

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kaarel Koitne

**Regulaatorvalkude FlhDC ja RsmA mõju *Pectobacterium wasabiae* SCC3193  
virulentsusele**  
Bakalaureusetöö

Juhendaja Viia Kõiv

Tartu 2014

## SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS.....	5
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. PEREKONNA <i>PECTOBACTERIUM</i> ISELOOMUSTUS .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. <i>PECTOBACTERIUM WASABIAE</i> VIRULENTSUSFAKTORID .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. VIRULENTSUSFAKTORITE REGULATSIOON .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1. KdgR.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2. Hulgatunnetus .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.3. Rsm süsteem.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.4. <i>FlhDC</i> operon .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.5. RsmC (HexY).....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. VIBURI SÜNTEES .....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.1. Viburi osad.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2. Energia viburi sünteesiks ja liigutamiseks (<i>E. coli</i> näitel).....</b>	<b>13</b>
<b>1.5. KASVUKIIRUSE JA ENSÜÜMIDE TOOTLIKKUSE VAHELINE SEOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. TÖÖ EESMÄRGID.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. MATERJAL JA METOODIKA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.2. Kasutatud oligonukleotiidid (praimerid).....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.3. Söötmed ja kasvatamine .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.4. PCR (Polümeraasi ahelreaktsioon).....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.5. DNA geelelektroforees .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.6. Transformatsioon ja elektroporatsioon .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.7. <i>FlhDC</i><sup>-</sup> mutandi konstrueerimine .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.7.1. Resistentsusmarkeri eemaldamine.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.7.2. <i>FlhDC</i><sup>-</sup>/<i>rsmA</i><sup>-</sup> topeltnutandi konstrueerimine .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.8. Kloneerimine.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.9. Plasmidse DNA eraldamine.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.10. Ensüümide aktiivsus .....</b>	<b>19</b>

2.2.10. Liikuvus.....	19
2.2.11. Virulentsus .....	20
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU .....	21
2.3.1. FlhDC mõju liikumisele .....	22
2.3.2. FlhDC mõju virulentsusele.....	22
2.3.3. Kasvukiirused .....	24
2.3.4. FlhDC ja RsmA koosmõju virulentsusele .....	26
2.4. JÄRELDUSED .....	29
<b>KOKKUVÕTE .....</b>	<b>30</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>31</b>
<b>KIRJANDUSE LOETELU .....</b>	<b>32</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>	<b>38</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

AHL – N-atsüül homoseriin laktoon

Amp – ampitsilliin

Cel – tsellulaas

Cm – klooramfenikool

CMC – karboksümetüülselluloos

Csr – süsiniku kogumise regulaator (**C**arbon **s**torage **r**egulator)

LB – lüsogeenne sööde

OD – optiline tihedus (**O**ptical **D**ensity)

*Pa* – *Pectobacterium atrosepticum*

*Pb* – *Pectobacterium betavascularum*

*Pc* – *Pectobacterium carotovorum*

PCWDE – taime rakuseina lagundavad ensüümid (**P**lant **C**ell **W**all **D**egrading **E**nzymes)

Peh – polügalakturonaas

Pel – pektaatlüaas

PGA – polügalakturoonhape

Pnl – pektiinlüaas

PP – polügalakturoonhape ja piim

Prt – proteaas

*Pw* – *Pectobacterium wasabiae*

QS – hulgatunnetus (**Q**orum **S**ensing)

Rsm – sekundaarsete metaboliitide repressor (**R**epressor of **s**ecundary **m**etabolites)

SOB – **S**uper **O**ptimal **B**roth

*wt* – metsiktüvi (**w**ild-**t**ype)

## SISSEJUHATUS

*Pectobacterium wasabiae* (*Pw*), varasemate nimedega *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* ning *Erwinia carotovora*, on enterobakterite sugukonda kuuluv patogeenne bakter.

*Pw* põhjustab taimedel rakuseina lagundamise teel märgmädaniku nimelist haigust, mille tagajärjel kaotavad need vett ning närbuvad ja kääbustuvad.

*Pw* on võimeline nakatama mitmeid põllukultuure, näiteks kartulit, maisi, porgandit, sibulat, tomatit ja teisi kultiveeritavaid taimi, põhjustades sellega suurt majanduslikku kahju (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Eesti põllumajanduse seisukohalt on *Pw* tähtsaimaks peremeesorganismiks kartul.

Taimede infitseerimisel ning rakuseina lagundamisel on keskseteks bakteri liikumisvõimelisus ning taime rakuseina lagundavate rakuväliste ensüümide (PCWDE) sekretsioon.

*Pw* ja teised nekrotroofid kasutavad nii-öelda toore jõu strateegiat, kus lisaks eelnevalt mainitud teguritele aitavad taimekudesid hävitada nekroosi indutseerivad valgud ja toksiinid. Saadud laguproduktid on toitaineteks, mille abil paljuneda ja jätkata edasist invasiooni.

Haiguse avaldumine ja mädanenud kudede kogus sõltub nii taime tundlikkusest kui ka bakteri jaoks soodsate keskkonnatingimuste olemasolust (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996). Eriti olulisteks keskkonnateguriteks on sobiv temperatuur ning niiskustase (Pérombelon, Kelman, 1980).

Kuna taimed moodustavad valdava osa inimeste igapäevasest toiduvajadusest, on oluline mõista, kuidas on reguleeritud fütopatogeenide virulentsusfaktorid. See avaks võimaluse tulevikus nende poolt põhjustatud saagi hävimist ära hoida keemilisi tõrjevahendeid kasutamata.

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida *Pw* SCC3193 *flhDC<sup>-</sup>/rsmA<sup>-</sup>* kaksikmutant tüvi ning teha seeläbi kindlaks, kas *rsmA<sup>-</sup>* tüve aeglase kasvu põhjus seisneb tema taimekudesid lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide ja viburite ületootlikkuses.

## 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1. Perekonna *Pectobacterium* iseloomustus

Perekonda *Pectobacterium* kuulub neli liiki: *P. wasabiae* (*Pw*), *P. atrosepticum* (*Pa*), *P. betavasculorum* (*Pb*) ja *P. carotovorum* (*Pc*), viimane neist on jaotatud omakorda kolmeks alamliigiks (Moleleki *et al.*, 2013).

Pektobakterid on gramnegatiivsed, pulgakujulised, peritrihhaalsete viburitega, mittesporuleeruvad ning fakultatiivsed anaeroobid (Pérombelon, 2002). Neid leidub nii parasvöötmes, lähistroopilises kui ka troopilises kliimavöötmes. Kasvutemperatuuri optimumid liikide vahel varieeruvad, *Pw*-l on selleks 30 °C (Toth *et al.*, 2003).

Üldiselt on tegu laia peremeesringiga fütopatogeenidega, kes nakatavad põllukultuure ning ka ilutaimi. Eranditeks on *Pa* ja *Pb*, keda on isoleeritud peaaegu üksnes vastavalt suhkrupeedist ja kartulist (Moleleki *et al.*, 2013). Kõik perekonda kuuluvad liigid põhjustavad taimedel märgmädanikku, lisaks tekitab *Pa* ka taimehaigust mustjalg (ik. *blackleg*) (Tarasova *et al.*, 2013).

Baktereid leidub nii taimede pinnal kui ka mullas. Taime saavad nad siseneda läbi haavade või pindadel olevate lõhede. Taime sees olles paiknevad nad vaskulaarkoes ja korgitaolise või õhukeseseinalise parenhümatooesse koe rakkudevahelises ruumis kuni tingimused haiguse arenguks soodsaks muutuvad. Peiteperiood võib kesta kuni mitu kuud (Pérombelon ja Kelman, 1980; Pérombelon ja Salmond, 1995).

Keskkonnafaktorid nagu temperatuur, madal hapnikutase ja vaba vee kättesaadavus on olulisteks teguriteks haiguse arengus. Vesi võimaldab bakterirakkudel vabamalt läbi taimekudede liikuda ja alandab kättesaadavat hapnikuhulka, luues mikro-aeroobse või anaeroobse keskkonna taimes. See ei mõjuta patogeeni kasvuvõimet, küll aga takistab hapnikust sõltuva kaitsevastuse tekkimist (Toth *et al.*, 2003) ja võib tõsta taimerakkude turgorit, mis koos hapnikupuudusega mõjutab membraani terviklikkust. Suurenenud siserõhu tagajärjeks on rakkude lekkimine ja vastuvõtlikum reaktsioon mädandamisele (Pérombelon ja Lowe, 1975).

## 1.2. *Pectobacterium wasabiae* virulentsusfaktorid

Keskseteks patogeenseteks teguriteks taimekudede matsratsioonis on rakuseina lagundavad eksoensüümid ning bakteriraku liikuvus.

PCWDE jagunevad tsellulaasideks (Cel), proteaasiks (Prt) ja pektinoolüütilisteks ensüümideks (Hyttiäinen, 2005). Viimased jaotuvad omakorda polügalakturonaasideks (Peh) ning pektaat- (Pel) ja pektiinlääsideks (Pnl) (Barras *et al.*, 1994).

Tsellulaasid, mis omavad eeskätt endoglükanaasid aktiivsust, lagundavad peremeesorganismi primaarsete ja sekundaarsete rakuseinte ehituses olevat tselluloosi. *Pw*-s on vähemalt kaht tüüpi tsellulaase: CelV ja CelS, mis aminohapete järjestuse alusel üksteisest kardinaalselt erinevad. *CelVI* tüvel puudub tsellulaasne aktiivsus, kuid paralleelselt *celS* väljalöömine virulentsust ei alanda. Patogeensuse seisukohalt pole tegemist hädavajalike ensüümidega, aga sellele vaatamata on nende avaldumine kooskõlas teiste eksoensüümidega (Mäe *et al.*, 1995).

Proteaas tagab mikroobsete valkude biosünteesiks vajaminevate aminohapete kättesaadavuse ning lagundavad ensüüme, mis on seotud taime kaitsevastusega (Heilbronn ja Lyon, 1990; Kyöstiöet *et al.*, 1991). Ka nende roll patogeneesis on väike, kuid nad võimendavad koostöös tsellulaasidega pektinaaside toimet (Marits *et al.*, 1999).

Kõige olulisem roll taimekudede matsratsioonis on pektinoolüütilistel ensüümidel, eriti just polügalakturonaasidel ja pektaatlääsidel (Collmer ja Keen, 1986). Need eksoensüümid lagundavad ja kasutavad ära taime kesklamellis ja rakuseinas asuvat pektiini, mille tagajärjeks on kudede lagunemine, rakkude kahjustus ja lekkimine (Barras *et al.*, 1994; Pérombelon, 2002).

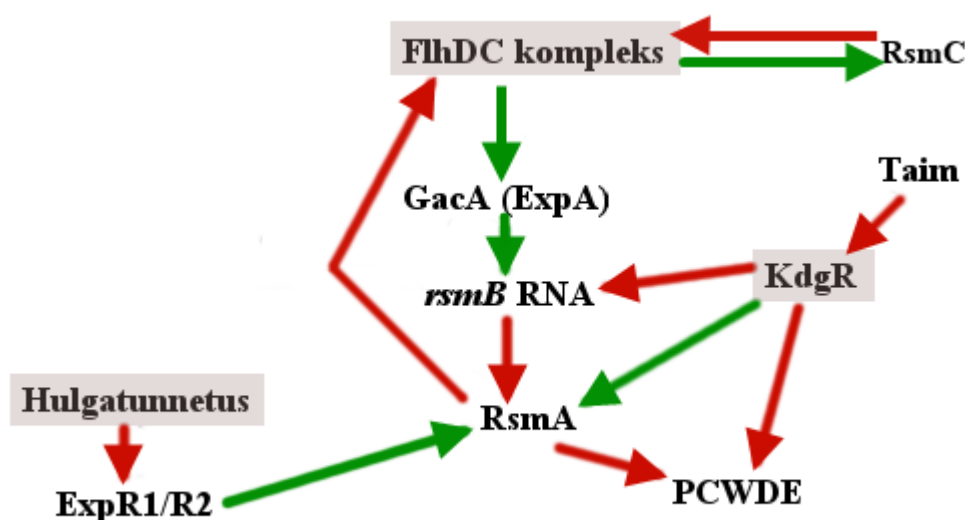
Ennetamiseks taime vastureaktsiooni, peab patogeeni rünnak olema kiire ning intensiivne, mis teeb selle energeetiliselt kulukaks. Seetõttu on virulentsusfaktorite avaldumine reguleeritud kompaktselt, keskkonnategurite kaudu läbi rakulise kontrollvõrgustiku.

Perekonna *Pectobacterium* esindajatel on kolm peamist, osaliselt kattuvat, regulatsioonisüsteemi, mis on kas positiivseks või negatiivseks mõjutajaks ühele või mitmele virulentsust määravale geenile. Nendeks on globaalne repressorvalk KdgR, hulgatunnetus ja viburi pearegulaator FlhDC (Kõiv *et al.*, 2013).

### 1.3. Virulentsusfaktorite regulatsioon

DNA-ga seonduvad valgud ja muud transkriptsioonifaktorid mängivad olulist rolli üldistes regulaatorvõrgustikes, mis koordineerivad bakteri metabolismi ja füsioloogiat vastusena keskkonnast saadavatele signaalidele. Eksoensüüme kodeerivaid gene reguleerivad koos hulgatunnatuse signaalmolekul N-atsüül homeseriin laktoon (AHL), taimest saadavad signaalid, valik transkriptsioonifaktoreid ning post-transkriptsioonilisi regulaatoreid (Cui *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 1998; Wharam *et al.*, 1995).

Looduskeskkonnas peavad bakterid olema võimelised kohanema toitainete kättesaadavuse kõikumisega (Matin *et al.*, 1989; Kolter *et al.*, 1993). Arvestades küllust või puudujääki on vajalik globaalse geeniekspressiooni ümberkorraldamine ja vastavalt kas kiire kasvu või stressvastuse eelistamine. Kuna virulentsusgeenide ekspressioon on energeetiliselt kulukas, kontrollivad seda keskkonnafaktorid.



#### Joonis 1. Virulentsusfaktorite regulatsioonimudel.

Skeemil on toodud olulisemad regulaatorid, mis mõjutavad taime rakuseina lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide avaldumist. Rohelised nooled tähistavad positiivset ja punased negatiivset regulatsiooni.

#### 1.3.1. KdgR

Repressorvalk KdgR vaigistab rakuseina lagundavate ensüümide ekspressiooni, kuni pektiini lagunemisel tekkivad produktid sellega seonduvad. Moodustunud KdgR-laguproduktide kompleks on inaktiivne ning ei ole võimeline DNA-ga seonduma ja ekstratsellulaarsete ensüümide avaldumist pärssima. Lisaks omab see repressorvalk negatiivset mõju *rsmB* (vt.



ptk. 1.3.3.) transkriptsioonile (Liu *et al.*, 1999; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996).

Liu *et al.* on näidanud, et *rsmB* geenil on kolm 25 aluspaari pikkust regiooni, mis on KdgR-i seondumiskohtadeks. Kahele promootorpiirkonnas asuvale seondumissaidile kinnituses takistab KdgR transkriptsiooni alustamist ning kolmandal seondumiskohal häirub transkriptsiooni elongatsioon.

Seega mõjutab KdgR ekstratsellulaarsete ensüümide tootmist kahel viisil: a) otseselt, surudes alla nende geenide transkriptsiooni ning b) kaudselt, ühest küljest takistades globaalse RNA regulaatori *rsmB* avaldumist ja teisalt soodustades *rsmA* ekspressiooni (Hyytiäinen *et al.*, 2001).

### 1.3.2. Hulgatunnetus

Teiseks kontrollsüsteemiks on hulgatunnetus (QS), mis on peamiseks ühenduslüliks bakterirakkude vahelises kommunikatsioonis. Bakterid kasutavad hulgatunnetust jälgimaks populatsioonitihedust ning koordineerivad sellele vastavalt ülesandeid, mis on soodustatud just kindla tiheduse korral (Fuqua *et al.*, 2001; Waters ja Bassler, 2005).

Hulgatunnetuse tööpõhimõte seisneb signaalmolekulide sekretsioonis ja äratundmises, mis gramnegatiivsetes bakterites on harilikult N-atsüül homoseriin laktoonid (AHL-id) (Sjöblom *et al.*, 2006). Need kontrollivad eri liikides mitmeid funktsioone, näiteks bioluminestsentsi (Eberhard *et al.*, 1981; Engebrecht ja Silverman, 1984), konjugatsiooni (Zhang *et al.*, 1993), antibiootikumide, ja sekundaarsete metaboliitide tootmist ning virulentsust nii taime- kui ka loomapatogeenides (Whitehead *et al.*, 2001).

QS on vajalik virulentsusfaktorite tootmiseks ja biokile moodustamiseks oportunistlikul inimpatogeenil *Pseudomonas aeruginosa* (Winson *et al.*, 1995). See mehhanism summutab ka virulentsusfaktorite sünteesi *Pectobacterium wasabiae*'s, kuni bakteripopulatsioon on saavutanud taimes piisava tiheduse edukaks invasiooniks (Barnard, Salmond, 2007).

*Pw*'s vastutab AHL-i sünteesi eest geen *expI* ning sellele vastavad retseptorid on ExpR1 ja ExpR2. ExpR1-l on range seondumisspetsiifika signaalmolekuliga, mille atsüülahela pikkuseks on 8 süsiniku aatomit. ExpR2 töötab koostöös R1-ga, kuid on võimeline seonduma ka teistsuguse atsüülahela pikkusega AHL-idega (Sjöblom *et al.*, 2006).

AHL-i puudumisel seonduvad ExpR1 ja ExpR2 *rsmA* promootorpiirkonnaga, aktiveerides tolle transkriptsiooni ja pärssides sellega virulentsusfaktorite avaldumist (Cui *et al.*, 2005, 2006).

Koos patogeeni arvukusega nakatumiskohas suureneb ka signaalmolekuli, N-atsüül homoseriin laktooni, kontsentratsioon. See difundeerub vabalt läbi rakumembraani väliskeskkonda ja ületades kriitilise piiri siseneb uuesti rakku. Seostudes retseptoritega ei saa

see enam soodustada *rsmA* transkriptsiooni (Liu *et al.*, 2008).

RsmA puudumisel ei ole AHL-il bakteri liikumisvõimele ning eksoensüümide produktsiooniline mingit mõju, mis annab kinnitust, et hulgatunnetuse signaalmolekul reguleerib virulentsust läbi RsmA (Chatterjee *et al.*, 2010).

### 1.3.3. Rsm süsteem

Rsm regulaatorsüsteemi olulisimad komponendid on globaalne repressorvalk RsmA ja mittekodeeritav sRNA *rsmB*.

Hulgatunnetuse, liikumise ja peremeestaimest saadavate signaalide mõju virulentsusfaktorite tootmisele vahendab transkriptsioonijärgne regulaator RsmA (vt. Joonis 1.) (Chatterjee *et al.*, 1995; Mukherjee *et al.*, 1996; Kõiv ja Mäe, 2001).

RsmA on RNA-ga seonduva valgu CsrA homoloog, mille rolli glükogeeni biosünteesi regulaatorina kirjeldati esmakordselt *Escherichia coli* puhul (Romeo *et al.*, 1993). Pilt CsrA ja tema homoloogide ülesannetest bakteriraku metabolismis on järk-järgult selginenud – muuhulgas on näidatud seost liikuvuse regulatsiooniga (Wei *et al.*, 2001) ning osa *Pseudomonas fluorescens*'i ja taimede vahelises interaktsioonis (Chao *et al.*, 2008).

RsmA seondub märklaud-mRNA-de 5' mittetransleeritava regiooniga, tundes silmusstruktuuris ära mitmesuguseid järjestusi, kus esineb konserveerunud trinukleotiidne motiiv GGA. Sellega blokeeritakse ribosoomide jaoks mRNA Shine-Dalgarno (SD) järjestus (Schubert *et al.*, 2007), mille tagajärjel ei saa mRNA-delt alata translatsioon ja soodustub nende lagundamine nukleaaside poolt (Liu *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2001).

*RsmA*<sup>-</sup> tüvi on hüpervirulentne, ent kasvab olenemata kasvusubstraadist 2,5 kuni 3 korda aeglasemalt kui metsiktüüpi bakterirakk (Kõiv *et al.*, 2013).

*RsmB* on väike sRNA molekul, mis, seondudes RsmA-ga, vabastab sellega märklaud-mRNA-d ja neutraliseerib RsmA negatiivse mõju. Seejärel saab nendelt mRNA-delt alata translatsioon. Selline mehhanism on võimalik, kuna *rsmB* seondumisafiinsus on palju kõrgem kui enamikel märklaud-mRNA-del (Gudapaty *et al.*, 2001).

Ehkki KdgR mõjutab rakuväliste ensüümide ekspressiooni otse (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996), on näidatud, et ta kontrollib ka *rsmA* ja *rsmB* geenide avaldumist (Hyytiäinen *et al.*, 2001).

#### 1.3.4. *FlhDC* operon

Kolmandaks regulatsioonirajaks on viburi sünteesi pearegulaator FlhDC, mis lisaks viburi ehituseks vajalikele geenidele kontrollib kaudselt ka ekstratsellulaarsete ensüümide produktsiooni. FlhDC panustab virulentsusfaktorite tootmisse läbi *fliA*, *rsmC* ja *gacA* (*expA*). Pole teada, kas FlhDC mõju *gacA*-le on otsene või kaudne, kuid sellest võib järeldada, et bakteril liikuvus ja virulentsus on omavahel tihedalt seotud (Cui *et al.*, 2008).

*FlhDC* operoni kuulub kaks geeni, *flhC* ja *flhD*. Geeniproductid koos moodustavad FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> heksameerse kompleksi (Wang *et al.*, 2006). FlhC subühik seondub DNA-ga ning FlhD ülesandeks on tõhustada edukat seondumist märklaudgeenidele ning kompleksi stabiliseerida (Cui *et al.*, 2008).

Claret ja Hughes on näidanud, et puhastatud FlhD ja FlhC subühikutest konstrueeritud FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> (või FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) kompleks suurendab seondumisspetsiifilisust DNA-ga ning ühtlasi tõstab tuleneva valk-DNA interaktsiooni stabiilsust *in vitro*. Ennustati, et FlhD ülesandeks on tagada FlhC tõhus seondumine õigetele sihtmärkgeenidele ning stabiliseerida kompleksi. (Claret ja Hughes, 2000).

Seevastu Campos ja Matsumura poolt läbi viidud füsioloogiliste, geneetiliste ja struktuuranalüüside tulemuseks saadi FlhD rolliks hoopis DNA-ga seondumine ja transkriptsiooniline aktiivsus (Campos ja Matsumura, 2001).

Efektiivseks transkriptsiooniks on mõlemad geenid hädavajalikud.

Liikuvust reguleerib positiivselt hulgatunnetuse signaalmolekul AHL ning negatiivselt RsmA. AHL-i puudumisel seondub ExpR1/ExpR2 *rsmA*-ga, mille ekspresseerumine takistab *flhDC* ja *fliA* avaldumist, ent signaalmolekuli kogunemisel keskkonnas *rsmA* ekspressioon alaneb ning selle negatiivne efekt nõrgeneb (Chatterjee *et al.*, 2010).

#### 1.3.5. RsmC (HexY)

RsmC on negatiivseks regulaatoriks eksoensüümide tootmisele ja bakteriraku liikumisele. RsmC ei suru alla *flhDC* transkriptsiooni, kuid käitub FlhDC antagonistina, mõjutades viimase sihtmärkgeenide avaldumist. RsmC puudumine *flhDC*<sup>+</sup> tüves peatab ekstratsellulaarsete ensüümide ületootmisega, hüperliikuvusega ja hüpervirulentsusega. *RsmC/flhDC* topeltmutandis on aga selline fenotüüp kadunud.

Prognoositud RsmC struktuuri analüüs vihjab, et tegemist pole DNA-ga seondumisvõimelise transkriptsioonifaktoriga, vaid et RsmC funktsioneerib kui transkriptsioonimehhanismi komponent. FlhDC positiivse mõju all olevate *gacA*, *rsmC* ja *fliA* avaldumine on RsmC poolt pärssitud.

RsmC seondub FlhD subühikuga ja FlhDC kompleksiga, aga mitte FlhC subühikuga. Kuna

RsmC-tüüpi valke esineb üksnes märgmädanikku põhjustavates bakterites, siis võib oletada, et nad on omandanud ja säilitanud mehhanismi, mis kontrolliks pearegulaatori mõju liikuvusele, ensüümide ja valkude tootmisele ning taimega interakteerumisele (Chatterjee *et al.*, 2009).

#### **1.4. Viburi süntees**

Vibur on kompleksne organell, mida bakter vajab ujumiseks vedelikes ja roomamiseks pindadel või läbi viskoossemate keskkondade. Ujumine ning roomamine erinevad teineteisest mitme aspekti poolest (Harshey, 1994; Copeland ja Weibel, 2009). Roomava fenotüübiga bakteritel on mitmeid morfoloogilisi iseärasusi, mis eristavad neid vegetatiivses seisundis olevatest bakteritest. Nimelt on rakud pikenenud, kaetud tihedalt paljude viburitega ning grupeerunud kärjetaolisse struktuuri (Tuson *et al.*, 2013).

Bakteriaalse viburi sünteesiks on vajalikud ligikaudu 50 geeni (McCarter, 2006).

Sünteesi alustamist kontrollib *flhDC* operon, mille geenid *flhD* ja *flhC* kuuluvad klass 1 regulaatorgeenide hulka.  $FlhD_4C_2$  seondub klass 2 geenide promootorpiirkondadega ja aktiveerib sellega nende transkriptsiooni (Liu ja Matsumura, 1994). Edasine viburi sünteesiks vajalike geenide ekspressioon toimub astmeliselt. Alamosade lisamine on üldjuhul järjestikune, mis tähendab, et sisemistele osadele lisanduvad ükshaaval välimised.

Klass 2 viburi reguloni kuuluvad geenid kodeerivad valke viburi basaalkoha ja konksu ehituseks. Lisaks on regulonis regulaatorid FliA ja FlgM. FliA on vibur-spetsiifiline sigma faktor, mis on vajalik mitmete klass 2 ja 3 geenide ekspressiooniks. Klass 3 geenid reguleerivad komponente viburiniidi kokkupanekuks, kemotaksises osalevate valkude sünteesiks ja motoorse aktiivsuse funktsioneerimiseks (Aizawa ja Kubori, 1998).

*FliC* geen kodeerib globulaarset valku flagelliini, millest koosneb viburiniit (Macnab, 2003).

##### **1.4.1. Viburi osad**

Basaalkoha on esimene struktuurne vahelüli rakumembraani lipiidises kaksikkihis. Keha ümbritsevad mootorvalgud – ioonkanalid, mis koguvad energiat viburi pöörlemiseks. Viburi mootori saab jagada kaheks osaks: staatoriks ja rootoriks.

Staator, mis seondub peptidoglükaan kihiga mittekovalentselt, on ehitatud mitmest lahutamatu membraanstruktuurist, mis koosnevad MotA ja MotB valkudest. Rootor koosneb paljudest FliG valgu koopiatest (Macnab, 2003). Basaalkoha MS (membraani läbivaid) rõngaid läbib vits, mis ulatub peptidoglükaan kihist (gramnegatiivsete bakterite puhul ka välismembraanist) väljapoole. Vitsale kinnitub omakorda konksjas jätke, mis saab muuta oma

pöörlemisnurka ning on viburiniidi kinnitumisele vundamendiks. Viburiniit on ühtlasi viimane struktuurelement, moodustades pooljäiga helikaalse propelleri (Macnab, 2003; Chevance ja Hughes, 2008).

#### **1.4.2. Energia viburi sünteesiks ja liigutamiseks (*E. coli* näitel)**

Bakteri liikumist kontrollivad viburi(te) pöörlemis-suund ning helikaalsete viburiniitide käelisuus. Viburi mootor kasutab ära membraanidevahelist elektrilist ja keemilist prootonpotentsiaali. Membraani läbivad prootonid seonduvad MotB valguga aspartaadijäägile, põhjustades staatori konformatsiooni muutumist ja pannes sellega rootori pöörlema. Järgneb aspartaadijäägi deprotoneerumine. Aspartaadijäägilt lahkunud prooton liigub tsütoplasmasse ning staatori esialgne konformatsioon taastub (Macnab, 2003).

#### **1.5. Kasvukiiruse ja ensüümide tootlikkuse vaheline seos**

Kõiv *et al.* on näidanud, et *Pw rsmA<sup>-</sup>* tüvi kasvab 2,5 kuni 3 korda aeglasemalt kui metsiktüvi ning toodab kogu kasvufaasi vältel, olenemata toitekeskkonnast, suurtes kogustes taime rakuseina lagundavaid ekstratsellulaarseid ensüüme. Lisaks on bakterirakud pikenenud ja kaetud tihedalt väga paljude viburitega. Need morfoloogilised muutused on aluseks *rsmA<sup>-</sup>* tüve roomavale fenotüübile (Kõiv *et al.*, 2013).

Kuna bakteriaalsete viburite ehituseks on vaja väga paljude geenide ekspressiooni, on loogiline eeldada, et viburi kokkupanek ning tööshoid on rakule suureks energeetiliseks väljaminekuks.

Seega sai eelnevate tulemuste selgitamiseks käesoleva töö eesmärgiks lüüa *rsmA<sup>-</sup>* tüves välja ka *flhDC*, mis on viburi ehituse pearegulaatoriks.

Lisaks kõikidele temast allavoolu jäävate viburigeenide kontrollile, on sellel ka kaudne positiivne mõju taimekudesid lagundavate rakuväliste ensüümide tootmisele.

Hüpoteesiks on, et mõlema regulatsioonisüsteemi inaktiveerimine taastab bakteriraku esialgse kasvukiiruse, mis ühtlasi kinnitaks, et aeglustunud kasvu põhjuseks on just PCWDE ületootmine.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

- Konstrueerida  $P_w flhDC^-$  mutant ja seejärel  $flhDC^-/rsmA^-$  kaksikmutant.
- Teha kindlaks, kas  $rsmA^-$  aeglase kasvu põhjuseks on PCWDE ja viburite ületootmine.
- Võrrelda erinevate mutantsete tüvede kasvu, liikuvust ja virulentsust.

### 2.2. Materjal ja meetoodika

#### 2.2.1. Kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Tabel 1.

Bakteritüved	Iseloomustus	Allikas
<i>Pectobacterium wasabiae</i> SCC3193	metsiktüvi	Pirhonen <i>et al.</i> , 1988
<i>P. wasabiae</i>	$flhDC^-$	Käesolev töö
<i>P. wasabiae</i>	$rsmA^-::Cm$	Kõiv <i>et al.</i> , 2013
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$supE4$ , $\Delta lacU169$ , ( $lacZ\Delta M15$ ), $hasdR17$ , $recA1$ , $endA1$ , $gyrA 96$ , $thi-1$ , $relA1$	Hanahan, 1983
<b>Plasmiidid</b>		
pKD46	Amp <sup>R</sup> ; plasmiid, mis ekspresseerib indutseeritud tingimustes $\lambda$ Red rekombinaasi	Datsenko ja Wanner, 2000
pKD3	Cm <sup>R</sup> ; Vektori pANTS $\gamma$ derivaat, mis sisaldab FRT-ga (FLP recognition target) külgnevat Cm <sup>R</sup> geeni vektorist pSC140	Datsenko ja Wanner, 2000
pMW119	Amp <sup>R</sup> ; madala koopiaarvuga kloneerimisvektor	Eurogentec
pMW $flhDC$	Amp <sup>R</sup> ; $flhDC$ operon on kloneeritud pMW119 vektorisse	Andresen <i>et al.</i> , 2010
pBluescript SK (-)	Amp <sup>R</sup> ; kõrge koopiaarvuga kloneerimisvektor	Stratagene

pBS <i>rsmB</i>	Amp <sup>R</sup> ; <i>rsmB</i> geen on kloneeritud pBluescript SK (-) vektorisse	Andresen <i>et al.</i> , 2010
pCP20	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> ; temperatuuritundlik plasmiid, milles on pärmi Flp rekombinaasi geen	Datsenko ja Wanner, 2000
pTZ57R/T	Amp <sup>R</sup> ; kõrge koopiaarvuga kloneerimisvektor	Fermentas
pTZ <i>rsmC</i>	Amp <sup>R</sup> ; <i>rsmC</i> geen on kloneeritud pTZ57R/T vektorisse	Käesolev töö

### 2.2.2. Kasutatud oligonukleotiidid (praimerid)

Tabel 2.

Nimi	Järjestus 5'-3'
<b>FlhDC70P1</b>	<b>ACA AAG ATG TGA TCA GGA AAT GAT TTG GAT AAC GCC ATA TCG CAG CTT TTG CAA TTG GTC CTA ATG GTT TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC</b>
<b>FlhDC70P2</b>	<b>TGT TTT ACC TGT TCA TCC AGC AGT TGA GGT ATT ATA TCG GCA AGG TTT TGC GAA AGT TTA CGC CTT TTT ACA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</b>
<b>FlhDA</b>	<b>AGA TTA ATG TCA TAA ATG TG</b>
<b>FlhDY</b>	<b>AAA TAT AAT CGA GTC GGT ATG</b>
<b>M13Fow</b>	<b>GTA AAA CGA CGG CCA GT</b>
<b>M13Rev</b>	<b>AAC AGC TAT GAC CAT G</b>
<b>rsmAP1</b>	<b>GAC CCG ACT CTT TAT AAT CTT TCA AGG AGC AAA GAA TGC TTA TTT TGA CGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC</b>
<b>rsmAP2</b>	<b>TAC GCA CCT GGT TGC CTT TCA CTC CTA ATA CGG TAA CCG TTA CCT CAT CCA TAT GAA TAT CCT CCT TAG</b>
<b>RAP18</b>	<b>GCG AAC ACG AGA CGC ATT G</b>
<b>alaS</b>	<b>TAA GCT ATA AGC GAT CCA TAA C</b>
<b>rsmcF</b>	<b>CCC GCT TAT TCA GCC GAT AGT</b>
<b>rsmcR</b>	<b>ACG CGC GTC TAC TTT TCT GG</b>

### 2.2.3. Söötmed ja kasvatamine

*Pectobacterium wasabiae* tüved kasvatati temperatuuril 30 °C LB või SOB söötmes (Hanahan, 1983). *Escherichia coli* tüved kasvatati temperatuuril 37 °C LB söötmes (Miller, 1972). Tardsöötmete valmistamisel lisati LB söötmele agarit kontsentratsioonis 15 g/l (Sambrook, Russell, 2001). Antibiootikume lisati söötmesse (kui pole märgitud teisiti) järgnevate kontsentratsioonidega: ampitsilliini 140 µg/ml ja klooramfenikooli 20 µg/ml. Vedelsöötmes kasvatamisel aereeriti kultuure loksutil.

Ekstratsellulaarsete ensüümide määramiseks valmistati järgmised selektiivsöötmetega indikaatortassid: tsellulaaside määramiseks karboksümetüülselluloosiga (CMC; 0,1%) LB tardsööde; polügalakturonaasi aktiivsuse määramiseks polügalakturoonhappega (0,7%) LB tardsööde ja proteaasi aktiivsuse määramiseks rasvavaba piima (5%) ja polügalakturoonhapet (PGA; 0,7%) sisaldav nn. piima tass (PP).

Kasvukõverad saadi bakteritüvede kasvatamisel mikrotiiterplaadil (Greiner Flat Transparent 96) LB söötmes kuhu vajadusel oli lisatud standardkontsentratsiooniga ampitsilliini. Ühe proovi mahuks oli 150 µl. Kasvutihedust mõõdeti Infinite M200Pro (Tecan) aparatuuriga.

### 2.2.4. PCR (Polümeraasi ahelreaktsioon)

PCR-i matriitsina kasutati rakulüsaati. Rakkude lüüsimiseks lisati 25 µl-le steriilsele veele tikuotsaga rakke ning kuumutati 96 °C juures 10 minutit. Seejärel tsentrifugeeriti rakud 16100 g juures 1 minut ning kasutati DNA-d sisaldavat supernatanti PCR-i matriitsina.

PCR-i reaktsioonisegu, üldmahuga 20 µl, sisaldas: 2 µl 10x PCR puhvrit, 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl 10 mM dNTP segu (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,12 µl Taq DNA polümeraasi (5 U/µl; Prof. J. Sedman), 0,5 µl rakulüsaati või märklaud DNA-d, 0,2 µl kumbagi praimerit (20 µM) ja lõppmahuni destilleeritud vett.

PCR-i etapid:

1. DNA esialgne denaturatsioon, polümeraasi aktiveerimine: 95 °C 3 minutit
2. DNA denaturatsioon: 95 °C 30 sekundit
3. Praimerite seondumine DNA ahelaga: 55-65 °C olenevalt praimerite pikkusest 30 sekundit
4. DNA süntees: 72 °C 30 1-2 minutit olenevalt sünteesitava DNA fragmendi pikkusest
5. DNA lõplik süntees: 72 °C 10 minutit

Etappe 2-4 korrati 30 korda



### 2.2.5. DNA geelelektroforees

DNA fragmentide olemasolu ja pikkuste kontrollimiseks kasutati geelelektroforeesi. PCR reaktsioonisegule lisati 1/10 üldmahust markervärvi, mis sisaldas 0,04% broomfenoolsinist 50%-lises glütseroolis. PCR-i proovi ja markervärvi segu kanti 1%-lisele agarosgeelile (1% agarooosi 1x TAE puhvris: 50 mM Tris-atsetaat, 1 mM EDTA; pH 8,2), mis sisaldas etiidiumbromiidi (0,25 µg/ml). Elektroforeeriti 15 minutit pingel 100 volti 1x TAE puhvris ning geel ilmutati UV valguses.

### 2.2.6. Transformatsioon ja elektroporatsioon

Retsipienttüvena kasutati *E. coli* tüve DH5 $\alpha$  või *Pw* erinevaid tüvesid.

Transformatsiooniks kasvatati rakud LB söötmes tiheduseni OD<sub>580</sub>~0,2-0,3. Kompetentsed rakud saadi Hanahani (1983) poolt kirjeldatud CaCl<sub>2</sub> meetodil. Transformeeritavat DNA-d lisati rakkudele ligikaudu 100 ng. Rakke koos DNA-ga hoiti jääl 20 minutit ning seejärel tehti kuumašokk 1,5 minutit 42 °C juures ja rakud jahutati jääl 10 minutit. Seejärel kasvatati neid 30-60 minutit 1 ml-s LB söötmes. Rakud tsentrifugeeriti põhja (1500 g, 2 minutit) ning plaaditi LB tardsöötmele, mis sisaldas sobivat antibiootikumi.

Elektroporatsioonikompetentide saamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml-s LB söötmes, kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum. Hommikul tehti 1:50 lahjendus 50 ml-i LB või SOB (kuhu vajadusel oli lisatud sobiv antibiootikum) söötmesse ja kasvatati tiheduseni OD<sub>580</sub>~0,5. Seejärel tsentrifugeeriti rakud (1500 g, 5-10 minutit) 4 °C juures ja eemaldati supernatant. Rakke pesti 3 korda 10% glütserooliga ning võeti üles 40 µl-s 10% glütseroolis. 40 µl-le rakkudele lisati 100-200 ng puhastatud PCR produkti, DNA-rakkude segu pipeteeriti jääl jahutatud küveti ja elektroporati BIO-RAD Pulseriga pingel 2,5 kV. Vahetult pärast elektroporatsiooni lisati 1 ml LB + MgSO<sub>4</sub> (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) söödete ning kasvatati 1-4 tundi, seejärel tsentrifugeeriti rakud põhja (1500 g, 2 minutit) ja plaaditi LB tardsöötmele, mis sisaldas sobivat antibiootikumi.

### 2.2.7. *FlhDC*<sup>-</sup> mutandi konstrueerimine

*FlhDC*<sup>-</sup> mutandi konstrueerimiseks kasutati Datsenko ja Wanneri meetodit, kus kromosomaalne geen katkestatakse homoloogilise rekombinatsiooni teel, kasutades lineaarset DNA fragmenti (Datsenko, Wanner, 2000).

Esimese etapina disainiti praimerid FlhDC70P1 ja FlhDC70P2, mis on 70 aluspaari ulatuses komplementaarsed *flhDC* järjestusega ja 20 aluspaari ulatuses Cm resistentsusgeeniga, mida sisaldab pKD3 plasmiid. PCR-i matriitsina kasutati plasmidi pKD3 ja saadud produktid

puhastati DNA Clean & Concentrator™-5 D4003 (Zymo Research Corp.) kit-i abil vastavalt tootja protokollile. Mõõdeti kontsentratsioon ning kvaliteet, kasutades Infinite M200Pro (Tecan) aparatuuri.

Kompetentsetesse *P<sub>w</sub>* metsiktüve rakkudesse elektroporeeriti  $\lambda$  Red rekombinaasisüsteemi kodeeriv plasmiid pKD46. *P<sub>w</sub>* + pKD46 kompetentide tegemisel lisati lahjenduskultuuri rekombinaasi indutseerimiseks arabinoosi (lõppkontsentratsiooniga 10 mM).

Seejärel elektroporeeriti eelnevalt valmistatud kompetentsetesse *P<sub>w</sub>* + pKD46 rakkudesse ~150 ng puhastatud PCR produkti, lisati 1 ml LB + MgSO<sub>4</sub> (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) söödet ning kasvatati 3-4 tundi ja jäeti üleöö toatemperatuurile seisma. Järgmisel päeval plaaditi rakud Cm (12,5 µg/ml) sisaldavale tardsöötmele ning inkubeeriti 30 °C termostaadis. Cm resistentsusgeeni olemasolu kontrolliti PCR-iga, kasutades selleks primereid FlhDA ja FlhDY.

#### **2.2.7.1. Resistentsusmarkeri eemaldamine**

Saadud *flhDC*::Cm mutant tehti eelnevalt kirjeldatud meetodi järgi kompetentseks ning lisati ~200 ng pCP20 plasmidi ja elektroporeeriti samadel tingimustel kui eelnevalt kirjeldatud. Vahetult pärast elektroporatsiooni lisati 1 ml LB + MgSO<sub>4</sub> (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) söödet ning kasvatati 30 °C juures 1 tund, seejärel plaaditi rakud Amp (25 µg/ml) sisaldavale tardsöötmele ning jäeti üleöö 30 °C juurde kasvama.

Järgmisel päeval külvati tekkinud kolooniad ümber LB + Amp vedelsöötmesse ning kasvatati 24 tundi temperatuuril 30 °C. Järgnevalt tehti 1:100 lahjendus LB söötmesse (ilma antibiootikumita) ning kasvatati 30 °C juures kuni OD<sub>580</sub>~0,1 ja edasi inkubeeriti 24 tundi temperatuuril 35 °C. Seejärel külvati 50 µl rakke LB tardsöötmele ning hoiti üleöö 30 °C juures. Tekkinud kolooniad külvati kontrolliks ümber Cm (20 µg/ml) ja Amp (140 µg/ml) sisaldavale tardsöötmetele. Antibiootikumi sisaldavatel söötmetel mittekasvanud kolooniad kontrolliti üle PCR-ga, kasutades primereid FlhDA ja FlhDY.

#### **2.2.7.2. *FlhDC*<sup>-</sup>/*rsmA*<sup>-</sup> topeltmutandi konstrueerimine**

PCR-i matriitsina kasutati plasmidi pKD3 ning fragmendi amplifitseerimiseks primereid rsmAP1 ja rsmAP2, mis on 50 aluspaari ulatuses komplementaarsed *rsmA* geeni ja 20 aluspaari ulatuses Cm resistentsusgeeniga.

*FlhDC* tüvi tehti eelnevalt kirjeldatud meetodi järgi kompetentseks, lisati ~100 ng pKD46 plasmidi ning elektroporeeriti samadel tingimustel kui eelnevalt kirjeldatud. Seejärel elektroporeeriti kompetentsetesse *flhDC*<sup>-</sup> + pKD46 rakkudesse ~150 ng puhastatud PCR-i produkti, lisati 1 ml LB + MgSO<sub>4</sub> (lõppkontsentratsiooniga 20 mM) söödet ning kasvatati 3-4 tundi ja jäeti üleöö toatemperatuurile seisma. Järgmisel päeval plaaditi rakud Cm (12,5 µg/ml)

sisaldavale tardsöötmele ning inkubeeriti 30 °C termostaadis. Cm resistentsusgeeni olemasolu kontrolliti PCR-iga, kasutades selleks praimereid RAP18 ja alaS.

### **2.2.8. Kloneerimine**

*RsmC* geeni kloneerimine vektorisse pTZ57R/T viidi läbi InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kitiga (Fermentas). Konstrukti valmistamiseks amplifitseeriti *rsmC* geen *Pw* kromosoomilt praimeritega *rsmcF* ja *rsmcR* ja puhastati DNA Clean & Concentrator™-5 D4003 (Zymo Research Corp.) kit-i abil vastavalt tootja protokollile. Eelnevalt lõigatud vektor ja kromosoomilt amplifitseeritud *rsmC* geen ligeeriti kokku kasutades T4 DNA ligaasi vastavalt tootja protokollile (Fermentas).

### **2.2.9. Plasmiidse DNA eraldamine**

Plasmiidne DNA eraldati FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech. Corp.) abil vastavalt tootja protokollile.

### **2.2.10. Ensüümide aktiivsus**

Tardsöötmetel ensüümide määramiseks kasutati CMC, PGA ja PP tasse (vt. ptk. 2.2.3.). Proteaasi aktiivsus määrati PP tassil, inkubeerides bakterirakke 48 tundi temperatuuril 30 °C. Aktiivsus detekteeriti tekkinud proteolüüsi tsoonide läbimõõdu järgi.

Tsellulaaside aktiivsuse määramiseks inkubeeriti bakterirakke 24 tundi CMC tassil, seejärel värviti 15 minutit 0,1% Kongo punasega. Pärast värvimist pesti tassi veega ning töödeldi 1M NaCl-ga 30-45 minutit. Tsellulaaside aktiivsus määrati kolooniate ümber tekkinud värvivabade tsoonide läbimõõdu järgi.

Pektinolüütiliste ensüümide (polügalakturonaasi) aktiivsuse määramiseks kasvatati bakterirakke 24 tundi PGA tassil. Seejärel töödeldi tassi 1M CaCl<sub>2</sub>-ga 30-45 minutit ja ensüümi aktiivsus tuvastati kolooniate ümber tekkinud läbipaistvate tsoonide läbimõõdu järgi.

### **2.2.10. Liikuvus**

Wt, *flhDC* + pMW ja *flhDC* + pMW*flhDC* tüvede liikuvust määrati söötmel, mis sisaldas 0,4% kartuliekstrakti ja 0,25% agarit. Võrdne kogus rakke torgati tardsöötmesse. Tardsöötmelega Petri tasse inkubeeriti temperatuuril 30 °C. Liikuvust hinnati 24 tunni möödumisel tekkinud tsoonide järgi.

### 2.2.11. Virulentsus

Wt, *flhDC* + pMW ja *flhDC* + pMW*flhDC* tüvede virulentsust testiti kartulimugulatel (sort: Laura). Võrdluseks võeti kõrvale metsiktüvi. Naktamiseks sobilike kartulite saamiseks leotati neid üleöö vees, järgmisel päeval mugulad pindsteriiliti hoides neid 10%-lises valgendajalahuses (ACE Blue) 10 minutit. Seejärel pesti mugulaid 96% etanooliga ja kaks korda destilleeritud veega. Kui mugulate pinnad olid kuivanud nakatati neid 10 mM MgSO<sub>4</sub>-ga pestud ja lahjendatud bakteritüvede üleöö kultuuriga (OD<sub>580</sub>=1). Igasse kartulisse vajutati steriilse pipetiotsikuga üks 1 cm sügavune auk, kuhu pipeteeriti 30 µl vastavat bakteritüve. Kartulid asetati steriilsetesse karpidesse niisutatud paberile. Mugulaid inkubeeriti toatemperatuuril 48 tundi. Matsereerunud kude eraldati ja kaaluti.

### 2.3. Tulemused ja arutelu

Bakalaureusetöö eesmärgiks oli tõestada, et *rsmA*<sup>-</sup> tüve kuni kolm korda aeglustunud kasvu põhjus seisneb PCWDE ja viburite massiivses tootmises.

Esimeseks etapiks oli *Pectobacterium wasabiae* SCC3193 tüve *flhDC*::Cm mutandi konstrueerimine järjestusspetsiifilise  $\lambda$  Red rekombinatsiooni teel. Saadud *flhDC* mutandi kontrolliti Cm geeni olemasolu järgi *flhDC* operonis.

Kuna lisaks *flhDC*-le oli soov paralleelselt välja lüüa ka *rsmA* geen, tuli pärast viburi pearegulaatori nokauteerimist eemaldada kromosoomist Cm resistentsusmarker. Oleks küll võimalik olnud kasutada samaaegselt teise resistentsusmarkerina kanamütsiini, kuid varasemad katsed on näidanud, et sama rekombinatsioonisüsteemi ( $\lambda$  Red) kasutamise puhul võivad bakterikromosoomis aset leida spontaansed rekombinatsioonid ja see muudaks mutandi ebastabiilseks.

Resistentsusgeeni väljalöömise meetodika sai *Pw* jaoks kohandatud käesoleva töö raames. Datsenko, Wanneri (2000) protokoll on koostatud eeskätt *E. coli* jaoks, aga kuna *Pw* elektroporatsioonisagedus on umbes 2 suurusjärku madalam ja ta pole võimeline kasvama temperatuurivahemikus 37-42 °C, tuli resistentsusmarkeri elimineerimiseks vajaliku pCP20 plasmidi sisseviimiseks ja pärast ka eemaldamiseks meetodikat kohandada.

Määravaks faktoriks sai pärast plasmidi elektroporeerimist plaatimine tardsöötmele, mis sisaldas tunduvalt madalamat ampitsilliini kontsentratsiooni kui tavaliselt ette on nähtud (140 µg/ml vs 25 µg/ml). Standardkontsentratsiooniga ei kasvanud vaatamata korduvatele katsetele ühtegi kolooniat. Flp rekombinaasi indutseerimiseks, et eemaldada kromosoomist resistentsusgeen, ja pCP20 väljasaamiseks rakkudest piisas kasvatamisest 24 tundi temperatuuril 35 °C, mitte 42-43 °C juures, nagu on kirjas ametlikus meetodikas, mis *Pw*-le on juba letaalne.

Edasiseks plaaniks oli *flhDC*<sup>-</sup>/*rsmA*<sup>-</sup> kaksikmutandi konstrueerimine. Kuna vaatamata korduvatele katsetustele seda saada ei õnnestunud, tekkis idee nende regulaatorvalkude koosmõju uurimiseks kasutada kaht kaudset meetodit.

Esiteks, eelnevalt konstrueeritud *flhDC* tüvesse sai sisse viidud kõrge koopiaarvuga plasmiid pBS*rsmB*, kuhu oli sisestatud *rsmB* geen. Nii saadi *rsmB*-d üleekspresseeriv tüvi, mis soodustaks PCWDE geenide avaldumist seondudes globaalse repressorvalguga RsmA.

Teiseks, funktsionaalne *rsmC* geen koos promootorjärjestusega sisestati kloneerimisvektorisse pTZ57R/T ning saadud konstrukt elektroporeeriti *rsmA*<sup>-</sup>::Cm tüvesse, et *rsmC*

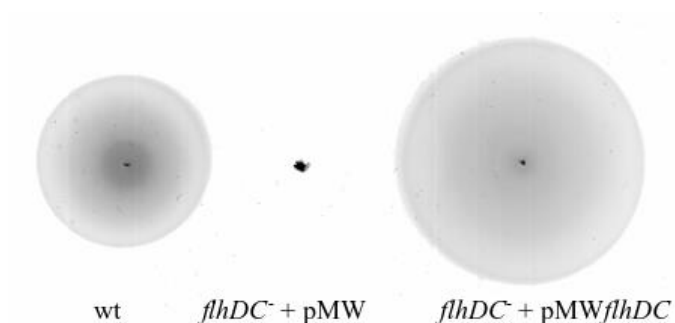
üleekspressiooni kaudu antagoniseerida FlhDC-d.

Seega üritati kahe erineva regulatsioonitee kaudu (vt. Joonis 1.) imiteerida soovitud kaksikmutanti.

### 2.3.1. FlhDC mõju liikumisele

Kinnitamaks, kas viburi pearegulaatoril FlhDC-l on ainumäärav roll bakteri liikumisvõimele, võrreldi omavahel metsiktüve, liikumatut *flhDC*<sup>-</sup> tüve ja komplementatsioonitüve *flhDC*<sup>-</sup> + pMW*flhDC* madala agarisisaldusega tassil.

Mustad täpid tähistavad vastava tüve külvi kohta ning hall ring tsooni, kuhu bakter on tassil ujunud.

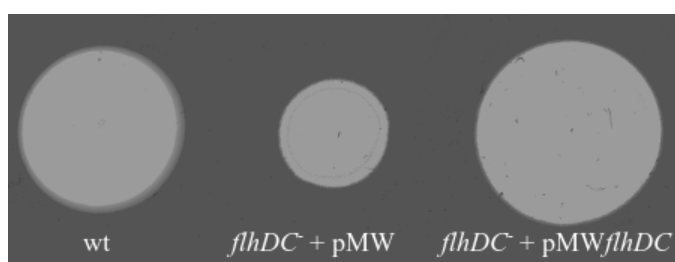


### Joonis 2. FlhDC mõjutab bakteri liikuvust.

*FlhDC*<sup>-</sup> genotüübiga bakterirakkudel puuduvad viburid ja seega ka liikumisvõimelisus, komplementatsioonitüvi on võrreldes metsiktüvega liikuvam, sest plasmiidilt transkribeeritakse FlhDC-d rohkem kui metsiktüve genoomilt.

### 2.3.2. FlhDC mõju virulentsusele

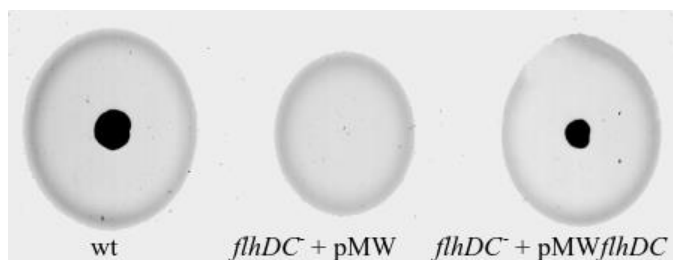
Taustast eristuv sõõr tähistab ala, kuhu bakterirakud on ensüüme sekreteerinud ja söötmes olevat taime imiteerivat komponenti lagundanud.



### Joonis 3. FlhDC mõjutab tsellulaasetsi aktiivsust.

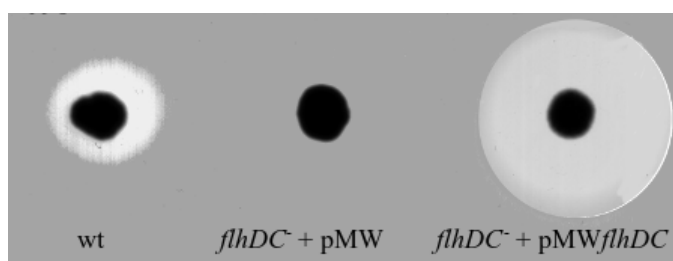
*FlhDC*<sup>-</sup> komplementatsioonitüves on tsellulaasne aktiivsus taastunud samale või natuke kõrgemale tasemele kui metsiktüves, kuid liikumatu *flhDC*<sup>-</sup> + pMW toodab vähem tsellulaase

kui metsiktüvi. Seetõttu on selge, et ensüümide aktiivsust ei mõjuta kontrollplasmid, vaid FlhDC.



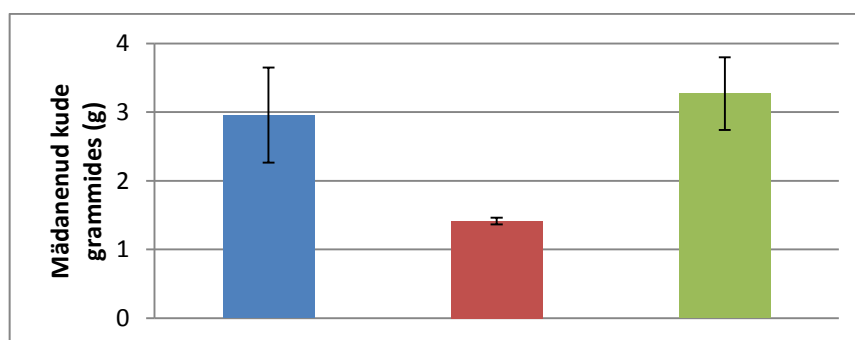
**Joonis 4. FlhDC mõjutab polügalakturonaasi aktiivsust.**

*FlhDC* komplementatsioonitüvi taastab metsiktüve fenotüübi, liikumatu *flhDC* + pMW toodab vähem polügalakturonaasi kui metsik- ja komplementatsioonitüvi.



**Joonis 5. FlhDC mõjutab proteaasi aktiivsust.**

Komplementatsioonitüve proteaasne aktiivsus on kõrgem kui metsiktüvel, kuna *flhDC*-d transkribeeritakse plasmiidilt rohkem kui metsiktüves genoomilt. Liikumatu *flhDC*- + pMW ei tooda proteaasi üldse.



**Joonis 6. *FlhDC* mõjutab kudede matsereerumist kartulimugulas.**

Wt (■), *flhDC* + pMW (■), *flhDC* + pMW*flhDC* (■). Joonisel on toodud keskmine mädanenud kudede hulk grammides kümne kartuli kohta ning standardhälve.

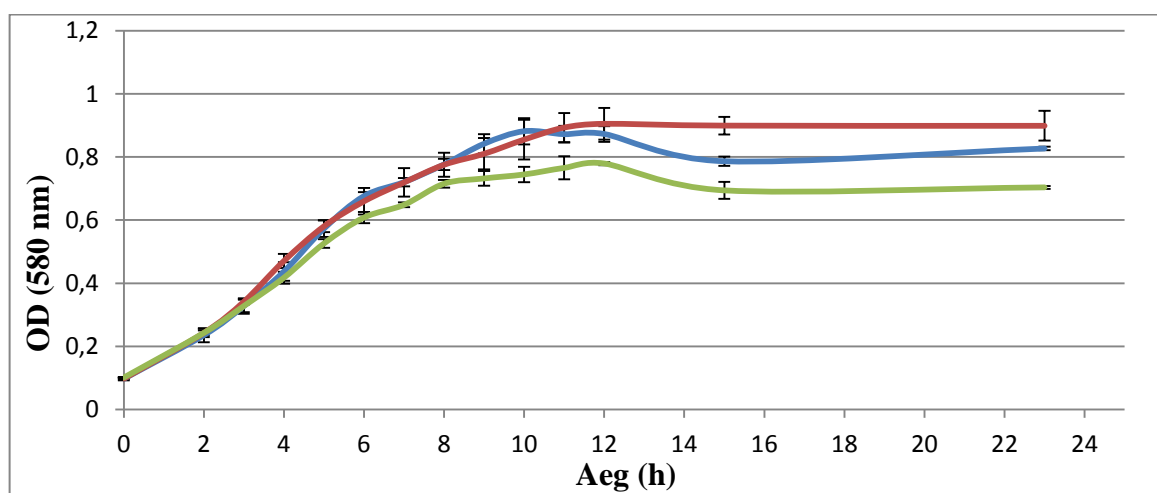
*FlhDC* tüvi on liikumisvõimetu ning mädandab 2 korda vähem kui metsiktüvi, komplementatsioonitüves on aga esialgne fenotüüp taastunud. Seega on FlhDC-l tugev mõju mädandamisvõimele kartulimugulas.

*FlhDC* tüvi on liikumisvõimetu ning toodab vähem tsellulaase ja polügalakturonaasi kui

metsiktüvi, proteaasne aktiivsus puudub täiesti. See on kooskõlas ka kahanenud kudede matseratsiooniga kartulimugulas, kuid pole selge, kas vähenenud virulentsuse põhjuseks on liikumisvõimetus või PCWDE sekretsiooni alanemine.

### 2.3.3. Kasvukiirused

Kõikide mutantide iseloomustamiseks määrati nende kasvukõverad.



**Joonis 7. Wt (—), *flhDC*<sup>+</sup> + pMW (—), *flhDC*<sup>+</sup> + pMW*flhDC* (—) tüvede kasvukõverad LB söötmel, kuhu vajadusel oli lisatud standardkontsentratsiooniga ampitsilliini. Graafikul on kolme sõltumatu katse tulemuse näidiseksemplar. Absoluutarvud katsete vahel erinesid, kuid tendents oli sama.**

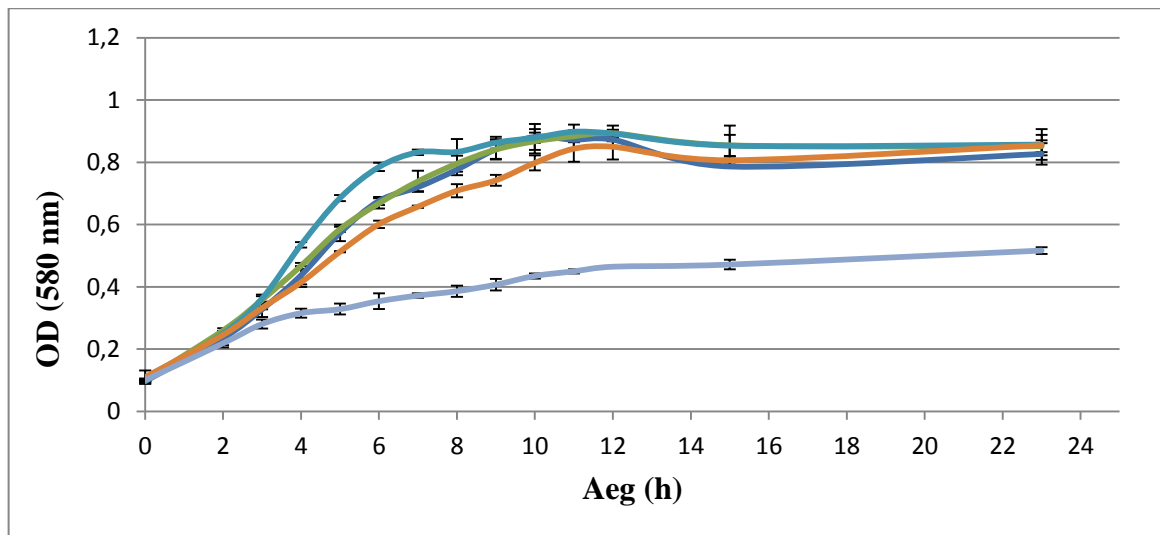
Graafikult on näha, et *flhDC*<sup>+</sup> + pMW tüvi ei kasva kiiremini kui metsiktüvi, kuid võrreldes komplementatsioonitüvega on kasvukiirus natuke tõusnud.

*FlhDC*<sup>+</sup> + pMW*flhDC* kasvukiirus on võrreldes metsiktüvega langenud.

Kuna komplementatsioonitüves transkribeeritakse *FlhDC*-d plasmiidilt, on selle tase kõrgem kui metsiktüves. Tulemus on kooskõlas ennustusega, et rohkete lisaviburite monteerimine avaldab mõju bakteriraku energiabilansile. Sellest võib tuleneda mõningane kasvukiiruste erinevus.

Aeglasem kasv võib olla põhjustatud ka suurenenud proteaasi tootmisest (vt. Joonis 5.), ent see on ebatõenäoline, kuna söötmes puudus induktor selle avaldumiseks.





**Joonis 8.** Wt (—), *flhDC*<sup>+</sup> + pBS (—), *flhDC*<sup>+</sup> + pBS*rsmB* (—), *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ (—), *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ*rsmC* (—) tüvede kasvukõverad LB söötmel, kuhu vajadusel oli lisatud standardkontsentratsiooniga ampitsilliini. Graafikul on kolme sõltumatu katse tulemuse näidiseksemplar. Absoluutarvud katsete vahel erinesid, kuid tendents oli sama.

Ainsana eristub graafikul teistest *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ*rsmC* tüve kasvukõver, see kasvab tunduvalt aeglasemalt kui metsiktüvi. Vaatamata kahanenud liikumisvõimele (andmed pole näidatud) ei kiirenda *rsmC* üleekspressioon *rsmA*<sup>-</sup> tüves kasvu. See tähendab, et virulentsusfaktorite ja viburite ületootlikkus ei ole vähemalt määravaks põhjuseks *rsmA*<sup>-</sup> tüve aeglustunud kasvule.

Kuigi varasemad katsed on näidanud, et *rsmA*<sup>-</sup> tüvi kasvab ligi 3 korda aeglasemalt kui metsiktüüpi bakterirakud, ei suudetud käesoleva töö raames *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ tüvega tulemust korrata.

*RsmA*<sup>-</sup> tüve ebastabiilsust on täheldatud ka varem. Saadud mutandil on aja jooksul spontaansete punktmutatsioonide tõttu metsiktüvele omane fenotüüp taastunud (Kõiv, avaldamata).

Pole kindel, kuid võib oletada, et selle tõttu ei õnnestunud ka *flhDC*<sup>-</sup>/*rsmA*<sup>-</sup> topeltmutandi konstrueerimine. Kahe mastaapse regulatsioonisüsteemi korraga eemaldamine võib *P<sub>w</sub>*-le letaalne olla.

Lisaks pole välistatud, et kasvukiirusele avaldab mõju ka kõrge koopiaarvuga plasmiid pTZ, kuigi selle mõju mehhanism jääb arusaamatuks.

Seetõttu tuleks kasvatamise kordamisel kasutada ka mõnda muud kõrge koopiaarvuga kontrollplasmidi.

*FlhDC*<sup>+</sup> + pBS ja *flhDC*<sup>+</sup> + pBS*rsmB* kasvukiiruste erinevused ei ole veamäära piires ning ka võrdluses metsiktüvega on kasv peaaegu sama. Nii võib ümberkaudsete meetodite

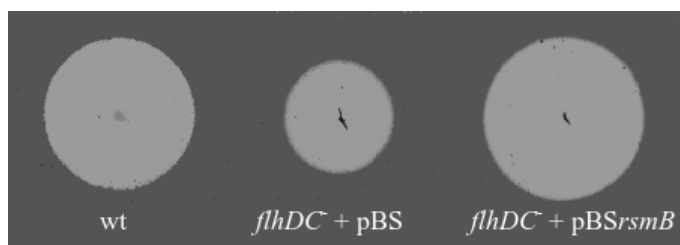
kasutamisel saadud informatsioonist teha kokkuvõttes järelduse, et ei *rsmB* ega *rsmC* üleekspressioon vastavalt *flhDC*<sup>-</sup> ja *rsmA*<sup>-</sup> tüves ei avalda bakteri kasvukiirusele määravat mõju.

#### 2.3.4. FlhDC ja RsmA koosmõju virulentsusele

Peale kasvukiiruste määramist tuli vaatluse alla võtta regulaatorite FlhDC ja RsmA koosmõju virulentsusele, selleks määrati PCWDE aktiivsused vastavatel indikaatoritassidel.

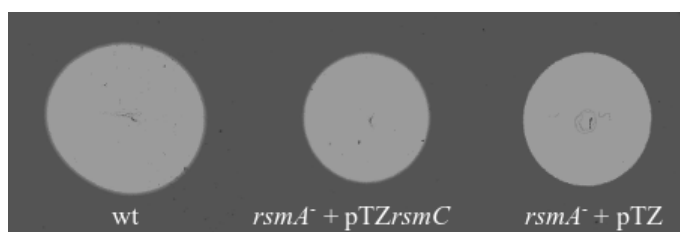
Taustast eristuv sõõr tähistab ala, kuhu bakterirakud on ensüüme sekreteerinud ja söötmes olevat taime imiteerivat komponenti lagundanud.

#### Tsellulaaside aktiivsus



**Joonis 9. *FlhDC* mõjutab tsellulaasset aktiivsust läbi Rsm süsteemi.**

Jooniselt on näha, et komplementeerides *flhDC*<sup>-</sup> tüve *rsmB*-ga taastub metsiktüvega sarnane fenotüüp, mis annab kinnitust, et tsellulaasset aktiivsust mõjutab FlhDC läbi Rsm süsteemi. Liikumatu *flhDC*<sup>-</sup> toodab tsellulaase vähem kui metsiktüvi.

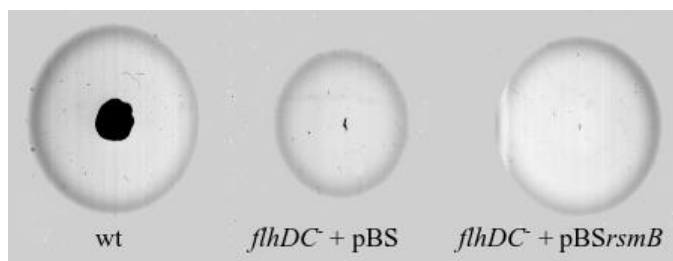


**Joonis 10. *RsmC* üleekspressioon ei alanda tsellulaasset aktiivsust.**

*RsmA*<sup>-</sup> + pTZ*rsmC* ja *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ tüved toodavad ühepalju tsellulaase, kuid vähem võrreldes metsiktüvega.

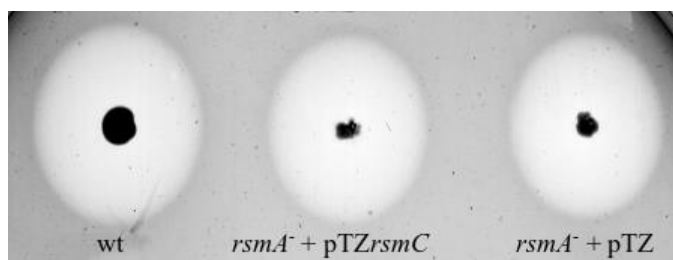
#### Polügalakturonaasi aktiivsus

Pektinolüütiliste ensüümide klassi kuuluval polügalakturonaasil on olulisimaid rolle taimekudede matsratsioonis.



**Joonis 11. *FlhDC* mõjutab polügalakturonaasi aktiivsust läbi Rsm süsteemi.**

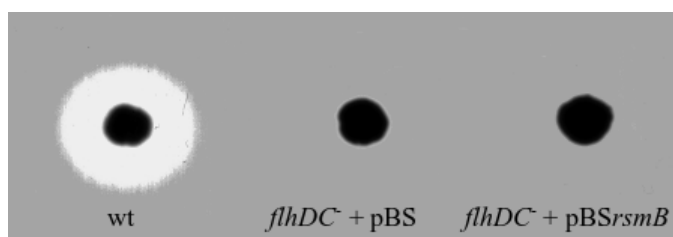
Komplementeerides *flhDC* tüve *rsmB*-ga taastub polügalakturonaasne aktiivsus, mis kinnitab, et ka selle klassi eksoensüümide regulatsiooni mõjutab FlhDC läbi Rsm süsteemi. Liikumatu *flhDC* tüvi toodab pisut vähem polügalakturonaase kui metsiktüvi.



**Joonis 12. *RsmC* üleekspressioon ei alanda polügalakturonaasi aktiivsust.**

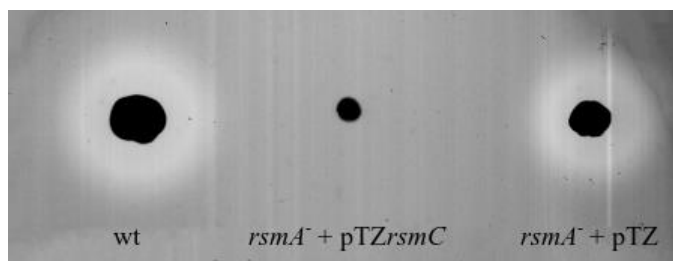
*RsmA*<sup>-</sup> + pTZ*rsmC* ja *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ tüvede polügalakturonaasne aktiivsus on võrdne, kuid väiksem võrreldes metsiktüvega.

### Proteaasi aktiivsus



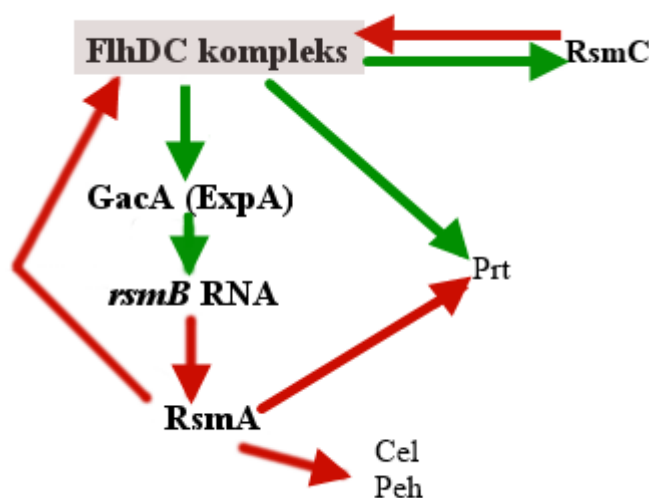
**Joonis 13. *FlhDC* ei mõjuta proteaasi aktiivsust läbi Rsm süsteemi.**

*FlhDC* tüves üleekspresseeritud *rsmB* ei taasta proteaasne aktiivsust, seega ei reguleeri FlhDC proteaasi kodeerivat geeni läbi Rsm süsteemi, vaid otse, või mingi muu, veel teadmata regulaatori kaudu.



**Joonis 14. RsmC üleekspressioon pärsib proteaasi aktiivsust.**

RsmC käitub FlhDC antagonistina ning surub selle sihtmärkgeenide avaldumist alla. Seega on ootuspärane, et *rsmC* üleekspressioon halvab proteaasi tootmist, järelikult ei reguleeri FlhDC nende tootmist läbi Rsm süsteemi.



**Joonis 15. Eeldatav regulatsioonimudel.**

Skeemil on käesoleva töö tulemuste põhjal tehtud täiendatud regulatsioonimudel (vrldl. Joonis 1.), mis näitab, et proteaasi ekspressioon ei käi sama raja kaudu kui tsellulaaside ja polügalakturonaasi. Rohelised nooled tähistavad positiivset ja punased negatiivset regulatsiooni.

Kuna kasvukiiruste võrdlus näitas, et *rsmA*<sup>-</sup> + pTZ tüvi minetas iseäraliku fenotüübi ning taastunud oli metsiktüvele iseloomulik kasv, ei saa seetõttu selle tüve PCWDE aktiivsuste tulemustest teha põhjanevaid järeldusi. Tsellulaaside ja polügalakturonaaside aktiivsus oli *rsmA*<sup>-</sup> tüves madalam ja proteaaside tootlikkus võrdne metsiktüvega. Need tulemused ei ühti varasematega. *RsmA*<sup>-</sup> tüves on näidatud tsellulaaside ja pektiinolüütiliste ensüümide, mille hulka kuulub polügalakturonaas, suurt aktiivsust. Seevastu proteaasi transkriptsiooni ja aktiivsuse vahel on täheldatud vastuolu. Vastavaid gene

transkribeeritakse suures koguses, kuid aktiivsus on madal (Kõiv *et al.*, 2013).

Katse kordamisel ja *rsmA*<sup>-</sup> tüve uuesti konstrueerimise korral tuleks teha ka kvantitatiivsed analüüsid ekstratsellulaarsete ensüümide tootlikkuse kohta, et saada täpsemat informatsiooni erinevuste suuruste kohta.

#### **2.4. Järeldused**

Saadud tulemustest võib järeldada, et viburite ja taime rakuseina lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide ületootlikkus ei ole vähemalt peamiseks põhjuseks *Pw rsmA*<sup>-</sup> tüve aeglustunud kasvule.

Viburi pearegulaator FlhDC ei mõjuta, erinevalt tsellulaaside ja polügalakturonaaside tootmisest, proteaasid aktiivsust läbi Rsm süsteemi, vaid otse või läbi mõne muu regulaatori.

Saadi kinnitus varasematele katsetele, et viburi pearegulaator FlhDC on oluliseks virulentsusfaktoriks ja selle puudumine vähendab taime mädandamist tunduvalt, kuid pole kindlalt teada, kas põhjuseks on liikumisvõimetus või vähenenud PCWDE tootmine.

## KOKKUVÕTE

*Pectobacterium wasabiae* on laia peremeesringiga fütopatogeen, kes põhjustab mitmetel majanduslikult olulistel taimedel märgmädaniku nimelist haigust.

Määravaks virulentsust mõjutavaks teguriks on taime rakukestasid lagundavate ekstratsellulaarsete ensüümide tootmine. Virulentsusfaktorite avaldumine õigel ajal ja kohas on reguleeritud läbi mitmeastmelise kontrollvõrgustiku, mille olulisemad komponendid on globaalne repressorvalk KdgR, hulgatunnetus ja viburi pearegulaator FlhDC.

Käesolev töö pidi andma kinnituse või ümber lükkama hüpoteesi, et *Pw rsmA<sup>-</sup>* tüve kuni kolm korda aeglasem kasv võrreldes metsiktüvega on põhjustatud tema massiivses taime rakuseina lagundavate eksoensüümide sekretsioonis ja viburite ületootmises. Selleks oli algne plaan konstrueerida *Pw flhDC/rsmA<sup>-</sup>* tüvi. *FlhDC<sup>-</sup>* tüve rakkudel puuduvad viburid ning nimetatud operoni eemaldamine avaldab negatiivset mõju ka PCWDE avaldumisele, kuna tegemist on nende suhtes kaudse regulaatoriga. Eeldati, et selle palju energiat nõudva elemendi kõrvaldamine taastab kasvukiiruse metsiktüve tasemele.

Topeltnutandi koostamine aga ei õnnestunud ja seetõttu tuli kasutada kaht ümberkaudset meetodit. Esialgsed andmed näitasid, et püstitatud hüpotees ei vasta tõele ning viburite ja eksoensüümide ületootlikkus ei ole kandvaks põhjuseks tunduvalt aeglasemale kasvule *rsmA<sup>-</sup>* tüves.

Täpsema ülevaate saamiseks on aga vaja katseid korrata, kuna *rsmA<sup>-</sup>* tüve ebastabiilsus võis tulemusi moonutada.

Lisaks saadi käesoleva töö raames teada, et FlhDC mõju proteaasile ei ole vahendatud läbi Rsm süsteemi.

Suured tänud töö juhendajale Viia Kõivule mõistva ning toetava suhtumise eest ning ka ülejäänud laborikollektiivile, kes vajadusel lahkelt aitasid.

# Effect of regulatory proteins FlhDC and RsmA on the virulence of *Pectobacterium wasabiae* SCC3193

Kaarel Koitne

## SUMMARY

*Pectobacterium wasabiae* is a phytopathogenic bacterium with broad host range, who causes soft rot on a wide variety of economically important crops.

The most important components, which affect the ability to successfully infect plants are the production and secretion of plant cell wall degrading enzymes. These virulence factors are tightly regulated by complex cellular control mechanisms and induced by signals from the host organism.

The aim of this study was to verify or disprove that *Pw rsmA*<sup>-</sup> strain's growth slowdown is the direct result of hyperflagellation and hypervirulence.

The plan for this was to construct a *flhDC*<sup>-</sup>/*rsmA*<sup>-</sup> double knock-out and thereby determine if the hypothesis is correct or not.

FlhDC is the master regulator for flagellum biosynthesis and it also indirectly controls the expression of PCWDE. By the removal of such energetically costly system, the growth rate was predicted to return to the same level as wild-type.

However, we were unable to construct such double knock-out and therefore a bypass method was used. *RsmC* and *rsmB* were overexpressed in the *rsmA*<sup>-</sup> and *flhDC*<sup>-</sup> strains, respectively. In order to imitate the phenotype that the *flhDC*<sup>-</sup>/*rsmA*<sup>-</sup> double knock-out would presumably have.

Preliminary results indicate that the hypothesis is not true and hypervirulence and hyperflagellation is at least not the main cause of growth slowdown. A novel observation was made that the regulation of protease by FlhDC is not mediated through Rsm system.

Due to the instability of the *rsmA*<sup>-</sup> strain and to properly quantify the levels of PCWDE in the mutant strains the experiment should be repeated to get more meaningful data.

## KIRJANDUSE LOETELU

Aizawa S. I., Kubori T. (1998). Bacterial flagellation and cell division. *Genes Cells*. 3: 625-634.

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 (5): 1323-1334.

Barnard A. M., Salmond G. P. C. (2007). Quorum sensing in *Erwinia* species. *Anal Bioanal Chem* 387: 415-423.

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

Campos A., Matsumura P. (2001). Extensive alanine scanning reveals protein-protein and protein-DNA interaction surfaces in the global regulator FlhD from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 39: 581-594.

Chao N-X., Wei K., Chen Q., Meng Q-L., Tang D-J. *et al.* (2008). The *rsmA*-like gene *rsmA<sub>Xcc</sub>* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* involved in the control of various cellular processes, including pathogenesis. *Mol Plant Microbe In* 21: 411-423.

Chatterjee A., Cui Y., Chatterjee A. K. (2009). RsmC of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* Negatively Controls Motility, Extracellular Protein Production, and Virulence by Binding FlhD and Modulating Transcriptional Activity of the Master Regulator, FlhDC. *J Bacteriol* 191 (14): 4582-4593.

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

Chatterjee A., Cui Y., Liu Y., Dumenyo C. K., 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 Microb* 61: 1959-1967.



- Chevance F. F. V., Hughes K. T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature* 6: 455-465.
- Claret L., Hughes C. (2000). Functions of the subunits in the FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming. *J Mol Biol* 303: 467-478.
- Collmer A., Keen N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 24: 383-409.
- Copeland M. F., Weibel D. B. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*. 5: 1174-1187.
- Cui Y., Chatterjee A., Yang H., Chatterjee A. 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. *J Bacteriol* 190: 4610-4623.
- Datsenko K. A., Wanner B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS* 97 (12): 6640-6645.
- Eberhard A., Burlingame A. L., Eberhard C., Kenyon G. L., Nealson K. H., Oppenheimer N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry-US* 20: 2444-2449.
- Engebrecht J., Silverman M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *PNAS* 81: 4154-4158.
- Fuqua C., Parsek M. R., Greenberg E. P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* 35: 439-468.
- Gudapaty S., Suzuki K., Wang X., Babitzke P., Romeo T. (2001). Regulatory interactions of Csr components: the RNA binding protein CsrA activates *csrB* transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 6017-6027.
- Hanahan D. (1983). Studies of the transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 577-580.

- Harshey R. M., Matsuyama T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. PNAS 91: 8631-8635.
- Heilbronn J., Lyon G. D. (1990). The ineffectuality of potato protease inhibitor on the extracellular protease from *Erwinia carotovora*. J Appl Bacteriol 69: 25-29.
- Hugouvieux–Cotte–Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu Rev Microbiol 50: 213-257.
- Hyytiäinen H. (2005). Regulatory networks controlling virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora ssp. carotovora*. Academic Dissertation, University of Helsinki, Faculty of Biosciences, Department of Biological and Environmental Sciences, Division of Genetics.
- Hyytiäinen H., Montesano M., 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 In 14: 931-938.
- Kolter R., Siegele D. A., Tormo A. (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. Annu Rev Microbiol 47: 855-874.
- 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.
- 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.
- Kyöstiö S. R. M., Cramer C.L., Lacy G. H. (1991). *Erwinia carotovora subsp. carotovora* extracellular protease: characterisation and nucleotide sequence of the gene. J Bacteriol 173: 6537-6546.
- Liu H., Coulthurst S. J., Pritchard L., Hedley P. E., Ravensdale M. *et al.* (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. PLOS Pathog 4 (6): e1000093.

- Liu Y., Cui Y., Mukherjee A., Chatterjee A. K. (1998). 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. *et al.* (1999). KdgR<sub>Ecc</sub> negatively regulates genes for pectinases, cellulase, protease, Harpin<sub>Ecc</sub>, and a global RNA regulator in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *J Bacteriol* 181: 2411-2421.
- Liu X., Matsumura P. (1994). The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J Bacteriol* 176: 7345-7351.
- Macnab R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol.* 57: 77-100.
- Ma W., Cui Y., Liu Y., Dumenyo C. K., Mukherjee A. *et al.* (2001). Molecular characterization of global regulatory RNA species that control pathogenicity factors in *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola pv. gypsophilae*. *J Bacteriol* 183: 1870-1880.
- Marits R., Kõiv V., Laasik E., Mäe A. (1999). Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phyto-pathogenicity. *Microbiology+* 145: 1959-1966.
- Matin A., Auger E. A., Blum P. H., Schultz J. E. (1989). Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol* 43: 293-316.
- McCarter L. L. (2006). Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol* 9: 180-186.
- Miller J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY.
- Moleleki L. N., Onkendi E. M., Mongae A., Kubheka G. C. (2013). Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *Eur J Plant Pathol* 135: 279-288.
- Mukherjee A., Cui Y., Liu Y., Dumenyo C. K., Chatterjee A. 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.

- Mäe A., Heikinheimo R., 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.
- Pirhonen M., Heino P., Helander I., Harju P., Palva E. T. (1988). Bacteriophage T4 resistant mutants of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Microb Pathogenesis* 4: 359-367.
- Pérombelon M. C. M., Kelman A. (1980). Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu Rev of Phytopathol* 18: 361-387.
- Pérombelon M. C. M., Lowe R. (1975). Studies on the initiation of bacterial soft rot in potato tubers. *Potato Res* 18: 64-82.
- Pérombelon M. C. M., Salmond G. P. C. (1995). Bacterial soft rots. In: *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Vol. 1. Prokaryotes* (Singh, U.S., Singh, R.P. and Kohmoto, K., eds), pp. 1-20. Oxford, UK: Pergamon.
- Romeo T., Gong M., Liu M. Y., Brun-Zinkernagel A. M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* 175: 4744-4755.
- Sambrook J., Russell D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schubert M., Lapouge K., Duss O., Oberstrass F. C., Jelesarov I. *et al.* (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* 14: 807-813.
- 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*. *Mol Microbiol* 60 (6): 1474-1489.
- Zhang L., Murphy P. J., Kerr A., Tate M. E. (1993). *Agrobacterium* conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. *Nature* 362: 446-448.
- Tarasova N., Gorshkov V., Petrova O., Gogolev Y. (2013). Potato signal molecules that activate pectate lyase synthesis in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. *World J Microb*

Biot 29: 1189-1196.

Toth I.K., Bell K. S., Holeva M. C., Birch P. R. J.. (2003). Soft-rot *Erwinia*: from genes to genomes. *Mol Plant Pathol.* 4 (1): 17-30.

Tuson H. H., Copeland M. F., Carey S., Sacotte R., Weibela D. B. (2013). Flagellum Density Regulates *Proteus mirabilis* Swarmer Cell Motility in Viscous Environments. *J Bacteriol.* 195 (2): 368-377.

Wang S., Fleming R. T., Westbrook E. M., Matsumura P., McKay D. (2006). Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* 355: 798-808.

Waters C. M., Bassler B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Bi* 21: 319-346.

Wei B. L., Brun-Zinkernagel A. M., Simecka J. W., Prüss B. M., Babitzke P. *et al.* (2001) Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 40: 245-256.

Wharam S. D., Mulholland V., Salmond G. P. C. (1995). Conserved virulence factor regulation and secretion systems in bacterial pathogens of plants and animals. *Eur J Plant Pathol* 101: 1-13.

Whitehead N. A., Barnard A. M., Slater H., Simpson N. J., Salmond G. P. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25: 365-404.

Winson M. K., Camara M., Latifi A., Foglino M., Chhabra S. R., Daykin M. *et al.* (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 92: 9427-9431.

## LIHTLITSENTS

Mina, Kaarel Koitne (19.09.1989),

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

**Regulaatorvalkude FlhDC ja RsmA mõju *Pectobacterium wasabiae* SCC3193  
virulentsusele**

mille juhendaja on Viia Kõiv

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, 26.05.2014