ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE OXIDATIVE STRESS REGULATED OXYR GENE FROM AGROBACTERIUM TUMEFACIENS NTL4

KAEWKANYA NAKJARUNG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003

ISBN 974-04-3439-8
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน *oxyR* ซึ่งถูกควบคุมโดยกลไก oxidative stress จาก เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE OXIDATIVE STRESS REGULATED *OXYR* GENE IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* NTL4)

แก้วกัญญา นาคจรุง 4436702 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D, วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr. Eng. จรัญญา ณรงคะชวนะ, Dr. Agr. Sc.

บทคัดย่อ

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียในดินที่ทำให้เกิดโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่และยังเป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชเพื่อประโยชน์ในการดัดแปลงพันธุกรรมพืช ในการปะทะสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างพืชกับแบคทีเรียและขบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน *Agrobacterium* จะต้องสัมผัส reactive oxygen species (ROS) การที่แบคทีเรียจะมีชีวิตอยู่ได้นั้นสารพิษเหล่านี้ต้องถูกทำลายอย่างรวดเร็ว แบคทีเรียมีกลไกในการป้องกันตัวเองจาก ROS หลายกลไก โดยบางกลไกจะถูกควบคุมด้วย โปรตีน OxyR ซึ่งโปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณจากสาร peroxide และเป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อ peroxide stress ในที่นี้ ยีนสำหรับโปรตีน OxyR ของ *A. tumefaciens* ได้ถูกศึกษา และพบว่ายีน *oxyR* อยู่ถัดจากยีน *kat A* (ยีน bifunctional catalase-peroxidase) ซึ่งยีนทั้งสองถูกถอดรหัสในทิศทางตรงข้ามกัน *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ถูกทำลายยีน *oxyR* โดยวิธีการแทนที่ยีน (เรียกว่า PN03) ถูกสร้างขึ้นและพบว่า PN03 มีความไวต่อสาร H_2O_2 มากขึ้นแต่ไม่ไวกับสารจำพวก superoxide generator (menadione) หรือ organic hydroperoxide (tBOOH)

การกระตุ้น *A. tumefaciens* NTL4 ซึ่งเป็นสายพันธ์ปกติด้วย H_2O_2 และ menadione (MD) สามารถเหนี่ยวนำเอนไซน์ catalase-peroxidase (KatA) ได้แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำเอนไซน์ antioxidant อื่นๆ เช่น glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase และ superoxide dismutase โดยการเหนี่ยวนำนี้ไม่พบในสายพันธ์ PN03 ลักษณะ phenotype ต่างๆที่หายไปใน PN03 สามารถทดแทนด้วยการแสดงออกของยีน oxyR ในพลาสมิด pOxyR

การวิเคราะห์ *katA::lacZ* promoter fusion ยืนยันผลจากการวิเคราะห์ปริมาณเอมโซน์และแสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำของ H_2O_2 นั้นขึ้นอยู่กับ โปรตีน OxyR นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกยีน *oxyR* ในเชื้อ *A. tumefaciens* โดยพบว่า การกระตุ้นของ H_2O_2 ไม่สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *oxyR* แต่สามารถเปลี่ยน reduced OxyR เป็น oxidized OxyR ได้ และจากการวิเคราะห์ promoter ของยีน *oxyR* พบว่ายีน *oxyR* สามารถควบคุมการแสดงออกด้วยตัวเองและไม่สามารถถูกเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2

นอกจากนี้ได้ศึกษาการตอบสนองต่อสาร oxidant ของ *A. tumefaciens* NTL4 พบว่าการกระตุ้น *A. tumefaciens* NTL4 ด้วยสาร H_2O_2 และสาร MD ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียต้านทานการฆ่าด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้นสูงๆได้มากขึ้น โดยการตอบสนองเหล่านี้ไม่พบใน PN03 เป็นการบ่งบอกว่าทั้ง adaptive และ cross-protective response ใน *A. tumefaciens* นั้นควบคุมโดยโปรตีน OxyR

126 หน้า ISBN 974-04-3439-8

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE OXIDATIVE STRESS REGULATED *OXYR* GENE IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* NTL4.

KAEWKANYA NAKJARUNG 4436702 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK, Ph.D, WATANALAI PANBANGRED, Dr. Eng., JARUNYA NARANGAJAVANA, Dr. Agr. Sc.

ABSTRACT

*Agrobacterium tumefacien*s is a soil-borne plant pathogenic bacterium causing crown gall tumors in many dicotyledonous plants. The bacterium is also widely used as a tool to generate genetically engineered plants. During interaction with plants and aerobic respiration, *Agrobacterium* is exposed to reactive oxygen species (ROS) that have to be rapidly detoxified if the bacterium wants to survive. Bacteria have evolved multiple systems to protect themselves from ROS, some of which are regulated by OxyR, a global regulator for the peroxide stress response. The protein is a bifunctional protein that acts as both a peroxide sensor and a transcriptional regulator in response to peroxide stress. Here, the gene for *Agrobacterium tumefaciens* OxyR was characterized. *oxyR* is located next to, and is divergently transcribed from, a bifunctional catalase-peroxidase gene (*katA*). An *A. tumefaciens oxyR* mutant (namely PN03) was constructed and shown to be hyper-sensitive to H_2O_2, but not to the superoxide generator, menadione, or an organic hydroperoxide. Exposure of *A. tumefaciens* NTL4 to H_2O_2 resulted in induction of the catalase-peroxidase enzyme but not other antioxidant enzymes, including glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase and superoxide dismutase. The induction was abolished in the *oxyR* mutant. All phenotypes of the PN03 could be complemented by expression of the functional *oxyR* from plasmid vector (pOxyR). *In vivo* analysis of a *katA::lacZ* promoter fusion confirmed the results of enzyme assays and indicated that induction of the *katA* promoter by H_2O_2 was dependent on OxyR. We also examined the regulation of *oxyR* in *A. tumefaciens*. Exposure to H_2O_2 did not induce expression of the gene, but simply changed OxyR from a reduced to an oxidized form. The *in vivo oxyR* promoter analysis showed that the promoter was auto-regulated and that transcription was not induced by H_2O_2. The response of *A. tumefaciens* oxidant pretreatments was also investigated. Exposure of *A. tumefaciens* NTL4 to sublethal doses of H_2O_2 and MD rendered bacterial cells more resistant to a subsequent H_2O_2 killing. These inductive responses were absented in the PN03 indicating that both adaptive and cross protective responses are mediated by OxyR.

KEY WORDS: *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* / *OXYR* / OXIDATIVE SRESS

126 P. ISBN 974-04-3439-8