



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการกระตุ้นอินเฟลมเมโซมใน  
เซลล์ฟาโกไซท์เมื่อติดเชื้อมีโคพลาสมา

โดย อ. ดร.ปฐิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์

พฤษภาคม พ.ศ. 2560

สัญญาเลขที่ TRG5780234

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษากลไกการกระตุ้นอินเฟลมเมชันใน  
เซลล์ฟาโกไซต์เมื่อติดเชื้อมีโคพลาสมา

ผู้วิจัย อ. ดร.ปฎิมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์  
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**Project Code :**

(รหัสโครงการ)

**Project Title : Induction of Inflammasome in innate response to *Pythium insidiosum* by phagocytic cells**

(ชื่อโครงการ) การศึกษากลไกการกระตุ้นอินเฟลมเมโซมในเซลล์ฟาโกไซท์เมื่อติดเชื้อก่อโรคฟิธิโอซิส

**Investigator :** อ. ดร.ปัทมาพร วงษ์พรหมพิทักษ์

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  
มหาวิทยาลัยมหิดล

**E-mail Address :** patimaporn.won@mahidol.ac.th

**Project Period :** 2 มิถุนายน 2557 ถึง 31 พฤษภาคม 2560 (3 ปี)

(ระยะเวลาโครงการ)

## บทคัดย่อ

*Pythium insidiosum* เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพิธิโอสิส (pythiosis) การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดขึ้นในพื้นที่เขตร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย การติดเชื้อจะเกิดขึ้นโดยการสัมผัสกับน้ำที่มี zoospores ผ่านทางผิวหนังที่มีบาดแผลขนาดเล็กหรือเนื้อเยื่อที่มีการบาดเจ็บ อาการของโรค pythiosis มีรายงานว่ามักพบอาการอักเสบตามข้อและผิวหนัง ซึ่งลักษณะโรคจะพบได้ตั้งแต่มีอาการเฉพาะที่ที่ผิวหนังจนถึงแพร่กระจายไปตามหลอดเลือด การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อราก่อโรคชนิดต่างๆ โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า inflammasome ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด มีบทบาทในกลไกการตอบสนองต่อการติดเชื้อราบางชนิด ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อเชื้อ *P. insidiosum* โดยการกระตุ้นการทำงานของ inflammasome โดยใช้เซลล์ THP-1 ซึ่งเป็น monocyte cell line ของมนุษย์ แล้ววัดการกระตุ้นให้เซลล์มีการสร้าง caspase-1 และ IL-1 $\beta$  เมื่อติดเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย pythiosis พบว่า IL-1 $\beta$  ถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่งออกจากเซลล์ THP-1 ที่ co-culture กับ *P. insidiosum* ทำให้เกิดการหลั่ง IL-1 $\beta$  และการกระตุ้น caspase-1 ซึ่งจะถูกยับยั้งโดยสารที่ยับยั้งการสร้าง NLRP3 complex นอกจากนี้ เมื่อทำการ knock out ยีน *NLRP3* จะพบว่ามีการสร้าง IL-1 $\beta$  ในเซลล์ที่ติดเชื้อลดลงเช่นกัน ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า NLRP3 inflammasome มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. insidiosum* ในอนาคต

*Pythium insidiosum* is an etiological agent of an emerging infectious disease, pythiosis. The infection occurs mainly in tropical and subtropical areas, especially in Thailand. Infection is acquired through small wounds or injured tissue via contact with water that contains motile zoospores. The symptoms of pythiosis are normally reported as artheritis, keratitis and cutaneous or subcutaneous infections. The disease occurs in localize as well as systemic or vascular forms. Human innate immune system plays an important role in combating with various fungal pathogens. The inflammasome, a protein complex, is one of the most important mechanism of host innate immunity. Therefore, the better understanding of the host response mechanism against fungal infection is required to develop antifungal action of the immune system. This study is aimed to investigate the inflammatory response to *P. insidiosum* by triggering activation of the inflammasome. Human monocytic cell line, THP-1, was used as a model for the activation of caspase-1 and IL-1 $\beta$  production upon infection with *P. insidiosum* isolated from Pythiosis patients. IL-1 $\beta$  was secreted from *P. insidiosum* co-cultivated THP-1 cells. *P. insidiosum* induced IL-1 $\beta$  secretion, ASC pyroptosome formation and caspase-1 activation were inhibited by competitive inhibitor of NLRP3 formation. The result suggest

that the NLRP3 inflammasome plays an important role in host defense against *P. insidiosum*, and provide information on the inflammatory response of host cell to *P. insidiosum* that may be useful for future development to control the disease caused by *P. insidiosum*.

**Keywords** : *Pythium insidiosum*, inflammasome, phagocytic cell, innate response

## บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

### ที่มาและความสำคัญของปัญหา

*Pythium insidiosum* is an etiologic agent of pythiosis in mammals. Pythiosis is a rarely occurring and non-transmissible infectious disease which is normally found in tropical, subtropical and temperate regions (1-3). In Thailand, pythiosis is considered to be endemic. Infection in humans is life threatening with high rates of morbidity and mortality, especially in regions with a lack of tools for early diagnosis and effective treatment. The zoospores can directly contact to mammalian or plant tissue in wet environments and encyst on the surface of the injured tissues. The encysted zoospores secrete a sticky glycoprotein to mediate the adhesion of zoospores before enter the tissue (2, 4). Host temperature can stimulate zoospores to develop a germ tube to be hypha that extends into the infected tissue and later can also infiltrate blood vessels, which make spreading within the body tissues easier. The disease can also be acquired through traumatic lesions and contact with hyphae of *P. insidiosum* (2). The invasion of blood vessels can lead to thrombosis and invasion of large arteries (5-9). In addition to *P. insidiosum* host colonization by invasive growth, the secretion of proteases and the exertion of mechanical force by the tips of the elongating hyphae have been implicated as its putative virulence factors (10). Pythiosis progresses rapidly and if not treated in the early stages can become life threatening in both humans and animals.

Host innate immune response to microbial pathogens is usually mediated by pattern-recognition receptors (PRRs), which are mainly expressed by innate immune cells such as monocytes, macrophages and dendritic cells. This response is initiated from cellular recognition of conserved microbial structures, which are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). There are at least four families of PRRs have been identified, Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) and nucleotide-binding domain and leucine-rich-repeat containing proteins (NLRs) (11). The NLRs, including NLRP3 and NLRP1, can respond to PAMPs as well as danger-associated molecular patterns (DAMPs) such as uric acid, and form a cellular protein complex called inflammasome which contains ASC and pro-caspase-1 (12). Assembly of inflammasome leads to activation of caspase-1 and secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 (13). Thus, the synthesis and production of IL-1 $\beta$  involves a two-step process. The first step is pro-IL-1 $\beta$  transcription and translation via NF- $\kappa$ B activation. The second step is pro-IL-1 $\beta$  cleavage by active caspase-1 largely due to inflammasome activation (14). IL-1 $\beta$  is an important pro-inflammatory cytokine for host defense, which helps to prevent against various invading microbes

such as bacteria and fungi. The production of this cytokine *via* the NLRP3 inflammasome has been proved to be essential in host defense against pathogenic fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus fumigates* (15-17). However, host immune responses to *P. insidiosum* are not well characterized. The ongoing study of our research group is about the interaction of *P. insidiosum* to epithelium and endothelium as well as the response by these cells after co-cultivation with the fungi to demonstrate how response of host cell after the pathogen invading at the entry sites into the body. In this study, we aim to investigate the possibility of *P. insidiosum* in activation of the inflammasome by induction of IL-1 $\beta$  production from human monocytes and monocyte-derived macrophages which is the step after the fungi entry into the bloodstream and invade the endothelium. The induction of IL-1 $\beta$  from human monocyte and monocyte-derived macrophage (hMDM) by *P. insidiosum* will be determined by co-cultivation of the fungus (live/killed zoospores and hypha) with the cells. The caspase-1 and IL-1 $\beta$  in culture supernatant will be detected using ELISA technique. The activation of caspase-1, NLRP3 and expression of ASC will be determined using real-time PCR and immunoblotting. These cell response will be confirmed by pretreatment the cells with silence expression shRNA and/or stimuli inhibitor before co-cultivation. The expected outcome of this proposal will be used to establish the knowledge about an essential role of the inflammasome in host defense against *P. insidiosum* infection, and suggests that positive manipulation of inflammasome signaling may be a novel approach for control of caused by this fungus. The outcome of the ongoing study and this proporsal are altogether helpful for more understanding the immunopathology of pythiosis and for development of the direction to prevent and treatment to *P. insidiosum* infection

## บทบทวนวรรณกรรม

### ***Pythium insidiosum* and Pythiosis**

*P. insidiosum* is not a true fungus because cell walls of this fungus are composed of “cellulose and  $\beta$ -glucans” without chitin. In wet environment, the organism generates biflagellated zoospores (18), which are single nucleated cells without a cell wall. The zoospores can swim with the help of anterior and posterior flagellum. The posterior flagellum is responsible for the movement in water, while the antherior flagellum functions as a rudder. The zoospores are considered to be the infective propagules, they show chemotaxis and become encysted once they come in contact with either decaying or injured plant or animal tissue. A glycoprotein secreted on the

surface of the encysted zoospores allows adhesion to the injured tissue (2, 4). *P. insidiosum* infections can be mostly found in healthy humans and animals (3-4, 19-21) which occurs mainly in regions of Southeast Asia, especially in Thailand (19, 22-24).

*P. insidiosum* is well adapted to the body temperature of mammalian hosts, which has an optimum temperature for growth at 34–36°C and a maximum temperature at 40-45°C (1). The fungus grows well on various artificial media when incubated at 25°C or 37°C (1). On Sabouraud agar, *P. insidiosum* grows in submerged, white to colorless colonies, which show irregular radiate pattern (1-2, 4). Zoospores are developed only in water cultures, which are stimulated by the presence of ions such as K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and chemically attracted by plant material, animal hairs or pieces of animal tissue (2, 26). The zoospore formation of *P. insidiosum* can take 1 h or more. There is no susceptible mammalian host for the fungal survival because it is able to survive and multiply in natural environment on decaying plants (2).

Zoospores show a marked chemotaxis towards wounds and other damaged skin parts (1-2). The adhesion of zoospores to the damaged tissues of skin was observed. The location of the lesions is related to the parts of the body that were directly contacted with water containing zoospores of *P. insidiosum* (2, 21).

The encysted zoospores stimulated by the host's body temperature develop a germ tube (hypha) that extends from the zoospores into the infected tissue and later can also infiltrate blood vessels (humans), which makes spreading within the body tissues easier. The disease can also be acquired through traumatic lesions and contact with hyphae of *P. insidiosum* (4). The invasion of blood vessels can lead to thrombosis and invasion of large arteries (5-9). In addition to *P. insidiosum* host colonization by invasive growth, the secretion of proteases and the exertion of mechanical force by the tips of the elongating hyphae have been implicated as putative virulence factors (10). A significant reduction in tissue strength has to be obtained by the action of proteases, before penetration of the tissue by hyphae can take place (10, 26-27). The protease is identified as a serine protease using inhibition experiments (27). Pythiosis progresses rapidly and if not treated in the early stages can become life threatening in both humans and animals.

The serological studies in humans and animals with pythiosis showed that *P. insidiosum* antigens can trigger a humoral immune response upon contact with the host (28), however, the presence of this type of immunity cannot clear these infections in humans (6). The cellular immunity provided by activated macrophages and other inflammatory cells shows direct involvement in the extensive tissue damage in infected

hosts (3). Based on data from previous studies, it can be concluded that the humoral immunity in infected hosts with pythiosis triggers the production of anti-*P. insidiosum* antibodies related to a T helper 2 (Th2) immune response (5). These antibodies are not protective, but can be used for the diagnosis of the disease. The cellular immunity triggered by *P. insidiosum* demonstrated the increasing levels of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and Interleukin 2 (IL2) which is indicators of a Th1 mediated immunity and decrease of Th2 mediated interleukins are present in cured patients (3, 6). Therefore, the cellular immunity may play more important roles in response to protect the host from *P. insidiosum* infection in comparison to the humoral immunity.

### **Inflammasome in respond to fungal infection**

The molecules of pathogen that can be recognized by the cell of innate immune system are identified as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (29). Examples of PAMPs are lipopolysaccharide (LPS) from Gram-negative bacteria, peptidoglycan (PGN) from Gram-positive bacteria, and zymosan and mannan from fungi. Receptors that bind these PAMPs are called pattern recognition receptors (PRRs). The PRRs exist that induce various host defense pathways, including the Toll-like receptors (TLRs) located in the plasma membrane and intracellular organelles and the intracellular family of NOD-like receptors (NLRs) (29). The NLR protein Cryopyrin/NALP3 (NLRP3) plays a crucial role in the assembly of a cytosolic protein complex termed the "inflammasome" (30-32). The inflammasome adaptor protein, apoptosis-associated speck-like protein containing CARD (ASC), bridges the interaction between NLRP3 and caspase-1 in the inflammasome allowing the recruitment of the cysteine protease (29). Activated caspase-1 subsequently mediates the maturation and secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18 (33-35). The NLRP3 inflammasome mediates caspase-1 activation in response to a variety of bacterial PAMPs such as LPS and PGN when combined with a second stimulus such as ATP (36-39).

Although the roles of specific inflammasomes in response to bacterial and viral PAMPs have been described, the inflammasome complexes that recognize fungal PAMPs to induce caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  secretion are still limited. The heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* and the purified cell wall components zymosan and mannan can induce caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  secretion from macrophages and dendritic cells upon co-stimulation with ATP (40). Macrophages deficient for the inflammasome adaptor ASC or the NLRP3 protein were defective in zymosan- and mannan-induced caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  secretion. The study demonstrated

that the conserved fungal cell wall components zymosan and mannan require ASC and NLRP3 for caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  secretion and suggest an important role for the NLRP3 inflammasome during fungal infections. IL-1 $\beta$  is also essential for host response against invasive candidiasis (41). IL-1 $\beta$ -deficient mice had decreased granulocyte recruitment upon intraperitoneal challenge with *Candida albicans* and had a higher mortality and an increased risk of disseminated disease compared with wild-type mice (41). Nlrp3 inflammasome is required for caspase-1 mediated IL-1 $\beta$  production in response to *C. albicans* and essential in the transduction of fungal recognition signal to the inflammasome adaptor ASC for caspase-1 activation (42). Hyphal fragments of *Aspergillus fumigatus* spores can upregulate pro-IL-1 $\beta$  synthesis and stimulate caspase-1 activation (17). NLRP3 and ASC acts as key regulators of inflammation during *A. fumigates* infection by a two-step activation process, due to TLR and dectin-1 ligation, promoting expression and synthesis of pro-IL1 $\beta$ ; and involving Syk-induced activation of the NLRP3 inflammasome and caspase-1 allowing secretion of mature IL-1 $\beta$  (17).

#### References:

1. De Cock AW, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol 1987; 25: 344-9.
2. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J Clin Microbiol 1993; 31: 2967-73.
3. Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Med Mycol 2005; 43: 477-86.
4. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J Mycol Med. 1996 ;6: 151-64.
5. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. Postgraduate Med J 1994; 70: 558–60.
6. Thitithanyanont A, Mendoza L, Chuansumrit A, Prachartam R, Laothamatas J, Sathapatayavongs B, *et al.* Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. Clin Infect Dis 1998; 27: 1394-400.
7. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, *et al.* Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis 2006; 43: 569-76.
8. Pupaibool J, Chindamporn A, Patrakul K, Suankratay C, Sindhuphak W, Kulwichit W. Human pythiosis. Emerg Infect Dis 2006; 12: 517-8.

9. Laohapensang K, Rutherford RB, Supabandhu J, Vanittanakom N. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. *Vascular* 2009; 17: 234-8.
10. Ravishankar JP, Davis CM, Davis DJ, MacDonald E, Makselan SD, Millward L, *et al.* Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. *Fungal Genet Biol* 2001; 34: 167-75.
11. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783–801.
12. Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009; 227: 106-28.
13. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-1 beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-26.
14. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 633-52.
15. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009; 459: 433-6.
16. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, *et al.* An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 487-97.
17. Saïd-Sadier N, Padilla E, Langsley G, Ojcius DM. *Aspergillus fumigates* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS One* 2010; 5: e10008.
18. Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW, Exel TK, Pegge RB, Scheurwater J, *et al.* *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol* 2010; 146: 1-16.
19. Thianprasit M. Human pythiosis. *Trop Dermatol* 1990; 4: 1-4.
20. Thomas RC, Lewis DT. Pythiosis in dogs and cats. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1998; 20: 63–74.
21. Grooters AM, Hodgins EC, Bauer RW, DeTrisac CJ, Znajda NR, Thomas RC. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. infection in 6 dogs: initial description of an emerging oomycosis. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 637-46.
22. Ichitani T, Amemiya J. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). *Trans Mycol Soc Jpn* 1980; 21: 263–5.
23. Thianprasit M. Fungal infection in Thailand. *Jpn J Dermatol* 1986; 96: 1343–45.

24. Sohn Y, Kim D, Kweon O, Seo I. Enteric pythiosis in a Jindo dog. *Korean J Vet Res* 1996; 36: 447–51.
25. Chaiprasert A, Samerpitak S, Wanachiwanawin W, Thasnakorn P. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycoses* 1990; 33: 317-23.
26. MacDonald E, Millward L, Ravishankar JP, Money NP. Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. *Fungal Gen Biol* 2002; 37: 245-49.
27. Davis DJ, Lanter K, Makselan S, Bonati C, Asbrock P, Ravishankar JP, *et al.* Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. *Mycol Res* 2006; 110: 96-103.
28. Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2980-3.
29. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 2007; 27: 549-59.
30. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; 20: 319-25.
31. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-26.
32. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; 227: 95-105.
33. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, *et al.* Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997; 386: 619-23.
34. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, *et al.* Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995; 80: 401-11.
35. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, *et al.* Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995; 267: 2000-3.

36. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228-32.
37. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, *et al.* Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 2007; 26: 433-43.
38. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, *et al.* Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006; 24: 317-27.
39. Kanneganti TD, Ozören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, *et al.* Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; 440: 233-6.
40. Lamkanfi M, Malireddi RK, Kanneganti TD. Fungal zymosan and mannan activate the cryopyrin inflammasome. *J Biol Chem* 2009; 284: 20574-81.
41. Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JW, Kullberg BJ. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2006; 193: 1419-26.
42. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009; 459:4 33-6.
43. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu JW, Meng R, Quong AA, Latz E, Scott CP, Alnemri ES. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem* 2010; 285: 9792-802.

### วัตถุประสงค์

1. To investigate the involvement of the inflammasome in response to *P. insidiosum* infection.
2. To determine how *P. insidiosum* activate inflammasome in human phagocytic cells.

## วิธีทดลอง

### **Cultivation of THP-1**

THP-1 cells will be maintained in RPMI 1640 media containing 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, 1 mg/mL streptomycin. The cells will be cultured in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

### Preparation of Human monocyte-derived macrophages (hMDM)

The whole blood of anonymous donor will be kindly provided by department of Transfusion Medicine Siriraj Hospital. The experiments will be approved by Siriraj Institutional Review Board of the Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Thailand.

Mononuclear leukocytes will be separated by density gradient centrifugation using Ficoll-Isopaque. Whole blood will be diluted at 1:1 with PBS in 50 ml-centrifuge tube and mixed with pipetting. The 10 ml of diluted blood will be overlaid on 4 ml of Isopaque. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) will be separated by centrifugation then the ring of PBMCs will be collected. The PBMCs pellet will be washed and resuspended with RPMI 1640 supplemented with 10% AB-serum, 10% FBS, 25 mM HEPES, 1X penicillin/streptomycin and 100 U/ml of GM-CSF. PBMCs will be transferred into 25 cm<sup>2</sup> culture flask and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> until adherent cell will be observed. In this condition, monocytes will adhere on tissue culture flask. The non-adherent cells will be removed. The monocytes will be differentiated to macrophage by cultured in RPMI 1640 (Life technology) supplemented with 10% FBS, 25 mM HEPES, 1X penicillin/streptomycin and 100 U/ml of GM-CSF for 7-10 days. The macrophages at day 9 will be used in cell stimulation experiments.

### Preparation of *P. insidiosum* antigen

### **Strain and culture of *P. insidiosum***

The *P. insidiosum* strain used in this study will be kindly provided by Assoc. Prof. Angkana Chaiprasert from the Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University. This strain will be isolated from patient with *P. insidiosum* systemic distribution. This isolate will be maintained on Sabouraud's dextrose agar (SDA) (BD, MD, USA) pH 7.0 at 25°C until used.

### Preparation of live *P. insidiosum* zoospore

The isolate of *P. insidiosum* on SDA will be inoculated on 2% water agar (BD) plate and then incubated at 37°C for 2 days. After 2 days of incubation, the isolate will be

inoculated into 150 ml of sterilized water containing grass blades (*Axonopus compressus*) and then incubated at 37°C for 2 days. In this condition, *P. insidiosum* will be developed which attached to grass blades. After incubation, water will be removed and replaced with induction media and then incubated at 37°C for 3-4 h or until release of zoospore will be observed. Production of sporangia and zoospore will be evaluated by light microscopy. Zoospore will be washed for 3 times with endotoxin-free phosphate buffer saline (PBS) (Life technology, NY, USA) at 4°C for 1 h. The live zoospore will be resuspended with RPMI 1640 (Life technology, NY, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 25 mM HEPES, 1X penicillin/streptomycin and 100 U/ml of GM-CSF. These zoospores will be counted using hemacytometer. Controlled medium without *P. insidiosum* will be also included in each experiment.

### **Real-time PCR**

Total RNA will be extracted from the THP-1 cells and hMDM using RNAeasy kit (IQIAGEN). Reverse Transcription of mRNA and synthesis of cDNA will be performed using Superscript III first strand synthesis (Invitrogen). Real-time PCR will be performed using the SYBR Green qPCR Master Mix (BIORAD) on real-time PCR machine (BIORAD). Relative quantification of genes will be normalized against GAPDH. The primers for target mRNA; pro-IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , NLRP3, AIM2 and NLRP1, will be used.

### **Quantification of cytokines by ELISA**

Supernatants of THP-1 cells or hMDM will be harvested. Human IL-1 $\beta$  and IL-8 (BD Biosciences) will be analyzed by ELISA according to the manufacturer's instructions.

#### **Generation of THP-1 cells expressing shRNA**

shRNA vectors against human NLRP3, ASC and their scramble vectors will be used. Lentiviruses expressing hairpins directed against these target genes will be produced by transfecting shRNA vectors and the second-generation packaging into 293T cells. The viral particles will be harvested 24 h later and infected into THP-1 cells. The positive clones will be selected using antibiotics. The silencing efficiency will be analyzed by real-time PCR and used for further studies.

### **Immunoblotting**

THP-1 cells will be pelleted and incubated in lysis buffer containing 50 mmol/L Tris (pH 7.5), 1% NP-40, 150 mmol/L NaCl, and protease inhibitor cocktail. After centrifugation,

the supernatants will be harvested and mixed with SDS loading buffer. The protein-loading buffer mixture will be then heated at 100°C for 10 min and separated on SDS-PAGE. The proteins will be then transferred onto nitrocellulose membranes and will be blocked with 5% bovine serum albumin in 1× TBS containing 0.05% Tween-20 and then probed with primary antibodies to mature IL-1 $\beta$ , NLRP3, ASC, caspase-1,  $\beta$ -actin. After incubation with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies, the immunoreactive bands will be visualized using ECL reagent (Amersham).

#### **In vitro *P. insidiosum* challenge**

The  $1 \times 10^5$  THP-1 cells scramble or NLRP3/ASC silenced hBMDM cells will be treated with *P. insidiosum*. The supernatants will be harvested 6 h later for determination of IL-1 $\beta$  and IL-8 concentration by ELISA (BD Biosciences). In some cases, supernatants or cell extracts will be collected for immunoblot analysis.  $1 \times 10^5$  hMDM (WT, NLRP3 KO and ASC KO) will be treated with PBS or *P. insidiosum* for 6 h and the culture supernatants will be harvested for IL-1 $\beta$  and IL-8 assay by ELISA (eBiosciences). The  $1 \times 10^6$  hMDM (WT, NLRP3 KO and ASC KO) will be treated with *P. insidiosum* for 6 h and the culture supernatants, cell pellets and cell lysates will be harvested to detect IL-1 $\beta$  and caspase-1 by Western blot.

#### **Statistical analysis**

Data will be analyzed for statistical significance by two-tailed student's t-test. A P-value of  $\leq 0.05$  will be considered as statistically significant.

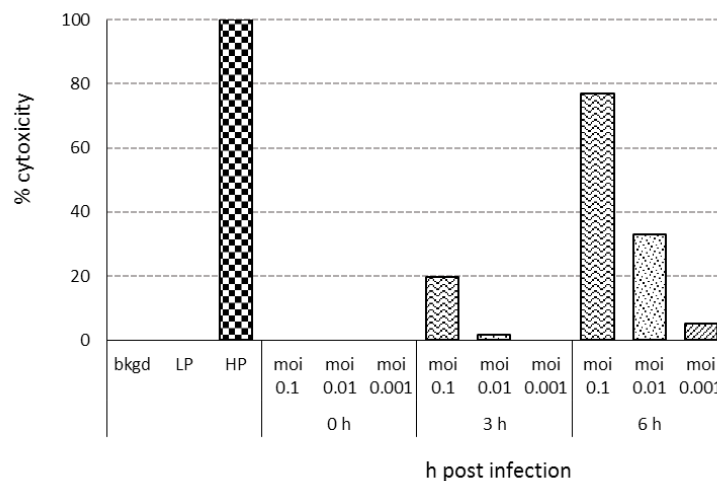
## ผลการทดลอง

### การเพาะเลี้ยงและการกระตุ้นให้เชื้อสร้าง zoospore

การเลี้ยงเชื้อ *P. insidiosum* จะเริ่มเลี้ยงในอาหารแข็ง sabouraud's dextrose agar (SDA) จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงใน 2% water agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2-3 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่โตในวันใสลงใน flask ที่มีน้ำและหญ้า *Axonopus compressus* ที่ปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน ใช้ pipet ดูดน้ำออก แล้วเติม induction media ลงไปแทน เพื่อให้เชื้อสร้าง zoospore โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8-10 ชม.

### การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกระตุ้นเซลล์

การทดสอบหา MOI และ ระยะเวลาที่เหมาะสม ในการกระตุ้นเซลล์ โดยใช้ MOI ของ zoospore ในการกระตุ้นเซลล์เท่ากับ 0.1, 0.01 และ 0.001 ในการ co-culture กับ เซลล์ THP-1 เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชม. แล้ววัดค่า cytotoxicity ดังรูปที่ 1

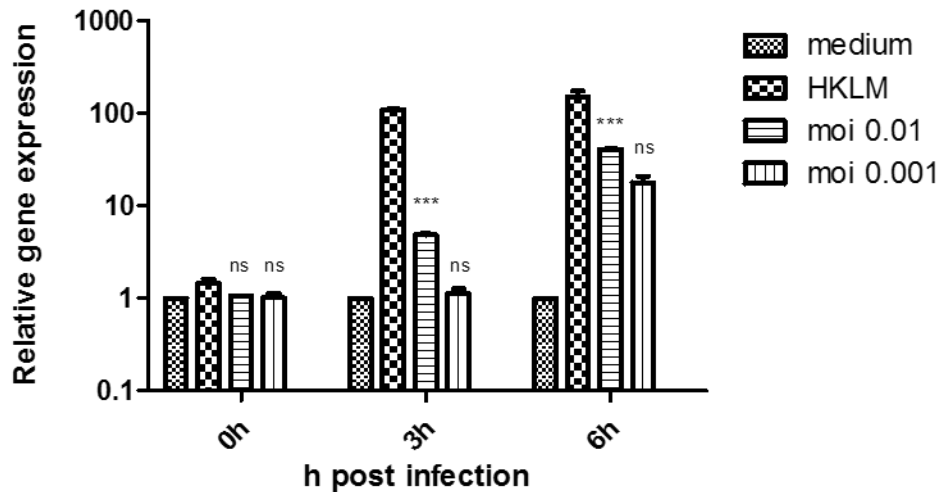


รูปที่ 1 การเกิด cytotoxicity ของ เซลล์ THP-1 ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรูปแบบของ zoospore ที่ MOI= 0.1, 0.01 และ 0.001 หลังจากการ co-culture เป็นเวลา 0 3 6 ชม. โดยผลการทดลองที่ได้มาจากการคำนวณทางสถิติจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (\*\* หมายถึง  $p < 0.01$  และ \*\*\* หมายถึง  $p < 0.001$ ); bkgd = background, LP = low positive control, hp = high positive control

ดังนั้น จากการทดลองนี้ พบว่า ที่ MOI 0.1 หลังจาก co-culture เป็นเวลา 6 ชม. มี %cytotoxicity สูงถึง 80% จึงไม่ใช้ MOI  $\geq 0.1$

นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์จากการวัด gene expression ของ *IL8* โดยใช้ MOI ของ zoospore ในการกระตุ้นเซลล์เท่ากับ 0.01 และ 0.001 ในการ co-culture กับ เซลล์ THP-1 เป็นเวลา 0, 3 และ 6 ชม.

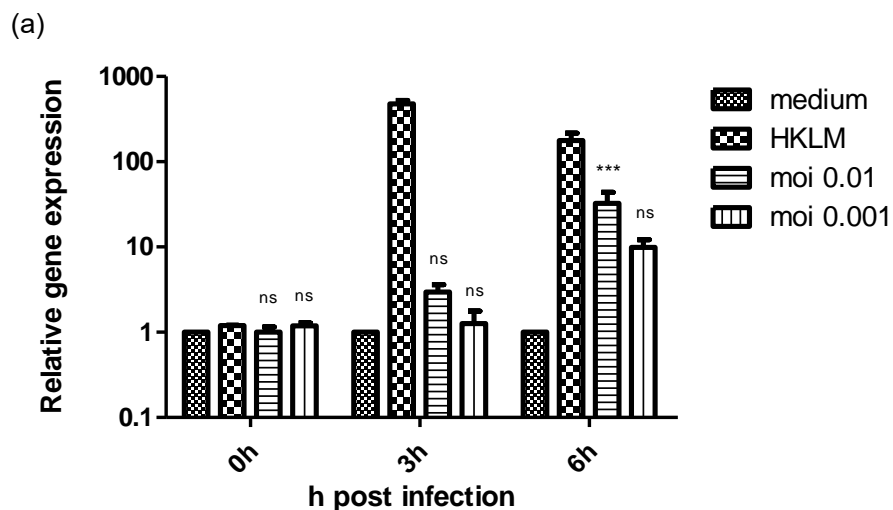
ดังนั้น ในการทดลองต่อไปนี้จึงจะเลือกใช้ MOI = 0.01

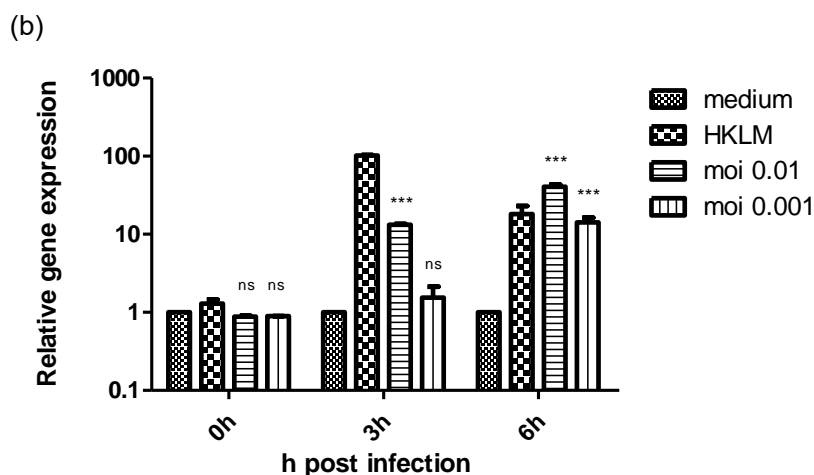


รูปที่ 2 การทดสอบตอบสนองของเซลล์ THP-1 ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรูปแบบของ zoospore ที่ MOI= 0.1 และ 0.01 โดยการวัด gene expression ของ *il8* ซึ่งผลการทดลองที่ได้มาจากการคำนวณทางสถิติจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (\*\*หมายถึง  $p < 0.01$  \*\*\* หมายถึง  $p < 0.001$  และ ns (no significant difference) คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ negative control)

#### การตรวจสอบการแสดงออกของ gene โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR

เซลล์ที่ย่อยสลายด้วย lysis buffer จะถูกนำมาสกัด RNA จากนั้นจะทำการสร้าง cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase แล้วตรวจการแสดงออกของ gene โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ gene *IL-* ด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่งผลการแสดงออกของยีน จะคำนวณให้อยู่ในค่าของ mean fold change เปรียบเทียบกันในแต่ละสภาวะ โดยใช้ GAPDH ซึ่งเป็น housekeeping gene สำหรับการทำให้ normalization การแสดงออกของยีนในแต่ละสภาวะ





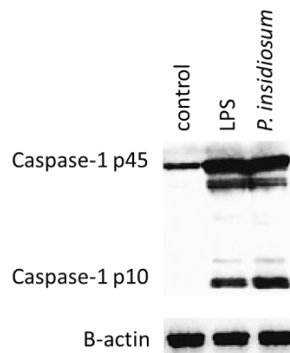
**รูปที่ 3** การทดสอบการตอบสนองของเซลล์ THP-1 ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรูปแบบของ zoospore ที่ MOI= 0.01 โดยการวัด gene expression ของ IL-1 $\beta$  (a) และ TNF- $\alpha$  (b) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ มาจากการคำนวณทางสถิติจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (\*\*หมายถึง  $p < 0.01$  \*\*\* หมายถึง  $p < 0.001$  และ ns (no significant difference) คือ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับ negative control)

ผลการศึกษาการตอบสนองของเซลล์ THP-1 ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรูปแบบของ zoospore เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อ *P. insidiosum* สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  มี gene expression สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รวมถึงจากการดู gene expression ของ NLRP3, ASC และ AIM2 พบว่าสูงขึ้นเมื่อ incubate เป็นเวลา 6 ชม. แม้จะในระดับที่ต่ำ โดยมี cycle threshold ที่  $32.36 \pm 1.16$ ,  $31.66 \pm 1.29$  และ  $33.09 \pm 1.06$  ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก unstimulated cell ทั้งนี้จะทำการทดสอบยืนยันต่อไปโดยใช้เทคนิค immunoblot

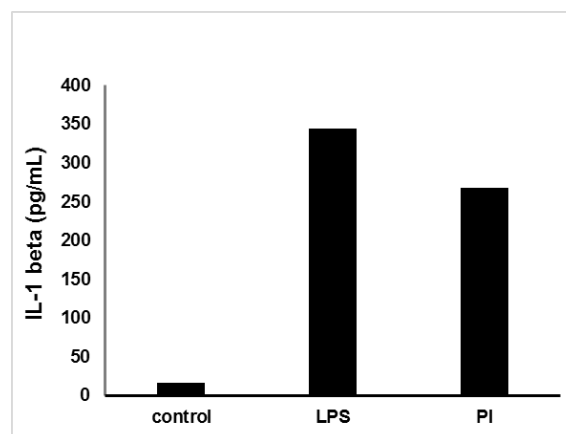
### การทดสอบเซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ทำให้เกิดการกระตุ้น caspase-1 และการสร้าง IL-1 $\beta$

เพื่อทดสอบว่า เชื้อ *P. insidiosum* สามารถกระตุ้นให้เซลล์ THP-1 สร้าง IL-1 $\beta$  ได้ จึงได้ทำการ incubate เชื้อ *P. insidiosum* กับเซลล์ THP-1 จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ (MOI 0.01) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึง เก็บ supernatant มาทำการวัด cytokines IL-1 $\beta$  ซึ่งเป็น product จากการถูกกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของ inflammasome complex โดยมี cell ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น negative control และเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS/ATP เป็น positive control จากนั้นจึงเก็บ supernatant มาทำการวัด IL-1 $\beta$  แล้วนำ pellet มาวิเคราะห์การกระตุ้น caspase-1

จากผลการทดลองพบว่า เซลล์ THP-1 ที่ไม่มีการกระตุ้น (negative control) จะสร้าง IL-1 $\beta$  ในระดับต่ำ ส่วนเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS/ATP และ เซลล์ที่ incubate เชื้อ *P. insidiosum* มีการสร้าง IL-1 $\beta$  ได้ในระดับที่สูงกว่า negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน caspase-1 ใน pellet ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธี Western blot ก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน คือ negative control จะมี caspase-1 ในระดับที่ต่ำ และการกระตุ้น caspase-1 ให้เป็น activated caspase-1 น้อยกว่า เซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS/ATP และ เซลล์ที่ incubate เชื้อ *P. insidiosum* จึงสรุปได้ว่าเชื้อ *P. insidiosum* สามารถกระตุ้นการหลั่ง IL-1 $\beta$  ได้ และทำให้มีการกระตุ้น caspase-1 ในเซลล์ human monocyte cell line THP-1 ได้



**รูปที่ 4** การทดสอบการกระตุ้น caspase-1 ให้เป็น activated form ของเซลล์ THP-1 โดยเชื้อ *P. insidiosum* ซึ่งได้ทำการ incubate เชื้อ *P. insidiosum* กับเซลล์ THP-1 จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ (MOI 0.01) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงนำ cell pellet มาวิเคราะห์การกระตุ้น caspase-1 โดยวิธี Western blot โดยมี cell ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น negative control และเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS เป็น positive control



**รูปที่ 5** การทดสอบการหลั่ง IL-1 $\beta$  ของเซลล์ THP-1 โดยเชื้อ *P. insidiosum* (PI) ซึ่งได้ทำการ incubate เชื้อ *P. insidiosum* กับเซลล์ THP-1 จำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ (MOI 0.01) เป็นเวลา 6

ชั่วโมง แล้วจึง เก็บ supernatant มาทำการวัด cytokines IL-1 $\beta$  ซึ่งเป็น product จากการถูกกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวของ inflammasome complex โดยมี cell ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น negative control และเซลล์ที่กระตุ้นด้วย LPS เป็น positive control

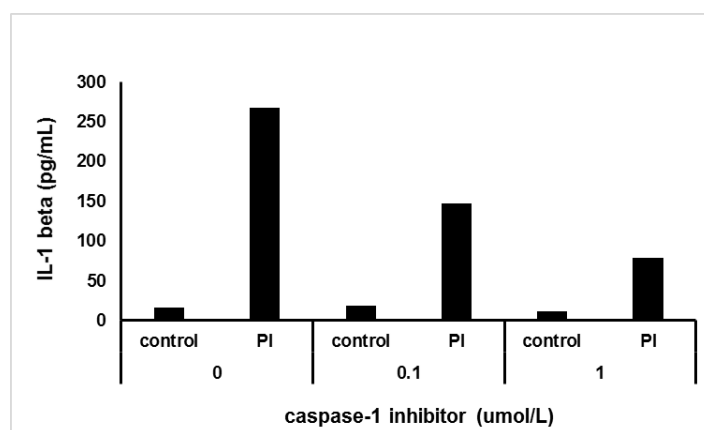
### การทดสอบการหลั่ง IL-1 $\beta$ ของเซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* ขึ้นกับการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1

เพื่อยืนยันว่าการหลั่ง IL-1 $\beta$  ของเซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* นั้น ขึ้นกับการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1

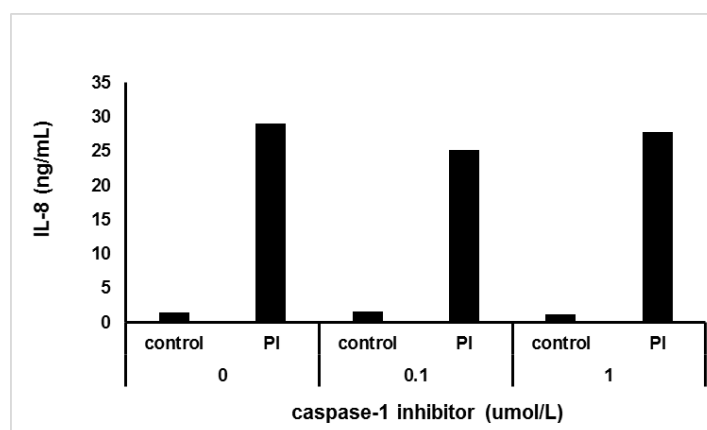
ในการทดลองนี้จึงได้ทำการ incubate เซลล์ THP-1 กับ caspase-1 inhibitor (AC-YVAD-CHO) โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1  $\mu\text{mol/L}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะ co-culture กับเชื้อ *P. insidiosum* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ supernatant มาทำการตรวจวัดปริมาณ IL-1 $\beta$  และ IL-8 โดยวิธี ELISA พบว่า เซลล์ที่ไม่มีการใส่ caspase-1 inhibitor และเมื่อใส่ caspase-1 inhibitor ในปริมาณที่สูงขึ้น พบว่าการสร้าง IL-1 $\beta$  ก็ลดลงตามไปด้วย ส่วนการหลั่ง IL-8 นั้น ไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะใส่ caspase-1 inhibitor หรือไม่ก็ตาม

การทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า การหลั่ง IL-1 $\beta$  ซึ่งกระตุ้นโดยเชื้อ *P. insidiosum* นั้น เป็นการกระตุ้นผ่านการกระตุ้น caspase-1

a.



b.

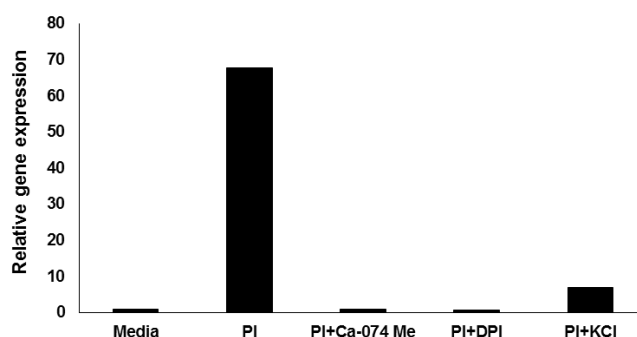


**รูปที่ 6** การทดสอบการหลั่ง IL-1 $\beta$  ของเซลล์ THP-1 โดยเชื้อ *P. insidiosum* (PI) เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ caspase-1 โดยใช้ caspase-1 inhibitor ซึ่งได้ทำการ incubate เซลล์ THP-1 กับ caspase-1 inhibitor (AC-YVAD-CHO) โดยใช้ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1  $\mu\text{mol/L}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะ co-culture กับเชื้อ *P. insidiosum* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ supernatant มาทำการตรวจวัดปริมาณ IL-1 $\beta$  (a) และ IL-8 (b) โดยวิธี ELISA โดยมี cell ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น negative control

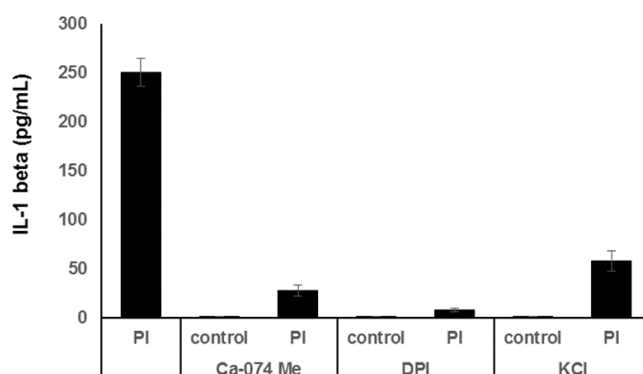
การศึกษาบทบาทของ **Lysosomal rupture, ROS production และ K<sup>+</sup> efflux** ในการกระตุ้นให้มีการทำงานของ **NLRP3** ในเซลล์ เซลล์ THP-1 ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum*

เพื่อศึกษาบทบาทของ signal 2 ของ การกระตุ้นการทำงานของ inflammasome มีบทบาทเมื่อมีการติดเชื้อ *P. insidiosum* หรือไม่ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการ incubate เซลล์ THP-1 กับ inhibitor ต่างๆ ของ signal 2 ได้แก่ CA-074 Me ยับยั้ง cathepsin B activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับ lysosomal rupture, Diphenyliodonium (DPI) ยับยั้ง การสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ Potassium chloride (KCl) ซึ่งยับยั้งการเกิด K<sup>+</sup> efflux โดยเพิ่มความเข้มข้นของ K<sup>+</sup> ภายนอกเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้น 100  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  และ 50  $\text{mmol/L}$  ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะ co-culture กับเชื้อ *P. insidiosum* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ pellet มาทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์จากการวัด gene expression ของ *IL1 $\beta$*  ส่วน supernatant นำมาทำการตรวจวัดปริมาณ IL-1 $\beta$  โดยวิธี ELISA พบว่า เซลล์ที่ไม่มีการใส่ inhibitor จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *IL1 $\beta$*  และ สร้างและหลั่ง IL-1 $\beta$  ได้ เมื่อใส่ inhibitor พบว่าการสร้าง IL-1 $\beta$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

a.



b.



รูปที่ 7 การทดสอบการหลั่ง IL-1 $\beta$  ของเซลล์ THP-1 โดยเชื้อ *P. insidiosum* (PI) เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ Lysosomal rupture, ROS production and K<sup>+</sup> efflux โดยใช้ inhibitor Ca-074-me, DPI และ KCl ตามลำดับ ซึ่งได้ทำการ incubate เซลล์ THP-1 กับ inhibitor โดยใช้ความเข้มข้น 100  $\mu$ mol/L, 100  $\mu$ mol/L และ 50 mmol/L ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะ co-culture กับเชื้อ *P. insidiosum* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำ pellet มาทำการทดสอบการตอบสนองของเซลล์จากการวัด gene expression ของ IL-1 $\beta$  (a) supernatant มาทำการตรวจวัดปริมาณ IL-1 $\beta$  โดยวิธี ELISA (b) โดยมี cell ที่ไม่มีการกระตุ้นเป็น negative control

ดังนั้น การทดลองที่ผ่านมาสรุปลงได้ว่า zoospore ของเชื้อ *P. insidiosum* สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  และ inflammasome components (NLRP3, AIM2 และ ASC) ใน เซลล์ THP-1 ได้ โดยจะทำการศึกษาในขั้นตอนต่างๆ ต่อไป โดยที่การกระตุ้นให้ IL-1 $\beta$  เป็น active form นั้น เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของ caspase-1 ซึ่งเป็นการกระตุ้นผ่านการทำงานของ inflammasome complex นอกจากนี้ การกระตุ้น signal 2 ของกลไกการกระตุ้น inflammasome ก็มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการทำงานดังกล่าว ผ่าน NLRP3

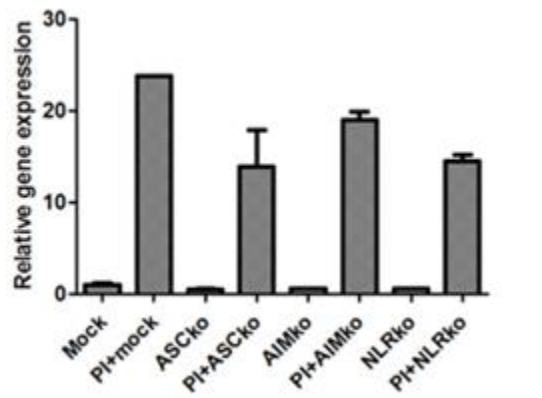
**การทดสอบเพื่อยืนยันว่าเชื้อ *P. insidiosum* สามารถกระตุ้น inflammasome NLRP3 ในเซลล์ hBMDM ให้มีการสร้าง IL-1 $\beta$**

เพื่อทดสอบ ว่า *P. insidiosum* สามารถกระตุ้น inflammasome ใน human monocyte derived macrophage (hBMDM) ที่ทำการ knock out ยีน NLRP3, ASC หรือ AIM2 โดยทำการ co-culture กับเชื้อ *P. insidiosum* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงวัดการแสดงออกของยีน IL1 $\beta$  ผลการทดลองพบว่า สำหรับเซลล์ hBMDM WT ที่ incubate กับ PBS จะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบอ้างอิงในการทดลองนี้ ส่วน WT ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  เท่ากับ 25 เท่าเมื่อเทียบกับ hBMDM WT ที่ incubate กับ PBS ส่วน hBMDM ที่ได้ทำ NLRP3 knock out ที่ incubate กับ PBS มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  <1 เท่า ส่วนกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ลดลงเป็นประมาณ 15 เท่า เมื่อเทียบกับ hBMDM

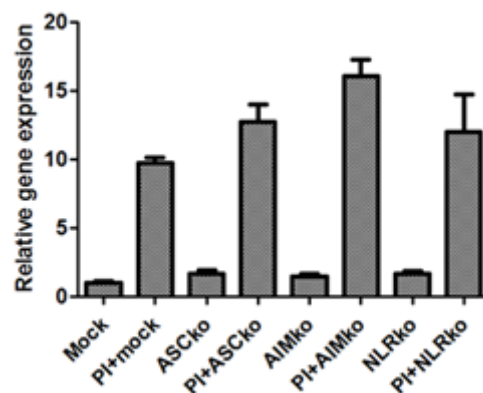
WT ที่ incubate กับ PBS ส่วน hBMDM ที่ได้ทำ ASC knock out ที่ incubate กับ PBS มีการแสดงออกของยีน IL1 $\beta$  <1 เท่า ส่วนกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ลดลงเป็นประมาณ 15 เท่า เมื่อเทียบกับ hBMDM WT ที่ incubate กับ PBS รวมถึง hBMDM ที่ได้ทำ AIM2 knock out ที่ incubate กับ PBS มีการแสดงออกของยีน IL1 $\beta$  <1 เท่า ส่วนกระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum* มีการแสดงออกของยีน IL1 $\beta$  ประมาณ 19 เท่า เมื่อเทียบกับ hBMDM WT ที่ incubate กับ PBS ซึ่งเซลล์ที่ทำการ knock out ยีน NLRP3, ASC หรือ AIM2 สร้าง IL-1 $\beta$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ hBMDM WT ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum*

ดังนั้น เชื้อ *P. insidiosum* สามารถ กระตุ้น hBMDM ให้สร้าง IL-1 $\beta$  ผ่านการกระตุ้น inflammasome NLRP3

a.



b.



**รูปที่ 8** เชื้อ *P. insidiosum* สามารถ กระตุ้น hBMDM ให้สร้าง IL-1 $\beta$  ผ่านการกระตุ้น inflammasome NLRP3 โดยทำการ co-culture เชื้อ *P. insidiosum* กับเซลล์ hBMDM WT,

NLRP3 knock out, ASC knock out และ AIM2 knock out เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้ววัดการ  
แสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  (a) และ IL-8 (b)

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

เชื้อราหลายชนิดสามารถก่อโรคได้ โดยขึ้นกับภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายของผู้ติดเชื้อ โดยมีการวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าเชื้อ *Candida albicans* และ *Aspergillus fumigatus* สามารถกระตุ้น NLRP3 inflammasome และนำไปสู่การสร้างและหลั่ง IL-1 $\beta$  ในเซลล์ของหนูและของคน ในการศึกษาได้วิเคราะห์การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของต่อเชื้อรา *P. insidiosum* ซึ่งพบว่าเชื้อ *P. insidiosum* กระตุ้นให้เกิดการทำงานของ caspase-1 และ IL-1 $\beta$  ของ monocytes ของคน มีผลการวิจัยที่พบว่าเชื้อก่อโรคหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome แต่กลไกในการกระตุ้นภายในเซลล์นั้นแตกต่างกันไป เช่น lysosome rupture การสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ K<sup>+</sup> efflux ซึ่งข้อมูลในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าทั้ง การทำงานของ Cathepsin B activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับ lysosome rupture การสร้าง ROS และ K<sup>+</sup> efflux มีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นการทำงานของ NLRP3 inflammasome โดย *P. insidiosum* เนื่องจากเมื่อยับยั้งกระบวนการเหล่านี้ ทำให้การหลั่ง IL-1 $\beta$  ลดลง เช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งพบว่าใน macrophages ของหนูนั้น NLRP3 inflammasome ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งการสร้าง ROS เช่น DPI ทำให้การหลั่ง IL-1 $\beta$  ลดลง เนื่องจากการยับยั้งกลไกการทำงานของ NLRP3 inflammasome

NLRP3 inflammasome สามารถถูกกระตุ้นได้โดยตัวกระตุ้นหลายชนิด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวกระตุ้นเหล่านี้ไม่ได้กระตุ้น inflammasome โดยตรงแต่กระตุ้นโมเลกุลที่อยู่ในส่วนที่เป็น upstream ภายในเซลล์ เช่น TLR2 TLR4 dectin1 dectin2 และ mincle เป็นต้น ซึ่งมีบทบาทในการจดจำเชื้อราก่อโรคแล้วจึงส่งสัญญาณต่อมายัง NLRP3 inflammasome แล้วจึงกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokine ซึ่งในเชื้อรา  $\beta$ -glucan นับเป็นส่วนประกอบสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ innate immunity

ในการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่า การตอบสนองของเซลล์ THP-1 ซึ่งเป็น monocyte cell line ต่อเชื้อ *P. insidiosum* ในรูปแบบของ zoospore สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-1 $\beta$  ให้มี gene expression สูงขึ้น และยังกระตุ้น caspase-1 ได้ด้วย ซึ่ง caspase-1 จะทำให้เกิดการทำให้ IL-1 $\beta$  เปลี่ยนเป็น active form และหลั่งออกนอกเซลล์ได้ จึงได้ทำการทดสอบยืนยันโดยใช้ caspase-1 inhibitor และเมื่อใส่ caspase-1 inhibitor ในปริมาณที่สูงขึ้น พบว่าการสร้าง IL-1 $\beta$  ก็ลดลงตามไปด้วย ส่วนการหลั่ง IL-8 นั้น ไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าจะใส่ caspase-1 inhibitor หรือไม่ก็ตาม หมายถึง การหลั่ง IL-1 $\beta$  ซึ่งกระตุ้นโดยเชื้อ *P. insidiosum* นั้น เป็นการกระตุ้นผ่านการกระตุ้น caspase-1 นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาความเกี่ยวข้องของ signal 2 ซึ่งได้ทำการ incubate เซลล์ THP-1 กับ inhibitor ต่างๆ ของ signal 2 ได้แก่ CA-074 Me ยับยั้ง cathepsin B activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับ lysosomal rupture, Diphenyliodonium (DPI) ยับยั้งการสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ Potassium chloride (KCl) ซึ่งยับยั้งการเกิด K<sup>+</sup> efflux โดยเพิ่มความเข้มข้นของ K<sup>+</sup> ภายนอกเซลล์ พบว่าเมื่อใส่ inhibitor การสร้าง IL-1 $\beta$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อศึกษายืนยันเพิ่มเติม โดยใช้เซลล์ human monocyte derived macrophage (hBMDCs) ที่ทำการ knock out ยีน NLRP3, ASC หรือ AIM2 มา co-

culture กับเชื้อ *P. insidiosum* ก็พบว่าเซลล์ที่ทำการ knock out ยีน NLRP3, ASC หรือ AIM2 สร้าง IL-1 $\beta$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ hBMDCs WT ที่กระตุ้นด้วยเชื้อ *P. insidiosum*

ข้อมูลทั้งหมดในการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า NLRP3 inflammasome เป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ *P. insidiosum* และการยับยั้งการกระตุ้นผ่าน NLRP3 inflammasome อาจเป็นหนึ่งในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้

**ภาคผนวก**

-ไม่มี-

**Output** จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ  
Wongprompitak, P.<sup>1\*</sup>, Intasin, N.<sup>1</sup>, Ekpo, P.<sup>1</sup>, Pattanapanyasat, K.<sup>2</sup> Induction of Inflammasome in innate response to *Pythium insidiosum* by phagocytic cells (In prep)  
จะส่ง submit ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
  - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้ โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
  - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
  - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง) สามารถต่อยอดสร้างเครือข่ายงานวิจัยโรคติดต่อเขตร้อน โดยเป็นเครือข่ายวิจัยภายใน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
  - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่) สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาค้นคว้าทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *P. insidiosum* ต่อไป ซึ่งจะเป็นโครงการวิจัยในอนาคตต่อไป
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)  
Wongprompitak, P, Intasin, N, Ekpo, P, Pattanapanyasat, K. Induction of Inflammasome in innate response to *Pythium insidiosum* by phagocytic cells.การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15 วันที่ 6-8 มกราคม 2559 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอ่า บีช รีสอร์ท จังหวัดเพชรบุรี