

TARTU ÜLIKOOL

Bioloogia-geograafia teaduskond

Molekulaar- ja rakubioloogia instituut

Geneetika õppetool

Liis Andresen

Rcs signaaliülekanne süsteemi roll taimepatogeeni

***Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum* virulentsuses**

Magistritöö

Juhendaja: Andres Mäe, Ph. D.

Tartu 2007

Sisukord

Lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 <i>Pectobacterium carotovorum</i> aml. <i>carotovorum</i>	6
1.2 Kahekomponendilised süsteemid.....	9
1.2.1 Klassikalised kahekomponendilised süsteemid	9
1.2.2 Kahekomponendilised süsteemid, mis erinevad klassikalistest.....	12
1.3 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne	12
1.3.1 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne <i>Bacillus subtilis</i> Kin-Spo-süsteemis	13
1.3.2 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne <i>E. coli</i> Arc-süsteemis	13
1.3.3 Rcs signaaliülekanne süsteem	14
1.3.3.1 Rcs süsteemi fosfaadiülekandes osalevad valgud	15
1.3.3.2 Rcs süsteemi abivalgud.....	17
1.3.3.3 <i>Enterobakterite</i> Rcs signaaliülekanne mudel	18
1.3.3.4 Rcs süsteemi sihtmärgid	19
2. MATERJAL JA METOODIKA	23
2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.	23
2.2 Söötmed ja kasvatamine	24
2.3 Mutantsete tüvede konstrueerimine ja isoleerimine	24
2.4 ARB PCR.....	25
2.5 Kloneerimine.....	26
2.6 Transformatsioon.....	26
2.7 Plasmiidse DNA eraldamine.....	27
2.8 Sekveneerimine	27
2.9 Plasmiidide pMW119::rcsB _{Pcc} ja pLACFw-rcsF _{Pcc} konstrueerimine.....	27
2.10 Ensüümi aktiivsuse määramine	28
2.10.1 Proovide kogumine.....	28
2.10.2 Polügalakturonaasi aktiivsuse määramine	28
2.10.2.1 Reaktiivid	28
2.10.2.2 Määramine.....	29
2.10.3 Pektaatlüaasi aktiivsuse määramine.....	29
2.10.4 Proteaasi aktiivsuse määramine.....	29
2.11 Virulentsuse määramine.....	30
2.12 Liikuvuse määramine	30
3. TULEMUSED.....	31
3.1 Isoleeritud transposoonmutantides on inaktiveeritud geenid rcsC, rcsD ja rcsB.....	31
3.2 Pcc-i genoom kodeerib Rcs süsteemi abivalku RcsF	32

3.3	<i>Rcs süsteemi mõju taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioonile indutseerimata tingimustes.....</i>	33
3.4	<i>Rcs süsteemi mõju taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioonile indutseeritud tingimustes.....</i>	35
3.5	<i>rcsF-i üleekspressioon represseerib ekstratsellulaarsete ensüümide</i>	37
	<i>produktsiooni Rcs süsteemi vahendusel</i>	37
3.6	<i>Rcs süsteem mõjutab Pcc-i liikuvust</i>	37
3.7	<i>Rcs süsteem mõjutab Pcc-i virulentsust kartulil</i>	38
4.	ARUTELU	39
	Kokkuvõte	44
	Summary	45
	Tänuavaldused	47
	Kasutatud kirjandus.....	47

Lühendid

ah	aminohape
Amp	ampitsilliin
Cel	tsellulaas
Cm	klooramfenikool
CMC	karboksümetüülselluloos
EDTA	dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat
HPt	histidiini sisaldav fosfaatrühma ülekande domään (ik. <i>histidine containing phosphotransmitter</i>)
HSL	homoseriinlaktoon
HTH	ik. <i>helix-turn-helix</i>
Km	kanamütsiin
LB	Luria-Bertani sööde
nt	nukleotiid
<i>Pcc</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> alaml. <i>carotovorum</i>
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
Peh	polügalakturonaas
Pel	pektaatlüaas
PGA	polügalakturoonhape
Pnl	pektiinlüaas
pNPG	p-nitrofenüül- β -D-glükuroniid
Prt	proteaas
<i>rcs</i>	ik. <i>regulator of capsule synthesis</i>
Tris	trisaminometüülhüdrosümetaan
TSA	trüptoon soja agar
WT	metsiktüvi (ik. <i>wild-type</i>)

Sissejuhatus

Homo sapiens alaml. *sapiensi* (nüüdisinimene) peamiseks toiduallikateks on mitmesugused taimeorganid. Toiduks olulisi taimi ründavad pidevalt mitmesugused taimepatogeeneid, mis muudavad meie peamise toiduallika söögi- ja müügikõlbmatuks. Üks levinumaid taimepatogeene on *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum* (*Pcc*), mis põhjustab kaubanduslikult olulistel taimedel taimehaigust nimega märgmädanik. Märgmädanik hävitab aastas tonnide viisi puu-, juur- ja köögivilju. Selleks, et selle tüüka patogeeniga võidelda, tuleb välja töötada meetodeid, mis suudaksid kaitsta taimi *Pcc*-i rünnakute eest. Üheks võimaluseks on konstrueerida transgeenseid taimi, mis toodavad molekule, mis suruvad maha *Pcc*-i infektsiooni taimes. Kuid enne, kui saab hakata transgeenseid taimi konstrueerima, on vaja välja selgitada *Pcc*-i virulentsuse regulatsioonimehhanismid. Virulentsuse regulatsioonist aru saamine annab võimaluse kasutada patogeenis leiduvaid regulaatoreid virulentsuse mahasurumiseks peremeestaimes.

Käesoleva töö ülesandeks oligi leida *Pcc*-i virulentsust mõjutavaid regulaatoreid.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum*

Pectobacterium carotovorum alaml. *carotovorum* (*Pcc*), endise nimega *Erwinia carotovora* alaml. *carotovora*, on laialt levinud taimepatogeen. *Pcc*-il on väga lai peremeestaimede ring. *Pcc* põhjustab taimehaigust, mida nimetatakse märgmädanikuks. Iga aasta nakatab *Pcc* tonne puu-, juur- ja köögivilju muutes need müügi- ja söögikõlbmatuks (Pérombelon, 2002). Märgmädanikku põhjustavad ka teised fütopatogeensed bakterid ja ka osad seened, nagu näiteks bakteritest *Erwinia chrysanthemi* ja *Pseudomonas fluorescens* ning seentest *Rhizopus* perekonda kuuluvad liigid (Agrios, 1997). Märgmädanikku põhjustavate bakterite poolt tekitatud kahju on raske täpselt hinnata, kuid erinevate allikate põhjal arvatakse, et märgmädanik põhjustab suuremat majanduslikku kahju kui ükski teine bakteriaalne haigus.

Pcc on võimeline nakatama kõiki taime osi. Patogeen ise ei ole aga võimeline taime tungima, vaid kasutab taime nakatamiseks kohti, kus taime epidermis on kahjustatud. Taimerakkude vahelises ruumis patogeen paljuneb kiiresti ning hakkab tootma oma peamisi virulentsusfaktoreid, ekstratsellulaarseid ensüüme, mis on võimelised lagundama taimerakkude kesklamelli pektiini sisaldavaid komponente ning põhjustab sellega taimekudede pehmenemise ehk matseratsiooni. Pekiini laguproduktide kontsentratsiooni kasv apoplastis põhjustab taimerakkudes veekaotust. Tekkinud limane mass, mis koosneb põhiliselt hukkunud taimerakkudest ja bakteritest, valgub kahjustatud taimest välja ning sattudes pinnasesse või tervetele taimedele, võib põhjustada märgmädaniku kiiret levikut (Agrios, 1997).

Pcc-i peamisteks virulentsusfaktoriteks on ekstratsellulaarsed ensüümid, mis lagundades taimeraku kesta komponente, võimaldavad bakterite levikut taimes ning varustavad haigustekitajat toitainetega kogu infektsiooniprotsessi vältel (Pérombelon ja Kelman, 1980; Pérombelon, 2002). Nendeks olulisteks ensüümideks on pektinolüütilised ensüümid: pektiini lagundavad pektaatlüaasid (Pel), pektiinlüaas (Pnl) ja polügalakturonaas (Peh), tselluloosi lagundamise eest vastutavad tsellulaasid (Cel) ning ekstratsellulaarne proteaas, mis võib lagundada nii taimeraku valgulisi komponente kui

ka taime kaitsevalke (Pirhonen jt., 1991; Heikinheimo jt., 1995; Mäe jt., 1995; Marits jt., 1999; Mattinen jt., 2004).

Virulentsusfaktorite produktsioon on erinevates fütopatogeensetes bakterites väga täpselt reguleeritud. Ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni täpne reguleerimine on *Pcc*-s vajalik selleks, et ühelt poolt vältida taime kaitsereaktsioonide käivitumist infektsiooni varases staadiumis, teiselt poolt aga varustada patogeeni täiendavate süsinikuallikatega rakkude paljunedes. *Pcc*-i ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni on kontrollitud mitmete nn. globaalsete regulaatorite poolt, mis moodustavad omavahel interakteeruva keeruka regulatoorse süsteemi.

Üks olulisemaid globaalseid ekstratsellulaarsete ensüümide geenide ekspressiooni mõjutavaid süsteeme on hulga tunnetusel (ik. „quorum sensing”) põhinev regulatsioonisüsteem. Hulga tunnetust kirjeldati esmakordselt *Vibrio fischeri*, kus see kontrollib bioluminessentsi nähtuses osalevate valkude sünteesi (Eberhard jt., 1981; Whitehead jt., 2001, ülevaateartikkel). *Pcc*-s moodustavad hulga tunnetusel põhineva süsteemi kolm geeni, milledest *expI* (autoinduktori süntetaas) määrab HSL(homoseriinlaktoon)-tüüpi autoinduktori sünteesi ja *expR1* ning *expR2* geenide poolt kodeeritud valgud osalevad autoinduktori äratundmises (Pirhonen jt., 1993; Andersson jt., 2000; Sjöblöm jt., 2006). Kui HSL-i kontsentratsioon rakus/keskkonnas saavutab teatud kindla väärtuse, toimub selle seondumine valkudega ExpR1 ja ExpR2. ExpR1-HSL ja ExpR2-HSL kompleksid seonduvad nende poolt kontrollitava(te) geeni(de) promootorpiirkonnaga. *Pcc*-s ei mõjuta hulgatunnetus ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni otse, vaid läbi Rsm regulatsioonisüsteemi (Sjöblöm jt., 2006).

Rsm regulatsioonisüsteemi põhiliseks komponendiks on mRNA-de stabiilsust mõjutav valk RsmA (Liu jt., 1995; 1997). Lisaks kuulub sellesse süsteemi veel *rsmA* transkriptsiooni reguleeriv valk RsmC ja regulatoorne *rsmB* RNA (Cui jt., 1995, 1999; Liu jt., 1998). *rsmB* RNA moodustab komplekse RsmA valguga, vähendades vaba RsmA hulka rakus (Liu jt., 1997). Lisaks RsmC-le osalevad *rsmA* transkriptsiooni regulatsioonis ka valgud ExpR1 ja ExpR2. Populatsiooni madala tiheduse juures (kui ei ole moodustunud ExpR1-HSL ja ExpR2-HSL komplekse) mõjutavad ExpR1 ja ExpR2 positiivselt *rsmA* ekspressiooni. HSL-tüüpi autoinduktori seondumisel blokeeritakse ExpR1-e ja ExpR2-e seondumine *rsmA* promootoriga, mistõttu väheneb *rsmA*

ekspressioon (Sjölöm jt., 2006). *rsmA* ekspressiooni vähenemine põhjustab suuremat ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni (Chatterjee jt., 1995; Cui jt., 1995). Seega moodustavad hulga tunnetus ja Rsm regulatsioonisüsteem ühtse regulatsioonivõrgustiku, mis tagab ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni siis, kui bakteripopulatsioon on saavutanud nakatunud taimekoos teatud arvukuse.

Meie poolt uuritavas *Pcc*-i tüves SCC3193 on kirjeldatud veel vähemalt kahte globaalset regulatsioonisüsteemi, mis mõjutavad ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni sõltuvalt keskkonnast tulevatest signaalidest. Üks selline kahekomponendiline regulatsioonisüsteem koosneb sensorvalgust ExpS ja vastuse regulaatorist ExpA (Eriksson jt., 1998). Millised on selle regulatsioonisüsteemi aktivatsiooniks vajalikud väliskeskkonnast tulevad signaalid, ei ole praeguseks veel lõplikult selge. Ühe võimalusena arvatakse, et sensorvalgu poolt äratuntavateks signaalmolekulideks võivad olla pektiini lagundamisel tekkivad oligogalakturniidid. Sensorvalgult kantakse fosfaatrühm üle vastuse regulaatorile ExpA. Aktiveeritud ExpA mõjutab positiivselt *rsmB* geeni ekspressiooni, mis omakorda suurendab rakus *rsmB* RNA hulka ja vähendab vaba RsmA hulka. Seega moduleerib ka kahekomponendiline regulatsioonisüsteem ExpS/ExpA ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni Rsm süsteemi vahendusel. Siiani ei ole selge, kas ExpA seondub vahetult *rsmB* geeni promootorile või on tema mõju kaudne (Hyytiäinen jt., 2001).

Teine kahekomponendiline regulatsioonisüsteem PmrA/PmrB mõjutab ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi sõltuvalt keskkonna pH-st ja Fe-ioonide kontsentratsioonist (Hyytiäinen jt., 2003).

Lisaks eelpool kirjeldatud regulatsioonisüsteemidele osaleb ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni regulatsioonis ka repressorvalk KdgR. KdgR seondub taimeraku kesta lagundavate ensüümide geenide promootoraladele ning takistab nende transkriptsiooni. KdgR-i seondumist märklaudgeenide regulaatorpiirkonnas paikneva KdgR-boxiga mõjutab pektiini laguproduktide olemasolu keskkonnas. Nimelt võivad pektiini lagunemisel tekkinud oligogalakturniidid seonduda KdgR valguga ja takistada viimase seondumist DNA-ga (Liu jt., 1999).

1.2 Kahekomponendilised süsteemid

Bakterid peavad pidevalt kohanema neid ümbritseva pidevalt muutuva keskkonnaga. Selleks kasutavad bakterid keskkonnast tulevate signaalide vastuvõtmiseks ja edasi kandmiseks rakus nn. kahekomponendilisi süsteeme (Stock jt., 2000). Esimesena kirjeldati kahekomponendilist signaaliülekande süsteemi bakterites 1986-ndal aastal (Ninfa ja Magasanik, 1986). Praeguseks on selge, et kahekomponendilised süsteemid on bakterites väga levinud ning tõenäoliselt moodustavad omavahel interakteerudes suuri signaaliülekande võrgustikke (Eguchi ja Utsumi, 2005).

Enamus tuntud baktereid omavad genoomis kahekomponendilisi süsteeme kodeerivaid geene. Näiteks *Escherichia coli* (*E. coli*) tüve K12 genoom kodeerib üle 30-ne erineva kahekomponendilise süsteemi. Samas esineb ka selliseid baktereid, milledes kahekomponendilised süsteemid puuduvad, näiteks *Mycoplasma genitalium* ja *Methanococcus jannaschii* (Mizuno, 1998).

Kahekomponendilised süsteemid on vajalikud mitmete erinevate väliskeskkonnast tulevate signaalide edastamiseks. Näiteks aitavad kahekomponendilised süsteemid ära tunda peremeesorganismi lähedust sümbiontidel, kohaneda keskkonnas esinevate toitainete ja elektronakseptorite hulgaga ning keskkonna osmolaarsusega. Samuti on kahekomponendilised süsteemid olulised bakterite kemotaksises ning stressi poolt indutseeritud diferentseerumises (sporulatsioon; Parkinson ja Kofoid, 1992).

1.2.1 Klassikalised kahekomponendilised süsteemid

Kahekomponendilise süsteemi prototüübiks on *E. coli* EnvZ/OmpR kahekomponendiline süsteem, mis osaleb osmoregulatsiooni, viburi moodustumise ja virulentsusega seotud protsessides (joonis 1a; Goh jt., 2004). Klassikaline kahekomponendiline süsteem koosneb kahest valgust: sensorvalgust ja vastuse regulaatorist (Stock jt., 2000). Klassikalise kahekomponendilise süsteemi sensorvalgus on bakterites sisemembraani seotud histidiinkinaas, mis omab kahte funktsionaalselt olulist domääni: sisenddomääni ja autofosforülatiooni/dimerisatsiooni domääni. Sisenddomään on oluline keskkonna tunnetamiseks ning

autofosforülatsiooni/dimerisatsiooni domään osaleb signaali edastamises. Klassikalise kahekomponendilise süsteemi teine komponent, vastuse regulaator, omab samuti kahte funktsionaalset domääni: vastuvõtu domääni ja DNA-d siduvat efektordomääni (Mizuno, 1998). Vastuvõtu domään katalüüsib signaali vastuvõtmist sensorvalgult ja vastuse regulaatori efektordomään reguleerib transkriptsiooni sihtmärkgeenide promootoritelt seondudes spetsiifilistele järjestustele (Parkinson, 1993; Hoch, 2000).

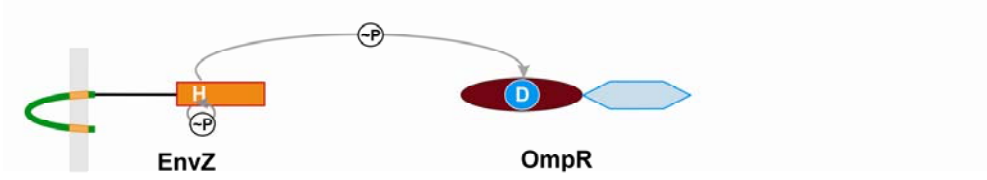
Signaaliülekanne protsessi klassikalises kahekomponendilises süsteemis võib jaotada kolmeks etapiks (joonis 1a):

- 1) signaali vastuvõtmine keskkonnast. Klassikalise sensorvalgu sisenddomään asub periplasmas, kust see on võimeline keskkonnast tulevat signaali tunnetama. Vastuseks keskkonnast tulevale signaalile toimub sensorvalgu autofosforülatsiooni/dimerisatsiooni domäänis konserveerunud histidiini jäägi (H) autofosforüleerumine (Stock jt., 2000);
- 2) signaali ülekanne sensorvalgult vastuse regulaatorile. Signaali ülekandeks sensorvalgult vastuse regulaatorile kasutatakse fosforülatsiooni reaktsiooni. Fosfaatrühma ülekannet sensorvalgu autofosforülatsiooni/dimerisatsiooni domäänilt vastuse regulaatorile katalüüsib vastuse regulaatori vastuvõtudomään. Selles protsessis fosforüleerub vastuvõtudomääni konserveerunud aspartaadi jääk (D; Stock jt., 2000);
- 3) signaali jõudmine sihtmärkgeenideni. Klassikalised kahekomponendilised süsteemid mõjutavad rakus toimuvaid protsesse reguleerides sihtmärkgeenide transkriptsiooni. Vastuse regulaatori fosforüleerumine peale sensorvalgu autofosforüleerumist, põhjustab struktuuri muutusi vastuse regulaatoris, mille tulemusel viimane on võimeline suurema affiinsusega seonduma sihtmärkgeenide promootoraladele ning reguleerima transkriptsiooni (Mizuno, 1998). Vastuse regulaatorid inaktiveeruvad katalüüsides fosfaatrühma hüdrolyüsi vastuvõtudomäänidelt (Stock jt., 2000). Samuti on võimelised vastuse regulaatoreid inaktiveerima osad sensorvalgud ja

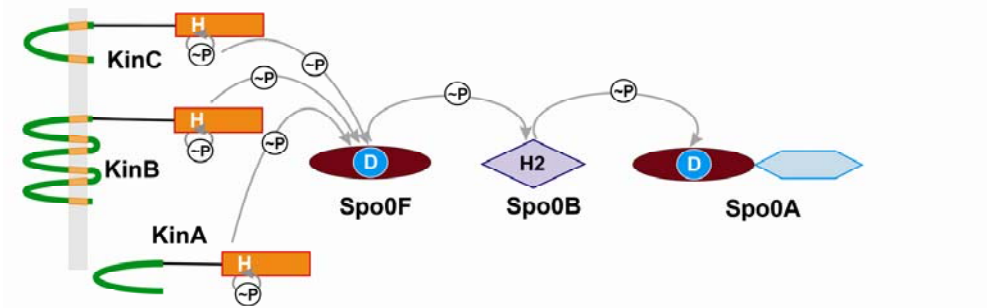
tsütoplasmaatilised fosfataasid (Kato jt., 1989; Bourret jt., 1991; Perego jt., 1994; Mizuno, 1998; Stock jt., 2000).

Kokkuvõtteks võib öelda, et klassikalistes kahekomponendilistes süsteemides toimub keskkonnast tulevate signaalide toimel transkriptsiooniregulaatorite aktiivsuse reguleerimine muutes vastuse regulaatori fosforüleerituse taset.

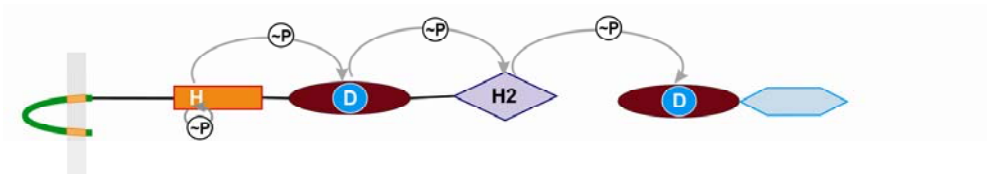
a) Klassikaline kahekomponendiline süsteem EnvZ/OmpR (*E. coli*)



b) *Bacillus subtilis* sporulatsiooni kontrolliv mitmeastmeline signaaliülekanne süsteem



c) Hübridset sensorvalku ArcB sisaldav mitmeastmeline signaaliülekanne süsteem *E. coli*s



Joonis 1. Kahekomponendiline ja mitmeastmeline signaaliülekanne bakterirakus.

Joonisel on näidatud sensorvalkude sisenddomäänid (roheline), mis vastutavad keskkonnast tulevate signaali ära tundmise eest. Hall vertikaalne triip tähistab bakteri sisemembraani. Oranž ristkülik sümboliseerib histidiinkinaasid domääni, konserveerunud histidiini jäägiga (H). Pruun ellips tähistab aspartaati sisaldavat klassikalist vastuvõtu domääni, romb histidiini sisaldavat (H2) fosfaatrühma ülekande domääni (HPt) ning sinine kuusnurk DNA-d siduvat efektordomääni. Fosfaatrühma ülekande suund vastuseks keskkonnast tulevale signaalile on näidatud nooltega. a) Klassikaline kahekomponendiline süsteem EnvZ/OmpR; b) Kin/Spo-süsteem *Bacillus subtilis*; c) Arc-süsteem *E. coli*s.

1.2.2 Kahekomponendilised süsteemid, mis erinevad klassikalistest

Lisaks klassikalistele kahekomponendilistele süsteemidele esineb bakterirakus kahekomponendilisi süsteeme, mis erinevad prototüüpselt EnvZ/OmpR süsteemist. Sensorvalk EnvZ omab kahte transmembraanset domääni, mille vahel paikneb sisenddomään (joonis 1a). Transmembraansed domäänid on olulised sensorvalgu lokaliseerumiseks sisemembraanis. Bakterites leidub ka sensorvalke, mis omavad rohkem kui kahte transmembraanset domääni, näiteks sensorvalk KinB, mis reguleerib *Bacillus subtilis* sporulatsiooni initsiatsiooni, omab kuute sisemembraani läbivat domääni (joonis 1b; LeDeaux jt., 1995). Osadel sensorvalkudel puuduvad transmembraansed domäänid täielikult, näiteks kemotaksises osalev sensorvalk CheA (Bilwes jt., 1999). CheA poolt fosforüleeritavaks vastuse regulaatoriks on CheY. CheY erineb klassikalisest vastuse regulaatorist selle poolest, et sellel valgul puudub DNA-seoseline efektordomään. Fosforüleeritud CheY reguleerib kemotaksist seondudes viburi mootorvalguga FliM, mille tulemusel muutub viburi pöörlemise suund (Rowsell jt., 1995).

Lisaks kahekomponendilistele süsteemidele, kus puudub mõni klassikalisest kahekomponendilises süsteemis olemasolev valgudomään, leidub ka selliseid signaaliülekande süsteeme, kus funktsionaalseid domääne on rohkem kui EnvZ/OmpR süsteemis. Kui need lisadomäänid osalevad fosfaatrühma ülekandes, toimub süsteemis rohkem kui üks fosfaatrühma ülekanne ning neid kahekomponendilisi süsteeme nimetatakse mitmeastmelisteks fosfaatrühma ülekande süsteemideks (Appleby, 1996).

1.3 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne

Lisaks kahekomponendilistele süsteemidele on bakterites kirjeldatud mitmeastmelisi fosfaadiülekande süsteeme, mis on võimelised reageerima keskkonnast tulevatele signaalidele (Appleby jt., 1996). Mitmeastmelised fosfaatrühma ülekande süsteemid sarnanevad kahekomponendiliste süsteemidega, kasutades signaaliülekandeks sarnaseid sensorvalke ning vastuse regulaatoreid. Mitmeastmeline fosfaadiülekanne erineb kahekomponendilisest signaaliülekandest selle poolest, et fosfaatrühma ülekandmiseks sensorvalgult vastuse regulaatorile toimub rohkem kui kaks

fosforüleerimise reaktsiooni ning fosfaatrühma ülekandes osaleb histidiini sisaldav fosfaatrühma ülekandev domään (HPt; joonis 1bc; Tsuzuki jt., 1995).

1.3.1 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne *Bacillus subtilis* Kin-Spo-süsteemis

Esimesena kirjeldati mitmeastmelist signaaliülekannet *Bacillus subtilis* sporulatsiooni kontrollis, kus ühe fosfaatrühma ülekandes vastuse regulaatorile osaleb neli erinevat valku (joonis 1b; Burbulys jt., 1991). Sensorvalkudeks on selles süsteemis kaks transmembraanset valku KinB ja KinC ning tsüstoplasmaatiline sensorvalk KinA. Kõik kolm sensorvalku on võimelised autofosforüleeruma vastuseks keskkonnast tulevale signaalile (LeDeaux jt., 1995). Sensorvalkudelt seob fosfaatrühma valk Spo0F, mis sisaldab ainult fosfaatrühma vastuvõtvat domääni, mis on sarnane kahekomponendiliste süsteemide vastuse regulaatorite vastuvõtudomäänidele. Mitmeastmelistele fosfaatrühma ülekande süsteemidele omane histidiini sisaldav fosfaatrühma ülekandedomään (HPt) asub Kin/Spo-süsteemis valgus Spo0B. Spo0B konserveerunud histidiinilt kantakse fosfaatrühm üle klassikalise vastuse regulaatori Spo0A aspartaadi jäägile (D). Fosforüleeritud Spo0A reguleerib transkriptsiooni sporulatsiooni kontrolli reguleerivate geenide promootoritelt (Burbulys jt., 1991).

1.3.2 Mitmeastmeline fosfaatrühma ülekanne *E. coli* Arc-süsteemis

Arc mitmeastmeline fosfaatrühma ülekande süsteem osaleb *E. coli* anaeroobsetes tingimustes aktiveeritud geenide ekspressiooni regulatsioonis (Iuchi ja Lin, 1993; Ogino jt., 1998). Arc-süsteem koosneb kahest fosfaatrühma ülekandvast valgust: ArcB ja ArcA (joonis 1c). ArcB on sisemembraani seoseline sensorvalk, mis on võimeline autofosforüleeruma vastuseks hapniku kontsentratsiooni langusele keskkonnas (Iuchi ja Lin, 1993). ArcB erineb klassikalisest kahekomponendilise süsteemi sensorvalgust, kuna sisaldab lisaks sisenddomäänile ja autofosforülatsiooni/dimerisatsiooni domäänile ka vastuvõtudomääni ning histidiini sisaldavat fosfaatrühma ülekande domääni (HPt; joonis 1). Arc-süsteemi vastuse regulaator ArcA on klassikaline vastuse regulaator. Arc-süsteem

on omapärane, kuna erinevalt Kin/Spo-süsteemist, kus kõik fosfaatrühma ülekande reaktsioonid toimuvad erinevate valkude vahel, toimuvad kolm esimest fosforüleerimisreaktsiooni sensorvalgus ArcB (joonis 1c; Ogino jt., 1998). Huvitav on veel, et Arc-süsteemi vastuse regulaator ArcA on võimeline fosfaatrühma siduma nii ArcB autofosforülatiooni/dimerisatsioonidomäänilt kui ka histidiini sisaldavalt fosfaatrühma ülekande domäänilt (HPt) sõltuvalt keskkonna aeroobsetest tingimustest (Tsuzuki jt., 1995).

1.3.3 Rcs signaaliülekande süsteem

Rcs signaaliülekande süsteemi kirjeldati esmakordselt *E. colis*, kus see süsteem reguleerib kapslit moodustavate polüsahhariidide sünteesi (Gottesman jt., 1985). Lisaks polüsahhariidide sünteesile reguleerib Rcs süsteem mitmete patogeensete liikide virulentsust, liikuvust, rakkude jagunemist ja paljusid teisi rakkudes toimuvaid protsesse (Virlogeux jt., 1996; Garcia-Calderon jt., 2005; Tobe jt., 2005). Rcs süsteem on mitmeastmeline signaaliülekande süsteem, mis koosneb kolmest fosfaatrühma ülekandvast valgust ning kahest abivalgust (joonis 2). Rcs süsteemi komponente on leitud mitmetes patogeensete liikide genoomidest: patogeensest *E. colist*, *Salmonellast*, *Yersiniast*, *Klebsiellast*, *Shigellast* ning taimepatogeenist *Pantoea stewartii* ning *Proteus mirabilisest*.

Osadel bakteritel kuuluvad Rcs süsteemi veel kaks abistavat valku RcsF ja RcsA (Majdalani jt., 2005; Majdalani ja Gottesman, 2005).

RcsC (ik. lüh. *regulator of capsule synthesis C*) on sensorvalk, mis on kahe N-terminaalse transmembraanse domääni abil seotud tsütoplasmaatilise membraaniga (Joonis 2; Stout ja Gottesman, 1990). Transmembraansete domäänide vahel paikneb sisenddomään, mis ulatub periplasmasse ja on oluline signaali vastuvõtmiseks. Sensori kinaasse aktiivsuse eest vastutab konserveerunud histidiini jääki sisaldav autofosforülatsoonidomään, mis lokaliseerub tsütoplasmas. Eelpool mainitud domäänid on omased klassikalisele kahekomponendilise süsteemi sensorvalgule (vt. EnvZ joonisel 1a). Lisaks eelpool nimetatud domäänidele kuulub RcsC struktuuri ka aspartaadi jääki sisaldav vastuvõtu domään. Selline ehitus on iseloomulik hübriidsetele sensorvalkudele (nt. ArcB joonisel 1c), kuid erinevalt teistest teadaolevatest hübriidsetest sensoritest ei oma RcsC C-terminaalset histidiini sisaldavat fosfaatrühma ülekandvat domääni (Stout ja Gottesman, 1990; Majdalani ja Gottesman, 2005). Seega toimub fosfaatrühma ülekanne sensorvalgult RcsC vastuse regulaatorile RcsB mitte otse, vaid RcsD vahendusel (Majdalani ja Gottesman, 2005).

RcsD (ik. lüh. *regulator of capsule synthesis D*), endise nimega YojN, on teine hübriidne sensorvalk, mis omab nii transmembraanseid kui ka sisenddomääni, kuid millel puudub funktsionaalne autofosforülatsoonidomään (joonis 2). Viimati nimetatud funktsionaalse domääni puudumise tõttu ei osale RcsD väliskeskkonnast tuleva signaali vastuvõtmisel. RcsD valgu funktsiooniks on fosfaatrühma ülekanne sensorilt RcsC regulaatorvalgule RcsB (Takeda jt., 2001).

RcsB (ik. lüh. *regulator of capsule synthesis B*) on Rcs süsteemi vastuse regulaator. RcsB on klassikaline vastuse regulaator, mille põhilised funktsionaalsed komponendid on aspartaati sisaldav vastuvõtudomään ja transkriptsiooni reguleeriv DNA-seoseline HTH(ik. lüh. *helix-turn-helix*)-tüüpi efektordomääni (joonis 2; Francez-Charlot jt., 2003). Fosforüleeritud RcsB võib käituda nii transkriptsiooni aktivaatori kui ka repressorina (Tobe jt., 2005).

1.3.3.2 Rcs süsteemi abivalgud

Osadel bakteritel kuuluvad Rcs süsteemi komponentide hulka veel kaks valku – RcsF ja RcsA. RcsF on vajalik teatud tingimustes signaali vastuvõtmiseks keskkonnast (Majdalani jt., 2002). RcsA on vajalik aktiveeritud RcsB stabiilsemaks seondumiseks nn. RcsAB-box'i sisaldavate promootoritega (Wehland jt., 1999; Wehland ja Bernhard, 2000).

RcsF (ik. lüh. *regulator of capsule synthesis F*) on välismembraaniga seotud lipoproteiin, mis on oluline teatud keskkonnast tulevate signaalide edastamiseks RcsC-le (joonis 2; Majdalani jt., 2005). *rscF*-i üleekspressioon aktiveerib nii kolaanhappe sünteesi kui ka *rprA-lacZ* fusiooni transkriptsiooni ainult RcsC olemasolul (Majdalani jt., 2002). Kuidas RcsF signaali RcsC-le vahendab pole veel teada. Hagiwara ja teised näitasid, et Rcs süsteemi *E. coli*s aktiveerivad Zn-ioonide kontsentratsiooni tõus ning 0,4% glükoos ja madal temperatuur (20°C). Kogu *E. coli* genoomi hõlmava DNA mikrokiibi analüüs näitas, et Rcs süsteemi aktivatsioon nendel tingimustel on RcsF-sõltuv. Kuna *rscF* mutandis on muutunud rohkemate geenide ekspressioon kui *rscC* mutandis, siis tõenäoliselt ei mõjuta RcsF valk geeniekspressiooni mitte ainult läbi Rcs süsteemi (Hagiwara jt., 2003).

RcsA (ik. lüh. *regulator of capsule synthesis A*) on Rcs süsteemi komponent, mis reguleerib RcsB seondumist osade Rcs süsteemi sihtmärkgeenidega (joonis 2; Wehland ja Bernhard, 2000). RcsA omab C-terminaalset HTH-tüüpi DNA-ga seonduvat domääni ning N-terminaalset domääni, mis on sarnane kahekomponendiliste süsteemide vastuse regulaatori vastuvõtu domääniga, kuid milles puudub konserveerunud aspartaadi jääk ning mitmed teised vastuvõtudomäänile omased aminohappe jäägid (Stout jt., 1991). RcsA moodustab RcsB-ga heterodimeere, mis seonduvad sihtmärkgeenide promootoraladele ning reguleerivad nende transkriptsiooni efektiivsust. RcsA seondub RcsB-ga 8 korda suurema afiinsusega, kui RcsB on fosforüleeritud (Francez-Charlot jt., 2003). Praeguseks kogunenud andmete põhjal võib väita, et RcsA on Rcs süsteemis

oluline kui RcsB-DNA kompleksi stabiliseerija (Wehland jt., 1999; Wehland ja Bernhard, 2000). Sõltuvalt sellest, kas RcsB seondumiseks DNA-ga on vaja RcsA valku või mitte, jaotatakse Rcs süsteemi poolt reguleeritavad promootorid kaheks: 1) RcsA-sõltuvad promootorid; 2) RcsA-sõltumatud promootorid (Majdalani ja Gottesman, 2005). RcsA-sõltuvate ja RcsA-sõltumatute promootorite esinemine tagab lisa regulatsiooni võimaluse vastuseks samale keskkonnast tulevale signaalile. RcsA hulga muutmine rakus mõjutab ainult RcsA-sõltuvaid promootoreid jättes RcsA-sõltumatud puutumata. RcsA hulk rakus on reguleeritud nii transkriptsiooni tasemel valgu HNS vahendusel kui ka valku lagundava ATP-sõltuva Lon proteaasi poolt (Torres-Cabassa ja Gottesman, 1987; Sledjeski ja Gottesman, 1995).

1.3.3.3 Enterobakterite Rcs signaaliülekanne mudel

Väliskeskkonnast tuleva signaali äratundmine võib toimuda, kas otse RcsC sisenddomääni poolt või kantakse signaal RcsC-le abivalgu RcsF vahendusel (joonis 2; Majdalani jt., 2002; 2005). Konkreetne signaal, mis Rcs süsteemi aktiveerib pole veel teada, kuid on kirjeldatud erinevaid tingimusi, mille juures Rcs süsteem aktiveerub. Mõnedes bakterites on näidatud, et Zn-ioonide ja antimikroobsete peptiidide mõju geeniekspressioonile toimub läbi Rcs süsteemi (Hagiwara jt., 2003; Erickson ja Detweiler, 2006). Samuti aktiveerub Rcs süsteem vastuseks osmootsele šokile ning mitmetele membraanis toimuvatele muutustele (Parker jt., 1992; Sledjeski ja Gottesman, 1996; Ferrieres ja Clarke, 2003). Lisaks mõjutab Rcs süsteemi aktiivsust ka mõnede bakteriraku valkude nagu näiteks DjlA üleekspressioon (joonis 2; Chen jt., 2001). Rcs süsteemi enda komponentidest aktiveerib süsteemi RcsF valgu üleekspressioon (Majdalani jt., 2002).

Kui signaal on jõudnud RcsC-ni, toimub sensorvalgu histidiinkinaasse domääni konserveerunud histidiini autofosforüleerumine (Stout ja Gottesman, 1990). Autofosforülatsiooni/dimerisatsiooni domäänilt kantakse fosfaatrühm edasi RcsC vastuvõtu domääni konserveerunud aspartaadile. RcsC moodustab RcsD-ga heterodimeeri, mis käitub kui hübriidne sensorkinaas (Takeda jt., 2001; Majdalani ja Gottesman, 2005). Aktiveeritud RcsC vastuvõtudomäänilt seotakse fosfaatrühm RcsD

fosfaadiülekanne domäänile. RcsD valgult on võimeline fosfaatrühma siduma vastuse regulaatori RcsB vastuvõtudomään. Aktiveeritud RcsB moodustab rakus dimeere, mis seonduvad sihtmärkgeenide promootoritele. Tuvastatud on nii RcsB homodimeere kui ka heterodimeere RcsA-ga (Carballes jt., 1999; Wehland jt., 1999). Erinevad dimeerid seonduvad erinevatele promootoritele ning reguleerivad sihtmärkgeenide ekspressiooni (vt. „Rcs süsteemi sihtmärgid”). Kui aktiveeriv signaal keskkonnast kaob, võib toimuda fosfaatrühma ülekanne ka vastupidises suunas, mille tulemusena RcsB defosforüleerub ja inaktiveerub (Majdalani jt., 2002; 2005).

1.3.3.4 Rcs süsteemi sihtmärgid

Kapsli süntees *Escherichia coli*: cps geenid

E. coli ja teised enterobakterid on võimelised moodustama kapslit, mis koosneb peamiselt eksopolüsahhariidist, mida nimetatakse kolaanhappeks. Kapsli polüsahhariidide sünteesis osaleb väga suur hulk geene (Roberts, 1996). Peamised geenid, mis on vajalikud kapsli sünteesiks, asuvad ühes suures klastris (Stevenson jt., 1996). Selle klatri 5'-otsas asuvad *wza*, *wzb* ja *wzc* geenid, neile järgneb *wca* operon, mis sisaldab umbes 20 geeni. Kõiki neid geene kokku nimetatakse *cps* geenideks. Rcs süsteem kirjeldati esmakordselt kui kapsli polüsahhariidide sünteesi määravate geenide positiivset regulaatorit *E. coli*s (ülevaateartiklid Rcs süsteemist *cps* regulaatorina: Gottesman ja Stout, 1991; Stout, 1994). *cps* geenide transkriptsiooni regulatsioonis osalevad Rcs süsteemi abivalgud RcsA ja RcsF (Gervais ja Drapeau, 1992; Ebel ja Trempy, 1999; Hagiwara jt., 2003).

Eksopolüsahhariidid *Erwinia amylovora*: *ams* operon

Erwinia amylovora on taimepatogeen, mis on võimeline nakatama mitmeid roosõielisi taimi põhjustades viljapuu-bakteripõletikku (Agrios, 1997). Nimetatud patogeeni peamiseks virulentsusfaktoriteks on mitmesugused sekreteeritavad polüsahhariidid, milledest tähtsaimaks loetakse amülovoraani (Bellemann ja Geider, 1992; Bernhard jt., 1993, 1996). Amülovoraani sünteesi eest vastutab *ams* geenide klaster, mis sisaldab 12 avatud lugemisraami (Bernhard jt., 1993; Bugert ja Geider,

1995). Rcs süsteem on üks olulisemaid regulatsiooni süsteeme, mis positiivselt mõjutab amülovoraani sünteesi *E. amylovoras* (Stout ja Gottesman, 1990; Stout, 1996; Kelm jt., 1997). Kelm ja teised (1997) näitasid, et *ams*-operoni aktivatsiooniks on vajalik RcsA-RcsB dimeeri moodustumine, mis seondub *ams* operoni promootorile piirkonnas -578 nt kuni -501 nt *amsG* geeni translatsiooni initsiatsiooni koodonist.

Liikuvus: *flhDC* operon *E. coli* ja *flgD*, *flgB* geenid *Salmonellas*

Paljudes bakterites nagu näiteks *E. coli*, *Salmonella* liikides ning *Proteus mirabilis* mõjutab Rcs süsteem negatiivselt viburite sünteesi (Belas jt., 1998; Toguchi jt., 2000; Takeda jt., 2001; Clemmer jt., 2007). Viburi sünteesis ja kemotaksises osalevate valkude süntees on kontrollitud hierarhilise regulatsioonisüsteemi poolt. Selle süsteemi kõige olulisemad komponendid on valgud FlhD ja FlhC, mis mõjutavad paljude viburi normaalseks funktsioneerimiseks vajalike valkude sünteesi (Chilcott ja Hughes, 2000). FlhD ja FlhC valku kodeerivad geenid asuvad ühes operonis, mille ekspressioon *E. coli*s on negatiivselt reguleeritud Rcs süsteemi poolt (Francez-Charlot jt., 2003). See oli esimene töö, mis näitas, et RcsB võib olla ka otsene negatiivne regulaator sidudes sihtmärkgeeni promootorit ning surudes maha selle ekspressiooni. Varem on näidatud ainult RcsB otsest positiivset efekti sihtmärkgeenide promootoritele.

Salmonella enterica serovar Typhimuriumis mõjutab Rcs süsteem negatiivselt *flgD* ja *flgB* geenide ekspressiooni (Erickson ja Detweiler, 2006). *flgD* ja *flgB* geenide produktid osalevad selle patogeeni viburi sünteesis (Ohnishi jt., 1994; Schoenhals jt., 1999). *flgD* ja *flgB* mRNA-de hulk rakus on *rsc*-mutantides keskmiselt vastavalt 7,83 ($\pm 1,43$) ja 6,42 ($\pm 1,56$) korda suurem võrreldes metsiktüvega (Rcs süsteemi aktiveerivates tingimustes). Rcs süsteemi mõju *flgD* ja *flgB* geenidele ei sõltu abivalgust RcsA (Erickson ja Detweiler, 2006). Kuna tegemist on DNA mikrokiibil saadud tulemustega, siis ei näita saadud tulemused, kas RcsB seondub *flgD* ja *flgB* geenide promootoritele või on Rcs süsteemi mõju kaudne. Arvatavasti on Rcs süsteemi mõju nendele geenidele kaudne ning ilmselt vahendatud FlhDC valkude poolt, mis reguleerivad enamuse liikuvusega seotud geenide ekspressiooni (Chilcott ja Hughes, 2000). Mitmetes töödes on näidatud Rcs süsteemi mõju veel mitmetele liikuvusega seotud geenidele (*fliC*: Arricau jt., 1998; *flgC*, *flgG* ja *flgI*: Oshima jt., 2002).

Rakkude jagunemine: *ftsZ*

Rcs süsteem mõjutab ka raku normaalseks jagunemiseks vajalike valkude sünteesi. Rcs süsteem aktiveerib transkriptsiooni *ftsZ* geeni promootorilt (Gervais ja Drapeau, 1992; Gervais jt., 1992; Carballes jt., 1999). FtsZ on tubuliini sarnane valk, mis raku jagunemisprotsessis polümeriseerub ning moodustab jagunemiskohta kokkutõmbuva rõnga (Lutkenhaus ja Addinall, 1997). Varieerides FtsZ valgu rakusisest taset reguleerivad bakterid rakkude jagunemise topoloogiat, sagedust ja ajastust (Ward ja Lutkenhaus, 1985; Tétart jt., 1992).

Statsionaarse kasvufaasi geenid: *rprA* RNA

Bakterite jõudmisel statsionaarsesse kasvufaasi, toimub rakus paljude füsioloogiliste protsesside ümberkorraldamine. Statsionaarse faasi sigmafaktori σ^S -i sünteesi määrab geen *rpoS*, mille ekspressiooni mõjutab ka Rcs süsteem. Rcs süsteem ei mõju σ^S -i ekspressiooni otse, vaid väikese reguleetorse *rprA* RNA vahendusel. *rprA* RNA seondub σ^S -i kodeeriva geeni *rpoS* mRNA liiderjärjestusele ning aktiveerib selle translatsiooni (Majdalani jt., 2002). Seega mõjutades positiivselt *rprA* transkriptsiooni, mõjutab Rcs süsteem kõikide σ^S -sõltuvate geenide transkriptsiooni.

Antimikroobsete peptiidide resistentsus *Salmonellas*: *ydeI*

Patogeeni *Salmonella enterica* serovar Typhimuriumi ellujäämiseks nakatunud organismis on olulised mehhanismid, mis kaitsevad bakterit peremeesorganismi poolt toodetud antimikroobsete peptiidide eest. *ydeI* geen on *S. Typhimuriumis* oluline infektsiooni püsima jäämises hiires. Rcs signaaliülekandeväline süsteem mõjutab positiivselt *S. Typhimuriumi ydeI* geeni transkriptsiooni, mis on aktiveeritud antimikroobse ühendi polümüksiin B poolt *rps*-sõltuvalt. *ydeI* geeni transkriptsiooni aktivatsioon on RcsA-sõltumatu, kuid vajab statsionaarse kasvufaasi sigmafaktorit, mida kodeerib *rpoS* (Erickson ja Detweiler, 2006).

Lisaks eelpool loetletud sihtmärkidele mõjutab Rcs süsteem mitmete patogeenide virulentsust, kuid täpne regulatsiooni mehhanism on tihti teadmata (Tobe jt., 2005;

Garcia-Calderon jt., 2005). Tänu DNA mikrokiipidel tehtud kogu genoomi uuringutele on näidatud väga mitmete geenide kuuluvus Rcs reguloni (Ferrieres ja Clarke 2003, Hagiwara jt., 2003). Enamuse Rcs reguloni kuuluvate geenide funktsiooni on teadmata, kuid ülejäänud on enamasti seotud membraani funktsioonidega või translokatsiooniga läbi membraani.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Kõik kasutatud plasmiidid ja bakteritüved on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.

Tüvi või plasmiid	Genotüüp, iseloomustus	Allikas, viide
<i>Pcc</i>		
SCC3193	metsiktüvi	Pirhonen jt., 1988
SCC6605	<i>rcsB_{Pcc}:: Tn5-gusA</i>	Andresen jt., 2007; Lisa 1
SCC6011	<i>rcsD_{Pcc}:: Tn5-gusA</i>	Andresen jt., 2007; Lisa 1
SCC6024	<i>rcsC_{Pcc}:: Tn5-gusA</i>	Andresen jt., 2007; Lisa 1
SCC6026	<i>rcsF_{Pcc}:: Cm^R</i>	Andresen jt., 2007; Lisa 1
SCC6027	<i>rcsD_{Pcc}52:: Cm^R</i>	Andresen jt., 2007; Lisa 1
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE4, ΔlacU169, (lacZΔM15), hasdR17, recA1, endA1, gyrA 96, thi-1, relA1</i>	BRL (San Diego, CA)
Plasmiidid		
pTZ57R/T	Amp ^R , kloneerimisvektor	Fermentas
pMW119	Amp ^R , kloneerimisvektor	Eurogentec
pLACFw- <i>rcsF_{Pcc}</i>	Kloneerimisvektor pMW119, mis sisaldab <i>rcsF</i> geeni <i>SmaI</i> restriktsoonisaidis; <i>rcsF</i> omab selles konstruktis 43 nt translatsiooni initsiatsiooni koodonist ülesvoolu ning on <i>lacZ</i> geeni promootori kontrolli all	Andresen jt., 2007; Lisa 1
pLACRev- <i>rcsF_{Pcc}</i>	Kloneerimisvektor pMW119, mis sisaldab <i>rcsF</i> geeni <i>SmaI</i> restriktsoonisaidis; <i>rcsF</i> omab selles konstruktis 43 nt translatsiooni initsiatsiooni koodonist ülesvoolu ning on orienteeritud vastupidises suunas <i>lacZ</i> geeni promootoriga	Andresen jt., 2007; Lisa 1
pMW119:: <i>rcsB_{Pcc}</i>	Kloneerimisvektor pMW119, mis sisaldab <i>SmaI</i> restriktsoonisaidis <i>rcsB</i> geeni kodeerivat ala ning lisaks <i>rcsB</i> promootorala 365 nt translatsiooni initsiatsiooni koodonist ülesvoolu	Andresen jt., 2007; Lisa 1
pKD3	Vektori pANTSγ derivaat, mis sisaldab FRT-ga (<i>ELP recognition target</i>) külgnevat Cm ^R geeni vektorist pSC140	Datsenko ja Wanner, 2000
pPRG	miniTn5Cm ^R :: <i>gusA</i>	Marits jt., 1999

2.2 Söötmed ja kasvatamine

Pectobacterium carotovorum alaml. *carotovorum* tüved kasvatati temperatuuril +30°C LB või minimaalsöötmes, *Escherichia coli* tüved temperatuuril +37°C LB söötmes (Miller, 1972). Tardsöötmed valmistati lisades LB söötmele agarit kontsentratsioonis 15 g/l. Antibiootikume lisati söötmesse vastavate kontsentratsioonidega: ampitsilliini 150 µg/ml, kanamütsiini 100 µg/ml ja klooramfenikooli 25 µg/ml. Minimaalsöötmed valmistati M9 baasil (Adams, 1959), millele lisati mikroelemente (2,5 ml/l; Bauchop ja Elsden, 1960) ja süsinikuallikana glütserooli lõppkontsentratsiooniga 0,4%. Vajadusel lisati minimaalsöötmele 0,4% polügalakturoonhapet (PGA; Sigma). Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

Ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks valmistati järgmised selektiivsöötmetega indikaatortassid: proteaaside aktiivsuse määramiseks rasvavaba piimaga (5%) trüpton soja agar (TSA) nn. piima tass; tsellulaaside määramiseks karboksümetüülselluloosiga (CMC; 0,1%) LB tardsööde; polügalakturonaasi aktiivsuse määramiseks polügalakturoonhappega (PGA; 0,7%) LB tardsööde.

2.3 Mutantsete tüvede konstrueerimine ja isoleerimine

Tüved SCC6605 (*rscB_{Pcc}::Tn5-gusA*), SCC6011 (*rscD_{Pcc}::Tn5-gusA*) ja SCC6024 (*rscC_{Pcc}::Tn5-gusA*) valiti välja transposoonmutantide kogumist, mis oli saadud kasutades eelnevalt kirjeldatud metoodikat (Marits jt., 1999).

Mutantne tüvi SCC6026 (*rscF_{Pcc}::Cm*) konstrueeriti järgmiselt. Disainiti praimerid *rscF*alg 5'-TTCAATACTCGCTCTTTGA^{-3'} ja *rscF*Δ 5'-GACTCATTGTGCAGAGAC^{-3'} *rscF* geeni jaoks kasutades *Erwinia carotovora* alaml. *atroseptica* tüve SCRI1043 genoomset järjestust (http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_carotovora/). Saadud DNA fragment kloneeriti kloneerimisvektoris pTZ57R/T. Kloneeritud DNA fragmendi nukleotiidne järjestus

määrati. *Pcc*-i *rcsF* geeni mutant konstrueeriti kasutades λ Red tehnoloogiat (Datsenko ja Wanner, 2000). Polümeraasi ahelreaktsioonis kasutati praimereid *rcsFP1* ^{5'}- ATAGCAACCGGCTACGCCACTAACGGTTTGGCATTTCATGTAGGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC^{-3'} ja *rcsFP2* ^{5'}- TAGCTATGTCGCTGACAGGCTGTTCTTTATTTTCAGAAGCCACCATATGAATAT CCTCCTTAG^{-3'} ning plasmidi pKD3. Saadud reaktsiooniprodukt sisaldas *cat* (Cm^R) geeni, mis külgnes mõlemalt poolt 42 nukleotiidiga *rcsF* geeni järjestusega.

Mutantne tüvi SCC6027 (*rcsD_{Pcc}52::Cm*) konstrueeriti samuti kasutades λ Red tehnoloogiat (Datsenko ja Wanner, 2000). Praimeritena kasutati *yoyNP1* ^{5'}- ACATCCGCTGACGACTATTGCCCAAGGTATACAGAAACGCATCGATACTTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC^{-3'} ja *yoyNP2* ^{5'}- AATTGCGCTAATGTTGGCGTCGCTAGCGGACGGTTCACTGTTCAGACTGCCAT ATGAATATCCTCCTTA^{-3'} oligonukleotiide. Polümeraasi ahelreaktsiooni produkt amplifitseeriti plasmiidilt pKD3.

2.4 ARB PCR

ARB PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon juhusliku praimeriga viidi läbi varem kirjeldatud meetodi järgi (Caetano-Anolles, 1993).

Kasutati praimereid:

ARB1: ^{5'} GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT ^{3'} (35 nt).

ARB2: ^{5'} GGCCACGCGTCGACTAGTAC ^{3'} (20 nt).

OE_{ext}: ^{5'} GGGACTCCTCAAAGCCGAATTG ^{3'} (22 nt).

OE_{int}: ^{5'} GCCGCACTTGTGTATAAGAGTCAG ^{3'} (24 nt).

Esimeses reaktsioonis (ARB1) kasutati algmaterjalina 5 μ l rakulüsaati. PCR-i reaktsioonisegu üldmaht 50 μ l sisaldab: 5 μ l 10 x PCR-i puhvrit [750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20]; 4 μ l 25 mM MgCl₂; 1 μ l 10 mM dNTP mix-i; 1 μ l praimerit ARB1 (20 pmol/ μ l); 1 μ l praimerit OE_{ext} (20 pmol/ μ l); 5 μ l rakulüsaati; 0,5 μ l Taq polümeraasi (1U/ μ l; Fermentas). PCR reaktsiooni tingimused: 1) +95°C 5 minutit 2) +95°C 30 sekundit 3) +30°C 30 sekundit 4) +72°C 1 minut 30 sekundit 5) 6 tsükli alates punktist 2 6) +95°C 30 sekundit 7) +45°C 30 sekundit 8) +72°C 2 minutit 9) 30 tsükli alates punktist 6.

Kahe PCR-i vahel puhastati ARB1 produkt MO BIO UltraClean™ PCR Clean-Up DNA Purification Kitiga.

Teises reaktsioonis (ARB2) kasutati templeidina 5 µl esimese reaktsiooni (ARB1) produkti. PCR-i reaktsioonisegu üldmaht 50 µl sisaldab: 5 µl 10 x PCR-i puhvrit [750 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20]; 4 µl 25 mM MgCl₂; 1 µl 10 mM dNTP mix-i; 1 µl praimerit ARB2 (20 pmol/ µl); 1 µl praimerit OE_{int} (20 pmol/µl); 5 µl ARB produkti; 0,5 µl Taq polümeraasi (1U/µl; Fermentas). PCR reaktsiooni tingimused: 1) +95°C 2 minutit 2) +95°C 30 sekundit 3) +45°C 30 sekundit 4) +72°C 2 minut 5) 30 tsüklit punktist 2 6) +72°C 10 minutit. PCR teostati firma Eppendorf aparaadiga Mastercycler personal (Saksamaa).

2.5 Kloneerimine

Kloneeritavad PCR-i fragmendid kontrolliti elektroforeesil ja puhastati agarosgeelist MO BIO kitiga UltraClean™15 DNA Purification Kit From Gels and Solutions. Kloneerimine vektorisse pTZ57R/T viidi läbi InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kitiga (Fermentas). *rcsF* ja *rcsB* geenide kloneerimiseks vektorisse pMW119 (konstruktid pMW119::*rcsB*_{P_{cc}}, pLACFw-*rcsF*_{P_{cc}} ja pLACRev-*rcsF*_{P_{cc}}) kasutati *Sma*I restriктаasi ja T4 DNA ligaasi firmalt „Fermentas“.

2.6 Transformatsioon

Retsipienttüvena kasutati *E. coli* tüve DH5α. DH5α rakud kasvatati LB söötmes tiheduseni OD₆₀₀=0,2-0,3. Kompetentsed rakud saadi Hanahani (1983) poolt kirjeldatud CaCl₂ meetodil. Transformeeritavat DNA-d lisati rakkudele ligikaudu 1 µg. Rakke koos DNA-ga hoiti jääl 45 minutit ning seejärel tehti kuumašokk 1 minut +41°C. Rakud jahutati jääl. Seejärel kasvatati neid 30-45 minutit 1,5 ml-s LB söötmes temperatuuril +37°C. Rakud tsentrifuugiti põhja (lauafuug 6000 pööret minutis, 4 minutit, Heraeus Biofuge Pico, Saksamaa) ning plaaditi LB tardsöötmele, mis sisaldas sobivat antibiootikumi.

2.7 Plasmiidse DNA eraldamine

Plasmiidne DNA eraldati Perfectprep® Plasmid Mini („Eppendorf“) kiti abil.

2.8 Sekveneerimine

Kaksikahelalise DNA nukleotiidse järjestuse määramiseks kasutati ensümaatilist Sangeri didesoksünukleotiididega termineerimise meetodit (Sanger jt., 1977). Sekveneerimisproovid valmistati vastavalt DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing premix kitis ettenähtud protokollile („Amersham Pharmacia Biotech, Inc“).

Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidseid järjestusi võrreldi BLASTX programmi abil andmebaasis olevate aminohappeliste järjestustega (Altschul jt., 1997).

Pcc-i *rcsDBC* genoomse regiooni aksessiooninumber geenipangas on EF415647. *Pcc*-i *rcsF*-i järjestuse aksessiooninumber on EF415648. Homoloogiaotsinguteks ja valkude domäänsete struktuuride kirjeldamiseks kasutati GenBank, EMBL ja SWISS-PROT andmebaase ning programme blastx ja blastp (University of Wisconsin Genetic Computer Group; Altschul jt., 1997). Valkude domäänsed piirid ennustati kasutades SMART andmebaasi (*Simple Modular Architecture Research Tool*; <http://smart.embl-heidelberg.de> ; Schultz jt., 1998). RcsC ja RcsD transmembraansed domäänid ennustati kasutades programmi TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; Hofmann ja Stoffel, 1993).

2.9 Plasmiidide pMW119::*rcsB*_{Pcc} ja pLACFw-*rcsF*_{Pcc} konstrueerimine

Funktsionaalne *rcsB* geen amplifitseeriti *Pcc*-i metsiktüve SCC3193 kromosoomist praimeritega *rscBL* 5'-GATGCGACGCAGGAGGGAGAACAGA^{-3'} ja *rscC1* 5'-CCGTGTGAGTTTGCACCGCATGA^{-3'}. Saadud produkt kloneeriti vektorisse pMW119 *Sma*I restriksioonisaiti ning saadi konstrukt pMW119::*rscB*_{Pcc}. Selles konstruktis on terve *rscB* geeni kodeeriv ala ning 365 nukleotiidi *rscB* geeni promootorjärjestust. *rscB* on orienteeritud vastupidises suunas *lacZ* geeni transkriptsiooni suunale.

rscF-i üleekspressiooni konstrukt saadi järgnevalt. *Pcc*-i *rscF* geen amplifitseeriti metsiktüve kromosoomist kasutades primereid *rscFal*g 5'-TTCAATACTCGCTCTTTGA^{-3'} ja Fstop 5'-TAGAGGATCTGATTGAAAAC^{-3'}. Saadud

produkt kloneeriti *SmaI*-ga restrikteeritud plasmidi pMW119 *lacZ* geeni promootori alla. Saadud konstrukt nimetati pLACFw-*rcsF*_{P_{CC}}. Sama moodi valmistati konstrukt pLACRev-*rcsF*_{P_{CC}}, kuid selles konstruktis on *rcsF* orienteeritud vastupidises suunas *lacZ* geeni promootoriga. Mõlemas konstruktis omab *rcsF* 43 nt translatsiooni initsiatsiooni koodonist ülesvoolu.

2.10 Ensüümi aktiivsuste määramine

Tardsöötmetel ensüümide esialgseks määramiseks kasutati piima, CMC ja PGA tasse (vt. „Söötmed ja kasvatamine”).

Proteaaside aktiivsused määrati piima tassil, inkubeerides bakterirakke 1-2 päeva temperatuuril +30°C. Aktiivsuse detekteeriti tekkinud proteolüüsi tsoonide läbimõõdu järgi.

Tsellulaasi aktiivsuse määramiseks inkubeeriti bakterirakke 1 päev CMC tassil, seejärel värviti 15 minutit 0,1% Kongo punasega. Pärast värvimist töödeldi tassi 1M NaCl-ga 15 minutit. Tsellulaasi aktiivsus määrati kolooniate ümber tekkinud värvivabade tsoonide läbimõõdu järgi.

Pektinolüütiliste ensüümide aktiivsuse määramiseks kasvatati bakterirakke 1 päev PGA tassil. Seejärel töödeldi tassi 1M CaCl₂-ga 15 minutit ja ensüümi aktiivsus tuvastati kolooniate ümber tekkinud läbipaistvate tsoonide läbimõõdu järgi.

2.10.1 Proovide kogumine

Üleöö kultuuridest tehti lahjendused (OD₆₀₀=0,1) minimaalsöötmesse, kas indutseeritult PGA-ga (lõppkontsentratsioon 0,4%) või ilma. Proovid korjati 6, 8 ja 10 tunni järel. Mõõdeti kultuuride optilised tihedused lainepikkusel OD₆₀₀. Võeti 500 µl kultuuri, fuugiti rakud põhja (lauafuug, 13000 pööret minutis, 3 minutit, Heraeus Biofuge pico, Saksamaa). Eraldatud supernatandid külmutati temperatuuril -70°C.

2.10.2 Polügalakturonaasi aktiivsuse määramine

Polügalakturonaasi aktiivsus määrati meetodil, mida on varem kirjeldanud Pirhonen jt. (1991).

2.10.2.1 Reaktiivid:

Peh-i puhver: 20 ml 4 M NaCl; 20 ml 1 M Na-atsetaati (pH 5,0); 1,6 ml 0,5 M EDTA; 138,4 ml ddH₂O.

Värvireagent: 25 g ammooniummolübdaati lahustati 450 ml-s ddH₂O-s ning lisati sellele 21 ml kontsentreeritud väävelhapet. 3 g Na-arsenaati lahustati 25 ml-s ddH₂O-s ning lisati see eelpool valmistatud lahusele. Lahust inkubeeriti 48 tundi +37°C, kuni see värvus kollaseks.

Vasereagent: 250 ml-s ddH₂O-s lahustati 24 g naatriumkarbonaati ja 12 g K-Na-tartraati. Sellele lahusele lisati 40 ml 10% CuSO₄·5H₂O lahust ning 16 g NaHCO₃. 18 g Na₂SO₄ lahustati 500 ml-s kuumas vees 30 minuti jooksul. Peale jahtumist lisati see eelpool valmistatud lahusele ja viidi maht ddH₂O-ga 1 liitrini.

2.10.2.2 Määramine:

Segati 45 µl Peh-i puhvrit ning 5 µl supernatanti (0-punkti jaoks 5 µl vett). Lisati 50 µl 1%-list PGA lahust proovi kohta. Inkubeeriti 30 minutit temperatuuril +30°C. Reaktsioon lõpetati 27 µl-i reaktsioonisegu lisamisega 27 µl-le vasereagendile. Kuumutati proove 15 minutit temperatuuril +97°C. Jahtunud proovidele lisati 27 µl värvilahust ja 162 µl vett. Fuugiti proove 10 minutit 2500 pööret minutis (Jouan RC 422). Supernatantide optilised tihedused mõõdeti mikrotiiterplaadil lainepikkusel 500 nm spektrofotomeetriga Lab system Multiscan[®] MCC/340. Ensüümi aktiivsus avaldati OD₅₀₀ muutusena OD₆₀₀, ml ja minuti kohta.

2.10.3 Pektaatlüaasi aktiivsuse määramine

Pektaatlüaasi aktiivsus määrati meetodil, mida on varem kirjeldanud Pirhonen jt. (1991).

Substraadina kasutati 80 µl 1% PGA lahust, mis sisaldas 0,25 mM CaCl₂ ja 100 mM Tris-HCl (pH 8,5). Substraadile lisati 16 µl supernatanti ja inkubeeriti temperatuuril +37°C 1 tund. Reaktsiooni peatamiseks lisati reaktsioonile 400 µl 0,5 M HCl ja 800 µl 10 mM tiobarbituraalhapet (TBA; Sigma). Inkubeeriti 1 tund 100°C. Tsentrifuugiti proove 3 minutit 13000 pööret minutis ning mõõdeti supernatandi optiline tihedus lainepikkusel 548 nm. Ühikuna kasutati OD₅₄₈ muutust OD₆₀₀, ml ja minuti kohta.

2.10.4 Proteaasi aktiivsuse määramine

Proteaasi aktiivsus määrati asokaseiini meetodil (Ji jt., 1987) ja ensüümi aktiivsused avaldati kui OD₄₃₆ muutus OD₆₀₀, ml ja tunni kohta.

2.11 Virulentsuse määramine

Mutantsete tüvede virulentsust testiti kartulimugulatel (*Solanum tuberosum*, Ants). Võrdluseks võeti kõrvale metsiktüvi SCC3193. Kartulimugulad pindsteriiliti leotades mugulaid 10%-lises valgendajas (ACE Blue) 10 minutit. Seejärel pesti mugulaid 96% etanooliga 5 minuti jooksul. Kui mugulate pinnad olid kuivanud nakatati neid 10 mM MgSO₄-ga pestud ja lahjendatud bakteritüvede üleöö kultuuriga (OD₆₀₀=1). Igasse kartulisse vajutati steriilse pipetiotsikuga kaks 1 cm sügavust auku. Ühte pipeteeriti 40 µl metsiktüve kultuuri ja teise 40 µl testitava mutandi kultuuri. Kartulid asetati steriilsetesse karpidesse niisutatud ligniinile. Mugulaid inkubeeriti temperatuuril +30°C 48 tundi. Matsereerunud kude eraldati ja kaaluti.

2.12 Liikuvuse määramine

Mutantide liikuvust määrati LB söötmel, mis sisaldas 0,3% agarit. *Pcc*-i metsiktüve ja erinevate *rcs* mutantide üleööökultuurid lahjendati LB söötmes tiheduseni OD₆₀₀~2. Võrdne kogus rakke torgati tardsöötmesse. Tardsöötmega Petri tasse inkubeeriti temperatuuril +30°C. Liikuvust hinnati 48 tunni möödumisel tekkinud tsoonide järgi.

3. TULEMUSED

Käesoleva magistritöö ülesandeks oli isoleerida uusi geene, mis kontrollivad teadaolevate virulentsusfaktorite sünteesi füopatogeenses bakteris *Pcc*. Selleks viisin läbi transposoonmutageneesi transposooniga miniTn5Cm tüves SCC3193. Eksperimendi tulemusena isoleerisin mutantide kogumi, mis sisaldas ~10000 mutanti. Transposoonmutageneesi käigus saadud mutandid külvasin edasi piima sisaldavale selektiivtassidele. Testitud kolooniate hulgast õnnestus isoleerida kolm mutanti, millede proteaasi produktsioon oli suurenenud võrreldes metsiktüvega SCC3193. *Pcc* reguleerib ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni enamasti globaalselt, kontrollides kõikide taime raku kesta lagundavate ensüümide produktsiooni korraga (va. PehR/S kahekomponendiline süsteem, mis reguleerib ainult Peh-i produktsiooni; Flego jt., 2000). Sellest tulenevalt on proteaasi produktsiooni reguleerivad geenid tihti ka teiste taimeraku kesta lagundavate ensüümide regulaatorid (Pirhonen jt., 1993; Liu jt., 1993; Murata jt., 1994; Liu jt., 1998; Eriksson jt., 1998; Hyytiäinen jt., 2003). Saadud tulemused viitasid sellele, et kõigis kolmes isoleeritud mutandis oli transposoon lülitunud regulaatorgeeni, mis kontrollis kõikide virulentsusfaktorite produktsiooni tüves SCC3193. Isoleeritud kolm mutanti valisin edasiseks uurimiseks ja tähistasin SCC6605, SCC6011 ja SCC6024. Järgmiseks püüdsin välja selgitada, milline geen on igas konkreetses mutandis inaktiveeritud ja kuidas need geenid on seotud virulentsusfaktorite produktsiooniga *Pcc*-s.

3.1 Isoleeritud transposoonmutantides on inaktiveeritud geenid *rscC*, *rscD* ja *rscB*

Töö järgmises etapis püüdsin välja selgitada transposoon miniTn5Cm insertiooni kohad mutantides SCC6605, SCC6011 ja SCC6024. Mutandis SCC6024 oli transposoon lülitunud geeni, mille aminohappeline järjestus on 73% sarnane RcsC valguga *E. coli*s (EAY49319). RcsC *E. coli*s on 951 ah pikkune hübriidne histiidinkinaas. Analüüsides *Pcc*-i RcsC valguga aminohappelist järjestust selgus, et sellele valgule on olemas kõik hübriidsele sensorkinaasile iseloomulikud domäänid. RcsC valk omab N-terminuses

kahte transmembraanset domääni (15-37ah ja 314-336ah), mille vahel paikneb periplasmas lokaliseeruv sisenddomään (37-314 ah). Lisaks neile domäänidele paiknevad valgu tsütoplasmas lokaliseeruv piirkonnas autofosforülatsiooni ja dimerisatsiooni domään (468-533ah) ning ATP-d siduv domään (580-691 ah). RcsC sisaldab ka fosfaatrühma vastuvõtvat domääni positsioonis 825-936 ah.

Mutandis SCC6011 oli transposoon lülitunud geeni, mille aminohappeline järjestus on 62% sarnane RcsD valgule *E. coli* (AAC75276). *rscD* geen *Pcc*-s kodeerib 897 ah pikkust valku, mis omab sensorvalgule iseloomulikke transmembraanseid domääne positsioonidesse 9-28 ah ja 298-316 ah. Transmembraansete domäänide vahele jääb periplasmaatiline sisenddomään (28-298 ah). Ka RcsD valk sisaldab järjestust, mis omab sarnasust autofosforülatsiooni ja dimerisatsiooni domääniga (443-508 ah), kuid see ei sisalda konserveerunud positsioonis histidiini jääki, mis on oluline autofosforüleerumiseks. ATP-d siduv domään ennustati RcsD valgu piirkonda 555-668 ah). Lisaks omab RcsD veel ka fosfaati ülekandvat domääni (799-878 ah). Kuna miniTn5Cm transposoon oli lülitunud *rscD* geeni lõpuossa, konstrueerisin uue *rscD* negatiivse tüve, kus Cm resistentsusgeen katkestab RcsD aminohappelise järjestuse peale 52-st aminohapet. Konstrueeritud tüve nimetasin SCC6027 (*rscD*52::Cm).

Mutandis SCC6605 oli transposoon lülitunud geeni, mille aminohappeline järjestus on 98% sarnane RcsB valguga järjestusega *E. coli* (ABE07966). RcsB (212 ah) struktuuris on olemas kõik klassikalise kahekomponendilisel süsteemi vastuse regulaatorile iseloomulikud domäänid. RcsB sisaldab nii fosfaatrühma vastuvõtu domääni (4-120 ah) kui ka HTH(helix-turn-helix)-tüüpi DNA-d siduvat domääni (148-205 ah). RcsB on kõige konserveerunud valk Rcs süsteemis. *Pcc*-i RcsB omab üle 90%-st sarnasust väga erinevates bakterites leiduvate RcsB valkudega (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia proteamaculans*, *Erwinia amylovora*, *Edwardsiella ictaluri*, *Sodalis glossinidius* ning *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia* erinevates liikides).

3.2 *Pcc*-i genoom kodeerib Rcs süsteemi abivalku RcsF

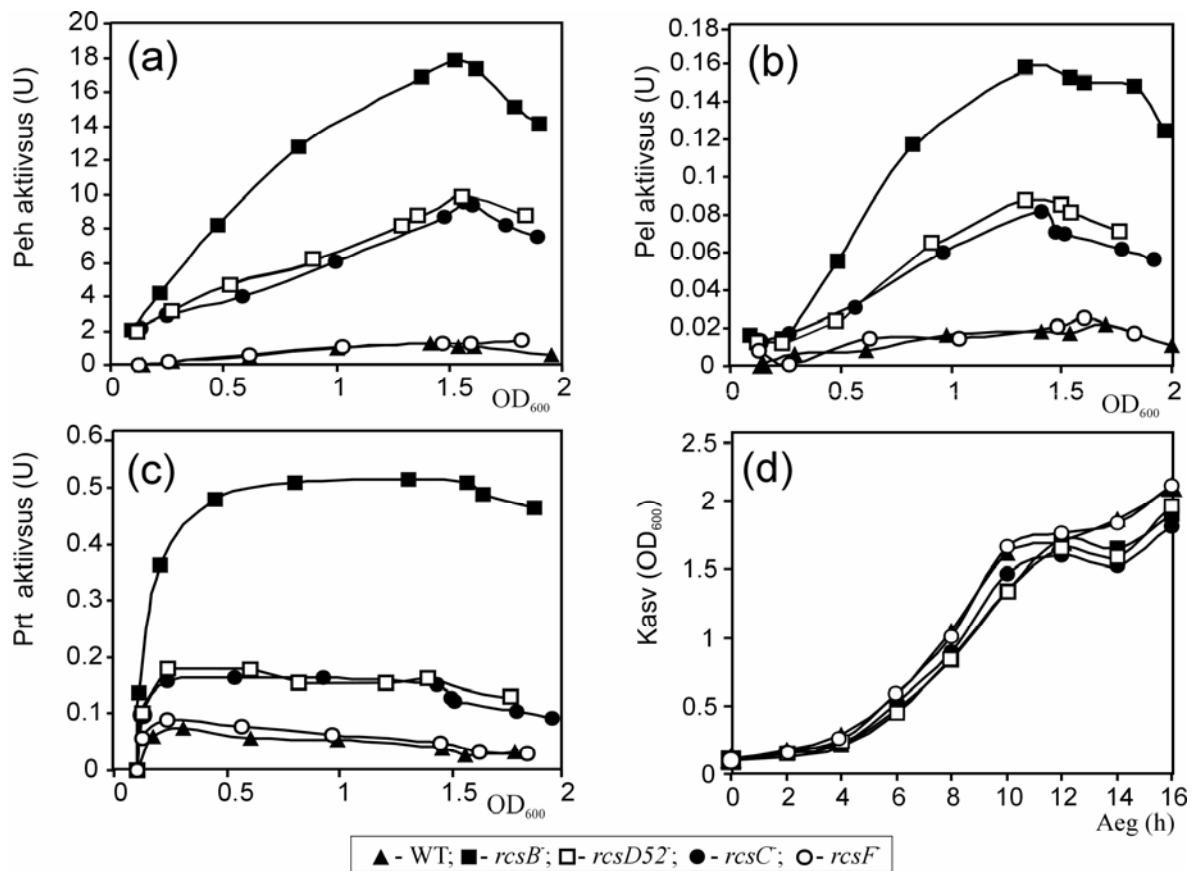
Töö järgmises etapis püüdsin välja selgitada, kas meie poolt uuritav tüvi SCC3193 omab ka Rcs süsteemi abivalke kodeerivaid gene *rscF* ja *rscA*, mida on leitud

paljudel Rcs süsteemi omavatel bakteritel. Analüüsid *Erwinia carotovora* alamli. *atroseptica* (*Eca*) tüve SCRI1043 genoomi nukleotiidsel järjestust (see organism on kõige lähedasem sekveneeritud organism meie tüvele), selgus et nimetatud tüvi omab *rscF* geeni. Selle informatsiooni põhjal disainisin spetsiifilised PCR-i praimerid, mille abil õnnestus tüvest SCC3193 isoleerida *rscF* geen. *Pcc*-i *rscF* geen kodeerib valku, mis on homoloogne vastava valguga *Eca*-s ja *E. colis* (vastavalt 94% ja 69% sarnane).

Teine olulisem abivalk, mis kuulub Rcs süsteemi on RcsA (Wehland ja Bernhard, 2000). *Eca* tüvi SCRI1043, mille genoom on täielikult sekveneeritud, ei oma *rscA* geeni. Seetõttu üritasin leida *rscA* geeni *Pcc*-i genoomist disainides degeneratiivsed praimerid kasutades erinevate organismide *rscA* geeni järjestusi. Vaatamata erinevate praimerite kasutamisele, ei õnnestunud mul tüvest SCC3193 *rscA* geeni isoleerida.

3.3 Rcs süsteemi mõju taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioonile indutseerimata tingimustes

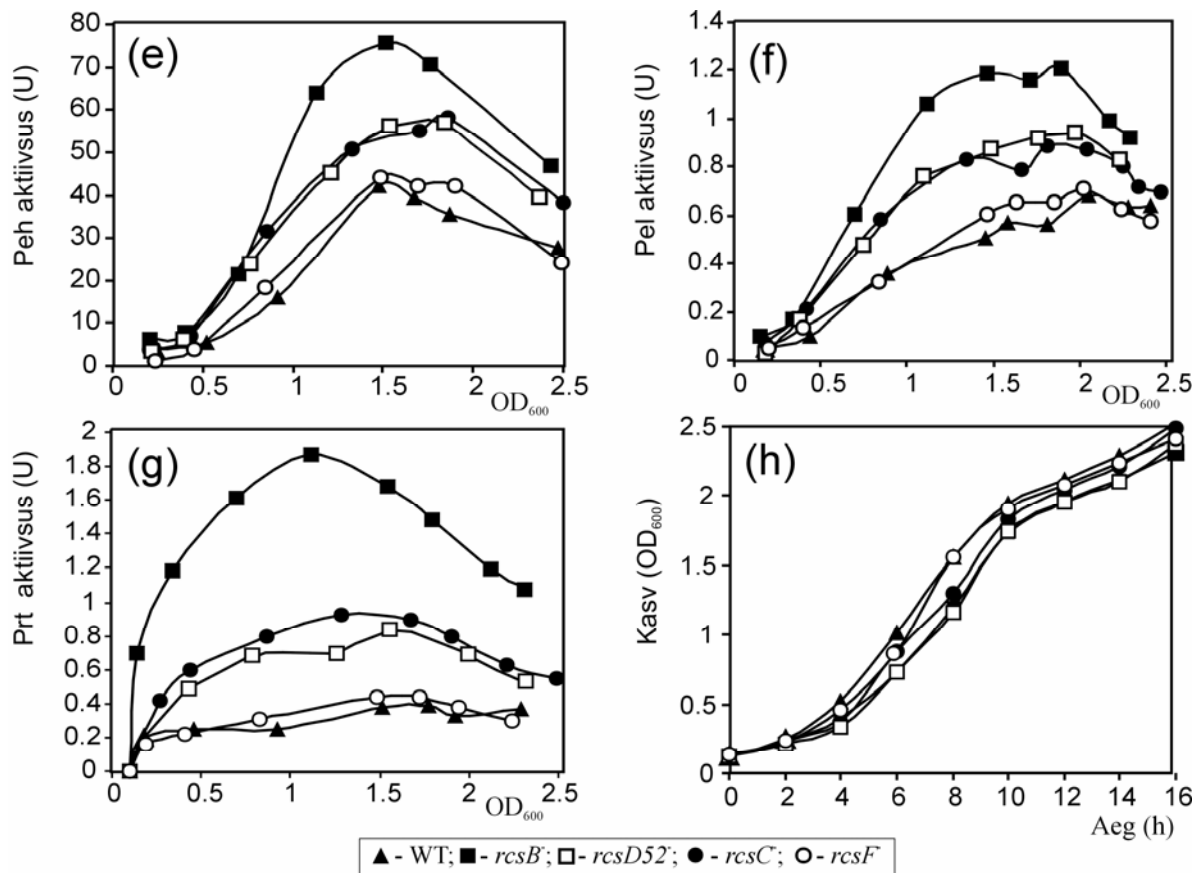
Rcs süsteem võib rakus erinevaid protsesse nii aktiveerida kui ka represseerida. Selleks, et välja selgitada, milline on erinevate Rcs süsteemi komponentide mõju viruletsusfaktorite produktsioonile, määrasin proteaasi, polügalakturonaasi ning pektaatlüaaside produktsiooni erinevates Rcs süsteemi komponentide mutantides (*rscC*-, *rscD*-, *rscB*- ja *rscF*-negatiivses mutandis). Tulemused on toodud joonisel 3. Tihedusel OD₆₀₀=1,5, kus ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioon on maksimaalne, põhjustas *rscB* geeni inaktiveerimine kõigi kolme analüüsitud ekstratsellulaarse ensüümi produktsiooni olulist kasvu võrreldes metsiktüvega. *rscB*-negatiivne mutant tootis 18 korda rohkem polügalakturonaasi (Peh), 9 korda rohkem pektaatlüaase (Pel) ja 19 korda rohkem proteaasi võrreldes metsiktüvega SCC3193. *rscD* ja *rscC* geenide inaktiveerimine mõjutas ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni vähem kui *rscB* mutatsioon. Nii *rscC* kui *rscD* negatiivses mutandis oli Peh-i tootmine tõusnud 9 korda võrreldes metsiktüvega. Prt ja Pel produktsioon oli mõlemas mutandis 4 korda suurem kui metsiktüves. *rscF* geeni inaktiveerimine ei mõjutanud ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni *Pcc*-s.



Joonis 3. Taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioon *Pcc*-i metsiktüves ja *rcs* mutantides indutseerimata tingimustes. Graafikutel (a), (b) ja (c) on toodud metsiktüve ja erinevate *rcs* mutantide polügalakturonaasi, pektaatlüaaside ja proteaasi aktiivsused avaldatuna optilise tiheduse muutusena rakutiheduse, minuti ja ml kohta (U; vt. „Materjal ja meetoodika”). Graafikul (d) on toodud bakterikultuuride optiline tihedus aja lõikes. Erinevate mutantide ja metsiktüve (WT) tähistused on toodud joonise alumises osas. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Standardhälvet pole joonise selguse huvides näidatud, kuid see on kõikidel juhtudel väiksem kui 10%

3.4 Rcs süsteemi mõju taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioonile indutseeritud tingimustes

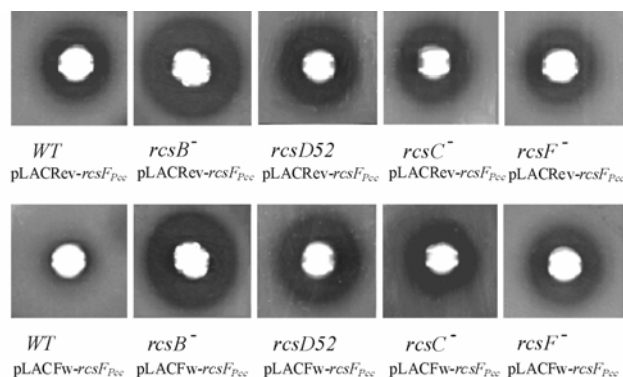
Virulentsusfaktorite produktsioon on oluline siis, kui patogeen satub peremeestaime. Taimekoes ümbritseb bakterit hoopis teistsugune keskkond võrreldes sellega, millised olid elutingimused taime pinnal või mullas. Vastuseks uutele keskkonnatingimustele muutub ka paljude geenide ekspressioon. Selleks, et välja selgitada, millist rolli omab Rcs süsteem virulentsusfaktorite sünteesile tingimustes, mis imiteerivad taimekoes olevaid tingimusi, määrasin ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni ka polügalakturoonhappe juuresolekul nii Rcs süsteemi erinevates mutantides kui ka metsiktüves SCC3193 (PGA; 0,4%). Indutseeritud tingimustes jäi Rcs süsteemi mõju ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile alles, kuid oluliselt vähesemal määral (joonis 4). *rscB* mutant tootis tihedusel $OD_{600}=1.5$ 2 korda rohkem Peh-i, 1,9 korda rohkem Pel-i ning 3,6 korda enam Prt-i kui metsiktüvi. Samuti nagu indutseerimata tingimustes, mõjutas *rscD* ja *rscC* geenide inaktiveerimine ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni vähem kui *rscB* mutatsioon. *rscC* mutandis oli Peh-i ja Pel-i produktsioon suurenenud 1,4 korda võrreldes metsiktüvega ning Prt-i tootmine oli 2,3 korda suurenenud võrreldes metsiktüvega. *rscD* mutandi poolt toodetud Peh-i ja Pel-i produktsioon oli 1,5 korda suurem kui metsiktüve vastav väärtus. Proteaasi tootis *rscD*-negatiivne tüvi 2,4 korda rohkem kui metsiktüvi. *rscF* geeni inaktiveerimine ei mõjutanud ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni *Pcc*-s ka indutseeritud tingimustes. Samas on säilinud PGA indutseeriv efekt *rsc*-negatiivsetes tüvedes.



Joonis 4. Taimeraku kesta lagundavate ensüümide produktsioon *Pcc*-i metsiktüves ja *rsc* mutantides indutseeritud tingimustes (+0,4% PGA). Graafikutel (a), (b) ja (c) on toodud metsiktüve ja erinevate *rsc* mutantide polügalakturonaasi, pektaatlüaaside ja proteaasi aktiivsused avaldatuna optilise tiheduse muutusena rakutiheduse, minuti ja ml kohta (U; vt. „Materjal ja meetoodika”). Graafikul (d) on toodud bakterikultuuride optiline tihedus aja lõikes. Erinevate mutantide ja metsiktüve (WT) tähistused on toodud joonise alumises osas. Graafikutel näidatud tulemused on kolme teineteisest sõltumatu katse keskmised. Standardhälvet pole joonise selguse huvides näidatud, kuid see on kõikidel juhtudel väiksem kui 10% väärtusest.

3.5 *rcsF*-i üleekspressioon represserib ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni Rcs süsteemi vahendusel

rcsF geeni inaktivatsioon mutandis SCC6026 ei mõjutanud ensüümide produktsiooni ei indutseeritud ega ka mitteindutseeritud tingimustes (Joonis 3 ja 4). Selleks, et välja selgitada, kas *rcsF* on Rcs süsteemi funktsionaalne komponent tüves SCC3193 konstrueerisin *rcsF*-üleekspressiooni plasmidi (pLACFw-*rcsF*_{PCC}). Plasmidi pLACFw-*rcsF*_{PCC} viimine metsiktüvesse SCC3193 põhjustas proteolüütilise aktiivsuse languse piima sisaldaval testtassil (joonis 5). RcsF üleekspressioon erinevates Rcs süsteemi mutantides ei avaldanud mõju proteaasi produktsioonile. RcsF üleekspressioon represseris ka pektinolüütiliste ensüümide produktsiooni ainult metsiktüves SCC3193, kuid ei avaldanud mingit mõju Rcs süsteemi mutantides.

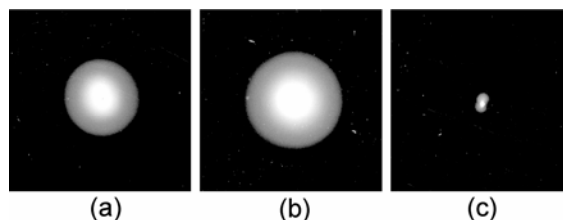


Joonis 5. *rcsF*-üleekspressiooni mõju proteaasi produktsioonile metsiktüves ja Rcs signaaliülekaneraja mutantides. Ülemises reas on metsiktüvi (WT) ja Rcs süsteemi mutantid, millesse on viidud kontrollplasmid pLACRev-*rcsF*_{PCC}. Alumises reas on metsiktüvi (WT) ja samad mutantid, millesse on viidud *rcsF*-üleekspressiooni konstrukt pLACFw-*rcsF*_{PCC}. Proteaasi produktsiooni on hinnatud piima sisaldaval agarsöötmel tekkinud halo suuruse järgi.

3.6 Rcs süsteem mõjutab *Pcc*-i liikuvust

*E. coli*s, *Proteus mirabilis*es ja mitmetes *Salmonella* tüvedes ja mõjutab Rcs süsteem nende bakterite liikuvust (Cano jt., 2002; Francez-Charlot jt., 2003; Clemmer jt., 2007). Testisin kas Rcs süsteem mõjutab ka *Pcc*-i liikuvust. *rcsB*-negatiivse tüve (joonis 6b) liikuvus 0,3%-lises agaris oli suurem võrreldes metsiktüvega (joonis 6a). Metsiktüvi

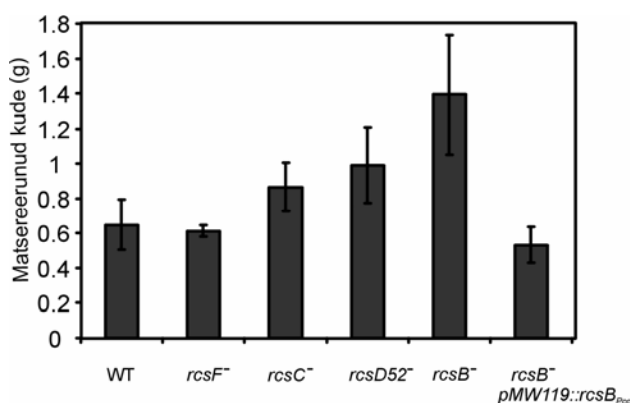
muutus liikumatuks kui sellesse viisin *rscB* geeni üleekspressiooni konstrukti (pMW119::*rscB_{Pcc}*; joonis 6c). Inertsioonid geenides *rscF*, *rscD* ja *rscD* ei mõjutanud oluliselt *Pcc*-i liikuvust.



Joonis 6. RcsB mõju liikuvusele. Liikuvust testiti 0,3%-lises LB agaris. (a) metsiktüvi; (b) *rscB*-negatiivne tüvi; (c) *rscB* üleekspressioon metsiktüves. Foto on tehtud 48 tundi pärast tassi inkubeerimist temperatuuril +30°C.

3.7 Rcs süsteem mõjutab *Pcc*-i virulentsust kartulil

Eelnevad uurimused on näidanud, et mida rohkem *Pcc*-i tüvi toodab ekstratsellulaarseid ensüüme, seda ulatuslikumat taimekoe matseratsiooni see põhjustab (Pirhonen jt., 1993; Chatterjee jt., 1995; Marits jt., 1999). Selleks, et kirjeldada Rcs süsteemi rolli *Pcc*-i virulentsuses, testisin Rcs süsteemi mutantide matseratsioonivõimet. Selleks nakatasin kartulimugulaid erinevate *rsc* mutantidega ning metsiktüvega. Tulemustest selgus, et *rscF*, *rscD* ja *rscC* negatiivsete mutantide virulentsus ei erinenud oluliselt metsiktüve virulentsusest (joonis 7). *rscB* mutandi virulentsus oli aga poole suurem kui metsiktüvel. *rscB* üleekspressiooni plasmidi (pMW119::*rscB_{Pcc}*) viimine *rscB* negatiivsesse mutanti SCC6605 põhjustas viimase matseratsioonivõime vähenemise.



Joonis 7. *rsc* mutantide ja metsiktüve virulentsus kartulimugulal. Joonisel on näidatud 10 kartuli nakatamisel saadud keskmine matsereerunud koe hulk grammides.

4. ARUTELU

Paljudel bakteritel on kirjeldatud erinevaid kahekomponendilisi ja mitmeastmelisi signaaliülekandesüsteeme, mis reguleerivad rakusiseseid füsioloogilisi protsesse vastavalt väliskeskkonnast tulevatele signaalidele. Üheks selliseks süsteemiks on Rcs süsteem, mida on leitud mitmete erinevate sealhulgas ka patogeensete bakterite genoomidest (nt. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia proteamaculans*, *Erwinia amylovora*, *Edwardsiella ictaluri*, *Sodalis glossinidius* ning *Salmonella*, *Shigella* ja *Yersinia* erinevates tüvedes). Rcs süsteem reguleerib paljude sealhulgas ka virulentsusfaktorite sünteesi määravate geenide ekspressiooni (Brill jt., 1988; Tobe jt., 2005; Garcia-Calderon jt., 2005). Rcs süsteemi lai levik patogeensete hulgas viitab sellele, et tegemist võib olla universaalse regulatsioonisüsteemiga, mis mõjutab geeni ekspressiooni sõltuvalt väliskeskkonna tingimustest. Käesolevas töös näitasin, et Rcs süsteem moduleerib ekstratsellulaarsete ensüümide ekspressiooni ja selle kaudu mõjutab ka virulentsust patogeenis *Pcc*.

Katse tulemused näitasid, et nii *rscB*, *rscC* kui ka *rscD* negatiivses mutandis oli mitteindutseeritud tingimustes virulentsusfaktorite süntees oluliselt suurenenud võrreldes metsiktüvega SCC3193. Kõige rohkem oli ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioon suurenenud *rscB* negatiivses mutandis (Joonis 3). *rscC* ja *rscD* negatiivses mutandis oli ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioon samuti suurenenud, kuid vähem kui *rscB* mutandis. Pregused tulemused viitavad sellele, et tüves SCC3193 võib RcsB aktiveerimine toimuda ka funktsionaalsete sensorvalkude RcsC või RcsD puudumisel. Ka varem on näidatud, et RcsB võib reguleerida sihtmärkgeenide ekspressiooni RcsC/RcsD-sõltuva fosfaatrühma ülekanderaja puudumisel (Castanié-Cornet jt., 2007). RcsB aktiivsus *rscC* ja *rscD* negatiivsetes mutantides võib sõltuda teistest rakusisestest fosfaatrühma doonoritest. Varem on näidatud, et RcsB on võimeline aktiveeruma omandades fosfaatrühma atsetüülfosfaadilt (Fredericks jt., 2006). Samuti võib olla RcsB aktiivsus reguleeritud teiste kahekomponendiliste süsteemide sensorvalkude poolt (Hagiwara jt., 2003). Välistada ei saa ka, et RcsB võib olla osaliselt aktiivne fosforüleerimata olekus, kuna fosforüleerimata RcsB on võimeline siduma mitmeid sihtmärkgeenide promootorregioone *in vitro* (Kelm jt., 1997; Davalos-Garcia jt., 2001;

Francez-Charlot jt., 2003). *In vivo* tõendid fosforüleerimata RcsB regulatoorsest rollist rakus puuduvad.

Minimaalsöötmel kasvatatud bakterikultuuride virulentsusfaktorite produktsiooni profiil ei vasta sellele, milline on virulentsusfaktorite produktsioon peremeestaimes. Selleks et uurida Rcs süsteemi mõju ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile tingimustel, mis on sarnased taime apoplastis olevale keskkonnale, kasvasime metsiktüve ja Rcs süsteemi mutante minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud 0,4% PGA-d. Varem on näidatud, et PGA lisamine söötmesse suurendab ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni kasutades erinevaid mehhanisme. Näiteks on kirjeldatud ekstratsellulaarsete ensüümide repressori KdgR vabanemist sihtmärkgeenide promootoritelt PGA juuresolekul (Liu jt., 1999). Lisaks on oluline, et *Pcc* kasutab PGA-d kui süsinikuallikat ning võrreldes minimaalsöötmega saab *Pcc* PGA-ga indutseeritud sööttest rohkem energiat, mida ensüümiproduktsioonile kulutada. PGA-ga indutseeritud tingimustes oli samuti *rcsC*, *rcsD* ja *rcsB* negatiivsete mutantide ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioon suurem metsiktüve vastavate ensüümide produktsioonist, kuid Rcs süsteemi mõju oli oluliselt kahanenud (joonis 4). Rcs süsteemi represseeriva efekti vähenemine indutseeritud tingimustes võib olla põhjustatud RcsB väljakonkureerimisest sihtmärkgeenide promootoritelt PGA-sõltuvate aktivaatorite poolt. PGA-sõltuvateks ekstratsellulaarsete ensüümide transkriptsiooni aktivaatoriteks *Pcc*-s võivad olla näiteks vastuse regulaatorid ExpA ja PmrA. Mõlemad valgud on olulised ekstratsellulaarsete ensüümide geenide normaalseks ekspressiooniks *Pcc*-s (Eriksson jt., 1998; Hyytiäinen jt., 2003). Praeguse mudeli kohaselt võib taimest tulev signaal aktiveerida ExpA ja/või PmrA vastuse regulaatori, mille tulemusel need valgud konkureerivad aktiveeritud RcsB ekstratsellulaarsete ensüümide geenide promootoritelt välja. Samuti võib RcsB vähenenud mõju ekstratsellulaarsete ensüümide geenidele indutseeritud tingimustes olla põhjustatud sellest, et indutseeritud tingimustes on fosfaatrühma ülekanne suunas $RcsC \rightarrow RcsD \rightarrow RcsB$ vähenenud ning olulisemaks saab RcsB defosforüleerimine, mis inaktiveerib selle vastuse regulaatori. Varasemad Rcs signaaliülekande süsteemi uurijate tulemused on viidanud sellele, et RcsC võib reguleerida RcsB aktiivsust katalüüsides nii RcsB fosforüleerimist kui ka defosforüleerimist (Clarke jt., 2002; Majdalani jt., 2002; 2005; Garcia-Calderon jt., 2005; Fredericks jt., 2006). RcsC roll kinaasi või fosfataasina

võib olla reguleeritud periplasmaatilise PGA poolt või ka rakusisestest regulatsioonimehhanismidest, mis käivituvad vastuseks PGA-induktsioonile. Näiteks võib RcsB fosforüleerimine olla maha reguleeritud faktorite poolt, mis aktiveeruvad vastuseks soodsale elukeskkonnale. Ka varem on näidatud, et Rcs süsteemi olulisus väheneb, kui bakter satub stressiindutsserivast keskkonnast bakterisõbralikumasse keskkonda. Näiteks aktiveerub Rcs süsteem *E. coli* vastuseks niiskuse vähenemisele keskkonnas. Rcs süsteemi aktiveerumine tagab kapslisünteesi geenide suurema ekspressiooni, mille tulemusel toodetakse keskkonna kuivuse eest kaitsev kapsel (Ophir ja Gutnick, 1994). Samuti on näidatud, et *E. coli* kapslisüntees on indutseeritud siis, kui bakter kasvab tunduvalt madalamal temperatuuril (20°C) kui optimaalne kasvutemperatuur (37°C; Hagiwara jt., 2003).

Varem on näidatud, et Rcs süsteemi abivalk RcsF omab olulist rolli signaali vahendamisel keskkonnast sensorvalgule RcsC (Majdalani jt., 2002). Tüves SCC3193 aga ei mõjutanud *rscF* geeni inaktiveerimine ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni. Need tulemused viitavad sellele, et antud tingimustes ei ole signaali vastuvõtmiseks RcsF valku vaja. Ka varem on kirjeldatud RcsF-sõltumatut Rcs süsteemi aktivatsiooni, näiteks DjlA valgu üleekspressioon on võimeline aktiveerima Rcs süsteemi sihtmärkgeenide ekspressiooni *E. coli rcsF* negatiivses mutandis (Kelley ja Georgopoulos, 1997). Samuti on *ydeI* geeni Rcs-sõltuv aktivatsioon säilinud *Salmonella* Typhi *rscF* negatiivses mutandis (Potrykus ja Wegrzyn, 2004). Selleks, et välja selgitada, kas RcsF valk kuulub Rcs süsteemi komponentide hulka *Pcc*-s, viisime funktsionaalset *rscF* geeni sisaldava plasmidi (pLACFW-*rscF_{Pcc}*) nii erinevatesse Rcs süsteemi mutantidesse kui ka metsiktüvesse SCC3193. RcsF valgu üleekspressioon mõjutas ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni metsiktüves, kuid ei mõjutanud nende ekspressiooni üheski Rcs süsteemi mutandis (joonis 5). Saadud tulemuste näitavad, et üleekspressiooni tingimustes on RcsF *Pcc*-is küll võimeline Rcs süsteemi aktiveerima, kuid *rscF*-i inaktiveerimisest ei piisa, et elimineerida Rcs süsteemi negatiivne mõju ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile. Selline RcsF üleekspressiooni mõju ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile võib olla kaudne. Varem on näidatud, et Rcs süsteem aktiveerub vastuseks mitmetele membraanis toimuvatele muutustele. Näiteks aktiveerub Rcs süsteem vastuseks välismembraani fosfolipiidse kaksikkihi

defektidele, membraanivalkude sünteesi defektidele ning ka mitmete membraanivalkude üleekspressioonile (Kelley ja Georgopoulos, 1997; Chen jt., 2001; Cano jt., 2002; Shiba jt., 2004). Arvestades asjaolu, et RcsF lokaliseerub välismembraanis, võib tema üleekspressioon põhjustada häireid välismembraanis, mis aktiveerivad sensorvalgu RcsC kinaasse aktiivsuse.

Lisaks ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonile on *Pcc*-i infektsiooni levikuks peremeestaimes oluline ka patogeeni liikuvus (Perombelom, 2002; Pirhonen jt., 1991). *E. colis*, *Proteus mirabilises* ja *Salmonella* erinevates tüvedes on näidatud Rcs süsteemi negatiivset mõju bakteri liikuvusele läbi liikuvusega seotud geenide peamiste regulaatorite FlhD ja FlhC (Cano jt., 2002; Francez-Charlot jt., 2003; Clemmer jt., 2007). *Pcc*-i RcsB on samuti liikuvuse negatiivne regulaator, kuid kas ka *Pcc*-s on Rcs süsteemi mõju liikuvusele vahendatud *flhDC* geenide poolt vajab veel tuvastamist (joonis 6). *rscC* ja *rscD* funktsionaalsete geenide puudumine ei mõjutanud *Pcc*-i liikuvust (tulemusi pole näidatud). *rscC* ja *rscD* mutantide liikuvuse sarnasus metsiktüvega võib tuleneda sellest, et RcsCD signaalirada ei osale liikuvuse regulatsioonis *Pcc*-s.

Selleks et toimuks peremeestaimes efektiivne nakatumine ja sellele järgnev patogeeni paljunemine ning levik, on vajalik kõigi virulentsusfaktorite koordineeritud süntees (Perombelon, 2002). Et testida, millist mõju avaldavad muutused ekstratsellulaarsete ensüümide produktsioonis virulentsusele, võrdlesime Rcs süsteemi mutantide virulentsust metsiktüvega SCC3193. Virulentsustestid kartulimugulatel näitasid, et kõige suuremat koe matseratsiooni võrreldes tüvega SCC3193 põhjustas *rscB* negatiivne mutant (Joonis 7). *rscC* ja *rscD* mutantide virulentsus oli vähem suurenenud võrreldes *rscB* mutandiga (Joonis 7). Erinevate *rsc* geenide mutantide virulentsus on kooskõlas nende mutantide ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooniga (joonis 3 ja 4). *rscB* mutandi suuremale virulentsusele kartulimugulal võib kaasa aidata ka selle mutandi suurenenud liikuvus. Saadud tulemuste põhjal võib teha järelduse, et Rcs süsteem mõjutab *Pcc*-i virulentsust peamiselt reguleerides ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni.

Praeguseks kogunenud tulemuste põhjal võib Rcs süsteem mõjutada ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni, kas otse või kaudselt. Otsese mõju puhul seondub fosforüleeritud RcsB Prt-i, Peh-i ja Pel-i kodeerivate geenide promootoraladele

ning repressseerib transkriptsiooni nendelt promootoritelt. Kui Rcs süsteemi mõju on kaudne, siis reguleerib fosforüleeritud RcsB mõnda teist globaalset regulaatorit, mõjutades kas selle transkriptsiooni või seondumist ekstratsellulaarsete ensüümide sünteesi määravate geenide promootorpiirkonnaga. Selleks, et välja selgitada, kas Rcs süsteemi mõju ekstratsellulaarsetele ensüümidele on otsene või kaudne, tuleb läbi viia DNA-valk interaktsiooni tuvastamise katsed ning selgitada, kas RcsB on võimeline siduma Prt-i, Peh-i või Pel-i kodeerivate geenide promootoreid. Kui selgub, et RcsB mõju nendele geenidele on siiski kaudne, tuleb otsida globaalseid regulaatoreid, mille inaktiveerimine tühistab Rcs süsteemi represseriva mõju sihtmärkgeenidele. Seda saab teha näiteks *rscB*-üleekspressiooni tingimustes transposoonmutageneesi abil.

Käesolevas töös kirjeldasin Rcs regulatsioonisüsteemi taimepatogeenis *Pcc*. Rcs süsteem repressseerib selles patogeenis ekstratsellulaarsete ensüümide (Peh, Pel ja Prt) produktsiooni, mis on *Pcc*-i peamiseks virulentsusfaktoriteks. Rcs süsteemi mõju on suurem mitteindutseeritud tingimustes. Seega ilmselt on Rcs süsteem oluline taimepatogeenis *Pcc*, siis kui see patogeen kasvab väljaspool peremeesorganismi, kus ekstratsellulaarsete ensüümide ülemäärane produktsioon oleks ressursside raiskamine.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli leida uusi regulaatorgeene, mis mõjutavad taimepatogeeni *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum* virulentsust.

Käesolevas töös kirjeldati esmakordselt Rcs signaaliülekanDESüsteemi osalust *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum* virulentsuse regulatsioonis. Töö tulemused näitavad, et Rcs mitmeastmeline signaaliülekanDE süsteem represserib *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum* virulentsust surudes maha peamiste virulentsusfaktorite, ekstratsellulaarsete ensüümide geenide ekspressiooni. Rcs süsteemi represseriv efekt on suurem, kui söötmesse ei ole lisatud polügalakturoonhapet. Polügalakturoonhappe lisamine söötmesse imiteerib osaliselt taime apoplastis esinevaid tingimusi. Samuti represserib Rcs süsteemi vastuse regulaatorvalk RcsB selle taimepatogeeni liikuvust. Lisaks näitavad katsete tulemused, et Rcs süsteemi abivalgu RcsF puudumine ei mõjuta Rcs-sõltuvat ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni ning virulentsust. RcsF on võimeline Rcs süsteemi aktiveerima vaid üleekspressiooni tingimustes.

Töö tulemustest järeldub, et Rcs süsteem *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum*is on oluline virulentsuse mahasuruja just väljaspool peremeestaime, kus liigne ekstratsellulaarsete ensüümide tootmine oleks liigne ressursside raiskamine. *rscF* geeni produkt *Pcc*-s ei ole hädavajalik Rcs süsteemi aktiveerumiseks, kuid aktiveerib Rcs-sõltuvat ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni üleekspressiooni tingimustes.

Rcs süsteemi fosfaadiülekanDET aktiveeriva/represseriva signaalmolekuli, vastuse regulaatori RcsB teiste aktivaatorite ning fosforüleeritud RcsB sihtmärkgeenide tuvastamiseks on vajalikud edasised katsed.

Summary

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* (*Pcc*) is one of the plant pathogens causing general tissue maceration, termed soft rot disease. Nearly all flesh vegetables are subject to bacterial soft rots. Although soft rot disease is caused by some other bacteria and fungi, *Pcc* is the most wide-spread and causes the most destructive soft rot. The plant cell wall degrading enzymes are the main virulence factors of *Pcc*, but because of them plant defences are evoked. Because tissue maceration before the bacterial population reaches the critical level might induce plant defences and cause suppression of bacterial invasion, production of plant cell wall degrading enzymes must be firmly controlled.

The aim of this study was to identify new regulators which affect the production of the main virulence factors (extracellular enzymes) in *Pcc*.

As a result the Rcs phosphorelay was identified from *Pcc*. Rcs phosphorelay represses the production of extracellular polygalacturonase (Peh), pectate lyases (Pel) and protease (Prt) in *Pcc*. The repressing effect of Rcs phosphorelay on extracellular enzyme production was partially decreased in induced conditions (0.4% PGA). The virulence and motility of *Pcc* is also repressed by Rcs phosphorelay. Inactivation of *rscF* gene coding for outer membrane lipoprotein RcsF had no effect on extracellular enzyme production in both uninduced and induced conditions. Over-expression of *rscF* gene reduced extracellular enzyme production in wild-type strain, but had no effect on *rscC*, *rscD* and *rscB* negative mutants.

The results of this study show that Rcs phosphorelay represses the virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by modulating the production of extracellular enzymes. RcsF is not necessary for the activation of Rcs phosphorelay both

in uninduced and induced conditions, but over-expression of *rscF* represses extracellular enzyme production in RcsCDB-dependent manner.

Further study is needed to find the signal molecule for Rcs phosphorelay and target promoters bound by response regulator RcsB in *Pcc*.

Tänuavaldused

Täna Andres Mäed inspireeriva juhendamise, Viia mitmekülgse abi ja huvitavate ideede ning kogu meie sõbralikku laborikollektiivi meeleolu loomise eest. Suured tänud ka Signele, Paulale ja Jaanisele sisutihedate diskussioonide eest.

Kasutatud kirjandus

- Adams, M. H (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers Inc. NY. 445-447.
- Agrios, G. N (1997). Plant Pathology 4th Ed. Academic Press, San Diego.
- Altschul, S., Berriman, M., Hall, N., Hattori, M., Hide, W. ja Lehane, M. J (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Andersson, R. A., Eriksson, A. R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A. ja Palva, E. T (2000). Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR(Ecc)*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 384-393.
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S. ja Bourret, R. B (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845-848. Ülevaateartikkel.
- Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P. S. ja Popoff, M. Y (1998). The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Mol. Microbiol.* **29**: 835-850.
- Bauchop, T. ja Elsdén, S. R (1960). The growth of microorganisms in relation their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* **23**: 469-475.
- Belas, R., Schneider, R. ja Melch, M (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding a regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol.* **180**: 6126-6139.

- Belleman, P. ja Geider, K (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 931-940.
- Bernhard, F., Coplin, D. L. ja Geider, K (1993). A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to *cps* genes in *Erwinia stewartii*. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 158-168.
- Bernhard, F., Schullerus, D., Belleman, P., Nimtz, M., Coplin, D. L. ja Geider, K (1996). Genetic transfer of amylovoran and stewartan synthesis between *Erwinia amylovora* and *Erwinia stewartii*. *Microbiology* **142**: 1087-1096.
- Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. ja Simon, M. I (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**: 131-141.
- Bourret, R. B., Borkovich, K. A. ja Simon, M. I (1991). Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 401-441. Ülevaateartikkel.
- Bugert, P. ja Geider, K (1995). Molecular analysis of the *ams* operon required for exopolysaccharide synthesis of *Erwinia amylovora*. *Mol. Microbiol.* **15**: 917-933.
- Burbulys, D., Trach, K. A. ja Hoch, J. A (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* **64**: 545-552.
- Caetano-Anolles, G (1993). Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl.* **3**: 85-94.
- Cano, D. A., Dominguez-Bernal, G., Tierrez, A., Garcia-Del Portillo, F. ja Casadesus, J (2002). Regulation of capsule synthesis and cell motility in *Salmonella enterica* by the essential gene *igaA*. *Genetics* **162**: 1513-1523.
- Carballes, F., Bertrand, C., Bouche, J. P. Ja Cam, K (1999). Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rscC-rscB*. *Mol. Microbiol.* **34**: 442-450.
- Castanie-Cornet, M. P., Treffandier, H., Francez-Charlot, A., Gutierrez, C. ja Cam, K (2007). The glutamate-dependent acid resistance system in *Escherichia coli*: essential and dual role of the His-Asp phosphorelay RcsCDB/AF. *Microbiology* **153**: 238-246.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, C. K. ja 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**: 1959-1967.

Chen, M. H., Takeda, S., Yamada, H., Ishii, Y., Yamashino, T. ja Mizuno, T (2001). Characterization of the RcsC-->YojN-->RcsB phosphorelay signaling pathway involved in capsular synthesis in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2364-2367.

Chilcott, G. S. ja Hughes, K. T (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 694-708. Ülevaateartikkel.

Clarke, D. J., Joyce, S. A., Toutain, C. M., Jacq, A. ja Holland, I. B (2002). Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **184**: 1204-1208.

Clemmer, K. M. ja Rather, P. N (2007). Regulation of *flhDC* expression in *Proteus mirabilis*. *Res. Microbiol.* **158**: 295-302.

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K. ja Chatterjee, A. K (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. *J. Bacteriol.* **177**: 5108-5115.

Cui, Y., Mukherjee, A., Dumenyo, C. K., Liu, Y. ja 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.

Datsenko, K. A. ja Wanner, B. L (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640-6645.

Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C. ja Cam, K (2001). Regulation of *osmC* gene expression by the two-component system *rscB-rscC* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5870-5876.

Ebel, W. ja Trempey, J. E (1999). *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions to activate its own expression. *J. Bacteriol.* **181**: 577-584.

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. ja Oppenheimer, N. J (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**: 2444-2449.

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealson, K. H. ja Oppenheimer, N. J (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. **20**: 2444-2449.

Eguchi, Y. ja Utsumi, R (2005). A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 70-72.

Erickson, K. D. ja Detweiler, C. S (2006). The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/commensals and activates *ydeI*, a gene important for persistent *Salmonella* infection of mice. *Mol. Microbiol.* **62**: 883-894.

Eriksson, A. R. B., Andersson, R. A., Pirhonen, M. ja Palva, E. T (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Ferrieres, L. ja Clarke, D. J (2003). The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Mol. Microbiol.* **50**: 1665-1682.

Flego, D., Marits, R., Eriksson, A. R., Kõiv, V., Karlsson, M. B., Heikinheimo, R. ja 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.

Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanie-Cornet, M. P., Gutierrez, C. ja Cam K (2003). RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **49**: 823-832.

Fredericks, C. E., Shibata, S., Aizawa, S., Reimann, S. A. ja Wolfe, A. J (2006). Acetyl phosphate-sensitive regulation of flagellar biogenesis and capsular biosynthesis depends on the Rcs phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **61**: 734-747.

Garcia-Calderon, C. B., Garcia-Quintanilla, M., Casadesus, J. ja Ramos-Morales, F (2005). Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**: 579-588.

- Gervais, F. G. ja Drapeau, G. R (1992). Identification, cloning, and characterization of *rscF*, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation *ftsZ84* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 8016-8022.
- Goh, E. B., Siino, D. F. ja Igo, M. M (2004). The *Escherichia coli tppB* (*ydgR*) gene represents a new class of OmpR-regulated genes. *J. Bacteriol.* **186**: 4019-4024.
- Gottesman, S. ja Stout, V (1991). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12. *Mol. Microbiol.* **5**: 1599-1606.
- Gottesman, S., Trisler, P. ja Torres-Cabassa, A (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J. Bacteriol.* **162**: 1111-1119.
- Hagiwara, D., Sugiura, M., Oshima, T., Mori, H., Aiba, H., Yamashino, T. ja Mizuno, T (2003). Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 5735-5746.
- Hanahan, D (1983). Studies of the transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 577-580.
- Heikinheimo, R., Flego, D., Pirhonen, M., Karlsson, M. B., Eriksson, A., Mäe, A., Kõiv, V. ja Palva, E. T (1995). Characterization of a novel pectate lyase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 207-217.
- Hoch, J. A (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 165-170. Ülevaateartikkel.
- Hofmann, K. ja Stoffel, W (1993). TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**,166.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M. ja 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**: 931-938.
- Hyytiäinen, H., Sjöblöm, S., Palomäki, T., Tuikkala, A. ja Palva, E. T (2003). The PmrA-PmrB two-component system responding to acidic pH and iron controls virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Mol. Microbiol.* **50**: 795-807.
- Iuchi, S. ja Lin, E. C (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9**: 9-15. Ülevaateartikkel.

- Kato, M., Aiba, H., Tate, S., Nishimura, Y. ja Mizuno, T (1989). Location of phosphorylation site and DNA-binding site of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the osmoregulatory genes of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **249**: 168-172.
- Kelley, W. L. ja Georgopoulos, C (1997). Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **25**: 913-931.
- Kelm, O., Kiecker, C., Geider, K. ja Bernhard, F (1997). Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 72-83.
- LeDeaux, J. R., Yu, N. ja Grossman, A.D (1995). Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**: 861-3.
- Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F. 3-s, Oakford, L., Yuksel, U., Giedroc, D. P. ja Romeo, T. The RNA molecule *CsrB* binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 17502-17510.
- Liu, M. Y., Yang, H. ja Romeo, T (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* **177**: 2663-2672.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A. ja Chatterjee, A. K. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. *Mol. Microbiol.* **29**: 219-234.
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, W. L. ja Chatterjee, A. K (1999). *kdgRPcc* negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, HarpinPcc, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* **181**: 2411-2421.
- Liu, Y., Murata, H., Chatterjee, A. ja Chatterjee, A. K (1993). 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.
- Lutkenhaus, J. ja Addinall, S. G (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 93-116. Ülevaateartikkel.

- Mäe, A., Heikinheimo, R. ja Palva, E. T (1995). Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celV1* and the role of cellulase in phytopathogenicity. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 17-26.
- Majdalani, N. ja Gottesman, S. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 379-405. Ülevaateartikkel.
- Majdalani, N., Heck, M., Stout, V. ja Gottesman, S (2005). Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: 6770-6778.
- Majdalani, N., Hernandez, D. ja Gottesman, S (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol. Microbiol.* **46**: 813-826.
- Marits, R., Kõiv, V., Laasik, E. ja 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**: 1959-1966.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mäe, A. ja Pirhonen, M (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 1366-1375.
- Miller, J. H (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Mizuno, T (1998). His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J. Biochem.* **123**: 555-563.
- Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 743-752.
- Murata, H., Chatterjee, A., Liu, Y. ja Chatterjee, A. K (1994). Regulation of the production of extracellular pectinase, cellulase, and protease in the soft rot bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: evidence that *aepH* of *E. carotovora* subsp. *carotovora* 71 activates gene expression in *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3150-3159.
- Ninfa A. J. ja Magasanik, B (1986). Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 5909-5913.

- Ogino, T., Matsubara, M., Kato, N., Nakamura, Y. ja Mizuno, T (1998). An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the HPt domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **27**: 573-585.
- Ohnishi, K., Ohto, Y., Aizawa, S., Macnab, R. M. ja Iino, T (1994). FlgD is a scaffolding protein needed for flagellar hook assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: 2272-2281.
- Ophir, T. ja Gutnick, D. L (1994). A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 740-745.
- Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., Hiraga, S. ja Mori, H (2002). Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **45**: 673-695.
- Parker, C. T., Kloser, A. W., Schnaitman, C. A., Stein, M. A., Gottesman, S. ja Gibson, B. W (1992). Role of the *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 2525-2538.
- Parkinson, J. S (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-71. Ülevaateartikkel.
- Parkinson, J. S. ja Kofoed, E. C (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112. Ülevaateartikkel.
- Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. ja Hoch, J. A (1994). Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**: 1047-1055.
- Pérombelon, M. C. M (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant. Pathol.* **51**: 1-12.
- Perombelon, M. C. M. ja Kelman, A (1980). Ecology of the soft rot erwinias. *Annu. Rev. Phytopathol.* **18**: 361-387.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R. ja 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. ja Palva, E. T (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb. Pathog.* **4**: 359-367.
- Pirhonen, M., Saarilahti, H., Karlsson, M-B. ja Palva, E.T (1991). Identification of pathogenicity determinants of *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* by transposon mutagenesis. *Mol. Plant–Microb. Interact.* **4**: 276–283.
- Potrykus, J. ja Wegrzyn, G (2004). The ypdI gene codes for a putative lipoprotein involved in the synthesis of colanic acid in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**: 265-271.
- Roberts, I. S (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 285-315. Ülevaateartikkel.
- Rowell, E. H., Smith, J. M., Wolfe, A. ja Taylor, B. L (1995). CheA, CheW, and CheY are required for chemotaxis to oxygen and sugars of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 6011-6014.
- Sanger, F., Nicklen, S. ja Coulson, A (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schoenhals, G. J. ja Macnab, R. M. FliL is a membrane-associated component of the flagellar basal body of *Salmonella*. *Microbiology* **145**: 1769–1775.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. ja Ponting, C. P (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857-5864.
- Shiba, Y., Yokoyama, Y., Aono, Y., Kiuchi, T., Kusaka, J., Matsumoto, K. ja Hara, H (2004). Activation of the Rcs signal transduction system is responsible for the thermosensitive growth defect of an *Escherichia coli* mutant lacking phosphatidylglycerol and cardiolipin. *J. Bacteriol.* **186**: 6526-6535.
- Sjöblöm, S., Brader, G., Koch, G. ja Palva, E. T (2006). Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1474-1489.
- Sledjeski, D. D. ja Gottesman, S (1996). Osmotic shock induction of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**: 1204-1206.

- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M. ja Reeves, P. R (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* **178**: 4885-4893.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. ja Goudreau, P. N (2000). Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 183-215. Ülevaateartikkel.
- Stout, V (1994). Regulation of capsule synthesis includes interactions of the RcsC/RcsB regulatory pair. *Res. Microbiol.* **145**: 389-392. Ülevaateartikkel.
- Stout, V (1996). Identification of the promoter region for the colanic acid polysaccharide biosynthetic genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**: 4273-4280.
- Stout, V. ja Gottesman, S (1990). RcsB and RcsC: a two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 659-669.
- Stout, V., Torres-Cabassa, A., Maurizi, M. R., Gutnick, D. ja Gottesman S (1991). RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. *J. Bacteriol.* **173**: 1738-1747.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H. ja 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.
- Tetart, F., Albigot, R., Conter, A., Mulder, E. ja Bouche, J. P (1992). Involvement of FtsZ in coupling of nucleoid separation with septation. *Mol. Microbiol.* **6**: 621-627.
- Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara, S. ja Sugimoto, N (2005). Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **58**: 320-333.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M. ja Harshey, R. M (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: critical role for lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **182**: 6308-6321.
- Torres-Cabassa, A. S. ja Gottesman, S (1987). Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis. *J. Bacteriol.* **169**: 981-989.

- Tsuzuki, M., Ishige, K. ja Mizuno, T (1995). Phosphotransfer circuitry of the putative multi-signal transducer, ArcB, of *Escherichia coli*: *in vitro* studies with mutants. *Mol. Microbiol.* **18**: 953-962.
- Virlogeux, I., Waxin, H., Ecobichon, C., Lee, J. O. ja Popoff, M. Y (1996) Characterization of the *rcsA* and *rcsB* genes from *Salmonella typhi*: *rcsB* through *tvfA* is involved in regulation of Vi antigen synthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1691-1698.
- Ward, J. E. Jr. ja Lutkenhaus, J (1985). Overproduction of FtsZ induces minicell formation in *E. coli*. *Cell* **42**: 941-949.
- Wehland, M. ja Bernhard, F (2000). The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**: 7013-7020.
- Wehland, M., Kiecker, C., Coplin, D. L., Kelm, O., Saenger, W. ja Bernhard, F (1999). Identification of an RcsA/RcsB recognition motif in the promoters of exopolysaccharide biosynthetic operons from *Erwinia amylovora* and *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *J. Biol. Chem.* **274**: 3300-3307.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. ja Salmond, G. P (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 365-404.
- Ülevaateartikkel.

Lisa 1