19 JUL 2002

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OXIDATIVE STRESS REGULATED CATALASE A GENE (*KATA*) FROM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI*

NOPMANEE CHAUVATCHARIN

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002

ISBN 974-04-1787-6

COPY RIGHT MAHIDOL UNIVERSITY

TH
N821i
2002
c.2

Copyright by Mahidol University

4238032SCBT/D : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; Ph.D. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : MONOFUNCTIONAL CATALASE / *XANTHOMONAS* / CATALASE A (*katA*) / OXIDATIVE STRESS

NOPMANEE CHAUVATCHARIN : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OXIDATIVE STRESS REGULATED CATALASE A GENE (*KATA*) FROM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI*. THESIS ADVISORS : SKORN MONGKOLSUK, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., PRAMVADEE Y. WONGSAENGCHANTRA, Ph.D.
217 p. ISBN 974-04-1787-6

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* (*Xp*) has two isozymes of monofunctional catalase denoted KatA and KatE. In this study *katA*, a major catalase gene, was cloned using reverse genetic techniques. Two degenerate primers were designed from a partial amino acid sequence of KatA purified from *Xp*HR (a spontaneous peroxide resistant mutant strain which over produced KatA enzyme) and from the conserved region of monofunctional catalases. The PCR was performed using *Xp* genomic DNA as a template. The 344 bp-PCR product was used as a DNA probe to screen a full length *katA* gene from a *Xp* genomic library in λ ZipLox phage by plaque hybridization. A positive clone that contained the complete sequence of *katA* was identified and named pKat29. A *katA* open reading frame of 1,521 bp encoded a 507 amino acids forming a theoretical molecular weight about 56 kDa. Moreover, ankyrin-like gene, *ankA*, was found downstream of *katA* with a putative open reading frame of 624 bp encoded 208 amino acids forming a protein with molecular mass about 23 kDa. Northern blot analysis showed that these two genes were transcribed as a polycistronic mRNA. Southern blot analysis indicated that *katA* was a single copy gene and conserved among various *Xanthomonas* ssp. Comparison of KatA amino acid sequences with other monofunctional catalases, showed that *Xp* KatA belonged to Clade I of monofunctional catalase. The kinetic study of purified KatA showed that it had apparent K_m and V_{max} values of 75 mM [H_2O_2] and 2.55×10^5 μmol H_2O_2 μmol heme^{-1}sec^{-1}, respectively. The k_{cat} at Vmax point was 2.55×10^5 sec^{-1}. Both *Xp* KatA activities from recombinant catalase-deficient *E.coli* and *Xp*HR were inhibited by NaN_3, 3-amino-1,2,4-triazole, hydroxylamine, and NaCN. This enzyme was unusual in several respects, exhibiting a narrower optimal pH range and reduced heat stability compared to other tetrameric monofunctional catalases. A *katA* mutant (*Xp katA*), double mutants (*katA ankA*, *katA katE*, *katA oxyR*), and a strain expression high level of *katA* were constructed to examine the physiological role of the gene. The mutant showed a significantly decreased level of catalase activity at log phase of growth, and was extremely sensitive to H_2O_2 killing compared to a wild type strain and high expression of *katA* strains but more resistance to organic peroxide tBOOH. The data conclusively showed that KatA had an important role in *Xp* against external H_2O_2 killing and implied the existence of compensatory mechanism between catalase and products of *ahpC* genes because the level of *ahpC* expression was higher than normal in *Xp katA* resulting in the resistance of organic peroxide (tBOOH). In addition, *Xp katA* showed an adaptive response to H_2O_2 killing and retained cross-protection response to H_2O_2 killing. The knowledge gained, concerning the molecular basis of major catalase in *Xp*, will allow further study of the function, regulation of this interesting gene and the correlation between this gene, and other genes involved in oxidative stress response.

Copyright by Mahidol University

4238032 SCBT/D : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ; ปร.ด. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

นพมณี เชื้อวัชรินทร์ : การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของยีน catalase A (*katA*) ซึ่งถูกควบคุมโดยกลไก oxidative stress จาก *Xanthomonas campestris* pv. *phasioli* (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF OXIDATIVE STRESS REGULATED CATALASE A GENE (*KATA*) FROM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *PHASEOLI*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศกรณ์ มงคลสุข Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด Ph.D., จรัญญา ณรงคะชวนะ D.Agr.Sc., เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์ Ph.D. 217 หน้า. ISBN 974-04-1787-6

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli* (*Xp*) สร้าง catalases ประเภท monofunction สองไอโซไซม์ คือ KatA และ KatE ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีน *katA* ซึ่งเป็น major catalase ของ *Xp* โดยงานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางด้าน reverse genetic เพื่อออกแบบ degenerate primers สองเส้นโดยเส้นแรกได้จาก partial amino acid sequence ของโปรตีน KatA ที่ได้จาก *Xp*HR (เป็น *Xp* ที่กลายพันธุ์แบบเกิดขึ้นเอง ซึ่งผลิตเอนไซม์ KatA ได้ในปริมาณมาก) และ เส้นที่สองได้จากบริเวณ conserved ของ monofunctional catalases ต่างๆ จากนั้นใช้วิธี PCR เพื่อสร้าง probe ที่จำเพาะกับ *katA* โดยใช้ *Xp* genomic DNA เป็น template ได้ผลผลิตจาก PCR ขนาด 344 bp จากนั้นได้นำ *katA* probe มาใช้ในการแยกหายีน *katA* ที่สมบูรณ์จากห้องสมุดจีโนมของเชื้อ *Xp* ใน λZipLox phage โดยวิธี plaque hybridization ได้โคลนที่ให้ชื่อว่า pKat29 ซึ่งมียีน *katA* ที่สมบูรณ์ เมื่อนำ pKat29ไปวิเคราะห์พบว่ายีน *katA* มีขนาด 1,521 bp แปลรหัสโปรตีนขนาด 507 กรดอะมิโนและมีมวลโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 56 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่ามียีน *ankA* อยู่ถัดจาก *katA* ทางด้าน downstream โดยมีขนาด 624 bp แปลรหัสโปรตีนขนาด 208 กรดอะมิโนและมีมวลโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน จากผลการวิเคราะห์ด้วย Northern blot พบว่าการถอดรหัสของยีน *katA* และ *ankA* เป็นแบบ polycistronic mRNA และจากการวิเคราะห์ด้วย Southern blot พบว่า *katA* เป็นยีนที่มีเพียงหนึ่งชุดบนโครโมโซมและยังพบได้ในเชื้อ *Xanthomonas* อื่นอีกหลายสปีชีส์ จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่ายีน *katA* นี้มีความคล้ายกับ monofunctional catalase อื่นๆ โดยสามารถจัดให้อยู่ใน catalase กลุ่ม1 จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางจลน์ศาสตร์ทางของเอนไซม์ KatA พบว่ามีค่าปรากฏ K_m and V_{max} คือ 75 มิลลิโมลของความเข้มข้น H_2O_2 และ 2.55×10^5 ไมโครโมล H_2O_2 ไมโครโมล $heme^{-1}$ วินาที$^{-1}$ตามลำดับ และมีค่า k_{cat} ที่จุด V_{max} เท่ากับ 2.55×10^5 วินาที$^{-1}$และ NaN_3, 3-amino-1,2,4- triazole, hydroxylamine, NaCN สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ และเอนไซม์มีการทำงานได้ดีที่สุดช่วง pH แคบและทนความร้อนได้น้อยเมื่อเทียบกับ tetrameric catalases ประเภท monofunction ทั่วไป นอกจากนี้ได้ทำการสร้างแบคทีเรียที่เสียการทำงานของ *katA* ใน *Xp* (*Xp katA*) และ *Xp* mutant อื่นๆที่เกี่ยวข้องเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ *katA* พบว่า *katA* mutant มีความไวต่อ H_2O_2แต่ต้านทานต่อ organic peroxide tBOOH แสดงว่ายีน *katA* มีบทบาทสำคัญในการต้านทาน H_2O_2 และพบว่าใน *Xp katA* มีการสร้าง AhpC ในระดับที่มากขึ้นทำให้ต้านทานต่อ organic peroxide (tBOOH) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *Xp katA* มีการตอบสนองแบบ adaptive ต่อ H_2O_2 และ แบบ cross-protection ต่อ H_2O_2 เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย menadione (สารที่สร้าง superoxide) ที่มีความเข้มข้นต่ำ ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จะสามารถเป็นพื้นฐานระดับโมเลกุลของเอนไซม์ Catalase ใน *Xp* เพื่อนำไปสู่การพัฒนางานวิจัยเกี่ยวกับหน้าที่และการควบคุมการทำงานของยีนนี้และความสัมพันธ์กับยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress response

Copyright by Mahidol University