

**MOLECULAR ANALYSIS OF THE FACTOR MEDIATING
ACTIN-BASED MOTILITY IN *BURKHOLDERIA SPECIES***



CHAYADA SITTHIDET

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2010**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

MOLECULAR ANALYSIS OF THE FACTOR MEDIATING ACTIN-BASED MOTILITY OF *BURKHOLDERIA* SPECIES

CHAYADA SITTHIDET 4836178 SIIM/D

Ph.D. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUNEE KORBSRISATE, Ph.D., PATTARACHAI KIRATISIN, M.D. Ph.D., NARISARA CHANTRATITA, Ph.D.

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei, the causative agent of melioidosis, is a Gram-negative facultative intracellular pathogen that can subvert the host actin machinery to promote its movement within and between cells in the absence of immune surveillance. Actin-based motility of *B. pseudomallei* requires the BimA protein (BimA_{ps}), and orthologues with distinct N-terminal sequences have been reported to exist in the closely related species *B. thailandensis* and *B. mallei*. BimA from these *Burkholderia* strains can restore actin tail formation in a *B. pseudomallei* *bimA* mutant, suggesting that they are functional despite divergence in their primary sequence. In this study, the prevalence and sequence diversity of *bimA* in 99 clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei* to identify conserved motifs and domains was investigated. BimA was found in all strains examined, though variation was detected in a number of predicted casein kinase II phosphorylation sites (PDASX) and the presence of a 13 residue direct repeat. Proline-rich motifs and WASP-homology (WH)-2 domains predicted to be involved in actin binding were conserved. A *B. mallei*-like *bimA* allele (12%) was identified in a subset of *B. pseudomallei* isolates that were restricted to Northern Australia, though not specific to any multilocus sequence type (ST). The role of the above motifs in actin binding, polymerization and intracellular motility was evaluated using defined mutants and purified proteins. The WH2 domains were found to be required for actin binding, polymerization and intracellular motility. The 13 amino acid repeat and a PRM1 motif were not required for these processes. PDASX domain was not required for actin binding, but acted in an additive manner to promote actin polymerization *in vitro*. In addition to defining the structural requirements for actin-based motility of *B. pseudomallei*, the role of a central acidic (CA) domain that was uniquely present in *B. thailandensis* BimA was also examined. Unlike BimA_{ps}, BimA from *B. thailandensis* recruits and activates the cellular Arp2/3 complex to polymerize actin in a manner dependent on the CA domain. These data imply that different strategies for actin-based motility have evolved among closely related *Burkholderia* species. Taken together, these data substantially advance our understanding of the mechanism of actin-based motility of *Burkholderia* species.

KEY WORDS: BIMA/ *Burkholderia pseudomallei*/ ACTIN-BASED MOTILITY/
ACTIN TAIL FORMATION/ *Burkholderia thailandensis*

204 pages

การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลของ โปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* spp. โดยอาศัย โปรตีน actin ในเซลล์ร่างกาย

MOLECULAR ANALYSIS OF THE FACTOR MEDIATING ACTIN-BASED MOTILITY OF *BURKHOLDERIA* SPECIES

ชญาดา สิทธิเดช 4836178 SIIM/D

ปร.ค. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุณีย์ กอปรศรีเศรษฐ์, Ph.D., ภัทรชัย กิระดิสิน, M.D. Ph.D., นริศรา จันทราทิพย์, Ph.D.

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยด์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเคลื่อนที่ภายในและระหว่างเซลล์โดยอาศัย actin ของเซลล์ดีดเชื้อที่เรียกว่า actin-based motility ขบวนการดังกล่าว เกิดจากการทำหน้าที่ของโปรตีน BimA ที่ผลิตจากเชื้อ *B. pseudomallei* โปรตีนนี้นอกจากพบใน *B. pseudomallei* แล้วยังพบในเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง ได้แก่ *B. thailandensis* and *B. mallei* ถึงแม้ว่าโปรตีน BimA ที่พบในเชื้อเหล่านี้มีส่วนประกอบของยีนที่แตกต่างกัน แต่สามารถกระตุ้นการเกิด actin-based motility ได้เช่นกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน BimA ของเชื้อ *B. pseudomallei* 99 ตัวอย่างที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและคนไข้ พบว่า ในทุกสายพันธุ์ของ *B. pseudomallei* มียีน *bimA* อยู่แต่อาจมีความหลากหลายในจำนวนซ้ำของ PDASX และ 13 amino acid domain นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *B. pseudomallei* (12%) ที่มีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน BimA เหมือนกับ *B. mallei* (*B. mallei*-like BimA) และเป็นเชื้อที่แยกได้จากประเทศออสเตรเลียเท่านั้น โดยเชื้อดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับ MLST (Multilocus sequence typing) ชนิดใดๆ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสำคัญของโปรตีน BimA ($BimA_{ps}$) แต่ละ domain ได้แก่ 13 amino acid, Proline-rich motif (PRM), WASP homology 2 (WH2) และ PDASX ว่า domain ใดมีบทบาทในการจับกับโปรตีน actin, การต่อสาย actin และการเคลื่อนที่ของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า WH2 domain ของ $BimA_{ps}$ มีความสำคัญต่อการเกาะกับโปรตีนและการต่อสาย actin เพื่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของเชื้อ ส่วน 13AA domain และ PRM domain ไม่มีความสำคัญต่อกระบวนการดังกล่าว ในขณะที่ PDASX domain ไม่มีความสำคัญต่อการเกาะกับโปรตีน actin แต่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการต่อสาย actin นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาโปรตีน BimA จากเชื้อ *B. thailandensis* ($BimA_{th}$) พบว่า โปรตีน BimA ชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำและกระตุ้นกลุ่มโปรตีนของเซลล์ดีดเชื้อที่เรียกว่า Arp2/3 (Arp2/3 complex) ทำให้เกิดการต่อสาย actin โดยอาศัย central acidic (CA) domain ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงกลไกการเคลื่อนที่โดยอาศัยการเหนี่ยวนำ actin ด้วยกลไกที่แตกต่างกันของเชื้อ *Burkholderia* สายพันธุ์ต่างกัน อันอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมและรักษาโรคเมลิออยด์ต่อไป