INACTIVATION AND MUTATION ANALYSIS OF RIBOSOMAL RNA (rRNA) OPERON(S) IN *SYNECHOCOCCUS* PCC7942 AND *THERMUS THERMOPHILUS*

TANAKARN MONSHUPANEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7843-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การยับยั้งการทำงานและการวิเคราะห์ด้วยการกลายพันธุ์ของ RIBOSOMAL RNA (rRNA) OPERON(S) ใน *SYNECHOCOCCUS* PCC7942 และ *THERMUS THERMOPHILUS* [INACTIVATION AND MUTATION ANALYSIS OF RIBOSOMAL RNA (rRNA) OPERON(S) IN *SYNECHOCOCCUS* PCC7942 AND *THERMUS THERMOPHILUS*]

ธนะกาญจน์ มัญชุพาณี 4436420 MBMG/D

ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิภา จึงจตุพรชัย, Ph.D., อภินันท์ อุดมกิจ, Ph.D., กุศล ภูธนกิจ, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

ABSTRACT

การมี rRNA operons มากกว่าหนึ่งชุดในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Synechococcus* PCC7942 และแบคทีเรียทนร้อน *Thermus thermophilus* เป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์ rRNA กลายพันธุ์ วิทยานิพนธ์นี้ได้พัฒนาระบบเซลล์สำหรับการวิเคราะห์ rRNA กลายพันธุ์แบบเดียวกัน ใน *Synechococcus* และ *T. thermophilus*

Synechococcus มีโครโมโซมหลายชุด แต่ละชุดมีสอง rRNA operons (*rrnA* และ *rrnB*) แต่ละ operon มี ยีน [16S rRNA-tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}-23S rRNA-5SrRNA] ได้ทำการยับยั้งการทำงานของ *rrn* operons ทั้งสองบนโครโมโซมตามลำดับโดยวิธี deletion-insertion mutagenesis จนได้สายพันธุ์สุดท้ายซึ่ง *rrn* operons บนโครโมโซมทั้งหมดถูกยับยั้งการทำงาน แต่มี *rrn* operon บนพลาสมิดซึ่งสามารถถูกแทนที่ได้ด้วยพลาสมิดอื่น สายพันธุ์ที่มี *rrnA* หรือ *rrnB* ถูกยับยั้งการทำงานมี lag time ซึ่งใช้ปรับตัวเริ่มการเจริญเติบโตจากที่มืดไปสู่ที่มีแสงเพิ่มขึ้น 50% เมื่อเปรียบเทียบกับ lag time ของ wide type สายพันธุ์ที่ *rrnA* ถูกยับยั้ง จะมี doubling time นานขึ้นกว่าของ wide type อย่างมีนัยสำคัญ แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าวไม่พบในสายพันธุ์ซึ่ง *rrnB* ถูกยับยั้ง พลาสมิดที่มีการกลายพันธุ์ของ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง 2588 ได้เข้าไปแทนที่พลาสมิดที่มี wild-type *rrn* ในสายพันธุ์ซึ่ง *rrn* บนโครโมโซมทั้งหมดถูกยับยั้ง ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่สร้าง 23S rRNA กลายพันธุ์แบบเดียวกันที่ C2588A มีความไวต่ออุณหภูมิที่ 16 ^{o}C และ 45 ^{o}C อย่างไรก็ตามไม่ประสบความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์ ซึ่งสร้าง 23S rRNA กลายพันธุ์แบบเดียวกันที่ C2588G/T ดังนั้นการกลายพันธุ์ C2588G/T อาจมีผลให้เซลล์ตาย ตำแหน่ง C2588 เทียบเท่ากับ C2611 ซึ่งอยู่ที่ศูนย์กลางของ peptidyltransferaseใน domain V บน 23S rRNA ของ*Escherichai coli*

T. thermophilus มีโครโมโซมเดียวแต่มีสอง rRNA operons (copy A และ copy B) แต่ละ operon มียีน [23S rRNA-5S rRNA-tRNA^{Gly}] ได้สร้างสายพันธุ์ซึ่งมีแต่ copy A ส่วน copy B ถูกยับยั้งโดยวิธี deletion-insertion mutagenesis เพื่อใช้คัดเลือกการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองและนำไปสู่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Capreomycin เมื่อวิเคราะห์การกลายพันธุ์บน chromosomal DNA ด้วยวิธี genetic-recombination mapping และ DNA sequencing พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ A1913T, T1915 หรือ ΔT1915 บน 23S rRNA ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งดังกล่าวนำไปสู่การดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Capreomycin การกลายพันธุ์นี้ยังก่อให้เกิดการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Viomycin และ aminoglycoside บางชนิด ตำแหน่ง A1913 และ T1915 ซึ่งอยู่ใน helix 69 ของ 23S rRNA เกี่ยวข้องกับการรวมตัวของ 30S และ 50S ribosome subunits

วิทยานิพนธ์นี้ได้พัฒนาระบบเซลล์ซึ่งสร้าง rRNA กลายพันธุ์ที่เป็นแบบเดียวกัน สามารถศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของ rRNA ใน phototrophs และ thermophiles

145 หน้า ISBN 974-04-7843-3

INACTIVATION AND MUTATION ANALYSIS OF RIBOSOMAL RNA (rRNA) OPERON(S) IN *SYNECHOCOCCUS* PCC7942 AND *THERMUS THERMOPHILUS*

TANAKARN MONSHUPANEE 4436420 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: WIPA CHUNGJATUPORNCHAI, Ph.D., APINUNT UDOMKIT, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D.

ABSTRACT

The presence of more than one copy of rRNA operons in phototrophic cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 and thermophlic bacterium *Thermus thermophilus* has been an obstacle to analyzing mutated rRNA. In this thesis, *in vivo* systems for analyzing homogeneous mutated rRNA in *Synechococcus* and *T. thermophilus* were developed.

Synechococcus has a multicopy chromosome, with each copy containing two rRNA operons (*rrnA* and *rrnB*), each operon harbors [16S rRNA-tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}-23S rRNA-5S rRNA] genes. The chromosomal *rrn* operons of *Synechococcus* were sequentially inactivated using deletion-insertion mutagenesis; a final strain was obtained with all the chromosomal *rrn* operons inactivated but carrying a replaceable multicopy plasmid encoding a single *rrn* operon. The lag time required for initiating cell growth after dark/light shift of mutant strains with *rrnA* or *rrnB* inactivated was increased 50% over that of the wild-type strain. The doubling time of strains with inactivated *rrnA* operon, but not strains with inactivated *rrnB* operon, were significantly longer than that of the wild-type strain. Plasmids containing a mutation at position 2588 of 23S rRNA were transferred into the strain with all the chromosomal *rrn* operons inactivated to replace the plasmid containing wild-type *rrn* operon. The results revealed that a strain in which all the cellular 23S rRNA contained the mutation C2588A was temperature sensitive at 16 °C and 45 °C. However, attempts to select for strains with all cellular 23S rRNA containing C2588G/T mutations were unsuccessful. Thus, the C2588G/T mutations may be lethal to the cells. Position C2588 is equivalent to C2611 of the peptidyltransferase centre in domain V of *Escherichia coli* 23S rRNA.

T. Thermophilus has one chromosome with two copies of rRNA operons (copy A and copy B), each containing [23S rRNA-5S rRNA-tRNA^{Gly}] genes. The *T. Thermophilus* strain with copy B operon inactivated was constructed using deletion-insertion mutagenesis. The resulting strain, harboring only one functional copy A, was used to isolate spontaneous mutants resistant to Capreomycin antibiotic. Analysis of chromosomal DNA of these mutants using genetic-recombination mapping and DNA sequencing revealed that each mutation of 23S rRNA, at positions: A1913T, T1915G or ΔT1915 is responsible for Capreomycin resistance phenotype. These three mutations also conferred cross resistance to Viomycin and some aminoglycoside antibiotics. The A1913 and T1915 located at helix 69 of 23S rRNA, which is involved in association between 30S and 50S ribosome subunits.

The *in vivo* systems for expressing homogeneous mutated rRNA in *Synechococcus* and *T. thermophilus* described in this thesis, provide potential to study rRNA structure-function relationships in phototrophs and thermophiles.

KEY WORDS: CYANOBACTERIUM *Synechococcus* PCC7942/ *Thermus thermophilus*/ rRNA MUTATION/ TEMPERATURE SENSITIVE/ CAPREOMYCIN RESISTANCE

145 P. ISBN 974-04-7843-3