Abstract

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ที่แยกได้จากคนไข้เมลิออยโดสิส มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า การเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีของเชื้อมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเชื้อในคน ดังนั้นโปรตีนที่แสดงออกต่างกันในโคโลนีแต่ละแบบอาจจะเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะต่างๆ ในการศึกษาเบื้องต้น ผู้วิจัยได้กระตุ้นเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 153 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีแบบที่หนึ่ง ให้เปลี่ยนเป็นโคโลนีแบบที่สอง และ แบบที่สาม ในภาวะอดอาหาร จากนั้นเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในเชื้อทั้งสามแบบ โดยวิธี 2D gel electrophoresis คณะผู้วิจัยพบว่าการสร้างโปรตีนหลายชนิดของโคโลนีแต่ละแบบมีความแตกต่างกัน โดยเชื้อโคโลนีแบบที่สองและสาม มี flagellin, arginine deiminase (AD) และ carbamate kinase (CK) เพิ่มขึ้นมากกว่าแบบที่หนึ่งมาก โปรตีน AD และ CK สร้างโดยยีน *arcA* และ *arcC* ตามลำดับ เป็นโปรตีนในกลุ่มของเอนไซม์ arginine deiminase system (ADS) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน arginine เป็น ornithine แอมโมเนีย คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน (ATP) คณะผู้วิจัยได้สันนิษฐานว่า ADS มีส่วนช่วยในการปรับตัวและเพื่อการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การศึกษานี้เราพบว่าเชื้อ parental สายพันธ์ 153 ที่มีโคโลนีแบบที่หนึ่งจะสร้าง AD และ CK เมื่อถูกกระตุ้นโดยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี arginine หรือในสภาวะเครียดอื่น เช่น การอยู่ในสภาวะอดอาหารในน้ำกลั่น หรือในภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ เราจึงสร้าง *arcA* mutant และ *arcC* mutant โดยวิธีการเอายีนออกโดยวิธี pEXKm5-based allele replacement จากนั้นเปรียบเทียบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อ wild type กับ mutants ในสภาวะต่างๆ ผู้วิจัยพบว่า *B. pseudomallei* ADS system มีการเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเชื้อในสภาวะกรด แต่ยีนทั้งสองไม่ได้มีบทบาทสำคัญในการอยู่รอดหรือเพิ่มจำนวนในเซลล์ mouse macrophages J774A.1 ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นข้อมูลใหม่ที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในขณะที่เชื้อมีการเปลี่ยนรูปร่างลักษณะโคโลนี และยังสนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะโคโลนีนี้เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อสามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมได้

Abstract

Colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* is a reversible phenomenon that is a notable feature of a proportion of primary clinical cultures from patients with melioidosis. We hypothesized that this process was important to survival *in vivo,* and undertook this study to define proteins that were differentially expressed in colony morphology variants, and to provide proof of concept that one or more of these proteins are involved in survival under adverse conditions. In our preliminary study, we generated isogenic colony morphology types II and III from *B. pseudomallei* strain 153, type I, and compared their protein expression using 2D gel electrophoresis. Numerous proteins were differentially expressed, the most prominent of which were flagellin, arginine deiminase (AD) and carbamate kinase (CK) which were over-expressed in isogenic types II and III compared with parental type I. AD and CK (encoded by *arcA* and *arcC*) are components of the arginine deiminase system (ADS), which catalyzes arginine to ornithine, ammonia, and CO_2 with the generation of ATP. We hypothesized that the ADS system facilitated adaptation and survival in challenging environments. In this study, reverse transcriptase analysis of parental type I strain 153 demonstrated that both AD and CK were highly induced when *B. pseudomallei* was cultured in medium with arginine, maintained in distilled water or exposed to a low oxygen concentration, we constructed *arcA* or *arcC* defective mutants by using a novel pEXKm5-based allele replacement strategy. Comparison of wild type and *arcA* or *arcC* defective mutants in a range of adverse laboratory conditions demonstrated that the *B. pseudomallei* ADS system was associated with survival in acid, although that genes did not appear to play a major role in intracellular survival or replication within the mouse macrophage cell line

J774A.1. These data provide novel insights into the proteomic alterations during the process of morphotype switching, and provide support for the idea that this may be associated with a fitness advantage *in vivo*.

Keywords: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, arginine deiminase system, proteomic analysis, colony variation