ALTERATION IN MULTINUCLEATED GIANT CELL FORMATION, INVASION AND PROTEOMIC PROFILE OF *Burkholderia pseudomallei* TYPE III SECRETION SYSTEM KNOCKOUT MUTANTS

VEERACHAT LAITONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเปลี่ยนแปลงการเกิด Multinucleated giant cell, การบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ และการแสดงออกของโปรตีน จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีนใน Type III Secretion System
(ALTERATION IN MULTINUCLEATED GIANT CELL FORMATION, INVASION AND PROTEOMIC PROFILE OF *Burkholderia pseudomallei* TYPE III SECRETION SYSTEM KNOCKOUT MUTANTS)

วีรฉัตร ลัยทอง 4737217 SIIM/M
วท.ม.(วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์, Ph.D., วิศิษฎ์ ทองบุญเกิด, พ.บ., ว.ว. (อายุรศาสตร์), ว.ว. (อายุรศาสตร์โรคไต), ศันสนีย์ น้อยสคราญ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นเชื้อแบคทีเรียกรัมลบก่อโรคชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้ออย่างรุนแรงในผู้ป่วยโรคเมลิออยโดซิส จากอัตราการตายของผู้ป่วยด้วยการติดเชื้อดังกล่าวผ่านทางการหายใจนั้นทำให้เกรงว่าเชื้อ *B. pseudomallei* จะถูกนำมาใช้เป็นอาวุธชีวภาพ Type III secretion system (T3SS) เป็น virulence factor ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่พบใน *B. pseudomallei* เช่นเดียวกับแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อจะศึกษาคุณลักษณะสำคัญของโปรตีนในส่วนที่เป็นโครงสร้างของ T3SS ที่มี ชื่อว่า "BsaQ" ที่มีผลต่อกระบวนการหลั่งโปรตีนอื่นจาก T3SS ตลอดจนการบุกรุกเข้าสู่โฮสต์ และความสามารถของเชื้อในการอยู่อาศัยได้ภายในโฮสต์เซลล์ โดยใช้เชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ชนิด *bsaQ* polar mutant เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการหลั่งโปรตีน translocator BipD ของเชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าวนั้นมีระดับลดลง และไม่สามารถหลั่งโปรตีน effector BopE ออกจากเซลล์แบคทีเรียมายังส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ เมื่อวัดความสามารถของแบคทีเรียในการบุกรุกเข้าไปยังเซลล์ epithelium พบว่าประสิทธิภาพดังกล่าวของเชื้อกลายพันธุ์นั้นลดลง อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ พยาธิสภาพสำคัญซึ่งเกิดขึ้นเฉพาะกับโฮสต์เซลล์ที่จับกินเชื้อ *B. pseudomallei* แล้วมีการกระตุ้นให้เซลล์หลายตัวมารวมกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่เรียกว่า "multinucleated giant cell (MNGC)" ของเชื้อกลายพันธุ์ข้างต้นนั้นลดต่ำลง จากผลการศึกษาด้วยเทคนิควิธี immunofluorescent โดยติดตามเชื้อด้วยการย้อม LPS ของ*B. pseudomallei* และย้อม LAMP-1 ซึ่งเป็น marker บน endocytic vesicle ภายในเซลล์ macrophage ด้วยสารเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal laser scanning พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่งโมง เชื้อกลายพันธุ์ดังกล่าวหลีกหนีออกจาก endocytic vesicle ได้ช้ากว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติ ข้อมูลที่ได้ศึกษาข้างต้นทำให้สรุปได้ว่าระดับความสามารถในการบุกรุกเข้าสู่โฮสต์เซลล์ที่ลดต่ำลง ตลอดจนการลดประสิทธิภาพในการอยู่อาศัยภายในโฮสต์เซลล์ของเชื้อกลายพันธุ์ชนิด *bsaQ* polar mutant น่าจะเป็นผลมาจากความผิดปกติต่อระดับการหลั่งโปรตีนชนิด effector และ translocator จาก T3SS

นอกจากนี้ ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ที่ใช้แยกวิเคราะห์โปรตีนจากเชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ชนิด *bipB* mutant เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของกลุ่มโปรตีนหลายชนิดด้วยกันประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่ลดการแสดงออก 42 ชนิด กลุ่มของโปรตีนที่เพิ่มการแสดงออก 19 ชนิด และโปรตีน อีก 3 ชนิดที่ไม่สามารถแสดงออกหลังสูญเสีย BipB translocon การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่ตรวจสอบได้จากการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่ยังมิได้มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงน่าจะเป็นตัวแทนของกลุ่มโปรตีนที่มีความสำคัญในแง่ของการก่อโรคจากเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งจะได้มีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไปในอนาคต ความรู้ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการนำไปสู่ความเข้าใจในกระบวนการหลั่งและส่งผ่านโปรตีนที่เป็น virulence factor จากตัวแบคทีเรียผ่าน T3SS ไปสู่โฮสต์ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญต่อการก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคเมลิออยโดซิสและเชื่อว่าการทำงานของระบบดังกล่าวน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีความร้ายแรง

119 หน้า.

ALTERATION IN MULTINUCLEATED GIANT CELL FORMATION, INVASION AND PROTEOMIC PROFILE OF *Burkholderia pseudomallei* TYPE III SECRETION SYSTEM KNOCKOUT MUTANTS

VEERACHAT LAITONG 4737217 SIIM/M
M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS: SUNEE KORBSRISATE (Ph.D.), VISITH THONGBOONKERD (M.D., Ph.D.), SANSANEE NOISAKARN (Ph.D.).

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is a pathogen that causes serious infections in melioidosis patients. Its aerosol infectivity and significant morbidity and mortality have led to fears that it will be used as a potential bioterrorism agent. Type III secretion systems (T3SSs) have been shown to be virulence factors in *B. pseudomallei* and many Gram-negative bacterial pathogens. In this study, a *B. pseudomallei* strain carrying polar mutation in *bsaQ* gene, disrupting structural component of Bsa T3SS, was constructed and examined for the ability to secrete proteins in Bsa T3SS and invade and survive within host cells. Mutation of *bsaQ* causes a profound effect on the secretion of BopE effector and BipD translocator protein into the culture supernatant, demonstrating the importance of BsaQ type III apparatus for protein secretion pathway. Comparisons of multinucleated giant cell (MNGC) formation and invasion of wild-type and *bsaQ* polar mutant in tissue culture assays indicated the defective of the mutant strain in MNGC formation and invasion. Intracellular localization of *B. pseudomallei* strains in the infected host cells relative to LAMP-1 (late endosome marker) containing vesicles revealed that more *bsaQ* mutant than wild-type was present within the endocytic vacuoles, suggesting that this mutant transited more slowly from the vacuoles of macrophages. Therefore, defective in MNGC induction of the *bsaQ* polar mutant may result from the delayed escape of the bacteria from the phagocytic vacuoles into host cytosol. The deficiencies in *B. pseudomallei* invasion and intracellular survival are believed to result from the inability of effector proteins secretion.

Although the role of BipB translocation apparatus protein was previously described for a role in the intracellular lifestyle of *B. pseudomallei*, its molecular and pathogenic mechanisms remain unclear. Using gel-based analysis whole cell extracts of wild-type and its *bipB* isogenic mutant, combined with MALDI-TOF MS/MS revealed several differential expressed proteins, including secreted/periplasmic proteins, oxidative, osmotic and other stress regulatory proteins, chaperons, transcriptional/translational regulators, biosynthetic enzymes, protease/peptidase, proteins involved in cell wall synthesis, fatty synthesis and other miscellaneous proteins. Of these proteins, forty-two were found to be down-regulated and nineteen proteins were found to be up-regulated, but in addition, three proteins were absolutely missing in the *bipB* mutant. The majority of differentially expressed proteins detected in this study was not previously reported to contribute to virulence and are candidates for more further detailed studies, representing potential new *B. pseudomallei* virulence determinant(s).

KEY WORDS: Type III Secretion System (T3SS) / *Burkholderia pseudomallei*
119 P.