vagy letörték a növény fenti védekezési reakcióit - így tehát képesek voltak bejutni a szövetekbe és ott megfelelő mennyiségű tápanyaghoz jutottak - képesek lennének elszaporodni és a betegség tüneteit kiváltani. Ez azonban további akadályokba ütközik.

A helyi indukált védekezés legszembeötlőbb megjelenési formája a megtámadott növénysejtek gyors lefutású programozott sejthalála (PCD, programmed cell death), a

hiperszenzitív reakció (HR), mely a kórokozó és a fertőzött növénysejtek halálát okozza, ezzel megakadályozza a fertőzés továbbterjedését (Greenberg, 1996). Noha a HR alapú PCD elsősorban a későbbiekben tárgyalásra kerülő indukált fajta specifikus védekezési reakció jellemzője, mégis a kórokozókra jellemző olyan általános faktorok is kiválthatják, mint amilyen a harpin (He et al., 1993, Lee et al., 2001).

A növényi sejtek többszörös jelek fogását lehetővé tevő rendszerekkel rendelkeznek, például az *Arabidopsis* és a dohány érzékeli a *Pseudomonas syringae* harpinjait (Lee et al., 2001, Desikan et al., 1999) illetve flagellinjét (Bauer et al., 2001), míg a paradicsom a gombák kitinjét és glikopeptidjeit (Boller, 1995). Mégis ahogy a PAMP-ek, úgy a harpin esetében is érvényes az, hogy nem minden növény reagál egyformán minden elicitorra. Ugyanakkor a kórokozók bizonyos avirulencia génjeinek (*avr*) termékei (részletezve alább), melyek a gazda-kórokozó koevolúciójának vélhetően régebbi elemei, a nem-gazda növényekben rezisztencia gének *(R)* termékei által felismerésre kerülnek és hiperszenzitív reakciót váltanak ki. Baktérium kórokozók esetében ilyen nem-gazda *avr* géneket leírtak *Xanthomonas campestris*-nek babbal alkotott kölcsönhatásában (Whalen et al., 1988), valamint *Pseudomonas syringae* esetében is, annak szója (Kobayashi et al., 1989), borsó (Wood et al., 1994), bab (Dangl et al, 1992) és *Arabidopsis* (Grant et al, 1995) növényekkel való kapcsolatában. Mivel a növények részben hasonló módon ismerik fel a nem-fajta- és a fajta specifikus inkompatibilis kórokozókat, így az ellenük történő védekezés is – legalább részben - hasonló. Ezért nehéz különbséget tenni az eltérő kölcsönhatásokra jellemző védekezési formák között. A fejezet legelső mondatának magyarázatát éppen a kórokozók itt bemutatott nem-gazda *avr* génjeinek jelenlétében lehet megtalálni, ha ugyanis egy kórokozó egy vagy több nem-gazda Avr fehérjéjét egy növényfaj minden fajtája (genotípusa) felismeri, akkor a kórokozónak e növényfaj egésze nem-gazdája lesz.

2.1.4. Indukált fajta specifikus hiperszenzitív rezisztencia

Az előbbiekben tárgyalt védekezési rendszerek hatására szűkülő kórokozók körét most már a növény-kórokozó, fajta-patovarietas szintjéig elmélyítő indukált fajta specifikus, hiperszenzitív védekezési válasz csökkenti. A következőkben tárgyalásra kerülő „gén génnel szemben” kölcsönhatás alapján működő HR éppen azért képes leszűkíteni a kórokozók gazdakörét, mert azok növényekkel történő koevolúciója során felhalmozott több tucat *avr* génje közül elég, ha csak egy is felismerésre kerül a gazdanövény *R* génjei által.

2.2 A kórokozók gazda specifitásának genetikai háttere, a gazdanövénykört befolyásoló tényezők

A növénykórokozó baktériumoknak tehát speciális gazdakörük van, amely gyakran korlátozódik egyes növényfajtákra, fajokra vagy nemzetségekre. A szűk gazdakör oka a kórokozó részéről az avirulencia génekben, illetve ezek termékeiben található. A növényi védekezés szempontjából tehát, a mikrobák avirulencia (*avr*) génjei olyan termékeket kódolnak, amelyek alapján a növény felismeri a betolakodót, és védekezési reakciót indít ellene. Ennek ellenére az *avr* gének által kódolt fehérjék eredeti szerepük szerint közvetve vagy közvetlenül a kórokozásban vesznek részt (Keen, 1990).

A gazdanövények spektrumának meghatározójaként az avirulencia faktorok mellett kisebb jelentőséggel bírnak a kórokozásért felelős egyéb gének, melyek termékei képessé teszik a kórokozót a tünetek közvetlen előidézésére, és a növény megbetegítésére. Ezeket virulencia faktoroknak nevezzük (Gross, 1991). A virulencia gének termékei lehetnek például: fitotoxinok, pektinbontó enzimek vagy extracelluláris proteázok. Ezeknek a faktoroknak az allelikus változatossága és multiplicitása lehetővé teszi a baktériumok számára, hogy tolerálják a virulencia gének némelyikének mutációját anélkül, hogy számottevően veszítenének kórokozó képességükből. Így az egyes virulencia gének mutációja és esetleges funkcióvesztése általában vagy a tünetek megváltozását okozza, vagy csak csökkenti, de nem szünteti meg a kórokozó képességet. Ennek példája a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-esetében a Tab toxint kódoló gén, melynek mutációja következtében megváltozik a betegség tünete, ami abban nyilvánul meg, hogy a toxin hiányában nem alakul ki klorotikus udvar a fertőzött növényen (Gross, 1991), de a mutáns baktérium kórokozó képessége megmarad.

Csak kevés olyan virulencia faktort ismerünk, amely valóban nélkülözhetetlen a kórokozásban. Egy ilyen például a *Xanthomonas citri pthA* génje, melynek mutációja a virulencia teljes elvesztését eredményezte (Swarup et al.,1991).

2.3 A gén génnel szemben elmélet

A gazdanövény és a kórokozó genetikai kölcsönhatását a „gene for gene” elmélet (gén génnel szemben), Flor 1955-ös modellje magyarázza. Újabban „*avr* for *R*” néven is említik a rendszert. A faj, illetve fajta specifitást meghatározó kölcsönhatás elméletét a kórokozás jelenségének modellezésére dolgozták ki (Ellingboe, 1982). A patogenitás a kórokozó megfelelő avirulencia (*avr*) és a növény rezisztencia (*R*) génjeinek kölcsönhatásával magyarázható. Flor (1955) a len és a *Melampsora lini* rozsdagomba közötti kölcsönhatást kutatta. Ellingboe a “mágikus négyzet” segítségével ábrázolta a kompatibilitás

és inkompatibilitás viszonyait (1. táblázat); a gazda specifitás alapjának a géntermékek közötti közvetlen kölcsönhatást tekintette.

1. Táblázat; Gén génnel szemben elmélet

A patogén genotípusa	A gazda genotípusa	
	RR/ Rr	rr
avr^+	-	+
avr^-	+	+

Jelmagyarázat: + a betegség kialakulása
- hiperszenzitív reakció

Az avirulencia és a rezisztencia gén kölcsönhatása válaszreakciók láncolatát váltja ki a növényben. E reakciók eredményezik a lokalizált sejthalált a megtámadott szövetekben (hiperszenzitív reakció-HR; Klement, 1982), megelőzve a patogének továbbterjedését a növényben és ezáltal a betegség kialakulását. Ha a komplementer génpár tagjai közül az egyik vagy mindkettő hiányzik (akár a gazda, akár a kórokozó részéről), a növény képtelen kórokozóként azonosítani a baktériumot, nem következik be a HR és kialakul a betegség, ez a fogékony reakció, a kompatibilis kapcsolat. A hiperszenzitív reakcióval szemben a kompatibilis kapcsolat magába foglalja a baktérium szaporodását a gazdában, továbbterjedését a környező szövetekbe, a makroszkópikus tünetek kialakulását, valamint a betegség karakterisztikus megjelenését. Mivel a rezisztencia és az avirulencia dominánsan öröklődik, a legtöbb növény-mikroba kapcsolat inkompatibilis lesz akkor is, ha a négyzet alapján a kölcsönhatásnak ez az esete csak egyféle úton vezethető le (Collmer, 1996).

Az „*avr* for *R*" kölcsönhatást hagyományosan a „receptor-ligand" modellel értelmezték, ami a két géntermék közvetlen kapcsolatát feltételezi (Gabriel és Rolfe, 1990).

A „heterodimer modell" szerint az avirulencia gén termékéről azt feltételezték, hogy a gazda rezisztencia génje által kódolt fehérjével konglomerátumot képezve a HR elicitora (Hamm és Glichrist, 1996).

A „guard modell" szerint az *R* gének termékei egy-egy Avr fehérje növénybeli célmolekuláját őrzik, vagyis közvetetten érzékelik az Avr fehérjék jelenlétét (Van der Biezen és Jones, 1998).

A fitopatogén baktérium szempontjából az avirulencia gének látszólag hátrányosak, mivel lehetővé teszik a lehetséges gazdanövény számára a kórokozó felismerését és az ellene való védekezést. Ez a nyilvánvaló szerepük vezetett leírásukhoz és izolálásukhoz. Természetesen emellett egyéb funkciókat is betöltenek, melyek viszont előnyt biztosítanak a patogenezisben, ellensúlyozva a koevolúció során kialakult hátrányos hatást (Collmer, 1996).

Néhány avirulencia génről bebizonyították, hogy szelekciós előnyt jelentenek a baktériumoknak (Dangl, 1994). A *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* baktérium tartalmazza a kromoszómán lokalizált *avrBs2* gént (Minsavage et al., 1990). Ennek a génnek a mutációja nemcsak az avirulencia elvesztésével járt, de csökkentette a patogén agresszivitását is, ami a kórokozó gazdanövénybeli szaporodási rátájának csökkenésében mutatkozott meg. A *X. campestris* pv. *alfalfae* homológ génjének mutációja hasonló eredménnyel járt, ezzel mindkét patovarietas esetében meggyőzően bizonyítva e gén fontosságát a baktérium növénybeni fitnesse szempontjából (Kearney és Staskawicz, 1990).

A baktériumok avirulencia génjeivel szemben a növény rezisztenciával kapcsolatos génjei védelmi funkciók kialakításáért felelős faktorokat, és védő anyagokat örökítenek: fitoalexineket, PR fehérjéket, hidroxiprolinban gazdag glikoproteineket (Stinzi et al., 1993). A gazdanövény védekező mechanizmusainak legyőzése és a kompatibilitás elérésének képessége adja a kórokozók specificitását. A kompatibilitás esetében tehát egy mikrobapopuláció patogén vagy szimbionta módon képes fennmaradni és szaporodni valamely növényfaj egyedeiben (Gabriel és Rolfe, 1990).

2.4 A III. típusú fehérje szekréciós rendszer

A Gram-negatív kórokozó baktériumokban hat eltérő útvonalát azonosították a belső és a külső membránokon keresztül történő fehérjeszekréciónak (Thanassi és Hultgren, 2000). A legbonyolultabb szerkezetű a III. típusú útvonal, melynek feladata, hogy a patogenitással kapcsolatos fehérjéket (Hrp és Avr) közvetlenül a gazdasejtekbe juttassa (Rosquist et al., 1994) az élő növényi sejt sejtfalán és plazmamembránjain keresztül (Alfano és Collmer, 1997).

A III. típusú szekréciós rendszert (TTSS, Type III Secretion System) a *hrp* (hiperszenzitív reakció és patogenitás) gének kódolják. Ez a fehérjeszállító mechanizmus eltér a hagyományos Sec-től függő szekréciós útvonalaktól, illetve az *Agrobacterium* IV. típusú export rendszerétől is (Zhanassi és Hultgren, 2000). A III. típusú fehérje szekréciós rendszer egyaránt előfordul állat-, és növénykórokozó baktériumokban is. Ezt példázza a *Yersinia* ssp. III. típusú fehérjeszekréciós rendszere (Cornelis és Wolf-Watz, 1997). Ezek az állatkórokozók elsődlegesen extracelluláris paraziták, az ún. Yop (Yersinia outer proteins) szekrétumaikat egyenesen a gazdasejtbe juttatják és ahhoz, hogy betegséget okozzanak, „sejt a sejthez" kapcsolatot igényelnek (Cornelis és Wolf-Watz, 1997). A legtöbb növénykórokozó baktériumot az ehhez hasonló gazdasejt kontaktus-függés jellemzi.

Maga a membrán transzlokációs apparátus számos, a flagellum biogenezisnél megismert fehérjével homológ elemet tartalmaz. A III. típusú fehérjeszekréciós rendszeren keresztül

kiválasztott fehérjékről hiányoznak az amino-terminális szignálpeptidek. A kiválasztáshoz az eddigi ismeretek szerint kétféle út vezethet (Thanassi, és Hultgren, 2000, Büttner és Bonas, 2002). Az egyik a kiválasztandó fehérjét kódoló mRNS 5' végén helyet foglaló szekvenciát használja, mely az RNS- riboszóma komplexet a szekréciós pílushoz rögzítve a transzlációt és a szekréciót térben és időben összekapcsolja. A kiválasztás másik lehetősége ún. Syc chaperon-okat alkalmaz, melyek a citoplazmában oldható állapotban tartják a kiválasztandó fehérjéket, illetve a kiválasztó rendszerhez kapcsolják azokat.

2.5 A *hrp* gének

A kórokozás képességét csakúgy, mint a HR kiváltását az ún. *hrp* gének illetve termékeik határozzák meg. Ez érvényes a kórokozók széles körére. A xilemben szaporodókon kívül minden növénykórokozó baktérium az apoplasztot kolonizálja, így az intercelluláris térből (IC, intercellular space) okoz betegségeket a termesztett növények többségén (Alfano és Collmer, 1996). Ezeknek a kórokozóknak a többsége Gram-negatív baktérium az *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* és *Ralstonia* nemzetségekből. Bár ezek a baktériumok taxonómialag és az általuk kiváltott betegségek tekintetében is eltérnek egymástól, valamennyien rendelkeznek *hrp* génekkel.

Az állatpatogén *Yersinia*, *Shigella* és *Salmonella* nemzetségekbe tartozó baktériumokban a III. típusú fehérjeszekréciós rendszer és a *hrp* gének jelentős homológiát mutatnak a növénykórokozó baktériumok megfelelő DNS szekvenciáival. A *Yersinia spp.* genomja kb. 80-95%-os homológia mellett tartalmazza a *hrp* cluster *Pseudomonas,* illetve *Erwinia* genusokban meglevő 9 konzervált génjét (Huang et al.,1995). Ezeknek a géneknek a nevét *hrc*-re módosították (hypersensitive reaction and conserved, Bogdanove et al., 1996).

Az első *hrp* clustereket a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* és a *P. syringae* pv. *phaseolicola*-ban írták le olyan Tn5 transzpozon mutánsok izolálásával, melyek minimál táptalajon a vad típusú törzzsel azonos ütemben szaporodtak, de dohánylevelekbe infiltrálva nem idéztek elő HR-t (Niepold et al., 1985, Lindgren et al., 1986).

A *hrp* gének csoportokba (clusterekbe) rendeződnek, és gyakran előfordul, hogy a hozzájuk kapcsolódó avirulencia gének csoportjaival együtt plazmidokon öröklődnek, illetve horizontális géntranszfer útján szerzett ún. patogenitás szigeteket alkotnak (Hacker és Kaper, 2000; Czelleng, 2005 b.). A patogenitás szigeteket gyakran övezik transzpozon vagy bakteriofág szekvenciák és alacsony guanozin és citozin tartalom jellemzi őket (Lawrence és Roth, 1996; Groisman és Ochmann, 1996).

A növénykórokozó baktériumok *hrp* génclustereinek horizontális átvitelére közvetett utalások vannak, ilyen például, hogy *Ralstonia solanacearum* esetében a *hrp* clustert egy megaplazmid

hordozza (Alfano és Collmer, 1996). Egy másik példa az *Erwinia herbicola* (*Pantoea aggromerans*), mely rendszerint nem okoz betegséget, bár előfordul a növények gyökerein és föld feletti részein is. Az *E. herbicola* pv. *gipsophillae*-ként meghatározott törzsekben –amelyek viszont tumorokat indukálnak a gyökereken, és dohánylevelekben HR-t idéznek elő -plazmidon lokalizált *hrp* géncsaládot, és 150 kbp nagyságú fitohormon- bioszintézist irányító szekvenciákat találtak, melyek egyaránt szükségesek a tumorok képződéséhez, és a HR kiváltásához. Ez arra utal, hogy a patogén funkciók a baktériumok között horizontálisan átvihetőek (Nizan et al., 1997).

A *hrp* génclusterek és a hozzájuk fűződő funkciók megegyeznek azon tulajdonságukban is, hogy átvitelük képessé teszi HR kiváltására az olyan nem patogén baktériumokat, mint pl. az *Escherichia coli*. Ezt olyan cosmidok átvitelével mutatták ki, mint a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*-ből származó *pHIR11*, és az *Erwinia amylovora*-ból származó *pCPP430* (Alfano and Collmer, 1996), illetve a *P. syringae* pv. *phaseolicola* baktériumból a *pPPY430*. Bár e cosmidok az *E. coli*-t képessé teszik HR kiváltására, egyéb szükséges faktorok hiányában kórokozó mégsem válik belőle (Puri et al., 1997).

A betegségokozás képessége tehát feltételezi a *hrp* gének teljes készletének jelenlétét, amelyek egyben a hiperszenzitív reakció kiváltásáért is felelősek, hiszen e gének elicitorok szintézisét illetve transzportját irányítják. Vagyis hatásuk kétirányú (episztatikus), mivel fogékony növényben a betegség előidézésében vesznek részt, rezisztens növényben HR-t váltanak ki, limitálva ezzel a gazdanövények körét. Mindkét reakció kiváltásához szükséges a *hrc* cluster, mivel szekvenciái az ún. III. típusú fehérjeszekréciós rendszert kódolják.

2.6 Az extracelluláris Hrp proteinek

Az extracelluláris Hrp proteinek a harpinek és a pilinek. A harpinek hőstabil, glicinben gazdag hidrofil fehérjemolekulák, ciszteint nem tartalmaznak és baktériumtenyészetekben a *hrp* rendszer kifejeződésekor választódnak ki. Az amino-terminálisukon nincsenek szignálpeptidáz felismerő helyek (Bonas, 1994). Dohánylevélbe vagy egyéb növénybe infiltrálva általában HR elicitor aktivitást mutatnak (He et al., 1993). A harpinek természetes feladata és a HR kiváltásában játszott szerepük alapjaiban mindeddig ismeretlen maradt, de feltételezik, hogy érzékennyé teszik a növényt az *avr* gének termékeire (Alfano és Colmer, 1996).

Egyes megfigyelések arra utalnak, hogy funkciójuk a növényi sejtfalhoz kapcsolódik. A tisztított *P. syringae* pv *syringae* harpinja a növényi sejtfalhoz kötődik és biológiai aktivitása is csak a sejtfallal rendelkező növényi sejtekkel szemben van (Hoyos et al., 1996). Az *E. amylovora* és a *P. syringae* HrpW harpinjának aminoterminalis része harpin-jellegű, de a

karboxiterminális része a kórokozó gombákban és baktériumokban leírt pektát liázok csoportjával mutat homológiát (Kim és Beer, 1998).

A harpinek, amellett, hogy az elsőként leírt bakteriális proteinek, melyek HR elicitor aktivitást mutattak (He et al., 1993), az apoplaszt alkalizációjával, valamint Avr fehérjék növényi sejtbe való bejutásának segítésével a parazitizmust szolgálhatják.

Az extracelluláris Hrp proteinek másik csoportját a *P. syringae* HrpA pilinje reprezentálja, amely a baktérium felszínén található Hrp pílus alegysége (Roine et al., 1997). A Hrp pílus szükséges a patogenitáshoz, a patogenitással kapcsolatos géntermékek transzlokációjához, és a HR kiváltásához. Egy hasonló struktúra játszik szerepet az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS transzferében is (Fullner et al., 1996).

2.7 Az Avr proteinek és szerepük a gazda-kórokozó kölcsönhatásban

A növénykórokozó baktériumok *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* és *Ralstonia* nemzetségeiben tehát működik a konzervatív III. típusú fehérjeszekréciós útvonal és a patogenitás szigeteikhez néhány *avr* gén is tartozhat. Emellett azonban nincs közvetlen bizonyíték arra, hogy az Avr fehérjék *in vivo* a *hrp* rendszeren keresztül szállítódnának, de ezt az elképzelést közvetetten alátámasztja az, hogy a Hrp útvonal hiányában az Avr effektorok nem képesek a növénysejtbe átjutni (Collmer, 1998).

Ezek szerint az avirulencia fehérjék, vagy effektorok, a kórokozó baktériumok azon termékei, melyek a III. típusú szekréciós rendszeren keresztül a gazdasejtbe jutnak és elsődleges hatásuk ott nyilvánul meg. Az evolúció során kétélű fegyverekké váltak, hiszen a gazdaszervezet által történő felismerésük avirulens fenotípust (rezisztenciát), az ellenkező eset viszont sikeres kórokozó képességet eredményez (Ritter és Dangl, 1995).

Az avirulencia gének termékeit két csoportba sorolják, attól függően, hogy a kórokozás során a gazdasejt mely organellumával kerülnek kapcsolatba. Az egyik csoportba az AvrPto-hoz hasonló, a gazdasejt membránjának citoplazmatikus oldalához kötődő (Tang et al., 1996), míg a másik csoportba az AvrBs3 családba sorolt, a sejtmagot megcélzó fehérjék tartoznak (Bonas et al., 1993).

A baktérium-növény kölcsönhatás jelenlegi modellje a következőket feltételezi: a kölcsönhatás a *hrp* gének működésén, a kórokozó által termelt Avr fehérjék növényi sejtbe történő bejutásán, valamint az *avr* és *R* gének koevolúcióján alapul. Utóbbi megállapítások szerint tehát az Avr jellegű fehérjék a parazitizmus elsődleges effektorai és a kórokozó -gazdanövény koevolúciója során a gazdapopuláció azon genetikai változásai, melyek csökkentik egy effektorfehérje parazitikus előnyét, vagyis lehetővé teszik az effektorfehérje

felismerését a rezisztenciagének védekező rendszere számára, az *avr* jellegű gének számának növekedéséhez vezetnek (Alfano és Colmer, 1996).

Az Avr fehérjék szabják meg a gazdakört faj-faj és rassz-cultivarietas szinten egyaránt. Harmincnál több Avr fehérjét jellemeztek (Leach és White, 1996). A legtöbb Avr fehérje jelenléte - a harpinokhoz hasonlóan - fizikailag nem mutatkozik meg, növénybe juttatva önmagukban nem minden gazda esetén váltanak ki HR-t, és biokémiai funkciójuk sem minden esetben tisztázott. Feladatuk lehet a gazda védekezésének meghiúsítása, az apoplaszt módosítása a kolonizáció elősegítéséhez, vagy a gazda anyagcseréjének átalakítása. A *P. syringae* pv. *tomato* AvrD fehérjéje egy, a jól ismert Avr fehérjék közül (Keen, 1990). Az AvrD irányítja a sziringolid HR elicitorok szintézisét (Leach és White, 1996). Egy másik fehérje, az AvrBs2 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) hasonlóságokat mutat az *Agrobacterium tumefaciens* agrocinopin szintetázával, amely a parazita *A. tumefaciens* számára hasznosítható speciális szénforrás előállítására teszi képessé a gyökérgümők sejtjeit (Sheng és Citovsky, 1996, Alfano és Collmer, 1997).

Avr proteineket csak ritka kivétellel mutattak ki *in vitro* (folyadékkultúrában szaporítva) a *Pseudomonas syringae* és *Erwinia* fajok citoplazmáján kívül. Az egyik ilyen az *E. amylovora dspE* (disease specific, szükségesek a kórokozáshoz, de nincs szerepük a HR kiváltásában) génje, mely a *P. syringae* pv. *tomato avrE* génjének homológja (Gaudriault et al., 1997). A *dspE* mutáns kórokozó képessége helyreállítható - legalább részlegesen - egy olyan plazmiddal, amely hordozza a *P. syringae avrE* lókuszát. Ez arra utal, hogy a DspE és az AvrE funkciója hasonló (Bogdanove et al., 1998) .

Egyes Avr fehérjék tisztázatlan módon bár, de jelentősen befolyásolják a kórokozó agresszivitását (Leach és White, 1996). Az *AvrBs7* géncsalád termékei a *Xanthomonas* fajokban a növényi sejt sejtmagját célozzák meg (Bonas és Ackerveken, 1997) és néhányukról kimutatták, hogy nagymértékben fokozzák a zsírfoltosság tüneteket, valamint a kórokozó agresszivitását (Yang et al., 1996).

Az Avr fehérjék egy nagy csoportjának a kórokozásban betöltött szerepe a gazdaszervezet induktív védekező rendszereinek elnyomása, illetve a baktérium jelenlétének „álcázása”. A beavatkozásnak többféle módja lehet. Történhet a növényi sejtfal megvastagodások (papillák) képzésének gátlásával (Brown et al., 1995), az általános és specifikus indukált rezisztencia folyamatának post-transzlációs szintű gátlásával, illetve az eukarióta DNS-kötő doménnal rendelkező AvrBs3-típusú effektorokkal, a gazda génindukciójának szabályozása révén (Szurek et al., 2001). A *P. syringae* AvrRpm1 effektora foszforilálja (Mackey, 2002), a cisztein proteázt, az AvrRpt2 pedig lebontja (Axtell et al., 2003) a RIN4 represszor fehérjét, ami az *Arabidopsis thaliana* általános védekezési rendszerében, valamint az RPM1 és RPS2

-közvetítésével megvalósuló HR-ben játszik szerepet. A *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 AvrRtoB effektora megakadályozza a HR kialakulását *Nicotiana benthamiana* növényben (Abramovich, 2003), a tirozin-foszfatáz aktivitású HopPtoD2 pedig amellett, hogy szükséges a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 teljes virulenciájához, az avirulens baktérium által kiváltott HR megjelenését is elnyomja paradicsom és *Arabidopsis* növényekben egyaránt (Espinosa, 2003, Bretz et al., 2003).

2.8 A *hrp* és *avr* gének szabályozása

A *hrp* gének akkor fejeződnek ki, amikor a növényekbe inokuláljuk a baktériumokat, vagy az apoplaszthoz hasonló feltételeket biztosító minimal táptalajon szaporítjuk őket, de rendszerint nem aktiválódnak komplex bakteriológiai táptalajon. (Lindgren, 1997). Ezek szerint a *hrp* gének promótereit szűkös táptalajviszonyok és növényi kivonatok indukálják (Bonas, 1994). Alfano és Collmer (1996) szerint a baktériumok két főbb csoportja különíthető el a *hrp* gének szabályozása alapján: az első csoportba a *P. syringae* és *Erwinia amylovora*, a másodikba pedig a *Ralstonia solanacearum* és a *X. campestris pv. vesicatoria* fajokat sorolták. Ez a felosztás megfelel a *hrp* clusterek összetételében mutatkozó különbségeknek is (Alfano és Colmer, 1997).

A *hrp* útvonal két típusában különböznek a gazdanövény sejtközötti állományának környezeti hatásaira reagáló szabályozó rendszerek. Az első csoportba tartozó *P. syringae* pv. *syringae* szignál transzdukciós rendszerében a *hrpS* környezetre reagáló szabályozó aktiválja a *hrpR* gént, melynek terméke egy transzkripciós aktivátor (Xiao et al., 1994). A *P. syringae* pv. *phaseolicola* szerkezetileg hasonló génjeiről feltételezik, hogy termékeik HrpR-S heterodimerként funkcionálnak (Grimm et al., 1995). Ezek a gének aktiválják a *hrpL* gént, melynek terméke az általa szabályozott promóterek konzervált *hrp*-box-ához kötődő, ún. ECF szigma faktor (extra cytoplasmic function). Ez *in planta* feltételek között, nevezetesen alacsony ozmotikumtartalom, pH és tápanyagtartalom mellett, a *hrp* operonok aktiválásával szabályozza a *hrp* gének kifejeződését (Xiao et al., 1994).

A második csoportba tartozó *Xanthomonas* és a *R. solanacearum* baktériumok signál transzdukciós útvonala egészen a PrhA (plant regulator of *hrp* genes, Aldon et al., 2000), nem diffúzibilis növényi jeleket érzékelő receptortól kiindulva ismert. A kétkomponensű szabályozó rendszer következő eleme a HrpG transzkripciós aktivátor, ami indukálja *Xanthomonas* esetében a HrpX, *Ralstonia* esetében a HrpB transzkripciós aktivátorokat. Utóbbiak által szabályozott promóterek többségében megtalálható az ún. PIP-box (plant inducible promoter, növényben indukálódó promóter, Fenselau és Bonas, 1995). PIP box-okat találtak több *hrp* gén és egyes avirulencia gének promóter szekvenciájában is. Emellett

azonban, a *X. campestris* pv. *vesicatoria avrBs3* promótere tartalmaz ugyan PIP-box-ot, de e génről megállapították, hogy kifejeződése független a *hrp* clustertől (Knoop et al., 1991).
Mindezek mellett, több *avr* gén promóterét a σ^{54} aktiválja, ami szintén a szűkös környezeti feltételekhez adaptálja a baktériumot.

2.9 Virulencia faktorok

Az apoplasztot kolonizáló, közönséges kórokozó baktériumok rothadást, foltosodást, rákosodást, hervadást vagy elhalást okoznak a növényeken. A gazdanövénnyel való kapcsolatuknak két sajátossága van: (i) parazitikus aktivitásukat a növény sejtközötti állományában, illetve a xilémben fejtik ki, valamint (ii) nekrogének, azaz képesek a sejtek elhalását okozni.
Lágyrothadást váltanak ki gazdanövényeiken a következő baktériumok: *Erwinia carotovora, E. chrysanthemi* és a *Pseudomonas viridiflava*. Ezeknek a kórokozóknak széles gazdakörük van. Leginkább a húsos parenchimaszövetben gazdag növényeken okoznak tüneteket. A tünetek megjelenése jelentősen függ a környezeti tényezőktől. A nedves, párás, hűvös időjárás kedvezően befolyásolja a betegség kialakulását. A kórfolyamatban dominál a pektinbontó enzimek szerepe, amelyek hidrolízis útján (poligalakturonázok), vagy β eliminációval (pektát liázok) elhasítják a növényi sejtfal srukturális alkotójaként elsődleges fontossággal bíró α-1-4 poligarakturon polimereket (Perombelon és Kelman, 1980; Barras et al., 1994).
A *Pseudomonas viridiflava* egy pektát liázt választ ki (Pel), amely lehetővé teszi opportunista kártételét a termesztett zöldségeken (Liao et al., 1988).
Az elterjedtebb kórokozóként ismert *Erwinia carotovora* és *E. chrysanthemi* pektinbontó enzimkomplexet termel. Ezeket az enzimeket a II. típusú szekréciós rendszer választja ki. A szekréciós rendszerükben károsodott mutáns baktériumok nem képesek az enzimkiválasztásra, így nem okoznak lágyrothadást (Barras et al.,1994).
Ezek mellett, a növénykórokozó baktériumok egyéb enzimeket is termelnek, melyek közül pl. a kataláz és a szuperoxid dizmutáz (Imlay, 2003) hatékony védelmet biztosít a védekező növény reaktív oxigén fajtáival szemben.
A patogén baktériumok változatos tüneteket produkálnak a gazdanövényeken, melyekben a sejtfalat degradáló enzimeken kívül fontos szerepet játszanak a toxinok, mint a nekrózis közvetett vagy közvetlen kiváltói. A nekrogén Gram-negatív baktériumokban termelődő toxinok másodlagos metabolitok (többnyire kisméretű peptidek), melyek nem mutatnak gazdaspecifitást, általában nem járulnak hozzá a baktérium növénybeli szaporodásához és diffuzió útján gyorsan terjednek a szövetekben (Gross, 1991).

A bakteriális toxinokat virulenciafaktoroknak tekintjük, de szerepük valójában nem tisztázott, hiszen a toxintermelés kimutatható néhány nem patogén *P. syringae* törzs esetében is (Adetuyi et al., 1995). Számos toxinnak antimikrobiális hatása is ismert, amely kompetitív előnyt jelent a mikroba számára (Gross, 1991).

A baktériumnyálka vagy burok anyagában jelenlevő extracelluláris poliszacharidokat (EPS) a toxinoktól eltérően a legtöbb baktérium termel, beleértve a legtöbb patogént is. Az EPS azzal segíti a kórokozót, hogy fenntartja az intercelluláris környezet vízzel való telítettségét, vagyis a zsírfoltosságot, valamint, hogy védi az élő baktériumsejtet a különböző környezeti stresszhatásoktól, így megvédi a baktérumsejtet az antimikrobiális anyagoktól, a mérgező hidrogén-peroxidtól (D'Haeze, 2004. a) vagy megváltoztatja a gazda védekező reakcióit kiváltó szignálokat (D'Haeze, 2004. b). A hervadást okozó baktériumokban a duzzadó EPS nyálka eltömíti a xilemet, ezzel váltva ki a tünetet (Denny, 1995).

A növénykórokozó baktériumok többsége rendelkezik a mozgásukhoz szükséges flagellummal. Működőképes flagellum nélkül inváziójuk (Chesnokova et al., 1997, Trans -kersen et al., 2001), illetve a növényszövetközi terjedésük (Pirhonen et al., 1991) gátolt, így virulenciájuk csökken. Mivel a flagellin, mint PAMP a növény immun-típusú védekező rendszerét indukálja, így aminosav sorrendjének megváltoztatása a baktérium felismerésének elmaradásához vezethet (Gómez-Gómez és Boller, 2002).

Az enzimek, a különböző toxinok és az EPS termelés csakúgy, mint a mozgás képessége tehát hozzájárulnak a baktérium *in planta* rátermettségéhez (fitness-éhez), kórokozó képességéhez és a betegségtünetek megjelenéséhez.

2.10 A kórokozás genetikájának vizsgálati módszerei

Adott környezeti tényezők között a baktérium genomban nem minden gén fejeződik ki. A génkifejeződés szigorú, elsősorban transzkripciós szinten megvalósuló szabályozása útján a baktérium csökkenti az energia felhasználását. Ez egyben azt is jelenti, hogy a feladatukban kapcsolódó géntermékeket (pl. valamely metabolikus útvonal enzimeit) kódoló gének kifejezése közös szabályozás alatt áll. Éppen a szabályozott génkifejeződés teszi lehetővé a különböző környezetben átíródó gének kimutathatóságát. Az eltérő helyzetekben ugyanis különböző mRNS és fehérje garnitúrák jelennek meg a baktériumban.

A transzkripció elemzésében nagyon lényeges szerep jut olyan *in vitro* módszereknek, mint a DNS mikroarray, vagyis a DNS chip technikák (Lipshutz RJ, 1999, Czelleng, 2005 b.), a kivonó (subtractive) hibridizáció vagy az RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction, Shelburne és Musser, 2004).

A vizsgált baktérium valamennyi génjének kifejeződését egyidejűleg nem csupán *in vitro* módszerekkel lehet elemezni. Léteznek olyan eljárások, melyekben valamennyi gént egy-egy mutáns baktériumtörzs reprezentál, együttesen génkönyvtárat alkotva. Ezeknél az eljárásoknál az egyes géneket *in vitro* külön-külön megjelöljük oly módon, hogy a jelölés egyrészt biztosítsa a gének elkülöníthetőségét, másrészt pedig adjon lehetőséget a géneket reprezentáló mutánsok *in vivo* szelekciójára (Handfield és Levasque, 1999, Chiang et al., 1999, Czelleng, 2005 b.). Jelölésre alkalmasak lehetnek transzpozonok (Hamer et al., 2001, Mecsas, 2002), vagy önmagukat kifejezni nem képes ún. riporter gének; a szelekció az előbbi esetben negatív, utóbbi esetben pozitív. Érdemes megjegyezni, hogy a transzpozon mutagenezis stratégiájára épülő módszerekkel csak közvetett módon és csak olyan géneket lehet azonosítani, melyek nagymértékben befolyásolják a patogenezist, hiszen funkcióvesztéssel járó (loss-of-function típusú) mutációjuk esetén a mutáns törzsek nem élik túl az *in vivo* szelekciót, vagyis negatív szelekcióval eltűnnek a génkönyvtárból.

Valamely környezeti tényező indukáló hatására kifejeződő géneket az azokat reprezentáló baktériumtörzsek *in vivo* pozitív szelekciójával is megtalálhatjuk. Ebben az esetben olyan géneket válogatunk ki, melyek önmagukkal együtt a hozzájuk kapcsolt riportergéneket is kifejezik. Ahogy a nevük is mutatja, a riportergének a velük fúzióban lévő promóterrel rendelkező gén kifejeződéséről tájékoztatnak, ugyanis a riportergének valamilyen jól szelektálható tulajdonságot kódolnak, de a transzkripció megindításához szükséges saját ún. promóter szekvencia hiányában önmagukban nem képesek megnyilvánulni. A riporter gén alapú promóter keresés módszerekre éppen az ad lehetőséget, hogy a vizsgált gén promóter szekvenciájáról meginduló mRNS átírással a riporter gén transzkripciója is végbemegy. A baktériumtörzs ezzel olyan fenotípusúvá válik, hogy *in vivo* el tudjuk különíteni a többi törzstől (Mahan et al., 2000, Rainey és Preston, 2000). Ilyen pozitív szelekciót eredményezhet például egy antibiotikum rezisztenciagén vagy auxotróf (valamely nélkülözhetetlen növekedési faktor előállítására képtelen mutáns) baktérium esetében a hibás anyagcsereút hiányzó elemének génje, mint riporter gén.

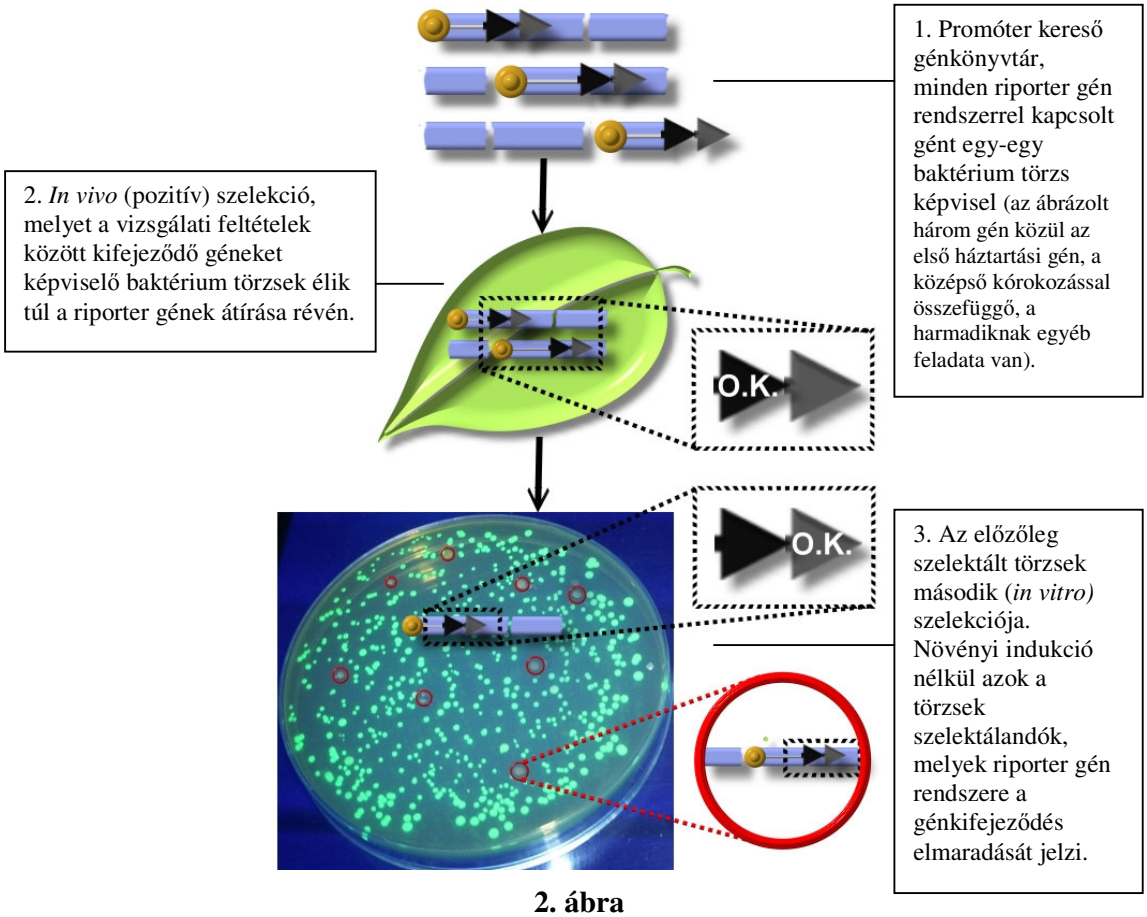
2.10.1 In vivo *expression technology*

Kézenfekvőnek látszik, hogy a gének kifejeződését *in situ* vizsgáljuk, vagy legalábbis legyen kihasználva a génkifejeződés biológiai teszt útján történő vizsgálhatósága. A mutáns törzsek pozitív szelekcióját használó promóter keresés stratégiáját elsőként Osbourn és munkatársai (1987) alkalmazták növénykórokozó baktériumok feltételes génkifejeződésének vizsgálatára. Később az eljárás „*in vivo* expression technology”, IVET (Mahan et al., 1993) néven vált ismertté. Ennél a módszernél a vizsgálandó baktérium genomban speciális promóter kereső

génkönyvtárat kell létrehozni. Ebben a klóntárban minden gént külön baktériumtörzs képvisel. Az összes génhez két-két riportergén van transzkripcionálisan fúzionáltatva úgy, hogy adott gén két eltérő környezetben (*in planta* és táptalajon) történő kifejeződését külön szelektálni lehessen. Ezzel a gén kifejeződése összehasonlíthatóvá válik.

A riporter génekkel alkotott transzkripcionális fúzió baktérium genomba történő egykópiás beépülését a vizsgálat alatt álló baktériumba juttatott, a baktérium genom fragmenst tartalmazó „suicide" replikációjú plazmid vektor és a genom homológ szekvenciája között lejátszódó rekombináció révén lehet elérni. Mivel az egyszeres crossing-over útján megvalósuló homológ rekombináció eredményeként egy részleges diploid (merodoploid) genotípus jön létre, a gén eredeti promótere megmarad, ami a funkcióvesztést megakadályozza. A genomba történő integrációval elkerülhetővé válnak azok a problémák, amelyek plazmidok alkalmazásával léphetnének fel. Ilyen a plazmid inkompatibilitásából és szerkezetéből adódó ún. szegregációs és strukturális instabilitás (Meima, 1996). Az sem elhanyagolható tényező, hogy a génszabályozást sokszor a szabályozó faktor és a szabályozott faktor stöchiometriai aránya szabja meg. A szabályozandó gén többkópiás plazmidon való jelenléte éppen ennek az egyensúlyi aránynak a felborításával a szabályozás meghiúsulásához vezethet.

Az eljárás széleskörű alkalmazhatóságát a riportergének variálhatósága adja, mely riportergének egyben a különböző IVET stratégiák alapjaiként is szolgálnak (Angelichio és Camilli, 2002). Kórokozás során aktiválódó gének vizsgálatakor például hasznos lehet, ha az egyik riportergén valamilyen antibiotikummal szemben teszi ellenállóvá az azt kifejező baktériumot (2. ábra). Ezt a riportergént a megbetegítés során a gazdaszervezetben lehet pozitív *in vivo* szelekcióra használni, hiszen ha valamely aktív promóterhez kapcsolt antibiotikum rezisztenciagén megnyilvánul, a baktérium ellenállóvá válik az antibiotikum kezeléssel szemben. Amennyiben a másik riportergén kifejeződése valamilyen könnyű szelekciót biztosító fenotípust eredményez, akkor ezzel táptalajon el lehet különíteni a csak a kórokozás folyamatában indukálódó géneket az állandóan kifejeződő (konstitutív) ún. háztartási génektől. Könnyű belátni, hogy az antibiotikumos kezelést azok a baktériumtörzsek élik túl, melyek vagy alap anyagcsere utakat kódoló, így állandóan kifejező, vagy a betegséget kialakító, a kórokozás ideje alatt aktiválódó géneket képviselnek. A táptalajon végzett szelekció során, a második riportergén alkalmazásával elkülöníthetővé válnak a gazdaszervezeten kívüli környezetben is aktív géneket képviselő és a csak a gazdaszervezetben aktív, ezzel vélhetően a kórokozásban szerepet játszó géneket képviselő mutánsok.



2. ábra

„*In vivo* expression technology" alkalmazása növénykórokozó baktériumok kórokozás során aktiválódó génjeinek azonosítására.
kék szakasz: gén, sárga korong: promóter, fekete és szürke nyilak: riporter gének, O.K.: kifejeződő riportergén, mely a szelekció alapjaként szolgál

Az IVET a baktérium szinte bármely két környezeti tényező között megváltozó génaktivitásának kimutatására alkalmas módszer, ennek megfelelően felhasználása is többirányú. Nem csak kórokozással kapcsolatban lévő gének, hanem a rhizoszférában a talajlakó *Pseudomonas*okban aktiválódó gének vizsgálatára (Silbi és Levy, 2004; Preston et al., 2001; Rainey, 1999; Gal et al., 2003), valamint a baktériumok biofilm képzése során aktiválódó (Finelli et al., 2003), illetve azok, a növényeket endofita (Rediers et al., 2003) és szaprofita (Oke és Long, 1999) módon történő kolonizálása alatt aktiválódó génjeinek izolálására is felhasználták. Ezek mellett természetes, hogy - habár csak a legutóbbi időkben - az IVET szelekciós rendszerét alkalmazták a növényeket parazitáló baktériumokban, az elsősorban a fertőzés alatt kifejeződő gének vizsgálatára is (Boch et al., 2002; Brown és Allen, 2004; Yang et al., 2004).

A fenti vizsgálatok közleményekben megjelent példáinak mindegyikében a baktérium auxotróf fenotípusát, a riportergén kifejezése útján komplementáló IVET szelekciós rendszert használták. Ez azonban számos nehézségbe ütközhet. Egyik az, hogy előzetes szekvencia ismeretekre támaszkodva, a vizsgálandó baktérium olyan mutáns származékát kell előállítani, amely egy feltételesen letális mutációt hordoz. A mutáns e tulajdonságának körülményektől függő komplementálásához, a mutációt hordozó funkcióját vesztett gén promóterétől megfosztott változatának felhasználásával promóter kereső plazmid vektort kell készíteni. Amennyiben mindezek már rendelkezésre állnak, akkor további problémát jelent, hogy a nem szaporodó hiánymutáns baktériumok kihígítása, vagyis negatív szelekciója csak azok többszörös átoltásával, a szelekciós nyomás 1-2 héten keresztül tartó folyamatos fenntartása esetében valósítható meg. Tovább nehezíti az ismert IVET plazmidok alkalmazását, hogy azokban a génkönyvtár kialakításához használható restrikciós endonukleáz felismerő helyek nem variálhatóak, így a rendszertanilag távoli baktériumok vizsgálatára több nem is alkalmas. A már ismert plazmidokkal izolált gének bázissorrendjének meghatározásához egyedi primerek használata szükséges, ami szintén megnehezíti e plazmidok széleskörű felhasználhatóságát.

Ezért olyan plazmidok és a használatukhoz szükséges kísérleti rendszer kidolgozását tűztem ki célul, amelyek (i) a baktériumok széles körében használhatóak, (ii) gyors és hatékony szelekciót biztosítanak és (iii) lehetővé teszik az izolált gének további könnyű elemzését is.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Baktériumtörzsek és plazmidok

2. Táblázat; Baktériumtörzsek és plazmidok

Fajok, törzsek és plazmidok	Tulajdonságok (fenotípus, genotípus)	Forrás
Fajok, törzsek		
E. coli		
DH5α/λ pir	*sup E44, DlacU169 (F80lacZDM15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, λpir phage lysogen.*	de Lorenzo et al., 1990
S17.1/λ pir	Tp^r Sm^r *rec*A, *thi*, *pro*, *hsd*R-M^+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7 *λpir*.	Simon et al., 1983
HB 101	*F^-, leuB6, proA2, recA13, thi-1, araC14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsl20 (Str^r), glnV44, Δ (mcrC-mrr)*	Sambrook et al., 1889
P. viridiflava	Prototróf, vad típus, Rif^r	NCAIM B.01581
IviPV-s1/1	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK: dGTPáz génfúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/2	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK: ATP-kötő/permeáz génfúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/3	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK: szerin szenzor receptor génfúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/4	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK: 2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratáz génfúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/5	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK: K^+-függő Na^+/Ca^{2+} exchanger génfúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/6	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK:*$mviN_{pv}$* fúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/7	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK:*pel* fúzió	Jelen Dolgozat
IviPV-s1/8	Rif^r, Gm^r, kromoszómába integrált pIviGK:*pel* fúzió	Jelen Dolgozat
PV-dm	Rif^r, Km^r, *$mviN_{pv}$* ::ΩKm^r	Jelen Dolgozat
P. fluorescens 55	Prototróf, Nx^r	Huang 1991
Plazmidok		
pBluescriptKS	Ap^r, *α-lac*	Stratagene,USA
pGP704	Ap^r, *ori* R6K, *mob* RP4	Miller és Mekalanos, 1988
pJQ199	Gm^r, *ori* R6K, *mob* RP4, *sacB*	Quandt és Hynes, 1993
pAG408	Ap^r, *ori* R6K, *mob* RP4, *aphA3* (Km^r), *accA1* (Gm^r), *atpE-gfp*	Suarez et al., 1997
pRK2013	Km^r, $TraRK^+$, $MobRP4^+$ helper	Figurski és Helinski, 1979
mini-Tn5Km (pUT)	Km^r, *ori* R6K, *mob* RP4, mini-Tn5	deLorenzo et al., 1990
pBAD18	Ap^r, AraC-P_{BAD}	Guzman et al., 1995
pGPMCSII	Ap^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSII*	Jelen Dolgozat
pGPMCSII:gm	Gm^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSII	Jelen Dolgozat
pGPMCSII:km	Km^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSII	Jelen Dolgozat
pBKS:gmS/R	Ap^r, Gm^r: promoter nélküli *accA1*transzkripciója a plazmid P_{lac} promóteréről	Jelen Dolgozat
pBKS:kmS/R	Ap^r, Km^r: promoter nélküli *aphA3*transzkripciója a plazmid P_{lac} promóteréről	Jelen Dolgozat
pBKS:gfp- gmS/R	Ap^r, Gm^r (azonos pBKS:gmS/R)::*gfp* fúzió	Jelen Dolgozat
pBKS:gfp- kmS/R	Ap^r, Km^r (azonos pBKS:kmS/R)::*gfp* fúzió	Jelen Dolgozat
pIviGK	Gm^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSII, promoter nélküli *aphA3*::*gfp* fúzió	Jelen Dolgozat
pIviGG	Km^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSII, promóter nélküli *accA1*::*gfp* fúzió	Jelen Dolgozat
pIviGKIII	Gm^r, *ori* R6K, *mob* RP4, MCSIII#, promóter nélküli *aphA3*::*gfp* fúzió	
pIviGK:s1/6	pIviGK–val azonos, de tartalmazza az *$mviN_{pv}$*: *[aphA3*::*gfp]* fúziót	Jelen Dolgozat

*MCSII, Multiple cloning site (klónozóhely; *Nco*I, *Xba*I, *Spe*I) a két M13/pUC (-20 és -26) szekvenáló primer -rel és a *Pac*I ritkán hasító restrikciós endonukleáz felismerő hellyel szegélyezve.

#MCSIII, mint MCSII, de *Nco*I, *Bcl*I, *Pst*I, *Sca*I, *Cla*I, *Eco81*I, *Spe*I restrikciós endonukleáz hasító helyeket tartalmaz.

3.2 Felhasznált oligonukleotidok

3. Táblázat; Felhasznált oligonukleotidok

Oligonukleotid	Nukleotidsorrend (5' - 3')
MCSIIs*	GTAAAACGACGGCCAGTTTAATTAACCATGGACTAGTTTAATTAAGTCATAGC TGTTTCCTG
MCSIIas#	CAGGAAACAGCTATGACTTAATTAAACTAGTCCATGGTTAATTAAACTGGCCG TCGTTTTAC
3MCSfw$	AAAGATCTGTAAAACGACGGCCAGT
4MCSrv§	TTTGGTACCCAGGAAACAGCTATGAC
MCSIIIs	AACCATGGTGATCACTGCAG TACTATCGATCCTCAGGACTAGTA
MCSIIIas	TACTAGTCCTGAGGATCGATAGTACTGCAGTGATCACCATGGTT
GMP1fw	AAGGAGGAAAAAATGTTACGCA
KMP1fw	AAGGAGGAAAAAATGGCTAAAATGA
GMSrv	TTCCCGGGTTAGGTGGC
KMSrv	AACCCGGGGGTACTAAAACAATTCATC
P2fw	GGAATTCGGGTTAACTTTAGGAAGGAGGA
GFP1fw	AAGGAGGAAAAAATGAGTAAAGGAGA
GFPrv	TTCCCGGGTTTATTTGTAGAGCT
GFPnatfw	AGAATTCAAGGAGGAAAAAATGA
AraCfw	AAAGGTACCATTATGACAACTTGA
P_{BAD}Lrv	GAATTCACAGTAGAGAGTTGCGA
MviRrv	GAGGACAGCGAGATCAGCAA
Mvi1fw	AGTCTTGTCAAGGGCAGTTA

*s, sense; #as, antisense; $fw, forward, §rv, reverse

3.3 Anyagok és forrásaik

Agar-agar (Bacto Difco, Oxoid), antibiotikumok (Serva, Sigma), agaróz (Sigma, Ammersham), casamino acids (Oxoid), etidium-bromid (Serva), élesztőkivonat (Bacto Difco, Oxoid), fenol (Loba Chemie), 8-hidroxiquinolin (Sigma), a többi anyag Reanal gyártmányú (analitikai tisztaságban).

3.4 Táptalajok, tápoldatok

3.4.1 E. coli *tenyésztéséhez, szaporításához használt táptalajok és tápoldatok*

- **LB** (Luria Broth) **tápoldat** (1000 ml): 5 g élesztőkivonat, 10 g Tripton, 5 g NaCl (pH 7,2)
- **LB komplett táptalaj**: LB tápoldat 1,2% agar kiegészítéssel
- **LB lágyagar:** LB tápoldat 0,75% agar kiegészítéssel
- **SB** (Super Broth) **tápoldat** (1000 ml): 900 ml desztillált vízben: 12 g Tripton, 24 g élesztőkivonat; külön sterilizálva: I.: 100 ml desztillált vízben 2,3 g KH_2PO_4, 12,5 g K_2HPO_4 (pH 7,3); és II.: 4 ml glicerin

3.4.2 Pseudomonas *törzsek tenyésztéséhez, szaporításához használt tápoldatok, táptalajok*

- **KB** (King's B) **tápoldat** (1000 ml): 18 g Proteose pepton, 10 ml glicerol, 0,75 g $MgSO_4$, 1,5 g K_2HPO_4

- **KB táptalaj**: KB tápoldat 1,48% agar kiegészítéssel
- **LB tápoldat, táptalaj**
- **M9 minimál táptalaj** (1000 ml): 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0,5 gNaCl, 1 g NH_4Cl, 15 g agar, külön sterilizálva: I.: 100 ml (0,1M) $MgSO_4$ oldat és II.: 100 ml (0,01M) $CaCl_2.2H_2O$, III.: 20 ml (20%) glükóz, fruktóz vagy szacharóz oldat
- **M63 minimál táptalaj** (1000 ml): 10 g $(NH_4)_2SO_4$, 6,8 g KH_2PO_4, 1 ml (2.5 g/1000 ml) $FeSO_4.7H_2O$, 15 g agar, külön sterilizálva: I.: 1 ml (120 g/1000 ml) $MgSO_4$, II.: 0,1 ml (0,5%) B1 tiamin, 5 ml (20%) Casamino acids, 20 ml (20%) glükóz, fruktóz vagy szacharóz oldat
- **MM minimál táptalaj** (1000 ml): 6 g Na_2HPO_4, 1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,16 g $MgCl_2$, 0,1 g NaCl, 15 g agar, 20 ml (20%) glükóz, fruktóz vagy szacharóz oldat

Antibiotikumos szelekció esetében, miután a táptalaj- oldat 45°C–ra lehűlt, az alábbiak szerinti végkoncentrációban alkalmaztuk a megfelelő antibiotikumot.

Antibiotikum	Törzsoldat koncentráció, oldószer	Végkoncentráció
Ampicilin: Ap	10 mg /ml - st. desztillált víz	100 µg/ml
Kanamycin: Km	10 mg/ml - st. desztillált víz	50 µg/ml
Gentamicin: Gm	10 mg/ml - st. desztillált víz	5 µg/ml
Rifampicin: Rif	10 mg/ml - metilalkohol	50 µg/ml

3.5 Módszerek

3.5.1 Baktérium törzsek fenntartása és szaporítása

A baktérium törzseket LB, illetve *Pseudomonas* törzseket -fenntartás céljából- KB táptalajon (szükség esetén a megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve) szaporítottuk, 4°C-on tároltuk, kéthavonta átoltottuk, illetve a törzsgyűjteményt 15%-os glicerinben –20°C-on tároltuk.

E. coli-t 37 °C-on , *Pseudomonas* törzseket, 27 °C-on, 16-18 órán keresztül, illetve 24-72 órán keresztül szaporítottuk.

3.5.2 Rekombináns DNS technikák

A *Pac*I restrikciós endonukleáz a New England Biolabs (UK) terméke, az összes többi alkalmazott enzim az MBI Fermentas (Litvánia) terméke.

A plasmid DNS-t a standard “alkaline-lysis” protokoll segítségével izoláltuk, az agaróz gélelektroforézist és minden enzimatikus kezelést Sambrook és munkatársai (1989) módszerével végeztük.

Az *E. coli* transzformálását Inoune és munkatársai (1990) szerint végeztük. A DNS fragmens izoláláshoz GELase-t (EPICENTRE, USA) alkalmaztunk, a gyártó ajánlása szerint.

A *P. viridiflava* genomi DNS izolálását, Pitcher és munkatársai (1989) által közölt, guanidium thiocyanate–alapú módszerrel végeztük, azt csak 1 órán keresztül, 37 °C-on történő RNázA kezeléssel egészítettük ki. A DNS oldatok koncentrációját Hoefer TKO 100 Mini -Fluorométerrel határoztuk meg, a cég ajánlása szerint. Southern hibridizációhoz digoxigenin (DIG) jelölő és detektáló kit-et használtunk a gyártó (Boringen Manheim) ajánlása szerint. Előhibridizációhoz hering sperma DNS (Sigma) ultrahanggal tördelt, 1000-4000 bp mérettartományba eső oldatát használtunk.

A Taq, illetve egyes esetekben Pfu polimerázzal végzett PCR programokat az alábbi módon állítottuk be:

1.	95 °C („template”-tól függően) 1X	2-5 perc
2.	95 °C	0,5 perc
3.	50-65 °C (alkalmazott primer-ektől függően)	0,5-1 perc
4.	72 °C 29X	1 perc
5.	72 °C (terméktől függően) 1X	2-7 perc
6.	4 °C	24 óra

3.5.3 A konjugáció kivitelezése, háromszülős keresztezés

LB tápoldatban, a megfelő antibiotikumok jelenlétében, 16 órán át kémcsőkeverőben szaporítottuk 37 °C-on az *E. coli*, illetve 27 °C-on a *P. viridiflava* törzseket,. A 10^6 cfu/ml töménységűre higított recipiens sejtszuszpenziót 2,5 órán keresztül (10^7 cfu/ml sűrűség eléréséig) szaporítottuk orbitális keverőben. A sejtszuszpenziót 4°C-on, 6000 rpm fordulatszámon, 5 percig centrifugáltuk, a felülúszó eltávolítása után még háromszor 1-1 ml LB tápoldattal mostuk. A sejtüledéket a kiindulási térfogat 1/100 részében szuszpendáltuk és LB táptalajra cseppentettük, ahol 27 °C-on további 2 órán át inkubáltuk.

A donor és helper (pRK2013 tartalmú *E. coli* HB101) törzseket a fentivel azonos módon készítettük elő és cseppentettük az elő-inkubált recipiensekre, D:H:R=2:1:2 arányban. A konjugációs keveréket steril oltókaccsal kevertük össze és 27 °C-on 6 órán át inkubáltuk. A táptalajból steril dugófúróval kivágtuk a vegyes tenyészeteket és 1 ml 10 mM foszfát pufferben (pH 7,0) szuszpendáltuk. Hígítási sorban szélesztettük szelektív LB táptalajra (Czelleng et al., 2006).

3.5.4 Promóter kereső (IVET) génkönyvtár előállítása

Az *Xba*I-el hasított pIviGK 5' túlnyúló végeit Klenow DNS polimeráz segítségével (1U/μg DNS) és dCTP és dTTP felhasználásával részlegesen feltöltöttük. A *Hind*III-al hasított *P. viridiflava* genomi DNS-ét 1 % agaróz gélben elválasztottuk és a 2000-3000 bp nagyságú frakciót izoláltuk. Az így kapott DNS fragmens pool 5' túlnyúló végeit dATP és dGTP felhasználásával részlegesen feltöltöttük. 2 μg pIviGK és 2 μg *P. viridiflava* genomi DNS-t ligáltunk T4 ligázzal. A ligátummal *E. coli* DH5α/λ pir-t transzformáltunk.

20 óra 37 °C-on történő inkubálást követően az összes transzformánsból 1-1 ml LB tápoldatban, két pool-t képeztünk, mindegyik $5x10^3$ kolóniát tartalmazott. Mindkét baktérium pool-t 10^9 cfu/ml sűrűségűre hígítottuk és 1-1 ml-rel, 100 ml (gentamicinnel kiegészített) LB tápoldatot oltottunk be. Orbitális keverőben, (150 rpm) 37 °C-on, 2,5 órán keresztül inkubáltuk, majd a baktérium pool-t donorként használtuk, *P. viridiflava* recipiens felé irányuló konjugációban. Ennek eredményeként rifampicin és gentamicin, kétszeresen rezisztens IVET-mutáns *P. viridiflava* génkönyvtárat kaptunk, a kiinduló recipiensek számához viszonyítva 10^{-6} gyakorisággal.

3.5.5 Zöldpaprikatermés fertőzése

Az érett zöldpaprika terméséből 0,5 cm széles paprikagyűrűket vágtunk ki. Ezeket bemártottuk 10^8 cfu/ml töménységű IVET-mutáns *P. viridiflava* szuszpenzióba. Az infiltrálást 0,5 perc alatt vákuum segítségével végeztük, ahogy a két órával későbbi antibiotikum utókezelést is. A vákuum többszöri megszüntetésével, majd újbóli létesítésével elértük azt, hogy a baktérium szuszpenzió a sejtközötti járatokba jusson.

3.5.6 **In vivo** ***szelekció***

Az *in planta* szelekció lebonyolításához IVET-mutáns *P. viridiflava* baktérium pool-t képeztünk 10^4 telepből. A 10^8 cfu/ml sűrűségűre hígított baktérium szuszpenziót használtuk fel vákuumos fertőzésre. Ennek során átlagosan 100 μl szuszpenzió jutott be minden egyes paprikagyűrűbe. Két órával a fertőzést követően a gyűrűket 50 μg/ml koncentrációban kanamycint tartalmazó oldatba mártottuk és egy második vákuumos infiltrálásnak vetettük alá. A kanamycinnel kezelt paprika mintákat szobahőmérsékleten (22°C), magas páratartalom mellett, 10-12 órán keresztül inkubáltuk. Végül a paprika mintákat mozsárban összezúztuk.

A baktériumokat, melyek túlélték az antibiotikum kezelést a következő módon nyertük vissza: 1 ml 10mM foszfát pufferrel (pH 7,0) készített baktériumokat tartalmazó paprika homogenátumot hígítási sorban szélesztettünk rifampicint és gentamicint tartalmazó szelektív LB táptalajra. A táptalajokat 48 órán keresztül, 28°C-on tartottuk, majd rövid ideig 370 nm

hullámhosszon sugárzó UV átvilágítóra helyeztük. További elemzésre azokat a telepeket válogattuk ki, amelyek nem bocsátottak ki jól láthatóan zöld fluoreszkáló fényt.

3.5.7 Az ivi-gének konjugatív klónozása és bázisösszetételük vizsgálata

A különböző *ivi*-gént tartalmazó pIviGK plazmid származékokat konjugatív retrotranszferrel (Rainey et al., 1997, Szpirer et al., 1999.) *E. coli* DH5α/λ *pir* törzsbe juttatuk. Ennek során az *ivi*-géneket reprezentáló mutáns *P. viridiflava* törzsek szerepeltek donorként, míg az *E. coli* DH5α/λ *pir* volt a recipiens, a pRK2013 tartalmú *E. coli* HB101 helper mellett. A háromszülős keresztezés mindhárom résztvevőjét 10^8 cfu/ ml sűrűségig szaporítottuk, majd mostuk, ahogy a 3.5.3 pontban. Jelen módszer abban tért el az idézett alfejezetben leírtaktól, hogy a résztvevő baktérium szuszpenziókat az LB táptalajra történő cseppentésük előtt összekevertük, D:H:R=2:1:2 arányban. Az inkubációs körülmények azonosak voltak a hivatkozott pontban leírtakéval. A különböző *ivi*-gént tartalmazó, pIviGK-származék plazmidok autonóm, replikatív formáit izoláltuk *E. coli* DH5α/λ *pir*–ből és az inszert nukleotid sorrendjének meghatározáshoz „template”-ként használtuk. Szekvenáláshoz az 5’- CAGGAAACAGCTATGAC, pUC/M13 (-26) szekvenáló primert alkalmaztuk.

3.5.8 **Arabidopsis** *fertőzése és a baktériumok szaporodásának mérése*

Az *Arabidopsis thaliana* leveleinek fertőzéséhez a *P. viridiflava* különböző törzseinek, illetve a *P. flourescens* 55 törzsnek, 10^6 és 10^8 cfu/ml sűrűségű vizes szuszpenzióját használtuk. A leveleket vagy fecskendővel fertőztük, vagy az egész növényt bemártottuk 0,02 % Silwet L-77 (Union Carbide) tartalmú baktérium szuszpenzióba, 2 másodpercig. A fertőzést követően a növényeket átlátszó, műanyag zacskóval letakartuk és magas páratartalomban (kb. 90%) 6 napig inkubáltuk.

A baktériumok szaporodásának követéséhez teljes leveleket távolítottunk el a fertőzött növényekről. Két független növényről származó levelekből, 6-6 db, 0,6 cm átmérőjű levélkorongot vágtunk ki, ez képzett egy mintát. Három minta készült a vizsgálat minden időpontjában. A levélkorongok szétzúzását követően a levél homogenátumot 10 mM foszfát pufferben (pH 7,0) szuszpendáltuk, majd higítási sorban szélesztettük egyszerű LB, illetve rifampicint és gentamicint tartalmazó szelektív LB táptalajra. A Petri-csészéket 48 órán keresztül 28 °C-on tartottuk.

3.5.9 Az **ivi-***gének kifejeződés-dinamikájának mérése fluoreszcens spektroszkópiával*

A fluoreszcens méréseket Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Franciao.) spektrofluorometerrel végeztük. A *gfp* gént feltételesen kifejező *P. viridiflava* sejtek gerjesztéséhez 395 nm-es UV

megvilágítást alkalmaztunk és 512 nm-en mértük a 2 mm szélességűre állított résen átjutó floureszcenciájukat. A fluoreszcencia mérésre használt *P. viridiflava* Ivi-mutánsokat éjszakán át szaporítottuk 10 μg/ml gentamicint tartalmazó LB tápoldatban. A baktériumokat 5 perc centrifugálással (6000 rpm) ülepítettük és desztillált vízben újra szuszpendáltuk. A paprikakorongokat 10^7 és 10^8 cfu/ml sűrűségű baktérium szuszpenzióval, vákuumban fertőztük, majd desztillált vízzel mostuk. A fertőzést követő különböző időpontokban a mintákat mozsárban eldörzsöltük.

Minden homogenátum mintát 3 ml, 10 mM foszfát pufferben szuszpendáltunk. Mintánként 2 ml szuszpenzió fluoreszcenciáját mértük 1 cm x 1 cm kvarc küvettában.

3.5.10 Az **ivi-***gének kifejeződésének vizsgálata minimál táptalajon*

Éjszakán keresztül szaporított Ivi-mutáns *P. viridiflava* törzsek sejtszuszpenzióit 10^6 cfu/ml sűrűségűre hígítottuk LB tápoldatban és 2,5 órán keresztül, 28 °C-on rázatás mellett inkubáltuk. A szuszpenziókat higítási sorban M9 minimál táptalajra (amely szénforrásként glükózt tartalmazott) szélesztettük. Az *ivi*-génfúziók kifejeződésének ellenőrzésére 2 órával a szélesztés után a táptalaj felszínére 1 ml lágyagart terítettünk, amely 50 μg/ml töménységben kanamycint tartalmazott.

3.5.11 TIS vizsgálata P_{BAD} indukcióval

A különböző transzlációt erősítő szekvenciával fúzionáltatott *gfp* riportergént hordozó transzpozon mutáns *E. coli* HB101 törzseket kanamycinnel kiegészített LB tápoldatban éjszakán keresztül szaporítottuk. Centrifugálást követően, a baktérium üledéket újból szuszpendáltuk és 10^3-10^4 cfu/ml sűrűségűre hígítottuk, 0,2% (13,3 μM) D-Arabinózzal kiegészített LB tápoldatban. A 37 ºC-on szaporított tenyészetekből a szaporodás 22. órájáig 2 óránként, utána a 48. órában vettünk mintákat. A baktériumok előkészítését és spektrofluoriméterben a GFP által kibocsátott jel mérését, a 3.5.9 pontban leírtakkal azonosan végeztük. A baktériumok szaporodását a fluoreszcencia mérésekkel egy időben vett minták, hígítási sorban, LB táptalajra történő szélesztésével határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Promóter kereső IVET plazmidok (pIviGK, pIviGG és pIviGKIII) készítése

A célkitűzésben szereplő, a baktériumok széles körében alkalmazható IVET promoter kereső plazmidok megtervezése során a következőket vettük figyelembe: (i) a baktériumok széles körében alkalmazható riportergének révén biztosítsák a szigorú *in vivo* és *in vitro* szelekciót, (ii) hatékonyan szolgálják a kialakított génkönyvtár vizsgálhatóságát és (iii) variálhatóságát.

E szempontok alapján az új plazmidok, (i) a vizsgálandó baktérium auxotróf mutációját koplementáló riportergén helyett, antibiotikummal szembeni rezisztenciát biztosító riportergént tartalmaznak, melyeknek (ii) 5' nemkódoló régiójuk, a szelekció hatékonyságát biztosító transzlációs erősítő szekvenciákkal, és transzlációs stop kodonokkal vannak kiegészítve és (iii) a klónozóhelyek könnyű variálhatóságával lehetővé teszik a rendszertanilag távoli fajok elemezhetőségét.

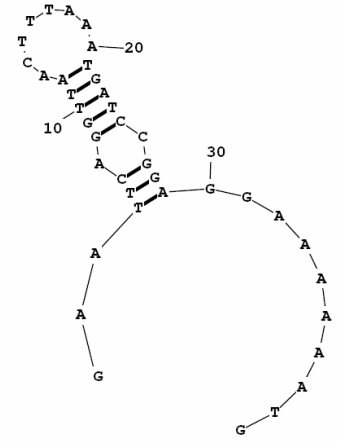
4.1.1 Riportergének előállítása

Az IVET kétszeres szelekciójához szükséges *gfp-km* és *gfp-gm* riportergén párokat az alábbi módon készítettük. Az első lépésben az *aphA3* és az *accA1* 5' nem kódoló régióinak átrendezésével azok promóter nélküli származékait készítettük el, melyek a továbbiakban *kmS/R* és *gmS/R* néven szerepelnek. A gyakorlatban ezt nested PCR technikával valósítottuk meg. Ennek során pAG408 mintáról a GMP1fw /GMSrv és KMP1fw/ KMSrv primer párokkal végzett első PCR termékei (*gmS/R'* és *kmS/R'*) egy második PCR minta DNS fragmenseként szolgáltak, ahol a P2fw primer mellett a GMSrv illetve a KMSrv indító szekvenciákat alkalmaztuk. E második PCR termékeit *EcoR*I és *Sma*I kettős hasítást követően ligáltuk az azonos enzimekkel linearizált pBluescriptKS plazmiddal (10. ábra, 5., 6. lépései). Ez utóbbi saját P_{Lac} promóteréről kifejezett *gmS/R*, illetve *kmS/R* riporter gén kazetták biztosították a gentamicin illetve kanamycin rezisztens *E. coli* DH5α/λ *pir* transzformánsok szelekcióját.

A két antibiotikum rezisztenciagén a fenti úton nemcsak az önálló transzkripciójukhoz szükséges régiójukat vesztették el, de egyben transzlációt erősítő szekvenciához is jutottak.

Az általunk újonnan tervezett TIS (Transzlációt Indító Szekvencia) enhancer, az 5'-GAATTCAGGTTAACTTTAAATGATCCGGAGGAAAAAATG, mely e riporter gének 5' nem kódoló régiójába került, több lényeges sajátsággal rendelkezik. Egyrészt tartalmazza a T7 bakteriofág 10 génjének, 5'-TTAACTTTA, ε transzlációt erősítő régióját (Olins és Rangwala, 1989), másrészt az 5'-TGATCC transzláció-megindítást kezdeményező hely (translation-initiation promoting site, TPS) szekvenciát. Ez utóbbi minden erősen kifejeződő

baktériumgénről átírt mRNS 5' régiójában szerepel (Thanaraj és Pandit, 1989). Az előző két enhancer az 5'-GGAGGAA Shine-Dalgarno szekvenciától (RBS, ribosome binding site, Gold et al., 1981) upstream (5' irányban) foglal helyet. Az RBS és a riporter gének ATG transzlációs kezdő kodonja között három adenozin nukleotid van, melyek az RBS utolsó adenozinjaival együtt az ideálisnak tekintett bázisösszetételt és távolságot biztosítják (Hongyun et al., 1994). A mRNS másodlagos szerkezete, vagyis a nem szomszédos nukleotidok egymással alkotott másodlagos kötéseiből adódó térszerkezete nagymértékben befolyásolja a transzlációt (Olins és Rangwala, 1989). A hatékony transzlációt segíti elő az „RNA stucture" (version 4.11, http://128.151.176.70/RNAstructure.html, Mathews et al., 2004) segítségével ellenőrzött teljes hosszúságú TIS régió azon tulajdonsága is, hogy kis szabadenergiájú (-2,6 kcal/mol) másodlagos szerkezetet vesz fel (3. ábra).



3. ábra

A TIS (Transzlációt Indító Szekvencia) mRNS másodlagos szerkezete, „RNA stucture" segítségével modellezve.

A riportergén párok elkészítésének második lépéseként a 650 bp hosszúságú *gfp* gént izoláltuk, a pAG408 *Kpn*I és *EcoR*I kettős emésztésével. Ez a DNS fragmens tartalmazza az *atpE* transzlációs erősítő szekvenciát is a *gfp* struktúrgén 5' nem kódoló régiójában (McCarthy et al., 1985; McCarthy et al., 1986; Schauder et al., 1987). A különálló antibiotikum rezisztencia és *gfp* riportergének, a pBKS:gmS/R és pBKS:kmS/R plazmidok *Kpn*I és *EcoR*I hasítását követő ligálás eredményeként lettek fúzionálva (10. ábra, 7., 8. lépései). Azokat a transzformáns E. *coli* DH5α/λ *pir* telepeket különítettük el, melyek szelektív LB táptalajon szaporítva a gentamicin, illetve kanamycin rezisztens fenotípus mellett, rövid idejű (kb. 5 másodperc) UV transzilluminátorral történő megvilágítás során élénk-zöld fluoreszkáló fényt bocsátottak ki. Ez a tulajdonság szintén a pBluescriptKS klónozó vektor P_{Lac} promóteréről megvalósuló transzláció eredményét mutatta. Az így kialakított riportergén párokat a pBKS:gfp-gmS/R és a pBKS:gfp-kmS/R plazmidok

tartalmazták. A *gfp-gmS/R* és *gfp-kmS/R* riportergén párok irányát PCR segítségével ellenőriztük, a GFP1fw és a GMSrv illetve a KMSrv primer párok felhasználásával.

4.1.2 TIS hatékonyság igazolása

A TIS transzlációt erősítő tulajdonságának igazolására a D-arabinózzal indukálható P_{BAD} promóterrel (Guzman, et al., 1995, Siegele és Hu, 1997, Khelebnikov et al., 2000) kifejezett GFP-t alkalmaztuk. Ebben a genetikai rendszerben a *gfp*-ről átírt, szabályozott mennyiségű mRNS mintáról történő transzláció mértéke fluoreszcencia méréssel meghatározható (Scholz et al., 2000). A mérések előtt elsőként a TIS-sel ellátott, illetve a csak az eredeti riboszóma kötőhellyel analóg szekvenciával kapcsolt *gfp* riportergént kellett előállítanunk. Ezt nested PCR segítségével értük el, melyben a GFP1fw és GFPrv primer párral készített első PCR termékét használtuk a második PCR minta (template) szekvenciájaként. Ez utóbbi PCR-ben a P2fw illetve a GFPnatfw primerek szerepeltek a GFPrv mellett, a TIS-el illetve az egyszerű RBS-el fúzionált *gfp* előállításában, melyek a TIS-*gfp* és RBS-*gfp* nevet kapták (4. ábra).

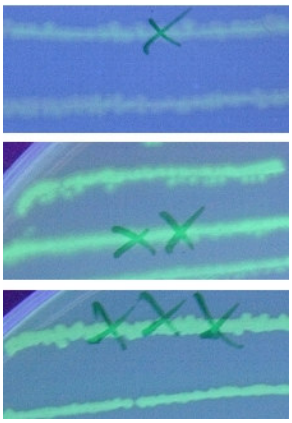
```
TIS: ggaattcaggttaactttaaatgatccggaggaaaaaatg
RBS: agaattcaaggaggaaaaaatg
pGFP :agaggatccccgggtaccggtagaaaaaatg
```

4. ábra

A pGFP-ben (U17997 / GI:603191) szereplő *gfp* eredeti riboszóma kötőhelyének összehasonlítása a TIS és RBS upstream nukleotid szekvenciákkal. Transzlációs kezdő kodon vastagon szedve, Shine-Dalgarno szekvencia (RBS) aláhúzva.

A P_{BAD} promótert az AraC aktivátorát kódoló génnel együtt szintén PCR-rel izoláltuk a pBAD18 plazmidból, az AraCfw és P_{BAD}Lrv primereket felhasználva. A *Kpn*I és *Eco*RI enzimekkel linearizált pBluescriptKS–t ligáltuk az azonos enzimekkel hasított PCR termékkel, majd a transzformáns *E. coli* DH5α/λ *pir*-ből tisztított plazmid DNS-t *Eco*RI és *Sma*I enzimekkel hasítottuk és az azonos enzimekkel hasított TIS-*gfp* és RBS-*gfp* génkazettákkal ligáltuk. A pAG408-ból *Kpn*I és *Eco*RI hasítással származó atpE-*gfp* fúziót T4 polimerázzal tompa végűre alakítottuk és az *Eco*RI-el hasított és szintén feltöltött végű, AraC-P_{BAD}-tartalmú pBluescriptKS plazmiddal ligáltuk. 0,2 W/V% D-arabinózzal kiegészített LB tápagaron az UV fény megvilágításra fényes zöld színt kibocsátó transzformánsokat szelektáltuk. A *gfp* orientációját PCR-rel ellenőriztük, az AraCfw és GFPrv primerpár alkalmazásával. A továbbiakban mini-Tn5Km (pUT) *Not*I-el hasított és T4 polimerázzal feltöltött végű származékával ligáltuk mindhárom (atpE-, TIS-, és RBS-*gfp*) *Kpn*I és *Sma*I enzimekkel kihasított *gfp* kazettát. Eredményként olyan mini-transzpozonokat kaptunk, melyek tartalmazták az indukálható promótert és a különféle *gfp* származékokat. Az ezekkel

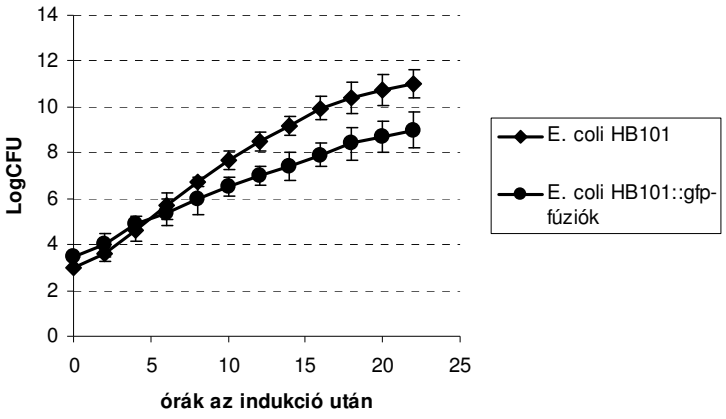
transzformált *E. coli* DH5α/λ *pir* transzformánsok a 0,2 W/V% D-arabinózzal kiegészített LB táptalajon, 24 órás, 37 ºC-on végzett inkubálás után UV fény hatására a táptalajon fluoreszkáltak (5. ábra).



5. ábra

0,2 W/V% D-arabinózzal kiegészített LB táptalajon 37ºC-on, 24 órán keresztül szaporított és UV transzilluminátoron megvilágított *E. coli* DH5α/λ pir transzformánsok fluoreszcenciája. A P_{BAD}- ot és különböző transzlációt indító, ill. erősítő szekvenciával ellátott *gfp* származékokat tartalmazó mini-Tn5Km jelölése a következő: X: RBS-*gfp*, XX: TIS-*gfp*, XXX: atpE-*gfp*.

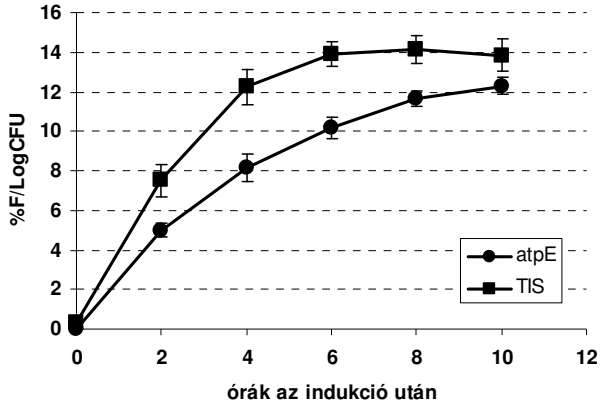
Az atpE-*gfp* és TIS-*gfp* pontos transzlációbeli különbözőségét *E. coli* HB101 transzpozon mutagenezisét követően mértük meg. A különböző transzlációt indító, illetve erősítő szekvenciával ellátott *gfp* származékokat tartalmazó mini-Tn5Km változatokat hordozó transzpozon mutáns törzsekből három-három független mutagenezisből származó 1-1 telepet vizsgáltunk párhuzamosan. A P_{BAD} indukcióját követően a mini-Tn5Km-mutáns baktériumok szaporodása lassúbb lett a GFP-t nem termelő, vad típusú törzshöz képest (6. ábra).



6. ábra

A P_{BAD}-ot és különböző transzlációt indító szekvenciával ellátott *gfp* származékot hordozó mini-Tn5Km tartalmú transzpozonos mutáns *E. coli* HB 101 törzsek és a vad típusú *E. coli* HB 101 szaporodási görbéinek különbözősége a D-arabinózzal történő indukció után. Az atpE-*gfp*-t és TIS-*gfp*-t képviselő mutáns szaporodási diagramja hasonló volt, valamint a vad típusú törzséhez képes is hasonló különbözőséget mutattak.

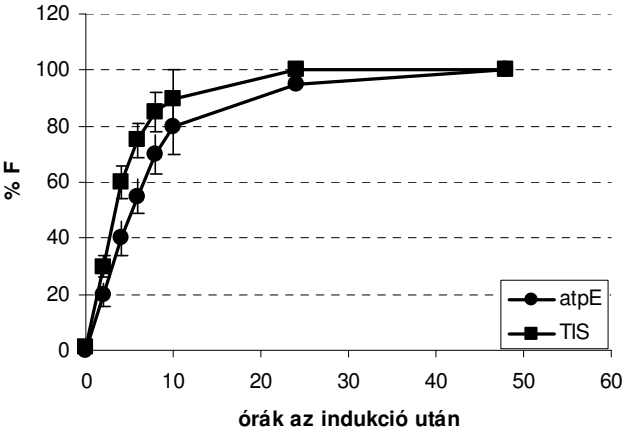
Az indukciót követő 4-6. óra között különbséget találtunk a GFP kifejezésében. Ebben az időközben a legnagyobb fluoreszcencia értékhez képest az atpE-*gfp* 40-55%-ot, míg a TIS-*gfp* 60-75%-ot ért el (7. ábra).



7. ábra

Az atpE-*gfp*-t és TIS-*gfp*-t tartalmazó transzpozon mutáns *E. coli* HB 101 törzsek fluoreszcencia mértékének, a szaporodási ütem arányában történő növekedése az időben. (%F, önkényes fluoreszcencia mérték, ahol a 48. órában mért érték képviseli a 100%-ot)

A 22. órától a fluoreszcencia értékek közel kiegyenlítődtek, majd a 48. órában a mért fluoreszcencia abszolút és egymáshoz viszonyított értéke is azonos szintre jutott (8. ábra).



8. ábra

Az atpE-*gfp*-t és TIS-*gfp*-t tartalmazó transzpozon mutáns *E. coli* HB 101 törzsek D-arabinózzal történő indukciója utáni fluoreszcencia kinetikája (%F, önkényes fluoreszcencia mérték, ahol a 48. órában mért érték képviseli a 100%-ot).

Az eredményekből látható tehát, hogy a TIS hatására, azonos szaporodási dinamika mellett a promóter indukcióját követő 6-8. óráig több GFP termelődött, mint az atpE transzlációs erősítő jelenlétében. Ezzel együtt a két transzlációt erősítő szekvencia 48 órán belül azonos mértékben serkentette a GFP termelését.

4.1.3 MCSII szintézise

Az újonnan szerkesztett plazmidok alkalmazhatósága érdekében több restrikciós endonukleáz hasító helyet tartalmazó klónozóhelyet készítettünk, amely egyéb tulajdonságai révén egyedi vonásokat ad a pIviGK és pIviGG plazmidoknak.

Az MCSII szintetikus szekvenciához (9.árba, GeneBank acc. number DQ077710), az MCSIIs és MCSIIas hibridizációját követő, 3MCSfw és 4MCSrv primerpárt felhasználó PCR reakcióval jutottunk. A reakció termékeit 4% Amplisize (Ammersham) agaróz gélben választottuk el és a 93 bp hosszúságú DNS fragmenst izoláltuk. Az MCSII központjában egy, az *Nco*I, *Xba*I és *Spe*I restrikciós endonukleázok felismerő helyeit tartalmazó klónozóhely van (MCS, Multiple Cloning Site). Az MCS-t két oldalról a ritkán hasító *Pac*I felismerő helye veszi közre, amit upstream irányban (5' felé) az M13/pUC -20, downstream irányban (3' felé) az M13/pUC -26 szekvenáló primer-ek komplementerei szegélyeznek.

gtaaaacgacggccagt*ttaattaa*<u>ccatggtctagaactagt</u>*ttaattaa*gtcatagctgtttcctgggtacc

9. ábra

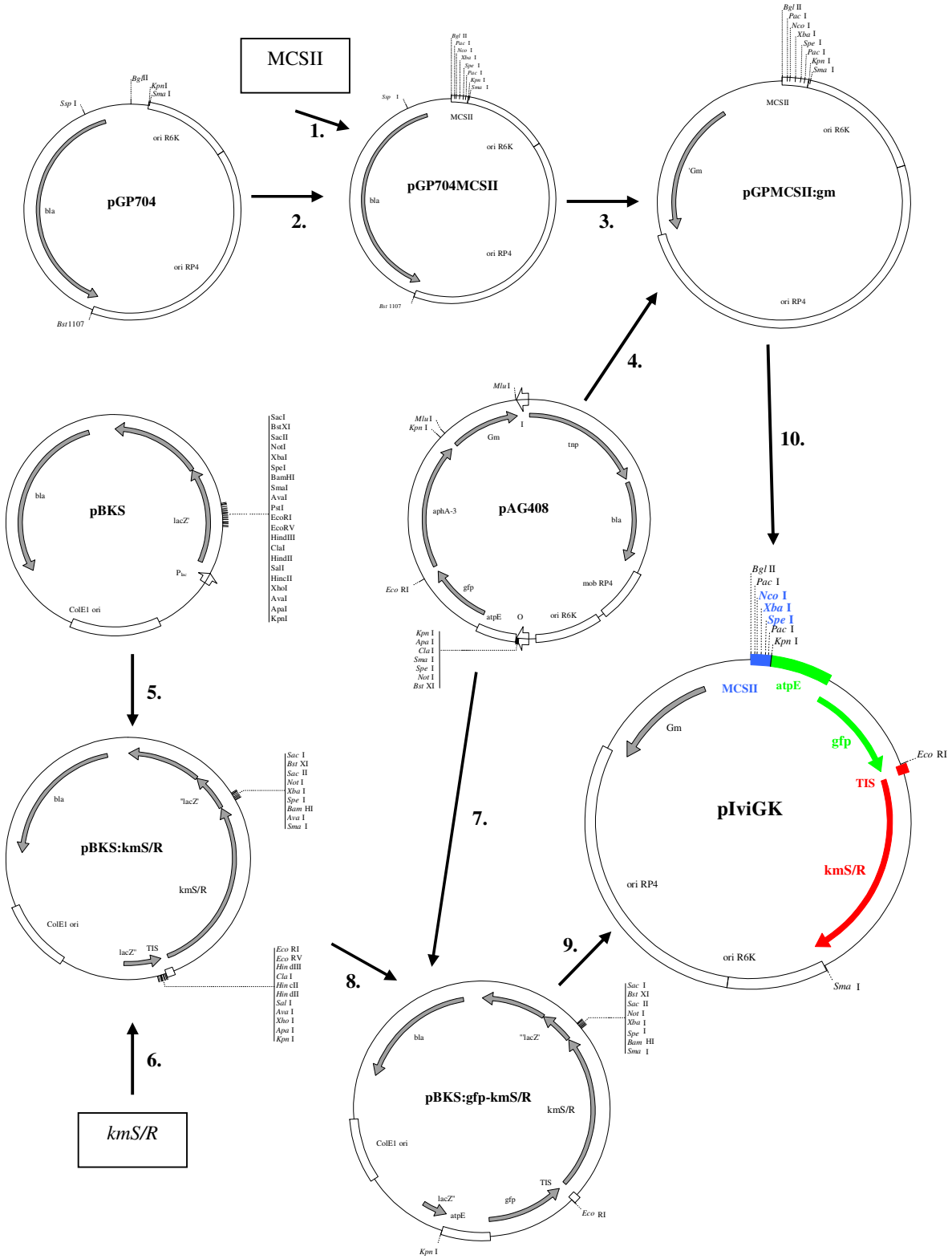
Az MCSII nukleotid sorrendje. aláhúzott szekvencia: MCS, Multiple Cloning Site, klónozóhely: *Nco*I, *Xba*I és *Spe*I; dőlt betűkkel jelölve: ritkán hasító *Pac*I felismerő helyek, szaggatott vonallal aláhúzva: M13/pUC -20 és M13/pUC -26 szekvenáló primerek komplementerei

4.1.4 pIviGK és pIviGG összeállítása

A *Bgl*II és *Kpn*I kettős emésztéssel linearizált pGP704 suicide plazmid és az azonos enzimekkel hasított MCSII szintetikus polilinker szekvencia ligálásának eredménye a pGPMCSII volt. (10. ábra, 1., 2. lépései)

A pAG408, *Mlu*I hasításával *az accA1* gentamicin rezisztencia gént, míg a plazmid *EcoR*I és *Kpn*I kettős hasításával az *aphA3* kanamycin rezisztencia gént izoláltuk. Az előző gént, mint 600 bp, az utóbbit mint 750 bp méretű fragmenst izoláltuk agaróz gélből. Mindkét markergén 5' és 3' túlnyúló végeit tompa végűre töltöttünk fel T4 polimerázzal. A génkazettákat az *Ssp*I és *Bst*1107I kettős emésztéssel linearizált pGMCSII plazmiddal ligáltuk (10. ábra, 3., 4. lépésie). A ligátumokkal transzformált *E. coli* DH5α/λ pir gentamicint illetve kanamycint tartalmazó szelektív LB táptalajon fejlődő telepei a pGRMCSII:gm és pGMCSII:km plazmidokat tartalmazták. A rezisztencia markergének, plazmidokban mutatott irányát PCR segítségével határoztuk meg, a GMP1fw/ PPLUrv és KMP1fw/ PPLUrv primer párok felhasználásával.

Végül a riportergén párokat a pBKS:gfp-gmS/R és pBKS:gfp-kmS/R plazmidokból *Kpn*I és *Sma*I hasítással izoláltuk és az azonos enzimekkel linearizált pGPMCSII:gm és pGPMCSII:km plazmidokkal megvalósított ligálásuk eredményeként keletkeztek a 4,5 kbp méretű pIviGK és pIviGG plazmidok. (10. ábra, 9., 10. lépései)



10. ábra; pIviGK előállítása

1. MCSII/ *Bgl*II+*Kpn*I; 2. pGP704/ *Bgl*II+*Kpn*I; 3. pGP704MCSII/*Ssp*I+*Bst*1107I; 4. pAG408/*Mlu*I (*aacA1*)+T4 polimeráz; 5. pBKS/*Eco*RI+*Sma*I; 6. *kmS/R*/*Eco*RI+*Sma*I; 7. pAG408/*Kpn*I+*Eco*RI (*gfp*); 8. pBKS:*kmS/R*/*Kpn*I+*Eco*RI; 9. pBKS:*gfp-kmS/R*/ *Kpn*I+*Sma*I (*gfp-kmS/R*); 10. pGPMCSII:gm/*Kpn*I+*Sma*I;

bla, ampicillin rezisztencia gén; ColE1 ori, pMB1 replikációs origó; *lacZ*, β-galaktozidázt kódoló gén; TIS, transzlációt indító szekvencia

Az *Nco*I, *Xba*I és *Spe*I hasítóhelyek alkalmasak génkönyvtár létesítésére. Az MCSII és TIS régiók transzlációs stop kodonokat tartalmaznak a három leolvasási keretben.

4.1.5 pIviGKIII készítése

A klónozóhely bővítéséhez az MCSII belső szakaszát alkotó MCS-t kicseréltük az MCSIII, 5'–CCATGGTGATCACTGCAGTACTATCGATCCTCAGGACTAG szintetikus DNS szekvenciára. Ehhez a pGPMCSII:gm és az MCSIIIs és MCSIIIas hibridizációjának termékét *Nco*I és *Spe*I enzimekkel hasítottuk és egymással ligáltuk. Az így kialakított pGPMCSIII:gm plazmidot *Kpn*I és *Sma*I enzimekkel linearizáltuk és a pBKS:gfp-kmS/R plazmidból, azonos enzimekkel kihasított *gfp-kmS/R* riportergén rendszerrel ligáltuk. Az új pIviGKIII plazmid, hét restrikciós endonukleáz hasító helyével (*Nco*I, *Bcl*I, *Pst*I, *Sca*I, *Cla*I, *Eco81*I, *Spe*I) a plazmid változatosabb felhasználását biztosítja.

4.2 pIviGK alkalmazása

4.2.1 Promóter kereső génkönyvtár készítése

Az IVET promóter keresési eljárás sikere nagymértékben függ a vizsgált baktériumból készített génkönyvtár megbízhatóságától. Egy klóntárnak képviselnie kell a teljes genomot, vagyis minden szekvenciának azonos valószínűséggel kell benne jelen lenni.

Az IVET plazmid vektorok nem rendelkeznek olyan markerekkel, amelyek az inszert jelenlétéről tájékoztatnának (ilyenek pl.: pBluescript KS: *lacZ*; pBR322: Tc^R). Az inszerttől upstream nem is tartalmazhatnak semmilyen RNS polimeráz kötőhelyet, hiszen annak jelenléte meghiúsítaná a klónozott promóterek felismerését. Ezek figyelembevételével a génkönyvtár előállításához olyan technikát kell választani, hogy inszertet nem tartalmazó plazmid vektorok gyakorlatilag ne keletkezzenek.

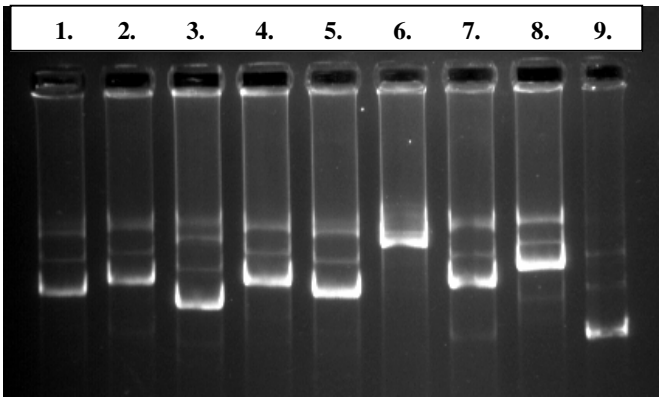
Ezek mellett a génkönyvtárat alkotó genomi DNS fragmensek mérettartománya is befolyásolja az eljárás eredményességét. Minél kisebb mérettartományba esik az inszert, annál kisebb eséllyel játszódik le a homológ rekombináció. Viszont minél hosszabb fragmensek kerülnek a génkönyvtárba, annál valószínűbb, hogy transzkripciós terminátor szekvencia fordul elő bennük, illetve, hogy a klónozott genomi szakasz homológ rekombinációja kétszeres crossing-over útján játszódik le. Ennek révén a plazmid nem integrálódik, így – riporter gének hiánya miatt – az IVET szelekció nem teljesülhet. A génkönyvtár kialakításának vizsgálataiban ezért három molekulamérettartományba eső fragmentumokat használtunk, ezek a genomi DNS hasításából származó 500-1000 bp, 1000-2000 bp és 2000-3000 bp frakciók voltak.

Több klónozási eljárást próbáltunk ki, melyekhez különböző, a hasítással közvetlenül, illetve részleges feltöltés után kialakítható komplementer ragadós végeket adó restrikciós enzimek lehetséges kombinációit használtuk fel (4. táblázat).

4. Táblázat; A pIviGK, MCS –beni restrikciós enzim hasító helyek közvetlen, illetve részleges feltöltés után történő alkalmazásának lehetséges kombinációi

MCS-ben lévő restrikciós endonukleáz hasító hely	Komplementer	Részleges feltöltés	
		MCS	Inszert
*Nco*I	*Pag*I	+ dCTP, dATP	*Alw*44I (*Apa*LI) + dTTP, dGTP
*Xba*I	*Spe*I, *Nhe*I	+ dCTP, dTTP	*Hind*III + dATP, dGTP
*Spe*I	*Xba*I, *Nhe*I	+ dCTP, dTTP	*Hind*III + dATP, dGTP

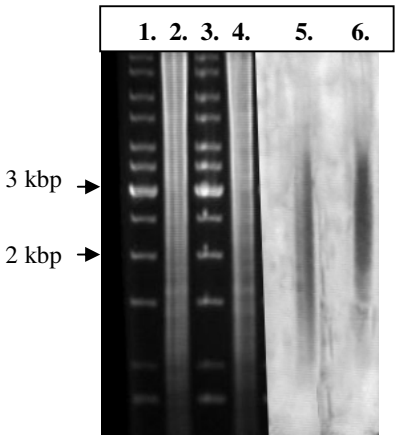
A klónozási eljárások között szerepelt a genomi DNS és a pIviGK azonos restrikciós endonukleáz hasításából (*Xba*I), illetve komplementer enzimek használatából (*Spe*I-*Nhe*I), valamint a fentiek alkalikus foszfatázzal (CIAP, SAP) kiegészített kezeléséből származó elegyeinek ligátumaival transzformált *E. coli* DH5α/λ pir elemzése. A csak részben komplementer ragadós (cohesive) végeket adó restrikciós endonukleázokkal hasított és megfelelő nukleotidokkal részlegesen feltöltött vektor- és inszert DNS, vagyis a pIviGK vektor *Xba*I és a genomi DNS *Hind*III hasítását követő részleges feltöltés alkalmazása adta a legjobb eredményt. Ezt a különböző mérettartományba eső inszertet tartalmazó pIviGK-val transzformált *E. coli* DH5α/λ pir, random kiválasztott telepeiből tisztított plazmid DNS-ek gél elektroforézis vizsgálata mutatta (11. ábra).



11. ábra

Az IVET génkönyvtár hatékonyságának ellenőrzése plazmid izolátumok gélelektroforetikus mintázata alapján.
A *P. viridiflava Hind*III-al hasított és 2-3 kbp mérettartományba tartozó véletlenszerű genom fragmenseit tartalmazó pIviGK származékokat hordozó *E. coli* DH5α/λ pir törzsekből tisztított plazmid DNS gél elektroforézis mintázata.
1-8.: inszertet tartalmazó pIviGK származékok, 9.: kontroll, pIviGK

Minden különböző transzformánsból izolált plazmid tartalmazott inszertet, valamint azok mérete egy mérettartományba esett (11. ábra). Ezek mellett, azt, hogy a génkönyvtár megfelel a véletlenszerűségnek, további Southern hibridizáció bizonyítja (12. ábra). A hibridizációhoz a transzformáns *E.coli* DH5α/λ pir 10^3 telepéből plazmid DNS-t izoláltunk és DIG módszerrel jelöltünk. A kevert minta próbaként szolgált a *P. viridiflava* genomi DNS *Hind*III –al hasított és gélelektroforézissel elválasztott fragmenseivel végzett hibridizációban.

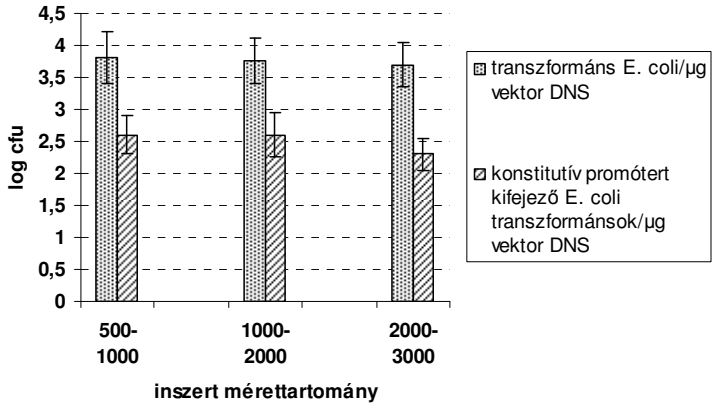


12. ábra

Az IVET génkönyvtár véletlenszerűségének ellenőrzése Southern hibridizációval.
2., 4.: A *P. viridiflava Hind*III-al hasított genom DNS-ének gél elektroforézis mintázata.
5., 6.: A *P. viridiflava Hind*III-al hasított genomból izolált 2-3 kbp mérettartományba tartozó fragmenseket tartalmazó pIviGK származékokat hordozó *E. coli* DH5α/λ pir 10^3 telepéből tisztított plazmid DNS-el végzett Southern hibridizáció. Mintaként a *P. viridiflava Hind*III-al hasított genom DNS szolgált.
1., 3.: DNS molekula marker

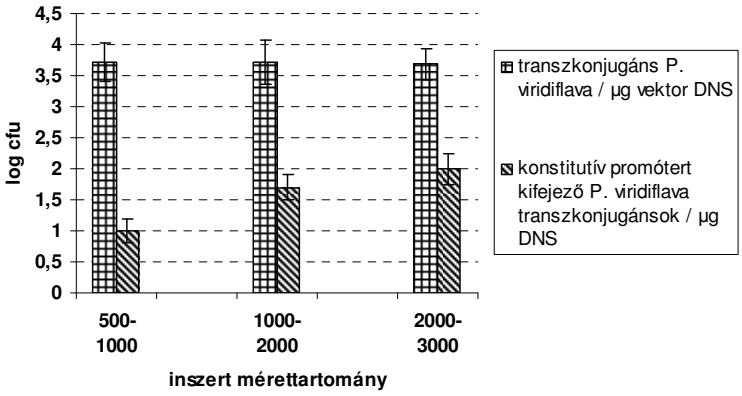
A továbbiakban háromszülős keresztezéssel, *P. viridiflava* –ba vittük át a promóter kereső génkönyvtárat.

A különböző mérettartományokba eső genomi DNS fragmensekkel készített génkönyvtárakból a 2000-3000 bp frakciót választottuk ki, mert bár nem ez a könyvtár tartalmazta a legtöbb *E. coli*-ban kifejeződő konstitutív promótert (13. ábra), de a *P. viridiflava*-ban lejátszódó homológ rekombináció gyakorisága, így a génkönyvtár előállításának sikeressége szempontjából ez mutatkozott ideálisnak (14. ábra, 15. ábra). Az összes transzkonjugáns *P. viridiflava* telepek számának és az ezek közül konstitutív promótert tartalmazók számának összehasonlítása azt bizonyította, hogy a 2-3 kbp mérettartományba eső inszert esetén, a konstitutív promótert kifejező *P. viridiflava* klónok száma kétszerese a 0,5-1 kbp mérettartományba eső inszertet tartalmazó klónokénak (14. ábra). Az előzőeket összevonva, ha az összes transzkonjugáns *P. viridiflava* számát viszonyítjuk a transzformáns *E. coli* mennyiségéhez és a konstitutív promótert tartalmazó *P. viridiflava* arányát a konstitutív promótert kifejező *E. coli* transzformánsokhoz képest akkor eredményként azt kapjuk, hogy az összes transzkonjugáns *P.viridiflava* és ezen belül a konstitutív promótert kifejezők legbiztosabban (1-hez legközelebb) a 2-3 kbp mérettartományba eső inszert esetén közelítették meg a transzformáns, illetve konstitutív promótert tartalmazó *E. coli* számát (15. ábra).



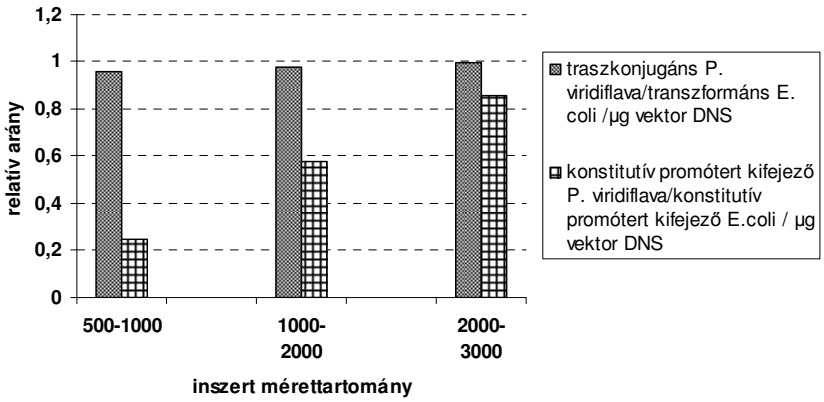
13. ábra

A háromféle mérettartományba eső *P. viridiflava Hind*III-al hasított genom fragmenseit tartalmazó pIviGK származékokban előforduló konstitutív promóterek száma és az összes transzformáns *E. coli* száma. (1µg pIviGK-ra vonatkoztatva)



14. ábra

A háromféle mérettartományba eső *P. viridiflava Hind*III-al hasított genom fragmenseit tartalmazó pIviGK származékokat hordozó *P. viridiflava* transzkonjugánsok száma és a *P. viridiflava* transzkonjugánsokban előforduló konstitutív promóterek száma. (1µg pIviGK-ra vonatkoztatva)



15. ábra

A háromféle mérettartományba tartozó *P. viridiflava Hind*III-al hasított genom fragmanseit tartalmazó pIviGK származékokat hordozó transzkonjugáns *P. viridiflava* aránya, a transzformáns *E. coli* mennyiségéhez képest és a konstitutív promótert tartalmazó *P. viridiflava* aránya a konstitutív promótert kifejező *E. coli* transzformánsokhoz képest.

4.2.2 Paprikatermés fertőzési eljárásának kidolgozása

Az *in planta* antibiotikumos szelekció félrevezető eredményt adhat, ha a fertőzési, illetve antibiotikum utókezelési eljárást helytelenül választjuk meg és az antibiotikum nem jut el minden vizsgálandó baktériumhoz. Ezért ki kellett választanunk a legmegfelelőbb növénykezelési eljárást.

A zöldpaprikatermés fertőzéséhez használt *P. viridiflava* baktériumot, valamint az *in vivo* szelekcióhoz szükséges antibiotikumot többféle fertőzési–utókezelési eljárás alkalmazásával juttattuk a növénymintákba. Az eljárások különböztek a fertőzött paprika darabok alakjában és méretében, a fertőzés módszerében, illetve a fertőző baktérium szuszpenzió töménységében, valamint az antibiotikum töménységében, bejuttatásának módszerében és az antibiotikum kezelésnek a fertőzés időpontjához viszonyított időpontjában.

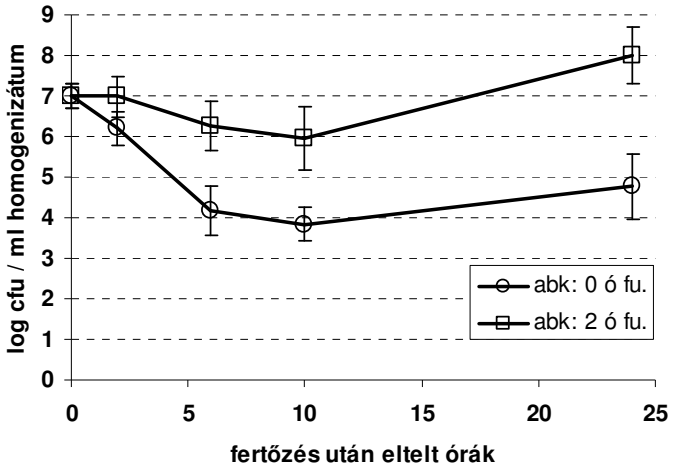
Elsőként a fertőzési és utókezelési eljárások vizsgálatát végeztük el. A paprikatermésből dugófúróval kimetszett 1 cm átmérőjű korongokkal végzett három különböző fertőzési eljárás és a fertőzés után két órával végzett antibiotikum kezelés, makroszkópikusan, 24 óra elteltével látható hatásait vizsgáltuk (16. ábra). A fertőzési és antibiotikum kezelési eljárások a következők voltak: (i) baktérium szuszpenzióba/antibiotikum oldatba merítés, (ii) ugyanez, de vákuummal infiltrálva és (iii) a baktérium szuszpenzió, majd az antibiotikum oldat fecskendőből injektálása. Az alkalmazott baktérium szuszpenzió minden esetben 10^7 cfu/ml sűrűségű volt, a kanamycin oldatot 50 µg/ml töménységben alkalmaztuk. A mintákat 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten 90% relatív nedvességtartalom mellett inkubáltuk. A kísérlet alapján a vákuumos fertőzési és utókezelési eljárás alkalmazása mellett döntöttünk.

16. ábra

Paprikakorong fertőzési eljárásainak összehasonlító vizsgálata. Szaggatott vonal alatt kanamycin kezelés nélküli kontroll. (uk.: utókezelt, 50 µg/ml kanamycin antibiotikumos utókezelés)

A vákuumos fertőzést követő vákuummal végzett antibiotikum kezelés vizsgálata során az alkalmazott antibiotikum oldat töménységének és a fertőzéstől az utókezelésig szükséges időnek a meghatározására került sor. A kísérletekben 50 és 150 µg/ml töménységű kanamycin

oldatot használtunk, a fertőzéssel egy időben és két órával később. Minden kísérletet háromszori ismétlésben végeztünk el, a fertőzött paprikamintákat mozsárban homogenizáltuk és 1-1 ml 10 mM foszfát pufferben (pH 7,0) szuszpendáltuk. Kontrollként a *P. viridiflava* különböző miniTn5-Km transzpozon mutáns származékai szolgáltak (Czelleng A., nem közölt eredménye), melyek konstitutívan fejezték ki a kanamycin rezisztenciagént. A fertőzéssel egy időben alkalmazott kanamycin kezelést a kontroll törzsek a fertőzést követő tizedik órára csak 10^{-3} gyakoriságban élték túl (17. ábra). Ezzel szemben, ha a kanamycin kezelést a fertőzést követő második órában alkalmaztuk, akkor az előzővel azonos időpontra ugyanez a baktériumszám csökkenés mindössze 10^{-1} nagyságrendben következett be (17. ábra). Az alkalmazott antibiotikum oldat töménysége nem befolyásolta a kísérlet eredményét.

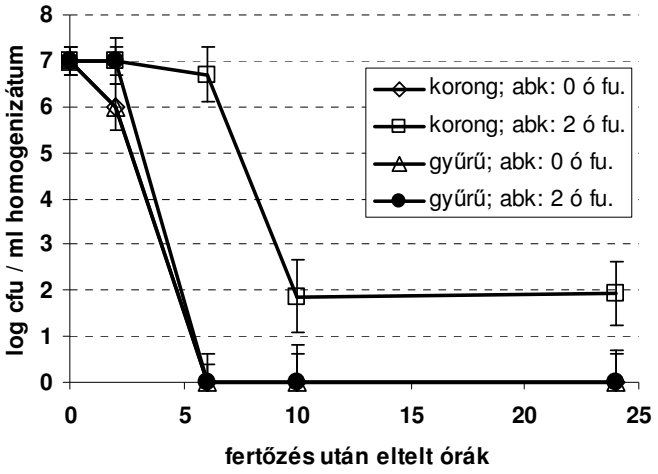


17. ábra

Kanamycin utókezelés hatása a kanamycin rezisztenciát hordozó (mini-Tn5Km) mutáns *P. viridiflava* törzsekre, amennyiben a fertőzéssel egy időben, illetve két órával azt követően történt.
abk: antibiotikum utókezelés, ó: óra, fu: fertőzés után

A kanamycinre érzékeny *P. viridiflava* vad típusú törzse jelen kísérleti körülmények között, vagyis paprika korong, 10^8 cfu/ml töménységű baktérium szuszpenzióval, vákuumban történő fertőzése és 50-150 µg/ml töménységű, szintén vákuummal történő kanamycin kezelése mellett 10^{-5} gyakorisággal élte túl az antibiotikum kezelést, ha az 2 órával a fertőzés után következett be (18. ábra).

Két különböző átmérőjű dugófúróval a paprikakorongból 0,5 cm szélességű gyűrűt lehetett kimetszeni. Ebben az esetben a fertőzés után 2 órával bekövetkező kanamycin kezelésnek a fertőző baktériumok között csak legfeljebb 10^{-7} gyakoriság alatt volt túlélője (18. ábra). Ezek szerint a paprikagyűrű alkalmazása biztosítja a fertőző baktériumok teljes szelekcióját, ha a fertőzés 10^7 cfu/paprikagyűrű nagyságrendig történik.

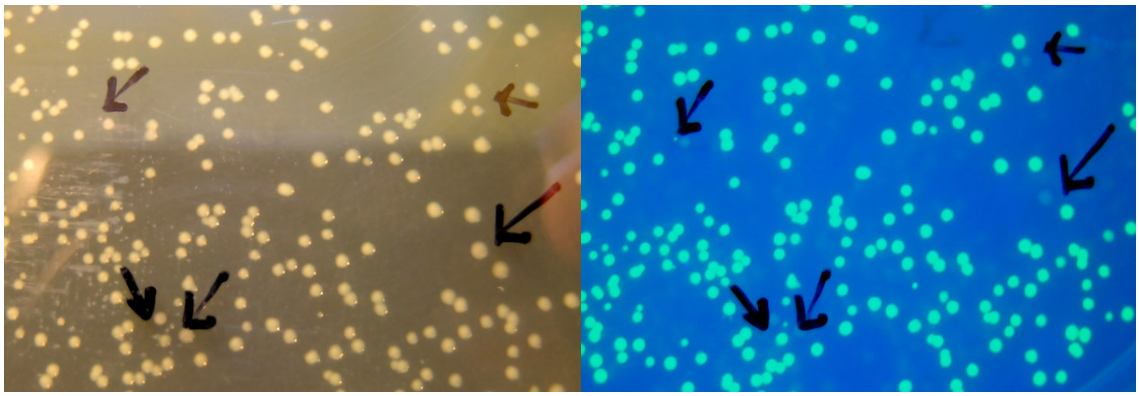


18. ábra

Kanamycin utókezelést túlélő vad típusú *P. viridiflava* baktériumok száma, paprikakorong, illetve paprikagyűrű használata esetén, a fertőzéssel egyidejűleg illetve az azt követő második órában elvégzett antibiotikum utókezelést alkalmazó kísérletben. (abk: antibiotikum utókezelés, ó: óra, fu: fertőzés után)

4.3 *In planta* indukálódó gének

Egyetlen fertőzött és kanamycinnel kezelt paprikagyűrűből 132, *in vivo* antibiotikum rezisztens *P. viridiflava* telepet izoláltunk, melyek közül 17 nem mutatott GFP által kibocsátott fluoreszkálást, 48 órányi LB bakteriológiai táptalajon történő inkubálás után (19. ábra).



19. ábra

IVET génkönyvtári elemek *in vitro* szelekciója 48 órával a növényből történő izolálás után (bal oldalon természetes fénnyel megvilágítva és jobb oldalon UV fénnyel átvilágítva). A nyilakkal jelzett törzsek telepei *in planta* indukálódó promótert képviselnek.

A szelektált klónokkal végzett ismételt paprikafertőzést követő kanamycin kezelést 3 klón nem élte túl, ezek a baktériumok az eredeti kísérletben az *in vivo* szelekció (10^{-7} gyakoriságban bekövetkező) hibája miatt lehettek szelektálva. A maradék 14 klónból az inszertet tartalmazó pIvGK származékokat retrotranszferrel *E. coli* DH5α/λpir–be juttattuk,

ahol azok replikatív formában maradtak fent. A *Pac*I és *Pst*I enzimekkel végzett hasítás alapján a 14 klón közül, az M13/pUC-26 szekvenáló primer segítségével, meghatároztuk 10 egyedi restrikciós mintázatot mutató inszert első 200-300 bp méretű szakaszának nukleotid sorrendjét (Czelleng et al., 2005 a.). A szekvenciák elemzése az ORF Finder használatával (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html) tíz egyedi ORF (open reading frame, nyitott leolvasási keret) azonosítását eredményezte. A kodon használatot minden esetben a *P. viridiflava* és a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 kodon használati táblázataival hasonlítottuk össze (http://www.kazusa.or.jp/codon). A riporter génekkel egyező irányban azonosított ORF -ekkel és azok *in silico* valószínűsített transzlációs termékeivel BlastN, BlastX és BlastP (BLAST: Altschul et al., 1990) elemzést végeztünk. Az eredmények azt mutatták, hogy a tíz vizsgált ORF közül kettő ismeretlen. Vagyis az NCBI BLAST adatbázisokban (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) nem volt szignifikáns nukleinsav, illetve fehérje homológja, vagy ismeretlen funkciójú terméket kódolt (Czelleng et al., 2004, Czelleng et al., 2005 a.). Az azonosított ORF-ek közül hét ismert feladatú fehérjéket kódoló génekkel mutat homológiát (5. táblázat).

5. Táblázat; *In vivo* szelektált *P. viridiflava* törzsek és az általuk képviselt ismert génekkel homológ ORF-ek (open reading frame) valamint az ismert gének feladata

Mutáns	Hasonló fehérje az adatbázisban	Feladat
IviPV-s1/1.	PSPTO2331 Deoxiguanozin-trifoszfát trifoszfohidroláz *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000	dGTP → deoxiguanozin + PPPi (szervetlen trifoszfát) reakciót katalizálja
IviPV-s1/2.	PSPTO2603 ABC transzporter, ATP-kötő/permeáz fehérje *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000	sziderofór::vas komplex receptor
IviPV-s1/3.	STM3216 az *E. coli* metil-fogadó kemotaxis fehérje I.-hez hasonló fehérje Salmonella typhimurium LT2	szerin érzékelő receptor (AAC77311.1)
IviPV-s1/4.	PPDMPEFGH 2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratáz *Pseudomonas sp.* CF600	a fenol/3,4-dimetilfenol átalakítás enzime (DmpE)
IviPV-s1/5.	PSPTO4477 a TIGR a HMM fehérje családhoz tartozónak találta, TIGR00846 K^+-függő Na^+/Ca^{2+} cserélő fehérje *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000	Ca^{2+}/H^+ cserélést katalizálja
IviPV-s1/6.	PSPTO0804 MviN membrán fehérje család *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000	vélhetően a kemotaktikus mozgásában játszik (eddig ismeretlen) szerepet
IviPV-s1/7., IviPV-s1/8.	D4461 pektát liáz (EC-number= 4.2.2.2) *Pseudomonas viridiflava*	poli-pektát bontó enzim

4.3.1 IviPV-s1/1: dGTPáz

Az IviPV-s1/1 törzs olyan ORF-riportergén fúziót tartalmaz, mely ORF homológ a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 deoxiguanozin-trifoszfát trifoszfohidrolázt (dGTPáz, EC 3.1.5.1) kódoló génjével. Ez az enzim katalizálja a dGTP→ deoxiguanozin + PPPi (szervetlen trifoszfát) reakciót (Kornberg et al., 1958, Seto et al., 1988). Az összes többi eddig megismert nukleozid trifoszfatáz olyan reakciókban vesz részt, melyek esetén Pi vagy PPi (szervetlen mono-, ill. difoszfát) szabadul fel. A dGTPáz tehát nemcsak specifikus a dGTP-re, de egyedülálló módon PPPi-t szabadít fel. Ezek mellett az enzim rendelkezik egy egyszállú-DNS-kötő (single stranded, ssDNS) hatással is (Huber et al., 1988), amelyik talán összefüggésben van az eddig nem tisztázott biológiai szerepével.

4.3.2 IviPV-s1/2: ABC transzporter

Az IviPV-s1/2 törzsben a riportergénekkel fúzióban lévő ORF homológja egy ABC transzporter, ATP-kötő/permeáz fehérjét kódol a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzsben. Ez utóbbi homológja egy a *Yersinia pestis* yersiniabactin nevű sziderofórt kódoló operonjában található gén, mely nem a sziderofór szintézisében, hanem vélhetően a vas felvételében játszik szerepet (Fetherson et al., 1999). A sziderofórok baktériumok által termelt Fe(III)-kelát képző vegyületek, melyek a vashiányos környezetben (amilyen az IC is) megfelelő vasszintet biztosítanak az azokat termelő baktériumok számára (Höfte, 1993). Mivel a vas csak azon baktériumok számára válik felvehetővé, melyek specifikus membránreceptorral rendelkeznek a saját maguk által termelt sziderofórok vassal alkotott komplexének megkötéséhez, így a szűkös környezeti tényezőkért folytatott versenyben a vashoz történő hozzájutáson túl a fajspecifikus sziderofórok előnyhöz is juttatják az azokat termelő baktériumokat (Buyer és Liong, 1986; Raaijmakers et al., 1994).

4.3.3 IviPv-s1/3: szerin érzékelő receptor fehérje

Az IviPV-s1/3 törzsben a riportergének metil-fogadó kemotaxis fehérje I családba tartozó, a *Salmonella typhimurium* LT2 szerin érzékelő receptort kódoló génjével homológ ORF-el vannak fúzióban. A kemotaxis a legtöbb flagellummal rendelkező baktérium sajátsága, mely során kémiai stimulus hatására megváltoztatják mozgásuk irányát az atraktánsok felé vagy a repellensektől távolodva. A metil-fogadó kemotaxis fehérjék, melyeket gyakran transzducereknek neveznek, valójában transzmembrán fehérjék, melyek a kemotaktikus mozgásban központi irányító szerepet töltenek be (Stock et al., 1989). A mozgás lényeges virulencia faktor egy sor kórokozó baktérium esetében. Például a *Vibrio cholerae* egy, a metil-fogadó kemotaxis fehérjéket kódoló génekkel nagy hasonlóságot mutató, génjének

mutációja nemcsak a bakterium mozgására gyakorolt negatív hatást, de annak virulenciájára is (Ottemann and Miller, 1997; Everiss et al., 1994).

4.3.4 IviPV-s1/4: DmpE

Az IviPV-s1/4 törzsben, a *Pseudomonas* sp. CF600 törzsben azonosított, 2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratázt kódoló génnel homológ ORF van fúzióban a riportergénekkel. Ez az enzim közreműködik egy hidroxilált fenol vegyület, a katekol (1,2-dihidroxibenzén) lebontásában, amelyik egyike a mikroorganizmusokra mérgező (Peres et al., 1997), növények által termelt legegyszerűbb bioaktív másodlagos metabolitoknak (Geissman, 1963). A legtöbb, növények által termelt fenolvegyület a növényi védekező rendszerek részeként a mikroorganizmusok, rovarok és a magasabb rendű növényevők elleni harcban vesz részt. A fenolok és metil-szubsztituált származékaik lebontásához szükséges enzimek számos különböző *Pseudomonas* fajnál ismertek (Dagley és Gibson, 1965; Kukor és Olsen 1991; Sala-Trapat et al., 1972; Shingler et al., 1989), így a *P*. sp. strain CF600 esetében is, mely képes egyszerű szénforrásként felhasználni a fenolt, krezolt vagy a 3,4-dimetilfenolt (3,4-dmp) is (Shingler et al., 1992).

4.3.5 IviPV-s1/5: Na^+/Ca^{2+} antiporter fehérje

Az IviPV-s1/5 törzs tartalmaz egy riportergénekkel fúzióban lévő ORF-et, melynek homológja a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzsben található és a HMM TIGR fehérje családba tartozó (TIGR00846) K^+-függő Na^+/Ca^{2+} cserével összefüggő fehérjét kódol. A sejten belüli pH- és ion homeosztázist minden élőlény különböző ionok koncentrációjának szabályozása révén éri el. A szabályozás lényegében transzmembrán ion transzportereken keresztül valósul meg. A Na^+/H^+ és Ca^{2+}/H^+ antiporterek katalizálják a membránon keresztül történő, Na^+-t H^+-ra és a Ca^{2+}-t H^+-ra cserélés folyamatát (Padan és Schuldiner 1996). Használatukkal a baktériumsejt képes megélni a változó környezet széles pH és sótartalma mellett, így a növényi intercelluláris járatokban is.

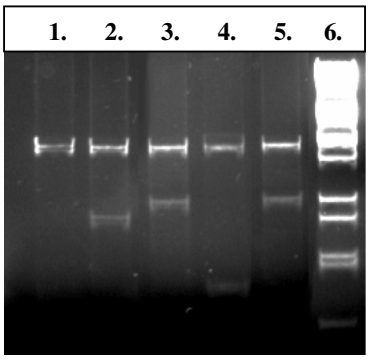
4.3.6 IviPV-s1/6: $MviN_{pv}$

A pIviGK használatával azonosított IviPV-s1/6 törzs (továbbiakban: s1/6), a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 törzsben található MviN feltételezett membrán fehérjét kódoló génnel 100% aminosav homológiát mutató ORF-et reprezentál. Ez a fehérje először MviS néven, a *Salmonella typhymurium* virulencia faktoraként került leírásra (Carsiotis et al., 1989), bár ezt követően a vele homológ fehérjéket kódoló géneket számos kórokozó, nem kórokozó, illetve növény szimbionta baktériumból is izolálták (O'Connell et al., 1998,

Rudnick et al., 2001). A fehérje feladata nem tisztázott és az e családba tartozó géneket lényegében szekvencia hasonlóságok fűzik össze (Bateman et al., 2002, Hvorup et al., 2003). Az aminosav homológia alapján, mivel ez az ORF eddig nem volt *P. viridiflava*–ban azonosítva, így az $mviN_{pv}$ nevet kapta, és a továbbiakban ezen a néven fog szerepelni.

4.3.7 IviPV-s1/7 és IviPV-s1/8: Pel

A fehérje homológiák keresése rámutatott, hogy az ismert feladatot ellátó génekkel homológ ORF-et tartalmazó nyolc törzs közül kettő, az IviPV-s1/7 és az IviPV-s1/8 (ezentúl: s1/7 és s1/8) ugyanazt az ORF-et tartalmazza két különböző méretű fragmensen, melyek egyedi restrikciós mintázatot adnak (20. ábra). Ez az ORF a *P. viridiflava* pektát liáz enzimét (PEL, EC 4.2.2.2) kódolja (Liao et al., 1988). A pektint depolimerizáló enzimek a növényi sejtfal fő összetevőjét, a pektint támadják meg. A pektát liáz – mely a poligalakturonsav α-1,4-galakturonozil kötéseit hasítja – tehető elsősorban felelőssé a gyümölcsök és zöldségek lágyrothadásos betegsége során fellépő szöveti macerációért és az ezzel együtt járó elektrolit vesztésért és sejthalálért (Mount et al., 1970, Collmer és Keen, 1986).



20. ábra

A *pel*-tartalmú pIviGK:s1/7 és pIviGK:s1/8 restrikciós mintázata, agaróz gélen elválasztva.
1.: kontroll pIviGK/*Pac*I, 2, 4.: pIviGK:s1/7 *Pac*I-el és *Pac*I+*Pst*I-el hasítva, 3, 5: pIviGK:s1/8 *Pac*I-el, és *Pac*I+*Pst*I-el hasítva, 6.: Lambda DNS/*Eco*47III+*Eco*91I molekula marker

A lágyrothadásos tünet kialakításában a *P. viridiflava* lényegi virulencia faktora a pektát liáz. Emellett azonban a baktérium számos egyéb virulenca faktort igényel a gazdanövény inváziójához, kolonizálásához. Ezek a baktérium, kórokozó „életstílusához” kapcsolódó génjei, amik a kórokozás járulékos elemeit kódolják.

4.4 Abiotikus stressz által szabályozott promóterek

A változó környezeti tényezők között élő baktériumok gyors adaptációs képességgel rendelkeznek, mely különböző stressz helyzetekben segíti őket a túlélésben. Gyakori abiotikus stresszt jelent a tápanyaghiány, a hőmérsékletingadozás, a változó pH, ozmotikus

eltérések vagy különböző mérgező vegyületek jelenléte. Ilyen körülmények között a baktériumok a genetikai potenciáljukban rejlő túlélési képességüket – elsősorban – különböző transzkripciós faktoraikkal hozzák felszínre. A transzkripció szabályozásában, vagyis a transzkripciós profil átalakításában különböző alternatív szigma faktorok (σ^{24}, σ^{28}, σ^{32}, σ^{38}, σ^{54} , Jishane et al., 1996) és egyéb, az RNS polimerázzal együtt, vagy az ellen dolgozó, elsősorban fehérjék működnek közre, mint a „cAMP-catabolite activator protein" (CAP, Silverman és Simon, 1974), H-NS, HU, DnaK, DnaJ, GrpE, Fis, Lrp és néhány quorum sensing faktor (Soutourina et al., 1999, Nishida et al., 1997, Shi et al., 1992, Osuna et al., 1995, Hay et al., 1997, Sperandio et al., 1999, Sperandio et al., 2000, Hengge-Aronis, 2002).
A baktériumok számára a növények sejtközötti járatai éppen a fentiekhez hasonló abiotikus stresszeket jelentik. Ezzel nagy mértékben hasonló környezetet nyújtanak a különböző minimál táptalajok, melyek így az IC analógiájára, a baktériumokban a kórokozással összefüggő gének kifejezését indíthatják meg.

4.4.1 Riportergén kifejezése minimál táptalajon

A különböző baktériumok eltérő igényeit más-más összetételű minimál táptalaj elégíti ki (Klement et al., 1990), ezért három különböző szénforrással (fruktóz, szacharóz, glükóz) kiegészített, három különböző összetételű minimál táptalajon (MM, M63, M9) vizsgáltuk meg a *P. viridiflava* NCAIM B.01581 törzs növekedési erélyét. A kísérletben a KB komplett bakteriológiai táptalajon fejlődő telepek számához viszonyítottuk a különböző minimál táptalajokon szaporodó baktériumtelepek számát (6. táblázat). Az eredmények alapján a glükóz tartalmú M9 táptalajt választottuk a további vizsgálatok lebonyolításához.

6. Táblázat; Különböző szénforrással kiegészített minimál táptalajokon szaporodó *P. viridiflava* telepek száma

Táptalaj	**Szénforrás** (0,4 g/l)	**Baktérium (cfu/petricsésze)** (háromszori ismétlés átlagában, +/-szórás)
MM	Fruktóz	—
	Szacharóz	Értékelhetetlen, kis kolóniák
	Glükóz	10^2 +/- 0,23
M63	Fruktóz	—
	Szacharóz	$2x10^2$ +/- 0,16
	Glükóz	$5x10^2$ +/- 0,12
M9	Fruktóz	10^2 +/- 0,11
	Szacharóz	$5x10^2$ +/- 0,08
	Glükóz	10^3 +/- 0,06
KB	Glicerol	10^3 +/- 0,05

Az autofluoreszcens sziderofórokat termelő baktériumok, amilyen a *P. viridiflava* is (Bultreys és Gheysen, 2000), vashiányos minimál táptalajon fejlődve nagy mennyiségben termelnek 360-390 nm hullámhosszúságú UV fény hatására fluoreszkáló vaskelát képző vegyületeket (Bultreys et al., 2001). Mivel a pIviGK *gfp* riportergénjének terméke alapján történő génkifejeződés vizsgálat éppen a fenti hullámhossztartományba eső fényt sugárzó transzilluminátorral történik, ezért az izolált *ivi*-gének minimál táptalajon történő kifejeződésének elemzéséhez a *kmS/R* riportergént alkalmaztuk. A vizsgálatban szereplő *ivi*-gén promótere által kifejezett *kmS/R* a baktériumnak kanamycinnel szemben ellenálló fenotípust ad. A kettős agarréteg technikát alkalmazó kísérletben az IviPV-s1/1-IviPV-s1/8 törzsek mindegyike kanamycin rezisztenciát mutatott minimál táptalajon, míg LB komplett bakteriológiai táptalajon csak az IviPV-s1/5 és IviPV-s1/6 törzsek. A többi törzs esetében csak a kísérlet negyedik napjára jelentek meg apró telepek, a kontroll (antibiotikum tartalmú lágyagar terítés nélküli) LB táptalajon fejlődött telepek számához viszonyított 10^{-5}-10^{-6} gyakoriságban. Ez az antibiotikum bomlásával, illetve a rezisztencia génnek, a DNS replikációja során végbemenő, vagy egy távoli promóterről történő „véletlen” átírásával magyarázható.

4.4.2 Az **mviN$_{pv}$** *promóterének* **in silico** *elemzése*

Az Ivi-törzsek *in vitro*, azaz LB tápagaron megvalósított szelekciója során azokat a telepeket válogattuk ki, melyek az inkubálás 48 órája alatt nem halmoztak fel szabad szemmel látható jel kibocsátására alkalmas mennyiségű GFP-t. A 4.4.1 alfejezetben leírtakkal korrelálva, két törzs, az IviPV-s1/5 és IviPV-s1/6 egy nappal később, az *in vitro* szelekció 72. órájára elégséges GFP termelése folytán UV fényű gerjesztés hatására zöld fluoreszkáló fény kibocsátására vált képessé. Ezekben a riportergén pár vélhetően az LB táptalajon alap aktivitású promóterekkel van fúzióban.

Az MviN$_{pv}$ fehérjét képviselő s1/6 törzsben a riportergénekkel fúzióban lévő promóter elemzése során több ismert transzkripciós faktor konzervatív kötőhelyének jelenlétét vizsgáltuk és mutattuk ki (21. ábra). Az összetett, átfedő promóter régiókat tartalmazó szekvencia elemzésében segítséget nyújtott a Softberry program, (http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/gfindb), a TRACTOR adatbázis (http://www.bioinfo.cu/Tractor_DB, Gonzalez et al., 2005), a RegulonDB (version 4.0, http://kinich.cifn.unam.mx:8850/db/regulondb_intro.frameset, Salgado et al., 2004), a Gibbs Motif Sampler (http://bayesweb.wadsworth.org/gibbs/gibbs.html, Liu et al., 1995), valamint a Wadsworth két másik adatbankja:

a http://bayesweb.wadsworth.org/binding_sites/index.html (McCue et al., 2002) és a http://bayesweb.wadsworth.org/binding_sites_20020802/ecoli_binding_sites.html (McCue et al., 2001). Az ORF upstream szekvenciájában megtalálható a σ^{70} kötőhely (RpoD) -35 (Pribnow) és -10 box-a, de emellett két másodlagos szigma factor, a σ^{28} (RpoF, Arnosti és Chamberlin, 1989, Helmann és Chamberlin, 1987, Helmann et al., 1988, Mirel és Chamberlin, 1989) és a σ^{54} (RpoN, Barrios et al., 1999, Merrick, 1993) egymással átfedő felismerő helyei is jelen vannak benne. Egyéb, transzkripciót szabályozó fehérjék kötését lehetővé tevő szekvenciák között található a CRP homológ (cAMP receptor protein, Kolb et al., 1993) Vfr (de Crombrugghe et al., 1984, Albus et al., 1997), valamint a CytR (Rasmussen et al., 1993), a LexA (Little és Mount, 1982, de Henestrosa et al., 2003) és a LasR (LuxR homológ, Fuqua et al., 1996) represszor fehérje kötőhelye is. Ezek mellett az NtrC (Friedman, 1988, Kur et al., 1989) és KdgR (Nasser et al., 1994, Aarons et al., 2000) felismerő helyek is. Érdekes, hogy a többi között PIP-box-hoz hasonló szekvenciákat (plant inducible promoter, Oku et al., 1995) is lehet találni a promóter régiók között. Ez a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* és a *Ralstonia solenacearum*, legtöbb *hrp* génjének aktiválásáért felelős szabályozó fehérjék kötőhelyeként ismert régió (Buck et al., 1986, Cunnac et al., 2004,).

MviN$_{pv}$ PROMÓTER:

gtcttgtcaagggcagttaaggtgttccg***ctgagtggttgcag***cttttgaccggatgatttatttccggcgtgcgacctgtaaactcgcggcc

tttgcttcgggcatttgcggcgcgaagtatcgcat**taaa**tggacggcttaatc**gcccat**cctttgcc**aagg**cgcacaagtctttca**atg**

******* ****

CRP	**tgt**g**a**nnnnnnt**ca**ca **tgt**ca.aggg..**ca**gt	CytR	**tgc**aannt**tgca** **tgc**ttcgg.**gca**	KdgR	**aat**(**g**/a)a**a**a(c/t)nn(**t/c**)(g/a)**ttt**(**c**/t)a **aatgga**cggc**t**taa**tc** **aat**cgccc**at**cc**ttt**
LexA	**ctg**nnnnnnnnnn**cag** **ctg**.agtggtcg.**cag**	Lux box	**acctgta**gga**tcg**ta**cagg**t **acctgta**aac**tcg**..**c**.**gg**c	NtrC	**tgc**acc**a**nnn**tggtgca** .**gc**tgag**tggttgca** **tgc**ttc**g**ggcatt**tgc**
PIP box	**ttcgc**nnnnnnnnnnnnnnn**ttcgc** **tttgc**….ttcgggca…**tttgc** c**tcgc**ggcctttgcttcgggca**tttgc**	σ^{28}	**taaa**gtttnnnnnnnnnnn**gccgat**aa **taaa**tggacggcttaatc**gcccat**	σ^{54} ****	**ytgg**c**acg**nnnnt**tgcw*** **atgg**.**acg**gcttaa**tcgcc**

21. ábra.

Az MviN$_{pv}$ membrán fehérjét kódoló gén 5' nem kódoló régiójának *in silico* elemzése. A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. A feltételezett σ^{70} kötőhelyek, a -35 box és a -10 box aláhúzva. A CRP (c-AMP receptor protein) kötőhely szaggatott vonallal van aláhúzva az upstream szekvenciában. A valószínű LexA felismerő hely dőlten és vastagon szedve. A Lux box konszenzus szekvenciát felső vonal jelzi, továbbá a σ^{28} két vonallal van aláhúzva, míg a σ^{54} kötőhelyet alsó csillagok jelzik. A feltételezett NtrC felismerő hely szaggatott vonallal, a KdgR kötőhely egyszerű vonallal bekeretezve. A vélhető PIP box-okat alsó nyilak jelölik.

Az ábra alsó részében az *mviN$_{pv}$* 5' nem transzlálódó szekvenciájában talált feltételezett transzkripciós faktor kötőhelyek részletezése látható, azok konzervált konszenzus felismerő helyekhez viszonyított homológiáival.

*y:a/t, w:c/g

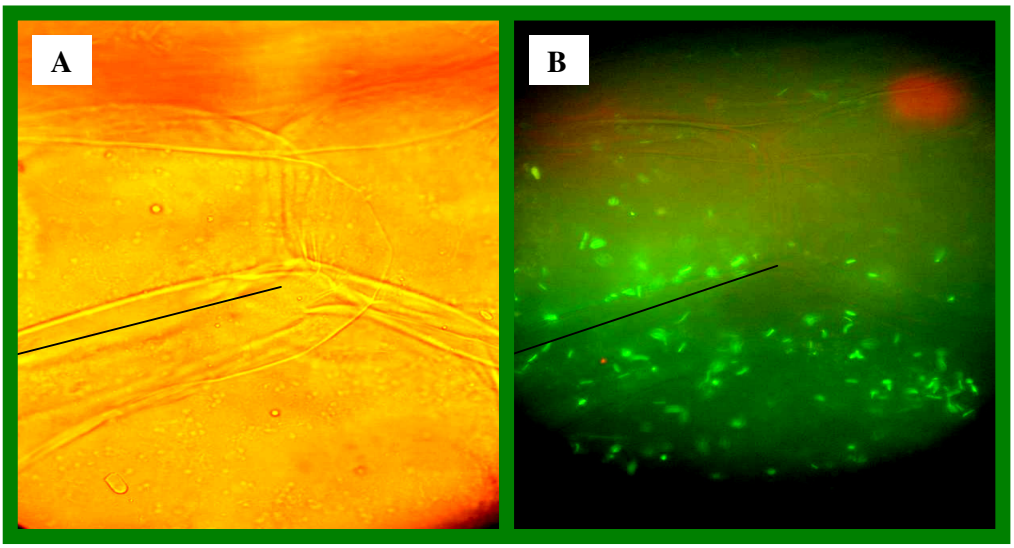
4.5 Fluoreszcencia vizsgálatok

A pIviGK genetikai rendszerben szereplő *gfp* riportergén kifejezése a különböző *P. viridiflava* Ivi-mutáns törzsek által képviselt promóterek indukcióját kívánja meg. A sejten belül

felhalmozott GFP fluoreszcens fény kibocsátását eredményezi. Így a *gfp* riportergén nem csupán az *in vitro* szelekcióban használható fel, hanem lehetővé teszi a klónozott promóterek időben változó kifejeződésének vizsgálatát és a kifejeződés mértékének meghatározását is (Scholz et al., 2000). A kibocsátott zöld fluoreszcens jel mérése alapján meghatároztuk az IviPV-s1/1-s1/8 törzsek, paprikatermés fertőzését követő *in planta* expressziós dinamikáját.

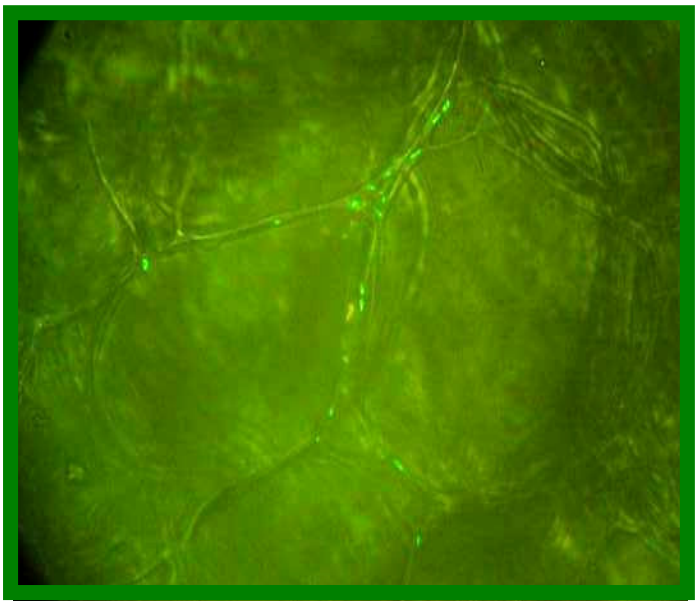
4.5.1 ivi-promóterek in vivo *elemzése: génkifejeződés vizsgálata epifluoreszcens mikroszkópiával*

Mikroszkópi technikákkal történő *in vivo* és *in situ* vizsgálatok legmegbízhatóbb és legteljesebb körben alkalmazható eszköze a GFP. A zöld fluoreszkáló fehérje segítségével különböző növénykórokozó mikrobák növényi szöveten belüli lokalizáltságát, illetve egyes génjeiknek szabályozott kifejeződését is elemezni lehet (Casper és Holt, 1996, Cheng et al., 2000, Aldon et al., 2000). Az *in situ* vizsgálathoz HBO 200 fluoreszcens fényforrással felszerelt Carl Zeiss (Jena, DDR) mikroszkópot alkalmaztunk, mely BG12 (max. 405 nm) gerjesztő szűrővel és OG1 (430 nm-től vágó) záró szűrővel volt ellátva. Az IviPV-s1/1-s1/8 törzsekkel vákuum alatt fertőzött zöldpaprikatermésből készített metszeteket fehér és UV fénnyel világítottuk meg. Az emissziós képet NIKON coolpix 540 digitális fényképezőgéppel rögzítettük. Ezzel az összeállítással a fertőzést követő hatodik órától lehetett fluoreszcens képeket rögzíteni (22. és 23. ábrák).



22. ábra

In planta indukálódó promóterek által kifejezett *gfp* riportergén termékeként jelenlévő GFP fénykibocsátása. 10^9 cfu/ml töménységű IviPV-s1/7 (*pel*) törzzsel infiltrált paprikatermés metszete, 6 órával a fertőzés után, A: fehér fénnyel és B: UV fénnyel megvilágítva. (Vonal mentén a parenchima sejtek érintkezési felülete.)

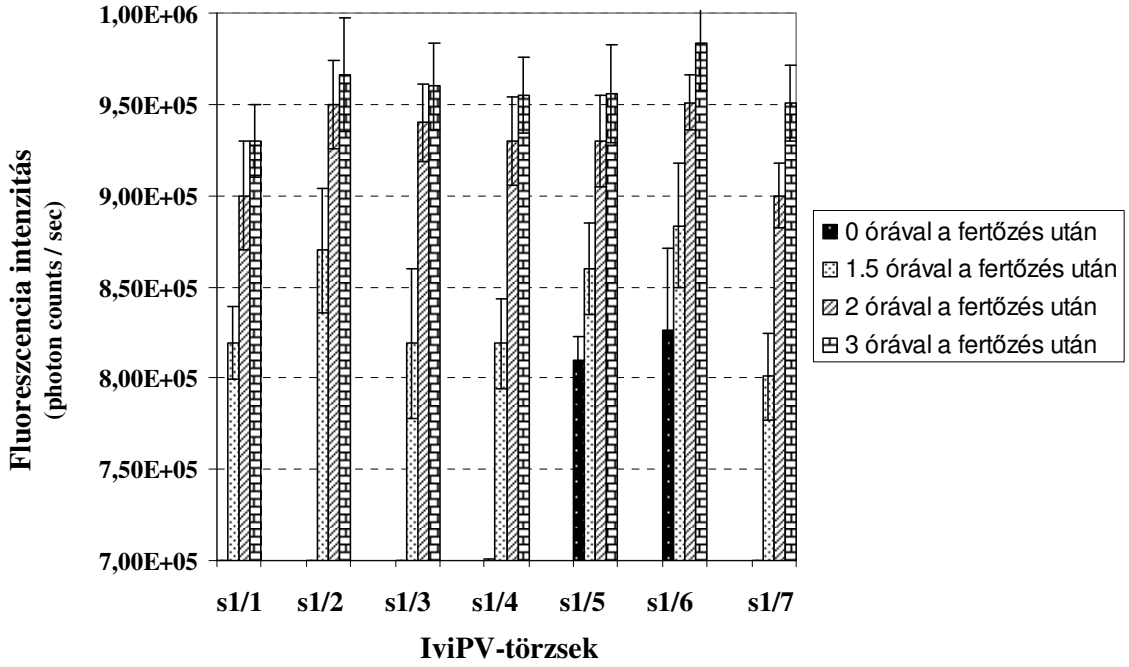


23. ábra

In planta indukálódó promóterek által kifejezett *gfp* riportergén termékeként jelenlévő GFP fénykibocsátása. 10^6 cfu/ml sűrűségű IviPV-s1/7 (*pel*) törzzsel fertőzött paprikatermés metszete, 16 órával a fertőzés után (kék színű záró szűrőn keresztül detektálva).

4.5.2 ivi-promóterek in vivo *elemzése: génkifejeződés dinamikájának meghatározása spektrofluorometerrel*

A vizsgálat során a különböző ORF-*gfp* fúziót tartalmazó Ivi-mutáns baktériumtörzsekkel, paprikatermésből kimetszett gyűrűket fertőztünk vákuummos telítéssel. A fluoreszcencia jeleket a baktérium szuszpenziót tartalmazó paprikaminták homogenátumában, a fertőzéssel egy időben és az azt követő 1,5., 2. és 3 órában határoztuk meg. Az összes *ivi*-gén indukálódott *in planta* (24. ábra). Az s1/5 és s1/6 törzsek, melyek a K^+-függő Na^+/Ca^{2+} cserélő fehérjét és az $MviN_{pv}$ membrán fehérjét kódoló géneket képviselik, a fertőzéssel egy időben már - ezzel a kísérleti rendszerrel - mérhető mennyiségű GFP-t halmoznak fel. Ez megerősíti a minimál táptalajon végzett kísérletek eredményét. Másfél órával a fertőzést követően a két törzs fluoreszcens fénykibocsátása 20%-al emelkedett, majd a mérés harmadik órájára ez az érték megduplázódott. Korábbi mérések azt mutatták, hogy abban az esetben, ha a fertőzés 10^8 cfu/ml sűrűségű baktérium szuszpenzióval történik, akkor a rákövetkező 3 órában az *in planta* baktériumszám nem változik (Czelleng A., nem közölt eredmény), vagyis az ez idő alatt emelkedő fluoreszcencia jel a *P. viridiflava* promóterei által kifejezett *gfp* riportergén termékének mennyiségi növekedésének eredménye.



24. ábra

Az izolált *ivi*-gének, a velük fúzióban lévő *gfp* riportergén kifejezése alapján mért, *in planta* expressziós dinamikája. A törzsek az 5. táblázat szerint képviselik a különböző géneket. A 395 nm hullám hosszúságú UV fénnyel megvilágított zöldpaprikatermés háttér fluoreszcenciája miatt, a GFP által kibocsátott jelet csak $7x10^5$ photon counts / sec felett lehetett megbízhatóan mérni, ez adta meg a kísérlet küszöbértékét. A fertőző baktérium szuszpenziót 10^7-10^8 cfu/ minta mennyiségben alkalmaztuk. A kísérletet háromszori ismétléssel, alkalmanként három-három mintával végeztük.

4.6 Az $MviN_{pv}$ funkcionális elemzése

Bár *S. typhimurium* esetében nem található az irodalomban kizárólag az *mviN* génre korlátozódó mutáció, mégis az *mviN* génben is mutáns baktérium mozgáskészsége és virulenciája egyaránt eltér a vad típusnál megfigyelhetőtől (Carsiotis et al., 1989).

4.6.1 Funkció-vesztett mutáns készítése

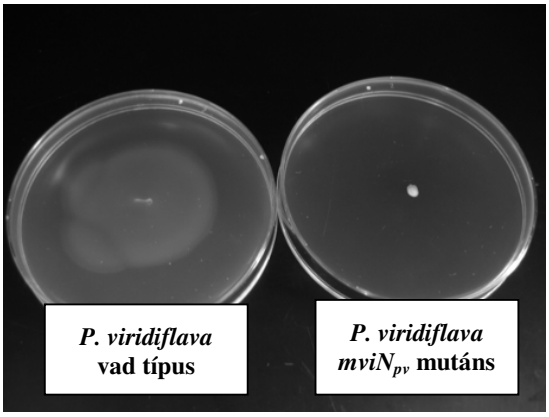
Az $MviN_{pv}$ lehetséges feladatának tisztázására a *P. viridiflava*-ból egy, az $mviN_{pv}$ génjére nézve funkcióját vesztett (knock-out) mutáns törzset készítettünk.

A *P. viridiflava* IviPV-s1/6 törzsből az autonom replikatív pIviGK::s1/6 plazmidot retrotranszferrel jutattuk *E. coli* DH5α/λ pir törzsbe. A plazmidon hordozott genomi DNS fragmenst PCR segítségével, a pUC/M13 -20 és -26 primer párral izoláltuk. A T4 polimerázzal tompa végűvé alakított PCR terméket, a SacB kontraszelektív markert tartalmazó pJQ199 suicide plazmid vektor *Sma*I restrikciós endonukleázzal hasított származékával ligáltuk. A tompa végű kanamycin rezisztenciakazettát (*aphA3*) az $mviN_{pv}$ egyedi *Sma*I helyébe ligáltuk és a ligátummal *E. coli* S17.1/λ pir –t transzformáltunk. A plazmid konstrukciót konjugációval jutattuk be a vad típusú *P. viridiflava* baktériumba, ahol a

mutált *mviN*$_{pv}$ marker-exchange mutagenezisének (Quandt és Hynes, 1993) eredményeként született a *P. viridiflava* PV-dm törzse. Az *aphA3* génkazetta helyes inszercióját kolónia PCR segítségével igazoltuk, a KmP1 és MviRrv, illetve a KmSrv és Mvi1fw primer párok felhasználásával.

4.6.2 A funkció-vesztett mutáns in vitro *és* in vivo *vizsgálata*

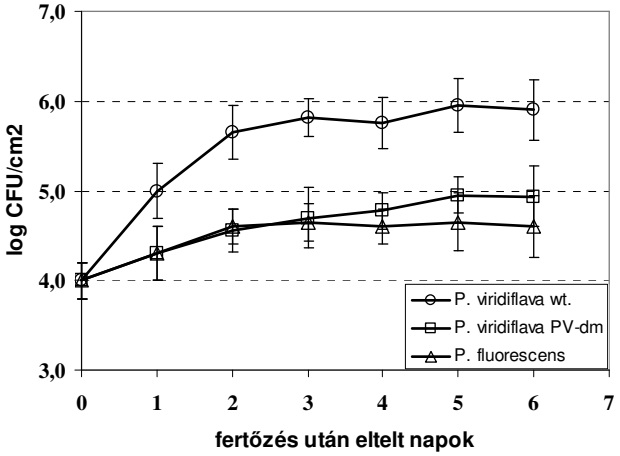
A *P. viridiflava* PV-dm mutáns származéka LB tápagaron szaporítva nem mutat szokatlan telepmorfológiát, illetve növekedési sajátságokat. Megvizsgáltuk a mutáns törzs mozgáskészségét lágyagarban. A vad típusú baktériummal szemben, a PV-dm törzs nem terjedt szét az inokuláció helyétől, mutatva, hogy az MviN$_{pv}$ szükséges a *P. viridiflava* mozgásához (25. ábra).



25. ábra

Motilitás teszt lágyagaron. 36 órával a beoltás után, 0.3% agar tartalmú 0.1% töménységű LB lágyagarban.

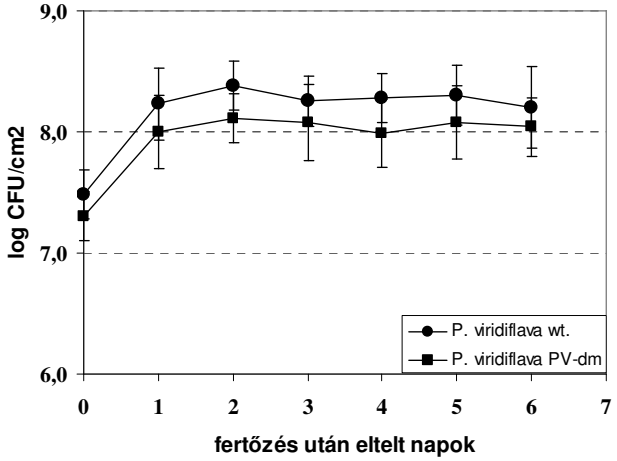
Mivel a *P. viridiflava* általunk tanulmányozott törzse az *Arabidopsis thaliana* (Col-0 ökotípus) kompatibilis kórokozója, így az *mviN*$_{pv}$ mutációjának a *P. viridiflava* virulenciájára gyakorolt hatását *A. thaliana* gazdanövényben végzett szaporodási görbe elemzéssel határoztuk meg. Elsőként a vad típusú és a PV-dm mutáns *P. viridiflava,* valamint *P. fluorescens* szerepelt a fertőzési kísérletben. Az utóbbi faj negatív kontrollként szolgált, mivel ez egy nem kórokozó, szaprofiton baktérium, amely természetes úton nem képes a növény szövetei között szaporodni. A baktériumok természetben bekövetkező invázióját modellezve, teljes *Arabidopsis* növényeket fertőztünk baktérium szuszpenzióba merítéssel. Ezzel a módszerrel tünetek kialakítását, illetve a szaprofiton *P. fluorescens* szaporodását meghaladó mértékű populációnövekedést a baktériumok csak a levelek természetes nyílásain keresztül történő behatolásuk révén érhetnek el. A PV-dm szaporodási görbéje különbözött a vad típusú *P. viridiflava* baktériumétól, de hasonlított ahhoz, ami a *P. fluorescens* fajra volt jellemző (26. ábrán).



26. ábra

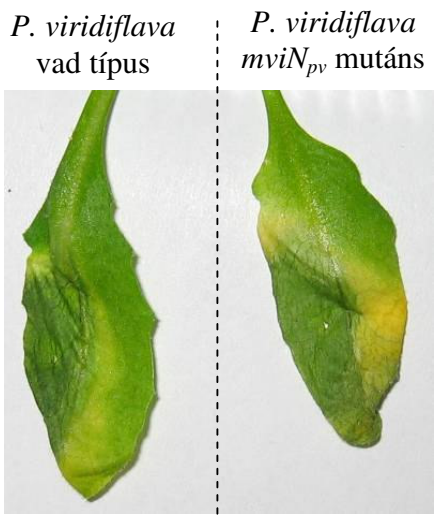
Baktérium szaporodási görbék, 10^8 cfu/ml töménységű baktérium szuszpenzióba merítéssel fertőzött (0.02 % Silwet L-77, Union Carbide) *A. thaliana* (Col-0 ökotípus) növényben. A baktériumok száma mintánként háromszori ismétlésben volt meghatározva. Minden mintát hat darab 0,6 cm átmérőjű levélkorong alkotott, melyek 2 független növényről származtak.
wt: vad típusú *P. viridiflava*, PV-dm: $mviN_{pv}$ génben hiánymutáns *P. viridiflava, P. fluorescens:* negatív kontroll, szaprofiton baktérium

Ezek alapján az $MviN_{pv}$ a *P. viridiflava* virulencia faktora, amely szükséges a növény inváziójához, de a levelek felületi kolonizálásához nem. Ezzel szemben, amikor a *P. viridiflava* vad típusú és PV-dm törzseiből készített, 10^6-10^9 cfu/ ml töménységű baktérium szuszpenziókat injekciós fecskendővel közvetlenül az *Arabidopsis* levelek sejtközötti járataiba jutattuk, akkor sem a szaporodási görbékben (27. ábra), sem a betegség tünetek makroszkópikus megjelenésének idejében és erősségében nem volt különbség (28. ábra).



27. ábra

Baktérium szaporodási görbék, 5×10^7 cfu/ml töménységű baktérium szuszpenzióval infiltrált *A. thaliana* (Col-0 ökotípus) növényben. Habár a különböző inokulumok sűrűsége (10^6-10^9 cfu/ml) eltért az egyes kísérletekben, a szaporodási görbék lefutása hasonló volt.
wt: vad típusú *P. viridiflava*, PV-dm: $mviN_{pv}$ génben hiánymutáns *P. viridiflava.*



28. ábra

10^9 cfu/ml sűrűségű *P. viridiflava* baktérium szuszpenzióival infiltrált *A. thaliana* levelein kialakuló klorótikus udvarral körülvett nekrózis, 80 órával a fertőzés után.

A fenti kísérletek eredményei alapján úgy tűnik, hogy az MviN$_{pv}$ a fertőzés korai szakaszában játszhat lényeges szerepet, hiszen az *mviN*$_{pv}$ inaktiválása nem vezetett a mutáns törzs mérsékelt apoplasztbeli szapododásához, a fertőzött *Arabidopsis* levelekben pedig sem a klorotikus udvar, sem pedig a nekrózis elmaradásához.

4.7 Új tudományos eredmények

1. A növénykórokozó baktériumok *in planta* indukálódó génjeinek izolálásához olyan új, az „*In vivo* expression technology”–hez alkalmas rekombináns plazmidokat készítettünk, melyek az *in vivo* szelekciót a baktérium antibiotikummal szemben kifejtett rezisztenciája útján biztosítják.

2. Az új plazmidok antibiotikum rezisztens fenotípust adó riportergénjeinek 5’ nemkódoló régiójába új összetételű transzlációt erősítő szekvenciát terveztünk, a TIS-t (transzlációt indító szekvenciát). A TIS-nak a transzláció mértékére gyakorolt hatását *gfp*-vel fúzionáltatva állapítottuk meg. A spektrofluorometriás mérések azt bizonyították, hogy azonos baktériumszaporodási ütem mellett, a transzkripció megindítása utáni 6. óráig a TIS-val erősített transzláció meghaladja az irodalomból ismert egyik leghatékonyabbnak tartott atpE transzlációs enhanszerrel elért eredményt.

3. Az egyik új plazmid, a pIviGK felhasználásával, *Pseudomonas viridiflava*-ban IVET, promóter kereső génkönyvtárat készítettünk.

4. A génkönyvtár részleges vizsgálatával a *P. viridiflava* több olyan génjét azonosítottuk, melyek a zöldpaprikatermés fertőzése során aktiválódnak. Ezek között szerepel a közvetlenül a lágyrothadásos betegségtünet kialakításáért felelős pektát liáz génje, illetve több, a fertőzéshez közvetlenül és közvetetten szükséges gén is.

5. Az egyik izolált gén, - a feltételezhetően membrán fehérjét kódoló $mviN_{pv}$ - funkcionális elemzéséhez előállítottunk egy, az e génre nézve funkcióvesztett mutánst, amely lágyagarban elvégzett mozgás vizsgálatban motilitását vesztett fenotípust mutatott. Az *Arabidopsis thaliana* e mutánssal végzett felületi fertőzése, a vad típusú baktériumhoz képest csökkent virulenciát, míg a szövetközi fertőzése (infiltrálása), azzal azonos virulenciát mutatott. Ez az első eset, amikor növénykórokozó baktériumok esetében az MviN fehérjét virulencia faktorként írták le. A *gfp* riporter génnek az $mviN_{pv}$ promóteréről történő kifejezését spektrofluorometriásan mérve kimutattuk, hogy a promóter LB komplett bakteriológiai tápoldatban alap aktivitást mutat, ami növényben (zöldpaprikatermésben) a fertőzést követő harmadik órára 40%-al megnövekszik.

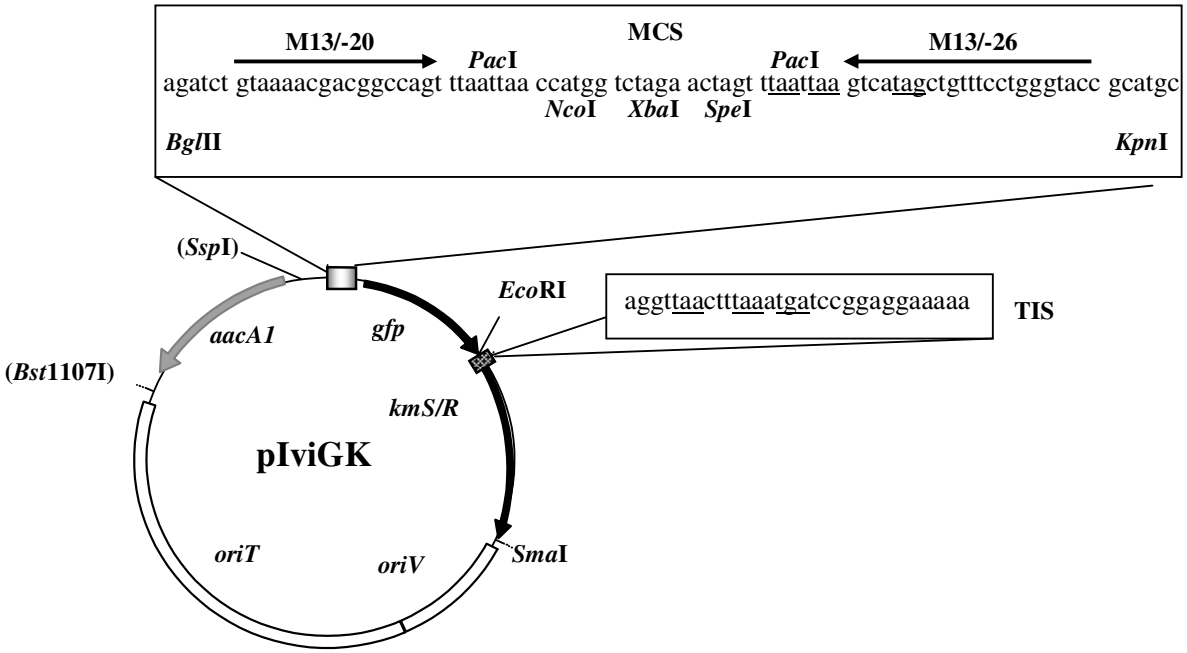
5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az élőlények, így a mikroszkopikus baktériumok is a körülöttük folytonosan változó (mikro - és makro) környezet kihívásában élnek. A magasabb rendű szervezetekkel ellentétben a baktériumok egyszerű felépítésüknél fogva nem rendelkeznek specializált szövetekkel, szervekkel, így az egyedek egésze reagál a különböző környezeti hatásokra. A baktériumoknak a különböző feltételekhez történő alkalmazkodáshoz tehát egyrészt különböző biokémiai rendszereket kell biztosítaniuk, másrészt ezeket szigorúan kell szabályozniuk. Ez a szigorú szabályozás elsősorban genetikai szinten valósul meg, mégpedig génjeik kifejeződésének gátlásával. Vagyis a baktérium genetikai állományának adott időben csak akkora hányada fejeződik ki, amennyi az adott élettérben az ott fellépő környezeti tényezőkhöz történő alkalmazkodásához szükséges. Így van ez a kórokozás során, a gazdaszervezetbeli abiotikus (hőmérséklet, pH, felvehető tápanyag) és biotikus (saját- és a gazda mérgező anyagcsere termékei) stresszekkel szemben mutatott ellenálló képesség genetikai meghatározóinak szabályozott kifejezése esetében is. Számos *in vitro* és *in vivo* vizsgálati módszer szolgálja a különböző szélsőséges környezeti tényezők között megváltozó génkifejeződés (expressziós profil) elemzését. Az *in vivo* módszerek közül, a transzpozon mutagenezis–alapú eljárások esetében a kórokozás során nélkülözhetetlen géneket képviselő mutánsok negatív szelekciójának eredményeként, azok elvesznek a transzpozon mutáns könyvtárból, így azonosításuk csak közvetett módon történhet. Az eljárás során viszont a redundáns, illetve a csak másodlagos feladatokat ellátó faktorokat örökítő gének azonosítása nem lehetséges, hiszen azok „loss-of-function” típusú mutációja nem vezet a mutáns törzs – adott környezeti feltételek közötti – életképtelenségéhez. Ennek ellenére, a baktériumok változó környezethez történő alkalmazkodásának vizsgálata során e géneket is figyelembe kell venni, hiszen gyakran ezek töltik ki a genom nagy százalékát, így várható, hogy fontos információkkal segítik a vizsgálatot (pl. az *E. coli* genom adatbázisát vizsgálva (http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/index.jsp) látszik, hogy a genom 90%-a nem nélkülözhetetlen gént tartalmaz).

A környezet által irányított, feltételes génkifejeződés általunk is alkalmazott *in vivo* vizsgálati módszere a fent bemutatott másodlagos hatású gének azonosítását is lehetővé teszi. Ez az IVET (Mahan et al., 1993) eljárás, amely a baktérium génjeinek transzkripcióját megindító promóterrel fúzionáltatott riportergének kifejeződése alapján teszi lehetővé az egyes gének azonosítását.

5.1 Új promóter kereső plazmidok

A vizsgálathoz először két promóter kereső plazmid vektort készítettünk, melyek a szükséges szelekciós rendszerrel együtt alkalmazva lehetővé teszik a kórokozással összefüggő baktérium gének izolálását. A genetikai rendszer, amely a pIviGG és pIviGK plazmidokat alkalmazza, homológ az IVET rendszerrel, melyet elsőként *S. typhimurium* vizsgálatánál írtak le (Mahan et al., 1993) és azóta sikeresen alkalmaztak egy sor egyéb kórokozó-gazda kapcsolatban (Angelichio és Camilli, 2002). Az eredeti genetikai rendszerrel összehasonlítva, az általunk készített plazmidok számos hasonló, de egyben több eltérő tulajdonsággal is rendelkeznek (29. ábra).



29. ábra

A pIviGK fizikai térképe. Az *Nco*I, *Xba*I és *Spe*I restrikciós helyeket tartalmazó MCS (multiple cloning site, klónozóhely) és az azt két oldalról szegélyező *Pac*I ritkán hasító endonukleáz felismerő hely, valamint a pUC/M13 szekvenáló primerek komplementer szekvenciái a felső, kiemelt keretben láthatók. A *Bgl*II és *Kpn*I 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.
Az *Ssp*I és *Bst*1107I restrikciós helyek meg lettek szüntetve az *aacA1* gentamicin rezisztenciagén pGPMCSII-be történő beépítésekor.
A pIviGK plazmidban szereplő π replikációs fehérjétől függő („suicide") replikációs origó (oriV) és konjugatív transzfer origó (oriT) a pGP704-ből megmaradt tulajdonságok.
A pIviGG plazmid ugyanezzel a szerkezettel rendelkezik, csak az *aacA1* helyett *aphA3* marker gént tartalmazza, ami kanamycinnel szemben teszi ellenállóvá az őt hordozó baktériumot. Ezzel együtt riportergénje *kmS/R* helyett *gmS/R.*

A hasonlóságok a következők: ori(V) R6K–alapúak, azaz π fehérje függő módon replikálódnak („suicide" tulajdonságúak), tartalmazzák az ori(T) RP4 cisz-domináns konjugációs origót (transz - komplementációval mobilizálhatóak (*mob*$^+$, *tra*$^-$ fenotípus). A plazmidok új tulajdonságai előnyökkel járnak, melyek közül az első, hogy alkalmazásuk nem

kívánja meg a vizsgált baktérium auxotróf mutációját, amit a baktériumban a riportergén feltételes kifejeződése komplementál, biztosítva ezzel a pozitív *in vivo* szelekciót. A kanamycin és gentamicin rezisztenciagén, mely a pIviGK és pIviGG plazmid egy-egy riportergénje, kiváló szelekciós markerként szolgálnak a Gram-negatív baktériumok széles körében. A növénykórokozó baktériumok antibiotikumokra való érzékenységét tanulmányozva (Czelleng A., nem közölt eredmény) azt találtuk, hogy a legtöbb, növényi szöveteket legkevésbé károsító (Sasser, 1982) és egyben bakteriológiailag is jól használható antibiotikum (klóramfenikol, tetraciklin, ampicillin) nagy dózisa is hatástalan a legtöbb vad típusú *Pseudomonas*, illetve *Erwinia* és *Xanthomonas* törzsre. E megfigyelést alapul véve két antibiotikum rezisztencia gént találtunk a kísérletekhez megfelelőnek. Az egyik kanamycinnel, a másik pedig gentamicinnel szemben teszi ellenállóvá a baktériumokat. Alkalmazhatóságuk azért tűnt jó választásnak, mert megfigyelések szerint e két rezisztenciagén előtt lévő, különböző promóterek erőssége és a fenotípusos rezisztencia mértéke között nem lineáris az összefüggés (Nordstöm, 1993). Vagyis kisebb dózisú antibiotikum alkalmazása mellett is megfelelő szelekciót biztosítanak, ami a növényben a szövetközi egyenetlen antibiotikum eloszlás miatt lényeges. E két antibiotikum emellett bakteriolitikus (Mardones és Venegas, 2000), vagyis az érzékeny baktérium halálát okozó tulajdonságuk révén elősegítik a növényi szövetben 10-12 óra alatt lebonyolítható szelekciót, az antibiotikumnak nem ellenálló baktériumok minimális túlélése mellett. Ráadásul míg az auxotróf komplementációt kihasználó IVET módszer csak a szaporodó sejtekre nézve letális, addig a bakteriolitikus hatású antibiotikum a nem szaporodó baktériumok esetében is biztosítja a szigorú szelekciót. Könnyen belátható, hogy ez a félrevezető eredmények előfordulásának csökkenését eredményezi.

A pIviGK és pIvGG plazmidok riportergén párjainak közös tagja a *gfp*, mely e plazmidok második előnyös tulajdonságát nyújtja. A promóter aktivitás minőségi és mennyiségi meghatározására használt, közvetlen detektálásra alkalmas riporter gének közül – mint amilyen a *cat* (chloramphenicol acetil transferase, Brosius és Lupski, 1987), *lacYZ* (β - galaktozidáz, Miller, 1972), *gus* (β - glükuronidáz), *luxAB* (luciferáz, Gordon et al., 1992) – csak a GFP nem igényli költséges szubsztrátok alkalmazását (Chalfie, et al., 1994). Napjainkra az eredetileg izolált *gfp* gén harmadik mutációs generációját állították elő (Heim, et al., 1995; Crameri et al., 1996; Cormack et al., 1996). Az ún. „*mut3*" variáns fehérje egyrészt oldékonyabb a vad típusúnál, másrészt a harmadlagos szerkezetének kialakulása során nem, vagy csak kevés zárványtest (inclusion body) keletkezik. Azaz azonos promóterek esetében a vad típusú gén termékénél jobban detektálható a keletkezett fehérje, mivel kevesebb inaktív forma képződik. A különböző fluorescens próbák alkalmazása a gazda

– parazita kölcsönhatásokban régi eljárás. A kórokozó baktériumokat hagyományosan közvetett módon detektálják fluorescens antitestek segítségével. Újabban az endoparazita mikroorganizmusok némelyikét ún. fluorochrom köpennyel fedik, így a gazdaszervezettel folytatott kölcsönhatásuk élő gazdasejtekkel végezhető (Falk et al., 1994). Az első eljárás csak a kórokozók szűk körének vizsgálatára alkalmas, hiszen specifikus antitestek előállítása időigényes folyamat. A flourochrom köpennyel burkolt baktériumok esetében nehézséget okoz, hogy szaporodásuk során a flourochrom festék relatív mennyisége csökken a sejtszétválás miatt. Ezzel ellentétben az autofluorescens GFP (Chalfie et al., 1994) alkalmazása átíveli az előző akadályokat, mivel: (i) a GFP alacsony toxicitású, citoplazmatikus fehérje (Chalfie et al., 1994), azaz folyamatos termelődése esetén sincs baktérium pusztulás (intakt, élő sejtek vizsgálhatók), illetve fluorochrom hígulás; (ii) specifikus ellenanyag, illetve egyéb exogén szubsztrát nélkül kimutatható abszolút és mennyiségi jelenléte. Az *in vivo* és *in situ* vizsgálatok legmegbízhatóbb és legteljesebb körben alkalmazható eszközének tehát a GFP mutatkozik. Ezt támasztják alá azok a vizsgálatok, melyek a különböző növénykórokozó mikrobák, így vírusok fertőzésének (Baulcombe et al., 1995; Casper és Holt, 1996) és növényen belüli terjedésének (szisztematizálódásának) (Huang et al., 2000, Epel et al., 1996, Cheng et al., 2000) nyomon követését célozták. Egyéb mikroorganizmusok, növénykórokozó gombák (Bottin et al., 1999, Vanden et al., 1997, van West et al., 1999) és baktériumok (Brandl et al., 2001, Stuurman et al., 2000, Aldon et al., 2000, Zhang et al., 2000, Xi et al., 1999) növényi szöveten belüli lokalizáltságát, illetve egyes génjeiknek szabályozott kifejeződését szintén elemezni tudták a GFP, illetve annak valamely származékának felhasználásával. A különböző hullámhosszúságú fényt kibocsátó mutáns GFP-k felhasználása arra is lehetőséget kínál, hogy egy időben több mutáns baktériumot és azokon belül is akár több mutáns gén aktivitását vizsgálhassuk (Ellenberg et al., 1999, Stauber et al., 1998).

A plazmidok harmadik kedvező tulajdonsága, hogy riportergénjeik 5' upstream régiójában transzlációt erősítő szekvenciákat tartalmaznak. Mivel az IVET a baktériumgének merodiploid állapotára épül, így genomonként csupán egy riportergénpár van jelen. A keletkező kisszámú mRNS akkor marad stabil, ha riboszómához kötődik (Gold et al., 1981, Gualerzi és Pou, 1990). Mindezek miatt olyan szekvenciákat építettünk a riportergénjeink elé, melyek elősegítik a kevés mRNS-ről a transzláció minél gyakoribb megindítását. A *gfp* riportergéntől upstream lévő *atpE* régió egy poláros hatású (a tőle downstream lévő riportergénre is átterjedő hatású) transzlációs erősítő szekvencia (McCarthy et al., 1985; McCarthy et al., 1986; Schauder et al., 1987). Az antibiotikum rezisztenciát adó riportergének transzlációs kezdő triplettje elé a TIS, újonnan létrehozott mesterséges régiót építettük.

Fluorométerrel végzett méréssel igazoltuk, hogy *E. coli*-ban a P_{BAD} promóterhez kapcsolt TIS-*gfp* fúziót tartalmazó baktériumtörzsek az atpE-*gfp*-t tartalmazókkal azonos ütemben szaporodnak, de a promóter indukcióját követő 6-8. óráig a GFP TIS-val végbemenő transzlációja intenzívebb. Emellett a TIS az indukciótól mért 22. órától az atpE enhanszerhez hasonló mértékben járul hozzá a *gfp* gén kifejezéséhez.. Ezek szerint hasonló fitness mellett, a TIS a vele fúzióban lévő riportergén transzkriptumáról történő gyors transzlációval gyorsabb reakciót biztosít a baktérium számára.

Az új plazmidok negyedik sajátossága, hogy a bennük található MCS mindkét oldalát a ritkán hasító *Pac*I restrikciós endonukleáz felismerő helye és két, szekvenáláshoz használt „univerzális" primer, a pUC/M13 (-20) és (-26) tapadási helye szegélyezi. Ezek felhasználásával a klónozott genomi szekvencia könnyen izolálható, valamint a *Pac*I hasító helyek biztosítják az MCS egyszerű variálhatóságát is. A génkönyvtár készítésében előnyös a részleges feltöltés alkalmazása, hiszen így nemcsak annak hatékonysága nő, de elkerülhető a több kromoszóma fragment egymás mellé ligálódásából keletkező inszert képződése is. A pIviGKIII több lehetőséget biztosít a génkönyvtár készítéséhez, mivel több restrikciós endonukleáz hasító helyet tartalmaz. (7. Táblázat)

7. táblázat, az MCSIII-ban szereplő restrikciós endonukleáz hasítóhelyek alkalmazhatósága

MCS-ben lévő restrikciós endonukleáz hasító hely	**Komplementer**	**Részleges feltöltés**	
		MCS	**Inszert**
*Nco*I	*Pag*I	+ dCTP, dATP	*Alw*44I (*Apa*LI) + dTTP, dGTP
*Bcl*I	*Sau*3AI	+ dTTP dATP, dGTP	*Hpa*II + dCTP
*Pst*I	*Pst*I	-	-
*Sca*I	tompa *(Rsa*I, *Alu*I)	-	-
*Eco*81I	*Sau*3AI	+ dTTP	+ dATP, dGTP
*Cla*I	*Hpa*II	+ dCTP	+ dTTP dATP, dGTP
*Spe*I	*SpeI, Xba*I, *Nhe*I	+ dCTP, dTTP	*Hind*III + dATP, dGTP

A plazmidok egy további értékes tulajdonsága a mindkét riportergén előtt (upstream) elhelyezett transzlációs stop kodonok jelenléte, melyek mindhárom leolvasási keretben megtalálhatók. Ezek biztosítják a genomi gén és a riportergének közötti transzkripciós fúziót. A stop kodonok nélkül ugyanis transzlációs fúzióval könnyen keletkezhetnének fúziós fehérjék, melyek sem a genomi gén, sem pedig a riportergén termékének feladatát nem tudnák ellátni.

5.2 Izolált *ivi*-gének

Az „*in vivo* expression technology” kísérletes optimalizálása során a paprikatermés különböző fertőzési eljárásait és antibiotikum utókezelési eljárásait próbáltuk ki. Kísérletünkben a dugófúróval kivágott paprikakorongokat fertőztük különböző koncentrációjú baktérium szuszpenzióba mártva, vákuummal telítve, ill. befecskendezve. Antibiotikum kezelésre azonos módszereket alkalmaztunk a fertőzéssel egy időben és 2 órával azt követően. Megbízhatónak a vákuumos fertőzési és utókezelési eljárás bizonyult, amennyiben utóbbit két órával a fertőzés után hajtottuk végre.

Munkánk során *Pseudomonas viridiflava* kórokozásban résztvevő génjeit azonosítottuk a pIviGK promóter kereső plazmid vektor felhasználásával (Czelleng et al., 2004).

A kísérletben 10^4 *P. viridiflava* Ivi-mutáns törzset használtunk, melyek az *E. coli*-ban kialakított génkönyvtár *Pseudomonas*-ba történő hat órán keresztüli konjugációjából származtak. Feltételezve, hogy minden recipiens egyedi génkönyvtári elemet hordozó donorral konjugált, vagyis a transzkonjugáns vonalak között nem volt ismétlődés, a zöldpaprika fertőzéshez felhasznált 10^4 transzkonjugáns telep legfeljebb 10^4 egyedi génkönyvtári fragmenst képviselt. Ennek 0,1%-a az a 10 *ivi*-gén, melyeket egyetlen vizsgált paprikagyűrűből különítettünk el. Az 1%-hoz közeli konstitutív promóterek arányával együtt (13., 14. ábrák) ez a 0,1% összemérhető az egyéb IVET rendszerekkel kapott eredményekkel.

A *P. viridiflava* heterogén faj (Goss et al., 2005, Manceau és Horvais, 1997). A faj izolátumai (törzsei) raktári károsítók, melyek a zöldségek és gyümölcsök lágyrothadását idézik elő. Az izolátumok többsége indukálja a HR-t dohánylevélen (Klement et al., 1964, Szépréti et al., 1999). Más izolátumok pedig az *Arabidopsis* levél nekrózisát okozzák (Jakob et al., 2002). A növények fertőzése során a kórokozó baktériumok több lépésen keresztül váltják ki a gazdanövény betegségét. Elsőként behatolnak a növény szövetei közé, majd a tápanyagot felhasználják / felhasználhatóvá alakítják, szaporodnak, elkerülik és/vagy letörik, illetve késleltetik a növény védekező rendszereit, végül kiváltják a betegségtüneteket. Amellett, hogy a *P. viridiflava* pektát liáz enzimének génjét már korábban izolálták, nem ismertek más, a kórokozással kapcsolatos egyéb faktorai, melyek a fertőzés során indukálódnak. Amikor a baktérium fogékony növénnyel alkotott kapcsolatának eredménye a lágyrothadás kialakulása, a pektint bontó enzimek a lényegi virulencia faktorok. Emellett azonban a baktérium számos egyéb virulenca faktort igényel a gazdanövény inváziójához, kolonizálásához. Ismert, hogy a kórokozó baktériumok, beleértve a filogenetikailag távoliakat is, genomjukban számos közös tulajdonságot hordoznak, mint amilyenek a patogenitás szigetek (PAI, review: Hacker és Carniel, 2001). Sok kórokozásban résztvevő gént azonosítottak a kórokozó baktériumokban, de számos esetben nem tisztázott ezek feladata, illetve fajok közötti elterjedtsége. Ezek közül

egy, az először *S. typhimurium* esetében közölt *mviN* (Carsiotis et al., 1989), ami egy feltételezett membrán fehérjét kódol, és amelyik szükséges a nitrogénkötő szimbionta *Rhizobium tropici* mozgásához is (O'Connell et al., 1998).

Az $mviN_{pv}$ génre nézve funkcióját vesztett *P. viridiflava* mutáns törzzsel végzett vizsgálatok bizonyították, hogy (i) az $mviN_{pv}$ szükséges a baktérium úszó-terjedő mozgásához, mivel lágyagarban a vad típusú baktériummal szemben, a mutáns törzs az inokuláció helyétől nem terjedt szét (25. ábra), valamint (ii) az $MviN_{pv}$ a *P. viridiflava* virulencia faktora, amely a növény inváziójához szükséges, hiszen a mutáns törzs a *P. fluorescens* szaprofiton baktériumhoz hasonlóan nem volt képes az *Arabidopsis thaliana* leveleinek felületéről a természetes nyílásokon bejutva elszaporodni a sejtközötti járatokban, ahogy azt a vad típusú törzs tette (26. ábra). (iii) Azt, hogy az $MviN_{pv}$ a fertőzés korai szakaszában játszhat lényeges szerepet, megerősítik azok a baktériumszaporodás görbék, melyek a vad típusú és a mutáns *P. viridiflava* törzsekből készített baktérium szuszpenziók injekciós fecskendővel közvetlenül az *Arabidopsis* levelek sejtközötti járataiba juttatását követően, a baktériumok *Arabidopsis* levelekben történő szaporodását mutatják (27. ábra). Az $MviN_{pv}$ invázióhoz kötött szerepét bizonyítja az is, hogy az $mviN_{pv}$ inaktiválása nem vezetett a fertőzött *Arabidopsis* levelekben sem a klorotikus udvar, sem pedig a nekrózis elmaradásához (28. ábra).

Habár az MviN feladata nem teljesen tisztázott, érdemes megjegyezni, hogy a lágyagarban végzett úszó mozgáshoz kemotaxis szükséges. Ennek figyelembevételével arra lehet gondolni, hogy az MviN a környezeti jelek érzékelésében, illetve a jelek szállításában részt véve váltja ki a kemotaxis alapú mozgást. Ezt a hipotézist erősíti meg az, hogy a szimbionta nitrogénkötő *Rhizobium leguminosarum* (Schlüter et al., 2000) és *R. tropici* (O'Conell et al., 1998) esetében az *mviN* gén 5' vége átfed a *glnD*, nitrogén szenzort kódoló gén 3' végével (Kennedy et al., 1994).

A munkánk során azonosított gének közül a betegségtünet megjelenéséig vezető folyamatban elsőként tehát a baktérium mozgásában szerepet játszó $mviN_{pv}$ kap feladatot. A többi izolált gén közül a kórokozó baktérium mozgásában játszik szerepet a szerin érzékelő receptor fehérje is, mely a baktériumokra jellemző kemotaktikus mozgás irányát szabályozza. A kórokozás folyamatában előrehaladva kapnak szerepet azok az azonosított gének, melyek a növény tápanyagainak felhasználásában és részben a védekezési rendszereinek letörésében működnek közre, ilyen az ABC transzporter; sziderofór::vas komplex receptor és a 2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratáz génje. Előbbi a szűkös környezeti tényezők leküzdésében szereplő vas(III)-kelát képző és hasznosító rendszer részeként működik, bár *P. aeruginosa* -ban e feladata mellett, a pyoverdin sziderofór kiváltja három kiválasztásra kerülő virulencia faktor termelését is (Beare et al., 2003). Emellett a *Ralstonia solanacearum*-ban talált PrhA,

mely egy külső membrán sziderofór receptorokkal homológ fehérje, az eddigi ismeretek szerint az egyetlen olyan faktor, amely a kórokozó baktérium *hrp* génjeinek indukálását váltja ki azáltal, hogy érzékeli a baktériumnak a növényi sejttel történő érintkezését (Aldon et al., 2000). A 2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratáz a fenol/3,4-dimetilfenol átalakítás enzime, mely egyrészt a növény védekező elemeiként ismert, több ezer fenol vegyület (egyszerű fenolok, fenol savak, kinonok, flavonoidok, Geissman, 1963) lebontásában vehet részt, másrészt a növényi jelmolekulaként ismert, szintén fenol származék szalicilsav (SA, 2-hidroxibenzoesav) lebontásával befolyásolhatja a növény védekező rendszereinek (systemic acquired resistance, SAR) működését. A gazdanövénybeli ozmótikus stresszel szembeni ellenállóság legalább részben a Ca^{2+}/H^{+} cserét katalizáló Ca^{2+}-antiporter fehérje révén valósulhat meg. A kórokozási folyamat végén, a lágyrothadásos tünetek kialakításáért felelős pektát liáz enzim (PEL, EC 4.2.2.2) génjének azonosításával megerősítettük az enzim kórokozásban betöltött szerepét

Vizsgálati rendszerünkkel tehát, többségében a kórokozó baktérium olyan génjeit azonosítottuk, melyek a kórokozás járulékos elemeit kódolják, ez alól kivétel a lágyrothadásos tünet elsődleges kiváltója, a pektát liáz enzim génje, valamint az $MviN_{pv}$ memránfehérjét kódoló gén.

A különböző környezeti stresszel szemben a baktériumok gyors alkalmazkodó képességgel rendelkeznek. A növény sejtközötti járatainak abiotikus stressz tényezőit modellezve, a kanamycin riportergén kifejeződése alapján minimál és komplett táptalajokon vizsgáltuk az izolált gének aktivitását. A kísérlet rámutatott arra, hogy az izolált gének többsége induktív környezet hiányában erős transzkripciós gátlás alatt áll, kivételt az IviPV-s1/5 és IviPV-s1/6 törzsek mutattak.

Az *ivi*-gének *in planta* expressziós dinamikájának vizsgálata során meghatároztuk a GFP által kibocsájtott fluoreszcencia jeleket a baktérium szuszpenziót tartalmazó paprikaminták homogenátumában, a fertőzéskor és azután 1,5-2-és 3 órával. A kísérlet megerősítette az *in vitro*, minimál táptalajon kapott eredményeket, azzal a kiegészítéssel, hogy a vizsgált *ivi*-gének transzkripciós gátlása a fertőzést követően megszűnik; valamint, hogy a génindukció révén termelődő GFP által sugárzott fluoreszcencia a fertőzést követő harmadik órában a mérhetőség küszöbértékét átlagosan 30%-al meghaladó mértékben növekszik (24. ábra).

Érdekes módon a 7.2 mellékletben megtalálható azonosított ORF-ek transzlációs indító kodonjától upstream elhelyezkedő nukleinsav szekvenciák között több esetben nem találtunk ismert, vagy valószínűsíthető promótert. Ez vélhetően az egy szabályozási egységbe (operonba) rendezett gének esetében az operon elejéről átíródó és ún. policisztronos mRNS-t

képző ORF-ek esetében lehetséges. A pektát liázt kódoló ORF esetében azonban a σ^{54} és σ^{70} kötőhelyek mellett, TGTGA-N_6-TCACA, CRP felismerő helyet valamint egy konzervált, (pirimidin)$_n$-CA-N-GGA, GacA-tól függő, RNS típusú szabályozó kötőhelyet is találtunk (Blumer et al., 1999, Liao et al., 1996). Ez a génkifejeződés transzkripciós és transzlációs szinten történő lehetséges szabályozását jelenti.

A pIviGK plazmid lehetővé teszi, hogy a konstitutív és induktív promótereket elkülöníthessük. Munkánk során azonban az is bebizonyosodott, hogy a *gfp* riportergén alkalmassá teszi a plazmidot olyan promóterek kiválogatására is, melyeknek van egy enyhe alapaktivitása, ami indukció hatására megnövekszik. Az IviPV-s1/5 és az IviPV-s1/6 törzsek az *in vitro* szelekció harmadik napjára elegendő GFP-t termeltek ahhoz, hogy UV fény megvilágítás hatására, szemmel látható fluoreszcens fényt bocsássanak ki. Ez arra utal, hogy (i) a törzsek által képviselt gének promóter régióinak alapaktivitása van és az ebből származó, stabilan fennmaradó GFP halmozódik fel, vagy, hogy (ii) azok kifejeződése függ a *P. viridiflava* növekedésétől (pl. stacioner fázisba lépésétől), illetve, hogy (iii) az indukció az inkubáció alatt, a táptalajban változó valamely fizikai faktor révén valósul meg (ilyen lehet pl. a szaporodó baktériumok másodlagos anyagcseretermékei által bekövetkező pH csökkenés). A fluorométerrel végzett *in planta* kifejeződés kinetikai vizsgálata alapján csak annyi biztos, hogy a két Ivi-törzsben vizsgált promóterek megfelelő környezetben képesek átváltani egy erősen kifejező állapotra. Az *mviN$_{pv}$* esetében a fenti feltételezések egyike sem zárható ki, hiszen az *E. coli*-ban és *Bacillus subtilis*-ben, a flagellin képzéséhez szükséges σ^{28} (RpoF, Arnosti és Chamberlin, 1989, Helmann és Chamberlin, 1987, Helmann et al., 1988, Mirel és Chamberlin, 1989) és a *Vibrio cholerae* (Correa et al., 2000), *Helicobacter pylori* (Spohn és Scarlato, 1999), és *Campylobacter jejuni* baktériumokban a flagellum biogeneziséhez szükséges σ^{54} (Barrios et al., 1999) kötőhelyek egyaránt megtalálhatók az *mviN$_{pv}$* promóter régiójában. Az RNS polimeráznak az utóbbival alkotott komplexe csak egy, az NtrC családba tartozó aktivátor kötődésével együtt képes a transzkripciót véghezvinni. Az aktivátor hiányában a σ^{54} nem képes a kettősszálú DNS szétnyitására, ami nemcsak a saját maga által irányított transzkripciót akadályozza meg, de egy másik átfedő illetve upstream promóterről meginduló átírást is meggátolja, mivel fizikai akadályt jelent a tőle 5' irány felől érkező RNS polimeráznak (Rojo, 2001). Érdekes módon az *mviN$_{pv}$* 5' upstream régiójában található, feltételezett NtrC kötőhelyek átfedésben vannak több DNS kötő fehérje feltételezett felismerő helyével, ami a kötőhelyért folytatott versengést eredményezheti. Az *mviN$_{pv}$* másik vélhető promótere, melyben a σ^{70} felismerő hely található, szintén többszörös szabályozás alatt állhat, mivel a -10 box-a fedésben van a quorum sensing (sejtszámtól függő-) szabályozást biztosító Lux box-al (Egland és Greenberg, 2000), emellett a katabolit represszióban aktivátorként és

represszorként egyaránt szerepet kapó, CRP és CytR kötőhelyek is megtalálhatók a régióban (Kolb et al., 1993, Rasmussen et al., 1993), valamint az SOS-válasz represszora, a LexA felismerő helye (Calero et al., 1991) és a KdgR represszor (Aarons et al., 2000) kötőhelye is. A CytR mozgásban betöltött jelentőségét *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* esetében már igazolták (Matsumoto et al., 2003), a CRP σ^{54} működését potenciálisan gátló hatása (Wang et al., 1998) bonyolítja a promóter régió szabályozásának megértését. Mindezek mellett, az *mviN*$_{pv}$ 5' nem kódoló régiójában találtunk tökéletlen PIP box-okat is (hrpII box néven is ismert, Oku et al., 1995). A PIP box, a *X.campestris* pv. *vesicatoria,* HrpX (Buck et al., 1986, Noël et al., 2002), és a *Ralstonia solenacearum* HrpB (Cunnac et al., 2004, Brown és Collmer, 2004), AraC-típusú transzkripciós aktivátorok (Wengelnik és Bonas, 1996) feltételezett kötőhelye, melyek e baktériumokban a *hrp* gének szabályozásában vehetnek részt. PIP-box által szabályozott génexpresszió *Pseudomonas*ok esetében nem található az irodalomban. Érdekes módon, a vizsgált promóter nem tartalmaz GGAACTNA-N13-CGACNNA, hrp box-ot, mely a *P. syringae* és *Erwinia* spp. (Bogdanove et al., 1998, Innes et al., 1993) esetében, a *hrpL*-től függő promóterekben található meg és feladatát tekintve analóg a PIP box-szal.

Az *mviN*$_{pv}$ 5' nem kódoló régiójában jelenlevő, többféle feltételezhető transzkripciós faktor jelenléte lehetőséget biztosít az MviN$_{pv}$ különböző mértékű termeléséhez, ez lehetővé teszi, hogy az *P. viridiflava* eltérő körülmények között, differenciáltan fejezze ki az *mviN*$_{pv}$-t. A transzkripciós start pontok meghatározása különböző körülmények között választ adhat a promóter régió használatával kapcsolatban felmerült kérdésekre.

Az új, IVET-típusú szelekciós módszert hasznosító pIviGK plazmiddal végzett kísérleteink eredményeként tehát több, a *P. viridiflava* kórokozásában szerepet játszó gént sikerült meghatároznunk. Ezen eredmények alapján az általunk szerkesztett pIviGK, az antibiotikummal szemben kifejtett ellenállóképességet kihasználó szelekciós rendszerrel együtt alkalmazva, más baktérium-növény kölcsönhatásában is alkalmazható lehet a kórokozó gazdanövényben indukálódó génjeinek feltárásához.

A módszerrel lehetőség nyílhat a baktérium olyan effektor fehérjéit kódoló génjeinek izolálására, melyek a növényi ellenálló képesség gátlása révén elősegítik a betegségek kialakulását. Az ilyen faktorokkal szembeni szelekció a baktériumos növénybetegségekkel szembeni széleskörű rezisztenciát eredményezhet. Ez a tudatos növénynemesítés rassz -specifikus, *R* gén alapú törekvésein túlmutató lehetőségeket biztosíthat, hiszen segítségével a termesztett növények a baktériumos kórokozóik egyszerre akár több fajával szemben is védettséget kaphatnának.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A növénykórokozó baktériumok kórokozó képességének genetikai tanulmányozása gyakran ütközik akadályokba olyan gének azonosításánál, melyek elsősorban a növényekkel alkotott kölcsönhatásuk során aktiválódnak. Munkánk során IVET (*in vivo* expression technology, Mahan et al., 1993) promóter kereső plazmidokat szerkesztettünk és alkalmaztunk olyan gének izolálásához és jellemzéséhez, melyek a lágyrothadásos betegséget okozó *Pseudomonas viridiflava* kórokozással kapcsolatban lévő faktorait örökítik.

A pIviGK plazmid használata, a hozzá kapcsolódó antibiotikum rezisztencia-alapú szelekciós módszerrel lehetővé tette a *P. viridiflava* több olyan génjének azonosítását, melyek a fertőzés során erősíthetik annak virulenciáját. Ezek közé, az *in vivo* indukálódott gének közé tartozik a *pel*, mely a lágyrothadásos tünetek kialakulásáért felelős pektát liázt kódolja. E mellett izoláltuk és jellemeztük a *P. viridiflava* egy új, feltételezhetően membránhoz kötött virulencia faktorát kódoló génjét, az $mviN_{pv}$–t is. Az $MviN_{pv}$ fehérjét kódoló gén mutációja a *P. viridiflava* mozgását és virulenciáját is befolyásolja. Az $mviN_{pv}$ génnel fúzionált *gfp* riportergén *in planta* kifejeződés dinamikája azt mutatta, hogy LB táptalajon az $mviN_{pv}$ –nek alap aktivitása van, amely induktív tényezők között megnövekedhet. Az $mviN_{pv}$ 5' upstream régiójának elemzése többszörösen átfedő, σ^{28}–at és σ^{54}–et felismerő, illetve vélhetően PIP-box-ot tartalmazó, feltételezett promóter szekvenciák jelenlétét mutatta. A különböző promóterek valószínűleg a növényi szövetekben a fertőzés során, megfelelő körülmények között lépnek működésbe.

A többi ismert génnel szekvencia homológiát mutató azonosított ORF-ek membrán fehérjéket, vagy lebontó folyamatokban szereplő enzimeket kódolnak.

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.

SUMMARY

Analysis of virulence mechanisms of plant pathogens is often limited by the lack of genetic tools that can be used to identify genes that are preferentially expressed during their interactions with plants. We have constructed IVET (*in vivo* expression technology) promoter probing plasmids and utilized them for the identification of genes that encode pathogenicity factors of the soft rot causing bacterium *Pseudomonas viridiflava.*

Using the plasmid pIviGK and the corresponding antibiotic resistance-based selection method allowed the identification a number of genes that potentially enhance the virulence of *P. viridiflava* during infection. These *in vivo* induced genes included *pel*, the gene encoding pectate lyase, which is responsible for the development of soft rot symptoms. We have also isolated, and characterized the gene $mviN_{pv}$ encoding a putative novel membrane associated virulence factor of *P. viridiflava.* A mutation in the gene encoding $MviN_{pv}$ protein was shown to influence motility as well as virulence of *P. viridiflava*. The $mviN_{pv}$ gene is expressed to a moderate level in LB media and it can increase under inducing conditions as was shown by measuring *in planta* expression dynamics of the fused *gfp* reporter gene. Analysis of the 5'upstream region of $mviN_{pv}$ showed the existence of multiple overlapping putative promoter sequences, recognized by σ^{28} and σ^{54} and a putative PIP-box. It is likely that the different putative promoters become functional under particular conditions, in plant tissues during infection.

The other identified ORFs that show sequence identity to known genes encode membrane proteins, or encode enzymes in catabolic pathways.

Based on these results the IVET method that utilizes pIviGK would certainly allow identification of additional virulence genes of plant pathogenic bacteria thereby provide deeper insights into the pathogenesis of bacterial diseases of plants.

7. MELLÉKLETEK

7.1 Irodalomjegyzék

Aarons, S., A. Abbas, C. Adams, A. Fenton, and F. O'Gara. (2000): A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. J. Bacteriol. 182: 3913–3919.

Abramovich, R. B. (2003): *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. EMBO J. 22:60-69.

Adetuyi, F. C., A. Isogani, D. Giorgio, A. Ballio, J. Y. Takemoto. (1995): Saprophytic *Pseudomonas syringae* strain M1 of wheat produces cyclic lipodepsipeptides. FEMS Microbiol. Lett. 131: 63-65.

Albus, A. M.,E. C. Pesci, L. J. Runyen-janecky, S. E. H. West, and B. H. Iglewski. (1997): Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol.* 179: 3928–3935.

Aldon, D., B. Brito, C. Boucher, and S. Genin. (2000): A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO J. 19:2304-2314.

Alfano, J. R., A. Collmer. (1996): Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. Plant Cell 8: 1683-1698.

Alfano, J. R., A. Collmer. (1997): The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. J. Bacteriol. 179: 5655-5662.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. (1990): Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403–410.

Angelichio, M.J., Camilli, A. 2002. *In vivo* expression technology. Infect. Immun. 70:6518-6523.

Arnosti, D. N., and M. J. Chamberlin. (1989): Secondary σ factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:830-834.

Axtell, K. J., and B. J. Staskawicz. (2003): Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. Cell 112:369-377.

Barras, F., F. Van Gijsegem, A. K. Chatterjee. (1994): Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annu. Rev. Phytopathol. 32: 201-234.

Barrios, H., B. Valderrama, and E. Morett. (1999): Compilation and analysis of σ^{54} dependent promoter sequences. Nucleic Acids Res. 22:4305–4313.

Bauer, Z. L. Gomez-Gomez, T. Boller, G. Felix. (2001): Sensitivity of different ecotypes and mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the bacterial elicitor flagellin correlates with the presence of receptor-binding sites. J. Biol. Chem. 276:45669-456776.

Baulcombe, D. C., S. Chapman, S. Santa Cruz. (1995): Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infection. Plant J. 7:1045-1053.

Bateman, A., E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K. L. Howe, M. Marshall, E. L. Sonnhammer. (2002): The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 30:276-80.

Beare, P. A, R. J. For, L. W. Martin and I. L. Lamont. (2003): Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. Mol Microbiol. 47:195-207.

Bell, A.A. (1981): Biochemical mechanisms of disease resistance. Annu. Rev. Plant Physiol. 32:21-81.

Bell, E. A., B. V. Charwood. (1980): Secondary plant products. Springer Verlag, Berlin.

Van der Biezen E. A., J. D. Jones. (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for gene concept. trends Biochem. Sci. 23:454-456.

Blumer, C., S. Heeb, G. Pessi, and D. Haas. (1999): Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:14073–14078.

Boch, J., V. Joardar, L. Gao, T. L. Robertson, M. Lim, B. N. Kunkel. (2002): Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Microbiol. 44:73-88.

Bogdanove, A. J., S. V. Beer, U. Bonas, C. A. Boucher, A. Collmer, D. L. Coplin, G. R. Cornelis, H.-C. Huang, S. W. Hutchenson, N. J. Panopoulos, F. VanGijsegem. (1996): Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. Mol. Microbiol. 20: 681-683.

Bogdanove, A. J., J. F. Kim, Z. Wei, P. Kolchinsky, A. O. Charkowsky, A. K. Conlin, A. Collmer, S. W. Beer. (1998): Homology and funcional similarity of a *hrp* linked pathogenicity operon, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the *avrE* locus locus of *Pseudomonas syringae* patovar *tomato.* Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 1325-1330.

Boller, T. (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. 46:189-214.

Bonas, U., J. Conrads-Strauch, I. Balbo. (1993): Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. Mol. Gen. Genet. 238:261-269.

Bonas, U. (1994): *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. In: Dangl, J. L. (Szerk.) Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular Mechanisms. (Current Topics in Microbiology and Immunology, vol.192), 79-98. Springer, Berlin

Bonas, U., G. Van der Achervecken. (1997): Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: general phenomenon in resistance to bacterial diseases? Plant J. 12: 1-7.

Bottin, A., L. Larche, F. Villalba, E. Gaulin, M. .T. Esquerre-Tugaye, M. Rickauer. (1999): Green fluorescent protein (GFP) as gene expression reporter and vital marker for studying development and microbe-plant interaction in the tobacco pathogen *Phythphthora parasitica* var. *nicotianae*. FEMS Microbiol. Lett. 176:51-56.

Bozsó, Z., P. G. Ott, M. L. Kecskés, Z. Klement (1999): Effect of heat and cycloheximide treatment of tobacco on the ability of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp/hrmA* mutants to cause HR. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:215- 223.

Brandl, M. T., B. Quinones, S. E. Lindow (2001): Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:3454-3459.

Bretz, J. R., N. M. Mock, J. C. Charity, S. Zeyad, C. J. Backer, and S. W. Hutcheson. (2003): A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. Mol. Microbiol. 49:389-400.

Brosius, J., J. R. Lupski. (1987): Plasmids for the selection and analysis of procaryotic promoters. Methods in Enzimol. 153: 54-68.

Brown, I., J. Mansfield, U. Bonas. (1995): *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophill cells. Mol. Plant-Microbe Interact. 8:825-836.

Brown, D.G., A. Collmer. (2004). *Ralstonia solanacearum* genes induced during growth in tomato: an inside view of bacterial wilt. Mol. Microbiol. 53:1641-1660.

Buck, M., S. Miller, M. Drummond, and R. Dixon. (1986): Upstream activator sequences are present in the promoter of nitrogen fixation genes. Nature (London) 320:374–378.

Bultreys, A., and I. Gheysen. (2000): Production and comparison of peptide siderophores from strains of distantly related pathovars of *Pseudomonas syringae* and *Pseudomonas viridiflava* LMG 2352. Appl. Environ. Microbiol. 66: 325–331.

Bultreys, A., I. Gheysen, H. Maraite, and E. De Hoffmann. (2001): Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. Appl. Environ. Microbiol. 67: 1718–1727.

Buyer, J. S. and J. Leong (1986): Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. J. Biol. Chem. 261:791–794.

Büttner, D., U. Bonas. (2002): Port of entry-the type III secretion translocon. Trends Microbiol. 10:186-192.

Calero, S., X. Garriga, and J. Barbet. (1991): One-step cloning system for isolation of bacterial LexA-like genes. J. Bacteriol. 173: 7345-7350.

Carsiotis, M., B. A. Stocker, D. L. Weinstein, and A. D. O'Brien. (1989): A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to *flg*. Infect. Immun. 57:3267-3280.

Casper, S. J., C. A. Holt. (1996): Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. Gene 173:69-73.

Cassab, G. I., J. E. Varner, (1988): Cell wall proteins. Ann. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39:321-353.

Chalfie, M., G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Phraser. (1994): Green fluorescent protein-encoded as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.

Cheng, N. H., C. L. Su, S. A. Carter, R. S. Nelson. (2000): Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. Plant J. 23:349-362.

Chesnokova, O., J. B. Coutinho, I. H. Khan, M. S. Mikhail, and C. I. Kado. (1997): Characterization of flagella genes of *Agrobacterium tumefaciens*, and the effect of abald strain on virulence. Mol. Microbiol. 23:579-590.

Chester, K. S. (1933): The problem of aquired physiological immunity in plants. Q. Rev. Biol. 8:275-324.

Chiag, S.L., J.J. Mekalanos, D.W. Holden. (1999): *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. Annu. Rev. Microbiol. 53:129-54.

Collmer, A., and N. T. Keen. (1986): The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 24:383–409.

Collmer, A. (1996): Bacterial avirulence proteins: where is the action? Trends Plant Sci. 1: 209-210.

Collmer, A. (1998): Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 329-335.

Cormarck, B. P., R. H. Valdivia. S. Falkow. (1996): FACS-optimised mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene 173: 33-38.

Cornelis, G.R., H. Wolf-Watz. (1997): The *Yersinia*: a bacterial system for subverting eucaryotic cells. Mol. Biology. 23: 861-867.

Correa, N. E., C. M. Lauriano, R. McGee, and K. E. Klose. (2000): Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization. Mol. Microbiol. 35:743–755.

Crameri, A., E. A. Whitehorn, E. Tate, W. P. C. Stemmer. (1996): Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nature Biotechnol. 14: 315-319.

de Crombrugghe, B., S. Busby, and H. Buc. (1984): Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. Science 224:831–838.

Cunnac, S., C. Boucher, and S. Genin. (2004): Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the Type III Secretion System and effector genes in *Ralstonia solanacearum.* J. Bacteriol. 186:2309–2318.

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

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

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

Czelleng, A. (2005 b.): A Baktériumok Változékonyságának Molekuláris Genetikai Alapja. In: Gáborjányi Richard (Szerk.): Molekuláris Növénykórtan. Budapest: Mezőg. Szaktudás kiadó. (megjelenés alatt)

Dagley, S. and Gibson D. T. (1965): The bacterial degradation of catechol. Biochem. J. 95:466-474.

Dangl, J. R., C. Ritter, M. J. Gibbon, L. A. Mur, J. R. Wood, S. Goss, J. Mansfield, J. D. Taylor, A. Vivian. (1992): Functional homologues of the *Arabidopsis RPM1* disease resistance gene in bean and pea. Plant Cell 4:1359-1369.

Dangl, J. L. (1994): The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. In: Dangl, J. L. (Szerk.) Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals: Molecular and Cellular Mechanisms (Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 192), 99-118. Springer, Berlin.

Delaney, T. P., S. Uknes, B. Vernooij. (1994): A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266:1247-1250.

Dennis, D. T., D. H., Turnip, D. D. Lefebvre, D. B. Layzell. (1997): Plant metabolism. Addison Wesley Longman, Harlow.

Denny, T. P., (1995): Involvement of bacterial polysaccharide in plant pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 33:173-197.

Desikan, R., A. Clarke, P. Atherford, J. T. Hancock, S. J. Neill. (1999): Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Planta 210:97-103.

Egland, K. A., and E. P. Greenberg. (2000): Conversion of the Vibrio fischeri transcriptional activator, LuxR, to a repressor. J. Bacteriol. 182:805-811.

Ellenberg, J., J. Lippincott-Schwartz, J. F.Presley. (1999): Dual-colour imaging with GFP variants. Trends Cell Biol. 9:52-56.

Ellis, J., P. Dodds, T. Pryor. (2000): Structure, function and evolution of plant disease resistant genes. Curr. Opin. Plant Biol. 3:278-284.

Ellingboe, A. H. (1982): Genetical aspects of active defence. In: R.K.S. Wood (Szerk.): Active Defence Mechanisms in Plants, 179-792. Plenum Press, New York.

Epel, B. L., H. S. Padgett, M. Heinlein, R. N. Beachy. (1996): Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. Gene 173(1 Spec No):75-79.

Espinosa, A. (2003): The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrozin phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. Mol. Microbiol. 49:377-387.

Everiss, K. D., K. J. Hughes, M. E. Kovach, and K. M. Peterson. (1994): The *Vibrio cholerae acfB* colonization determinant encodes an inner membrane protein that is related to a family of signal-transducing proteins. *Infect. Immun.* 62:3289–3298.

Falk, P., T. Boren, D. Haslam, M. Caparon (1994): Bacterial adhesion and colonization assays. Methods Cell Biol. 45:165-192.

Felix, G. (1999): Plants recognize bacteria through the most conserved domain of flagellin. Plant J. 18:265-276.

Felix, G., and T. Boller. (2003): Molecular sensing of bacteria in plants. J. Bacteriol. 278:6201-6208.

Fenselau, S., U. Bonas. (1995): Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa and Fli secretion systems. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 845-854.

Fetherston, J. D., V. J. Bertolino, and R. D. Perry (1999): YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 32:289–299.

Figurski, D. and D. R. Helinski. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:1648-1652.

Finelli, A., C. V. Gallant, K. Jarvi, and L. L. Burrows. (2003): Use of In-Biofilm Expression Technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J. Bacteriol. 185:2700–2710.

Flor, H. H. (1955): Host-parasite interactions in flax rust – its genetics and other implications. Phytopathol. 45: 680-685.

Friedman, D. I. (1988): Integration host factor: a protein for all reasons. Cell 55:545–554.

Fullner, K. J., J. C. Lara, E. W. Nester. (1996): Pilus assembly by *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA transfer genes. Science 273: 1107-1109.

Fuqua, C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. (1996): Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 50:727–751.

Gabriel, D. W., B. G. Rolfe. (1990): Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 28:365-391.

Gal, M., G. M. Preston, R. C. Massey, A. J. Spiers, P. B. Rainey. (2003): Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. Mol. Ecol. 12:3109-3121.

Gaudriault, S., L. Malandrin, J. P. Paulin, M. A. Barny. (1997): DspA, an essential pathogenicity factor in *Erwina amylovora* and the locus of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomatoe*. Proc. Natl. Acad. Sci. 26: 1057-1068.

Geissman, T. A. (1963): Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: M. Florkin and E. H. Stotz (Szerk.), Pyrrole Pigments, Isoprenoid Compounds And Phenolic Plant Constituents, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y. p. 265.

Gold, L., D. Pribnow, T. Schneider, S. Shinedling, B. S. Singer, G. Stormo. (1981): Translational initiation in prokaryotes. Annu. Rev. Microbiol. 35:365-403.

Gómez-Gómez, L., and T. Boller. (2002): Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. Trends Plant Sci. 7:251-256.

Gonzalez, A. D., V. Espinosa, A. T. Vasconcelos, E. Perez-Rueda, and J. Collado-Vides. (2005): TRACTOR_DB: a database of regulatory networks in gamma-proteobacterial genomes. Nucleic Acids Res. 33:D98–D102.

Gordon, S. A., B. Stewart, P. Williams. (1992): *lux* genes and the application of bacterial bioluminescence. J. Gen. Microbiol. 138: 1289-1300.

Goss, E. M., M. Kreitman and J. Bergelson. (2005): Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana.* Genetics 169: 21–35.

Grant, M. R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R. W. Innes, J. L. Dangl. (1995): Structure of the *Arabidopsis PMR1* gene enabling dual specificity disease resistance. Science 269:843-846.

Greenberg, J. T. (1996): Programmed cell death: a way of life for plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:12094-12097.

Grimm, C., W. Aufsatz, N. J. Panopuolos. (1995): The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complet regulatory unit. Mol. Microbiol. 15: 155-165.

Groisman, E. A., H. Ochman. (1996): Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. Cell 87: 791-794.

Gross, D.C. (1991): Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 247-278.

Gualerzi, C. O., C. L. Pou. (1990): Initiation of mRNA translation in prokaryotes. Biochemistry 29: 5881-5889.

Guzman, L-M., D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith. (1995): Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. J. Bacteriol. 177:4121-4130.

Hacker, J., and J. B. Kaper. (2000)**:** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Micrbiol. 54:641-679.

Hacker, J., and E. Carniel. (2001): Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. EMBO reports 2:376-381.

D'Haeze, W. (2004, a): Structural characterization of extracellular polysachadides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. Mol. Microbiol. 52:485-500.

D'Haeze, W., and M. Holsters. (2004. b): Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity. Trends Microbiol. 12:555-561.

Hamer, L., T. M. DeZwaan, M. V. Montenegro-Chamorro, S. A. Frank, and J. E. Hamer. (2001): Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. Curr. Opin. Chem. Biol. 5:67–73.

Handfield, M., and R. C. Levasque. (1999): Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria, FEMS Microb. Reviews 23:69-91.

Hamm, H. E., A. Glicrist. (1996): Heterodimeric G proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 8: 189-196.

Hammerschmidt, R. (1999): Phytoallexins: what have we learned after 60 years? Annu. Rev. Phytopathol. 37:285-306.

Hay, N. A., D. J. Tipper, D. Gygi, and C. Hughes. (1997): A nonswarming mutant of *Proteus mirabilis* lacks the Lrp global transcriptional regulator. J. Bacteriol. 179:4741–4746.

He, S. Y., H-C. Huang, A. Collmer. (1993): *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* $Harpin_{Pss}$: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell 73:1255-1266.

Heath, M. C. (2001): Non-host resistance top lant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? Physiol. Mol. Plant Pathol. 58:53-54.

Helmann, J. D., L. M. Marquez, and M. J. Chamberlin. (1988): Cloning, sequencing, and description of the *Bacillus subtilis* σ^{28} gene. J. Bacteriol. 170:1568-1574.

Heim, R., A. B. Cubitt, R. Y. Trien. (1995): Improved green fluorescence. Nature 373:663-669.
Helmann, J. D., and M. J. Chamberlin. (1987): DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative σ factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:6422-6424.

de Henestrosa, F., A. R., J. Cune, G. Mazon, B. L. Dubbels, D. A. Bazylinski, and J. Barbe. (2003): Characterization of a new LexA binding motif in the marine *Magnetotactic* bacterium strain MC-1. J. Bacteriol. 185: 4471–4482.

Hengge-Aronis, R. (2002): Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. Microbiol. Molecular Biol. Reviews. 66: 373-395.

Hongyun, C., M. Bjerknes, R. Kumar, and E. Jay. (1994): Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. Nucleic Acids Res. 22:4953-4957.

Hoyos, M. E., C. M. Stanley, S. Y. He, S. Pike, X-A. Pu, A. Novacky. (1996): The interaction of harpin$_{Pss}$ with plant cell walls. Mol. Plant- Microbe Interact 9: 608-616.

Höfte, M. (1993): Classes of microbial siderophores. In: L. L. Barton and B. C. Hemming (Szerk.) Iron Chelation In Plants And Soil Microorganisms. Academic Press, San Diego, Calif. p. 3–26.

Huang, H.-C., R-H. Lin, C.-J. Chang, A. Collmer, W.-L. Deng. (1995): The *Pseudomonas syringae* pv. *syringae 61* induces two blocks of genes required for harpin$_{Pss}$ secretion that are arranged collineary with *Yersinia ysc* homologues. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 733-746.

Huang, Z., Han, Y., Howell, S. H. (2000): Formation of surface tubules and fluorescent foci in *Arabidopsis thaliana* protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and the cauliflower mosaic virus movement protein. Virology 271:58-64.

Huber, H. E., B. B. Beauchamp, and C. C. Richardson. (1988): *Escherichia coli* dGTP triphosphohydrolase is inhibited by gene 1.2 protein of bacteriophage T7. J. Biol. Chem. 263:13549-13556

Hvorup, R. N., B. Winnen, A. B. Chang, X-F. Zhou, and M. H. Saier Jr. 2003. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. Eur. J. Biochem. 270:799–813.

Imlay, J. A. (2003): Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol. 57:395-418.

Innes, R. W., A. F. Bent, B. N. Kunkel, S. R. Bisgrove, and B. J. Staskawicz. (1993): Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. J. Bacteriol. 175:4859–4869.

Inoune, H., H. Nojima, and H. Okayama (1990): High efficient transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96: 23-28.

Jakob, K., E. M. Goss, H. Araki, T. Van, M. Kreitman, and J. Bergelson. (2002): *Pseudomonas viridiflava* and *P. syringae*-natural pathogens of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe. Interact. 15:1195-1203.

Jishane, M., A. Iwata, S. Ueda, and A. Ishihama. (1996): Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. J. Bacteriol. 178: 5447-5451

Kearney, B., B. J. Staskawicz. (1990): Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. Nature 346: 385-386.

Keen, N. T. (1990): Gene for gene complementary in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. 24: 447-469.

Kennedy, C., N. Doetsch, D. Meletzus, E. Patriarca, M. Amar, and M. Iaccarino. (1994): Ammonium sensing in nitrogen-fixing bacteria: functions of the *glnB* and *glnD* gene products. Plant Soil 161: 43-57.

Khlebnikov, A, Ø. Risa, T. Skaug, T. A. Carrier, and J. D. Keasling. (2000): Regulatable arabinose-inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. J. Bacteriol. 182:7029–7034.

Kim, J. F., F. W. Beer. (1998): HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that is a member of a proposed class of pectate lyases. J. Bacteriol.

Kitajama, S, F. Sato. (1999): Plant pathogenesis-related proteins:molecular mechanisms of gene expression and protein function. J. Biochem. Tokyo 125:1-8.

Klement Z. (1956): A zöldpaprika baktériumos lágyrothadása. Növénytermelés. 5:71-76.

Klement, Z., G. L. Farkas, L. Lovrekovich (1964): Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathol. 54: 474-477.

Klement, Z. (1982): Hypersensitivity. In: Mounth, M. S, G. H. Lacy (Szerk.) Phytopathogenic prokaryots, vol. 2: 149-177. Academic Press, New York

Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D. C. (Szerk.) (1990). Methods in Phytobacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Knoop, V., B.J. Staskawicz, U. Bonas. (1991): The expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. 173: 7142-7150.

Kobayashi, D. Y., S. J. Tamaki, N. T. Keen. (1989): Cloned avirulence gene from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:157-161.

Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges, and S. Adhya. (1993): Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. Annu. Rev. Biochem. 62:749-795.

Kornberg, S. R., I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, and A. Kornberg. (1958): Enzymatic cleavage of deoxyguanosine triphosphate to deoxyguanosine and tripolyphosphate. J. Biol. Chem. 233:159-162.

Kukor, J. J., and R. H. Olsen.(1991): Genetic organisation and regulation of a meta cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. J. Bacteriol. 173:4587-4594.

Kur, J., N. Hasan, and W. Szybalski. (1989): Physical and biological consequences of interactions between integration host factor (IHF) and coliphage lambda P9R promoter and its mutants. Gene. 81:1–15.

Laloi, C. (2004): Reactive oxygen signaling: the latest news. Curr. Opin. Plant Biol. 7:323-328.

Lawrence, J. G., J. R. Roth. (1996): Selfish operons: horisontal transfer may drive the evolution of gene clusters. Genetics 143: 1843-1860.

Leach, J. E., F. F. White (1996): Bacterial avirulence genes. Annu. Rev. Phytopathol. 34:153-179.

Lee, J., D. F. Klessig, T. Nürnberger. (2001): A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *HIN1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. Plant Cell 13:1079-1093.

Liao, C.-H., H. Y. Hung, A. K. Chatterjee. (1988): An extracellular pectate lyase is the pathogenicity factor of the soft-rotting bacterium *Pseudomonas viridiflava*. Mol. Plant-Microbe Intract. 1: 199-206.

Liao, C. H., D. E. McCalus, J. M. Wells, S. S. Tzean, G. Y. Kang. (1996): The *repB* gene required for production of extracellular enzymes and fluorescent siderophores in *Pseudomonas viridiflava* is an analog of the *gacA* gene of *Pseudomonas syringae*. Can. J. Microbiol. 42:177-182.

Ligtering, W., and H. Hirt. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. Int. Rev. Cytol. 201:209-275.

Lindgren, B. P., R. C. Peet, N. J. Panopoulos. (1986): Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv *phaseicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. J. Bacteriol. 168: 512-522.

Lingren P. B., (1997): The role of *hrp* genes during plant-bacterial interaction. Annu. Rev. of Phytopathol. 35: 129-152.

Lipshutz, R.J., S.P. Fodor, T.R. Gingeras, D.J. Lockhart. (1999): High density synthetic oligonucleotide arrays. Nat. Genet. 21(1 Suppl):20-4.

Little, J. W., and D. W. Mount. (1982): The SOS regulatory ization of the reaction and stimulation by DNA-binding prosystem of *Escherichia coli*. Cell 29:11-22.

Liu, J.S., A.F. Neuwald,and C.E. Lawrence. (1995): Bayesian models for multiple local sequence alignment and Gibbs sampling strategies. J. Am. Stat. Associat. 90:1156-1170.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, K. Timmis. (1990): Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and cromosomal insertion of cloned DNA in gram-negativ *Eubacteria*. J. Bacteriol. 172: 6568-6572.

Lu, M., X. Tang, J. M. Zhou. (2001): *Arabidopsis* NHO1 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. Plant Cell 13:437-447.

Mackey, D. (2002): RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. Cell 108:743-754.

Mahan, M. J., Slauch, J. M., Mekalanos, J. J. (1993): Selection of bacterial virulence genes, that are specifically induced in host tissues. Science, 259: 686-688.

Mahan, M. J., D. M. Heithoff, R. L. Sinsheimer, and D. A. Low. (2000): Assessment of bacterial pathogenesis by analysis of gene expression in the host. Annu. Rev. Genet. 34:139–164.

Manceau, C., and A. Horvais. (1997): Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. Appl. Environ. Microbiol. 63:498–505.

Mardones, G., A. Venegas. (2000): Chromogenic plate assay distinguishing bacteriolytic from bacteriostatic activity of an antibiotic agent. J. Microbiol. Methods. 40:199–206.

Mathews, D. H., M. D. Disney, J. L. Childs, S. J. Schroeder, M. Zuker, and D. H. Turner. (2004): Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:7287-7292.

Matsumoto, H., H. Muroi, M. Umehara, Y. Yoshitake, and S. Tsuyumu. (2003): Peh production, flagellum synthesis, and virulence reduced in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by mutation in a homologue of *cytR*. Mol. Plant-Microbe. Interact. 16:389-397.

McCarthy, J. E., H. U. Schairer, W. Sebalt. (1985): Translational initiation frequency of *atp* genes from *Eschericia coli* identification of an intercistronic sequence that enhances translation. EMBO J. 4/2: 519-529.

McCarthy, J. E. G., W. Sebalt, G. Gross, R. Lammers. (1986): Enhancement of translational efficiency by the *Escherichia coli atpE* translational initiation region: its fusion with two human genes. Gene. 41: 201-206.

McCue, L.A., Thompson, W., Carmack, C.S., Ryan, M.P., Liu, J.S., Derbyshire, V. and Lawrence, C.E. (2001): Phylogenetic footprinting of transcription factor binding sites in proteobacterial genomes NAR 29:774-782.

McCue, L.A., W. Thompson, C.S. Carmack, and C.E. Lawrence. (2002): Factors influencing the identification of transcription factor binding sites by cross-species comparison. Genom. Res. 12:1523-1532.

Mecsas, J. (2002): Use of signature-tagged mutagenesis in pathogenesis studies. Curr. Opin. Microbiol. 5:33–37.

Meima, R. B. (1996): Plasmid maintenance. In: Meima, R. B. (Szerk.) Mechanisms Underlying Structural Plasmid Instability in Bacillus subtilis. Egyetemi jegyzet, Rijksuniversiteit Groningen, Hollandia

Merrick, M. J. (1993): In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σN). Mol. Microbiol. 10:903–909.

Miller, J. H. (1972): Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Miller, V. L., and J. J. Mekalanos. (1988): A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. J. Bacteriol. 170:2575-2583.

Minsavage, G. V., D. Dahlbeck, M. C. Whalen, B. Kearney, U. Bonas, B. J. Staskavicz, R. E. Stall. (1990): Gene-for-gene relationship specifying disease resistance in X*anthomonas campestris* pv. v*esicatoria* - pepper interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 3: 41-47.

Mirel, D. B., and M. J. Chamberlin. (1989): The *Bacillus subtilis* flagellin gene (*hag*) is transcribed by the form σ^{28} of RNA polymerase. J. Bacteriol. 171:3095-3101.

Morgues, F, M-N. Brisset, and E. Chevreau. (1998): Strategies to improve plant resistance to bacterial diseasethrough genetic engineering. Tibtech. 16: 203-210.

Mount, M. S., D. F. Bateman, and H. G. Basham. (1970): Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase. Phytopathology. 60:924-931

Nasser, W., S. Reverchon, G. Condemine, and J. Robert-Baudouy. (1994): Specific interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR repressor with different operators of genes involved in pectinolysis. J. Mol. Biol. 236:427–440.

Niepold, F., D. Anderson, D. Mills. (1985): Cloning determinants of pathogenesis of *Pseudomonas syringae* patovar *syringae* Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 406-410.

Nishida, S., T. Mizushima, T. Miki, and K. Sekimizu. (1997): Immotile phenotype of an *Escherichia coli* mutant lacking the histone-like protein HU. FEMS Microbiol. Lett. 150:297–301.

Nizan R., I. Barash, L. Valinsky, A. Licter, S. Manulis. (1997): The presence of *hrp* genes on the pathogenicity-associated plasmid of the tumorigenic bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophillae.* Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 677-682.

Noël, L., F. Thieme, D. Nennstiel, U. Bonas. (2002): Two novel Type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the *hrp* Pathogenicity Island. J. Bacteriol. 184: 1340–1348.

Nordström, K. (1993): Plasmid Replication and Maintatenance. In: Hadry, K. G. (szerk.) Plasmids A Pratcical Approach (Second edition). Oxford University Press, New York. pp. 1-4.

O'Connell, K. P., S. J. Raffel, B. J. Saville, J. Handelsman. (1998): Mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 that do not induce chlorosis in plants. Microbiology. 144:2607-2617.

Oke, V., and S. R. Long. (1999): Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. Mol. Microbiol. 32:837–849.

Oku, T., A. M. Alvarez, and C. I. Kado. (1995): Conservation of the hypersensitivity-pathogenicity regulatory gene *hrpX* of *Xanthomonas campestris* and *X. oryzae*. DNA Sequencing 5:245-249.

Olins,P.O. and Rangwala,S.H. (1989): A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the *lacZ* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264, 16973–16976.

Osbourn, A. E., C. E. Barber, and M. J. Daniels. (1987): Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. EMBO J. 6:23–28.

Osuna, R., D. Lienau, K. T. Hughes, and R. C. Johnson. (1995): Sequence, regulation, and functions of fis in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 177:2021–2032.

Ott, P. G., L. Szabó, Z. Klement, E. Balázs (1998): Submicroscopical evidence of bacterially induced resistance in tobacco leaves. Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 32:265-280.

Ottemann, K. M., and J. F. Miller. (1997): Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.* 24:1109–1117.

Padan, E., S. Schuldiner. (1996): Bacterial Na^+/H^+ antiporters: molecular biology, biochemistry, and physiology. In: WN Konings, HR Kaback, JS Lolkema, (Szerk.), Handbook of Biological Physics, Vol 2. Elsevier Science, Amsterdam, pp 501–531.

Parker, J. E. (2003): Plant recognition of microbial patterns. Trends Plant Sci. 8:245-247.

Peres, M. T. L. P., F. D. Monache, A. B. Cruz, M. G. Pizzolatti, and R. A. Yunes. (1997): Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J. Ethnopharmacol. 56:223–226.

Perombelon, M. C. M., A. Kelman. (1980): Ecology of the soft - rot erwinias. Annu. Rev. Phytopatol. 18: 361-387.

Pirhonen, M., H. Saarilahti, M-B. Karlson, and E. T. Palva. (1991): Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* by transposon mutagenesis. Mol. Plant-Microbe. Interact. 4:276-283.

Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen. (1989): Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology 8: 151-156.

Preston, G. M , N. Bertrand, P. B. Rainey. (2001): Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Mol. Microbiol. 41:999-1014.

Puri N., C. Jenner, M. Bennet, R. Stewart, J. Mansfield, N. Lyons, J. Taylor (1997): Expression of *avrPphB*, an avirulencia gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitve reaction in bean. Mol. Plant Microbe Interact. 10: 247-256.

Quandt, J., and M. F. Hynes. (1993): Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. Gene 127:15-21.

Raaijmakers, J. M., L. van der Sluis, M. Koster, P. A. H. M. Bakker, P. J. Weisbeek, and B. Schippers. (1994): Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. Can. J. Microbiol. 41:126–135.

Rainey, P. B., D. M., Heithoff, M.J., Mahan. (1997): Single-step conjugative cloning of bacterial gene fusions involved in microbe-host interactions. Mol. Gen. Genet. 256:84-87.

Rainey, P. B. (1999): Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. Environ. Microbiol. 1:243-257.

Rainey, P. B., and G. M. Preston. (2000): *In vivo* expression technology strategies: valuable tools for biotechnology. Curr. Opin. Biotechnol. 11:440–444.

Rasmussen, P., L. Sogaard-Andersen, and P. Valentin-Hansen. (1993): Identification of the nucleotide sequence recognized by the cAMP-CRP dependent CytR repressor protein in the *deoP2* promoter in *E. coli*. Nucleic Acids Res. 21:879–885

Rediers, H., V. Bonnecarrére, P. B. Rainey, K. Hamonts, J. Vanderleyden, and R. De Mot. (2003): Development and application of a *dapB*-based *in vivo* expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. Appl. Environ. Microbiol. 69:6864-6874.

Reymond, P. H. Weber, M. Damond, E. E. Farmer. (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. Plant Cell 12:707-719.

Ritter, C., J. L. Dangl. (1995): The *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola avrRpm1* gene is required for virulence on *Arabidopsis*. Mol. Plant-Microbe interact. 8:444-453.

Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E.-L Nurmiaho-Lassia, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, S. Y. He. (1997): Hrp pilus a *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomatoe* DC 3000. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 3459-3464.

Rojo, F. (2001): Mechanisms of transcriptional repression. Curr. Opin. Microbiol. 4:145-151.

Rosquist, R., K.-E. Magnusson, H. Wolf-Watz. (1994): Target cell contrast triggers experssion and polarised transfer of Y*ersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. EMBO J. 13: 964-962.

Rudnick, P. A., T. Arcondeguy, C. K. Kennedy, D. Kahn. (2001): *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 183:2682-2685.

Ryals, J., S. Uknes, E. Ward. (1994): Systemic acquired resistance. Plant Physiol. 104:1109-1112.

Sala-Trapat, J. M., Murray K., and Williams P. A. (1972): The metabolic divergence in the meta cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015: physiological significance and evolutionary implications. Eur. J. Biochem. 28:347-356.

Salgado, H., S. Gama-Castro, A. Martınez-Antonio, E. Dıaz-Peredo, F. Sanchez- Solano, M. Peralta-Gil, D. Garcia-Alonso, V. Jimenez-Jacinto, A. Santos-Zavaleta, C. Bonavides-Martınez, and J, Collado-Vides. (2004): RegulonDB (version 4.0): transcriptional regulation, operon organizationand growth conditions in *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. 32:303–306.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis. (1989): Molecular Cloning Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sasser, M. (1982): Inhibition by antibacterial compounds of the hypersensitve reaction induced by *Pseudomonas pisi* in tobacco. Phys. Bioch. 72: 1513-1517.

Schneider, M., P. Schweizer, P. Meuwly, J. P. Métraux. (1996): Systemic acquired resistance in plants. Int. Rev. Cytol. 168:303-340.

Schauder, B., H. Blöcker, R. Frank, J. E. G. McCarthy. (1987): Inducible expression vectors incorporating the *Echerichia coli atpE* translational initiation region. Gene 52: 279-283.

Schlüter, A., M. Nöhlen, M. Kramer, R. Defez, and U. B. Priefer. (2000): The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae glnD* gene, encoding a uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme, is expressed in the root nodule but is not essential for nitrogen fixation. Microbiology 146:2987-2996.

Scholz, O., A. Thiel, W. Hillen, and M. Niederweis. (2000): Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. Eur. J. Biochem. 267:1565-1570.

Seto, D., S. K. Bhatnagar, and M. J. Bessman (1988): The purification and properties of deoxyguanosine triphosphate triphosphohydrolase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 263:1494-1499.

Shelburne, S. A., and J. M. Musser. (2004): Virulence gene expression *in vivo*. Current Opinion in Microbiology. 7:283–289.

Sheng, J., V. Citovsky. (1996): *Agrobacterium*- plant cell DNA transport: Have avirulence proteins, will travel? Plant Cell 8: 1699-1710.

Shi, W., Y. Zhou, J. Wild, J. Adler, and C. A. Gross. (1992): DnaK, DnaJ, and GrpE are required for flagellum synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:6256–6263.

Shingler, V., M. Bagdarsarian, D. Holroyd, and F. C. H. Franklin. (1989): Molecular analysis of the plasmid encoded phenol hydroxylase of *Pseudomonas* CF600. J. Gen. Microbiol. 135:1083-1092.

Shingler, V., J. Powlowski, and U. Marklund. (1992): Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. J. Bacteriol., 174:711-724

Shualev, V., P. Silverman, I. Raskin. (1997): Airborne signalling by methyl-salicylate in plant pathogen resistance. Nature 385:718-721.

Siegele, D. A., and J. C. Hu (1997): Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:8168–8172.

Silby, M. W. and S. B. Levy. (2004): Use of *in vivo* expression technology to identify genes important in growth and survival of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 in soil: discovery of expressed sequences with novel genetic organization. J. Bacteriol. 186:7411-7419.

Silverman, M., M. Simon. (1974): Characterization of *Escherichia coli* flagellar mutants that are insensitive to catabolite repression. J. Bacteriol. 120:1196–1203.

Simon, R., M. O'Connell, M. Labes, A. Pühler. (1986): Plasmid vectors for the genetic analysis, and manipulation of *Rhizobia* and other gram-negative bacteria. Methods Enzymol. 118: 640-659.

Sivasanakar, S., B. Sheldrick, S. J. Rothstein. (2000): Expression of allene oxide synthase determines defence gene activation in tomato. Plant Physiol. 122:1335-1342.

Soutourina, O., A. Kolb, E. Krin, C. Laurent-Winter, S. Rimsky, A. Danchin, and P. Bertin. (1999): Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. J. Bacteriol. 181:7500–7508.

Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper. (1999): Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:15196–15201.

Sperandio, V., , J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen, and J. B. Kaper. (2000): Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. Mol. Microbiol. 38, 781–793.

Spohn, G., and V. Scarlato. (1999): Motility of *Helicobacter pylori* is coordinately regulated by the transcriptional activator FlgR, an NtrC homologue. J. Bacteriol. 181:593–599.

Stauber, R. H., K. Horie, P. Carney, E. A. Hudson, N. I. Tarasova, G. A. Gaitanaris, G. N. Pavlakis. (1998): Development and applications of enhanced green fluorescent protein mutants. Biotechniques 24:462-471.

Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemann-Merdinogu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, B. Fritig. (1993): Plant pathogenesis related proteins and their role in defense against pathogens. Biochemistry, 75: 687-706.

Suarez, A., A. Guttler, M. Stratz, L. H. Staendner, K. N. Timmis, and C. A. Guzman. (1997): Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene. 196:69-74

Stock, J. B., A. J. Ninfat, and A. M. Stock. (1989): Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Reviews 53:450-490.

Stuurman, N., C. P. Bras, H. R. Schlaman, A. H. Wijfjes, G. Bloemberg, H. P. Spaink. (2000): Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:1163-1169.

Swarup, S., R.DeFeyter, R. H. Brlansky, D. W. Gabriel. (1991): A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathol. 81:802-809.

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

Szpirer, C., E. Top, M. Couturier, M. Mergeay. (1999): Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. Microbiology. 145:3321-3329.

Szurek, B., E. Marois, U. Bonas, and G. Van den Ackerveken. (2001): Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. Plant J. 26:523-534.

Tang, X., R. D. Frederick, J. Zhou, D. A. Halterman, Y. Jia, G. B. Martin. (1996): Initiation of plant desease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. Science. 274:2060-2063.

Tarchevsky, I. A. (2001): Pathogen-induced plant proteins. Appl. Biochem. Microbiol. 37:313-335.

Thanaraj, T.A.and M.W. Pandit. (1989): An additional ribosome-binding site on mRNA of highly expressed genes and a bifunctional site on the colicin fragment of 16S rRNA from *Escherichia coli*: important determinants of the efficiency of translation-initiation. Nucleic Acids Res. 17: 2973-2985.

Thanassi, D. G., and S. J. Hultgren. (2000): Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Cell Biol. 12:420-430.

Thompson, J. N., J. J. Burdon. (1992): Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. Nature. 360:121-125.

Thordal-Christensen, H. (2003): Fresh insights into processes of nonhost resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 6:351-357.

Trans-kersen, J., H. Huang, and C. Allen. (2001): *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J. Bacteriol. 183:3597-3605.

Vanden Wymelenberg, A. J., D. Cullen, R. N. Spear, B. Schoenike, J. H. Andrews (1997): Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. Biotechniques 23:686-690.

Wang, Y-P., A. Kolb, M. Buck, J. Wen, F. O'Gara, and H. Buc. (1998): CRP interacts with promoter-bound σ^{54} RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. EMBO J. 17:786-796.

Wengelnik, K. and U. Bonas. (1996): HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. J. Bacteriol. 178:3462-3469.

van West, P., B. Reid, T. A. Campbell, R. W. Sandrock, W. E. Fry, S. Kamoun, N. A. Gow. (1999): Green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*. FEMS Microbiol. Lett. 178:71-80.

Whalen, M. C., R. E. Stall, B. J. Staskawicz. (1988): Characterisation of a gene from a tomato pathogen determining hypersensitive resistance in non-host species and genetic analysis of this resistance in bean. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:6743-6747.

De Wilt, P. J. G. M. (1997): Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends Plant Sci. 2:452-458.

Wood, J. R., A. Vivian, C. Jenner, J. W. Mansfield, J. D. Taylor. (1994): Detection of a gene in pea controlling nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Mol. Plant-Microbe. Interact. 7:534-537.

Woods , C. (2000): Pathogen perception. Trends Plant Sci. 5:185-186.

Xi, C., M, Lambrecht, J, Vanderleyden, J, Michiels, (1999): Bi-functional *gfp*- and *gusA*-containing mini-Tn5 transposon derivatives for combined gene expression and bacterial localization studies. J. Microbiol. Methods 35:85-92.

Xiao, Y., S. Heu, J. Yi, Y. Lu, S.W. Hutchenson. (1994): Identification of a putative alternate sigma factor and characterisation of a multicomponent regulatory cascade controlling expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J. Bacteriol. 176: 1025-1036.

Yang, Y., Q. Yuan, D. W. Gabriel. (1996): Watersoaking funcions of XcmH1500 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. Mol. Plant-Microbe Interact. 9: 105-113.

Yang, S., N. T. Perna, D. A. Cooksey, Y. Okinaka, S. E. Lindow, A. M. Ibekwe, N. T. Keen, C. H. Yang. (2004): Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP -based IVET leaf array. Mol. Plant Microbe Interact. 17:999-1008.

Zhang, Y., D. D. Bak, H. Heid, K. Geider (2000): Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. J. Mol. Biol. 289:1239-1251.

7.2 DNS nukleotid sorrendek

IviPV-s1/1.:

PSPTO2331
Deoxiguanozin-trifoszfát trifoszfohidroláz
Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

ggcc<u>ttgcgg</u>taggcccgtcgaac<u>agggaagct</u>aagccactatcattgat**ggag**tgaccgcc**ttg**gattggcagaccctgcttaaccg

cgaacgactcggcaaaaccctgcacagccccgaagaactggggcgcagcccgtttcacaaggaccacgaccggatcatcttttccg

gtgccttccgccgtctggggcgcaagacgcaggtccatccggtgtccagcaacgaccacatccatactcggctgacccactcactgg

aagtcagct

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. A feltételezett σ^{70} kötőhelyek, a -35 box -10 box aláhúzva. (GeneBank acc. number DQ273692)

IviPV-s1/2.:

PSPTO2603
ABC transzporter, ATP-binding/permease protein
Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

acaccgtcatcgacgcgcaacgcatcgtcgtcctcgatcagggccgggtgctcggcatcggccgccatgagcagttgctcgaaaact

gcgagctgtatcaacaactctggcaagaccacacccgcattcgccaatggcaactgagcagt**ggaga**acccgc**atg**atttccagtct

gatgcgcgcgggcgaacgcctcgcagggcaacgcgatccacgcctgagccaaggcttgcgcctggcagtccttgaaggtctgttga

gcgcagcgccgtacctgctgctgtactggctgctggcgagcctgttcgacaatacgctgcagggctggagcctgatctggctggcgct

gggcatgcttgcctgtttgatcgggcgaattgtcgtcggcgccctcggcacaccgctgatattcaccggtgcctacgcaatgatggcaa

atgcccgcctgcgtctggtcgaccatttacaaaagct

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. (GeneBank acc. number DQ273693)

IviPV-s1/3.:

STM3216
az *E. coli* „methyl-accepting" kemotaxis fehérje I.-hez hasonló fehérje
Salmonella typhimurium LT2

taaaaataatgtgatatttattccttctcccttgtctacctattaataggtataaactcagtta***ataaata***agaaatggttaacctttagcgtatt

tctttcattattagtgccaatttatgtcacttttggttcatctttctgtgaacaataaatattacttactaataatgttccgaaataaaaagcgatca

atatcataaagttagtaacattattgccgataaatcttcctgtatgaggatatgcaatcccag**ggag**aaaat**atg**tttttgcataacattaaaa

tacgttcaaaattatttatggcctttggcttattcattgttctcatggtggtgagttccgctctgtctttgtttagccttgatcgggctaatacggg

tatgcagaacattattaccaatgattatcccaccacggtgaaagccaatctgttaatcgataattttaatgatttcatca

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. A feltételezett σ^{70} kötőhelyek, a -35 box -10 box aláhúzva. A CRP (c-AMP Receptor protein) kötőhely szaggatott vonallal aláhúzva az upstream szekvenciában. A valószínű LexA felismerő hely dőlten és vastagon szedve. A feltételezhető RpoH (σ^{32},) felismerő hely két vonallal aláhúzva. (GeneBank acc. number)

IviPV-s1/4.:

PPDMPEFGH
2-hidroxipent-2,4-dienoát hidratáz
Pseudomonas sp. CF600

ttcctgaga**gag**acgaaa**atg**gacaagattttgatcaacgagctcggcgacgagctgtatcaggcgatggtcaatcgcgaggccgtg

tcgccgctgaccagccgtggcctggatatttccgtcgacgatgcctaccacatctccctgcgcatgctcgaacgccgactggccgccg

gcgagaaggtgatcggcaagaagatcggtgtcaccagcaaggcagtgcagaacatgctcaacgtgtatcagccagacttcggttacc

tgaccgaccgcatggtgttcaacagcggcgaggcgatgccgatcagccagttgctgatgcag

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. (GeneBank acc. number DQ273696)

IviPV-s1/5.:

PSPTO4477
a TIGR a HMM fehérje családhoz tartozónak találta, TIGR00846
K^+-függő Na^+/Ca^{2+} kicserélő fehérje
Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

ccctcgactaagccctcgatcaaggacaaccccctattctccagctatcggccctgcccgcccccgcgct**ga**ttcag**atg**ctcagtggt

ttgctgttgctgctgatcggggccgaactgtcggtgcgcgctgccgtacacctggcggcgattttcaaggttcggccactgatcatcgg

cctgactgtcgtggcgatgggcaccagcgcgcctcaaatggccgtcagcctgcaagccgcgttttccgacaacaccgacattgccgt

gggcagcgtgatcggcggcaacatcttcaatgtgctggtcatcctcgggctgtgttcgctgatcattccgttgcgcgtcgcgcgtcaggt

attgcacatcgacatcccgctgatgatcggcgcctgcctgctggccatcggcctgtcgtggagc

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. (GeneBank acc. number DQ273694)

IviPV-s1/6.:

PSPTO0804
MviN membrán fehérje család
Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000

gtcttgtcaagggcagttaaggtgttccgctgagtggttgcagcttttgaccggatgatttattttccggcgtgcgacctgtaaactcgcgg

cctttgcttcgggcatttgcggcgcgaagtatcgcataaatggacggcttaatcgcccatcctttgcc**aagg**cgcacaagtctttca**atg**

aatctactcaagtcactcgccgccgtcagctctatcacaatggtttcccgggttctgggcttcgtccgggacaccatcattgcgcgcactt

tcggggctggaatggcgaccgacgccttctttatcgccttcaaactgcccaacctgctgcggcgcatctttgccgagggcgctttttccc

aggcattcgtgccgattcttgccgaataccaa

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. A feltételezett σ^{70} kötőhelyek, a -35 box -10 box aláhúzva. (Egyéb jellemző kötőhely-homológiák a 20. ábrán láthatók.)
Két vonallal van aláhúzva az *mviN* transzmembrán fehérjékre jellemző konzervált aminosav szekvencia motívumot (AEGAFSQAFVPILA) kódoló nukleinsav régió. (GeneBank acc. number DQ077711)

IviPV-s1/7.:

D4461
pektát liáz (EC-number= 4.2.2.2)
Pseudomonas viridiflava

ctgcagcggacgttattcgctgcaaaggcgataaggacgtccgctcgagaaacgtgccgtgaccggtacgttaaaaaactcaag
** **

ttaatcaaggatctgattactca**atg**gtcaaaccttcactttttctgccaacaaactggcaagtgccgttgtcgcttctttgctgtttgcaag

cgctggtgcacaggccgatatcgctacggatgtcgcaaccaccggctgggccacccagaacggcggcaccaagggcggctccaaa

gcggctgcgaacaacatctacaccgtaaagaacgctgccgagct

A transzlációs start kodon és a feltételezett riboszóma kötőhely (RBS) vastagon szedve. A feltételezett σ^{70} kötőhelyek, a -35 box -10 box aláhúzva. A σ^{54} konszenzus szekvenciát alsó csillagok jelzik.
A GacA-függő szabályozáshoz szükséges $(\text{pirimidin})_n$ CA-N-GGA kötőhely kettős vonallal van aláhúzva. (GeneBank acc. number DQ273695)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Klement Zoltán Professzor Úrnak, aki mély fájdalmunkra, még a Dolgozat megvédése előtt tragikusan váratlanul elhunyt, hogy azon túl, hogy megteremtette kutatómunkám minden feltételét, ösztönzésével, örök optimizmusával, állhatatosságával és szüntelen bizalmával példát és egyben támaszt is nyújtott közös munkánk minden pillanatában. Köszönöm, hogy munkahelyemen és azon túl is megajándékozott barátságával, bizalmával és gondoskodó szeretetével.

Köszönöm Dr. Hornok László Professzor Úrnak, hogy lehetőséget adott doktori munkám elvégzésére és ösztönzésével segítette is azt.

Köszönöm a MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében dolgozó munkatársaimnak, barátaimnak, munkám elvégzése során nyújtott segítségüket.

Köszönöm Családomnak (lányaimnak: Rékának és Annának, feleségemnek: Nórának, Édesapámnak: Ferencnek, Édesanyámnak: Magdolnának), hogy sokszor lemondásokkal terhelt életünkben mindvégig bíztak bennem, türelmükkel és támogatásukkal óriási szerepet vállalva munkám sikerességében!

Czelleng Arnold

Budapest, 2005. augusztus