

**COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION OF HUMAN  
MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS WITH  
VIRULENT *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND  
AVIRULENT *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS***



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY  
(MICROBIOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2008**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาเปรียบเทียบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง macrophages และ dendritic cells ของคน กับ  
จุลชีพก่อโรค *Burkholderia pseudomallei* และจุลชีพไม่ก่อโรค *Burkholderia thailandensis*

(COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION OF HUMAN MACROPHAGES AND  
DENDRITIC CELLS WITH VIRULENT *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND  
AVIRULENT *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*)

จารึก เจริญทรัพย์ 4536218 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สถิตย์ สิริสิงห, D.M.D., Ph.D.,

พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ, Ph.D., สาธิต พิษณุางกูร, Ph.D.

### บทคัดย่อ

melioidosis เป็นโรคติดเชื้อในเขตร้อนที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยในดินชื่อ *Burkholderia pseudomallei* โรคติดเชื้อนี้มีความรุนแรงมากเพราะสามารถทำให้เสียชีวิตได้รวดเร็วแต่ก็สามารถก่อให้เกิดภาวะทุพพลภาพยาวนานในการติดเชื้อแบบเรื้อรังได้เช่นกัน เมื่อไม่นานมานี้พบว่าเชื้อที่ใกล้ชิดมากทางพันธุกรรมกับเชื้อชนิดหนึ่งแต่กลับไม่มีความสามารถในการก่อโรคชื่อ *Burkholderia thailandensis*

ในส่วนแรกเป็นการศึกษาถึงบทบาทของ macrophages (Mφs) และ dendritic cells (DCs) ของมนุษย์ต่อพยาธิวิทยาการก่อโรคมะลิออยโดสิส ซึ่งได้ทำการศึกษาไปบนปฏิสัมพันธ์ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างเชื้อจุลชีพและเซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ การอยู่รอดของเชื้อภายในเซลล์เจ้าบ้านและการตอบสนองต่างๆของเซลล์เจ้าบ้านต่อเชื้อ ทั้งสองเป็นสำคัญ พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใน DCs แต่การอยู่รอดของเชื้อ *B. thailandensis* ถูกจำกัดได้อย่างมีนัยสำคัญภายใน Mφs อย่างไรก็ตามเมื่อกระตุ้น Mφs ก่อนการติดเชื้อด้วย IFN-γ พบว่าทำให้ Mφs สามารถฆ่าเชื้อ *B. pseudomallei* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในส่วนของการตอบสนองอื่นๆของเซลล์เจ้าบ้าน ได้แก่ การแสดงออกของ CD80, CD86 และ CD11b ที่ผิว Mφs และ CD83, CD86 และ CD40 ที่ผิว DCs การหลั่ง TNF-α และ IL-10 โดย Mφs และ IL-12p70 กับ IL-10 โดย DCs รวมทั้งชนิดของการพัฒนาของ T cells พบว่าการตอบสนองดังกล่าวทั้งหมดต่อเชื้อทั้งสองไม่แตกต่างกัน ผลของการศึกษานี้แนะว่า การตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านทั้งสองดังกล่าวไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการการก่อโรคโดยตรง หากแต่ น่าจะเป็นความสามารถของเชื้อ *B. pseudomallei* เองที่สามารถหลบหลีกกลไกการฆ่าเชื้อโดย Mφs ได้

ในส่วนที่สองเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อตระกูล *Burkholderia* กับตัวรับ DC-SIGN บนผิว DCs อันสืบเนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่าจุลชีพก่อโรคเรื้อรังอื่นบางอย่างมีคาร์โบไฮเดรตที่ทำให้มันสามารถมุ่งเป้าไปที่ DC-SIGN อันเป็นประโยชน์ต่อการก่อโรคของเชื้อนั้นได้ ในการศึกษาเบื้องต้นด้วยการใช้โมเลกุล DC-SIGN-Fc พบว่าเชื้อในกลุ่ม *Burkholderia* ทั้งหมดไม่สามารถจับกับ DC-SIGN ได้ ยกเว้นสายพันธุ์มิวแทนท์หนึ่งที่มีความบกพร่องในการแสดงออกของ type II O-polysaccharide ของ LPS ซึ่งการจับกับตัวรับ DC-SIGN ของเชื้อมิวแทนท์นี้อาจมีส่วนทำให้ กดการตอบสนอง IL-12p70 และ IL-10 ของ DCs อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ wild type ในการตอบสนองของ T-helper cells กลับพบว่าไม่ต่างกัน ผลการศึกษาส่วนนี้แสดงว่าการกระตุ้น DCs ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่ผ่านการจับกับตัวรับ DC-SIGN แต่ในทางตรงกันข้าม มีความเป็นไปได้ว่าการจับกับ DC-SIGN โดยเชื้อมิวแทนท์ดังกล่าวซึ่งมีคุณสมบัติของ DC-SIGN positive binding นั้น อาจมีส่วนทำให้การตอบสนองของ DCs ลดลงได้

169 หน้า

COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION OF HUMAN MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS WITH VIRULENT *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND AVIRULENT *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*

JARUEK CHAROENSAP 4536218 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: STITAYA SIRISINHA, D.M.D., Ph.D.,  
PONGSAK UTAISINCHAROEN, Ph.D., SATHIT PICHYANGKUL, Ph.D.

**ABSTRACT**

Melioidosis is a serious infectious disease caused by a gram-negative soil-saprophyte *Burkholderia pseudomallei*. The infection can be fatal in its septicemic form or persist as a chronic infection. *Burkholderia thailandensis* is an avirulent organism that is closely related to *B. pseudomallei*. In this thesis, a comparative study using these two species was undertaken.

In the first part of the study, the roles of human macrophages and dendritic cells (DCs) were investigated *in vitro* for their association in disease pathogenesis. Intracellular growth of bacteria and host responses to virulent *B. pseudomallei* and avirulent *B. thailandensis* were analyzed. The results showed that while both bacteria could similarly multiply inside the DCs, the intracellular growth of *B. thailandensis*, but not *B. pseudomallei*, was significantly suppressed in the macrophages. When the macrophages were preactivated with IFN- $\gamma$ , a protein that protects against infection in animals, they acquired a strong suppressive effect against the *B. pseudomallei* growth. However, responses of both macrophages and DCs to these 2 bacterial species in terms of upregulating surface marker expressions (CD80, CD86, and CD11b for macrophages; CD83, CD86, and CD40 for DCs), cytokine productions (TNF- $\alpha$  and IL-10 for macrophages; IL-12p70 and IL-10 for DCs) and DC-driven T cell differentiation were similar. The information suggests that human macrophage and DC responses according to these parameters are most likely not involved in the disease pathogenesis, but it is probably associated with the ability of *B. pseudomallei* to evade killing by professional phagocytes such as macrophages.

In the second part, the possible involvement of DC-SIGN, a C-type lectin receptor expressed largely by DC, in melioidosis was investigated. The rationale for investigation was that some human pathogens can subvert DCs for their own advantage, i.e. utilizing their carbohydrate to target DC-SIGN. The initial screening for DC-SIGN binding ability by an assay method using DC-SIGN-Fc chimeric protein in an ELISA-like system showed that all *Burkholderia* tested failed to react with DC-SIGN. However, in contrast to the wild type strain, the LPS mutant lacking type II O-polysaccharide component bound strongly to DC-SIGN. Although the mutant could readily activate DCs, it induced significantly lower levels of IL-12p70 and IL-10 production than its wild type counterpart. By contrast, the wild type and the mutant were indistinguishable from one another in Th1-Th2 differentiation. The results suggest that DC activation by *B. pseudomallei* does not require DC-SIGN interaction, and the DC-SIGN binding of LPS mutant may have a suppressive effect on DC cytokine production.

KEY WORDS: *Burkholderia. pseudomallei/ Burkholderia thailandensis/* DENDRITIC CELLS/ MACROPHAGES/ DC-SIGN

169 pp.