POSSIBLE ROLE OF CAPSULE, LIPOPOLYSACCHARIDE AND FLAGELLA IN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* PATHOGENICITY USING PHAGOCYTIC AND NONPHAGOCYTIC CELLS

CHANTHIWA WIKRAIPHAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

POSSIBLE ROLE OF CAPSULE, LIPOPOLYSACCHARIDE AND FLAGELLA IN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* PATHOGENICITY USING PHAGOCYTIC AND NONPHAGOCYTIC CELLS

CHANTHIWA WIKRAIPHAT 4736173 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: STITAYA SIRISINHA, D.M.D, Ph.D., PONGSAK UTAISINCHAROEN, Ph.D., NARISARA CHANTRATITA, Ph.D.

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei is one of the most serious invasive bacteria which is a causative agent of melioidosis. The bacteria can remain latent in the body for a long period and also possess the mechanisms to survive inside the cell and evade immune response of the host. Some virulence determinants of *B. pseudomallei* have been identified, but the mechanisms in pathogenesis of melioidosis have not been fully elucidated.

This study aimed to determine the possible involvement of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide (LPS) and flagella of *B. pseudomallei* as virulence factors involved in the pathogenesis of melioidosis using an *in vitro* cell-free system, human lung epithelial cell line (A549), mouse macrophage cell line (RAW 264.7) and primary human polymorphonuclear cells (PMNs) as models. *B. pseudomallei* deficient in capsule, LPS, and flagella were tested for susceptibility to different antimicrobial compounds. The wild type and all mutants were resistant to killing by α-defensin (HNP-2). Only the LPS mutant was susceptible to killing by incubating it with 30% normal human serum (NHS). All strains were killed by nitric oxide (NO)-generating compounds and hydrogen peroxide (H_2O_2) but the levels of susceptibility were quite different. The LPS and flagellin mutants were slightly more resistant to reactive nitrogen intermediate (RNI)-killing than the wild type, but the LPS mutant was more sensitive to reactive oxygen species (ROS) killing. All bacterial strains were also assessed for adherence, invasion and survival in A549, RAW 264.7 and PMNs using different multiplicities of infection (MOI) and time intervals. The adherence and invasion into A549 of the LPS and flagellin mutants, but not the capsule mutant, were significantly lower than the wild type. The adherence and invasion of the flagellin mutant could be increased by centrifugation. The wild type of *B. pseudomallei* and all mutants were able to survive and multiply inside A549 and RAW 264.7 cells but all of them were killed by PMNs. LPS and flagellin mutants also induced lower degrees of multinucleated giant cell (MNGC) formation and IL-8 production compared to the wild type, but these degrees were not different from the wild type and capsule mutant after increasing the MOI of LPS and flagelin mutants. The LPS mutant, compared to the other strains, was able to induce IL-1β, IL-6, IL-10 and IL-12 expression by RAW 264.7, but its ability to induce TNF-α and IL-8 productions by PMNs were lower. All strains were able to induce ROS response by PMNs. Inhibiting NADPH oxidase enhanced survival of all *B. pseudomallei* strains indicating that oxidative killing activity of NADPH oxidase by PMNs is effective against *B. pseudomallei*. Data from this study provided additional information about some virulence determinants of *B. pseudomallei* that are probably involved in the pathogenesis of melioidosis.

KEY WORDS: *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* / MELIOIDOSIS / CAPSULE / LIPOPOLYSACCHARIDE / FLAGELLA

138 pages

Copyright by Mahidol University

บทบาทของแคปซูล ลิโพโพลีแซกคาไรด์ และแฟลกเจลลา ในการก่อโรคของเชื้อ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ในเซลล์ฟาโกไซต์และนอนฟาโกไซต์

POSSIBLE ROLE OF CAPSULE, LIPOPOLYSACCHARIDE AND FLAGELLA IN *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* PATHOGENICITY USING PHAGOCYTIC AND NONPHAGOCYTIC CELLS

จันทร์ทิวา วิกรัยพัฒน์ 4736173 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สถิตย์ สิริสิงห, D.M.D, Ph.D., พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ, Ph.D., นริศรา จันทราทิตย์, ปร.ด.

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อบุกรุกที่เป็นปัญหาสำคัญชนิดหนึ่ง เป็นสาเหตุของโรคเมลิ-ออยโดสิส เชื้อแบคทีเรียสามารถแอบแฝงอยู่ในร่างกายเป็นเวลานานก่อนที่จะแสดงอาการของโรค เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มีกลไกต่างๆที่จำเป็นในการดำรงชีวิตภายในเซลล์เจ้าบ้านและใช้ในการหลบหลีกระบบภูมิคุมกันของร่างกาย ปัจจุบันได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* แต่อย่างไรก็ตามความรู้ที่ได้จากการศึกษาบทบาทของปัจจัยต่างๆเหล่านี้ในการเกิดโรคเมลิออยโดสิสยังคงไม่สมบูรณ์

วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ การศึกษาบทบาทของ capsule lipopolysaccharide (LPS) และ flagella ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเมลิออยโดสิส โดยได้แบ่งการศึกษานี้ออกเป็น 4 ส่วน ได้แก่ การศึกษาในหลอดทดลองที่ปราศจากเซลล์ การศึกษาในเซลล์อิพิทีเลียมจากเนื้อเยื่อปอดคน (A549) เซลล์มาโครฟาจของหนู (RAW264.7) และเซลล์ PMNs ของคน การศึกษาเริ่มจากการนำเชื้อที่มีความบกพร่องในการสร้าง capsule LPS หรือ flagellin มาทดสอบความไวต่อสารที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแปลกปลอม ซึ่งผลที่ได้พบว่าเชื้อ wild type และเชื้อที่บกพร่องทั้งหมดต่างก็ทนต่อการถูกฆ่าด้วย α-defensin HNP-2 และเชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS เท่านั้นที่ไวต่อการถูกฆ่าด้วย 30% normal human serum (NHS) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ต่างก็ถูกฆ่าด้วย NO-generating compounds และ H_2O_2 โดยเชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS และ flagellin ต่างก็ดื้อต่อการถูกฆ่าด้วย Reactive nitrogen intermediate (RNI) ในขณะที่เชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS ไวต่อการถูกฆ่าด้วย Reactive oxygen species (ROS) ต่อมาได้ศึกษาการเกาะติด การบุกรุก และการมีชีวิตรอดในเซลล์ A549 เซลล์ RAW264.7 และเซลล์ PMNs ซึ่งผลที่ได้พบว่าเชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS และ flagellin มีการเกาะติดและการบุกรุกเข้าสู่เซลล์ A549 ต่ำกว่าเชื้อ wild type แต่การเกาะติดและการบุกรุกของเชื้อที่บกพร่องในการสร้าง flagellin เพิ่มขึ้นหลังจากมีการปั่นตกด้วยความเร็วต่ำ นอกจากนี้เชื้อ wild type และเชื้อที่บกพร่องทุกสายพันธุ์สามารถใช้ชีวิตและเพิ่มจำนวนในเซลล์ A549 และ RAW264.7 แต่ไม่สามารถใช้ชีวิตในเซลล์ PMNs เชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS และ flagellin มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง multinucleated giant cell (MNGC) formatIon และ IL-8 ต่ำกว่า เชื้อ wild type แต่เมื่อเพิ่มค่า (multiplicities of infection (MOI) ของเชื้อทั้งสองชนิดกลับไม่พบความแตกต่างใดๆเลยจากเชื้อ wild type และเชื้อที่บกพร่องในการสร้าง capsule นอกจากนี้เชื้อที่บกพร่องในการสร้าง LPS สามารถกระตุ้น IL-1β, IL-6, IL-10 และ IL-12 ได้ดีกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นในเซลล์ RAW 264.7 แต่กลับกระตุ้น TNF-α และ IL-8 ได้ต่ำในเซลล์ PMNs นอกจากนี้เชื้อทุกสายพันธุ์ต่างก็กระตุ้น ROS ในเซลล์ PMNs และหลังจากที่ยับยั้งการสร้าง NADPH oxidase ในเซลล์ PMNs พบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตในเซลล์ได้มากขึ้น แสดงให้เห็นว่ากลไกการทำลายเชื้อโดยใช้ NADPH oxidase ของเซลล์ PMNs สามารถกำจัดเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ให้ประโยชน์ เพิ่มขึ้นในด้านความรู้เกี่ยวกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *B. pseudomallei*

138 หน้า

Copyright by Mahidol University