IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF QUORUM SENSING-LIKE GENES IN *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*

SAMERKHAE SOYLUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-5274-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพิสูจน์และวิเคราะห์บทบาทหน้าที่ของยีน QUORUM SENSING ในเชื้อ BURKHOLDERIA THAILANDENSIS (IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF QUORUM SENSING-LIKE GENES IN BURKHOLDERIA THAILANDENSIS)

เสมอแข สอยเหลือง 4436755 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D., วิไล หนุนภักดี, Ph.D.

บทคัดย่อ

แบคทีเรียชนิดแกรมลบจำนวนมากมีการสร้าง *N*-acyl homoserine lactone (AHL) เพื่อควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนจำเพาะโดยตอบสนองต่อความหนาแน่นของเซลล์ด้วยระบบ quorum sensing ระบบ quorum sensing ที่ใช้ AHL ประกอบไปด้วยยีนที่สร้างโปรตีนชนิด LuxI และยีนที่สร้างโปรตีนชนิด LuxR โปรตีนชนิด LuxI คือ AHL synthase ซึ่งสร้างสาร AHL ส่วนโปรตีนชนิด LuxR คือตัวควบคุมการถอดรหัสซึ่งตอบสนองต่อระดับของ AHL

Burkholderia thailandensis เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบและไม่ก่อให้เกิดโรคซึ่งมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเมลิออยโดสิสมาก การศึกษาเปรียบเทียบระบบ quorum sensing ของเชื้อทั้งสองจะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาถึงลักษณะที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ในการศึกษานี้ ระบบ quorum sensing ของเชื้อ *B. thailandensis* ได้ถูกศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับของเชื้อ *B. pseudomallei* การสร้าง AHL ถูกตรวจพบโดยพลาสมิด pSB401 *N*-hexanoyl homoserine lactone (HHL) และ *N*-octanoyl homoserine lactone (OHL) ถูกตรวจพบโดยการแยกสารสกัด AHL ด้วย TLC และ HPLC และพบว่าเชื้อ *B. thailandensis* สร้าง OHL มากกว่า HHL ยีน quorum sensing ถูกพิสูจน์โคลนและหาลำดับเบส พบว่า ยีน *bthI* ซึ่งมีขนาด 612 นิวคลีโอไทด์ อยู่ห่างจากยีน *bthR* ที่มีขนาด 720 นิวคลีโอไทด์อยู่ 735 คู่เบส ยีนทั้งสองมีการถอดรหัสออกจากกัน โปรตีน AHL synthase ของเชื้อ *B. thailandensis* เหมือนของเชื้อ *B. pseudomallei* 97% ขณะที่โปรตีนชนิด LuxR เหมือนกัน 98% การแสดงออกของยีน *bthI* ในเชื้อ *E. coli* สร้าง HHL และ OHL เมื่อวิเคราะห์โดย TLC และเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าปริมาณของ OHL ที่สร้างโดยยีน *bthI* มีมากกว่า HHL ระบบ quorum sensing ที่ควบคุมด้วย HHL กระตุ้นการแสดงออกของยีน extracellular protease ขณะที่ OHL ยับยั้งการแสดงออกของยีน extracellular protease จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า มีความคล้ายคลึงกันของระบบ quorum sensing ระหว่างเชื้อทั้งสองซึ่งต้องตรวจสอบต่อไปเพื่อที่จะเข้าใจในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pseudomallei*

113 หน้า ISBN 974-04-5274-4

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF
QUORUM SENSING-LIKE GENES IN BURKHOLDERIA THAILANDENSIS

SAMERKHAE SOYLUANG 4436755 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D.,
WILAI NOONPAKDEE, Ph.D.

ABSTRACT

Many gram-negative bacteria produce *N*-acyl homoserine lactone (AHL) to regulate the expression of specific genes in response to cell density via quorum sensing. AHL-mediated quorum sensing uses of two genes that code to LuxI- and LuxR-type proteins. LuxI-type protein is AHL synthase that synthesizes AHL signaling molecule. LuxR-type protein is transcription regulator that regulates the transcription of specific genes in response to the level of AHL.

Burkholderia thailandensis is a gram-negative and non-pathogenic bacterium that is closely related to *B. pseudomallei*, the causative agent of melioidosis. A comparison of the quorum sensing systems of both bacteria could lead to useful knowledge about the virulence factor of *B. pseudomallei*. In this study, quorum sensing system of *B. thailandensis* was identified and characterized for comparison with that of *B. pseudomallei*. The AHL production of *B. thailandensis* was investigated by using pSB401 biosensor. The AHL signaling molecules, *N*-hexanoyl homoserine lactone (HHL) and *N*-octanoyl homoserine lactone (OHL), were identified by C_{18} reverse phase TLC using *Chromobacterium violaceum* CV026 as the sensor, and C_{18} reverse phase HPLC using pSB401 biosensor. *B. thailandensis* produced OHL as the major AHL signaling molecule. *bthI* and *bthR* quorum sensing genes were identified, cloned and sequenced. *bthI* and *bthR* genes comprised 612 and 720 nucleotides, respectively. They were divergently transcribed with the intergenic region of 735 bp. AHL synthase of *B. thailandensis* exhibited 97% sequence identity to that of *B. pseudomallei*, whereas BthR transcription regulator exhibited 98% sequence identity to that of *B. pseudomallei*. *bthI* gene expression in *E. coli* produced HHL and OHL when analyzed by TLC and HPLC. The amount of OHL produced by *bthI* gene was higher than HHL. HHL-mediated quorum sensing activated extracellular protease gene expression, whereas OHL inhibited extracellular protease gene expression. In conclusion, there are large areas of similarity between quorum sensing systems of *B. thailandensis* and *B. pseudomallei*, which could be further investigated in order to understand the virulence of *B. pseudomallei* .

KEY WORDS: QUORUM SENSING / ACYL HOMOSERINE LACTONE /
BURKHOLDERIA THAILANDENSIS

113 pp. ISBN 974-04-5274-4