



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ

Burkholderia pseudomallei

โดย ดร. อิษฎา เล่งเวหาสฤติย์ และคณะ

มิถุนายน 2548



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ

Burkholderia pseudomallei

โดย ดร. อธิภา เล่งเวหาสภิตย์ และคณะ

มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

คณะผู้วิจัย สังกัด

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. ดร.อิษฎา เล่งเวหาสถิตย์ | ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล |
| 2. ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล |

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความลับในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทคัดย่อไทย	1
บทคัดย่ออังกฤษ	2
Executive Summary	3
เนื้อหางานวิจัย	
1. บทนำ	4
2. วิธีการวิจัย	6
2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์	6
2.2 การ infect เซลล์	6
2.3 การวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์	6
2.4 การตรวจสอยการรั่วของไมโทคอนเดรีย	6
2.5 การทดสอบสถิติ	8
3. ผลการทดลอง	9
3.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	9
3.2 การเพิ่มจำนวนของเซลล์หลังได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	10
3.3 การปล่อย lactate dehydrogenase (LDH) จากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	11
3.4 การเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	14
3.5 การทำลายเซลล์ของเชื้ออาศัยเชื้อที่มีชีวิตและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ	17
3.6 ผลของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> ต่อการรั่วของ cytochrome c และการทำงานของ caspase-3	18
4. สรุปและวิจารณ์ผล	20
5. References	22
Output ที่ได้รับจากโครงการ	24
ภาคผนวก	25

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
Figure 1	Cell fusion and multinucleated cell formation in <i>B. pseudomallei</i> -infected cells 9
Figure 2	Cell viability of cells infected <i>B. pseudomallei</i> (844) and <i>B. thailandensis</i> (UE5) 10
Figure 3	LDH release from macrophage (RAW264.7) cells infected with 844 and UE5 12
Figure 4	Change in the LDH activity from RAW264.7 (a) and A549 (b) cells infected with 844 and UE5 during the time course 13
Figure 5	Detection of mitochondrial membrane potential from RAW264.7 and A549 cells infected with 844 and UE5 15
Figure 6	Change in the mitochondrial membrane potential during the time course of RAW264.7 (a) and A549 cells (b) infected with 844 and UE5 16
Figure 7	Effect of IFN-gamma, cytochalasin D and non-living bacteria to cell damage 17
Figure 8	Cytochrome c release from the mitochondria of 844-infected RAW264.7 cells 19
Figure 9	Activation of caspase-3 in 844-infected RAW264.7 cells..... 19

สัญญาเลขที่ : MRG4680057

โครงการ : การศึกษาหน้าที่ของไมโทคอนเดรียจากเซลล์ที่ติดเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

คณะผู้วิจัย : ดร.ธิษฐา เล่งเวหาสถิตย์¹

ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ² (นักวิจัยที่ปรึกษา)

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ¹ และ ภาควิชาจุลชีววิทยา² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : scilw@mahidol.ac.th

ระยะเวลาดำเนินการ : 1 กรกฎาคม 2546 – 30 มิถุนายน 2548

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคmelioidosis ในคนและสัตว์ เชื้อชนิดนี้สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งมีชีวิตรอดและเพิ่มปริมาณได้ใน phagocytic cells เช่น แมคโครฟาจ และ non-phagocytic cells เช่น epithelial cells อย่างไรก็ตามกลไกการตอบสนองของเซลล์และการก่อให้เกิดโรคของเชือนั้นยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน ในงานวิจัยนี้พบว่าทั้งเชื้อ *B. pseudomallei* (สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค) ทำให้เซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) มีการรั่วของ lactate dehydrogenase (LDH) จากเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งบ่งบอกว่าเซลล์มีความเป็นพิษ และโดยส่วนหนึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการลดลงของ mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) ที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *B. thailandensis* (สายพันธุ์ไม่ก่อให้เกิดโรค) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อที่ไม่มีชีวิตไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ LDH และ $\Delta\psi_m$ ในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทั้ง LDH และ $\Delta\psi_m$ ภายในเซลล์นั้นจะต้องอาศัยเชื้อที่มีชีวิตเท่านั้น นอกจากนั้นยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียทำให้เกิดการรั่วของ cytochrome c และการทำงานของ caspase ซึ่งมีผลทำให้เซลล์สามารถเกิดการตายแบบ apoptosis ได้ ดังนั้นจากผลการวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทำลายเซลล์โดยการทำให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียหน้าที่ไปและการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นอยู่กับเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ในเซลล์เท่านั้น

คำสำคัญ: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, LDH, mitochondrial membrane potential, cytochrome c, caspase-9

Project code : MRG4680057

Project title : Study of mitochondrial function of the cells infected with *Burkholderia pseudomallei*

Investigators : Dr. Idsada Lengwehasatit ¹

Dr. Pongsak Utaisinchaoen ² (Mentor)

Department of Biotechnology ¹ and Department of Micrology ² Faculty of Science,
Mahidol University

E-mail address : scilw@mahidol.ac.th

Project Duration : 1 July 2003 – 30 June 2005

Abstract

Burkholderia pseudomallei is gram-negative bacterium causing melioidosis. The bacteria are usually found in contaminated soil and water and are transmitted to humans and animals through direct contact with the contaminated sources. This infection affects various organs throughout the body leading to death if host defense mechanism relapses. However, in which cellular mechanism responding to this bacterium conducting to pathogenesis is not fully known. After internalization, both bacteria could survive and multiply inside cells. Morphological changes of the infected cells including cell-cell fusion and the formation of multinucleated giant cells were observed. In this study, we demonstrated that *B. pseudomallei* could induce the release of lactate dehydrogenase (LDH) and the decrease of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) that significantly more than the macrophage infected with *B. thailandensis* (non-pathogenic strain). The increase of LDH leakage and the decrease of $\Delta\psi_m$ are the indicators of cell damaging by *B. pseudomallei*. We also found that the cell damage was not observed when the cells were activated with heat killed-bacteria indicating that the effect to LDH release and $\Delta\psi_m$ inside macrophage required only living *B. pseudomallei*. In addition, the loss of mitochondrial membrane potential resulted in cytochrome c release and the activation of caspase leading to apoptotic cell death. This result suggests that *B. pseudomallei* (pathogenic material) can cause cell damage by interfering mitochondria while the non-pathogenic strain can not damage cells at the same level. Furthermore, the cell damage induced by *B. pseudomallei* requires the internalization of living bacteria.

Keywords: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, LDH, mitochondrial membrane potential, cytochrome c, caspase-9

Executive Summary

โรคเมลิออยโดสิสเป็นโรคในคนและสัตว์ที่เกิดจากการได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ซึ่งระบาดในประเทศเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทยด้วย โดยคนและสัตว์สามารถติดเชื้อได้จากการสัมผัสกับแหล่งดินและน้ำหรือการหายใจเอาฝุ่นละอองที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป การติดเชื้อนั้นสามารถทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้หากเชื้อลามไปทั่วร่างกายและระบบป้องกันตัวล้มเหลว กลไกการก่อโรคของเชือนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอนแต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อสามารถหลีกเลี่ยงหนีจากการทำลายของเซลล์แมคโครฟาจ หลังจากที่ได้รับเชื้อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์คือเซลล์มีการรวมตัวกัน กลายเป็น multinucleated giant cells และยังพบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วย จากผลงานวิจัยนี้พบว่าเชือนี้ทำให้เซลล์เป็นพิษโดยมีการรั่วของ lactate dehydrogenase (LDH) ออกมาจากเซลล์ ซึ่งปริมาณของเอนไซม์ชนิดนี้จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทำลาย อีกทั้งปริมาณเชื้อที่ได้รับมากขึ้นยังส่งผลให้มีการรั่วของ LDH มากขึ้น ซึ่งเป็นผลให้เซลล์ตายเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการรั่วของ LDH สามารถลดลงได้ เมื่อทำการ treat เซลล์ก่อนการได้รับเชื้อด้วย IFN-gamma เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สามารถผลิต nitric oxide เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเซลล์ หรือทำการ treat เซลล์ด้วย cytochalasin D เพื่อยับยั้ง actin polymerization ซึ่งทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าสู่เซลล์

นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในเซลล์ที่ติดเชื้อพบว่า *B. pseudomallei* สามารถทำให้ไมโทคอนเดรียมีการลดลงของระดับ mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) และเมื่อทำการ treat เซลล์ก่อนการได้รับเชื้อด้วย IFN-gamma พบว่า $\Delta\psi_m$ ในเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงของ $\Delta\psi_m$ ในเซลล์ที่ติดเชือยังเป็นผลให้โมเลกุลอื่นๆในไมโทคอนเดรียได้แก่ cytochrome c รั่วออกมา ซึ่งทำให้เอนไซม์ caspase ทำงาน และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า เชื้อ *B. pseudomallei* มีความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงระดับของ LDH สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกการทำลายของเซลล์เบื้องต้นได้ และการที่เซลล์ถูกทำลายนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย และการเปลี่ยนแปลงนี้ขึ้นกับเชื้อที่มีชีวิตและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้ออีกด้วย

เนื้อหางานวิจัย

1. บทนำ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียชนิดกรัมลบที่ทำให้เกิดโรค melioidosis ซึ่งระบาดในประเทศเขตร้อน ได้แก่ ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางเหนือของประเทศออสเตรเลีย และประเทศในเขตเส้นศูนย์สูตร รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Howe et al, 1971; Chaowagul et al, 1989; Leelarasamee and Bovomkitti, 1989; Yabuuchi and Arakawa, 1993) โดยคนและสัตว์สามารถติดเชื้อได้จากการสัมผัสกับแหล่งดินและน้ำหรือการหายใจเอาฝุ่นละอองที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าส่วนใหญ่เชื้อจะผ่านเข้าสู่ร่างกายคนทางบาดแผลและเข้าสู่กระแสเลือด และทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการไข้สูง ซึ่งตรงนี้อาจเกิดจากสารพิษที่ตัวเชื้อปล่อยออกมา รวมทั้งเกิดจากการที่ร่างกายพยายามสร้างกลไกการป้องกันตัวขึ้นในกระแสเลือดโดยการปล่อยสารเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันออกมา แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะมีการกระตุ้นกลไกอย่างรุนแรงทำให้ร่างกายหลังสารนี้ออกมามากเกินไป จึงทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อค และเสียชีวิตก่อนการวินิจฉัยโรค (Mays and Ricketts, 1975) ซึ่งอาการเหล่านี้ หากผู้รักษาไม่ทราบหรือไม่สังเกตว่าน่าจะเป็นอาการของโรค Melioidosis และผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากๆ แล้วอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาเพียง 2-3 วัน ทั้งๆ ที่หากได้รับการรักษาอย่างถูกต้องและทันเวลาที่ผู้ป่วยจะสามารถหายเป็นปกติโดยง่าย

นอกจากนี้ในธรรมชาติก็ยังมี *Burkholderia* บางสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Burkholderia thailandensis* (*B. thailandensis*) โดยทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความคล้ายคลึงกันมาก ปัจจุบันจึงมีนักวิจัยจำนวนมากที่พยายามศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ *Burkholderia* sp. ทั้ง 2 สายพันธุ์นี้รวมทั้งศึกษาการตอบสนองของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงกลไกการเกิดโรค Melioidosis

B. pseudomallei สามารถมีชีวิตและเพิ่มปริมาณในเซลล์ทั้ง phagocytic cells เช่น แมคโครฟาจ และ non-phagocytic cells เช่น epithelial cells ได้ (Jones et al, 1996; Pruksachartvuthi et al, 1990) จากรายงานการวิจัย เชื้อชนิดนี้สามารถหลบระบบภูมิคุ้มกันของ innate immunity โดยเมื่อเชื้อที่ถูกแมคโครฟาจ uptake เข้าไปจะมีอัตราการผลิต nitric oxide (NO) และการแสดงออกของ inducible nitric oxide (iNOS) ที่ต่ำ ทำให้แมคโครฟาจไม่สามารถทำลายเชื้อได้ (Utaisincharoen et al, 2001) นอกจากนี้ยังมีการพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังการถูก infect ด้วยเชื้อชนิดนี้ โดยที่แบคทีเรียสามารถหลบเลี่ยงการถูกทำลายโดยแมคโครฟาจและสามารถทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์หลายเซลล์กลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (Multinucleated giant cells) อย่างไรก็ตามการตอบสนองของเซลล์และกลไกการบุกรุกทำลายของเชื้อนี้ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่นอน รายงานวิจัยยังพบว่า *B. pseudomallei* มีการกระตุ้นให้ host cells เปลี่ยนแปลงรูปร่างคือ เซลล์เกิดการหดตัวเนื่องจากโครมาตินหดตัวและดีเอ็นเอถูกทำลายโดยเห็นเป็นคล้ายๆ ladder ซึ่งเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ตายแบบ apoptosis (Kespichayawattana et al, 2000)

การเกิด apoptosis ของ host cells อาจเป็นสิ่งที่นำไปสู่การอักเสบหรือเป็นกลไกการป้องกันตัวเองของ host cells เซลล์แมคโครฟาจเป็นเซลล์หนึ่งที่เป็นอันตรายต่อเชื้อ รายงานที่ผ่านมามีเชื้อหลายชนิดที่กระตุ้นให้เซลล์เกิด apoptosis เช่น *Shigella* spp. และ *Salmonella* spp. ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด

cytotoxicity และ การอักเสบด้วย ซึ่งการศึกษากลไกการตายของเซลล์หลังได้รับเชื้อนี้ทำให้ทราบการก่อให้เกิดโรคได้ (Navarre and Zychlinsky, 2000; Jarvelainen et al, 2003)

ไมโตคอนเดรียมีบทบาทสำคัญในกระบวนการตายของเซลล์โดยเป็นตัวเชื่อมโยงสัญญาณภายนอกกับภายในเซลล์ สัญญาณภายนอกโดย ligand engagement ของ receptors บนผิวเซลล์ สามารถกระตุ้นให้เกิด permeabilization ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของไมโตคอนเดรีย เป็นผลให้เกิดการลดลงของ membrane potential ($\Delta\psi_m$) ของไมโตคอนเดรีย และการปลดปล่อยของสารบางอย่างจากไมโตคอนเดรีย เช่น cytochrome c จะเป็นสัญญาณภายในซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของ caspase (cysteine aspartate proteases) และการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการตายของเซลล์ (Mignotte and Vayssiere, 1998) ดังนั้นการศึกษการเปลี่ยนแปลงของไมโตคอนเดรียจากเซลล์ที่ได้รับเชื้อเชื่อนี้ในระดับโมเลกุลจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคและการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei*

งานวิจัยนี้จะทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของไมโตคอนเดรียในระดับโมเลกุลโดยการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ $\Delta\psi_m$ การรั่วของ LDH และ cytochrome c รวมทั้งการวัดการทำงานของ caspase ในเซลล์ที่ถูก infect ด้วย *B. pseudomallei* (pathogenic strain) และ *B. thailandensis* (nonpathogenic strain) และเพื่อศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงนี้มีส่วนสำคัญต่อการตายของเซลล์อย่างไร

2. วิธีการวิจัย

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

RAW 264.7 (ATCC#TIB-71) และ A549 (ATCC#CCL-185) ได้มาจาก the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)

ทำการ seed เซลล์ mouse macrophage (RAW 264.7) และ human epithelial lung cell (A549) ด้วย DMEM (ผสม 10% FBS) โดยมีเซลล์ตั้งตัว 1×10^5 cells/ml สำหรับ RAW264.7 และ 5×10^5 cells/ml สำหรับ A549 ใน 6-well plates และนำไปเลี้ยงใน CO₂ incubator ชามคืนที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะแวดล้อม 95% บรรยากาศ และ 5% CO₂ เพื่อทำการ infect ในวันรุ่งขึ้น

สำหรับการ treat เซลล์ด้วย IFN-gamma นั้น จะ treat เซลล์ก่อนที่จะนำไป infect เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์ส่งสัญญาณให้เซลล์ข้างเคียงมีการผลิต nitric oxide ที่เพิ่มขึ้นเพื่อทำลายเชื้อในขณะที่ยังเข้าสู่เซลล์ไปแล้ว

2.2 การ infect เซลล์

Berkholderia pseudomallei (ATCC 23343, WRAIR 286); strain 844 ได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ. ขอนแก่น

Burkholderia thailandensis (ATCC700388); strain UE5 จากแหล่งดินในประเทศไทย

1. ในวันที่ทำการ infect นั้นให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่และเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปในแต่ละหลุมของจานเพาะเซลล์ตาม multiplicity of infection (MOI) ที่กำหนด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างโดย phosphate-buffered saline (PBS) จำนวน 3 รอบ สำหรับการ treat เซลล์ด้วย cytochalasin D นั้น จะทำการ treat เซลล์ด้วย cytochalasin D โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 2 µg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการ infect

2. เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย kanamycin 250 µg/ml และเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 2 ชั่วโมงสำหรับ RAW264.7 เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจจะเกาะอยู่ภายนอกเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี kanamycin 20 µg/ml และทำการเลี้ยงเซลล์ต่อตามเวลาที่กำหนด

2.3 การวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์

หลังจากเซลล์ถูก infect ตามเวลาที่กำหนดแล้ว ทำการ harvest เซลล์โดยล้างเซลล์ด้วย PBS สำหรับ RAW264.7 นั้นให้เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml และทำการดูดเซลล์ สำหรับ A549 นั้นให้ใช้ trypsin ในการแยกเซลล์ ทำการนับจำนวนเซลล์ตายและเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย trypan blue dye exclusion และ light microscopy

2.4 การตรวจสอบการรั่วของไมโทคอนเดรีย

1. วิเคราะห์ LDH release

โดยใช้วิธีตามคู่มือที่แนบมากับ Cytotoxicity detection kit (LDH) (Promega) ซึ่งใช้หลักการปฏิกิริยาของ enzyme-substrate โดยการเก็บ cultured supernatant และ cell lysate มาทำปฏิกิริยากับ substrate เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัด O.D. ที่ 490 nm ค่าที่ได้จะคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของ LDH ซึ่งคิดจาก LDH activity ใน medium และ ในเซลล์

$$\% \text{ LDH activity (in supernatant)} = \frac{(\text{OD in sup-OD blank1}) \times 100}{(\text{OD in sup} - \text{OD blank1}) + (\text{OD in cell-OD blank2})}$$

โดย Blank1 = Fresh media

Blank2 = Fresh media + lysis buffer

Cell lysate เตรียมโดยการนำเซลล์จำนวน 2×10^4 เซลล์มาทำให้แตกโดยใช้ 9% TritonX100 และหลังจากที่บ่มที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 45 นาที แล้วให้เก็บเซลล์โดยการปั่นที่ 4°C ความเร็วรอบ 250 g เป็นเวลา 4 นาที ซึ่ง lysate ที่ได้จะนำไปทำการหา LDH ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

2. วิเคราะห์การปลดปล่อยของ cytochrome c

โดยใช้วิธีการสกัด mitochondrial fraction ตามคู่มือที่แนบมากับ ApoAlert[®] Cell Fractionation Kit (Clontech) จากนั้นจะ detect cytochrome c โดยใช้วิธี Western blot analysis การสกัดโปรตีนทำได้โดยการเติม Fractionation buffer mix ซึ่งมีส่วนผสมของ protease อยู่ ลงในเซลล์ที่เก็บมา ใช้เข็มฉีดยาทำให้เซลล์แตก และปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บส่วนที่เป็น cytosol จากนั้นนำส่วนที่ได้นี้ไปทำการหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Bradford reagent นำโปรตีนความเข้มข้น 1-5 μg มาทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE ที่ 15% gel ทำการ transfer protein จาก acrylamide gel ลงสู่ nitrocellulose membrane และ probe membrane กับ cytochrome c antibody เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อล้างและ probe ด้วย secondary antibody แล้ว ทำการเติม Substrate (Chemiluminescence) บนแผ่น membrane และนำไปประกบฟิล์ม จะเห็น band protein ที่ได้อยู่ที่ 14 kDa

3. วิเคราะห์ mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

โดยใช้ JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazoly carbocyanine iodide) dye staining ซึ่งใช้ดูการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของ $\Delta\psi_m$ สามารถวัดออกมาเป็นค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสง fluorescence เมื่อถูก stain ด้วย lipophilic cation JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazoly carbocyanine iodide) ในเซลล์ปกติ JC-1 จะอยู่เป็น monomer เดี่ยวๆใน cytosol (สีเขียว) และสะสมในไมโทคอนเดรียซึ่งติดสีแดง ในขณะที่เซลล์ที่เป็น apoptotic หรือ necrotic cells นั้น JC-1 จะอยู่ในรูป monomeric form และ stain cytosol เป็นสีเขียว ดังนั้นอัตราส่วนของ red fluorescence ต่อ green fluorescence จะลดลงในเซลล์ที่ตายและเซลล์ที่เข้าสู่กระบวนการ apoptosis เทียบกับเซลล์ปกติ

การวิเคราะห์ทำได้โดยการ stain cell ด้วย JC-1 assay buffer เป็นเวลา 15 นาที ที่ 37°C และนำไปวัดค่าการเรืองแสง red fluorescence (excitation 550 nm, emission 600 nm) และ green fluorescence (excitation 485, emission 535 nm)

4. วิเคราะห์ caspase activity

โดยใช้ BD ApoAlert[™] Caspase-3 Colorimetric Assay Kits (Clontech) ซึ่งทำได้โดยเก็บเซลล์ 2×10^6 เซลล์ ทำการ lyse เซลล์โดย cell lysis buffer เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เติม reaction buffer/DTT mix และ caspase substrate (DEVD-pNA) และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปวัด O.D. ที่ 405 nm โดย microplate reader คำนวณปริมาณ pNA โดยทำ calibration curve

$$\text{Units caspase activity} = \Delta \text{ ODU} \times (1 / \text{curve slope})$$

$\Delta \text{ ODU}$ = the difference in ODU between an uninduced control and its corresponding induced sample

2.5 ค่าทางสถิติ

ค่าต่างๆที่คำนวณจากการทดลองที่ทำซ้ำจะอยู่ในรูปของ means $\pm$ standard error of the mean (SEM) หรือ standard deviation (SD) ตามระบุ

$$\text{SD} = \sqrt{[\sum (x-m)^2 / (n-1)]}$$

$$\text{SEM} = \text{SD} / \sqrt{n}$$

Where n = number of independent observations
 $n-1$ = number of degrees of freedom
 x = an observed value
 m = arithmetical mean of n observations

Significance testing ทำโดยใช้ Student t -test ซึ่งตัวเลขที่พิจารณาว่ามีความสำคัญคือที่ $P < 0.05$

3. ผลการทดลอง

3.1 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

เซลล์เมื่อมีการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 844 พบว่าหลังการได้รับเชื้อเป็นเวลา 8 และ 12 ชั่วโมง สำหรับเซลล์ RAW264.7 และ A549 ตามลำดับ มีการเปลี่ยนแปลงคือ เกิดการรวมตัวของเซลล์ (cell fusion) และกลายเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cells) และการเปลี่ยนแปลงนี้จะพบได้น้อยในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. thailandensis* สายพันธุ์ UE5 (Figure 1) นอกจากนี้เมื่อทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ เช่น ที่ MOI 10:1 สำหรับ RAW264.7 ก็จะพบการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วขึ้น

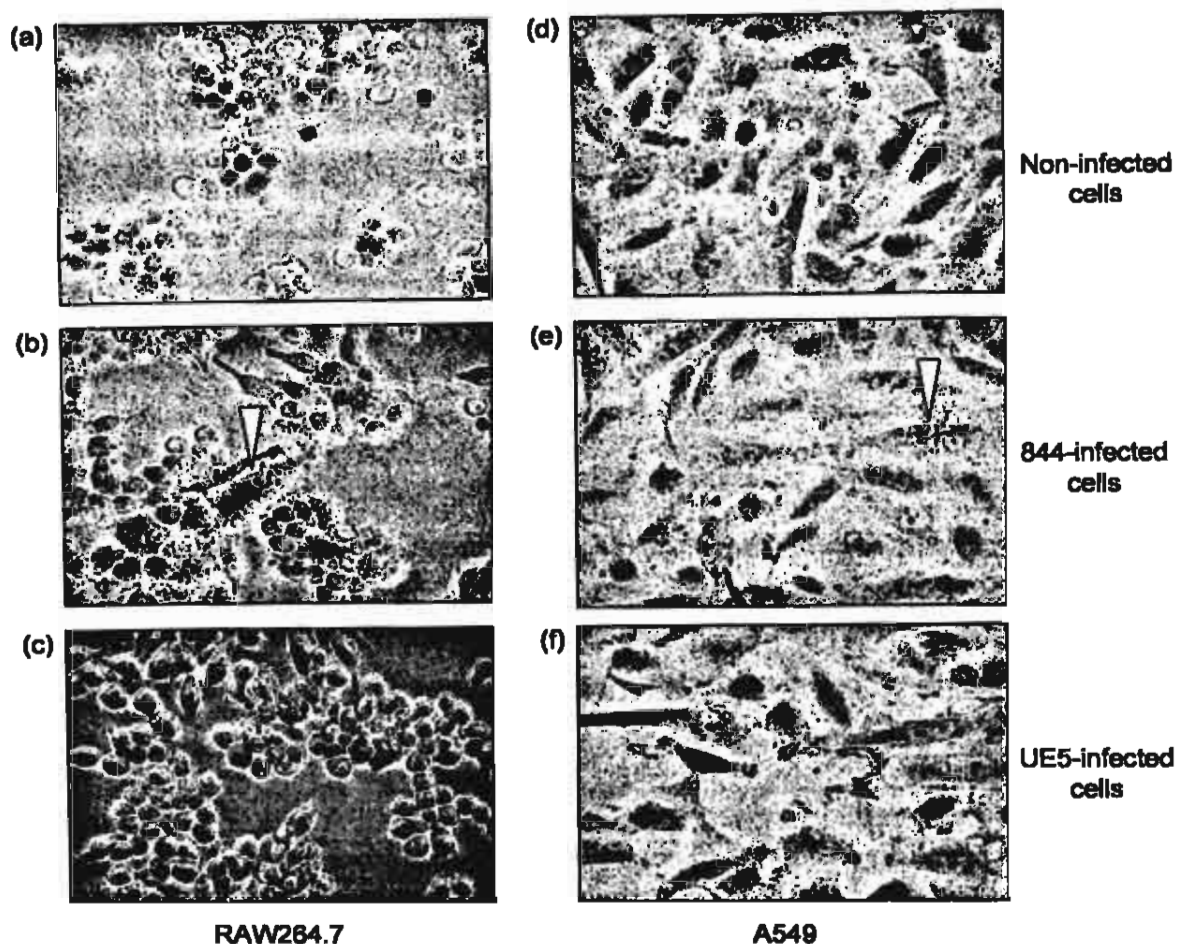


Figure 1. Cell fusion and multinucleated cell formation in *B. pseudomallei*-infected cells. RAW264.7 and A549 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells and 5×10^5 cells, respectively. Cells were infected with *B. pseudomallei* (844) or *B. thailandensis* (UE5) at an MOI of 2:1 for RAW264.7 and an MOI of 10:1 for A549. After 1 h of infection, cells were treated with kanamycin. At 8 h (for RAW264.7) and 12 h (for A549), the cells were visualized under inverted microscope (20X). Multinucleated cells (arrowed) could be observed in the cells infected with 844 (b, e). Such a morphological change could not be visualized in non-infected cells (a, d) and UE5-infected cells (c, f).

3.2 ความอยู่รอดของเซลล์หลังได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

การที่จะทดสอบผลของเชื้อที่มีต่อเซลล์ในระดับโมเลกุลนั้น จะต้องควบคุมให้เซลล์ที่ได้รับเชื้อมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดที่สูงในช่วงระยะเวลาที่ทำการศึกษา จากผลการทดลองพบว่าทั้งเซลล์ RAW264.7 และ A549 ที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิด (844 และ UE5) ที่ MOI 2:1 และ 10:1 ตามลำดับนั้นยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดสูง (Figure 2 ลูกศรชี้) โดยมากกว่า 90% cell viability แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเข้าไปก็พบว่าเซลล์ RAW264.7 ณ เวลาที่ 8 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดที่ต่ำลงโดยเมื่อได้รับเชื้อ 844 จะมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด 75% cell viability ที่ MOI 10:1 และ 35% cell viability ที่ MOI 100:1 ส่วนเซลล์ที่ได้รับเชื้อ UE5 ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นนั้นพบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดที่สูงกว่าในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 ในปริมาณที่เท่ากัน โดย มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด 88% cell viability ที่ MOI 10:1 และ 75% cell viability ที่ MOI 100:1 จากการทดลองนี้จะเห็นว่าเชื้อ 844 มีความสามารถในการทำลายเซลล์แมคโครฟาจมากกว่า UE5 เมื่อเซลล์นั้นได้รับเชื้อด้วยปริมาณแบบที่เรียกว่าเท่ากัน สำหรับ A549 นั้น เมื่อได้รับเชื้อในปริมาณที่มากขึ้นจะพบว่าไม่มีผลต่อความอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ

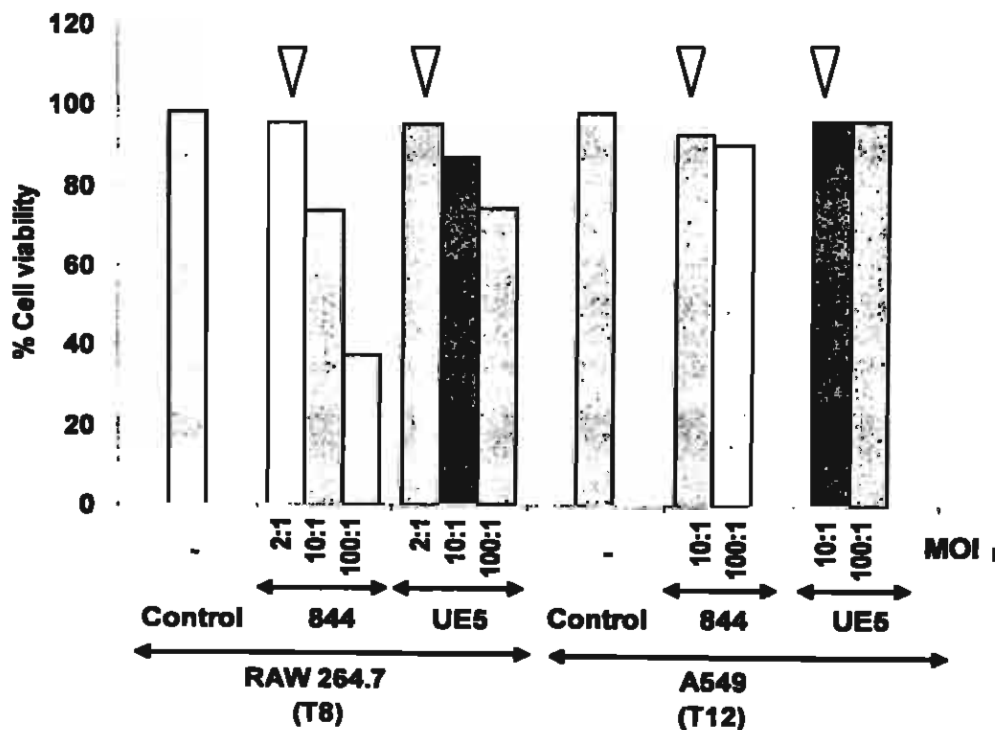


Figure 2. Cell viability of cells infected *B. pseudomallei* (844) and *B. thailandensis* (UE5). RAW264.7 and A549 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells and 5×10^5 cells, respectively. Cells were infected with *B. pseudomallei* (844) or *B. thailandensis* (UE5) at different MOI (MOI of 2:1, 10:1 and 100:1 for RAW264.7 ; MOI of 10:1 and 100:1 for A549). After 1 h of infection, cells were treated with kanamycin. At 8 h (for RAW264.7) and 12 h (for A549), cell viability was determined using trypan blue dye exclusion. Non-infected cells were performed as control.

3.3 การปล่อย lactate dehydrogenase (LDH) จากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

ผลการทดลองพบว่าหลังจากได้รับเชื้อ *Burkholderia* เป็นเวลาที่เห็น cell fusion หรือก่อนที่เซลล์จะแตกนั้น เซลล์มีการปล่อย LDH ออกมาหลังจากได้รับเชื้อ *Burkholderia* (Figure 3) โดย เซลล์ RAW264.7 ที่ถูก infect ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* (844) ที่ปริมาณต่างๆ คือ MOI 2:1, 20:1 และ 40:1 มีการปล่อย LDH คิดเป็น 4.7, 6 และ 8 เท่า ของปริมาณ LDH ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ ตามลำดับ และเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 นี้พบว่ามี การปล่อย LDH ออกมาในปริมาณที่มากกว่า LDH ที่ปล่อยจากเซลล์ที่ถูก infect ด้วย *B. thailandensis* (UE5) โดยที่ MOI 2:1, 20:1 และ 40:1 มีการปล่อย LDH คิดเป็น 2.8, 5 และ 6 เท่า ของปริมาณ LDH ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ ตามลำดับ

เมื่อติดตามช่วงเวลาของการปล่อย LDH จากเซลล์ RAW264.7ที่ได้รับเชื้อ 844 ที่ MOI 2:1 นั้นพบว่าหลังจากได้รับเชื้อเป็นเวลามากขึ้นก็จะพบการปล่อยของ LDH ที่เพิ่มขึ้น (Figure 4a) โดยเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนหลังจากเวลาที่ 4 ชั่วโมงขึ้นไป ส่วนเชื้อ UE5 นั้นทำให้เซลล์มีการปล่อย LDH ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาหลังการรับเชื้อเพิ่มขึ้น แต่เป็นการเพิ่มในปริมาณที่น้อยกว่าการปล่อย LDH จากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844

สำหรับเซลล์ A549 นั้น เมื่อติดตามช่วงเวลาของการปล่อย LDH จากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 ที่ MOI 10:1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถวัดการปล่อย LDH ออกมาได้ชัดเจนที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยคิดเป็นประมาณ 3 เท่าของปริมาณ LDH ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อและเซลล์ที่รับเชื้อ UE5 (Figure 4b)

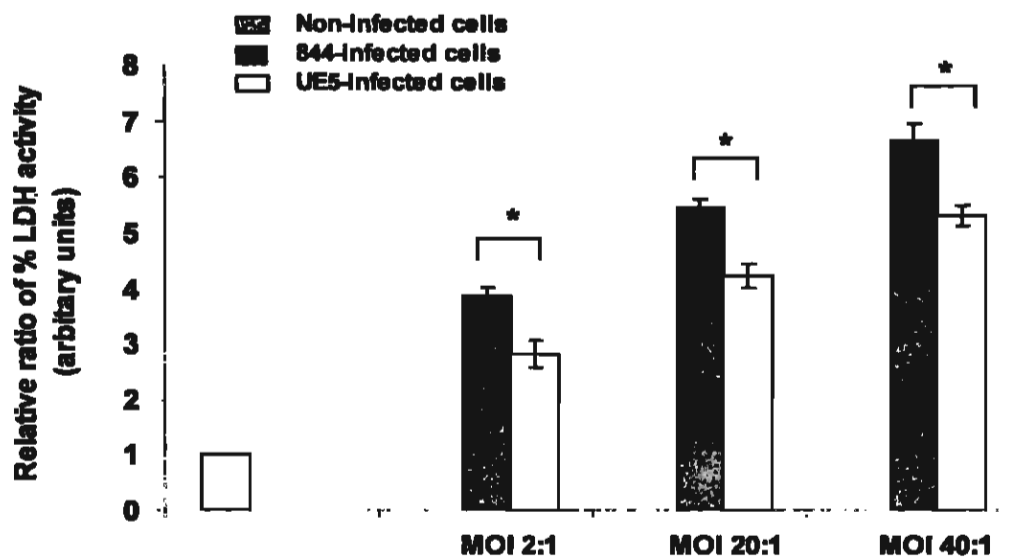
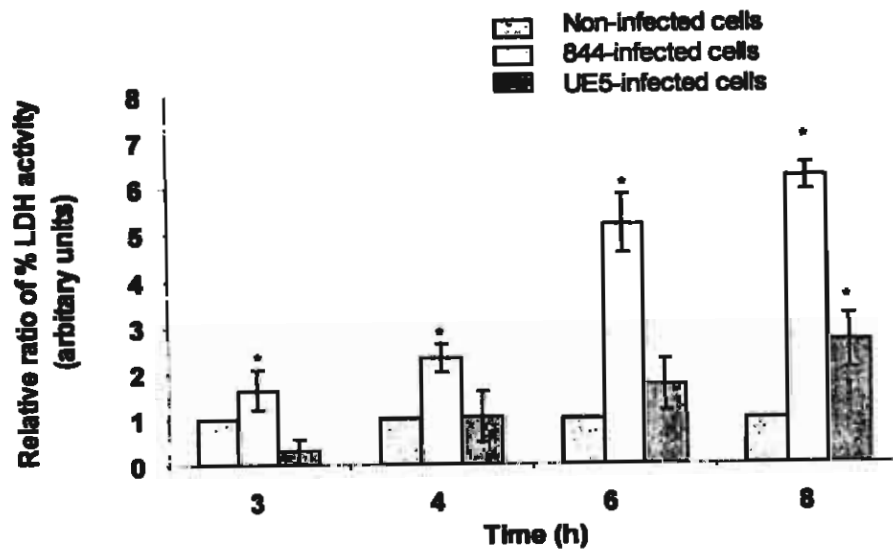


Figure 3. LDH release from macrophage (RAW264.7) cells infected with 844 and UE5. Cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells. Cells were infected with 844 or UE5 at different MOI (2:1, 20:1 and 40:1) for 1 h. After kanamycin treatment, cells were incubated until cell fusion was observed. Cell lysate and supernate were collected to determine LDH activity in cultured medium. Non-infected cells were performed as control. Data presented are means $\pm$ SEM for three separate experiments. * $P < 0.05$ according to Student's *t*-test.

(a)



(b)

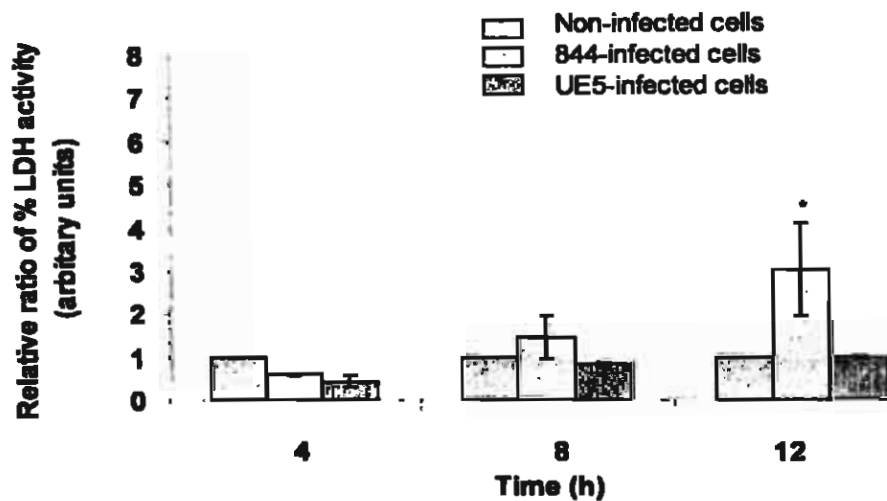


Figure 4. Change in the LDH activity from RAW264.7 (a) and A549 (b) cells infected with 844 and UE5 during the time course. RAW264.7 and A549 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells and 5×10^5 cells, respectively. Cells were infected with 844 or UE5 (MOI 2:1 for RAW264.7 and MOI 10:1 for A549) for 1 h. After kanamycin treatment, cells were incubated at interval time. Cell lysate and supernate were collected to determine LDH activity in cultured medium. Non-infected cells were performed as control. Data presented are means $\pm$ SEM for three separate experiments. * indicates significantly different from control at each time point, $P < 0.05$ according to Student's *t*-test.

3.4 การเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

จากการทดลองพบว่า หลังจากที่เซลล์ RAW264.7 ได้รับเชื้อ 844 และ UE5 เป็นเวลาที่เป็น cell fusion และก่อนที่เซลล์จะแตกกลายนั้น ไมโทคอนเดรียมีการสูญเสีย $\Delta\psi_m$ (Figure 5) โดยมีค่า 0.55 และ 0.68 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่ตรวจพบการลดลงของ $\Delta\psi_m$ อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ A549 ที่ได้รับเชื้อ 844 และ UE5

เมื่อติดตามช่วงเวลาของการลดลงของ $\Delta\psi_m$ ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับเชื้อ 844 ที่ MOI 2:1 นั้น จะพบการลดลงของ $\Delta\psi_m$ มากขึ้นหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อเป็นระยะเวลามากขึ้น (Figure 6a) และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อ 6 ชั่วโมงขึ้นไป โดยลดลงจาก 0.77 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ ที่เวลา 6 ชั่วโมง เหลือ 0.55 เท่า ที่เวลา 8 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ UE5 นั้นทำให้เซลล์สูญเสีย $\Delta\psi_m$ เช่นเดียวกันแต่ลดลงในระดับที่น้อยกว่าที่พบในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 คือ 0.85 และ 0.68 เท่า ของเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ ที่เวลา 6 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

สำหรับเซลล์ A549 นั้น เมื่อติดตามช่วงเวลาของการลดลงของ $\Delta\psi_m$ ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 หรือ UE5 ที่ MOI 10:1 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงนั้น ระดับของ $\Delta\psi_m$ ยังไม่ลดลงไปกว่า 0.75 เท่าของเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ (Figure 6b)

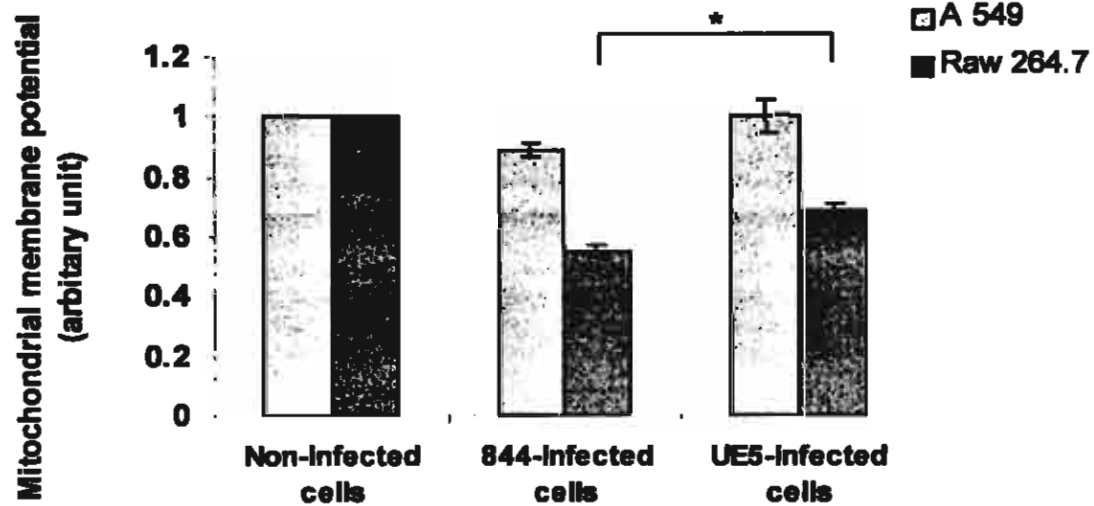


Figure 5. Detection of mitochondrial membrane potential from RAW264.7 and A549 cells infected with 844 and UE5. RAW264.7 and A549 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells and 5×10^5 cells, respectively. Cells were infected with 844 or UE5 (MOI 2:1 for RAW264.7 and MOI 10:1 for A549) for 1 h. After kanamycin treatment, RAW264.7 and A549 cells were incubated at 8 and 12 h, respectively. Cells were harvested and stained with JC-1. After a 15 min incubation, cells were washed and analyzed by fluorescence plate reader. The values of $\Delta\psi_m$ are expressed as the fluorescent-intensity ratio of red to green fluorescence. Non-infected cells were performed as control. Data presented are means $\pm$ SEM for three separate experiments. * $P < 0.05$ according to Student's *t*-test.

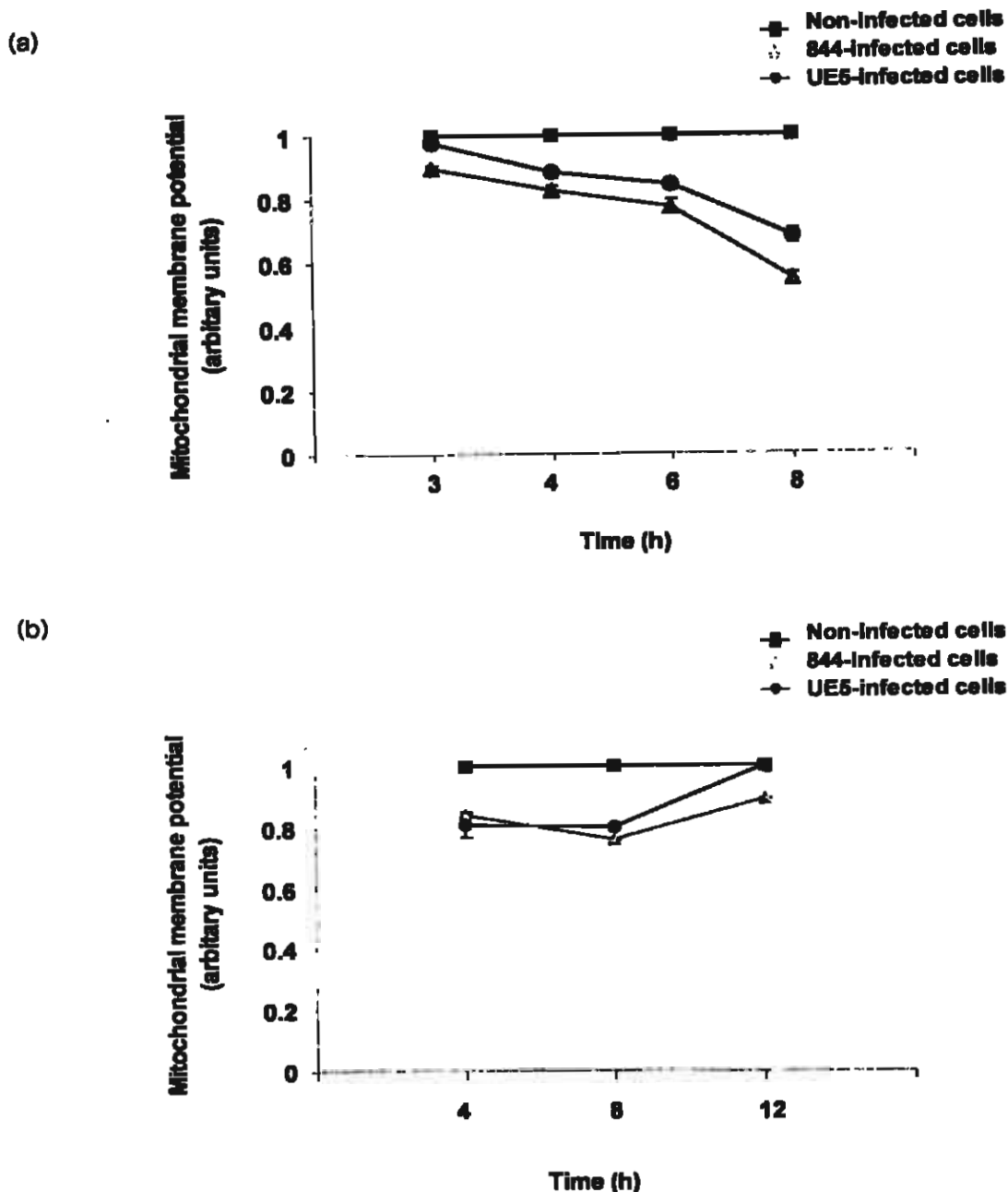


Figure 6. Change in the mitochondrial membrane potential during the time course of RAW264.7 (a) and A549 cells (b) infected with 844 and UE5. RAW264.7 and A549 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells and 5×10^5 cells, respectively. Cells were infected with 844 or UE5 (MOI 2:1 for RAW264.7 and MOI 10:1 for A549) for 1 h. After kanamycin treatment, RAW264.7 and A549 cells were incubated at desired time. For detection of $\Delta\psi_m$, cells were harvested and stained with JC-1. After a 15 min incubation, cells were washed and analyzed by fluorescence plate reader. Non-infected cells were performed as control. The values of $\Delta\psi_m$ are expressed as the fluorescent-intensity ratio of red to green fluorescence. The values of $\Delta\psi_m$ in non-infected (control) cells of either RAW264.7 or A549 were taken to be 1 and other values were expressed relative to that. Data of $\Delta\psi_m$ presented are means $\pm$ SD for triplicate measurement from one experiment.

3.5 การทำลายเซลล์ของเชื้ออหิวาต์เชื้อที่มีชีวิตและการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อ

การที่เชื้อ *B. pseudomallei* ทำลายเซลล์ได้นั้นจะต้องอาศัยการมีชีวิตของเชื้อซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองคือ เมื่อเซลล์ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ LDH และ $\Delta\psi_m$ เมื่อเทียบกับในเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ แม้ว่าเซลล์จะได้รับเชื้อในปริมาณที่มากขึ้นก็ตาม (Figure 7)

เมื่อทำการ treat เซลล์ก่อนการได้รับเชื้อด้วย IFN-gamma เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สามารถผลิต nitric oxide เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในเซลล์ พบว่าหาก treat เซลล์ด้วย IFN-gamma ที่ความเข้มข้นมากขึ้นจะทำให้เซลล์มีการรั่วของ LDH ลดลง และทำให้ไมโทคอนเดรียสามารถรักษาระดับของ $\Delta\psi_m$ นอกจากนี้เมื่อทำการ treat เซลล์ด้วย cytochalasin D จะพบว่าระดับการรั่วของ LDH มีค่าใกล้เคียงกับระดับการรั่วของ LDH ในเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อ

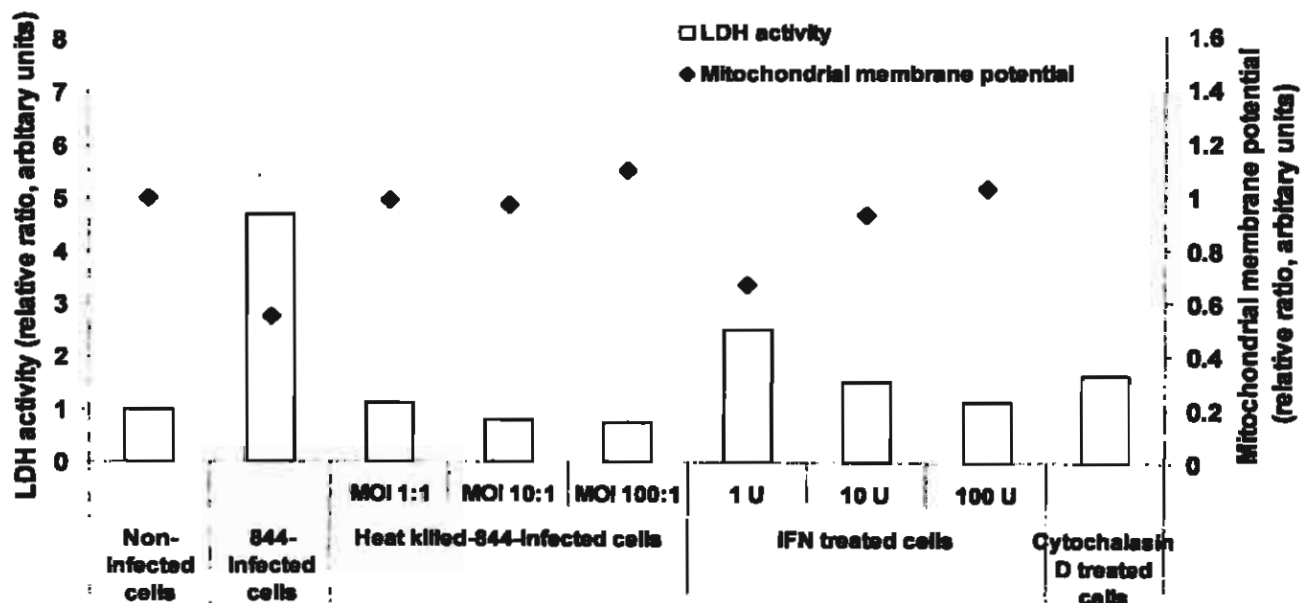


Figure 7. Effect of IFN-gamma, cytochalasin D and non-living bacteria to cell damage. RAW264.7 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells. For IFN-gamma treatment, cells were treated with IFN-gamma at the concentration of 1, 10, 100 units for overnight. Cells were infected with 844 at MOI 2:1 (for treated and untreated cells with IFN-gamma) or heat-killed 844 (at MOI 1:1, 10:1 and 100:1) for 1 h. For cytochalasin D treatment, cells were treated with 2 μ g of cytochalasin D for 2 h before 1h-infection with 844 at MOI 2:1. After kanamycin treatment, at 8 h, cell lysate and supernate were collected to determine LDH activity and $\Delta\psi_m$. Non-infected cells were performed as control. The values of $\Delta\psi_m$ are expressed as the fluorescent-intensity ratio of red to green fluorescence. The values of %LDH activity and $\Delta\psi_m$ in non-infected (control) cells were taken to be 1 and other values were expressed relative to that.

3.6 ผลของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อการรั่วของ cytochrome c และการทำงานของ caspase-3

เนื่องจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า *B. pseudomallei* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ ซึ่งอาจเกิดได้จากการที่ไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลง และจากการทดลองในรายงานนี้พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียของ mitochondrial membrane potential ดังนั้นการตรวจสอบการรั่วของโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆจากไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome c จะทำให้ยืนยันว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้เซลล์ตายโดยไปมีผลที่ไมโทคอนเดรีย และการวัดการทำงานของ caspase-3 จะช่วยยืนยันว่าเชื้อชนิดนี้ทำให้เซลล์ตายโดย apoptosis

จากการศึกษาพบว่าเซลล์แมคโครฟาจหลังได้รับเชื้อ 844 มีการรั่วของ cytochrome c (Figure 8) จากไมโทคอนเดรียออกมาสู่ cytosol ซึ่งตรวจพบโดยวิธี Western blot analysis นอกจากนั้นยังพบการทำงานของเอ็นไซม์ caspase-3 (Figure 9) ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ 844 อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองไม่พบการรั่วของ cytochrome c และการทำงานของเอ็นไซม์ caspase-3 จากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ UE5

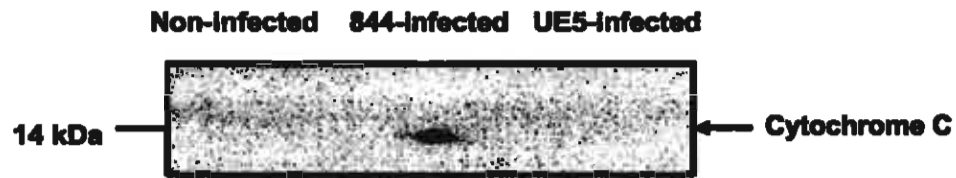


Figure 8. Cytochrome c release from the mitochondria of 844-infected RAW264.7 cells. Cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells. Cells were infected with either 844 or UE5 at MOI 2:1 for 1 h. After kanamycin treatment, cells were incubated for 8 h and cells were lysed. Cytosol protein was extracted and used to detect cytochrome c using western blot analysis.

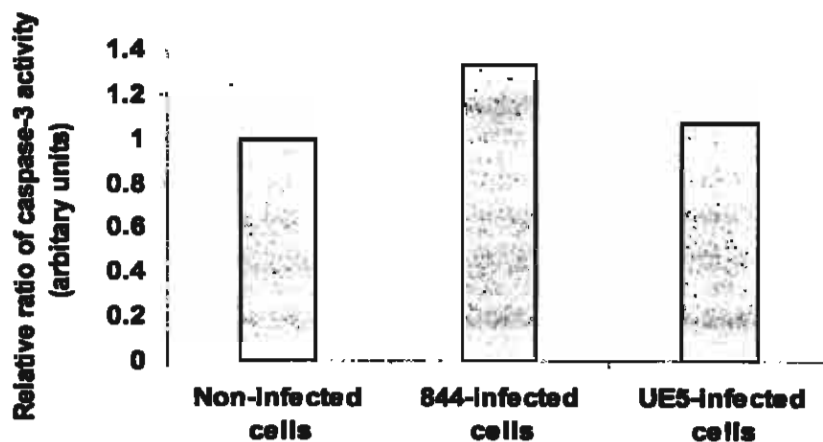


Figure 9. Activation of caspase-3 in 844-infected RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were plated on 6-well plate the day before infection at the initial seeding of 1×10^6 cells. Cells were infected with 844 at MOI 2:1 for 1 h. After kanamycin treatment, at 8 h, cells were harvested and caspase-3 activity was determined using BD ApoAlert™ Caspase Colorimetric Assay Kits. Non-infected cells were performed as control. The values of caspase-3 activity in non-infected (control) cells were taken to be 1 and other values were expressed relative to that.

4. สรุปและวิเคราะห์ผล

การศึกษาเกี่ยวกับการก่อให้เกิดโรคของ *Burkholderia pseudomallei* นั้น แม้จะมีการศึกษาทั้งทางอนุพันธุศาสตร์ ทางชีวเคมี และทางด้านอิมมูโนวิทยาของเชื้อ แต่กลไกการหลบหลีกของเชื้อจากการถูกทำลายของเซลล์แมคโครฟาจและการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบกันดีนัก จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัย Kespichayawattana และคณะ (2000) พบว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์คือก่อให้เกิด cell fusion และ multinucleated giant cells ซึ่งจากการศึกษาในรายงานนี้ (Figure 1) ก็ได้ยืนยันผลงานวิจัยที่ผ่านมา การเปลี่ยนแปลงของเซลล์นี้จะเห็นได้มากและเร็วขึ้น อีกทั้งความอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับเชื้อจะน้อยลงด้วยเมื่อเซลล์ได้รับเชื้อในปริมาณที่มากขึ้น (Figure 2) เมื่อเทียบกับเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค (844) แล้ว เชื้อ *B. thailandensis* สายพันธุ์ UE5 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนั้นสามารถทำให้ทำให้เซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) เกิดการตายได้เช่นเดียวกันหากได้รับเชื้อในปริมาณที่มาก อย่างไรก็ตามความรุนแรงจะน้อยกว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค การทดลองใน non-phagocytic cells (A549) พบว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิดมีอัตราการรอดชีวิตสูงแม้จะเพิ่มปริมาณเชื้อแล้วก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าไปในเซลล์ได้น้อยเมื่อเทียบกับเซลล์แมคโครฟาจซึ่งมีความสามารถในการด้าน phagocytosis

จากการศึกษาในรายงานนี้พบว่าที่ปริมาณเชื้อต่อเซลล์ (MOI; multiplicity of infection) ที่เหมาะสม ที่ทำให้เซลล์ที่ได้รับเชื้อยังมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดสูง (มากกว่า 90% cell viability) คือ ที่ MOI 2:1 สำหรับ RAW264.7 และ MOI 10:1 สำหรับ A549 (Figure 2) เมื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ที่ได้รับเชื้อในปริมาณที่เหมาะสมพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้เซลล์เกิดความเป็นพิษขึ้น โดยวัดจากการที่เซลล์มีปัสัย LDH ออกมา และความเป็นพิษนี้มีมากกว่าในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. thailandensis* ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่สูง ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการปล่อย LDH จากเซลล์ เป็น indicator ของ cell damage นอกจากนี้ปริมาณ LDH ที่หลั่งออกมายังขึ้นอยู่กับการปริมาณเชื้อที่ได้รับ (Figure 3) โดยปริมาณ LDH จะถูกปล่อยมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับเชื้อในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลให้เซลล์ถูกทำลายและตายมากขึ้น ปริมาณ LDH ที่ถูกปล่อยออกมายังขึ้นกับเวลาหลังการได้รับเชื้อและชนิดของเซลล์ที่ได้รับเชื้อด้วย จากการทดลองพบว่าแมคโครฟาจที่ถูก infect ด้วยแบคทีเรีย มีการปล่อย LDH ออกมาได้ในปริมาณที่มากกว่า epithelial cells ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่แมคโครฟาจ มีความสามารถในการ phagocytose แบคทีเรีย ได้ดีกว่า epithelial cells ซึ่งเป็นเซลล์ชนิด non-phagocytic cells ทำให้จำนวนแบคทีเรียภายใน phagocytic cells มีสูงกว่า non-phagocytic cells ที่ได้รับเชื้อใน MOI ที่เท่ากัน (Figure 4)

การตายของเซลล์สามารถแบ่งได้เป็น การตายแบบ necrosis ซึ่งเป็นการตายแบบเฉียบพลัน โดยเซลล์จะเกิดการบวมและเยื่อหุ้มเซลล์แตก และการตายแบบ apoptosis (programmed cell death) ซึ่งเซลล์ที่ตายแบบนี้จะมีการหดตัวและกลายเป็น apoptotic body โดยที่ organelles ต่างๆยังคงอยู่ เซลล์หลายชนิดสามารถเกิดการตายแบบ apoptosis หากได้รับสิ่งเร้าจากภายนอก เช่น การขาดอาหารหรือการได้รับ pathogen ต่างๆ ซึ่งจะไปกระตุ้น death receptor บนผิวเซลล์ เป็นผลทำให้ initiator caspases (caspase-2, -8 และ -10) ทำงาน และกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ effector caspases (caspase-3, -6 และ -7) หรือกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่ไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้สิ่งเร้าจากภายในเซลล์ เช่น การเกิดของ oxidative stress เป็นต้น ยังส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์ของไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงด้วยโดยจะไปทำให้มีการสูญเสีย $\Delta\psi_m$ ซึ่งมีผลทำให้มีการรั่วของโมเลกุลหรือโปรตีนต่างๆจากไมโทคอนเดรีย เช่น cytochrome c และ cytochrome c จะรวมตัวกับ

โปรตีน Apaf-1 และ procaspase-9 เป็น apoptosome และกระตุ้นให้ caspase-9 ทำงานได้ โดยมี dATP/ATP เป็นตัวช่วย ซึ่งหากมีการลดลงของ $\Delta\Psi_m$ และ ATP เป็นอย่างมากจะทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ necrosis ได้ การทำงานของ caspase-9 จะไปกระตุ้นให้ effector caspases ทำงานได้ ส่งผลให้เกิดการทำลายของ DNA และ เซลล์จะเกิดเป็น apoptotic body ในที่สุด ซึ่งจะถูกจับกินโดย phagocyte ต่อไป

จากการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ พบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของ $\Delta\Psi_m$ ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* โดย *B. pseudomallei* ทำให้ ไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงได้มากกว่า และการเปลี่ยนแปลงนั้นนอกจากจะขึ้นอยู่กับเวลาที่ได้รับเชื้อและชนิดของเชื้อแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ได้รับเชื้อด้วย (Figure 5 และ Figure 6) ทั้งนี้การทำลายเซลล์ของ *B. pseudomallei* ทั้งที่ทำให้ไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงและที่ทำให้เซลล์มีความเป็นพิษ ยังขึ้นกับการมีชีวิตของเชื้อ ดังจะพบได้จาก Figure 7 คือเมื่อเซลล์ได้รับเชื้อที่ถูกฆ่าด้วยความร้อนหรือเซลล์ที่ถูก treat ด้วย IFN-gamma ก่อนการได้รับเชื้อที่มีชีวิต พบว่าเซลล์สามารถรักษาระดับของ LDH และ $\Delta\Psi_m$ ให้คงที่ได้

การเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย นั้น หากมีการสูญเสีย $\Delta\Psi_m$ มากจะทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ necrosis โดยสามารถวัดได้จากการหลั่งของ LDH ออกมานอกเซลล์ หรือการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ อย่างไรก็ตาม การพบว่า เซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถพบการรั่วออกมาของ cytochrome c จากไมโทคอนเดรียออกสู่ออกไซโตซอล (Figure 8) และการทำงานของ caspase-3 (Figure 9) ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วย ทำให้สามารถยืนยันได้กับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบการเกิด DNA fragmentation และลักษณะของ apoptotic bodies (Kespichayawattana et al, 2000) ดังนั้นอาจจะสรุปได้ว่าการเกิด apoptosis นี้ ส่วนหนึ่งนั้น มาจากการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของไมโทคอนเดรีย และกลไกหนึ่งที่เชื้อสามารถก่อให้เกิดโรคได้คือการกระตุ้นให้ host cells เกิด apoptosis โดยเชื้อจะถูกกักอยู่ใน apoptotic bodies และเมื่อ phagocytes อันจับกินเซลล์จับกิน เซลล์ที่ตายแล้วนี้ จะทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์บริเวณอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อสามารถ ก่อให้เกิดโรคในที่สุด อีกประการหนึ่งคือ การพบว่าในขณะที่เซลล์ยังมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดสูง แต่มีการ เปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่จะนำไปสู่การเกิด apoptosis นั้น อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ delay การเกิด necrosis ซึ่งมี รายงานพบได้ในเซลล์แมคโครฟาจที่ติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเชื้ออาศัยเซลล์ที่มีลักษณะของ "pseudo-healthy" ในการหลบหนีการถูกทำลายจาก phagocytes ชนิดอื่นๆ (Barsig and Kaufmann, 1997) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถมีชีวิตอยู่รอดภายในเซลล์ได้

5. References

- Barsig J, Kaufmann SH (1997) The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 65(10): 4075-4081.
- Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, Looareesuwan S, Pitakwatchara N. (1989) Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis.* 159(5):890-9.
- Howe C, Sampath A, Spotnitz M. (1971) The pseudomallei group: a review. *Infect Dis.* 124(6):598-606.
- Jarvelainen HA, Galmiche A, Zychlinsky A. (2003) Caspase-1 activation by *Salmonella*. *Trends Cell Biol.* 13(4):204-209.
- Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. (1996) Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun.* 64(3):782-90.
- Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T, Utaisinchaoen P, Sirisinha S. (2000) *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. *Infect Immun.* 68(9):5377-84.
- Leelarasamee A, Bovornkitti S. (1989) Melioidosis: review and update. *Rev Infect Dis.* 11(3):413-25.
- Mays EE, Ricketts EA. (1975) Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure. *Chest.* 68(2):261-3.
- Mignotte B, Vayssiere JL. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 252(1):1-15.
- Navarre WW, Zychlinsky A. (2000) Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol.* 2(4):265-73.
- Pruksachartvuthi S, Aswapokee N, Thanerngpol K. (1990) Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes. *J Med Microbiol.* 31(2):109-14.
- Utaisinchaoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W., Chaisuriya P, Sirisinha S. (2001) *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol. Immunol.* 45(4): 307-313.

Yabuuchi E, Arakawa M. (1993) *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: be aware in temperate area. *Microbiol Immunol.* 37(11):823-36.

Output ที่ได้จากโครงการ

Nuchtas A, Thisayathiko, B and Lengwehasatit I (2004) The study of cellular response in *Burkholderia pseudomallei*-infected cells. The fifth science project exhibition, March, 2004. Faculty of Science, Mahidol University, Thailand (Poster-Abstract In English and Thai, BT-24).

Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. (2004) *Burkholderia pseudomallei* stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A549. Clin. Exp. Immunol. 138(1): 61-65.

Boonyos P, Kullavanijaya K and Lengwehasatit I (2005) The study of apoptosis in *Burkholderia pseudomallei*-infected cells. The sixth science project exhibition. March 15, 2005. Faculty of Science, Mahidol University, Thailand (Poster-Abstract In English and Thai, BT-05 p138-p139).

Utaisincharoen P, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Sirisinha S. (2005) *Burkholderia pseudomallei* invasion and activation of epithelial cells requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Microb Pathog. 38(2-3):107-12.

Lengwehasatit I and Utaisincharoen P (2005) Study of mitochondrial function of the cells infected with *Burkholderia pseudomallei*. Thailand Research Fund Meeting. January 14-16, 2005, Kanchanaburee, Thailand (Poster-Abstract in English, MRG057 p115).

Cell damage by *Burkholderia pseudomallei* requires internalization and living bacteria. Micobial. Pathog. (Manuscript in preparation)

ภาคผนวก

ผู้อธิบายโครงงานวิจัย

นางสาวอโนชา นุชเทศ และนางสาวโบ ดิษยาริคม

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

การศึกษาการตอบสนองของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

อโนชา นุชเทศ, โบ ดิษยาริคม, และ อัญญา เล่งเวหาสฤติย์¹

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค Melioidosis ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน โคลน แหล่งน้ำนิ่ง และนาข้าว จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า โดยส่วนใหญ่เชื้อนี้สามารถเข้าสู่ร่างกายคนทางบาดแผล และเข้าสู่กระแสเลือด เป็นผลให้ผู้ป่วยมีอาการไข้สูง ซึ่งอาจเกิดจากสารพิษที่ตัวเชื้อปล่อยออกมา รวมทั้งเกิดจากการที่ร่างกายพยายามสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นในกระแสเลือด แต่เนื่องจากเชื้อนี้มีการกระตุ้นกลไกนี้อย่างแรง ส่งผลให้ร่างกายหลังสารต้านทานออกมามากเกินไป จึงทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อก และเสียชีวิตในที่สุด

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ในระดับโมเลกุลจะช่วยให้เข้าใจกลไกการเกิดโรคและการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการตรวจสอบการรั่วของ cytochrome C จากไมโทคอนเดรีย ซึ่งเชื่อมโยงสัญญาณภายนอกและภายในเซลล์ และเป็นสาเหตุหนึ่งของ การตายของเซลล์แบบ Apoptosis นอกจากนี้ยังทำการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ (Cytotoxicity) เมื่อได้รับเชื้อ โดยวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของ Key enzyme (Lactate dehydrogenase, LDH)

ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* นั้น ไม่มีการรั่วของ cytochrome C แม้จะมีรายงานถึงการเกิด Apoptosis โดยเชื้อชนิดนี้ก็ตาม (Kespichayawattana et al., 2000) จึงเป็นไปได้ว่าการเกิด Apoptosis นั้นอาจเกิดมาจากปัจจัยอื่นที่ไม่ใช่จากการรั่วของ cytochrome C อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ได้รับเชื้อมีการปลดปล่อย LDH ออกมานอกเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้อาจเป็นการตอบสนองเบื้องต้นของเซลล์ที่บาดเจ็บ

¹ อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. อัญญา เล่งเวหาสฤติย์ (scilw@mahidol.ac.th)

Presenters**Miss Anocha Nuchtas, Miss Bo Thisayatikom****Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University****The Study of Cellular Response in *Burkholderia pseudomallei* – Infected Cells****Anocha Nuchtas, Bo Thisayatikom, and Idsada Lengwehasatit**

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*), the causative agent of melioidosis, is a saprophytic gram negative rod bacteria found in environment such as soil, mud, water, and paddy field. This organism can infect humans and animals via inhalation of contaminated dust particles or by wounds resulting in acute septicemia, with high fever symptom. This infection affects various organs throughout the body and leads to death within a few days if host defense mechanism relapses.

However, how host cells interact with *B. pseudomallei* is not fully known. Studying cellular response of infected cells at the molecular level will provide us information to understand the pathogenesis of *B. pseudomallei*. This study focused on the detection of the cytochrome C release from mitochondria, involving in the progression of cell death by apoptosis. Cytotoxicity was also determined by measuring the level of the key enzyme, lactate dehydrogenase, LDH.

The results showed that cytochrome C release was not found in infected cells in this experiment. Although *B. pseudomallei* was reported to cause cell death by apoptosis (Kespichayawattana et al., 2000), it should be noted that apoptosis can be activated by another pathway. However, cytotoxicity was detectable as LDH activity increased in cultured medium of infected cells. This result implies that change in LDH level is an early response of injured cells indicating that cells are damaged.

References:

1. Leelarasamee A, and Bovornkitti S. 2001. Melioidosis-An Infection Hazard to Travelers Visiting Endemic Areas. Intern Med J Thai. 17 (2):85-87.
2. Kespichayawattana, W., Rattanachetkul, S., Wanun T., Utaisincharoen, P., and Sirisinha, S. 2000. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. Infection and Immunity. 68 (9): 5377-5384.

INDEX KEY WORDS: *B. pseudomallei*, cytochrome C, LDH, Melioidosis, Apoptosis

***Burkholderia pseudomallei* stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A549**

P. UTAISINCHAROEN*, N. ANUNTAGOOL†, S. ARJCHAROEN*, I. LENGWEHASATTI‡, K. LIMPOSUWAN*,

P. CHAISURIYA† & S. SIRISINHA* *Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand,

†Laboratory of Immunology, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, and ‡Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

(Accepted for publication 19 July 2004)

SUMMARY

Melioidosis is a life-threatening disease caused by *Burkholderia pseudomallei*. The lung is the most commonly affected organ, resulting in abscess formation in patients with chronic melioidosis. Previous study has shown that *B. pseudomallei* was able to invade and multiply in epithelial cells. In the present study, we have demonstrated that *B. pseudomallei* is able to stimulate interleukin 8 (IL-8) production from the human alveolar lung epithelium cell line A549. However, the level of IL-8 production was significantly lower than when the cells were infected with other Gram-negative bacteria such as *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) which were used for comparison. The degree of I κ B α degradation in the *B. pseudomallei*-infected cells was lower than that of the *S. typhi*-infected cells, suggesting that *B. pseudomallei* is also a poorer cell activator. Inhibition of *B. pseudomallei* invasion by cytochalasin D did not interfere with either IL-8 production or I κ B α degradation, indicating that bacterial uptake is not required for the production of this chemokine. Thus, it appears that the signalling initiated by the interaction of *B. pseudomallei* with the epithelial cell surface is sufficient for epithelial cell activation.

Keywords *Burkholderia pseudomallei* human lung epithelial cell I κ B α IL-8 melioidosis

INTRODUCTION

Melioidosis is an important cause of sepsis in several tropical areas, including South-east Asia and northern Australia [1,2]. In humans, the disease is usually acquired by skin inoculation or inhalation of the dust contaminated with *Burkholderia pseudomallei*. The clinical features vary from an acute fulminate septicæmia to chronic debilitating localized infection [1]. Abscess formation can be found in any organ, with lung as the most commonly affected organ in those with chronic melioidosis [3,4]. The patients often present themselves with cough and fever as a result of primary lung abscess or secondary to septicæmia spread.

B. pseudomallei is a facultative intracellular Gram-negative bacillus which can survive and multiply in both phagocytic and non-phagocytic cells [5]. After internalization, the bacteria can escape from membrane-bound phagosome into the cytoplasm [5,6]. Internalized *B. pseudomallei* can also induce a cell-to-cell fusion, resulting in a multinucleated giant cell (MNGC) formation [6,7]. This unique phenomenon, which has never been observed in any other bacteria, thus facilitates the spreading of bacterium

from one cell to another [7]. The presence of MNGC has also been observed in the tissues of patients with melioidosis [8].

The mechanism by which *B. pseudomallei* is able to escape host defence is not fully understood. However, we have reported previously that the macrophages infected with this bacterium failed to produce inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is a key enzyme in antibacterial activity of the macrophages [9]. Moreover, unlike other Gram-negative bacterium, including the prototype *S. typhi* that has been studied more extensively in the macrophages infected with *B. pseudomallei*, produced significantly less cytokines such as tumour necrosis factor- α (TNF- α) or beta interferon (IFN- β) [9,10]. These features may facilitate the bacteria to survive inside the macrophages. In contrast to the phagocytic cells, very little information is currently available for the cytokine response in the non-phagocytic cells infected with *B. pseudomallei*. In the present study, we investigated the production of interleukin 8 (IL-8) from *B. pseudomallei*-infected human lung epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolation

B. pseudomallei strain 844 used in this study was isolated originally from a patient admitted to Srinagarind Hospital in the

Correspondence: P. Utasincharoen, Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.
E-mail: seput@mahidol.ac.th

meliodosis-endemic Khon Kaen province of Thailand. The bacterium was identified originally as *B. pseudomallei* based on its biochemical characteristics, colonial morphology on selective media, antibiotic sensitivity profiles and reaction with polyclonal antibody [11–13] and was used in our previous reports [9,10]. *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) used for comparative study were maintained at Ramathibodi Hospital (Mahidol University, Bangkok, Thailand) and kept as a stock culture in our laboratory. For use in the experiments, the bacteria were cultured in Trypticase soy broth at 37°C with shaking at 120 r.p.m. The overnight cultures were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and adjusted to a desired concentration by measurement of the optical density at 650 nm and the colony-forming unit (CFU) was calculated from the precalibrated standard curve.

Infection of human lung epithelial cell (A549)

Human lung epithelial cell line (A549) used in the experiments was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). The cells were cultured in Ham's F-12 (HyClone, Logan, UT) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, USA) at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. If not indicated otherwise, these cells (5×10^5) were cultured in a six-well plate overnight before exposure to the bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 for 2 h. To remove extracellular bacteria, the cells were washed three times with 2 ml of PBS before replacing with the medium containing 250 µg/ml kanamycin (GIBCO Laboratories). At the time indicated, the cells were lysed and subjected to immunoblotting while the supernatant was used for IL-8 analysis.

Bacterial uptake (internalization)

A standard antibiotic protection assay was performed to determine the degree of bacterial internalization by human lung epithelial cell line. After the infected cells were incubated in the medium containing 250 µg/ml of kanamycin for 1 h, the cells were washed three times with PBS and intracellular bacteria were liberated by lysing the cells with 0.1% Triton X-100 and plating the released bacteria in tryptic soy agar. The number of intracellular bacteria expressed as colony forming units (CFU), was determined by bacterial colony counting.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from the infected cells according to the manufacturer's instructions (Eppendorf, Hamburg, Germany) before being used for cDNA synthesis by cMaster RT Enzyme (Eppendorf). The PCR reaction was conducted using cDNA as template for IL-8 and actin and amplified by *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The primers for IL-8 were: sense 5'-ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT-3', antisense 5'-TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C-3' and those for actin were: sense 5'-TGG CAT TGT TAC CAA CTG GGA CG-3', antisense 5'-GCT TCT CTT TGA TGT CAC GA CG-3'. The amplified products were electrophoresed on 1.8% agarose gel and stained with ethidium bromide before being visualized under an ultraviolet lamp.

Immunoblotting

At time intervals, the infected cells were lysed in buffer containing 20 mM Tris, 100 mM NaCl and 1% NP40. The lysates containing 30 µg of protein were electrophoresed using 10% polyacrylamide and were then electrotransferred onto nitrocellulose

membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membrane was blocked with 5% milk for 1 h before incubating overnight with polyclonal rabbit antibody to IL-8 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA). Blots were then reacted with horseradish peroxidase-conjugated swine antirabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark). Protein bands were detected with an enhanced chemiluminescence kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The concentrations of IL-8 in the supernatant of infected lung epithelial cells were measured using an ELISA kit (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The sensitivity of the assay system was 50 U/ml.

Statistical analysis

If not indicated otherwise, all experiments carried out in this study were conducted at least three times. The data shown are representative results. Experimental values are expressed as mean $\pm$ standard errors. The statistical significance of differences between two means was evaluated by Student's *t*-test, and a *P*-value ≤ 0.01 was considered significant.

RESULTS

The quantity of IL-8 produced by the cells infected with either *B. pseudomallei* or *S. typhi* correlated with the MOI used (Fig. 1). However, comparing with *S. typhi*, the level of IL-8 induced by *B. pseudomallei* was significantly lower (Fig. 1). Kinetics of the IL-8 production from the cells infected with both bacteria was also similar to one another. Results presented in Fig. 2a show that the level of IL-8 increased gradually before reaching the maximum at 6 h. It should be mentioned that the viability of the cells infected with either bacterium, judged by trypan blue staining, were more than 90% throughout the time-course of the experiments (data not shown).

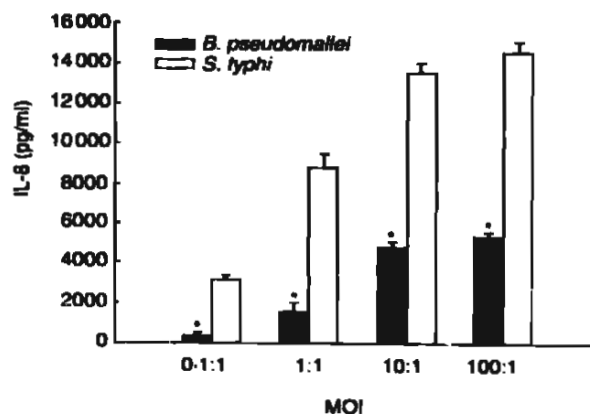
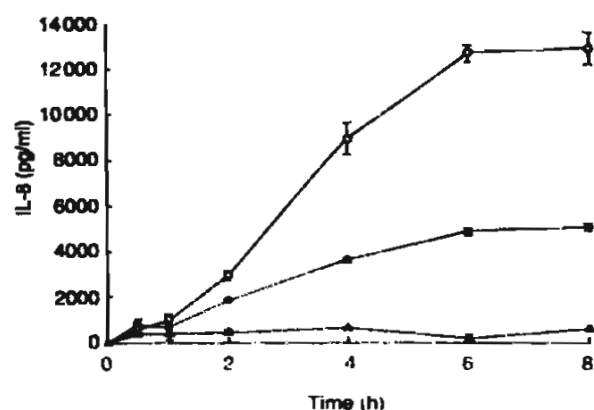
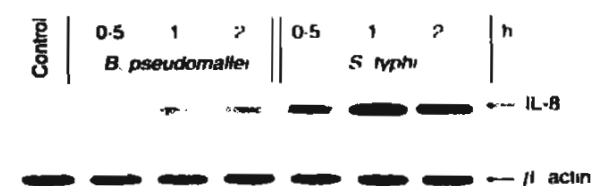


Fig. 1. IL-8 production by infected human alveolar lung epithelial cell line (A549). The cells (5×10^5 cells/well) were infected for 2 h with either *B. pseudomallei* or *S. typhi* at MOI of 0.1:1, 1:1, 10:1 and 100:1. The infected cells were washed with PBS three times before fresh culture medium containing 250 µg/ml of kanamycin was added and cultured for 8 h. The supernatants were collected and used for IL-8 analysis by ELISA. Data represent mean and standard errors of 3 separate experiments, each carried out in duplicate. **P* < 0.01 by Student's *t*-test.

(a) IL-8 secretion



(b) IL-8 mRNA expression



(c) I κ B α degradation

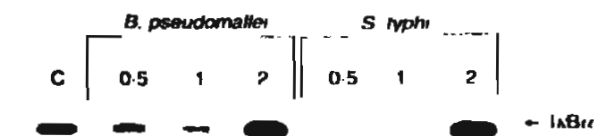


Fig. 2. Kinetics of IL-8 production, IL-8 mRNA expression and I κ B α degradation. The cells (5×10^6 cells/well) were infected with either *B. pseudomallei* (●) or *S. typhi* (○) at an MOI of 10:1. Uninfected cells were used as control (○). At times indicated, the supernatants were collected and analysed for IL-8 by ELISA (a). The cells were then lysed and used for analysis of IL-8 mRNA expression by RT-PCR (b) or for I κ B α degradation by immunoblotting (c). Data represent mean and standard errors of three separate experiments, each carried out in duplicate.

The expression of IL-8 mRNA from the bacterial infected cells could be detected as early as 30 min of infection before reaching a maximum at 1 h (Fig. 2b). In parallel with the ELISA results above, the level of IL-8 mRNA expression in the *S. typhi*-infected cells was considerably higher than in the *B. pseudomallei*-infected cells performed at the same MOI. In accord with these observations, the level of I κ B α degradation was also higher in the *S. typhi*-infected cells, suggesting that *S. typhi* was a stronger cell activator. The results presented in Fig. 2c showed that the I κ B α in *S. typhi*-infected cells was degraded after 30 min and then reappeared after 2 h of infection.

Several other cytokines have been reported to be produced by epithelial cells. Some of these are known to be able to stimulate

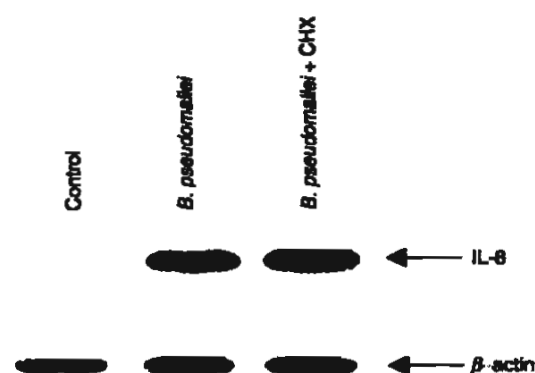


Fig. 3. Effects of cyclohexamide on the expression of IL-8 mRNA in *B. pseudomallei*-infected cells. The cells were pretreated with cyclohexamide (5 μ g/ml) for 2 h before being infected with the bacteria at MOI of 10:1. After 2 h of incubation, the infected cells were washed with PBS and then lysed. The expression of IL-8 mRNA was determined by RT-PCR as described in Materials and methods.

IL-8 production from the epithelial cell [14]. In order to rule out the possibility that the IL-8 detected in *B. pseudomallei*-infected cells might have been stimulated by other cytokines produced by these infected cells, these cells were pretreated with cyclohexamide to inhibit protein synthesis for 2 h before being infected with *B. pseudomallei*. The infected cells were then lysed and analysed for IL-8 mRNA expression. The results in Fig. 3 showed that under this condition, the *B. pseudomallei*-infected cells were still able to up-regulate IL-8 mRNA expression, suggesting that *B. pseudomallei* was able to directly initiate the IL-8 production.

Because *B. pseudomallei* has been reported to be able to invade and survive inside the non-phagocytic cells [7], it should be of interest therefore to determine whether or not invasion would be required to initiate the IL-8 production. In this series of experiments, cytochalasin D was added to the test system to prevent bacterial invasion [15]. Inhibition of bacterial entry by cytochalasin D did not reduce IL-8 production significantly (data not shown). Moreover, as shown in Fig. 4a and b, inhibition of the bacterial invasion interfered with neither expression of IL-8 mRNA nor I κ B α degradation. These results suggested that invasion of *B. pseudomallei* was not necessary for cell activation and IL-8 production. It should be noted that in the presence of cytochalasin D, the number of internalized bacteria was reduced significantly to less than 8% compared with the cells tested in the absence of this inhibitor (data not shown).

DISCUSSION

Burkholderia pseudomallei is a facultative intracellular bacterium which can survive and multiply in both phagocytic and non-phagocytic cells. The mechanism of this bacterium to evade host defence is not understood fully. By comparing with other Gram-negative bacteria such as *S. typhi*, this bacterium appeared to be a rather poor macrophage activator [9,10]. More importantly, this bacterium failed to activate iNOS expression, which is a key enzyme in macrophages defence against bacteria including *B. pseudomallei* [9]. The failure to stimulate iNOS production would allow the bacteria to survive and multiply inside the macrophages,

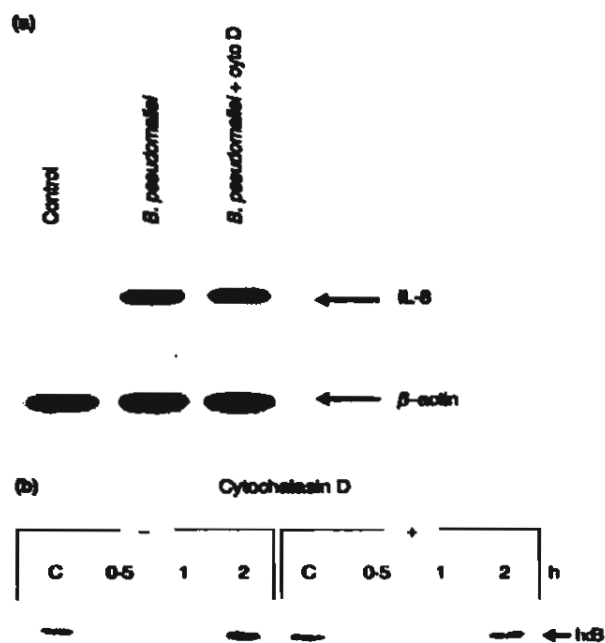


Fig. 4. Effects of cytochalasin D pretreatment on IL-8 mRNA expression (a) and IκBα degradation (b) on the cells infected with *B. pseudomallei*. The cells (5×10^5 cells/well) were pretreated with cytochalasin D (2 µg/ml) for 2 h before being infected with *B. pseudomallei* at an MOI of 10:1. The cells were lysed after 2 h of infection. The expression of IL-8 mRNA was determined by RT-PCR and the degradation of IκBα was detected by immunoblotting.

allowing infection of neighbouring cells by cell-to-cell spreading, as we have reported previously [6,7].

Because lung is the most commonly affected organ found in patients with melioidosis, in the present study we turned our attention to the interaction of this bacterium with human alveolar lung epithelium cells. Epithelial cells have the ability to produce an array of chemokines, including IL-8, which is a potent chemoattractant for polymorphonuclear cells and can direct recruitment of these cells into the infected sites [16]. In this study we have demonstrated that although *B. pseudomallei* could induce the human lung epithelium to produce IL-8 (Fig. 1), the level of cytokine and gene expression exhibited by *B. pseudomallei*-infected cells was significantly lower than those exposed to other Gram-negative bacteria such as *S. typhi* (Figs 1 and 2). One possible mechanism that depresses the cytokine gene expression in the infected cells involves nuclear translocation of transcription factors. NF-κB is an important regulator of IL-8 gene expression [17]. It is well documented that degradation of IκBα regulates NF-κB activation by forming a complex with NF-κB, preventing its translocation to the nucleus [18]. In response to stimuli, IκBα is degraded by proteasome, thereby freeing NFκB which then enters the nucleus. In normal circumstances, the IκBα is rapidly resynthesized [18]. The data presented in Fig. 4, showing that the IκBα from the *B. pseudomallei*-infected cells was degraded to a lesser extent than those infected with *S. typhi*, suggested that *B. pseudomallei* was not able to stimulate NF-κB translocation as

extensively as *S. typhi* (Fig. 2b). This could be one possible mechanism that causes the low IL-8 production in this model.

Several factors have been reported to play critical roles in the activation of epithelial cells. Infection of HeLa cells with invasive *Shigella flexneri* induced NF-κB translocation leading to the up-regulation of IL-8 mRNA [19]. In contrast, non-invasive *S. flexneri* was unable to activate NF-κB and the expression of IL-8 gene was impaired. Similarly, intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* was necessary to elicit IL-8 production by alveolar epithelial cell [20]. However, the inhibition of *B. pseudomallei* invasion by pretreatment of the cells with cytochalasin D did not interfere with IL-8 production and gene expression (Fig. 4). Moreover, the level of IκBα degradation was similar to the cells which were not treated with this inhibitor (Fig. 4b). Altogether these results suggested that the activation of lung epithelial cells by *B. pseudomallei* did not require bacterial entry into the cells. Recently, we demonstrated that *B. pseudomallei* was able to adhere to the surface of human lung epithelial cells [21]. It is therefore logical to conclude from the data presented in the present study that adherence to the cell surface alone by *B. pseudomallei* is sufficient to initiate a signal for IL-8 production. Several components on the surface of Gram-negative bacteria, e.g. lipopolysaccharide (LPS) have the ability to stimulate epithelial cells which lead to NF-κB activation and IL-8 production [22]. One possible mechanism for the IL-8 production in our model is the interaction of LPS of *B. pseudomallei* to the surface of the human lung epithelial cells. Another bacterial product, the flagellin, could also elicit IL-8 production in lung epithelial cells via TLR5 [23]. The role of *B. pseudomallei* flagellin in lung epithelial cell activation remains to be investigated.

Melioidosis presents itself as a febrile illness, ranging from acute septicemia to a chronic localized infection. This disease is characterized by abscess formation in various organs. Airway inflammation, characterized by influx and activation of neutrophils, plays a major role in the pathology of human melioidosis. In this study we demonstrated that *B. pseudomallei* is able to stimulate IL-8 release from lung epithelial cells. The production of this chemokine may contribute to an influx of neutrophils that may lead ultimately to the lung damage observed in the patients with melioidosis. Accumulation of neutrophils may not only cause pathology of lung tissue, but it may also enhance host defence against *B. pseudomallei*. Even though the neutrophils were reported to have little activity against *B. pseudomallei*, increased neutrophil production by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has been shown recently to decrease the mortality rate significantly in patients with melioidosis [24,25]. Production of IL-8 from lung epithelial cells infected with *B. pseudomallei* may be sufficient to induce influx of neutrophils to the sites of infection and provide a sufficient degree of protective inflammatory response against *B. pseudomallei* infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Thailand Research Fund.

REFERENCES

- White N. Melioidosis. *Lancet* 2003; 361:1715–22.
- Dharakul T, Songsivilai S. The many facets of melioidosis. *Trends Microbiol* 1999; 7:138–46.

- 3 Dhiensiri T, Puapairoj S, Susaengrat W. Pulmonary melioidosis: clinical-radiologic correlation in 183 cases in northeastern Thailand. *Radiology* 1988; **166**:711-5.
- 4 Currie BJ, Fisher DA, Howard DM *et al.* Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10 years prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000; **31**:981-6.
- 5 Jone A, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 1996; **64**:782-90.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Wong KT, Puthucheary SD, Vadivelu J. The histopathology of human melioidosis. *Histopathology* 1995; **26**:51-5.
- 9 Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul 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.
- 10 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.
- 11 Anuntagool N, Intachote P, Wuthiekanun N, 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.
- 12 Kawahara K, Dejsirilert S, Danhara H, Ezaki T. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Pseudomonas pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **96**:129-34.
- 13 Wuthiekanun N, Smith MD, Dance DAB, Walsh AL, Pitt TL, White NJ. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 1996; **45**:408-12.
- 14 Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez C, Sarihas E, Kufe DW. Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. *J Clin Invest* 1988; **81**:455-60.
- 15 Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner S, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 2000; **19**:2803-12.
- 16 Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993; **61**:4569-74.
- 17 Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. Cooperative interaction of nuclear factor κ B and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activation the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993; **268**:21128-33.
- 18 Vema I, Stevenson M, Van Schwaz JKEM, Antwap D, Miyamoto S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995; **9**:2723-35.
- 19 Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 2000; **165**:903-14.
- 20 Lin Y, Zhang M, Barnes P. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacteria tuberculosis*. *Infect Immun* 1998; **66**:1121-6.
- 21 Kespichayawattana W, Intachote P, Utaisincharoen P, Sirisinha S. Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to cultured human epithelial cells. *Microb Pathog* 2004; **36**:287-92.
- 22 Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Sirisinha S. Kinetic studies of the production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in macrophages stimulated with *Burkholderia pseudomallei* endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**:324-9.
- 23 Liaudet L, Szabo C, Iremonger OV *et al.* Flagellin from Gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. *Shock* 2003; **19**:131-7.
- 24 Egan AM, Gordon DL. *Burkholderia pseudomallei* activates complement and is ingested but not killed by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1996; **64**:4952-9.
- 25 Cheng AC, Stephens DP, Anstey NM, Currie BJ. Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor for treatment of septic shock due to melioidosis. *Clin Infect Dis* 2004; **38**:32-7.

ผู้เรียบเรียงงานวิจัย

นางสาว พชรพร บุญยศ, นาย กิจวัตร กุลละวณิชย์

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

BT-05

การศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย

Burkholderia pseudomallei

พชรพร บุญยศ, กิจวัตร กุลละวณิชย์, อธิญา เล่งเวหาสภิตย์¹

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดหนึ่ง ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรค Melioidosis ในคนและสัตว์ ซึ่งเป็นโรคติดต่อที่แพร่หลายอยู่ในเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเนื่องจากว่าในปัจจุบันนี้ โรค Melioidosis ยังคงเป็นโรคติดต่อที่ยังไม่มีวิธีในการป้องกันและรักษาโรค ดังนั้น จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาและทำความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการก่อให้เกิดโรคนี เพื่อที่จะได้หาวิธี ในการรักษาและป้องกันโรคได้ต่อไป

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการตอบสนองและกลไกการตายของเซลล์ โดยศึกษาการปลดปล่อย Cytochrome C, การเกิด Protease activation ของ Enzyme caspase - 9 และการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential ของ phagocytic cells ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* มีการปลดปล่อย Cytochrome C จาก Mitochondria ออกสู่ Cytoplasm ของเซลล์ เป็นผลทำให้เกิด caspase-9 activity ซึ่งอาจจะทำให้เซลล์เกิด apoptosis ขึ้นได้ การรั่วของ Cytochrome C นี้ อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ในเซลล์ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้มี Membrane potential ที่ลดลง และการรักษาระดับของ Membrane potential ไม่ให้ลดลงนี้สามารถทำได้โดยการ treat เซลล์ด้วย Interferon - γ ก่อนที่เซลล์จะได้รับเชื้อ การ treat เซลล์หลังจากได้รับเชื้อด้วย Antibiotic ชนิด Chloramphenicol และการทำลายเชื้อแบคทีเรียด้วยความร้อน ซึ่งเหล่านี้อาจจะช่วย ป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายโดยเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ดังนั้นแนวทางในการป้องกันและรักษาโรค Melioidosis นั้น อาจนำเอา Interferon - γ มาทำเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันการเกิดโรค แต่ทั้งนี้ต้องมีการศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม และรายละเอียดเกี่ยวกับการตอบสนองของเซลล์คือ Interferon - γ อย่างถี่ถ้วนต่อไป ส่วน Chloramphenicol นั้น สามารถที่จะนำมาใช้รักษาโรคนี้ได้ ซึ่งในปัจจุบันนี้ก็ได้มีการนำเอายาชนิดนี้มาใช้รักษาผู้ป่วยที่มีอาการที่ไม่รุนแรงแล้ว จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เซลล์มีการตอบสนองต่อเชื้อแบคทีเรียโดยการเปลี่ยนแปลงที่ Mitochondria ซึ่งเป็นผล ทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ตามมา อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังต้องมีการทดลองเพื่อยืนยันว่าเซลล์ เกิดการตายแบบ apoptosis จริง โดยการศึกษา markers ตัวอื่นๆของการเกิด apoptosis

¹อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. อธิญา เล่งเวหาสภิตย์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

Presenters**Ms. Patcharaporn Boonyos, Mr. Kitchawatt Kullavanijaya****Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.****The study of apoptosis in *Burkholderia pseudomallei* – infected cells.****Patcharaporn Boonyos, Kitchawatt kullavanijaya, Idsada Lengwehasatit**

Burkholderia pseudomallei, a gram - negative bacterium, is the causative agent of melioidosis disease which occurs in both human and animals. This infectious disease can be found in tropical countries especially in Southeast Asia. However, the mechanisms of this bacterium infecting cells are not fully clear. Study of cellular responses and cell death in infected cells will provide information for better understanding the pathogenesis of this bacterium and also for rapid diagnosis of the disease.

The purpose of this research is to study the response and cell death mechanisms of infected cells by studying the release of cytochrome C, caspase – 9 activity, and changes in the level of mitochondrial membrane potential in infected phagocytic cells. From this study, we found the release of cytochrome C from mitochondria into cytoplasm of *Burkholderia pseudomallei* - infected cells leading to the activation of caspase – 9. These results imply the initiation of apoptosis as the consequence. In addition, the release of cytochrome C may result from the decrease in the level of mitochondrial membrane potential.

Cells pre-treated with interferon - γ before infection was shown to maintain mitochondrial membrane potential. Similar results were found in infected cells treated with chloramphenicol and cells infected with heat killed-bacteria, thus protecting cells from the damage caused by *Burkholderia pseudomallei*. From our results, we can conclude that cells respond to *Burkholderia pseudomallei* by interfering mitochondrial function leading to apoptosis. However, other markers of apoptosis should be carried out to make sure that infected cells undergo apoptosis.

References :

1. Sprague LD, Neubauer H. (2004) Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 51(7):305-20.
2. <http://bpcseudomallei.mlst.net/musc/info.asp>
3. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/melioidosis_g.html

INDEX KEY WORDS: *Burkholderia pseudomallei*, melioidosis, apoptosis, interferon - γ

Burkholderia pseudomallei invasion and activation of epithelial cells requires activation of p38 mitogen-activated protein kinase

P. Utaisincharn^{a,*}, S. Arjcharoen^a, I. Lengwehasatit^b, K. Limposuwan^a, S. Sirisinha^a

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

^bDepartment of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received 4 November 2004; received in revised form 20 December 2004; accepted 27 December 2004

Abstract

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis. This gram-negative bacterium is able to survive inside the macrophages and also able to invade non-phagocytic cells including epithelial cells. Interaction of pathogenic bacteria to the host cells is frequently associated with activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases signaling activity. In this study, we demonstrated that *B. pseudomallei* stimulated p38 MAP kinase of human alveolar lung epithelial cell line (A549). Phosphorylation of p38 was observed after 15 min, attained a maximal level at 60 min after the infection. A specific inhibitor of p38 phosphorylation, SB 203580, was able to inhibit invasion of this bacterium into the cells suggesting that invasion of *B. pseudomallei* required activation of p38. In contrast, wortmannin which is a specific inhibitor of phosphoinositide 3-kinase (PI3 kinase) failed to inhibit the invasion. Moreover, SB 203580 can also interfere with IκBα degradation and IL-8 mRNA expression, indicating that the phosphorylation of p38 occurred upstream of NF-κB activation. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization needed for internalisation of bacteria, did not have any effect on the phosphorylation of p38. These results indicate that *B. pseudomallei* stimulate phosphorylation of p38 making by initial contact with the cell surface components and do not require internalisation and interaction with intracellular cytoplasmic components of the cells.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*; Melioidosis; p38 MAP kinase; Human lung epithelial cell line; IκBα

1. Introduction

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis, an endemic disease in several tropical countries including southeast Asia and northern Australia [1,2]. In humans, the disease is usually acquired by skin inoculation or by inhalation of the dust contaminated with *B. pseudomallei* [1]. Melioidosis is characterized by formation of abscess in various organs. Lungs are the most commonly affected organ in those with chronic melioidosis [3,4]. The patients often present themselves with cough and fever as a result of primary lung abscess or secondary to septicemia spread.

This gram-negative bacterium could survive and multiply in both phagocytic and non-phagocytic cells. After

internalisation, *B. pseudomallei* can escape membrane bound phagosome into the cytoplasm [5]. Inside the cells, *B. pseudomallei* can also induce cell-to-cell fusion resulting in multinucleated giant cell (MNGC) formation [6,7]. This unique ability may facilitate this bacterium to spread from one cell to another. The MNGC formation was also observed in the tissues of patients with melioidosis [8]. The mechanisms by which *B. pseudomallei* survives and multiplies inside the cells are not fully understood. However, accumulated evidence indicate that this bacterium is able to invade macrophages without activating inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) which is a key enzyme in antimicrobial activity of the macrophage [9]. The failure to stimulate iNOS expression may facilitate this bacterium to survive and multiply inside the macrophages [9,10]. Interaction and activation of non-phagocytic cells by *B. pseudomallei* have been recently reported. This microorganism is not only able to invade human alveolar lung epithelial cell (A549) but it also can activate NF-κB leading

* Corresponding author. Tel.: +662 201 5954; fax: +662 201 5972.

E-mail address: scput@mahidol.ac.th (P. Utaisincharn).

to IL-8 production [11,12]. Interestingly, activation of NF- κ B and IL-8 production did not require invasion of bacteria, indicating that adhesion of *B. pseudomallei* to the surface of the epithelium was sufficient for signaling.

The mitogen-activated protein (MAP) kinases are central to many host cell signaling pathway. These signaling proteins have been reported to be involved in many host responses against invasive bacterial infection. Inhibition of MAP kinase by specific inhibitor results in a significant decrease of cell activation, which led to the reduction of cytokine production from the infected cells [13–15]. Moreover, the role of MAP kinase in bacteria internalisation has also been reported. For example, invasion of *Listeria monocytogenes* into the epithelial cell was inhibited when the cells were pretreated with MAP kinase inhibitor [14]. In contrast, MAP kinase inhibitor did not interfere with invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) [14]. Among the MAP kinase proteins, p38 MAP kinase is known to play an important role in epithelial cell response against a number of invasive bacteria [13–15]. Infection of epithelial cell lines with *S. typhimurium* induces activation of p38 MAP kinases leading to activation of NF- κ B and AP-1 [13–15]. Inhibition of p38 MAP kinase could also prevent cytokine production such as IL-8 from the epithelial cells infected with *S. typhimurium* [13]. In the present study, we demonstrate the involvement of p38 MAP kinase in the epithelial cell response to *B. pseudomallei* infection.

2. Results

2.1. Phosphorylation of p38 in *B. pseudomallei*-infected human alveolar lung epithelial cell line (A549)

In order to determine whether or not phosphorylation of p38 is involved in *B. pseudomallei* infection, the cells were infected with the bacteria at MOI of 10:1. At times indicated, the infected cells were lysed and phosphorylated p38 (pp38) was determined by immunoblotting. The results presented in Fig. 1 showed that *B. pseudomallei* was able to stimulate phosphorylation of p38 within the first 15 min of infection and reached the maximal level at 60 min.

2.2. Cytochalasin D does not inhibit the phosphorylation of p38 induced by *B. pseudomallei*

To investigate whether or not initiation of signal for phosphorylation of p38 requires bacterial internalisation, cytochalasin D (2 μ g/ml) was added to the cells cultured for 1 h before *B. pseudomallei* infection. One hour after the infection, the phosphorylation of p38 from the infected cells was determined by immunoblotting. As shown in Fig. 2, cytochalasin D did not inhibit the phosphorylation of p38 protein. In contrast, SB 203580, a specific inhibitor of p38



Fig. 1. Phosphorylation of p38 in *B. pseudomallei*-infected cells. The human alveolar lung epithelial cell line (5×10^5 cells/well) was infected with *B. pseudomallei* at MOI of 10:1. As time indicated, the cells were lysed and phosphorylation of p38 was determined by immunoblotting.

MAP kinase, used as a positive control, prevented the phosphorylation of p38.

2.3. *B. pseudomallei* invasion into A549 requires phosphorylation of p38

In order to investigate the role of p38 MAP kinase in invasion of *B. pseudomallei* into the cells, the cells were pretreated with various concentrations of SB 203580 1 h before infection. The results showed that this inhibitor at a concentration as low as 2.5 μ M was able to significantly reduce the invasion of *B. pseudomallei* (Fig. 3). The inhibition of *B. pseudomallei* invasion by this inhibitor was a concentration dependent and at 20 μ M, SB 203580 was able to reduce internalisation of this bacterium to less than 30%. SB 203580 at the concentration used in these experiments did not interfere with the growth of *B. pseudomallei* in TSB (data not shown). On the other hand, wortmannin (an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase, PI3-kinase) failed to inhibit invasion of *B. pseudomallei* into the cells (Fig. 3). It should be mentioned that the viability of the infected cells treated with SB 203580 at the concentration used in these experiments were more than 90%, as judged by trypan blue staining (data not shown).

We previously demonstrated that the number of MNGC formation used as a marker for *B. pseudomallei* infection is directly proportional to the number of viable intracellular

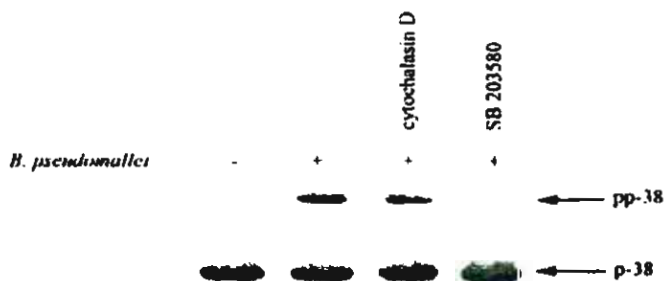


Fig. 2. Effect of cytochalasin D on the phosphorylation of p38 induced by *B. pseudomallei*. The cells (5×10^5 cells/well) were pretreated with 2 μ g/ml of cytochalasin D or 20 μ M of SB 203580 for 1 h before infected with *B. pseudomallei* at MOI of 10:1. After 1 h of infection, the cells were lysed and phosphorylation of p38 was determined by immunoblotting.

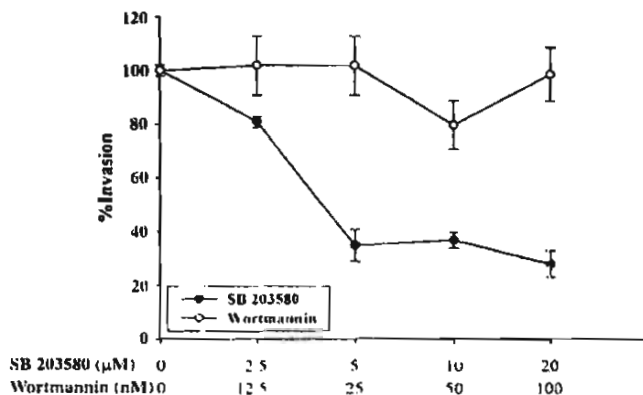


Fig. 3. Inhibition of *B. pseudomallei* invasion by SB 203580 and wortmannin. The cells (5×10^5 cells/well) were pretreated with various concentrations of SB 203580 and wortmannin for 1 h before being infected with *B. pseudomallei* at MOI of 10:1. The invasion of bacteria was determined by standard antibiotic protection assay as described in Section 4. Data represent means and standard errors of three separate experiments, each carried out in duplicate.

bacteria [7,16]. In the presence of SB 203580, this inhibitor significantly reduced the number of MNGC formation as shown in Fig. 4. Similar results were observed when the cells were pretreated with cytochalasin D. In contrast, wortmannin also failed to inhibit MNGC formation. It should be noted that the SB 203580 inhibitor used in this

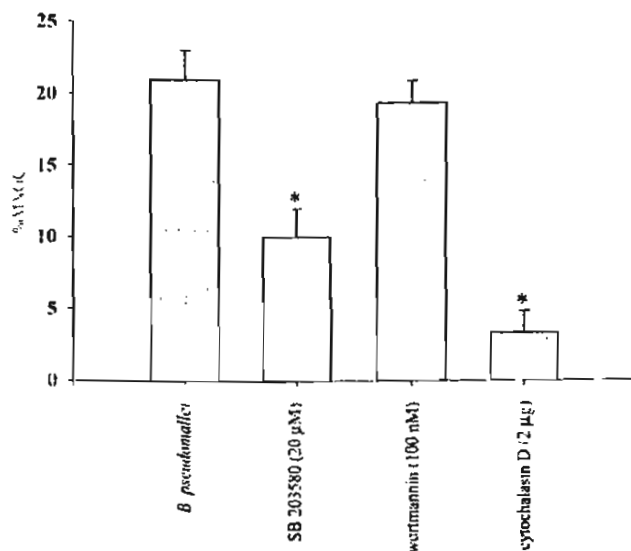


Fig. 4. Effects of the inhibitors in preventing MNGC formation of *B. pseudomallei* infected cells. The cells (5×10^5 cells/well) were cultured in coverslips overnight before pretreated with SB 203580 (20 μM), wortmannin (100 nM) or cytochalasin D (2 μg/ml) for 1 h and were then infected with *B. pseudomallei* at MOI of 10:1. Eight hours after the infection, coverslips were fixed and stained with Giemsa staining and the number of MNGC was determined by microscopic examination (400×). Data represent means and standard errors of three separate experiments, each carried out in duplicate. * $P \leq 0.05$ by student's *t*-test.

experiment did not reduce MNGC formation if added an hour after *B. pseudomallei* infection, indicating that at the concentration used, this inhibitor did not interfere with the process of MNGC formation (data not shown).

2.4. *IκBα* degradation and IL-8 production of A549 infected with *B. pseudomallei* requires phosphorylation of p38

Previously, we demonstrated that *B. pseudomallei* was able to activate *IκBα* degradation indicating the NF-κB activation in A549 [12]. The activation of this nuclear factor also led to the upregulation of IL-8 gene expression [12]. To further investigate the signaling proteins required to activate NF-κB, the cells were pretreated with SB 203580 before infected with *B. pseudomallei*. At time indicated, *IκBα* degradation from the infected cells was determined by immunoblotting. As shown in Fig. 5A, comparing with the cells infected with bacteria alone, *IκBα* degradation was inhibited in the cells pretreated with SB 203580. Similarly, SB 203580 was able to significantly reduce IL-8 mRNA expression as judged by RT-PCR (Fig. 5B).

3. Discussion and conclusions

Pathogenesis of *B. pseudomallei* infection have been extensively studied both in vitro and in vivo. Several potential virulence factors including type III secretion system, flagella and capsular exopolysaccharide have been investigated [17–20]. However, very limited information on how this bacterium modulate the host cells is currently available. Previously, we reported that *B. pseudomallei* was able to survive macrophages killing by modulating the cells by mechanism which was different from other invasive gram-negative bacterium such as *S. enterica* serova Typhi (*S. typhi*). The macrophages infected with *B. pseudomallei* produced very low level of IFN-β which is a key cytokine that regulates iNOS expression, resulting in its ability to survive inside the macrophages [10]. The activation of non-phagocytic cells, e.g. human alveolar lung epithelium (A549), by *B. pseudomallei* has been recently reported [12]. This microorganism was able to activate NF-κB of the infected cells by interacting to the cell surface [12]. The *B. pseudomallei*-infected epithelium also produced IL-8, which is a potent chemoattractant for polymorphonuclear cell [12].

MAP kinase pathways have been demonstrated to play an important role in bacterial internalisation and modulation of cytokine responses. Invasive bacteria modulate the cells by activating different signaling proteins of MAP kinase pathways. For example, invasion of *Porphyromonas gingivalis* activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) of the human gingival epithelial cells while non-invasive *Streptococcus gordonii* did not have significant effect on JNK activation [21]. *S. typhimurium* infection of cultured intestinal epithelial cells resulted in the activation of JNK,

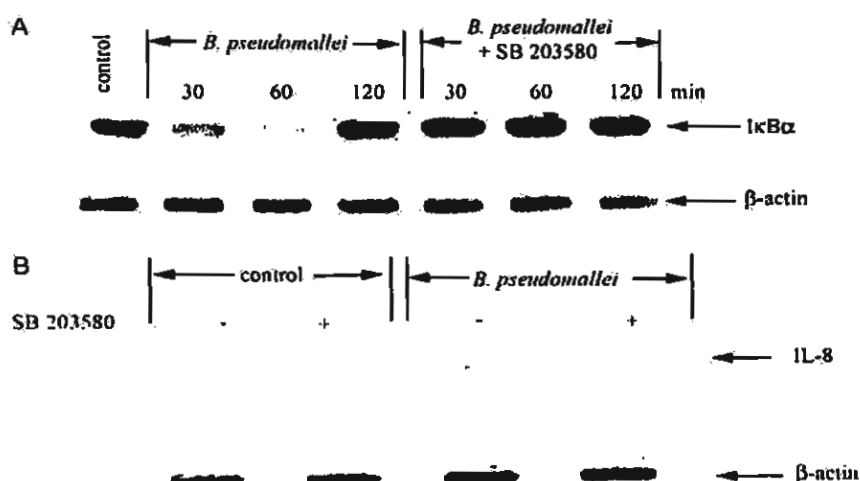


Fig. 5. Effect of SB 203580 on cell activation. The cells (5×10^5 cells/well) were pretreated with SB 203580 (20 μ M) for 1 h before being infected with *B. pseudomallei* at MOI of 10.1. To determine the IκBα degradation, the samples taken at 30 min, 1 and 2 h were lysed and subjected to immunoblotting (A). Expression of IL-8 mRNA was determined by RT-PCR from the cells that were infected with *B. pseudomallei* for 2 h (B).

p38 and extracellular regulated kinase (ERK) [13]. Induction of these signaling pathways by *S. typhimurium* was strictly dependent on the function of the type III protein secretion system [13]. Wild type *Shigella flexneri* but not LPS-defective mutant was able to stimulate ERK of the intestinal epithelium indicating that LPS may play an important role in mediating epithelial signaling [22]. Invasion of *L. monocytogenes* to epithelial cells requires activation of both MEK-1/ERK-2 and PI 3-Kinase [14,23]. PD 98059 or wortmannin could prevent invasion of this bacterium. Previously, we reported that comparing with *B. thailandensis*, *B. pseudomallei* was able to more effectively adhere and invade into human alveolar lung epithelium [11]. In the present study, we showed that this bacterium was able to induce phosphorylation of p38 within 15 min after infection (Fig. 1). The phosphorylation of p38 was still observed when the cells were pretreated with cytochalasin D indicating that activation of p38 MAP kinase was triggered at the time of initial contact with the cell surface (Fig. 2). Inhibition of p38 MAP kinase by SB 203580 prevented invasion of *B. pseudomallei* into the cells (Fig. 3). In contrast, wortmannin, an inhibitor of PI 3 Kinase, which was able to inhibit invasion of *L. monocytogenes*, failed to inhibit invasion of *B. pseudomallei* suggesting that invasion of *B. pseudomallei* does not require activation of PI-3 kinase. Moreover, inhibition of p38 MAP kinase also prevented IκBα degradation which indirectly suggested the NF-κB activation was inhibited by this inhibitor (Fig. 5A). This result also suggests that activation of p38 MAP kinase was associated with NF-κB activation. Inhibition of NF-κB activation by this inhibitor also leads to significant reduction of IL-8 mRNA expression (Fig. 5B). Similar to *B. pseudomallei*, *S. typhimurium* was also able to activate p38 MAP kinase leading to NF-κB activation in the intestinal epithelial cell [13]. Inhibition of p38 MAP kinase by SB 203580 also could block NF-κB activation and

IL-8 production from the cells infected with *S. typhimurium* [13]. However, in contrast to *B. pseudomallei*, inhibition of MAP kinase signaling did not prevent invasion of *S. typhimurium* [14,15]. These results suggested that *B. pseudomallei* modulates invasion into epithelial cell by mechanism which is different from *S. typhimurium*.

Several potential *B. pseudomallei* components including LPS or/and type III proteins secretion system may play a role in activation of p38. Previously we have demonstrated that LPS isolated from *B. pseudomallei* was able to activate phosphorylation of p38 in mouse macrophage [24]. Therefore, LPS may be one of the components contributing in activation of the non-phagocytic cell. Type III secretion system has also been reported to be the essential component in modulating the intracellular behavior of *B. pseudomallei* [17]. This group of bacterial proteins may participate in pathogenesis of *B. pseudomallei* by enhancing its ability to invade the cells [11]. However, the role of *B. pseudomallei* type III secretion system in activating p38 remains to be investigated.

4. Materials and methods

4.1. Bacterial isolation

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. The bacterium was originally identified as *B. pseudomallei* based on its biochemical characteristics, colonial morphology on selective media, antibiotic sensitivity profiles and reaction with polyclonal antibody [25–27] which was used in our previous reports [9,10,12]. For use in the experiments, the bacteria were cultured in Trypticase soy broth at 37 °C with rotation at 120 rpm. The overnight

cultures were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and adjusted to a desired concentration by measurement of the optical density at 650 nm and the colony-forming unit (CFU) was estimated from the precalibrated standard curve.

4.2. Inhibitors

SB 203580, wortmannin, and cytochalasin D were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, MO). These inhibitors were reconstituted in dimethyl sulfoxide and stored in -20°C until used.

4.3. Infection of human lung epithelial cells (A549)

Human lung epithelial cell line (A549) used in the experiments was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). The cells were cultured in Ham's F-12 (HyClone, Logan, UT) supplemented with 10% fetal bovine serum, FBS (Gibco Labs, Grand Island, NY) at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. If not indicated otherwise, these cells (5×10^5) were cultured overnight in a six-well plate before exposure to the bacteria at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1 for 2 h. To remove extracellular bacteria, the cells were washed three times with 2 ml of PBS before replacing with the medium containing 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin (Gibco Labs). At the time indicated, the cells were lysed and subjected to immunoblotting.

4.4. Invasion assay

A standard antibiotic protection assay was performed to determine the degree of bacterial internalisation by human lung epithelial cell line [16]. After the infected cells were incubated in the medium containing 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of kanamycin for 1 h, the cells were washed three times with PBS and intracellular bacteria were liberated by lysing the cells with 0.1% Triton X-100 and plating the released bacteria in tryptic soy agar. The number of intracellular bacteria expressed as colony forming unit (CFU) was determined by bacterial colony counting.

4.5. Quantification of multinucleated giant cell (MNGC) formation from the cells infected with *B. pseudomallei*

In order to quantitate the degree of MNGC, the A549 (5×10^5) were first cultured overnight on a coverslip. The cells were infected with *B. pseudomallei* as described. 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 [7]. For enumeration of MNGC formation, at least 1000 nuclei per coverslip were counted and the percentage of multinucleated cells was calculated. The MNGC was

defined as the cell possessing more than one nuclei within the same cell boundary [16].

4.6. Immunoblotting

At time intervals, the infected cells were lysed in buffer containing 20 mM Tris, 100 mM NaCl and 1% NP40. The lysates containing 30 μg of protein were electrophoresed using 10% polyacrylamide and were then electrotransferred to nitrocellulose membrane (Schleicher&Schuell, Dassel, Germany). The membrane was blocked with 5% skim milk for 1 h before incubating overnight with rabbit polyclonal antibody to IkB α or monoclonal mouse antibody to pp38 or p38 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). Blots were then reacted with horseradish peroxidase-conjugated swine anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark). Protein bands were detected with enhanced chemiluminescence kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany).

4.7. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

After the cells were infected with *B. pseudomallei* for 2 h, the cells were washed three times with PBS. Total RNA was extracted from the infected cells according to the manufacturer's instruction (Eppendorf, Hamburg, Germany) and used for cDNA synthesis by cMaster RT Enzyme (Eppendorf). The PCR reaction was performed using primers specific for IL-8 as previously described [12]. The amplified products were electrophoresed on 1.8% agarose gel and stained with ethidium bromide before being visualized under an ultraviolet lamp.

4.8. Statistical analysis

If not indicated otherwise, all experiments carried out in this study were conducted at least three times. The data shown are representative results. Experimental values are expressed as means $\pm$ standard errors. The 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.

References

- [1] White N. Melioidosis. *Lancet* 2003;361:1715–22.
- [2] Dharakul T, Songsivilai S. The many facets of melioidosis. *Trends Microbiol* 1999;7:138–46.

- [3] Dhiensiri T, Puapairoj S, Susaengrat W. Pulmonary melioidosis: clinical-radiologic correlation in 183 cases in northeastern Thailand. *Radiology* 1988;166:711–5.
- [4] Currie BJ, Fisher DA, Howurd DM, Burrow JN, Lo D, Selva-Nayagam S, et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10 years prospective study and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2000;31:981–6.
- [5] Jone A, Beveridge TJ, Woods DE. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 1996;64:782–90.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Wong KT, Puthucherry SD, Vadivelu J. The histopathology of human melioidosis. *Histopathology* 1995;26:51–5.
- [9] Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul 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.
- [10] 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.
- [11] Kespichayawattana W, Intachote P, Utaisincharoen P, Sirisinha S. Virulent *Burkholderia pseudomallei* is more efficient than avirulent *Burkholderia thailandensis* in invasion of and adherence to culture human epithelial cells. *Microb Pathog* 2004;36:287–92.
- [12] Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Chaisuriya P, et al. *Burkholderia pseudomallei* stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A 549. *Clin Exp Immunol* 2004;138:61–5.
- [13] Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997;159:5550–9.
- [14] Tang P, Sutherland CL, Gold MR, Finlay BB. *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infect Immun* 1998;66:1106–12.
- [15] Mynott TL, Crosset B, Prathalingam SR. Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infect Immun* 2002;70:86–95.
- [16] 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.
- [17] Stevens MP, Wood MW, Taylor LA, Monaghan P, Hawes P, Jones PW, et al. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behavior of the pathogen. *Mol Microbiol* 2002;46:649–59.
- [18] Stevens MP, Friebe A, Taylor LA, Wood MW, Brown PJ, Hardt WD, et al. A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *J Bacteriol* 2003;185:4992–6.
- [19] Chua KL, Chan YY, Gun YR. Flagella are virulent determinants of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 2003;71:1622–9.
- [20] Reckseidler SL, DeShazer D, Sokol PA, Woods DE. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. *Infect Immun* 2001;69:34–44.
- [21] Watanabe K, Yilmaz O, Nakhjiri SF, Belton CM, Lamont R. Association of mitogen-activated protein kinase pathways with gingival epithelial cell response to *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun* 2001;69:6731–7.
- [22] Kohler H, Rodrigues SP, McCormic BA. *Shigella flexneri* interactions with the basolateral membrane domain of polarized model intestinal epithelium: role of lipopolysaccharide in cell invasion and in activation of the mitogen-activated protein kinase ERK. *Infect Immun* 2002;70:1150–8.
- [23] Ireton K, Payraastre B, Chap H, Ogawa W, Sakaue H, Kasuga M, et al. A role of phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 1996;274:780–2.
- [24] Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Sirisinha S. Kinetic studies of the production of nitric oxide and tumor necrosis factor- α in macrophages stimulated with *Burkholderia pseudomallei* endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000;122:324–9.
- [25] Anuntagool N, Intachote P, Wuthiekanun N, 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.
- [26] Kawahara K, Dejsirilert S, Danbara H, Ezaki T. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Pseudomonas pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;96:129–34.
- [27] Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DAB, Walsh AL, Pitt TL, White NJ. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 1996;45:408–12.

Study of mitochondrial function of cells infected with *Burkholderia pseudomallei*

Ildsada Lengwehasatit^{a*} and Pongsak Utaisincharon^b

^aDepartment of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Ratchathewee, Bangkok 10400

^bDepartment of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Ratchathewee, Bangkok 10400

Abstract—*Burkholderia pseudomallei* is gram-negative bacterium causing melioidosis. The bacteria are usually found in contaminated soil and water and are transmitted to humans and animals through direct contact with the contaminated sources. This infection affects various organs throughout the body leading to death if host defense mechanism relapses. However, in which cellular mechanism responding to this bacterium conducting to pathogenesis is not fully known. In this study, phagocytic mouse macrophage, RAW264.7 cell line was infected with either *B. pseudomallei* (pathogenic strain) or *B. thailandensis* (non-pathogenic strain). After internalization, both bacteria could survive and multiply inside cells. Morphological changes of the infected cells including cell-cell fusion and the formation of multinucleated giant cells were observed. Cytotoxicity and alteration of the cells infected with these two bacteria were detected. Although, cells infected with *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* showed the decrease in the level of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and intracellular lactate dehydrogenase (LDH), the level determined in *B. pseudomallei*-infected cells was significantly less than those in *B. thailandensis*-infected cells. This result suggests that *B. pseudomallei* (pathogenic material) can cause cell damage by interfering mitochondria while the non-pathogenic strain can not damage cells in the similar fashion.

Keywords *Burkholderia pseudomallei*, macrophage, cytotoxicity, mitochondria

Output -

* Corresponding author. Tel. +66-2-201-5918; fax: +66-2-201-5926; e-mail: scilw@mahidol.ac.th.