Abstract

Project Code: BRG4780003

Project Title: Regulation of Suppressor Cytokines Signaling (SOCS) by *Burkholderia pseudomallei* in mouse macrophage cell line

Investigators: Utaisincharoen P. , Sirisinha S. , Limposuwan K. , Ekchariyawat P., and Pudla S.

Faculty of Science, Mahidol University

Email address: scput@mahidol.ac.th

Project Duration: May 2004- April 2007

Burkholderia pseudomallei, the causative agent of melioidosis, is a facultative intracellular gram-negative bacterium that is able to survive and multiply in macrophages. It has been reported that *B. pseudomallei* was able to escape macrophage killing by interfering with the expression of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS). The results from this study demonstrated that both viable or heat-killed *B. pseudomallei* was able to activate the expression of suppressor of cytokine signal-3 (SOCS3) and cytokine-inducible Src homology 2-containing protein (CIS) but not SOCS1 in a mouse macrophage cell line (RAW 264.7). This bacterium could directly induce the expression of these negative regulators. However, the presence of cytochalasin D was able to prevent SOCS3 and CIS expression indicating that the signaling for SOCS3 and CIS expression may be initiated inside the macrophages. The expression of SOCS3 and CIS in *B. pseudomallei*-infected macrophages directly correlated with a decreased gamma interferon (IFN-γ) signaling response, as indicated by a reduction in Y701-STAT-1 phosphorylation (pY701-STAT-1). Moreover, a reduction in the expression of IFN-γ-induced proteins, such as interferon regulatory factor 1 (IRF-1), was observed in *B. pseudomallei*-infected macrophages that were treated with IFN-γ. Since pY701- STAT-1 and IRF-1 are essential transcription factors for regulating iNOS expression, the failure to activate these factors could also result in depression of iNOS expression and loss of the macrophages killing capacity. Furthermore, the induction of these

negative regulators was most probably triggered from within rather than at the cell surface of mouse macrophage cell line (RAW 264.7) suggesting that macrophage activation most likely requires the interaction of bacteria with a putative host cell cytoplasmic component(s). Taken together, the data indicate that the activation SOCS3 and CIS expression in *B. pseudomallei*-infected macrophages interfered with IFN-γ signaling, thus allowing the bacteria to escape killing by these phagocytic cells. In addition, the present study, we also demonstrated that *B. pseudomallei* was able to induce gene expression through MyD88-dependent pathway (e.g. *iκbζ, il-6, tnf-α, socs3*) but failed to activate MyD88-independent pathway (e.g. *inos, ifn-β, irg1, socs1*). IFN-γ restored the gene expression of the MyD88-independent pathway and inhibited intracellular survival of *B. pseudomallei* in the infected macrophages. These results suggest that the MyD88-independent pathway is an essential pathway controlling *B. pseudomallei* survival in macrophages.

Keywords : *B. pseudomallei*, Melioidosis, SOCS3, CIS, IFN-γ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BRG4780003

ชื่อโครงการ : การควบคุมการสร้าง Suppressor of Cytokines Signaling (SOCS) โดยเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู

ชื่อนักวิจัย : พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ , สถิตย์ สิริสิงห , กรแก้ว ลิ้มโพธิ์สุวรรณ , พีรยา เอกจริยาวัฒน์ และ สุทธิสา พุดลา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Email address : scput@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : พฤษภาคม 2547- เมษายน 2550

เชื้อเบอร์โคลเดอเรีย สูโดมาลลิไอ (*Burkholderia pseudomallei*) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเมลิออยโดซิส เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นแบคทีเรียชนิดfacultative intracellular ที่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ทั้งในเซลล์ phagocytic และ non-phagocytic เชื้อนี้มีความสามารถในการหลบหลีกจากการทำลายโดยเซลล์แมโครฟาจโดยเมื่อเชื้อนี้ถูกเซลล์ phagocytosed จะไม่กระตุ้น ให้เซลล์สร้างเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในการสร้าง reactive nitrogen intermediate (RNI) ที่มี คุณสมบัติในการทำลายจุลชีพ ทั่วไป ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทั้งมีชีวิตและไม่มีชีวิตสามารถกระตุ้น เซลล์แมโครฟาจของหนู (RAW 264.7) ให้สร้างโปรตีน suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 และ cytokine-inducible Src-homology 2 (CIS) แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง SOCS1 ได้ การแสดงออกของ SOCS3 และ CIS จะเกิดขึ้นได้ต่อเมื่อเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเข้าสู่เซลล์แมโครฟาจแล้ว ระดับการแสดงออกของ SOCS3 และ CIS ในเซลล์แมโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* สัมพันธ์กับการลดลงของระดับphosphorylation ของ signal transducer and activator of transcription (STAT)-1(pY701-STAT-1)

ซึ่งบ่งชี้ถึงการส่งสัญญาณที่ลดลงของ IFN-γ เมื่อระดับการส่งสัญญาณของ IFN-γ ลดลงจึงทำให้เซลล์แมโครฟาจไม่สามารถสร้างโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการการทำลายจุลชีพได้ อาทิเช่น interferon regulatory factor (IRF)-1 และ iNOS จึงทำให้เชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในเซลล์แมโครฟาจได้ ในการศึกษานี้ยังพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนผ่าน MyD88-dependent pathway (*iκbζ, il-6, tnf-α, socs3*) แต่ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกนี้ผ่าน MyD88-independent pathway (*inos, ifn-β, irg1, socs1*)นอกจากนั้นยังพบว่า IFN-γ สามารถที่จะเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนทั้ง MyD88-dependent และ MyD88-independent pathway อีกทั้งยังพบว่าเมื่อมีการแสดงออกของยีนโดยผ่าน MyD88-independent pathway แล้วแมโครฟาจจะสามารถทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ภายในเซลล์ได้ จึงสรุปว่า MyD88-independent pathway มีความสำคัญในการควบคุมและทำลายเชื้อ *B. pseudomallei* ภายในเซลล์แมโครฟาจ