

Tartu Ülikool
Bioloogia-geograafia teaduskond
Molekulaar- ja rakubioloogia instituut
Geneetika õppetool

Hedi Laursoo

Taimepatogeenile *Erwinia carotovora subsp. carotovora*
spetsiifilise mikrokiibi väljatöötamine

Magistritöö

Juhendajad: Andres Mäe, Ph.D.
Viia Kõiv

Tartu 2005

Lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE.	6
1.1. Geeniekspressiooni mikrokiibid.....	6
1.2. Märklaudjärjestused.....	7
1.2.1. Oligonukleotiidsed mikrokiibid.....	8
1.2.2. PCR-fragmentidega mikrokiibid	8
1.2.3. Oligonukleotiidne vs PCR-fragmentidega mikrokiip	9
1.3. Proovi ettevalmistamine eukariootides	10
1.3.1. Pöördtranskriptsiooni praimerid	10
1.3.2. Märgistamine	10
1.4. Proovi ettevalmistamine prokariootides.....	11
1.4.1. Pöördtranskriptsiooni praimerid	11
1.4.2. Märgistamine	12
1.5. Andmetöötlus	14
1.6. <i>Erwinia carotovora</i> alaml. <i>carotovora</i>	16
1.7. Virulentsusfaktorid	17
1.8. Virulentsuse regulatsioon.....	19
1.8.1. HSL-vahendatud regulatsioonisüsteem.....	20
1.8.2. Rsm-vahendatud regulatsioonisüsteem.....	21
1.9. Mitut kvoorum sensing süsteemi omavad bakterid	22
1.10. Kvoorum sensingu analüüs mikrokiibil	24
1.10.1. Kvoorum sensing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 's.....	24
1.10.2. Kasvufaasi ja keskkonna mõju kvoorum sensingu regulatsioonile	25
1.10.3. Kvoorum sensing <i>Escherichia coli</i> 's	26
1.11. <i>Erwinia chrysanthemi</i> geenide ekspressioonianalüüs mikrokiibil	26
1.12. Töö eesmärk	27
2. MATERJAL JA METOODIKA	28
2.1. <i>Erwinia carotovora</i> alaml. <i>carotovora</i> tüvele SCC3193 vastava mikrokiibi valmistamine	28
2.1.1. Märklaudjärjestuste leidmine	28
2.1.2. Märklaudjärjestuste ettevalmistamine.....	29
2.1.3. Kontrolljärjestuste ettevalmistamine.....	30
2.1.4. Märklaudjärjestuste kandmine mikrokiibile.....	31
2.2. Proovi ettevalmistamine.....	31
2.2.1. Tüved ja kasvatamine.....	31
2.2.2. Proovide korjamine ja RNA eraldamine	31
2.2.3. cDNA süntees	32
2.2.4. cDNA märgistamine fluorestseeruva värviga	33
2.3. Proovide hübridisatsioon mikrokiibile.....	33
2.4. Mikrokiipide skaneerimine ja andmetöötlus.....	34
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	37
3.1. <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	37
3.2. Märklaudjärjestuste leidmine	38
3.3. Mikrokiibi väljatöötamine.....	38

3.4. Kasutatud tüved ja tingimused	40
3.5. <i>Ecc</i> geeniekspressioon mikrokiibil.....	42
3.5.1. Diferentsiaalne ekspressioon ajas	43
3.5.2. PGA mõju diferentsiaalsele ekspressioonile	46
3.5.3. Diferentsiaalne ekspressioon HSL ⁻ mutandis võrreldes metsiktüvega.....	48
Kokkuvõte	51
Summary	52
 Tänuõnad	 53
Lisad	54
KASUTATUD KIRJANDUS	59

Lühendid

aa-dUTP	5-(3-aminoallüül)-2'-desoküüridiin 5'-trifosfaat
AI	autoinduktor
AHL	3-oxo-C12-homoseriinlaktoon
Amp	ampitsilliin
aRNA	amplifitseeritud RNA
bp	aluspaari
cDNA	koopia DNA (copy DNA)
Cel	tsellulaas
Cm	klooramfenikool
CMC	karboksümetüülselluloos
Cy3	tsüaniinvärv 3
Cy5	tsüaniinvärv 5
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DTT	ditiotreitool
<i>Ecc</i>	<i>Erwinia carotovora</i> aml. <i>carotovora</i>
EDTA	dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat
GDP	Genoomsel järjestusel baseeruvad praimerid (genome directed primers)
FITC	fluorestiin-isotiotsüanaat
HSL	N-atsüül homoseriinlaktoon
IPTG	isopropüültkio-β-D-galaktosiid
Km	kanamütsiin
OHHL	N-(3-oxohexanoyl)-L-homoseriinlaktooni
OOHL	N-(3-oksooktanüül)-L-homoseriinlaktoon
PCR	polümeraasi ahelrektsioon
Peh	polügalakturonaas
Pel	pektaatlüaas
PGA	polügalakturoonhape
Pme	pektiinmetüülesteras
Prt	proteas
RT-PCR	reaalaja-PCR
SDS	naatrium-dodetsüülsulfaat
SSC	standartne naatriumtsitraadi puhver (<i>saline sodium citrate</i>)
Tris	trisaminometüülhüdrosümetaan

Sissejuhatus

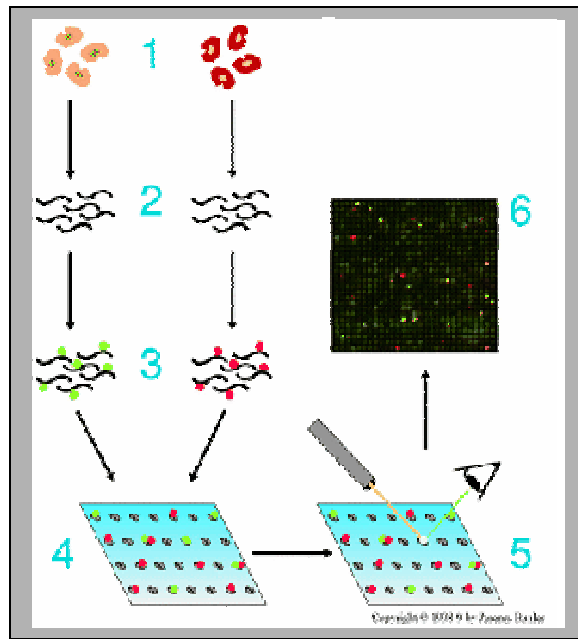
Vaatamata mikrokiipide ulatuslikule kasutuselevõtule geeniekspressiooni uurimisel erinevates organismides, ei ole varem nimetatud meetodit kasutatud *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) puhul. *Ecc* on taimedel märgmädanikku põhjustav patogeen, kelle peamiseks virulentsusfaktoriteks on taimeraku seinu lagundavad ekstratsellulaarsed ensüümid. Viimastel aastatel on avastatud märkimisväärne hulk uusi ekstratsellulaarsete ensüümide regulaatoreid, mis moodustavad omavahel keeruka võrgustiku ning tihti pole teada, milliseid teid mööda jõuab mõju virulentsusfaktoriteni. Mikrokiibi kasutamine võimaldaks anda ülevaate geenide üles- või allaekspressioonist erinevates tingimustes ning seostada seda nende rolliga patogeneesis.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Geeniekspressiooni mikrokiibid

Genoomiuuringutes on üha suurem roll mikrokiibi tehnoloogial, mis võimaldab ühele slaidile paigutada tuhandeid erinevaid DNA fragmente - oligonukleotiide või PCR fragmente. Sel viisil on võimalik jälgida näiteks geenide ekspressioonitaset, olulisteks kasutusaladeks on ka võrdlev genoomika ja genotüpiseerimine (Case-Green jt., 1998; Lander, 1999; Ferea ja Brown 1999).

Geeniekspressiooni mõõtmiseks hübridiseeritakse slaidile cDNA või RNA, mis on fluorestseeruvalt märgistatud, cDNA saadakse mRNA-st pöördtranskriptsiooni abil (Harrington jt., 2000). Klaasile immobiliseeritud DNA püüab kinni märgistatud komplementaarse cDNA/RNA ning iga spoti fluorestsentsi intensiivsus peegeldab sellele vastava geeni ekspressiooni aktiivsust (Sherlock 2000). Saadud informatsiooni kasutatakse ravimite märklaudade identifitseerimiseks, tundmatutele geenidele funktsiooni andmiseks, erinevatele stiimulitele vastavate geeniekspressiooni profiilide uurimiseks ning suures plaanis ka rakuliste protsesside paremaks tundma õppimiseks (Harrington jt., 2000). Kuna sellisel moel mõõdetakse tuhandete geenide ekspressiooni üheaegselt, luues suuri andmebaase uue informatsiooniga, on kõige kriitilisemateks aspektideks uue tehnoloogia juures tõenäoliselt õige tingimuste valik ning usaldusväärne andmete töötlemine (Sherlock 2000).



Joonis 1. Võrdlev hübridisatsiooniekspriiment kasutades mikrokiibi tehnoloogiat: 1. Kontroll- ja uuritav rakukultuur 2. mRNA eraldamine mõlemast rakukultuurist 3. mRNA või sellelt sünteesitud cDNA märgistamine erinevate fluorestseeruvate värvidega 4. mRNA hübridiseerimine mikrokiibile 5. Signaalide detekteerimine laseri abil 6. Geeniekspressiooni aktiivsust peegeldavad erineva tugevusega fluorestseeruvad spotid (Peer Itsik, www.math.tau.ac.il/~rshamir).

Mikrokiipide kiire areng ning laialdane kasutuselevõtt on tekitanud kahtlusi, et selline genoomiuuringute põhine uurimistöö viib mitte-hüpoteesipõhise teaduse juurdumisele. Samas võimaldab funktsionaalne genoomika luua seoseid siiani teadmata funktsiooniga geenide vahel ning tekitada/luua seeläbi hüpoteese, mida kontrollitakse siiski juba traditsiooniliste molekulaarbioloogia ning biokeemia meetoditega (Hughes jt., 2000). FUN-geenide (FUN – function unknown) funktsiooni leidmiseks on vaja tõenäoliselt nii funktsionaalse genoomika tehnoloogiaid kui loomingulisi eksperimente (Lucchini jt., 2001).

1.2. Märklaujärjestused

Kuigi praegusel hetkel kasutatakse mikrokiipidel märklaujärjestusena kõige rohkem nukleiinhappeid, on põhimõtteliselt võimalik mikrokiipe konstrueerida peaaegu igasugustest huvipakkuvatest molekulidest: antikehadest, ensüümidest, süsivesikutest, lipiididest, rakuekstraktist ja intaktsest rakust.

Geeni ekspressiooni profiili vaatlevatel DNA-mikrokiipidel kasutatakse kahte tüüpi nukleiinhappeid: oligonukleotiide ja PCR-fragmente (Schena, 2003).

1.2.1. Oligonukleotiidsed mikrokiibid

Oligonukleotiidseid märklaudu võib sünteesida mikrokiibi pinnal *in situ* või sünteesida eraldi ning kinnitada seejärel mikrokiibile (Schena, 2003). Kuna oligonukleotiidid on lühikesed (tavaliselt 5-25 nt, max. 120 nt), on neid võimalik disainida geeni unikaalsest piirkonnast. See vähendab risthübridisatsiooni tõenäosust geeniperekonna sarnase järjestusega geenide vahel ja tagab seega kõrge spetsiifilisuse. Niisiis eeldab oligonukleotiid-mikrokiibi kasutamine vaadeldava organismi nukleotiidse järjestuse olemasolu, samas kui PCR-fragmente saab sünteesida ka tundmatust järjestusest, kasutades eelnevalt tehtud raamatukogu või juhuslikke heksameerseid praimereid (Harrington jt., 2000).

Enamasti on iga geen mikrokiibil esindatud 15-20 erineva 25-mer üheaahelaliste oligonukleotiidide spotina, mis toimivad unikaalse, järjestusspetsiifilise detektorina (perfect match, PM). Kontrollilemendina kasutatakse oligonukleotiide, mis on identsed PM analoogidele, v.a. üks kesksel positsioonil olev nukleotiid. Seeläbi on võimalik hinnata risthübridisatsiooni ja lokaalset taustsignaali, mis lahutatakse PM signaalist maha (Lockhart jt., 1996).

Geeniekspressiooni analüüsiks kasutatakse pikemaid oligonukleotiide (50-70 nt). Seeläbi on võimalik kasutada kõrgemat hübridisatsiooni temperatuuri, mis võimaldab lahti sulatada ka võimalikud märklaudjärjestuse sekundaarstruktuurid ning suurendab reaktsiooni spetsiifilisust. Pikad oligonukleotiidid sünteesitakse tavaliselt *sense* ahelalt, v.a. juhul kui *sense*-ahelalt ei sünteesita just märklauale hübridiseeritavat proovi, nagu näiteks amplifitseeritud RNA (aRNA) puhul. Mikrokiibile tuleks kanda ka negatiivne kontroll, milleks sobib hästi järjestus mõnest heteroloogsest organismist (näiteks *Arabidopsis*). Oligonukleotiidi pikkus ja koostis valitakse selline, mis ei nõua ekstreemseid hübridisatsiooni temperatuure (Schena 2003).

1.2.2. PCR-fragmentidega mikrokiibid

PCR-i abil on võimalik suhteliselt kerge vaevaga üles amplifitseerida suuri koguseid geneetilist materjali kõikvõimalikest organismidest, mis teeb antud meetodi mikrokiibi valmistamisel lihtsamaks. Mikrokiibil on iga geen enamasti esindatud

ühe, mitusada nukleotiidi pika DNA fragmentide spotina (Harrington jt., 2000). Genoomse materjali amplifitseerimiseks kasutatakse geenspetsiifilisi ja juhuslikke praimereid, raamatukogu amplifitseerimise korral ka ühte universaalset praimerite paari (Schena, 2003).

Kombineeritud kahe-etapilise PCR-i puhul kasutatakse nii geen-spetsiifilisi kui universaalseid praimereid. Esimese etapi PCR tehakse otse genoomselt DNA-lt kusjuures kasutatakse kimäärseid praimereid, mis sisaldavad nii universaalset (5') kui järjestusspetsiifilist (3') osa. Teisel etapil on templiks esimese etapi PCR-i produkt ning tänu universaalsele järjestusele esimese etapi praimerites, saab nüüd kõigi geenide puhul kasutada ühte universaalset praimerite paari. Antud meetodil on mitu eelist: esiteks vähendab teise etapi kasutamine genoomse DNA kontaminatsiooni tõenäosust märklaudjärjestuse hulgas. Ning teiseks, kuna PCR-i teise etapi tingimused on optimeeritud ja kõigi geenide jaoks ühesugused, võimaldab see sünteesida erinevate geenide produkte võrreldavas koguses. Nende geenide PCR-i produktid, mille saagikus peale esimest etappi oli väike, on peale teist etappi ülejäänutega võrreldavad (Postier jt., 2003).

Juhuslike praimeritega saab amplifitseerida fragmente nii DNA-lt kui mRNA-lt, viimase korral pöördtranskriptsiooni abil. Pöördtranskriptsiooni produktiks on üheahelaline cDNA, mida ei tule erinevalt 2-ahelalisest PCR-i produktist enne hübridisatsiooni denatureerida. Seega puudub ka nende renaturatsiooni oht ning see on antud meetodi juures kindlasti eeliseks.

PCR-i fragmentide pikkus (100-5000 bp) peaks olema küllaldane, et garanteerida hübridisatsiooni spetsiifilisus. Küll aga jääb risthübridisatsiooni oht, kui mikrokiibil vaadeldakse muuhulgas ka kõrgelt konserveerunud geeniperekondi, mille geenid omavad märkimisväärset identsust (>70% 1000 nt kohta) (Schena, 2003).

1.2.3. Oligonukleotiidne vs PCR-fragmentidega mikrokiip

Hindamaks oligonukleotiidse ja cDNA mikrokiibi täpsust geeniekspressiooni mõõtmisel, viisid Yuen jt. läbi paralleelsed katsed pärmi mRNA-ga, kasutades kontrollreaktsioonina kvantitatiivset reaaljaja PCR-i. Nimetatud katsete tulemusena selgus, et mõlema mikrokiibiga saadud diferentsiaalne ekspressioon on alahinnatud, ainult et cDNA mikrokiibil on viga ennustatav ja enamasti ka Yuen'i jt. poolt välja töötatud kalibratsioonikonstandi abil vähendatav. Oligonukleotiidsel kiibil oli aga

kalibratsioon ebausaldusväärne. Mõlema meetodi abil on siiski võimalik diferentsiaalset geeniekspressiooni identifitseerida (Yuen jt., 2002).

1.3. Proovi ettevalmistamine eukarüootides

Üks tähtsamaid ja vastutusrikkamaid etappe geeniekspressiooni mikrokiibi kasutamise juures on kindlasti märkega proovi ettevalmistamine. Kogu protsess RNA eraldamisest kuni märkega proovi (cDNA või RNA) hübridisatsioonini hõlmab mitmeid etappe ning väikegi kõrvalekalle igas etapis võib viia ebaõigetele või raskesti seletatavale tulemusele (Lucchini jt., 2001).

Kasutatakse cDNA otsest ja kaudset märgistamist ning RNA märgistamist. Geeniekspressiooni mikrokiipide juures on enim kasutust leidnud fluorestseeruvad märged (põhiliselt küll tsüaniin e. Cy), mis inkorporeeritakse proovi tavaliselt pöördtranskriptsiooni reaktsiooni abil või siis RNA otsesel märgistamisel (Schen 2003).

1.3.1. Pöördtranskriptsiooni praimerid

Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni praimeritena on eukarüootide korral mugav kasutada oligo-dT primereid, mis kleepuvad mRNA polü-A sabale, pöördtranskribeerides seega spetsiifiliselt vaid mRNA-d. Samas kasutatakse edukalt ka juhuslikke heksameerseid primereid.

1.3.2. Märgistamine

cDNA otsesel märgistamisel lisatakse pöördtranskriptsiooni reaktsiooni modifitseeritud oligonukleotiide nagu Cy-3-dCTP või Cy-5-dCTP. Reaktsiooni lõppedes degradeeritakse templiks olnud RNA naatriumhüdrokksiidi abil ning märkega cDNA puhastatakse ja hübridiseeritakse mikrokiibile (Eisen ja Brown, 1999; Tseng jt., 2001). Otsemärgimise adaptatsioonina on välja töötatud meetod, kus esimeses etapis inkorporeeritakse pöördtranskriptsiooni teel cDNA-sse modifitseeritud nukleotiid aminoallüül-dUTP, mis järgnevas värvimise etapis reageerib fluorestseeruva värvi molekuliga, tsüaniiniga. Seejärel märkega cDNA puhastatakse ja hübridiseeritakse mikrokiibile (Postier jt., 2003).

cDNA otseseks märgistamiseks kasutatakse ka fluorestseeruva mäkega konjugeeritud juhuslikke heksameerseid praimereid, pöördtranskriptsiooni teel saadakse siis mäkega proov (Yue jt., 2001).

cDNA kaudsel märgistamisel kasutatakse samuti pöördtranskriptsiooni, kuid mäke inkorporeeritakse cDNA-sse linkermolekuli abil, milleks võib olla näiteks biotiin. Pöördtranskriptsioonil inkorporeeritakse cDNA-sse linkermolekuliga modifitseeritud nukleotiid, näiteks biotiin-ddUTP. Seejärel cDNA puhastatakse, hübridiseeritakse mikrokiibile ning märgistatakse fluorestseeruva värviga, mille molekulid on võimelised reageerima biotiiniga (Scheno, 2003).

Välja on töötatud ka RNA märgistamise protokoll(e), mille kohaselt seotakse fluorestseeruv mäke RNA-sse linkermolekuli e. biotiini abil. Antud lähenemine ei kasuta pöördtranskriptsiooni ning produktiks on seega mäkega RNA (Affimetrix; Rosenow jt., 2001). RNA märkimine ilma vahepealse cDNA sünteesi etapita nõuab küll vähem aega, kuna aga RNA on palju vastuvõtlikum keemilisele ja ensümaatilisele degradatsioonile, on mugavam töötada cDNA-ga (Postier jt., 2003).

1.4. Proovi ettevalmistamine prokarüootides

Bakteriaalse RNA märgistamise juures kehtivad samad põhitõed mis eukarüootide puhul, kuid sealjuures on ka mõningaid olulisi erinevusi: esiteks on prokarüootide mRNA tunduvalt ebastabiilsem kui eukarüootne, näiteks mõne *Escherichia coli* mRNA eluiga võib olla lühem kui 30 sekundit. Teiseks pole bakteriaalne mRNA polüadenüleeritud, mis tähendab seda, et cDNA tuleb sünteesida totaalsest RNA-st või kasutada RNA otsemärgimist (Carpousis jt., 1999; De Saizieu jt., 1998).

1.4.1. Pöördtranskriptsiooni praimerid

Bakteriaalse pöördtranskriptsiooni puhul peetakse kõige paremini toimivateks juhuslikke heksameerseid praimereid. Kasutatakse ka praimerite kogumit, milles on igale mRNA 3' otsale spetsiifiline praimer, aga sellise pöördtranskriptsiooni tulemusel on umbes 30% cDNA-dest esindatud tunduvalt väiksemal määral, kui heksameersete praimeritega tehtud reaktsioonid. Põhjuseks võib olla mRNA ebastabiilsus, kuna seda hakatakse lagundama transkripti 3' otsast, aga ka praimerite erinev võime mRNA-le kleepuda (Arfin jt., 2000).

Talaat jt. on töötanud välja arvutiprogrammil põhineva algoritmi, mille abil saab kindlaks teha minimaalse oligonukleotiidide arvu, mis kleepuksid spetsiifiliselt kõigile teatud organismi geenidele (genome directed primers e. GDP). Kogu *Mycobacterium tuberculosis*'e genoomi amplifitseerimiseks läheb vaja vaid 37 oligonukleotiidi. Võrreldes juhuslike praimeritega amplifitseeritud prooviga, olid GDP-prooviga saadud tulemused tundlikumad ning spetsiifilisemad, eriti juhul, kui mükobakteriaalse RNA sekka oli segatud imetaja RNA-d. Seega oleksid GDP-d eriti kasulikud, kui soovitakse hinnata geeniekspressiooni patogeeni infektsioonil *in vivo*, kus on võimalik kasutada piiratud hulka bakteriaalset mRNA-d peremehe RNA juuresolekul (Talaat jt., 2000).

1.4.2. Märgistamine

Esimeses avaldatud artiklis, kus vaadeldi bakteriaalset geeniekspressiooni kõrge tihedusega oligonukleotiididel mikrokiibil, näitasid De Saizieu jt., et rRNA juuresolek ei takista geeni transkriptide detekteerimist, kasutades selleks RNA otsemärgimise meetodit (De Saizieu jt., 1998). Siiski inkorporeeritakse enamus märkest rRNA-sse ning tRNA-sse, kuna just neist koosneb totaalne RNA 95-97% ulatuses (Rosenow jt., 2001).

Rosenow jt. (2001) töötasid ka bakterite jaoks välja mRNA rikastamise protokollid ning võrdlesid RNA otsemärgimist ja märgitud cDNA hübridiseerimist saadud tulemusi. Mõlemal juhul vaadeldi IPTG mõju *Escherichia coli* geenide ekspressioonile, kasutades selleks oligonukleotiid-mikrokiipe.

mRNA rikastamiseks sünteesiti pöördtranskriptsioonil komplementaarne cDNA 16S ja 23S rRNA-le, kasutades selleks vastavatele rRNA-dele spetsiifiliste praimerite kogumit. Tänu cDNA sünteesile sai võimalikuks 16S ja 23S rRNA spetsiifiline degradatsioon RNAasH-ga ning seejärel lagundati DNAasI abil ka cDNA ning oligonukleotiidid. Tulemusena saadi 80% võrra rikastatud mRNA. Rikastatud mRNA-le rakendati otsemärgimist, samal ajal kui cDNA sünteesiks kasutati totaalset RNA-d. Mõlemal juhul kasutati märgistamiseks fükoeütriini, mis inkorporeeriti proovi biotiini ning streptavidiini abil.

Katsed näitasid, et mõlema meetodiga saadud tulemused olid korduskatsetel reprodutseeritavad. Samuti tehti kumbagi meetodi abil kindlaks sama geenide grupp, mis IPTG mõjul diferentsiaalselt ekspresseerusid. Kuid ebakõla tekkis kahe meetodi vahel siis, kui hakati mõõtma iga geeni diferentsiaalse ekspressiooni (DE) suurst

kordades. Ühel kolmandikul kõigist vaadeldavatest geenidest erines kahe meetodiga saadud DE rohkem kui kaks korda. Sellise ebakõla tekkele võisid kaasa aidata mitmed tegurid, näiteks: 1) RNA ja DNA molekulide erinev hübridisatsioonikineetika 2) erinevad märkimisprotokollid 3) cDNA sünteesil tekkiv viga, mis tuleneb juhuslike heksameersete praimerite hübridisatsioonist märklauale 4) rikastatud mRNA-sse jäänud rRNA ebaspetsiifiline hübridiseerumine kiibile. Rosenow jt. töös näidati, et kui märkimiseks kasutati totaalset RNA-d, suurenes tõepoolest ebaspetsiifiline hübridisatsioon. Tulemused ei paranenud aga ka juhul, kui cDNA sünteesi templina kasutati totaalse RNA asemel rikastatud mRNA-d.

Küsimusele, kumba meetodit eelistada, pole aga ühest vastust leitud. Ühest küljest tundub usaldusväärsem RNA otsene märkimine, kuna cDNA sünteesil jääb alati võimalus, et juhuslikud praimerid omavad märklaual teatud hot-spote, eri reaktsioonidesse sattuvad eri praimerite populatsioonid või on pikemad mRNA-d võrreldes lühikestega proovis suuremal määral esindatud. Teisest küljest on RNA-d raskem käsitseda kui DNA-d ning ka rikastatud mRNA hübridisatsioonil jääb alati rRNA ebaspetsiifilise hübridisatsiooni oht. Kahe erineva meetodi võrdlus viitab sellele, et erinevates katsetes oleks mõistlik kasutada järjekindlalt ühte ja sama proovi märgistamise protokoll, et tulemused oleks omavahel võrreldavad. Eriti tähtsaks muutub see juhul, kui hakatakse moodustama geeniekspressiooni raamatukogusid, kuhu tulevad andmed erinevatelt laboratooriumitelt (Rosenow jt., 2001).

1.4.2.1. Cy3 ja Cy5 värvide kasutamine ekspressioonianalüüsis

Kiibile hübridiseeritavate proovide märgistamiseks on välja töötatud erinevaid hästi toimivaid fluorestseeruvaid värve: FITC baasil Alexa, Lissamiin; tsüaniinid Cy3/Cy5 ja indokarbotsüaniinid C3 ja C5, lisaks neile veel seeria BODIPY värve (Scheno 2003).

Kõige sagedamini kasutatakse proovi märgistamiseks Cy5 ja Cy3 värve, mis fluorestseeruvad erinevatel lainepikkustel. Nimetatud värvid on suhteliselt ebastabiilsed, s.t. nad lagunevad valguse käes, lisaks sellele võivad nad teoreetiliselt inkorporeeruda proovi erineva efektiivsusega, fluorestseeruda erineva intensiivsusega ning olla skänneri poolt erineva efektiivsusega detekteeritud (Tseng jt., 2001).

Teisest küljest annab Cy5/Cy3 kasutamine võimaluse kanda ühele mikrokiibile kaks proovi, hõlbustades seega reprodutseeritavate tulemuste saamist kahe proovi geeniekspressiooni võrdlusel. Tulemuste analüüsil langevad ära erinevate

mikrokiipide kasutamisest või hübriidsatsioonist tekkivad vead. Praktika näitab, et Cy3 ja Cy5 võivad tõesti inkorporeeruda teatud järjestustesse erineva efektiivsusega. Yu jt. näitasid, et nii otsesel kui aa-dUTP kaudu cDNA märgistamisel inkorporeerus Cy5 proovi efektiivsemalt kui Cy3 (Yu jt., 2002). Kuid võrreldes kõigi teiste variatsioonide allikatega mikrokiibi tehnoloogia juures on sel võrdlemise vähe tähtsust, lisaks sellele on võimalik kahe värvi kasutamisest tulenevat viga kontrollida nn. värvivahetuse (dye-swapping) abil, s.t. üks proov ja kontroll jagatakse kaheks, ühel juhul värvitakse proov Cy3-ga ja kontroll Cy5-ga, teisel juhul vastupidi (Tseng jt., 2001).

1.5. Andmetöötlus

Mikrokiibi tehnoloogia abil toodetav andmeformaad koosneb tavaliselt hulgest geenidest ning neile vastavatest väärtustest, mis peegeldavad vastava geeni suhtelist RNA-transkriptide taset rakus. Kogu prokarüoodi genoomi hõlmavalt mikrokiibilt saadakse iga eksperimendiga tuhandeid ja kümneid tuhandeid andmepunkte, mistõttu on mõtestatud tulemuse saamise eelduseks ka andmete normaliseerimine, filtreerimine ning ekspressioonimustrite otsimine ja geenide grupeerimine (Harrington jt., 2000).

Andmete normaliseerimist ühe eksperimendi piires kasutatakse selleks, et eristada tõelist, bioloogilist tähendust omavat RNA-taseme muutust juhuslikust müra või mittespetsiifilisest eksperimentaalsest varieeruvusest (Harrington jt., 2000). Andmete normaliseerimisega tasandatakse erinevaid eksperimentaalseid kõrvalekaldeid, milleks võivad olla näiteks erinev hulk algmaterjalina kasutatud RNA-d, erinevused märgistamise või fluorestsentsintensiivsuste detekteerimise efektiivsuses ning mikrokiipide kvaliteedis. Normaliseerimise abil ühtlustatakse tulemused üle ühe mikrokiibi või üle erinevate mikrokiipide, muutes need seeläbi omavahel võrreldavaks ja kõrvaldades mitte-bioloogilistel põhjustel esinev näiline varieeruvus (Quackenbush 2002).

Normaliseermisel kasutatakse ühe võimalusena mitte-diferentsiaalselt ekspresseeruvaid gene, milleks võivad olla näiteks nn. *housekeeping* geenid. Probleemid ilmnevad aga juhul, kui normaliseerimiseks kasutatavaid gene pole piisavalt palju või kui nende ekspressioonitase ei kata kogu võimalikku geenide

ekspressiooni ulatust. Lisaks võivad ka housekeeping geenid omada teatud loomulikku ekspressiooni varieeruvust (Tseng jt., 2001; Wei jt., 2001). Kasutatud on ka normaliseerimist ühe kiibi intensiivsuste keskväärtuse abil (DeLis jt., 2001; Rosenow jt., 2001).

Kasuks tuleb ka kalibratsioonikatsete tegemine, milles leitud süstemaatilisi vigu saab hiljem kasutada võrdlevate katsete korrigeerimiseks. Näiteks värvitakse identsed proovid nii Cy5 kui Cy3-ga ning hübridiseeritakse seejärel ühele kiibile. Tulemus visualiseeritakse esimeses lähenduses M-A graafikuna, kus X-teljele kantakse $\log(\text{Cy5}) - \log(\text{Cy3})$, Y-teljele aga $[\log(\text{Cy3}) + \log(\text{Cy5})]/2$ (Tseng jt., 2001).

Ühe märklaudjärjestuse kandmine mikrokiibile mitme spotina annab võimaluse filtreerida ning jätta edasisest andmetöötlusest välja kontamineerunud või halva kvaliteediga spotte, suurendades seega geenile vastava väärtuse usaldusväärsust. Juhul, kui kontamineerunud on aga kõik ühele geenile vastavad spotid, eemaldatakse edasisest protsessist kogu geen (Tseng jt., 2001). Kõrvaldatakse ka geene, mille ekspressioonitase jääb allapoole eksperimentaatori poolt määratud läviväärtust või geene, mille ekspressioonitase katse tingimustes ei muutunud (Harrington jt., 2000). Ühe võimalusena määratakse igale geenile vastav variatsioonikoefitsient e. CV (coefficient of variation), mis saadakse, jagades standardhälve geeni keskmise ekspressiooni intensiivsusega. CV väärtus on pöördvõrdeline geeniekspressioonile vastava väärtuse kvaliteediga. Läviväärtusest suurema CV-ga spot kõrvaldatakse edasisest analüüsist (Tseng jt., 2001).

Normaliseeritud geeniekspressiooni väärtuste hulgast otsitakse ekspressioonimusterid ja sarnaselt ekspresseeruvate geenide gruppe, mis võimaldavad omistada ekspressiooniprofiilidele bioloogilist tähendust. Kasutatakse erinevaid meetodeid, alustades otsestest suurenenud ja vähenenud ekspressiooniga geenide nimekirjadest, mis on koostatud vastavalt eksperimentaatori poolt määratud läviväärtusele, ning lõpetades *hierarchical clustering* ja *self-organizing map*'ide koostamisega (Harrington jt., 2000). *Hierarchical clustering* meetodit on traditsiooniliselt kasutatud fülogeneetilistes analüüsides ning nimetatud meetod kasutab järk-järgulist sarnaseimate elementide ühendamist (Eisen jt., 1999). *Self-organizing map* meetodi puhul määratakse kogu andmehulga üksikute elementide

kaugus juhuslikult määratud punktidest, mida nimetatakse tsentroidideks (Tamayo jt., 1999; Törönen jt., 1999).

Kuna igas mikrokiibi tehnoloogia etapis esinevad variatiivsused kujutavad hoolimata üha täiustuvast andmetöötlusest ohtu tulemuste usaldusväärsusele, ei saa alahinnata korduskatsete tähtsust (Lucchini jt., 2001; Wei jt., 2001). Eristamaks bioloogilist tähendust omavat diferentsiaalset geeniekspressiooni ja juhuslikku kõikumist, on kindlasti abiks ka ühe eksperimendi raames mõõdetavad mitu ajapunkti (Diehn ja Relman, 2001; Postier jt., 2003). Samuti suurendab tulemuste usaldusväärsust valmistatud mikrokiipidel läbiviidavad kalibratsioonikatsed ning saadud andmete kontroll juba sisse töötatud meetoditega nagu northern blot ning RT-PCR (Tseng jt., 2001; Lucchini jt., 2001; Postier jt., 2003). Lihtsustamaks erinevates laboratooriumides saadud tulemuste võrdlust, saaks kontrollina igas eksperimendis kasutada näiteks uuritava organismi märgistatud genoomset DNA-d (Lucchini jt., 2001; Wei jt., 2001). Ning teades, et näiteks juba väike NaCl konts. muutus söötmes võib oluliselt nihutada ekspresseeruvate geenide koosseisu ja ekspressioonitaset, tuleks igale organismile luua võimalikult looduslähedane kasvukeskkond (Posas jt., 2000; Vasil jt., 2003).

Vaatamata pingutustele andmete normaliseermisel, jäävad madala ekspressiooniga geenid siiski olulisel määral mõjutatuks katsete läbiviimisest tulenevatele variatsioonidele. Wei jt. andmetel pole mikrokiibi tehnoloogia siiski limiteeritud kõrge ekspressioonitasemega geenidega, kuid madalat ekspresseeruvate geenide puhul on olulisem tulemuste hindamine klassikaliste RNA-taset või geeniekspressiooni mõõtvate meetoditega (Wei jt., 2001).

1.6. *Erwinia carotovora* alaml. *carotovora*

Fütopatogeensetest bakteritest on meie kliimas üks levinumaid *Erwinia carotovora* alaml. *carotovora* (*Ecc*), kes tekitab taimedel märgmädanikku. Tegemist on gramnegatiivse fakultatiivse anaeroobiga perekonnast *Enterobacteriaceae*. *Ecc* vajab kasvuks ja paljunemiseks niiskust ning temperatuuri 20-28°C, antud tingimustel on ta levik kiire ja ta on võimeline nakatama erinevaid taimi ning taimeosi nii põllul kui hoidlates (Perombelon ja Kelman, 1980; Agrios 1997). *Ecc* patogeensus on

tihedalt seotud võimega produtseerida ja seejärel sekreteerida keskkonda ekstratsellulaarseid ensüüme e.virulentsusfaktoreid, mis lagundavad taimeraku seina komponente pektiini ja tselluloosi. Erinevalt paljudest teistest fütopatogeenidest nagu näiteks *Pseudomonas syringae*, ei produtseeri *Ecc* toksiine (Agrios 1997).

Ecc poolt nakatavatest taimedest on meile kõige suurema majandusliku tähtsusega kartul. Arvestades asjaolu, et patogeensed erwiniad on laialt levinud, aga kultiveeritavad kartulisordid ei ole resistentsed haiguse suhtes ning puuduvad ka efektiivsed taimekaitsevahendid, ulatub erwiniate poolt tekitatud majanduslik kahju maailmas 100 miljardi dollarini aastas (Agrios 1997). Selleks, et välja töötada efektiivseid patogeeni tõrjevahendeid ja aretada haiguskindlaid taimesorte, on vaja välja selgitada, millised protsessid toimuvad patogeenis peremeestaim-patogeen vahelise interaktsiooni käigus. *Ecc* on selleks sobiv tänu tema kohta kogunenud geneetilistele ja molekulaarbioloogilistele andmetele.

Peremeestaim-patogeen interaktsiooni käigus toimub pidev mõlemapoolne mõjutamine. Selleks, et tagada erinevate virulentsusfaktorite produktsioon õigel ajal ja õiges kohas ning vältida taime kaitsemehhanismide käivitumist infektsiooni varajases staadiumis, peab nende süntees olema väga täpselt reguleeritud. *Ecc*-l on arenenud välja kompleksne regulatoorne süsteem, et tunnetada ümbritsevat keskkonda ning modifitseerida vastavalt sellele virulentsusfaktorite produktsiooni (Pirhonen jt., 1993; Eriksson jt., 1998).

1.7. Virulentsusfaktorid

Ecc peamisteks virulentsusfaktoriteks on ekstratsellulaarsed ensüümid.

Kõige tähtsam rühm ekstratsellulaarseid ensüüme on pektinolüütilised ensüümid. Pektiin on polüsahhariid, mis koosneb galakturoonhappe jääkidest. *Ecc* poolt produtseeritavate pektinolüütiliste ensüümide hulka kuuluvad pektiinmetüülesteras (Pme), pektaatlüaasid (Pel) ja polügalakturonaas (Peh) (Rexova-Benkova ja Markovic 1976). *Ecc* tüves SCC3193 on kirjeldatud nelja erinevat tüüpi pektaatlüaasi - PelA, PelB, PelC ja PelD (Heikinheimo jt., 1995) ja ühte polügalakturonaasi- PehA (Saarilahti jt., 1990).

Pektiinmetüülesteras (Pme) eemaldab pektiini ahelalt metüülrühmad, muutes niimoodi tekkinud pektaadi e. polügalakturoonhappe (PGA) teistele ensüümidele paremini kättesaadavaks. Pektaati on võimeline hüdrolüüsima polügalakturonaas

(Peh) (Plastow 1988). Pektaatlüaasid (Pel) lagundavad pektaati ja mõõdukalt metüleeritud pektiini β -eliminatsiooni abil (Collmer ja Keen 1986; Kotoujansky 1987; Barras jt. 1994).

Antud ensüümidel esinevad nii endo-kui eksovormid. Endovormid lõikavad pektiini ahela keskele, mille tagajärjel tekivad erineva pikkusega oligogalakturniidid, eksovormid aga eemaldavad otsmisi galakturoonhappe jääke. *Ecc* tüvel SCC3193 kirjeldatud pektaatlüaasid kuuluvad endo-ensüümide hulka.

Teise rühma ekstratsellulaarsetest ensüümidest moodustavad tsellulaasid CelV ja CelS, mis lagundavad tselluloosiahelas β -1,4 glükosiidsidemeid (Saarilahti jt., 1990; Mäe jt., 1995). Tselluloos on glükoosi molekulidest koosnev polüsahhariid, milles glükoosi jäägid on seotud β -1,4 glükosiidsidemetega. Kuna patogeen nakatab erinevaid taimi, mille rakuseina ehitus on pisut erinev, siis vajatakse ka erineva substraadispetsiifilisusega ensüüme. *Ecc*-s on küll kindlaks tehtud kaks tsellulaaside sünteesi eest vastutavat geeni: *celV1* ja *celS*, kuid *celS* ekspressiooni rakus pole siiani suudetud näidata. Võimalik, et see geen ekspresseerub ainult kindlates tingimustes (kindlas peremeestaimes) (Mäe jt., 1995).

Kolmandaks ekstratsellulaarsete ensüümide rühmaks on proteaasid, mida on meie poolt uuritavas *Ecc* tüves SCC3193 siiani iseloomustatud üks. Selleks on PrtW, mis lagundab peptiidides aminohappeid ühendavaid peptiidsidemeid (Wandersman jt., 1987; Kyöstiö jt., 1991; Marits jt., 1999). Proteaaside funktsioon patogeneesis on siiani ebaselge, kuigi on näidatud, et Prt⁻ mutandi virulentsus kartulis on vähenenud võrreldes metsiktüvega (Marits jt., 1999). Mõned autorid seostavad patogeenide poolt produtseeritud proteaaside rolli taime kaitsevalkude lagundamisega, kuna *in vitro* katses oli *Ecc* proteaas võimeline lagundama kartuli kaitsevalku lektiini (Heilbronn jt., 1995).

Peamisteks virulentsusfaktoriteks *Ecc*-s on pektinolüütilised ensüümid (Peh, Pel, Pme). Taimekoe matseratsioon on pektinolüütiliste ja tsellulolüütiliste ensüümide koostöö tagajärg. Seega ühe eksoensüümi sünteesi määrava geeni inaktivatsioon, nagu näiteks SCC3193 *celV*⁻ (Mäe jt., 1995), *prtW*⁻ (Marits jt., 1999) või *pelB*⁻ (Heikinheimo jt., 1995) tüvedes, ei anna täiesti avirulentset fenotüüpi. SCC3193-s on

võrreldes metsiktüvega kõige rohkem vähenenud virulentsus just PehA⁻ mutandis (Eriksson jt., 1998).

Erwiniate virulentsusele aitavad kaasa ka liikuvus ning ekstratsellulaarsete polüsahhariidide süntees (Agrios 1997). Viimased ümbritsevad bakterit kapslina ning loovad talle soodsa mikrokeskkonna nii peremeestaimes kui väliskeskkonnas (Coplin ja Cook 1990). Edukas invasioon taime sõltub veel keskkonna temperatuurist, pH-st, osmolaarsusest jne. (Withers jt., 2001, ülevaateartikkel).

1.8. Virulentsuse regulatsioon

Pektiini lagundamisel tekivad erineva pikkusega oligogalakturniidid, mis ühelt poolt on sobivateks süsiniku ja energia allikateks patogeenile, teiselt poolt indutseerivad need aga mitmete taime kaitsevalkude sünteesi. Selleks, et taime kaitsemehhanismid ei käivituks infektsiooni varajases staadiumis, kui patogeeni arvukus taimes on veel väike ja taim suudab patogeeni invasiooni peatada, peab ekstratsellulaarsete ensüümide süntees olema täpselt reguleeritud (Walton jt., 1994; Eriksson jt., 1998; Whitehead jt., 2000, ülevaateartikkel). Kõigi ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioon bakteris sõltub kasvufaasist ja lisaks sellele on see ka reguleeritud globaalsete ning geenspetsiifiliste regulaatorite poolt.

Globaalsed regulaatorid mõjutavad kõigi ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni *Ecc*-s. Globaalseid regulaatoreid võib jagada oma toimemehhanismilt positiivseteks ja negatiivseteks. Globaalsed positiivsed regulaatorid on näiteks ExpI, *rsmB* RNA, ExpS/ExpA (GacS/GacA), AepA, RpfA, negatiivsed aga HexA, KdgR, RsmA, RsmC, RpoS (Liu jt., 1993, 1998; Chatterjee jt., 1995; Frederick jt., 1997; Eriksson jt., 1998; Harris jt., 1998; Mukherjee jt., 1998; Cui jt., 1999; Thomson jt., 1999). Nimetatud regulaatorvalgud on mõjutatud erinevate signaalide poolt. Näiteks üheks oletatavaks signaaliks, mille olemasolul aktiveerib positiivne regulaatorvalk AepA ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi *Ecc*-s, on kas taime normaalse ainevahetuse või pektinolüütiliste ensüümide töö tulemusel tekkinud oligogalakturniidid (Murata jt., 1991; Liu jt., 1993).

Globaalne regulaatorvalk KdgR, mis reguleerib negatiivselt pektinaaside (Peh, Pel), tsellulaaside (Cel) ja proteaasi (Prt) ekspressiooni, on samade

signaalmolekulide-oligogalakuroniidide poolt represseritav (Nasser jt., 1992). KdgR seostub mõjutatavate geenide ees olevale spetsiifilisele konserveerunud järjestusele, KdgR boksile ning represserib antud geenide ekspressiooni. KdgR poolt represseritud geenide ekspressiooni indutseerivad uuesti pektiini laguproduktid, oligogalakuroniidid, mis seonduvad KdgR-ga ning ei lase sellel KdgR boksile seonduda (Hugouvieux-Cotte-Pattat jt., 1996).

Geenspetsiifilisi reguloorseid süsteeme on aga siiani teada ainult üks. Selleks on PehR/PehS kahekomponendiline süsteem, mis kontrollib polügallakturnaasi geeni *pehA* ekspressiooni positiivselt (Flego jt., 2000).

1.8.1. HSL-vahendatud regulatsioonisüsteem

Paljud patogeenid aktiveerivad oma virulentsusega seotud geenide ekspressiooni bakteripopulatsiooni tihedusest sõltuvalt (Withers jt., 2001).

Virulentsusfaktoreid hakatakse tootma alles siis, kui patogeeni arvukus nakatumiskohal on piisavalt suur, et maha suruda taime kaitsereaktsioonid (Jones jt., 1993; Phironen jt., 1993). Rakutihedust tunnetavad nad keskkonnas olevate signaalmolekulide kontsentratsiooni kaudu, kuna signaalmolekule eritab keskkonda iga üksik populatsiooni rakk. Signaalmolekulideks on tavaliselt N-atsüül homoseriinlaktoonid (HSL), mis erinevad üksteisest atsüülahela poolest. Teatava signaalmolekulide kontsentratsiooni saabudes moodustavad signaalmolekulid kompleksi kindla regulaatorvalguga ning kompleks on võimeline aktiveerima vaikivate geenide ekspressiooni. Sellist rakutihedusest sõltuvat geenide ekspressiooni bakterites nimetatakse kvoorum sensinguks (quorum sensing e. QS) (Whitehead jt., 2000).

Esmalt kirjeldati kvoorum sensing nähtust merebakteris *Photobacterium fischeri*, kes on ka antud süsteemi mudelorganism (Eberhard 1981). Nimetatud bakteris sõltub valguse e. bioluminestsentsi produktsioon LuxI valgu poolt sünteesitava signaalmolekuli N-(3-oksoheksanoüül)-L-homoseriinlaktooni (OHHL) kontsentratsioonist keskkonnas (Meighen 1991). OHHL-i kogunemisel keskkonda toimub teatud kontsentratsioonil selle seondumine regulaatorvalguga LuxR. OHHL-LuxR kompleks aktiveerib *lux*-operoni transkriptsiooni, mis on vajalik valguse produktsiooniks. Seega toimub valguse produktsioon ainult siis, kui bakteripopulatsioon on saavutanud sellise tiheduse, et populatsiooni rakkude poolt

toodetava OHHL-i kontsentratsioon on *lux*-geenide aktivatsiooni jaoks piisav (Fuqua jt., 1994; Meighen 1994).

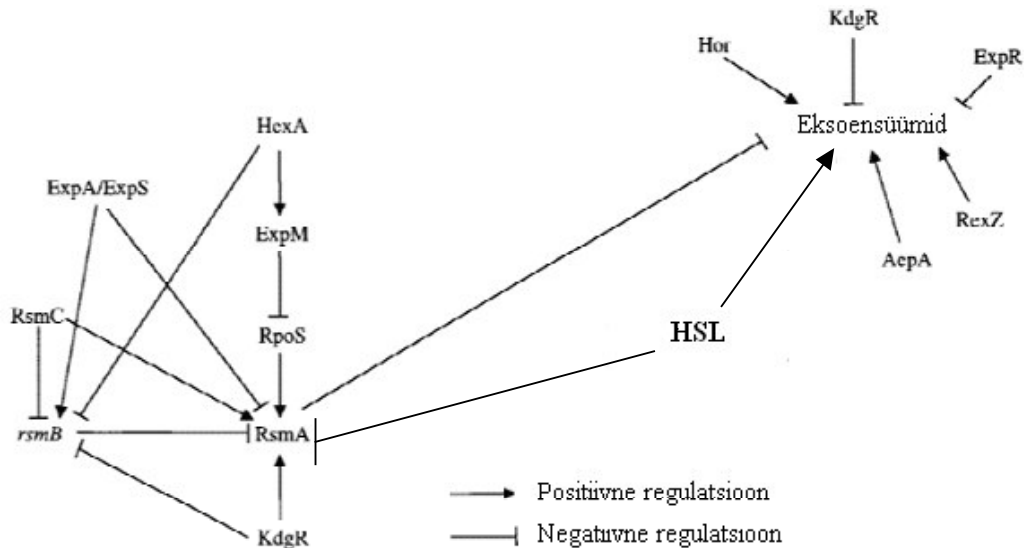
Nii nagu paljudes teistes patogeenides, on ka *Ecc* virulentsusfaktorite süntees reguleeritud rakutihedusest sõltuvalt. LuxI homoloogiks on *Ecc*-s ExpI, mis vastutab signaalmolekuli N-(3-oksooktanoüül)-L-homoseriinlaktoon (OOHL) sünteesi eest (Jones jt., 1993; Pirhonen jt., 1993). ExpI kuulub *Ecc*-s globaalsete regulaatorite hulka, kuna vastav *expI* mutant ei ole võimeline sünteesima mitte ühtegi ekstratsellulaarset ensüümi ja on seetõttu avirulentne (ei ole võimeline põhjustama taimedel märgmädanikku) (Pirhonen jt., 1993). *Ecc*-s on leitud ka LuxR homoloog, mida tähistatakse ExpR. Erinevalt *V. fischeri*'st on *Ecc*-s tegemist ekstratsellulaarsete ensüümide negatiivse regulaatoriga, mille mõju jõuab märklauani rsm-süsteemi vahendusel (Cui jt., 2005; vt. peatükk 1.8.2).

1.8.2. Rsm-vahendatud regulatsioonisüsteem

Üha suuremat tähtsust ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi regulatsioonisüsteemil omistatakse rsm posttranskriptsioonilisele regulatsioonisüsteemile. Nimetatud süsteemi osad RsmA ja RsmC on ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesile repressoriteks, *rsmB* RNA aga induktoriks, kuna ta mõjutab negatiivselt RsmA taset rakus (Chatterjee jt., 1995; Liu jt., 1998; Cui jt., 1999).

ExpI/ExpR ja rsm süsteemide ühisosaks on ExpR: nimelt on viimase aja uurimustes on selgunud, et *Ecc* tüves 71 on ExpR *rsmA* ekspressiooni aktivaator. Kui aga ExpR-le seondub OOHL, ei saa kompleks enam *rsmA*-le seonduda ning viimase ekspressioon väheneb (Cui jt., 2005).

Eelnevates uurimustes on kirjeldatud veel hulk regulaatoreid, mis kõik mõjutavad RsmA-*rsmB* RNA posttranskriptsioonilist regulatsioonisüsteemi ning seeläbi ka ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni. Nendeks on KdgR, HexA, ExpS/ExpA, RpoS ja ExpI (joonis 2). Need andmed viitavad võimalusele, et RsmA-*rsmB* RNA on ekstratsellulaarsed ensüümide produktsioonile tsentraalsed regulaatorid ning ülejäänud regulaatorite toime avaldub läbi RsmA-*rsmB* RNA, mida nad mõjutavad (Cui jt., 2000). Siiski jääb veel ebaselgeks, milline oleks kõiki neid regulaatoreid hõlmav terviklik süsteem ning regulaatorite omavaheline hierarhia.



Joonis 2. Skeemil on kujutatud teatud osa seni avastatud regulaatorite võrgustikust, mis kontrollivad ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi *Ecc*-s (Whitehead jt., 2002).

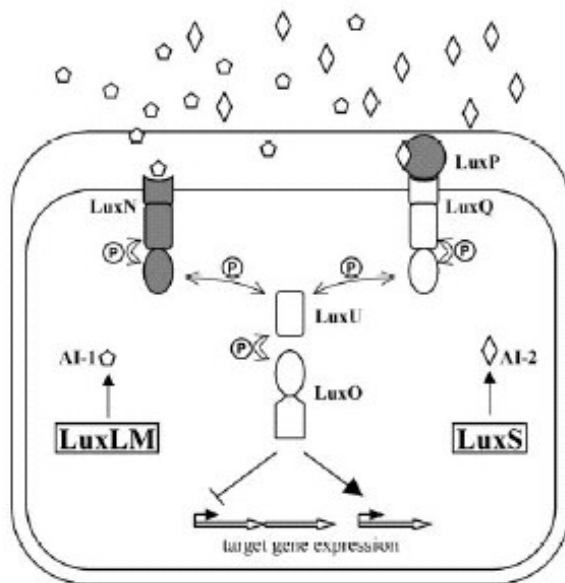
1.9. Mitut kvoorum sensing süsteemi omavad bakterid

Paljud bakterid kasutavad ka kahte või rohkemat kvoorum sensing süsteemi, mis võivad toimida nii paralleelselt kui järjestikuliselt. Mitme QS-süsteemi kasutamine aitab bakteril sensoorse informatsiooni kilde tervikuks ühendada ning lisab geneetilisele võrgustikule plastilisust (Taga ja Bassler, 2003).

Pseudomonas aeruginosa on väga hea adaptatsioonivõimega patogeen, kes suudab koloniseerida erinevaid keskkonna nishe, sealhulgas taimi, loomi, inimesi ning meres elavaid peremeesorganisme (de Kievit jt., 2000). Nimetatud patogeeni on kirjeldatud kahte *lux*-süsteemile sarnanevat kvoorum sensing mehhanismi, *las* ja *rhl*, mida on väga põhjalikult uuritud. *las* süsteem koosneb LasR regulaatorvalgust ja sellele vastavast signaalmolekulist, N-(3-oxododecanoyl) homoseriinlaktoonist (3O-C₁₂-HSL), mille sünteesi reguleerib *lasI* poolt kodeeritud autoindukti süntaas. *rhl* süsteem koosneb RhlR regulaatorvalgust ning autoindukti süntetaasist (RhlI), mis

osaleb autoinduktori N-butüürüül homoseriinlaktooni (C₄-HSL) sünteesil. Nimetatud kahe süsteemi vahel toimib kindel hierarhia, nimelt kontrollib *las* süsteem *rhl* süsteemi nii transkriptsioonilisel kui posttranslatsioonilisel tasemel (Pesci jt., 1997). Varasemad uurimused näitavad, et kvoorum sensing reguleerib *P. aeruginosas* virulentsusfaktorite produktsiooni, biofilmi formeerumist ja arengut ning ka resistentsust antibiootikumidele (Davies jt., 1998; de Kievit jt., 2000).

Merebakter *Vibrio harveyi* kasutab kahte paralleelset kvoorum sensing süsteemi, mille märklauaks on muuhulgas ka bioluminestsentsi tootmise eest vastutavad geenid. Kumbki autoinduktori süntaas, LuxS ja LuxLM, katalüüsib spetsiifilise autoinduktori sünteesi: LuxLM korral on selleks 3-hüdroksübutanoüül homoseriinlaktoon ehk AI-1, LuxS korral furanosüül boraadi diester ehk AI-2 (Cao ja Meighen, 1989; Surette jt., 1999; Chen jt., 2002). Erinevalt teistest kvoorum sensing süsteemidest, kus autoinduktooreid detekteeritakse tsütoplasmaatilise LuxR-tüüpi valgu abil, toimub *V. harveyi* kahe autoinduktori detektsioon periplasmas 2-komponendiliste sensorikinaasi valkude abil, kust signaal jõuab üle mitmete transmittervalkude lõpuks märklauajärjestusteni (Bassler jt., 1993).



Joonis 3. *V. harveyi* kvoorum sensingu süsteem. Kahte autoinduktorit, AI-1 (viisnurgad) ja AI-2 (rombid) produtseeritakse vastavalt süntetaaside LuxLM ja LuxS poolt. AI-1 ja AI-2 seonduvad sensoritele, vastavalt LuxN ja LuxPQ-le, initsieerides fosforüleerimiste kaskaadi (P), mis kulgeb läbi LuxU ning muudab vastuse regulaatorivalgu LuxO fosforüleerituse astet. LuxO kontrollib märklauageenide ekspressiooni. Valgud, mis vastutavad autoinduktori sidumise eest, on kujutatud hallina (Taga ja Bassler, 2003).

Mitme QS-süsteemi vajalikkust *V. harveyis* seletatakse sellega, et kahe kvoorum sensing süsteemi autoinduktoritel on erinevad funktsioonid (Surrette jt., 1999). AI-1, nagu teised homoseriinlaktoonid, on liigispetsiifiline, eri liikides on sel küll valdavalt virulentsuse regulatsiooniga seotud roll. Seevastu AI-2 on kõrgelt konserveerununa avastatud paljudes gram-positiivsetes ja gram-negatiivsetes bakterites: *E. coli*'s, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*'s, *Vibrio cholerae*'s, *Streptococcus pyogenes*'es jpt. (Xavier ja Bassler 2003; Bell jt., 2004). Seetõttu usutakse, et AI-2 osaleb eri liigi rakkude vahelises suhtlemises ning tänu AI-2-le saab bakter modifitseerida oma käitumist vastavalt sellele, kas ta moodustab eri liikide populatsioonis enamuse või vähemuse (Surrette jt., 1999; Mok jt., 2003). Lisaks sellele on iga liigi AI-2-l siiski ka spetsiifiline funktsioon, näiteks virulentsusfaktorite sünteesi induktsioon, liikuvus, antibiootikumide tootmine vms. (Xavier ja Bassler 2003).

1.10. Kvoorum sensingu analüüs mikrokiibil

1.10.1. Kvoorum sensing *Pseudomonas aeruginosa*'s

Varasemad uurimused näitavad, et kvoorum sensing reguleerib *P. aeruginosa* virulentsusfaktorite tootmist, biofilmi formeerumist ja arengut ning ka resistentsust antibiootikumidele (Davies jt., 1998; de Kievit jt., 2000). Tänu laialdasele mikrokiipide kasutuselevõtule ka prokariotide hulgas, on *P. aeruginosa* kvoorum sensing süsteemi kohta selgunud palju uut informatsiooni.

Wagner jt. jälgisid oma töös kvoorum sensingu efekti kogu genoomi geenide ekspressioonile, (5570 avatud lugemisraami e. ORF-i), võrreldes omavahel *P. aeruginosa* metsiktüve ning mutanti, mis autoinduktoreid ei tooda. Oma uurimuses kasutasid nad oligonukleotiidset mikrokiipi (Affimetrix GeneChip) (Wagner jt., 2003). Nende andmetel oli kvoorum sensingu poolt reguleeritud 666 geeni ehk u. 10% kõigist ORF-idest, mis on umbes kaks korda rohkem sellest, palju eeldati varasemate andmete põhjal (Whiteley jt., 1999). Enamus varem identifitseeritud QS-indutseeritud geenidest leidsid kinnitust ning leiti ka 222 QS-represseeritud geeni. Viimane on eriti tähelepanuväärne, kuna varasemates töödes pole *P. aeruginosa* avastatud mitte ühtegi QS-represseeritud geeni. Suur osa identifitseeritud QS-reguleeritud geenidest (34%) on teadmata funktsiooniga, ülejäänud osalevad aga väga erinevates füsioloogilistes protsessides: DNA replikatsioon, RNA transkriptsioon ja

translatsioon, raku jagunemine, aminohapete biosüntees, kemotaksis, biofilmi moodustamine ja virulentsus. Paljud QS reguleeritud geenidest kodeerivad ise transkriptsiooni faktoreid, seega toimub märkimisväärne osa regulatsioonist tõenäoliselt kaudselt. Kõik eelnev viitab sellele, et kvoorum sensing ei reguleeri vaid üksikuid füsioloogilisi protsesse, vaid rakulist käitumist globaalsel tasemel (Wagner jt., 2003).

Ka Schulster jt. (2003) võrdlesid mikrokiibil *P. aeruginosa* metsiktüve ning HSL-i poolest defektset mutanti, otsides seega kvoorum sensingu poolt reguleeritavaid geene. QS-indutseeritavaid geene leiti antud töös samas suurusjärgus kui Wagneri jt. töös, samuti leidsid kinnitamist enamus varasemalt identifitseeritud QS poolt positiivselt reguleeritud geene (Schulster jt., 2003).

Kui mõlema töögrupi poolt leitud QS-indutseeritud geenidest kattus 50%, siis QS poolt repressseeritud geenidest vaid 5%, suuresti seetõttu, et Schulster jt. identifitseerisid vaid 38 QS-repressseeritud geeni. Suhteliselt suured olid erinevused ka suurusjärgudes, mille võrra mingi geen on üles või alla ekspresseeritud. Suured erinevused geenide ekspressiooni tasemetes viitavad kindlasti kahe tööühma poolt katsetes kasutatud erinevatele kasvutingimustele (söötme komponendid, aeratsioon), erineva taustaga bakteritüvedele (iseeneslikud mutatsioonid) ning statistilistele meetoditele, mida andmete analüüsiks kasutati. Erinevused tulenevad ka oligonukleotiidide komplektist, mis teatud geeni mikrokiibil esindavad. Tõenäoliselt pole sellistel mitmekordsetel ekspressiooni erinevustel bioloogilist tähendust ning saadud tulemuste põhiline väärtus seisneb selles, et mõlemas katses näidatakse QS-poolset induksiooni või repressiooni (Vasil, 2003).

1.10.2. Kasvufaasi ja keskkonna mõju kvoorum sensingu regulatsioonile

Erinevused varasemates töödes ning viimasel ajal mikrokiibil identifitseeritud QS-reguleeritud geenide koosseisus võivad tuleneda nii kasvufaasist kui erinevatest söötmetest ja kasvutingimustest tulenevatest faktoritest. Wagner jt. (2003) tegid kindlaks, et logaritmilises kasvufaasis oli QS-reguleeritud geene 244, varases statsionaarses kasvufaasis aga 450 ning mõlemas faasis oli samu diferentsiaalselt ekspresseeritud geene vaid 78. Seejuures on huvipakkuv, et 4 geeni 78-st reguleeriti kahefaasiliselt, s.t. nende ekspressioon oli induitseeritud logaritmilises faasis ning repressseeritud varases statsionaarses faasis.

Katsed erinevates kasvutingimustes näitasid aga, et erinevates söötmetes ning erineva aeratsiooni juures kasvades vähenes *P. aeruginosa* QS poolt reguleeritud geenide arv 4-18% võrra. Sealjuures polnud bakteri kasvukiirus erinevates tingimustes mõjutatud. Sellest võib järeldada, et söötme komponendid (KNO_3 või glükoos), mis indutseerivad spetsiifiliselt vaid teatud geenide ekspressiooni, nagu näiteks *nar* geenid ja glükoosi poolt indutseeritav *oprB* geen, välistavad selliste QS-reguleeritud geenide detekteerimise söötmes, kus nimetatud komponendid puuduvad (Wagner jt., 2003).

1.10.3. Kvoorum sensing *Escherichia coli*'s

Kvoorum sensing süsteem *E. coli*'s avastati suhteliselt hiljuti. Nüüdseks on teada, et autoinduktor-2 toodavad praktiliselt kõik patogeensed ja mittepatoogeensed *E. coli* tüved, kuid AI-2 füsioloogiline roll vajab veel täpsustamist (Surrette jt., 1998). Palju uut informatsiooni saadi DeLisa jt. tööst, kus mikrokiibil vaadeldi AI-2 mõju kogu genoomi ekspressioonile. Sarnaselt *P. aeruginosa*le on AI-2 poolt mõjutatud üllatavalt suur osa genoomist ehk 5,6%, s.h. raku jagunemine ja morfoloogia, virulentsus, biofilmi ja eksopolüsahhariidide formeerumine ning väikeste molekulide metabolism, mis võiksid teoreetiliselt olla lüüks tsentraalse metabolismi ja QS-signalisatsiooni vahel. Huvitaval kombel mõjutas AI-2 oodatust vähesemal määral praegu teadaolevate kvoorum sensingu geenide RNA-taset (*sdiA*, *rpoS*, *cysK*), vähemalt antud katsetingimustes. Kuid mõjutatud oli 10 oletatava signaali ülekandega seotud geeni ekspressioon (DeLisa jt., 2001).

1.11. *Erwinia chrysanthemi* geenide ekspressioonianalüüs mikrokiibil

2002 aastal Okinaka jt. poolt avaldatud töös vaadeldi *Erwinia chrysanthemi* tüve 3937 diferentsiaalset geeniekspressiooni võrdlevalt laboritingimustes ja peremeestaimes (patogeenses faasis). Mikrokiibile pandi *E. chrysanthemi* genoomsest raamatukogust 5000 PCR-i abil üles amplifitseeritud 3 kb fragmenti, proov märgistati totaalsest RNA-st pöördtranskriptsiooni abil, kasutades Cy3 ja Cy5 värve. *E. chrysanthemi* proovid korjati taimest peale 14-tunnist infektsiooni. Lõpptulemusena detekteeriti antud töös 48 taimes üles ekspresseeritud ORF-i ning suhteliselt vähe, vaid 15 vähenenud ekspressiooniga ORF-i, millest enamus olid *housekeeping* geenid. Üllatav oli, et teada-tuntud virulentsusgeene detekteeriti taimes indutseeritud geenide

hulgas suhteliselt vähe. Kuid suur osakaal oli geenidel, mille produktid pole otseselt virulentsusfaktorid, kuid aitavad patogeneesis kaasa häirides taime kaitsemehhanismide tööd või aidates patogeenil taimes kohaneda (osmosensorid, spetsiifilised transporterid jne.). Sellest võib järeldada, et nimetatud virulentsusgeenid omavad patogeneesis palju suuremat tähtsust kui seni arvatud. Tõenäoliselt on paljude funktsioonide taga ka mitu paralleelset geeni, mistõttu on nende tähtsust traditsiooniliste mutantide abil raskem mõista.

Mitmed *E. coli* geenide homoloogid näitasid taimes indutseeritud *E. chrysanthemi* kloonides hoopis erinevaid omavahelisi seoseid, mis tähendab ilmselt seda, et *E. chrysanthemi* genoom on suures osas mosaiik *E. coli* tüvede genoomsetest ümberkorraldustest.

Kuigi saadi huvitavaid tulemusi, oli kasutatud meetodite juures ka mitmeid kitsaskohti: raamatukogu tegemisel võis mõni geen jääda kloneerimata, samas kui mõni teine võis olla mitme koopiana. Olulist informatsiooni võis kaduma minna ka seetõttu, et proov võeti vaid 14-l tunnil ning ka mRNA lühikese poolestusaja tõttu. Kuna u. 3 kb kloonid sisaldasid reeglina mitu ORF-i, võisid ühe ORF-i induktsioon ja teise ORF-i repressioon üksteist varjutada (Okinaka jt., 2002).

1.12. Töö eesmärk

Tänu mikrokiibi tehnoloogia võimsale arengule viimasel aastakümnel on saanud võimalikuks tuhandete geenide ekspressiooni taseme üheaegne mõõtmine, varieerides sealjuures ka katsetingimusi. See kergendab oluliselt geenide ekspressiooni ja omavaheliste seoste uurimist, mis klassikaliste meetoditega (northern blot, reportergeenid) on väga töömahukas. Antud töö eesmärgiks on töötada välja *Ecc* tüvele SCC3193 spetsiifiline mikrokiip ning vastav märkimis- ja hübridisatsiooniprotokoll ning mõõta kiibile valitud geenide ekspressioonitaset ja omavahelisi seoseid 1) erinevates kasvufaasides 2) indutseeritud tingimustes polügalakturoonhappe juuresolekul ja ilma 3) OOHL^- mutantset tüves võrreldes metsiktüübiga.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. *Erwinia carotovora* alamli. *carotovora* tüvele SCC3193 vastava mikrokiibi valmistamine

2.1.1. Märklauajärjestuste leidmine

Märklauajärjestuste valimisel kasutati geenipanga ning erinevate eelnevalt meie töögrupi poolt tehtud katsetes saadud andmeid, kokku kanti kiible 82-le geenile vastavad järjestused, lisaks 3 kontrolljärjestust *A. thaliana* genoomilt (vt. peatükk 3.2.1.). Märklauajärjestused on *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* mikrokiibile valitud Viia Kõivu poolt.

A. Kiibile kandmiseks valiti välja kõik 2002. aasta seisuga geenipankades (GenBank) olevad *Ecc* geenid ning osa järjestusi ka *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* genoomilt.

B. *Ecc* mutant SCC3065, milles OOHL-i eest vastutav *expI* geen on katkestatud kanamütsiini geeniga, toodab ekstratsellulaarseid ensüüme vähesel määral ning on seega avirulentne. Nimetatud mutandile tehti transposoonmutagenees, kasutades selleks transposooni sisaldavat plasmidi pUT Tn5Cm *E. coli* tüves S-17 (de Lorenzo jt., 1990). Mutante selekteeriti karboksümetüültselluloosi sisaldaval selektiivsöötmel (CMC; 0,1%) ning valiti välja mutandid, milles oli ühe ekstratsellulaarse ensüümi - tsellulaasi - produktsioon taastunud metsiktüvega võrreldaval tasemel. Transposooni insertiooniga geenid vastavas mutandis sekveneeriti, identifitseeriti ning 3 geeni (*vojN*, *rcsB*, *hexY*) amplifitseeriti mikrokiibile kandmiseks

C. SCC 3065 mutanti (*expI*⁻, Km⁺) viidi kaks *Ecc* metsiktüvest tehtud raamatukogu: plasmidis pDR540 (Amp⁺; Russell and Bennett, 1982) ning pACYC184 (Cm⁺; Chang ja Cohen, 1978). Seejärel testiti kolooniaid taas karboksümetüültselluloosi sisaldaval selektiivsöötmel tsellulaasi produktsiooni taastumise järgi. Amplifitseerimiseks ja mikrokiibile kandmiseks valiti välja ja sekveneeriti 12 geeni (*hns*, *kdgR*, *emrB*, *rek*, *yie*, *str*, *ugpA*, *ugpB*, *cys*, *flhD*, *flhC*, *dcuC*).

D. *E. coli* tüvesse S-17 viidi kõigepealt plasmid pUT prtW lacZ, milles oli reportergeeni *lacZ* ette kloneeritud proteaasi *prtW* promootor (prt). Seejärel elektroporeeriti nimetatud plasmiidiga S-17 tüvesse veel *Ecc* gene sisaldavad raamatukogu plasmiidid pACYC184. Sini-valge testi abil valiti välja sellised

mutandid/kolooniad, milles proteaasi (*lacZ*) ekspressioon oli muutunud võrreldes *E. coli* mutandiga, kus raamatukogu plasmidi polnud. 10 geeni (*yibQ*, *dcuS*, *dcuR*, *hexR*, *kduD*, *pelW*, *pelX*, *rscF*, *ytf*, *trf*) sekveneeriti, amplifitseeriti ja kanti mikrokiibile.

Samasuguse skeemi abil uuriti raamatukogus olevate geenide mõju polügalakturonaasi geeni (*pehA*) ekspressioonile, mikrokiibile kandmiseks valiti välja, sekveneeriti ja amplifitseeriti 5 geeni (*sal*, *hy26*, *senS*, *ygi*, *pri70*).

Kiibile kandmiseks valiti välja ka kaks *Escherichia coli* ribosomaalset geeni, *S12* ja elongatsioonifaktor *tufB*, mida plaaniti kasutada andmete normaliseerimiseks (vt. peatükk 3.3).

Praimerid disainiti *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* ja *E. coli* geenide avatud lugemisraamidele (ORF) nii, et võimaluse korral tuleks märklaudjärjestuse pikkuseks 500 bp. Praimerid on 15-25 nt pikkused ning 5' praimeri küljes on aminolinker, mille abil PCR-i fragment hiljem kiibile kinnitati.

2.1.2. Märklaudjärjestuste ettevalmistamine

Mikrokiibile valitud geenid amplifitseeriti PCR-l. Iga geen amplifitseeriti kogumahus 700 µl, 50 µl reaktsioonisegu sisaldas: 10x PCR-i puhvrit 5 µl (750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20) (Fermentas); MgCl₂ 4 µl (25 mM); 10 mM dNTP mix-i 1 µl (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Fermentas); 5' ja 3' praimerit kumbagi 1 µl (20 pmol/µl) (Sigma Genosys Ltd); Taq polümeraasi 2,5 U (J. Sedman, Biokeemia õppetool, TÜMRI) templina kasutati *Ecc* genoomset DNA-d ning plasmidi pKECA, millesse oli kloneeritud *E. coli* geen *tufB* (molekulaarbioloogia õppetool, TÜMRI).

PCR reaktsiooni tingimused: esimesele tsüklile eelnes DNA denaturatsioon 95°C juures 2 minutit. Järgnevad 35 tsüklit toimusid järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon 95°C juures 0,5 minutit, praimerite seondumine matriitsile 48-58°C juures 0,5 minutit (sõltuvalt praimeritest), DNA süntees 1 minut 72°C juures. Viimasele tsüklile järgnes täiendav DNA süntees 72°C juures 10 minutit. PCR teostati firma Biometra aparadiga UnoII.

Märklaudjärjestuste amplifikatsioonil kasutatud praimerite nimekiri on toodud lisas1.

Reaktsiooniproduktid visualiseeriti geelelektroforeesil. Selleks lisati 3 µl-le reaktsiooniproduktile 3µl markervärvi (50% glütserooli lahus, mis sisaldab 0,04% broomfenoolsinist; Fermentas) ning kanti see 0,8%-lisele etiidiumbromiidi sisaldavale agarosgeelile TAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat; 1mM EDTA; pH 8,2). Elektroforees viidi läbi pingel 100 volti ja DNA detekteeriti UV-valguses.

Amplifitseeritud järjestuste puhastamiseks kasutati UltraClean™15 DNA puhastuskitti (Mo Bio Laboratories Inc), järgides tootja poolt koostatud protokoll.

Puhastatud märklaudjärjestuste kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriga (UltroSpec 3100 pro) lainepikkustel 280nm ja 260nm. Seejärel kuivatati DNA vaakumsentrifuugis (Maxi Dry Plus, Heto) ning DNA sade lahustati 25% DMSO-s lõppkontsentratsioonini 500 µg/ml.

2.1.3. Kontrolljärjestuste ettevalmistamine

Negatiivse kontrollina kasutati mikrokiibil kolme *Arabidopsis thaliana* geeni järjestusi: RUBISCO aktivaasi (*RCA*), fotosüsteem I klorofüll a/b seonduv valgu (*Cab*) ja ribuloos 1,5-bisfosfaat karboksülaas/oksügenaasi suure subühiku (*rbcL*) geenide järjestusi. Nimetatud kolm järjestust amplifitseeriti samuti PCR-ga, kasutades sellist reaktsioonisegu ja –mahtu nagu *E. carotovora* märklaudjärjestuste korral. Templina kasutati *A. thaliana* genoomset DNA-d, mis on eraldatud Erkki Truve töörühma poolt (Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, TTÜ).

Amplifikatsiooniks kasutatav PCR-i programm: esimesele tsüklile eelnes DNA denaturatsioon 95°C juures 2 minutit. Järgnevad 35 tsüklit toimusid järgmistel tingimustel: DNA denaturatsioon 95°C juures 1 minut, praimerite seondumine matriitsile 60°C juures 1 minut, DNA süntees 72°C juures 1 minut. Viimasele tsüklile järgnes täiendav DNA süntees 72°C juures 10 minutit. PCR teostati firma Biometra aparaadiga UnoII.

PCR-l kasutatud geenspetsiifiliste praimerite järjestused on disainitud TUMRI biotehnoloogia õppetoolis ning need on ära toodud tabelis 1.

Kontrolljärjestuste ettevalmistamine viidi lõpule vastavalt eelpool kirjeldatule.

Tabel 1. *A. thaliana* geenide amplifikatsiooniks kasutatud praimerid

Geen	5' praimer	3' praimer
<i>RCA</i>	TCGCACAGAGCAACAAGAAGAG	AGTAGTACCACCCATACGACCC
<i>Cab</i>	TGACCCACTTGGACTTGGAGAAG	GCACACAGAATCCTACAAACGCC
<i>rbcL</i>	TGGGGAGGCAAAGGTCAAGG	TCACGGATGAGAGGAGCGTATAG

2.1.4. Märklaudjärjestuste kandmine mikrokiibile

Märklaudjärjestuse kandmiseks klaasile disainiti mikrokiibi maatriks (Tõnis Org), millel on iga järjestus esindatud kahe spotina. Vastavalt maatriksi skeemile kanti 384 mikrotiiterplaadile (Genetix Ltd) 25% DMSO-s lahustatud uuritavad järjestused, kontrolljärjestused (*A. thaliana* geenifragmendid) ning negatiivse kontrollina ka printimispuhver 25% DMSO. Maatriksi nurkadesse kanti 1µM Cy3 või Cy5 värviga konjugeeritud 25-meersed oligonukleotiidid, mida kasutati tulemuste analüüsil maatriksi asukoha paika panemiseks.

Klaasid valmistati SAL-1 meetodil ja DNA järjestused kanti klaasidele (Asper Biotech, Tartu).

2.2. Proovi ettevalmistamine

2.2.1. Tüved ja kasvatamine

Ekspressioonanalüüsiks kasutati *Erwinia carotovora* alamli. *carotovora* metsiktüve SCC3193 (Pirhonen jt., 1988) ning *expI*⁻, *OOHL*⁻ mutanti SCC3065 (Pirhonen jt., 1993).

Ecc tüvesid kasvatati 30°C juures LB või minimaalsöötmes (Miller, 1972). Minimaalsöötmed valmistati M9 baasil (Adams, 1959), millele lisati mikroelemente (2,5 ml/l; Bauchop ja Elsdén, 1960) ning süsinikuallikana glütserooli lõppkontsentratsiooniga 0,4%. SCC3065-le lisati kanamütsiini kontsentratsiooniga 25 µg/ml.

2.2.2. Proovide korjamine ja RNA eraldamine

Proovide korjamiseks kasvatati tüvesid üle öö 5 ml LB puljongis (tüve SCC3065 kasvatati kanamütsiini juuresolekul). Hommikul tehti neist lahjendused 20

ml M9 minimaalsöötmesse nii, et kultuuri lõpptihedus (OD 600) oleks 0,1. Söötmesse lisati PGA-d lõppkontsentratsioonini 0,4%. Proovid korjati 2, 6, 10, 24 tunni möödudes. Arvestades, et optiliselt tihedusel OD=1 on *E. coli* rakukultuuris u. 5×10^8 rakku/ml-s (E. Heinaru, mikrobioloogia praktikumi andmed), võeti igast ajapunktist selline kogus rakukultuuri, et ühe proovi kohta tuleks 1×10^9 - 1×10^{10} rakku. Kontroll-RNA eraldamiseks korjati proovid optiliselt tihedusel OD=1. Proove fuugiti 7000rpm/5 min., kasutades Sorvall® RC 5B tsentrifuugi (Du Pont Instruments) rootoreid HS-4 ja GSA-4. Supernatant eemaldati, rakud külmutati vedelas lämmastikus ning säilitati temperatuuril -75°C.

Totaalne RNA eraldati NucleoSpin® RNA L Kitiga (Macherey-Nagel), mis sisaldab ka DNAas-töötlust. Eraldamine toimus vastavalt tootja protokollile.

2.2.3. cDNA süntees

cDNA sünteesiks ja märkimiseks kasutati V. Bains poolt (2002) välja töötatud protokoll (http://hsc.unm.edu/som/research/lyons/microarray/protocol2.pdf). Pöördtranskriptsiooni käigus inkorporeeriti cDNA-sse 5-(3-aminoallüül)-2'-desoksüuridiin 5'-trifosfaat e. aa-dUTP (Sigma-Aldrich Co), millele liideti järgnevas värvimise reaktsioonis fluorestseeruv märgis Cy3 või Cy5 (Amersham Biosciences). cDNA sünteesi reaktsioonid viidi läbi Eppendorf'i aparaadiga Mastercycler personal (Saksamaa).

I Primaerite kleepumine

cDNA sünteesiks võeti 40 µg totaalset RNA-d, millele lisati 12 µg juhuslikke heksameerseid primereid (DNA Technology A/S), reaktsiooni maht viidi milliQ H₂O-ga 60 µl-ni. Segu inkubeeriti 10 min. 70°C juures ning asetati seejärel jääle kuni 1 minutiks.

II Pöördtranskriptsiooni reaktsioon

Pöördtranskriptsiooniks segati kokku ensüümisegu mahus 60 µl: 24 µl 5x M-MuLV pöördtranskriptaasi puhvrit (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT; Fermentas); 2,4 µl 50x aminoallüül-dNTP segu [25mM dATP, dCTP ja dGTP, 15mM dTTP (Fermentas) ja 10mM aa-dUTP]; 1200 U ensüümi Revert Aid H Minus M-MuLVRT Reverse Transcriptase (Fermentas); ensüümisegu maht viidi 60 µl-ni mQ H₂O-ga. Ensüümisegu lisati RNA-praimerite segule ning inkubeeriti 2 tundi 42°C juures.

III RNA hüdrolüüs

Reaktsiooni peatamiseks lisati 40 µl 0,5M EDTA-d (1/3 reaktsiooni mahust), RNA hüdrolüüsimiseks lisati 40 µl 1M NaOH. Proove segati vortexil (Heidolph Reax Top) ning inkubeeriti 15 min. 65°C juures. Seejärel neutraliseeriti reaktsioonisegu 40 µl 1M HCl-ga.

cDNA puhastamiseks kasutati PCR-i puhastuskitti (MoBio Laboratories Inc), järgides antud protokoll: cDNA reaktsioonisegu jagati kaheks ja lisati kumbalegi osale 1200 µl sidumispuhvrit (SpinBind Buffer). DNA sidumiseks kolonni täideti DNA-sidumispuhvri seguga kolonni (spin filter) ja tsentrifuugiti täispööretel 30 sek (Heraeus Biofuge Pico). Kolonni pesti kaks korda 720 µl 5 mM kaaliumfosfaat-pesulahusega (80% etanool; 0,05 M kaaliumfosfaat) ning puhas cDNA elueeriti kolonnilt, tsentrifuugides kaks korda 30 µl fosfaat-eluatsioonilahusega (täispööretel 30 sek.) (4 mM kaaliumfosfaat). cDNA kuivatati vaakumtsentrifuugis (Maxi Dry Plus, Heto).

2.2.4. cDNA märgistamine fluorestseeruva värviga

Cy3 ja Cy5 monoreaktiivsed fluorestsentsvärvid lahustati 72 µl 100% DMSO-s.

cDNA sade lahustati 9 µl 0,1M Na₂CO₃-s (pH 9). Seejärel lisati kumbalegi proovile 9 µl vastavat värvilahust, Cy3 või Cy5 ning inkubeeriti segu 1 tund pimedas toatemperatuuril.

Reaktsioonidele lisati 70 µl 0,1M NaOAc (pH 5,2) ning märgistatud cDNA puhastamiseks kasutati PCR-i puhastuskitti järgides tootja juhiseid (MoBio Laboratories Inc). Puhastatud cDNA kuivatati vaakumtsentrifuugis (Maxi Dry Plus, Heto).

2.3. Proovide hübridisatsioon mikrokiibile

Ühele klaasile kantavad erinevalt märgistatud uuritav ja kontroll-RNA lahustati 20 µl hübridisatsioonilahuses (50% formamiid; 6x SSC; 2,5x Dernhardt'i lahus; 0,5% SDS; heeringa sperma 0,025mg/ml), millele oli eelnevalt lisatud pärmi totaalset RNA-d (0,05 mg/ml) ebaspetsiifilise hübridisatsiooni vähendamiseks. DNA

denatureerimiseks inkubeeriti segu 2 min. 95°C juures, misjärel kanti denatureeritud DNA lahus mikrokiibile ning kaeti 22x22 mm suuruse katteklaasiga. Klaasid asetati hübridisatsioonikambrisse HybChamber™ (Gene Machines; San Carlos, CA, USA), kuhu lisati niiske keskkonna hoidmiseks 40 µl milliQ H₂O-d. Hübridisatsioon toimus vesivannis 42°C juures 16 tundi.

Peale hübridisatsiooni pesti klaase kolme pesulahusega, kusjuures igas järgmises lahuses oli soola kontsentratsiooni vähendatud. Lahused olid eelnevalt soojendatud 42°C-ni ning pesemine toimus loksutil 42°C juures. I pesulahus: 2x SSC; 0,1% SDS; II pesulahus 1x SSC; 0,1% SDS; III pesulahus 1x SSC. I ja II lahusega pesti 10 minutit, III lahusega 2 x 5 minutit. Klaasid kuivatati tsentrifuugides 1000 rpm 5 minutit (CR 422, Jouan Inc).

2.4. Mikrokiipide skaneerimine ja andmetöötlus

Mikrokiibid skaneeriti Affimetrix 428 Array Scanner'il (Affimetrix Inc). Cy3 fluorestsentsmärgise ergastamiseks kasutati laserit lainepikkusega 532 nm, Cy5 märgis ergastatakse lainepikkusel 635 nm. Detekteerimisläveks (gain) valiti 50.

Spottide intensiivsuse ning tausta mõõtmiseks kasutati arvutiprogrammi ArrayPro 32, kasutades programmi poolt väljastatud keskmisi väärtusi (mean). Igale mikrokiibil olevale järjestusele vastava intensiivsuse leidmiseks lahutati spoti intensiivsusele vastavast arväärtusest selle lokaalsele taustale (background) vastav väärtus. Edasised arvutused sooritati Microsoft Excel programmi abil (Microsoft Corporation).

Ühel mikrokiibil oli iga märklaudjärjestus esindatud kahe spotina. Tulemuste usaldusväärsuse suurendamiseks rakendati värvivahetust, s.t. iga proov hübridiseeriti kahele mikrokiibile: ühel kiibil oli proov värvitud Cy5-ga ja kontroll Cy3-ga, teisel kiibil aga sama proov Cy3-ga ja kontroll Cy5-ga. Kuna igal kiibil on ka 2 gridi (spottidega kaetud diskreetne ala kiibil), on üks geen kokkuvõttes esindatud 4 gridil (8 spotiga).

Kuna igale kiibile kanti peale märgitud proovi ka universaalne kontroll-cDNA, jagati proovi (*Ecc* metsiktüvi ja *expI* mutant) väärtused kõigepealt samale kiibile hübridiseeritud, vastasvärviga märgitud kontroll cDNA väärtustega, muutes seeläbi eri kiipidel olevad proovid omavahel võrreldavaks.

Tulemuste normaliseerimiseks kasutati Quacenbush'i poolt (2002) välja töötatud meetodit.

Antud töös mõõdeti igal mikrokiibil 82 erineva geeni ekspressiooni. Omavahel võrreldi *Ecc* tüve proovi (R) ning igale mikrokiibile kantud universaalset kontrolli (G), mis olid märgistatud värvidega Cy3 ja Cy5. Proovi ja kontrolli suhe T_i , $i = 1, \dots, 82$, i -nda geeni jaoks on

$$T_i = \frac{R_i}{G_i},$$

kus R_i ja G_i on i -nda geeni intensiivsused vastavates kanalites.

Totaalsel intensiivsusel põhinev normaliseerimismeetod eeldab, et kiibil esindatud geenide summaarne fluorestsentsintensiivsus eri tingimustes ei muutu, s.t. kui teatud hulga geenidele vastav fluorestsentsintensiivsus kasvab, siis võrdeliselt sellega väheneb teistele geenidele vastav fluorestsentsintensiivsus. Kasutades sellist lähenemist, arvutati normaliseerimisfaktor

$$N = \frac{\sum_{i=1}^{82} R_i}{\sum_{i=1}^{82} G_i},$$

liites eraldi kiibi kummalegi värvile vastavas kanalis mõõdetud fluorestsentsintensiivsuste väärtused ja seejärel saadud summad jagades.

Normaliseeritud ekspressiooni suhteks saadi iga gridil oleva geeni kohta seega

$$T'_i = \frac{1}{N} \frac{R_i}{G_i},$$

kohandades iga suhtarvu nii, et suhtarvude keskmine oleks võrdne ühega.

Samal ajal kui normaliseerimine kohandab suhtarve (T'_i) üksteisele, võivad juhuslikud protsessid põhjustada varieeruvuste erinevusi ühe mikrokiibi piires või erinevate kiipide vahel. Antud töös mõõdeti ühele proovile vastavate geenide ekspressiooni kahel kiibil ehk kokku neljal gridil. Üks võimalus gridide vahelise varieeruvuste erinevuse kõrvaldamiseks oleks T'_i väärtuste kohandamine selliseks, et varieeruvus oleks sama. Kuna gridil oli 82 geeni, siis nende varieeruvuse väärtuseks n -ndal gridil saadi

$$\sigma_n^2 = \sum_{i=1}^{82} \left[\log_2(T_i') \right]^2,$$

kus $n = 1, \dots, 4$. Iga gridi skaleerimisfaktoriks valiti

$$a_k = \frac{\sigma_k^2}{\left[\prod_{n=1}^4 \sigma_n^2 \right]^{1/4}}, \quad k = 1, \dots, 4,$$

kus vastava gridi variantsus on jagatud kõigi gridide varieeruvuste geomeetrilise keskmisega. Seejärel skaleeriti kõigi nelja gridi elemente, jagades logaritmilise T_i' väärtuse antud gridi jaoks arvutatud skaleerimisfaktoriga a_k ning saades

$$\log_2(T_i'') = \frac{\log_2(T_i')}{a_k}.$$

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

Fütopatogeen *Erwinia carotovora* alaml. *carotovora* ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni kontrollitakse mitmete regulatoorsete süsteemide kaudu, mis on omavahel tihedalt põimunud ning moodustavad keerulise ülesehitusega struktuuri.

Ecc-s on leitud *Photobacterium fischeri* kvorum sensing süsteemile sarnanev süsteem, kus LuxI/LuxR homologideks on ExpI/ExpR. ExpI vastutab signaalmolekuli OOHL sünteesi eest, mille teataval kontsentratsioonil keskkonnas aktiveerib *Ecc* oma ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi (Pirhonen jt., 1993; Jones jt., 1993).

Viimaste aastate uurimustes omistatakse keskne roll *Ecc* virulentsuse regulatsioonis aga rsm-posttranskriptsioonilisele regulatsioonisüsteemile. (Kõiv ja Mäe, 2001). Rsm-süsteemi kaudu jõuab virulentsusfaktoriteni paljude regulaatorite mõju, s.h. ka ExpI ja ExpR-i. Nimelt repressseerib OOHL koos ExpR-ga *rsmA* ekspressiooni, RsmA on aga omakorda ekstratsellulaarsetele ensüümidele negatiivseks regulaatoriks (Chatterjee jt., 1995; Cui jt., 2005).

Praeguseks on kirjeldatud hulk globaalseid regulaatoreid, mis reguleerivad ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni nii positiivselt kui negatiivselt. Osa regulaatoreid mõjuvad ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesile otse, osa rsm süsteemi kaudu (ExpS/ExpA, KdgR, RpoS, HexA, ExpI) ning väga paljude regulaatorite puhul pole ekstratsellulaarsete ensüümideni viiv tee ning regulaatorite omavahelised seosed veel teada (AepA, Hor, RexZ; vt. ka joonis 1). Regulaatoreid omakorda mõjutavad taimest ja teistelt bakteritelt tulevad signaalid, keskkonna/kasvutingimused, kasvufaas ja mitmed teised tegurid (Whitehead jt., 2001).

Uuritavate geenide hulk kasvab iga aastaga ning iga uue uurimisobjekti puhul tuleks kindlaks teha suurema hulga geenide vahelised seosed. Samas saab mikrokiibil üheaegselt hinnata tuhandete geenide ekspressioonitaset, kasutades sealjuures erinevaid kasvutingimusi ja mutante. Nimetatud põhjustel tekkiski idee töötada välja *Ecc*-le spetsiifiline mikrokiip.

3.2. Märklaujärjestuste leidmine

Käesolevaks ajaks on *Ecc*-le kõige lähedasema organismi, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* genoom sekveneeritud (Bell jt., 2004), kuid 2002. aastal, kui toimus märklaujärjestuste valimine käesolevas töös kirjeldatud mikrokiibile, oli võimalik lähtuda vaid andmebaasis (GenBank) olevatest *Erwinia carotovora* geenidest ning varasematel aastatel meie töögrupi poolt erinevate meetoditega „välja püütud“ virulentsusfaktoreid mõjutavatest geenidest. Uute *Ecc* geenide identifitseerimine toimus peamiselt virulentsusfaktoritest lähtuvalt, s.t. geenid „püüti välja“, hinnates nende mõju ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile. Seetõttu on enamus kiibil kasutatud märklaujärjestusi otse või kaudselt seotud *Ecc* virulentsusega. Kiibile on kantud kokku 85 märklaujärjestust, s.h. 80 *Erwinia carotovora* ja 2 *E. coli* geenidele vastavat järjestust ning lisaks 3 kontrollfragmenti *A. thaliana* genoomselt järjestuselt (vt. Materjal ja metoodika).

3.3. Mikrokiibi väljatöötamine

Geeniekspressiooni on mikrokiibil uuritud alles viimased kümmekond aastat, aegamööda mikrokiibi tehnoloogia areneb ning täiustub. Kuniks universaalset prokarüoodi RNA märkimis- ja hübridisatsiooniprotokolli pole välja töötatud, kombineerib iga töögrupp protokolli, arvestades oma võimaluste ja vajadustega.

Ecc mikrokiibile valiti märklaujärjestusteks PCR-fragmendid. Arvestades, et oligonukleotiidsele geeniekspressiooni mikrokiibile kantakse keskmisest pikemad oligonukleotiidid (50-70 nt) ning iga geen on esindatud u. 15 erineva oligonukleotiidide spotina (Schen 2003), oleks majanduslikult soodsam kasutada märklaujärjestustena PCR-fragmente. PCR-fragmentide pikkus (~500bp) peaks olema ebaspetsiifilise hübridisatsiooni vältimiseks piisav ning tänu suhteliselt väikesele mikrokiibile kantavate geenide arvule oli ka PCR-reaktsioonide tegemine ning puhastamine jõukohane. Märklaujärjestused amplifitseeriti 5'-3' geenspetsiifiliste praimeritega ning PCR-i produktid kinnitati kiibile 5' praimeri küljes oleva aminolinkeri kaudu.

Proovi märgistamiseks inkorporeeriti cDNA-sse pöördtranskriptsiooni abil aa-dUTP, millele liideti seejärel fluorestseeruva värvi molekulid (Cy3 või Cy5). Reaktsioonid viidi läbi V. Bainsi poolt koostatud protokolli järgi (<http://hsc.unm.edu/som/research/lyons/microarray/protocol2.pdf>). Eelnevalt prooviti

märgistamiseks kasutada ka komertsiaalselt eukariotide kiti, kasutades pöördtranskriptsioonil oligo-dT praimerite asemel juhuslikke heksameerseid primereid. Kitiga saadud reaktsioonid osutusid aga nõrgemateks kui V. Baini protokoll järgi tehtud reaktsioonid ning võttes arvesse kiti maksumust, otsustati reaktsioonid läbi viia eelpool nimetatud protokoll järgi (andmed pole näidatud).

Arfin jt. kinnitasid oma uurimuses, et 3' geenispetsiifiliste praimerite kasutamisel pöördtranskriptsioonil on 30% cDNA-de saagikus väiksem kui heksameersete praimeritega tehtud reaktsioonis (Arfin jt., 2000). Sellist tendentsi näitasid ka V. Kõivu poolt võrdlevalt tehtud reaktsioonid nii 3' geenispetsiifiliste kui juhuslike heksameersete praimeritega (andmed pole näidatud). Pöördtranskriptsiooniks valiti seega juhuslikud heksameersed praimerid, eeldusel, et need katavad kogu genoomilt transkribeeritava mRNA ühtlaselt.

Templina kasutati pöördtranskriptsiooni reaktsioonil *Ecc* tüve SCC3193 totaalselt RNA-d. Bakteriaalse mRNA jaoks on küll välja töötatud mRNA rikastamise protokoll ning rikastatud mRNA otsemärgimisel vähenes ebaspetsiifiline hübridisatsioon, kuid kui rikastatud mRNA võeti cDNA sünteesi templiks, kasutades aa-dUTP kaudu märkimist, jäi soovitud efekt detekteerimata (Rosenow jt., 2001). Arvestades ka seda, et RNA rikastamine on töömahukas protsess, otsustati käesolevas töös kasutada pöördtranskriptsioonil totaalselt RNA-d.

cDNA märkimine viidi läbi aa-dUTP kaudu, eeldusel, et aa-dUTP-le liidetavad värvi molekulid inkorporeeruvad proovi ühtlasemalt, kui neid ei viida otse cDNA ahelasse. Yu jt. näitasid oma töös seevastu, et nii cDNA otsesel kui aa-dUTP kaudu märgistamisel inkorporeerus Cy5 proovi efektiivsemalt kui Cy3 (Yu jt., 2002). Värvide ebavõrdsest inkorporeerumisest tulenevat viga aitab vähendada värvivahetuse kasutamine (Tseng jt., 2001). Seetõttu rakendatigi antud töös värvivahetust, s.t. proov ja kontroll jagati kaheks, ühele kiibile kanti Cy3-ga märgistatud proov ja Cy5-ga märgistatud kontroll, teisele kiibile aga sama proov ning kontroll vastupidiselt värvituna. Värvivahetuse kasutamine võimaldab kanda kaks võrreldavat proovi ühele kiibile, välistades seega klaaside erinevusest või hübridisatsioonist sisse tulevad vead (Schenja jt., 1995; Wei jt., 2000)

Andmete normaliseerimiseks sooviti esialgselt kasutada kahte kiibile kantud *E. coli* ribosomaalset geeni, *tufB* ja S12, eeldusel, et nende ekspressioonitase (RNA-tase) ajas ei muutu. Kuna aga nimetatud geenide RNA-tase osutus kordades

suuremaks ülejäänud kiibil olevate geenide keskmisest RNA-tasemest, oleks seeläbi tekkinud arvutustest tulenev viga.

Seejärel rakendati normaliseerimiseks iga gridi geenide keskmist fluorestsentsintensiivsuste väärtust ning võrdlevalt Quackenbushi poolt 2002 aastal avaldatud artiklis välja pakutud normaliseerimismeetodit (Quackenbush jt., 2002; vt. materjal metoodika). Mõlema viimatinimetatud meetodi puhul detekteeriti samade geenide diferentsiaalne ekspressioon, siiski erinevustega absoluutväärtustes. Kuna aga Quackenbushi meetodit rakendades saadi ühe geeni replikaatide võrdlemisel väiksem standardhälve, jäädigi antud normaliseerimismeetodi juurde. Antud töös kirjeldatud katsetes on iga mikrokiibil olev geen igas ajapunktis esindatud kokku 8 replikaadina: ühel kiibil on 2 gridi, kumbalgi gridil on iga märklaujärjestus 2 spotina; iga proov on värvitud nii Cy3 kui Cy5-ga ning hübridiseeritud 2-le kiibile. Selline replikaatide arv annab võimaluse filtreerida ühele geenile vastavaid spottide väärtuseid ning kõrvaldada edasiseist andmetöötlusest kontamineerunud ning halva kvaliteediga spottide fluorestsentsintensiivsuste väärtuseid ning suurendada seega tulemuste usaldusväärsust.

3.4. Kasutatud tüved ja tingimused

Esimesteks tüvedeks, mille geeniekspressiooni profiili valmistataval mikrokiibil vaadeldi, valiti *Ecc* metsiktüvi SCC3193 ning OOHL⁻ mutant SCC3065. Nimetatud mutandis on katkestatud *expI* geen, mis vastutab OOHL-i sünteesi eest, seetõttu toodetakse SCC3065-s ekstratsellulaarseid ensüüme väga madalal tasemel ning antud tüvi on avirulentne. SCC3065 mutant on selge fenotüübiga ning seda on erinevate meetoditega üsna põhjalikult uuritud, samas on vähe mõõdetud kõikvõimalike regulaatorgeenide ekspressiooni OOHL-i puudumisel. ExpI⁻ mutant osutus esimeseks testitavaks tüveks ka seetõttu, et paljud mõõdetavad geenid on „välja püütud“ just nimetatud mutandi abil (vt. materjal ja metoodika). Seega sobib SCC3065 suurepäraselt nii mikrokiibi töökindluse hindamiseks kui ka huvitavaks uurimisobjektiks.

Mõlema tüve RNA-taset mõõdeti ka indutseerimata ja indutseeritud tingimustes polügalakturoonhappe (PGA) juuresolekul. *Ecc* poolt toodetavad pektinoolüütilised ensüümid (PehA ja Pel-id) on võimelised lagundama taime rakuseina komponenti pektiini erineva pikkusega oligogalakturoniidideks, millede hulka kuulub ka polügalakturoonhape (PGA) (Heikinheimo jt., 1995; Saarilahti jt.,

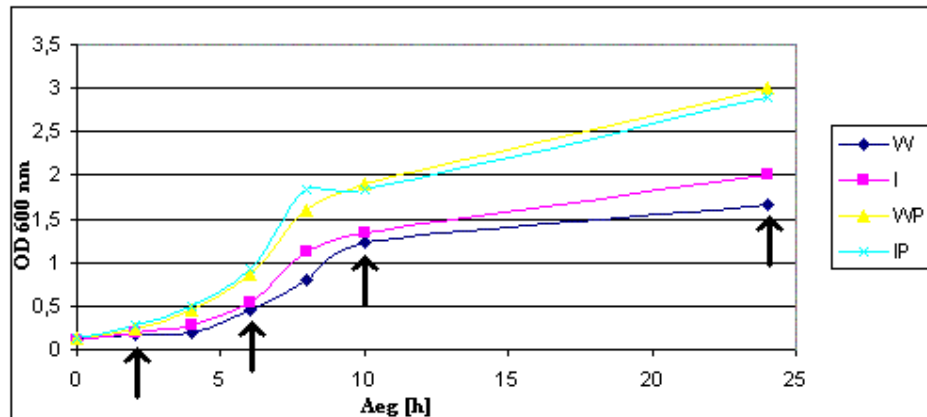
1990). Viimased on patogeenile süsiniku ja energia allikaks ning toimivad induktorina ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonil. Selliste väliskekkonnast tulevate signaalide vastuvõtmiseks on bakteril olemas spetsiifilised süsteemid, millest pole aga kuigi palju teada. Ühe võimalusena jõuab oligogalakturniidide mõju ekstratsellulaarsete ensüümideni läbi regulatoorsete geenide nagu AepA ja KdgR (Liu jt., 1993; Hugouvieux-Cotte-Pattat jt., 1996), tõenäoliselt pole need geenid aga ainsad PGA-mõju vahendajad ning vähe on teada ka sellest, millised kaudseid radu mööda jõuab PGA mõju ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesini (Marits jt., 2002).

Kuna PGA on taime (pektiini) osa, viib selle lisamine söötmesse meid sammukese lähemale keskkonnale, millega on patogeen taimes ümbritsetud.

Geeniekspressiooni profiili määramisel osutub vajalikuks proovide korjamine mitmest ajapunkst läbi kasvukõvera. *Ecc*-s määratakse patogeneesi algus taimes kvoorum sensing süsteemi poolt, OOHl koguneb aegamööda ning eksponentsiaalses kasvufaasis algab ekstratsellulaarsete ensüümide süntees. Seega avalduvad erinevates kasvufaasides erinevad geenid juba OOHl-st sõltuvalt, lisaks veel teised regulatsioonisüsteemid, mis kõik annavad väärtuslikku informatsiooni bakteris toimuva kohta. Näiteks *rsm*-süsteemi komponentide ekspressiooniprofiil on ajas erinev: kui *Ecc* mutandis SCC3065 saavutab *rsmA* ekspressioon maksimumi 6 tunnil, siis *rsmB* ekspressioon on kõrgeimal tasemel 10 tunnil ja *rsmC* ekspressioon hoopis 2 tunnil (Kõiv ja Mäe, 2001). Geeniekspressiooni mõõtmine vaid ühel ajapunktil võib viia ebatäpsetele järeldustele.

Ajas muutuvad ka kasvu (keskkonna)tingimused. Kui tingimuste muutumise kohta taimes on vähe teada, siis laboritingimustes muutub aja jooksul nii söötme koostis kui pH, mis kajastub ka geeniekspressioonis. Näiteks *E. chrysanthemi*'s on näidatud, et sõltuvalt söötme koostisest avaldub erinev Pel-ensüümide koosseis (Nachin and Barras, 2000).

Käesolevas töös korjati proovid RNA eraldamiseks 2, 6, 10 ja 24 tunnil (joonis 4).



Joonisel 4 on kujutatud proovide korjamiseks kasutatud tüvede kasvukõverad. Tüvesid kasvatati M9 minimaalsöötmes, millele lisati vajadusel PGA-d lõppconts.-ni 0,4%. W - SCC3193 metsiktüvi; I - SCC3065, *expI* mutant; P - PGA-ga indutseeritud kultuur. Noolega on näidatud ajapunktidel korjati kõikidest nimetatud kultuuridest proovid RNA eraldamiseks.

3.5. *Ecc* geeniekspressioon mikrokiibil

Ecc metsiktüve ja SCC3065 mutandi geeniekspressiooni mõõtmiseks erinevates ajapunktides ning PGA-ga indutseeritud tingimustes ja ilma hübridiseeriti proovid kokkuvõttes 36-le klaasile. Vaatamata pingutustele muuta hübridisatsioon võimalikult ühtlaseks üle kõigi klaaside, oli geeniekspressioonile vastavate fluorestsentsintensiivsuste kõikumine klaaside lõikes üsna suur. Tõenäoliselt tulenes see nii individuaalsete klaaside erinevusest kui juhuslikest erinevustest proovide märkimise protsessil. Signaalitugevused jäid üldiselt keskmisest madalamateks ning 10. tunnil võetud proovidele vastavatel klaasidel olid signaalid detekteerimiseks liiga nõrgad. Ülejäänud ajapunktides näitasid diferentsiaalset ekspressiooni vaid tugevalt ekspresseeruvad geenid. Diferentsiaalset ekspressiooni näitasid kokkuvõttes 82-st kiibile kantud geenist 29 (35%). Seda on siiski oodatust vähem, arvestades, et kõik mikrokiibile kantud geenid on arvatavalt seotud patogeeni virulentsusega ning OOHL-i puudumine SCC3065 mutandis viitab suurtele muutustele virulentsusfaktorite produktsioonis. Arvestades aga, et paljud varasemates töodes teiste meetoditega uuritud geenid näitasid samasuunalist diferentsiaalset ekspressiooni ka mikrokiibil, võib saadud andmeid pidada usaldusväärseks.

Kolmes järgmises antud peatüki alaosas peatutakse lühidalt neil geenidel, millel detekteeritud diferentsiaalne ekspressioon oli abiks mikrokiibilt saadud

tulemuste valideerimisel, s.t. tulemused kattusid varem saadutega, ning valikuliselt ka geenidel, mille diferentsiaalne ekspressioon on antud tingimustel huvipakkuv.

3.5.1. Diferentsiaalne ekspressioon ajas

Kasvufaasist tulenevate geeniekspressiooni muutuste hindamiseks võrreldi 6. ja 24. tunni tulemusi ehk siis geeniekspressiooni varases eksponentsiaalses faasis ning hilises statsionaarses faasis. Kuuenda ajapunkti tähtsust infektsiooniprotsessis näitab asjaolu, et just varases eksponentsiaalses faasis algab patogeeni ekstratsellulaarsete ensüümide produktisoon, millele taim vastab oma kaitsemehhanismide aktiveerimisega. Seega on see faas otsustav: kas patogeeni rünnak lüüakse tagasi või jätkub bakteri invasioon taime (Agrios, 1997). 24-ks tunniks pole infektsioon taimes sugugi lõppenud ning statsionaarses faasis tehtud katsed omavad seega patogeneesi uurimisel samuti kaalu. Kuna teadaolevalt pole paljude geenide puhul varem 24. tunnil *Ecc* tüves SCC3193 geeniekspressiooni RNA tasemel mõõdetud, saadi selles uurimuse osas huvipakkuvaid tulemusi.

Vaatamata tulemuste ebahütlusele võib öelda, et ekstratsellulaarsete geenide diferentsiaalne ekspressioon ajas oli ootuspärane. Kuna nimetatud geenide puhul on tegu mikrokiibi kõige kaalukamate kontrollidega, tõstab see tulemuste usaldusväärsuse kaalu. Varasemate tööde kohaselt ekspresseeruvad ekstratsellulaarsetest ensüümidest eksponentsiaalses faasis aktiivselt *prtW* ja *pehA*: proteaasi ekspressioon saavutab maksimumi 6h (Marits jt., 1999) ja polügalakturonaasil 8 h (Eriksson jt., 1998). Mikrokiibilt saadud tulemuste kohaselt ekspresseerusid ekstratsellulaarsete ensüümide geenid eksponentsiaalses faasis kaks kuni seitse korda (logaritmilises skaalas 0,5 kuni 3,5 korda) tugevamalt võrreldes statsionaarse faasiga, kusjuures vahe eksponentsiaalse ja statsionaarse faasi ekspressiooniaktiivsustes on suurem PGA-ga indutseeritud tingimustes (lisa 2). Sarnaselt varasemate katsetega ei näidanud *celS*, *pelW* ja *pehX* ekspressiooniaktiivsust ka mikrokiibil. Tsellulaasi sünteesi eest vastutav *celS* ning polügalakturonaasi eest vastutav *pehX* on *Ecc*-s küll isoleeritud, kuid nimetatud geenide ekspressiooni pole varasemates töödes suudetud näidata (Mäe jt., 1995; Kristi Pärt, 2000, bakalaureusetöö). *pelW* on aga isoleeritud vaid *E. chrysanthemi*'s, seetõttu pole meil selle avaldumise kohta *Ecc*-s täiendavaid andmeid (Shevchik jt., 1999).

Ekspponentsiaalses faasis indutseeritud sünteesi näitas ka *kduD*, mis kodeerib 2,5-diketo-deoksüglukonaat dehüdrogenaasi, ühte ekstratsellulaarsetest ensüümidest, mis osaleb pektiini lagundamise rajas (lisa 2). Kuna iga *erwinia* liik erineb teisest sünteesitavate ekstratsellulaarsete ensüümide komplekti poolest, on nimetatud geeni varem kirjeldatud vaid *Erwinia chrysanthemi* alamliikides (Chatterjee jt., 1985; Miamin jt., 2004). *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*'s kirjeldatakse *kduD* geeni antud töös esimest korda ning esialgu võib öelda vaid, et kooskõlas ülejäänud ekstratsellulaarsete ensüümidega on *kduD* süntees indutseeritud ekspponentsiaalses kasvufaasis.

Ekspponentsiaalses faasis näitasid suurenenud ekspressiooni ka *oxyR* ja *cpxR* geenid (lisa 2). *oxyR* geeni on põhjalikult uuritud *E. coli*'s, ning leitud, et tegemist on transkriptsioonifaktoriga, mis aktiveeritakse oksüdatiivse stressi tingimustes, enamasti peale 12 kasvatundi (Michan jt., 1999). CpxR on kahekomponendilise süsteemi CpxA/CpxR regulaatorvalk, mis *E. coli*'s osaleb erinevat tüüpi rakukesta stresside tunnetamisel. Süsteemi ülesandeks on aidata bakteril üle elada ebasoodsaid tingimusi nagu kuumashokk, oksüdatiivne stress, kõrge pH ja statsionaarsesse faasi sisenemine (De Wulf jt., 1999). Huvitaval kombel antud töös detekteeriti mikrokiibil mõlema geeni suurenenud RNA-tase just ekspponentsiaalses kasvufaasis.

Ainuke seni teadaolev statsionaarse faasi geen *Ecc-s*, statsionaarse faasi sigma faktorit kodeeriv *rpoS*, ekspresseerus 24-l tunnil kuni 4 korda aktiivsemalt kui 6-l tunnil (lisa 2). RpoS on transkriptsioonifaktor, mis reguleerib paljude statsionaarses faasis avalduvate geenide ekspressiooni, mille produkte vajatakse ellujäämiseks stressi tingimustes (Venturi, 2003). Kuigi *Ecc-s* mõjutab RpoS kaudselt ka ekstratsellulaarsete geenide ekspressiooni, vajatakse seda rohkem stressi tingimustes ellujäämiseks kui taime edukaks nakatamiseks (Andersson jt., 1999). *E. coli*'s on välja selgitatud, et RpoS on kasvavates rakkudes väga ebastabiilne, kuid see stabiliseeritakse statsionaarsesse faasi sisenemisel või osmootse stressi korral (Lange ja Hengge-Aronis, 1994; Muffler jt., 1996b). Sellest võib järeldada, et *rpoS* regulatsioon võib toimuda nii transkriptsioonilisel kui valgu tasemel. Vastukäivaid tulemusi annavad ka eksperimentaalsed andmed: Anderssoni jt. väitel *Ecc-s* *rpoS* ekspressioon statsionaarses faasis väheneb, samas kui Wei jt. poolt mõõdeti *E. coli* statsionaarses faasis *rpoS*-l just suurenenud ekspressioon (Andersson jt., 1999; Wei jt., 2001)

Huvipakkuvad olid aga *expI*, *expA*, *car* ja *rscC* ekspressiooniprofiilid (lisa 2).

expI ekspressiooniaktiivsust pole seni teadaolevalt LuxI-LuxR süsteemi omavates organismides 24. tunnil vaadatud. Mikrokiibilt saadud tulemuste kohaselt kasvab *expI* ekspressioon statsionaarses kasvufaasis kuni 3 korda (lisa 2). Tulemus on huvipakkuv, teades, et ExpI on OOHL-i süntetaas ning et OOHL koguneb eksponentsiaalse faasi supernatanti, kuid statsionaarses faasis väheneb OOHL-i hulk kiiresti (Holden jt., 1998). Seletus sellistele vastukäivatele andmetele võiks leiduda Byers'i jt. avaldatud uurimuses (Byers jt., 2002). Nimetatud töös näidati, et OOHL-i degradatsioon statsionaarses faasis on mitte-ensümaatiline ning sõltub supernatandi pH-st. OOHL muutub ebastabiilseks pH vahemikus 7-8, samas kui Luria-Bertani söötmes tõuseb kultuuri pH statsionaarses kasvufaasis 8,5-ni. See võiks olla ka üheks põhjuseks, miks *expI* ekspressioon statsionaarses kasvufaasis suureneb, samas kui OOHL-i hulk supernatandis väheneb.

Huvipakkuv oli ka *expA* suurenenud ekspressioon statsionaarses kasvufaasis (lisa 2). ExpA ja ExpS on homoloogid GacS/GacA-le, mis moodustavad kahekomponendilise regulatsioonisüsteemi ning mille homoloogid on laialt levinud gramnegatiivsetes bakterites kui signaalivahendajad väliskeskkonnast (Heeb ja Haas, 2001; Eriksson jt., 1998). SCC3193 tüves mõjutab ExpA ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi positiivselt, tehes seda vähemalt osaliselt *rsmA* kaudu (Hyytiäinen jt., 2001). *expA* oodatust kõrgem ekspressioon statsionaarses faasis on kindlasti huvipakkuv ning vajab edasist uurimist, kuna siiani on nimetatud valku siiski seostatud vaid ekstratsellulaarsete ensüümide indutseerimisega. Viimaste süntees toimub peaaesjalikult eksponentsiaalse faasi lõpus ning statsionaarse faasi alguses, millest lähtuvalt võib oletada, et ExpA-l võiks olla veel teine funktsioon, mida praegu veel ei teata. Kahjuks ei õnnestunud detekteerida muutusi *expS*-i RNA-tasemes, arvatavalt *expS*-i madalama ekspressioonitaseme tõttu.

Statsionaarses faasis näitas suurenenud ekspressiooniaktiivsust ka *car* geen (lisa 2). *car* geeni produkt reguleerib sellise bakteriotsiini nagu karotovoriitsiini sünteesi *Ecc* tüves Er, mis ühe virulentsusfaktorina aitab kaasa mädaniku tekkele taimes (Hamon ja Peron 1961). Teistes erwiniates, s.h. meie poolt uuritavas *Ecc* tüves SCC3193 pole antud bakteriotsiini sünteesi näidatud, seega annab antud geeni leidmine ning ekspressiooniaktiivsuse detekteerimine meie tüves põhjust edasisteks uuringuteks, selgitamaks välja *car* geeni võimaliku funktsiooni.

Statsionaarses kasvufaasis näitas suurenenud ekspressioonitaset ka *rscC* (lisa 2). Rcs süsteem koosneb sensoritest RcsF ja RcsC, regulaatorist RcsB ning fosfaatrühma ülekandjast YojN (Gervais ja Drapeau, 1992; Takeda jt., 2001). *Erwinia amylovora*'s reguleerib Rcs süsteem eksopolüsahhariidide sünteesi, *E. coli*'s aga näiteks liikuvust (Kelm jt., 1997; Takeda jt., 2001). Varem uuritu põhjal peaks *rscC* ekspressiooni käivitama keskkonna stiimulid nagu näiteks osmootne šokk. Süsteemi ülejäänud geenid olid samuti kantud mikrokiibile, kuid nende diferentsiaalset ekspressiooni ei detekteeritud.

3.5.2. PGA mõju diferentsiaalsele ekspressioonile

Varasemate uurimuste kohaselt indutseerib PGA lisamine söötmesse ekstratsellulaarsete ensüümide ekspressiooni, kuid siiani pole teada, milline on PGA-st lähtuv rada, mis viib ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi induktsioonile. PGA mõju regulaatorgeenidele on väga vähe uuritud.

Mikrokiibilt saadud tulemuste kohaselt oli ekstratsellulaarsete ensüümide ekspressioon tõepoolest aktiivsem selles *Ecc* kultuuris, mis oli kasvatatud PGA juuresolekul. PGA-st lähtuv induktsioon oli kõige suurem 6. ajapunktil ning metsiktüves SCC3193 (lisa 3). Teadaolevalt toimub ekstratsellulaarsete ensüümide süntees küll kõige aktiivsemalt hilises eksponentsiaalses ja varases statsionaarses faasis, kuid kuna käesolevas töös oli võimalik võrrelda vaid varast eksponentsiaalset ning hilist statsionaarset kasvufaasi, jäi nii ekspressiooni kui PGA induktsiooni laeks 6. tund, mis on antud tingimustel kooskõlas ka varasemate töödega, 24. tunniks on suur osa PGA-st tõenäoliselt söötmes ära lagundatud (Saarilahti jt., 1990; Mäe jt., 1995; Marits jt., 1999).

Vähesel määral on induktsiooni märgata ka *Ecc* mutandis SCC3065, mis toodab ekstratsellulaarseid ensüüme väga madalal tasemel ning on avirulentne (lisa 3). HSL-vahendatud regulatsioonisüsteem pole ainus, mis ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi reguleerib. PGA mõju avaldub teadaolevalt AepA ja KdgR kaudu, jõudes seeläbi ekstratsellulaarsete ensüümideni ka HSL⁻ mutandis. Nimetatud mutandis võib toimuda PGA vahendatud induktsioon ekstratsellulaarsetele ensüümidele, mis on suhteliselt samas suurusjärgus metsiktüves toimuva induktsiooniga, kuid ekstratsellulaarsete ensüümide absoluutne hulk on HSL⁻ mutandis kordades väiksem võrreldes metsiktüvega. Teiseks on välja pakutud ka idee, et SCC3065 võib olla vähemalt osaliselt ka sekretoorne mutant, raku sees pole

ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni kunagi mõõdetud (andmed pole avaldatud). See oleks samuti seletusks ekstratsellulaarsete ensüümide mRNA tasemel toimuvale PGA induktsioonile. Erinevalt metsiktüvest säilib ExpI mutandis vähenenud PGA induktsioon ekstratsellulaarsete ensüümide puhul ka 24. tunnil (*pehA*, *celIV*, *priW*), kuna ExpI mutant lagundab PGA-d tunduvalt aeglasemalt ning võrreldes metsiktüvega on seda söötmes säilinud suuremal hulgal.

Kuna PGA mõju reguleerijatele geenidele on siiani väga vähe uuritud, saadi ka selles töö osas huvipakkuvaid tulemusi, nimelt indutseeris PGA selliste regulaatorgeenide nagu *hexA*, *rsmB* ning *expA* ekspressiooni (lisa 3). Nii *hexA* kui *expA* kohta on teada märklaudgeenid, mille ekspressiooni nad mõjutavad, kuid teada pole nimetatud regulaatorite enda avaldumist mõjutavaid signaale. ExpA on üks osa ExpS/ExpA kahekomponendilise süsteemi, mis vahendab rakku signaale ümbritsevast keskkonnast (Eriksson jt., 1998). Kuna *Erwinia* poolt nakatud taime keskkonnas esineb kahtlemata taime raku seinaga komponendi pektiini lagundamisel tekkivat PGA-d, võiks ka PGA olla üheks signaaliks, mille olemasolu keskkonnas ExpA rakku vahendab.

rsmB induktsiooni PGA poolt pole samuti varem näidatud. PGA induktsioon võiks *rsmB*-ni jõuda näiteks KdgR regulaatorvalgu vahendusel. Nasser jt. näitasid, et *kdgR* ekspressioon on PGA poolt repressiivne ning kuna KdgR mõjutab omakorda negatiivselt *rsmB* transkriptsiooni, võiks PGA positiivne mõju sellist teed mööda kaudselt *rsmB*-ni jõuda (Nasser jt., 1992; Liu jt., 1999). Kuid eespool nimetatud regulatsiooniskeem oleks kindlasti vaid üks võimalikest variantidest.

Huvitaval kombel on PGA poolt indutseeritud ka *flhC/flhD*, geenid, mille kontrolli all on *E. coli*'s flagella biosüntees (Aizawa ja Kubori, 1998; lisa 3). Tõenäoliselt on ka PGA induktsioon see, mis varjutab *flhC* ja *flhD* suurenenud ekspressiooniaktiivsuse statsionaarses faasis (lisa 2 ja 3). *Ecc* tüve SCC 3193 virulentsuse üheks oluliseks osaks on liikuvus, mitteliikuvate mutantide virulentsus on repressiivne, kuigi nad toodavad ekstratsellulaarseid ensüüme metsiktüvega võrreldaval tasemel (Pirhonen jt., 1991). Järelikult võiks PGA induktsioon mõjutada tõesti liikuvust kui üht olulist virulentsusfaktorit, millist teed mööda, jääb praegu aga selgusetuks.

3.5.3. Diferentsiaalne ekspressioon HSL⁻ mutandis võrreldes metsiktüvega

SCC3065 on *Ecc* mutant, mis ei tooda autoinduktorit, milleks SCC3193-s on OOH_L, ning sellest tulenevalt ka ekstratsellulaarseid ensüüme (Pirhonen jt., 1993). Need ekstratsellulaarsed ensüümid, mis üldse näitasid detekteerimisläve ületavat ekspressiooniaktiivsust, andsid ka töö selles osas eelnevate uurimustega kooskõlas olevaid tulemusi: *pehA*, *celV* ja *priW* ekspresseerusid metsiktüves kuni kolm korda (logaritmilises skaalas 1,5 korda) aktiivsemalt kui HSL⁻ mutandis (lisa 4).

Ainsana rsm-süsteemist näitas diferentsiaalset ekspressiooni *rsmB* kui rsm-süsteemi kõige kõrgema ekspressioonitasemega geen (lisa 4). Meie poolt uuritavas tüves on varem küll näidatud suurenenud *rsmB* RNA taset SCC3065 mutandis, kuid viidatud sealjuures asjaolule, et moodustuv *rsmB*-RsmA kompleks stabiliseerib *rsmB* RNA-d. Kuna aga HSL⁻ mutandis on RsmA tase 4 korda kõrgem kui metsiktüves, suureneb seal ka *rsmB*-RNA hulk (Kõiv ja Mäe, 2001). Varasemates uurimustes pole *Ecc* HSL⁻ mutandis suurenenud *rsmB* ekspressiooni näidatud (Cui jt., 2000). Küll aga on selline regulatsiooniskeem kindlaks tehtud *E. coli*'s, mis omab *Ecc* rsm-süsteemile analoogset csr-süsteemi. RsmA homoloog CsrA reguleerib seal *rsmB* homoloogi *csrB* ekspressiooni (Pernestig jt., 2001; Suzuki jt., 2002). Ei tohi aga unustada, et RsmA pole ainus regulaator, mille tase *Ecc* HSL⁻ mutandis muutub ning *rsmB* on peale RsmA mõjutatud veel mitmete regulaatorite poolt, millest kõik pole tõenäoliselt veel teadagi (Chatterjee jt., 2002; Hyytiäinen jt., 2001). Igal juhul on mikrokiibilt saadud tulemus intrigeeriv ja vajab kindlasti edasist uurimist.

Kahjuks jäi allapoole detektsioonitaset enamike meile huvipakkuvate regulaatorgeenide (*rsmC*, *rsmA* ja *expR*) ekspressioon.

Antud töös kirjeldatud mikrokiibile on kantud *Ecc* virulentsusega seotud geenide fragmendid ning nende RNA-taset mõõdeti *Ecc* avirulentses mutandis, mis ei tooda HSL-i.. Seega oleks teoreetiliselt võinud teatud ajapunktis või teatud tingimustel diferentsiaalset ekspressiooni näidata pea iga kiibile kantud geen. Reaalselt olid erinevused RNA tasemes aga 28 geenil. Tõenäoliselt ei suutnud me teatud osa geenide diferentsiaalset ekspressiooni detekteerida seetõttu, et signaalid jäid keskmisest madalamateks. Küll aga näitasid varem põhjalikult uuritud geenid (näiteks ekstratsellulaarsete ensüümide geenid) kiibil sellist ekspressioonimustrit, mis oli kooskõlas varasemates töödes saadud tulemustega. Seetõttu võib saadud andmeid olla küll oodatust vähem, kuid kõigi eelduste kohaselt võib neid pidada usaldusväärseteks. Samal põhjusel (madalad fluorestsentsintensiivsused) tuleks geeniekspressiooni väärtuste interpreteerimisel pöörata tähelepanu mitte niivõrd kordsuste absoluutväärtustele, kuivõrd tendentsidele, s.t. kas RNA tase on suurenenud või vähenenud. Andmete võrdlemisel teiste töögruppide poolt saadud tulemustega saab niikuinii vaadata vaid tendentse. Vasil on läinud oma seisukohtades veelgi kaugemale, väites, et mikrokiibilt saadud tulemustes ei saa kunagi vaadata absoluutväärtusi nimetatud tehnoloogia äärmise tundlikkuse tõttu juba väikestele variatsioonidele (Vasil 2003).

Kiibile kanti muuhulgas 31 meie laboris erinevate meetoditega identifitseeritud, eeldatavalt patogeeni virulentsusega seotud geeni. Diferentsiaalset ekspressiooni näitas neist ühel või teisel moel vaid 6 – *rek*, *kduD*, *flhC*, *flhD*, *pelX* ja *cys*. Enamus neist geenidest on „välja püütud“ katsetes OOHL⁻ mutandiga.

Ei tohiks unustada, et antud töös kasutatud meetoditega saab hinnata ainult teatud geenile vastavat mRNA hulka antud ajahetkel. See ei ütle meile aga midagi geeni ekspressiooniaktiivsuse, valgu hulga või valgu aktiivsuse kohta. Järelikult annab mikrokiibilt saadud informatsioon meile ainult lähtepunkti edasisteks uuringuteks, mitte vastuseid valmis kujul.

Üheks paljudest aspektidest, mis meid mikrokiibi tehnoloogia juures huvitas, oli küsimus, kas on võimalik mõõta ka madalal tasemel ekspresseeruvate regulaatorgeende RNA taset. Praeguse hetke seisuga väidame, et usaldusväärseid tulemusi oodates pole see võimalik. Siiski jätkame tööd juba välja töötatud tehnoloogia täiustamiseks.

Esiteks on kavas lisada kiibile nn. sisemisi positiivseid kontrole, *housekeeping* geene või geene mõnest teisest organismist, näiteks *A. thaliana*'lt.

Kindlasti peaks need geenid esindama erinevaid ekspressioonitasemeid, kuna juhul kui kasutada *housekeeping* geene normaliseerimisel, on kordades erinev RNA tase potentsiaalseks vea tekitajaks.

Teiseks on plaanis jätkata tööd ka sobivamate hübridisatsioonitingimuste välja töötamiseks.

Juba tehtud eksperimentide käigus on selgeks saanud, kui suurt tähtsust omab proovina kasutatava RNA kvaliteet ning ühtsus proovi märkimise ning hübridisatsiooni erinevate etappide läbiviimisel. Järelikult tuleks need etapid samaaegselt läbi viia võimalikult suure hulga proovidega, mis välistaks eksperimentide läbiviimisest tuleneva potentsiaalse vea allika.

Üle tuleks vaadata ka andmetöötluse pool, kuna bioinformaatika on kiiresti arenev valdkond, mis pakub järjest uusi ja paremaid lahendusi kiibilt saadud suure hulga andmete käsitlemiseks. Sealjuures on muidugi selge, et halva kvaliteediga kiibilt saadud tulemusi ei tee ükski normaliseerimismeetod lõpuni usaldusväärseks, mistõttu tuleks põhirõhk panna siiski eksperimentaalse poole täiustamisse, hilisem andmetöötluse ulatus ning keerukus on juba soovituslikuma iseloomuga.

Kokkuvõte

Erwinia carotovora subsp. *carotovora* virulentsus põhineb rea virulentsusfaktorite koordineeritud ekspressioonil. Geenide omavaheliste seoste ning seeläbi ka patogeneesi mehhanismide tundmaõppimist hõlbustab oluliselt geeniekspressiooni mikrokiipide kasutamine, mis võimaldab samaaegselt tuhandete geenide RNA-taseme mõõtmist erinevates tingimustes.

Nimetatud põhjustel disainiti ja valmistati taimepatogeenile *Ecc* spetsiifiline geeniekspressiooni mikrokiiip. Kiibile kanti 80 *Ecc* geenile vastavat PCR-fragmenti, 3 kontrollfragmenti *Arabidopsis thaliana* ja 2 *Escherichia coli* genoomilt, eeldades, et kõik kiibil vaadeldavad *Ecc* geenid on seotud patogeeni virulentsusega. Välja töötati ka proovi märkimis- ja hübriidisatsiooniprotokoll. Geeniekspressiooni mõõdeti võrdlevalt metskitüves SCC3193 ning *Ecc* avirulentses mutandis SCC3065 (ExpI⁻). Mõlemaid tüvesid kasvatati indutseerimata ja indutseeritud tingimustes PGA juuresolekul ning proovid korjati erinevates kasvufaasides.

Saadud tulemuste kõrvutamine varem traditsiooniliste geeniekspressiooni mõõtvate meetoditega saadud tulemustega andis kinnitust, et detekteeritud diferentsiaalne geeniekspressioon on tõepärane. Töös kirjeldatud meetod töötab hästi küll kõrgelt ekspresseeruvate geenide korral, kuid katsete tulemusena ei õnnestunud detekteerida madalalt ekspresseeruvate geenide RNA-taset. Viimati nimetatud küsimuse lahendamiseks jätkub aga juba välja töötatud tehnoloogia arendamine.

Summary

The virulence of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is based on coordinated production of high levels of multiple exoenzymes, which are coregulated by transcriptional and posttranscriptional factors. DNA microarray technology has been applied to study differential gene expression in bacteria.

In the present study we used DNA microarray technology to elucidate the possible interaction between different genes. An array consisting of 80 PCR fragments specific to *Ecc* genes involved in virulence, 3 control-sequences of *Arabidopsis thaliana* ja 2 sequences specific to *Escherichia coli* was generated. The protocol of labeling and hybridization for probe was also developed. Gene expression was detected comparatively in *Ecc* wildtype SCC3193 and in avirulent mutant SCC3065 (ExpI⁻). Both strains were grown in induced conditions with PGA and in uninduced conditions, cells were harvested in different growth-phases.

The previous studies by other groups who studied the expression of virulence factors in *Ecc* under the same conditions support our results obtained by using the DNA microarray technology. We have already started experiments to improve the technique for detection genes which expression level is low.

Tänuõnad

Eelkõige sooviksin tänada Viia Kõivu ning Andres Mäed, kelle juhendamisel antud töö teoks sai. Tänuõnad kuuluvad ka Ants Kurele, Tõnis Orgile ning Viljo Soole biotehnoloogia õppetoolist, samuti firmale Asper, kus valmisid töös kasutusel olnud mikrokiibid.

Samuti soovin tänada toredat laborikollektiivi, kes alati nõu ja jõuga abiks olid.

Lisad

Lisa 1. Märklaudivärestuste amplifitseerimiseks kasutatud praimerid.

Geen	5' praimer	3' praimer
AEPA	CATGCATGAAAGTGCGATGC	CGCAAAAGCGTCTAAAATCG
ARAC	ATCGACGCATTTTTATGGG	CGTGAGAAATAGAGCTGATC
ASC	GTGGATATTCCAGGCCATTG	GTAGATAACGGCATCGC
BAH	TGTTGCACTGATTGCTGCG	GGTTTCTCGGCTTTGTGTG
CAR	AGAATGGTTAAGGGGCAATC	TATTCGGCGTCATCAGCTTC
CELS	TGCAGACTGTGAATACCCAG	TCATCAATTGTCGGTAGGC
CELV	GTGTAGTAACAACGATGCTG	TGACTTCCAGCGCATAAGG
CPXR	AGATAGTCGATAACACCATTG	CGAGATATGCATTTCGATCG
CYS	GTGAACCTTCAGCAACTGAAG	CGAATCCTGTGCGCTACAGCG
DCUC	AATCACCGTACTGGTAATCTG	GATGTGCGCTTCACTACCTA
DCUR	AATCGATTTGGTACTGCTGG	GTGTCAGACAGGTAAATCAG
DCUS	ATTACGCTCTCCATCAGTG	GCTTTGCTGATAAGGAATAG
DSBA	GAAAAGATTATGGCTTGCGC	TAACGAACATGGCAGGAACAC
EMBR	GGCAATTGTGCTCTTGCCGC	TGGTGCCGTAATCTGCTCTG
EXPA	GACGCATTCTTGACGATATC	GCTTGCTAAACATACGGTAG
EXPI	GGATAGGCTGAATTGGGCGG	AAGACAGTGGCCACTCTCGC
EXPL	AGGGATAGACGTTGATGTTG	CCGTTGGTTTAATCGATAGC
EXPM	ATTAGATGCGCTAAGTATTC	GTTTACCTGCTTTAATAACG
EXPR	TTGATCCTGTGGTCATTGCAG	TCGATGCCAAGTCTGATCGC
EXPS	TTTCGTACAATAAGCTGCAC	TCAGTTCGTGTGACATATTC
FIS	TGACAGAACTATGTTCAGAAC	AGTTCATGCCGTACTTTTTTC
FLHC	GAAACTCAGTTAAGTCGCGG	TTACAGGCTCAGACTGCGTG
FLHD	AAACATAGCCTGCGGGATG	ATGCCCTTTTCTTAGGCAGG
FLMD	GTGATTATCTTGATTTAGTG	ATCTATTGTAATAGCAGTAC
GROEL	GCTGGTTATCGTTGCTGAAG	CCGTATTCTTCAGTTGCAGC
GROES	GTGATCGTCAAGCGCAAAG	TTACGCTTCAACAATTGCCAG
HEXA	TATGACCAGTGCAAATCGAC	GGAGAACTGCGTAATAACAC
HEXR	TTACATGGCCCTTGTCGTATG	GACGGCGGCGACATCCAGAC
HEXY	TACATAGCATGATGCAGAGG	TTACGATGCCAGATTTGTCTG
HNS	TCGATAAATAACCATCGGG	CTTTTTTACCGTTCTCAAGC
HOR	GAATTGCCATTAGGATCTG	CGCTTGATTCTCATGTAATG
HY26	TTAATTGGAGAGATGATG	AACATCAGTTGGTTCATC
INH	TGTATGGCAAGTAGTCTG	TGTCAGGGCTGTTTGTG
KDGRA	ATGGCTAGTGACAGTTTAG	ATTCGACAGTCGACAGAAC
PELB	ATGACACCATGCTGATGCTG	TGGTTGCTGCATCTTCACAG
KDUD	CTAAGTATTGTGCTTACAG	GATGAACTGGCGCGCAAC
LEXA	AAGGCAGCAGCAGGTTTATG	CTGTTACGAATCACGCCAAC
MINN	TCAATACTGTTCACTACG	GAAAGGCATGGGTTAATG
NEU	AACCGTTTTGTGGTAAGCCG	GGCGGCGGTTGCATAAATG
NUOB	AGAGCCGGACGGTGAGAATG	AGCAACAGCGCTTGCATGTAG
OMPA	CTGATGTCAACAACAACCC	ACGTCAGATTTACGCGTG
RSMB	GGACACCTCCAGGAAGGAGAC	TTGCATCCCTGCTCATCCGTG
ORF2	AGAAGCATGGCGCAGATTGG	TCACTGCGCATCAACCAAATC
OUT	ATCTATGGCACGATTGCAAGC	GTCGCTTCTTCTCCTGATAC
OXYR	CAGTGGACAGATTCGTAAAC	CGGAAATGCGTATCTTCATC
PEHR	AAGCTGCCTATTCTGGTACTGACTG	TCATACGCAGCCTGAGGGTGTATCA
PEHS	GGTTATTACCTGCATCGCGCTAGC	TCACCCCTCATTCTGGCTGAGGTT
PEHX	GGGCACGATTGATGGTAATGGC	CATGCCCGGGCACGG

PELB	ATGACACCATGCTGATGCTG	TGGTTGCTGCATCTTCACAG
PELW	TTACGCCATTGCTGGCAG	ATTAACGCGATGTAACAGCG
PELX	GACACAATGAAACGTTGTTC	TTGTTCCACGGTAATATCAG
PRT47	ATTAACGCTGCTATTTCTGG	CTGCGTACACGCATTTATAG
PRT70	TGGCATTACCCATCGTCTTC	AACACCTTTTCCAGCCAGC
PRTW	GTAACCTACACCCGTG	ACGTATCATTACCAC
PSTS	TGAAACCGATGCGTACCACTC	AGCTGGTGAACACGAAAGACG
QAC	AGAAAGCAGTCATGGCTGTG	TTCATCTGCGCCCATTTTAG
RCSB	GTAATTATTGCCGACGACC	CAGCACTTCAACTTCTTTC
RCSC	CCTCGGTAGGCGGCTATC	ATACGCAGAATACAGATGCC
RCSF	ATCCTTAATGCGTGCTGTTC	GCAAACGACTTGGCTATAGC
RDGA	AAACGACACTTGCAGAACG	AGAGCTTTCCATCAATGATGC
PEHA	GAATATCAATCAGGCAAGCGCG	GGCGTTATTACAGCGCGTAG
REK	GAGTGTGCGGTGCTCTGATTC	ACGCGGARAACACAGGAGTC
REXZ	GAATATATTCCAACAGCTCG	GTCAAATACTCAAAGGTGC
RPFA	ATGACCAAATACAGTCTTCG	AAAGATAACAGCAGTAGGAG
RPOS	TGGCAGAGGAAGATACC	ATGCGGTTGACGTCATC
RSMA	GGTTATACCATCGTCTAGGTTTACG	GCGAACACGAGACGCATTG
RSMC	GATGCAGAGGAAACAATGAGTC	GCCAGATAATCTCCGATCATTG
S12	TGGCAACAGTTAACCAGCTG	GCCTGCTTACGGTCTTTAAC
SAL	TCGTGAGGCATGCCCGTG	TCAGACAGTGCAATATGGTC
SEK	GCCATCGTTATAATCCTG	GATTCAATCACCTCGGC
SENS	AGCAGATGTGTGTTTATCTG	ATCATCGGTAGTGCAATGTC
STR	ATTTTGATCGGCCCTGG	CGCGGTAGTCAGTTTATC
TRF	TTATCATCAGCCACTAACGG	GGATTGTTACTGACGATA
TSP	TCTGCGTGCCAAAGTCGATC	ATTCCGAGGTGATCTCCGTC
TUFB	CGTTAACGTCGGTACTATCG	AGCAGAACCACGAACGATCG
UGPA	AGTTACCGCATGACATCATC	AGGCGGCTGGCACGAATGAC
UGPB	ACAGATGGCTGACTACAC	TTCTGGTGCCATTACAGCG
XYL	CGAAGCGCAAGGCGGAC	TCGGTATTGAGCAGCGTTAC
YGI	GTGATGACAGTTGGGTAC	AGTTTACGAATCTGCTTCAC
YIBQ	GCGACAAAAGCCCACCAG	TCTGCTGTAAGACACGGATG
YIEA	CATCGGTATGCAGGTAATAC	ATTTCCACATGACGAGTCGG
YOJN	TGTTGCCACGATTGAATC	AACGCATCCGTTTTCTGACC
YTF	TGACTTATCAGTTGGTGCGG	TTGTTGCGATCCGCACCGCG

Lisa 2. Geenide diferentsiaalne ekspressioon *Ecc* tüvede SCC3193 ja SCC3065 erinevates kasvufaasides. Geenide diferentsiaalse ekspressiooni leidmiseks erinevates ajapunktes jagati omavahel 6. ja 24. tunnil vastavad geeniekspressiooni väärtused. Suurenenud ja vähenenud geeniekspressioon on esitatud vastavalt positiivse või negatiivse logaritmina jagatisest; tühjad ruudud- diferentsiaalset geeniekspressiooni ei detekteeritud. W – SCC3193 metsiktüvi; I – SCC3065 mutant; P-PGA-ga indutseeritud kultuur; number tähistuses – proovi võtmise aeg (h).

Geen	Log ₂ W6/W24	Log ₂ WP6/WP24	Log ₂ I6/I24	Log ₂ IP6/IP24	Funktsioon
kduD	0,8	0,8	1,2	2,8	deoksüglükonaadi dehüdrogenaas
flhC	-1,2		-1,5		viburite sünteesi regulaator
flhD	-0,8		-1,8		viburite sünteesi regulaator
rscC	-1,3	-2	-2	-2,8	kahekomponendilise süsteemi sensor
expA	-1,5	-1	-2		kahekomponendilise süsteemi regulaator
rdgA	-1,8	-2	-1,8	-1,2	transkriptsioonifaktor
car	-2,5	-2	-3	-2,3	oletatav karotovoriitsiini sünteesi regulaator
aepA	-0,8	-0,9	-1,2		ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi regulaator
hor	-0,8	-0,9	-1,2		ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi regulaator
groEL	-0,8		-1,5	-0,5	kuumashoki valk (tšaperon)
oxyR	2,6	2,6	3	2	transkriptsiooni aktivaator
cpxR	2,4	1,3	2,7	1,8	kahekomponendilise süsteemi regulaator
ugpA	0,9	1,2	0,8	0,9	membraanseoseline valk (G3P transport)
expl	-0,8	-1	-1,5	-0,7	OOHL-i süntetaas
pehA	1,9	3,5		1,3	polügalakturonaas
rpoS	-1	-2	-0,8	-0,5	statsionaarse faasi sigma faktor
pelX		0,7		1,5	pektaatlüaas
sek		0,6		0,5	Proteaasi sekretsioonivalk
celV		2	0,5		tsellulaas
prtW		2,2		1,2	proteaas
inh		1		0,5	proteaasi inhibiitor

Lisa 3. Geenide diferentsiaalne ekspressioon *Ecc* tüvedes SCC3193 ja SCC3065 indutseeritud tingimustes PGA juuresolekul. Geenide diferentsiaalne ekspressioon PGA mõjul leiti, jagades sama ajapunkti PGA-ga indutseeritud geeniekspressiooni väärtused indutseerimata väärtustega. Suurenenud ja vähenenud geeniekspressioon on esitatud vastavalt positiivse või negatiivse logaritmina jagatisest; tühjad ruudud-diferentsiaalset geeniekspressiooni ei detekteeritud. W – SCC3193 metsiktüvi; I – SCC3065 mutant; P-PGA-ga indutseeritud kultuur; number tähistuses – proovi võtmise aeg (h)

Geen	Log ₂ WP2/W2	Log ₂ IP2/I2	Log ₂ WP6/W6	Log ₂ IP6/I6	Log ₂ WP24/W24	Log ₂ IP24/I24	Funktsioon
flhC			1	1,8			viburite sünteesi regulaator
flhD			1	1,7			viburite sünteesi regulaator
expA			0,7	1,6	0,8		kahekomponendilise süsteemi regulaator
groEL			1,2	0,8	0,7		kuumashoki valk (tšaperon)
oxyR			-1,9		-0,5	0,6	transkriptsiooni aktivaator
cpxR			-1,7		-0,6	0,8	kahekomponendilise süsteemi regulaator
pehA	1,2	1,4	1,5	1,7	-0,9	0,7	polügalakturonaas
rpoS					1		statsionaarse faasi sigma faktor
pelX			1	2,2			pektaatlüaas
sek			1,2				proteaasi sekretsioonivalk
celV	0,6		1,3	0,7		0,8	tsellulaas
prtW	1,2	0,9	2,1	2,2		0,5	proteaas
inh			0,9	0,7		0,6	proteaasi inhibiitor
rsmB	1,2		1,2	0,6	1,8		regulatoorne RNA
ompA				-1			välismembraani valk, sekretsioonisüsteem
out			0,8	1,2	0,6		tüüp II sekretsiooniraja valk
cys		0,6	0,6	0,9			transkriptsioonifaktor
rek	0,9	0,8					rekombinatsioonivalk
hexA			0,7	1,2			virulentsusfaktorite regulaator
pstS				-1,2			fosfaat-spetsiifiline transportsüsteem, periplasmaatiline fosfaati siduv valk

Lisa 4. Geenide diferentsiaalne ekspressioon SCC3193-s võrreldes SCC3065-ga. Geenide diferentsiaalne ekspressioon SCC3193-s võrreldes SCC3065-ga leiti, jagades SCC3193-le vastavad geenide ekspressiooni väärtused sama ajapunkti SCC3065-le vastavate ekspressiooni väärtustega. Suurenenud ja vähenenud geeniekspressioon on esitatud vastavalt positiivse või negatiivse logaritmina jagatisest; tühjad ruudud-diferentsiaalset geeniekspressiooni ei detekteeritud. W – SCC3193 metsiktüvi; I – SCC3065 mutant; P-PGA-ga indutseeritud kultuur; number tähistuses – proovi võtmise aeg (h)

Geen	Log ₂ W2/I2	Log ₂ WP2/IP2	Log ₂ W6/I6	Log ₂ WP6/IP6	Log ₂ W24/I24	Log ₂ WP24/IP24	Funktsioon
aepA					-0,7	-0,5	ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi regulaator
oxyR		-0,6	1	-0,6	1,3	0,5	transkriptsiooni aktivaator
cpxR				-1,3	0,7		kahekomponendilise süsteemi regulaator
pehA	0,5		1,5	1,5	0,8	-0,7	polügalakturonaas
celV			0,8	1,4	0,9		tsellulaas
prtW			1	1,2	1		proteaas
inh				0,8	0,6		proteaasi inhibiitor
rsmB	-0,75		-1,8	-1,7	-2,2	-0,5	regulatoorne RNA
pelB			0,8	0,8			pektaatlüaas
pstS		-0,45	-0,8				fosfaat-spetsiifiline transportsüsteem, periplasmaatiline fosfaati siduv valk

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adams, M.H. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers Inc., NY. 445-447.
- Agrios, G.N. 1997. In Plant Pathology. 4th edition. New York: Academic press.
- Aizawa, S.I. and Kubori, T. 1998. Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells*. **3**:625-34
- Andersson, R.A., Eriksson, A.R.B., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A., and Palva, T. 2000. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR_{Ecc}*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **13**:384-393.
- Andersson, R.A., Kõiv, V., Norman-Setterblad, C. and Pirhonen, M. 1999. Role of RpoS in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology* **145**:3547-56.
- Arfin, S.M., Long, A.D., Ito, E.T., Toller, L., Riehle, M.M., Paegle, E.S. and Hatfield, G.W. 2000. Global gene-expression profiling in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem*. **38**:29672-29684
- Barras, F., van Gijsegem, F., and Chatterjee, A.K. 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol*. **32**:201-234.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E. and Silverman, M.R. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol*. **9**:773-86.
- Bauchop, T. and Elsdon, S.R. 1960. The growth of microorganisms in relation their energy supply. *J. Gen. Microbiol*. **23**:469-475
- Bell, K.S., Sebaihia, M., Pritchard, L., Holden, M.T., Hyman, L.J., Holeva, M.C., Thompson, N.R., Bentley, S.D., Chuscher, L.J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, D., Clark, C., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M.A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G.P., Birch, B.R., Parkhill, J., Toth, I.K. 2004. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **101**:11105-10
- Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P. and Welch, M. 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *J. Bacteriol*. **184**:1163-71.
- Cao, J.G. and Meighen, E.A. 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J. Biol. Chem*. **264**:21670-6.
- Carpousis, A.J., Vanzo, N.F. and Raynal, L.C. 1999. mRNA degradation: a tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet*. **15**:24-28
- Case-Green, S.C., Mir, K.U., Pritchard, C.E. and Southern, E.M. 1998. Analysing genetic information with DNA arrays. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **2**:404-410
- Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol*. **134**:1141-1156
- Chatterjee, A., Cui, Y. and Chatterjee, A.K. 2002. RsmA and the quorum-sensing signal, N-[3-oxohexanoyl]-L-homoserine lactone, control the levels of *rsmB* RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability. *J. Bacteriol*. **184**:4089-95.

- Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C.K. and Chatterjee, A.K. 1995. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1959-1965.
- Chatterjee, A.K., Thurn, K.K. and Tyrell, D.J. 1985. Isolation and characterization of Tn5 insertion mutants of *Erwinia chrysanthemi* that are deficient in polygalacturonate catabolic enzymes oligogalacturonate lyase and 3-deoxy-D-glycero-2,5-hexodiulosonate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **162**:708-14.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczar, I., Bassler, B.A. and Hughson, F.M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* **415**:545-9.
- Collmer, A. and Keen, N.T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**:383-409.
- Coplin, D.L. and Cook, D. 1990. Molecular genetics, of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant -Microbe Interact.* **3**:271-279.
- Cui, Y., Mukherjee, A., Dumenyo, C.K., Liu, Y. and Chatterjee, A.K. 1999. *rsmC* of the soft-rotting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and hairpin_{Ecc} production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA-binding protein (RsmA). *J. Bacteriol.* **181**:6042-6052.
- Cui, Y., Chatterjee, A., and Chatterjee, A.T. 2000. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and hairpin_{Ecc}. *Mol. Plant -Microbe Interact* **4**(14): 516-526.
- Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N. And Chatterjee, A.K. 2005. ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **187**:4792-803.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell to cell signals in the development of bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298
- de Kievit, T.R. and Iglewski, B.H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**:4839-4849
- deLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. 2001. DNA microarray based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5239-5247
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K.N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6568-72.
- De Saizieu, A., Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Mous, J. 1998. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **16**:45-48
- De Wulf, P., Kwon, O., Lin, E.C. 1999. The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *J. Bacteriol.* **181**: 6772-6778

- Diehn, M and Relman, A. 2001. Comparing functional genomic datasets: lessons from microarray analyses of host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:95-101.
- Eberhard, A., Burlingame, A., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neilson, K.H. and Oppenheimer, N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-2449.
- Eisen, M.B. and Brown, P.O. 1999. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* **303**:179-205.
- Eriksson, A.R.B., Andersson, R.A., Pirhonen, M., and Palva, E.T. 1998. Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**:743-752.
- Ferea, T.L., Brown, P.O. 1999. Observing the living genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**:715-722.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Kõiv, V., Karlsson, M., Heikinheimo, R., and Palva, E.T. 2000. A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:447-455.
- Frederick, R.D., Chiu, J., Bennetzen, J.L., Handa, A.K. 1997. Identification of a pathogenicity locus, *rpfA*, in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that encodes a two-component sensor-regulator protein. *Mol. Plant Microbe Interact* **6**:407-415.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.
- Gervais, F.G. and Drapeau, G.R. 1992. Identification, cloning, and characterization of *rcsF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation ftsZ84 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**:8016-22.
- Harrington, C.A., Rosenow, C. and Retief, J. 2000. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:95-101.
- Harris, S.J., Shih, Y., Bentley, S.D., Salmond, G.C.P. 1998. The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Molecular Microbiology* **28**(4):705-717.
- Heeb, S. and Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**:1351-63.
- Heikinheimo, R., Flego, D., Karlsson, M., Pirhonen, M., Eriksson, A., Mäe, A., Kõiv, V., and Palva, E.T. 1995. Characterization of novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:207-217.
- Heilbronn, J., Johnston, D., Dunbar, B. and Lyon, G. 1995. Purification of a metalloprotease produced by *Erwinia carotovora* spp. and the degradation of potato lectin *in vitro*. *Physiol. Mol. Plant Physiol.* **47**:285-292.
- Holden, M.T., McGowan, S.J., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. and Salmond, G.P. 1998. Cryptic carbapenem antibiotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile trans activation by the *carR* transcriptional regulator. *Microbiology* **144**:1495-508.
- Hughes, T.R., Roberts, C.J., Dai, H., Jones, A.R., Meyer, M.R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T.R., Kidd, M.J., Friend, S.H., Marton, M.J. 2000.

- Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* **25**:333-7.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Gondemine, G., Nasser, W., Reverchon, S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:213-257.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M. and Palva, E.T. 2001. Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-*rsmB* system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact.* **14**(8):931-8
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.L. 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* **12**:2477-2482.
- Kelm, O., Kiecker, C., Geider, K., Bernhard, F. 1997. Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylorovan biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Mol. Gen. Genet.* **256**:72-83
- Kotoujansky, A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**:405-430.
- Kõiv, V., and Mäe, A. 2001. Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors by modulating *rsmA* gene expression in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Gen. Genet.* **265**:287-292.
- Kyöstiö, S. R. M., Cramer, C.L. and Lacy, G. H. 1991. *Erwinia carotovora* *alaml*. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene. *J. Bacteriol* **173**:6537-6546.
- Lander, E. 1999. Array of hope. *Suppl Nat Genet* **21**:3-4
- Lange, R. and Hegge-Aronis, R. 1994. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* **8**:1600-12.
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., and Chatterjee, A.K. *kdgREcc* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin*Ecc*, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* **181**:2411-21.
- Liu, Y., Murata, H., Chatterjee, A., Chatterjee, A.K. 1993a. Characterization of a novel regulatory gene *aepA* that controls extracellular enzyme production in the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**:299-308.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A., and Chatterjee, A.K. 1998. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* **29**:219-234.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* **14**:1675-1680
- Lucchini, S., Thompson, A. and Hinton J.C.D. 2001. Microarrays for microbiologists. *Microbiology* **147**:1403-1414
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E., Mäe, A. 1999. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon

- mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology* **145**:1959-1967.
- Marits, R., Tshuikina, M., Pirhonen, M., Laasik, E. And Mäe, A. 2002. Regulation of the expression of *prtW::gusA* fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiology* **148**:835-42.
- Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of Bacterial Bioluminescence. *Microbiol. Rev.* **55**:123-142.
- Meighen, E.A. 1994. Genetics of bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* **28**:117-139.
- Miamin, V.E., Pesniakovich, A.G. and Prokulevich, V.A. 2004. Genetic regulation of pathogenicity and virulence factors in *bacteria Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*: phenotypic characteristic of bacteria with the mutant *kduD* gene. *Genetika* **40**:1194-9
- Michan, C., Manchado, M., Dorado, G., Pueycó, C. 1999. In vivo transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress. *J Bacteriol.* **181**:2759-64.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Mok, K.C., Wingreen, N.S. and Bassler, B.L. 2003. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.* **22**:870-81.
- Muffler, A., Traulsen, D.D., Lange, R. and Hegge-Aronis, R. 1996. Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:1607-13.
- Mukherjee, A., Cui, Y., Ma, W., Liu, Y., Ishihama, A., Eisensark, A. and Chatterjee, A.K. 1998. RpoS (Sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, hairpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. *J. Bacteriol.* **180**:3629-2634.
- Murata, H., Chatterjee, A., Collmer, A., Chatterjee, A.K. 1991. Molecular cloning of an *aepA* gene that activates production of extracellular pectolytic, cellulolytic, and proteolytic enzymes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:239-246.
- Mäe, A., Heikinheimo, R., Palva, E.T. 1995. Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celV* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* **247**:17-26.
- Nachin, L. and Barras, F. 2000. External pH: an environmental signal that helps to rationalize *pel* gene duplication in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:882-6.
- Nasser, W., Reverchon, S., and Robert-Baudouy, J. 1992. Purification and functional characterization of the KdgR protein, a major repressor of pectinolysis genes of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **6**:257-265.
- Okinaka, Y., Yang, C.-H., Perna, N.T. and Keen, N.T. 2002. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**:619-629
- Pernestig, A.K., Melefors, O. and Georgellis, D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**:225-31.
- Perombelon, M.C.M. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**:361-387.

- Pesci, E., Pearson, J., Seed, P. and Iglewski, B. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **179**:3127-3132
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E.T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. EMBO J. **12**:2467-2476.
- Pirhonen, M., Heino, P., Helander, I., Harju, P. and Palva, E.T. 1988. Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. Microb. Pathog. **4**:359-67.
- Plastow, G.S. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectin methyl esterase gene of *Erwinia chrysanthemi* B374. Mol. Microbiol. **2**:247-254.
- Posas, F., Takekawa, M., Saito, H. 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. Curr. Opin. Microbiol. **1**:175-82.
- Postier, B.L., Wang, H-L., Singh, A., Impson, L., Andrews, H.L., Klahn, J., Li, H., Risinger, G., Pesta, D., Deyholos, M., Galbraith, D.W., Sherman, L.A. and Burnap, R.L. 2003. The construction and use of bacterial DNA microarrays based on an optimized two-stage PCR strategy. BMC Genomics **4**:23
- Pärt, Kristi. Eksopolügalakturonaas PehX *Erwinia carotovora* alamliik *carotovora* tüves SCC3193. Bakalaureusetöö, Tartu 2000.
- Quackenbush, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. Nat. Genet. Suppl. **32**:496-451
- Rexova-Benkova, L., and Markowic, O. 1976. Pectic enzymes. In advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. New York: Academic Press. **33**: 328-385.
- Rosenow, C., Saxena, R.M., Durst, M. and Gingeras, T.R. 2001. Procaryotic RNA preparation methods useful for high density array analysis: comparison of two approaches. Nucleic Acids Res. **29**:E112.
- Russell, D.R. and Bennett, G.N. 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *Escherichia coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. Gene **20**:231-243
- Saarilahti, H.T., Pirhonen, M., Karlsson, M.-B., Flego, D., Palva, E.T. 1992. Expression of *pehA-bla* gene fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and isolation of regulatory mutants affecting polygalacturonase production. Mol. Gen. Genet. **234**:81-88.
- Saarilahti, H.T., Henrissat, B., and Palva, E.T. 1990b. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Gene **90**:9-14.
- Schena, M., Shalon, D., Davies, R.W. and Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science **270**:467-70.
- Schena, M. 2003. Microarray analysis. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 125-220
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T. and Greenberg, E.P. 2003. Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcription analysis. J. Bacteriol. **185**:2066-2079
- Sherlock, G. 2000. Analysis of large-scale gene expression data. Curr. Opin. Immunol. **12**:201-205
- Shevchik, V.E., Kester, H.C., Bene, J.A., Visser, J., Robert-Baudouy, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N. 1999. Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. J. Bacteriol. **181**:1652-63.

- Surette, M.G., Miller, M.B. and Bassler, B.L. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:1639-44.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, B. and Romeo, T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:5130-40.
- Taga, M.E. and Bassler, B.L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **12**:14549-54.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. And Mizuno, T. 2001. A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC→YojN→RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Mol. Microbiol.* **40**:440-450
- Talaat, A.M., Hunter, P. and Johnston S.A. 2000. Genome-directed primers for selective labeling of bacterial transcripts for DNA microarray analysis. *Nat. Biotechnol.* **18**:679-682
- Tamayo, P., Slonim, D., Mesirov, J., Zhu, Q., Kitareewan, S., Dmitrovsky, E., Lander, E.S. and Golub, T.R. 1999. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:2907-12.
- Thomson, N.R., Nasser, W., McGowan, S., Sebaihia, M. and Salmind, G.P.C. 1999. *Erwinia carotovora* has two kdgR-like proteins belonging to the IclR family of transcriptional regulators: identification and characterization of the RexZ activator and the KdgR repressor of pathogenesis. *Microbiology* **145**:1531-1545.
- Tseng, G.C., Oh, M-K., Rohlin, L., Liao, J.C. and Wong, W.H. 2001. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* **29**:2549-2557
- Törönen, P., Kolehmainen, M., Wong, G. and Castren, E. 1999. Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS* **451**:142-6.
- Vasil, M.L. 2003. DNA microarrays in analysis of quorum sensing: strengths and limitations. *J. Bacteriol.* **185**:2061-2065
- Venturi, V. 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol. Microbiol.* **49**:1-9.
- Wagner, E.V., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. and Iglewski, B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriology* **185**: 2080-2095
- Walton, J.D. 1994. Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* **104**:1113-1118.
- Wandersman, C., Delepelaire, P., Loeffe, S., Schwartz, M. 1987. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Echerichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**:5046-5053.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Microbiology. Reviews.* **25**:365-404.
- Whiteley, M., Lee, K.M. and Greenberg, E.P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:13904-13909
- Withers, H., Swift, S., Williams, P. 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Microbiology. Reviews.* **4**:186-193.

- Xavier, K.B. and Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:191-7.
- Yu, J., Othman, M.I., Farjo, R., Zarepars, S., MacNee, S.P., Yoshida, S. and Swaroop, A. 2002. Evaluation and optimization of procedures for target labeling and hybridization of cDNA microarrays. *Molecular Vision* **8**:130-7
- Yue, H., Eastman, P.S., Wang, B.B., Minor, J., Doctolero, M.H., Nuttall, R.L., Stack, R., Becker, J.W., Montgomery, J.R., Vainer, M. and Johnston, R. 2001. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 2001 **29**:E41-1.
- Yuen, T., Wurnbach, E., Pfeffer, R.L., Ebersole, B.J., Sealfon, S.C. 2002. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **30**:e48.

