

**IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* RPOS
REGULATED GENES AND OPERONS INVOLVED IN THE
HYDROGEN PEROXIDE STRESS RESPONSE**



PALATIP CHUTOAM

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

2014

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* RPOS REGULATED GENES AND OPERONS INVOLVED IN THE HYDROGEN PEROXIDE STRESS RESPONSE

PALATIP CHUTOAM 5137058 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: SUMALEE TUNGPRADABKUL, Ph.D., KITTISAK YOKTHONGWATTANA, Ph.D., VARODOM CHAROENSAWAN, Ph.D.

ABSTRACT

B. pseudomallei, a pathogenic bacterium, causes melioidosis. This organism can survive in eukaryotic host cells by escaping oxidative stress, via the regulation of RpoS sigma factor. In this study, we have further characterized the RpoS-dependent oxidative stress response system using comparative proteomics analysis. Alterations in the proteomic profiles of *B. pseudomallei* wild-type and rpoS mutant strains exposed to hydrogen peroxide were analyzed. Using stringent criteria, the high confidence 176 hydrogen peroxide responsive proteins were identified, which were divided as 13 proteins from 2D-gels MALDI-TOF MS/MS and 163 proteins from 1D-gels LC MS/MS. A total of 26 proteins were discovered to be determined by the RpoS sigma factor. ScoA, which functions together with ScoB as a subunit of SCOT enzyme in lipid metabolism, was found to be regulated by RpoS and significantly down-regulated after hydrogen peroxide treatment. ScoA and ScoB have been predicted to organize as an operon using computational methods, and we have confirmed that they are indeed co-transcribed as single mRNA using RT-PCR and time-series gene expression data. Our study is the first to identify a role of RpoS in the down-regulation of SCOT expression in response to oxidative stress in *B. pseudomallei*.

KEY WORDS: *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* / OXIDATIVE STRESS / RPOS / PROTEOMICS / OPERON

139 pages

การวินิจฉัยยีนและ OPERONS ซึ่งถูกควบคุมการแสดงออกโดย RPOS ของเชื้อ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากไฮโดรเจน เปอออกไซด์

IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* RPOS REGULATED GENES AND OPERONS INVOLVED IN THE HYDROGEN PEROXIDE STRESS RESPONSE

พลาริป ชูท้วม 5137058 SCBC/D

ปร.ค. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: สุมาลี ตั้งประดับกุล, Ph.D., กิตติศักดิ์ หยกทองวัฒนา, Ph.D.,
วโรดม เจริญสุวรรณค์, Ph.D.

บทคัดย่อ

B. pseudomallei คือแบคทีเรียก่อโรคอันเป็นสาเหตุของโรค melioidosis ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถหลบหนีจากสภาวะเครียดจาก oxidative ทำให้สามารถดำรงชีวิตในเซลล์เหยื่อได้ ในการศึกษาครั้งนี้เราได้ศึกษาถึงระบบการตอบสนองต่อสภาวะเครียดจาก ไฮโดรเจน เปอออกไซด์ ของ *B. pseudomallei* อันถูกควบคุมโดย RpoS ด้วยวิธีวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกโปรตีนเชิง proteomics โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นโดยไฮโดรเจน เปอออกไซด์ใน *B. pseudomallei* สายพันธุ์ wild-type และ RpoS mutant ซึ่งพบว่า 176 โปรตีนตอบสนองต่อสภาวะเครียดจาก ไฮโดรเจน เปอออกไซด์ โดย 13 โปรตีนถูกวินิจฉัยโดยวิธีการ 2D-gels MALDI-TOF MS/MS และ 163 โปรตีนโดยวิธีการ 1D-gels LC MS/MS ซึ่งในจำนวนนี้มี 26 โปรตีนถูกควบคุมโดย RpoS ทั้งนี้พบว่า ScoA ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ SCOT ร่วมกับหน่วยย่อย ScoB ในระบบ lipid metabolism อยู่ภายใต้การควบคุมของ RpoS และมีการลดการแสดงออกของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญหลังจากโดนกระตุ้นโดย ไฮโดรเจน เปอ ออกไซด์ ทั้งนี้ ScoA และ ScoB ได้รับการพยากรณ์โดยกระบวนการทาง computational ว่ามีการจัดการยีนแบบ operon ซึ่งข้อมูลนี้ได้รับยืนยันโดยการทดสอบ RT-PCR และโดยข้อมูลการแสดงออกของยีนตามห้วงเวลา นี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานถึงบทบาทของ RpoS ในการลดการแสดงออกของเอนไซม์ SCOT เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดจาก ไฮโดรเจน เปอออกไซด์ ใน *B. pseudomallei*