

หัวข้อวิจัย การวิเคราะห์โปรตีนที่มีบทบาทในการก่อโรคของเชื้อ *Streptococcus suis*

ผู้วิจัย ดร. ขวัญจิต ดวงสงค์
 ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล
 ดร. หทัยรัตน์ ธนัญชัย

บทคัดย่อ

Streptococcus suis เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญในสุกร สามารถติดต่อมาสู่คนและก่อให้เกิดการติดเชื้อรุนแรงได้ เชื้อ *S. suis* เป็นเชื้อที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในการก่อโรค การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนที่เชื้อ *S. suis* สร้างขึ้นในภาวะที่สัมผัสกับเซลล์มาโครฟาจ รวมถึงการศึกษาโปรตีนจากองค์ประกอบต่างๆของเชื้อในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้หลั่ง cytokine *S. suis* อาจสามารถช่วยให้เข้าใจถึงกระบวนการก่อโรคของเชื้อได้มากขึ้น

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน (Proteomic profiles) ของเชื้อ *S. suis* serotype 2 และ serotype 14 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยและหมูปกติ จำนวน 5 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมาโครฟาจ ทั้งของตนและของหนู ด้วยการใช้เทคนิค LC-MS/MS และนำมาจัดจำแนกและวิเคราะห์กับฐานข้อมูล เพื่อจะได้ทราบชนิดและหน้าที่ของโปรตีนเหล่านั้น รวมถึงศึกษาการกระจายตัวของ Virulence associated genes 3 ยีน ในกลุ่มตัวแทนของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่างๆจากคนและหมูอีก 50 สายพันธุ์ ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยย่อยที่ 1 พบว่า เชื้อ *S. suis* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีความสามารถในการรุกรานเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนได้ดีกว่าเม็ดเลือดขาวของหนู และมีการตอบสนองต่อภาวะในเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งสองชนิดแตกต่างกัน การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ค้นพบและสามารถระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่เชื้อ *S. suis* สร้างขึ้นเพื่อตอบสนองเมื่อตัวเชื้อรุกรานเข้าไปในมาโครฟาจทั้งของคนและหนู ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน โดยเมื่อเชื้ออยู่ภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหนูจะตอบสนอง ด้วยการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดมากที่สุด (16%) ในขณะที่เมื่อเชื้ออยู่ในมาโครฟาจของคนจะมีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสมากที่สุด (48%) โดยผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *S. suis* มีการกระตุ้นการแสดงออกของยีนให้สร้างเป็นโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อติดเชื้อในคน และชนิดของโปรตีนที่สร้างขึ้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเตรียมตัวเพื่อเพิ่มจำนวนทันทีภายหลังจากการรุกรานเข้าสู่เซลล์มาโครฟาจของคน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อตัวเชื้อเองในการอยู่รอดภายในโฮสต์ ในขณะที่สภาวะภายในเซลล์เม็ดเลือดขาวของหมูนั้นไม่เหมาะสมที่เชื้อจะเจริญได้ทันที เชื้อจึงมีการตอบสนอง โดยสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดออกมา สำหรับการศึกษาการกระจายตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในเชื้อ *S. suis* ที่แยกได้จากคนและหมูจำนวน 50 สายพันธุ์นั้นพบ genotype *sly-/epf-/mrp+* มากที่สุด (42%) โดยแบ่งเป็นพบ genotype นี้ใน 40% ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยและ 44% ของเชื้อที่แยกได้จากหมูปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. suis* ส่วนใหญ่ที่แยกได้ในบริเวณจังหวัดเชียงใหม่และลำพูนไม่มียีนที่กำหนดการสร้าง suilysin และ extracellular protein factor

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของเชื้อ *S. suis* หลายสายพันธุ์รวมถึงสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการ Streptococcal Toxic Shock Syndrome (STSS) และศึกษาความสามารถของโปรตีนจากเชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ดังกล่าวในการกระตุ้นเม็ดเลือด

ขาวให้หลัง proinflammatory cytokine และ HMGB-1 โดยการศึกษาเริ่มจากการสกัดโปรตีนจากเซลล์รวมถึงโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) ของเชื้อ *S. suis* จำนวน 9 สายพันธุ์ แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อโดยวิธี Lactate dehydrogenase (LDH) assay และทำการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวด้วยโปรตีนของเชื้อ แล้วทำการตรวจหา proinflammatory cytokines และ HMGB-1 ที่หลั่งจากเม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้น ผลการศึกษาจากโครงการวิจัยย่อยที่ 2 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยหรือหมูป่วย รวมถึงโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความเป็นพิษต่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากหมูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่น่าสนใจคือ โปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจากเชื้อสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin นั้นมีความเป็นพิษต่อโมโนนิวเคลียร์เซลล์เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *S. suis* บางสายพันธุ์ยังมีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิลด้วย

เมื่อทำการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าโปรตีนที่สกัดจากเยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *S. suis* 2 และ serotype 14 ทั้ง 9 สายพันธุ์สามารถกระตุ้นให้โมโนนิวเคลียร์เซลล์สร้าง IL-1 β , IL-6, IL-8 และ MCP-1 ได้ อีกทั้งยังมีรูปแบบของการหลั่งไซโตไคน์ที่หลากหลายตามแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้โปรตีนที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังกระตุ้นให้มีการสร้าง TNF- α และ HMGB-1 ได้ จะเห็นได้ว่าโปรตีนของเชื้อมีความเป็นพิษต่อเซลล์และมีความสามารถกระตุ้นเม็ดเลือดขาวให้หลั่งไซโตไคน์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าปัจจัยที่จะก่อให้เกิดการติดเชื้อแบบ STSS ที่รุนแรงของเชื้อ *S. suis* นี้ อาจเกิดจากการที่เชื้อกระตุ้นให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine จากโมโนนิวเคลียร์เซลล์ ร่วมกับความสามารถของเชื้อที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ซึ่งเป็นผลให้มีการหลั่ง HMGB-1 ออกมา จากนั้น HMGB-1 นี้จะไปกระตุ้นให้มีการหลั่ง proinflammatory cytokine เพิ่มมากขึ้นจนนำไปสู่อาการของ STSS ได้ และที่น่าสนใจคือ เชื้อ *S. suis* สายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้าง suilysin นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อมีการสร้างโปรตีนอื่นที่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

คำสำคัญ: สเตรปโตคอคคัส ซูอิส, โปรตีนโอมิคส์, มาโครฟาจ, ไซโตไคน์; toxic shock syndrome; โมโนนิวเคลียร์เซลล์

Research title: Analyses of virulence-associated proteins of *Streptococcus suis*

Researchers : Dr. Kwanjit Duangsonk
Dr. Sittiruk Roytrakul
Dr. Hatharat Thananchai

Abstract

Streptococcus suis is a pathogenic bacteria in pigs that could transmit to people and cause serious infection. *S. suis* is genetically diverse and the exact mechanism of pathogenesis is still unclear. Research studies on proteins *S. suis* that express during exposure to macrophage cells as well as the protein components of these bacteria that could stimulate white blood cells to secrete cytokines, may lead to the more understanding in the pathogenesis of infection.

Objective of the first sub-project was aimed to study the expression pattern of the protein (Proteomic profiles) of *S. suis* serotype 2 and serotype 14 strains isolated from patients and healthy pigs when cultured in the presence of macrophages. The other objective was to study the distribution of virulence associated genes in representative groups of bacteria isolated from various sources. For research methodology, the expression of the protein of *S. suis* serotype 2 and serotype 14 strains during exposure to intra-macrophagic condition was analyzed by using LC -MS/MS and classification of the type and function of those proteins was performed using database to. Distribution study of genes associated with virulence in 50 *S. suis* strains isolated from human and pig from Chiang Mai and Lumphun provinces.

The results of the first sub-research showed that all 5 *S. suis* strains were able to invade human macrophages better than murine macrophages. They responded to the conditions in 2 types of macrophages differently, by producing different types of proteins. This study is the first study to discover and identify type and function of proteins produced by *S. suis* in response to macrophage invasion in both human and murine macrophages. Proteins of *S. suis* that were mainly detected when infection within murine macrophages include proteins related to stress response (16%) whereas those mainly detected when infection in human macrophage were proteins involved in translation (48%). The results of the study were the first to found that human macrophages were sensitive to being invaded by *S. suis* than cells of mice. This could be one of the reasons the *S. suis* often cause infections in human more easily than rodents. The proteins of *S. suis* generated during exposure to the intra-macrophagic condition detected in this study indicated that after infection into human cells, *S. suis* upregulate their genes and prepare to grow immediately after the invasion into the human host. This may be beneficial to the bacteria to survive

within the host itself. While conditions in the murine macrophages were not suitable for *S. suis* to grow, the bacteria respond by producing proteins involved in the response to stress. For the study of the distribution of genes involved in the pathogenesis, *S. suis* 50 isolates from human and pig showed major genotype of *sly-/epf-/mrp +* (42%). This genotype was detected in 40% of isolates from patients and 44% of bacteria isolated from normal pigs. These indicated that the majority of *S. suis* strains isolated in Chiang Mai and Lamphun do not contain suilysin and extracellular protein factor genes.

The second sub-project was aimed to investigate cytotoxicity to leukocytes and the ability of *S. suis* serotype 2 isolated from STSS patients and *S. suis* serotype 14 to induce the production of proinflammatory cytokines by mononuclear leukocytes. Research methodology of the second sub-project were performed by extraction of proteins from 9 strains of *S. suis*, including secreted proteins. Toxicity to leukocytes was measured by using Lactate dehydrogenase (LDH) assay. For cytokines production, after stimulated mononuclear cells with bacterial proteins, proinflammatory cytokines and HMGB-1 were detected by using ELISA test.

The results of second project indicated that *S. suis* strains isolated from patients or diseased pig and their culture supernatants were significantly more toxic to mononuclear cells than strains isolated from healthy pigs. Moreover, culture supernatants from suilysin-negative strains were toxic to mononuclear cells. Additionally, some *S. suis* strains were also toxic to neutrophils. Proteins extracted from the cell membrane and culture supernatant from 9 strain of *S. suis* serotype 2 and 14 could stimulate mononuclear cells to secrete IL-1 β , IL-6, IL-8. and MCP-1 with various patterns. In addition, the proteins in culture supernatant also stimulated the production and HMGB-1 and TNF- α . The results of this study have shown that protein virulence factors may play a role in the pathogenesis of *S. suis* serotype 2 and serotype 14 infection. Proteins extracted from cell membranes and culture supernatant of *S. suis* could stimulate mononuclear cells with various patterns according to each species. Thus, it is possible that the factors that are involved in the severity of *S. suis* infection, including STSS, may result from an infection stimulates the secretion of proinflammatory cytokines from mononuclear cells together with the ability of bacteria to cause cell death. In addition, this cell death will result in the secretion of HMGB-1 which stimulates more secretion of proinflammatory cytokines and lead to symptoms of STSS. Interestingly, strains isolated from patients or diseased pig were significantly more toxic to mononuclear cells than the strains isolated from healthy pigs although such strains were suilysin-negative. These results suggested that suilysin-negative strains may produce other proteins that toxic to mononuclear cells.

Key Word (s): *Streptococcus suis*, Proteomic, Macrophages, Cytokine, toxic shock syndrome, peripheral blood mononuclear cell