

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : สัญญาเลขที่ MRG5580161
ชื่อโครงการ : บทบาทควบคุมของยีนแฟลเจลลาต่อการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Helicobacter pylori*
ชื่อนักวิจัยหลักและสถาบัน : อาจารย์ ดร. ปาหนัน ภัททิยธนี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษาและสถาบัน : ศาสตราจารย์ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา มหาวิทยาลัยมหิดล
E-mail address : panan_etc@yahoo.com
ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Helicobacter pylori* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อเรื้อรังในชั้นเยื่อเมือกกระเพาะอาหารของผู้ป่วยซึ่งยากต่อการรักษาและสามารถกลับมาติดเชื้อซ้ำได้ ปัจจุบันยังไม่ทราบถึงกลไกที่แน่ชัดในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่แฟลเจลลามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนกลุ่มควบคุมการเคลื่อนที่ ประกอบด้วยโปรตีน FlgL, FlgE, FlgD, FlaA และ FlhD มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในเชื้อ *H. pylori* ที่ดำรงอยู่ในสถานะของไบโอฟิล์ม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของยีนแฟลเจลลาที่ควบคุมโปรตีนดังกล่าวข้างต้นในการควบคุมการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* โดยทำการสร้างเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *flgL*, *flgE*, *flgD*, *flaA* และ *flhD* ด้วยเทคนิค inverse PCR mutagenesis ศึกษาการเคลื่อนที่และการยึดเกาะของเชื้อกับเซลล์เยื่อบุผิวของมนุษย์ด้วยวิธี motility assay และ adhesion assay โดยการย้อมสีเซลล์เชื้อด้วยสี fluorescein isothiocyanate ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการประเมินการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี pellicle assay ทำการวัดปริมาณไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นโดยทำการย้อมไบโอฟิล์มดังกล่าวด้วยสี crystal violet และศึกษาโครงสร้างสามมิติของไบโอฟิล์มของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากการศึกษาสามารถสร้างเชื้อที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์ได้เพียงสายพันธุ์เดียว พบว่ายีน *flhD* ไม่ส่งผลกระทบต่อความสามารถของเชื้อ *H. pylori* ในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิวกลองเสียง HEP-2 และการสร้างไบโอฟิล์ม แต่การกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวส่งผลให้เชื้อเคลื่อนที่ได้ลดลง สร้างไบโอฟิล์มช้าลง และยังส่งผลต่อโครงสร้างที่สมบูรณ์ของไบโอฟิล์มที่เชื้อ *H. pylori* สร้างขึ้นอีกด้วย โดยเชื้อที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์เกาะกลุ่มกันอย่างหลวมๆ ภายในโครงสร้างไบโอฟิล์ม และพบการเชื่อมกันระหว่างตัวเชื้อด้วยเส้นใยจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะไบโอฟิล์มของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC43504 ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ นอกจากนี้เชื้อ *H. pylori* ที่มียีน *flhD* กลายพันธุ์มีแฟลเจลลาที่สั้นกว่าปกติ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ถือเป็นหลักฐานขั้นต้นที่แสดงให้เห็นว่ายีน *flhD* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์ม และจำเป็นสำหรับการเคลื่อนที่ของเชื้อ *H. pylori*

คำหลัก : *Helicobacter pylori*, biofilm, flagella, *flhD*

Abstract

Project Code : MRG5580161
Project Title : Regulatory role of flagellar gene complex in *Helicobacter pylori* biofilm formation
Investigator : Dr.Panan Pattiyathanee, Chulalongkorn University
Mentor : Prof.Dr. Wanpen Chaicumpa, Mahidol University
E-mail Address : panan_etc@yahoo.com
Project Period : 2 years

Helicobacter pylori biofilm formation is considered as a cause of difficult-to-treat, chronic and recurrent infections in gastric mucosa of patients. However, the regulation of *H. pylori* biofilm formation is still poorly understood. Flagella contribute to a biofilm formation by many bacteria. Previous study has shown an upregulation of movement controlling proteins during *H. pylori* biofilm mode of growth, including FlgL, FlgE, FlgD, FlaA and FliD. Here, role of flagellar genes in a regulation of biofilm formation of *H. pylori* was investigated. *H. pylori* flgL, flgE, flgD, flaA and fliD mutants were constructed by inverse PCR mutagenesis. Bacterial mobility and adhesion to human epithelial cells were assessed by motility assay and fluorescein isothiocyanate staining adhesion assay, respectively. Biofilm formation was evaluated both by pellicle assay and quantitatively by crystal violet staining. The cyto-architecture of biofilm was photographed by scanning electron microscopy. Only *fliD* mutant could be successfully constructed here. We observed no significantly different levels of bacterial adhesion and biofilm formation between the wild-type ATCC 43504 and the *fliD* mutant *H. pylori*. Apart from a poor motility, the *fliD* mutant had a slightly delayed biofilm formation as well as a remarkable incomplete cyto-architecture of biofilm. Bacterial cells residing in biofilm of the *fliD* mutant, compared to that of wild-type, showed a loose accumulation with less apparent cross-linking fibrils. Furthermore, most of the mutant cells had truncated flagella. This study provided preliminary evidences of *fliD* that potentially regulated biofilm formation and also was required for motility of *H. pylori*. Further works are being required in order to elucidate a precise molecular mechanism regulating biofilm formation of *H. pylori*.

Keywords : *Helicobacter pylori*, biofilm, flagella, *fliD*