



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาเกี่ยวกับ type III secreted protein และ actin-based motility
ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในระดับโมเลกุล”

รศ.ดร. สุนีย์ กอรรพศรีเศรษฐ์

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

31 ธันวาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาเกี่ยวกับ type III secreted protein และ actin-based motility
ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในระดับโมเลกุล”

รศ.ดร. สุนีย์ กอรปศรีเศรษฐ์

ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน

คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : RMU5080015

Project Title : Molecular analysis of *Burkholderia pseudomallei* type III secreted proteins and actin-based motility

Investigator : Assoc. Prof. Sunee Korbsrisate
Department of Immunology
Faculty of Medicine Siriraj Hospital
Mahidol University, Bangkok 10700

E-mail Address : grsks@mahidol.ac.th

Project Period : 3 years 2006-2009

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis, a severe and fatal human infectious disease which is endemic in Southeast Asia and Northern Australia. In Thailand, 2,000 to 3,000 new cases are diagnosed every year. The incidence of clinical melioidosis is estimated to be 3.6-5.5 cases per 100,000 per annum in the northeastern part of Thailand. The infection is primarily acquired *via* the inoculation and inhalation. The most severe form of melioidosis leads to death in approximately 40-50% of patients in Thailand despite optimal antibiotic therapy.

The main objective of this study is to investigate a *B. pseudomallei* virulence factor called BimA (Burkholderia Intercellular Motility) and the proteomic profiling of *B. pseudomallei* under salt stress. BimA protein was identified as a bacterial virulence factor involved in actin-based motility of *B. pseudomallei* inside host cell. Data obtained from this study has important implications for the design and reliability of *bimA* based tests to differentiate between *Burkholderia* species and highlight the existence of polymorphisms that have the potential to influence actin binding and assembly for *B. pseudomallei* intercellular spread and virulence. For proteomic study, we report the first dataset of the secretome of *B. pseudomallei* and its alterations during salt stress. These findings may provide some novel insights into the adaptive response of this microorganism to survive during the salt stress. Further characterizations and functional analyses of these altered proteins may lead to identification of new therapeutic targets or vaccine development.

Keywords : *Burkholderia pseudomallei* , BimA, salt stress, proteomic

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU5080015

ชื่อโครงการ : การศึกษาเกี่ยวกับ type III secreted protein และ actin-based motility ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ในระดับโมเลกุล

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร. สุนีย์ กอปรศรีเศรษฐ์
ภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10700

E-mail Address : grsks@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (2549-2552)

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียติดสปีแกรมลบ สาเหตุของโรคติดเชื้อที่มีชื่อว่า โรคเมลิอยด์ (melioidosis) โรคดังกล่าวพบระบาดมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของโรคเมลิอยด์ประมาณ 3.6-5.5 รายต่อประชากร 100,000 ลักษณะอาการของโรคพบได้ตั้งแต่ติดเชื้อเฉพาะที่ไปจนถึงติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) ในรายรุนแรงมีอัตราการตายของผู้ป่วยโรคเมลิอยด์สูงถึง 40-50% โรคนี้ติดต่อได้โดยทางบาดแผลและทางเดินหายใจ แบคทีเรียชนิดนี้ต้องอาศัยปฏิชีวนะหลายชนิดและในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนสำหรับโรคเมลิอยด์

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนชนิดหนึ่งของ *B. pseudomallei* มีชื่อว่า BimA (*Burkholderia* Intracellular Motility) โปรตีนดังกล่าวจัดเป็น virulence factor ของเชื้อ *B. pseudomallei* ข้อมูลที่ได้จากการศึกษา BimA สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการออกแบบการทดสอบแยกความแตกต่างระหว่าง *Burkholderia* species ต่างกัน และยังชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายของยีน *bimA* ใน *B. pseudomallei* สายพันธุ์ต่างๆ

นอกจากนั้นโครงการวิจัยนี้ ยังอาศัยเทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่หลั่งออกจากเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูกเลี้ยงในสภาวะเกลือเข้มข้นสูง ผลการศึกษาพบว่า *B. pseudomallei* ที่เลี้ยงในสภาวะเกลือเข้มข้นสูงนั้นมีการเปลี่ยนแปลงการหลั่งโปรตีนหลายชนิดเพื่อความอยู่รอดของแบคทีเรีย กลุ่มของโปรตีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะได้มีการศึกษาต่อไปอันอาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรค รวมทั้งการผลิตวัคซีนป้องกันโรคในอนาคต

คำหลัก: *Burkholderia pseudomallei*, BimA, เกลือเข้มข้นสูง, โปรตีโอมิกส์

เนื้อหางานวิจัย

Burkholderia pseudomallei is a causative agent of melioidosis, a severe and fatal human infectious disease which is endemic in Southeast Asia and Northern Australia. Melioidosis is one of the most important causes of fatality from bacteremia in the northeastern part of Thailand. In northeastern Thailand alone, an estimated 20% of community acquired septicemia and approximately 40% of deaths due to the complications associated with bacterial sepsis can be attributed to *B. pseudomallei*. This bacterial pathogen is able to persist in the host for a long time and develop severe disease later in life when the host immune system is weakened. Latent infection or relapse is believed to result from the ability of *B. pseudomallei* to invade non-phagocytic cell and to survive and replicate within phagocytes. The mechanism that *B. pseudomallei* generates to survive within host cells, especially phagocytes is largely unknown.

In common with other intracellular pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri*, *B. pseudomallei* can induce continuous polymerization of actin at one pole of the bacterial cell (1,2). This process results in the formation of *B. pseudomallei*-containing host cell membrane protrusions that may facilitate cell-to-cell spread and promote multinucleated giant cell (MNGC) formation. Recently, a bacterial factor (BimA, *Burkholderia* intracellular motility A) required for this process has been identified (3). This protein was localized at the pole of the bacteria at which actin tails formed inside cells. Studies on actin-based motility will increase our understanding of how *B. pseudomallei* exploits host cells and may lead to the design pharmacological agents to inhibit intracellular proliferation and cell-to-cell spread of the organism.

Natural diversity exists in the prevalence and sequences of bacterial factors required for actin-dependent movement, such as *Listeria* ActA, *Shigella* and entero invasive *Escherichia coli* IcsA etc. The impact of polymorphisms on actin assembly, cell-to-cell spread, and pathogenesis is ill defined. The BimA orthologues described to date contain variable numbers and types of a proline-rich motif, and variation in the number of such motifs has been related to the efficiency of actin assembly by entero hemorrhagic *E. coli* TccP and *Listeria* ActA. In this study, we sampled the prevalence and sequence of BimA in clinical and environmental isolates of *B. pseudomallei*, both to

evaluate the reliability of differential PCR tests differential PCR tests based on *bimA* and to examine the conservation of motifs and domains predicted to be important for the subversion of actin dynamics by this factor. The data generated from this study has been published in Journal of Clinical Microbiology 2008; 46: 2418-2422 (attach #1).

Regarding its survival, *B. pseudomallei* as a saprophyte, is a difficult micro-organism to kill and can survive in soil and water for many years (4). Therefore, it must have adaptive mechanisms to survive in these environments even with various stresses due to environmental changes (e.g., alterations in salt contents, osmolarity, pH, etc.). However, these mechanisms of its adaptive response to environmental changes remain largely unknown. We therefore conducted to explore adaptive response in *B. pseudomallei* during a salt stress. After the stationary phase was reached, the bacteria were grown further with or without an addition of NaCl (at a final concentration of 150 mM) to the fresh culture medium. The secreted proteins were then isolated and analyzed by a gel-based proteomics method. Using this approach, a number of secreted proteins with altered levels were identified. The data has been written and accepted to be published in Biochemica et Biophysica Acta 2009; 1794: 898-904 (attach #2).

References

1. Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T, Utaisincharoen P, Sirisinha S. *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. Infect Immun. 2000; **68**: 5377-84.
2. Stevens JM, Galyov EE, Stevens MP. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol. 2006; **4**: 91-101.
3. Stevens MP, Stevens JM, Jeng RL, Taylor LA, Wood MW, Hawes P, et al. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*. Mol Microbiol. 2005; **56**: 40-53.
4. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management Clin Microbiol Rev. 2005; **18**: 383–416.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง
 - Sitthidet C, Stevens JM, Chantratita N, Currie BJ, Peacock SJ, **Korbsrisate S**, Stevens MP. Prevalence and sequence diversity of a factor required for actin-based motility in natural populations of *Burkholderia* species. J Clin Microbiol 2008; **46**:2418-2422. IF = 3.708.
 - Pumirat P, Saetun P, Sinchaikul S, Chen S-T, **Korbsrisate S**, Thongboonkerd V. Altered secretome of *Burkholderia pseudomallei* induced by salt stress. Biochim Biophys Acta 2009; **174**: 898-904. IF = 3.17.
2. ผลิตภัณฑ์ตีพิมพ์เอกสาร 1 คน ได้แก่ ดร. พรพรรณ ภูมิรัตน์
3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ เช่น
 - **Pumirat P**, Cuccui J, Stabler RA, Muangsombut V, Singsuksawat E, Stevens MP, Stevens JM, Wren BW, **Korbsrisate S**. Global transcriptional profiling of *Burkholderia pseudomallei*, a bioterrorism agent, under salt stress reveals effects on the invasion- and virulence-associated type III secretion system. Oral presentation. Euroscience Mediterranean Event (ESME) 2009, October 15-19, 2009, at the "TECHNOPOLIS" Altens Gazi Industrial Archaeological Park, Athens, Greece.
 - **Pumirat P**, Cuccui J, Stabler RA, Singsuksawat E, Stevens MP, Stevens JM, Wren BW, **Korbsrisate S**. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional profiling under salt stress and the effect on a type III secretion system. Oral and poster presentation. Joint Conference in Medical Sciences 2009, June 22-24, 2009, at Centara Grand & Bangkok Convention Center at Central World, Bangkok, Thailand.
 - **Pumirat P**, Cuccui J, Stabler RA, Singsuksawat E, Stevens MP, Stevens JM, **Korbsrisate S**, Wren BW. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional profiling under salt stress and the effect on a type III secretion system. Oral presentation. 30th AMS Anniversary Conference, March 16-18, 2009, at Pullman Khon Kaen Hotel, Khon Kaen. Thailand.