

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5580040

ชื่อโครงการ : บทบาทของปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์จากเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ ต่อการแสดงออกของโปรตีนภายในโฮสต์เซลล์ และความแพร่หลายของปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์ในเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. (นางสาว) พรพรรณ ภูมิรัตน์

ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมิวโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

อีเมล : pornpan.pum@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

Cycle inhibiting factor (Cif หรือ ปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์) คือ bacterial effector ที่พบในเชื้ออีโคไล ชนิด enteropathogenic และ enterohaemorrhagic (EPEC และ EHEC) ซึ่งเมื่อเชื้อแบคทีเรียฉีดโปรตีนนี้เข้าไปในโฮสต์เซลล์ชนิด HeLa โดย Type III secretion system (T3SS) แล้วมีผลทำให้ยับยั้งวงจรแบ่งตัวของโฮสต์เซลล์ อีกทั้งยังทำให้เกิดการสร้าง stress fibres ขึ้นภายในเซลล์ และกระตุ้นเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายในที่สุด ซึ่งต่อมามีรายงานว่า homologue ของ Cif ในเชื้อเบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ สายพันธุ์เคเก่าหกสองสี่สาม (CHBP) แต่ถึงกระนั้นยังไม่เคยมีการรายงานถึงหน้าที่ของ CHBP กับการติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ มาก่อน ดังนั้นในงานวิจัยหนึ่งของเราจึงสร้างเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ สายพันธุ์ที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมให้ผิดปกติไปจากเดิมบริเวณยีนปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์โฮสต์ขึ้น และทำการศึกษาจนพบว่าจะมีโปรตีน CHBP ปรากฏในไซโทพลาสซึมของโฮสต์เซลล์ U937 ที่มีการติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ โดยทั้งนี้พบว่า secretion ของโปรตีน CHBP ในโฮสต์เซลล์ U937 ขึ้นอยู่กับ T3SS ด้วย ยิ่งไปกว่านั้น CHBP ยังอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกก่อโรคของเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ เนื่องจากพบว่า เชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลีไอ สายพันธุ์ที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมให้ผิดปกติไปจากเดิมบริเวณยีนปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์โฮสต์ ลดความสามารถในการสร้าง plaque formation และ cytotoxicity ของโฮสต์ HeLa เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

ส่วนในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาต่อ โดยเริ่มต้นจากการทำ PCR เพื่อตรวจหา CHBP ในเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ จำนวน 32 สายพันธุ์ และยืนยันด้วย Western blot analysis ทำให้ทราบว่าในกลุ่มเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ มีปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์โฮสต์ หรือ CHBP อยู่ หลังจากนั้นผู้วิจัยได้แบ่งกลุ่มเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มี CHBP และไม่มี CHBP แล้วนำไปทดสอบ Plaque-forming efficiency เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของการมีปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์นี้ต่อการทำให้เกิดพยาธิสภาพของเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ แต่ผลการศึกษาพบว่าการมี CHBP ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการก่อพยาธิสภาพของเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาต่อเพื่อที่จะค้นหาว่าแล้ว CHBP มีประโยชน์อะไรกับเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ โดยใช้เทคนิค proteomics เพื่อศึกษาโปรตีนโฮสต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ ด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมตรี จากการศึกษาพบว่าโฮสต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ สายพันธุ์ที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมมีการปรับเปลี่ยนการสังเคราะห์โปรตีนแตกต่างไปจากโฮสต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยพบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 97 ชนิด และพบโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงจำนวน 166 ชนิด ในกลุ่มโปรตีนของโฮสต์เซลล์ที่ติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ สายพันธุ์ที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรม ซึ่งโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงไปนี้มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์หลายด้าน รวมทั้งด้าน microtubule network และ stress fibre formation นอกจากนี้ผลการศึกษา Pathway analysis ทำให้ทราบว่าโปรตีนบางชนิดในกลุ่มนี้มีความเชื่อมโยงกับการก่อพยาธิสภาพในลักษณะเช่นเดียวกันกับเชื้อ EPEC ดังนั้นจากการศึกษานี้ถือได้ว่าเป็นข้อมูลที่สำคัญที่ช่วยทำให้ทราบถึงความสำคัญของ CHBP ที่มีผลต่อการทำงานของโฮสต์เซลล์ โดยอย่างน้อยมีผลในการปรับเปลี่ยนการแสดงออกของโปรตีนภายใน HeLa cells ที่ติดเชื้อ เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ เช่น cytoskeleton rearrangement เพื่อให้เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อแบคทีเรีย แต่ถึงอย่างไรยังจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันต่อไป

คำหลัก : เบอโคลเดอเรีย สูดิมัลลิโอ, บทบาทของปัจจัยที่ยับยั้งวงจรของเซลล์, โฮสต์เซลล์, การแสดงออกของโปรตีน

Abstract

Project Code : MRG5580040

Project Title : Role of cycle inhibiting factor (Cif) in host protein expression and prevalence of Cif in *Burkholderia pseudomallei*

Investigator : Assistant Professor Dr. (Ms) Pornpan Pumirat

E-mail Address : pornpan.pum@mahidol.ac.th

Project Period : 2 years

A cycle-inhibiting factor (Cif) is a bacterial effector that present in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Cif is known to be injected into HeLa cells by *E. coli* Type III secretion system (T3SS) and induces cell cycle arrest, stress fibre formation and delayed apoptosis. Subsequently, a homologue of Cif in *B. pseudomallei* (CHBP) was identified. However, the function of *B. pseudomallei* CHBP in pathogenesis of meliodosis disease is still unclear. In our previous study, we constructed *B. pseudomallei chbP* mutant to explore the role of CHBP in *B. pseudomallei* infection. Infection of U937 macrophage with *B. pseudomallei* revealed that host cell contact was required for the secretion of CHBP. Interestingly, CHBP was secreted into the host cell in a manner dependent on the Bsa T3SS. Moreover, the responsibility of CHBP is likely to be important for *B. pseudomallei* pathogenesis as we found that *B. pseudomallei chbP* mutant showed the significant defects in abilities to induce plaque formation and cytotoxicity of HeLa cells when compared to the wild type.

In this study, we found the existence of *cif* homologue gene encoding for Cif in *B. pseudomallei* populations. To investigate the requirement of CHBP for pathogenesis of *B. pseudomallei* infection, *B. pseudomallei* clinical isolates were investigated on their virulence in term of plaque formation efficiency. The result showed that CHBP was not really intended to involve with pathogenicity of *B. pseudomallei*. In addition, we further investigated the host

protein expression profiles of infected HeLa cells using mass spectrometry. Investigation by this technique, we identified 97 up-regulated and 166 down-regulated proteins that significantly altered in HeLa cells infected with *chbP* mutant compared with that of *B. pseudomallei* wild type strain. Among these, there are proteins associated with microtubule network and stress fibre formation. Pathway analysis revealed that some of these proteins are linked with infection of pathogenic *E. coli*. Thus, based upon our finding, it is suggested that CHBP is involved in modulation of host cell process, at least by disturbing the protein expression of host cell cytoskeleton rearrangement, which might be benefit for the pathogenesis of *B. pseudomallei*. However, additional studies are needed to confirm these findings.

Keywords : *Burkholderia pseudomallei*, host protein expression, cycle inhibiting factor (Cif)