



**REGULATORY FACTOR INVOLVING IN EXOPOLYSACCHARIDE
SYNTHESIS IN Burkholderia pseudomallei :
A MUTAGENESIS STUDY**

PHANSUPA KERDSUK
2

With components of
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2003

TH
P 535M
2003
C.2

ISBN 974-04-2865-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

**REGULATORY FACTOR INVOLVING EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS
IN *Burkholderia pseudomallei*: A MUTAGENESIS STUDY.**

PHANSUPA KERDSUK 4336545 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : SUNEE KORBSRISATE, Ph.D., CHANWIT
TRIBUDDHARAT, M.D., Ph.D.**ABSTRACT**

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a disease which is recognized as a major public health problem primarily in Southeast Asia and Northern Australia. Exopolysaccharide is known as major virulent factor in bacteria and its pathogenesis has been revealed. One of the key regulatory genes controlling alginate exopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is *algU*. AlgU showed 63% amino acid identity to translated *B. pseudomallei* sequence. In this study, to investigate the role of *algU* homologue in exopolysaccharide production, *B. pseudomallei algU* mutant designated PSK was constructed by insertional inactivation using pKNOCK-Cm vector for gene knockout. On tryptic soy agar, colony morphology of *algU* mutant showed knotty colony whereas *B. pseudomallei* wild-type showed button colony. Inactivation of *algU* homologue demonstrated the defect in exopolysaccharide production, which was assessed by the biofilm formation assay but did not affect to growth rate of *B. pseudomallei*. To examine whether AlgU homologue is related to σ^E , the effect of *algU* homologue inactivation on the sensitivity to oxygen radicals and heat killing were tested. *B. pseudomallei algU* mutant showed higher sensitivity to paraquat and H_2O_2 comparing to wild-type strains. However, *B. pseudomallei* wild-type and *algU* mutant strains were resistant to heat killing at 50°C. The results suggest a major roles for the *algU* homologue in exopolysaccharide production and the environmental stress response in *B. pseudomallei*.

KEY WORDS : *Burkholderia pseudomallei* / EXOPOLYSACCHARIDE / *algU* /
ALGINATE

116 P. ISBN 974-04-2865-7

การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง exopolysaccharide จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
(REGULATORY FACTOR INVOLVING IN EXOPOLYSACCHARIDE
SYNTHESIS IN *Burkholderia pseudomallei*: A MUTAGENESIS STUDY)

พัลย์ศุภา เกิดสุข 4336545 SIIM/M

วท. ม. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุณีย์ กอปรศรีเศรษฐ์, Ph.D, ขาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, พ.บ.
Ph.D

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เป็นสาเหตุของโรคmelioidosis ซึ่งเป็นโรคที่ก่อให้เกิดปัญหาทางการแพทย์ เป็นที่ทราบกันว่า exopolysaccharide ของแบคทีเรียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในแบคทีเรียหลายชนิด จากการศึกษาใน *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ายีน *algU* เกี่ยวข้องกับการสร้าง exopolysaccharide เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ AlgU และลำดับกรดอะมิโนจากยีน *B. pseudomallei* มาเปรียบเทียบกับผลปรากฏว่ามีลำดับกรดอะมิโนส่วนหนึ่งบนยีนของ *B. pseudomallei* ซึ่งมีความเหมือนกับ *algU* ของ *P. aeruginosa* อยู่สูงถึง 63% ยีนที่กำหนดลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวใน *B. pseudomallei* นี้ได้ให้ชื่อว่า *algU* homologue ในการศึกษารุ่นนี้ ยีน *algU* homologue ถูกทำให้กลายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ด้วยหลักการ insertional inactivation ทำให้ได้เชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ มีชื่อว่า *B. pseudomallei* PSK จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar แสดงให้เห็นว่าโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์มีความแตกต่างจากโคโลนีของเชื้อดั้งเดิม เมื่อทำการทดลองตรวจหา biofilm ที่สร้างขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับการสร้าง exopolysaccharide พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์แสดงความสามารถพร้อมในการสร้าง exopolysaccharide นอกจากนั้นยังพบอีกว่าเชื้อ *B. pseudomallei* กลายพันธุ์ แสดงความไวต่อการตอบสนองต่อสาร H₂O₂ และ paraquat มากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่า เชื้อที่กลายพันธุ์และไม่กลายพันธุ์ตอบสนองต่ออุณหภูมิที่ 50°C ไม่แตกต่างกัน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษารุ่นนี้ แสดงให้เห็นว่ายีน *algU* homologue มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้าง exopolysaccharide และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะ stress ของเชื้อ *B. pseudomallei*