

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen		Laitos Institution Department Biotieteiden laitos, perinnöllisyystieteen osasto	
Tekijä Författare Author Ruusu Rieki, 011272-126Y			
Työn nimi Arbetets titel Title KASVIPATOGEENISTEN <i>Erwinioiden</i> PATOGENEESIPROSESSIT JA NIIHIN OSALLISTUVAT TEKIJÄT, ESIMERKKINÄ <i>Erwinia rhaponticin</i> SELLULAASI			
Oppiaine Biologia			
Työn laji Arbetets art Subject Pro Gradu	Aika Datum Month and Year Syyskuu 1999	Sivumäärä Sidoantal Number of pages 41	
Tiivistelmä Referat Abstract			
<p>Työn tarkoituksena oli selvittää kasvipatogeenisen bakteerin <i>Erwinia rhaponticin</i> endoglukanaasigeeni <i>celA</i>:n nukleotidisekvenssi ja karakterisoida geenin tuottama proteiini CelA. <i>E. rhapontici</i> kuuluu enterobakteereihin kuuluvaan kasvipatogeeniseen <i>Erwinia</i>-sukuun, jonka jäsenet aiheuttavat mätänemistä, lakastumista, limottumista, leesioita ja nekroosia monille koristekasveille ja taloudellisesti tärkeille viljelykasveille. <i>Erwinia</i>-sukuun kuuluu mm. merkämätää aiheuttava carotovora-ryhmä, johon kuuluvat mm. <i>Erwinia carotovora</i> ja <i>Erwinia chrysantemi</i>. <i>E. rhapontici</i> kuuluu yhdessä <i>Erwinia amylovoran</i> kanssa amylovora-ryhmään, jonka jäsenet aiheuttavat isäntäkasveilleen kuivanekroosia ja lehtien lakastumista. <i>E. rhaponticin</i> yksi pääasiallisista isäntäkasveista on raparperi (<i>Rheum rhaponticum</i>), jossa se aiheuttaa lehtien kuivanekroosia ja rusehtumista. <i>E. rhapontici</i> ja sen eri kannat ovat laajalti infektiokykyisiä eri isäntäkasveissa ja erilaisissa olosuhteissa. <i>E. rhaponticin</i> virulenssitekijöistä ja patogeenisuominaisuuksista tiedetään vähän, eikä <i>E. rhaponticin</i>, merkämätää-erwinioista poiketen, ole huomattu tuottavan solunulkoisia pektaattilyaaseja. Merkämätää-erwiniat aiheuttavat merkämätää tuottamalla ja erittämällä suuria määriä solunulkoisia, kasvisoluseinää hajottavia entsyymejä, kuten pektaattilyaaseja, pektiinilyaaseja, polygalakturonaaseja, sellulaaseja ja proteaaseja. Nämä solunulkoiseen tilaan erittyvät tai ulkokalvolle ankkuroituvat entsyymit eritetään solusta erilaisilla proteiinieritysmenetelmillä. Entsyymien erityys on olennaista patogeenin taudinaiheuttamiskyvylle ja patogeneesille. Gram-negatiivisilta bakteereilta, joihin myös <i>Erwinia</i>-suvun bakteerit kuuluvat, on löydetävissä ainakin kolme toisistaan poikkeavaa proteiinieritystreittiä; tyyppi I, tyyppi II (GSP) ja tyyppi III –proteiinieritystreitit. Gram-negatiiviset bakteerit käyttävät erityisesti GSP:ta (General Secretory Pathway) solunulkoisten virulenssitekijöiden eritykseen. GSP:n kautta tapahtuva erityys on kaksivaiheinen prosessi, jolloin eritettävä proteiini kuljetaan molempien kalvojen yli erikseen, ja jonka aikana proteiini muodostaa hetkellisen periplasmisen välimuodon. Erityys sisemmän kalvon yli perustuu eritettävän proteiinin N-terminaaliseen signaalisekvenssiin, ja erityis ulomman kalvon yli erityskoneiston toimintaan sekä eritettävän proteiinin sisäisestä rakenteesta löytyvään informaatioon. Selluloosa on glukoo-alyksiköistä muodostunut hiilihydraattipolymeeri, joka molekyylin sisäisten ja välisten vetysidosten avulla muodostaa muiden selluloosaketjujen kanssa jäykkiä, liukenemattomia mikrosäikeitä. Sellulaasit ovat selluloosan glykosidisia sidoksia hydrolysoivia glykosylhydrolaaseja. Kasvipatogeenisilla bakteereilla sellulaasit tehostavat bakteerin tunkeutumista kasvikuodukseen patogeneesin aikana. Sellulaasit, kuten muutkin glukosylhydrolaasit, on ryhmitelty katalyyttisen domeenin HCL-analyysin perusteella proteiiniperheisiin. Sellulolyttisten entsyymien ja niiden isoentsyymien suuri määrä perustuu lähinnä suurten sellulaasigeeniperheiden esiintymiseen bakteerigenomissa, mutta myös translaation jälkeiseen modifointiin. Bakteerit ovat hankkineet sellulaasigeenejä laajan horisontaalisen geenivaihdon avulla. <i>E. rhaponticin celA</i>-geenin sekvensointi suoritettiin perus-DNA-tekniikoita käyttäen vektorikonstruktio pRR198:n suunnatun eksonukleaasi-delektion avulla. Sellulolyttinen aktiivisuus testattiin CMC-indikaattorialustalla ja spektrofotometrisella sellulaasi-assaylla. Nukleotidisekvenssin rakennemäärittelyt ja proteiinisekvenssivertailut tehtiin tietokoneohjelmien avulla. <i>E. rhaponticin</i> todettiin olevan sellulolyttisesti aktiivinen, ja sen endoglukanaasigeeni <i>celA</i> koodaa 333 aminohapon pituisen CelA-proteiinin. Tähän saakka kaikki <i>Erwinia</i>-suvusta karakterisoidut sellulaasit ovat löytyneet merkämätää-erwinioilta. Cel-proteiinin sekvenssivertailu osoitti sen kuuluvan sellulaasiperheeseen 8. CelA osoitti samaan perheeseen kuuluvien <i>E. chrysantemin</i> CelY:n kanssa 67% homologiaa ja <i>Cellulomonas udan</i> sellulaasin kanssa 51,5% homologiaa. <i>E. rhaponticin</i> CelA:n sellulaasiaktiivisuuden pH-optimi on hyvin alhainen, pH 3.4. Lämpötilaoptimi sijoittuu +40°C ja +50°C lämpötilojen välille.</p>			
Avainsanat Nyckelord Keywords <i>Erwinia rhapontici</i> , kasvipatogeeni, sellulaasi, proteiinieritys			
Säilytyspaikka Förvaringsställe Where deposited Helsingin yliopiston Biokeskuksen kirjasto			
Muita tietoja Övriga uppgifter Additional information			