

Abstract

Project Code : RMU4980044

Project Title : การวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนของ *Burkholderia pseudomallei* ในหนูทดลอง

Investigator : รศ.ดร.รศนา วงศ์รัตนชีวิน ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address : rasana@kku.ac.th

Project Period : 20 กรกฎาคม 2549- 20 กรกฎาคม 2552

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สาเหตุของโรคmelioidosis ที่พบได้ทั้งในคนและสัตว์ เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อม การติดเชื้อผ่านทางบาดแผล ทางเดินหายใจ และทางการกิน เป็นสาเหตุการติดเชื้อในกระแสเลือดจากเชื้อถิ่นในประเทศไทยถึง 20% อัตราการตายหลังการติดเชื้อในกระแสเลือดสูงถึง 40% เชื้อที่พบในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมมีความรุนแรงในการก่อโรคได้หลากหลาย และการจัดจำแนกที่มีอยู่ในปัจจุบันสามารถพบกลุ่มเดียวกันได้ทั้งจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม และไม่ขึ้นกับความรุนแรงในการก่อโรค ปัจจัยพื้นฐานของผู้ได้รับเชื้อจึงน่าจะเป็นส่วนสำคัญที่นำไปสู่ความรุนแรงที่แตกต่าง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการเกิดโรค เช่น type III secretion system 3 และ type 6, pili, flagella ฯลฯ ยังไม่สามารถอธิบายความรุนแรงของการเกิดโรคที่ต่างกันได้ในงานวิจัยนี้จึงหา marker ที่สามารถใช้จำแนกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมและจากผู้ป่วย และยีนใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคซึ่งแสดงออกต่างกันในสัตว์ทดลองที่มีปัจจัยพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันที่ต่างกันโดยใช้เทคนิค DNA microarray ซึ่งมียีนของ *B. pseudomallei* K96243 sequence strain เมื่อเปรียบเทียบจีโนมของเชื้อที่แยกจากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมพบว่า มี 4 GIs ที่พบในทุก isolate เหมือนกับ K96243 และ 15 GIs ที่แตกต่าง โดย GIs ในเชื้อจากผู้ป่วยมีความหลากหลายมากกว่า และมีบาง GI ที่ต่างกันชัดเจนระหว่างเชื้อจากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม แต่ virulence ของแต่ละ isolate เมื่อทดสอบใน BALB/c mice ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทดสอบ GI เหล่านี้โดย PCR ในอีก 96 isolate พบว่า clinical isolate มี GI8a 58-60% ในขณะที่ soil isolates มี 2-15% และพบ GI 17 48-50% ใน clinical isolates และ 2% ใน soil จึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจติดตามแหล่งที่มาของเชื้อเมื่อมีการระบาด สำหรับยีนที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ได้นำหนู BALB/C ที่ไวต่อการเกิดโรค และ C57BL/6 ที่ค่อนข้างทนต่อการเกิดโรคมาศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค DNA microarray C57BL/6 มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบโต้ของเชื้อลดลง BALB/c มีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้ ยีนการอยู่รอดของเชื้อและยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการก่อโรคก็เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งนำไปอธิบายความไวในการก่อโรคของหนู BALB/C ได้ดี ได้คัดเลือก 2 ยีน ที่มีการแสดงออกต่างกันในหนูทั้งสองกับสิ่งแวดล้อมอย่างชัดเจนไปศึกษา ต่อมา 2 ยีน ที่เลือกทำการทดลองมีการตีพิมพ์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับ type VI secretion system และ TssM ที่ควบคุมการแสดงออกโดย Type III secretion system นับเป็นแนวทางคัดเลือกที่ถูกต้อง แต่จำเป็นต้องคัดเลือกยีนเพิ่มเพื่อศึกษาต่อไป

Keywords : *B. pseudomallei*, Genomic islands, DNA microarray, virulence genes

Abstract

Project Code : RMU4980044

Project Title : Analysis of gene expression profile of *Burkholderia pseudomallei* in mice model

Investigator : Rasana Wongratanacheewin, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

E-mail Address : rasana@kku.ac.th

Project Period : 20 July 2006- 20 July 2009

Burkholderia pseudomallei is a saprophytic Gram-negative bacterium that causes melioidosis in humans and animals. The routes of infection are through inhalation, ingestion and skin abrasion. In Thailand, it accounts for 20% of community-acquired septicemias where the mortality rate is up to 40%. Bacteria isolated from environment and clinical samples showed no significant difference in virulence and molecular typing methods are unable to classify them according to virulence or source. Immune response and underlying diseases of host may contribute to the severe manifestation of the disease. The expression level of virulence genes such as type III secretion system 3, type 6, pili and flagella could only partially explain manifestation and gradient severity of the disease. Therefore, DNA microarray containing genes of *B. pseudomallei* K96243 sequence strain was used to screen for a suitable marker to identify environmental out of clinical isolates and novel genes that have different expression level under different immune background in animal model. When 2 environmental and 3 clinical isolates were compared, 4 genomic islands (GIs) were found to be in common with the K96243. Higher variability of GIs was observed in clinical isolates. However, the virulence in BALB/c mice was not significantly different. A few GIs that different from clinical to environmental isolates were selected and tested by PCR in 96 isolates. GI8a was found in 58-60% of clinical while only 2-15% in soil isolates. GI 17 was detected in 48-50% of clinical and only 2% in soil isolates. The GI detection may be a useful tool to trace the source of infection in nature for epidemiological purpose. The bacterial gene expression profile in BALB/c (sensitive) and C57BL/6 (resistance) was compared using DNA microarray. Genes related to cell cycle were expressed higher in C57BL/6 but not in defense mechanism. On the other hand, genes related to cell cycle, survival and virulence were all expressed higher in infected BALB/c. These could explain the more sensitive to infection in BALB/c. Two genes that significantly expressed differently between 2 mice and *in vitro* were selected. Unfortunately, 2 of them were recently published as a unit in type 6 secretion system and a TssM protein controlled by Type III. It confirmed suitable criteria we chose but we need to find more unknown function genes for further study.

Keywords : *B. pseudomallei*, Genomic islands, DNA microarray, virulence genes