23 NOV 1999

THE STUDY OF OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *XANTHOMONAS* SPP.

PAIBOON VATTANAVIBOON

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1999

ISBN 974-662-981-6

COPY RIGHT MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

W4
P444k
1999

43221 e.1

3937569 SCBT/D : MAJOR: BIOTECHNOLOGY; Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : *XANTHOMONAS*/ CATALASES/ OXIDATIVE STRESS
PAIBOON VATTANAVIBOON: THE STUDY OF OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *XANTHOMONAS* SPP. THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK, Ph. D., AMARET BHUMIRATANA Ph. D., WATANALAI PANBANGRED, D. Eng., CHANPEN WIWAT, Ph. D.,212 P. ISBN 974-662-981-6

Xanthomonas is one of the important genus of phytopathogenic bacteria. In order to successfully colonize the host plant, pathogens must overcome oxidative stress generated as the initial plant defense response. The response to exogenous oxidative stress in *Xanthomonas* was investigated. Exposure of *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) as well as *X. campestris* pv. *phaseoli* (*Xp*) to sublethal doses of H_2O_2 confers protection to H_2O_2 killing (adaptive response). No adaptive response to *tert*-butylhydroperoxide (tBOOH) or superoxide generator menadione (MD) was observed. However, exposure to low doses of tBOOH induced cross-protection against H_2O_2 killing. Pre-treatment with MD conferred cross-protection against H_2O_2 and tBOOH killing. The levels of protection against H_2O_2 killing were correlated with their ability to induce catalase. Both adaptive and cross-protective responses required *de novo* protein synthesis.

Pretreatment of *Xp* with low inducing concentrations of thiol reagents such as N-Ethylmaleimide (NEM) and diamide induced resistance to H_2O_2 killing. Thiol reagent-induced responses required a functional redox sensor/transcription activator *oxyR* and were absent in an *oxyR* mutant. By contrast, NEM pretreatment enhanced the killing effects of organic peroxide.

Hydroxyl radical was a major reactive oxygen species involved in H_2O_2 killing of *Xp*. Compounds capable of absorbing hydroxyl radicals (glycerol and DMSO) protected *Xp* from H_2O_2 killing but not from killing by MD and tBOOH. Addition of ferrous ions to *Xp* suspension in water potentiated H_2O_2 killing. On the other hand, pre-treatment of *Xp* with an iron chelator showed no protective effects and H_2O_2 killing was actually enhanced.

Catalase is an important enzyme in detoxification of H_2O_2. *Xp* possessed at least two distinct isozymes of monofuctional catalases, denoted Kat1 and Kat2. Kat1 was expressed throughout the growth phase and could be induced in response to exposure to oxidative stresses in the manner of functional *oxyR* dependence. Kat2 expression was specific to stationary phase of growth. The *Xanthomonas*-specific *kat* fragment was amplified from *Xp* genomic DNA. This specific *kat* probe was used as a DNA probe to screen a functional *kat* gene from *Xp* genomic library constructed in a λZipLox phage vector by plaque hybridization. By this method, a *katE* gene encoding Kat2 was cloned and characterized. KatE deduced amino acid sequence shows high degree of identity to group II bacteria monofunctional catalase. The role of *katE* against external peroxide and superoxide killing was evaluated in a mutant strain lacking functional *katE*. No significant differences were observed in either log or stationary phase cells. The level of total catalase activity in the *katE* mutant was similar to that of wild type even in stationary phase cells. This result implies the existence of a compensatory mechanism between two catalase isozymes.

3937569 SCBT/D : สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ไพบูลย์ วัฒนวิบูลย์: การศึกษากลไกการต้านทานต่อ OXIDATIVE STRESS ในแบคทีเรียแซนโทโมนาส (THE STUDY OF OXIDATIVE STRESS RESPONSE IN *XANTHOMONAS* SPP.): คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณ์ มงคลสุข, Ph. D., อมเรศ ภูมิรัตน, Ph. D., วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D. Eng., จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, Ph. D., 212 หน้า. ISBN 974-662-981-6

แซนโทโมนาสเป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของการก่อโรคในพืช การที่แบคทีเรียจะเจริญได้ในพืชนั้นจะต้องต้านทานต่อสภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันเบื้องต้นที่พืชสร้างขึ้น ในการศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะ oxidative stress ในแบคทีเรียกลุ่มนี้พบว่าเมื่อกระตุ้น *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) และ *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xp*) ด้วยสาร H_2O_2 ความเข้มข้นต่ำจะเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียต้านทานต่อการฆ่าด้วยสารH_2O_2 (เรียกว่า adaptive response) ซึ่งไม่พบการตอบสนองแบบนี้เมื่อกระตุ้นแบคทีเรียด้วยสาร *tert*-butylhydroperoxide (tBOOH) หรือสารที่สร้าง superoxide เช่น menadione (MD) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นด้วย MD จะเหนี่ยวนำให้เกิด cross protection ต่อ H_2O_2 และ tBOOH โดยที่ระดับของความต้านทานต่อ H_2O_2 สัมพันธ์โดยตรงต่อระดับเอนไซม์ catalase นอกจากนี้ ความต้านทานของ *Xp* ต่อการฆ่าด้วยสาร H_2O_2 ยังสามารถเหนี่ยวนำด้วยสารไธออล เช่น N-ethylmaleimide (NEM) และ diamide โดยการเหนี่ยวนำด้วยสารไธออลต้องอาศัยยีน *oxyR* ซึ่งเป็น redox sensor และ transcriptional regulator แต่กระตุ้น *Xp* ด้วย NEM กลับทำให้เซลไวต่อสาร tBOOH มากขึ้น

Hydroxyl radical เป็น reactive oxygen species ที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของ H_2O_2 ในการทำให้เซล *Xp* ตาย โดยพบว่าสารที่ดูดซับ hydroxyl radical เช่น กลีเซอรอล และ DMSO สามารถป้องกัน *Xp* จากการฆ่าด้วยสารH_2O_2 แต่สารเหล่านี้ไม่สามารถป้องกัน *Xp* จากการทำลายด้วย MD และ tBOOH ได้ การเพิ่ม ferrous ions ลงในน้ำที่มี *Xp* แขวนลอยอยู่จะ เพิ่มอัตราการฆ่าด้วยสาร H_2O_2 ในทางตรงกันข้ามการเพิ่ม iron chelator นอกจากจะไม่ช่วยป้องกันพิษของ H_2O_2 ยังกลับเพิ่มอัตราการฆ่าของ H_2O_2 อีกด้วย

Catalase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการทำลายพิษของ H_2O_2 *Xp* สร้าง catalase ประเภท monofuctional อย่างน้อยสองไอโซไซม์คือ Kat1 และ Kat2 โดยที่Kat1จะถูกสร้างตลอดระยะของการเจริญและสามารถเหนี่ยวนำให้แสดงออกมากขึ้นได้โดยการกระตุ้นด้วยสาร oxidants ในลักษณะที่ขึ้นกับการทำงานของยีน *oxyR* ในขณะที่ Kat2 จะถูกสร้างในระยะ stationary phase เท่านั้น ยีน *katE* ที่ code Kat2 ได้ถูกแยกจาก genomic library ของ *Xp* มาวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโน สามารถจัด *Xp* Kat2 ให้อยู่ในกลุ่มของ atypical catalase จากการศึกษาเปรียบเทียบบทบาทของ *katE* ใน *Xp* กลายพันธุ์ที่สูญเสียการทำงานของ *katE* กับ *Xp* wild type พบว่าระดับของ catalase และความไวต่อสารoxidantsไม่แตกต่างกันแสดงว่ามีกลไกการชดเชยระหว่างไอโซไซม์ Kat1 และ Kat2