20 FEB 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* HYDROGEN PEROXIDE RESISTANT MUTANT AND ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE MUTANT

WIRONGRONG WHANGSUK

With compliments
of
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
2000

ISBN 974-665-195-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W998m
2000
c.2

b11406112
i12956284

4136673 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : *oxyR* / *ahpC*/ *Xp*HR/ *XpahpC1*

WIRONGRONG WHANGSUK: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* HYDROGEN PEROXIDE RESISTANT MUTANT AND ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE MUTANT. THESIS ADVISORS: SKORN MONGKOLSUK Ph.D., AMARET BHUMIRATANA Ph.D., SAOVANEE DHRAMSTHITI Ph.D. 177 P. ISBN 974-665-195-1

This study was intended to characterize a previously isolated hydrogen peroxide resistant mutant of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, *Xp*HR. The mutant had an elevated expression of peroxide protective enzymes such as catalase and alkyl hydroperoxide reductase. These enzymes were regulated by *oxyR*, a gene involved in peroxide sensing and transcription regulation.

The *oxyR* from *Xp*HR, designated *oxyR5*, was isolated and the nucleotide sequence determined. The binding property of OxyR proteins from the mutant and the wild type to the *ahpC* promoter was determined by gel retardation and DNaseI footprinting assays. In addition, a *Xanthomonas ahpC* knockout mutant was constructed and partially characterized.

Analysis of a putative OxyR5 revealed two amino acid changes at a highly conserved G197 to D and a non-conserved L301 to R. These mutations could lock protein in its oxidized (activated) form. Analysis of each amino acid change in *oxyR5* indicate that only mutation at G197D effects the redox state of OxyR which led to high expression of genes in *oxyR* regulon. Gel retardation and DNaseI footprinting assays showed the difference in both binding affinity and protection patterns, respectively, under reducing and oxidizing conditions. Site directed mutagenesis at the redox-center cysteine, C199 and C208 of OxyR5 did not change it to the reduced form as found in the wild type protein. By contrast, mutation at D197 to G or A in OxyR5 could deactivate its ability to induce constitutive gene expression. Thus, mutation at G197 is accounted for activation of OxyR5 in an active form. The *Xanthomonas ahpC* mutant had increased sensitivity to organic peroxide killing, but was unexpectedly hyperresistant to H_2O_2 killing. Moreover, the mutation in *ahpC* appeared to convert OxyR from reduced to an oxidized form leading to activation of genes in *oxyR* regulon in uninduced cells.

4136673 SCBT/M สาขาวิชา: เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

วิรงรอง หวังสุข : การศึกษาระดับโมเลกุลของ *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI* สายพันธุ์ ที่ทนทานต่อสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ที่ยีน ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *PHASEOLI* HYDROGEN PEROXIDE RESISTANT MUTANT AND ALKYL HYDROPEROXIDE REDUCTASE MUTANT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณ์ มงคลสุข, Ph.D., อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D., เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, Ph.D. 177 หน้า. ISBN 974-665-195-1

การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียแซนโทโมนาส สายพันธุ์ *Xp*HR พบว่าระดับของเอ็นไซม์ที่ต้านทานพิษของสารประเภท peroxide ต่างๆ เช่น เอ็นไซม์ catalase และ Alkyl hydroperoxide reductase เพิ่มขึ้นในระดับที่สูงมาก ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *oxyR* ซึ่งเป็นยีนที่ไวต่อสารประเภท peroxide จากการศึกษาลำดับ DNA ของยีน *oxyR* ที่แยกมาจากแซนโทโมนาส สายพันธุ์ *Xp*HR (*oxyR* 5) พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไปจากโปรตีน OxyR ของแซนโทโมนาสโดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่กรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง197 จากไกลซีนเป็นกรดแอสปาติก และที่ตำแหน่ง301 จากลูซีนเปลี่ยนเป็นอาร์จินีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลทำให้สภาพของโปรตีนเปลี่ยนแปลง โดยคงอยู่ในรูปของโปรตีน oxidized form ตลอดเวลา จากการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน OxyR5 เกี่ยวกับความสามารถในการจับกับ DNA บริเวณ *ahpC* promoter โดยเทคนิค Gel mobility shift และ DNaseI protection assay พบว่าความสามารถและตำแหน่งในการจับ DNA นั้นแตกต่างจากโปรตีน OxyR ปกติ การศึกษาวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงในแต่ละตำแหน่ง พบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 197 เป็น กรดแอสปาติกเท่านั้นที่มีผลต่อสภาวะ redox ของโปรตีนทำให้โปรตีนอยู่ใน oxdized form ซึ่งสามารถกระตุ้นยีนต่างๆ ที่ควบคุมโดยยีน *oxyR* นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนซิสเตอีน ที่ตำแหน่ง 199 และ 208 ซึ่งเป็น redox active center ของโปรตีน OxyR โดยเทคนิค Site directed mutagenesis พบว่าไม่ทำให้โปรตีน OxyR5 เปลี่ยนไปอยู่ในสภาพ reduced form อย่างเช่นโปรตีน OxyR ปกติ แต่เมื่อเปลี่ยนกรดแอสปาติกเป็นไกลซีน หรืออะลานีนในโปรตีน OxyR5 พบว่า คุณสมบัติในการกระตุ้นยีนต่างๆเปลี่ยนแปลงกลับไปเหมือนโปรตีน OxyR ปกติ

การศึกษาวิเคราะห์เบื้องต้นของแบคทีเรียแซนโทโมนาส สายพันธุ์ที่ทำให้กลายพันธุ์ที่ยีน Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) โดยการทำ gene knockout พบว่า แซนโทโมนาส สายพันธุ์นี้ไวต่อพิษของสาร organic peroxides แต่ทนต่อพิษของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีน OxyR ไปอยู่ในรูปของ oxidized form ถึงแม้ว่าเซลล์จะไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วยสาร oxidants ต่างๆ

Copyright by Mahidol University