Abstract

Project Code: BRG5180003

Project Title: Regulation of Sterile α Armadillo-Motif (SARM) containing protein in the mouse macrophage cell line infected with *Burkholderia pseudomallei*

Investigators: Utaisincharoen P. , Sirisinha S. , Limposuwan K. , and Pudla M.

Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

Email address: scput@mahidol.ac.th

Project Duration: May 2008- May 2011

Burkholderiapseudomallei, a causative agent of melioidosis, is a Gram-negative facultative intracellular bacterium that can survive and multiply in macrophages. Previously we demonstrated that *B. pseudomallei* failed to activate gene expression downstream of MyD88-independent pathway, particularly the expression of IFN-β and inducible nitric oxide synthase (iNOS), leading to the inability of macrophages to kill this bacterium. Failure to activate MyD88-independent pathway may due to the fact that *B. pseudomallei* may be able to activate negative regulator of this pathway. Among negative regulator of MyD88-independent pathway Sterile-α and Armadillo Motif (SARM) containing protein has been extensively in many model. In the present report, we extended our study to show that *B. pseudomallei* was able to activate Sterile-α and Armadillo Motif (SARM) containing protein, a known negative regulator of MyD88-independent pathway. Both live and heat-killed *B. pseudomallei* were able to upregulate SARM expression in a time-dependent manner in mouse macrophage cell line RAW 264.7. In addition, the intracellular survival of *B. pseudomallei* was suppressed in SARM-deficient

macrophages. Increased expression of IFN-β, iNOS and degradation of IκBα correlated with enhanced macrophage killing capability. Moreover, the expression of SARM required bacterial internalization as it could be inhibited by cytochalasin D suggested that intracellular receptors may involved in SARM expression. However, *B. pseudomallei*-infected NOD1 and NOD2-depleted macrophages still able to stimulate SARM expression implied that others intracellular receptor but not NOD1 and NOD2 responsible for SARM expression. Altogether, these results demonstrated that *B. pseudomallei* modulated macrophage defense mechanisms by upregulating SARM, thus leading to the suppression of IFN-β and iNOS needed for bacterial elimination.

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BRG5180003

ชื่อโครงการ : การศึกษาการควบคุมการสร้าง Sterile α- Armadillo-motif containing protein (SARM) ในเซลล์แมคโครฟาจของหนูที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ชื่อนักวิจัย : พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ , สถิตย์ สิริสิงห , กรแก้ว ลิ้มโพธิ์สุวรรณ , และ มัตสยาพรรณ พุดลา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Email address : scput@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : พฤษภาคม 2551-พฤษภาคม 2554

เชื้อเบอร์โคลเดอเรีย สูโดมาลลิไอ (*Burkholderia pseudomallei*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดซิส เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นแบคทีเรียชนิด facultative intracellular ที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์แมคโครฟาจ ก่อนหน้านี้ทางคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ล้มเหลวในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน downstream ของ MyD88-independent pathway รวมถึงการแสดงออกของ IFN-β และ iNOS นำมาซึ่งการที่เซลล์แมคโครฟาจไม่สามารถที่จะทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ซึ่งความล้มเหลวในการกระตุ้น MyD88-independent pathway อาจมาจากความจริงที่ว่า เชื้อ *B. pseudomallei* อาจจะกระตุ้น negative regulators ของ MyD88-independent pathway ในบรรดา negative regulators ของ MyD88-independent pathway นั้น SARM เป็นตัวหนึ่งที่ถูกศึกษากันอย่างกว้างขวางในรูปแบบต่างๆ ในรายงานนี้ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. pseudomallei* นั้นสามารถที่จะกระตุ้นการแสดงออกของ SARM ได้ทั้งในแบคทีเรียที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต อีกทั้งการแสดงออกของ SARM ยังมีการเพิ่มระดับการแสดงออกไปตามเวลาที่เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้การดำรงชีวิตของ เชื้อ *B. pseudomallei* นั้นจะลดลงในเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่มีการแสดงออกของ SARM และการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของ IFN-β, iNOS และการสลายของ IKB ยังสอดคล้องกับการเพิ่มความสามารถของเซลล์แมคโครฟาจในการทำลาย เชื้อ *B. pseudomallei* อีกด้วย นอกจากที่กล่าวมาแล้วการแสดงออกของ SARM นั้นต้องการการ internalization ของแบคทีเรียให้เข้าไปในเซลล์ซึ่งการแสดงออกของ SARM สามารถถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้ง cytochalasin D ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า intracellular receptors อาจมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ SARM อย่างไรก็ตามเมื่อทำการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจที่ไม่มีการแสดงออกของ NOD1 และ NOD2 ยังพบว่ามีการแสดงออกของ SARM อยู่ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่า intracellular receptors ชนิดอื่นมีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของ SARM แต่ถึงอย่างไรก็ตามจากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถที่จะทำการเปลี่ยนแปลงกลไกการป้องกันของเซลล์แมคโครฟาจ โดยการเพิ่มการ

แสดงออกของ SARM ซึ่งนำมาสู่การยับยั้งการแสดงออกของ IFN-β, iNOS ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อ *B. pseudomallei*