บทคัดย่อ

229436

การอยู่รอดภายในเซลล์ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นสิ่งสำคัญในการก่อโรค ปัจจัยหนึ่งที่เป็นส่วนสำคัญและทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อยู่รอดระหว่างและหลังการติดเชื้อ คือความสามารถในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดชนิดที่มีออกซิเจนเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งการทำงานของระบบการควบคุม RpoS และ OxyR จัดเป็นหนึ่งในการตอบสนองชนิดนี้ สมมุติฐานว่าระบบการควบคุมทั้งสองชนิดนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อภายในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล การศึกษานี้เริ่มจากการหาสภาวะการกินเชื้อโดยนิวโทรฟิล พบว่า อัตราส่วนระหว่างเชื้อกับนิวโทรฟิลที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีน *rpoS* คือ 10:1 และ 15:1ที่เวลา 90 นาที การแสดงออกของยีน *rpoS* ในสภาวะทั้งสองอัตราส่วนนี้เพิ่มขึ้นกว่าในสภาวะควบคุม (control) 2 และ 3 เท่าตามลำดับ เนื่องจากจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ภายในนิวโทรฟิลที่ได้จากการทดลองมีปริมาณน้อย ทำให้วิธีนี้ไม่เหมาะต่อการนำไปทำการทดลองต่อไป ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีใหม่ด้วยการ coincubate ระหว่างเชื้อกับ WBC lysate พบว่า เมื่อทำการทดลอง 90 นาที การแสดงออกของยีน *rpoS* เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้แทนวิธีการกินเข้าไปในเซลล์ได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อไปทำการทดลองต่อ โดยการวัดการแสดงออกของยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของระบบการควบคุม RpoS และ OxyR ด้วย RT-PCR พบว่า การแสดงออกของยีน *dpsA* และ *sodB* เพิ่มขึ้น 1.3 และ 1.9 เท่าตามลำดับ แต่การแสดงออกของยีน *oxyR* ไม่มีการเปลี่ยนแปลง การศึกษานี้สามารถคาดการณ์ได้ว่าระบบการควบคุม RpoS มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอยู่ภายในนิวโทรฟิล นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หายีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองการอยู่รอดในความเครียดของแบคทีเรียนี้ คณะวิจัยได้ใช้วิธีการเปรียบเทียบโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่าเหล่า *rpoS* เทียบกับเชื้อปกติ โดยพบว่ามีโปรตีนที่สร้างแตกต่างกันอย่างน้อย 70 โปรตีน จากการวิเคราะห์โดยใช้ชีวสารสนเทศพบว่าโปรตีนเหล่านี้แบ่งตามกลุ่มการทำงานได้เป็น 14 กลุ่ม และส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับสภาวะความเครียด ทั้งนี้เมื่อศึกษาโดย Hidden Markov Model (HMM) เพื่อวิเคราะห์โปรโมเตอร์ที่ยืนยันการควบคุมโดย *rpoS* สามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนที่พบเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะศึกษาต่อยอดในการวิเคราะห์หายีน หรือ กลุ่มยีนภายใต้การควบคุมของ *rpoS* ทั้งระบบจีโนมรวมทั้งต่อยอดการศึกษาระบบชีววิทยาของแบคทีเรียนี้ต่อไป

Abstract

229436

The intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* is important in the pathogenesis of infection. *B. pseudomallei* can persist in a dormant stage for months or years. Relapse after apparent cure and recurrences of infection make treating this disease difficult. One important factor which helps them survive during and after infection is the microbial oxidative stress response. The regulation of RpoS and OxyR regulons is also in this category. In this study, it is hypothesized that one of these 2 regulatory systems may be involved in *B. pseudomallei* survival inside the human neutrophils under an oxidative stress condition. First, the condition for phagocytosed process was determined. The appropriate ratio between *B. pseudomallei rpoS* expression in human neutrophils are 10:1 and 15:1. The optimal coincubation time is 90 minutes. To prove whether conditions inside neutrophils are stressful for *B. pseudomallei*, the β-galactosidase production of intracellular *rpoS*plac *Z* transcription fusion was measured. The result showed that *B. pseudomallei rpoS* intracellular ratios of 10:1 and 15:1 increased 2- and 3- fold more than the control, respectively. Therefore, the intracellular environment of human neutrophils produced stress factors which affected *rpoS* expression. By this method, the harvested cells of *B. pseudomallei* were too low for other applications. The developing method was performed by coincubation of the whole white blood cells lysate with *B. pseudomallei* (so called *in situ* condition). The results showed the *B. pseudomallei rpoS* expression at 90 minutes was 3- fold more than control. This *in situ* process can be used to imitate the intracellular environment of human neutrophils. To determine the relationship between RpoS and OxyR regulatory systems after *in situ* conditions, the *oxyR, dpsA* and *sodB* expression detected by RT-PCR was determined. The results showed that the expression levels of *dpsA* and *sodB* were 1.3 and 1.9 times higher than control, respectively; whereas, the *oxyR* remained unchanged. The findings suggest that the *B. pseudomallei* RpoS regulon is involved in the intracellular environment of human neutrophils. In addition, we also identified genes under RpoS regulation using proteomic approach. Comparative proteomic profiles between *B. pseudomallei rpoS* mutant with its wild type showed approximately 70 differentially expressed proteins. The RpoS-dependent genes were then classified into 14 functional categories, most of which were related to stress response. We then used Hidden Markov Model (HMM) for prediction of RpoS-dependent promoters in 51 genes encoding 63 down-regulated proteins in *rpoS*$^{-}$ strain and successfully defined such promoters, which were classified into three main groups based upon their consensus sequences. Our data will be able to extend for identification the RpoS regulated genes in the whole genome and for system biology study as well.