Abstract

A human severe infectious disease with high mortality rate in many Tropical countries, melioidosis, is caused by highly versatile pathogen *Burkholderia pseudomallei*. The function of the *B. pseudomallei* sigma S (RpoS) transcription factor in survival during stationary growth phase and conditions of oxidative stress is well documented. Besides *rpoS*, bioinformatics analysis of *B. pseudomallei* genome showed the existence of two *rpoN* genes, *rpoN1* and *rpoN2*. To access the function of RpoN, both *rpoN1* and *rpoN2* were inactivated, unfortunately only the *rpoN2* mutant (Δ*rpoN2*) strain was successfully constructed and characterized. In this study the functions of the *rpoN2* were analyzed for bacteria survival via biofilm formation and pathogenesis of bacterial intracellular survival via Multinucleated Giant Cell (MNGC) formation. The involvement of *B. pseudomallei* RpoS and RpoN2 in invasion, intracellular survival leading to the reduction in Multinucleated Giant Cell (MNGC) formation of RAW264.7 cell line was illustrated. Our result also demonstrated that MNGC formation in RAW264.7 cell line depended on a certain number of intracellular bacteria (at least 10^4) and that both RpoS and RpoN2 are not directly involved in MNGC formation judging by the same 15% MNGC formation observed in RAW264.7 cells infected with either *B. pseudomallei* wild type MOI 2 or RpoN2 mutant (Δ*rpoN2*) MOI 10 or RpoS mutant (Δ*rpoS*) MOI 100. Moreover, the role of *B. pseudomallei* RpoS and RpoN2 in regulation of biofilm formation was studied. The biofilm formation is believed to be one of the possible relapse causes because of the ability to increase drug resistance. Extracellular polymeric substance (EPS) in biofilm has been reported to be related to limitation of antibiotic penetration in *B. pseudomallei*. However, the mechanisms through which that biofilm creates a restricting diffusion to antibiotics remains unclear. The result of CLSM revealed a reduction of the exopolysccharide production and disability of the micro-colony formation in *B. pseudomallei* mutants, which paralleled the antibiotic resistance. Different ratios of carbohydrate contents in exopolysaccharide of the mutants was detected, although they had the same components; glucose, galactose, mannose, and rhamnose with no detectable peak found in *bps*I mutant. These results indicated that the correlation between these phenomenal in *B. pseudomallei* biofilm at least resulted from exopolysaccharide which may have been under the regulation of *rpo*N2 or *rpo*S genes.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, Biofilm formation, Multinucleated Giant Cell (MNGC) formation, Sigma N2 factor (*rpo*N2), Sigma S factor (*rpo*S)

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียอันเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดสิส โรคติดเชื้อในมนุษย์ที่ร้ายแรง ระบาดในประเทศเขตร้อน หน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในสภาวะแบคทีเรียเจริญเต็มที่ หรือเครียดจากออกซิเดทีฟ และการขาดอาหารอยู่ภายใต้การควบคุมด้วยซิกม่าเอส ขณะที่ข้อมูลสารสนเทศทางยีโนมของแบคทีเรียดังกล่าวนี้พบว่ามียีนกลุ่มซิกม่าเอ็น และพบรหัสของยีนซิกม่าเอ็นใน 2 โครโมโซม เรียกว่า เอ็น1 และ เอ็น2 ทั้งนี้ซิกม่าเอ็นที่พบนี้ยังไม่มีการศึกษาบทบาทหน้าการควบคุมการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้มาก่อน การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาบทบาทหน้าที่ของซิกม่าเอ็นเทียบกับซิกม่าเอส โดยการสร้างแบคทีเรียที่เกิดการผ่าเหล่าของยีนซิกม่าอ็น1 และเอ็น2 แต่เนื่องจากสามารถสร้างแบคทีเรียที่ผ่าเหล่าได้เฉพาะยีนเอ็น2 เท่านั้น ในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนซิกม่าเอ็น2 เทียบกับซิกม่เอสในการอยู่รอดของแบคทีเรียที่ภาวการณ์สร้างไบโอฟิล์ม และการที่แบคทีเรียอยู่รอดภายในเซลล์เจ้าบ้านที่ก่อเกิดพยาธิสภาพการหลอมรวมตัวของเซลล์เจ้าบ้าน ผลจากการศึกษาการหลอมรวมตัวของเซลล์เจ้าบ้านพบว่าซิกม่าเอส และซิกม่าเอ็น2 เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเจาะเข้าเซลล์เจ้าบ้านส่งผลให้จำนวนเชื้อที่เข้าเซลล์เจ้าได้รับลดประสิทธิภาพเมื่อแบคทีเรียขาดยีนทั้งซิกม่าเอสและเอ็น2 แต่เมื่อเพิ่มจำนวนแบคทีเรียให้มีจำนวนเชื้อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้เพิ่มขึ้นจนมีจำนวนแบคทีเรียในระดับ 10^4 แบคทีเรียต่อ 1 เซลล์เจ้าบ้าน พบว่าปรากฏการณ์การหลอมรวมตัวของเซลล์เจ้าบ้านมีจำนวนและคุณลักษณ์เหมือนกันของแบคทีเรียปกติ เทียบกับแบคทีเรียที่ผ่าเหล่าซิกม่าเอส และซิกม่าเอ็น2 แสดงว่าปรากฏการณ์หลอมรวมตัวของเซลล์เจ้าบ้าน ไม่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ซิกม่าเอสและเอ็น2 โดยตรง นอกจากนี้การศึกษาบทบาทหน้าที่ของซิกม่าเอสและเอ็น2 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม พบว่าการขาดยีนซิกม่าเอสและเอ็น2 มีผลต่อโครงสร้างของไบโอฟิล์ม ที่กระทบต่อสัดส่วนของคาร์โบไฮเดรท ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส และแรมโนส โดยส่งผลต่อการดึงยาของเชื้อเมื่อเข้าสู่ภาวการณ์สร้างไบโอฟิล์ม

คำหลัก : เชื้อเมลิออยโดสิส**,** ไบโอฟิล์ม, การหลอมรวมตัวของเซลล์เจ้าบ้าน, ซิกม่า-เอส, ซิกม่า-เอ็น2