

42465 azonosítójú

„Az *Agrobacterium vitis* agrocín termelését kódoló DNS szakasz izolálása, klónozása és a termelt agrocín növénykórtani értékelése”

Az *Agrobacterium vitis* baktérium az agrobaktérium nemzetség egy szőlőre specializált faja. A baktérium a szőlő földfeletti részein tumoros elváltozásokat okoz. Ezek az elváltozások a betegség előrehaladtával a tőke pusztulásához vezetnek. Mai tudásunk szerint a tumorképzés mechanizmusa megegyezik az irodalomból már jól ismert *Agrobacterium tumefaciens* –nél leírtakkal. A betegség ellen, annak ellenére, hogy a fertőzés molekuláris vonatkozásai már alapjaiban ismertek, mind a mai napig nem tudunk hatásosan védekezni. A patogén baktérium a szőlőt az esetek egy jelentős részében látenszen fertőzi, ezért az egészségesnek látszó szaporítóanyag sokszor fertőzött és a betegség kiindulóforrása lehet. A szaporítóanyag begyűjtése előtt a tőkét éveken keresztül meg kell figyelni. Indexelésnek kell alávetni, és ha csak a gyanúja is felmerül a fertőzésnek, akkor az egész ültetvényt ki kell zárni a továbbszaporításból. A gyakorlati védekezés szempontjából az indexelésen kívül a hőkezelés és a hajtáscsúcs tenyészetek használata jöhet számításba, de ezek ipari méretekben való megvalósítása még várat magára. Egy viszonylag új területnek tekinthető a betegség elleni biológiai védekezés. A kórokozó baktériumnak ugyanis vannak olyan törzsei, amelyek nem képesek tumort indukálni és antagonistá hatással rendelkeznek a patogén változattal szemben. Egy ilyen törzs az F2/5-ös törzs, amely az előzetes vizsgálatok szerint eredményesen gátolja meg a patogén törzsek tumorindukálását. A racionális biológiai védekezés megkívánja, hogy értsük a biológiai védekezés hatásmechanizmusát.

A jelen OTKA pályázat az F2/5-ös biológiai védekezésre alkalmas törzs hatásmechanizmusát kívánta tisztázni, közelebbről pedig a baktérium agrocín termelését kódoló DNS szakasz izolálását és a termelt agrocín növénykórtani értékelését.

A cél érdekében a következőket végeztük el:

1. Agrocint nem termelő új Tn5 mutánsok előállítása
2. A kapott mutánsokban a Tn5 beépülési helye körüli DNS szakaszok szekvenálása
3. Génkönyvtár készítése az antagonista baktériumból
4. A génkönyvtár szűrése a Tn5 beépülési helye körüli szekvenciákból készített próbákkal
5. Az agrocín biokémiai természetének meghatározása és jellemzése
6. Az F2/5-ös törzs quorum-sensing reguláló rendszerének biológiai védekezéshez való kapcsolódása
7. A tisztított agrocín növénykórtani tesztelése

1. Agrocint nem termelő új Tn5 mutánsok előállítása

A mutánsok előállítását a következő módon végeztük. Az F2/5-ös törzs és a transzpozit hordozó S17-1pSUP2021 friss szuszpenzióit különböző arányokban összekevertük és 20 mm átmérőjű 0,22 mikron lyukméretű membránszűrőn átszűrtük. A szűrőt a rajta lévő baktériumokkal együtt Petri csészében lévő antibiotikummentes táptalajra helyeztük és 28 C-on éjszakán át inkubáltuk. Másnap a szűrőmembránt steril vízben lemostuk és a kapott szuszpenziót kanamycin és tellurit tartalmú táptalajra szélesztettük. A kinövő kolóniákat egyenként teszteltük agrocín termelésre. A mutánsokat Petri csészében lévő táptalaj felületére pettyeztük fel, majd három napos inkubálás után egy párhuzamos Petricsészére oltottuk át őket. Az eredeti csészében lévő

baktériumokat kloroform gőzzel elöltük. A táptalaj felületére egy ismert agrocinnal érzékeny törzs (S4) vizes szuszpenzióját vittük fel. 2-3 napos inkubálás után a gátlási zónák megjelenéséből következtetünk arra, hogy az agrocin termelésért felelős gén működését gátolta-e a beépült transzpozon. A tesztelt 2400 mutáns közül hét agrocint nem termelő mutánst sikerült találnunk. Ezeket a mutánsokat DIG-gel jelzett Southern blottal ellenőriztük arra vonatkozólag, hogy a transzpozon hány kópiában épült be a genomba. A próbát a Tn5 részleges szekvenciáit tartalmazó plazmidből készítettük (pUT miniTn5Km2). A mutánsokból totál DNS-t izoláltunk, majd a kapott DNS-t EcoRV enzimmal éjszakán át emésztettük. Az emésztett DNS-t elektroforetizáltuk, majd préseléssel átvittük egy membránra. A membránt ezután hibridizáltattuk a jelölt próbával. A membránt ezt megelőzőleg előhibridizáltattuk hibridizáló oldatban 68 C-on 135 percig. A hibridizálást ugyancsak 68 C-on éjszakán át (18 óra) végeztük. A hibridizáló oldat 0.03 ml hibridizáló oldatot tartalmazott négyzet-centiméterenként. A DNS próbát 10 percig 95 C-on denaturáltuk, mielőtt a hibridizáló oldathoz adtuk. A hibridizálást a mosásuk után értékeltük ki. A hét mutánsból kettőben a transzpozon két, ötben pedig egy kópiában épült be. A két kópiát tartalmazó mutánsokkal a későbbiekben nem foglalkoztunk. Az egy hibridizáló csíkot mutató öt mutánsból kettőnél a beépülés helye az elektroforetikus profilon egy magasságban a maradék négy mutánsnál pedig különböző magasságokban helyezkedett el. Ezért várhatóan a baktériumnak négy különböző génje sérült a mutáció következtében. Ez egyben már azt is jelezte, hogy nem egyszerű egy-génes esettel állunk szemben, amit egyébként a későbbi vizsgálatok igazoltak is. A mutánsokból a transzpozont tartalmazó génszakaszokat EcoRI-es emésztés után izoláltuk és pBS plazmidba vittük be. A keresett génszakaszt kanamycinre történő szelekcióval izoláltuk.

2. A kapott mutánsokban a Tn5 beépülési helye körüli DNS szakaszok szekvenálása

A kapott klónokat a pBS vektor szekvenciáiból kiindulva megszekvenáltattuk. A szakaszok különböző méretűek voltak és a beépülés helye az adott szakaszon belül is különböző volt. Volt olyan eset amikor a transzpozon középen helyezkedett el, máskor viszont a szakasz egyik végéhez közel, attól mintegy 200 bázis távolságra. A szekvenciákat ezután BLAST programmal összehasonlítottuk az adatbázisban található szekvenciákkal. Néhány részleges homológiát kaptunk egy Rhizobium membránfehérjével kapcsolatban. Ebből arra következtettünk, hogy a vizsgált mutáns esetében, az agrocin exportban résztvevő gének sérülhettek meg. Ennek bizonyítására, a mutáns baktériumokat ultrahanggal roncsoltuk, és a kapott termék agrocin aktivitását vizsgáltuk agar lemezen. Azt tapasztaltuk, az egyik klónból származó lizátumnak gyenge gátló hatása volt az indikátor törzssel szemben. Ebből arra következtettünk, hogy a vizsgált mutáns esetében a mutáció valószínűleg nem a keresett génben, hanem a géntermék exportját irányító génben következett be. Ezt támasztotta alá a szekvenciák ORF-re történő elemzése is. A klónokból a program (ORF finder) klóntól függően 6-8 részleges ORF-t tudott találni. A manuális ORF keresés során sem találtunk elfogadható ORF-t. Mindezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy ezzel a technikával nem tudjuk kiemelni a keresett génszakaszt, sőt igen valószínűnek látszik, hogy az agrocin termelésében és exportjában több gén vesz részt, és azok viszonylag szétszórva, vagy legalábbis nagyobb DNS szakaszon helyezkednek el, mint a transzpozon körüli EcoRI-es szakasz. Az ismert DNS szekvenciák alapján a klónozást és a szekvenálást ugyan folytathattuk volna az EcoRI helyektől kifelé is, de úgy ítéltük meg, hogy a téma alacsony költségvetése ezt nem bírta volna el.

3. Génkönyvtár készítése és szkrinellese az antagonista baktériumból

Az eredeti munkatervnek megfelelően azt a stratégiát választottuk, hogy a sikertelen PCR-es génkiemelés helyett génkönyvtárt készítünk és ebben a génkönyvtárban a már megszekvenált szakaszokból készített próbák segítségével keressük azt a DNS szakaszt, amelyen várhatóan megtaláljuk az agrocin termeléséért és exportjáért felelős géneket. Az F2/5-ös *Agrobacterium vitis* törzsből DNS-t izoláltunk és a tisztított baktérium DNS-t előkészítettük a génkönyvtár készítéséhez. A DNS-t megfelelő előkísérletek után BamHI restrikciós enzimmel emésztettük. Az emésztés eredményét gélelektroforézissel ellenőriztük. Megfelelő markerek segítségével meghatároztuk azt a tartományt (20-40 kb), amelyet a génkönyvtár készítéséhez kívántunk felhasználni. A próbafuttatás után 2 mg DNS-t emésztettünk és futtattunk. A 20-40 kb tartományt kivágtuk a gélből és a DNS-t Pharmacia Flexi Prep segítségével kivontuk belőle. A DNS tisztaságát ismételt próbafuttatással ellenőriztük.

A fragmentumok végeit részleges kitöltéssel előkészítettük a vektorba történő beligálásra. A beligálást és a génkönyvtár készítését a Stratagen Lambda ZAP II Cloning Kit segítségével az Instruction Manual szerint végeztük.

A készen kapott Lambda ZAP II vektor fág karjainak cos végét ligáltuk, majd a körre zárt fagot BamHI restrikciós enzimmel emésztettük. Itt is részlegesen töltöttük ki a végeket. Az ezt követő vektor - inszert összeligálása során a vektort és az inszertet megfelelő arányban összekevertük, majd hozzáadtuk a T4 ligázt, és az ATP-t. Az elegyet 16 C-on éjszakán át inkubáltuk.

A kapott terméket Gigapack II extraktummal csomagoltuk be ugyancsak a Stratagen protokoll szerint. A becsomagolás végén a kapott fágkönyvtárt titráltuk és 10 alkönyvtárra szétosztva hűtőszekrényben tároljuk.

A génkönyvtár egyes alkönyvtárait az *E.coli* XL1-Blue MRF' törzsében felszaporítottuk, majd szélesztettük. A növekvő bakteriofágra rányomtunk egy Hybond-N+ membránt egészen addig, míg a membrán teljesen átnedvesedett. A membránt ezután olyan szűrőpapírra fektettük 5-10 percre, amely 0,5 M-os NaOH-val volt telítve. Ezt követően 5XSSC-ben mostuk 1-2 percig, majd leitattuk szűrőpapíron.

Az így előkészített membránt hibridizáltattuk az előző évben szekvenált rész alapján készített PCR próbával. A szkrinellest a Roche cég DIG Nucleic Acid Detection Kit-jével végeztük. A sikeres hibridizálás után visszakerestük azokat a klónokat, amelyek tartalmazták a keresett inszertet. Ezeket a klónokat ezután ismét hibridizáltattuk egy másik mutáns szekvenciái alapján készített próbával.

A hibridizálás eredményeként két klónt találtunk amely mindkét próbával hibridizált. Ezek a klónok 28 illetve 38 kb inszertet tartalmaznak. További vizsgálatukhoz és szekvenálásukhoz újabb anyagi forrásokat kell keresnünk.

A génkönyvtárt egy másik szkrinellest is alávetettük. Véletlenszerűen 2400 kolóniát választottunk ki. Ezeket a kolóniákat 24-vel Petri csészében lévő táptalaj felületére pettyeztük fel, majd a szokott módon két nap után elöltük őket és a táptalaj felületére az agrocinra érzékeny indikátor törzs (*A.vitis* S4) szuszpenzióját vittük fel. Két nap elteltével kerestük a gátlási zónák megjelenését. Egyetlen egy klónnál sem jelent meg gátlási zóna. Hasonló módon teszteltük a DNS hibridizációval kisselektált két klón agrocin termelését is. Ezek a klónok sem gátolták az indikátor törzs növekedését.

Mindezen kísérletek alapján valószínűsítettük, hogy az agrocin nem képes áthatolni az *Escherichia coli* sejtmembránján és kijutni a sejtéből. De az sem kizárt, hogy az *E.coli* -ban nem termelődik az agrocin, vagy a keletkező agrocin a képződés után lebontódik

A membránon való sikertelen átjutást támasztja alá az a biokémiai vizsgálatunk, amely szerint a keresett agrocín mérete rendkívül nagy (>1000 kDa) és számos alegységből épül fel.

4. Az agrocín biokémiai természetének meghatározása és jellemzése

Az F2/5-ös törzs agrocín termelésének optimalizálásához egy sor táptalajt próbáltunk ki. A részletek leírásáról itt eltekintek, mivel ez a munka meglehetősen munkaigényes, de végsősoron mechanikus volt csupán. Az optimalizálás eredményeként megállapítottuk, hogy a termelés maximumát 6-8 pH tartományban viszonylag alacsony tápanyagszint mellett lehet biztosítani. A táptalajban lévő divalens kationok és egyéb sók általában gátolják az agrocín termelését. Rutinszerűen feles erősségű nutrient broth-ban 0,1% szaharóz kiegészítéssel termelődik a legnagyobb mennyiségben. A termelés a maximumát rázatott körülmények között 24-48 óra között éri el. Ezt követően csökken a titrálható mennyisége.

A tisztításhoz, a táptalajt a baktériumoktól centrifugálással szabadítottuk meg. A felülúszót számos tisztítási móddal kíséreltük meg (ioncserélő gyantán történő elválasztás, molekulásúly alapján történő membránszűrés, kromatográfia stb.). Végül a következő módszer vált be. A 48 órás tenyészet felülúszóját 100 kDa-os molekulaszűrőn engedjük át centrifugálással. A szűrőn fennmaradó agrocínt a kisméretű szennyező anyagoktól desztillált vizes mosással szabadítjuk meg. A végső szűrőn fennmaradó frakciót teszteljük antagonistá hatására nézve. Ha ez a hatás eléri a 100-os hígíthatóságot, akkor az anyaggal tovább tudunk dolgozni. Ha a hatásossága ezt nem éri el, akkor tovább koncentrálnak liofilizálással.

A tisztított anyagot natív poliakrilamid gélelektroforézissel tisztítottuk tovább. A géleket a futtatás után steril körülmények között desztivízzel mostuk, majd az indikátorbaktérium szuszpenzióját tartalmazó tápagarral öntöttük le. A gátlási zóna megjelenéséből következtettünk az agrocín molekulásúlyára. Megállapítottuk, hogy még az 5%-os akrilamid gélen is az agrocín a gél legfetején helyezkedik el, tehát molekulásúlya >1000 kDa feletti.

SDS-es kezelés hatására ez a csík megszűnik és az anyag számos alegységre esik szét. Az agrocín hő hatására 50 C-on 5 perc alatt elveszti hatását. Ugyancsak hatását veszti proteínázK és egyéb proteolitikus enzimek hatására.

Mindezen kísérleti eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a kísérletben szereplő agrocín egy nagy molekulásúlyú több alegységből álló fehérje.

5. Az F2/5-ös törzs quorum-sensing reguláló rendszerének biológiai védekezéshez való kapcsolódása

A pályázat vitele során vált ismeretessé, hogy az F2/5-ös törzs quorum-sensing aktivitással is rendelkezik, és valószínűleg ez a tulajdonsága kapcsolatban áll a biológiai védekezésben játszott szerepével.

Az N-acil-homoszerin-lakton (AHL) által irányított quorum-sensing során a sejtek egymással kommunikálnak, ami olyan fiziológiai funkciók aktiválásához vezet, mint amilyen a virulencia, a biofilm képzés, antagonistá hatások kifejtése stb.

Az aktivitás tesztelésének első lépcsőfoka az F2/5-ös törzs AHL termelésének az igazolása. A baktériumot burgonyadextróz agaron tenyésztettük 6 napig. A négy Petri csészében nőtt baktériumokat lemosással összegyűjtöttük, majd lecentrifugáltuk. A baktériumokat ezután 20 ml etilacetát és acetónitril savasított 1:1 arányú keverékében ráztuk éjszakán át. A szuszpenziót centrifugáltuk (10 perc 10 000 g) és a felülúszót

vákuumban beszárítottuk nitrogén alatt. A kapott extraktumot 70%-os metanollal vékonyrétegen (C18 reverz fázisú) választottuk el. Az AHL jelenlétét az NTL4pZLR4 indikátortörzs segítségével határoztuk meg. A futás távolsága a szintetikus standardéhoz volt hasonlítva. Az indikátor törzset Cha et al. (1998) készítette. Ez a baktérium az *A.tumefaciens* C58-as törzsének egy származéka, amely nem tartalmazza a Ti plazmidot. A pZLR4 plazmid tartalmaz egy *traR* -t a C58-ből eredően és egy *traG::lacZ* fúziót a pBR1MCS5 plazmidba klónozva. Ha a vékonyréteg kromatogramot egy olyan lágy tápaggal öntjük le, amely ezt a konstrukciót tartalmazza, akkor az AHL foltok körül a lemez megkékül. Az egyes AHL komponensek meghatározását kooperáló partnerünk (Prof. T.J.Burr Cornell Egyetem, Geneva, USA) határozta meg, ezért azok leírásától eltekintek.

A vizsgálatok eredménye szerint az F2/5-ös törzs legalább hat AHL-t termel (pl. N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl)hexamide, N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl)octamide stb). Az ezeket a vegyületek képzését kódoló gének egyrészt a kromoszómán, másrészt a baktérium plazmidjain vannak kódolva. Egy előző munkánkban (Szegedi és Süle and Burr, 1999) előállított isogén vonalak segítségével megállapítottuk, hogy a plazmidokon kódolt AHL vegyületek rövid szénláncúak, míg a kromoszómán kódolt AHL vegyületek hosszú szénláncúak. Az előzetes vizsgálataink szerint az agrocin termelése szintén összefüggésben van ezeknek a vegyületeknek a szintézisével. Pontos szerepüknek tisztázása azonban még további vizsgálatokat igényel.

6. A tisztított agrocin növénykórtani tesztelése

A 4. pontban leírtak szerint előállított agrocin növénykórtani tesztelését baktériumok és növényeken (dohány, paradicsom és szőlő) végeztük.

A százszoros erősségű agrocint az összes növénykórtani jelentőségű baktérium ellen kipróbáltuk. A tesztelés során a tápagarba 5 mm átmérőjű lyukat vágunk és a lyukba 20 mikroliter agrocint pipettáztunk. A Petri csészéket ezután éjszakára 5 C fokú hűtőszekrénybe tettük, azért, hogy az agrocin oldat teljesen bediffundálódjon a táptalajba. Másnap reggel az agar felületére a tesztelendő baktérium vizes szuszpenzióját szélesztettük. A következő eredményeket kaptuk.

Agrobacterium tumefaciens (25 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Agrobacterium rhizogenes (biovar 2) (25 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Agrobacterium vitis (25 törzs) mind érzékeny volt.

Clavibacter michiganensis pv. *michiganensis* (5 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Erwinia amylovora (30 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (4 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* (12 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* (16 törzs) egyik sem volt érzékeny.

Összefoglalva megállapítható, hogy a vizsgált agrocin csak az *Agrobacterium vitis* törzseinek növekedését gátolta.

Az agrocin hatása a növényekre. A vegyület esetleges fitotoxikusságának az értékelésére a 100X erősségű agrocint ecseteléssel vittük fel dohány, paradicsom és szőlő levelekre. A kezelés eredményeként a levelek semmiféle elváltozást nem mutattak, fitotoxikus hatást nem figyeltünk meg. Továbbmenve ugyanezen preparátumot a fenti növények intercelluláris járataiba is bejuttattuk. Hasonló eredményt kaptunk, tehát a preparátum nem volt fitotoxikus.

Összefoglalva megállapítható, hogy az agrocinnak nincs fitotoxikus hatása.

Az agrocin tumorképzésre kifejtett hatását paradicsomon és szőlőn vizsgáltuk. Az agrocin három időpontban használtuk. A patogén baktérium sebbe juttatása előtt 24 órával, a patogénnal együtt vagy pedig a patogén sebbe juttatása után 24 órával. A kísérleteket három ismétlésben 5 patogén *Agrobacterium vitis* törzsszel végeztük. A kapott eredmények a következők voltak. Paradicsomon az agrocin csak akkor gátolta a tumorképződést, ha azt a patogén baktériummal együtt juttattuk a sebbe. Sem a pre, sem a poszt alkalmazások nem gátolták meg a tumorképződést. A szőlőn hasonló módon a legerősebb gátlást a 0 órában alkalmazott agrocin biztosította. Szemben a paradicsommal, az inokulálást megelőző alkalmazás is hatásos volt. A képződött tumorok kisebbek lettek, egyes esetekben el is maradtak. Az inokulálást követő agrocin kezelés nem csökkentette a tumorok számát és méretét. Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a tisztított agrocin mind paradicsomon, mind szőlőn képes a fertőzést megakadályozni, hatása azonban korlátozott.