178985

บทคัดย่อ

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกรัมลบ *Burkholderia pseudomallei* ในการศึกษาหน้าที่ของยีนซิกม่า-เอสโดยการทำลายยีนดังกล่าวของเชื้อ *B. pseudomallei* ให้ได้ สายพันธุ์ *rpo*S mutant หรือเรียกว่าเชื้อผ่าเหล่า พบว่าเชื้อผ่าเหล่านี้จะมีความไวต่อสภาวะการอดอาหาร สภาวะความเครียสจากออกซิเจนทั้งชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และชนิดเมธิไวโอโลเจนเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซิกม่า-เอสโดยการใช้โปรโมเตอร์ของยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่แสดงกระบวนการทรานสคริปชั่นติดตามโดยการวัดปฏิกิริยาของเบต้า-กาแลคโตไซเคส พบว่าการแสดงออกของซิกม่า-เอสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase และสัมพันธ์กับการผลิตสารหลั่ง Quorum sensing ในช่วงระยะเดียวกันในลักษณะการควบคุมแบบลบ อีกทั้งการแสดงออกของซิกม่า-เอสในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสภาวะความเครียสจากออกซิเจนนี้ได้มุ่งประเด็นการทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อนี้มีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat* G และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat* Eโดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat* E ขึ้นกับการควบคุมของซิกม่า-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxy*R, *kat* G และ *dps* A ถูกควบคุมโดยซิกม่า-เอสภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการควบคุมในเครือข่ายระหว่าง RpoS และ OxyR และเพื่อเป็นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนอื่นๆที่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านั้นโดยซิกม่า-เอส ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่าเหล่า จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกม่า-เอส เช่นพบว่าซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไปในเชื้อที่ผ่าเหล่าแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกม่า-เอสเป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาหน้าที่ของซิกม่า-เอสของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อกลไกการก่อโรคในระดับเบื้องต้นพบว่าเชื้อผ่าเหล่าจะไม่สามารถก่อสภาพพยาธิแบบ multinucleated giant cell formation และ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของเซลล์เจ้าบ้านได้ แสดงว่าเชื้อผ่าเหล่าขาดความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคได้

Key words: เชื้อเมลิออยโดสิส, ซิกม่า-เอส, การแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ, สภาวะความเครียสจากออกซิเจน, ปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรค

Abstract 178985

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. Our study on the *B. pseudomallei rpo*S mutant was shown to be more sensitive to carbon starvation, hydrogen peroxide and methyl viologen than the wild type. Analysis of *rpo*S gene expression by transcription fusion with beta-galactosidase activity assay indicated that *rpo*S was activated when entry into stationary phase and related to quorum sensing expression by negatively regulation. Moreover, when the bacteria exposed to hydrogen peroxide in the stationary phase, the *rpo*S was also activated. In an oxidative stress condition, the study of catalase activities were indicated that *B. pseudomallei* has 2 types of catalases, catalase I encoded by *kat*G and catalase II encoded by *kat*E, respectively. Our results revealed that *kat*E is directly controlled by the RpoS and is not induced by hydrogen peroxide. However, the RpoS was shown to regulate *kat*G, *dps*A and *oxy*R operon under hydrogen peroxide treatment. Our finding is novel and first illustrate the regulation network between RpoS, OxyR, KatG and DpsA expression under hydrogen peroxide induction. In order to identify other genes expressions under RpoS regulation, 2-dimensional gel electrophoresis and MADI-TOF techniques were applied. We have constructed a proteomic reference map of a wild type *B. pseudomallei* 844 strain and used for comparative identification of differential protein expressions in the *rpo*S mutant strain. A superoxide dismutase, one of an identified product from the proteomic profile, was shown to be under RpoS regulation. We also demonstrated that the *B. pseudomallei* RpoS involved in regulation of virulent factors such as an induction of multinucleated giant cell formation and of nitric oxide synthase of the host cells.