



สัญญาเลขที่ BRG4680017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานและศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออก
ทั้งระดับก่อนและหลังของยีน **Sigma S Factor** ในแบคทีเรีย

Burkholderia pseudomallei

**Functional analysis and mechanism involved in
up and down regulation of Sigma S factor in
*Burkholderia pseudomallei***

คณะผู้วิจัย

สังกัด

- | | | |
|----|----------------------------|--------------------------------|
| 1. | รศ.ดร.สุมาลี ตั้งประดับกุล | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
| 2. | นางสาวเบญจมาศ ทรัพย์สิน | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
| 3. | นายวิวัฒน์ แจ่มเี่ยม | ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ |
| 4. | นายปฐมพล วงศ์ตระกูลเกตุ | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นของรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. Our study on the *B. pseudomallei* *rpoS* mutant was shown to be more sensitive to carbon starvation, hydrogen peroxide and methyl viologen than the wild type. Analysis of *rpoS* gene expression by transcription fusion with beta-galactosidase activity assay indicated that *rpoS* was activated when entry into stationary phase and related to quorum sensing expression by negatively regulation. Moreover, when the bacteria exposed to hydrogen peroxide in the stationary phase, the *rpoS* was also activated. In an oxidative stress condition, the study of catalase activities were indicated that *B. pseudomallei* has 2 types of catalases, catalase I encoded by *katG* and catalase II encoded by *katE*, respectively. Our results revealed that *katE* is directly controlled by the RpoS and is not induced by hydrogen peroxide. However, the RpoS was shown to regulate *katG*, *dpsA* and *oxyR* operon under hydrogen peroxide treatment. Our finding is novel and first illustrate the regulation network between RpoS, OxyR, KatG and DpsA expression under hydrogen peroxide induction. In order to identify other genes expressions under RpoS regulation, 2-dimensional gel electrophoresis and MADI-TOF techniques were applied. We have constructed a proteomic reference map of a wild type *B. pseudomallei* 844 strain and used for comparative identification of differential protein expressions in the *rpoS* mutant strain. A superoxide dismutase, one of an identified product from the proteomic profile, was shown to be under RpoS regulation. We also demonstrated that the *B. pseudomallei* RpoS involved in regulation of virulent factors such as an induction of multinucleated giant cell formation and of nitric oxide synthase of the host cells.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, Sigma S factor (*rpoS*), oxidative stress, 2-dimensional gel electrophoresis, virulent factors

บทคัดย่อ

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกรัมลบ *Burkholderia pseudomallei* ในการศึกษาหน้าที่ของยีนซิกมา-เอสโดยการทำลายยีนดังกล่าวของเชื้อ *B. pseudomallei* ให้ได้ สายพันธุ์ *rpoS* mutant หรือเรียกว่าเชื้อผ่าเหล่า พบว่าเชื้อผ่าเหล่านี้นี้มีความไวต่อสภาวะการอดอาหาร สภาวะความเครียดจากออกซิเจนทั้งชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และชนิดเมธิวโอโลเจนเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซิกมา-เอสโดยใช้โปรโมเตอร์ของยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่แสดงกระบวนการทรานสคริปชันติดตามโดยการวัดปฏิกิริยาของเบต้า-กาแลคโตไซเดส พบว่าการแสดงออกของซิกมา-เอสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase และสัมพันธ์กับการผลิตสารหลั่ง Quorum sensing ในช่วงระยะเดียวกันในลักษณะการควบคุมแบบลบ อีกทั้งการแสดงออกของซิกมา-เอสในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ได้มุ่งประเด็นการทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกมา-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกมา-เอสภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษาได้ข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการควบคุมในเครือข่ายระหว่าง RpoS และ OxyR และเพื่อเป็นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนอื่นๆที่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านั้นโดยซิกมา-เอส ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่าเหล่า จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกมา-เอส เช่นพบว่าซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไปในเชื้อที่ผ่าเหล่าแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกมา-เอสเป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาหน้าที่ของซิกมา-เอสของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อกิจกรรมการก่อโรคในระดับเบื้องต้นพบว่าเชื้อผ่าเหล่าจะไม่สามารถก่อสภาพพยาธิแบบ multinucleated giant cell formation และ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของเซลล์เจ้าบ้านได้ แสดงว่าเชื้อผ่าเหล่าขาดความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคได้

Key words: เชื้อเมลิออยโดสิส, ซิกมา-เอส, การแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ, สภาวะความเครียดจากออกซิเจน, ปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรค

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย) การวิเคราะห์หน้าที่การทำงานและศึกษากลไกการควบคุมการ
แสดงออกทั้งระดับก่อนและหลังของยีน Sigma S Factor ใน
แบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei*

(ภาษาอังกฤษ) Functional analysis and mechanism involved in up and down
regulation of Sigma S factor in *Burkholderia pseudomallei*

หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.สุมาลี ตั้งประดับกุล ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400 โทรศัพท์ 02
2015376 โทรสาร 02 2480375 e-mail: scstp@mucc.mahidol.ac.th

ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

ในการเจริญเติบโต การขยายเผ่าพันธุ์ และขบวนการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต ต้องมีการสังเคราะห์โปรตีน (Translation) ผ่านการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ จากแม่แบบดีเอ็นเอ (Transcription) การถอดรหัสอาร์เอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น แบคทีเรีย ถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยทั่วไปแล้วกระบวนการถอดรหัสนั้นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase และเอนไซม์นี้จะทำงานโดยการรวมตัวของโปรตีนหน่วยย่อยที่สำคัญ คือ Sigma factor ซึ่งจะจับกับโปรตีนที่กระตุ้นให้เอนไซม์ RNA polymerase ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ Sigma factor มีอยู่หลายชนิด โดยทั่วไปการถอดรหัสอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตโปรตีนที่ต้องการในสภาวะปกติ จะถูกกระตุ้นโดย Sigma factor D หรือ Sigma 70 แต่ในบางสภาวะที่แบคทีเรียต้องเผชิญความผิดปกติ เช่นสิ่งแวดล้อมที่ผิดปกติ ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน เมื่อเข้าสู่สภาวะในคนก็จะมีกระบวนการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยความเครียด และการอยู่รอดให้ได้ เป็นต้น ในสภาวะที่ผิดปกติเช่นนี้ สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีขบวนการที่จะปรับตัวให้อยู่ได้โดยใช้การสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านกระบวนการถอดรหัสที่แตกต่างจากสภาวะปกติ ดังนั้นการใช้โปรตีน Sigma factor อื่น เช่น Sigma S, Sigma N และ Sigma E เป็นต้น มากระตุ้น RNA polymerase ก็เป็นวิธีการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตนั่นเอง

Sigma S หรือ Sigma 38 เป็นโปรตีนที่กำหนดโดยยีน rpoS ซึ่งพบว่าเป็น sigma factor ที่มีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของแบคทีเรียหลายชนิดที่มีสภาวะผิดปกติ เช่นสภาวะเครียด สภาวะคับขัน และสภาวะการอยู่รอดที่แบคทีเรียเข้าสู่การเจริญสูงสุด (Stationary phase) เป็นต้น นอกจากนี้ในแบคทีเรียบางชนิดพบว่า Sigma S มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการถอดรหัสของกลุ่มยีนที่ก่อความรุนแรง (Virulent factor) หรือก่อพยาธิสภาพ (Pathogenesis) ในเชื้อก่อโรค เพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรียนั้น

เนื่องจาก *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ก่อให้เกิดโรคในคน เรียกว่า โรคเมดิออยโคสิส ดังนั้นแบคทีเรียดังกล่าวนี้ต้องมีการสร้างผลผลิตที่เป็นปัจจัยในการก่อความรุนแรงและพยาธิสภาพของโรค ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมุติฐานในการศึกษาวิจัยในโครงการที่ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ในทุนเมธีวิจัย โดยได้มีการศึกษาในเบื้องต้นในช่วงปีที่ 3 ของทุนเมธีวิจัย (ได้รายงานไว้ในรายงานฉบับสมบูรณ์ เดือนธันวาคม 2545) ซึ่งสมมุติฐานที่ตั้งก็คือ *B. pseudomallei* จะต้องมียีน *rpoS* ที่แปลเป็นโปรตีน Sigma S ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการควบคุมการสร้าง Virulent factor และ Pathogenesis ของการก่อโรค ในการวิจัยดังกล่าวได้อาศัยฐานข้อมูลของยีนของเชื้อ *B. pseudomallei* (*B. pseudomallei* Genome Database) และสามารถหาคำแหน่งของยีน *rpoS* หลังจากที่ได้โคลนยีน และศึกษารหัสของยีนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น เพื่อพิสูจน์ว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่กำหนดการสร้าง Sigma S จึงได้ทำการสร้างแบคทีเรีย *B. pseudomallei* mutant ที่ทำลายยีน *rpoS* โดยวิธี Knockout ผลจากการศึกษาสามารถสร้าง *B. pseudomallei* mutant และได้ศึกษาในเบื้องต้นว่า Sigma S ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในระหว่างการเจริญที่สูงสุด (stationary phase) นอกจากนี้เชื้อ *B. pseudomallei* mutant ที่ได้นี้ ได้ใช้เป็นแบคทีเรียเปรียบเทียบในการศึกษาการก่อพยาธิสภาพในเซลล์ (ส่วนหนึ่งของโครงการการสร้างเครือข่ายกลุ่มวิจัยเมดิออยโคสิส)

จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ สามารถชี้แนะว่า Sigma S factor น่าจะมีบทบาทที่สำคัญอื่นๆ และกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของ Sigma S ไม่ว่าจะเป็นขบวนการถอดรหัส หรือ การแปลเป็นโปรตีน (Transcriptional or Translational level) อีกทั้งได้มีการศึกษาถึงกลไกในการบังคับควบคุมโดยยีนหรือโปรตีนอื่นๆทั้งในระดับก่อนและหลังยีน *rpoS* (Up and Down regulation of *rpoS* gene) ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นผลให้สามารถอธิบายความรุนแรงของการก่อโรคในแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยที่การศึกษาเกี่ยวกับ Sigma S ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ยังไม่มีการศึกษามาก่อน รวมทั้งผู้วิจัยมีการสร้าง *B. pseudomallei* mutant จึงเป็นประโยชน์ที่จะนำมาเปรียบเทียบศึกษาเพื่อให้ทราบถึงบทบาทหน้าที่และกลไกในการควบคุมการแสดงออกของ *rpoS* ที่กำหนดผลผลิต Sigma S ในเชื้อก่อโรคนี

การศึกษาในโครงการวิจัยดังกล่าวจะได้องค์ความรู้ที่เกี่ยวกับบทบาทของ Sigma S ในสถานะต่างๆ ทั้งที่เป็นสถานะการปรับตัวของเชื้อ *B. pseudomallei* เอง และสถานะการเข้าสู่สิ่งแวดล้อมภายในร่างกายมนุษย์ที่มีผลต่อพยาธิสภาพ ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน รวมทั้งก่อให้เกิดความเข้าใจอย่างแท้จริงในบทบาทของหน่วยโปรตีนที่มีส่วนสำคัญต่อการเกิดขบวนการถอดรหัส (Transcription) ของยีนมีชีวิตชั้นต่ำ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังได้พัฒนาการใช้ฐานข้อมูลยีนที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์ อันจะเป็นการส่งเสริม และสร้างนักวิจัย

นักศึกษาที่เข้าร่วมในโครงการได้เกิดองค์ความรู้
(Bioinformatic)

ความเข้าใจและทักษะในการใช้สารสนเทศทางชีวภาพ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาบทบาทหน้าที่การทำงานของ Sigma S ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* โดยใช้ *B. pseudomallei* mutant เป็นตัวเปรียบเทียบ
2. ศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของ Sigma S ของ *B. pseudomallei* ในระดับ Transcription และ Translation
3. ศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนและโปรตีน ทั้งระดับก่อนและหลัง ยีน *rpoS* (Up and Down Regulation of *rpoS* gene)

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ปีที่ 3	
	1-6	7-12	1-6	7-12	1-6	7-12
1. ศึกษาหน้าที่การทำงานของ Sigma S	↔					
2. ศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของ Sigma S ทั้งระดับ Transcription and Translation	↔					
3. หาชิ้นหรือโปรตีนที่มีส่วนควบคุมรวมทั้งการกระตุ้นในส่วน promotor		↔				
4. ศึกษาการควบคุมของ Sigma S ต่อการแสดงออกของยีนทั้งก่อนและหลัง ยีน <i>rpoS</i> (up and down regulates)			↔			
5. ศึกษาแบบแผนโปรตีนองค์รวมโดย 2-D gel		↔	↔	↔	↔	↔
6. รายงานความก้าวหน้า และฉบับสมบูรณ์	↔	↔	↔	↔	↔	↔
7. ตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ	↔		↔			↔

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาในโครงการนี้เป็นการนำความรู้เกี่ยวกับข้อมูลยีนที่ได้มีการศึกษาในระดับจีโนม (Genome database) ของแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* มาใช้เพื่อตอบคำถามและศึกษากลไกในการก่อพยาธิสภาพ ก่อโรคในคน ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ ในการพัฒนาบุคลากรให้มีความรู้ทักษะในการนำข้อมูลยีนที่มีอยู่มาสืบหาการทำงานที่เป็นกลไกของการก่อโรค โดยใช้วิธีการทางอนุชีววิทยา ชีวเคมี มาหาคำตอบที่ชัดเจน

นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในโครงการนี้ยังสามารถสร้างองค์ความรู้ที่จำเพาะของแบคทีเรียก่อโรคนี้อย่างชัดเจน เพื่อที่จะสามารถนำไปอธิบายและแก้ปัญหาการก่อโรคดังกล่าวได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการพัฒนาการด้านสาธารณสุขของประเทศไทย

อีกทั้งการศึกษากการทำ mutant ที่ได้ยังสามารถนำไปเชื่อมโยงกับกลุ่มวิจัยที่เกี่ยวข้อง ภูมิคุ้มกันวิทยา ระดับเซลล์วิทยา และระดับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับจีโนมมนุษย์เมื่อได้รับแบคทีเรียนี้เข้าไปสามารถนำไปสร้างองค์ความรู้ที่หลากหลายสาขา เพื่อเกิดความเข้าใจกลไกในระดับแบคทีเรียเอง และระดับ Host-bacterial Interaction. และ Pathogenesis.

นอกจากผลผลิตที่ออกมาในรูปแบบผลงานตีพิมพ์แล้ว (คู่มือที่ได้จากการตีพิมพ์) ยังมีผล (Output) ในการผลิตบุคลากรระดับ -ปริญญาเอก 2 คน -ปริญญาโท 1 คน

-ปริญญาตรี 2 คน (โดยเฉพาะนักศึกษาในโครงการพิเศษ เช่น พสวท. โครงการศรีตรังทอง โครงการอัจฉริยภาพทางวิทยาศาสตร์ โครงการเรียนดีทางวิทยาศาสตร์ เป็นต้น)

ความเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาและที่ปรึกษา

1. Dr. Mark Thomas, and Dr. Jonathan G Shaw, Medical School, Sheffield University, UK.
2. ศ.ดร.สถิตย์ สิริสิงห์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. คุณวรรณพร วุฒิกอนันต์ Wellcome Unit, คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล
4. รศ.นพ.มงคล คุณากร ภาควิชาพยาธิคลินิก รพ.รามารับดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. ศ.ดร.สกล พันธุ์ยิ้ม สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
6. ศ.ดร.มรว.ชัชณสร สวัสดิวัฒน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	I
บทคัดย่อ (ไทย)	II
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	III
วัตถุประสงค์	V
แผนการดำเนินงาน	V
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Output ที่ได้จากโครงการ)	VI
ความเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่ผู้เชี่ยวชาญในสาขาและที่ปรึกษา	VI
สารบัญ	VII
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูปภาพ	IX
บทนำ	1
ระเบียบการวิจัย	5
ผลการวิจัย	7
สรุปและวิจารณ์การวิจัย	30
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	35
-ผลงานตีพิมพ์	

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนรวมของเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> wild type ที่เป็น reference map	22
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลโปรตีนที่พบว่ามีหลายรูปแบบ (Isoform)	26
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลการเปรียบเทียบโปรตีนระหว่าง wild type เทียบกับ rpoS mutant	27
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนรวมของเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> rpoS mutant ที่เป็น reference map	28

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงภาพเชื้อ <i>Burkholderia pseudomallei</i> ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง และลักษณะของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารวุ้น	4
รูปที่ 2 กราฟเปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในภาวะอดอาหาร (starvation) ของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	7
รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในภาวะความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เมธิลไวโอโลเจนของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	8
รูปที่ 4 กราฟเปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในภาวะกรด, heat shock, Hyperosmolarity, Biofilm ของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	9
รูปที่ 5 เปรียบเทียบโครงสร้างสารและโครงสร้างของ Protease, Hemolysin and Flagellin ของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	10
รูปที่ 6 แสดงการติดตามการแสดงออกของยีน rpoS ในระยะการเจริญเติบโตในระดับ Transcription and Translation	11
รูปที่ 7 แสดงผลการแสดงออกของ AHL ภายใต้การควบคุมของ rpoS และผลของ rpoS ภายใต้การควบคุมของระบบ Quorum sensing	12
รูปที่ 8 แสดงผลการติดตามการแสดงออกของ rpoS ของเชื้อปกติที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	13
รูปที่ 9 แสดงชนิดของเอนไซม์ Catalase I และ Catalase II	14
รูปที่ 10 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Catalase I และ Catalase II	15
รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ของการควบคุมยีนภายใต้ยีน rpoS และ OxyR	16
รูปที่ 12 แสดงผลการแสดงออกของยีน dpsA ของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	17
รูปที่ 13 แสดงผล Northern blot hybridization ของกลุ่มยีนภายใต้ OxyR ที่ควบคุม Kat G and DpsA	18
รูปที่ 14 แสดงแบบแผนโปรตีนองค์รวมใน 2-D gel electrophoresis	20
รูปที่ 15 แสดงผลตัวอย่างการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดย MALDI-TOF MS	21
รูปที่ 16 แสดงแบบแผนของโปรตีนองค์รวมระหว่าง ของเชื้อที่ผ่าเหล่า rpoS mutant เทียบกับเชื้อปกติ	27

บทนำ

ในการเจริญเติบโต การขยายเผ่าพันธุ์ และขบวนการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต ต้องมีการสังเคราะห์โปรตีน (Translation) ผ่านการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ จากแม่แบบดีเอ็นเอ (Transcription) การถอดรหัสอาร์เอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำเช่น แบคทีเรีย ถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยทั่วไปแล้วกระบวนการถอดรหัสนั้นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase และเอนไซม์นี้จะทำงานโดยการรวมตัวของโปรตีนหน่วยย่อยที่สำคัญ คือ Sigma factor ซึ่งจะเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้เอนไซม์ RNA polymerase ไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ Sigma factor มีอยู่หลายชนิด โดยทั่วไปการถอดรหัสอาร์เอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตโปรตีนที่ต้องการในสภาวะปกติ จะถูกกระตุ้นโดย Sigma factor D หรือ Sigma 70 แต่ในบางสภาวะที่แบคทีเรียต้องเผชิญความผิดปกติ เช่น สิ่งแวดล้อมที่ผิดปกติ ในกรณีที่เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในคน เมื่อเข้าสู่สภาวะในคนก็ต้องการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่เต็มไปด้วยความตึงเครียด และการอยู่รอดให้ได้ เป็นต้น ในสภาวะที่ผิดปกติเช่นนี้ สิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีขบวนการที่จะปรับตัวให้อยู่ได้โดยใช้การสังเคราะห์โปรตีนที่ผ่านกระบวนการถอดรหัสที่แตกต่างจากสภาวะปกติ ดังนั้นการใช้โปรตีน Sigma factor อื่น เช่น Sigma S, Sigma N และ Sigma E เป็นต้น มากระตุ้น RNA polymerase ก็เป็นวิธีการปรับตัวของสิ่งมีชีวิตนั่นเอง

Sigma S หรือ Sigma 38 เป็นโปรตีนที่กำหนดโดยยีน *rpoS* ซึ่งพบว่าเป็น sigma factor ที่มีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของแบคทีเรียหลายชนิดที่มีสภาวะผิดปกติ เช่น สภาวะตึงเครียด สภาวะคับขัน และสภาวะการอยู่รอดที่แบคทีเรียเข้าสู่การเจริญสูงสุด (Stationary phase) เป็นต้น นอกจากนี้ในแบคทีเรียบางชนิดพบว่า Sigma S มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการถอดรหัสของกลุ่มยีนที่ก่อความรุนแรง (Virulent factor) หรือก่อพยาธิสภาพ (Pathogenesis) ในเชื้อก่อโรค เพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรีนั่น

เนื่องจาก *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่ก่อให้เกิดโรคในคน เรียกว่า โรคเมลิออยโดสิส ดังนั้นแบคทีเรียดังกล่าวนี้นี้ต้องมีการสร้างผลผลิตที่เป็นปัจจัยในการก่อความรุนแรงและพยาธิสภาพของโรค ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมุติฐานในการศึกษาวิจัยในโครงการที่ผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนจาก สกว. ในทุนเมริวิชัย โดยได้มีการศึกษาในเบื้องต้นในช่วงปีที่ 3 ของทุนเมริวิชัย (ได้รายงานไว้ใน

รายงานฉบับสมบูรณ์ เดือนธันวาคม 2545) ซึ่งสมมุติฐานที่ตั้งก็คือ *B. pseudomallei* จะต้องมียีน *rpoS* ที่แปลเป็นโปรตีน Sigma S ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดและการควบคุมการสร้าง Virulent factor และ Pathogenesis ของการก่อโรค ในการวิจัยดังกล่าวได้อาศัยฐานข้อมูลของยีนของเชื้อ *B. pseudomallei* (*B. pseudomallei* Genome Database) และสามารถหาตำแหน่งของยีน *rpoS* หลังจากที่ได้โคลนยีนและศึกษารหัสของยีนพบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนในแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่น เพื่อพิสูจน์ว่ายีนดังกล่าวเป็นยีนที่กำหนดการสร้าง Sigma S จึงได้ทำการสร้างแบคทีเรีย *B. pseudomallei* mutant ที่ทำลายยีน *rpoS* โดยวิธี Knockout ผลจากการศึกษาสามารถสร้าง *B. pseudomallei* mutant และได้ศึกษาในเบื้องต้นว่า Sigma S ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในระยะเวลาเจริญที่สูงสุด (stationary phase) นอกจากนี้เชื้อ *B. pseudomallei* mutant ที่ได้นี้ ได้ใช้เป็นแบคทีเรียเปรียบเทียบในการศึกษาการก่อพยาธิสภาพในเซลล์ (ส่วนหนึ่งของโครงการการสร้างเครือข่ายกลุ่มวิจัยแมลลิออยโดสิส)

จากข้อมูลเบื้องต้นนี้ สามารถชี้แนะว่า Sigma S factor น่าจะมีบทบาทที่สำคัญอื่นๆ และกลไกที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการแสดงออกของ Sigma S ไม่ว่าจะเป็นขบวนการถอดรหัส หรือ การแปลเป็นโปรตีน (Transcriptional or Translational level) อีกทั้งได้มีการศึกษาถึงกลไกในการบังคับควบคุมโดยยีนหรือโปรตีนอื่นๆทั้งในระดับก่อนและหลังยีน *rpoS* (Up and Down regulation of *rpoS* gene) ในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นผลให้สามารถอธิบายความรุนแรงของการก่อโรคในแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยที่การศึกษาเกี่ยวกับ Sigma S ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* ยังไม่มีการศึกษามาก่อน รวมทั้งผู้วิจัยมีการสร้าง *B. pseudomallei* mutant จึงเป็นประโยชน์ที่จะนำมาเปรียบเทียบศึกษาเพื่อให้ทราบถึงบทบาทหน้าที่และกลไกในการควบคุมการแสดงออกของ *rpoS* ที่กำหนดผลผลิต Sigma S ในเชื้อก่อโรคนี้

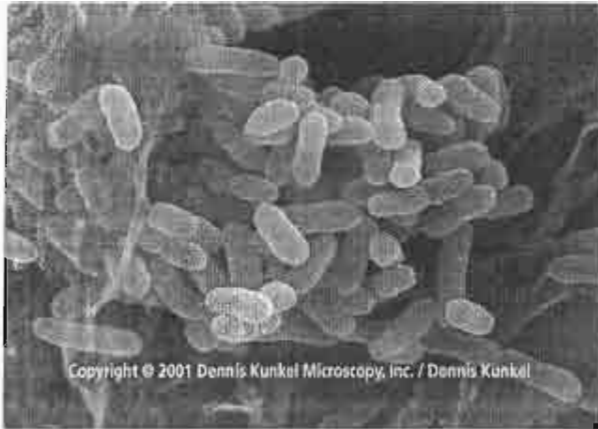
การศึกษานี้ในโครงการวิจัยนี้จะต้องการความรู้ที่เกี่ยวกับบทบาทของ Sigma S ในสภาวะต่างๆ ทั้งที่เป็นสภาวะการปรับตัวของเชื้อ *B. pseudomallei* เอง และสภาวะการเข้าสู่สิ่งแวดล้อมภายในร่างกายมนุษย์ที่มีผลต่อพยาธิสภาพเบื้องต้น ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน รวมทั้งก่อให้เกิดความเข้าใจอย่างแท้จริงในบทบาทของหน่วยโปรตีนที่มีส่วนสำคัญต่อการเกิดขบวนการถอดรหัส (Transcription) ของสิ่งมีชีวิตชั้น

ต่ำ นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังได้พัฒนาการใช้ฐานข้อมูลยีนที่มีอยู่ให้เกิดประโยชน์อันจะเป็นการส่งเสริม และสร้างนักวิจัย นักศึกษาที่เข้าร่วมในโครงการได้เกิดองค์ความรู้ ความเข้าใจและทักษะในการใช้สารสนเทศทางชีวภาพ (Bioinformatic)

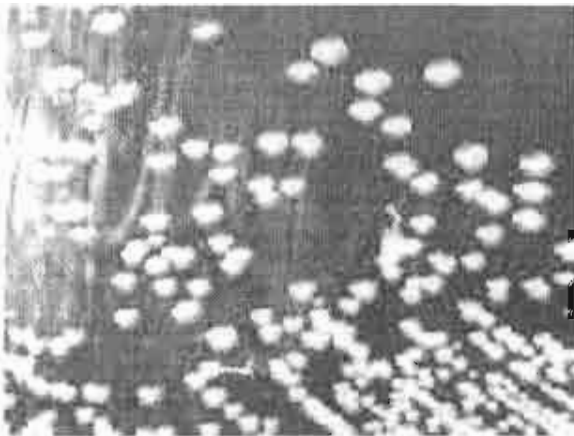
ผลจากการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ พบว่าเชื้อผ้าเหล่านี้จะมีความไวต่อสภาวะการอดอาหาร สภาวะความเครียดจากออกซิเจนทั้งชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และชนิดเมธิวไอโอโลเจนเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซิกม่า-เอสโดยการใช้โปรโมเตอร์ของยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่แสดงกระบวนการทรานสคริปชันติดตามโดยการวัดปฏิกิริยาของเบต้า-กาแลคโตไซเดส พบว่าการแสดงออกของซิกม่า-เอสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase และสัมพันธ์กับการผลิตสารหลัง Quorum sensing ในช่วงระยะเดียวกันในลักษณะการควบคุมแบบลบ อีกทั้งการแสดงออกของซิกม่า-เอสในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ได้มุ่งประเด็นการทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื่อนี้มีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกม่า-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกม่า-เอส ภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการควบคุมในเครือข่ายระหว่าง RpoS และ OxyR และเพื่อเป็นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนอื่นๆที่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านั้นโดยซิกม่า-เอส ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนของคร่อมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนของคร่อมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนของคร่อมของเชื้อที่ผ้าเหล่านี้ จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไป เมื่อเชื้อขาดยีนซิกม่า-เอส เช่นพบว่าซูปเปอร์ออกไซด์ดีสมิเตส ขาดหายไป ในเชื้อที่ผ้าเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกม่า-เอสเป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาหน้าที่ของซิกม่า-เอสของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อกิจกรรมการก่อโรคในระดับเบื้องต้นพบว่าเชื้อผ้าเหล่านี้จะไม่สามารถก่อ

สภาพพยาธิแบบ multinucleated giant cell formation และ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของเซลล์เจ้าบ้านได้ แสดงว่าเชื้อผ่านเหล่าขาดความสามารถในการสร้างไปจี้ความรุนแรงของการก่อโรคได้

(ก)



(ข)



รูปที่ 1. แสดงภาพเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (ก) และลักษณะของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารวุ้น (ข)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ระเบียบการวิจัยตามวัตถุประสงค์ที่ 1 การศึกษาบทบาทหน้าที่การทำงานของ

Sigma S

1.1 ศึกษาหน้าที่การทำงานของ Sigma S ในการปรับสภาวะการอยู่รอดอื่นๆ เช่น Oxidative stress, pH ที่เป็นกรด, การสร้างโปรตีนเอส, การสร้างไบโอฟิล์ม และอื่นๆ โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. pseudomallei* mutant เทียบกับ *B. pseudomallei* wild type ในสภาวะที่กล่าวข้างต้น เพื่อเปรียบเทียบการปรับตัวของแบคทีเรียทั้งสองนี้ว่ามีความเหมือน หรือแตกต่างกันอย่างไร ถ้าพบว่ามีเหมือนกันในการเจริญเติบโตในสภาวะนั้นๆ ได้ แสดงว่าการปรับตัวไม่ได้ผ่านการใช้ Sigma S แต่ถ้าพบว่า *B. pseudomallei* mutant มีการเจริญเติบโตได้ช้า หรือตายในสภาวะนั้นๆ ในขณะที่ *B. pseudomallei* wild type สามารถอยู่รอด แสดงว่าในสภาวะนั้นแบคทีเรียสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ผ่านการใช้ Sigma S นั้นเอง

1.2 เพื่อเป็นการยืนยันคุณสมบัติดังกล่าว จะต้องมีการนำเอาชิ้น *rpoS* กลับเข้าสู่ *B. pseudomallei* mutant เพื่อให้แบคทีเรียนี้มีชิ้นในสภาพปกติ และเมื่อมีการนำชิ้นกลับเข้าสู่ *B. pseudomallei* mutant และพบว่าสามารถอยู่รอดและปรับตัวได้เหมือน *B. pseudomallei* wild type ก็เป็นการยืนยันหน้าที่และบทบาทของ

Sigma S

2. ระเบียบการวิจัยตามวัตถุประสงค์ที่ 2 ศึกษากลไกการแสดงออกของ Sigma S

2.1 เนื่องจากมีข้อมูลในเบื้องต้นว่า Sigma S เกี่ยวข้องกับการปรับตัวในสภาวะขาดอาหารในช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุด (Starvation) ดังนั้นในการศึกษาในขั้นตอนนี้จึงต้องการศึกษากลไกการแสดงออกของยีนดังกล่าวว่าจะถูกควบคุมในระดับใด Transcription หรือ Translation โดยสร้าง Vector ที่ให้ผลผลิตเป็น RNA ที่มีชิ้น *rpoS* ที่อยู่ภายใต้ยีนรายงาน หรือยีนติดตาม (Reporter gene) และนำ plasmid ที่ได้เข้าสู่ *B. pseudomallei* mutant และเลี้ยงแบคทีเรียนี้ในสภาวะดังกล่าว จากนั้นติดตามการแสดงออกของยีนติดตามในช่วงเวลาต่างๆ เทียบกับการปรับตัวของแบคทีเรีย โดยเป็นการตามในระดับ Transcription และหา

ความสัมพันธ์กับผลผลิตในระยะเวลาเดียวกันโดยมุ่งประเด็นที่ quorum sensing production

2.2 ในกรณีการติดตามในระดับ Translation จะต้องใช้ vector ที่ให้ผลผลิตที่เป็นโปรตีน โดยมีขั้นตอนติดตามเช่นกับในข้อ 2.1

2.3 เมื่อพบว่าการควบคุมเกิดขึ้นในระดับใด ก็จะทำการศึกษาหาชิ้นที่ควบคุมในระดับนั้นๆ โดยเริ่มจากการเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่น จากนั้นนำข้อมูลมาติดตามใน *B. pseudomallei* Genome database เป็นวิธีทาง Bioinformatic จากนั้นจึงทำการโคลนยีนและสร้างผลผลิตโปรตีน เพื่อทดสอบโดยวิธี mobility shift assay กับส่วนของ promoter sequence ของ *rpoS* แต่เนื่องจากมีข้อมูลในแบคทีเรียอื่นๆ ในการควบคุมภายใต้ *rpoS* ในสภาวะความเครียดจากออกซิเจนโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นใน *B. pseudomallei* จึงนำมาทดสอบการกระตุ้นของโปรโมเตอร์ *rpoS* ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการวัดในระดับ Transcription จากนั้นหาชิ้นที่เกี่ยวข้องซึ่งได้แก่ Catalase, Oxy R และ DpsA

3. ระเบียบการวิจัยในวัตถุประสงค์ที่ 3 การศึกษาการควบคุมของ Sigma S ต่อการแสดงอยู่ของยีนทั้งก่อนและหลังยีน *ropS*

3.1 การวิจัยในวัตถุประสงค์นี้จะใช้วิธีการทางโปรตีน คือใช้การเปรียบเทียบผลผลิตโปรตีนที่สร้างจาก *B. pseudomallei* mutant เทียบกับ *B. pseudomallei* wild type ซึ่ง สมมุติฐานที่ตั้งไว้คือ ในแบคทีเรีย *B. pseudomallei* mutant น่าจะมีโปรตีนบางชนิดขาดหายไป เมื่อเทียบกับ *B. pseudomallei* wild type การวิเคราะห์โดยละเอียดจะใช้ 2-D gel electrophoresis และนำโปรตีนที่ต่างกันมาหาลำดับกรดอะมิโนเพื่อวิเคราะห์ว่าน่าจะเป็นโปรตีนอะไร มีหน้าอย่างไรได้

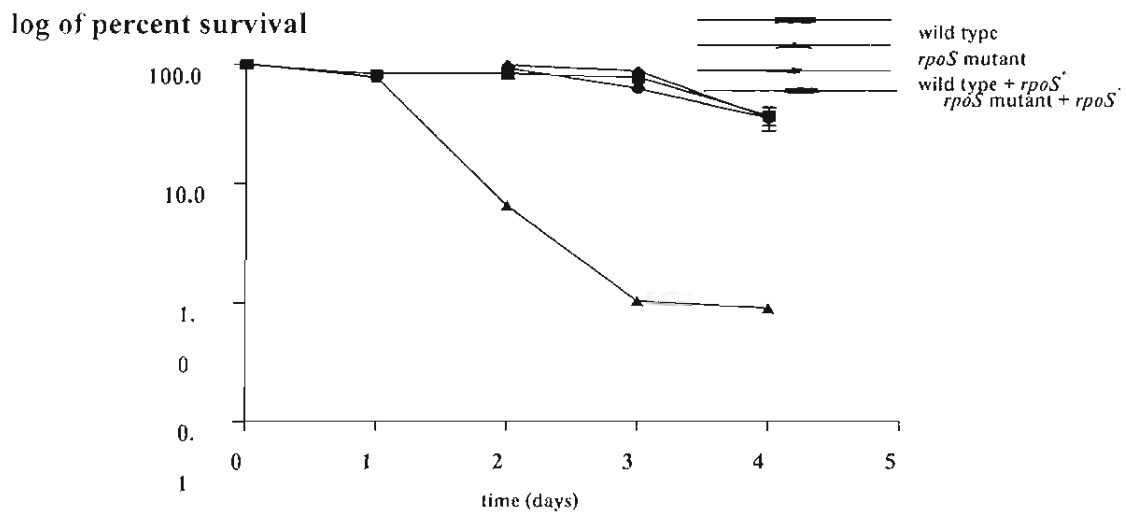
3.2 นำผลข้อ 2-D gel ที่ได้มาทำเป็นแบบแผนมาตรฐาน เพื่อให้เปรียบเทียบในกรณีอื่นๆ

ผลการวิจัย

1. การศึกษาบทบาทหน้าที่การทำงานของ Sigma S

ได้ทำการสร้างสายพันธุ์ผ้าเหล่า *rpoS* *B. pseudomallei* mutant strain จากนั้นทำการศึกษากุณสมบัติหน้าที่ของเชื้อผ้าเหล่าเปรียบเทียบกับเชื้อปกติ รวมทั้งเชื้อที่นำยีน *rpoS* กลับเข้าไปในเชื้อผ้าเหล่า โดยศึกษาหน้าที่ในสภาวะต่างๆดังนี้

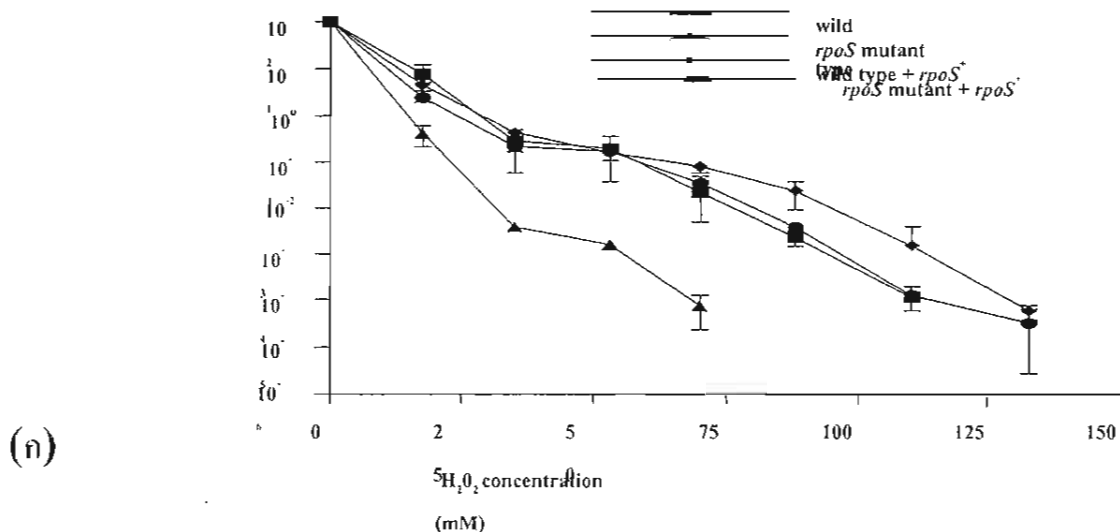
1.1 สภาวะการอดอาหาร (Starvation)



รูปที่ 2. เปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะการอดอาหาร (Starvation) ของเชื้อผ้าเหล่า *rpoS* mutant เทียบกับเชื้อปกติ

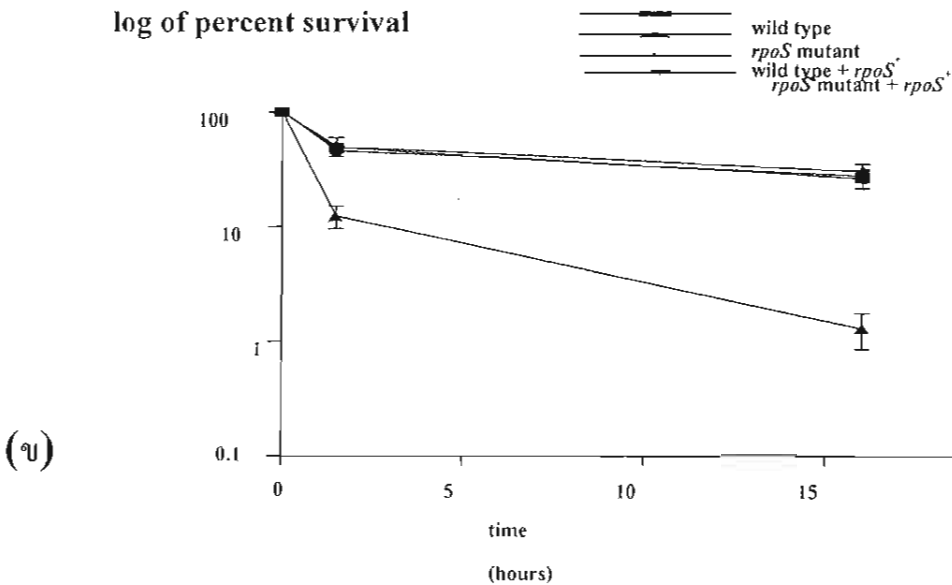
1.2 สภาวะความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

log of percent survival



1.3 สภาวะความเครียดจากเมทิลไวโอโลเจน (Methyl Viologen)

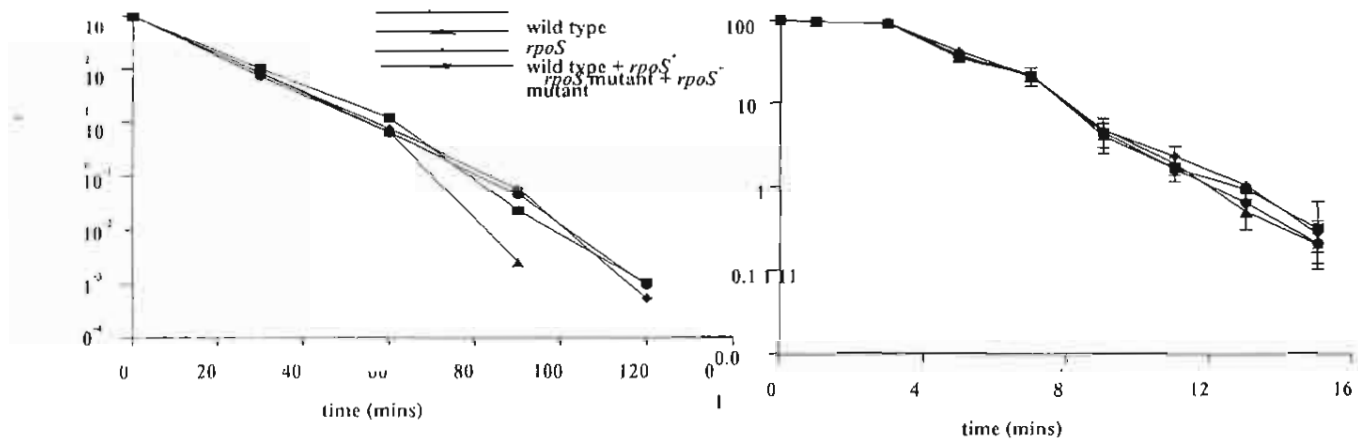
log of percent survival



รูปที่ 3.

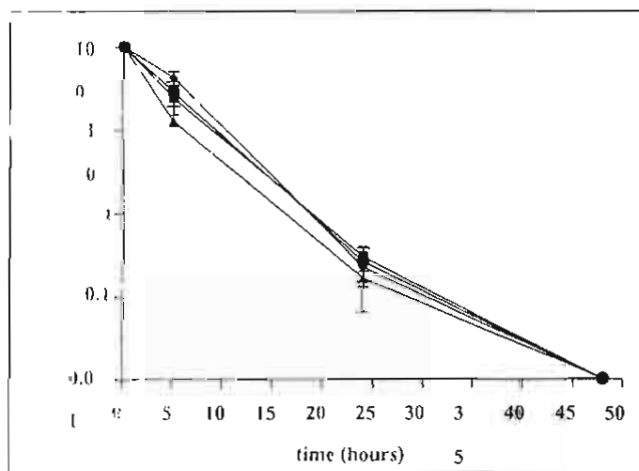
เปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในภาวะความเครียด (Oxidative stress) จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ก) และเมทิลไวโอโลเจน (ข) ของเชื้อผ่าเหล่า *rpoS* mutant เทียบกับเชื้อปกติ

1.4 สภาวะแวดล้อมอื่นๆ เช่น กรด pH 3, heat shock, hyperosmolarity และ การสร้าง Biofilm

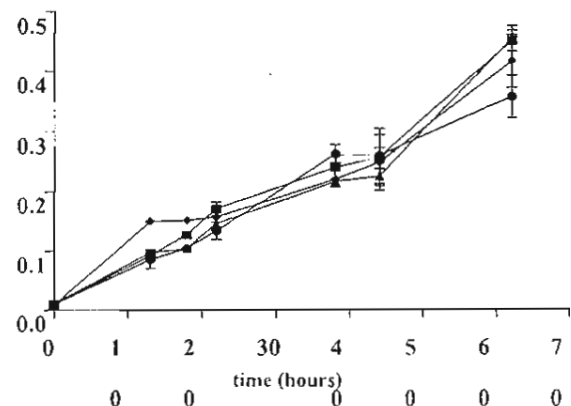


(ก)

(ข)



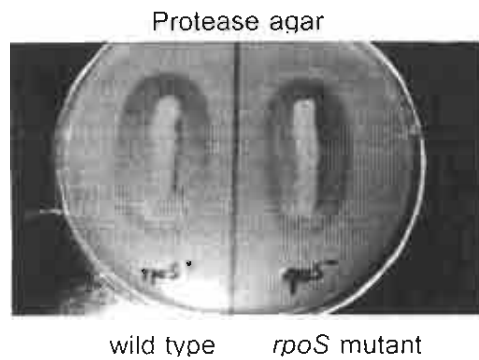
(ค)



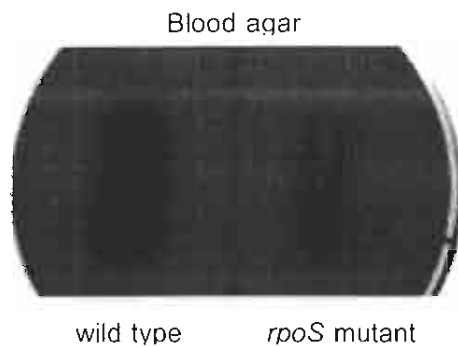
(ง)

รูปที่ 4. เปรียบเทียบสภาวะการอยู่รอดของเชื้อในภาวะกรด pH 3 (ก), heat shock (ข) , hyperosmolarity (ค) และ การสร้าง Biofilm (ง) ของเชื้อผ่าเหล่า *rpoS* mutant เทียบกับเชื้อปกติ

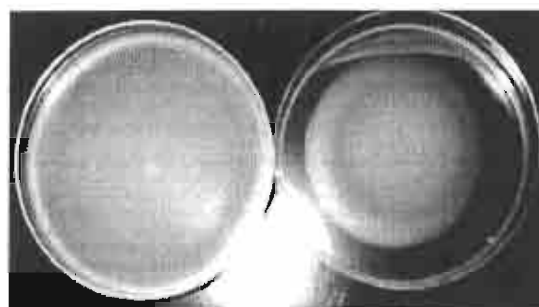
1.5 สถานะการสร้างโครงสร้างอื่นๆ เช่น Protease, Hemolysin และ Flagellin



(ก)



(ข)



(ค)

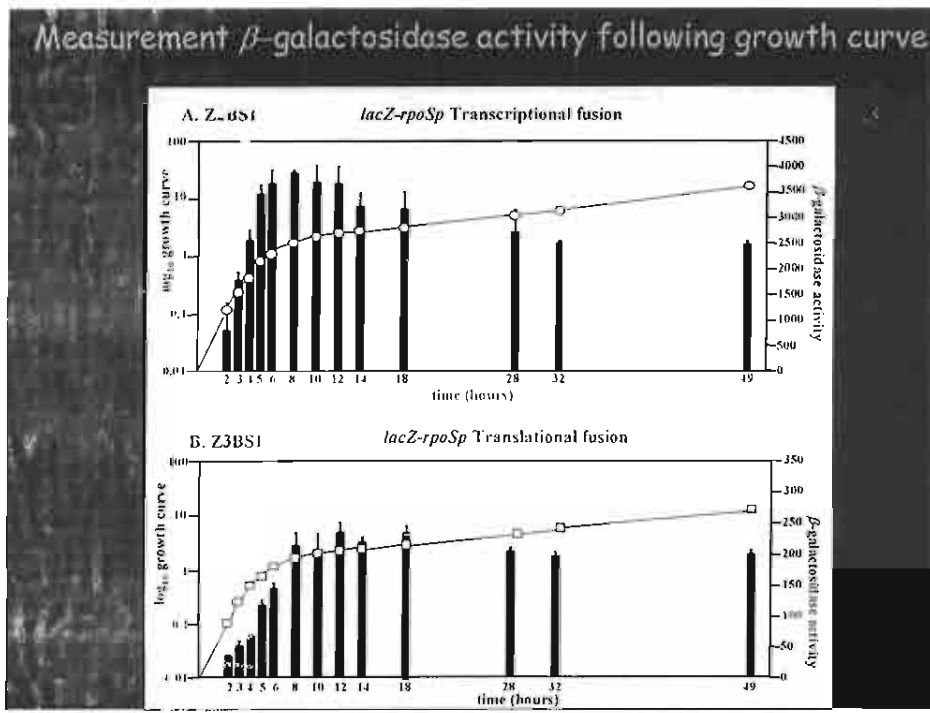
รูปที่ 5. เปรียบเทียบการสร้างสารและโครงสร้างของ Protease (ก), Hemolysin (ข) และ Flagellin (ค) ของเชื้อผ่าเหล่า *rpoS* mutant เทียบกับเชื้อปกติ

จากการศึกษานี้พบว่าหน้าที่และบทบาทของ *rpoS* เกี่ยวข้องโดยตรงต่อสภาวะการอดอาหาร และสภาวะความเครียดจากออกซิเจน ทั้งชนิด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเมธิลไวโอโลเจน ส่วนสภาวะอื่นๆไม่เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

2. ศึกษากลไกการแสดงออกของ Sigma S

โดยการนำเอาส่วนโปรโมเตอร์ของยีน *rpoS* มาต่อเข้ากับพาหะที่วัดการแสดงออกของยีนในระดับ Transcription และพาหะที่วัดการแสดงออกของยีนที่ระดับ Translation ที่มีส่วนของ beta-galactosidase เป็น reporter

2.1 ทำการตรวจวัดการแสดงออกของ ยีน *rpoS* ในระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งพบว่า เชื้อจะมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้สูงสุดที่ Stationary phase และระดับการควบคุมยีนกับระดับ Transcription ดังแสดงในรูปที่ 6

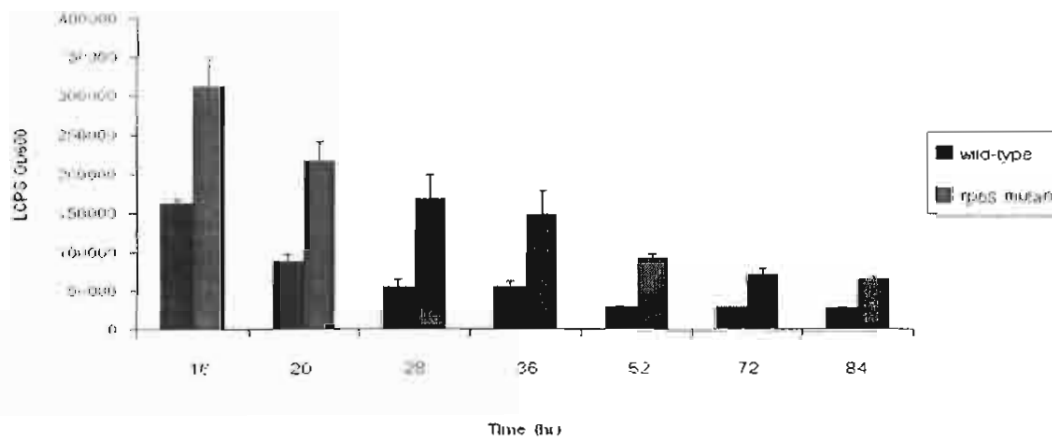


รูปที่ 6. แสดงการติดตามการแสดงออกของยีน *rpoS* (กราฟแท่ง) ในระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ (เส้น—○) ในระดับ Transcription (บน) และ Translation (ล่าง)

2.2 ติดตามการแสดงออกของยีน *rpoS* ของเชื้อที่ผ่าเหล่าจากการขาดยีน quorum sensing (I, autoinducer synthase) และ ทดสอบแบบยืนยันในการติดตามการสร้าง quorum sensing โดยการวัด Autoinducer product (AHL) ของเชื้อที่ผ่าเหล่าจากการขาดยีน *rpoS* ซึ่งผลที่ได้พบว่า *rpoS* และยีน I มีการควบคุมกันแบบลบ Negative Regulation

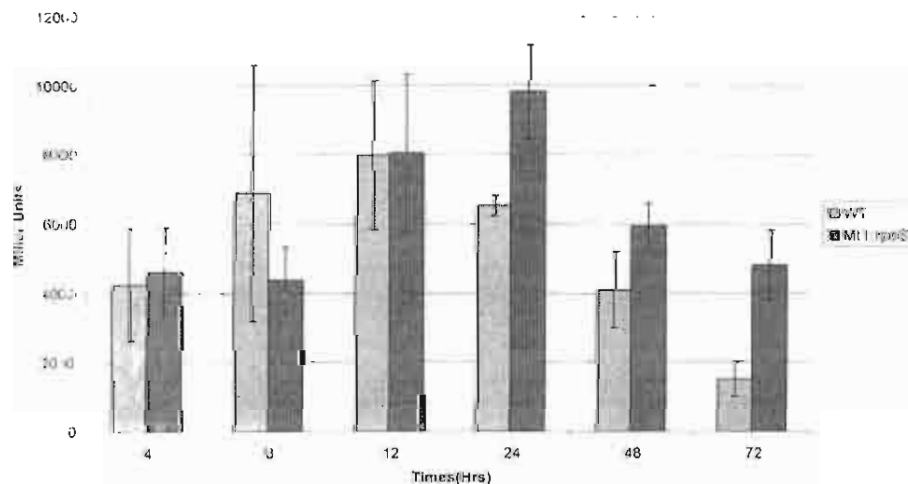
(ก)

N-acyl homoserine lactone production



(ข)

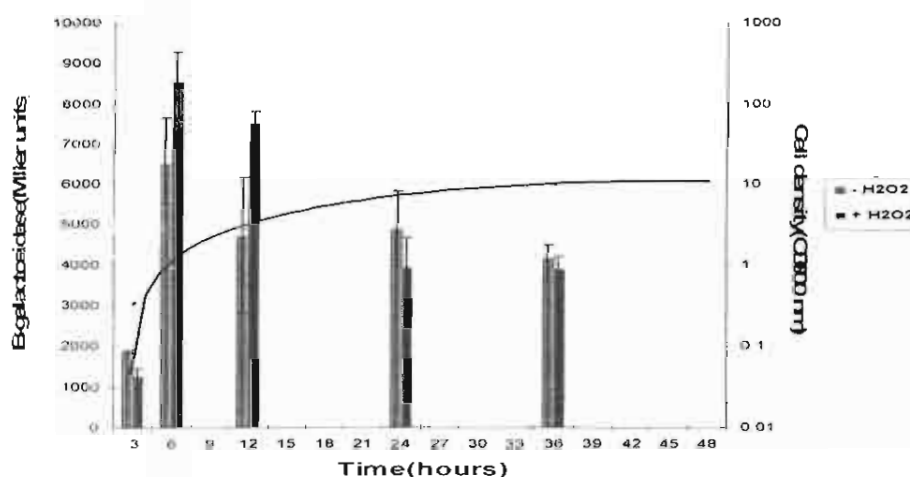
Beta galactosidase production



รูปที่ 7. กราฟแสดงผลการแสดงออกของ AHL ภายใต้ การควบคุมโดย *rpoS* (ก) และ ผลการแสดงออกของ *rpoS* ภายใต้ระบบ quorum sensing (ข)

- 2.3 ติดตามการแสดงออกของยีน *rpoS* ภายใต้สภาวะความเครียดจากออกซิเจนโดยกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลที่ได้พบว่าการแสดงออกของยีน *rpoS* จะเพิ่มขึ้นในระดับ Transcription เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase ดังแสดงในรูปที่ 8.

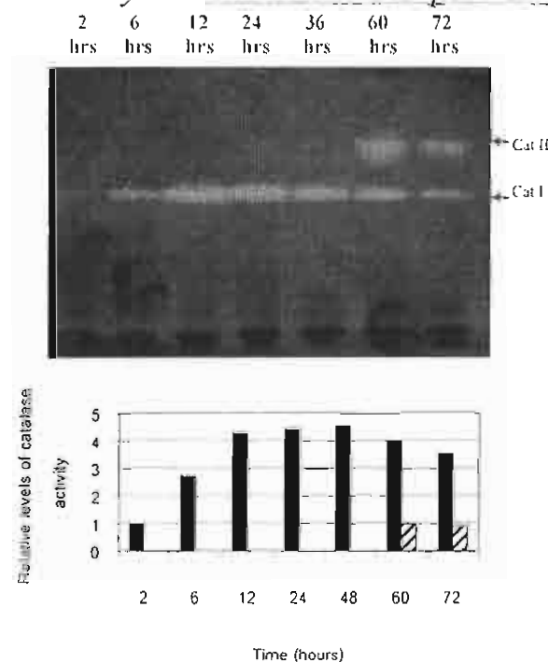
Result



รูปที่ 8. แสดงการติดตามการแสดงออกของยีน *rpoS* ของเชื้อปกติที่ไม่ถูก (กราฟแท่งสีเทา) และที่ถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (กราฟแท่งสีดำ) ในระยะการเจริญเติบโตของเชื้อ (เส้น) ในระดับ Transcription

2.4 การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *rpoS* ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนหรือกลุ่มยีน จากการใช้ข้อมูลทาง bioinformatics และการเทียบหาข้อมูลที่มีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าบทบาทของ *rpoS* ในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress คือ Catalase ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งประเด็นในการศึกษาการแสดงออกของ Catalase ในเชื้อนี้ โดยใช้การวิเคราะห์เอ็นไซม์ด้วยการแยกบนกระดเสไฟฟ้าและใช้ Activity staining ซึ่งพบว่าเชื้อนี้มี Catalase 2 ชนิด คือ Catalase I และ Catalase II และยังพบว่า Catalase I แปรรหัสจากยีน *katG* ส่วน Catalase II แปรรหัสจากยีน *katE* (โดยการสร้างเชื้อที่เก่าเล่าจากการขาดยีน *katE* ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยจากกลุ่ม ดร.สุวิทย์ ล้อประเสริฐ) ดังแสดงในรูปที่ 9.

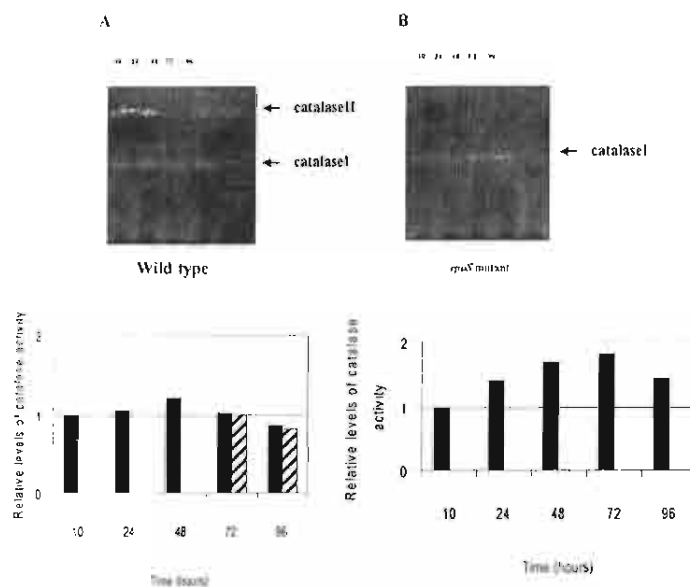
Catalase activity in Burkholderia pseudomallei



รูปที่ 9. แสดงชนิดของเอ็นไซม์ Catalases, Catalase I และ Catalase II โดยการใช้ Native gel electrophoresis activities assay (บน) และการเปรียบเทียบระดับการทำงานของเอ็นไซม์ที่ระยะการเจริญของเชื้อ (ล่าง)

2.5 การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *rpoS* ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน Catalases พบว่า *rpoS* ควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ Catalase II โดยตรง เพราะเมื่อเชื้อขาดยีน *rpoS* ก็จะไม่พบการทำงานของ Catalase II ส่วน Catalase I จะถูกควบคุมจาก *rpoS* ในช่วงที่เชื้อเริ่มเข้าสู่ Stationary phase และในภาวะที่เชื้อไม่มี *rpoS* เอ็นไซม์ Catalase I จะทำงานมากขึ้น เพื่อชดเชยการทำงานของ Catalase II ดังแสดงในรูปที่ 10

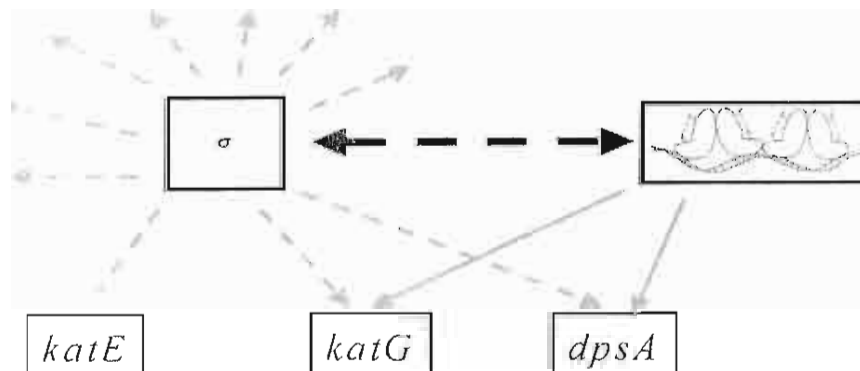
Catalase activity



รูปที่ 10. แสดงการทำงานของเอ็นไซม์ Catalase I และ Catalase II (บน) ของเชื้อปกติ (A) เทียบกับเชื้อผ่าเหล่า (B) และระดับการทำงานของเอ็นไซม์ในรูปบน (ล่าง)

2.6 การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *rpoS* ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนหรือกลุ่มยีน Catalases ในสภาวะ oxidative stress ที่เชื้อถูกกระตุ้นด้วย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งพบว่า RpoS จะควบคุมการแสดงออกของเอ็นไซม์ Catalase ทั้ง 2 ชนิดที่ต่างกัน โดยที่ Catalase II หรือ Kat E ถูกควบคุมให้มีการแสดงออกโดยตรงจาก RpoS ในช่วงระยะของการเจริญของเชื้อที่แก่มาก (late stationary phase) และไม่สามารถถูกกระตุ้นด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ Catalase I หรือ Kat G ถูกควบคุมด้วย RpoS แบบเบ และลักษณะอ้อม โดยกรณีที่เชื้อขาด *rpoS* การแสดงออกของ Kat G จะมากขึ้นในระยะการเจริญที่ Log phase

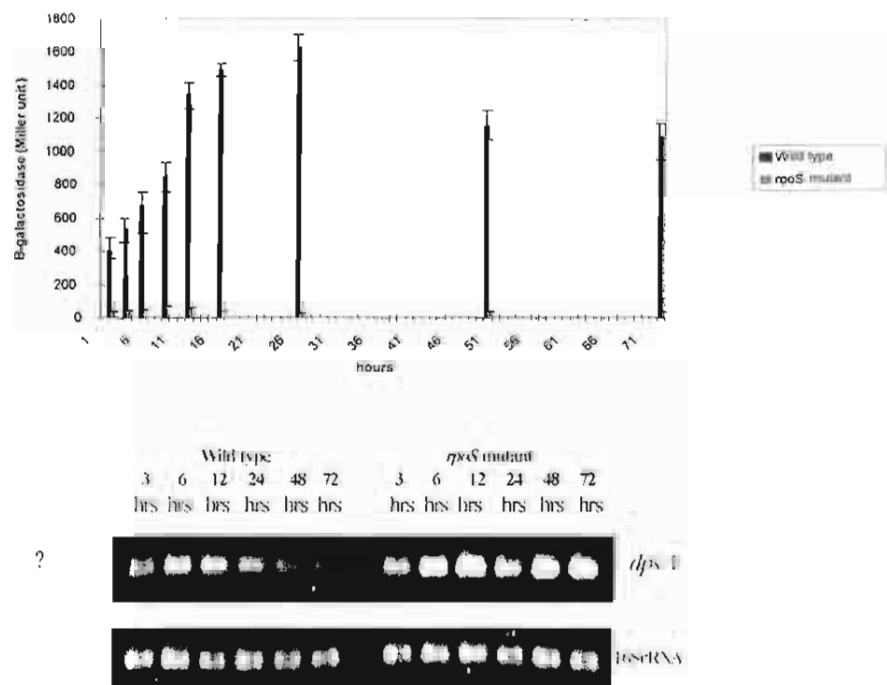
เนื่องจาก Kat G เป็นผลผลิตของยีน *katG* ซึ่งอยู่ใน operon ที่ควบคุมโดย *OxyR* ดังนั้นจึงทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระบบการควบคุมของ *rpoS* กับ ระบบ *OxyR* ดังแสดงใน รูปที่ 11



รูปที่ 10. แสดงการควบคุมการแสดงออกของยีนภายใต้ระบบ *rpoS* และระบบ *OxyR* รวมทั้งสมมุติฐานความสัมพันธ์ระหว่าง 2 ระบบในภาวะ oxidative stress

2.7 ในการศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ *rpoS* และระบบ *OxyR* โดยการติดตามการแสดงออกของยีน *katG* และ *dpsA* พบว่าการแสดงออกของ DpsA จะขึ้นกับ RpoS ดังแสดงในรูปที่ 12

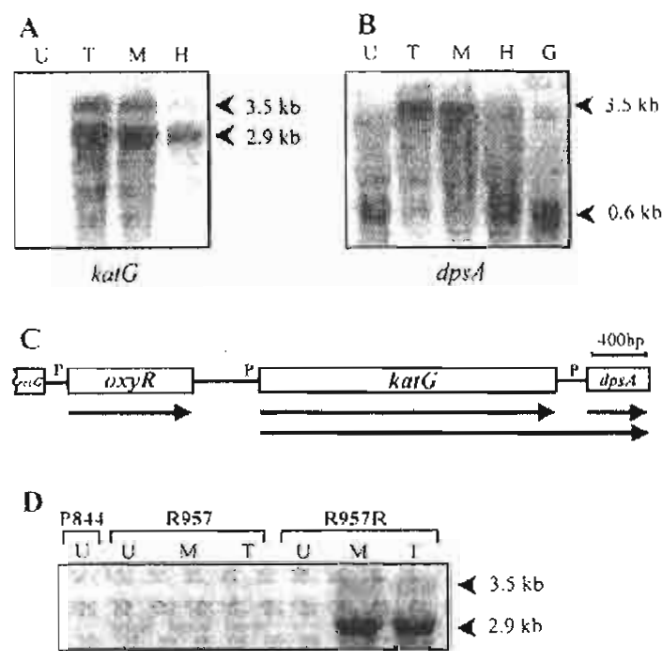
Results



รูปที่ 12. แสดงผลการแสดงออกของยีน *dpsA* ในเชื้อปกติ เทียบกับ *rpoS* mutant โดยเทียบกับการติดตามโปรโมเตอร์ (รูปบน) กับการสร้างผลผลิต RNA, RT-PCR (รูปล่าง, มีแถบล่างสุดเป็น positive control)

2.8 จากการหาความสัมพันธ์ของ ระบบ *rpoS* และระบบ *OxyR* โดยการติดตามการแสดงออกของยีน *katG* และ *dpsA* เพื่อให้เป็นการยืนยันว่าการแสดงออกของ *dpsA* เกี่ยวข้องโดยตรงกับการแสดงออกของ *katG* ภายใต้ออกซิเจน หรือเป็นแบบอิสระภายใต้ออกซิเจน *rpoS* จึงได้ทำการศึกษารหัสพันธุกรรม แล้วนำมาติดตามด้วยยีน *katG* และ *dpsA* โดยวิธี Northern Blot hybridization ดังแสดงในรูปที่ 13

ผลที่ได้สรุปได้ว่า *dpsA* สามารถแสดงออกได้ทั้งภายใต้ออกซิเจน และ เป็นแบบอิสระภายใต้ออกซิเจน *rpoS*



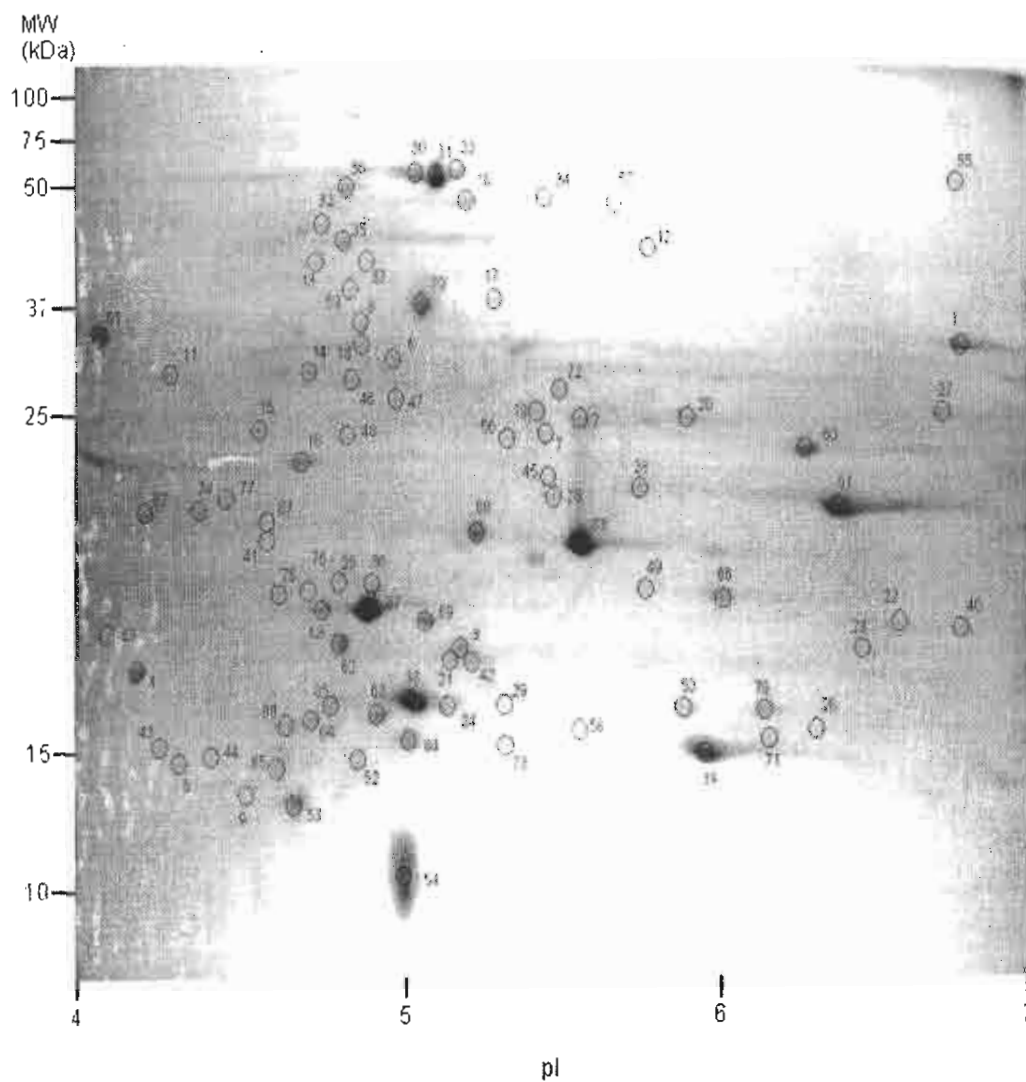
รูปที่ 13 ผลการทำ Northern Blot hybridization ที่ติดตามด้วย *katG* (A) และ *dpsA* (B) และภาพสรุปโครงสร้างการเรียงตัวของ *katG* และ *dpsA* และภาพ (D) เป็นผลการแสดงออกของ *katG* และ *dpsA* เมื่อเชื้อถูกกระตุ้นด้วย oxidative stress

3. การศึกษาการควบคุมของ Sigma S ต่อการแสดงอยู่ของยีนทั้งก่อนและหลังยีน

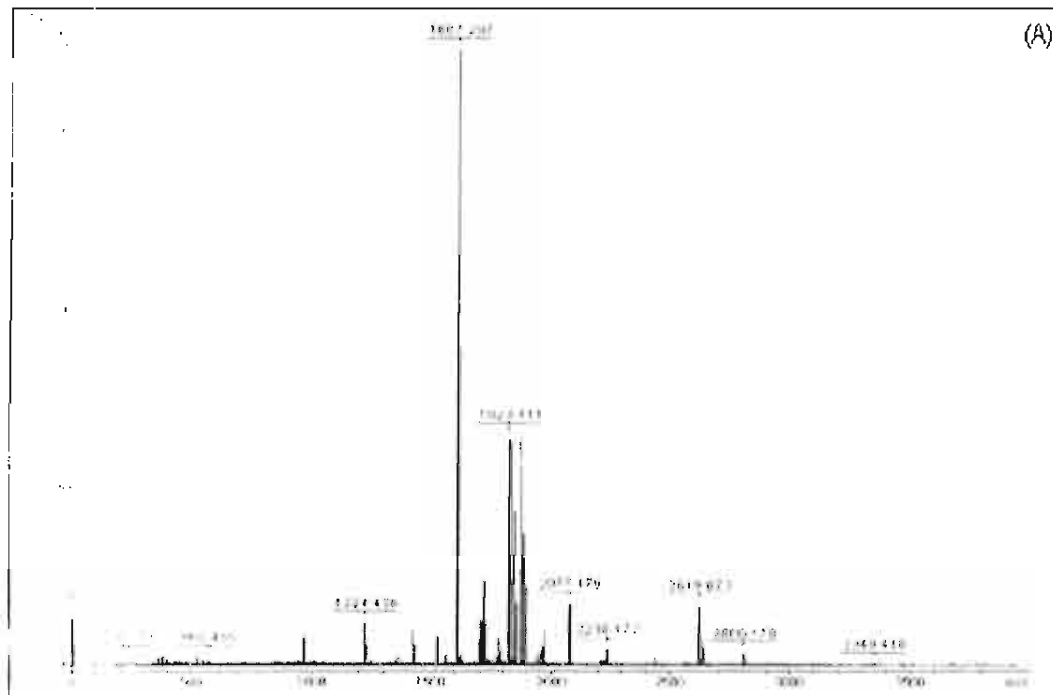
ropS

จุดมุ่งหมายในการศึกษาในวัตถุประสงค์นี้ เพื่อจะได้สืบหา ยีน หรือการ
แสดงออกของ ยีน และกลุ่มยีนอื่นๆที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ Sigma S ทั้ง
แบบก่อน และหลัง หรือ เพิ่ม และลด (Up and Down regulation) ที่ยังไม่มี
การค้นพบหรือรายงานมาก่อน โดยอาศัยเทคนิคทาง 2-D gel
electrophoresis ซึ่งจะสามารถวิเคราะห์โปรตีน หรือ กลุ่มโปรตีนที่ถูก
แสดงออกภายใต้การควบคุมของ Sigma S ได้

- 3.1 ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาแบบแผนของโปรตีนของเชื้อปกติใน
ภาวะที่มีการเจริญเติบโตช่วง Stationary phase เพื่อจัดทำเป็นแผนที่
อ้างอิง (Reference map) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ตำแหน่งของโปรตีน
ต่างๆใน 2-D gel ที่ย้อมด้วย comassei blue จำนวน 550 ตำแหน่ง
และวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ได้ 88 ตำแหน่ง ด้วยวิธี MALDI-TOF
MS ซึ่งแสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 14 และรูปที่ 15 แสดงผล
ตัวอย่างการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ด้วย MALDI-TOF MS โดย
พบว่า ในจำนวน 88 ตำแหน่ง มีโปรตีนแตกต่างกัน 77 ชนิด ในช่วงของ
pI 4-7 และขนาดของโปรตีน 20- 100 kDa ดังแสดงในรูปที่ 14
โดยพบชนิดของโปรตีนที่เป็นทั้ง membrane, metabolic, stress และ
อื่นๆ ดังสรุปเป็นตารางที่ 1 ส่วนในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่ามีโปรตีน
บางชนิดที่ทำการวิเคราะห์มีลักษณะของประจุ และ/หรือขนาดใน
ตำแหน่งที่แตกต่างได้ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนเหล่านั้นมี isoform pattern



รูปที่ 14. แสดงแบบแผนโปรตีนองค์รวมใน 2-D gel electrophoresis ที่ pI 4-7 และ M.W. 10-100 kDa จุดที่วงไว้เป็นตำแหน่งโปรตีนที่นำไปศึกษาโดย MALDI-TOF MS ซึ่งทั้งสิ้น 88 โปรตีนได้แสดงผลในตารางที่ 1



YF_109293. 80 kDa chaperonin, *B. pseudomallei*; Score 126

Start	End	Observed	Mr (exp1)	Mr (calc)	Delta	Rank	Sequence
5	13	966.17	963.17	964.46	0.71	0	DVVPGDSAR
16	28	1373.27	1372.26	1372.74	0.48	0	NVEGRVILARVK Oxidation (K)
81	101	2077.10	2076.17	2077.03	-0.06	0	TSDNAGDGTTATVLAQSIVR
105	117	1357.25	1356.94	1356.61	0.36	0	YVASGNPHDLK 2 Oxidation (K)
113	161	1809.16	1808.16	1808.91	-0.76	0	GLAQVGAISANDSSIGDR
167	197	1823.11	1822.10	1822.84	0.74	0	SLADELDVVEGRHFDNR
182	197	1839.08	1838.07	1838.84	-0.77	0	SLADELDVVEGRHFDNR Oxidation (K)
196	218	1527.17	1526.17	1526.74	-0.57	0	GLSPYTHNFDK
211	225	1721.24	1720.23	1720.95	-0.72	0	QVAVLEKRPVLIHDK
212	227	1224.14	1223.43	1223.71	-0.28	0	DLLPVLEQVAK
287	311	2631.18	2630.18	2630.17	-0.19	0	ASHLEDAITGLQVIAETVLTLEK (b1/b2) (100.0%)
320	345	1672.18	1671.17	1671.92	-0.75	0	EHTTIIQGAGEAVHIEAR
351	362	1427.17	1426.16	1426.62	-0.46	0	LTTERATSDYDR
365	421	1607.30	1606.29	1606.90	-0.61	0	AAVEEGIVPGGEVALIR
424	441	1713.21	1712.20	1712.91	0.70	0	VATAGLTGVRADQHAGIK
451	471	1969.20	1968.19	1969.05	-0.06	0	QIVYNGGEKASVVVAARAKK
453	473	1970.21	1969.20	1969.05	0.16	0	QIVYNGGEKASVVVAARAKK

รูปที่ 15. แสดงผลตัวอย่างการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีน ด้วย MALDI-TOF MS

Table 1. Identification of *Burkholderia pseudomallei* proteins in non-redundant sequence databases (National Center for Biotechnology) using Mascot search engine and data from MALDI-TOF mass spectrometry

Functional: category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Cell surface				
Perin related exported protein (OmpC)	1	YP_111684	7.78/6.75	40.1/34.5
Mechanosensitive ion channel (YggB)	2	AAK49791	10.2/5.60	29.3/25.0
Phosphatidyl ethanolamine-binding protein	3	YP_107676	5.26/5.20	18.3/18.5
Bacterial cell wall degradation protein (LysM)	4	YP_108071	4.54/4.20	16.4/17.5
Invasion protein B family (SpaK)	5	YP_111548	4.61/4.31	15.2/14.5
Invasion plasmid antigen (IpaD)	6	YP_111535	5.13/5.02	34.0/33.0
Chitin binding protein (CbpD)	7	YP_104403	5.96/5.50	24.0/24.5
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	8	YP_111434	9.80/4.89	34.6/36.0
Outer membrane protein a precursor (OmpA)	9	YP_109118	9.51/4.50	24.3/13.5
Energy metabolism				
Phosphoglucosyltransferase	10	YP_109262	5.23/5.25	50.2/49.5
Thioredoxin protein	11	YP_107481	4.71/4.29	33.4/32.0
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate synthase	12	YP_109433	5.97/5.79	39.1/44.0
Enolase (Eno)	13	YP_108866	4.81/4.69	45.9/42.5
Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	14	YP_109094	4.86/4.75	31.6/32.5
Family C56 unassigned peptidase	15	YP_110733	4.72/4.56	23.9/24.5
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B	16	YP_108552	4.70/4.69	22.3/24.0
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	17	ZP_00221810	5.22/5.33	42.4/37.0
Family M19 non-peptidase homologue	18	YP_110569	5.77/4.88	36.1/35.0
Enoyl-CoA hydratase (PaaG)	19	YP_109638	5.31/5.43	28.5/26.5
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A	20	YP_108553	5.56/5.93	25.4/25.0
Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	21	YP_107960	5.76/5.16	32.5/18.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	22	YP_108841	5.94/6.60	17.9/19.0
NADPH-dependent FMN reductase	23	YP_112348	6.51/6.45	20.3/18.5
ATP synthase epsilon chain	24	YP_109988	5.11/5.18	14.9/17.0
Riboflavin synthase alpha chain	25	YP_109221	5.49/4.81	21.7/20.5
Rhodanese-related sulfurtransferases (GlpE)	26	YP_108915	7.82/6.39	18.0/15.5
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	27	YP_110641	6.19/6.72	30.2/25.0
Sedoheptulose 7-phosphate isomerase	28	YP_109390	5.58/5.75	21.0/23.0

Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Glyoxalase family protein	29	YP_103534	5.55/5.35	16.2/16.5
Cellular process as				
60 kDa chaperonin	30	YP_109293	5.13/5.09	57.1/57.0
60 kDa chaperonin	31	YP_109293	5.13/5.14	57.1/57.0
60 kDa cheperonin	32	YP_109293	5.13/4.73	57.1/47.5
GroEL	33	AAO46033	5.18/5.25	56.5/57.0
GroEL	34	AAO46033	5.18/5.50	56.5/50.0
GroEL	35	AAO46033	5.18/4.77	56.5/45.0
Chaperonin GroEL	36	AAG32927	5.13/4.85	57.2/55.0
Cell division protein (FtsZ)	37	YP_109616	4.87/4.85	41.7/42.0
HSP20/alpha crystallin family protein	38	YP_112291	5.14/5.06	16.0/16.0
10 kDa chaperonin (GroES)	39	YP_109294	5.78/5.95	10.5/15.0
Heat shock Hsp20-related protein	40	YP_109511	6.30/6.77	15.2/19.0
Heat shock protein (GrpE)	41	YP_109423	4.78/4.58	19.7/21.5
Regulatory functions				
DnaK suppressor protein (DksA)	42	YP_106833	5.26/5.25	16.1/18.0
Response regulator protein (AmiR)	43	YP_111254	5.36/4.25	22.0/15.5
Multiple antibiotic resistance regulatory protein (MarR)	44	YP_111785	5.36/4.41	17.0/15.0
Response regulator protein (TtrR)	45	YP_108899	5.40/5.49	23.7/23.0
Regulatory protein (IcIR)	46	YP_108891	8.45/4.84	29.9/30.5
Sigma54-dependent transcription suppressor (PspA)	47	YP_108702	5.11/5.05	24.5/29.5
Response regulator protein	48	YP_110651	5.26/4.85	26.9/24.5
Replication				
Single-strand binding protein (SSB)	49	YP_107172	5.51/5.77	18.7/20.0
Nucleoside diphosphate kinase	50	YP_108130	5.61/5.89	15.6/15.5
Transcription				
Transcription elongation factor (GreA)	51	YP_107977	4.50/4.10	17.0/19.0
Transcription initiation factor	52	YP_111848	5.04/5.35	13.1/15.0

Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Translation				
50S ribosomal protein L7/L12	53	YP_109816	5.10/4.64	11.1/13.0
50S ribosomal protein L7/L12	54	YP_109816	5.10/5.00	11.1/11.0
tRNA nucleotidyltransferase	55	YP_106892	7.25/6.75	45.2/55.0
Peptidyl-tRNA hydrolase	56	YP_107145	9.22/5.35	22.0/24.5
Seryl-tRNA synthetase	57	YP_109196	5.53/5.70	47.7/50.0
Translation initiation inhibitor (TdcF)	58	YP_112061	5.30/5.60	14.4/15.5
Stress responses				
Calcineurin-like phosphoesterase	59	YP_110898	9.96/4.77	43.0/38.5
Oxidoreductase (AhpC)	60	YP_109344	5.75/6.29	23.9/24.0
Phasin-like protein (PhaZ)	61	YP_108894	5.96/6.41	19.9/22.0
Phasin-like protein (PhaZ)	62	YP_108894	5.96/4.83	19.9/18.5
Phasin-like protein (PhaZ)	63	YP_108894	5.96/4.95	19.9/15.5
Phasin-like protein (PhaZ)	64	YP_108894	5.96/4.70	19.9/15.5
Phasin-like protein (PhaZ)	65	YP_108894	5.96/4.58	19.9/15.0
Superoxide dismutase (SodA)	66	YP_107505	5.74/6.00	21.1/20.0
Hydroperoxide reductase	67	YP_108693	5.05/4.91	20.5/19.5
Hydroperoxide reductase	68	YP_108693	5.05/4.79	20.5/19.5
Thiol peroxidase (Tpx)	69	YP_109581	5.12/5.14	17.4/19.0
Universal stress-related protein (UspA)	70	YP_110056	5.78/6.14	16.6/15.5
Glyoxalase/Bleomycin resistance/Dioxygenase superfamily	71	YP_110250	5.75/6.20	14.8/15.5
Phage-related proteins				
Phage-related DNA polymerase	72	YP_108778	5.10/5.52	30.5/30.0
Bacteriophage tail completion protein R (GpR)	73	YP_111086	4.32/5.43	15.2/15.0
Unknown function				
Uncharacterized conserved protein	74	YP_107552	4.64/4.38	23.9/22.0
Uncharacterized conserved protein	75	YP_109700	6.43/4.62	18.4/20.0
Uncharacterized conserved protein	76	YP_110194	4.85/4.70	20.7/20.0
Uncharacterized conserved protein	77	YP_109289	4.67/4.49	20.7/22.5
Uncharacterized conserved protein	78	YP_107931	4.72/5.50	22.1/22.5

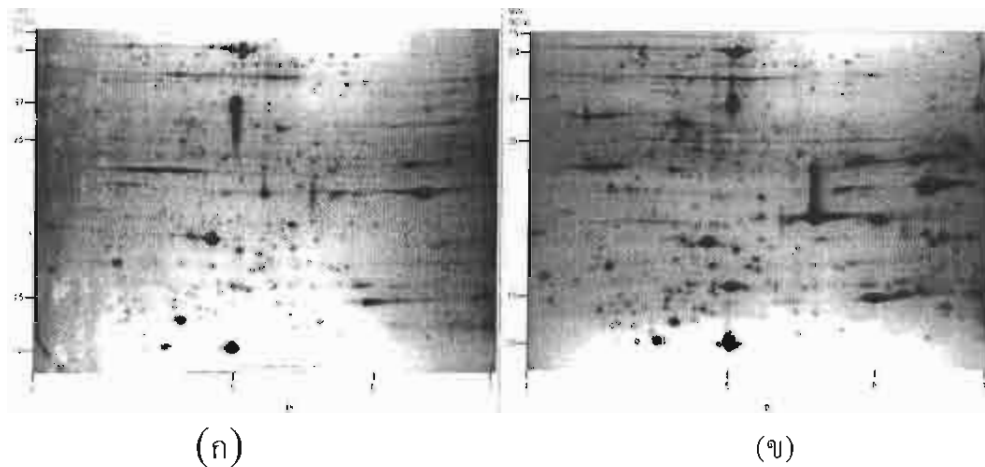
Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Hypothetical proteins				
Hypothetical protein BPSL1549	79	YP_108169	5.14/5.09	23.4/37.0
Hypothetical protein BPSL1549	80	YP_108169	5.14/5.25	23.4/22.0
Hypothetical protein BPSL1958	81	YP_108556	4.38/4.10	36.1/35.5
Hypothetical protein BPSL0348	82	YP_106975	6.59/4.21	28.0/22.0
Hypothetical protein BPSS0212	83	YP_110232	5.34/5.60	22.5/21.5
Hypothetical protein BPSS0683	84	YP_110696	5.09/5.04	13.1/15.0
Hypothetical protein BPSL0599	85	YP_107228	4.94/4.75	13.9/16.0
Hypothetical protein BPSL0349	86	YP_106976	5.04/4.89	20.3/20.5
Hypothetical protein BPSL0213	87	YP_110233	6.65/4.58	21.7/22.0
Hypothetical protein BPSL1431	88	YP_111443	5.91/4.60	17.2/16.5

Table 2. Summary of the proteins which have isoforms

Protein name	Spot number	Modification
60 kDa chaperonin	30-32	Charge and mass differences
GroEL	33-35	Charge and mass differences
50S ribosomal protein L7/L12	53-54	Charge and mass differences
Phasin-like protein (PhaZ)	61-65	Charge and mass differences
Hydroperoxide reductase	67-68	Charge difference
Hypothetical protein BPSL1549	79-80	Charge and mass differences

3.2 การวิเคราะห์หาโปรตีน หรือกลุ่มของโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของยีน *rpoS* โดย 2-D gel electrophoresis เทียบกับ reference map จากการที่มีแผนที่โปรตีนองค์รวม จึงได้นำมาเป็นแผนที่เพื่อเปรียบเทียบกับแบบแผนโปรตีนของเชื้อที่ขาด ยีน *rpoS* และวิเคราะห์หาผลผลิตโปรตีนที่ขาดหายไป ก็สามารถระบุได้ว่ามีโปรตีนใดหรือยีนใดที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ ยีน *rpoS* โดยผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 16. และโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ ยีน *rpoS* ได้สรุปในตารางที่ 3



รูปที่ 16. แสดงแบบแผนของโปรตีนรวมระหว่าง เชื้อที่ขาด ยีน *rpoS* (ก) เทียบกับเชื้อปกติ (ข)

ตารางที่ 3. Global analysis of the *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulon by proteomics

Spot pattern	No. of spots	% of total spots
Total number of spots	475	100
Spots unique in wild-type	26	5.5
Spots unique in $\Delta rpoS$	16	3.4
Spots upregulated in wild-type	155	32.6
Spots upregulated in $\Delta rpoS$	37	7.8

a. Spots of wild-type plus spots that are exclusively present in the *rpoS* mutant.

The protein spot pattern of the wild-type was compared with that of the *rpoS* mutant. The wild-type spot pattern was used as reference for protein matching by using the PDQuest software version 7.2 (Bio-rad). Only spots that differed in intensities by at least 3.0 fold were considered.

Figure 4. Identification of RpoS-regulated proteins by MALDI-TOF MS peptide mass fingerprinting

Functional category and protein name	Spot number	Regulation	Accession number	Theor/exp pI	Theor/exp MW (kDa)
Cell surface					
Mechanosensitive ion channel (YggB)	6510	Up	AAK49791	10.2/5.61	29.3/25.0
Invasion protein B family (SpaK)	3706	Up	YP_111548	4.61/4.31	15.2/14.5
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	1109	Up	YP_111434	9.80/4.89	34.6/36.0
Energy metabolism					
Endolase (Eno)	3371	Up	YP_108866	4.81/4.69	45.9/42.5
Family C56 unassigned peptidase	2502	Up	YP_110733	4.72/4.56	23.9/24.5
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	5710	Down	ZP_00221810	5.22/5.33	42.4/37.0
Enoyl-CoA hydratase (PaaG)	6502	Down	YP_109638	5.31/5.43	28.5/26.5
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A	7503	Up	YP_108553	5.56/5.93	25.4/25.0
Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	5201	Up	YP_107960	5.76/5.16	32.5/18.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	9302	Up	YP_108841	5.94/6.60	17.9/19.0
NADPH-dependent FMN reductase	8205	Up	YP_112348	6.51/6.45	20.3/18.5
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	9606	Up	YP_110641	6.19/6.72	30.2/25.0
Glyoxalase family protein	5103	Up	YP_103534	5.55/5.35	16.2/16.5
Cellular processes					
HSP20/alpha crystallin family protein	4105	Up	YP_112291	5.14/5.06	16.0/16.0
Heat shock Hsp20-related protein	9307	Up	YP_109511	6.30/6.77	15.2/19.0
Transcription					
Transcription elongation factor (GreA)	0202	Up	YP_107977	4.50/4.10	17.0/19.0
Translation					
tRNA nucleotidyltransferase	9901	Up	YP_106892	7.25/6.75	45.2/55.0
Seryl-tRNA synthetase	6807	Down	YP_109196	5.53/5.70	47.7/50.0
Stress responses					
Phasin-like protein (PhaZ)	8402	Up	YP_108894	5.96/6.41	19.9/22.0
Phasin-like protein (PhaZ)	3205	Up	YP_108894	5.96/4.83	19.9/18.5
Phasin-like protein (PhaZ)	2104	Up	YP_108894	5.96/4.58	19.9/15.0
Superoxide dismutase (SodB)	8304	Up	YP_107505	5.74/6.00	21.1/20.0

Table 2 Continued

Functional category and protein name	Spot number	Regulation	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Glyoxalase/Bleomycin resistance/Dioxygenase superfamily	8102	Up	YP_110250	5.75/6.20	14.8/15.5
Unknown function					
Uncharacterized conserved protein	2309	Down	YP_109700	6.43/4.62	18.4/20.0
Hypothetical proteins					
Hypothetical protein BPSL1549	5303	Up	YP_108169	5.14/5.25	23.4/22.0
Hypothetical protein BPSL1958	0704	Up	YP_108556	4.38/4.10	36.1/35.5
Hypothetical protein BPSS0212	6303	Up	YP_110232	5.34/5.60	22.5/21.5
Hypothetical protein BPSL0213	2315	Up	YP_110233	6.65/4.58	21.7/22.0
Hypothetical protein BPSL1431	3101	Up	YP_111443	5.91/4.60	17.2/16.5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ พบว่าเชื้อผ่านเหล่านี้จะมีความไวต่อสภาวะการอดอาหาร สภาวะความเครียดจากออกซิเจนทั้งชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และชนิดเมธิวไอโอโลเจนเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซิกมา-เอสโดยการไฮบริดของยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่แสดงกระบวนการทรานสคริปชันติดตามโดยการวัดปฏิกิริยาของเบต้า-กาแลคโตไซเดส พบว่าการแสดงออกของซิกมา-เอสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase และสัมพันธ์กับการผลิตสารหลั่ง Quorum sensing ในช่วงระยะเดียวกันในลักษณะการควบคุมแบบลบ อีกทั้งการแสดงออกของซิกมา-เอสในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ได้มุ่งประเด็นการทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อนี้มีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกมา-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกมา-เอส ภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการควบคุมในเครือข่ายระหว่าง RpoS และ OxyR และเพื่อเป็นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนอื่นๆที่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้โดยซิกมา-เอส ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ฆ่าแล้ว จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกมา-เอส เช่นพบว่าซูเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไป ในเชื้อที่ฆ่าแล้วแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกมา-เอสเป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาหน้าที่ของซิกมา-เอสของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อกิจกรรมการก่อโรคในระดับเบื้องต้นพบว่าเชื้อผ่านเหล่านี้จะไม่สามารถก่อสภาวะพยาธิแบบ multinucleated giant cell formation และ ไม่สามารถยับยั้งการสร้าง

inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของเซลล์เจ้าบ้านได้ แสดงว่าเชื้อผ่าเหล่าขาดความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคได้

จากการศึกษาบทบาทหน้าที่การทำงานของ sigma S ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สรุปได้ว่า

1. บทบาทการทำงานของ sigma S จะเพิ่มขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตที่ early stationary phase และจะแสดงออกในระดับ Transcription ซึ่งเป็นบทบาททั่วไปที่พบในแบคทีเรียต่างๆ
2. หน้าที่ของ sigma S ที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อนี้ได้แก่
 - 2.1 สภาวะการอดอาหาร (Starvation)
 - 2.2 สภาวะความเครียดจากออกซิเจน (oxidative stress, hydrogenperoxide and methyl viologen)
3. สภาวะความเครียดจากออกซิเจน (oxidative stress โดยเฉพาะ hydrogenperoxide การแสดงออกของ sigma S ในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้น
4. ในสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ การทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกม่า-เอสโดยตรงและไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกม่า-เอส ภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
5. ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่าเหล่า จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกม่า-เอส เช่นพบว่าซูปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไป ในเชื้อที่ผ่าเหล่าแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกม่า-เอส

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ พบว่าเชื้อผ่าเหล่านี้จะมีความไวต่อสภาวะการลดอาหาร สภาวะความเครียดจากออกซิเจนทั้งชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และชนิดเมธิวไฮโดรเจนเมื่อเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ปกติ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนซิกม่า-เอสโดยการไฮโปรโมเตอร์ของยีนเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะที่แสดงกระบวนการทรานสคริปชันติดตามโดยการวัดปฏิกิริยาของเบต้า-กาแลคโตไซเดส พบว่าการแสดงออกของซิกม่า-เอสจะเพิ่มขึ้นในช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อที่ Stationary phase และสัมพันธ์กับการผลิตสารหลัง Quorum sensing ในช่วงระยะเดียวกันในลักษณะการควบคุมแบบลบ อีกทั้งการแสดงออกของซิกม่า-เอสในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเชื้อได้รับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ได้มุ่งประเด็นการทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกม่า-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกม่า-เอส ภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งผลการศึกษานี้ได้ข้อมูลใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการควบคุมในเครือข่ายระหว่าง RpoS และ OxyR และเพื่อเป็นการค้นหาชิ้นหรือกลุ่มยีนอื่นๆ ที่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านั้นโดยซิกม่า-เอส ได้ใช้เทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีนโดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่าเหล่า จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกม่า-เอส เช่นพบว่าซูปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไปในเชื้อที่ผ่าเหล่าแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกม่า-เอสเป็นต้น นอกจากนี้ในการศึกษาหน้าที่ของซิกม่า-เอสของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อกิจกรรมการก่อโรคในระดับเบื้องต้นพบว่าเชื้อผ่าเหล่าจะไม่สามารถก่อสภาพพยาธิแบบ multinucleated giant cell formation และ ไม่สามารถยับยั้งการกว้าง inducible nitric oxide synthase (iNOS) ของเซลล์เจ้าบ้านได้ แสดงว่าเชื้อผ่าเหล่าขาดความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของการก่อโรคได้

จากการศึกษาบทบาทหน้าที่การทำงานของ sigma S ในเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* สรุปได้ว่า

1. บทบาทการทำงานของ sigma S จะเพิ่มขึ้นในระยะการเจริญเติบโตที่ early stationary phase และจะแสดงออกในระดับ Transcription ซึ่งเป็นบทบาททั่วไปที่พบในแบคทีเรียต่างๆ
2. หน้าที่ของ sigma S ที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อนี้ได้แก่
 - 2.1 สภาวะการอดอาหาร (Starvation)
 - 2.2 สภาวะความเครียดจากออกซิเจน (oxidative stress, hydrogenperoxide and methyl viologen)
3. สภาวะความเครียดจากออกซิเจน (oxidative stress โดยเฉพาะ hydrogenperoxide การแสดงออกของ sigma S ในช่วงการเติบโตนี้จะเพิ่มมากขึ้น
4. ในสภาวะความเครียดจากออกซิเจนนี้ การทำงานของเอ็นไซม์แคตตาเลสของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งพบว่าเชื้อมีการสร้างเอ็นไซม์แคตตาเลส 2 ชนิด คือ ชนิด I ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat G* และ ชนิด II ซึ่งแปลรหัสจากยีน *kat E* โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *kat E* ขึ้นกับการควบคุมของซิกม่า-เอสโดยตรง และไม่ถูกเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในขณะที่ ยีนในกลุ่มโอพอรอน *oxyR*, *kat G* และ *dps A* ถูกควบคุมโดยซิกม่า-เอส ภายในการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
5. ได้อาศัยเทคนิคการแยกโปรตีนองค์รวมแบบ 2 มิติ ร่วมกับการวิเคราะห์โปรตีน โดย MS-MALDI-TOF เริ่มจากการสร้างแผนที่อ้างอิงของโปรตีนองค์รวมจากเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงและทำการเปรียบเทียบกับแบบแผนของโปรตีนองค์รวมของเชื้อที่ผ่านแล้ว จะสามารถพบโปรตีนที่ขาดหายไปเมื่อเชื้อขาดยีนซิกม่า-เอส เช่นพบว่าซูปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเตส ขาดหายไปเมื่อเชื้อที่ผ่านแล้ว แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของซิกม่า-เอส

ผลผลิตที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ที่ตีพิมพ์แล้วและที่ตอบรับเพื่อรอการตีพิมพ์ รวม 4 เรื่อง คือ

1.1 Subsin, B., Thomas, M. S., Katzenmeier, G., Shaw, J. G.,

Tungpradabkul, S., and Kunakorn, M. (2003) Role of the stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. *Journal of Bacteriology*, 185, 7008-7014. (I.F. = 3.9)

1.2 Utaisincharoen, P., Arjcharoen, S., Limposuwan, K., **Tungpradabkul, S.**, Sirisinha, S. (2006) *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Microbial Pathogenesis* 40, 184-189. (I.F. = 2.05)

1.3 Lumjiaktase, P., Diggle, S.P., Loprasert, S., **Tungpradabkul, S.**, Daykin, M., Camara, M., William P., and Kunakorn, M. (2006) Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* (in press). (I.F. = 3.11)

1.4 Wongtrakoongate, P., Mongkoldhumrongkul, N., Chaijan, S., Kamchonwongpaisan, S., and **Tungpradabkul, S.** (2006) Comparative proteomic profiles and the potential markers between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Molecular and Cellular Probes* (in press) (I. F. = 1.588)

2. ผลงานที่กำลังรวบรวมเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ รวม 2 เรื่อง

2.1 Jangiam, W., Loprasert, S., and **Tungpradabkul, S.** Role of *Burkholderia pseudomallei* RpoS in regulation of catalase activities under hydrogen peroxide induction. *Microbiology* (I.F. = 3.11)

2.2 Jangiam, W., Loprasert, S., and **Tungpradabkul, S.** Role of *Burkholderia pseudomallei* RpoS in regulation of *oxyR*, *katG* and *dpsA* under oxidative stress. *Molecular Microbiology* (I.F. = 6.39)

3. ผลงานในการผลิตนักศึกษาในโครงการ

3.1 นักศึกษาระดับปริญญาเอก 2 คน (ภายใต้ทุน คปก. สกว.)

น.ส.เบญจมาศ ทรัพย์สิน คปก. รุ่นที่ 2

นายวิหวัศ แจ่มเอี่ยม คปก. รุ่นที่ 7

3.2 นักศึกษาระดับปริญญาโท 1 คน

น.ส. นภชนก มงคลดำรงกุล

3.3 นักศึกษาปริญญาตรี โครงการพิสิฐพิธาน และโครงการอัจฉริยภาพ (JSPT)

นายปฐมพล วงศ์ตระกูลเกต

เอกสารอ้างอิง

ดูในเอกสารในแต่ละผลงานตีพิมพ์ในภาคผนวก

1. **Reprint (1) and Manuscripts (3 and 4)**
Subsin, B., Thomas, M. S., Katzenmeier, G., Shaw, J. G.,
Tungpradabkul, S., and Kunakorn, M. (2003) Role of the stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. *Journal of Bacteriology*, 185, 7008-7014. (I.F. = 3.9)
2. **Reprint (2)**
Utaisincharoen, P., Arjcharoen, S., Limposuwan, K., **Tungpradabkul, S.**, Sirisinha, S. (2006) *Burkholderia pseudomallei* RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Microbial Pathogenesis* 40, 184-189. (I.F. = 2.05)
3. **Manuscript (3)** with accepted letter.
Lumjiaktase, P., Diggle, S.P., Loprasert, S., **Tungpradabkul, S.**, Daykin, M., Camara, M., William P., and Kunakorn, M. (2006) Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology* (in press). (I.F. = 3.11)
4. **Manuscript (3)** with accepted letter.
Wongtrakoongate, P., Mongkoldhumrongkul, N., Chaijan, S., Kamchonwongpaisan, S., and **Tungpradabkul, S.** (2006) Comparative proteomic profiles and the potential markers between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Molecular and Cellular Probes* (in press) (I.F. = 1.588)

Role of the Stationary Growth Phase Sigma Factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in Response to Physiological Stress Conditions

Benchamas Subsin,¹ Mark S. Thomas,² Gerd Katzenmeier,³ Jonathan G. Shaw,²
 Sumalee Tungpradabkul,¹ and Mongkol Kunakorn^{4*}

Department of Biochemistry, Faculty of Science,¹ and Department of Pathology, Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital,² Mahidol University, Bangkok, Thailand; Division of Genomic Medicine, University of Sheffield Medical School, Sheffield, United Kingdom²; and Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Nakorn Pathom, Thailand³

Received 17 March 2003/Accepted 5 September 2003

The *Burkholderia pseudomallei* *rpoS* gene was identified, and an *rpoS* null mutant was constructed. The mutant was shown to have an increased sensitivity to carbon starvation and oxidative stress. By using *rpoS-lacZ* fusions, transcription of *rpoS* was shown to be growth phase regulated, reaching a peak upon entry into stationary phase.

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a disease endemic in Southeast Asia and Australia (7). *B. pseudomallei* can survive inside phagocytes (14, 20) and adapt to many environments (21, 36). Recently, nonpathogenic strains of *B. pseudomallei* were reassigned as *B. thailandensis* (5). In gram-negative bacteria, the sigma factor RpoS (σ^S) activates expression of genes required in response to various stresses including acid, heat shock, UV light, osmotic, oxidative stresses, and carbon starvation (4, 15, 33, 35). σ^S also controls expression of extracellular virulence factors and is important for pathogenicity in members of the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* (9, 19, 35).

Expression of virulence factors is also correlated with entry into stationary phase and nutrient limitation in the intracellular pathogen *Legionella pneumophila* (3). In *Escherichia coli*, σ^S is regulated by transcription, translation and proteolysis, and different stress conditions differentially affect these levels of control (16, 24). However, expression of *rpoS* in pseudomonads is predominantly controlled at the transcriptional level (38). In this study, we isolated the *rpoS* gene from *B. pseudomallei* and present evidence that σ^S is involved in the response to several environmental stresses. Expression experiments with translational and transcriptional fusions were performed to examine the regulation of *rpoS* in relation to growth phase.

Isolation of the *rpoS* gene from *B. pseudomallei*. Recently, the complete genome sequence of *B. pseudomallei* has been determined (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pseudomallei). Using the *rpoS* sequence from *P. aeruginosa* PAO1 (34) as the query in a TBLASTX search, an open reading frame of 1,080 bp encoding the predicted σ^S protein of 359 amino acids was identified. The *B. pseudomallei* *rpoS* gene was amplified

from PP844 (Table 1) genomic DNA with Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, Mass.) and primers RPOSF and RPOSR (Fig. 1, Table 2). PCR was performed for 30 cycles at 94°C for 1 min., 68°C and 72°C for 45 s each cycle. The amplified *rpoS* DNA was cloned into the *Sma*I site of pUC19 to generate pUCBS2 (Table 1) and the nucleotide sequence was determined (GenBank accession number AY183467).

The deduced amino acid sequence exhibits 93% amino acid identity to σ^S of *Burkholderia cepacia*, 67% to *Ralstonia solanacearum* σ^S , 46% to *Pseudomonas aeruginosa* σ^S and 43% to *E. coli* σ^S . Similar to the situation in *R. solanacearum*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*, *rpoS* in *B. pseudomallei* is located downstream of *nlpD* (Fig. 1). In several gram-negative bacterial species *rpoS* transcription is directed from promoters located within and upstream of *nlpD* (12, 22, 25, 30). Only 11 bp separate the *nlpD* coding sequence from *rpoS*, suggesting that transcription of *rpoS* in *B. pseudomallei* also initiates within or upstream of *nlpD*. Perusal of the *B. pseudomallei* *nlpD* sequence reveals two sequences which could serve as promoters for transcription of *rpoS*. Nineteen base pairs upstream of the *nlpD* translation initiation codon is the sequence TTGATC(N₁₇)TAAAT, which probably serves as the promoter for *nlpD* and possibly also for *rpoS*. Located 131 bp upstream of the *nlpD* stop codon is the sequence TGCACA(N₁₇)TAAAG, which could also serve as a promoter for *rpoS* transcription.

Role of RpoS in response to environmental stresses. An *rpoS* knockout mutant, KN100 (Table 1), was created with pKBS1 according to a previously described procedure (26). The plasmid pUCBS1 was constructed by blunt-end ligation of a 632-bp internal fragment of *rpoS*, generated by PCR with primers SBKF and SBKR, into the *Sma*I site of pUC19. pKBS1 was constructed by transferring the 632-bp *Kpn*I-*Xba*I fragment from pUCBS1 into the mobilizable suicide vector pKNOCK-Tc (2). The effects of *rpoS* inactivation on cell survival during prolonged carbon starvation as well as other func-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Pathology, Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital, Mahidol University, 270 Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand. Phone: 662-644-5325. Fax: 662-246-4281. E-mail: ramkn@mahidol.ac.th.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Genotype or relevant characteristics	Source or reference
<i>B. pseudomallei</i>		
PP844	Prototroph, blood culture isolate from a patient at Khon kaen University Hospital	37
KN100	PP844/pKBS1	This study
PP844(pBBS1)	PP844 containing pBBS1	This study
KN100(pBBS1)	PP844/pKBS1 containing pBBS1	This study
Z2BS1	PP844/pZ2BS1 containing single copy of <i>rpoS-lacZ</i> transcriptional fusion	This study
Z3BS1	PP844/pZ3BS1 containing single copy of <i>rpoS-lacZ</i> translational fusion	This study
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
BSST100	Clinical isolate from a patient at Royal Hallamshire Hospital	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F^- ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K^- m_K^-</i>) <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1 relA1 gyrA96</i>	13
CC118 <i>lambda</i> pir	Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB</i> (RF) <i>argE</i> (Δ m) <i>recA1 lambda</i> pir ⁺	17
JM83	F^- <i>arn</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> (Sm ^r) ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15	39
SM10 <i>lambda</i> pir	RP4-2- <i>tet::Mu</i> -1 (Km ^r) <i>thi-1 thr leu tonA lacY supE recA</i>	32
S17- <i>lambda</i> pir	RP4-2- <i>tet::Mu</i> -1 <i>kan::Tn7</i> (Tp ^r Sm ^r) <i>thi proA hsdR recA</i>	32
<i>Y. enterocolitica</i>		
08081c	Inv ⁻	29
Plasmids		
pUCBS1	pUC19 containing a 600-bp internal segment of <i>B. pseudomallei rpoS</i>	This study
pUCBS2	pUC19 containing the full-length <i>rpoS</i>	This study
pKNOCK-Tc	Mobilizable suicide vector for construction of gene knockouts in Gram-negative bacteria	2
pKBS1	pKNOCK-Tc containing a 600-bp internal segment of <i>B. pseudomallei rpoS</i>	This study
pBBR1MCS	Broad-host-range cloning vector, Cm ^r	23
pBBS1	pBBR1MCS containing the full-length <i>B. pseudomallei rpoS</i> gene	This study
pZINT2	Mobilizable integrative vector for construction of single-copy <i>lacZ</i> transcriptional fusions	27
pZINT3	Mobilizable integrative vector for construction of single-copy <i>lacZ</i> translational fusions	This study
pZ2BS1	pZINT2 containing the 5' region of <i>nlpD</i> and 3' region of <i>rpoS</i> fused to <i>lacZ</i>	This study
pZ3BS1	pZINT3 containing the 5' region of <i>nlpD</i> and 3' region of <i>rpoS</i> fused to <i>lacZ</i>	This study
pFR97	Plasmid vector for construction of <i>lacZ</i> translational fusions	31

tions were analyzed with this mutant. To confirm that all changes in phenotypes were caused by the disruption of *rpoS* and were not due to polar effects on downstream genes, a plasmid (pBBS1) containing the complete *rpoS* coding sequence under control of the *lacZ* and *cat* gene promoters was constructed and transferred into *B. pseudomallei* wild-type and mutant strains for complementation analysis.

To examine the ability of *B. pseudomallei* to survive during

prolonged carbon starvation, overnight cultures were diluted 100-fold into glucose minimal medium and grown at 37°C with aeration. After the cells entered the stationary phase of growth, incubation was continued for several days, during which time cell viability was determined by measuring CFU. Seventy-two hours after entry into the stationary phase, a 100-fold decrease in the number of viable cells was observed for the *rpoS* mutant compared to the wild type. This finding suggests

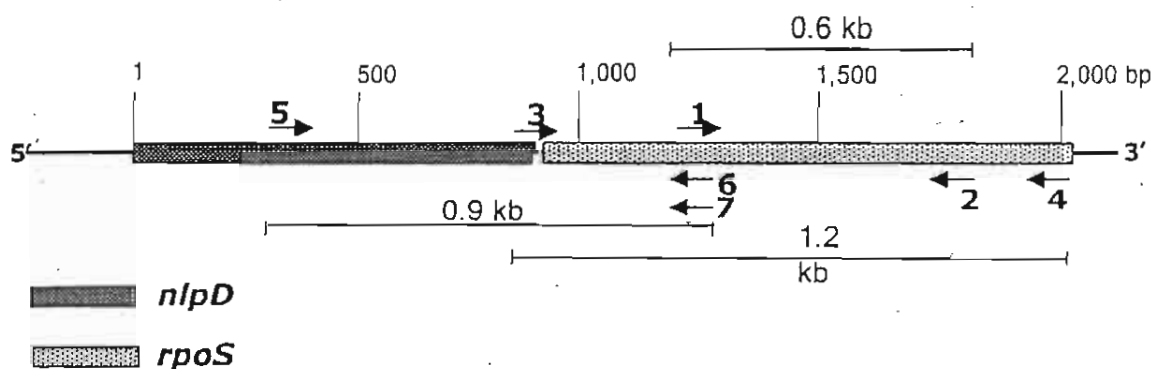


FIG. 1. Arrangement of the *nlpD-rpoS* genes in the genome of *B. pseudomallei*. Arrows indicate the location and orientation of primers used to construct *rpoS* plasmids in this study: 1, SBKF; 2, SBKR; 3, RPOSF; 4, RPOS; 5, PNSF; 6, PNSR; and 7, PNSFR97.

TABLE 2. PCR primers

Primer	Sequence	Restriction site ^a
SBKF	5'-GACGACTTCCGGGCGCTTCT-3'	
SBKR	5'-ATCGTCGGGCGAGATCGAG-3'	
RPOSF	5'-CCTGTCGATCCGCTGAAGTATT-3'	
RPOSR	5'-CCAGAATCGGTGTCATTGATGAA-3'	
PNSF	5'-GCCCCGATGCGCTTTATCGGATCGCGCTCG-3'	<i>Sph</i> I
PNSR	5'-GCCGTCTAGAAAGCGCCCGGAAGTCGTC-3'	<i>Xba</i> I
PNSFR97	5'-GCCGTCTAGAAAGCGCCCGGAAGTCGTCAG-3'	<i>Xba</i> I

^a Underlined in the sequence.

that the *rpoS* mutant is more sensitive to carbon starvation than the wild type. This result is in accordance with previous findings, which have demonstrated a general function for σ^S as a growth phase-dependent regulator of metabolism under conditions of nutrient limitation (10, 16, 35). Introduction of plasmid pBBS1, containing the full-length *rpoS* gene, completely restored starvation tolerance to the wild-type level in the mutant, indicating that the loss of viability of the mutant was specifically caused by inactivation of the *rpoS* gene (Fig. 2A).

The effect of *rpoS* inactivation on sensitivity to H_2O_2 and the redox-cycling agent methyl viologen was also examined. Sensitivity to hydrogen peroxide was measured on cells grown to mid-logarithmic phase (optical density at 600 nm = 0.4). H_2O_2 was added to the cells at the indicated concentrations, and the cells were incubated for 20 min at 37°C. Catalase was added (400 units/ml), and cell viability was measured as described above. After a 20-min incubation in 50 mM H_2O_2 , the number of viable cells for the mutant was approximately 80-fold lower than in the wild type (Fig. 2B). The sensitivity of the mutant to methyl viologen was also examined by exposing mid-logarithmic-phase cells to 40 mM methyl viologen. Growth of the wild-type cells was not significantly affected by the presence of 40 mM methyl viologen, whereas the mutant showed a 50-fold reduction in viability after exposure for 16 h (Fig. 2C). The sensitivity of the mutant to H_2O_2 and methyl viologen suggests a role for σ^S in oxidative stress resistance. This is consistent with the role of *rpoS* in resistance to oxidative stress in *B. cepacia* and *P. aeruginosa* (1, 35). On the other hand, inactivation of the *rpoS* promoter in *R. solanacearum* did not result in increased sensitivity to H_2O_2 (10).

The ability of cells to survive in pH 3.0 was measured following an adaptation step at pH 4.0 (11). Bacterial cells were grown in Luria-Bertani (LB) (pH 7.0) to stationary phase overnight, washed, and suspended in LB adjusted to pH 4.0. Incubation was continued for 4 h before the cells were resuspended in medium adjusted to pH 3.0. Cell viability was then determined at different time intervals. Figure 2D shows that the sensitivity of the *rpoS* mutant was not significantly different from that of the wild type after exposure to acid pH 3.0 for up to 60 min. However, at 90 min the mutant demonstrated a 10-fold decrease in survival compared to the wild type. Acid tolerance in several gram-negative bacteria has also been shown to be mediated by σ^S (10, 11, 30).

To measure the ability of cells to survive extreme heat shock, cells were grown to stationary phase, whereupon they were washed and diluted in minimal medium to a density of approximately 7,000 CFU/ml. One milliliter of the diluted culture was placed in a prewarmed tube at 53°C, and viability was deter-

mined after different time intervals. To measure sensitivity to osmotic stress, cells were grown to stationary phase, washed, and resuspended in minimal medium containing 4.0 M NaCl. The resuspended cells were incubated at 37°C with aeration, during which time cell viability was determined. Our results showed that there is no significant difference between the wild type and the mutant in their sensitivity to heat shock or osmotic stress (Fig. 2E and 2F). In contrast, a *B. cepacia* *rpoS* knockout mutant exhibited hypersensitivity to high temperature but, like *B. pseudomallei*, showed a wild-type hyperosmotic response (1).

Role of *rpoS* in invasion of epithelial and macrophage cell lines. Invasion assays were performed as previously described with slight modifications (8). HEp-2 cells and the Abelson murine leukemia virus-induced tumor cell line RAW264.7 were seeded in 24-well plates at 5×10^5 cells per well. Cells were grown overnight at 37°C with 5% CO_2 in Eagle's minimal essential medium (EMEM) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco BRL) for HEp-2 and RAW264.7, respectively. The cell monolayers were washed and incubated with 1 ml of the same medium containing 4% bovine serum albumin for 30 min at 37°C with 5% CO_2 . After incubation, the monolayers were washed with fresh medium. A log-phase culture of bacteria was resuspended in 1 ml of EMEM medium for HEp-2 cells and DMEM medium for RAW264.7 cells, and 25 μ l of the suspension was added to cell monolayers and incubated for 2 h at 37°C with 5% CO_2 . Cells were washed with phosphate-buffered saline and medium and then incubated with 1.5 ml of medium containing kanamycin for an additional 2 h to eliminate extracellular bacteria. Cell monolayers were then lysed with 1% saponin (Sigma) to release the intracellular bacteria.

The inocula and intracellular bacteria were quantified by plating serial dilutions. For overnight invasion assays, the monolayers were washed with phosphate-buffered saline and incubated overnight with 1.5 ml of medium containing kanamycin. Table 3 shows that both the wild type and *rpoS* mutant demonstrated an equal ability to invade RAW264.7 cells and HEp-2 cells, although at an order of magnitude less efficiently than *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Yersinia enterocolitica*. This indicates that *rpoS* is not required for survival within the intracellular compartment and suggests that *B. pseudomallei* is not exposed to or is able to circumvent carbon starvation and oxidative stress inside the host cell. Similar observations were made with *Y. enterocolitica*, in which inactivation of *rpoS* had no significant effects on virulence in mice or on the expression of the *inv* or *ail* genes, which are involved in cell invasion (4). In contrast, expression of the *rpoS* gene in *S.*

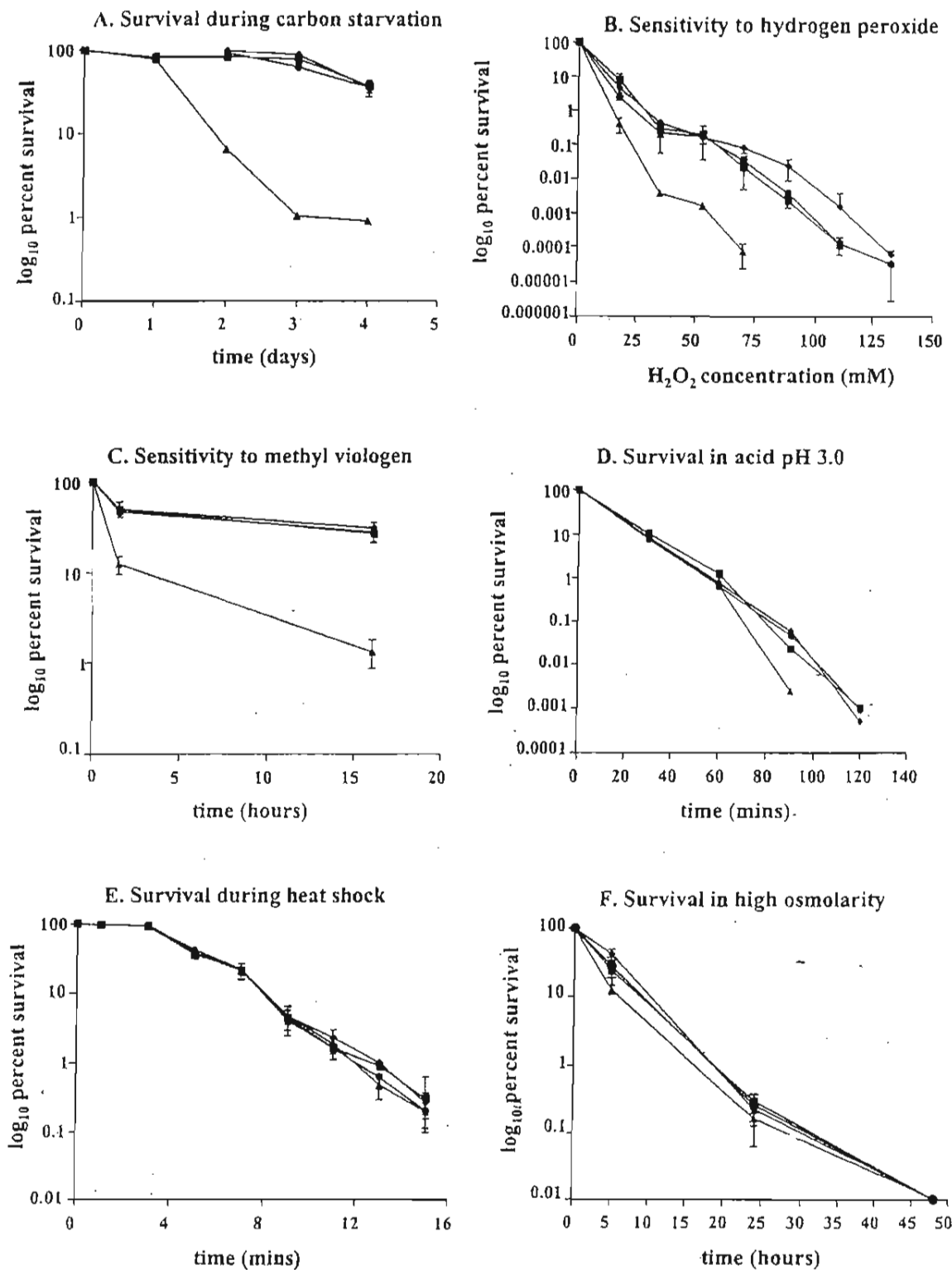
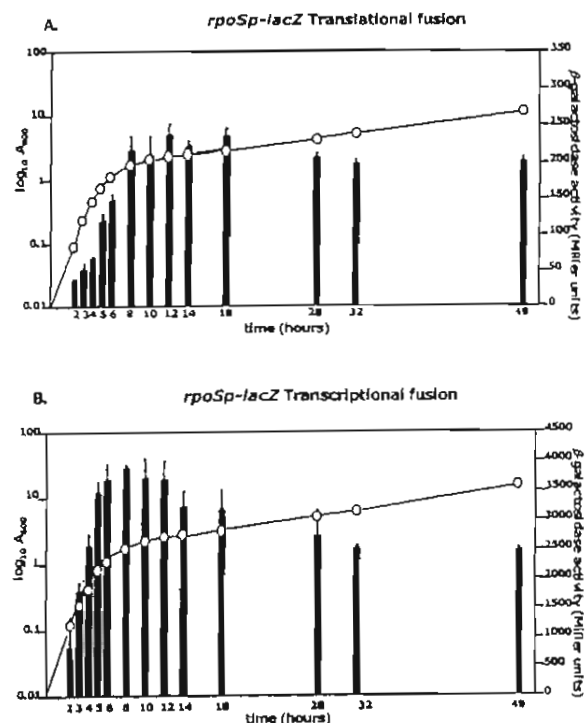


FIG. 2. Effect of *rpoS* mutation on stress responses. *B. pseudomallei* parent strain PP844 (■), *B. pseudomallei rpoS* mutant (▲), *B. pseudomallei* parent strain harboring pBBS1 (◆), and *B. pseudomallei rpoS* mutant harboring pBBS1 for complementation (●). (A) Survival during carbon starvation. (B) Sensitivity to hydrogen peroxide. (C) Sensitivity to methyl viologen. (D) Survival in acid pH (pH 3.0). (E) Survival during heat shock. (F) Survival in high osmolarity.

TABLE 3. Effect of *rpoS* mutation on invasion of cell lines^a

Strain	RAW264J cells			HEp-2 cells		
	Inoculum (CFU)	Mean no. of cells recovered at 4 h	Mean no. of cells recovered at 24 h	Inoculum (CFU)	Mean no. of cells recovered at 4 h	Mean no. of cells recovered at 24 h
PP844 (wild type)	2.6×10^6	$8.6 \times 10^3 \pm 5.1 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$	8.0×10^8	$1.3 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^3$	$3.0 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$
KN100 (<i>rpoS</i> knockout mutant)	8.0×10^6	$6.8 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^3$	$2.2 \times 10^5 \pm 3.0 \times 10^4$	5.0×10^8	$3.6 \times 10^4 \pm 2.2 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^4$
PP844 with pBBS1 (wild type + <i>rpoS</i> plasmid)	2.0×10^6	$2.9 \times 10^3 \pm 5.7 \times 10^3$	$1.7 \times 10^5 \pm 6.0 \times 10^4$	5.0×10^8	$1.8 \times 10^4 \pm 4.3 \times 10^3$	$2.3 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$
KN100 with pBBS1 (<i>rpoS</i> knockout mutant + <i>rpoS</i> plasmid)	8.0×10^6	$3.7 \times 10^3 \pm 3.2 \times 10^4$	$7.0 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^4$	3.0×10^8	$4.1 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^3$
<i>E. coli</i> JM83	2.2×10^7	$<1.0 \times 10^3 \pm 0.0$	ND	8.0×10^8	$<1.0 \times 10^3 \pm 0.0$	ND
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	2.1×10^7	$2.2 \times 10^3 \pm 7.2 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND
<i>Y. enterocolitica</i>	ND	ND	ND	3.0×10^7	$4.8 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^3$	ND

^a ND, not done. Values are means $\pm$ standard deviations.FIG. 3. Growth phase-dependent regulation of the *B. pseudomallei* *rpoS* gene. The bars represent the β -galactosidase activity in Miller units, while the circles represent the cell density (optical density at 600 nm). (A) Expression of *B. pseudomallei* *rpoS-lacZ* translational fusion according to growth phase. (B) Expression of *B. pseudomallei* *rpoS-lacZ* transcriptional fusion according to growth phase.

enterica serovar Typhimurium increased rapidly after phagocytosis (6), and inactivation of *rpoS* reduced virulence in mice (18). The use of culture cell lines instead of human phagocytes could explain the discrepancy between our study and that of Jones et al. (20), who showed that *B. pseudomallei* was able to replicate within human phagocytes. Furthermore, bacterial growth within cells could ultimately result in host cell lysis that would release the bacteria into the extracellular environment, where they would be killed by the antibiotic.

Growth phase-dependent regulation of the *B. pseudomallei* *rpoS* gene. To study the regulation of the *rpoS* gene in *B. pseudomallei*, *rpoS-lacZ* transcriptional and translational fusions were constructed and integrated into the chromosome in single copy. The mobilizable suicide plasmid pZINT2 (27) was used for the construction of an *rpoS-lacZ* transcriptional fusion. The resultant plasmid, pZ2BS1, was generated by amplification of 221 codons of the 3' region of the *nlpD* gene and the first 71 codons of *rpoS* with primers PNSF and PNSR, followed by ligation of the *Sph*I- and *Xba*I-digested PCR products with pZINT2. pZINT3 was used as the vector for construction of a single-copy *rpoS-lacZ* translational fusion and was constructed from pZINT2 by replacing a 5.2-kb *Sal*I-*Sna*I fragment containing the *lacZYA* cassette with a 3.0-kb *Xho*I-*Dra*I restriction fragment of pFR97 (31), which contains the *lacZ* gene devoid of the first six codons of *lacZ* and the Shine-Dalgarno sequence.

To construct the *rpoS-lacZ* translational fusion plasmid pZ3BS1, a 0.92-kb PCR product obtained with primers PNSF and PNSR97 was ligated as an *SphI-XbaI* fragment into pZINT3. pZ2BS1 and pZ3BS1 were integrated in single copy at the *rpoS* locus of *B. pseudomallei* PP844 by homologous recombination, resulting in strains Z2BS1 and Z3BS1, respectively. Cultures were grown in LB broth, and β -galactosidase assays (28), normalized to culture density (optical density at 600 nm), were performed at various time points.

The strain harboring the translational fusion (Z3BS1) showed an increase in β -galactosidase activity starting from the exponential phase and reaching a peak on entry into stationary phase (Fig. 3A). This result showed that RpoS production is growth phase regulated. As the β -galactosidase activities for the translational fusion represent the sum of transcriptional and translational control, the transcriptional fusion was used to see whether this regulation is exerted at the transcriptional or translational level. The β -galactosidase activity of the strain harboring the transcriptional fusion followed a similar pattern (Fig. 3B). In both fusion strains, the activity on entry into stationary phase was approximately fivefold higher than in the early logarithmic phase. The results indicate that *B. pseudomallei* *rpoS* is regulated according to growth phase at the transcriptional level. However, the possibility that *rpoS* is subject to cell density-dependent regulation cannot be ruled out.

In conclusion, we have shown that RpoS is likely to play an important role in the response of *B. pseudomallei* to carbon starvation and oxidative stress. Furthermore, our results show that the *rpoS* gene in this organism is likely to be regulated according to the growth phase.

This work was supported by research grants from the Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital. B.S. was supported by a Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship from the Thailand Research Fund.

We thank P. Sonthayanon and S. Butrapet for providing laboratory facilities, S. Loprasert and S. Mongkolsuk for technical support, S. Sirsinha for providing *B. pseudomallei* PP844, and M. F. Alexeyev for providing the pKNOCK-Tc plasmid used in this study.

REFERENCES

- Aguilar, C., I. Bertani, and V. Venturi. 2003. Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (RpoS) of the union pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1739-1747.
- Alexeyev, M. F. 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *BioTechniques* 26:824-826, 828.
- Bachman, M. A., and M. S. Swanson. 2001. RpoS cooperates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol. Microbiol.* 40:1201-1214.
- Badger, J. L., and V. L. Miller. 1995. Role of RpoS in survival of *Yersinia enterocolitica* to a variety of environmental stresses. *J. Bacteriol.* 177:5370-5373.
- Chalyaroj, S. C., K. Kotron, S. Koonpaew, N. Anantagool, N. J. White, and S. Sirsinha. 1999. Differences in genomic macrorestriction patterns of arabinose-positive (*Burkholderia thailandensis*) and arabinose-negative *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiol. Immunol.* 43:625-630.
- Chen, C. Y., L. Eckmann, S. J. Libby, F. C. Fang, S. Okamoto, M. F. Kagnoff, J. Flierer, and D. G. Guiney. 1996. Expression of *Salmonella typhimurium* *rpoS* and *rpoS*-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 64:4739-4743.
- Dhurakul, T., and S. Songvilai. 1999. The many facets of melioidosis. *Trends Microbiol.* 7:138-140.
- Elsinghorst, E. A. 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol.* 236:405-420.
- Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeyer, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, and D. G. Guiney. 1992. The alternative sigma factor *kaiF* (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:11978-11982.
- Flavier, A. B., M. A. Schell, and T. P. Denny. 1998. An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 28:475-486.
- Foster, J. W. 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:215-237.
- Fujita, M., K. Tanaka, H. Takahashi, and A. Memura. 1994. Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol. Microbiol.* 13:1071-1077.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Harley, V. S., D. A. Dance, G. Tovey, M. V. McCrossan, and B. S. Drasar. 1998. An ultrastructural study of the phagocytosis of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbios* 94:35-45.
- Hengge-Aronis, R. 1993. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72:165-168.
- Hengge-Aronis, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:373-395.
- Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172:6557-6567.
- Ibanez-Ruiz, M., V. Robbe-Saule, D. Hermant, S. Lubrude, and F. Nuret. 2000. Identification of RpoS (σ^S)-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 182:5749-5756.
- Irlarte, M., I. Stainer, and G. R. Cornells. 1995. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect. Immun.* 63:1840-1847.
- Jones, A. L., T. J. Beveridge, and D. E. Woods. 1996. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 64:782-790.
- Kanal, K., E. Kondo, S. Dejsiriert, and P. Naigowit. 1994. Growth and survival of *Pseudomonas pseudomallei* in acidic environment with possible relation to the ecology and epidemiology of melioidosis. p. 26-38. In S. D. Puthucherry and M. A. Yasmin (ed.), *Melioidosis: revealing problems and future directions*. SP-Muda, Kuala Lumpur.
- Kojic, M., C. Aguilar, and V. Venturi. 2002. TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas* *rpoS* and *psrA* promoters. *J. Bacteriol.* 184:2324-2330.
- Kovach, M. E., R. W. Phillips, P. H. Elzer, R. M. 2nd Roop, and K. M. Peterson. 1994. pBRR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *BioTechniques* 16:800-802.
- Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1994. The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA-polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation and protein stability. *Genes Dev.* 8:1600-1612.
- Lange, R., and R. Hengge-Aronis. 1994. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol. Microbiol.* 13:733-743.
- Low, K. B. 1991. Conjugational methods for mapping with Hfr and F-prime strains. *Methods Enzymol.* 204:43-62.
- Lowe, C. 2001. Ph.D. thesis. University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Portny, D. A., H. F. Blank, D. T. Klingsbury, and S. Falkow. 1983. Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dis.* 148:297-304.
- Ramos-Gonzalez, M. I., and S. Molina. 1998. Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT-240. *J. Bacteriol.* 180:3421-3431.
- Shapira, S. K., J. Chou, F. V. Richaud, and M. J. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to lacZ gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of beta-galactosidase. *Gene* 25:71-82.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *BioTechnology* 1:784-791.
- Small, P., D. Blankenbom, D. Welty, E. Zinser, and J. L. Slonczewski. 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* 176:1729-1737.
- Stover, C. K., X.-Q. T. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warriner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Huftagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Gultzy, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kus, K. Larbig, R. M. Lim, K. A. Smith, D. H. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.
- Suh, S. J., L. Silu-Suh, D. E. Woods, D. J. Hassett, S. E. West, and D. E. Ohman. 1999. Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:3890-3897.

36. Thomas, A. D., J. Forbes-Faulkner, and M. Parker. 1979. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers in defined depths. *Am. J. Epidemiol.* 110:515-521.
37. Utaiwanchaen, P., N. Tangthawornchaikul, W. Kespichayawattana, P. Chaisuraya, and S. Sirisinha. 2001. *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol. Immunol.* 45:307-313.
38. Whistler, C. A., N. A. Carbell, A. Sarrniguet, W. Reum, and J. E. Luper. 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor σ^H and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 180:6635-6641.
39. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.



Burkholderia pseudomallei RpoS regulates multinucleated giant cell formation and inducible nitric oxide synthase expression in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)

P. Utaisincharoen^{a,*}, S. Arjcharoen^a, K. Limposuwan^a, S. Tungpradabkul^b, S. Sirisinha^a

^a Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^b Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received 31 August 2005; received in revised form 27 December 2005; accepted 3 January 2006

Available online 9 March 2006

Abstract

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis. This bacterium can invade and survive inside the phagocytic and nonphagocytic cells. After internalization, the bacteria can escape from the membrane-bound phagosome into the cytoplasm. Internalised *B. pseudomallei* can also induce a cell-to-cell fusion, resulting in a multinucleated giant cell (MNGC) formation. In the present study, we demonstrated that *B. pseudomallei* *rpoS* null mutant was similar to its wild type parent in its ability to survive and multiply inside the mouse macrophages, but it failed to stimulate MNGC formation. The *rpoS* mutant was also unable to activate inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in resting mouse macrophages but in gamma interferon (IFN- γ)-activated macrophages, the mutant was able to induce significantly higher levels of iNOS and NO when compared with its wild-type counterpart, resulting in a significantly lower number of bacteria inside the infected host cells.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; Melioidosis; RpoS; Multinucleated giant cell formation; iNOS

1. Introduction

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a disease of man and animals in southeast Asia and northern Australia [1,2]. The clinical features of melioidosis vary greatly from acute fatal sepsis to localised chronic infections [1]. Systemic infections are associated with high mortality rate and high rate of relapse despite prolonged treatment [1,2]. At a cellular level, this gram-negative bacterium can survive and multiply in both phagocytic and non-phagocytic cells [3]. After internalisation, it can readily escape from the membrane bound phagosome into the cytoplasm [3]. The internalised *B. pseudomallei* can also induce a cell-to-cell fusion, resulting in a multinucleated giant cell (MNGC) formation and cell death [4,5]. The MNGC has also been observed in the tissues of patients with melioidosis [6]. It was hypothesised that this unique phenomenon, which

has never been observed in any other bacteria, may facilitate the spreading of the bacterium from one cell to another [5].

The mechanism by which *B. pseudomallei* is able to escape host defense is not fully understood. However, we have demonstrated previously that the macrophages infected with this microorganism failed to activate inducible nitric oxide synthase (iNOS) [7]. The failure to stimulate iNOS expression may facilitate this bacterium to survive and multiply inside the macrophages [7,8]. However, preactivation of the macrophages with exogenous IFN- γ or IFN- β could enhance iNOS expression and facilitate intracellular killing of *B. pseudomallei* [7–9].

RpoS is a global regulatory factor known to control the expression of a large number of chromosomal genes involved in resistance to stress conditions and prolonged nutrient deprivation [10,11]. It has also been reported to regulate virulence gene expression in a number of pathogenic bacteria. In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the RpoS controls the expression of *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes required to initiate systemic spread [12–14]. The *S. typhimurium* *rpoS* mutant was significantly less lethal for mice, thus suggesting its role in disease-producing potential [14,15]. However, the ability of the mutant to survive inside the

* Corresponding author. Tel.: +66 2 201 5954; fax: +66 2 201 5950.
E-mail address: scput@mahidol.ac.th (P. Utaisincharoen).

macrophages was unaltered [14]. Although the possible involvements of RpoS in the pathogenesis of melioidosis have never been investigated, our group demonstrated previously that the *B. pseudomallei* *rpoS* null mutant of this bacterium exhibited an increased sensitivity to oxidative stress [16]. In this communication, we extend our finding to demonstrate the involvement of *rpoS* null mutant in modulating the host cell response, particularly with regard to the macrophage antimicrobial capacity to control the intracellular fate of *B. pseudomallei* itself.

2. Results

2.1. Internalisation and intracellular multiplication of *rpoS* knockout mutant in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)

In order to evaluate a possible involvement of RpoS in internalisation and intracellular multiplication of *B. pseudomallei*, mouse macrophage cell monolayers were infected with *rpoS* mutant and wild type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1 and the number of intracellular bacteria was then analysed by standard antibiotic protection assay. The results presented in Fig. 1 showed that *rpoS* mutant appeared to have significantly lower invasive potential comparing with wild-type, judging from the number of intracellular bacteria 3 h after the infection was initiated. In contrast, once internalised, both *rpoS* and wild-type *B. pseudomallei* could similarly survive and multiply intracellularly inside the macrophages. The doubling time of the *rpoS* mutant and the wild-type calculated was 45 and 47 min, respectively, suggesting that the rate of replication of the *rpoS* mutant inside the macrophages was similar to that of the wild-type (data not shown). These results are consistent with the possibility that RpoS plays a role in cellular invasion but not in controlling the rate of replication inside the macrophages.

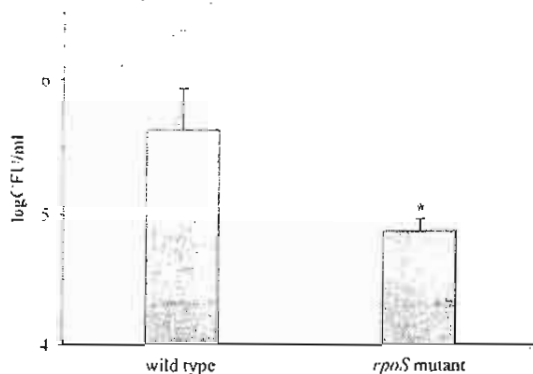


Fig. 1. Internalisation of *rpoS* mutant. Mouse macrophage cell line, (RAW 264.7) was infected with either the *rpoS* mutant or the wild type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1 for 1 h. Internalisation of the bacteria was determined after 2 more hours of incubation. The number of viable intracellular bacteria was determined by standard antibiotic protection assay as described in Materials and Methods. Data shown represent means and standard errors of 3 separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

2.2. RpoS interferes with MNGC formation in mouse macrophage cell line (RAW 264.7)

Mouse macrophages were infected with either the *rpoS* mutant or the wild-type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1 for a total of 8 h before the host cell morphological changes were analysed under a microscope. As is to be expected from our previous reports [5,9,17], the wild-type *B. pseudomallei* could readily induce cell fusion and MNGC formation (arrows in Fig. 2A). The *rpoS* mutant, on the other hand, failed to initiate these changes. These results suggested that the RpoS of *B. pseudomallei* is involved in this process. This prediction is supported by the results showing that in the presence of chloramphenicol, the MNGC formation induced by the wild-type was inhibited. In this experiment, the macrophages were infected with the wild-type bacteria for 1 h before the chloramphenicol was added at a concentration known to inhibit bacterial protein synthesis. In the presence of this inhibitor, no MNGC formation could be observed, suggesting that the process leading to MNGC formation in the wild type-infected macrophages was initiated after bacterial internalisation (Fig. 2A). It should be mentioned that the concentration of chloramphenicol used in these experiments was able to significantly inhibit bacterial growth (data not shown). The number of MNGC induced by the bacteria was also enumerated by Giemsa staining. Results presented in Fig. 2B showed that the percentage of MNGC induced by *rpoS* mutant and the chloramphenicol-treated wild-type infection was less than 3% while that of the wild-type infection in the absence of the inhibitor was 17%.

2.3. Involvement of RpoS in iNOS expression and nitric oxide production

To investigate the possible association of RpoS with iNOS activation, the mouse macrophages were infected with *rpoS* mutant and wild-type *B. pseudomallei* or *Salmonella enterica* serovar Typhi (used as positive control) at MOI 2:1. Eight hours after the infection was initiated, the iNOS expression of infected macrophages was determined by immunoblotting. Unlike the *Salmonella* control, both *rpoS* mutant and wild-type *B. pseudomallei* failed to stimulate iNOS expression. We previously demonstrated that IFN- γ could enhance iNOS expression and killing capacity of the macrophages if it was added to the cell culture prior to the time of infection [7,9]. In the present study, a similar experiment using *rpoS* mutant-infected macrophages was performed. Briefly, the macrophages were preactivated overnight with IFN- γ prior to *B. pseudomallei* exposure and at 4, 6 and 8 h post-infection, the expression of iNOS was determined by immunoblotting. The results showed that although the IFN- γ could enhance iNOS expression of the macrophages, the level of iNOS expression in the cells infected with *rpoS* mutant was noticeably higher than in those infected with the wild type (Fig. 3B). Consistent with this observation, the level of NO, determined by Griess reaction, in the IFN- γ activated macrophages infected with the *rpoS* mutant was also

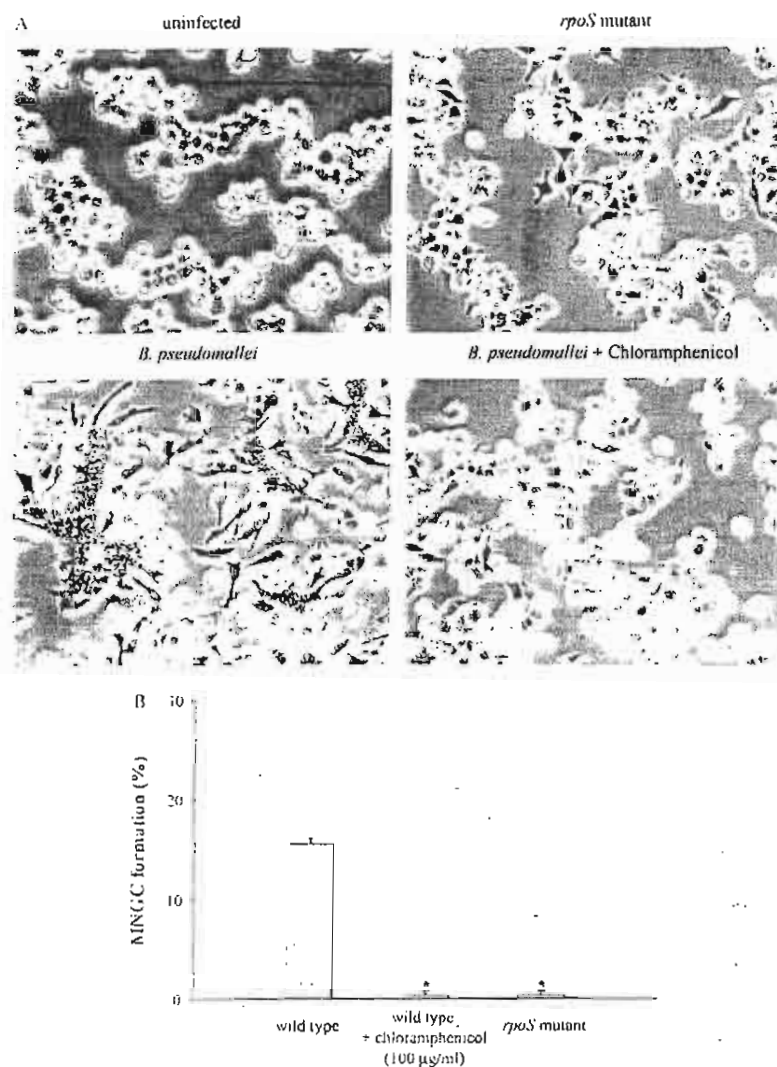


Fig. 2. Inability of *rpoS* mutant to induce MNGC formation. Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) was infected with either the *rpoS* mutant or the wild type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1 for 1 h. The infected cells were subsequently cultured in the medium with or without chloramphenicol added (100 µg/ml). The MNGC formation (arrows) after 8 h of infection was observed by microscopic examination (100x) (A). To enumerate MNGC formation, the infected cells were fixed, stained with Giemsa and the number of MNGC was determined under microscope (400x) (B). Data shown represent means and standard errors of 3 separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

significantly higher than that of the wild-type control (Fig. 3C). These results suggested the involvement of RpoS in regulating antimicrobial activity of the IFN- γ activated macrophages.

2.4. Bacterial RpoS modulates intracellular killing capacity of IFN- γ activated macrophages

It was shown previously that the expression of iNOS in macrophages infected with the wild type *B. pseudomallei* directly correlated with the macrophage ability to kill intracellular bacteria [7–9]. To determine whether or not a similar phenomenon would be observed with the macrophages infected with the *rpoS* mutant, the number of viable intracellular bacteria in the IFN- γ activated macrophages was analysed 8 h post infection. The results presented in Fig. 4

clearly demonstrated that although IFN- γ could enhance the macrophage ability to suppress the intracellular growth of both wild-type *B. pseudomallei* and *rpoS* mutant, the level of suppression was higher in the *rpoS* mutant-infected macrophages (a decrease by 2 orders of magnitude for the *rpoS* mutant compared with a decrease of only 1 order of magnitude for the wild-type).

3. Discussion and conclusion

RpoS is recognized as a global stationary-phase sigma factor that controls the expression of several genes including those encoding for virulence factors [12–14,18,19]. The *S. typhimurium rpoS* mutant was shown to be less virulent than its wild-type counterpart [20,21], even though it could still

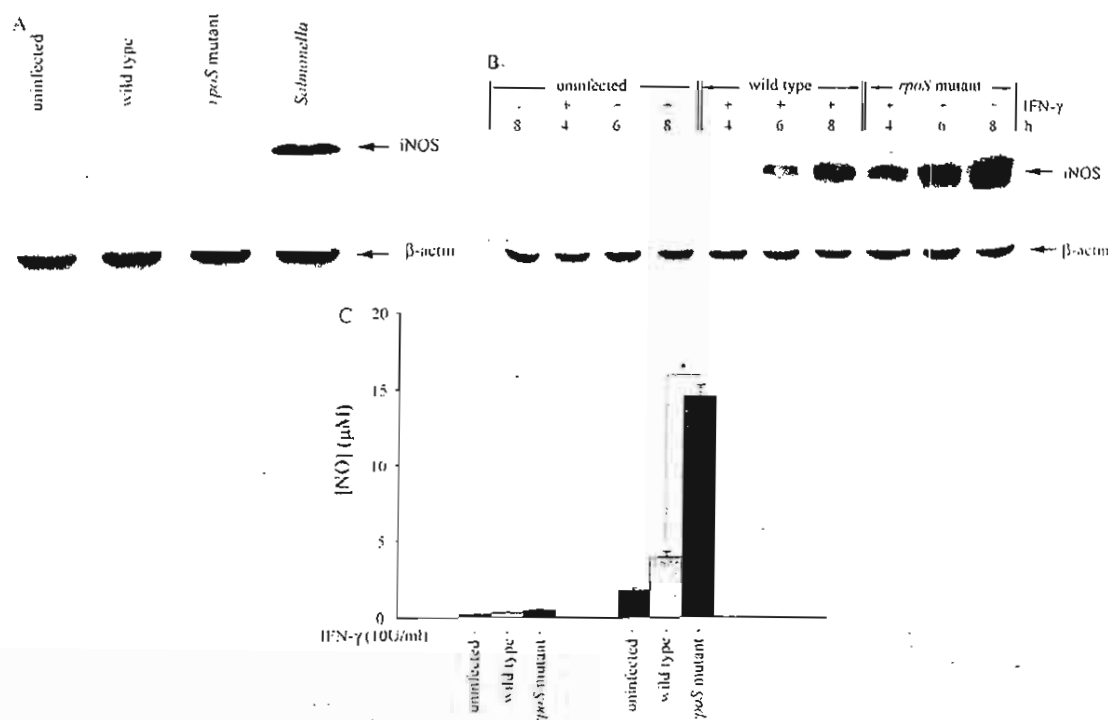


Fig. 3. Influence of RpoS on iNOS expression and NO production. Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) was infected with either *rpoS* mutant or wild type *B. pseudomallei* or *Salmonella* at MOI of 2:1. At 8 h time point, the iNOS expression of the infected cells was determined by immunoblotting (A). The effect of IFN- γ on iNOS expression and NO production by the macrophages infected with either the *rpoS* mutant or the wild type *B. pseudomallei* was also investigated (B and C). The macrophages were pretreated with IFN- γ (10 U/ml) overnight before being infected with either the *rpoS* mutant or the wild type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1. The expression of iNOS was determined after 4, 6 and 8 h of infection by immunoblotting (B). The level of NO in the supernatant of 8 h macrophage culture was determined by Griess reaction (C). Data represent means and standard errors of 3 separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

survive and multiply inside the macrophages [18]. The modulation of human activity by *S. typhi* *rpoS* mutant had also been investigated. For instance, the mutant exhibited lower degree of cytotoxicity for human macrophages, judging from a decreased ability to induce host cell death compared with the wild type counterpart [22]. As with the *rpoS* mutant of *Salmonella*, *rpoS* deficient *B. pseudomallei* in the present study could also survive and multiply inside the mouse macrophages in a similar way to the wild type parent (Fig. 1).

One of the unique characteristics of *B. pseudomallei* is their ability to induce a cell-to-cell fusion, resulting in MNGC formation which may facilitate the bacteria to spread from one cell to the others [4,5]. The mechanism of *B. pseudomallei*-induced cell-to-cell fusion is yet to be determined. However, we demonstrated in this communication that the wild-type *B. pseudomallei* failed to induce MNGC when the bacterial protein synthesis was inhibited after the bacteria had been internalised (Fig. 2), suggesting that it is the bacterial factor(s) expressed after being internalised that plays a role in the induction of MNGC formation. This conclusion is based on the data that in the presence of chloramphenicol, no MNGC formation was observed in the macrophages that were infected with the wild-type *B. pseudomallei* even at a very high MOI ratio of 100:1 (data not shown). In contrast to the wild-type, the *B. pseudomallei* lacking *rpoS* at the same MOI could not

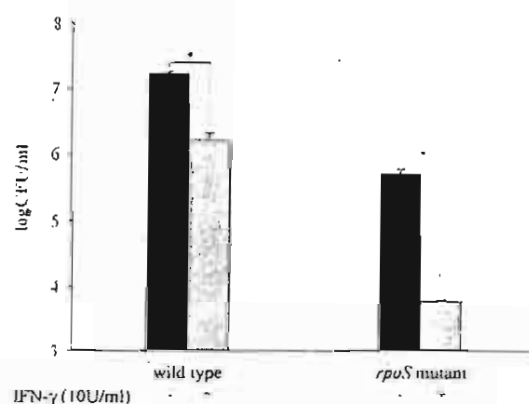


Fig. 4. Effects of IFN- γ in suppression of intracellular bacteria in the infected macrophages. Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) was preactivated with or without IFN- γ (10 U/ml) overnight before being infected with either *rpoS* mutant or wild type *B. pseudomallei* at MOI of 2:1. Eight hours after the infection, the number of intracellular viable bacteria was determined by standard antibiotic protection assay as described in Materials and Methods. A highly significant reduction was noted with the *rpoS* mutant. Data shown represent means and standard errors of 3 separate experiments, each carried out in duplicate. * $P < 0.01$ by Student's *t*-test.

induce MNGC formation, suggesting a possible involvement of RpoS in the induction of MNGC formation (Fig. 2).

Activation of iNOS and NO production in macrophages is known to play an essential role in inhibiting growth and killing of intracellular bacteria including *B. pseudomallei* [7–9]. Previously we demonstrated that *B. pseudomallei* could interfere with iNOS expression, thus allowing it to survive macrophage killing [7,8]. However, exogenous IFN- γ or IFN- β added to resting macrophage could enhance and restore its ability to kill intracellular *B. pseudomallei* by activating iNOS expression [7–9]. In the present study, we demonstrated that by itself the *rpoS* mutant, like its wild-type counterpart, also failed to activate iNOS expression (Fig. 3). However, in the presence of IFN- γ , the level of iNOS in the *rpoS* mutant-infected macrophages was markedly elevated compared with its wild-type control. The increase of iNOS expression and NO production level also correlated to the decrease of intracellular survive of the bacteria (Fig. 4). However, it could also be argued that the lower number of intracellular *rpoS* mutant may be due to inherently higher susceptibility of the mutant to killing by reactive nitrogen intermediate than the wild-type. This problem is now under investigation by our group.

RpoS is known to play an important role in response of bacteria to a number of environmental stresses. *Escherichia coli* produces KatE (hydroperoxidase I) which has both catalase and peroxidase activity, allowing it to overcome the antimicrobial activity of hydrogen peroxide produced by the host [23]. This enzyme is also known to be under the control of RpoS [24]. In the host tissue, RpoS could also regulate virulence gene expression, such as the *spv* of *S. typhimurium* [25]. In our study, we demonstrated that RpoS of *B. pseudomallei* could regulate not only the expression of a putative bacterial factor(s) which may be involved in MNGC formation, but also of the iNOS. However, the virulence factors of *B. pseudomallei* that are regulated by RpoS have never been identified but needed to be investigated if we are to more fully understand the pathogenesis of melioidosis and to develop novel approaches for the management of the disease.

4. Materials and Methods

4.1. Cell line and culture condition

Mouse macrophage cell line (RAW 264.7) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). If not indicated otherwise, the cells were cultured in Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) (Gibco Labs, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT) at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere.

4.2. Bacterial strains

B. pseudomallei strain 844 used in this study was originally isolated from a patient admitted to Srinagarind Hospital in the melioidosis endemic Khon Kaen province of Thailand as previously described [7–9]. *Salmonella enterica* serovar Typhi

(*Salmonella*) used for comparison throughout this study was originally isolated from a patient at Ramathibodi Hospital (Mahidol University, Bangkok, Thailand).

rpoS mutant of *B. pseudomallei* was constructed and had been characterized as previously described [16]. It should be mentioned that the mutant was still reactive with polyclonal anti-*B. pseudomallei* and monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide and exopolysaccharide components of *B. pseudomallei* [26].

4.3. Infection of mouse macrophage cell line (RAW 264.7)

An overnight culture of mouse macrophages (1×10^6 cells) in a six-well plate was co-cultured with bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of 2:1 for 1 h. To remove extracellular bacteria, the cells were washed three times with 2 ml of PBS and residual bacteria were killed by incubating in DMEM containing 250 μ g/ml kanamycin (Gibco Labs) for 2 h. Thereafter, the infection was allowed to continue in the medium containing 20 μ g/ml of kanamycin until the experiment was terminated [5,8]. To determine intracellular survival and multiplication of the bacteria, a standard antibiotic protection assay was performed as previously described [5]. The number of intracellular bacteria expressed as colony forming unit (CFU) was determined by bacterial colony counting.

4.4. Immunoblotting

Mouse macrophage preparations were lysed in buffer containing 20 mM Tris, 100 mM NaCl and 1% NP40. The lysates containing 30 μ g of protein were electrophoresed on 10% SDS-PAGE and then electrotransferred to nitrocellulose membrane (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany). The membrane was blocked with 5% skim milk for 1 h before incubating overnight with appropriate specific polyclonal rabbit antibodies to mouse iNOS (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). The blots were then allowed to react with horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit IgG (Pierce, Rockford, IL). Protein bands were detected by enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

4.5. Enumeration of multinucleated giant cells (MNGCs) in *B. pseudomallei*-infected macrophages

In order to quantitate the degree of MNGC formation, the macrophages (1×10^6) were first cultured overnight on a coverslip as previously described [5]. For the chloramphenicol experiment, the drug (100 μ g/ml) was added into the culture medium after the bacteria were internalised for 1 h. Eight hours after the infection, the coverslips were washed with PBS, fixed for 15 min with 1% paraformaldehyde and then washed sequentially with 50 and 90% ethanol for 5 min each. The coverslips were air dried before staining with Giemsa [5]. For enumeration of the MNGC formation, at least 1000 nuclei per coverslip were counted using light microscope at

a magnification of 40× and the percentage of multinucleated cells was calculated [5]. The MNGC was defined as the cell possessing more than one nuclei within the same cell boundary.

4.6. NO assay

The production of NO in the form of nitrite in the supernatant was determined by the Griess reaction [27]. The nitrite was used as standard ranged from 0 to 40 µM.

4.7. Statistical Analysis

If not otherwise indicated, all experiments in this study were conducted at least three times. Experimental values were expressed as means ± standard errors. Statistical significance of differences between the two means was evaluated by Student's *t* test, and *P* value <0.01 was considered significant.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from Thailand Research Fund. We are grateful to Mr Maurice Broughton (Chulabhorn Research Institute) for his comments and suggestions during the preparation of this manuscript.

References

- [1] Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:383–416.
- [2] Dharakul T, Songsvilai S. The many facets of melioidosis. *Trends Microbiol* 1999;7:138–46.
- [3] Jone A, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 1996;64:782–90.
- [4] Harley VS, Dance DAB, Drasar BJ, Tovey G. Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukaryotic cells in tissue culture. *Microbios* 1998;96:71–93.
- [5] Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T, Utaisincharoen P, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. *Infect Immun* 2000;68:5377–84.
- [6] Wong KT, Puthucheary SD, Vadivelu J. The histopathology of human melioidosis. *Histopathology* 1995;26:51–5.
- [7] Utaisincharoen P, Tangthawornchakul N, Kespichayawattana W, Chaisuriya P, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol Immunol* 2001;45:307–13.
- [8] Utaisincharoen P, Anuntagool N, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Involvement of IFN-β in enhancing inducible nitric oxide synthase (iNOS) production and antimicrobial activity of *B. pseudomallei*-infected macrophages. *Infect Immun* 2003;71:3053–7.
- [9] Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Induction of iNOS expression and antimicrobial activity by interferon (IFN)-β is distinct from IFN-γ in *Burkholderia pseudomallei*-infected mouse macrophages. *Clin Exp Immunol* 2004;136:277–83.
- [10] Muffler A, Traulsen DD, Lange R, Hengge-Aronis R. Posttranscriptional osmotic regulation of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178:1607–13.
- [11] Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66:373–95.
- [12] Kowarz L, Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F. The *Salmonella typhimurium* *katF* (*rpoS*) gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J Bacteriol* 1994;176:6852–60.
- [13] Norel F, Robbe-Saule V, Popoff MY, Coynault C. The putative sigma factor KatF (RpoS) is required for the transcription of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *spvB* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;99:271–6.
- [14] Nickerson CA, Curtiss III R. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 1997;65:1814–23.
- [15] Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, et al. The alternative sigma factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11978–82.
- [16] Subsin B, Thomas MS, Katzenmeier G, Shaw JG, Tungpradabkul S, Kunakorn M. Role of the stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. *J Bacteriol* 2003;185:7008–14.
- [17] Utaisincharoen P, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichyangkul S, Krieg AM, et al. CpG ODN enhances uptake of bacteria by mouse macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003;132:70–5.
- [18] Foster JW, Spector MP. How *Salmonella* survive against the odds. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:145–74.
- [19] Kolter R, Siegle DA, Tormo A. The stationary phase of bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:855–74.
- [20] Wilmes-Riesenberg MR, Foster JW, Curtiss III R. An altered *rpoS* allele contributes to the avirulence of *Salmonella typhimurium* LT12. *Infect Immun* 1997;65:203–10.
- [21] Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F. Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (ss) regulon. *Mol Microbiol* 1996;22:149–60.
- [22] Khan AQ, Zhao L, Hirose K, Miyake M, Li T, Hashimoto Y, et al. *Salmonella typhi* *rpoS* mutant is less cytotoxic than the parent strain but survives inside resting THP-1 macrophages. *FEMS Microbiol Lett* 1998;161:201–8.
- [23] Gonzalez-Flecha B, Demple B. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997;179:382–8.
- [24] Schellhorn HE, Stones VL. Regulation of *kafF* and *kafE* in *Escherichia coli* K-12 by weak acids. *J Bacteriol* 1992;170:3903–9.
- [25] Chen CY, Eckmann L, Libby SJ, Fang FC, Okamoto S, Kagnoff MF, et al. Expression of *Salmonella typhimurium* *rpoS* and *rpoS*-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infect Immun* 1996;64:4739–43.
- [26] Anuntagool N, Intachote P, Wuthiekanun V, White NJ, Sirisinha S. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara⁺ *Burkholderia pseudomallei* isolates is immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara⁺ clinical isolate. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:225–9.
- [27] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok S, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131–8.

INBOX: 21 of 156

Move | Copy | this message to: ▼

[Delete](#) | [Reply](#) | [Reply to all](#) | [Forward](#) | [Save as](#)[Back to INBOX](#) ◀ ▶**Date** : Mon, 28 Aug 2006 11:31:24 +0700**From** : Mongkol Kunakorn <ramkn@mucc.mahidol.ac.th> **To** : Sumalee Tangpradapkul <scstp@mucc.mahidol.ac.th> **Cc** : Putthapoom Lumjiaktase <putthapoom@hotmail.com> **Subject** : Fwd: MS29226-revised**Parts** :  mic29226revised.pdf (1211.25 KB) 

We got published at last.

Best Regards,
Mongkol

----- Forwarded message -----

From : "Pierre Cornelis" <pcornel@vub.ac.be>**To** : ramkn@mucc.mahidol.ac.th**Cc** : mikros@sgm.ac.uk**Subject** : MS29226-revised**Date** : Fri, 25 Aug 2006 22:29:54 +0700

Dear Dr. Kunakorn,

I have been through the revised version of your manuscript and it is now accepted for publication in Microbiology. The manuscript is quite interesting and reads very easily. You will be contacted soon by the Editorial Office who will confirm you my decision.

Regards,

Pierre Cornelis
Associate Editor

Pierre Cornelis
Laboratory of Microbial Interactions
Vrije Universiteit Brussel
Institute for Molecular Biology & Biotechnology
Building E
Pleinlaan 2
1050 Brussels
Belgium

Tel: 32 2 6291906

Fax: 32 2 6291902

E-mail: pcornel@vub.ac.be

[Delete](#) | [Reply](#) | [Reply to all](#) | [Forward](#) | [Save as](#)[Back to INBOX](#) ◀ ▶

Move | Copy | this message to: ▼

Manuscript 29226 (revised according to July 26,2006 letter)

**Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response
in *Burkholderia pseudomallei***

Putthapoom Lumjiaktase,¹ Stephen P. Diggle,² Suvit Loprasert,³ Sumalee Tungpradabkul,⁴
Mavis Daykin,² Miguel Cámara,² Paul Williams² and Mongkol Kunakorn¹

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital, Mahidol University,
Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand.

²Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences,
University of Nottingham, Nottingham, NG7 2RD, UK

³Department Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok,
10210, Thailand

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Mahidol University, Rama VI Road,
Bangkok 10400, Thailand.

Correspondence

Mongkol Kunakorn

munko@mahidol.ac.th

Key Words: *Burkholderia pseudomallei*; quorum-sensing; *N*-octanoylhomoserine lactone;
BpsI; BpsR; DpsA, oxidative stress

Abbreviations: LC MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry; *N*-
acylhomoserine lactone (AHL); C8-HSL, *N*-octanoyl-homoserine lactone; 3-oxo-C8-HSL, *N*-
(3-oxooctanoyl)homoserine lactone; 3-hydroxy-C8-HSL, *N*-(3-hydroxyoctanoyl)homoserine
lactone; C10-HSL, *N*-decanoylhomoserine lactone; 3-hydroxy-C8-HSL, *N*-(3-
hydroxydecanoyl)homoserine lactone and 3-hydroxy-C12-HSL, *N*-(3-
hydroxydodecanoyl)homoserine lactone.

1 Summary

2
3 *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a fatal human tropical
4 disease. The non-specific DNA-binding protein, DpsA plays a key role in protecting *B.*
5 *pseudomallei* from oxidative stress mediated, for example, by organic hydroperoxides. The
6 regulation of *dpsA* expression is poorly understood but one possibility is that it is regulated in
7 a cell population density-dependent manner via *N*-acylhomoserine lactone (AHL)-dependent
8 quorum sensing (QS) since we have located a *lux*-box motif within the *dpsA* promoter region.
9 Using liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC MS/MS), we first
10 established that *B. pseudomallei* strain PP844 synthesizes AHLs. These were identified as *N*-
11 octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL); *N*-(3-oxooctanoyl)homoserine lactone (3-oxo-C8-
12 HSL); *N*-(3-hydroxyoctanoyl)-homoserine lactone (3-hydroxy-C8-HSL), *N*-
13 decanoylhomoserine lactone (C10-HSL), *N*-(3-hydroxydecanoyl) homoserine lactone (3-
14 hydroxy-C10-HSL) and *N*-(3-hydroxydodecanoyl)homoserine lactone (3-hydroxy-C12-HSL).
15 Mutation of the genes coding for the LuxI homologue, BpsI or the LuxR homologue, BpsR
16 resulted in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis demonstrating that BpsI was
17 responsible for directing the synthesis of these AHLs only and that *bpsI* expression and hence
18 C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL production depends on BpsR. In *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants,
19 *dpsA* expression was substantially down-regulated. Furthermore, when expressed in
20 *Escherichia coli*, *dpsA* expression required both BpsR and C8-HSL. *bpsIR*-deficient mutants
21 exhibited hypersensitivity to the organic hydroperoxide, *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH),
22 by displaying a reduction in cell viability which was restored by provision of exogenous C8-
23 HSL (*bpsI* mutant only) or by complementation with the *bpsIR* genes or by overexpression of
24 *dpsA*. These data indicate that in *B. pseudomallei*, QS regulates the response to oxidative
25 stress at least in part via the BpsR/C8-HSL dependent regulation of DpsA.

1 INTRODUCTION

2

3 *Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a fatal tropical disease
4 endemic in areas of Southeast Asia and Australia (Wuthiekanun *et al.*, 1995). The organism
5 can be isolated from soil and water. Human infections occur mainly through skin abrasions
6 and inhalation of contaminated aerosols. Frequent relapse has been observed after apparent
7 cure and serological studies have shown that a significant proportion of individuals in
8 endemic areas can be infected asymptotically (Cheng & Currie, 2005). *In vitro* studies
9 have demonstrated that *B. pseudomallei* can survive and multiply inside phagocytes (Jones *et*
10 *al.*, 1996). To survive inside the phagolysosome, the organism has to endure both acid and
11 oxidative stress. DNA-binding protein from starved cells (Dps) is an abundant protein in
12 stationary phase *Escherichia coli* cells (Almiron *et al.*, 1992). Although Dps was originally
13 described as a non-specific DNA binding protein involved in resistance to oxidative stress, it
14 is actually a bacterioferritin and there are examples of Dps proteins which both bind DNA and
15 sequester iron (Martinez & Kolter, 1997; Stillman *et al.* 2005). These are thought to protect
16 DNA from damage both as a physical shield and by inhibiting Fenton reaction-catalyzed
17 oxyradical formation. Recently, the crystal structures of two Dps proteins (DpsA and DpsB)
18 from *Lactococcus lactis* have been described where both proteins were demonstrated to bind
19 DNA via an N-terminal α -helix (Stillman *et al.* 2005)

20

21 In *B. pseudomallei*, DpsA has been shown to protect DNA from damage by both acid and
22 oxidative stress (Loprasert *et al.*, 2004). The *dpsA* gene in the *B. pseudomallei* genome is
23 located downstream of *kaiG* which codes for a bifunctional enzyme with both catalase and
24 peroxidase activities. Although the mechanism by which DpsA is regulated is not well
25 understood, it is known that expression increases in response to oxidative stress through

1 increased transcription of the *katG* (catalase peroxidase) promoter, which is OxyR-dependent
2 (Loprasert *et al.*, 2004). Furthermore, *dpsA* can also be transcribed from its own promoter in
3 an OxyR-independent manner (Loprasert *et al.*, 2004).

4
5 Quorum sensing (QS) is a term used to describe the phenomenon where bacteria coordinate
6 the production of a diverse array of phenotypic behaviours in accordance with their cell
7 population size via production of diffusible cell-to-cell signal molecules (Swift *et al.*, 2001;
8 Cámara *et al.*, 2002). Once a threshold concentration has been reached, a response is triggered
9 that leads to changes in gene expression and consequently the phenotype of the cells. In
10 Gram-negative bacteria, the most intensively studied quorum-sensing systems rely upon the
11 interaction of *N*-acylhomoserine lactone (AHL) signal molecules, synthesised via LuxI-type
12 AHL synthases, with LuxR-type transcriptional regulator proteins. Together, the LuxR-type
13 protein and its cognate AHL then activate the expression of specific target genes (Swift *et al.*,
14 2001). Many Gram-negative bacteria possess more than one LuxR and/or LuxI gene and
15 produce multiple AHLs. For example, the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*
16 contains two LuxRI systems which operate in a hierarchical manner to regulate an arsenal of
17 virulence determinants and secondary metabolites (Cámara *et al.*, 2002; Lazdunski *et al.*,
18 2004).

19
20 In *B. pseudomallei*, a LuxRI AHL-dependent QS system termed BpsRI was first described in
21 2002 by Lumjiaktase, *et al.*, (GenBank accession no. AF501236). Subsequently, Valade *et al.*
22 (2004) reported that the PmlI-PmlR QS system is required for full virulence in *B.*
23 *pseudomallei* strain 008 as a *pmlI* mutant was significantly less virulent than the parental
24 strain in a murine infection model. The PmlI protein exhibits 98% sequence identity to BpsI
25 (Valade *et al.*, 2004). In *B. pseudomallei* strain KHW, a LuxRI pair closely related to BpsI-

BpsR was described by Song *et al.* (2005) who reported that it positively regulated phospholipase C but negatively regulated siderophore production. Both *bpsI* and *bpsR* mutants were attenuated in a *Caenorhabditis elegans* virulence assay (Song *et al.* 2005). Using HPLC and bioassays of *B. pseudomallei* spent culture supernatants, Valade *et al.*, (2004) tentatively identified C10-HSL which they attributed to PmlI although they did not examine the supernatant of the *pmlI* mutant or express *pmlI* in *E. coli* to establish whether PmlI was indeed responsible for C10-HSL synthesis. Song *et al.*, (2005) expressed *bpsI* in *E. coli* and, by HPLC, tentatively identified C8-HSL but did not examine the AHL profile of a *B. pseudomallei bpsI* mutant. Recently, three LuxR1 pairs together with two additional LuxR homologues have been identified in *B. pseudomallei* DD503 (Ulrich *et al.*, 2004a). DD503 was reported to produce at least five AHLs, including *N*-octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL), *N*-decanoyl-homoserine lactone (C10-HSL), *N*-(3-hydroxyoctanoyl) homoserine lactone (3-hydroxy-C8-HSL), *N*-3-hydroxydecanoyl homoserine lactone (3-hydroxy-C10-HSL) and *N*-3-oxotetradecanoyl homoserine lactone (3-oxo-C14-HSL). Mutation of individual *B. pseudomallei luxI* homologues was reported to have no effect on the AHL profile (Ulrich *et al.*, 2004a).

The regulation of *dpsA* expression in *Burkholderia* is poorly understood but one possibility is that it is regulated via AHL-dependent QS since there is a *lux* box motif located within its promoter region. Here we define the nature of the AHLs synthesized by *B. pseudomallei* PP844 and show that *dpsA* expression and resistance to oxidative stress is dependent on QS via BpsIR and C8-HSL.

1 METHODS

2
3 **Bacterial strains, plasmids and media.** Bacterial strains and plasmids used are shown in
4 Table 1. Unless otherwise stated, bacteria were cultured using Luria Bertani (LB) broth or
5 agar with appropriate antibiotics at 37°C. In cases of mixed cultures, e.g. conjugations,
6 incubations were at 30°C. Pseudomonas agar base supplemented with SR 103E (cetrимide,
7 fusidic acid and cephaloridine) from Oxoid was used, after conjugation, as a selective medium to
8 inhibit growth of *E. coli*. M9 minimal medium with 2% w/v glucose was used for β -
9 galactosidase activity assays. Antibiotics were used at the following concentrations when
10 required: ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, trimethoprim 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. pseudomallei* and 100 μg
11 ml^{-1} for *E. coli*, spectinomycin 800 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. pseudomallei* and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *E. coli*,
12 tetracycline 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and chloramphenicol 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

13
14 **Amplification and cloning of *bpsI* and *bpsR* genes.** Using the *cepI* and *cepR* genes of
15 *Burkholderia cepacia* as a template for the BLAST program
16 (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>), homologues of this AHL synthase and its cognate
17 transcriptional activator were identified in *B. pseudomallei* genome database
18 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pseudomallei/) and designated *bpsI* and *bpsR*
19 respectively. A PCR product of 663 bp containing the full length *bpsI* was amplified from *B.*
20 *pseudomallei* strain PP844 genomic DNA using primers BPSIF (5'-
21 ctgcagctccttgaatgacgaacggc -3') and BPSIR (5'- aagcttcacgcgaacttcgttcacgg -3') and cloned
22 into the *HindIII* and *PstI* sites of pUC19 to create pUCI. A PCR product of 2.5 kbp
23 containing both *bpsI* and *bpsR* (*bpsIR*) was amplified using primers BPSIF and BPSRR (5'-
24 ctgcaggaaccgttgatggagtgagc -3') and cloned into pBBR-Sp by blunt ended ligation to create
25 pBBR-IR3. The 2.5 kbp PCR product was cut by *EcoRI* to obtain a 1288 bp DNA fragment

1 containing full length *bpsR* gene which was cloned into pBBR-Sp to create pBBR-R2. The
2 sequences of *bpsI* and *bpsR* from *B. pseudomallei* strain PP844 were deposited in the
3 Genbank (accession number AF501236).

4 **Construction of *B. pseudomallei* *bpsI* and *bpsR* knockout and complemented mutants.**

5 *bpsI* (PK15), *bpsR* (PKR7) and *bpsIR* (KBIR5) mutants were constructed in *B. pseudomallei*
6 strain PP844. Briefly, A 298 bp fragment of the *bpsI* gene was amplified from PP844 using
7 primers BIPF (5'- gtcacgccgatcagttgctt -3') and BIPR (5'- agtacgatcgcgacgatacc -3'). The
8 blunt ended product was ligated into the suicide vector pKNOCK-TC to create pKBI, which
9 was then mobilized from *E. coli* S17-1 λ pir into PP844 by conjugation. Single-crossover
10 insertion mutants were selected on pseudomonas base agar containing 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline.
11 A blunt ended 323 bp fragment of the *bpsR* gene was amplified using primers BRPF (5'-
12 cgaacacctatccgaacggct -3') and BRPR (5'- aacggctcatcagcgagtgct -3'). The resulting fragment
13 was ligated into pKNOCK-CM to create pKBR. After conjugation into PP844, mutants were
14 selected on pseudomonas base agar containing 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol. Finally, the
15 double *bpsIR* mutant KBIR5 was created by conjugating pKBR into the PK15 mutant and
16 selecting on pseudomonas base agar containing 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$
17 chloramphenicol. For complementation of the knockout strain, pBBR-R2 was conjugated into
18 PKR7 to create PKR7+R which was selected on pseudomonas base agar containing 800 μg
19 ml^{-1} spectinomycin and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol. Plasmid pBBR-IR3 was conjugated into
20 KBIR5 to create KBIR5+IR which was selected on pseudomonas base agar containing 800 μg
21 ml^{-1} spectinomycin, 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol.

22
23
24 **Construction of *dpsA::lacZ* transcriptional fusion strains.** TnpD is a mini-transposon
25 vector containing the *dpsA* promoter fused to *lacZ* and maintained in *E. coli* CC118 (CpUT) as

described in previous studies (Loprasert *et al.*, 2004). Integration of the *dpsA* promoter::*lacZ* transcriptional fusion into the chromosome of *B. pseudomallei* PP844, the QS mutants PKI5, PKR7 and KBIR5 and their corresponding complemented strains was achieved by conjugation of TnpD on plates containing trimethoprim (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$). In order to express the DpsA protein in KBIR5, pDps (Loprasert *et al.*, 2004) was transformed into this mutant to create KBIR5+dpsA. To determine whether BpsR regulated *dpsA* directly, pBBR-R2 was introduced into *E. coli* CpUT to generate *E. coli* CpUT+R. The bacteria were selected on agar containing trimethoprim (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and spectinomycin (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Assay for β -galactosidase activity. Cell lysates taken from different phases of growth from *B. pseudomallei* strains grown in MM9 medium with 0.5 μM NaCl and with or without C8-HSL (200 nM) at 37°C were prepared using bacterial protein extraction reagent (Pierce) and assayed for β -galactosidase activity in Miller units using o-nitrophenyl- β -D-galactoside as a substrate (Miller, 1972). Similar assays were undertaken for *E. coli* CpUT and CpUT+R grown in the absence or presence of C8-HSL, 3-oxoC8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL (100 nM).

Growth on oxidant agar plates. Bacterial cultures were grown overnight in M9 low glucose medium and adjusted to OD₆₀₀ 1.0 and 10-fold serially diluted. Ten microliters of each dilution was spotted onto LB agar containing 150 μM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) and the extent of growth was observed after 24 h of incubation at 37°C (Loprasert *et al.*, 2004).

Growth inhibition zone assay. Bacterial cultures grown overnight in M9 low glucose medium were adjusted to OD₆₀₀ 1.0 and added to 3 ml of warm top LB agar. The mixtures

were overlaid onto LB agar plates. Paper discs containing *t*-BOOH (250 μ M) were placed on the cell lawn. Zone diameters of growth inhibition were measured after 24 h incubation (Loprasert *et al.*, 2004).

Oxidative stress assay. Overnight stationary phase cultures of wild type, KBIR5 and KBIR5+dpsA mutants cells were incubated at 37°C with shaking at 250 rpm in the presence and absence of *t*-BOOH at concentrations up to 150 μ M. After the addition of *t*-BOOH (which becomes time zero in the experiment), viable-cell counts every 30 min were periodically determined.

Synthesis of AHLs. A range of AHLs with acyl side chains from C4 to C14 in length with or without 3-oxo or 3-hydroxy substituents were synthesised as previously described by Chhabra *et al.* (1993; 2003).

AHL extraction and LC MS/MS analysis *B. pseudomallei* strains were grown to an OD₆₀₀ 1.6 in 2 l tryptic soy broth at 37°C with shaking at 250 rpm. Cells were removed by centrifugation and the supernatant was extracted twice with equal volumes of acidified ethyl acetate (100 μ l of glacial acetic acid per liter of ethyl acetate) and concentrated by rotary evaporation at 40-45°C. The residue was resuspended in 50 μ l of methanol prior to liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). AHLs were separated by reverse phase chromatography (RP-HPLC) using an Exsil Pure C18 MS 5 μ column (250 x 2.1 mm; Alltech Associates, Inc.) coupled to a tandem mass spectrometer (Applied Biosystems 4000 Q-TRAP) and eluted with a 35-70% w/v acetonitrile/water gradient as described before (Yates *et al.*, 2002). Enhanced product trap experiments (EPI) were triggered by precursor ion (m/z 102) scanning for between the m/z range 150-350. The precursor ion m/z 102 is

characteristic of the homoserine lactone ring moiety. EPI spectra (m/z range 80-400) containing an ion at m/z 102 ion were compared with the product mass spectra of the corresponding synthetic AHL standard.

RESULTS

B. pseudomallei strain PP844 produces multiple AHLs

Spent stationary phase culture supernatants prepared from *B. pseudomallei* strain PP844 were extracted with ethyl acetate and subjected to LC MS/MS. The data obtained are summarized in Table 2. Six AHLs were unequivocally identified by comparison of their retention times, molecular and principal fragment ions with synthetic standards. These are C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL.

C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL production is dependent on *bpsI* and *bpsR*

The gene coding for the LuxI homologue *bpsI* was cloned from the *B. pseudomallei* PP844 chromosome and sequenced. *BpsI* is 97% and 98% identical with the corresponding genes from *B. pseudomallei* strains K96243 and KHW respectively (data not shown). Since the identity of the AHL(s) synthesized via *BpsI* have not been unequivocally chemically identified, the *bpsI* gene was expressed in *E. coli* EBPI. Ethyl acetate extracts of EBPI culture supernatants were subjected to LC MS/MS and a molecule with an m/z 228 was identified with fragmentation ions of m/z 127 and 102, characteristic of C8-HSL (Table 2).

To evaluate the impact of *bpsI* and *bpsR* mutations on the AHL profile of *B. pseudomallei* PP844, we constructed *bpsI* (PK15) and *bpsR* (PKR7) mutants. Table 2 compares the AHL profiles derived from LC MS/MS analysis of the corresponding spent culture supernatants. In both mutants, the only compounds absent are C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL a finding which indicates that *bpsI* is responsible for their synthesis in *B. pseudomallei* PP844 and that the BpsIR system does not impact on the expression of the other AHL synthases present in this organism. Table 2 also shows that *bpsI* is regulated by BpsR since mutation of *bpsR* results in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis.

Expression of *dpsA* in *B. pseudomallei* is BpsIR/C8-HSL-dependent

In the promoter region (-74 to -55) of *dpsA*, we identified a 20 base pair sequence (GCATCCCGcATCGGGcATGC) as a *lux* box motif characteristic of genes which are regulated via LuxRI/AHL-dependent QS. This motif matches the consensus sequence for the *V. fischeri luxI lux* box at 11 out of 21 positions as well as the *P. aeruginosa rhII lux* box (12/20 bases). To assess whether QS is involved in regulating the response of *B. pseudomallei* to oxidative stress, we first introduced a *dpsA::lacZ* transcriptional fusion via *trpD* onto the chromosome of *B. pseudomallei* PP844, the isogenic *bpsI* (PK15), *bpsR* (PKR7) mutants and *bpsIR* double mutant (KBIR5) as well as the corresponding complemented strains.

Fig. 1 shows that *dpsA* expression is induced in late logarithmic phase of growth (6 h post inoculation). The *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants all exhibited substantially reduced levels of β -galactosidase activity throughout growth when compared to the PP844 wild type indicating that *dpsA* is regulated via *bpsIR*. Provision of exogenous, synthetic C8-HSL for the *bpsI*

mutant (PKI5) or genetic complementation of the *bpsR* (PKR7) and *bpsIR* (KBIR5) mutants completely restored *dpsA* expression (Fig. 1) suggesting that the *dpsA* gene is directly or indirectly regulated by the *bpsIR* QS system. Fig. 1 also demonstrates that mutations in the *bpsIR* QS system have no adverse effects on the growth of *B. pseudomallei* under these culture conditions and that exogenous synthetic C8-HSL is unable to overcome the growth phase-dependency of *dpsA* expression.

***B. pseudomallei* *bpsIR* QS mutants show increased sensitivity to oxidative stress due to reduction of *dpsA* expression**

Mutation or overexpression of *dpsA* in *B. pseudomallei* confers hypersensitivity or increased resistance respectively to the organic oxidants such as the organic hydroperoxide *t*-BOOH (Loprasert et al., 2004). To determine the sensitivity of the *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants to oxidative stress, each strain was grown on oxidant agar plates containing 150 μ M *t*-BOOH. Each of the mutants was more sensitive to *t*-BOOH than the wild type or the corresponding complemented strains (Fig. 2a). The wild type and complemented strains grew when diluted to 10^{-5} - 10^{-7} cfu ml⁻¹ however in contrast, the QS mutants only grew when diluted to 10^{-3} - 10^{-4} cfu ml⁻¹. This suggests that PKI5, PKR7, and KBIR5 are between 1,000 - 10,000 times more sensitive to hydroperoxide stress.

To evaluate whether the increased sensitivity of the QS mutants was a consequence of reduced *dpsA* expression, we analyzed the response of the wild type PP844, *bpsIR* mutant KBIR5 and KBIR5 carrying pDps (KBIR5+dpsA). pDps is a plasmid borne copy of *dpsA* previously shown to enhance the resistance of *B. pseudomallei* to *t*-BOOH (Loprasert et al., 2004). Fig. 2b shows that the wild type grew to the dilution of to 10^{-7} cfu ml⁻¹ and KBIR5 to

1 10^{-2} cfu ml⁻¹, whereas KBIR5+dpsA grew to 10^{-6} cfu ml⁻¹. Taken together, these results
2 demonstrate that *bpsI* and *bpsR* QS mutants are more sensitive to oxidative stress and this is
3 likely to be due to a reduction in *dpsA* expression and hence DpsA production. The growth
4 inhibition zone assay (Fig. 2c) further confirmed that both wild type and complemented *B.*
5 *pseudomallei* strains were more resistant to *t*-BOOH than were the QS mutants on LB agar.
6 The *dpsA* complimented strain also showed more resistant to *t*-BOOH as expected.

7

8 **BpsR and C8-HSL are required for maximum expression of *dpsA* in *E. coli***

9

10 To determine whether BpsR directly regulated the expression of *dpsA* in the presence or
11 absence of AHLs, we used *E. coli* CpUT harbouring the *dpsA::lacZ* transcriptional fusion
12 plasmid, TnpD, together with pBBR-R2 to give *E. coli* strain CpUT+R. Fig. 3 shows that
13 *dpsA* promoter activity in *E. coli* CpUT is ~800 β -galactosidase units ml⁻¹ and remains
14 unchanged on introducing *bpsR* (*E. coli* CpUT+R). Exogenous provision of C8-HSL to *E.*
15 *coli* CpUT+R but not *E. coli* CpUT increased *dpsA* expression approximately 3-fold (to
16 ~2 200 β -galactosidase units ml⁻¹). None of the other AHLs produced by *B. pseudomallei*
17 strain PP844 enhanced *dpsA* expression.

18

19

20 **DISCUSSION**

21

22 In common with Gram negative bacteria such as *P. aeruginosa* (Winson *et al.*, 1995),
23 *Rhizobium leguminosarum* (Lithgow *et al.*, 2000) and *Yersinia pseudotuberculosis* (Atkinson
24 *et al.*, 1999), *B. pseudomallei* possesses several LuxI homologues and produces multiple AHL
25 QS signal molecules. *B. pseudomallei* PP844 is an extremely virulent strain isolated from a

1 patient who died from the most severe clinical manifestation of melioidosis (Utaisincharoen *et*
2 *al.*, 2001). PP844 produces six AHLs with C8, C10 and C12 acyl side chains with or without
3 C3 position substituents. Of these, 3-oxo-C8-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL have not
4 previously been identified in *B. pseudomallei* while C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL,
5 and 3-hydroxy-C10-HSL were previously reported by Ulrich *et al.* (2004a) in *B. pseudomallei*
6 strain DD03. This strain also made 3-oxo-C14-HSL, an AHL which was not present in *B.*
7 *pseudomallei* PP844 culture supernatants. In bacteria which possess multiple LuxRI
8 homologues, these QS systems are usually interdependent. In *B. pseudomallei* DD03,
9 mutation of any of the three individual AHL synthase genes had no effect on the AHL profile
10 apart from the *pmlII* mutant which did not produce 3-hydroxy-C14-HSL. These data do not
11 however define which AHLs are synthesized by which LuxI homologue and suggest that
12 there is substantial redundancy in the system. Here we have shown that mutation of *bpsI*
13 results in the specific loss of two AHLs, C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL from the AHL profile of
14 the parental PP844 strain. To confirm these data, *bpsI* was expressed in *E. coli*. However,
15 only C8-HSL was synthesized suggesting either that *E. coli* is unable to synthesize 3-oxo-C8-
16 HSL via BpsI or that 3-oxo-C8-HSL is produced via a different AHL synthase, the expression
17 of which depends on the presence of C8-HSL. When expressed in a heterologous host, LuxI
18 homologues do not always generate the same AHL profile as in the original bacterium
19 (Atkinson *et al.*, 1999) and this is the most likely explanation for our observation. Our
20 unequivocal demonstration that BpsI directs the synthesis of C8-HSL is consistent with the
21 HPLC and bioassay data reported by Song *et al* (2005) for *B. pseudomallei* strain KHW.
22 However, it is not possible to conclude that C10-HSL is the main AHL produced via PmlI
23 (the equivalent gene to *bpsI*) in *B. pseudomallei* strain 088 since the authors only examined
24 culture supernatants from the parent strain (Valade *et al.*, 2004) which produces multiple
25 AHLs.

1
2 In *E. pseudomallei* and the closely related obligate animal pathogen *Burkholderia mallei*, QS
3 mutants are highly attenuated in experimental animal infection models (Ulrich *et al.*, 2004a;
4 2004b). Although *B. mallei* appears to possess only two *luxI* homologues, nevertheless it also
5 produces C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL and 3-hydroxy-C10-HSL (Ulrich *et al.*
6 2004b) whereas the non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* does not produce any of the
7 3-hydroxy or 3-oxo- compounds although it does synthesize C6-HSL, C8-HSL and C10-HSL
8 (Ulrich *et al.*, 2004c). It is therefore possible that the QS systems employing the substituted
9 AHLs are more closely associated with the regulation of virulence.

10
11 Mutation of *bpsR* in PP844 also resulted in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis
12 indicating that BpsR is required for the synthesis of these two AHLs presumably by
13 controlling *bpsI* expression. Indeed, Song *et al* (2005) have shown that C8-HSL is required to
14 activate transcription of both *bpsI* and *bpsR*. Our data also indicate that the *bpsIR* system
15 does not control the expression of the two other *luxI* homologues systems present in *B.*
16 *pseudomallei* although it remains possible that the other LuxR proteins and AHLs may
17 influence *bpsIR* expression.

18
19 The organic hydroperoxide *t*-BOOH has been shown to cause DNA damage in mammalian
20 cells because it reacts with metals to generate *tert*-butoxyl radicals (Altman *et al.*, 1994).
21 DpsA type proteins have previously been demonstrated to prevent iron-dependent hydroxy
22 radical formation (Yamamoto *et al.*, 2002) and in *B. pseudomallei*, DpsA conferred protection
23 against *t*-BOOH (Loprasert *et al.*, 2004). As *bpsI* and *bpsR* mutants exhibit reduced
24 expression of *dpsA*, we thought it likely that they would show increased sensitivity to *t*-
25 BOOH. This was indeed the case with both mutants being more sensitive to *t*-BOOH. This

1 defect could be complemented by provision of C8-HSL to the *bpsI* mutant or by genetic
2 complementation of the *bpsR* and *bpsRI* mutants. In addition, the viability of the QS mutants
3 was reduced in the presence of *t*-BOOH when compared with the parent strain cultured under
4 similar conditions. Protection against *t*-BOOH could also be achieved in the *bpsRI* mutants
5 by increasing the expression of *dpsA*. The data suggest that the increased sensitivity to *t*-
6 BOOH observed in the *bpsRI* mutants is due specifically to a reduction in *dpsA* expression.
7 Thus the response of the *B. pseudomallei* wild type to oxidative stress is partially controlled in
8 a cell population density manner through QS as demonstrated in this study perhaps reflecting
9 the need to protect DNA from oxidative damage in high density "overcrowded" stationary
10 phase cultures. In *P. aeruginosa*, the response to oxidative stress imposed by hydrogen
11 peroxide and the O₂⁻ generating agent phenazine methosulphate is also QS controlled since
12 *sodA*, *sodB* and *kata* are regulated by both the *las* and *rhl* QS systems (Hassett *et al.*, 1999).
13
14 *B. pseudomallei* can resist phagocytic intracellular killing (Egan & Gordon, 1996) and remain
15 dormant within a host for many years (Nathan *et al.*, 2005). It has evolved a variety of
16 mechanisms to protect its DNA from oxidative damage from either cellular metabolism or the
17 environment, and under such conditions will produce high levels of the non-specific DNA-
18 binding protein: DpsA which effectively protects DNA against oxidants (Almiron *et al.*, 1992;
19 Loprasert *et al.*, 2004). In *B. pseudomallei* (and also *B. cenocepacia* strain, J2315) *dpsA* is
20 located adjacent to *katG*. In the former, both genes are co-transcribed during oxidative stress
21 but under conditions where *katG* is not highly induced, *dpsA* is transcribed from a second
22 promoter within the *katG-dpsA* intergenic region (Loprasert *et al.*, 2003). This region also
23 contains a *lux* box motif and here we have shown that *dpsA* expression is positively controlled
24 by the BpsRI QS system. In *Burkholderia cepacia* strain ATCC25416, Aguilar *et al.* (2003)
25 identified a genomic clone (P80) that was activated in an *E. coli* strain carrying CepR when

1 supplied with C8-HSL. Although they were unable to identify the target gene(s) regulated by
2 CepF in ATCC25416, from the sequence data obtained they noted that a DpsA homologue
3 was present 200 bp downstream of the identified sequence in *B. cenocepacia* strain (J2315), a
4 strain whose genome has been sequenced. Although no direct evidence was presented, it is
5 possible that the response of *B. cepacia* complex to oxidative stress may also be quorum
6 sensing controlled.

7
8 In *B. pseudomallei*, *dpsA* expression is not completely dependent on *bpsRI* since ~450 β -
9 galactosidase u ml⁻¹ are observed in the QS mutants (Fig. 1). It is therefore likely that *dpsA*
10 expression is also subject to control by a number of regulatory systems where QS provides the
11 population density signal required to trigger *dpsA* expression in combination with other
12 environmental signals. This is a characteristic of many AHL-dependent QS systems (Withers
13 et al., 2001). Furthermore, it is noteworthy that *dpsA* expression was not advanced in *B.*
14 *pseudomallei* by provision of exogenous C8-HSL and remains population and growth phase-
15 dependent. This phenomenon has also been noted in *P. aeruginosa* where provision of
16 exogenous AHLs at the start of growth does not induce early induction of QS-dependent
17 virulence determinants (Diggle et al., 2002; 2003).

18
19 In conclusion, we show that (a) *B. pseudomallei* PP844 synthesizes six AHLs two of which
20 (3-oxo-C8-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL) have not previously been identified in *B.*
21 *pseudomallei*; (b) BpsI directs the synthesis of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL; (c) BpsR, in
22 conjunction with C8-HSL, contributes to the oxidative stress response by positively
23 regulating *dpsA* expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Thailand Research Fund grant RSA 4780017, the Melioidosis network research grants from the National Health Foundation Thailand, and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council, U.K. P. Lumjiaktase was supported by Thailand Research Fund Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (PHD/0187/2544). The authors would like to thank W. Whangsuk and R. Sallabhan at the Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute and Catherine Ortori at Centre for Analytical Bioscience, University of Nottingham for help with the LC MS/MS.

REFERENCES

- Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M. & Venturi, V. (2003). Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* **185**, 6456-6462.
- Alexeyev, M. F. (1999). The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *Biotechniques* **26**, 824-826.
- Amiron, M., Link, A. J., Furlong, D. & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes & Dev.* **6**, 2646-2654.

Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers, L., Lin, Z., Lumpkin, J. A., Remacle, J.,
Dizdaroglu, M. & Rao, G. (1994). *tert*-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in
cultured mammalian cells. *Mutat Res* **306**, 35–44.

Atkinson, S., Throup, J. P., Stewart, G. S. A. B. & Williams, P. (1999). A hierarchical
quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of
motility and clumping. *Mol Microbiol* **33**, 1267–1277.

Cámara, M., Williams, P. & Hardman, A. (2002). Controlling infection by tuning in and
turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* **2**, 667–676.

Cheng, A. C. & Currie, B. J. (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and
management. *Clin Microbiol Rev* **18**, 383–416.

Chhabra, S. R., Stead, P., Bainton, N. J., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B.,
Williams, P. & Bycroft, B. W. (1993). Autoregulation of carbapenem biosynthesis in
Erwinia carotovora *J Antibiot* **46**, 441–454.

Chhabra, S.R., Harty, C., Hooi, D.S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard,
D.I. & Bycroft, B.W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal quorum sensing
molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J Med Chem*
46, 97–104.

De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., & Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon
derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned
DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6568–6572

- 1 Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., & Cámara, M. (2002). Advancing
2 the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine
3 lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**, 2576-2586.
- 4
- 5 Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M. & Williams, P.
6 (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-
7 dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of
8 stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**, 29-43.
- 9
- 10 Egan, A.M., & Gordon, D.L. (1996). *Burkholderia pseudomallei* activates complement and
11 is ingested but not killed by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **64**, 4952-4959.
- 12
- 13 Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*
14 **166**, 557-580.
- 15
- 16 Hassett, D.J., Ma, J.F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochsner, U., West, S.E.H.,
17 Huang, C.-T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P.S., McFeters, G., Passador, L., &
18 Iglewski, B.H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of
19 catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen
20 peroxide. *Mol Microbiol* **34**, 1082-1093.
- 21
- 22 Jones, A. L., Beveridge, T. J. & Woods, D. E. (1996). Intracellular survival of *Burkholderia*
23 *pseudomallei*. *Infect Immun* **64**, 782-790.
- 24

- 1 **Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J.N. (2004).** Regulatory circuits and
2 communication in gram-negative bacteria. *Nature Rev Microbiol* 2, 581-592.
- 3
- 4 **Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams,**
5 **P. & Downie, J.A. (2000).** The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls
6 a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* 37, 81-97.
- 7
- 8 **Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2000).** Characterization
9 and mutagenesis of *fur* gene from *Burkholderia pseudomallei*. *Gene* 254, 129-137.
- 10
- 11 **Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2003).** Regulation of the
12 *katG-dpsA* operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei*
13 exposed to oxidative stress. *FEBS Lett* 542, 17-21.
- 14
- 15 **Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2004).** DpsA protects the
16 human pathogen *Burkholderia pseudomallei* against organic hydroperoxide. *Arch Microbiol*
17 182, 96-101.
- 18
- 19 **Martinez, A. & Kolter, R. (1997).** Protection of DNA during oxidative stress by the non-
20 specific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* 179, 5188-5194.
- 21
- 22 **Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold
23 Spring Harbor Laboratory Press. pp. 352-355.
- 24

- 1 Nathan, S. A., Qvist, R. & Puthucheary, S. D. (2005). Kinetic studies of bioactive products
2 nitric oxide and 8-iso-PGF(2alpha) in *Burkholderia pseudomallei* infected human
3 macrophages, and their role in the intracellular survival of these organisms. *FEMS Immunol*
4 *Med Microbiol* **43**, 177-183.
- 5
- 6 Simon, R., Priefer, U. & Puhler A. (1983). A broad host range mobilization system for *in*
7 *vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology*
8 **1**, 784-791.
- 9
- 10 Song, Y., Xie, C., Ong, Y. M., Gan, Y. H. & Chua, K. L. (2005). The BpsIR quorum-
11 sensing system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol* **187**, 785-790.
- 12
- 13 Stillman, T.J., Upadhyay, M., Norte, V.A., Sedelnikova, S.E., Carradus, M., Tzokov, S.,
14 Bullough, P.A., Shearman, C.A., Gasson, M.J., Williams, C.H., Artymiuk, P.J. & Green
15 J. (2005). The crystal structures of *Lactococcus lactis* MG1363 Dps proteins reveal the
16 presence of an N-terminal helix that is required for DNA binding. *Mol Microbiol* **57**:1101-
17 1112.
- 18
- 19 Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Salmond, G. P. & Williams
20 P. (2001). Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial
21 physiology. *Adv Microb Physiol* **45**, 199-270.
- 22
- 23 Ulrich, R. L., Deshazer, D., Brueggemann, E. E., Hines, H. B., Oyston, P. C. & Jeddloh,
24 J. A. (2004a). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J*
25 *Med Microbiol* **53**, 1053-1064.

1

2 **Ulrich, R. L., Deshazer, D., Hines, H. B. & Jeddalo, J. A. (2004b).** Quorum sensing: a
3 transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect*
4 *Immun* **72**, 6589-6596.

5

6 **Ulrich, R. L., Hines, H. B., Parthasarathy, N. & Jeddalo, J. A. (2004c).** Mutational
7 analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-
8 sensing network. *J Bacteriol* **186**, 4350-4360.

9

10 **Utaisincharoen, P., Tangthawornchaikul, N., Kespichayawattana, W., Chaisuriya, P., &**
11 **Sirisinha, S. (2001).** *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide
12 synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol*
13 *Immunol* **45**, 307-313.

14

15 **Valade, E., Thibault, F. M., Gauthier, Y. P., Palencia, M., Popoff, M. Y. & Vidal, D. R.**
16 **(2004).** The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key
17 role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J Bacteriol* **186**, 2288-2294.

18

19 **Wason, M. K., Cámara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally,**
20 **M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B.,**
21 **& Williams, P. (1995).** Multiple *N*-acylhomoserine lactone signal molecules regulate
22 production of virulence determinants and secondary metabolites in *P. aeruginosa*. *Proc Natl*
23 *Acad Sci USA* **92**, 9427-9431.

24

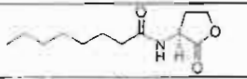
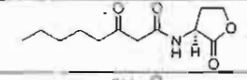
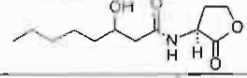
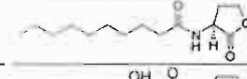
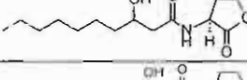
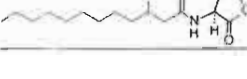
- Withers, H., Swift, S. & Williams P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks. *Curr. Opin. Microbiol* **4**, 186-193.
- Wuthiekanun, V., Smith, M. D., Dance, D. A. & White, N. J. (1995). Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**, 41-43.
- Yamamoto, Y., Foote L. B., Hantgan R. R. & Kamio, Y. (2002). An iron-binding protein, Dpf, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J. Bacteriol* **184**, 2931-2939.
- Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goidner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., & Williams, P. (2002). *N*-acyl homoserine lactone undergo lactonysis in a pH- temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **70**, 5635-5646.

1 Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristic(s)*	Source or reference
<i>B. pseudomallei</i> strains		
PP844	Wild-type, virulent clinical isolate	Loprasert et al. 2000
PK15	PP844 containing pKNOCK::bplp, Tc ^r	This study
PKR7	PP844 containing pKNOCK::bplp, Cm ^r	This study
KBIR5	PP844 containing pKNOCK::bplp, pknock::bplp, Tc ^r Cm ^r	This study
PKR7+R	PKR7 containing pBBR-R2, Cm ^r Sp ^r	This study
KBIR5+IR	KBIR5 containing pBBR-IR3, Tc ^r Cm ^r Sp ^r	This study
KBIR5+dpsA	KBIR5 containing pDps, Tc ^r Cm ^r Sp ^r	This study
<i>E. coli</i> strains		
DH5α	<i>F</i> Φ80dlacZ ΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 hsdR17 (rk ^r mk ^r) supE44 λ-thi-1 relA1 gyr A96	Hanahan et al. 1983
S17-1 λ pir	RP4-2-ter::Mu-1 kan::Tn7 (Tp ^r Sm ^r) thi proA hsdR recA	Simon et al. 1983
CC118	<i>E. coli</i> strain used as a host for conjugation of transposable element pUT-mini-Tn5Cm	De Lorenzo et al. 1990
CpUT	CC118 containing TnpD vector, Tp ^r	Loprasert et al. 2004
CpUT+R	CpUT containing pBBR-R2, Tp ^r Sp ^r	This study
EBPI	DH5α containing pUCI, Amp ^r	This study
Plasmids		
pUC1	pUC19 containing the full-length <i>B. pseudomallei</i> bplp gene, Amp ^r	This study
pKNOCK-Tc	Mobilizable suicide vector for construction of gene knockouts in Gram-negative bacteria, Tc ^r	Alexeyev et al. 1999
pKNOCK-Cm	Mobilizable suicide vector for construction of gene knockouts in Gram-negative bacteria, Cm ^r	Alexeyev et al. 1999
pBBR-Sp	Broad-host-range cloning vector, Sp ^r	Loprasert et al. 2004
pKBI	pKNOCK containing a 298-bp internal segment of <i>B. pseudomallei</i> bplp	This study
pKBR	pKNOCK containing a 323-bp internal segment of <i>B. pseudomallei</i> bpsR	This study
pBBR-R2	pBBR-Sp containing the full-length <i>B. pseudomallei</i> bpsR	This study
pBBR-IR3	pBBR-Sp containing the full-length <i>B. pseudomallei</i> bpsIR gene	This study
pDps	pBBR-Sp containing the full-length <i>B. pseudomallei</i> dpsA gene	Loprasert et al. 2004
TnpD	A 654 bp fragment containing the 5' end of <i>dpsA</i> and 400 bp of upstream <i>dpsA</i> sequence inserted upstream of <i>lacZ</i> in pUT-Tn5lacZ1, Tp ^r	Loprasert et al. 2004

2
3 * Amp^r, ampicillin resistant; Tc^r, Tetracycline resistant; Cm^r, Chloramphenicol resistant; Sp^r, Spectinomycin resistant; Tp^r
4 trimethoprim resistant.

1 **Table 2.** LC MS/MS analysis of the spent culture supernatants of *B. pseudomallei* PP844, its
 2 corresponding quorum sensing mutants, and an *E. coli* strain harbouring *bpsI*, showing the
 3 profiles of AHL molecules synthesized by these strains.

AHL		<i>m/z</i>	Reten tion time (min)	Principal fragment ions	PP844 (wild type)	PKI5 (<i>bpsI</i> -)	PKR7 (<i>bpsR</i> -)	EBPI (<i>E. coli</i> + <i>bpsI</i>)
C8-HSL		228	5.9	228, 127, 102	+	-	-	+
3-oxo-C8-HSL		242	4.8	242, 141, 102	+	-	-	-
3-hydroxy-C8-HSL		244	4.6	244, 226, 125, 102	+	+	+	-
C10-HSL		256	8.5	256, 155, 102	+	+	+	-
3-hydroxy-C10-HSL		272	5.4	272, 254, 153, 102	+	+	+	-
3-hydroxy-C12-HSL		300	7.9	300, 282, 181, 102	+	+	+	-

7

3

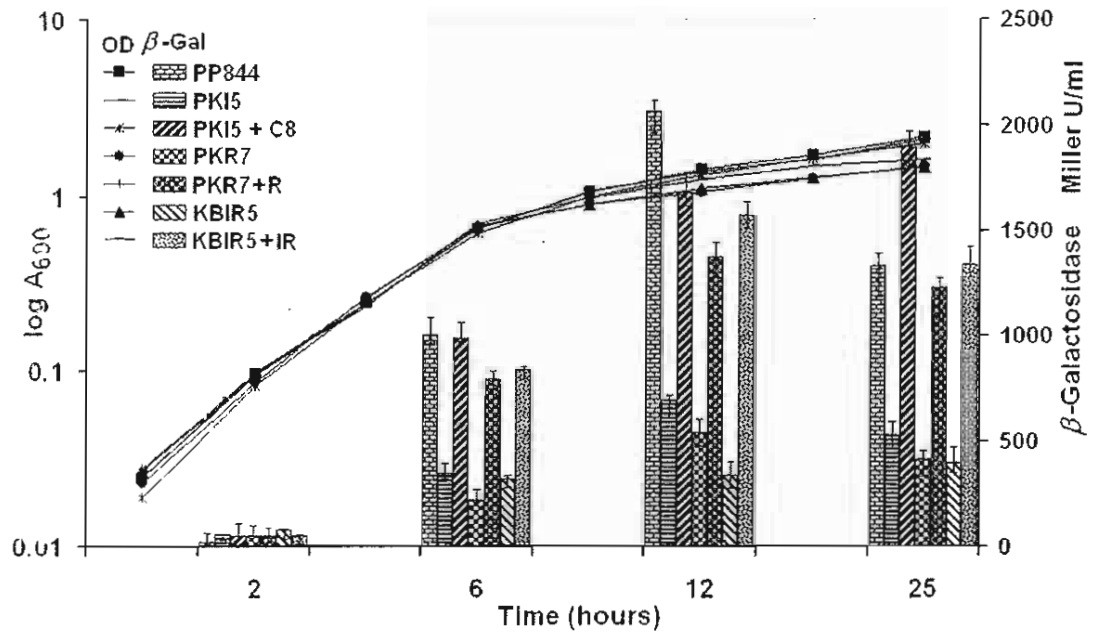
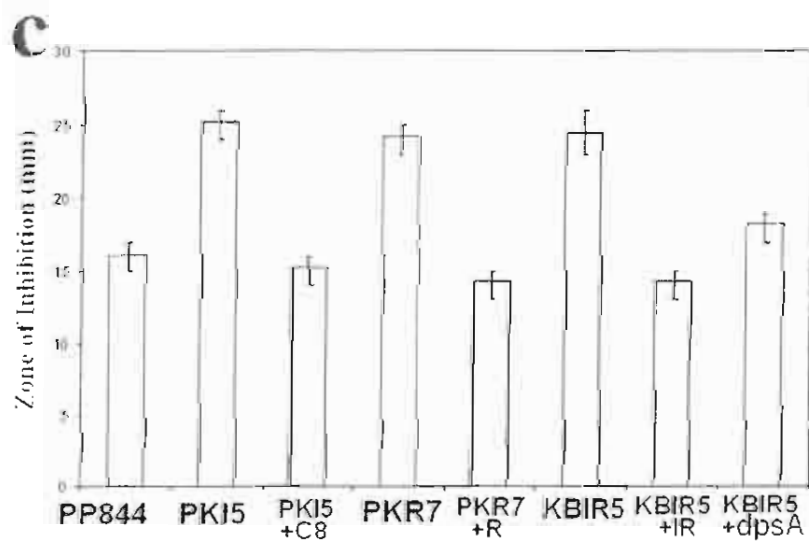
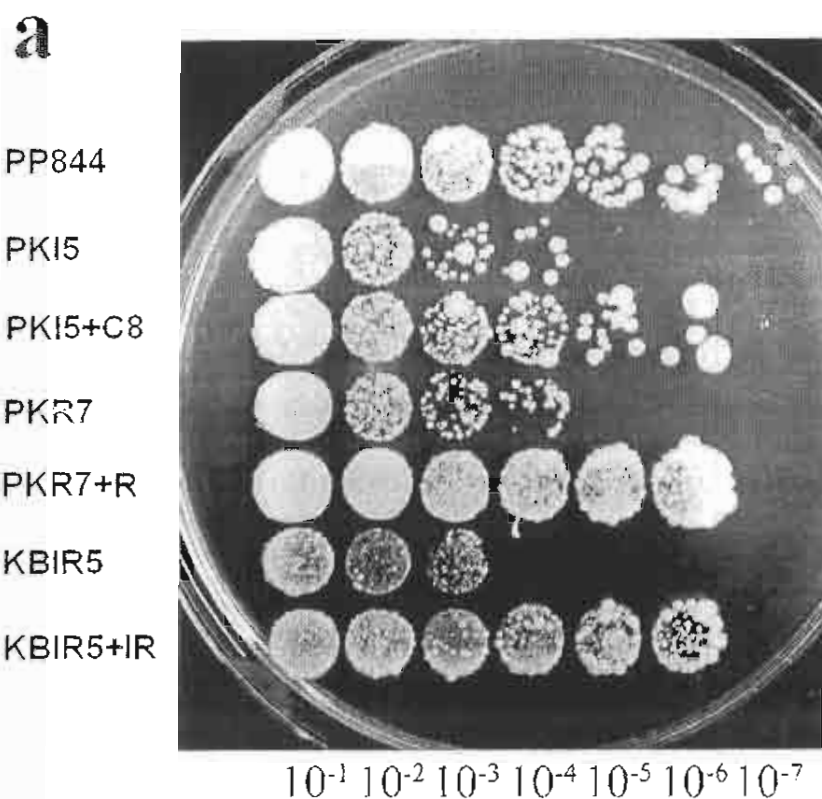


Fig. 1. Expression of *dpsA* promoter during growth of *B. pseudomallei*. Average β -galactosidase activities (patterns) from triplicate experiments in crude extracts of the *dpsA-lacZ* transcription fusion integrated into *B. pseudomallei* parent strain PP844, *bpsI* knockout mutant (PKI5), *bpsI* knockout mutant supplied with 200 nM of exogenous C8-HSL (PKI5+C8), *bpsR* mutant (PKR7), *bpsR* knockout mutant complemented with *bpsR* plasmid pBBR-R2 (PKR7+R), *bpsIR* double knockout mutant (KBIR5) and *bpsIR* double knockout mutant complemented with the *bpsIR* plasmid pBBR-IR3 (KBIR5+IR) were shown by bar graphs and their range were shown by error bars. The negative control used was the PP844 parent strain without the *dpsA-lacZ* transcriptional fusion. The growth (A₆₀₀) was shown (line with symbol).



1

2 **Fig. 2.** Sensitivity of *B. pseudomallei* quorum sensing mutants to *t*-BOOH.

3 Determination of the levels of resistance to *B. pseudomallei* *t*-BOOH killing in the parent
4 strain PP844, PKI5, PKI5 with exogenous C8-HSL (PKI5+C8), PKR7, PKR7+R,
5 KBIR5, KBIR5+IR, and KBIR5+dpsA. (a, b) Growth on oxidant agar plates assay. Serial
6 10-fold dilutions of cultures were spotted. (c) Growth inhibition zone assay. Average
7 growth inhibitory zone diameters were shown. The assay was done in triplicate and
8 ranges were shown as error bars.

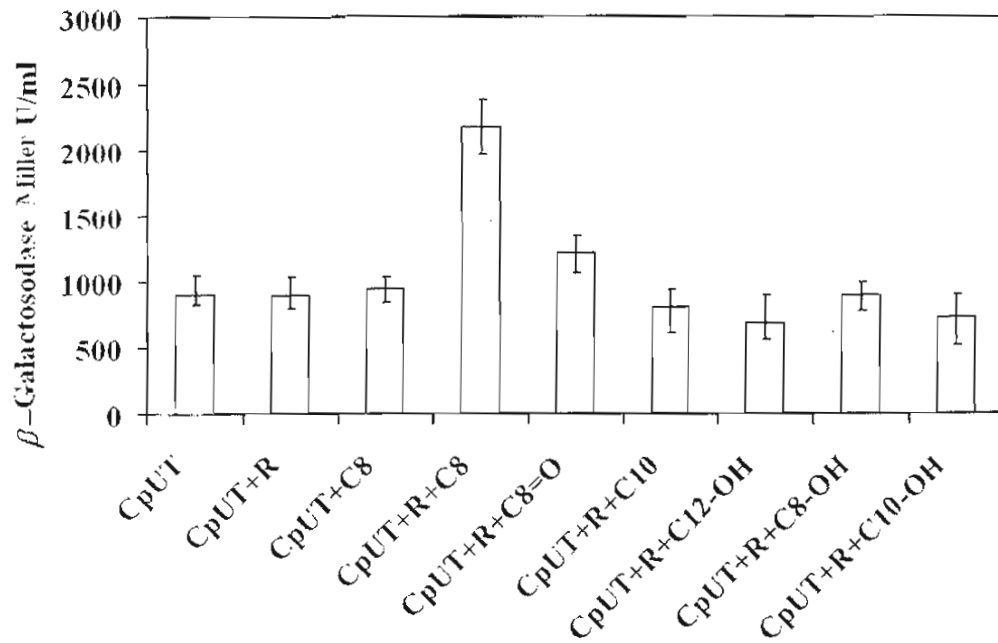


Fig. 3. Expression of *dpsA* in *E. coli* in the presence and absence of *bpsR* and AHLs (100 nM). The β -galactosidase activities were determined for *E. coli* carrying the *dpsA::lacZ* fusion without (*E. coli* CpUT) or with *bpsR* (*E. coli* CpUT+R) in the absence or presence of the AHLs produced by *B. pseudomallei* PP844 where C8 is C8-HSL, C8=O is 3-oxo-C8-HSL, C10 is C10-HSL, C12-OH is 3-hydroxy-C12-HSL; C8-OH is 3-hydroxy-C8-HSL and C10-OH is 3-hydroxy-C10-HSL. Data are given as means of triplicate experiments.

INBOX: 41 of 156

Move | Copy [Delete](#) | [Reply](#) | [Reply to all](#) | [Forward](#) | [Save as](#)[Back to INBOX](#)  **Date** : Fri, 04 Aug 2006 14:28:33 +0100**From** : Molecular and Cellular Probes <esubmissionsupport@elsevier.com> **To** : scstp@mucc.mahidol.ac.th **Subject** : Your Submission

Ms. Ref. No.: YMCPR-D-06-00032R1

Title: Comparative proteomic profiles and the potential markers between Burkholderia pseudomallei and Burkholderia thailandensis
Molecular & Cellular Probes

Dear Dr. Sumalee Tungpradabkul, PhD,

A final disposition of "Accept" has been registered for the above-mentioned manuscript.

Kind regards,

Sara Dornan

Journal Manager

Molecular & Cellular Probes

Comments from the Editors and Reviewers:

[Delete](#) | [Reply](#) | [Reply to all](#) | [Forward](#) | [Save as](#)[Back to INBOX](#)  Move | Copy

Comparative proteomic profiles and the potential markers between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*

Patompon Wongtrakoongate¹, Napachanok Mongkoldhumrongkul², Suthidarak Chaijan³, Sumalee Kamchonwongpaisan² and Sumalee Tungpradabkul^{2*}

¹Department of Biology and ²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand

³National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathumthani, Thailand

Running title: Proteome and protein markers in *Burkholderia pseudomallei*

*Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd, Bangkok 10400 THAILAND.

Tel: (662) 2015376

Fax: (662) 3547174

Email: scstp@mahidol.ac.th

Abstract

Burkholderia pseudomallei is a bacterial pathogen causing the melioidosis disease, which is predominantly found in tropical areas of Southeast Asia and Northern Australia. *Burkholderia thailandensis* is a closely related species to *B. pseudomallei* but it is non-pathogenic species. In this study, we have constructed a proteome reference map of *B. pseudomallei* at the stationary phase of growth by using two-dimensional gel electrophoresis with a pH 4-7 immobilized pH gradient combined with matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. Approximately 550 spots could be detected by Coomassie brilliant blue G-250 staining, and 88 spots representing 77 unique proteins were identified. Eleven of the gene products were found in multiple spots indicating as isoforms. In attempt to detect distinctive expressed proteins between a virulent and a non-virulent species, the use of comparative proteomic profiles under the same condition were performed. We could identify more than twenty different spots. Twelve out of fourteen spots are detected in *B. pseudomallei* and six proteins have been identified and indicated that they are involved in virulent characters of bacteria. Two hypothetical proteins were expressed and found only in *B. pseudomallei*. These proteins are potential markers to distinguish between these two species. Our study also provides a useful information of global intracellular protein expression and is a valuable starting point for analyzing a proteomic pathogenicity of the bacterial pathogen.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei* / Melioidosis / Pathogenicity / Proteome / *Burkholderia thailandensis*

Introduction

Burkholderia pseudomallei is a Gram-negative rod shaped bacteria. It is the causative agent of melioidosis, an infectious disease that is an important cause of acute pneumonia and septicaemia in tropical regions of India, Southeast Asia and Northern Australia and is of worldwide concern. *Burkholderia thailandensis* is a closely related to *B. pseudomallei*. Although, the biochemical profiles of both organisms are in similar, an ability to assimilate L-arabinose and its non-virulent character are distinct [1]. The recent determination of *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* genome sequence [2] provides a new framework for the elucidation of the genomic and physiological roles of these bacteria by using transcriptomics and proteomics [3]. However, proteomics can provide more reliable protein markers in a specific condition than transcriptomics that could be applied in term of the function of genes [4-6].

Many reports on *B. pseudomallei* and its induced diseases have been published, but a study of large scale expressed proteins from the whole genome of *B. pseudomallei* have been started to be carried out [3]. No proteome reference map of *B. pseudomallei* intracellular expressed proteins at the stationary phase of growth has been performed. In this study, we provide a global analysis of the intracellular expressed proteins and construct an initial proteome reference map of total proteins of *B. pseudomallei* grown in the stationary phase using 2D-GE and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). We also illustrate a useful information of the proteome reference map to a study of potential virulent factors and differentiation of the protein markers of *B. pseudomallei* by comparing with *B. thailandensis*.

Materials and methods

Bacteria, growth condition and protein extraction

The clinically isolated *Burkholderia pseudomallei* strain 844 [7] and *B. thailandensis* E257 was grown to stationary phase (OD_{600} of 9.6) in a 100 mL Luria Bertani (LB) medium under vigorous agitation at 37°C and 250 rpm. One mL of the culture was harvested by centrifugation at $10\,000 \times g$ for 1 min at 4°C into a microcentrifuge tube. The protein was extracted using ReadyPrep total protein extraction kit (BioRad, Hercules, CA, USA) or lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 1% w/v ASB-14 detergent, 40 mM Tris-base, 2 mM TBP and 0.001% bromophenol blue). Immobilized pH-gradient (IPG) buffer pH 4-7 (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden) and protease cocktail inhibitor set II (CalBiochem, La Jolla, CA, USA) were added into the lysis buffer with a final concentration of 1% v/v. The prepared lysis buffer of about 500 μ L was added into the cell pellet. Cell lysis was performed on ice by sonication, and the cell debris was removed by centrifugation at $13\,000 \times g$ for 30 min at 20°C. The supernatant was transferred into a clean tube. The protein concentration was determined by RC DC protein assay (BioRad). One, two and three μ L aliquots of the protein solution were mixed with the assay reagents in microcentrifuge tubes. Two hundred μ L of the mixed solutions were transferred into a 96-wells plate and the absorbance were measured at 620 nm by Multiskan EX (ThermoLabsystems). Protein concentration was calculated using BSA as a standard.

Two-dimensional gel electrophoresis (2D-GE), gel scanning, and image analysis

For the first dimension, a 1 mg protein sample was added with the rehydration buffer (8 M urea, 2% w/v CHAPS, 20 mM DTT and 1% v/v IPG buffer pH 4-7) to a total volume of 350 μ L. The isoelectric focusing gel was performed using 18-cm precast Immobiline DryStrip with a linear pH 4-

7 and in ITCphor system (Amersham Biosciences) as described elsewhere [8]. Briefly, the strip was rehydrated for 12 h at 20°C following with the voltage profiles: (i) linear increase from 0 to 500 V for 1000 Vh; (ii) linear increase from 500 to 1000 V for 2000 Vh; (iii) linear increase from 1000 to 8000 V for 65 000 Vh as the final phase. All profiles were controlled at the current of 50 μ A/strip. The ITC-strip was then equilibrated for 15 min in 10 mL of equilibration buffer I (6 M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.05 M Tris/HCl buffer pH 8.8 and 1% DTT) followed by 20 min in 10 mL of equilibration buffer II (6 M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS, 0.05 M Tris/HCl buffer pH 8.8 and 4% iodoacetamide). After the equilibration, the strip was transferred to 20 cm x 20 cm 12.5% SDS-PAGE gel for the second dimension. Electrophoresis was performed at 4°C in an Owl separation system (Fisher Scientific) at 10 mA for 20 min, and 20 mA for approximately 18 h. After electrophoresis, proteins were visualized by Coomassie brilliant blue G-250 staining as described elsewhere [9]. The number of proteins expressed on 2D-GE was analysed using PDQuest software version 7.2 (BioRad).

Tryptic in-gel digestion of 2-DE spots

Protein spots were excised and transferred into 1.5 mL microcentrifuge tubes and subjected to in-gel digestion which was performed by an Ettan Spot Handling workstation (Amersham Biosciences). The digestion was performed as described elsewhere [10] with minor modifications. The gel pieces were washed three times in 1 mL deionized water followed by 1 mL washing solution (50% v/v methanol) for three times. The gel pieces were dehydrated by addition of 200 μ L acetonitrile and complete drying in a vacuum centrifuge. The proteins were reduced by addition of 50 μ L 10 mM DTT and alkylated by addition of 50 μ L 100 mM iodoacetamide for both 30 min at room temperature. To exchange the buffer, the gel pieces were dehydrated in 200 μ L acetonitrile,

hydrated in 200 μ L of 100 mM ammonium bicarbonate and dehydrated again with 200 μ L acetonitrile. The dehydrated gel pieces were then dried completely in a vacuum centrifuge and rehydrated in 50 μ L of 20 ng/ μ L ice-cold, sequencing-grade trypsin (Amersham Biosciences) for 5 min on ice. Any excess trypsin solution was removed and the digestion was carried out for overnight at 37°C. The peptides produced after digestion, were collected by successive extractions with 50 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate and 50 μ L of 50% acetonitrile with 5% formic acid. A total extract was concentrated in a vacuum centrifuge to 20 μ L for further analysis.

MALDI-TOF MS

Peptide mass fingerprinting (PMF) were obtained by BioService Unit (BSU), National Science and Technology Development Agency, Pathumthani, Thailand, using an Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik Bremen, Germany), with delayed extraction and reflection [11]. The matrix solution, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker) was prepared by dissolving to saturation in 70% acetonitrile/water with 0.1% trifluoroacetic acid. The digested peptide of approximately 1 μ L was mixed with 5-10 μ L of matrix solution. The mixture was spotted onto a stainless steel target and left to dry at room temperature. The mixture was then irradiated with a 337 nm N₂ laser, accelerated with 20 kV accelerating voltage in a two-stage gridless pulsed-ion extraction source. The instrument was operated in the positive, reflectron mode. Typical mass accuracy was better than 200 ppm with external calibration. The protein calibration standard 1 (Bruker Daltonik, USA) was used as an external calibrant that was applied to a target well separated from the samples. The calibrant consists of four proteins which are insulin, ubiquitin I, cytochrome

C and myoglobin with the covered mass approximately range between 3000 to 25000 Dalton. The resulted PMF were visualized by flexAnalysis software version 2.0 (Bruker Daltonik).

Database searches for protein identification

PMF were used for protein identification from tryptic fragment sizes by using MASCOT search engine (www.matrixscience.com) based on the entire NCBI nr protein database using the assumption that peptides are monoisotopic, oxidized at methionine residues and carbamidomethylated at cysteine residues [12]. Up to two-missed trypsin cleavages was allowed, although most matches did not contain any missed cleavages.

PCR amplification of a gene marker BPSL1958 in *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*

The presence and absence of BPSL1958 encoding a hypothetical protein in proteomic profiles and in genome of *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*, respectively, were confirmed by PCR method. The fragment of BPSL1958 was amplified by specific primers based on a *B. pseudomallei* K96243 sequence for sense strand primer, 5'-GGCAAATTAGCAGCTTCAAATC-3' and for antisense strand primer, 5'-CCCAGGCAACGCGTAGTG-3'. Amplification condition started with denaturation at 100° C for 10 minutes and 30 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, 72°C for 1 min then ended up with extension at 72°C for 5 min with DNA Thermal Cycler 480 (Applied Biosystems, USA). PCR products of about 872 bp were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

Results

Two-dimensional gel electrophoresis of *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* proteins

For an overview of protein expression of *B. pseudomallei* 844 and *B. pseudomallei* E257, 2D-GE gel of total intracellular protein extracted from cells of the bacteria grown under the stationary phase was performed using an 11 cm, pH 3-10 linear IPG strip. Approximately 500 spots could be detected by silver staining. The region with the greatest protein expression was between pI 4-7 (data not shown) which was similar to that found in other bacterial species [5, 6, 13, 14, 15]. This result led us to choose a pH 4-7 IPG strip that allows for a better separation of proteins.

The separation by 2D-GE of 1 mg of *B. pseudomallei* total proteins stained with Coomassie brilliant blue G-250, which is compatible with mass spectrometry, permitted the detection of approximately 550 spots using an 18 cm, pH 4-7 linear IPG strip. Most spots were located between pI 4.5-7 and molecular weight of 20-75 kDa (Fig. 1). *B. pseudomallei* protein spots having abundant expression were selected and cut out for subsequent identification by MALDI-TOF MS.

Identification of *B. pseudomallei* proteins by MALDI-TOF MS

In order to create a proteome reference map for *B. pseudomallei*, 88 of the most abundant spots of various isoelectric points and molecular weights were cut out. In-gel digestion of protein spots by trypsin was performed to cleave proteins at arginine and lysine residues. Peptide mass fingerprints (PMF) were obtained from MALDI-TOF mass spectrometry. A result of spot number 31 in the peptide mass fingerprinting is shown in Fig.2. The PMF was identified as 60 kDa chaperonin using the MASCOT search engine to query the NCBI nr protein database allowing up to two missed cleavages, but most matches did not contain any missed cleavages. Seventy-seven unique proteins were identified from 88 spots presented on the gel. Most of these spots were located between pI 4.5-

5.5. According to their relative functions, several groups of *B. pseudomallei* protein were classified, which are listed in Table 1. The groups of proteins include cell surface, energy metabolism, cellular processes, regulatory functions, replication, transcription, translation, stress responses, phage-related proteins, proteins with unknown function and hypothetical proteins.

A group of cell surface proteins appeared with small abundance in *B. pseudomallei*. This is because the extraction method used in this study was performed by total protein extraction, but not by cell surface protein extraction, which allows for solubilization and analysis of the cellular compartment [4]. In addition, membrane proteins are generally low-copy-number proteins, so they were not very abundant [13]. In contrast, a group of proteins related with energy metabolism shared with the greatest number of the protein so far identified.

Many regulatory proteins were also identified. Protein spots with high expression and similar to those were found in other bacterial species [5, 6, 12, 13, 14] were 60 kDa chaperonin, GroEL, chaperonin GroEL, 10 kDa chaperonin (GroES), enolase (Eno), heat shock protein (GrpE), oxidoreductase (AhpC), superoxide dismutase (SodA), hydroperoxide reductase and thiol peroxidase (Tpx). This indicates that these proteins had high expression level in many growth conditions, including minimal [5, 12, 14] or enriched mediums [6, 13] and the patterns of their expression were similar in many bacterial species. Moreover, the existence post-translational modifications were identified. In this study, we found 17 spots of isoforms from the 6 genes as summarized in Table. 2.

Identification of *B. pseudomallei* potential virulent factors and protein markers

In attempt to study potential virulent factors and protein markers found in *B. pseudomallei* compared with *B. thailandensis*, we therefore hypothesized that the differences of protein expressions found in *B. pseudomallei* but absent in *B. thailandensis*, were suspected to play a role as potential virulent factors or potential protein markers. The proteomic profiles of *B. thailandensis* and *B. pseudomallei* were then compared and the different spots were identified as shown in figure 3. The results showed significant different protein expressions in more than twenty spots. Fourteen spots showed significant different levels of protein expression in *B. pseudomallei* compared with *B. thailandensis*. Twelve out of fourteen spots were found in *B. pseudomallei* but were absent or at low levels of protein expression in *B. thailandensis*. These proteins were analyzed using *B. pseudomallei* reference map and found to be cell surface proteins, energy metabolic proteins, cellular processes, stress response and also hypothetical proteins as summarized in Table 3. In order to verify the different level of protein expressions found in proteomic profiles, the PCR amplification of a gene, a hypothetical protein BPSL1958, was performed with 5 isolates of both *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* (data not shown). The results were corresponding to the level of the protein expressions and theirs genome databases as shown in figure 4.

Discussion

Since *B. pseudomallei* has a complete genome database [2], the function of open reading frames (ORF) of this bacteria can be easily characterized. However, overall ORF are not yet characterized. To support the functional genomics, proteomics is a powerful technique to study the global protein expression. We have constructed the first proteome reference map for intracellular protein expression under the stationary phase of *B. pseudomallei*, which can be used for study of protein expression of this bacteria. The analysis of *B. pseudomallei* began with the analysis of protein profile using a pH 3-10 IPG strip, which demonstrated clearly that the greatest number of proteins were located between pI 4-7. Therefore, a pH 4-7 IPG strip was chosen for construction of a *B. pseudomallei* proteome reference map.

Approximately 550 spots were detected on the Coomassie brilliant blue G-250 stained gel on 18 cm, pH 4-7 IPG strip. The result of the 2D-GE pattern from total protein of *B. pseudomallei* showed highly resolved protein spots. The most abundant proteins were present in great numbers within the range of pH 4.5-7 and 20-75 kDa. The differences in coding capacities and visualized proteins may be explained by some of the following possibilities [8]: (i) some proteins were not in the experimental window; (ii) certain proteins were insoluble in the IPG buffer; (iii) Coomassie blue staining was less sensitive; (iv) some proteins were not expressed under the growth condition; and (v) membrane proteins are generally low-copy-number proteins so they were not very abundant.

Evaluation and processing of the 2D-GE of *B. pseudomallei* samples were conducted by comparing the observed peptide mass fingerprints (PMF) to the NCBI nr database using MASCOT search engine (www.matrixscience.com). There are three protein databases used by the MASCOT that are MSDB, NCBI nr and SwissProt. However, the identification of *B. pseudomallei* proteins

could only be performed by using the NCBI nr database, this is due to the presence of its protein sequences derived from the genomic DNA sequence in the NCBI nr but not the other two databases.

The PMF were widely successful when searched against the fully sequenced genome. We identified 77 unique total proteins by PMF which were expressed in 88 forms on 2D-GE. Most of these proteins were metabolic-related enzymes, heat shock proteins, and cell surface proteins. Some of these proteins such as heat shock-response proteins and oxidative stress-response proteins were expressed at high level similar to those found in other bacterial species [5, 6, 12, 13, 14]. The existence post-translational modifications were identified from the six gene products since we found the presence of isoforms (17 spots) as shown in Table 2. Post-translational modifications are known to play a major role in eukaryotes but less is known about their role in bacterial physiology. The migrated products of the same gene to several distinct spots indicate that the different properties of the proteins, due to either mistranslation or post-translational events [6]. The 2D-GE is a more powerful technique to identify their existence of isoforms compared to DNA microarray. Interestingly, we found six isoforms of 60 kDa chaperonin and GroEL, since all of these proteins are the same type of 60 kDa heat shock protein suggesting that post-translational modifications occurred with 60 kDa chaperonin and GroEL in this growth condition. Our finding is novel since there have not been reports of post-translational modifications in *B. pseudomallei*. Study of their mechanism may provide an insight into pathogenicity, which may be related to post-translational modifications.

We also applied the usefulness of the reference map to identify the potential virulent factors and protein markers of the organism by comparing the proteomic profiles of the virulent with the non-virulent species under the same conditions. More than twenty different spots were detected. Fourteen spots were significantly found in different levels of protein expression between *B.*

pseudomallei, a virulent species, and *B. thailandensis*, a non-virulent species. Twelve out of fourteen spots were present or highly expressed in *B. pseudomallei*. Although, these proteins were also found in their coding genes in the genome of *B. thailandensis* using BLAST search, six out of twelve proteins have been studied and indicated that they are involved in virulent characters of bacteria. Phosphatidyl ethanolamine, a composition in membrane, and LysM were highly expressed in *B. pseudomallei* which have been identified as a potential virulent factor and involved in biofilm formation, respectively [16]. Eventhough in metabolic proteins that play the major functions involving in energy for surviving, it have been suggested the role of phosphoglucomutase in virulence [17]. The study of phosphoglucomutase mutant which could not change glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate resulting in gluconucleotide and product derived from UDP-Glu including LPS were insufficient. The cellular processes proteins, GroEL and GroES are importance for proper folding and function of proteins. A virulent property of GroEL has been proposed [18]. However, an appearance of isoform structure of the protein was interesting, particularly an isoform that found highly expression in the virulent species. The stress response proteins, oxidoreductase and superoxide dismutase, were also involved in virulence of bacteria [19, 20]. Interestingly, there are four unknown function proteins, hypothetical proteins, to be identified in virulent organism. Two of the hypothetical proteins are not found in the genome database of *B. thailandensis*. Thus, the two genes coding for the hypothetical proteins were considered to be the specific markers, not only for protein markers but also for gene markers using PCR identification as shown in figure 4. Obviously, these proteins should be investigated further in order to know their functions.

In summary, the first proteome reference map for *B. pseudomallei* was constructed. A total of intracellular *B. pseudomallei* protein fractions at a stationary phase were analyzed and identified.

Establishing for *B. pseudomallei* is essential before starting further proteomic studies and is a valuable starting point for analyzing the proteomic pathogenicity of this bacterial pathogen. In addition, comparative proteomes for identification of the potential protein markers between the two closely related species, *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*, are applicable.

Acknowledgements

The work was granted by the Thailand Research Fund (TRF). We greatly appreciate the assistance of BioService Unit (BSU), National Science and Technology Development Agency, Pathumthani, Thailand, in the peptide mass fingerprinting identification of proteins by mass spectrometry. Mr. Wongtrakoongate, P. was supported by the Junior Science and Talent Project (JSTP), the National Science and Technology Development Agency with the Thailand Research Fund. Ms. Chaijan, S. and Ms. Kamchonwongpaisan, S. was supported by the Target Research Unit/Network of Thailand Tropical Diseases Research Programme (TARUN-T2). We thank Mr. W. George, Visiting Lecturer in the Graduate Language Center at Mahidol University for critically reading of this manuscript.

References

- [1] P. J. Prette, D. DeShazer, and D.E. Woods, *Burkholderia thailandensis* sp. nov., description of a *Burkholderia pseudomallei*-like species, *Int. J. Syst. Bacteriol* 48 (1998) 317-320.
- [2] M.T. Holden, R.W. Titball, S.J. Peacock, A.M. Cerdeno-Tarraga, T. Atkim, L.C. Crossman, T. Pitt, C. Churcher, K. Mungall, S.D. Bentley, M. Seib, R.N. Thomson, *et al.*, Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (2004) 14240-14245.
- [3] K. Ou, C. Ong, S. Yung Koh, F. Rodrigues, S.H. Sim, D. Wong, C.H. Ooi, K.C. Ng, H. Jikuya, *et al.*, Integrative genomic, transcriptional, and proteomic diversity in natural isolates of human pathogen *Burkholderia pseudomallei*, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 4276-4285.
- [4] C. Arevalo-Ferro, M. Hentzer, G. Reil, A. Görg, S. Koelleberg, M. Givskov, K. Riedel, and L. Eberl, Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.* 5 (2003) 1350-1369.
- [5] R. Rosen, A. Sacher, N. Shechter, D. Becher, D. Beacher, D. Biran, M. Hecker, and E.Z. Ran, Two-dimensional reference map of *Agrobacterium tumefaciens* proteins, *Proteomics* 4 (2004) 1061-1073.
- [6] M.R. Park, E.G. Lee, Y.H. Kim, T.S. Jung, Y. Shin, G. Shin, H. Cha, and G. Kim, Reference map of soluble proteins from *Salmonella enteritidis* by two-dimensional electrophoresis, *J. Vet. Sci* 4 (2003) 143-149.
- [7] P. Utaisincharoen, N. Tangthawornchaikul, W. Kespichayawattana, P. Chaisuriya, and S. Sirisinha, *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS)

- production: A possible mechanism of evading macrophage killing, *Microbiol. Immunol.* 45 (2001) 307-313.
- [8] A. Görg, C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wadgruber, and W. Weiss, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis* 21 (2000) 1037-1053.
- [9] V. Neuhoff, R. Stamm, and H. Eibl, Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis, *Electrophoresis* 6 (1985) 427-448.
- [10] S.L. Hanna, N.E. Sherman, M.T. Kinter and J.B. Goldberg, Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing iniyial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: An analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column, *Microbiology* 146 (2000) 2495-2508.
- [11] C. Srisomsap, P. Sawangareetrakul, P. Subhasitanont, T. Panichakul, S. Keeratichamroen, K. Lirdprapamongkol, D. Chokchaichamnankit, S. Sirisinha, and J. Svasti, Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line, *Proteomics* 4 (2004) 1135-1144.
- [12] V. Thongboonkerd, J. Luengpailin, J. Cao, W.M. Pierce, J. Cai, J.B. Klein, and R.J. Doyle, Fluoride exposure attenuates expression of *Streptococcus pyogenes* virulence factors. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16599-16605.
- [13] M. Pamnath, K.B. Rechinger, L. Jansch, J.W. Hastings, S. Knochel, and A. Graveson, Development of a *Listeria monocytogenes* EGD partial proteome reference map and comparison with the protein profiles of food isolates, *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2003) 3368-3376.

- [14] S. Heim, M. Ferrer, H. Heuer, D. Regenhardt, M. Nimtz and K.N. Timmis, Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: Distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase, *Environ Microbiol* 5 (2003) 1257-1269.
- [15] K. Buttner, J. Bernhardt, C. Scharf, R. Schmid, U. Mader, C. Eymann, H. Antelmann, A. Volker, U. Volker, and M. Hecker, A comprehensive two-dimensional map of cytosolic proteins of *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* 22 (2001) 2908-2935.
- [16] B. Yu, E. Hailman, S.D. Wright, Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids, *J. Clin. Invest* 99 (1997) 315-324.
- [17] J.E. Ugalde, D.J. Comerici, M.S. Leguizamon, R.A. Ugalde, Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (pgm) mutant as a new live rough-phrnotype vaccine, *Infect Immun*. 11 (2003) 6264-6269.
- [18] P.C. Woo, P. K. Leung, S.S. Wong, P.L. Ho, and K. Yuen, groEL Encodes a highly antigenic protein in *Burkholderia pseudomallei*, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (2001) 832- 836.
- [19] I.L. Jung, and I.G. Kim, Transcriptional of alpC, katG, and katE genes in *Escherichia coli* is regulated by polyamines: Polyamine deficient mutant sensitive to H₂O₂-induced oxidative damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 915-922.
- [20] D.J. Hassett, J.F. Ma, J. G. Elkins, T.R. McDermott, U.A. Ochsner, S.E.H West, C. Huang, J. Fredericks, S. Burnett, P.S. Stewart, G. MaFeters, L. Passador, and B.H. Iglewski, Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* control expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogenperoxide, *Mol. Microbiol.* 34 (1999) 1082-1093.

Figure Legends

Figure 1. Proteome reference map of total protein extraction of *Burkholderia pseudomallei* 844 obtained from stationary phase of growth. Identification of proteins was performed by 2D-GE followed by MALDI-TOF MS. Isoelectric focusing was performed with 1 mg of bacterial proteins for 68 kVh using a 4-7 pH-strip. SDS-PAGE was performed on a 12.5% gel and stained with Coomassie blue G-250. The numbers refer to the spot identity used in the table and text.

Figure 2. MALDI-TOF mass spectrometry analysis of spot number 31. (A) Illustration of an example of peptide mass fingerprint that is typical for the mass spectra of 60 kDa chaperonin. (B) Peptide mass fingerprint of the observed mass was performed using the MASCOT search engine. Observed masses (17 of total 40 masses) were matched to the theoretical masses of 60 kDa chaperonin with less than 386-ppm window of error and 0 missed cleavage. The matched masses were converted to amino acid sequences along variable residue sites and covered 43% of the protein sequence. Peptides that caused oxidation at methionine residue were shown.

Figure 3. Proteomic profiles of *Burkholderia pseudomallei* 844 (left) and *Burkholderia thailandensis* E257 (right) obtained from the stationary phase of growth running in the same 2D-GE conditions and staining with Coomassie blue G-250. The circles represent the different levels of protein expressions between the two species. The numbers refer to the protein spots are detected in *B. pseudomallei* 844 a reference map but absent or lower express in *B. thailandensis* E257, except number 16 and 61 are higher expression in *B. thailandensis* E257 than in *B. pseudomallei* 844.

Figure 4. PCR identification of a BPSL1958 gene coding for a hypothetical protein BPSL1958 of *Burkholderia pseudomallei* 844 (lane 3) compared with *Burkholderia thailandensis* E257 (lane 4). Lane 1 is a standard size marker and lane 2 is a negative control.

Table 1. Identification of *Burkholderia pseudomallei* proteins in non-redundant sequence databases (National Center for Biotechnology) using Mascot search engine and data from MALDI-TOF mass spectrometry

Table 2. Summary of the proteins which have isoforms

Table 3. Summarize an analysis of the proteins are significantly present or higher expression found between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. The arrows represent the present or the higher levels of protein expressions and asterisks represent the hypothetical proteins are not found in *Burkholderia thailandensis* genome database.

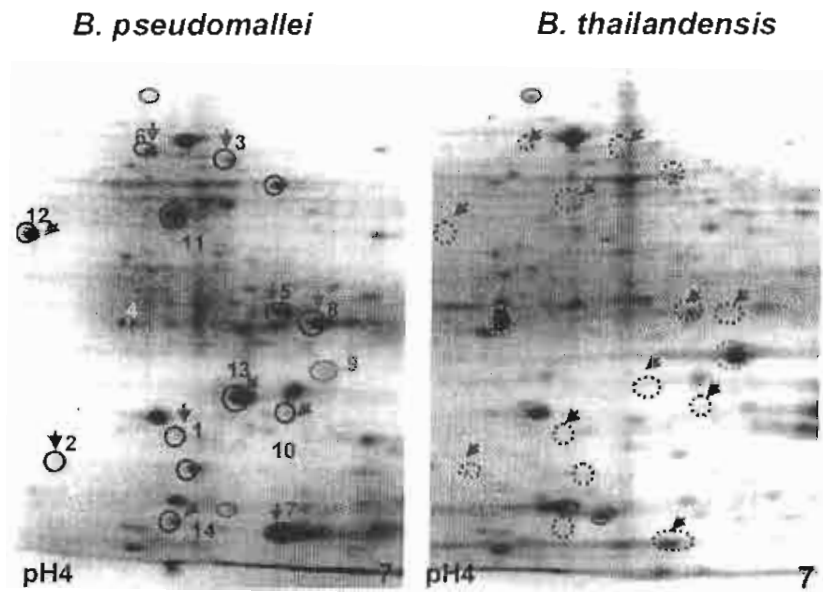


Figure 2. Proteomic profiles of *Burkholderia pseudomallei* 844 (left) and *Burkholderia thailandensis* E257 (right) obtained from the stationary phase of growth running in the same 2-DE conditions and stained with Coomassie blue G-250. The circles represent the different levels of protein expressions between the two species. The numbers refer to the protein spots are detected in *B. pseudomallei* 844 but absent or lower express in *B. thailandensis* E257, except number 4 and 9 are higher expression in *B. thailandensis* E257 than in *B. pseudomallei* 844.



Figure 3. PCR amplification of a BPSL1958 gene coding for a hypothetical protein BPSL1958 of *Burkholderia pseudomallei* 844 (lane 3) compared with *Burkholderia thailandensis* E257 (lane 4). Lane 1 is a standard size marker and lane 2 is a negative control.

Table 1. Identification of *Burkholderia pseudomallei* proteins in non-redundant sequence databases (National Center for Biotechnology) using Mascot search engine and data from MALDI-TOF mass spectrometry

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Cell surface				
Porin related exported protein (OmpC)	1	YP_111684	7.78/6.75	40.1/34.5
Mechanosensitive ion channel (YggB)	2	AAK49791	10.2/5.60	29.3/25.0
Phosphatidyl ethanolamine-binding protein	3	YP_107676	5.26/5.20	18.3/18.5
Bacterial cell wall degradation protein (LysM)	4	YP_108071	4.54/4.20	15.4/17.5
Invasion protein B family (SpaK)	5	YP_111548	4.61/4.31	15.2/14.5
Invasion plasmid antigen (IpaD)	6	YP_111535	5.13/5.02	34.0/33.0
Chitin binding protein (CbpD)	7	YP_104403	5.96/5.50	24.0/24.5
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	8	YP_111434	9.80/4.89	34.6/36.0
Outer membrane protein a precursor (OmpA)	9	YP_109118	9.51/4.50	24.3/13.5
Energy metabolism				
Phosphoglucosyltransferase	10	YP_109262	5.23/5.25	50.2/49.5
Thioredoxin protein	11	YP_107481	4.71/4.29	33.4/32.0
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate synthase	12	YP_109433	5.97/5.79	39.1/44.0
Enolase (Eno)	13	YP_108866	4.81/4.69	45.9/42.5
Electron transfer flavoprotein alpha-subunit	14	YP_109094	4.86/4.75	31.6/32.5
Family C56 unassigned peptidase	15	YP_110733	4.72/4.56	23.9/24.5
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit B	16	YP_108552	4.70/4.69	22.3/24.0
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase	17	ZP_00221810	5.22/5.33	42.4/37.0
Family M19 non-peptidase homologue	18	YP_110569	5.77/4.88	36.1/35.0
Enoyl-CoA hydratase (PaaG)	19	YP_109638	5.31/5.43	28.5/26.5
Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit A	20	YP_108553	5.56/5.93	25.4/25.0
Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	21	YP_107960	5.76/5.16	32.5/18.0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	22	YP_108841	5.94/6.60	17.9/19.0
NADPH-dependent FMN reductase	23	YP_112348	6.51/6.45	20.3/18.5
ATP synthase epsilon chain	24	YP_109988	5.11/5.18	14.9/17.0
Riboflavin synthase alpha chain	25	YP_109221	5.49/4.81	21.7/20.5
Rhodanese-related sulfurtransferases (GlpE)	26	YP_108915	7.82/6.39	18.0/15.5
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	27	YP_110641	6.19/6.72	30.2/25.0
Sedoheptulose 7-phosphate isomerase	28	YP_109390	5.58/5.75	21.0/23.0

Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Glyoxalase family protein	29	YP_103534	5.55/5.35	16.2/16.5
Cellular processes				
60 kDa chaperonin	30	YP_109293	5.13/5.09	57.1/57.0
60 kDa chaperonin	31	YP_109293	5.13/5.14	57.1/57.0
60 kDa chaperonin	32	YP_109293	5.13/4.73	57.1/47.5
GroEL	33	AAO46033	5.18/5.25	56.5/57.0
GroEL	34	AAO46033	5.18/5.50	56.5/50.0
GroEL	35	AAO46033	5.18/4.77	56.5/45.0
Chaperonin GroEL	36	AAG32927	5.13/4.85	57.2/55.0
Cell division protein (FtsZ)	37	YP_109616	4.87/4.85	41.7/42.0
HSP20/alpha crystallin family protein	38	YP_112291	5.14/5.06	16.0/16.0
10 kDa chaperonin (GroES)	39	YP_109294	5.78/5.95	10.5/15.0
Heat shock Hsp20-related protein	40	YP_109511	6.30/6.77	15.2/19.0
Heat shock protein (GrpE)	41	YP_109423	4.78/4.58	19.7/21.5
Regulatory functions				
DnaK suppressor protein (DksA)	42	YP_106833	5.26/5.25	16.1/18.0
Response regulator protein (AmiR)	43	YP_111254	5.36/4.25	22.0/15.5
Multiple antibiotic resistance regulatory protein (MarR)	44	YP_111785	5.36/4.41	17.0/15.0
Response regulator protein (TtrR)	45	YP_108899	5.40/5.49	23.7/23.0
Regulatory protein (IclR)	46	YP_108891	8.45/4.84	29.9/30.5
Sigma54-dependent transcription suppressor (PspA)	47	YP_108702	5.11/5.05	24.5/29.5
Response regulator protein	48	YP_110651	5.26/4.85	26.9/24.5
Replication				
Single-strand binding protein (SSB)	49	YP_107172	5.51/5.77	18.7/20.0
Nucleoside diphosphate kinase	50	YP_108130	5.61/5.89	15.6/15.5
Transcription				
Transcription elongation factor (GreA)	51	YP_107977	4.50/4.10	17.0/19.0
Transcription initiation factor	52	YP_111848	5.04/5.35	13.1/15.0

Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Translation				
50S ribosomal protein L7/L12	53	YP_109816	5.10/4.64	11.1/13.0
50S ribosomal protein L7/L12	54	YP_109816	5.10/5.00	11.1/11.0
tRNA nucleotidyltransferase	55	YP_106892	7.25/6.75	45.2/55.0
Peptidyl-tRNA hydrolase	56	YP_107145	9.22/5.35	22.0/24.5
Seryl-tRNA synthetase	57	YP_109196	5.53/5.70	47.7/50.0
Translation initiation inhibitor (TdcF)	58	YP_112061	5.30/5.60	14.4/15.5
Stress responses				
Calcineurin-like phosphoesterase	59	YP_110898	9.96/4.77	43.0/38.5
Oxidoreductase (AhpC)	60	YP_109344	5.75/6.29	23.9/24.0
Phasin-like protein (PhaZ)	61	YP_108894	5.96/6.41	19.9/22.0
Phasin-like protein (PhaZ)	62	YP_108894	5.96/4.83	19.9/18.5
Phasin-like protein (PhaZ)	63	YP_108894	5.96/4.95	19.9/15.5
Phasin-like protein (PhaZ)	64	YP_108894	5.96/4.70	19.9/15.5
Phasin-like protein (PhaZ)	65	YP_108894	5.96/4.58	19.9/15.0
Superoxide dismutase (SodA)	66	YP_107505	5.74/6.00	21.1/20.0
Hydroperoxide reductase	67	YP_108693	5.05/4.91	20.5/19.5
Hydroperoxide reductase	68	YP_108693	5.05/4.79	20.5/19.5
Thiol peroxidase (Tpx)	69	YP_109581	5.12/5.14	17.4/19.0
Universal stress-related protein (UspA)	70	YP_110056	5.78/6.14	16.6/15.5
Glyoxalase/Bleomycin resistance/Dioxygenase superfamily	71	YP_110250	5.75/6.20	14.8/15.5
Phage-related proteins				
Phage-related DNA polymerase	72	YP_108778	5.10/5.52	30.5/30.0
Bacteriophage tail completion protein R (GpR)	73	YP_111086	4.32/5.43	15.2/15.0
Unknown function				
Uncharacterized conserved protein	74	YP_107552	4.64/4.38	23.9/22.0
Uncharacterized conserved protein	75	YP_109700	6.43/4.62	18.4/20.0
Uncharacterized conserved protein	76	YP_110194	4.85/4.70	20.7/20.0
Uncharacterized conserved protein	77	YP_109289	4.67/4.49	20.7/22.5
Uncharacterized conserved protein	78	YP_107931	4.72/5.50	22.1/22.5

Table 1. Continued

Functional category and protein name	Spot number	Accession number	Theo/exp pI	Theo/exp MW (kDa)
Hypothetical proteins				
Hypothetical protein BPSL1549	79	YP_108169	5.14/5.09	23.4/37.0
Hypothetical protein BPSL1549	80	YP_108169	5.14/5.25	23.4/22.0
Hypothetical protein BPSL1958	81	YP_108556	4.38/4.10	36.1/35.5
Hypothetical protein BPSL0348	82	YP_106975	6.59/4.21	28.0/22.0
Hypothetical protein BPSS0212	83	YP_110232	5.34/5.60	22.5/21.5
Hypothetical protein BPSS0683	84	YP_110696	5.09/5.04	13.1/15.0
Hypothetical protein BPSL0599	85	YP_107228	4.94/4.75	13.9/16.0
Hypothetical protein BPSL0349	86	YP_106976	5.04/4.89	20.3/20.5
Hypothetical protein BPSL0213	87	YP_110233	6.65/4.58	21.7/22.0
Hypothetical protein BPSL1431	88	YP_111443	5.91/4.60	17.2/16.5

able

Table 2. Summary of the proteins which have isoforms

Protein name	Spot number	Modification
60 kDa chaperonin	30-32	Charge and mass differences
CroEL	33-35	Charge and mass differences
50S ribosomal protein L7/L12	53-54	Charge and mass differences
Phasin-like protein (PhaZ)	61-65	Charge and mass differences
Hydroperoxide reductase	67-68	Charge difference
Hypothetical protein BPSL1549	79-80	Charge and mass differences