

# Regulacja ekspresji genów warunkujących biosyntezę enzymów pektynolitycznych w komórkach *Erwinia*: ich znaczenie w patogenezie mokrej zgnilizny

Sylvia Jafra

Ewa Łojkowska

Pracownia Fitopatologii, Katedra Biotechnologii

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna

Gdańsk

## 1. Wstęp

W środowisku naturalnym bakterie z rodzaju *Erwinia* występują jako saprofity glebowe lub patogeny wielu gatunków roślin użytkowych. Bakterie te należą do rodziny *Enterobacteriaceae* i są urzęsionymi anaerobami fakultatywnymi nie formującymi spor. W obrębie bakterii z rodzaju *Erwinia* wyróżnia się gatunki wywołujące degradację składników roślinnych ścian komórkowych i powodujące objawy mokrej zgnilizny oraz gatunki niezdolne do maceracji tkanki roślinnej. Na podstawie właściwości biochemicznych i rodzaju wywoływanych objawów chorobowych bakterie z rodzaju *Erwinia* podzielono na trzy grupy: *Amylovora*, *Herbicola* i *Carotovora* (1).

*Erwinia amylovora* i inne gatunki należące do grupy *Amylovora* (*E. salicis*, *E. mallotivora*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens*) są mało aktywne metabolicznie i wymagają organicznego azotu do wzrostu. Większość to patogeny wywołujące nekrozy i wędnięcia tkanek. Ważnym gospodarczo gatunkiem należącym do tej grupy jest *Erwinia amylovora*. Bakteria ta wytwarza toksynę — amyloworynę, będącą zewnątrzkomórkowym polisacharydem (EPS), która powoduje wędnięcie liści i łodyg oraz rozległe nekrozy i zgorzele. *E. amylovora* wywołuje chorobę drzew owocowych zwaną zarazą ogniową (62). W Polsce *E. amylovora* podlega obowiązkowemu zwalczaniu.

Grupa *Herbicola* obejmuje trzy gatunki bakterii: *E. herbicola*, *E. stewartii* i *E. uredovora*. Występują one jako saprofity na organach roślinnych będąc istotnym elementem tworzącym fylosferę (*phylosphere*). Niektóre bakterie z tej grupy są patogenami roślin zasiedlającymi glebę, wodę, powietrze oraz tkanki

zwierzęce i ludzkie. Szczepy *E. herbicola* mogą występować we wszystkich wymienionych środowiskach, jednakże izolowane ze źródeł klinicznych klasyfikowane są jako *Enterobacter agglomerans* (62). *E. stewartii* jest patogenem kukurydzy i kilku gatunków jej pokrewnych, powoduje wędnięcie i śmierć rośliny (62).

Ostatnia, najważniejsza grupa — Carotovora — obejmuje gatunki i podgatunki bakterii wykazujących zdolność degradacji roślinnych ścian komórkowych, która jest związana z wytwarzaniem licznych enzymów degradujących pektyny i celulozę. Grupa bakterii pektynolitycznych obejmuje gatunki *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. cyripedii* i *E. rhapontici*.

Dwa pierwsze *E. carotovora* (*Ec*) i *E. chrysanthemi* (*Ech*) mają istotne znaczenie gospodarcze ponieważ powodują poważne straty plonów roślin użytkowych takich jak: ziemniak, marchew, burak cukrowy, ogórek czy pomidor, a także roślin ozdobnych: sępolia, goździk, filodendron, difenbachia, chryzantema (2). Bakterie z gatunku *E. carotovora* wywołują objawy chorobowe w czasie wegetacji roślin (czarna nóżka, wędnięcie roślin i gnicie nadziemnych i podziemnych części roślin), jak i w czasie przechowywania zbiorów (mokra zgnilizna bulw i korzeni) (2,3). W gatunku *E. carotovora* wyróżnia się pięć podgatunków: *E. carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*), *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*), *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* (*Ecb*), *E. carotovora* subsp. *odorifera* (*Eco*), *E. carotovora* subsp. *wasabiae* (*Ecw*) (4).

Bakterie z gatunku *E. chrysanthemi* na roślinach ziemniaka powodują odbarwienia i żółknięcie liści, gnicie łodyg, karłowacenie i wędnięcie roślin w polu (5). W klimacie umiarkowanym *Ech* może wywoływać objawy czarnej nóżki identyczne z symptomami powodowanymi przez *Eca* (6).

## 2. Rozwój procesu chorobowego w roślinie

Zarówno bakterie z gatunku *E. carotovora*, jak i *E. chrysanthemi* mogą infekować szerokie spektrum gatunków roślin, a wystąpienie objawów chorobowych zależy od patogeniczności szczepu, odporności infekowanej rośliny, a także od specyficznych interakcji między rośliną a patogenem. Istotną rolę w rozwoju procesu chorobowego odgrywają takie czynniki środowiskowe jak: temperatura, wilgotność powietrza, deficyt tlenowy oraz poziom presji infekcyjnej. Bakterie wnikają do tkanek poprzez uszkodzenia mechaniczne lub naturalne otwory anatomiczne (przetchlinki i aparaty szparkowe). W przestworach komórkowych gospodarza następuje mnożenie się bakterii i wytwarzanie przez nie enzymów degradujących pektynowe i celulozowe składniki ścian komórkowych (3,7). Uszkodzone ściany nie są w stanie chronić struktury błon komórkowych, stąd zwykle dochodzi do ich uszkodzenia i zachwiania kompartmentacji komórkowej. Następuje wówczas wyciek treści komórkowej do przestworów międzykomórkowych, a kolejne pokolenia bakterii mają bogate źródło substancji odżywczych. Następuje zatem dalsze rozmnażanie bakterii i powiększanie się obszaru tkanki ulegającej infekcji.

### 3. Czynniki warunkujące patogeniczność bakterii z rodzaju *Erwinia*

Zdolność do wywoływania procesu infekcyjnego związana jest przede wszystkim z wytwarzaniem licznych zewnątrzkomórkowych enzymów degradujących składniki ścian komórkowych (8,9,10). Enzymy te dzielone są zwykle na dwie grupy: pierwsza obejmuje enzymy degradujące pektynowe składniki ściany komórkowej, do których zaliczane są metyloesterazy pektyn, acetyloesterazy pektyn, liazy pektyn, liazy kwasu poligalakturonowego, poligalakturonazy (10,11), do drugiej należą celulazy, hemicelulazy i proteinazy (12). Ponadto pewną rolę w patogenie odgrywają istotne w degradacji błon komórkowych fosfolipazy i proteazy (8,11).

W procesie infekcji bardzo ważną rolę odgrywa mechanizm wzajemnego rozpoznawania się patogena i gospodarza. W wyniku tego procesu może dojść do szybkiego rozprzestrzeniania się infekcji lub też następuje indukcja procesu nadwrażliwości i włączenie systemu obronnego w tkance roślinnej (13,14). Uruchomienie odpowiedzi nadwrażliwości (HR — *hypersensitive response*) bezpośrednio wiąże się z aktywnością bakteryjnych genów *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) i *avr* (*avirulence*) oraz roślinnego genu *R* (*resistance*) (14,15). Pewną rolę w tym mechanizmie, jak się wydaje, odgrywają produkowane przez bakterie zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS) (16).

Wykazano, że do zapoczątkowania procesu chorobowego niezbędny jest odpowiedni poziom czynników istotnych w patogenie, co z kolei wiąże się z liczbą bakterii w miejscu infekcji (2,17,18). Dowiedziono, że wiele patogenów zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych wykazuje tzw. „sygnalizator zagęszczenia” (*quorum sensing*), związany z wytwarzaniem przez bakterie cząsteczek sygnałowych pełniących rolę regulatorów ekspresji genów warunkujących patogeniczność (17-20).

#### 3.1. Enzymy pektynolityczne

Wspomniano już, że bakterie z rodzaju *Erwinia* wytwarzają szereg zewnątrzkomórkowych enzymów pektynolitycznych. Bardzo istotne, jak się wydaje, są badania nad regulacją ekspresji genów warunkujących ich biosyntezę oraz poznanie roli poszczególnych enzymów w procesie patogeny. W ostatniej dekadzie nastąpił znaczący postęp w zastosowaniu metod i technik biologii molekularnej w badaniach genomu bakterii z rodzaju *Erwinia* (7,9,10,21). Wielki postęp w badaniach nad poznaniem mechanizmów regulujących degradację kwasu poligalakturonowego i pektyn nastąpił bezpośrednio po sklonowaniu i zsekwencjonowaniu całego szeregu genów kodujących syntezę enzymów zdolnych do degradacji złożonej struktury pektynowych składników ścian komórkowych (9,10,21).

##### 3.1.1. Liazy kwasu poligalakturonowego (PL; EC4.2.2.2)

Wśród enzymów pektynolitycznych szczególne znaczenie w patogenie mają liazy kwasu poligalakturonowego. Ich biosynteza i aktywność jest nie-

zbędna w procesie degradacji ścian komórkowych zainfekowanej rośliny (7,10,21). Liazы kwasu poligalakturonowego rozszczepiają wewnętrzne wiązania glikozydowe w PGA niezmetylowanym lub zmetylowanym w niskim procencie na drodze  $\beta$ -eliminacji (22). Wykazują zmniejszoną aktywność względem PGA o wysokim procencie metylacji lub acetylacji, dlatego też ich aktywność jest poprzedzana lub wspomagana działaniem metyloesterazy i acetyloesterazy pektyn, które usuwają grupy metylowe i acetylowe pektyn uwalniając kwas poligalakturonowy (11,23).

Zarówno bakterie z gatunku *E. chrysanthemi*, jak i *E. carotovora* wytwarzają kilka różnych izoenzymów liaz kwasu poligalakturonowego kodowanych przez niezależne geny *pel* (7,21). Sklonowano osiem genów kodujących syntezę liaz kwasu poligalakturonowego (PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelZ) produkowanych przez *E. chrysanthemi*, z których wszystkie są wydzielane poza komórkę (24-28). Pięć pierwszych genów dla tzw. głównych liaz kwasu poligalakturonowego, sklonowanych z genomu *Ech*, oznaczono kolejnymi literami alfabetu, przy czym PelA ma najniższy, a PelE najwyższy punkt izoelektryczny (24). *Ecc* i *Eca* wytwarzają trzy lub cztery izoenzymy Pel (PelA, PelB, PelC, PelD) (29-31), przy czym takie same nazwy liaz kwasu poligalakturonowego dla gatunków *Ech* i *Ec* nie oznaczają tych samych izoenzymów. Nazewnictwo izoenzymów zostało przyjęte niezależnie dla wymienionych gatunków przez odrębne zespoły badawcze (24,29,30,32). W przypadku niektórych szczepów np. *Eca* SCRI193 stwierdzono wydzielanie na zewnątrz komórki tylko izoenzymów PelC i PelD, natomiast PelA i PelB pozostają w przestrzeni peryplazmatycznej (30). Izoenzymy produkowane przez *Ecc* wykazują większą aktywność względem substratu – kwasu poligalakturonowego zmetylowanego w około 30% (22). Wszystkie liazы wymagają do swej aktywności obecności jonów  $Ca^{2+}$ , a synteza głównych liaz kwasu poligalakturonowego indukowana jest w obecności kwasu poligalakturonowego oraz produktów jego degradacji (23,33). Optymalne stężenie jonów  $Ca^{2+}$  dla pięciu głównych izoenzymów Pel wynosi 0,1 mM, w przypadku PelE aktywność pozostaje wysoka nawet w obecności śladowych ilości jonów wapnia (23).

W badaniach nad regulacją i rolą enzymów i izoenzymów wykorzystano trzy podstawowe strategie: 1) uzyskanie mutantów nie wytwarzających pojedynczych enzymów lub ich grup na drodze delekcji, 2) uzyskanie szczepów *E. coli* z klonowanymi genami warunkującymi biosyntezę enzymów pektynolitycznych *Erwinia*, 3) skonstruowanie *in vitro* fuzji poszczególnych genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów pektynolitycznych z genami reporterowymi (gen *lacZ* kodujący  $\beta$ -galaktozydazę lub gen *uidA* odpowiedzialny za syntezę  $\beta$ -glukuronidazy) i rekombinacja fuzji do genomu bakterii z rodzaju *Erwinia*. Ta ostatnia strategia pozwoliła na otrzymanie mutantów niezdolnych do syntezy jednego lub kilku enzymów lub izoenzymów, co z kolei pozwoliło na dokładniejsze określenie roli poszczególnych enzymów (33-36).

W badaniach prowadzonych za pomocą elektroforezy dwukierunkowej, elektroogniskowania oraz specyficznej detekcji aktywności liazы kwasu poligalakturonowego wykazano, że mutanty *Ech* i *Ecc* pozbawione zdolności syntetyzowania głównych liaz wytwarzają nowe izoenzymy tego enzymu (37). Zaob-

serwowano również zdolność do wytwarzania nowych izoenzymów Pel podczas wzrostu mutantów bakterii z gatunku *Ecc* i *Ech* w pożywce syntetycznej z różnymi źródłami węgla (pektyny, ekstrakt roślinny, glicerol) oraz podczas wzrostu bakterii w tkance roślinnej (37,38). Izoenzymy te ze względu na ich niską aktywność w komórce bakteryjnej, maskowaną przez aktywność liaz głównych, określono mianem liaz drugorzędowych lub izoenzymów indukowanych w wyniku interakcji roślina-patogen (*plant inducing izoenzymes*) (37).

W wyniku bezpośredniej delecji genów *pel* kodujących 5 głównych izoenzymów Pel z genomu *Ech* 3937 uzyskano mutant nie produkującego pięciu głównych liaz. Beaulieu i in. (35) wykazali, że mutant taki zdolny jest do wywoływania objawów mokrej zgnilizny, a w zmacerowanej tkance stwierdzono aktywność liazy kwasu poligalakturonowego. W celu identyfikacji genów kodujących drugorzędowe liazy kwasu poligalakturonowego utworzono bibliotekę DNA genomowego *Ech* 3937. Analiza uzyskanych w wyniku klonowania szczepów doprowadziła do scharakteryzowania pierwszego genu odpowiedzialnego za syntezę liazy drugorzędowej *pell* w szczepach *Ech* 3937 (26) oraz EC16 (25). Stwierdzono, że gen *pell* kodujący izoenzym PelL występuje również w innych szczepach *Ech*, a nie występuje w gatunku *Eca* i *Ecc* (25,26,39).

W ostatnich latach sklonowano i scharakteryzowano w genomie *Ech* dwa kolejne geny kodujące drugorzędowe liazy kwasu poligalakturonowego: *pelZ* i *pell* (27,28,40). W przypadku tych genów stwierdzono obecność genów homologicznych w genomie innych szczepów *Ech*, a także *Ecc* (27,28).

Shevchik i in. (28) zaproponowali nowy podział liaz kwasu poligalakturonowego. Na podstawie konserwatywnych sekwencji poszczególnych białek wyróżniono 5 klas liaz kwasu poligalakturonowego: 1) klasa I obejmuje superrodzinę liaz kwasu poligalakturonowego, do której należy wiele białek bakteryjnych i roślinnych, w tym pięć głównych PL ze szczepu *E. chrysanthemi* (41), 2) klasa II obejmuje peryplazmatyczne liazy kwasu poligalakturonowego *E. carotovora* (30) i KdgC z *E. chrysanthemi* (42), 3) klasa III obejmuje PelB/Pel-3 z *E. carotovora*, cztery liazy kwasu poligalakturonowego patogenicznego grzyba *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *pisii*) (PelA, PelB, PelC, PelD) oraz Pell z *E. chrysanthemi*, 4) w klasie IV znajdują się PelL oraz PelX z *E. chrysanthemi* oraz 5) klasa V do której należy tylko PelZ (28).

### 3.1.2. Liaza pektyn (Pnl) (PNL; EC4.2.2.10)

Kolejna grupa enzymów uczestniczących w degradacji roślinnej ściany komórkowej to liazy pektyn. Enzymy te zostały opisane u *E. carotovora* i *E. chrysanthemi*, jednakże tylko w przypadku *E. carotovora* gen *pnl* kodujący liazę pektyn został sklonowany i scharakteryzowany (43). Liaza pektyn działa na pektyny lub zmetylowany w co najmniej 70% kwas poligalakturonowy, odszczepiając reszty galakturonianowe.

Wykazano, że indukcja genów warunkujących syntezę tego enzymu regulowana jest *in vitro* przez promieniowanie UV i mitomycynę C. Wynika stąd, że indukcja aktywności liazy pektyn jest związana z odpowiedzią SOS

na czynniki uszkadzające DNA (44). Synteza liazы pektyn jest uzależniona od funkcjonowania genu *recA*, natomiast nie stwierdzono, by transkrypcja genu *pnl* znajdowała się pod bezpośrednią kontrolą białka LexA, typowego represora regulonu SOS (10).

### 3.1.3. Poligalakturonazy (PG) (EC; 3.2.1.15)

Endopoligalakturonazy zidentyfikowano w szczepach *E. carotovora*, natomiast u *E. chrysanthemi* stwierdzono obecność aktywności hydrolitycznej egzopoligalakturonazy (9). Enzymy te hydrolizują wiązanie  $\alpha$ -1,4-glikozydowe kwasu poligalakturonowego odszczepiając nasycone digalakturonidy. Stwierdzono, że geny *peh* odpowiedzialne za syntezę poligalakturonaz znajdują się w genomie *E. carotovora* w sąsiedztwie genów *pel* (45). Gen *pehX* kodujący egzopoligalakturonazę w szczepie *Ech* EC16 (46) został zidentyfikowany również w szczepie *E. chrysanthemi* 3937 (21).

### 3.1.4. Metyloesterazy (Pem) i acetyloesteraza pektyn (Pae)

Prawdopodobnie jednym z pierwszych etapów degradacji roślinnych ścian komórkowych jest demetylacja pektyn. Metyloesteraza pektyn usuwa grupy metylowe z pektyn wytwarzając metanol i kwas poligalakturonowy, który stanowi substrat dla liazы kwasu poligalakturonowego. W genomie *Ech* 3937 scharakteryzowano dwie metyloesterazy pektyn: PemA i PemB, kodowane przez geny *pemA* i *pemB* (47,48). Gen *pemA* kodujący PemA na chromosomie *E. chrysanthemi*, położony jest w pobliżu genów *peLA-peLE-peLD*. Mutanty pozbawione aktywności PemA wykazują obniżoną wirulencję w stosunku do szczepu dzikiego, ale w dalszym ciągu są zdolne do wywoływania miejscowych nekroz na roślinach sępolii (49). Metyloesteraza PemB, ma charakter lipoproteiny wykazującej dużą homologię z innymi metyloesterazami bakteryjnymi i roślinnymi (48). PemB w odróżnieniu od izoenzymu PemA, jest zlokalizowana w zewnętrznej błonie komórkowej i nie jest uwalniana poza komórkę bakteryjną. Z racji swego usytuowania PemB demetyluje oligomery pektyn, których wielkość pozwala na dyfuzję do przestrzeni peryplazmatycznej komórki (48).

W ostatnich latach zidentyfikowano aktywność acetyloesterazy pektyn w szczepie *Ech* 3937. PaeY jest pierwszą acetyloesterazą pektyn opisaną dla bakterii, natomiast niektóre rośliny i grzyby produkują ten enzym (11). PaeY kodowana jest przez gen *paeY*, który zlokalizowany jest na chromosomie *Ech* w pobliżu genów *peLA-peLE-peLD-pemA*. Również w innych szczepach *Ech* znaleziono sekwencje homologiczne do genu *paeY*, jednak nie stwierdzono obecności genu homologicznego do *paeY* w szczepach *Ecc* i *Eca* (11). Acetyloesteraza i metyloesteraza pektyn wspomagają pektynolityczne działanie liazы kwasu poligalakturonowego. We wstępnych wynikach wskazuje się na synergistyczne działanie sąsiadujących ze sobą genów *peLA-peLE-peLD-paeY-pemA* (11).

### 3.1.5. Liaza oligogalakturonidów (Ogl)

W komórkach *E. chrysanthemi* zidentyfikowano także wewnątrzkomórkowy enzym — liazę oligogalakturonidów, degradującą do cukrów prostych, niskocząsteczkowe oligogalakturonidy powstałe w wyniku działania zewnątrzkomórkowych enzymów. (50). Sklonowano gen *ogl* odpowiedzialny za syntezę tego enzymu w genomie *Ech* (51) i *Ec* (52). Mutanty *Ech* pozbawione aktywności liazy oligogalakturonidów nie rosną na pożywce zawierającej kwas poligalakturonowy lub digalakturonidy jako jedyne źródło węgla.

## 3.2. Regulacja syntezy enzymów pektynolitycznych

Regulacja syntezy enzymów pektynolitycznych jest zjawiskiem złożonym i zależy od wielu czynników środowiskowych. U *E. chrysanthemi* synteza pektynaz i celulaz zależy od fazy wzrostu bakterii (21,33,50). Ponadto biosynteza liaz kwasu poligalakturonowego jest regulowana przez wiele czynników takich jak: obecność produktów degradacji pektyn lub ekstraktu z tkanki roślinnej (42,53), ciśnienie osmotyczne, represja kataboliczna, dostępność tlenu, głodzenie azotowe (33), a także obecność jonów żelaza (54).

### 3.2.1. Wpływ fazy wzrostu bakterii i wielkości populacji na regulację ekspresji genów

Skonstruowanie fuzji genów kodujących poszczególne enzymy pektynolityczne z genem reporterowym *uidA* kodującym  $\beta$ -glukuronidazę pozwoliło na prześledzenie wpływu czynników zewnętrznych na regulację ekspresji poszczególnych izoenzymów w zawiesinie bakteryjnej (33). Wykazano, że w późnej fazie logarytmicznej wzrostu, kiedy gęstość populacji bakterii osiąga poziom maksymalny, następuje 5–60-krotne zwiększenie poziomu ekspresji genów kodujących liazy kwasu poligalakturonowego, metyloesterazę pektyn i genów *out* kodujących białka systemu sekrecyjnego, w stosunku do poziomu we wczesnej fazie logarytmicznej (33).

Ten typ aktywacji regulacji ekspresji genów podobny jest do aktywacji zachodzącej za pośrednictwem systemu LuxI-LuxR u morskiej bakterii *Vibrio fischeri* i jest on zależny od fazy wzrostu komórek bakterii (ang. *quorum sensing mechanism*) (55). Rodzina LuxR obejmuje białka regulatorowe oddziałujące z niewielkimi, łatwo dyfundującymi cząsteczkami sygnałowymi, zwanymi feromonami — HSL (laktone N-acylo-homoseryny). Poszczególne cząsteczki HSL różnią się łańcuchami cukrowymi przyłączonymi do N-acylowego końca. U *Vibrio fischeri* HSL pełni rolę autoinduktora regulującego ekspresję genów *lux* odpowiedzialnych za bioluminescencję, w sposób zależny od fazy wzrostu bakterii.

Do interakcji między HSL i produktem genu *luxR* dochodzi po przekroczeniu, w wyniku zwiększenia gęstości populacji bakterii, poziomu progowego autoinduktora, którego synteza zależy od ekspresji genu *luxI*. Wytworzony kompleks indukuje transkrypcję genu *luxI* i produkcję białka LuxI (17,18).

Homologii HSL są szeroko rozpowszechnione i biorą udział w kontroli różnych procesów życiowych u gatunków z rodzaju: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Yersinia* oraz *Erwinia* (56). Wykazano, że analog HSL uczestniczy w kontroli syntezy karbapenemu – antybiotyku wytwarzanego przez *E. carotovora* (57). Również wytwarzanie zewnątrzkomórkowych enzymów przez bakterie z gatunku *Erwinia carotovora* jest indukowane przez HSL, którego synteza znajduje się pod kontrolą białka regulatorowego ExpI, homologa LuxI z *Vibrio fischeri* (17,18). Przez wiązanie się HSL do białka regulatorowego ExpR (homolog LuxR), HSL może aktywować ekspresję zarówno genów kodujących enzymy zewnątrzkomórkowe jak i gen *expI*. Wynika stąd, że system ten jest indukowany autogenie. Szczepy Ecc z mutacją w genie *expI* nie produkują egzoenzymów, a także są niezdolne do maceracji tkanki roślinnej i namnażania się w roślinie (31,58). Pironhen i in. (18) stwierdzili, że mutacja *expI* w *E. carotovora* objawiająca się brakiem syntezy enzymów zewnątrzkomórkowych podlega komplementacji przez *luxI*. Podobnie mutacja Lux<sup>-</sup> w *Vibrio fischeri* jest komplementowana przez *expI*, w efekcie czego zostaje przywrócona zdolność bioluminescencji. Wynika stąd, że HSL może pośredniczyć w regulacji ekspresji czynników wirulencji, jak i w produkcji metabolitów wtórnych i odgrywa rolę nadrzędnego globalnego regulatora wielu operonów bakterii (17).

W genomie bakterii *Ech* 3937 stwierdzono obecność homologów genów *expI* i *expR* (21). W szczepie tym wykazano także obecność trzech różnych feromonów — pochodnych HSL: OHHL — *N*-(3-oksyhexanylo)-lakton homoserynowy, HHL — *N*-(hexanylo)-lakton homoserynowy i DHL — *N*-(dekanilo) lakton homoserynowy (59). Białko ExpI reguluje produkcję zarówno OHHL, jak i HHL, natomiast nie zidentyfikowano genu pośredniczącego w regulacji syntezy DHL. Wykazano, że inaktywacja genu *expI* nieznacznie obniża ekspresję genów kodujących dwa z pięciu głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego: PelA i PelB. Natomiast mutacja w genie *expR* nie ma wpływu na syntezę feromonów i liaz kwasu poligalakturonowego (59). Oczyszczone białko ExpR z *Ech* 3937 wiąże się specyficznie do regionów promotorowych 5 głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego, a także chroni region DNA zlokalizowany powyżej regionów promotorowych genów *pel* przed działaniem DNazy I w eksperymentach typu *footprinting* (59). Nasser i in. (1998) przypisują białku ExpR funkcję aktywatora tych genów, a także genu *expI*. W dalszych badaniach wykazano, że ExpR działa jako autorepresor (60). Region promotorowy genu *expR* zawiera dwa miejsca promotorowe, do których wiąże się ExpR. Zjawisko autorepresji związane jest z niską gęstością populacji komórek bakteryjnych i zostaje zniesione przy wysokiej gęstości populacji – wysokie stężenie OHHL powoduje dysocjacje kompleksu ExpR-*expR* DNA (60).

### 3.2.2. Ciśnienie osmotyczne

Ciśnienie osmotyczne jest czynnikiem środowiskowym oddziałującym na wszystkie żywe organizmy. Wpływa na rozwój komórki poprzez oddziaływanie



na wiele procesów metabolicznych, a także na ekspresję czynników patogeniczności. Wykazano, że ciśnienie osmotyczne pożywki wpływa na tempo syntezy liaz kwasu poligalakturonowego u *Ech*, a jego wzrost hamuje wydzielanie liaz kwasu poligalakturonowego (61). W szczepie *Ech* 3937 całkowita synteza liaz kwasu poligalakturonowego rośnie wraz ze wzrostem ciśnienia osmotycznego, osiąga maksimum przy stężeniu 0,2 M NaCl w pożywce, po czym wraz z dalszym wzrostem ciśnienia osmotycznego spada do poziomu podstawowego (61). Sytuacja taka jest spowodowana tym, że w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego następuje indukcja transkrypcji genu *pelE*. Nie obserwowano wpływu ciśnienia na ekspresję genów *pelA*, *pelB*, *pelC*, natomiast ekspresja genów *pelD* i *pelL* jest nieznacznie hamowana (33,62).

### 3.2.3. Temperatura

Temperatura istotnie wpływa na patogeniczność bakterii z rodzaju *Erwinia* (62). Produkcja enzymów pektynolitycznych ulega obniżeniu, jeśli temperatura prowadzenia hodowli wzrasta powyżej optymalnej temperatury dla wzrostu tych bakterii. Synteza liaz kwasu poligalakturonowego u *Ech* wzrasta około 7-krotnie, gdy hodowla rośnie w temperaturze 25°C i spada średnio 5-krotnie w temperaturze 37°C w stosunku do poziomu syntezy w 30°C (33). Podobnie w przypadku bakterii z gatunku *Eca* w temperaturze 27°C synteza liazy kwasu poligalakturonowego jest 3-6 razy większa niż w temperaturze 30,5°C (63).

### 3.2.4. Warunki beztlenowe

Dostęp tlenu wpływa zarówno na patogeniczność bakterii, jak i omówioną, odporność roślin na bakterie z rodzaju *Erwinia*. W warunkach beztlenowych następuje osłabienie wzrostu bakterii, jednakże jako fakultatywne anaeroby mogą rozwijać się i powodować objawy chorobowe na roślinach (62,63). Przy ograniczonym dostępie tlenu następuje około 6-krotna indukcja ekspresji niektórych genów *pel* (33). Warunki beztlenowe stymulują transkrypcję genów *pelA*, *pelD* i *pelE*, natomiast ekspresja genu *pelL* jest zredukowana (26,33).

Zmiana warunków z tlenowych na beztlenowe wymaga uruchomienia w komórce alternatywnego akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym. Wysłunięto hipotezę, że takim akceptorem mogą być azotany (21). Tezę taką potwierdza fakt, że w innych doświadczeniach wykazano, iż głodzenie azotowe prowadzi do zahamowania syntezy liaz kwasu poligalakturonowego (33).

### 3.2.5. Indukcja przez produkty degradacji pektyn

W szczepach *Erwinia chrysanthemi* synteza metyloesterazy pektyn, liaz kwasu poligalakturonowego i poligalakturonazy jest indukowana około 40-krotnie w obecności PGA (33,64). W indukcji syntezy tych enzymów biorą udział także produkty rozpadu kwasu poligalakturonowego, szczególnie gala-

kturonidy i digalakturonidy (KDG, DKI i DKII), (65). Wynika z tego, że produkty depolimeryzacji pektyn są równocześnie induktorami syntezy enzymów pektynolitycznych, a w efekcie proces ten jest typową reakcją autoindukcji.

### 3.2.6. Represja kataboliczna

Produkcja liaz kwasu poligalakturonowego podlega represji katabolicznej kontrolowanej przez cykliczny AMP podczas wzrostu bakterii w obecności glukozy (33). Indukcja syntezy poszczególnych pektynaz uzależniona jest od źródła węgla w pożywce. Wynika stąd, że ekspresja pojedynczych genów podlega represji katabolicznej (28). Szczep *Ech* z mutacją w genie *crp* (*catabolite repression protein*) może wykorzystywać jako źródło węgla glukozę, traci natomiast zdolność wzrostu na pożywce zawierającej PGA, galakturonidy, glicerol, mannitol czy galaktozę. Szczep taki wykazuje obniżoną produkcję liaz kwasu poligalakturonowego (21). Mutacja w genie *crp* powoduje wyraźne obniżenie poziomu ekspresji genu *expI* (60). W doświadczeniach *in vitro* białko CRP wiąże się specyficznie do regionów promotorowych genów *expI* i *expR*. Promotory genu *expR* podlegają aktywacji przez białko CRP, natomiast ekspresja genu *expI* podlega represji zależnej od białka CRP. Zjawisko represji genu *expI* zależnej od CRP może tłumaczyć ograniczenie akumulacji enzymów pektynolitycznych, gdy bakterie znajdują się w fazie stacjonarnej (60).

### 3.2.7. Inne geny uczestniczące w regulacji

W genomie *Ech* zidentyfikowano trzy główne białka regulatorowe: KdgR, PecS-PecM i PecT uczestniczące w biosyntezie pektynaz (66-70). Wspólną cechą wymienionych białek regulatorowych jest to, że mutacje w genach warunkujących ich biosyntezę powodują wzmoczoną syntezę liaz kwasu poligalakturonowego w środowisku nie zawierającym induktorów biosyntezy tych enzymów.

**KdgR.** Indukcja genów kodujących białka uczestniczące w pektynolizie oraz sekrecji izoenzymów liaz kwasu poligalakturonowego w obecności PGA i jego pochodnych wskazuje na istnienie skoordynowanej regulacji tych genów. U *Ech* wszystkie wewnątrzkomórkowe etapy degradacji galakturonidów pozostają pod kontrolą represora KdgR kodowanego przez gen *kdgR* (66,72). Represor ten reguluje również ekspresję genów *pel* z wyjątkiem genu *pell*, który pozostaje pod kontrolą innego represora PecS (26,51,67). Pod kontrolą białka KdgR pozostaje również system genów sekrecyjnych *out* (73).

Porównanie sekwencji DNA regionów regulatorowych genów kontrolowanych przez białko KdgR wykazało obecność konserwatywnych motywów będących miejscem wiązania represora KdgR, tzw. kasetą KdgR (42,51). Obecność w środowisku produktu degradacji PGA — KDG (2-keto-3-deoksyglukuronidu) hamuje wiązanie się represora KdgR z regionami regulatorowymi genów *pel*, których transkrypcja podlega kontroli tego białka (73,74). W badaniach przy użyciu metody *footprinting* wykazano, że miejsca chronione przez związanie się do nich represora KdgR pokrywają się lub znajdują się

blisko sekwencji regionów -35 lub -10 właściwych promotorom (74). Stąd można wnioskować, że represor KdgR współzawodniczy z polimerazą RNA o dostęp do sekwencji promotorowej, a wiążąc się z nią lub w jej sąsiedztwie zapobiega transkrypcji danego genu (21,74).

**PecS-PecM.** Kasetą *pecS* obejmuje dwa geny *pecS* i *pecM*, których produkty uczestniczą w regulacji syntezy liaz kwasu poligalakturonowego, a także biosyntezy celulaz i białek systemu sekrecyjnego oraz niebieskiego barwnika (68). Mutanty z defektywnymi genami *pecS* czy *pecM* wykazują wyższy poziom syntezy pektynaz i celulaz co sugerowało, że białka PecS i PecM działają podobnie. Ważniejszą rolę w regulacji przypisuje się białku PecS, gdyż mutacja w genie *pecS* prowadzi do uzyskania wyższego poziomu syntezy pektynaz i celulaz, niż unieczynnienie genu *pecM*. W badaniach frakcji komórkowych wykazano, że białko PecS zlokalizowane jest w cytoplazmie komórki bakteryjnej, natomiast PecM jest zakotwiczone w wewnętrznej błonie cytoplazmatycznej (68). Oczyszczone białko PecS wiąże się do regionów regulatorowych genów *pelA*, *pelE*, *pelL*, *ogl*, *outC*, a także do genu *celZ* kodującego celulazę EGZ (74). Sposób oddziaływania represora PecS, można tłumaczyć podobnie jak w przypadku białka KdgR. PecS współzawodniczy z polimerazą RNA o miejsce regulatorowe lub też przeszkadza w elongacji RNA. PecS działa jako represor transkrypcji, natomiast PecM prawdopodobnie uczestniczy w modyfikowaniu konformacji białka PecS zwiększając lub zmniejszając jego powinowactwo do DNA, a w efekcie reguluje poziom transkrypcji genów *pel* (21,75).

**PecT.** Trzecie białko regulatorowe PecT, kodowane przez gen *pecT*, należy do rodziny transkrypcyjnych regulatorów LysR (70). Rodzina ta obejmuje białka działające jako aktywatory transkrypcji wyróżniające się stałymi, konserwatywnymi domenami (obecność na N-końcu motywu heliks-skret-heliks (*helix-turn-helix*) wiążącego DNA). Białko PecT posiada motyw heliks-skret-heliks wiążący DNA, ale działa jako represor w kontroli ekspresji niektórych genów kodujących liaz kwasu poligalakturonowego (71). Wykazano, że mutacja w genie *pecT* powoduje wzrost ekspresji genów *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pelL* i *kdgC*, natomiast nie wpływa na syntezę pozostałych liaz oraz na wewnątrzkomórkowe etapy degradacji oligogalakturonidów (69). Szczególną cechą mutantów *pelT* jest synteza dużych ilości egzopolisacharydów (EPS) podczas wzrostu na podłożu minimalnym (69). Egzopolisacharydy, podobnie jak w przypadku patogenezy *Pseudomonas solonacaerum*, mogą stanowić czynnik wirulencji (75).

Mutagenеза chemiczna lub wprowadzenie elementów insercyjnych do genomu *Ech* 3937 doprowadziła do wyizolowania wielu mutantów wykazujących zróżnicowany poziom syntezy liaz kwasu poligalakturonowego w stosunku do szczepu dzikiego. Większość uzyskanych mutacji prowadzi do wzrostu syntezy izoenzymów, natomiast nieliczne powodują obniżenie syntezy liazy kwasu poligalakturonowego. Można wysunąć hipotezę, że regulacja pozytywna nie jest tak istotna jak kontrola negatywna, jakkolwiek znacznie łatwiej jest izolować mutanty defektywne w negatywnej regulacji (mutacje represora) niż w pozytywnej (zmiana aktywności induktora (21)).

### 3.3. Wydzielanie pektynaz i celulaz na zewnątrz komórki bakteryjnej

Większość pektynaz i celulaz wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Erwinia* wydzielana jest na zewnątrz komórki, co pozwala na degradację wielko-cząsteczkowych substratów. Sekrecja tych enzymów zachodzi w dwóch etapach: pierwszy obejmuje eksport białek do przestrzeni peryplazmatycznej, drugi — ich wydzielenie poza zewnętrzną błonę komórkową. Ten dwuetapowy rodzaj wydzielania całego szeregu białek bakteryjnych określa się mianem ogólnego mechanizmu sekrecyjnego (*general secretory pathway*, GSP) (76,77). Wiele białek wydzielanych przez system GSP stanowi czynniki wirulencji patogenów roślinnych i zwierzęcych (76). Białka homologiczne do systemu sekrecji funkcjonującego w komórkach *Erwinia* opisano także w komórkach bakterii patogenicznych z rodzajów *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Neisseria* oraz *Pseudomonas*. Występowanie tego systemu nie jest ograniczone do patogenów (76).

Pierwszy etap sekrecji polega na eksporcie enzymów do przestrzeni peryplazmatycznej. W przeprowadzonych badaniach dotyczących ekspresji genów, kodujących pektynazy i celulazy, sklonowanych do *E. coli* oraz wydzielania białek enzymatycznych poza komórkę bakteryjną wykazano, że mechanizm sekrecji u bakterii z rodzaju *Erwinia* jest identyczny ze szlakiem wydzielniczym *sec* z *E. coli* (76). Po przemieszczeniu do peryplazmy, cząsteczki pektynaz są poddane różnorodnym zmianom konformacji i wydzielane są na zewnątrz komórki. Stwierdzono, że utworzenie wiązań dwusiarczkowych w strukturze celulazy CelZ z *Ech* znajdującej się w peryplazmie, jest niezbędne do wydzielenia tego białka poza komórkę bakteryjną (78). Rola mostków dwusiarczkowych w opisanym mechanizmie sekrecji została wykazana także w przypadku liaz kwasu poligalakturonowego (79). Ponadto opisano geny z *Ech* (*dsbA* i *dsbC*) kodujące enzymy o aktywności izomerazy dwusiarczkowej uczestniczące zarówno w tworzeniu wiązań dwusiarczkowych jak i fałdowaniu białka w peryplazmie (79). Mutacje w genach *dsbA* i *dsbC* uniemożliwiają wydzielanie głównych liaz kwasu poligalakturonowego na zewnątrz komórki bakteryjnej, a co za tym idzie, obniżają patogeniczność bakterii (80).

W drugim etapie wydzielania, enzymy transportowane są przez zewnętrzną błonę do środowiska. Wyizolowano szereg mutantów różnych patogenów *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *X. campestris* niezdolnych do tego etapu sekrecji (77,81). W takich mutantach następuje nagromadzenie pektynaz i celulaz, w przestrzeni peryplazmatycznej. Ze względu na to, że egzoenzymy nie wydostają się poza komórkę bakteryjną mutanty te określono mianem mutantów *Out<sup>-</sup>*. W przypadku szczepów *Out<sup>-</sup>* obserwuje się znacznie obniżoną patogeniczność (82).

System *Out* u bakterii z gatunku *Ech* obejmuje przynajmniej 15 genów zgrupowanych w 5 jednostek transkrypcyjnych: *outS*, *outB*, *outT*, *outCDEFGHIJKLM* i *outO*. Natomiast u bakterii z gatunku *Ecc* system ten obejmuje 13 genów *out*. W genomie *Ecc* nie stwierdzono obecności odpowiedników genów *outB*, *outS*, *outT*, natomiast występuje gen *outN* nieobecny u *Ech* (77). Na podstawie

analizy sekwencji aminokwasowej białek Out wykazano, że są one homologiczne do białek tworzących systemy sekrecyjne bakterii patogennych z rodzajów *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Aeromonas* i *Vibrio* (81). Większość białek Out *Ech* i *Ecc* związanych z wewnętrzną błoną komórkową uczestniczy prawdopodobnie w procesach fałdowania wydzielanych białek jako białka pomocnicze (*chaperones proteins*) lub w tworzeniu struktur systemu wydzielniczego. Dotychczas nie określono dokładnej roli poszczególnych białek Out w sekrecji enzymów na zewnątrz komórki (77).

### 3.4. Ekspresja genów pektynaz w tkance roślinnej

W badaniach nad rolą poszczególnych pektynaz w maceracji tkanki roślinnej wykorzystano dwie grupy mutantów *Erwinia*: szczepy z delecją odpowiedniego (-nich) genu (-ów) oraz mutanty zawierające fuzję genów odpowiedzialnych za syntezę pektynaz (geny *pel* i *pemA*) z genem reporterowym *uidA* (GUS). Pierwsze badania nad rolą poszczególnych izoenzymów Pel i Pema w patogenezie bakterii na roślinach sępolii prowadzono z użyciem mutantów *Erwinia chrysanthemi* wykazujących brak pojedynczych izoenzymów Pel (34,35,49). Stwierdzono, że wycięcie grupy genów *pelA*, *pelD*, *pelE* i *pemA* znacząco obniża patogeniczność *E. chrysanthemi* (34). Wykazano także, że rola poszczególnych enzymów w patogenezie zależy od gatunku zainfekowanej rośliny (35).

Skonstruowanie transkrypcyjnych fuzji *pel::uidA* pozwoliło na prześledzenie ekspresji genów *pel* w inokulowanej tkance roślinnej (33,36,83-85). Gen reporterowy *uidA* kodujący  $\beta$ -glukuronidazę nie występuje w tkance roślinnej, dlatego może być zastosowany w badaniach ekspresji genów bakteryjnych *in planta*. W badaniach tych wykazano, że ekspresja genu *pelA* podlega znacznej indukcji w tkance bulw w porównaniu z tkanką łodyg czy liści. W przypadku tych ostatnich obserwowano natomiast znaczną indukcję *pelE* i *pemA*. (36). Wyniki te wskazują na specyficzność poszczególnych enzymów pektynolitycznych względem infekowanej tkanki roślinnej (36,83,84). W ostatnim czasie wykazano znaczącą rolę najpóźniej sklonowanych izoenzymów Pell i PelL we wczesnych etapach infekcji *Ech* na bulwach ziemniaka (85,86).

## 4. Podsumowanie

W ostatnich latach nastąpił znaczny postęp w zakresie poznania mechanizmów patogenezy bakterii z rodzaju *Erwinia*. Z przedstawionego przeglądu literaturowego wynika wyjątkowo złożony system regulacji ekspresji genów warunkujących biosyntezę enzymów pektynolitycznych. Zastosowanie nowych technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwoliło na scharakteryzowanie szeregu regulatorów uczestniczących w procesach indukcji lub hamowania ekspresji genów istotnych w patogenezie bakterii z rodzaju *Erwinia*. Opisany system regulacji ekspresji genów pozwala na niezależną akty-

wagę czynników wirulencji przez różne uwarunkowania środowiskowe i cząsteczki sygnałowe. Ponieważ większość przedstawionych wniosków wyciągnięto na podstawie badań modelowych prowadzonych w warunkach wzrostu bakterii na pożywce syntetycznej, a nie w tkance roślinnej dokładne poznanie i zrozumienie roli poszczególnych genów w patogenie wymaga dalszych badań.

Praca finansowana z projektu KBN 0400/P04/96/10.

## Literatura

1. Dye D. W., (1969), *New Zeland J. Sci.*, 12, 81-97.
2. Perombelon M. C. M., Kelman A., (1980), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 18, 361-387.
3. Łojkowska E., (1992), *Post. Mikrobiol.*, 31, 227-238.
4. Schaad N. W., (1994), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, American Phytopathological Society, Minneapolis, USA.
5. Janse, J. D., Roussen M. A., (1988), *Phytopathology*, 78, 800-808.
6. Perombelon M. C. M., Kelman A., (1987), *Plant Disease*, 71, 283-285.
7. Basham H. G., Bateman D. F., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 249-262.
8. Collmer A., Keen N. T., (1986), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24, 383-409.
9. Kotoujansky A., (1987), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25, 405-430.
10. Barras F., Gijsegem F., Chatterjee A. K., (1994), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 201-234.
11. Shevchik V. E., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1997), *Mol. Microbiol.*, 6, 1285-1301.
12. Baras F., Thurn K. K., Chatterjee A. K., (1986), *FEMS Microbiol. Lett.*, 34, 343.
13. Klement Z., Farkas G. L., Loverkovich L., (1964), *Phytopathology*, 54, 474-477.
14. Alfano J. R., Collmer A., (1996), *The Plant Cell*, 8, 1683-1698.
15. Bauer D., Beer S. V., Collmer A., (1994), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 573-581.
16. Denny T. P., (1995), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 173-197.
17. Jones S., Yu B., Bainton N. J., Birdsall M., Baycroft B. W., Chhabra S. R., Cox A. J. R., Golby P., Reeves P. J., Stephens S., Winson M. K., Salmond G. P. C., Stewart G. S. A. B., Williams P., (1993), *EMBO J.*, 12, 2477-2482.
18. Pirhonen M., Flego D., Heikinheimo R., Palva E. T., (1993), *EMBO J.*, 12, 2467-2476.
19. Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P., (1993), *J. Bacteriol.*, 176, 269-275.
20. Mukherjee A., Cui Y., Liu Y., Chatterjee A., (1996), *Microbiology*, 142, 427-434.
21. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 213-257.
22. Bartling S., Wegener C., Olsen O., (1995), *Microbiology*, 141, 873-881.
23. Tardy F., Nasser W., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1997), *J. Bacteriol.*, 8, 2503-2511.
24. Bertheau Y., Madgidi-Hervan E., Kotoujansky A., Nguyen-The C., Andro T., Coleno A., (1984), *Analyt. Biochem.*, 139, 383-389.
25. Alfano J. R., Ham H. H., Collmer A., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 4553-4556.
26. Łojkowska E., Masclaux C., Boccara M., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1995), *Mol. Microbiol.*, 16, 1183-1195.
27. Pissavin C., Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1996), *J. Bacteriol.*, 24, 7187-7196.
28. Shevchik V. E., Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 7321-7330.
29. Ried J. L., Collmer A., (1988), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1, 32-38.
30. Hinton J. C. D., Sidebotham J. M., Salmond G. P. C., (1989), *Mol. Microbiol.*, 3, 1785-1795.
31. Pirhonen M., Saarilahti H., Palva E. T., (1991), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4, 276-283.
32. Lanham P. G., McIlravey K. I., Perombelon M. C. M., (1991), *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 20-24.
33. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Dominguez H., Baudouy J., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 7807-7818.

34. Boccara M., Diolez A., Rouve M., Kotoujansky A., (1988), *Physiol. Mol. Plant.*, 33, 95-104.
35. Beaulieu C., Boccara M., van Gijsegem F., (1993), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 197-202.
36. Łojkowska E., Dorel C., Reignaul P., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1993), *Mol Plant-Microbe Interact.*, 6, 488-494.
37. Kelemu S., Collmer A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1756-1761.
38. McMillan G. P., Barrett A. M., Perombelon M. C. M., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 175-184.
39. Jafra S., Bielawski K., Łojkowska E., (1998), *J. App. Gen.*, 39a, 167.
40. Pissavin C., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1998), *Bioch. Biophys. Acta*, 1383, 188-196.
41. Henrissat B. S., Heffron S. E., Yoder M. D., Jurnak F., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 963-976.
42. Condemine G., Rober- Baudouy J., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 2191-2202.
43. Chatterjee A., McEvoy J. L., Blasco F., Chaterjee A. K., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 1765-1769.
44. Tsuyumu S., Funakubo T., Chatterjee A. K., (1985), *Physiol. Plant Pathol.*, 27, 119-130.
45. Willis J. W., Engwal J. K., Chatterjee A., K., (1987), *Phytopathology*, 77, 1199-1205.
46. He S. Y., Collmer A., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 4988-4995.
47. Laurent F., Kotoujansky A., Labesse G., Bertheau Y., (1993), *Gene*, 13, 17-25.
48. Shevchik V. E., Condemine G., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1996), *Mol. Microbiol.*, 19, 455-466.
49. Boccara M., Chatain V., (1989), *J. Bacteriol.*, 171, 4085-4087.
50. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Reverchon S., Condemine G., Robert-Baudouy J., (1986), *J. Gen. Microbiol.*, 32, 2099-2106.
51. Reverchon S., Huang Y., Bourson C., Robert-Baudouy J., (1989), *Gene*, 85, 125-134.
52. Weber J., Olsen O., von Wettstein D., (1994), *Abs. VII<sup>th</sup> Sym. ISMPMI*, 320.
53. Bourson C., Favey S., Reverchon S., Robert-Baudouy J., (1993), *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1-9.
54. Sauvage C., Expert D., (1994), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7, 71-77.
55. Meighen E. A., (1991), *Microbiol. Rev.*, 55, 123-142.
56. Salmond G. P. C., Bycroft B. W., Williams P., (1995), *Mol. Microbiol.*, 16, 615-624.
57. Bainton N., Baycroft B. W., Chhabra S. R., Stead P. M., Hill P. J., (1992), *Gene*, 116, 87-91.
58. Palva T. K., Holmstrom K. O., Palva E. T., (1993), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2, 190-196.
59. Nasser W., Bouillant M. L., Salmond G. P. C., Reverchon S., (1998), *Mol. Microbiol.*, 29, 1391-1405.
60. Reverchon S., Bouillant M. L., Salmond G. P.C., Nasser W., (1998), *Mol. Microbiol.*, 29, 1407-1418.
61. Gousebet G., Jebbar M., Bonnassie S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Himdi-Kabbab S., (1995), *Microbiology*, 141, 1408-1412.
62. Perombelon M. C. M., (1991), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, application*, III, 2899-2921, Eds. Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Scheifer K. J., Springer-Verlag, Berlin.
63. Śledź W., Mcmillan G., Perombelon M. C. M., Łojkowska E., (1995), *Biotechnologia*, 4 (31), suplement, 112.
64. Collmer A., Bateman D. F., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 3920-3024.
65. Condemine G., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Baudouy J., (1986), *J. Bacteriol.*, 169, 937-941.
66. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 1223-1231.
67. Reverchon S., Nasser W., Robert-Baudouy J., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 2203-2216.
68. Reverchon S., Nasser W., Robert-Baudouy J., (1994), *Mol. Microbiol.*, 11, 1127-1139.
69. Surgey N., Robert-Baudouy J., Condemine G., (1996), *J. Bacteriol.*, 6, 1593-1599.

70. Castillo A., Reverchon S., (1997), *J. Bacteriol.*, 15, 4909-4918.
71. Condemine G., Robert-Baudouy J., (1987), *FEMS Microbiol. Lett.*, 42, 39-46.
72. Nasser W., Reverchon S., Robert-Baudouy J., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 257-265.
73. Nasser W., Reverchon S., Condemine G., Baudouy J., (1994), *J. Mol. Biol.*, 236, 427-440.
74. Praillet T., Nasser W., Baudouy J., Reverchon S., (1996), *Mol. Microbiol.*, 20, 391-402.
75. Leigh J. A., Coplin D. L., (1992), *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 307-346.
76. Pugsley A. P., (1993), *Microbiol. Rev.*, 57, 50-108.
77. Salmund G. P. C., (1994), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 181-200.
78. Bortoli-German I., Py B., Chippaux M., Barras F., (1994), *Mol. Microbiol.*, 11, 545-553.
79. Shevchik V. E., Condemine G., Robert-Baudouy J., (1994), *EMBO J.*, 13, 2007-2012.
80. Shevchik V. E., Bortoli-German I., Robert Baudouy J., Robinet S., Barras F., Condemine G., (1995), *Mol. Microbiol.*, 16, 745-763.
81. Salmund G. P. C., Reeves P. J., (1993), *TIBS*, 18, 7-12.
82. Condemine G., Dorel C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 3199-3212.
83. Dorel C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., Łojkowska E., (1996), *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 511-517.
84. Masclaux C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Expert D., (1996), *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 3, 198-205.
85. Jafra S., Figura I., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Łojkowska E., (1997), *Developments in Plant Pathology „Diagnosis and Identification of Plant Pathogenes”*, 511-514, Kulwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
86. Jafra S., Figura I., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Łojkowska E., *Mol. Plant-Microbe Interact.* (złożone do druku).

## Characteristics and regulation of the expression of genes coding *Erwinia* pectinases and its significance for soft rot disease

### Summary

The enterobacterium *Erwinia* causes soft rot disease in various plants. *Erwinia* pathogenicity results from the secretion of pectinolytic and cellulolytic enzymes responsible for the deterioration of the plant cell wall. It produces pectin methylesterases, several pectate lyases, polygalacturonase, pectin lyase, cellulases and hemicellulase. Regulation of pectinases genes requires several regulatory systems. Deletion of the major pectate lyase genes from *Erwinia* genome failed to totally eliminate tissue maceration. Structural genes for secondary pectate lyase were cloned and sequenced. The important role of the secondary *pelL* gene in the development of infection was demonstrated.

### Key words:

liazy kwasu poligalakturonowego, pektynazy, patogeny roślin, *Erwinia*.

### Adres do korespondencji

Ewa Łojkowska, Pracownia Fitopatologii, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i AMG, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, e-mail: lojkowsk@biotech.univ.gda.pl