

**CHARACTERIZATION OF THE GENE HOMOLOGOUS OF
RPOS IN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI***

BENCHAMAS SUBSIN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2003

ISBN 974-04-3269-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษายีน *rpoS* ในเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei*
(CHARACTERIZATION OF THE GENE HOMOLOGOUS OF *RPOS* IN
BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI)

เบ็ญจมาศ ทรัพย์สิน 4238014 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุมาลี ตั้งประดับกุล Ph.D., มงคล คุณากร M.D.,
ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D., GERD KATZENMEIER Ph.D.

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคเมลิออยด์โดซิส ในการศึกษานี้ได้ทำการวิจัยความสามารถในการทนอยู่ในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และความสามารถในการหลบอาศัยอยู่ภายในเซลล์เป็นเวลานาน (dormancy) ในเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นมียีน *rpoS* เป็นตัวควบคุมความสามารถเหล่านี้ ดังนั้นยีนที่มี homologous ต่อยีน *rpoS* ในเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ถูกนำมา clone และวิเคราะห์ลำดับของยีน พบว่าลำดับกรดอะมิโน RpoS ในเชื้อ *B. pseudomallei* นี้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโน RpoS ในเชื้อ *B. cepacia* 93% และ *R. solanacearum* 67% และพบยีนที่มีลำดับเบส homologous ต่อยีน *nlpD* อยู่ทางด้านปลาย -5' ของยีน *rpoS* เช่นเดียวกับที่พบในเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เพื่อที่จะทำการศึกษาหน้าที่ความสำคัญของยีน *rpoS* ในเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ยีน *rpoS* ได้ถูกทำ mutation เพื่อสร้างเชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei rpoS mutant* และใช้ทำการศึกษาหน้าที่การตอบสนองต่อสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์แม่ พบว่า *rpoS mutant* ทนต่อสภาวะที่มี carbon น้อย และ oxidative สูงได้น้อยกว่าสายพันธุ์แม่ และพบว่า *rpoS mutant* จะทนต่อสภาพความเป็นกรดแตกต่างจากสายพันธุ์แม่ได้เล็กน้อย *rpoS mutant* กับสายพันธุ์ปกติไม่มีความแตกต่างระหว่างในการตอบสนองต่อสภาวะ heat shock, สภาวะ hyperosmolarity, haemolytic, proteolytic, และ motility activity และไม่พบความแตกต่างอย่างชัดเจนในการสร้าง biofilm, siderophores และ invasion ใน culture cell lines เพื่อทำการศึกษา expression ของยีน *rpoS* เชื้อแบคทีเรีย *B. pseudomallei rpoSp-lacZ* transcriptional และ translational fusions ได้ถูกสร้างขึ้น พบว่า expression ของยีน *rpoS* อยู่ภายใต้การควบคุมในระดับ transcription ตามช่วงระยะเวลาของการเจริญเติบโต

CHARACTERIZATION OF THE GENE HOMOLOGOUS OF *RPOS* IN
BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

BENCHAMAS SUBSIN 4238014 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: SUMALEE TUNGPRADABKUL Ph.D., MONGKOL
KUNAKORN M. D., PRAPON WILAIRAT Ph.D., GERD KATZENMEIER Ph.D.

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. Its ability to survive environmental stress conditions and intracellularly for long periods (dormancy) remains to be elucidated. The *rpoS* gene has been shown to be important for survival during environmental stress in several other bacterial species. In this study, the gene homologous to *rpoS* in *B. pseudomallei* has been cloned and the nucleotide sequence was determined. The sequence showed 93% amino acid identity to *B. cepacia* and 67% to *R. solanacearum*. An *nlpD*-like gene was found upstream and in the same orientation of *rpoS*, as in many other species of bacteria. To study the role of *rpoS* in *B. pseudomallei*, we constructed an *rpoS* mutant and analyzed its response to various environmental stresses in comparison with the parent strain. The mutant was more sensitive to carbon starvation and oxidative stress than the parent strain. Slight difference was found in sensitivity to acid stress while no significant difference was found in their sensitivity to heat shock or increased osmolarity, nor in their motility, haemolytic and protease activity, production of siderophores, biofilm formation and their ability to invade culture cell lines. To study the expression of the *rpoS* gene, *rpoSp-lacZ* transcriptional and translational fusions were constructed. Our results showed that expression of *rpoS* is regulated at the transcriptional level according to the growth phase.

KEY WORDS: *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* / SIGMA S FACTOR

200 P. ISBN 974-04-3269-7