



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของเอนไซม์ทรีฮาเลสต่อการเจริญเติบโตในสภาวะ  
เครียดและการก่อโรคของเชื้อบอโคเดเรียสโตมาลีอาย

โดย ดร.มุกิตา วนาภรณ์

เดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของเอนไซม์ทรีฮาเลสต่อการเจริญเติบโตในสภาวะ  
เครียดและการก่อโรคของเชื้อบอโคเดเรียสโตมาลีอาย

ผู้วิจัย ดร.มุกิตา วนาภรณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก Prof. Richard Titball นักวิจัยที่ปรึกษาที่สละเวลาอันมีค่าเป็นที่ปรึกษาของโครงการมาโดยตลอด และ Dr. Aaron Butt ผู้ร่วมทำการวิจัย จาก University of Exeter, UK ที่ได้ช่วยเหลือในส่วนของการทำวิจัยที่ประเทศอังกฤษ

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและมหาวิทยาลัยมหิดลที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ทำให้โครงการนี้สำเร็จได้ด้วยดี

มูทิตา วนาภรณ์

## สารบัญ

|                                                                                                 | หน้า  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| บทคัดย่อ                                                                                        | 1     |
| Abstract                                                                                        | 2     |
| Executive summary                                                                               | 3-4   |
| เนื้อหางานวิจัย                                                                                 |       |
| - บทนำ                                                                                          | 5-8   |
| - วัตถุประสงค์ของโครงการ                                                                        | 8     |
| - งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)                                                     | 8-17  |
| - รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ                                                            |       |
| ● การสร้างและการตรวจสอบ <i>B. pseudomallei</i> trehalose mutant                                 | 17-20 |
| ● การสร้างและการตรวจสอบ <i>B. pseudomallei</i> trehalose complement                             | 21-23 |
| ● การทำ whole genome sequencing ของ <i>B. pseudomallei</i> K96243 และ <i>tre</i> mutant         | 24-26 |
| ● การศึกษาการเจริญเติบโตของ <i>B. pseudomallei</i> ภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ                       | 26-32 |
| ● การศึกษาการเข้าสู่เซลล์และการเจริญภายในเซลล์ของเชื้อ <i>B. pseudomallei</i> <i>tre</i> mutant | 33-35 |
| - สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง                                                                      | 36-37 |
| Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน                                                              | 38    |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                   | 39-48 |
| ภาคผนวก (การเผยแพร่และนำไปใช้ประโยชน์)                                                          | 49    |

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480076

ชื่อโครงการ: บทบาทของเอนไซม์ทรีฮาเลสต่อการเจริญเติบโตในสภาวะเครียดและการก่อโรคของเชื้อบอโคเดเรียสตูโดมาลีอาย

ชื่อนักวิจัย: ดร.มูทิตา วนาภรณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล: muthita.van@mahidol.ac.th

ระยะเวลาดำเนินโครงการ: 2 ปี

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสของเชื้อบอโคเดเรียสตูโดมาลีอายต่อการเจริญเติบโตในสภาวะเครียดและการก่อโรคโดยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ที่ปราศจากยีนทรีฮาเลสและนำมาทดสอบการเจริญเติบโตในสภาวะเครียดต่างๆและการก่อโรค สภาวะต่างๆที่นำมาทดสอบได้แก่ สภาวะที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสเป็นแหล่งพลังงาน ความร้อน ความเย็น สารอนุมูลอิสระ การสร้างbiofilm ความเป็นกรด ยาปฏิชีวนะ ส่วนการก่อโรคนั้นได้ศึกษาการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนในแมคโครฟาจของหนู (mouse macrophage cell line J774.1) งานวิจัยนี้พบว่าการขาดยีนทรีฮาเลสส่งผลทำให้เชื้อไม่สามารถโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรีฮาโลสเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว และความสามารถในการตอบสนองต่อสารอนุมูลอิสระลดลง อีกทั้งการสร้างbiofilm ก็ลดลงเช่นกัน สำหรับการก่อโรคพบว่าเชื้อที่ปราศจากยีนทรีฮาเลสมีความสามารถในการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับเชื้อปกติ สรุปได้ว่า ยีนทรีฮาเลสของเชื้อบอโคเดเรียสตูโดมาลีอายมีความสำคัญต่อการใช้น้ำตาลทรีฮาโลสเป็นแหล่งพลังงาน และการเจริญภายใต้สภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระ รวมทั้งการสร้างbiofilm ซึ่งให้ส่งผลต่อการก่อโรคที่ลดลงเมื่อขาดยีนนี้ไปในการเจริญเติบโตในแมคโครฟาจ ของหนู โดยงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่รายงานความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการก่อโรคในแบคทีเรีย สำหรับข้อเสนอแนะในอนาคตคิดว่าการศึกษาproteomic เพื่อดูว่าโปรตีนอะไรที่เกี่ยวข้องกับยีนทรีฮาเลส ที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการก่อโรคน่าจะเป็นประโยชน์มากในการศึกษาเรื่องอื่นๆต่อไป

คำหลัก: เอนไซม์ทรีฮาเลส, บอโคเดเรียสตูโดมาลีอาย, การก่อโรค

## Abstract

Project code: MRG5480076

**Project title:** The role of trehalase in stress response and virulence of *Burkholderia pseudomallei*

**Investigator:** Dr.Muthita Vanaporn

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine  
Mahidol University

**E-mail:** Muthita.van@mahidol.ac.th

**Project period:** 2 years

The aim of this research is to study the role of trehalase in stress responses and virulence of *B. pseudomallei* by constructed the *tre* deletion mutant and looking at its phenotypes compare with the parental strain. First, look at the growth under minimal culture condition with trehalase supplement and found that the *tre* mutant can not use trehalose as a carbon source and can not grow at all. Second, look at stresses such as cold, hot, low pH, oxidative agents, biofilm formation, and antibiotic. The *tre* mutant has lower ability to grow under oxidative stress and lower ability to form biofilm compare to those of wild-type. For virulence, the ability to survive and multiply inside mouse macrophage cell line (J774.1) was lower compared to wild-type. It can be concluded that trehalase gene in *B. pseudomallei* is play roles in oxidative stress response and biofilm formation which affect the impair survival and multiplication inside macrophage. This is the first report of the role of bacterial trehalase in virulence. For future study, the proteomic profiling may reveal the link between trehalase and other proteins that related to virulence of the bacteria.

**Keywords:** Trehalase, *Burkholderia pseudomallei*, virulence

## Executive Summary

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบมากในภาคอีสานของประเทศไทย ก่อให้เกิดโรค melioidosis ซึ่งมีผู้ป่วยต่อปีเป็นจำนวนมาก ทั้งยังต้องอาศัยต้านจุลชีพหลายตัวส่งผลต่อการรักษาที่ต้องใช้ยา

หลายชนิดเป็นระยะเวลานาน และโอกาสที่จะกลับเป็นซ้ำเกิดขึ้นได้บ่อย ปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคนี้ได้ จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างกว้างขวางในแง่มุมต่างๆ ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจเอนไซม์ที่ชื่อว่าทรีฮาเลสเนื่องจากมีการศึกษาในเชื้อก่อโรคเช่นเชื้อราและยีสว่าเอนไซม์นี้มีผลต่อเจริญเติบโตและการก่อโรค แต่ในแบคทีเรียยังไม่มีการศึกษาที่แพร่หลายนัก ทราบแต่เพียงว่าพบเอนไซม์นี้ในแบคทีเรียและมีความสำคัญเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* โดยในงานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการหาว่า เชื้อ *B. pseudomallei* มียีนทรีฮาเลสหรือไม่และมีกี่ยีน (ในแบคทีเรียบางชนิดมีมากกว่าหนึ่งยีน) พบว่ามียีนทรีฮาเลสหนึ่งยีน อยู่บนโครโมโซมที่สองของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ตำแหน่ง BPSS0671 ขนาด 1,695 เบส (โปรตีนขนาด 565 กรดอะมิโน) จึงได้ออกแบบพลาสมิดเพื่อจะทำการกำจัดยีนนี้ออกไปสร้างเป็นmutantหรือเชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่มียีนทรีฮาเลส เมื่อเชื้อกลายพันธุ์แล้วจะนำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่นการเจริญเติบโตในสภาวะต่างๆ การอยู่รอดของเชื้อ การก่อโรคของเชื้อ รวมไปถึงดู transcriptome profiling เพื่อดูว่ายีนใดบ้างที่เกี่ยวข้องกับทรีฮาเลสโดยการทำให้ whole genome sequencing ที่ University of Exeter ประเทศอังกฤษ แต่เกิดปัญหาในขั้นตอนการขนส่ง RNA ที่สกัดไปจากประเทศไทยไปประเทศอังกฤษ พบว่าความเข้มข้นและคุณภาพไม่ดีเพียงพอที่จะนำไปทำการทดลองต่อ จึงแก้ปัญหาโดยการส่งตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ไปประเทศอังกฤษแทน โดยใช้ระยะเวลาทำเอกสารนานพอสมควร หลังจากเชื้อถึงประเทศอังกฤษแล้ว ได้นะ DNA ไปทำ whole genome sequencing ก่อน แต่พบว่าเชื้อที่ส่งไป เป็นเชื้อ *E. coli* ไม่ใช่ *B. pseudomallei* จากนั้นได้ทำการทดสอบเชื้อที่ประเทศไทยอีกครั้งโดยวิธี agglutination และ Mass Spectrophotometry และพบว่า เป็นเชื้อ *E. coli* จริง จึงต้องสร้าง mutant ขึ้นมาใหม่และให้ทางอังกฤษ ส่งmutant ที่ผู้วิจัยเคยทำไว้มาประเทศไทยด้วย (แต่ต้องใช้เวลานานในการขออนุญาตจากอังกฤษ) หากได้จากทางใดก่อนจะได้ทำการทดลองต่อได้เลย เมื่อได้mutant ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็น *B. pseudomallei* ได้ทำการสร้าง complement คือใส่ยีนทรีฮาเลสกลับเข้าไป เพื่อใช้เป็นการยืนยันว่าผลที่แตกต่างจากการทดลองในเชื้อปกติเทียบกับmutant มาจากการขาดยีนทรีฮาเลส โดยเริ่มจากออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนทรีฮาเลสด้วยวิธีPCR นำไปทดสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธีsequencing เมื่อได้ยีนที่ลำดับเบสถูกต้องแล้ว นำไปใส่ใน expression vector เพื่อทำการ conjugation ใส่พลาสมิดเข้าสู่ mutant เมื่อได้ครบทั้ง mutantและ complement แล้ว จึงได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่างๆ เพื่อดูการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อขาดยีนทรีฮาเลส พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีแต่น้ำตาลทรีฮาโลสได้ แสดงว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการนำน้ำตาลทรีฮาโลสไปใช้นั่นเอง และยังพบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการสร้างbiofilmของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อขาดยีนนี้ เชื้อจะสร้างbiofilm ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการตอบสนองต่อ oxidative stress นั้น ยีนทรีฮาเลส มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อ tBOOH เมื่อขาดยีนนี้จะทำให้เชื้อมีความไวต่อ tBOOH มากขึ้น เมื่อดูความสามารถใน

การเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อในแมคโครฟาจพบว่า ยีนทรีฮาเลส มีความสำคัญเมื่อขาดยีนนี้ จำนวนของเชื้อที่อยู่ในแมคโครฟาจจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

กล่าวโดยสรุปคืองานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสในเชื้อ *B. pseudomallei* ในด้านการเจริญเติบโตในสภาวะเครียดต่างๆ และการก่อโรค พบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อต้องอยู่ในสภาวะที่มีแต่น้ำตาลทรีฮาโลสจะไม่สามารถเจริญได้เลยถ้าขาดยีนนี้ และยังจำเป็นต่อการตอบสนองต่อoxidative agent เช่น tBOOH และการสร้างbiofilmของเชื้อซึ่งเกี่ยวข้องกับการทนสภาวะต่างๆในสิ่งแวดล้อมและมีส่วนในการก่อโรคด้วย ส่วนด้านการก่อโรคนั้นพบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนในแมคโครฟาจ เมื่อขาดยีนนี้จะมีการเพิ่มจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่ายีนทรีฮาเลสของ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการก่อโรคของเชื้อ*B. pseudomallei* ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีการรายงานความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรีย



## บทนำ

*Burkholderia pseudomallei* is a gram-negative intracellular bacterium and causes a fatal disease called melioidosis, which has an overall mortality around 50% in the northeast of Thailand and 20% in Australia (1). *B. pseudomallei* is a saprophyte found in soil and water of the endemic area. People who contact directly with contaminated environment such as a farmer have high risk of *B. pseudomallei* infection. The symptom of melioidosis is varying from mild to severe, and the most common presentation is pneumonia. The manifestation of melioidosis is also varying from a few days to many decades (2). Several studies have revealed that *B. pseudomallei* has the ability to survive and multiply inside host cells (epithelial cells and macrophage) (3). A major characteristic of *B. pseudomallei* in the context of human disease is its ability to survive in the environment. Particularly, it has an ability to survive for years in hostile environments such as those lacking nutrients and over a wide range of temperature, and dehydration conditions (4-6). Unfortunately, there is no vaccine available for the prevention of melioidosis, and *B. pseudomallei* is considered as a potential bioterrorism agent.

The pathogenesis of *B. pseudomallei* has been study for many years. Several *B. pseudomallei* pathogenicity determinants have been identified including both cell-associated products e.g. lipopolysaccharide (LPS), capsule polysaccharide and secreted products e.g. proteases (7), phospholipase C (8), hemolysin, and lipase(9). Three type III secretion systems (TTSSs) have been identified in the sequenced genome of *B. pseudomallei* and a third TTSS cluster (TTSS3) homologous to the SPI-1 animal pathogenicity island of *S. Typhimurium* (10). A recent report has suggested a role for the TTSS3 cluster for the survival, persistence, and escape of bacteria within a murine macrophage-like or non-phagocytic cell line.

Trehalose is a nonreducing disaccharide which composed of glucose two molecules linked together in  $\alpha$  1, 1-glycosidic linkage. It can be found trough out the

biological world. Trehalose was discovered in lower orders of the plant kingdom for many years (11). Trehalose is quite common disaccharide in spores, fruiting bodies, and vegetative cells of yeast and fungi (12, 13) with 7-10 % of dry weight. The rapidly lost of trehalose when these spores germinated suggested the role of this sugar as a source of carbon and energy. Many Trehalose is also present in many higher plants since it has been isolated from *Arabidopsis thaliana* (14). It is also found in a number of different bacteria, including *Streptomyces hygroscopicus* and other species of *Streptomyces* (15), various mycobacteria, including *Mycobacterium smegmatis* and tuberculosis (16) and corynebacteria (17). Trehalose plays many roles in the living organisms such as energy and carbon reserve, protein and membrane stabilizer, protect from heat shock, cold and free radical, and part of bacterial cell wall. Trehalose is synthesized by many pathways. The most common and the well studied pathway involves the enzyme Trehalose-6-phosphate synthase (TPS, OstA in *E. coli*), which catalyses the transfer of UDP-glucose to glucose-6-phosphate, leading to trehalose-6-phosphate (T6P) follow by enzyme trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP, OstB in *E. coli*) that hydrolyze the phosphate group from the intermediate disaccharide to generate trehalose (18). The second pathway involved enzyme trehalose synthase (TS) catalyses an intramolecular arrange of maltose, in order to convert the glycosidic bond  $\alpha$ -(1-4) of this disaccharide to the  $\alpha$ -(1-1) trehalose bond (19). The third is TreY-TreZ pathway which can breakdown maltooligosaccharides in starch to trehalose which reported in *Sulfolobus* genus (20). Another pathway is trehalose phosphorylase (TreP). TreP catalyzes a reversible reaction *in vitro*, which hydrolyzes trehalose and transfers a glucose molecule to the inorganic phosphate, to form glucose-1-phosphate and release free glucose in mushroom *Agaricus bisporus* (21). The last pathway is trehalose glycosyltransferring synthase (TreT) which form trehalose from ADP-glucose and glucose. This reversible reaction has been detected in various organisms, such as *Thermococcus litoralis* and *Sulfolobus solfataricus* KM1 (22).

Another important enzyme in trehalose metabolism is trehalase (Tre), which may be involved in energy metabolism and also have a regulatory role in controlling the levels of trehalose in cells. This enzyme may be important in lowering trehalose concentrations once the stress is alleviated. Trehalase ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose-1-C-glucosylhydrolase, EC 3.2.1.28) has been

reported in many other organisms within the plant and animal kingdoms (11). It can hydrolyse trehalose to glucose. Interestingly, in contrast to other enzymes of trehalose metabolism, trehalase is also found in mammals both in the kidney brush border membranes (23) and in the intestinal villae membranes (24). Trehalose hydrolysis is an essential process in various organisms, such as in fungal spore germination, insect flight, and the resumption of growth in resting cells (12). *S. cerevisiae* showed two different trehalases which separated and partially characterized: the cytoplasmic enzyme had a pH optimum of about 7 and was called the neutral trehalase, whereas the vacuolar protein exhibited maximal activity at a pH of 4.5 and was referred to as the acid trehalase (25). Various bacteria, such as *E. coli*, have trehalases that may function as part of an uptake system such as to supply glucose to the phosphotransferase system (PTS) (26). They also have trehalase activity that may be involved in the function of trehalose as an osmoregulator. *E. coli* trehalase A is a periplasmic trehalase that hydrolyse external trehalose and trehalase F is Cytoplasmic trehalase which induced by osmolarity and RpoS-dependent (26, 27). At high osmolarity, trehalose hydrolysis is carried out by TreA and the released glucose is for the phosphotransferase system. Remarkably, high osmolarity also triggers synthesis of trehalose in *E. coli* through expression of the genes *otsA* and *otsB*. At low osmolarity, an alternative pathway for trehalose degradation operates as trehalose 6-phosphate will be transported into the cytoplasm, where it is further split by a cytoplasmic hydrolase (TreC), yielding glucose and glucose 6-phosphate (28).

### วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. To identify and construct deletion mutants of *trehalase (tre)* in *B. pseudomallei*
2. To investigate the role of *trehalase* in *B. pseudomallei* growth and infection.

## งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

### *Burkholderia pseudomallei*

*Burkholderia pseudomallei* is visualized as a gram-negative bacillus with bipolar staining and is vacuolated and slender (29). *B. pseudomallei* oxidase test is positive and can be distinguished from the closely related but less pathogenic *Burkholderia thailandensis* by its ability to assimilate arabinose (30, 31). On culture, the organism demonstrates differing colonial morphology, with mostly smooth colonies initially and dry or wrinkled colonies on further incubation. Mature colonies of *B. pseudomallei* on solid agar media often take on a wrinkled appearance after several days of incubation in solid media (32). Some strains do not show this wrinkling effect, which is more pronounced in solid agar formulations containing glycerol (32). *B. pseudomallei* have one or more terminal flagella and are motile, particularly in the early stages of their growth cycle. Some strains of *B. pseudomallei* produce smooth colony growth on first culture, and occasional strains are overtly mucoid, with an appearance similar to that of *Pseudomonas aeruginosa* capsular polysaccharide overproducers. Recent study revealed seven unique *B. pseudomallei* colony morphotypes on Ashdown's agar. *B. pseudomallei* is listed by the Centers for Disease Control as a potential bioterrorism agent ([www.bt.cdc.gov/agent/agentlist.asp](http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist.asp)) because it causes melioidosis in humans, a potentially fatal septicemic infection following soil or water exposure (33). This bacterium can cause disease in horses, sheep, goats, pigs, lambs, and other animals as well as humans (34).

### Epidemiology

Melioidosis has a major endemic area in Southeast Asia and northern Australia, corresponding approximately to the tropical latitudes between 20°N and 20°S (35). The highest prevalence of melioidosis is observed in rice farmers, servicemen, miners, adventure travelers, and indigenous peoples in the main endemicity zone of northern Australia and Southeast Asia (36). However, many evidences showed the distribution of melioidosis around the world. There are only two evidences for local acquisition of melioidosis outside

the laboratory in North America, Oklahoma and Georgia, following a motor vehicle accident (37, 38). Moreover, it has been reported in Puerto Rico (39), and considered to be under diagnosed in other areas of the Caribbean and South America (40, 41). Recently, melioidosis has been found in Brazil, where a case cluster in Northern Brazil was associated with the onset of unusually heavy rainfall (42). In Thailand, *B. pseudomallei* is widely distributed in soil and, more particularly, in pooled surface water such as in rice paddies (43, 44). However, the rate of the closely related but less virulent *B. thailandensis*, which had previously been recognized as *B. pseudomallei*, may account for the variation in disease throughout the country (45).

### Melioidosis

The pathologist Alfred Whitmore and his assistant first described melioidosis as a “glanders-like” disease (46). This disease, now termed melioidosis, was named from the Greek “melis” (distemper of asses) and “eidos” (resemblance) by Stanton and Fletcher in 1932. It is most common in Southeast Asia and Northern Australia. Melioidosis is responsible for 20% of all community-acquired septicemias and 40% of sepsis related mortality in northeast Thailand (47).

Three modes of transmission, inhalation, ingestion, and inoculation, are reported for *B. pseudomallei*. Inhalation was initially thought to be the primary mode of transmission, based on studies of U.S. soldiers in Vietnam (48). The finding that periods of heavy rainfall are associated not only with higher numbers of cases but also pneumonic presentations and cases of increased severity may suggest a shift to inhalation during extreme weather events (49). Interestingly, it is now believed that inoculation is the major mode of acquisition. Minor wounds to the feet of rice farmers are common during the planting and harvesting seasons, inoculation at the time of a snake bite has also been described (50). Lastly, ingestion has been suggested as a mode of infection (48). However, the contribution of this route of infection is undefined; although contamination of potable water has been implicated as the point source in two outbreaks (51, 52).

Clinical manifestations of melioidosis are varied from localized infection to fulminant septic melioidosis (53, 54). The most common presentation of melioidosis is pneumonia

which involved in approximately half of all cases (33). Skin and soft tissue infections are a common manifestation of melioidosis and may be the source of systemic infection, while bone and joint infections are uncommon and may be difficult to differentiate from other causes of infection (55). Encephalomyelitis, characterized by brain stem encephalitis and flaccid paralysis, is seen in 4% of melioidosis presentations in northern Australia and is associated with considerable morbidity and mortality (56). Small numbers of children with a similar syndrome have been recognized in Thailand (57). Variation in the clinical presentation and severity of melioidosis may be due to one or more of three factors: variation in bacterial strains (including the presence or absence of virulence factors), variation in the host immune response, and variation in acquisition (33).

Relapse after apparently successful treatment is well described and is associated with mortality similar to that for the initial episode. It occurs in 13 to 23% of cases and a median of 6 to 8 months (but up to many years) later (58, 59). In the majority of cases, relapse is due to reactivation of the original infecting strain (demonstrated by restriction fragment length polymorphism or pulsed-field gel electrophoresis). Infection with a different strain was demonstrated in between 4 and 7% of cases in Thailand and Australia (58, 60) and in one of five recurrent cases in Malaysia (61).

### ***B. pseudomallei* virulence factors**

*B. pseudomallei* can survive in a variety of hostile conditions and also well adapted to its many hosts (1). It is resistant to complement lysosomal defensins and cationic peptidases and can survive within many eukaryotic cell lines, including professional phagocytes such as neutrophils and macrophages (1). *B. pseudomallei* produces a glycocalyx polysaccharide capsule that is probably an important virulence determinant (62). This capsule (biofilm or slime) allows for the formation of microcolonies in a protective environment in which the organism is phenotypically altered, resulting in significant antibiotic resistance (63).

*B. pseudomallei* produce many secreted antigens including proteases (64), phospholipase C (8, 65), and hemolysin, lecithinase, and lipase (9) are probably secreted *via* the general secretory pathway (type II secretion system) (66). These antigens play role in

facilitate bacterial infection. Interestingly, *B. pseudomallei* contains three type III secretion system (TTSS) gene clusters, which contain between 16 and 18 reported genes (67-69). One of these clusters (the TTSS3 cluster) shares homology with the *inv/spa/prg* TTSS of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and the *ipa/mxi/spa* TTSS cluster of *Shigella flexneri* (10, 69, 70). The study of BopE, a TTSS protein homologous to *Salmonella enterica* SopE/SopE2, showed that BopE facilitates *B. pseudomallei* invasion (71). In addition, the *B. pseudomallei* *bsa* locus encodes homologues of the *Salmonella* Sip translocator proteins (BipB, BipC and BipD) (70). *B. pseudomallei* BipD mutants are attenuated following intraperitoneal or intranasal challenge of BALB/c mice, and have impaired bacterial replication in liver and spleen (72). *B. pseudomallei* BipB has been shown to mediate the formation of multinucleated giant cells, cell-to-cell spreading of bacteria and apoptosis of infected host cells, and also associated with attenuation following intranasal challenge of BALB/c mice (73).

A number of cell-associated antigens have been demonstrated to be immunogenic in patients with melioidosis, including capsular polysaccharide (CPS), lipopolysaccharide (LPS) (formerly O-PS II) (74), and flagellin proteins (75, 76). The important role of LPS is supported by studies examining laboratory induced mutations in the gene coding for LPS. *B. pseudomallei* LPS mutant demonstrates a susceptibility to alternative complement pathway and an attenuation in virulence in a mouse diabetes model (67, 77). CPS appears to have a role in environmental protection (78), immune system evasion, and attachment to epithelial cells (79). In addition, passive immunization against an exopolysaccharide provided protection against high-dose challenge in a mouse model (80). Antigenic differences in CPS or other surface proteins may account for the lack of epithelial attachment and pathogenicity of *B. thailandensis* (81). A number of genes for different CPSs, termed CPS I to IV, have recently been described. CPS I is found only in *B. pseudomallei* and is a virulence determinant; CPS II is down regulated *in vivo* and is thought to be involved in environmental survival. *B. pseudomallei* is flagellated and motile. The study of an *B. pseudomallei* isogenic mutant defective in flagella expression showed no difference in the ability and to invade, and replicate in human lung cells *in vitro* compare with wild-type (82). However, bacterial numbers of an aflagellate mutant were markedly reduced in the

lung and spleen of BALB/c mice following intranasal infection compared with the wild-type, and the mutant was less virulent based on the LD50 (82).

## Trehalose

Trehalose is a nonreducing disaccharide which composed of glucose two molecules linked together in  $\alpha$  1, 1-glycosidic linkage. Although there are three possible anomers of trehalose, that is,  $\alpha$ ,  $\beta$ -1, 1-,  $\beta$ ,  $\beta$  -1, 1-, and  $\alpha$ ,  $\alpha$  1, 1-, only the  $\alpha$ ,  $\alpha$  -trehalose has been isolated from and biosynthesized in living organisms. This naturally occurring disaccharide can be found trough out the biological world. Trehalose was discovered in lower orders of the plant kingdom for many years, with the first tentative report being in 1832, and followed by the review of Elbein in 1974 (11). Trehalose is quite common disaccharide in spores, fruiting bodies, and vegetative cells of yeast and fungi (12, 13). For example, the spores and macrocysts of *Dictyostelium mucoroides* have been reported to contain as much as 7% trehalose on a dry-weight basis (83) and the ascospores of *Neurospora tetrasperma* have as much as 10% trehalose (84). The rapidly lost of trehalose when these spores germinated suggested the role of this sugar as a source of carbon and energy. Many Trehalose is also present in many higher plants since it has been isolated from *Arabidopsis thaliana* (14).

Trehalose is also found in a number of different bacteria, including *Streptomyces hygroscopicus* and other species of Streptomyces (15), various mycobacteria, including *Mycobacterium smegmatis* and tuberculosis (16) and corynebacteria (17). In mycobacteria and corynebacteria, this disaccharide plays a structural role as a cell wall component, but it may also serve other functions in these organisms. It is also present in *Escherichia coli* (85) and a number of other bacteria, such as *Rhizobium* sp. (86), thermophilic archaeobacterium, *Sulfolobus acidocaldarius* (20), and so on.

## Trehalose biosynthesis

There are five pathways for trehalose biosynthesis present in the prokaryotes and eukaryotes (87). The most common and the well studied pathway involves the enzyme Trehalose-6-phosphate synthase (TPS, OstA in *E. coli*), which catalyses the transfer of UDP-



glucose to glucose-6-phosphate, leading to trehalose-6-phosphate (T6P). In the second step trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP, OstB in *E. coli*) catalyzes the hydrolysis of the phosphate group from the intermediate disaccharide to generate trehalose (18). This TPS-TPP route is found in a variety of organisms; for example *Escherichia coli* (85) and *Saccharomyces cerevisiae* (88), plants such as *Arabidopsis thaliana* (89). The second pathway involved enzyme trehalose synthase (TS) catalyses an intramolecular arrange of maltose, in order to convert the glycosidic bond  $\alpha$ -(1-4) of this disaccharide to the  $\alpha$ -(1-1) trehalose bond (19). This enzyme is found in several organisms such as *Pimelobacter* sp, *Pseudomonas syringae* and *Thermus caldophilus*. The third is TreY-TreZ pathway which cans breackdown maltooligosacharides in starch to trehalose. This pathway was studied in *Sulfolobus* genus (20). Another pathway is trehalose phosphorylase (TreP). TreP catalyzes a reversible reaction *in vitro*, which hydrolyzes trehalose and transfers a glucose molecule to the inorganic phosphate, to form glucose-1-phosphate and release free glucose in mushroom *Agaricus bisporus* (21). The last pathway is trehalose glycosyltransferring synthase (TreT) which form trehalose from ADP-glucose and glucose. This reversible reaction has been detected in various organisms, such as *Thermococcus litoralis* and *Sulfolobus solfataricus* KM1 (22).

### The roles of trehalose

Trehalose plays role as an energy and carbon reserve of organisms. As mention earlier, trehalose level was reduced when fungal spore is germinated. In insects, trehalose is a major sugar in the hemolymph and thorax muscles and is consumed during flight (90). Another important role of trehalase is stabilizing and protecting protein and membrane. In yeast, the log-phase cultures have low concentrations of trehalose and are quite sensitive to dehydration, but when they enter the stationary phase the levels of trehalose increase, along with their ability to survive dehydration (91). This ability to survive in the presence of trehalose is independent of the growth phase of the cells because log-phase cells subjected to heat shock rapidly synthesize trehalose and also acquire the ability to survive dehydration (92). The study of two different temperature sensitive reporter proteins showed that enzymes are better able to retain activity during heat shock in cells that are producing trehalose (93). These studies showed an additional and important role of trehalose, that is,

the ability to suppress aggregation of proteins that have already been denatured. On the otherhand, if the trehalose concentration remains high, it interferes with the refolding process, and the protein is not renatured by the chaperone (93). Another role for trehalose is in protecting cells against oxygen radicals. Exposure of *S. cerevisiae* to a mild heat shock or to a proteosome inhibitor induced trehalose accumulation and also markedly increased the viability of cells on exposure to a free radical generating system ( $H_2O_2$ /iron). However, a mutant cell line defective in trehalose synthesis was much more sensitive to oxygen killing than was the wild type, but adding trehalose to the medium enhanced the resistance of these cells to  $H_2O_2$  (94). Trehalose is not only protecting cell from heat shock, but also from cold. *E. coli* mutant that was unable to produce trehalose died much faster than did the wild type at 4°C. However, transformation of this mutant with *otsA/otsB* genes restored the ability to synthesize trehalose and also cell viability in the cold (95). Trehalose is function as a structure component of the bacterial cell wall. In mycobacteria and corynebacteria, trehalose is the basic component of a number of cell wall glycolipids (96). The most studied of these trehalose lipids is cord factor, a cell wall lipid of *M. tuberculosis* that contains the unusual fatty acid mycolic acid esterified to the 6-hydroxyl group of each glucose to give trehalose-dimycolate. It is one of the major toxic components of the cell wall and responsible for the low permeability of the mycobacterial cell wall, which confers considerable drug resistance to these organisms (97).

### Trehalase

Trehalase ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose-1-C-glucohydrolase, EC 3.2.1.28) has been reported in many other organisms within the plant and animal kingdoms (11). It can hydrolyse trehalose to glucose. Interestingly, in contrast to other enzymes of trehalose metabolism, trehalase is also found in mammals both in the kidney brush border membranes (23) and in the intestinal villae membranes (24). Its role in the kidney is still not clear, but in the intestine its function is undoubtedly to hydrolyze ingested trehalose because individuals with a defect in their intestinal trehalase have diarrhea when they eat foods with a high trehalose content, such as mushrooms (98). Trehalose hydrolysis does appear to be essential process in the life functions of various organisms, such as in fungal spore germination, insect flight, and the resumption of growth in resting cells (12). The studies in *S. cerevisiae* showed 2

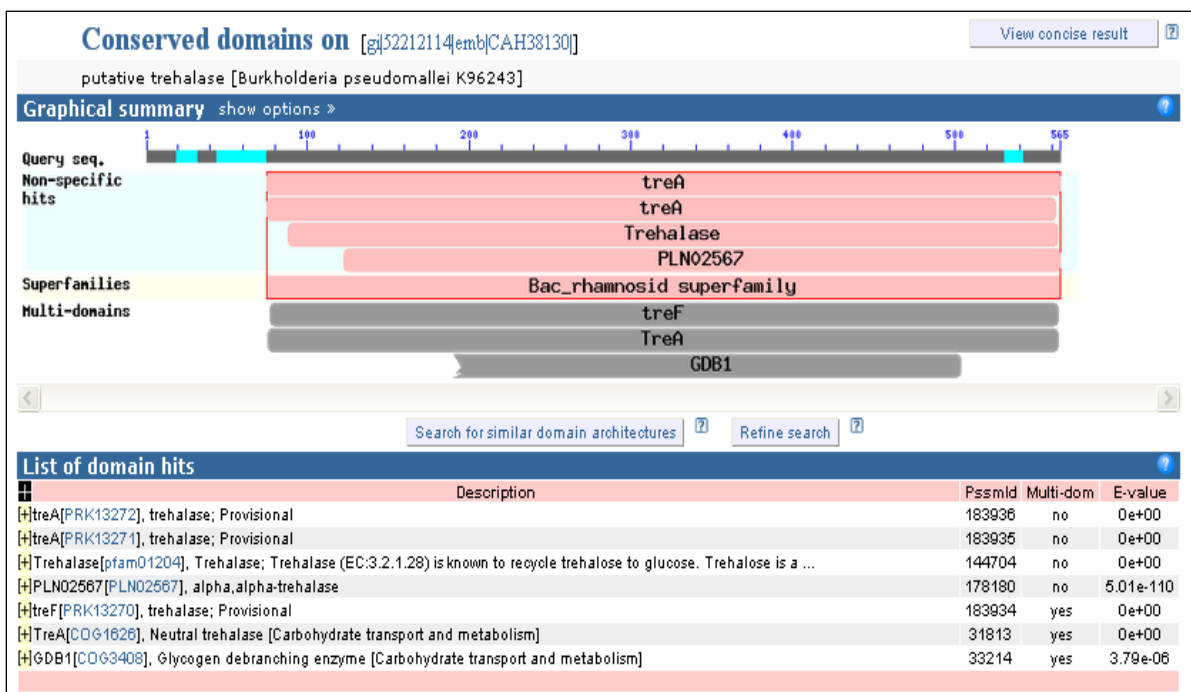
trehalases; inducible trehalase and constitutively express in vacuole. (99, 100). The two different trehalases were separated and partially characterized: the cytoplasmic enzyme had a pH optimum of about 7 and was called the neutral trehalase, whereas the vacuolar protein exhibited maximal activity at a pH of 4.5 and was referred to as the acid trehalase (25). Various bacteria, such as *E. coli*, have trehalases that may function as part of an uptake system such as to supply glucose to the phosphotransferase system (PTS) (26). They also have trehalase activity that may be involved in the function of trehalose as an osmoregulator. *E. coli* has trehalose A (TreA) and trehalose F (TreF). Trehalase A is a periplasmic trehalase that hydrolyse external trehalose and trehalase F is Cytoplasmic trehalase which induced by osmolarity and RpoS-dependent (26, 27). At high osmolarity, trehalose hydrolysis is carried out by TreA and the released glucose is for the phosphotransferase system. Remarkably, high osmolarity also triggers synthesis of trehalose in *E. coli* through expression of the genes *otsA* and *otsB*. At low osmolarity, an alternative pathway for trehalose degradation operates as trehalose 6-phosphate will be transported into the cytoplasm, where it is further split by a cytoplasmic hydrolase (TreC), yielding glucose and glucose 6-phosphate (28). The accumulation of trehalose in *E. coli* in response to high osmotic strength clearly fits well with its role as compatible solute in other bacteria.

## รายละเอียดผลการดำเนินงานของโครงการ

### 1. การสร้างและการตรวจสอบ *B. pseudomallei* trehalose mutant

#### 1.1 การระบุยีน *trehalase* (*tre*) ในเชื้อบอโคเดเรีย สูดมาลีอาย

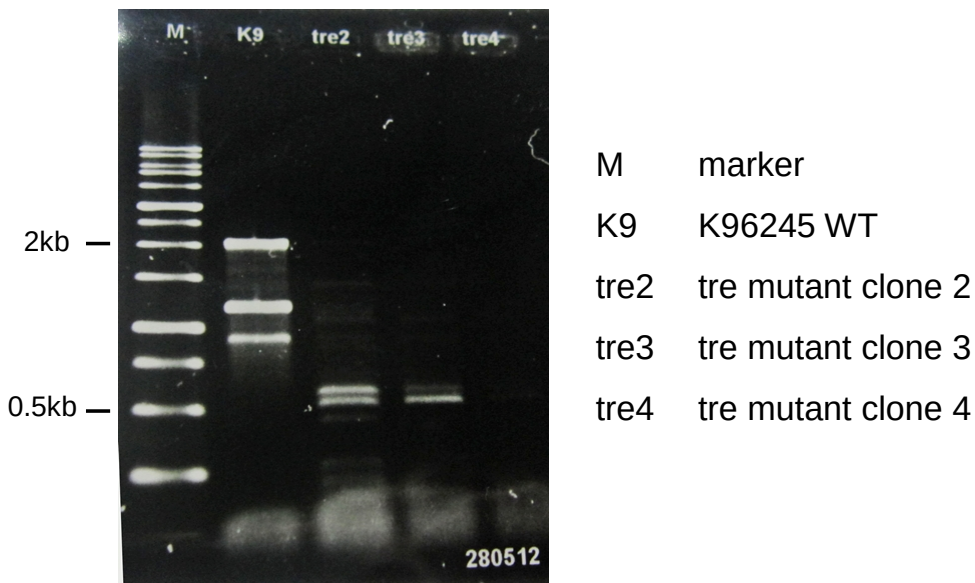
จากการค้นหาในฐานข้อมูลของ NCBI พบยีนที่มีความเหมือนกับ *trehalase* ในเชื้ออื่นๆ พบว่ายีนที่มี Bac\_rhamnosid superfamily (แสดงในรูปที่ 1) ซึ่งเป็นกลุ่มจำเพาะของยีน *trehalase* อยู่บนโครโมโซมที่สองของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ตำแหน่ง BPSS0671 ขนาด 1,695 เบส โปรตีนขนาด 565 aa GENBANK ID CAH38130.1 จึงใช้ยีนนี้ในการวิจัยตามวัตถุประสงค์อื่นๆต่อไป



รูปที่ 1 แสดง conserve domain ของยีน BPSS0671 ในเชื้อ *B. pseudomallei*

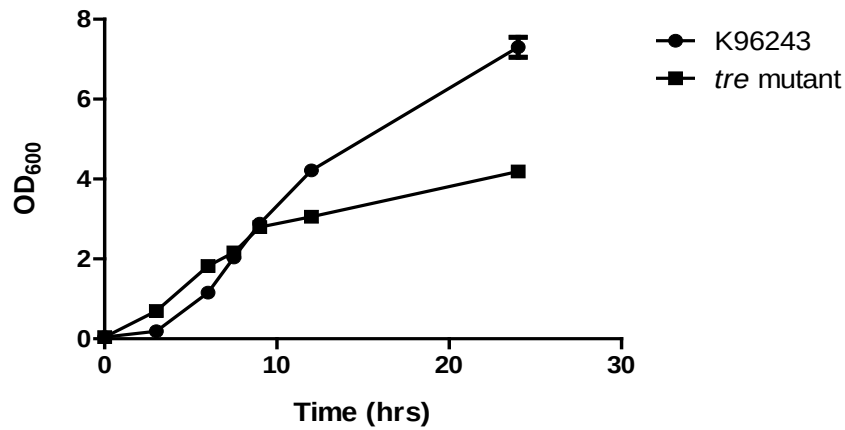
#### 1.2 การสร้างเชื้อกลายพันธุ์ ที่ไม่มียีน *trehalase* (*tre*)

ในการกำจัดยีน *trehalase* ออกจากโครโมโซมของเชื้อ *B. pseudomallei* ปกติ strain K96243 จะใช้ plasmid pMo ที่มีส่วนก่อนหน้าและหลัง (upstream and downstream) ของยีนเป้าหมาย ซึ่งจะเข้าไปแทนที่ในโครโมโซมตรงตำแหน่งที่สนใจคือ ยีน *trehalase* สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีพลาสมิดเข้าไปด้วยวิธี antibiotic selection (Kanamycin 700 ug/ml) จากนั้นจะใช้วิธี sucrose selection โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ที่มี Sucrose 10% เชื้อที่กำจัดพลาสมิดรวมทั้งยีน *trehalase* เดิมออกไปได้ จะสามารถโตได้ เนื่องจากบนพลาสมิดมียีนที่เป็นพิษต่อแบคทีเรียในสภาวะที่มี sucrose (*sac* gene) เมื่อได้เชื้อจากวิธี sucrose selection จะนำเชื้อมาสกัด DNA และยืนยันการหายไปของยีน *trehalase* ด้วยวิธี PCR และนำไปทำ gel electrophoresis เพื่อดูผล ดังแสดงในรูปที่ 2 เมื่อเพิ่มจำนวน DNA โดนใช้ primers ตำแหน่งก่อนและหลังยีน *trehalase* ผลที่แสดงคือตัวเชื้อปกติ จะได้แบนที่ขนาด 2,100 เบส ส่วนเชื้อกลายพันธุ์จะได้แบนที่ขนาด 500 เบส ยืนยันการหายไปของยีนขนาดประมาณ 1,600 เบส



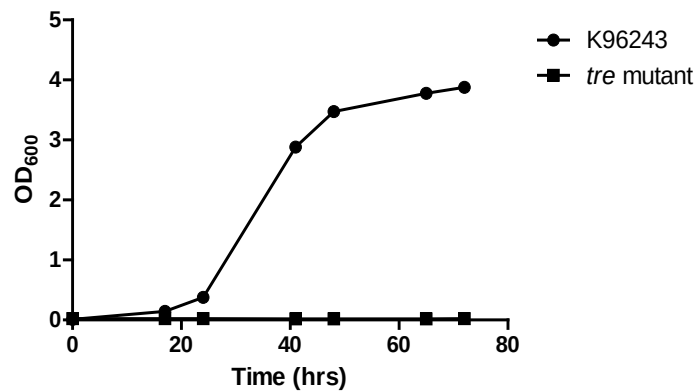
รูปที่ 2 การยืนยันเชื้อกลายพันธุ์ (*tre* deletion mutant) ใน เชื้อ *B. pseudomallei* strain K96243 โดยวิธี PCR

เมื่อได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่มียีน *trehalase* แล้ว ต้องศึกษาการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกับเชื้อปกติ ในสภาวะทั่วไปใช้ LB broth ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1 พบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อกลายพันธุ์ลดลงครึ่งหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สมบูรณ์



รูปที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* strain K96243 และ เชื้อกลายพันธุ์ (*tre* mutant) ใน LB broth

เมื่อเลี้ยงในสภาวะสารอาหารจำกัดคือ minimal M9 broth ดังแสดงในแผนภูมิที่ 2 เชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย กล่าวได้ว่ายีน *trehalase* มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยเฉพาะสภาวะที่มีสารอาหารอย่างจำกัด



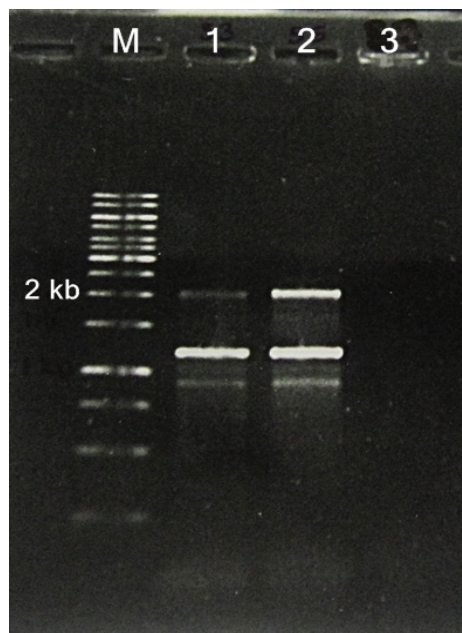
รูปที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* strain K96243 และ เชื้อกลายพันธุ์ (*tre* mutant) ใน M9 broth

## 2. การสร้างและการตรวจสอบ *B. pseudomallei* trehalose complement

## 2.1 การสร้าง complement strain ที่มียีน *trehalase* นี้ใส่กลับเข้าไปใหม่

ขั้นตอนแรกเริ่มจากการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนยีน *trehalase* อย่างจำเพาะโดยรวมไปถึง 300 เบสด้านหน้าที่ใช้เป็น ribosome binding site ด้วย ไพรมเมอร์ที่ใช้คือ Tre fw (5' CTG CGG CTG GCC ATC GAT C 3') และ Tre rw (5' AAC GCT TAT TCC CGG CCT C 3') เมื่อทำ PCR แล้วจะให้ชิ้น DNA ขนาด ประมาณ 2,100 เบส

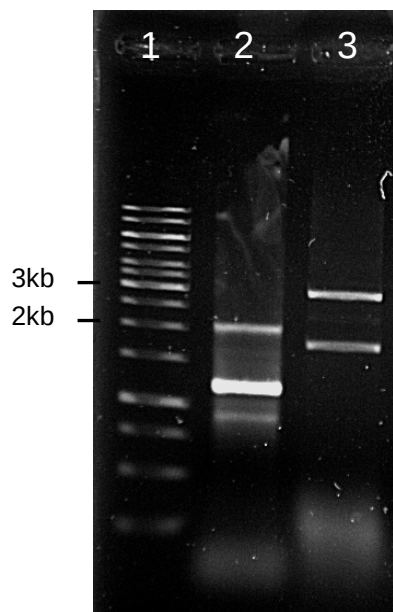
ขั้นที่สองสกัด Genomic DNA จากเชื้อ *B. pseudomallei* strain K96243 โดยใช้ชุดสกัด DNA (Qiagen) เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำ PCR เมื่อมี DNA และ primers แล้ว ได้ลองทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR ต่างๆ ตั้งแต่ 53, 55 และ 57°C และนำไปทำ gel electrophoresis เพื่อดูผล (ดังแสดงในรูปที่ 3) พบว่า เลนที่ 2 ที่ใช้อุณหภูมิ 55°C ให้ขนาดของชิ้น DNA ตามต้องการและมีปริมาณมากที่สุด



|   |                   |
|---|-------------------|
| M | marker            |
| 1 | annealing at 53°C |
| 2 | annealing at 55°C |
| 3 | annealing at 57°C |

รูปที่ 3 การหาอุณหภูมิ (annealing) ที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีน *trehalase* จาก เชื้อ *B. pseudomallei* strain K96243 โดยวิธี PCR

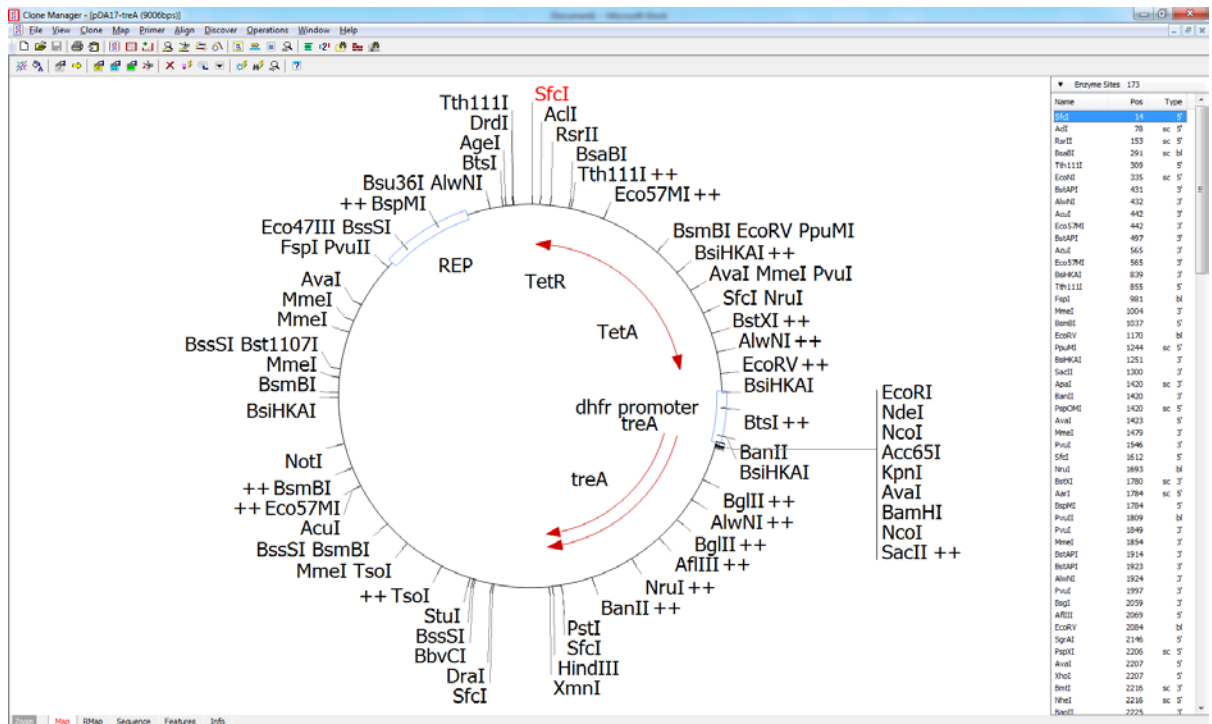
จากนั้น ตัดแบนที่ขนาด 2,000 เบส นำไปโคลนเข้า pGEMT easy vector (Promega) แล้วตรวจสอบการเข้าไปของชิ้น PCR ด้วยการตัดจำเพาะโดย EcoRI restriction enzyme และนำไปทำ gel electrophoresis เพื่อดูผล ดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าเลนที่ 3 มีสองแบน คือ pGEMT vector ขนาด 3,000 เบส และชิ้น *tre* ขนาดเกือบ 2,000 เบส ได้ทำการส่งไปทำ sequencing เพื่อดูความถูกต้องของลำดับเบสต่อไป



รูปที่ 4 การตรวจสอบยีน *trehalase* ใน pGEMT easy vector โดยการตัดจำเพาะ ของ EcoRI

แต่ผลที่ได้กลับมากจากการหาลำดับเบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ *B. pseudomallei* genome ไม่ตรงกับ ลำดับเบสของยีน *trehalase* และได้ทำการเปลี่ยนไพรเมอร์ หลายครั้ง แต่ก็ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีน *trehalase* ที่ถูกต้องได้ ด้วยความร่วมมือของ Dr. Claudia Muller จาก University of Exeter ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน *trehalase* และโคลนเข้า Expression vector pDA17 เป็นที่เรียบร้อย และได้ส่ง recombinant plasmid (pDA17-treA) มาที่ประเทศไทย ดังแสดงในรูปที่ 5





รูปที่5 แสดงส่วนประกอบของ pDA17-treA ที่ใช้สำหรับ complementation

การนำ Recombinant plasmid pDA17-treA เข้าสู่เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ทำได้โดยวิธี conjugation ดังนี้ ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* tre mutant (recipient) และ *E. coli* S17λpir pDA17-treA (donor) ใน LB broth เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นนำเชื้อทั้งสองมาเลี้ยงใน LB broth ใหม่ ให้มี OD= 0.7 ปั่นล้าง แล้วนำแบคทีเรียที่ได้มาผสมกับ LB broth ใหม่ ให้เข้ากัน จากนั้นนำ donor และ recipient ผสมกัน อัตราส่วน 1:1 หยดบน nitrocellulose membrane ที่วางบน LB agar บ่มไว้หนึ่งคืน วันรุ่งขึ้นนำแผ่น nitrocellulose membrane ที่มีเชื้ออยู่ มาละลายใน PBS เพื่อให้เชื้อหลุดจากแผ่นเมมเบรน นำมา spread บน LB agar (60µg/ml Tetracycline) บ่มไว้ 1-2 วัน จนกว่าจะมีเชื้อขึ้นมาบนเพลท นำเชื้อที่ได้มาตรวจสอบว่ามี recombinant plasmid หรือไม่ โดยการทำ PCR หรือการสกัด plasmid จาก transconjugant ที่ได้มา

3. การทำ whole genome sequencing ของ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre* mutant

### 3.1 การสกัด RNA

ในการสกัด RNA เพื่อนำไปทำ whole genome sequencing ดู expression profile จะใช้เชื้อที่โตในช่วง lag phase คือ 8 ชั่วโมง หลังจากเก็บเชื้อ *B. pseudomallei* มาแล้ว มาผสม RNA protect (Qiagen) เพื่อรักษาสภาพของ RNA แล้วทำการสกัด RNA โดยใช้ Trizol (Invitrogen) ด้วยวิธีที่แนะนำจากบริษัท โดยย่อก็คือ ปั่นเชื้อ 250µl ดูดส่วนใสออก เติม Trizol 750µl ดูดชั้นลงเพื่อให้เซลล์แตกที่เรียวแตกทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม Chloroform 200µl เขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 วินาที นำไปปั่นที่ 12,000g 4°C 15 นาที ส่วนที่มี RNA จะเป็นส่วนไม่มีสีด้านบนสุด ดูดมาใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 500µl ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อตกตะกอน RNA นำไปปั่นที่ 12,000g 4°C 10 นาที นำส่วนใสทิ้ง เติม 75% Alcohol 1ml เก็บที่ -20°C โดย RNA ที่สกัดได้จากขั้นตอนนี้จะส่งไปประเทศอังกฤษที่ University of Exeter เพื่อดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

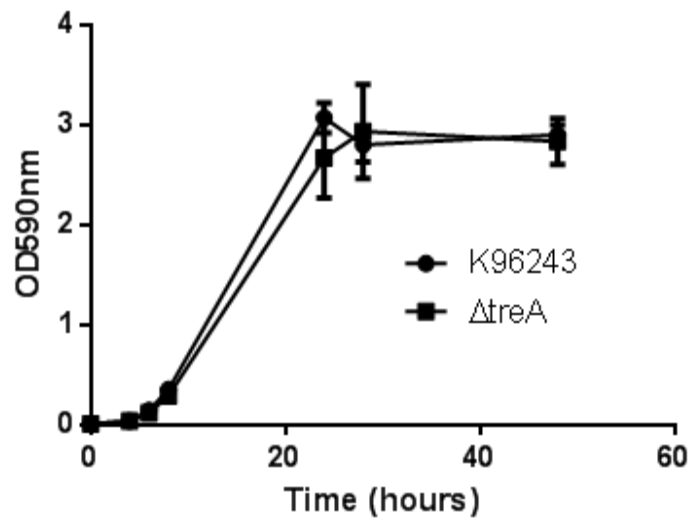
### 3.2 การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA

จาก RNA ที่สกัดได้ที่ประเทศไทย เมื่อส่งไปถึงประเทศอังกฤษ ปริมาณและคุณภาพที่ได้ไม่สามารถที่จะนำมาเปลี่ยนเป็น cDNA ได้ จึงได้ทำการสกัดและส่งไปเพิ่มอีกหลายครั้ง แต่ก็ไม่ได้ขึ้นเลยได้ตัดสินใจส่งเชื้อ *tre* mutant ที่ได้ ไปประเทศอังกฤษ ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูงมาก แต่ Prof. Titball ยินดีดูแลค่าใช้จ่ายทั้งหมด แต่ก็ต้องใช้เวลาวินิจฉัยเอกสารและทำเรื่องหลายเดือน เมื่อเชื้อ *B. pseudomallei* ไปถึงที่ University of Exeter แล้ว ได้ทำ whole genome sequencing แต่พบว่าผลที่ได้ไม่ใช่เชื้อ *B. pseudomallei* แต่เป็นเชื้อ *E. coli* หลังจากทราบผลแล้วได้ทำการทดสอบเชื้อที่มีอีกครั้งโดยวิธี Agglutination สำหรับเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ผล negative และได้ยืนยันโดยการตรวจ Mass spectrophotometry ผลที่ได้คือเชื้อ *E. coli* ดังนั้น ผลการทดลองที่ได้มาหลายๆการทดลองจะใช้ไม่ได้ ทั้งนี้วิธีที่เร็วที่สุดคือส่งเชื้อ *tre* mutant ที่ผู้วิจัยเคยทำไว้และตรวจสอบแล้วที่ประเทศอังกฤษกลับมาที่ไทย ในระหว่างรอเอกสารอนุญาตและการติดต่อประสานงาน ผู้ร่วมวิจัยที่ประเทศอังกฤษจะทำการทดลองบางส่วนเพื่อไม่ให้เป็นการเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการขนส่งเชื้อมาประเทศไทย Prof. Titball ยินดีดูแลค่าใช้จ่ายทั้งหมดเช่นเดิม

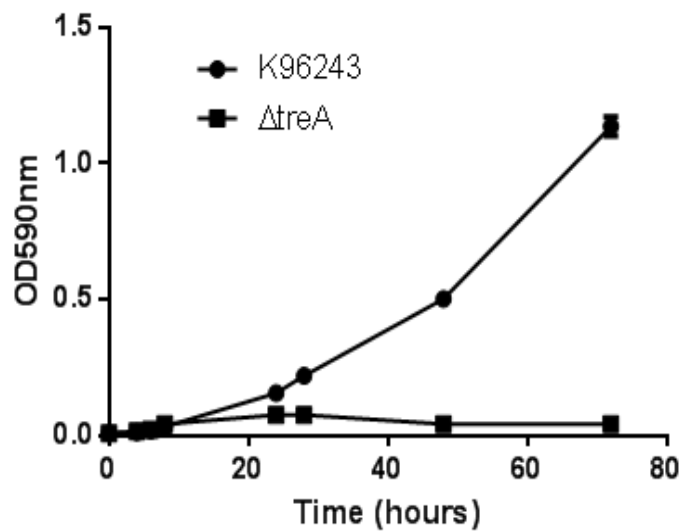
หลังจากที่ได้เชื้อ *tre* mutant มาจากประเทศอังกฤษ ผู้วิจัยได้ทำการทดลองซ้ำในการทดลองที่ทำไปแล้ว คือ การเจริญเติบโตในสภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ปกติและสภาวะที่มีอาหารขาดแคลน พร้อมกับสร้าง complement strain ที่มี *trehalase* ใส่กลับเข้าไป

โดยผลที่ได้เป็นดังนี้

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre* mutant ในสภาวะที่ขาดแคลนอาหาร คือใน M9 minimal media พบว่า เมื่อใส่ glucose เชื้อทั้งสองมีการเจริญเติบโตได้ดีเท่ากัน (รูปที่ 6) แต่เมื่อใส่ trehalose พบว่า มีเพียง K96243 เท่านั้นที่เจริญเติบโตได้ (รูปที่ 7) จึงสรุปได้ว่า *tre* mutant มีความบกพร่องในการใช้น้ำตาล trehalose ในการเจริญเติบโต เนื่องจากขาด เอนไซม์ทรียาเลสนั่นเอง



รูปที่6 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre* mutant ใน M9 minimal media with 0.4% glucose

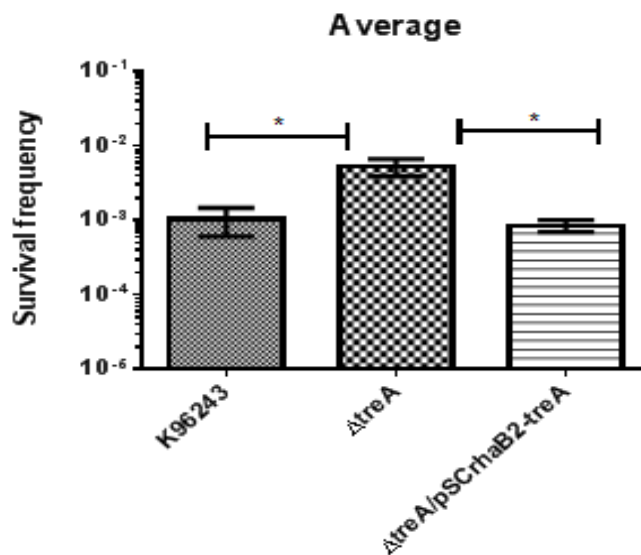


รูปที่7 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre* mutant ใน M9 minimal media with 0.4% trehalose

#### 4. การศึกษาการเจริญเติบโตของ *B. pseudomallei* ภายใต้สภาวะเครียดต่างๆ

##### 4.1 การตอบสนองต่อความร้อน

เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสภาวะที่มีความร้อนสูงกว่าปกติ ได้ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลาสองชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำเชื้อมาทำ dilution และเพลทเพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่อยู่รอด เทียบกับจำนวนโคโลนีที่เวลาดั้งต้น แล้วนำมาคำนวณเป็นค่าความอยู่รอด survival frequency (ดังแสดงในรูปที่8) พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ไม่มียีนทรีฮาเลส สามารถทนต่อความร้อนได้มากกว่าเชื้อที่มียีนทรีฮาเลส (K96243 และ *tre* complement) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P \leq 0.05$

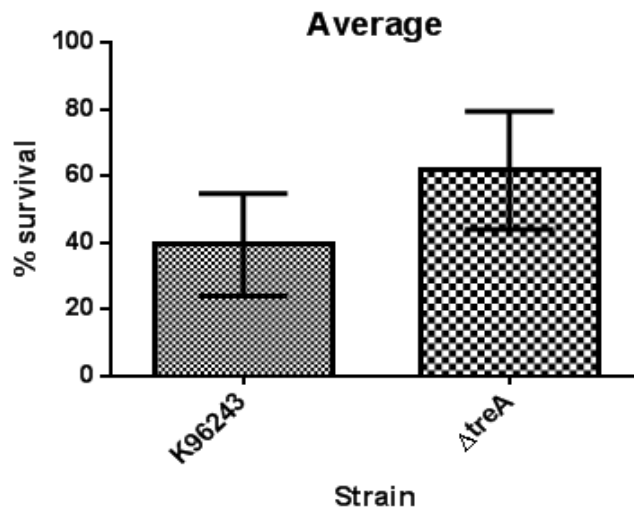


รูปที่8 การอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement หลังจากได้รับความร้อน 65°C เป็นเวลาสองชั่วโมง (\* หมายถึง  $P \leq 0.05$ )

##### 4.2 การตอบสนองต่อความเย็น

เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* ต่อการตอบสนองต่อความเย็น ได้ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาห้าวัน เมื่อครบกำหนด นำเชื้อมาทำ dilution และเพลทเพื่อนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่อยู่รอด เทียบกับจำนวนโคโลนีที่เวลาดั้งต้น แล้วนำมา

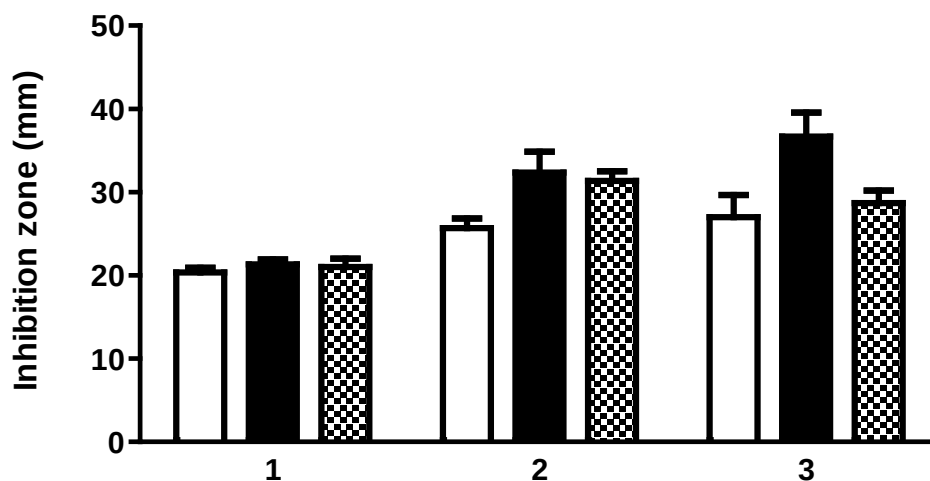
คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด percent survival (ดังแสดงในรูปที่9) พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ไม่มียีนทรีฮาเลส สามารถทนต่อความเย็นได้มากกว่าเชื้อที่มียีนทรีฮาเลส (K96243 และ *tre complement*) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่9 การอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre mutant* หลังจากได้รับความเย็น 4°C เป็นเวลาห้าวัน

#### 4.3 การตอบสนองต่อ oxidative agents

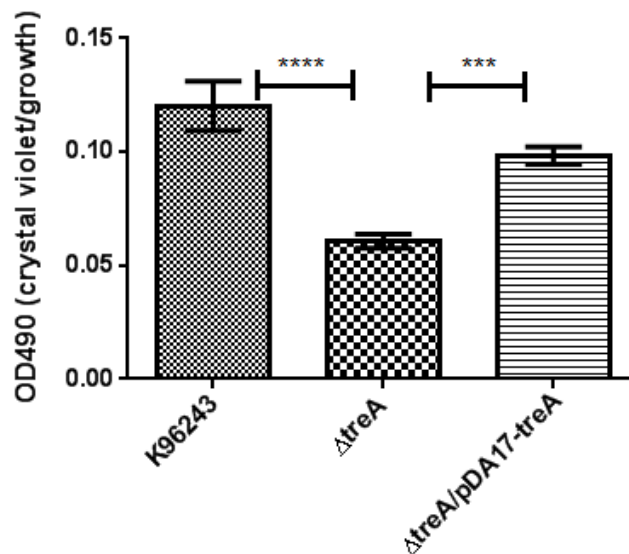
เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการตอบสนองต่อ oxidative stress ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองหาการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre mutant* และ *tre complement* เมื่อมี oxidative agents คือ  $H_2O_2$  และ tBOOH ด้วยวิธี Disk inhibition assay ดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาปรับ OD (600nm) = 0.1 แล้วเพลทบน LB agar ทิ้งให้แห้ง นำ disc ที่มีoxidative agent 6  $\mu$ l ไปวางบนเพลทที่มีแบคทีเรีย บ่มข้ามคืนที่ 37°C วันต่อมาทำการวัด inhibition zone รอบๆ disc ที่วางไว้ ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 10 พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ไม่มียีนทรีฮาเลส มีการตอบสนองต่อtBOOHที่ 0.03 และ 0.04M ได้ไวกว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ปกติ แต่การตอบสนองต่อ  $H_2O_2$  ไม่แตกต่างกัน



รูปที่10 การตอบสนองต่อ oxidative stress ของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243 (สีขาว), *tre* mutant (สีดำ) และ *tre* complement (ตาราง) โดย 1 คือ 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 คือ 0.03M tBOOH และ 3 คือ 0.04M tBOOH.

#### 4.4 การสร้าง biofilm

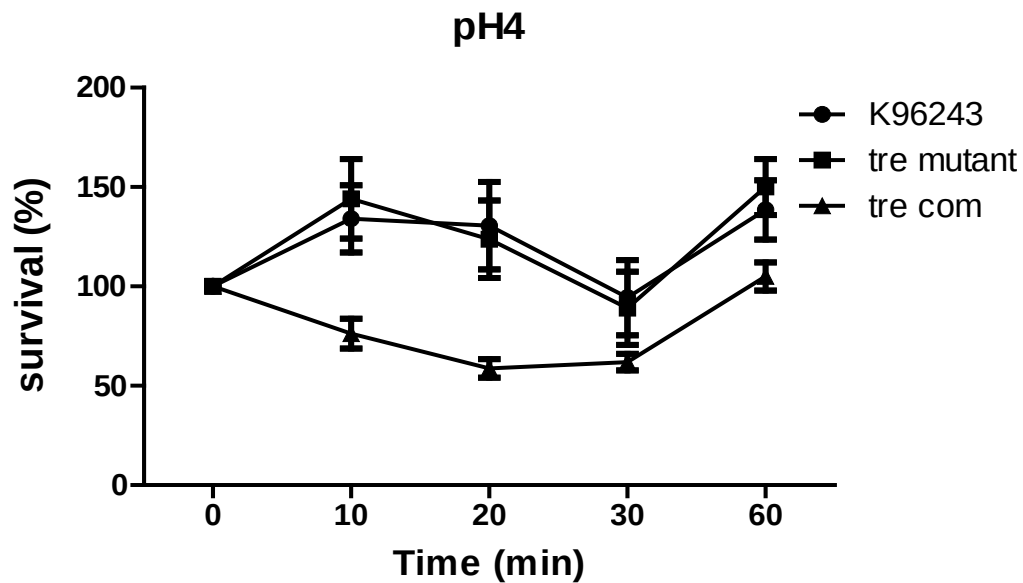
เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองวัด biofilm ของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ดังนี้ นำเชื้อมาเลี้ยงใน TSB broth ที่มี glucose โดยใส่ใน 96 microplate หลุมละ 100μl เลี้ยงเชื้อไว้หนึ่งคืน วันรุ่งขึ้น ทำการย้อมสี biofilm ด้วยสี crystal violet ล้างสีส่วนเกินออก นำไปวัด OD ที่ 490nm เทียบกับ OD ของเชื้อที่ไม่ได้ย้อมสี ผลที่ได้แสดงในรูปที่11 การขาดยีนทรีฮาเลส มีผลต่อการสร้าง biofilm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) แสดงว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญในการสร้าง biofilm ของเชื้อ *B. pseudomallei*



รูปที่11 การสร้าง biofilmของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement วัน โดยการย้อมสี crystal violet (\*\*\*=  $P<0.001$ , \*\*\*\*=  $P<0.0001$ )

#### 4.5 การตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรด

เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาลีสต่อการเจริญเติบโตในสภาวะที่เป็นกรดของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองหาการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ในสภาวะที่เป็นกรด ดังนี้ นำเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน มาปั่นล้าง ปรับ OD (600nm) ให้ได้ 0.1 จากนั้น ใส่เชื้อที่ปรับความเข้มข้นแล้วใน LB broth pH4 ตามเวลาที่กำหนดคือ 10, 20, 30, 60 นาที เมื่อครบเวลา นำเชื้อมาทำ dilution และเพลทลงบน LB agar ทั้งไว้ข้ามคืน นับจำนวน โคโลนีที่ได้ และนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด โดยเทียบกับจำนวนแบคทีเรียตั้งต้น ดังแสดงใน รูปที่ 12 พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีหรือไม่มียีนทรีฮาลีส มีการอยู่รอดในสภาวะที่มี pH4 หรือเป็น กรด ไม่ต่างกัน แต่เชื้อ *tre* complement มีความสามารถในการทนกรด ต่ำกว่าเชื้อ *B. pseudomallei* K96243และ *tre* mutant ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับยีนทรีฮาลีส

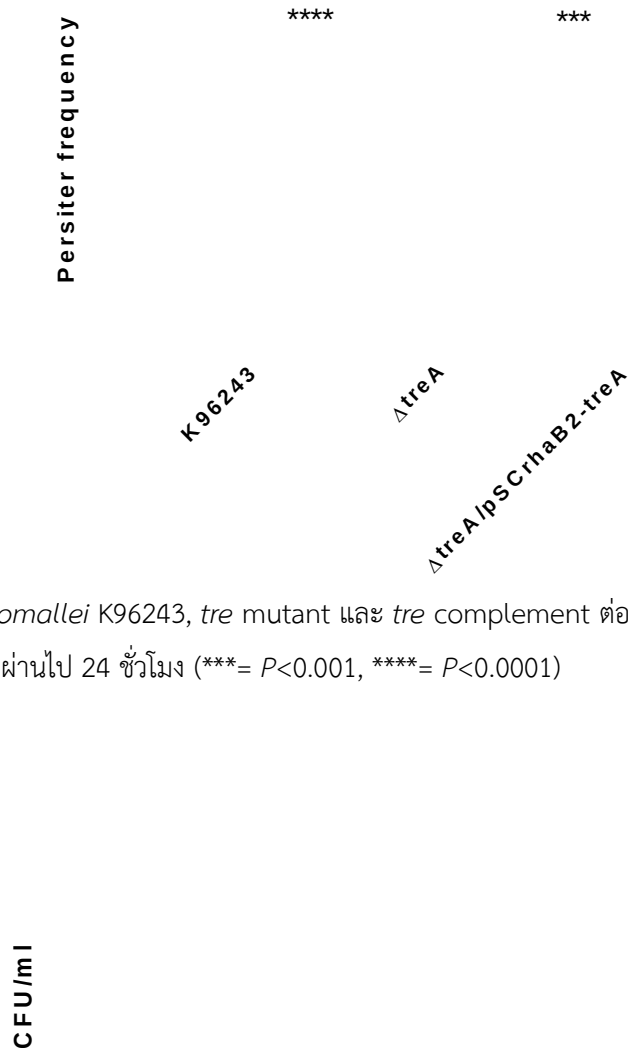


รูปที่12 การตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement โดยแสดงค่าความอยู่รอดหลังจากอยู่ในLB broth ที่มี pH=4 เป็นเวลา 10, 20, 30 และ 60 นาที

#### 4.6 ความทนทานต่อยาปฏิชีวนะ

เพื่อศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาลีสในการทนทานต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองหาการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ในสภาวะที่มียาปฏิชีวนะ คือ Ciprofloxacin 200 µg/ml (100X MIC) ดังนี้ นำเชื้อ *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน มาปั่นล้าง ปรับ OD (600nm) ให้ได้ 0.1 จากนั้น เติมนยา Ciprofloxacin ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 µg/ml จากนั้นแบ่งมานับจำนวนแบคทีเรียที่ยังคงอยู่ภายในเวลา 30 ชั่วโมง และเทียบกับจำนวนแบคทีเรียตั้งต้น เพื่อคำนวณ การคงอยู่ของแบคทีเรีย (persistence frequency) ที่ 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ดังแสดงในรูปที่13.1 และ 13.2 พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ขาดยีนทรีฮาลีสมีความทนทานต่อยา Ciprofloxacin มากกว่าเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ





รูปที่ 13.1

เชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ต่อยา Ciprofloxacin 200 µg/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (\*\*\*=  $P < 0.001$ , \*\*\*\*=  $P < 0.0001$ )

การคงอยู่ของ

รูปที่

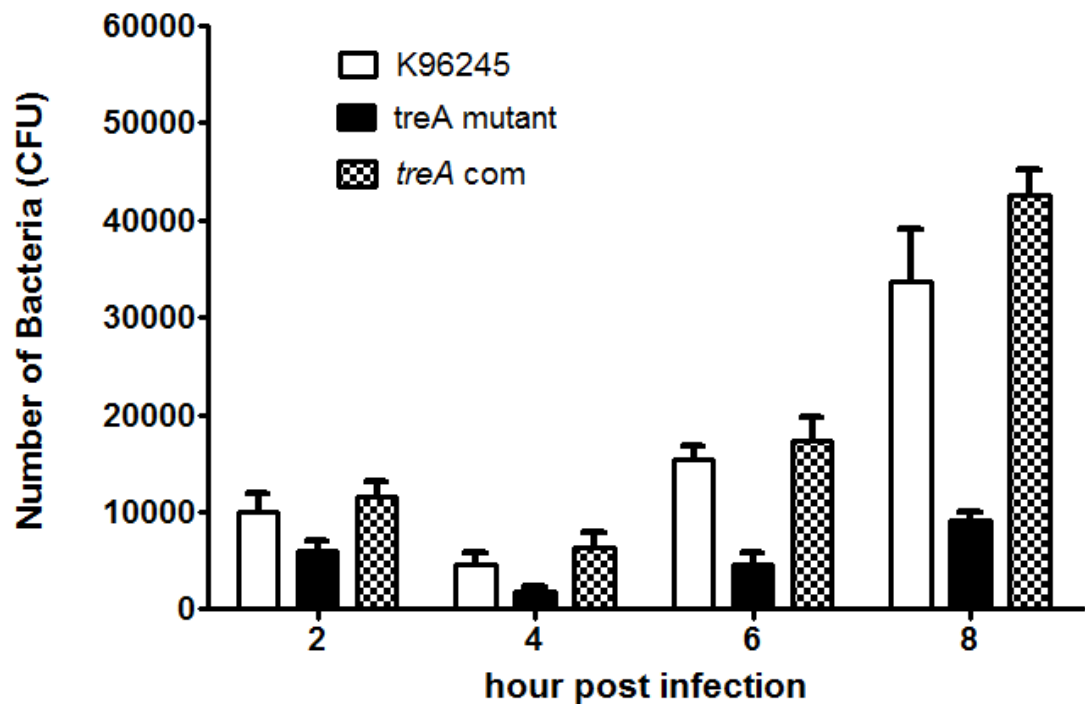
13.2

จำนวนของ *B. pseudomallei* K96243 และ *tre* mutant หลังจากได้รับยา Ciprofloxacin 200 µg/ml

## 5. การศึกษาการเข้าสู่เซลล์และการเจริญภายในเซลล์ของเชื้อ *B. pseudomallei tre* mutant

### 5.1 การอยู่รอดของเชื้อใน mouse macrophage cell line

เพื่อศึกษาการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนของเชื้อใน mouse macrophage cell line ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองหาการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ดังนี้ ทำการเลี้ยงเซลล์ mouse macrophage cell line J774.1 ใน DMEM (Gibco) ที่มี 10% fetal bovine serum และยา Pen/Strep ที่ 37°C 5%CO<sub>2</sub> หนึ่งวันก่อนทำการทดลอง จะนับจำนวนเซลล์เพื่อใส่ใน 24 well-plate เป็นจำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ เลี้ยงไว้หนึ่งคืน พร้อมทิ้งลงเชื้อ *B. pseudomallei* ใน LB broth วันรุ่งขึ้น นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาปั่นล้าง ปรับ OD (600nm) ให้ได้ 0.15 จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับแล้ว 10  $\mu$ l (เพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน  $1 \times 10^6$  CFU/well) ในหลุมที่มีเซลล์อยู่ บ่มไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM ที่มียา Kanamycin 250  $\mu$ l/ml เพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อยู่นอกเซลล์ แล้วเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อต่อไปจนครบเวลาที่กำหนดคือ 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS สามครั้ง แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย 0.1% Triton-X (Sigma) นำมาทำ dilution และเพลทบน LB agar บ่มไว้หนึ่งคืน เพื่อนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ขาดยีนทรีฮาเลส มีความสามารถอยู่รอดในแมคโครฟาจลดลง เทียบกับเชื้อปกติและเชื้อกลายพันธุ์ที่มีการใส่ยีนทรีฮาเลสกลับเข้าไป แสดงว่า ยีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. pseudomallei* ในแมคโครฟาจ

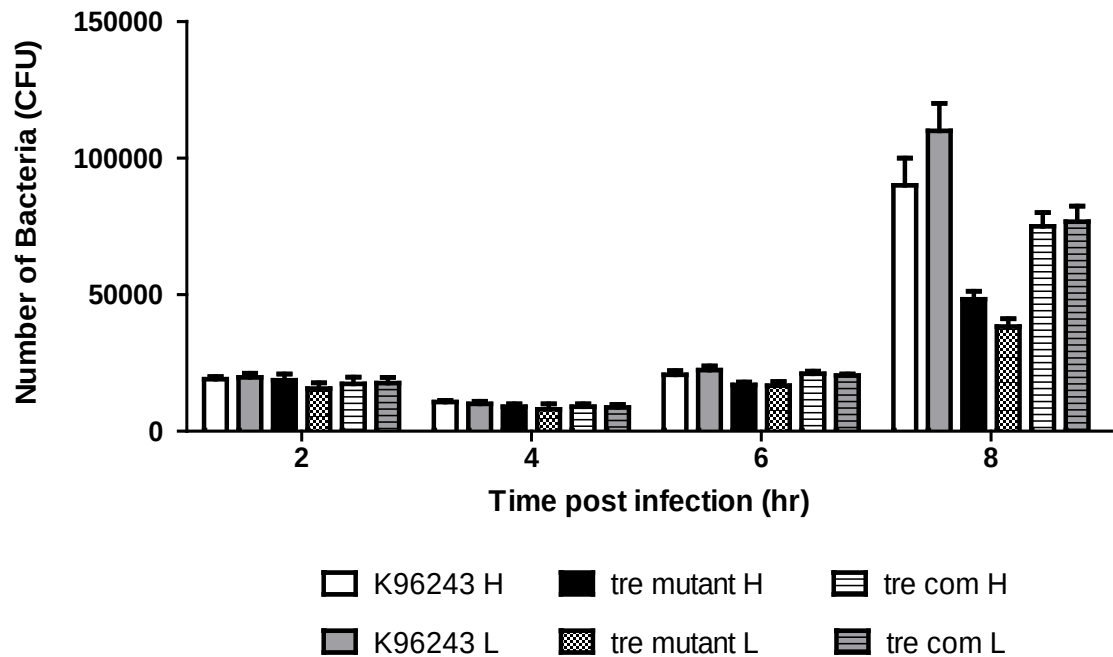


รูปที่14 การอยู่รอดของเชื้อเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ใน mouse macrophage cell line 744.1 ที่เวลา 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง

## 5.2 การอยู่รอดของเชื้อใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณglucose ต่ำ

เพื่อศึกษาความสำคัญของน้ำตาลกลูโคสการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนของเชื้อใน mouse macrophage cell line ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ทำการทดลองหาการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ดังนี้ ทำการเลี้ยงเซลล์ mouse macrophage cell line J774.1 ในDMEMสูตรhigh และ low glucose (Gibco) ที่มี 10% fetal bovine serum และยา Pen/Strep ที่ 37°C 5%CO<sub>2</sub> หนึ่งวันก่อนทำการทดลอง จะนับจำนวนเซลล์เพื่อใส่ใน 24 well-plate เป็นจำนวน  $1 \times 10^5$  เซลล์ เลี้ยงไว้หนึ่งคืน พร้อมทั้งลงเชื้อ *B. pseudomallei* ใน LB broth วันรุ่งขึ้น นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาปั่นล้าง ปรับ OD (600nm) ให้ได้ 0.15 จากนั้นใส่เชื้อที่ปรับแล้ว 10μl ในหลุมที่มีเซลล์อยู่ บ่มไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM ที่มียา Kanamycin 250 μl/ml เพื่อฆ่าแบคทีเรียที่อยู่นอกเซลล์ แล้วเลี้ยงเซลล์ที่มีเชื้อต่อไปจนครบเวลาที่กำหนดคือ 2, 4, 6, 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS สามครั้ง แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย 0.1% Triton-X (Sigma) นำมาทำ dilution และเพลทบน LB agar บ่มไว้หนึ่งคืน เพื่อนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ได้ผลดังแสดงในรูปที่15 พบว่า เชื้อ *B. pseudomallei* ที่ขาดยีนทรีฮาเลส มีความสามารถอยู่รอดในแมคโครฟาจดลดลง เทียบกับเชื้อปกติและเชื้อกลายพันธุ์ที่มีการใส่ยีนทรีฮาเลสกลับ

เข้าไป และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกลูโคสสูงและต่ำพบว่า ปริมาณกลูโคสที่ต่ำทำให้ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ขาดยีนทรีฮาเลสลดลงต่ำไปอีก แต่กลับไม่มีผลต่อเชื้อปกติ แสดงว่า ยีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการอยู่รอดและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *B. pseudomallei* ในสถานะที่มีน้ำตาลปริมาณน้อย



รูปที่ 14 การอยู่รอดของเชื้อเชื้อ *B. pseudomallei* K96243, *tre* mutant และ *tre* complement ใน mouse macrophage cell line 744.1 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสปริมาณสูง (H) และต่ำ (L) ที่เวลา 2, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อก่อโรคที่พบมากในภาคอีสานของประเทศไทย ก่อให้เกิดโรค melioidosis ซึ่งมีผู้ป่วยต่อปีเป็นจำนวนมาก ทั้งยังต้องอาศัยด้านจุลชีพหลายตัวส่งผลต่อการรักษาที่ต้องใช้ยาหลายชนิดเป็นระยะเวลานาน และโอกาสที่จะกลับเป็นซ้ำเกิดขึ้นได้บ่อย ปัจจุบันยังไม่สามารถผลิตวัคซีนที่มีประสิทธิภาพเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคนี้ได้ จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างกว้างขวางในแง่มุมต่างๆ ซึ่งในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจเอนไซม์ที่ชื่อว่าทรีฮาเลสเนื่องจากการศึกษาในเชื้อก่อโรคเช่นเชื้อราและยีสว่าเอนไซม์นี้มีผลต่อเจริญเติบโตและการก่อโรค แต่ในแบคทีเรียยังไม่มีการศึกษาที่แพร่หลายนัก ทราบแต่เพียงว่าพบเอนไซม์นี้ในแบคทีเรียและมีความสำคัญเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* โดยในงานวิจัยนี้เริ่มต้นจากการหาว่า เชื้อ *B. pseudomallei* มียีนทรีฮาเลสหรือไม่และมีกี่ยีน (ในแบคทีเรียบางชนิดมีมากกว่าหนึ่งยีน) พบว่ามียีนทรีฮาเลสหนึ่งยีน อยู่บนโครโมโซมที่สองของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ตำแหน่ง BPSS0671 ขนาด 1,695 เบส (โปรตีนขนาด 565 กรดอะมิโน) จึงได้ออกแบบ พลาสมิดเพื่อจะทำการกำจัดยีนนี้ออกไปสร้างเป็น mutant หรือเชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่มียีนทรีฮาเลส เมื่อเชื้อกลายพันธุ์แล้วจะนำไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ เช่นการเจริญเติบโตในสภาวะต่างๆ การอยู่รอดของเชื้อ การก่อโรคของเชื้อ รวมไปถึงดู transcriptome profiling เพื่อดูว่ายีนใดบ้างที่เกี่ยวข้องกับทรีฮาเลสโดยการทำการ whole genome sequencing ที่ University of Exeter ประเทศอังกฤษ แต่เกิดปัญหาในขั้นตอนการขนส่ง RNA ที่สกัดไปจากประเทศไทยไปประเทศอังกฤษ พบว่าความเข้มข้นและคุณภาพไม่ดีเพียงพอที่จะนำไปทำการทดลองต่อ จึงแก้ปัญหาโดยการส่งตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ไปประเทศอังกฤษแทน โดยใช้ระยะเวลาทำเอกสารนานพอสมควร หลังจากเชื้อถึงประเทศอังกฤษแล้ว ได้นะ DNA ไปทำ whole genome sequencing ก่อน แต่พบว่าเชื้อที่ส่งไป เป็นเชื้อ *E. coli* ไม่ใช่ *B. pseudomallei* จากนั้นได้ทำการทดสอบเชื้อที่ประเทศไทยอีกครั้งโดยวิธี agglutination และ Mass Spectrophotometry และพบว่า เป็นเชื้อ *E. coli* จริง จึงต้องสร้าง mutant ขึ้นมาใหม่และให้ทางอังกฤษ ส่ง mutant ที่ผู้วิจัยเคยทำไว้มาประเทศไทยด้วย (แต่ต้องใช้เวลานานในการขออนุญาตจากอังกฤษ) หากได้จากทางใดก่อนจะได้ทำการทดลองต่อได้เลย เมื่อได้ mutant ที่ตรวจสอบแล้วว่าเป็น *B. pseudomallei* ได้ทำการสร้าง complement คือใส่ยีนทรีฮาเลสกลับเข้าไป เพื่อใช้เป็นการยืนยันว่าผลที่แตกต่างจากการทดลองในเชื้อปกติเทียบกับ mutant มาจากการขาดยีนทรีฮาเลส โดยเริ่มจากออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มจำนวนยีนทรีฮาเลสด้วยวิธี PCR นำไปทดสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธี sequencing เมื่อได้ยีนที่ลำดับเบสถูกต้องแล้ว นำไปใส่ใน expression vector เพื่อทำการ conjugation ใส่พลาสมิดเข้าสู่ mutant เมื่อได้ครบทั้ง mutant และ complement

แล้ว จึงได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่างๆ เพื่อดูการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อขาด ยีนทรีฮาเลส พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีแต่น้ำตาลทรีฮาโลสได้ แสดงว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการนำน้ำตาลทรีฮาโลสไปใช้นั่นเอง และยังพบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการสร้าง biofilm ของเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อขาดยีนนี้ เชื้อจะสร้าง biofilm ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการตอบสนองต่อ oxidative stress นั้น ยีนทรีฮาเลส มีความสำคัญต่อการตอบสนองต่อ tBOOH เมื่อขาดยีนนี้จะทำให้เชื้อมีความไวต่อ tBOOH มากขึ้น เมื่อดูความสามารถในการเข้าสู่เซลล์และการเพิ่มจำนวนของเชื้อในแมคโครฟาจพบว่า ยีนทรีฮาเลส มีความสำคัญเมื่อขาดยีนนี้ จำนวนของเชื้อที่อยู่ในแมคโครฟาจจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

กล่าวโดยสรุปคืองานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสำคัญของยีนทรีฮาเลสในเชื้อ *B. pseudomallei* ในด้านการเจริญเติบโตในสภาวะเครียดต่างๆ และการก่อโรค พบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อเชื้อ *B. pseudomallei* เมื่อต้องอยู่ในสภาวะที่มีแต่น้ำตาลทรีฮาโลสจะไม่สามารถเจริญได้เลยถ้าขาดยีนนี้ และยังจำเป็นต่อการตอบสนองต่อ oxidative agent เช่น tBOOH และการสร้าง biofilm ของเชื้อซึ่งเกี่ยวข้องกับการทนสภาวะต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมและมีส่วนในการก่อโรคด้วย ส่วนด้านการก่อโรคนั้นพบว่ายีนทรีฮาเลสมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนในแมคโครฟาจ เมื่อขาดยีนนี้จะมีการเพิ่มจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่ายีนทรีฮาเลสของ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการก่อโรคของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีการรายงานความสำคัญของยีนทรีฮาเลสต่อการก่อโรคในเชื้อแบคทีเรีย

## Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ  
Muthita Vanaporn, Mitali Sarkar-Tyson, Philip Ireland, Richard W Titball, Aaron Butt. Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*.  
(อยู่ในขั้นตอนการเขียนmanuscript คาดว่าจะส่งตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Bacteriology หรือเทียบเท่า)
2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ  
มีการนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการแห่งชาติและนานาชาติ ดังนี้
  - 2.1 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมนานาชาติ World Melioidosis Congress 2013, Bangkok, Thailand ระหว่างวันที่ 18-20 กันยายน 2556 หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*”
  - 2.2 เสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2013, Bangkok, Thailand ระหว่างวันที่ 11-13 ธันวาคม 2556 หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*”
  - 2.3 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่13 ระหว่างวันที่ 16-18 ตุลาคม 2556 จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*”

## เอกสารอ้างอิง

1. White NJ. Melioidosis. Lancet. 2003 May 17;361(9370):1715-22.
2. Chodimella U, Hoppes WL, Whalen S, Ognibene AJ, Rutecki GW. Septicemia and suppuration in a Vietnam veteran. Hosp Pract (Off Ed). 1997 May 15;32(5):219-21.
3. Ngauy V, Lemeshev Y, Sadkowski L, Crawford G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):970-2.
4. Wuthiekanun V, M. D. Smith, and N. J. White. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89:491.
5. Chen YS, Chen SC, Kao CM, Chen YL. Effects of soil pH, temperature and water content on the growth of *Burkholderia pseudomallei*. Folia Microbiol (Praha). 2003;48(2):253-6.
6. Tong S, Yang S, Lu Z, He W. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei*. Microbiol Immunol. 1996;40(6):451-3.
7. McCormick JB, Sexton DJ, McMurray JG, Carey E, Hayes P, Feldman RA. Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. Ann Intern Med. 1975 Oct;83(4):512-3.
8. Korbsrisate S, Suwanasai N, Leelaporn A, Ezaki T, Kawamura Y, Sarasombath S. Cloning and characterization of a nonhemolytic phospholipase C gene from *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microbiol. 1999 Nov;37(11):3742-5.
9. Ashdown LR, Koehler JM. Production of hemolysin and other extracellular enzymes by clinical isolates of *Pseudomonas pseudomallei*. J Clin Microbiol. 1990 Oct;28(10):2331-4.
10. Attree O, Attree I. A second type III secretion system in *Burkholderia pseudomallei*: who is the real culprit? Microbiology. 2001 Dec;147(Pt 12):3197-9.
11. Elbein AD. The metabolism of alpha,alpha-trehalose. Adv Carbohydr Chem Biochem. 1974;30:227-56.
12. Nwaka S, Holzer H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1998;58:197-237.



13. Trevelyan WE, Harrison JS. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. *Biochem J.* 1956 Feb;62(2):177-83.
14. Muller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2001 Feb;125(2):1086-93.
15. Brana AF, Mendez C, Diaz LA, Manzanal MB, Hardisson C. Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol.* 1986 May;132(5):1319-26.
16. Elbein AD, Mitchell M. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *J Bacteriol.* 1973 Feb;113(2):863-73.
17. Shimakata T, Minatogawa Y. Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Aug 15;380(2):331-8.
18. Cabib E, Leloir LF. The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem.* 1958 Mar;231(1):259-75.
19. Nishimoto T, Nakano M, Nakada T, Chaen H, Fukuda S, Sugimoto T, et al. Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996 Apr;60(4):640-4.
20. Maruta K, Mitsuzumi H, Nakada T, Kubota M, Chaen H, Fukuda S, et al. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Dec 6;1291(3):177-81.
21. Wannet WJ, Op den Camp HJ, Wisselink HW, van der Drift C, Van Griensven LJ, Vogels GD. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Sep 16;1425(1):177-88.
22. Qu Q, Lee SJ, Boos W. TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):47890-7.
23. Yoneyama Y, Lever JE. Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of LLC-PK1 monolayers. *J Cell Physiol.* 1987 Jun;131(3):330-41.
24. Murray IA, Coupland K, Smith JA, Ansell ID, Long RG. Intestinal trehalase activity in a UK population: establishing a normal range and the effect of disease. *Br J Nutr.* 2000 Mar;83(3):241-5.
25. App H, Holzer H. Control of yeast neutral trehalase by distinct polyphosphates and ribonucleic acid. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1985 Oct;181(4):276-82.

26. Horlacher R, Uhland K, Klein W, Ehrmann M, Boos W. Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1996 Nov;178(21):6250-7.
27. Boos W, Ehmann U, Bremer E, Middendorf A, Postma P. Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. J Biol Chem. 1987 Sep 25;262(27):13212-8.
28. Rimmele M, Boos W. Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1994 Sep;176(18):5654-64.
29. Pitt TL. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. In: Sussman WJHaM, editor. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. London, United Kingdom: Arnold; 1995. p. 1109-38.
30. Lertpatanasuwan N, Sermsri K, Petkaseam A, Trakulsomboon S, Thamlikitkul V, Suputtamongkol Y. Arabinose-positive *Burkholderia pseudomallei* infection in humans: case report. Clin Infect Dis. 1999 Apr;28(4):927-8.
31. Smith MD, Angus BJ, Wuthiekanun V, White NJ. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun. 1997 Oct;65(10):4319-21.
32. Champion OL, Karlyshev AV, Senior NJ, Woodward M, La Ragione R, Howard SL, et al. Insect infection model for *Campylobacter jejuni* reveals that O-methyl phosphoramidate has insecticidal activity. J Infect Dis. Mar;201(5):776-82.
33. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):383-416.
34. Dance DA. Melioidosis: the tip of the iceberg? Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):52-60.
35. Dance DA. Melioidosis as an emerging global problem. Acta Trop. 2000 Feb 5;74(2-3):115-9.
36. Leelarasamee A, Bovornkitti S. Melioidosis: review and update. Rev Infect Dis. 1989 May-Jun;11(3):413-25.
37. Nussbaum JJ, Hull DS, Carter MJ. *Pseudomonas pseudomallei* in an anophthalmic orbit. Arch Ophthalmol. 1980 Jul;98(7):1224-5.
38. McCormick JB, Weaver RE, Hayes PS, Boyce JM, Feldman RA. Wound infection by an indigenous *Pseudomonas pseudomallei*-like organism isolated from the soil: case report and epidemiologic study. J Infect Dis. 1977 Jan;135(1):103-7.

39. Dorman SE, Gill VJ, Gallin JI, Holland SM. *Burkholderia pseudomallei* infection in a Puerto Rican patient with chronic granulomatous disease: case report and review of occurrences in the Americas. Clin Infect Dis. 1998 Apr;26(4):889-94.
40. Miralles IS, Maciel Mdo C, Angelo MR, Gondini MM, Frota LH, dos Reis CM, et al. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceara, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Jan-Feb;46(1):51-4.
41. Perez JM, Petiot A, Adjide C, Gerry F, Goursaud R, Juminer B. First case report of melioidosis in Guadeloupe, a French West Indies archipelago. Clin Infect Dis. 1997 Jul;25(1):164-5.
42. Rolim DB, Vilar DC, Sousa AQ, Miralles IS, de Oliveira DC, Harnett G, et al. Melioidosis, northeastern Brazil. Emerg Infect Dis. 2005 Sep;11(9):1458-60.
43. Nachiangmai N, Patamasucon P, Tipayamonthein B, Kongpon A, Nakaviroj S. *Pseudomonas pseudomallei* in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1985 Mar;16(1):83-7.
44. Wuthiekanun V, Smith MD, Dance DA, White NJ. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995 Jan-Feb;89(1):41-3.
45. Trakulsomboon S, Vuddhakul V, Tharavichitkul P, Na-Gnam N, Suputtamongkol Y, Thamlikitkul V. Epidemiology of arabinose assimilation in *burkholderia pseudomallei* isolated from patients and soil in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1999 Dec;30(4):756-9.
46. Whitmore A, Krishnaswamia, C. An account of disease of hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. Indian Med Gaz. 1912;47:262-7.
47. Wiersinga WJ, van der Poll T, White NJ, Day NP, Peacock SJ. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. Nat Rev Microbiol. 2006 Apr;4(4):272-82.
48. Howe C, Sampath A, Spotnitz M. The pseudomallei group: a review. J Infect Dis. 1971 Dec;124(6):598-606.
49. Currie BJ, Jacups SP. Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia. Emerg Infect Dis. 2003 Dec;9(12):1538-42.
50. Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. J Infect Dis. 1989 May;159(5):890-9.

51. Currie BJ, Mayo M, Anstey NM, Donohoe P, Haase A, Kemp DJ. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Sep;65(3):177-9.
52. Inglis TJ, Garrow SC, Adams C, Henderson M, Mayo M, Currie BJ. Acute melioidosis outbreak in Western Australia. *Epidemiol Infect.* 1999 Dec;123(3):437-43.
53. Koszyca B, Currie BJ, Blumbergs PC. The neuropathology of melioidosis: two cases and a review of the literature. *Clin Neuropathol.* 2004 Sep-Oct;23(5):195-203.
54. Schwarzmaier A, Riezinger-Geppert F, Schober G, Karnik R, Valentin A. Fulminant septic melioidosis after a vacation in Thailand. *Wien Klin Wochenschr.* 2000 Oct 27;112(20):892-5.
55. Clark GC, Briggs DC, Karasawa T, Wang X, Cole AR, Maegawa T, et al. *Clostridium absonum* alpha-toxin: new insights into clostridial phospholipase C substrate binding and specificity. *J Mol Biol.* 2003 Oct 31;333(4):759-69.
56. Currie BJ, Fisher DA, Howard DM, Burrow JN. Neurological melioidosis. *Acta Trop.* 2000 Feb 5;74(2-3):145-51.
57. Saipan P. Neurological manifestations of melioidosis in children. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1998 Dec;29(4):856-9.
58. Currie BJ, Fisher DA, Anstey NM, Jacups SP. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000 May-Jun;94(3):301-4.
59. Chaowagul W, Suputtamongkol Y, Dance DA, Rajchanuvong A, Pattara-arechachai J, White NJ. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. *J Infect Dis.* 1993 Nov;168(5):1181-5.
60. Desmarchelier PM, Dance DA, Chaowagul W, Suputtamongkol Y, White NJ, Pitt TL. Relationships among *Pseudomonas pseudomallei* isolates from patients with recurrent melioidosis. *J Clin Microbiol.* 1993 Jun;31(6):1592-6.
61. Vadivelu J, Puthucheary SD, Drasar BS, Dance DA, Pitt TL. Stability of strain genotypes of *Burkholderia pseudomallei* from patients with single and recurrent episodes of melioidosis. *Trop Med Int Health.* 1998 Jul;3(7):518-21.
62. Steinmetz I, Rohde M, Brenneke B. Purification and characterization of an exopolysaccharide of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Infect Immun.* 1995 Oct;63(10):3959-65.

63. Vorachit M, Lam K, Jayanetra P, Costerton JW. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidime and co-trimoxazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Sep;37(9):2000-2.
64. Lee MA, Liu Y. Sequencing and characterization of a novel serine metalloprotease from *Burkholderia pseudomallei*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Nov 1;192(1):67-72.
65. Korbsrisate S, Tomaras AP, Damnin S, Ckumdee J, Srinon V, Lengwehasatit I, et al. Characterization of two distinct phospholipase C enzymes from *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology.* 2007 Jun;153(Pt 6):1907-15.
66. DeShazer D, Brett PJ, Burtnick MN, Woods DE. Molecular characterization of genetic loci required for secretion of exoproducts in *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol.* 1999 Aug;181(15):4661-4.
67. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeno-Tarraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 28;101(39):14240-5.
68. Warawa J, Woods DE. Type III secretion system cluster 3 is required for maximal virulence of *Burkholderia pseudomallei* in a hamster infection model. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Jan 1;242(1):101-8.
69. Rainbow L, Hart CA, Winstanley C. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J Med Microbiol.* 2002 May;51(5):374-84.
70. 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 behaviour of the pathogen. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(3):649-59.
71. Stevens MP, Friebel 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 Aug;185(16):4992-6.
72. Stevens MP, Haque A, Atkins T, Hill J, Wood MW, Easton A, et al. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis. *Microbiology.* 2004 Aug;150(Pt 8):2669-76.
73. Suparak S, Kespichayawattana W, Haque A, Easton A, Damnin S, Lertmemongkolchai G, et al. Multinucleated giant cell formation and apoptosis in infected host cells is mediated by *Burkholderia pseudomallei* type III secretion protein BipB. *J Bacteriol.* 2005 Sep;187(18):6556-60.

74. Ho M, Schollaardt T, Smith MD, Perry MB, Brett PJ, Chaowagul W, et al. Specificity and functional activity of anti-*Burkholderia pseudomallei* polysaccharide antibodies. *Infect Immun*. 1997 Sep;65(9):3648-53.
75. DeShazer D, Brett PJ, Carlyon R, Woods DE. Mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei* with Tn5-OT182: isolation of motility mutants and molecular characterization of the flagellin structural gene. *J Bacteriol*. 1997 Apr;179(7):2116-25.
76. Perry MB, MacLean LL, Schollaardt T, Bryan LE, Ho M. Structural characterization of the lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*. 1995 Sep;63(9):3348-52.
77. Woods DE, Jones AL, Hill PJ. Interaction of insulin with *Pseudomonas pseudomallei*. *Infect Immun*. 1993 Oct;61(10):4045-50.
78. Kanai K, Kondo E. Recent advances in biomedical sciences of *Burkholderia pseudomallei* (basonym: *Pseudomonas pseudomallei*). *Jpn J Med Sci Biol*. 1994 Feb;47(1):1-45.
79. Puthuchery SD, Vadivelu J, Ce-Cile C, Kum-Thong W, Ismail G. Short report: Electron microscopic demonstration of extracellular structure of *Burkholderia pseudomallei*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996 Mar;54(3):313-4.
80. Jones SM, Ellis JF, Russell P, Griffin KF, Oyston PC. Passive protection against *Burkholderia pseudomallei* infection in mice by monoclonal antibodies against capsular polysaccharide, lipopolysaccharide or proteins. *J Med Microbiol*. 2002 Dec;51(12):1055-62.
81. 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 Jan;69(1):34-44.
82. Chua KL, Chan YY, Gan YH. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):1622-9.
83. Clegg JS, Evans DR. Blood trehalose and flight metabolism in the blowfly. *Science*. 1961 Jul 7;134:54-5.
84. Susman E. Psoriasis: a physician's evaluation. *Med J Aust*. 1959 Jan 10;46(2):50-2.
85. Kaasen I, McDougall J, Strom AR. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*. 1994 Jul 22;145(1):9-15.

86. Maruta K, Hattori K, Nakada T, Kubota M, Sugimoto T, Kurimoto M. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-11. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1996 Apr;60(4):717-20.
87. Iturriaga G, Suarez R, Nova-Franco B. Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int J Mol Sci*. 2009 Sep;10(9):3793-810.
88. Hottiger T, De Virgilio C, Hall MN, Boller T, Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur J Biochem*. 1994 Jan 15;219(1-2):187-93.
89. Blazquez MA, Santos E, Flores CL, Martinez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J*. 1998 Mar;13(5):685-9.
90. Becker A, Schloder P, Steele JE, Wegener G. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*. 1996 May 15;52(5):433-9.
91. Gadd GM, Chalmers, K., and Reed, R.H. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1987;48:249-54.
92. Attfield PV. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett*. 1987 Dec 10;225(1-2):259-63.
93. Singer MA, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol*. 1998 Nov;16(11):460-8.
94. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):24261-7.
95. Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 23;99(15):9727-32.
96. Lederer E. Cord factor and related trehalose esters. *Chem Phys Lipids*. 1976 Mar;16(2):91-106.
97. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63.
98. Ruf J, Wacker H, James P, Maffia M, Seiler P, Galand G, et al. Rabbit small intestinal trehalase. Purification, cDNA cloning, expression, and verification of glycosylphosphatidylinositol anchoring. *J Biol Chem*. 1990 Sep 5;265(25):15034-9.

99. Thevelein JM. Cyclic-AMP content and trehalase activation in vegetative cells and ascospores of yeast. Arch Microbiol. 1984 May;138(1):64-7.
100. Londesborough J, Varimo K. Characterization of two trehalases in baker's yeast. Biochem J. 1984 Apr 15;219(2):511-8.
101. Hamad MA, Zajdowicz SL, Holmes RK, Voskuil MI. An allelic exchange system for compliant genetic manipulation of the select agents *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Gene. 2009 Feb 1;430(1-2):123-31.
102. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. 1995 Dec 1;166(1):175-6.
103. Nandi T, Ong C, Singh AP, Boddey J, Atkins T, Sarkar-Tyson M, et al. A genomic survey of positive selection in *Burkholderia pseudomallei* provides insights into the evolution of accidental virulence. PLoS Pathog. Apr;6(4):e1000845.
104. 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 May;36(5):287-92.
105. 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 Sep;68(9):5377-84.



### ภาคผนวก (การเผยแพร่และนำไปใช้ประโยชน์)

1. เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมนานาชาติ World Melioidosis Congress 2013, Bangkok, Thailand ระหว่างวันที่ 18-20 กันยายน 2556 หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*” (เอกสารแนบหมายเลข1)
2. เสนอผลงานแบบปากเปล่าในงานประชุมนานาชาติ Joint International Tropical Medicine Meeting 2013, Bangkok, Thailand ระหว่างวันที่ 11-13 ธันวาคม 2556 หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*” (เอกสารแนบหมายเลข2)
3. เสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่13 ระหว่างวันที่ 16-18 ตุลาคม 2556 จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย หัวข้อเรื่อง “Trehalase regulates growth and virulence in *Burkholderia pseudomallei*” (เอกสารแนบหมายเลข3)