- 7 DEC 2001

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* AND ITS PHYSIOLOGICAL STUDY

CHOTIROTE SEEANUKUN

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-040-731-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
C551m
2001
c.2

Copyright by Mahidol University

4136657 SCBT/M : MAJOR : BIOTECNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : *XANTHOMONAS* / PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE / OXIDATIVE STRESS

CHOTIROTE SEEANUKUN: MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* AND ITS PHYSIOLOGICAL STUDY. THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK Ph.D., WATANALAI PANBANGRED D.Eng., CHUENCHIT BOONCHIRD Ph.D. 153 P. ISBN 974-040-731-5

A gene encoded peptide, methionine sulfoxide reductase (*msrA*), an enzyme playing an important role in repairing oxidative damage to proteins, was cloned from the *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (*Xp*) genomic library.

One of the positive clones namely pA8 was further characterized and the nucleotide sequence was determined. Analysis of the nucleotide sequence revealed a putative open reading frame of 0.65-kb encoding with 216-amino acid peptide and with a theoretical molecular weight of 23.5-kDa. This open reading frame had a high homology to *msrA* genes. Amino acid sequence alignment revealed conserved sequence motifs among various organisms. The phylogenetic tree constructed from MsrA of various organisms classified *Xp* MsrA into the same group as *Escherichia coli*.

Southern blotted analysis of *Xanthomonas* genomic DNA digested with various restrictive enzymes showed that *msrA* was a single copy gene and existed in all *Xanthomonas* strains tested. The primer extension technique revealed the transcription start site of both log and stationary-phases of growth corresponding to C, upstream 27 nucleotides from ATG. Northern blotted analysis showed that *msrA* was transcribed as a monocistronic mRNA. The expression was high at the log-phase of growth and then declined at the stationary-phase. Moreover, the expression of *msrA* could be induced by oxidative stresses such as H_2O_2, tBOOH, MD, NEM and IAA. These inductions were not depended on known global regulators such as *oxyR*, *ohrR*, *rnk* and *camk*.

A *Xp msrA* mutant strain was constructed by insertional inactivation technique. The mutant increased sensitivity to H_2O_2, tBOOH, NEM but not to MD in both log and stationary-phase of growth. The increased sensitivity could be complemented by an expression of *msrA* in a plasmid vector. High expression of *msrA* in wild type *Xp* conferred more resistance against H_2O_2, tBOOH, MD and NEM killing.

Copyright by Mahidol University

4136657 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

โชติรส สีห์อนุกูล : การโคลนยีนและศึกษาลักษณะของยีน peptide methionine sulfoxide reductase รวมถึงลักษณะทางสรีรวิทยา ในเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDE METHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE IN *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* AND TIS PHYSIOLOGICAL STUDY). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ศกรณ์ มงคลสุข Ph.D., วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด D.ENG, ชื่นจิตต์ บุญเฉิด Ph.D. 153 หน้า. ISBN 974-040-731-5

ยีน peptide methionine sulfoxide reductase (*msrA*) มีบทบาทสำคัญต่อการซ่อมแซมโปรตีนที่เสียหายเนื่องจากภาวะเป็นพิษของสารจำพวกอนุมูลอิสระของออกซิเจน ในเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ได้ทำการแยกยีนนี้จากห้องสมุดจีโนมของเชื้อโดยวิธี Plaque hybridization พบโคลนที่น่าสนใจคือ pA8 ซึ่งมีขนาดครอบคลุมยีน *msrA* ทั้งหมด เมื่อนำ pA8 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์พบว่ายีน *msrA* มีขนาด 0.65 กิโลเบส ที่ลอกรหัสเป็นเปปไทด์ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 216 ตัว มีมวลโมเลกุล 23.5 กิโลดาลตัน จากการเปรียบเทียบลำดับอะมิโนพบว่ายีนนี้มีความคล้ายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรีย *Escherichia coli* จากผลการวิเคราะห์ด้วย Southern blot พบว่า *msrA* เป็นยีนที่มีเพียงหนึ่งชุดบนโครโมโซมและตรวจพบได้ในเชื้อ *Xantomonas* อีกหลายสปีชีส์ที่ทดสอบ การถอดรหัสของยีนเป็นชนิด monocistronic ที่มีขนาด 0.9 กิโลเบสและการถอดรหัสมีปริมาณสูงในระยะlog แล้วลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะstationary นอกจากนี้เมื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนด้วยสารที่ให้อนุมูลอิสระของออกซิเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ H_2O_2, tBOOH, MD, NEM และ IAA พบว่าระดับ mRNA ของยีนนี้เปลี่ยนแปลงในระดับสูงขึ้น โดยไม่อยู่ภายใต้การควบคุมของ regulators *oxyR*, *ohrR*, *rnk* และ *camk* จากการทำ primer extension พบว่าตำแหน่งเริ่มต้นการถอดรหัสห่างจากตำแหน่งเริ่มต้นของการลอกรหัส 27 นิวคลีโอไทด์ และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับโปรโมเตอร์ของเชื้อแซนโทโมนาส เมื่อทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนนี้แล้วนำแบคทีเรียกลายพันธุ์ไปทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา พบว่ามีความไวต่อสารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนได้แก่ H_2O_2, tBOOH, NEM ยกเว้น MD ทั้งระยะ log และ stationary และเมื่อทำการทดสอบโดยใส่ยีน *msrA* ที่ปกติเข้าไปในแบคทีเรียกลายพันธุ์พบว่าการแสดงออกมีเพิ่มขึ้น อีกทั้งเมื่อนำเข้าไปในเชื้อสายพันธุ์ปกติ สามารถป้องกันตัวเองจากสภาวะเป็นพิษของอนุมูลอิสระได้ด้วย

Copyright by Mahidol University