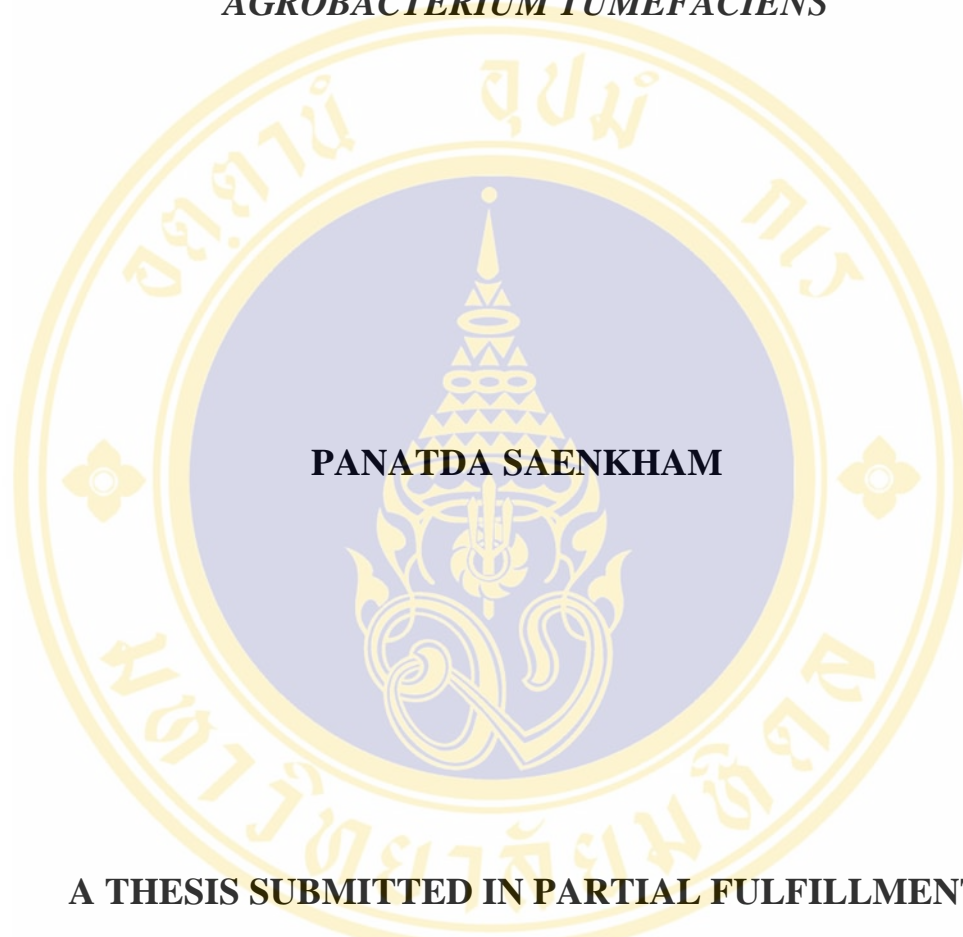


**CHARACTERIZATION OF *SOD* GENES INVOLVED IN  
OXIDATIVE STRESS RESPONSE AND TUMOR FORMATION IN  
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***



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

**2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาคูสมบัติของยีน *SOD* ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การตอบสนองต่อ OXIDATIVE STRESS และความสามารถในการก่อให้เกิดเนื้องอกของเชื้อ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*  
(CHARACTERIZATION OF *SOD* GENES INVOLVED IN OXIDATIVE STRESS RESPONSE AND TUMOR FORMATION IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*)

ปณัฒนา แสนคำ 4536519 SCBT/D

ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณั มงคลสุข, Ph.D., จริญญา ณรงค์ชวณะ, D.Agr.Sc., อาจารย์ นิลวงษ์, Ph.D., ไพบุญย์ วัฒนวิบูลย์, Ph.D. อรนาฎ มาตั้งคสมบัติ D.D.S., Ph.D.

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่ก่อโรคราในพืชโดยปกติจะสัมผัสกับ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งสร้างขึ้นจากกระบวนการหายใจโดยใช้ออกซิเจน และจากกลไกการป้องกันตนเองของพืช เพื่อหลีกเลี่ยงจากการถูกทำลายโดยปฏิกิริยา oxidative แบคทีเรียจึงผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลาย ROS เพื่อลดความเป็นพิษก่อนจะถึงระดับที่อันตรายต่อแบคทีเรีย เอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) เป็น metalloenzyme ซึ่งเปลี่ยน superoxide anion ไปเป็น  $H_2O_2$  และ  $O_2$  การกำจัด superoxide anion เป็นการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาขั้นที่สองซึ่งจะนำไปสู่การสร้าง hydroxyl radical ซึ่งเป็น ROS ที่มีฤทธิ์รุนแรงที่สุด ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของ *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคราเนื้องอกในพืชพบว่ามี 3 open reading frames คือ Atu0876, Atu4583 และ Atu4726 ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีน SOD โดยอาศัยพื้นฐานจากการทดลองการยับยั้งความสามารถของเอนไซม์และการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนสนับสนุนว่าทั้ง 3 ยีนนี้ถูกแปลรหัสเป็น FeSod จึงให้ชื่อว่า SodBI SodBII และ SodBIII โดย SodBI และ SodBII เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมในขณะที่ SodBIII เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเอนโดพลาสม ยีน *sodBI* แสดงออกในปริมาณสูงตลอดช่วงเวลารอดิบ โดยของแบคทีเรียในขณะที่ยีน *sodBII* จะแสดงออกในระดับสูงเมื่อแบคทีเรียสัมผัส superoxide anion โดยถูกควบคุมโดยโปรตีน SoxR ส่วนยีน *sodBIII* แสดงออกในช่วง stationary การทำลายยีน *sodBI* ส่งผลให้ความสามารถในการต้านทานต่อ menadione (MD, superoxide generator) ลดลงอย่างเห็นได้ชัดนอกจากนี้สายพันธุ์นี้ยังทนต่อ  $H_2O_2$  เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์ catalase-peroxidase ซึ่งถูกแปลรหัสโดยยีน *katA* การทำลายยีน *sodBII* หรือ *sodBIII* เพียงยีนเดียวส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อความสามารถของแบคทีเรียในการจัดการต่อความเป็นพิษของ MD สายพันธุ์ซึ่งขาดเอนไซม์ SodB ทั้งสามจะไวต่อ MD มากที่สุดซึ่งชี้ให้เห็นว่าทั้งสามยีนนี้มีระดับการต้านทานต่อ MD ในระดับที่แตกต่างกัน บทบาทของยีน *sodB* ในการป้องกันแบคทีเรียจากความเป็นพิษของ singlet oxygen ซึ่งถูกสร้างจาก irradiated rose bengal โดยได้ทำการศึกษาในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในช่วง exponential และ stationary ผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่ทำลาย *sodBI* จะไวต่อ singlet oxygen เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่ทำลายยีน *sodBII* หรือ *sodBIII* ยิ่งไปกว่านั้นสายพันธุ์ที่ทำลายทั้งยีน *sodBI* และ *sodBII* จะไวต่อ singlet oxygen มากกว่าที่พบในสายพันธุ์ที่ทำลายเพียง *sodBI* ยีนเดียวเท่านั้นและความไวนี้อยู่ในระดับที่เท่ากับสายพันธุ์ที่ยีน *sodB* ถูกทำลายทั้งหมดในขณะที่ระดับความต้านทานต่อ singlet oxygen ของสายพันธุ์ที่ยีน *sodBI* และ ยีน *sodBIII* ถูกทำลายอยู่ในระดับที่เหมือนกับที่พบในสายพันธุ์ที่ *sodBI* ถูกทำลายเพียงยีนเดียว การแสดงออกของยีน *sodBI* และ *sodBII* ในระดับสูงสามารถทำให้ความไวต่อ MD, singlet oxygen และความต้านทานต่อ  $H_2O_2$  ที่สูงขึ้นของสายพันธุ์ที่ยีน *sodB* ทั้งสามถูกทำลายให้กลับมามีอยู่ในระดับที่เท่ากับสายพันธุ์ดั้งเดิมในขณะที่การแสดงออกของ *sodBIII* สามารถทำให้คุณสมบัติของสายพันธุ์ที่ยีน *sodB* ถูกทำลายทั้งหมดในกลับมาได้เพียงบางส่วนเท่านั้น นอกจากนี้ SodB ยังมีบทบาทสำคัญต่อความรุนแรงในการก่อโรคราของ *A. tumefaciens* ในพืชพบว่าความสามารถในการทำให้เกิดเนื้องอกบนใบยาสูบของสายพันธุ์ที่ยีน *sodBI* ถูกทำลายเพียงยีนเดียวลดลงอย่างเห็นได้ชัดและความสามารถนี้จะหมดไปในสายพันธุ์ที่ยีน *sodB* ทั้งสามถูกทำลายทั้งหมด

**CHARACTERIZATION OF *SOD* GENES INVOLVED IN OXIDATIVE STRESS RESPONSE AND TUMOR FORMATION IN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

PANATDA SAENKHAM 4536519 SCBT/D

Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK, Ph.D., JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., ARJAREE NILAVONGSE, Ph.D., PAIBOON VATTANAVIBOON, Ph.D. ORANART MATANGKASOMBUT, D.D.S., Ph.D.

**ABSTRACT**

Phytopathogenic bacteria are always exposed to reactive oxygen species (ROS) generated from aerobic metabolisms as well as from the host plant's first line defense. To avoid oxidative damage, this kind of bacteria produces an array of ROS-scavenging enzymes to get rid of the harmful of ROS before it can reach a toxic level. Superoxide dismutase (SOD) is a metalloenzyme catalyzing dismutation of superoxide anions to form H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and molecular oxygen. The removal of superoxide blocks the secondary reaction which in turn leads to the formation of the most reactive hydroxyl radicals. *Agrobacterium tumefaciens*, the causative agent of crown gall disease in plants, possesses three open reading frames, Atu0876, Atu4583 and Atu4726, which encoded SOD. SOD activity inhibition tests and amino acid sequence analysis strongly suggests that these three putative genes encode FeSods and are named SodBI, SodBII and SodBIII. SodBI and SodBII are cytoplasmic isozymes while SodBIII is a periplasmic isozyme. *sodBI* is expressed at a high level throughout all growth phases while *sodBII* expression is highly induced upon exposure to superoxide anions in a SoxR dependent manner. *sodBIII* is expressed during its stationary phase. Deprivation of *sodBI* markedly alleviated resistance to menadione (MD), a superoxide generator. Moreover, the strain increased tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due to a compensatory expression of catalase-peroxidase encoded by *kata*. Inactivation of *sodBII* or *sodBIII* alone slightly affected the bacteria's ability to cope with superoxide toxicity. A mutant lacking all three SodB enzymes showed the most sensitivity to MD treatment, which indicates that all *sods* contribute at varying levels towards the overall MD resistance level. The role of *sodB* genes regarding the protection of singlet oxygen toxicity generated from irradiated rose bengal was evaluated through various *sodB* mutants in both the exponential and stationary phases. *sodBI* mutant was slightly sensitive to singlet oxygen relative to wild type, *sodBII* and *sodBIII* mutant strains. Moreover, *sodBI sodBII* double mutant was much more sensitive to singlet oxygen than *sodBI* single mutant and the sensitivity level was comparable to that of the *sodB* null mutant. While *sodBI sodBIII* double mutant showed a resistance level similar to the *sodBI* mutant, a high expression of *sodBI*, and *sodBII* fully complemented MD, singlet oxygen-hypersensitive and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hyperresistant phenotypes of the *sodB* null mutant. However, the expression of periplasmic *sodBIII* partially restored such altered phenotypes. SodBs also have important roles in *A. tumefaciens* virulence toward host plants. A *sodBI*, but not *sodBII* or *sodBIII* mutant, showed a marked reduction in their ability to induce tumor formation on tobacco leaf discs while the *sodB* null mutant was totally avirulent.

KEY WORDS: *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*/ *SOD*/ OXIDATIVE STRESS/ SINGLET OXYGEN/ TUMOR FORMATION

200 P.