

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

Marili Palover

**ExpS /ExpA kahekomponentse süsteemi roll virulentsuse regulatsioonis
taimepatogeenis *Pectobacterium wasabiae* SCC3193**

Bakalaureusetöö

Juhendajad PhD Lee Põllumaa
PhD Andres Mäe

Tartu 2013

SISUKORD

Lühendid.....	4
Sissejuhatus	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Pectobacterium'ide üldiseloomustus.....	6
1.2. Pectobacterium wasabiae' virulentsusfaktorid.....	7
1.3. Virulentsusfaktorite regulatsioon.....	7
1.3.1. Hulgatunnetus.....	8
1.3.2. FlhDC.....	9
1.3.3. KdgR.....	9
1.3.4. Rsm süsteem.....	9
1.4. Kahekomponendilised süsteemid.....	10
1.4.1. Üldiseloomustus ja signaali ülekanne.....	10
1.4.2. ExpS-ExpA [GacS/GacA].....	11
1.4.3. Rcs süsteem.....	12
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	13
2.1. Töö Eesmärgid.....	13
2.2. Materjal ja meetodika.....	13
2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid.....	13
2.2.2. Söötmed ja kasvatamine.....	14
2.2.3. Mutatsiooni sisseviimine.....	15
2.2.4. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon.....	15
2.2.5. Kloneerimine.....	16
2.2.6. Sekveneerimine.....	16
2.2.7. Transformatsioon, elektroporatsioon.....	17
2.2.8. β -glükuronidaasi aktiivsuse määramine.....	17
2.3. Tulemused ja arutelu.....	19
2.3.1. Rcs ja ExpS/ExpA süsteemid mõjutavad rsmB ekspressiooni.....	19
2.3.2. ExpA regulaatorvalgu mõju rsmB promootori aktiivsusele.....	22

2.3.3. Järeldused.....	24
KOKKUVÕTE.....	25
SUMMARY.....	26
KASUTATUD KIRJANDUS.....	27
LIHTLITSENTS	33

Lühendid

Amp – ampitsilliin

Cel – tsellulaas

Cm – klooramfenikool

Csr – süsiniku kogumise regulaator

CTAB – tsetüültrimetüülammooniumbromiid

Exp – ekstratsellulaarse ensüümide tootmine (ik. *extracellular enzyme production*)

FlhDC – flagellaarsete geenide ekspressiooni reguleeriv valkkompleks

gusA – β -glükuronidaasi geen

HSL – homoseriinlaktoon, hulgatunnetuse signaalmolekul

Km – kanamütsiin

LB – Luria-Bertani sööde

MU – 4-metüülumbelliferooni

MUG – 4-metüülumbelliferüül- β -D-glükuroniid

Nip – nekroosi esilekutsuv valk

PCWDE – taime rakukesta lagundavad ensüümid (ik. *Plant cell wall degrading enzymes*)

Peh – endopolügalakturonaas

Pel – pektaatlüaas

Pnl – pektiinlüaas

Prt – proteaas

Pw – *Pectobacterium wasabiae*

Rsm – sekundaarsete metaboliitide regulaator (ik. *regulator of secondary metabolites*)

sRNA – väike mittekodeeriv RNA molekul

Sissejuhatus

Taimehaiguste ja mitmesuguste kahjurite tõttu hävib igal aastal suur osa põllumajanduslikku toodangut. Taimehaigusi põhjustavad mitmesugused mikroorganismid, kelle hulgas mängivad tähtsat rolli fütopatogeensed bakterid. Üheks laialt levinud taimehaiguseks on märgmädanik, mida põhjustavad perekonda *Pectobacterium* kuuluvad laia peremeesringiga bakterid. Mullas ja taimede pinnal on patogeen latentses faasis ning ei põhjusta taimehaigust. Infektsiooni levikuks on vajalikud soodsad keskkonnatingimused nagu kõrge niiskuse tase, anaeroobsed kasvutingimused ning sobilik temperatuur (Perombelon, 2002). Taime nakatamiseks sekreteerivad bakterid taime rakuseina lagundavaid ensüüme, mis lagundavad taime rakuseina komponente pektiini ja tselluloosi, varustades samal ajal kasvavat bakteripopulatsiooni eluks vajalike toitainetega.

Virulentsusfaktorite ekspressiooni kontrollib mitmeastmeline reguleeriv võrgustik, mis tagab nende sünteesi õigel ajal õiges kohas. Nende seas on tähtis hulgatunnetus, mis reguleerib virulentsusfaktorite sünteesi, tunnetades bakteripopulatsiooni arvukust. Signaalmolekul, millele süsteem vastab, on homoseriinlaktoon. Kui selle kontsentratsioon keskkonnas on ületanud kriitilise piiri, käivitatakse nakatunud taimes virulentsusfaktorite produktsioon.

Lisaks hulgatunnetusele, kontrollivad virulentsusfaktorite produktsiooni ka kahekomponendilised regulatsioonisüsteemid. Need süsteemid võtavad vastu keskkonnast ja rakust tulevaid signaale ja mõjutavad nende poolt kontrollitavate geenide ekspressiooni kas positiivselt või negatiivselt. *Pectobacterium wasabiae* kahekomponendiliste regulatsioonisüsteemide hulgas on üheks olulisemaks ExpS/ExpA süsteem, mis mõjutab virulentsusfaktorite sünteesi määravate geenide ekspressiooni.

Töö eesmärgiks oli mutatsiooni sisseviimine *rsmB* promootorpiirkonda, et välja selgitada ExpA regulaatorvalgu mõju *rsmB* transkriptsioonile.

Täna oma juhendajat Lee Põllumaad ja Andres Mäed ning meeldivat laborikollektiivi.

1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. *Pectobacterium*'ide üldiseloomustus

Ühed enimlevinud *Pectobacterium* liiki kuuluvad patogeenid on *Pectobacterium atrosepticum*, kes on peamiselt levinud mõõdukas kliimavööndis, ning käesolevas töös uuritav *Pectobacterium wasabiae*, kes on levinud nii mõõdukas, troopilises kui ka subtroopilises kliimavööndis (Perombelon, 2002; Toth jt, 2003). Geograafilise jaotuse tõttu on neil välja kujunenud erinevad kasvutemperatuuride optimumid. *Pectobacterium wasabiae* kasvutemperatuuri optimum on 30°C, kus mõõdukama kliimaga harjunud *Pectobacterium atrosepticum*'i, optimumiga <25°C, kasv oleks inhibeeritud (Perombelon, 1987).

Perekond *Pectobacterium* kuulub *Enterobacteriaceae* sugukonda. Nad on gramnegatiivsed pulkbakterid, kelle suurus varieerub 0,5–1,0 mikromeetrini (Agrios, 1997). Nad omavad vibreid, mis on olulised, et taimes edasi liikuda ja terveid kudesid nakatada. Meie labori tüvi *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 (*P_w*, varem nimetati seda tüve *Pectobacterium carotovorum* alaml. *carotovorum*; *Erwinia carotovorum* alaml. *carotovorum*) isoleeriti nakatunud kartulimugulast Soomes 1980-ndate alguses (Pirhonen jt, 1988; Nykyri jt, 2012). Sealt alates on *P_w*'d märgmädaniku uurimises kasutatud mudeltüvena ning praeguseks on juba päris palju teada tema virulentsuse ja molekulaarbioloogia kohta.

Pectobacterium'id põhjustavad kartulimädanikku, mis põhjustab arvestatavat majanduslikku kahju. Bakter võib olla taimede ja mugulate pinnal nn latentses faasis, kus virulentsusfaktoreid ei sünteesita. Taimes sisenevad nad läbi õhulõhede, kartulitaimede varte ja mugulate. Esmase infektsiooni piirkonnas hakatakse tootma ja sekreteerima taimede rakuseina lagundavaid ensüüme. Nende abil lõhustatakse taimede rakusein oligogalakturniidideks, mida kasutab bakter oma elutegevuseks ja paljunemiseks. Bakteri levides kogunevad taimes lagunenuid rakuseina komponendid, mis põhjustab vee kadu ja lõpuks taimede närbumise.

1.2. *Pectobacterium wasabiae*' virulentsusfaktorid

Pectobacterium wasabiae on kohastunud eluks erinevates keskkonnatingimustes. Selleks, et kartulitaimet kaitseks maha suruda ja edukalt taimes paljuneda, peab bakter tootma ja transportima rakust välja taime rakuseina lagundavaid ensüüme. Pärast bakteritaimekoosse tungimist lagundavad need ensüümid taime rakuseina komponente, mis põhjustab nakatunud taimes kudede matsratsiooni. Olulisemad taime rakuseina lagundavad ensüümid on polügalakturonaas, proteaas, tsellulaas, pektinaas (Hyytiäinen jt, 2001).

Üks põhilisi rakuseina komponente, mida pektinaasid lagundavad, on pektiin. See on polümeer, mis koosneb omavahel α -1,4-glükosiidsidemega seotud galakturoonhappe jääkidest. Pekiini hüdrolyüsil pektinaaside toimel moodustuvad erineva ahelapikkusega oligogalakturoniidid, mida bakter saab kasutada süsiniku- ja energiaallikana (Barras jt, 1994). Pektatülaas lagundab pektiini α -1,4-glükosiidsidet, pektiinmetüülesterasid lagundavad metüleeritud pektiini ning polügalakturonaasid lagundavad mittemetüleeritud pektatülaasi α -1,4-glükosiidsidemeid (Collmer ja Keen, 1986; Chatterjee, A., jt, 1991; Barras jt, 1994).

Teine tähtsam rakuseina komponent tselluloos moodustab kuni 30% primaar- ja sekundaarrakuseina kuivmassist taimes. Tsellulaasid hüdrolyüsivad tselluloosi glükoosi monomeeride vahelisi β -1,4-D-glükosiidsidemeid ja on *Pectobacterium wasabiae*'s kodeeritud tsellulaaside geenide *celS* ja *celVI* poolt. *celS* ja *celVI* geenide mutandid on metsiktüvega võrreldes vähem virulentsed (Saarilahti jt, 1990; Barras jt, 1994).

Proteaasid, mis *Pectobacterium wasabiae*'s on kodeeritud *prtW* geeni poolt, lagundavad taimseid valke. Arvatakse, et nende üheks oluliseks funktsiooniks on taime kaitsevalkude lagundamine. Sellele viitab ka asjaolu, et patogeen produtseerib PrtW proteaasi juba varajases kasvufaasis, kui teiste virulentsusfaktorite süntees ei ole veel käivitunud (Marits jt, 2002).

Samuti on olulised virulentsusfaktorid nekroosi indutseeriv valk Nip, mis põhjustab taimeraku surma (Mattinen jt, 2004), ja bakterit liikumisvõime, nakkuse edasiseks levikuks (Perombelon, 2002).

1.3. Virulentsusfaktorite regulatsioon

Muutuvate keskkonnatingimustega toimetulekuks on bakteritel mitmesugused regulatsioonisüsteemid, mis võimaldavad teha kiiresti ümberkorraldusi rakus toimuvates füsioloogilistes protsessides. Regulatsioon peab tagama selle, et virulentsusfaktorite süntees käivitatakse õigeaegselt. Nende süntees vales ajal ja vales kohas põhjustaks asjatut energiakulu ning indut-

seeriks taime kaitsevastuse infektsiooni varajases staadiumis, kui patogeeni arvukus esmases nakatumiskohas on veel väike.

Virulentsusgeenide ekspressiooni kontrollivad regulatsioonisüsteemid on nii globaalsed kui geenispetsiifilised, mis reguleerivad taime rakuseina komponente lagundavate ensüümide tootmist nii transkriptsiooni kui translatsiooni tasemel. Kõik see kokku moodustab keerulise ja mitmeastmelise regulatoorse võrgustiku.

1.3.1. Hulgatunnetus

Hulgatunnetuse regulatsioonisüsteem on levinud paljudes bakterites, kus see kontrollib erinevaid füsioloogilisi protsesse nagu virulentsusfaktorite tootmist ja biofilmi moodustumist *Pseudomonas aeruginosa*'s, eksopolüsahhariidide tootmist *Pantoea stewartii*'s ja rakuseina lagundavate ensüümide tootmist *Pectobacterium wasabiae*'s (Sjöblom jt, 2006). Hulgatunnetuse esmane tähtsus arvatakse olevat rakk-rakk kommunikatsioonis ja põhineb bakterite võimel sekreteerida ja ära tunda autoinduktorit homoseriinlaktooni (HSL). Bakterite arvukuse suurenemisega primaarses nakatumiskohas hakkab suurenema ka HSL kontsentratsioon ümbritsevas taimekoos. Kui HSL kontsentratsioon on saavutanud teatud kriitilise piiri, käivitatakse sellele vastusena virulentsusfaktorite süntees patogeenis. (Andersson jt, 2000; Pirhonen jt, 1993)

Pectobacterium wasabiae's kuuluvad sellesse süsteemi kolm geeni: *expI*, autoinduktori süntetaas, ja kaks regulaatorgeeni *expR1* ja *expR2* (Pirhonen jt, 1993; Andersson jt, 2000). Mutandid, kes ei tooda HSL'i, on avirulentsed. ExpI, ExpR1 ja ExpR2 valgud mõjutavad virulentsusfaktorite produktsiooni läbi Rsm süsteemi (Kõiv ja Mäe, 2001; Cui jt, 2005; Sjöblom jt, 2006) Täpsemalt Rsm süsteemist vt 1.3.4.

ExpR reguleerib positiivselt *rsmA* transkriptsiooni. *RsmA* kodeerib RsmA valku, mis on virulentsusfaktorite negatiivne regulaator: destabiliseerib ekstratsellulaarsete ensüümide mRNA-d neile seondudes. Bakteripopulatsiooni tiheduse suurenemisel suureneb ka HSL'i kontsentratsioon. Autoinduktor seondub ExpR1 ja ExpR2'ga ja blokeerib nende seondumise *rsmA* promootorile (Sjöblom jt, 2006). See kaotab *rsmA* represseeriva mõju taime rakuseina lagundavate ensüümide tootmisele.

1.3.2. FlhDC

flhDC operon reguleerib viburite sünteesi enterobakterites. *E. Coli*'s osaleb viburite sünteesis ligikaudu 40 geeni, mis paiknevad vähemalt 14 operonis (Liu ja Matsumura, 1994). Viburite sünteesiks vajalikud geenid on jaotatud kolme klassi: I, II ja III. *flhD* ja *flhC* on flagellaarsete geenide I klass. Nendelt toodetud valgud moodustavad FlhDC heksameerse kompleksi, mis soodustab sigmafaktori σ^{70} seondumist II klass geenide promootorpiirkonda. II klass geenid on vajalikud viburi basaalkoha ja konksu sünteesiks, mis koos moodustavad HBB (ik. *hook-basal body*) kompleksi. Lisaks kuulub sellesse klassi ka sigmafaktor σ^{28} ja selle sünteesi määrav geen *fliA*, mis on vajalik III klass geenide avaldumiseks (Aldridge jt, 2006).

Praeguseks on selgunud, et FlhDC on oluline ka virulentsusfaktorite sünteesi regulatsioonis. Tema mõju virulentsusgeenide ekspressioonile on kaudne ja toimub läbi ExpS/ExpA süsteemi, milles ta aktiveerib *expA* geeniekspressiooni (Cui jt, 2008). Seega kontrollib FlhDC taimepatogeenis kahte protsessi: viburite ja virulentsusfaktorite sünteesi, mis mõlemad on patogeenile olulised peremeestaime nakatamisel .

1.3.3. KdgR

KdgR on globaalne regulaatorvalk, mis mõjutab virulentsusfaktorite sünteesi otse, seondudes nii vastavate geenide regulaatorpiirkonnas oleva kdgR-boksiga, kui ka kaudselt läbi Rsm süsteemi. KdgR seondub tema poolt kontrollitavate geenide promootorpiirkonnaga ja blokeerib vastavate geenide transkriptsiooni (Liu jt, 1999). Pektini lagunemisel tekkivad laguproduktid seonduvad KdgR'ga, mille tulemusena tekib inaktiivne kompleks valgu ja laguproduktide vahel, mis ei ole võimeline seonduma DNA-ga (Hugouvieux-Cotte-Pattat jt, 1996). *kdgR* mutandil on näidatud *celVI*, *pehA* ja *prtW* transkriptide sarnast taset metsiktüve SCC3193'ga ning 30% kõrgemat Pel aktiivsuse taset kui metsiktüves (Hyytiäinen jt, 2001).

1.3.4. Rsm süsteem

Rsm (sekundaarse metabolismi regulaator) regulatsioonisüsteemil on oluline roll bakterite metabolismis ja käitumises. Esmalt avastati RsmA-*rsmB* süsteemi homoloog CsrA-*csrB* *E.coli*'s, kus see kontrollib suhkrute metabolismi. Csr süsteem koosneb RNA-d siduvast valgust CsrA, kahest mittekodeerivast sRNA-st, mis on CsrA antagonistid (*csrB*, *csrC*) ja CsrD valgust. CsrA valk seondub sihtmärk mRNA-le ja takistab seeläbi translatsiooni iniitsiatsiooni. Ta mõjutab negatiivselt glükogeeni sünteesi ja metabolismi ja aktiveerib viburi

sünteesi ja liikumist. Väikesed mittekodeerivad *csrB* ja *csrC* RNA-d seovad CsrA'd ja blokeerivad selle mõju mRNA-le (Liu jt, 1997; Dubey jt, 2005).

Pectobacterium wasabiae's reguleerib Rsm süsteem virulentsusfaktorite produktsiooni ja koosneb RNA-le seonduvast valgust RsmA; mittetransleeritud regulaatorsest *rsmB*-RNA-st ja RsmC'st, mis reguleerib positiivselt *rsmA* ja negatiivselt *rsmB*-RNA taset (Chatterjee jt, 1995; Cui jt, 1995). RsmA seondub sihtmärk mRNA-le ja blokeerib vastavalt mRNA-lt translatsiooni, mille tõttu mRNA muutub ebastabiilseks ja lagundatakse rakus olevate RNAaside poolt (Liu jt, 1998; Ma jt, 2001). Regulaatorne *rsmB*-RNA on RsmA antagonist, mis eemaldab RsmA virulentsusgeenide mRNA-delt võimaldades virulentsete geenide ekspressiooni. RsmA sidumiseks *rsmB*-RNA-RsmA kompleksi on olulised *rsmB*-RNA paardumata alades paiknevad GGA motiive sisaldavad järjestuselemendid (Liu jt, 1998).

Rsm regulaatorne süsteem mängib olulist rolli ekstratsellulaarsete ensüümide tootmises, ekstratsellulaarsete polüsahhariidide sünteesis, sekundaarsete metaboliitide tootmises, hulgatunnetuses ja liikumises (Chatterjee jt, 1995; Cui jt, 1995; Cui jt, 1996; Mukherjee jt, 1996; Ma jt, 2001; Kõiv jt, 2013). Rakus olev vaba RsmA, *rsmB*-RNA ja *rsmB*-RNA-RsmA ribonukleoproteiin kompleksuue paneb suuresti paika, kas virulentsusfaktoreid kodeerivaid gene ekspresseeritakse või represseritakse.

1.4. Kahekomponendilised süsteemid

1.4.1. Üldiseloostus ja signaali ülekannet

Kahekomponendilised süsteemid on bakterite hulgas laialdaselt levinud. Need regulaatorsed süsteemid aitavad organismil muutuvate keskkonnatingimustega kohaneda. Paljudes bakterites, kaasa arvatud *Pectobacterium wasabiae*'s, koosnevad kahekomponendilised süsteemid sensorikinaasist ja regulaatorvalgust, mis on tavaliseks viisiks, kuidas bakterid tunnetavad keskkonna muutusi ja vastavad nendele. Lisaks klassikalistele kahekomponendilistele süsteemidele, mis koosnevad kahest valgust, on nende kõrval ka süsteemid, kus fosfaatrühma ülekannet teostab rohkem kui kaks valku.

Keskkonnast tulevad signaalid, mis käivitavad kahekomponendilise regulatsioonisüsteemi, võivad olla nii abiootilised (pH, temperatuur) kui ka biootilised (produtseeritud peremeesraku või bakteri enda poolt). Klassikalise kahekomponendilise süsteemi signaali tunneb ära sensorivalk, mis on seondunud membraanile. Tihti on sensoriks histidiini kinaas. Signaali ära tundes toimub ATP sõltuv autofosforülatsioon, kus ATP-lt kantakse fosfaatrühm üle konserveeru-

nud histidiini jäägile valgu C-terminaalses domäänis. Sensorkinaasilt tuleva signaali tunneb ära vastuseregulaatori vastuvõtjadomään, kus asub konserveerunud aspartaadijääk. Fosfaatrühm kantakse üle regulaatori aspartaadile, mis põhjustab valgu konformatsiooni muutusi, võimaldades DNA-ga seondumist ja seega reguleerib geeniekspressiooni (Stock jt, 2000).

Signaali ülekande süsteemides, mis koosnevad rohkem kui kahest valgust, toimub fosfaatrühma ülekande mitmeetapiliselt. Fosfaatrühma ülekande mehhanism on sama, mis kahekomponendilistel süsteemidel, kuid fosfaatrühma ülekande histidiini ja aspartaati sisaldavate domäänide vahel toimub rohkem kui üks kord, enne kui see jõuab vastuseregulaatorile (Andresen jt, 2007).

Pectobacterium wasabiae kasutab teadaolevat nelja erinevat kahekomponendilist süsteemi, et ära tunda keskkonnast tulenevaid signaale ja seeläbi reguleerida virulentsusfaktorite geeniekspressiooni. Nendeks süsteemideks on ExpS-ExpA (Eriksson jt, 1998), PehS-PehR (Flego jt, 2000), PmrA-PmrB (Hyytiäinen jt, 2005) ja Rcs süsteem (Andresen jt, 2007) Mitmete kahekomponendiliste süsteemide signaalmolekulid pole veel praeguseks teada.

1.4.2. ExpS-ExpA [GacS/GacA]

Gramnegatiivsetes bakterites on kirjeldatud GacS/GacA signaalülekande süsteemi, mis reguleerib ainevahetust, eksoensüümide või virulentsusfaktorite sekretsiooni (Heeb ja Haas, 2001). GacS on sensorkinaas, mida kirjeldati esimesena *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*'s (Hrabak ja Willis 1992). Vastuseregulaator GacA'd kirjeldati esimesena *P.fluorescens*'s kui antibiootikumide ja tsüaniidi toomise aktivaatorit (Laville jt, 1992). *Pseudomonas fluorescens* CHA0'1 on uuritud, et GacA mõjutab *rsmYZ* (*rsmY*, *rsmZ*) geenide transkriptsiooni positiivselt (Humair jt, 2010). Dieter Haas'i uurimisrühmas on näidatud, et mutatsioonid *rsmYZ* geenide järjestustes viivad vähenenud virulentsusgeenide ekspressioonile, mis sarnaneb *gacA* mutandi võimega toota ekstratsellulaarseid ensüüme (Valverde jt, 2003; Humair jt, 2010). Arvatakse, et GacA võib seonduda *rsmYZ* geenidel oleva konsensusjärjestusega (Humair jt, 2010). Sarnaselt on *Legionella pneumophila*'s leitud, et LetA/LetS süsteemi vastuseregulaator LetA kontrollib *rsmYZ* gene (*rsmY*, *rsmZ*) positiivselt, neile seondudes (Rasis ja Segal, 2009; Sahr jt, 2009).

Pectobacterium wasabiae's on kirjeldatud GacS/GacA homoloogne süsteem ExpS/ExpA. ExpS/ExpA süsteem kontrollib positiivselt *rsmB*-RNA-de ekspressiooni (Cui jt, 2001; Hyytiäinen jt, 2001). *rsmB*-RNA-s on mittepaardunud GGA motiivid, mis aitavad *rsmB*-RNA-l siduda RsmA valku. Seega ei saa RsmA taime rakuseina lagundavate ensüümide mRNA-sid

blokeerida ning on ribosoomidele translatsiooniks kättesaadavad. Varasemad uuringud on näidanud, et *expA* negatiivsed mutandid toodavad oluliselt vähem ekstratsellulaarseid taime raku-seina lagundavaid ensüüme nagu Pel, Peh ja Cel (Eriksson jt, 1998). Sama efekt on ka *rsmA* negatiivse mutandiga, mis on hüpervirulentne ja toodab kõrgel tasemel ekstratsellulaarseid ensüüme (Chatterjee jt, 1995; Kõiv jt, 2013).

1.4.3. Rcs süsteem

Rcs süsteem koosneb kolmest valgust: RcsC, RcsD ja RcsB. RcsC on sensorvalk, mis omab histidiini kinaasi ja vastuvõtu domääni. RcsD kannab üle fosfaatrühma ja täiendab sellega RcsC'd, millel puudub fosfaatrühma ülekandedomään. Kolmandaks on vastuseregulaator RcsB, millele fosfaatrühm üle kantakse. RcsB on regulaatorvalk, mis seondub DNA-ga ning reguleerib geeniekspressiooni nii positiivselt kui ka negatiivselt (Wehland ja Bernhard, 2000). Üldiselt reguleerib Rcs süsteem bakterites nii kapsli polüsahhariidide sünteesi, rakujagunemist, liikuvust kui ka virulentsusfaktorite sünteesi (Andresen jt, 2010).

Hiljuti näidati meie uurimisgrupis, et *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 Rcs süsteem kontrollib virulentsust nii otseselt kui kaudselt. Kaudset regulatsiooni näidati läbi *flhDC* negatiivse mutandi, kus pektaatlüaaside, tsellulaaside ja proteaaside tase võrreldes metsiktüvega oli langenud. *flhDC/rcsB* topeltnmutant ei näidanud PCWDE'de taseme tõusu, seega *rcsB* inaktivatsioon ja sellega kaasnev ensüümide tootmine on sõltuv FlhDC'st. Lähtuvalt sellest, et RcsB seondub *flhDC* promootoralale otseselt, mõjutab ta kaudselt ka *rsmB* regulatsiooni ja seda negatiivselt (Andresen jt, 2010).

Samuti on näidatud RcsB otsest seondumist *rsmB* promootoralale, positsioonides –192 kuni –211 ja –213 kuni –230 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu, ning *rsmB* transkriptsiooni repressiooni (Andresen jt, 2010).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö Eesmärgid

Humair jt (2010) on näidanud *Pseudomonas fluorescens* CHA0 regulaatorvalgu GacA ning Rasis ja Segal (2009) *Legionella pneumophila* regulaatorvalgu LetA otsest seondumist *rsmXYZ* ja *rsmY* geenidest ülesvoolu asuvatele regulatoorsele aladele, mis mõjutavad *sRNA*-de ekspressiooni positiivselt.

Minu töö eesmärgiks oli:

- teha konstruktsioon, viies sisse 2 punktmutatsiooni *rsmB* promootoril ülesvoolu asuval regulaatorsel alal.
- uurida ExpA regulaatorvalgu mõju *rsmB* transkriptsioonile.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tabel 1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>Pectobacterium wasabiae</i> SCC3193	metsiktüvi	Pirhonen jt, 1988
<i>Pectobacterium wasabiae</i> SCC6030	<i>rscB</i> ::Km ^R	Andresen jt, 2010
<i>Pectobacterium wasabiae</i> SCC3060	<i>expA</i> ::Km ^R	Pirhonen jt, 1993
<i>Pectobacterium wasabiae</i>	<i>expA</i> / <i>rscB</i> ::Km ^R Cm ^R	Kõiv, avaldamata
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE4</i> , \square <i>lacU169</i> , (<i>lacZ</i> \square <i>M15</i>), <i>hasdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA</i> 96, <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
Vektorplasmiidid		
pSEVA:: <i>rsmBgusA</i>	Plasmiid, mis sisaldab <i>SmaI</i> saidis <i>rsmB</i> :: <i>gusA</i> fragmenti, Km ^R	Andresen, avaldamata

pMW119:: <i>gusA</i>	HindIII saiti kloneeritud promootorita glükuronidaasi geen <i>gusA</i> ; Amp ^R	Marits jt, 2002
pMW119:: <i>rsmB_{gusA}</i>	Kloneerimisvektor pMW119:: <i>gusA</i> , mis sisaldab <i>SmaI</i> saidis <i>rsmB</i> geeni promootorit; Amp ^R	Andresen jt, 2010
pMW119:: <i>rsmB_{mut}gusA</i>	Vektor pMW119:: <i>gusA</i> , mis sisaldab <i>SmaI</i> saidis muteeritud <i>rsmB</i> promootorit nukleotiidides -226 ja -215; Amp ^R	Andresen, avaldamata
pMW119:: <i>rsmB_{m1}gusA</i>	Vektor pMW119:: <i>gusA</i> , mis sisaldab <i>SmaI</i> saidis muteeritud <i>rsmB</i> promootorit nukleotiidides -203 ja -196; Amp ^R	Käesolev töö

Tabel 2. Kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Parimeri järjestus
rsmBm1	5' GATAATACATTTTTTACAGCAAA 3'
rsmBpY	5' TTCTGGCCTTAACCCGTTAG 3'
rsmBpA	5' TCCTAAAACAATCCGAGTGAC 3'
M13 Fw	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'
GusMun	5' ACTGATCGTTAAACTGCCTGG 3'

2.2.2. Söötmed ja kasvatamine

E.coli tüved kasvatati temperatuuril 37°C ning *Pectobacterium wasabiae* tüved temperatuuril 30°C. Tüved kasvatati LB vedelsöötmes, tardsöötme valmistamisel lisati LB söötmele agarit 15g/l (Miller, 1972). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* tüved kasvatati temperatuuril 30°C M9 minimaalsöötmes, mis sisaldas süsinikuallikana 0,4% glütserooli (Sambrook ja Russell, 2001).

Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti bakterikultuure loksutil. Vajadusel lisati söötmesse antibiootikume: ampitsiliini (Amp; 150µg/ml), kanamütsiini (Km; 25µg/ml), klooramfenikooli (Cm; 15µg/ml).

2.2.3. Mutatsiooni sisseviimine

Viisin *rsmB* promootoralasse sisse kaks kohtsuunatud punktmutatsiooni, kasutades praimerit pikendamise ehk megapraimerit meetodit (Sambrook ja Russell, 2001). PCR1 käigus kasutades *rsmB_{m1}* ja *rsmB_{pY}* primereid, sain produkti (megapraimerit), mille puhastasin 96% etanooliga sadestamise teel ja kasutasin seda PCR2' e jaoks teiseks praimeriks *rsmB_{pA}* kõrval. Templina kasutasin pSEVA::*rsmBgusA* plasmidi.

2.2.4. PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

Kasutasin PCR'i mutatsiooni sisseviimiseks *Pectobacterium wasabiae rsmB* promootoralasse ning *rsmB* promootorala amplifitseerimiseks. Et tagada täpsem DNA süntees, kasutasin *Pfu* DNA polümeraasi.

PCR'i reaktsioonisegu üldmahuga 25µl destilleeritud vees sisaldas: 2,5µl 10x *Pfu*+MgSO₄ puhvrit; 1,875µl 25mM MgSO₄; 0,5µl 10mM dNTP; 0,5µl 20µM praimer 1 ja 0,5µl 20µM praimer 2; 0,25µl 2,5u/µl *Pfu* DNA polümeraasi; 18,375µl H₂O; 0,5µl märklaud DNA-d.

PCR'i reaktsiooni etapid:

1. 95°C algne denaturatsioon, DNA polümeraasi aktivatsioon 3 minutit
2. 95°C DNA denaturatsioon 30 sekundit
3. 52°C Praimerite seondumine DNA-le 30 sekundit
4. 72°C DNA süntees 50 sekundit

Etappe 2-4 korrati 35 korda.

Konstruktide kontrollimiseks kasutati samuti PCR'i. Reaktsioon viidi läbi reaktsioonisegus mahuga 25µl, mis koosnes: 2,5µl 10x *Taq* puhver [750 mM Tris-HCl (pH 8.8 25°C); 200 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20]; 2,5µl 25mM MgCl₂; 2µl 10mM dNTP; 2µl 20mM M13 Fw ja 2µl 20mM GusMun; 1µl 5u/µl *Taq* DNA polümeraas (Prof. J. Sedman); 13µl H₂O märklaud DNA-ks pMW119::*rsmBgusA*, pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* plasmiididega transformeeritud *wt*, *expA*⁻, *rcsB*⁻, *expA*⁻/*rcsB*⁻ rakud.

PCR'i reaktsiooni etapid:

1. 95°C algne denaturatsioon, DNA polümeraasi aktivatsioon 3 minutit
2. 95°C DNA denaturatsioon 30 sekundit

3. 55°C Praimerite seondumine DNA-le 30 sekundit
4. 72°C DNA süntees 50 sekundit

Etappe 2-4 korrati 25 korda.

2.2.5. Kloneerimine

pMW119::*rsmB_mgusA* konstrukti valmistamiseks lõikasin pMW119::*gusA* plasmidi *SmaI* restriктаasiga ning puhastasin UltraClean™ 15 DNA Purification Kit'ga (MO BIO, USA). PCR'i teel amplifitseeritud *rsmB* DNA fragmendi ning pMW119::*gusA* restriктаasiga lõigatud vektori ligeerisin kokku kasutades Fermentas'e ligeerimispuhvrit ja T4 ligaasi vastavalt tootja protokollile (Fermentas).

2.2.6. Sekveneerimine

Kaksikahelalise DNA järjestuse määramiseks kasutati Sanger'i ensümaatilist meetodit, kus uue ahela süntees lõpetatakse didesoksüribonukleotiididega (Sanger jt, 1977). Sekveneerimisproovid valmistati *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*'i (Applied Biosystems, Kanada) protokoll järgi.

Enne sekveneerimisreaktsiooni alustamist tuli PCR reaktsioonist eemaldada kasutamata jäänud PCR praimerid ning desoksüribonukleotiidid. Selle jaoks kasutati aluselist fosfataasi FastAP ja eksonukleaas I'e (*ExoI*). 5µl-le proovile lisati 0,25µl *ExoI* (20 U/µl) ja 1µl FastAP (1U/µl) ensüüme. Kasutati termotsükleri programmi:

1. 37°C inkubeeriti proove 15 minutit
2. 80°C inaktiveeriti ensüümid 15 minutit

Sekveneermisproovide reaktsioonisegu 10µl sisaldas: 2µl 5x lahjenduspuhver; 0,7µl premix; 0,4µl 4pmol/µl praimer; 1µl PCR puhastatud produkt; 6,8µl H₂O. Sekveneerimiseks kasutati primereid M13Fw ja GusMun.

PCR reaktsiooni etapid:

1. 95°C 1 minut
2. 95°C DNA ahelate denatureerimine 15 sekundit
3. 60°C Praimeri seondumine DNA-ga 10 sekundit
4. 60°C DNA süntees 45 sekundit

Kokku 30 tsükli.

Saadud sekveneermisproovid sadestati -20°C 96%-lise etanooliga (2,5 mahtu) ja 2 μl dekstraanilahusega (ammooniumatsetaadi ja dekstraani segu). Proove hoiti 20 minutit -20°C juures. Seejärel tsentrifugeeriti 15 minutit 4°C juures 13 000 p/min (Eppendorf centrifuge 5415 R). Sadet pesti 200 μl 70% etanooliga, tsentrifugeeriti põhja 10 minutit 4°C juures 13 000 p/min ja eemaldati supernatant. Pesu korrati. Peale supernatandi uuesti eemaldamist lasti sademel kuivada, et vabaneda etanooli jääkidest. Pärast seda lisati 10 μl 70% formamiidi. Proovid sekveneeriti TŪMRI DNA automaatsekvenaatoril (Applied Biosystems).

Sekveneeritud järjestused analüüsiti programmi BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) abil ning sekveneermisel saadud DNA järjestusi võrreldi blastn programmi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abil NCBI Gen-Bank andmebaasis olevate järjestustega.

2.2.7. Transformatsioon, elektroporatsioon

Transformatsioonikompetentsetesse *E.coli* DH5 α rakkudesse lisati 8 μl ligeerimisegu ja hoiti 20 minutit jääl, seejärel tehti kuumašokk 42°C juures 1 minut ja jahutati 5 minutit jääl ning plaaditi Amp-LB tassile. Plasmiid puhastati üleöö LB vedelsöötmes kasvanud rakkudest FavorPrepTM Plasmid Extraction Mini Kit'ga (FAVORGEN, Hiina).

Plasmiidse DNA *P_w* rakkudesse viimiseks kasutati elektroporatsiooni. Kompetentsetele rakkudele lisati ~10 ng plasmiidset DNA-d või sadestatud ligeerimisegu ja hoiti 1 minut jääl. Seejärel pipeteeriti rakud eelnevalt jääl jahutatud elektroporatsiooniküveti. DNA transformatsioon *P_{cc}* tüvedesse viidi läbi elektroporatsiooniga (Ausubel jt, 1987) kasutades BIO-RAD Pulser'it pingel 2,5 kV.

2.2.8. β -glükuronidaasi aktiivsuse määramine

β -glükuronidaasi aktiivsuse määramiseks kasvatati bakterirakke üleöö mikrotiiterplaadil 180 μl -s minimaalsöötmes (M9+glütserool) 30°C juures loksutil (Heidolph Titramax 1000). Hommikul mõõdeti kasvanud rakukultuuride optiline tihedus spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 580nm kasutades Infnit Pro 2000 (Tecan) ja tehti lahjendused algtihedusega $\text{OD}_{580}=0,05$ 150 μl mahus mikrotiiterplaadi kannusesse. Lahjendused tehti minimaalsöötmesse M9, mis sisaldas 0,4% glütserooli.

β -glükuronidaasi aktiivust määrati ajapunktides 6, 8, 10 tundi. Fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati musta läbipaistmatut 96 kaevuga mikrotiiterplaati (Greiner bio-one). Rakkude permeabiliseerimiseks lisati 5 μ l rakkudele 90 μ l CTAB puhvrit (0,05% heksadetsüültrimetüülammoonium bromiid; 0,27% β -merkptoetanool ja 1mM EDTA 50 mM naatriumfosfaatpuhvrist pH=7) ning loksutati 10 minutit. Seejärel lisati 5 μ l MUG (4-metüülumbelliferüül- β -D-glükuroniid; 0.6mg/ml) lahust, mille lagundab *gusA* geeni produkt β -D-glükuronidaas ning tekib fluorestseeruv 4-metüülumbelliferoon (MU). Lasti uuesti 10 minutit loksuda. Peale seda mõõdeti fluorestseeruva produkti MU akumulereerumist spektrofotomeetri abil Infinit Pro 2000'ga (Tecan). Kuna MU fluorestseerub, siis kasutati selle mõõtmiseks ergastamise filtrit 360 nm ja emissiooni filtrit 465 nm. Arvutati relatiivse fluorestsentsi ühiku tõusu sekundis rakutiheduse suhtes (RFU/ sek OD₅₈₀). Kõik proovid määrati vähemalt kolmes korduses.

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Rcs ja ExpS/ExpA süsteemid mõjutavad *rsmB* ekspressiooni

Pw tüve SCC3193 Rcs süsteem on pektobakterites tähtis signaali ülekande süsteem. On näidatud, et selle süsteemi regulaatorvalk RcsB seondub *rsmB* geenile ja blokeerib *rsmB* transkriptsiooni. Suureneb vaba RsmA hulk ja virulentsusfaktorite sünteesi ei toimu. RcsB süsteemi regulaatorvalgu seondumist *rsmB* promootoralale, *rsmB* startkoodonist ülesvoolu positsioonides –192 kuni –211 ja –213 kuni –230, on eelnevalt näidatud meie töögrupis (Andresen jt, 2010). Joonisel 1 on näidatud kaks RcsB seondumiskohta *rsmB* promootoril: positsioonis –230 kuni –213 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu nimetame edaspidi esimeseks seondumiskohaks ja positsioonis –211 kuni –192 teiseks seondumiskohaks.



Joonis 1. *Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 *rsmB* promootorpiirkond koos RcsB seondumiskohtadega (märgitud kastides) positsioonides –230 kuni –213 ja –211 kuni –192 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu (Andresen jt, 2010).

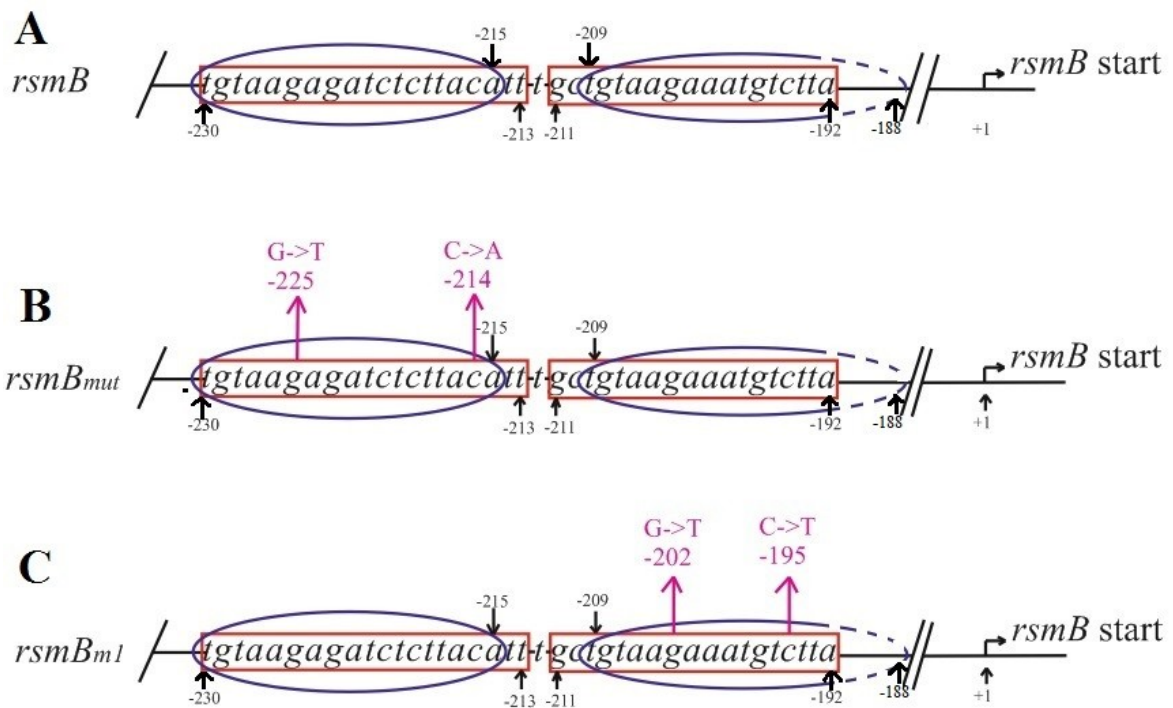
Vastupidiselt Rcs süsteemile on näidatud, et ExpS/ExpA signaaliülekandesüsteem reguleerib *rsmB* geeni transkriptsiooni positiivselt. *rsmB*-RNA-d seovad RsmA valku neutraliseerides RsmA negatiivse efekti taime rakuseina lagundavate ensüümide mRNA-dele ja võimaldavad virulentsusfaktorite tootmist (Hyytiäinen jt, 2001)

Kirjandusest on eelnevalt teada, et ExpA homoloogid kontrollivad sRNA-de regulatsiooni positiivselt. *Legionella pneumophila*'s on näidatud ExpA homoloogi LetA seondumist *rsmYZ* geenide promootoralale (Joonis 2C, Rasis ja Segal, 2009; Sahr jt, 2009). Humair jt (2010) viitasid, et *Pseudomonas fluorescens*'i ExpA homoloog GacA on tähtis *rsmYZ* geenide positiivseks regulatsiooniks. Nad näitasid, et GacA oletatavaks seondumiskohaks võiks olla konsensusjärjestus *rsmYZ* geenide promootoraladel (Joonis 2A). Lähtuvalt ExpA homoloogide LetA seondumisest ja GacA arvatavast seondumisest vastavatele RNA-de konsensusjärjestustele analüüsiti *Pectobacterium wasabiae* tüve SCC3193 *rsmB* geeni promootorpiirkonda. Analüüs näitas ExpA regulaatorvalgu võimalikku seondumist *rsmB* geeni promootoralale (Joonis 2B).

A. LetA <i>rsmY</i>		attg agaaatftctt aca
LetA <i>rsmZ</i>		tgta agaaatftct caat
B. ExpA <i>rsmB</i>	tgtaag ag atctcttaca attgctgta agaaatgtctt atct	
C. GacA <i>rsmY</i>	tgtaag tc atctcttaca	
GacA <i>rsmZ</i>	tgtaag cc aaagattactt	
GacA _{box}	tgtaag nn at nn cttaca	
LetA _{box}		nnnn agaaatnctt nnnn

Joonis 2. LetA/ExpA/GacA hüpoteetilised seondumiskohad sRNA-de promootorpiirkondades. Hallil taustal on GacA_{box}'i konsensusjärjestus ja kollasel taustal LetA_{box}'i konsensusjärjestus. **A.** *Legionella pneumophila rsmYZ* promootoralad (Rasis ja Segal, 2009; Sahr jt, 2009); **B.** *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 *rsmB* promootoralala; **C.** *Pseudomonas fluorescens* CHA0 *rsmYZ* promootoralad (Humair jt, 2010).

Pectobacterium wasabiae tüve SCC3193 *rsmB* geeni promootorpiirkonna analüüs näitab, et regulaatorvalkude RcsB seondumiskohad ja ExpA oletatavad seondumiskohad kattuvad osaliselt (Joonis 3A). Sellest lähtuvalt võiks järeldada, et ExpA ja RcsB valgud konkureerivad üksteisega seondumise pärast *rsmB* promootoralale. On võimalik, et ExpA ja RcsB valkude interaktsioon mõjutab *rsmB* transkriptsiooni.



Joonis 3. *Pw* SCC3193 *rsmB* promootala. Punaste kastidega on tähistatud RcsB seondumiskohad (Andresen jt, 2010); siniste ovaalidega ExpA oletatavad seondumiskohad (Humair jt, 2010; Rasis ja Segal, 2009), nukleotiidide asendus on näidatud positsioonides *rsmB* startkoodonist ülesvoolu. Mutatsioonideta *rsmB* promootala (**A**), esimene seondumiskoht: kaks punktmutatsiooni positsioonides -225 ja -214 (**B**), teine seondumiskoht: kaks punktmutatsiooni positsioonides -202 ja -195 (**C**).

Et uurida, kuidas mutatsioonid *rsmB* promootalas mõjutavad ExpA oletatavat seondumist ja RcsB seondumist valmistati *gusA* reportergeeniga konstruktid, mille abil on jälgitav *rsmB* promootori aktiivsus. Meie töögrupi poolt on varasemalt konstrueeritud pMW119::*rsmBgusA* ja pMW119::*rsmB_{mut}gusA* plasmiidid, kus pMW119::*rsmB_{mut}gusA* plasmiid sisaldab punktmutatsioone ülesvoolu *rsmB* startkoodonit positsioonides -225, kus lämmastikalus guaniin on asendatud tümidiiniga, ja -214, kus lämmastikalus tsütosiin on asendatud adeniniiniga (Joonis 3B). Lisaks konstrueerisin plasmidi, kus *rsmB* startkoodonist ülesvoolu asuvasse promootalasse viisin positsioonidesse -202 ja -195 punktmutatsioonid. Positsioonis -202 asendati lämmastikalus guaniin tümidiiniga ja positsioonis -195 asendati tsütosiin tümidiiniga (Joonis 3C). Saadud konstrukti tähistasin pMW119::*rsmB_{m1}gusA*.

2.3.2. ExpA regulaatorvalgu mõju *rsmB* promootori aktiivsusele

Selleks, et uurida ExpA ja RcsB regulaatorvalkude mõju *rsmB* geeniekspressioonile, viisin pMW119::*rsmBgusA*, pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* transkriptsiooni konstruktid järgmistesse tüvedesse: SCC3193 *wt*, SCC3193 *expA*⁻, SCC3193 *rcsB*⁻ ja SCC3193 *expA*⁻/*rcsB*⁻.

Tabel3. ExpA ja RcsB mõju *rsmB*::*gusA* transkriptsioonile. Transkriptsiooni konstruktid pMW119::*rsmBgusA*, pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* elektroporeeriti tüvedesse SCC3193 *wt*, SCC3193 *expA*⁻, SCC3193 *rcsB*⁻ ja SCC3193 *expA*⁻/*rcsB*⁻. Tüved kasvatati 30°C juures M9 minimaalsöötmes, kuhu oli lisatud 0,4% glütserooli. β-glükuronidaasi aktiivsus mõõdeti, kui kultuurid olid kasvanud 8 tundi. GusA aktiivsus on avaldatud kui RFU sek⁻¹ OD₅₈₀⁻¹. Esitatud on kolme korduse mõõtmiste keskmised tulemused ja standardhälve.

Plasmiid/ SCC3193 tüvi	<i>wt</i>	<i>expA</i> ⁻	<i>rcsB</i> ⁻	<i>expA</i> ⁻ / <i>rcsB</i> ⁻
pMW119:: <i>rsmBgusA</i>	1,46±0,11	0,18±0,02	2,75±0,06	0,17±0,04
pMW119:: <i>rsmB_{mut}gusA</i>	0,23±0,03	0,17±0,01	0,54±0,11	0,2±0,03
pMW119:: <i>rsmB_{m1}gusA</i>	0,73±0,1	1,07±0,01	1,14±0,16	0,84±0,02

Katses saadud tulemused näitavad, et testitud kasvutingimustes oli uuritavate konstruktid pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* β-glükuronidaasi aktiivsus vastavalt 6 ja 2 korda madalam võrreldes SCC3193 *wt* tüve pMW119::*rsmBgusA* konstruktiga. (Tabel 3) . Saadud tulemused näitavad, et *rsmB* promootorpiirkonda sisse viidud mutatsioonid mõjutavad metsiktüve pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* transkriptsioonikonstruktid aktiivsust ja on olulised piirkonnad selle geeni ekspressiooni regulatsioonis.

SCC3193 *expA*⁻ tüves on pMW119::*rsmBgusA* konstrukti β-glükuronidaasi aktiivsus samal tasemel kui pMW119::*rsmB_{mut}gusA* konstruktil ja 6 korda madalam kui pMW119::*rsmB_{m1}gusA* konstrukti puhul (Tabel 3). *expA* negatiivse tüve pMW119::*rsmBgusA* ja pMW119::*rsmB_{mut}gusA* konstruktid võrdlemine näitab, et mutatsioonid esimeses seondumiskohas *rsmB* promootoril (positsioonis -230 kuni -213 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu, joonis 3B) ei mõjuta RcsB seondumist *rsmB* promootalale. pMW119::*rsmB_{m1}gusA* konstrukti ekspressiooni tõus võiks olla seotud DNA konformatsiooni muutusega mutatsioonide tõttu RcsB teises seondumiskohas (positsioonis -211 kuni -192 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu) ja ExpA oletatavas

seondumiskohas (Joonis 3C), kus RNA polümeraas saab DNAGA seonduda ja *rsmB* geenilt transkriptsiooni alustada. Saadud katsetulemused näitavad, et teine seondumiskoht *rsmB* promootoril (positsioonis –211 kuni –192 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu) on oluline RcsB seondumiseks ja *rsmB*'lt transkriptsiooni blokeerimiseks.

SCC3193 *rscB* negatiivse tüve pMW119::*rsmBgusA* konstrukti β -glükuronidaasi aktiivsus on 2 korda kõrgem kui SCC3193 *wt* tüve pMW119::*rsmBgusA* konstruktil (Tabel 3). See on põhjustatud RcsB valgu puudumisest selles tüves, kus RcsB negatiivne mõju *rsmB* ekspressioonile on vähenenud. Uuritavate konstruktide pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA* β -glükuronidaasi aktiivsus võrreldes SCC3193 *rscB*⁻ tüve pMW119::*rsmBgusA* konstruktiga on vastavalt 5 ja 2,4 korda vähenenud (Tabel 3). Tulemused näitavad, et esimene seondumiskoht *rsmB* promootoril (positsioonis –230 kuni –215 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu, joonis 3B) võiks olla ExpA seondumiskoht nagu see arvatakse olevat *Pseudomonas fluorescens* GacA valgu puhul, kus on näidatud tema tähtsus *rsmYZ* geenide positiivseks regulatsiooniks (Humair jt, 2010). ExpA oletatav seondumine teise seondumiskohaga *rsmB* promootoril (positsioonis –209 kuni –188 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu, joonis 3C) on vähem tõenäoline, kuna *rsmB* transkriptsioon on 2 korda kõrgem kui esimese seondumiskoha muteerimisel. Saadud tulemuste järgi võime oletada, et ExpA ja tema homoloog LetA (Rasis ja Segal, 2009) võivad seonduda nn teisele seondumisalale (positsioonis –209 kuni –188 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu, joonis 2), kuid ExpA eelistab esimest seondumisala (positsioonis –230 kuni –215 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu). See võib olla tingitud erinevustest ExpA ja LetA valkude sekundaarstruktuuris või nn esimese seondumiskoha (positsioonis –230 kuni –215 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu) puudumisest *Legionella pneumophila*'s.

Kui omavahel võrrelda *wt* ja *rscB*⁻ mutandi rakkudesse viidud mutatsioonidega konstrukte: pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW119::*rsmB_{m1}gusA*, näeme *rscB*⁻ mutantides vastavalt 2 ja 1.5 kordselt kõrgemaid *rsmB* transkriptsiooni aktiivsusi (Tabel 3). See viitab RcsB valgu seondumisele *wt* *rsmB* promootorala mõlemale konsensusjärjestusele, RcsB seondumisaladele (Joonis 3A).

SCC3193 *expA/rscB*⁻ tüve pMW119::*rsmBgusA* β -glükuronidaasi aktiivsus võrreldes SCC3193 *wt* tüve pMW119::*rsmBgusA* konstruktiga on 8,5 korda vähenenud (Tabel 3). Sama madal β -glükuronidaasi aktiivsus on ka uuritavas *expA/rscB*⁻ tüve pMW119::*rsmB_{mut}gusA* konstruktis, mis *wt* tüve pMW119::*rsmBgusA* konstruktiga võrreldes on samuti 8,5 korda vähenenud (Tabel 3). Need tulemused kinnitavad, et RcsB ja ExpA regulaatorvalkude puudumisel on *rsmB* ekspressioon väga madal. Teise seondumiskoha (positsioonis –211 kuni –192

rsmB startkoodonist ülesvoolu) mutatsioonid *rsmB* promootoralal *expA⁻/rscB⁻* ja *expA⁻* mutantides näitasid *rsmB* ekspressioonitaseme tõusu vastavalt 5 ja 6 korda (Tabel 3) võrreldes tüvede *expA⁻/rscB⁻* ja *expA⁻* ilma mutatsioonita konstruktidega, kus mutatsioonid on esimeses potentsiaalses ExpA seondumiskohas (positsioonis –230 kuni –215 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu). Võime oletada, et teise seondumiskoha (positsioonis –209 kuni –188 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu) mutatsioonid *rsmB* promootoril võivad muuta DNA konformatsiooni ja RNA polümeraas saab *rsmB*'lt transkriptsiooni alustada.

Täpsemalt saaks kinnitada ExpA seondumist *rsmB* promootoralale ja konkureerimist RcsB valguga *in vitro* DNA footprint või Gel Shift analüüsidega.

2.3.3. Järeldused

Pw rsmB promootorpiirkonna analüüs näitas kahte potentsiaalset ExpA valgu seondumiskohta *rsmB* promootoril, mille mõju *rsmB* transkriptsioonile uuriti pMW119::*rsmB_{mut}gusA* ja pMW118::*rsmB_{m1}gusA* transkriptsiooni konstruktidega abil.

Mutatsioonid nii esimeses kui teises seondumiskohas *rsmB* promootoralal mõjutasid *rsmB* transkriptsiooni metsiktüves ja seega on olulised piirkonnad selle geeni ekspressiooni regulatsioonis.

Mutatsioonid *rsmB* promootorpiirkonnas mõjutavad ExpA valgu mõju *rsmB* transkriptsioonile erinevalt ja ExpA tundub eelistavat esimest seondumiskohta.

Mutatsioonide esinemine *rsmB* promootori teises seondumiskohas tundub muutvat DNA konformatsiooni, mille tõttu RNA polümeraas saab seonduda ja *rsmB*'lt transkriptsiooni aktiveerida.

KOKKUVÕTE

Pectobacterium wasabiae on gramnegatiivne fütopatogeen, mille patogeensus sõltub tema võimest toota taime rakuseina lagundavaid ensüüme. Virulentsusfaktorite regulatsiooni kontrollib mitmeastmeline võrgustik, mille osadeks on Rcs ja ExpS/ExpA kahekomponentsed süsteemid. Nende süsteemide regulaatorvalkude mõju avaldub erinevalt läbi Rsm süsteemi.

Eelnevalt on meie töögrupis näidatud Rcs süsteemi regulaatorvalgu RcsB seondumist *rsmB* promootorile ja negatiivset mõju *rsmB*-RNA transkriptsioonile (Andresen jt, 2010). Käesolevas töös uurisin ExpS/ExpA signaali ülekande süsteemi ExpA regulaatorvalgu rolli patogeeni virulentsusfaktorite regulatsioonis. See süsteem kontrollib positiivselt *rsmB*-RNA sünteesi. Rasis ja Segal (2009) on näidanud positiivset mõju virulentsusfaktorite sünteesile läbi ExpA homoloogi LetA seondumise reguleerivate RNA-de geenidele. Samuti on Humair jt (2010) näidanud ExpA homoloogi GacA võimalikku seondumiskohta reguleerivatel RNA geenidel asuvale konsensusjärjestusele. *Pw rsmB* promootoripiirkonna analüüs näitas kahte potentsiaalset ExpA valgu seondumiskohta (positsioonides –230 kuni –215 ja –209 kuni –188 *rsmB* startkoodonist ülesvoolu) *rsmB* promootoril.

Töö eesmärgiks oli uurida ExpA regulaatorvalgu mõju *rsmB* transkriptsioonile. Selleks muuteriti mõlemad ExpA hüpoteetilised seondumiskohad. Määrati pMW119::*rsmB*_{gusA}, pMW119::*rsmB*_{mut}_{gusA} ja pMW119::*rsmB*_m_{gusA} transkriptsiooni konstruktide β-glükuronidaasi aktiivsus *Pw* SCC3193 *wt*, SCC3193 *expA*⁻, SCC3193 *rcsB*⁻ ja SCC3193 *expA*⁻/*rcsB*⁻ tüvedes. Tulemused näitasid, et mutatsioonid nii esimeses kui teises seondumiskohas *rsmB* promootoralal mõjutasid *rsmB* transkriptsiooni metsiktüves. Samuti näidati, et ExpA mõjutab *rsmB* transkriptsiooni positiivselt esimese seondumiskoha kaudu. Mutatsioonide esinemine *rsmB* promootori teises seondumiskohas tundub muutvat DNA konformatsiooni aktiveerides *rsmB* transkriptsiooni.

ExpS/ExpA süsteem on *Pectobacterium wasabiae*'s tähtis virulentsusfaktorite tootmist kontrolliv regulatsioonisüsteem. Sellepärast vajab ExpS/ExpA süsteemi regulaatorvalgu ExpA potentsiaalne seondumine *rsmB* promootoralale veel edasist uurimist.

The Role of the ExpS/ExpA Two Component System in the Regulation of the Virulence in *Pectobacterium wasabiae* SCC3193

Marili Palover

SUMMARY

Pectobacterium wasabiae is a gram-negative phytopathogen, who causes soft rot disease in a wide variety of plants. *Pw* pathogenicity is determined by its ability to produce virulence factors. These factors are regulated by two-component regulatory systems like ExpS/ExpA, Rcs.

ExpS/ExpA two-component regulatory system plays an important role in regulating the production of plant cell wall-degrading enzymes (PCWDE). This system controls positively the transcription of *rsmB*-RNA. It has been shown, that ExpA homologue LetA binds to *rsmYZ* genes promoter regions and thereby regulates their transcription positively.

In the current thesis I analysed a *rsmB* gene promoter region and found out two potential ExpA binding sites (in the positions from -230 to -215 and from -209 to -188 upstream of the start codon of *rsmB*) on *rsmB* promoter region. To understand wheather these sites are important to ExpS/ExpA system, I measured β -glucuronidase (GusA) activity in the SCC3193 *wt*, SCC3193 *expA*⁻, SCC3193 *rscB*⁻ ja SCC3193 *expA*⁻/*rscB*⁻ strains which carrie the plasmids pMW119::*rsmB**gusA*, pMW119::*rsmB*_{mut}*gusA* ja pMW119::*rsmB*_{m1}*gusA*.

The results of my thesis demonstrate, that mutations in the *rsmB* promoter region causes decrease in *rsmB* transcription in the wild-type strain. My results demonstrate that ExpA affects the transcriptsion of *rsmB* via the first binding site (in the positions from -230 to -215 upstream of the start codon of *rsmB*) in the promoter region of the *rsmB* gene. The results of my study also indicate that RcsB modulates the expression of *rsmB* transcription via the second binding site (in the positions from -211 to -192 upstream of the start codon of *rsmB*) in the promoter region of *rsmB* gene. Further study is needed to identify wheather the ExpA directly binds to the promoter region of *rsmB* gene or mediates its effect through other regulators.

KASUTATUD KIRJANDUS

Agrios, G. N. (1997). In Plant Pathology. 4th edition. New York: Academic press.

Aldridge, P. D., Karlinsey, J. E., Aldridge, C., Birchall, C., Thompson, D., Yagasaki, J., Hughes, K. T. (2006). The flagellar-specific transcription factor, σ^{28} , is the Type III secretion chaperone for the flagellar-specific anti- σ^{28} factor FlgM. *Genes and development*. 20:2315-2326.

Andersson, R. A., Eriksson, A. R. B., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen, H., Tuikkala, A., Palva E. T. (2000). Quorum Sensing in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*: The Role of *expR_{Ecc}*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 13(4): 384-393.

Andresen, L., Kõiv, V., Alamäe, T., Mäe, A. (2007). The Rcs phosphorelay modulates the expression of plant cell wall degrading enzymes and virulence in *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*. *FEMS Microbiol Lett*. 273: 229-238.

Andresen, L., Sala, E., Kõiv, V., Mäe, A. (2010). A role for the Rcs phosphorelay in regulating expression of plant cell wall degrading enzymes in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microbiology*. 156: 1323-1334.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Strahl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley and Sons.

Barras, F., van Gijsegem, F., Chatterjee, A.K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 32: 201-234.

Brencic, A., McFarland, K. A., McManus, H. R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S. L., Lory, S. (2009). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol*. 73(3): 434-445.

Chatterjee, A., McEvoy, J.L., Chambost, J.P., Blasco, F. and Chatterjee, A.K. (1991). Nucleotide sequence and molecular characterization of *pnlA*, the structural gene for damage-inducible pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71. *Journal of*

Bacteriol. 173:1765-1769.

Chatterjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, Korsi C., Chatterjee, Arun 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-Oxohehexanoyl)-L-Homoserine Lactone. Applied and Environmental Microbiology. 61(5): 1959-1967.

Chatterjee, A., Cui, Y., Chakrabarty, P., Chatterjee, Arun K. (2010). Regulation of Motility on *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: Quorum-Sensing Signal Controls FlhDC, the Global Regulator of Flagellar and Exoprotein Genes, by Modulating the Production of RsmA, and RNA-Binding Protein. Mol Plant-Microbe Interact. 23(10): 1316-1323.

Collmer, A. and Keen, N.T. (1986). The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis. Annual Review of Phytopathology 24:383-409.

Cui, Y., Chatterjee, A., Liu, Y., Dumenyo, C. K., Chatterjee, A. K. (1995). Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, *N*-(3-oxohehexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rotting *Erwinia* spp. Journal of Bacteriology. 177 (17): 5108-5115.

Cui, Y., Madi, L., Mukherjee, A., Dumenyo, C.K. and Chatterjee, A.K. (1996). The RsmA mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain Ecc71 overexpress *hrpN_{Ecc}* and elicit a hypersensitive reaction-like response in tobacco leaves. Mol Plant-Microbe Interact. 9:565-573.

Cui, Y., Chatterjee, A., Chatterjee Arun K. (2001). Effects of the Two-Component System Comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the Production of Global Regulatory *rsmB* RNA, Extracellular Enzymes, and HarpinEcc. Mol Plant-Microbe Interact. 14(4): 516-526.

Cui, Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N., Chatterjee, Arun K. (2005). ExpR, a LuxR Homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Activates Transcription on *rsmA*, Which Specifies a Global Regulatory RNA-Binding Protein. Journal of Bacteriology. 187(14): 4792-4803.

Cui, Y., Chatterjee, A., Yang, H., Chatterjee, Arun K. (2008). Regulatory Network Controlling Extracellular Proteins in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: FlhDC, the Master Regulator of Flagellar Genes, Activates *rsmB* Regulatory RNA Production by

- Affecting *gacA* and *hexA* (*lrhA*) Expression. Journal of Bacteriology. 190(13): 4610-4623.
- Dubey, A. K., Baker, C., Romeo, T., Babitzke, P.** (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. RNA. 11:1579-1587.
- Eriksson, A. R. B., Andersson, R. A., Pirhonen, M., Palva, E. T.** (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol. Plant Microbe Interact. 11 (8): 743-752.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Kõiv, V., Karlsson, M., Heikinheimo, R. and Palva, E.T.** (2000). A two-component regulatory system, PehR-PehS, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact. 13:447-455.
- Heeb, S., Haas, D.** (2001). Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria. Mol Plant-Microbe Interact. 14 (12): 1351-1363.
- Hrabak, E. M. and Willis, D. K.** (1992). The *lemA* Gene Required for Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on Bean Is a Member of a Family of Two-Component Regulators. Journal of bacteriology. 174(9): 3011-3020.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., Reverchon, S.** (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. 50: 213-257.
- Humair, B., Wackwitz, B., Haas, D.** (2010). GacA-Controlled Activation of Promoters for Small RNA Genes in *Pseudomonas fluorescens*. Applied and Environmental Microbiology. 76(5): 1479-1506.
- Hyytiäinen, H., Montesano, M., Palva, Tapio E.** (2001). Global regulators ExpA (GacA) and KdgR modulate extracellular enzyme gene expression through the RsmA-*rsmB* system in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact. 14 (8): 931-938.
- Juge, N.** (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. Trends in Plant Science. 11 (7): 359-367.
- Kõiv, V., Mäe, A.** (2001). Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors by modulating *rsmA* gene expression in *Erwinia Carotovora* subsp. *carotovora*. Mol. Genet Genomics 265: 287-292.
- Kõiv, V., Andresen, L., Broberg, M., Frolova, J., Somervuo, P., Auvinen, P., Pirhonen,**

- M., Tenson, T., Mäe, A.** (2013). Lack of RsmA-Mediated Control Results in Constant Hypervirulence, Cell Elongation, and Hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. PLOS ONE. 8(1): 1-12.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G., Haas, D.** (1992). Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 1562-1566.
- Liu, X., Matsumura, P.** (1994). The FlhD/FlhC Complex, a Transcriptional Activator of the *Escherichia coli* Flagellar Class II Operons. Journal of Bacteriology. 176(23): 7245-7351.
- Liu, Y., Cui, Y., Mukherjee, A. and Chatterjee, A.K.** (1997). Activation of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectin lyase structural gene *pnlA*: a role for RdgB. Microbiology. 143:705-712.
- Liu, Y., Mukherjee, A., Chatterjee, Arun K.** (1998). Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. Molecular Microbiology. 29(1): 219-234.
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, W.L. and Chatterjee A.K.** (1999). Kdg-R_{Ecc} negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin_{Ecc}, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Journal of Bacteriol. 181(8):2411-2422.
- Ma, W., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, Korsi C., Mukherjee, A., Chatterjee, Arun K.** (2001). Molecular Characterization of Global Regulatory RNA Species That Control Pathogenicity Factors in *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. Journal of Bacteriology. 183(6): 1870-1880.
- Marits, R., Tshuikina, M., Pirhonen, M., Laasik, E. and Mäe, A.** (2002). Regulation of the expression of *prtW::gusA* fusions in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Microbiology 148:835-842.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mäe, A., Pirhonen, M.** (2004). Identification and Characterization of Nip, Necrosis-Inducing Virulence Protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Mol Plant-Microbe Interact. 17(12): 1366-1375.
- Miller, J.** (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory,

New York.

Mukherjee, A., Cui, Y., Liu, Y., Dumenyo, Korsi C., Chatterjee, Arun K. (1996). Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora rsmA*, a homologue of *Escherichia coli csrA*: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. *Microbiology*. 142:427-434.

Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Tötönen, P., Holm, L., Pirhonen, M., Palva, Tapio E. (2012). Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLOS Pathogens*. 8(11): 1-18.

Pérombelon, M. C. M., Lumb, V. M., Zutra, D. (1987). Pathogenicity of soft rot erwinias to potato plants in Scotland and Israel. *Applied Bacteriology* 63 (1): 73-84.

Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Mol. Plant Pathology* 51: 1-12.

Pirhonen, M., Heino, P., Helander, I., Harju, P., Palva, Tapio E. (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb Pathog* 4 (5): 359-367.

Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, Riikka., Palva, Tapio E. (1993). A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *The EMBO Journal*. 12(6): 2467-2476.

Pöllumaa, L., Alamäe, T., Mäe, A. (2012). Quorum Sensing and Expression of Virulence in *Pectobacteria*. *Sensors*. 12 (3): 3327-3349.

Rasis, M. and Segal, G. (2009). The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Molecular Microbiology*. 72(4): 995-1010.

Saarilahti, H.T., Henrissat, B. and Palva, E.T. (1990). CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Gene*. 90:9-14.

Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., Buchrieser, C. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology*. 72(3): 741-762.

- Sambrook J. and Russell D. W.** (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sjöblom, S., Brader, G., Koch, G., Palva, T. E.** (2006). Cooperation of two distinct ExpR regulators controls quorum sensing specificity and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Molecular Microbiology*. 60 (6): 1474-1489.
- Stock, J. and Da Re, S.** (2000). Signal transduction: response regulators on and off. *Curr Biol*. 10:420-424.
- Toth, I. K., Bell, K. S., Holeva, M. C. and Birch, P. R. J.** (2003). Soft-rot erwiniae: from genesto genomes. *Molecular Plant Pathology*. 4(1): 17-30.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., Haas, D.** (2003). RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*. 50(4): 1361-1379.
- Wehland, M. and Bernhard, F.** (2000). The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *The Journal of biological chemistry*. 275(10): 7013-7020
- Whitehead, Neil A., jt.** (2002). The regulation of virulence in phytopatogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81: 223-231.

LIHTLITSENTS

Mina, Marili Palover (12.06.1991),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

ExpS /ExpA kahekomponentse süsteemi roll virulentsuse regulatsioonis taimepatogeenis

***Pectobacterium wasabiae* SCC3193**

mille juhendajad on Lee Põllumaa ja Andres Mäe

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013