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

WARAWAN EIAMPHUNGPORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6376-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีน *SOXR* ซึ่งถูกควบคุมโดยกลไก OXIDATIVE STRESS จากเชื้อ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* NTL4 (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE OXIDATIVE STRESS REGULATED *SOXR* GENE IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* NTL4)

วราวรรณ เอี่ยมพึ่งพร4336360 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., จรัญญา ฉรงคะชวนะ, D.Agr.Sc., พัฒนา ศรีฟ้า, Ph.D., ไพบูลย์ วัฒนวิบูลย์, Ph.D.

บทคัดย่อ

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียในดินที่ทำให้เกิดโรคปุ่มปมในพืชใบเลี้ยงคู่ ในการปะทะสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างพืชกับแบคทีเรียและกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน *Agrobacterium* จะต้องสัมผัส reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสารเหล่านี้เป็นพิษต่อแบคทีเรีย แบคทีเรียได้พัฒนาระบบหลายระบบเพื่อต่อสู้กับ ROS ซึ่ง SoxRS เป็นระบบหนึ่ง โดยโปรตีน SoxR จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองต่อ superoxide stress ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* โปรตีน SoxR จะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกเชิงบวกของโปรตีน SoxS ซึ่งโปรตีน SoxS จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีนอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ไม่พบโปรตีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับโปรตีน SoxS ในแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ดังนั้น ในที่นี้ได้ทำการศึกษาระบบ SoxR ของ *A. tumefaciens* ซึ่งพบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ที่ยีน *soxR* (PW01) ถูกทำลาย มีความไวต่อสารจำพวก superoxide generator มากขึ้นแต่ไม่ไวกับสารอื่นๆ ซึ่งลักษณะไวต่อสาร superoxide generator นี้สามารถกลับสู่ปกติได้ด้วยการแสดงออกของยีน *soxR* ในพลาสมิด pSoxR นอกจากนี้ ยังพบว่าการสัมผัสกับสาร H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียชนิดนี้ต้านทานการฆ่าด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้นสูงๆได้ (adaptive) และการสัมผัสกับสาร menadione ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียต้านทานการฆ่าด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้นสูงๆได้ (cross-protection) โดยการตอบสนองแบบ cross-protection นี้ไม่ขึ้นอยู่กับโปรตีน SoxR และยังพบว่าระดับเอนไซม์ catalase สัมพันธ์โดยตรงกับการอยู่รอดของแบคทีเรียต่อสาร H_2O_2 จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *soxR* ด้วยเทคนิค Northern blot และ *soxR::lacZ* promoter fusion แสดงให้เห็นว่า *soxR* สามารถควบคุมการแสดงออกได้ด้วยตัวเองและสามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสาร menadione การทำ promoter deletion และ gel mobility shift เผยให้เห็นว่าบริเวณที่โปรตีน SoxR สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของตัวเองที่บริเวณระหว่างตำแหน่ง -35 และ -10 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย *A. tumefaciens* มียีน 3 ยีน (*sod1, sod2* และ *sod3*) ที่สามารถถูกแปรรหัสเป็นเอนไซม์ superoxide dismutaseได้ ด้วยเทคนิค Northern blot และ *sod3::lacZ* promoter fusion ต่างยืนยันว่าการแสดงออกของยีน *sod3* สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสาร menadione ซึ่งการเหนี่ยวนำนี้ขึ้นอยู่กับโปรตีน SoxR และการทำ gel mobility shift แสดงให้เห็นว่าโปรตีน SoxR สามารถจับกับโปรโมเตอร์ *sod3* ได้ที่บริเวณระหว่างตำแหน่ง -35 และ -10 เช่นกัน โดยลำดับเบสบริเวณที่โปรตีน SoxR จับกับโปรโมเตอร์ของยีนทั้งคู่ ได้ถูกนำมาใช้สำหรับการหายีนอื่นๆที่เป็นเป้าหมายของโปรตีน SoxR ซึ่งพบว่ามี 3 ยีนคือยีน *Atu2361*, *Atu4895* และ *Atu5152* ซึ่งสามารถถูกแปรรหัสเป็นเอนไซม์ MFS permease และ โปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่อีก 2 ตัว ตามลำดับ เทคนิค Northern blot และ gel mobility shift แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *Atu4895* และ *Atu5152* สามารถถูกเหนี่ยวนำได้ด้วยสาร menadione ซึ่งการเหนี่ยวนำนี้ขึ้นอยู่กับโปรตีน SoxR

199 หน้า ISBN 974-04-6376-2

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

WARAWAN EIAMPHUNGPORN 4336360 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., PATTANA SRIFAH, Ph.D., PAIBOON VATTANAVIBOON, Ph.D.

ABSTRACT

*Agrobacterium tumefacien*s, plant pathogenic soil bacterium, infects wound sites in many dicotyledonous plants causing crown gall tumors. During plant-microbe interactions and aerobic respiration, *Agrobacterium* is exposed to reactive oxygen species (ROS) which are highly toxic to bacterial cells. Bacterium has evolved multiple systems to cope with ROS, one of which is SoxRS system. SoxR is a transcriptional regulator that controls a superoxide stress response. In *Escherichia coli*, SoxR positively regulates SoxS expression which in turn activates many genes. However, SoxS homolog has not been found in *A. tumefaciens*. Here, *A. tumefaciens* SoxR system has been characterized. The *soxR* mutant (PW01) was hypersensitive to superoxide generators but not to other oxidants. This phenotype of the PW01 could be restored by the functional *soxR* from plasmid vector (pSoxR). Adaptive and cross-protection responses to oxidants of *A. tumefaciens* were also investigated. Exposure of *A. tumefaciens* to sublethal doses of H_2O_2 induced adaptive protection to H_2O_2 killing and exposure of sublethal doses of menadione conferred cross-protection against H_2O_2 killing. This menadione induced cross-protection response was not SoxR dependent. The levels of catalase directly correlated with the bacterium's ability to survive H_2O_2 treatment. *In vivo* activity of a *soxR::lacZ* promoter fusion demonstrated that SoxR is autoregulating which could be induced by menadione. Promoter deletion analysis revealed that the sequence upstream of a putative -35 region is not required for SoxR to bind its promoter suggesting that the SoxR binding site located between the -35 and -10 regions. The gel mobility shift revealed SoxR bound directly to its promoter. *A. tumefaciens* possesses three superoxide dismutase genes namely *sod1*, *sod2* and *sod3*. Northern blots and *in vivo sod3::lacZ* promoter activity suggested that menadione induced the level of *sod3* expression in a *soxR* dependent manner. The gel mobility shift also revealed SoxR bound directly to *sod3* promoter. In addition, SoxR binding site sequence was utilized to identify SoxR target genes. Three SoxR target genes, *Atu2361*, *Atu4895* and *Atu5152*, encode MFS permease and two hypothetical proteins were identified. Northern blots and gel mobility shift assays suggested that the levels of *Atu4895* and *Atu5152* expression were induced by menadione that depends on SoxR.

KEY WORDS: *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* / *SOXR* / OXIDATIVE STRESS / SUPEROXIDE SENSOR

199 P. ISBN 974-04-6376-2