



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความเกี่ยวข้องของ NADPH oxidase ในการตายของ
เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

Involvement of NADPH oxidase in the cell death of
macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*

โดย ดร. อิชฎา มุ่งสันติสุข

พฤษภาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความเกี่ยวข้องของ NADPH oxidase ในการตายของ
เซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

Involvement of NADPH oxidase in the cell death of
macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร.อิษฏา มุ่งสันติสุข

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	1
บทคัดย่อไทย	2
บทคัดย่ออังกฤษ	3
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary).....	4
เนื้อหางานวิจัย	
1. บทนำ	6
2. วิธีการทดลอง	9
2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์	9
2.2 การ treat เซลล์	9
2.3 การ infect เซลล์.....	9
2.4 การวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์	10
2.5 การวัดปริมาณ ROS	10
2.6 การ silence ยีน	10
2.7 ตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอและโปรตีน	10
2.8 ค่าทางสถิติ	11
3. ผลการทดลอง	12
3.1 เชื้อ <i>B. pseudomallei</i> มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แมคโครฟาจ	12
3.2 การทดสอบการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจ.....	15
3.3 <i>B. pseudomallei</i> สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ได้น้อยในเซลล์แมคโครฟาจ...	17
3.4 การตรวจวัดการแสดงออกของ NADPH oxidase subunits ในเซลล์แมคโครฟาจ ที่ได้รับเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	19
3.5 เชื้อ <i>B.pseudomallei</i> กระตุ้นให้เกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจ.....	22
3.6 บทบาทของ autophagy กับความอยู่รอดของเชื้อ <i>B.pseudomallei</i> ในเซลล์แมคโครฟาจ.....	24
3.7 ความสัมพันธ์ของ NADPH oxidase และการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจ ที่ได้รับเชื้อ <i>B.pseudomallei</i>	26
4. บทวิจารณ์	29
5. หนังสืออ้างอิง.....	32
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.....	35
ภาคผนวก	36

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
Figure 1 The morphological changes in <i>B.pseudomallei</i> -infected macrophages.....	13
Figure 2 The intracellular survival of <i>B.pseudomallei</i> wild type and LPS mutant in mouse macrophages.....	14
Figure 3 Effect of DPI on viability of macrophages and bacterial survival.....	16
Figure 4 The reactive oxygen species (ROS) production in phagocytes.....	18
Figure 5 The ROS production in human monocytes.....	18
Figure 6 The mRNA expression of NOX2 subunits in mouse macrophages.....	20
Figure 7 The protein expression of p40 ^{phox} and p67 ^{phox} in mouse macrophages.....	21
Figure 8 The protein expression of p47 ^{phox} in mouse macrophages.....	21
Figure 9 The protein expression of LC3-II in mouse macrophages.....	23
Figure 10 The intracellular survival of <i>B. pseudomallei</i> in cells pretreated with rapamycin or wortmannin.....	25
Figure 11 The expression of LC3-II protein and phosphorylated p40 ^{phox} protein in NOX2 - deficient mouse macrophages induced by <i>B.pseudomallei</i> or LPS mutant.....	28

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

Table1 The specific primer of each subunit and the expected size of PCR product.. 11

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยตลอดระยะเวลาเงินทุน ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการหน่วยเพาะเลี้ยงเซลล์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่เกื้อหนุนสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือและสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณนักวิจัยผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้คำแนะนำและปรึกษา ได้แก่ รศ.ดร. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ และ ศ.ดร. สติตย สิริสิงห์ นอกจากนี้ ขอขอบคุณนางสาว ทรายทอง มุณีแก้ว นักศึกษาปริญญาโท และนักวิจัยทุกคนในห้องปฏิบัติการหน่วยเพาะเลี้ยงเซลล์ สำหรับคำแนะนำในด้านเทคนิคต่างๆในการทำวิจัย ซึ่งทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จได้

อิษฎา มุ่งสันติสุข

รหัสโครงการ : RMU5180046

ชื่อโครงการ : ความเกี่ยวข้องของ NADPH oxidase ในการตายของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน : ดร.อิษฏา มุ่งสันติสุข

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail address : scilw@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 15 พฤษภาคม 2551 ถึงวันที่ 14 พฤษภาคม 2554

บทคัดย่อ

เบอร์โคเดอเรีย สูดมาเลียย เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคเมลิออยโดสิส โดยสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ทั้งในเซลล์ประเภทกลืนกินและไม่กลืนกิน และมีความสามารถในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำงานและบทบาทของ NADPH oxidase (NOX2) ในเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW 264.7) ต่อความอยู่รอดของเชื้อเบอร์โคเดอเรีย สูดมาเลียย สายพันธุ์ดั้งเดิม และเชื้อที่บกพร่องต่อการสร้าง LPS ของมัน โดยพบว่าเชื้อทั้งสองสามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NADPH oxidase ได้ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ แต่การทำงานของ NADPH oxidase ไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ นอกจากนี้ ยังพบการสะสมของโปรตีน LC3-II ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อภายใน 15 นาที ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงการเกิด autophagy ในระยะแรกๆของการได้รับเชื้อ จากการศึกษาในเซลล์แมคโครฟาจที่มีความบกพร่องของ p40^{phox} (subunit หนึ่งของ NOX2) ที่ได้รับเชื้อที่บกพร่องต่อการสร้าง LPS พบว่า NADPH oxidase มีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการ autophagy ในแมคโครฟาจ ซึ่งเป็นไปได้ที่เชื้อนี้จะมีสัญญาณที่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ปกติในการที่จะไปกระตุ้น autophagy จากผลที่ได้รับยังแสดงให้เห็นว่าแม้การทำงานของ NADPH oxidase และการเกิด autophagy ในเซลล์หลังการได้รับเชื้อนั้นเป็นกลไกที่จำเป็นและสำคัญ ก็อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ การตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อเบอร์โคเดอเรีย สูดมาเลียย อาจจะขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ดังนั้นการศึกษการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์ชนิดอื่นๆจะทำให้ได้รับข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ และการศึกษาโดยใช้แบคทีเรียที่มีความบกพร่องต่อปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคจะช่วยให้เข้าใจกลไกการก่อให้เกิดโรคของเชื้อชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: เบอร์โคเดอเรีย สูดมาเลียย, แมคโครฟาจของหนู, autophagy, LPS, NADPH oxidase

Project Code : RMU5180046

Project Title : Involvement of NADPH oxidase in the cell death of macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*

Investigators : Dr. Idsada Mungsantisuk
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail address : scilw@mahidol.ac.th

Project Period : 15 May 2008 – 14 May 2011

Abstract

Burkholderia pseudomallei is gram-negative bacterium causing melioidosis. This bacterium can survive and replicate in both phagocytic and non-phagocytic cells and has the ability to escape the host defense. This research focused on function and the role of NADPH oxidase (NOX2) in mouse macrophage (RAW264.7) on intracellular survival of *B. pseudomallei* and its LPS mutant. Both bacteria could induce the activity of NADPH oxidase in the early phase of infection. However, NOX2 activation did not alter the number of intracellular bacteria. Furthermore, the accumulation of LC3-II protein in macrophages was detected within 15 min after infection indicating the activation of autophagy in the early phase of infection. The study in p40^{phox} knockdown cells reveals the contribution of NADPH oxidase to regulating autophagy only in the macrophages infected with LPS mutant suggesting that LPS mutant uses different signals from the wild type to activate autophagy. Although the induction of NADPH oxidase and autophagy are necessary in host defense against bacteria, these may not be sufficient to kill the bacteria in macrophages. The responses of host cells against *B. pseudomallei* are cell-type dependent; therefore, study of NOX2 function in other cell types may help to gain more information of cellular mechanisms in response to this bacterium. Furthermore, use of bacterial mutants to study virulence factors may help to understand the pathogenesis of *B. pseudomallei*.

Keywords: autophagy, *Burkholderia pseudomallei*, mouse macrophage, LPS, NADPH oxidase

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

Executive Summary

Burkholderia pseudomallei (*B. pseudomallei*) เป็นแบคทีเรียทรงแท่ง ชนิดกรัมลบ ที่ทำให้เกิดโรคเมลิอยโดสิส (Meliodosis) เชื้อนี้สามารถมีชีวิตและเพิ่มปริมาณในเซลล์กลืนกิน เช่น แมคโครฟาจ และที่ไม่ใช่เซลล์กลืนกิน เช่น เซลล์เยื่อบุผิว ได้ (Pruksachartvuthi et al., 1990; Jones et al., 1996) จากรายงานการวิจัย เชื้อชนิดนี้สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ได้ โดยจากการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ของเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่าเซลล์แมคโครฟาจมีอัตราการผลิตไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และการแสดงออกของ inducible nitric oxide (iNOS) ที่ต่ำ ทำให้แมคโครฟาจไม่สามารถทำลายเชื้อได้ (Utaisinchaoen et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังจากได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งแบคทีเรียสามารถหลบเลี่ยงการถูกทำลายโดยแมคโครฟาจและสามารถทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เป็นหลายนิวเคลียส เหล่านี้อาจเป็นกลไกหนึ่งของเชื้อที่ทำให้ตัวเชื้อเองสามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์เจ้าบ้าน ในขณะที่เซลล์เองก็มีการป้องกันตัวเองโดยมีการตอบสนองผ่านสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น การเกิด apoptosis (Lengwehasatit et al, 2008) การเกิด autophagy (Cullinane et al, 2008) และ การทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ซึ่งมีบทบาทต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย (Breitbach et al, 2006) งานวิจัยนี้มุ่งไปที่กลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* โดยศึกษาความเกี่ยวข้องของการทำงานของ NADPH oxidase และกระบวนการเกิด autophagy เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อนี้ได้

โครงการวิจัยนี้ได้ศึกษาการทำงานของ phagocytic NADPH oxidase (NOX2) ที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW264.7 cell) หลังได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยจะทำการวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) และตรวจสอบการแสดงออกของ NOX2 subunit ต่างๆ ในระดับ mRNA และโปรตีน ที่เกิดขึ้น และศึกษาบทบาทของ NOX2 ต่อความอยู่รอดของแบคทีเรียภายในเซลล์ จากการศึกษาค้นพบว่า NOX2 ทำงานได้ในเซลล์แมคโครฟาจ แต่ ROS ที่ผลิตขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับโมโนไซต์ของมนุษย์ การแสดงออกของ NOX2 subunit ในระดับ mRNA และ โปรตีน เกิดขึ้นในช่วงแรกๆ (15 นาที) ของการได้รับเชื้อ อย่างไรก็ตามการทำงานของ NOX2 นี้ไม่ได้ส่งผลให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์ลดลง เป็นที่ทราบกันว่าเชื้อ *B.pseudomallei* สามารถหลบหนีออกมาจาก phagocytic vesicle ได้ และอีกหนึ่งใน innate immunity ที่มีความสำคัญในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่หลบหนีออกมา คือ autophagy เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถลดหรือเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ autophagy และการผลิต ROS ของเซลล์ก็มีส่วนสำคัญในการเกิด autophagy ด้วยเช่นกัน ROS จากการทำงานของ NOX2 อาจเป็นสัญญาณไปยัง phagophore-LC3 เพื่อจะจับเชื้อ *B.pseudomallei* ที่หนีรอดมาได้เข้าไปใน autophagosome งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของ NOX2 และกระบวนการเกิด autophagy อีกทั้งบทบาทของ autophagy ต่อความอยู่รอดของเชื้อ

B.pseudomallei รวมทั้งยังได้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่ LPS mutant ของเชื้อชนิดนี้ด้วย เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกันกับเชื้อ wild type การศึกษาพบว่า แม้เชื้อ *B.pseudomallei* wild type จะกระตุ้นให้เซลล์แมคโครฟาจเกิด autophagy ได้ในระยะแรกของการติดเชื้อ (วัดจากการสะสมของโปรตีน LC3) แต่การแสดงออกของโปรตีน LC3 ไม่ได้ลดลงในเซลล์ที่มีความบกพร่องในหน้าที่ของ NADPH oxidase (p40^{phox} knockdown เซลล์) ในขณะที่ LPS mutant ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์เกิด autophagy ได้น้อยกว่า และพบการแสดงออกของโปรตีน LC3 ลดลงใน p40^{phox} knockdown เซลล์ แสดงว่า NOX2 มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ LPS mutant และดูเหมือนว่าทั้งเชื้อ *B.pseudomallei* wild type และ LPS mutant สามารถกระตุ้นให้เกิดกลไก autophagy ได้ในสัญญาณที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามกระบวนการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจนี้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยู่รอดภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองชนิด

จากผลที่ได้รับทำให้สรุปได้ว่า เชื้อ *B.pseudomallei* สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NADPH oxidase ได้ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ โดยจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อย่างไรก็ตาม NADPH oxidase ไม่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ การศึกษาใน p40^{phox} knockdown เซลล์ที่ได้รับเชื้อ LPS mutant พบว่า NADPH oxidase มีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการ autophagy ในแมคโครฟาจ แต่กระบวนการ autophagy นี้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิด การทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์หลังการได้รับเชือนั้นอาจไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ แต่ก็มี ความสำคัญ โดยอาจส่งสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ให้เกิดการตอบสนองต่อเชื้อ *B.pseudomallei*

เนื้อหาทางวิจัย

1. บทนำ

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียชนิดกรัมลบที่ทำให้เกิดโรค melioidosis ซึ่งระบาดในประเทศเขตร้อน ได้แก่ ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางเหนือของประเทศออสเตรเลีย และประเทศในเขตเส้นศูนย์สูตร รวมทั้งประเทศไทยด้วย (Howe et al, 1971; Chaowagul et al, 1989; Leelarasamee and Bovornkitti, 1989; Yabuuchi and Arakawa, 1993) โดยคนและสัตว์สามารถติดเชื้อได้จากการสัมผัสกับแหล่งดินและน้ำหรือการหายใจเอาฝุ่นละอองที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีเชื้อจะผ่านเข้าสู่ร่างกายคนทางบาดแผลและเข้าสู่กระแสเลือด และทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการไข้สูง ซึ่งตรงนี้อาจเกิดจากสารพิษที่ตัวเชื้อปล่อยออกมา รวมทั้งเกิดจากการที่ร่างกายพยายามสร้างกลไกการป้องกันตัวขึ้นในกระแสเลือดโดยการปล่อยสารเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันต้านทานออกมา แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้จะมีการกระตุ้นกลไกอย่างรุนแรงทำให้ร่างกายหลั่งสารนี้ออกมามากเกินไป จึงทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการช็อค และเสียชีวิตก่อนการวินิจฉัยโรค (Mays and Ricketts, 1975) ซึ่งอาการเหล่านี้ หากผู้รักษาไม่ทราบหรือไม่สังเกตว่าน่าจะเป็นอาการของโรค Melioidosis และผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากๆ แล้วอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาเพียง 2-3 วัน ทั้งๆ ที่หากได้รับการรักษาอย่างถูกต้องและทันท่วงที ผู้ป่วยจะสามารถหายเป็นปกติโดยง่าย

B. pseudomallei สามารถมีชีวิตและเพิ่มปริมาณในเซลล์ทั้ง phagocytic cells เช่น แมคโครฟาจ และ non-phagocytic cells เช่น epithelial cells ได้ (Jones et al, 1996; Pruksachartvuthi et al, 1990) จากรายงานการวิจัย เชื้อชนิดนี้สามารถหลบระบบภูมิคุ้มกันของ innate immunity โดยเชื้อสามารถยับยั้งการทำงานของ inducible nitric oxide (iNOS) และ กระตุ้น suppressor ของ cytokine signaling 3 (SOC3) ในเซลล์แมคโครฟาจได้ (Utainsincharoen et al, 2001; Ekchariyawat et al, 2005) นอกจากนี้ยังมีการพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์หลังการได้รับเชื้อชนิดนี้ เช่น การเกิด actin-associated membrane protrusion ทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์หลายเซลล์กลายเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (Multinucleated giant cells) เชื้อ *B. pseudomallei* ยังกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเป็นพิษ โดยพบการหลั่งของเอนไซม์ lactate dehydrogenase ออกมาจากเซลล์ ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายในที่สุดทั้งแบบ apoptosis และ necrosis (Kespichayawattana et al, 2000; Lengwehasatit et al, 2008) ปัจจัยที่ทำให้เชื้อชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคนั้นมีหลายปัจจัย ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS), capsule, flagella, type three secretion system, type IV pilli และ quorum sensing เป็นต้น โดย LPS, pili และ capsule ของเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรคในฟาโกไซต์แต่ไม่ได้จำเป็นต่อการกระตุ้นให้เกิด MNGCs และความอยู่รอดของเชื้อ

B. pseudomallei ใน epithelial cells (Essex-Lopresti et al, 2005; Wikraiphat et al, 2009) ส่วน type three secretion system นั้นทำให้เชื้อง่ายต่อการบุกรุกและหลบหนีจาก phagocytic vesicle (Stevens et al, 2002; Stevens et al, 2003)

การตอบสนองของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* นั้นจะมีหลายกลไก เช่น ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่เฉพาะเจาะจงและแบบเฉพาะ (adaptive immunity และ innate immunity) โดย innate immune จะมีบทบาทต่อการติดเชื้อของ *B. pseudomallei* โดยทันที ส่วน adaptive immune จะควบคุมการติดเชื้อโดยการทำงานของลิมโฟไซต์ซึ่งผลิตไซโตไคน์หรือแสดงตนเป็น antigen-presenting cells หนึ่งในกลไกการป้องกันตนเองของเซลล์ที่งานวิจัยนี้จะศึกษา คือ การทำงานของ NADPH oxidase ซึ่งจัดเป็น innate immunity โดยปกติเมื่อแบคทีเรียเข้าสู่เซลล์โดยขบวนการ phagocytosis จะทำให้เกิดการก่อตัวขึ้นของ NADPH oxidase membrane complex ภายใน phagosome ของฟาโกไซติกเซลล์ NADPH oxidase จะย้ายอิเล็กตรอนเดี่ยวจาก intracellular NADPH ให้กับ extracellular oxygen ทำให้เกิด superoxide ซึ่งเป็นตัวตั้งต้นของ reactive oxygen species (ROS) หลายตัวที่จะไปทำหน้าที่กำจัดเชื้อที่เข้ามา นอกจากนี้ superoxide ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ยังทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้อีกด้วย เอนไซม์ NADPH oxidase ของฟาโกไซต์ (หรือ NOX2 ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase ที่ปรากฏในเซลล์ฟาโกไซต์) ประกอบไปด้วยส่วนประกอบที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ คือ gp91^{phox} และ p22^{phox} (cytochrome b 558) และ ส่วนประกอบที่อยู่ในส่วนของไซโตพลาสซึม คือ p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} และ RacGTPase หากเกิดความผิดปกติของยีนที่ควบคุม subunit หนึ่งของเอนไซม์ NADPH oxidase จะทำให้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการป้องกันการติดเชื้อได้น้อยมาก โดยเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถผลิต catalase เพื่อป้องกันตนเองจากการถูกทำลายโดย hydrogen peroxide ซึ่งผลิตจากแมคโครฟาจและนิวโทรฟิล จากการศึกษาการติดเชื้อ *B. pseudomallei* ในหนูพบว่า หนูที่ขาดการทำงานของ NADPH oxidase จะไวต่อการติดเชื้อ (Breitbach et al, 2006)

โครงการวิจัยนี้จะศึกษาการทำงานของ phagocytic NADPH oxidase (NOX2) ที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW264.7 cell) หลังได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* โดยจะทำการวัดปริมาณ ROS และตรวจสอบการแสดงออกของ NOX2 subunit ต่างๆในระดับ mRNA และโปรตีน ที่เกิดขึ้น และศึกษาบทบาทของ NOX2 ต่อความอยู่รอดของแบคทีเรียภายในเซลล์ นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันว่าเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถหลบหนีออกมาจาก phagocytic vesicle ได้ และอีกหนึ่งใน innate immunity ที่มีความสำคัญในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่หลบหนีออกมา คือ autophagy เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถลดหรือเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ autophagy และการผลิต ROS ของเซลล์ก็มีส่วนสำคัญในการเกิด autophagy ด้วยเช่นกัน ROS จากการทำงานของ NOX2 อาจเป็นสัญญาณไปยัง phagophore-LC3 เพื่อจะจับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่หนีรอดมาได้เข้าไปใน autophagosome งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของ NOX2 และกระบวนการเกิด autophagy อีกทั้งบทบาทของ autophagy ต่อความอยู่รอดของเชื้อ

B.pseudomallei รวมทั้งยังได้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่ LPS mutant ของเชื้อชนิดนี้ด้วย เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกันกับเชื้อ wild type การศึกษานี้ทั้งหมดนี้จะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์ต่อเชื้อ *B. pseudomallei* มากยิ่งขึ้น เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อนี้ได้

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ

1. เซลล์แมคโครฟาจของหนู (RAW264.7, ATCC#TIB-71 ได้มาจาก the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)) จะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ผสม 10% ซีรัม บ่มใน CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะแวดล้อม 95% บรรยากาศ และ 5% CO₂ เซลล์ที่นำไปทำการทดลอง จะถูก plate ใน 6-well plates โดยมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 1×10^6 เซลล์ (หรือตามต้องการในการทดลองนั้นๆ)

2. เซลล์ฟาโกไซต์ของมนุษย์ ซึ่งได้รับมาจากห้องปฏิบัติการ Tissue culture ของ รศ.ผศ. พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบในงานวิจัยนี้ เนื่องจากเซลล์หลักที่ใช้ซึ่งคือ RAW264.7 นั้น ให้ผลการทดลองในส่วนของการ ROS production ที่ไม่ชัดเจน จึงต้องใช้เซลล์ฟาโกไซต์ของมนุษย์ซึ่งผลิต ROS ที่สามารถวัดปริมาณได้ โดยเซลล์ฟาโกไซต์นี้ได้ทำการแยกจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีโดยวิธี Ficoll-Hypaque density gradient separation และ Dextran sedimentation และทำการแยกเซลล์แต่ละชนิดให้บริสุทธิ์ต่อไปจนได้ Peripheral blood mononuclear (PBMCs), monocytic cells และ polymorphonuclear cells (PMNs)

2.2 การ treat เซลล์

เซลล์ที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนจะได้รับการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ การ treat เซลล์ด้วย NADPH oxidase inhibitor นั้นจะเติม NADPH oxidase inhibitor (diphenyliodonium chloride; DPI) ตามเวลาที่จะศึกษา และทำการ infect เซลล์ด้วยเชื้อแบคทีเรีย สำหรับการ treat ด้วย phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) จะใช้ความเข้มข้น 200 ng/ml สำหรับการกระตุ้นให้เซลล์เกิด autophagy หรือยับยั้งการเกิด autophagy จะทำการ treat เซลล์ด้วย 4 μ M rapamycin หรือ 100 nM wortmannin ตามลำดับ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการได้รับเชื้อ

2.3 การ infect เซลล์

Berkholderia pseudomallei strain 1026b (wild type) และ SRM117 (LPS mutant) ได้รับมาจาก Prof. D.E. Woods (University of Calgary, Canada) โดยทำการเลี้ยงใน Luria-Bertani (LB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับ LPS mutant นั้นจะเติม 50 μ g/ml Tetracyclin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

ในวันที่ทำการ infect นั้นให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่และเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปในแต่ละหลุมของจานเพาะเซลล์ตาม multiplicity of infection (MOI) ที่กำหนด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์จะถูกล้างโดย phosphate-buffered saline (PBS) จำนวน 3 รอบ เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมด้วย kanamycin 250 μ g/ml และเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 2 ชั่วโมง เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่อาจจะเกาะอยู่

ภายนอกเซลล์ จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี kanamycin 20 µg/ml และทำการเลี้ยงเซลล์ต่อตามเวลาที่กำหนด

2.4 การวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์

ทำการเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนด โดยล้างเซลล์ด้วย PBS เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml และทำการขูดเซลล์ ทำการนับจำนวนเซลล์ตายและเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย trypan blue dye exclusion และนับเซลล์โดยใช้ haemocytometer และ light microscopy

2.5 การวัดปริมาณ ROS

ROS ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย จะวิเคราะห์โดยใช้ 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) เพื่อจะตรวจหา intracellular oxidation ที่เกิดจากการทำงานของ ROS ระหว่างที่เซลล์ได้รับการกระตุ้น DCFH-DA จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการก่อตัวของ DCFH ซึ่งเป็นสารประกอบที่เป็น nonfluorescent โดยต่อมาจะถูกออกซิไดส์เป็น 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วย flow cytometer หรือ spectrophotometer

การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์หลังการได้รับเชื้อ โดยการทำให้เซลล์แตกด้วย 0.1% Triton X-100 จากนั้นทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ออกมาโดยการ plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticasein soy agar และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย

2.6 การ silence ยีน

ทำการ transfect ยีนที่สนใจ พร้อมกับ siRNA ไปในเซลล์ที่ทำการ plate ไว้นาน 24 ชั่วโมงซึ่งมีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 2×10^5 เซลล์ (ตาม protocol ของ Dharmacon RNA Technologies) และทำการ infect เซลล์ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และทำการวิเคราะห์เซลล์

2.7 ตรวจสอบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอและโปรตีน

ทำการสกัด total RNA จากเซลล์ที่ได้รับการ infect ด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และสร้าง cDNA ของยีนที่จะวิเคราะห์จาก RNA โดยวิธี RT-PCR และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR โดยใช้ primer ดังตารางที่ 1 จากนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี DNA gel electroporation สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนนั้นจะใช้วิธี immunoblotting

Table1. The specific primer of each subunit and the expected size of PCR product

Gene	primer	Sequence 5'→3'	Size (bp)
<i>CYBB</i> (gp91)	Forward	GTT GAG TGG TGT GTG AAT GCC AG	522
	Reverse	TGG CGA TCT CAG CAA AAG GTG GT	
<i>CYBA</i> (p22)	Forward	CCC TCC ACT TCC TGT TGT C	249
	Reverse	CTG CCT CCT CTT CAC CCT	
<i>p47</i>	Forward	ACC TGA AAC TGC CCA CTG AC	492
	Reverse	TTA TCT CCT CCC CAG CCT TC	
<i>p67</i>	Forward	CAA ATG AGA GGC AGG TGG C	795
	Reverse	TCT GCT TAC TGG CGT CTG AG	
<i>p40</i>	Forward	AGA GAG CGA CTT TGA GCA GC	688
	Reverse	GTT GGT GGT GTC CTC GTC CT	
<i>β-actin</i>	Forward	CCA GAG CAA GAG AGG TAT CC	445
	Reverse	CTG TGG TGG TGA AGC TGT AG	

2.8 ค่าทางสถิติ

ค่าต่างๆที่คำนวณจากการทดลองที่ทำซ้ำจะอยู่ในรูปของ means $\pm$ standard error of the mean (SEM) หรือ standard deviation (SD) ตามระบุ

$$SD = \sqrt{[\sum(x-m)^2 / (n-1)]}$$

$$SEM = SD / \sqrt{n}$$

Where n = number of independent observations
 n-1 = number of degrees of freedom
 x = an observed value
 m = arithmetical mean of n observations

Significance testing ทำโดยใช้ Student *t*-test ซึ่งตัวเลขที่พิจารณาว่ามีความสำคัญคือที่ $P < 0.05$

3. ผลการทดลอง

3.1 เชื้อ *B. pseudomallei* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แมคโครฟาจ

ตามที่ได้เคยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มีความสามารถในการอยู่รอดภายในเซลล์แมคโครฟาจและทำให้เซลล์มีการรวมตัวเป็นหลายนิวเคลียสนั้น การทดลองนี้ได้ยืนยันคุณสมบัติของ *B. pseudomallei* ที่มีผลต่อโฮสต์เซลล์ โดยทำการศึกษาความอยู่รอดของเซลล์แมคโครฟาจ (RAW264.7) หลังจากได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* และความอยู่รอดของเชื้อหลังจากเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 ล้านเซลล์ใน 6-well plate และให้ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ MOI 2:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำเชื้อออก และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 2 และ 8 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอด (โดยวิธี trypan blue dye exclusion) ที่ 86.7% และ 84.2% ตามลำดับ โดยลดลงจากเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับเชื้อเพียง 4.2% และ 3.8% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อมากกว่า 8 ชั่วโมง จะพบการเกิดการรวมตัวของเซลล์และเซลล์ตายมากขึ้น ดังนั้นระยะเวลาที่จะใช้ทำการทดลองกับเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อนี้จะใช้เวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์ที่ได้รับเชื้อยังคงมีความอยู่รอดสูงตลอดระยะเวลาที่ใช้ทำการทดสอบขั้นต่อไป

ในทางเพิ่มเติมสำหรับการศึกษากการตอบสนองของเซลล์เจ้าบ้านต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคจากเชื้อแบคทีเรียกรัมลบ คือ Lipopolysaccharide หรือ LPS จากการศึกษาผลของ LPS ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อพบว่าเมื่อให้เซลล์แมคโครฟาจได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีความบกพร่องของ LPS (LPS mutant) ที่ MOI 2:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำเชื้อออก และเลี้ยงเซลล์ต่อเป็นเวลา 2 และ 8 ชั่วโมง พบว่าที่ 8 ชั่วโมง เซลล์ที่ได้รับเชื้อ LPS mutant นั้นเกิด membrane protrusion และการรวมตัวของเซลล์ได้เช่นกัน แต่น้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* wild type (รูปที่ 1) นั่นแสดงว่า LPS ของเชื้อไม่ได้จำเป็นต่อการเกิดการรวมตัวของเซลล์

การศึกษาคความอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* หลังจากเข้าสู่เซลล์แมคโครฟาจ พบว่าเชื้อมีความสามารถในการอยู่รอดและเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์แมคโครฟาจ (รูปที่ 2) โดยที่ 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมงของการได้รับเชื้อของเซลล์ เชื้อ *B. pseudomallei* ภายในเซลล์มีปริมาณเท่ากับ 5.22 ± 0.13 , 5.71 ± 0.18 , 6.33 ± 0.36 และ 6.77 ± 0.12 log CFU/ml ตามลำดับ สำหรับจำนวนของเชื้อ LPS mutant ภายในเซลล์นั้นมีปริมาณเท่ากับ 5.61 ± 0.18 , 5.57 ± 0.06 , 5.55 ± 0.13 และ 6.38 ± 0.04 log CFU/ml ตามลำดับ โดยจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าจำนวนเชื้อที่เป็น LPS mutant ภายในเซลล์นั้นจะลดลงในช่วงแรกและเพิ่มขึ้นหลังเวลา 6 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้ออาจจะสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมภายในเซลล์ได้ในภายหลัง

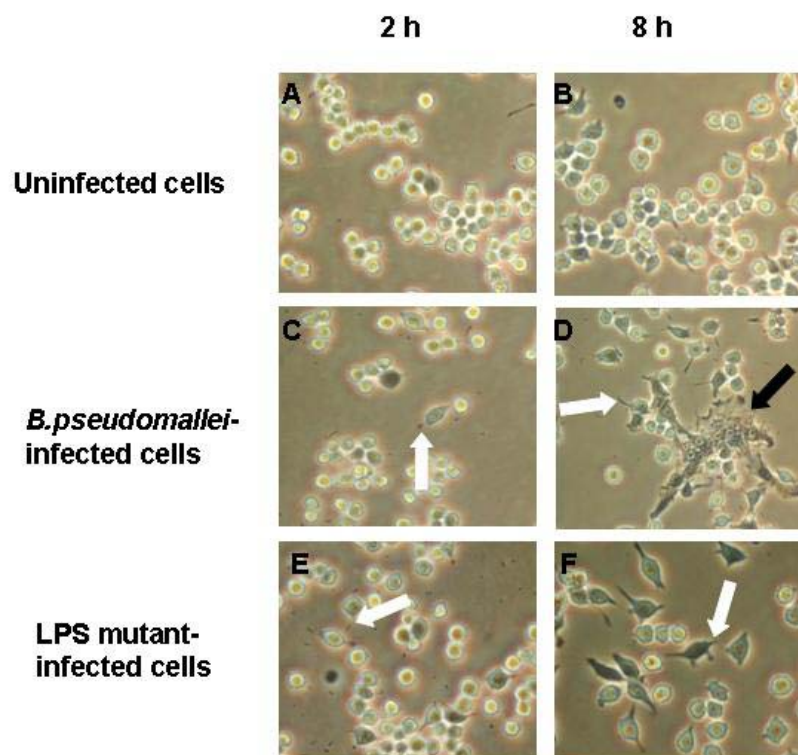


Figure 1. The morphological changes in *B.pseudomallei*-infected macrophages. The mouse macrophage cells (RAW 264.7) were plated on 6-well plate the day before infection at initial seeding of 1×10^6 cells. Mouse macrophages were infected with wild type *B.pseudomallei* (C, D) or LPS mutant (E, F) at the MOI of 2:1. After 1 h of infection, the infected mouse macrophages were washed twice with PBS before cultured in medium containing kanamycin. The cells were visualized under the inverted microscope (20X) at 2 and 8 h of incubation (left (A, C, E) and right (B, D, F) columns, respectively). White arrow showed the membrane protrusion and black arrow showed cell fusion. A and B were control (uninfected) cells at 2 and 8 h of incubation.

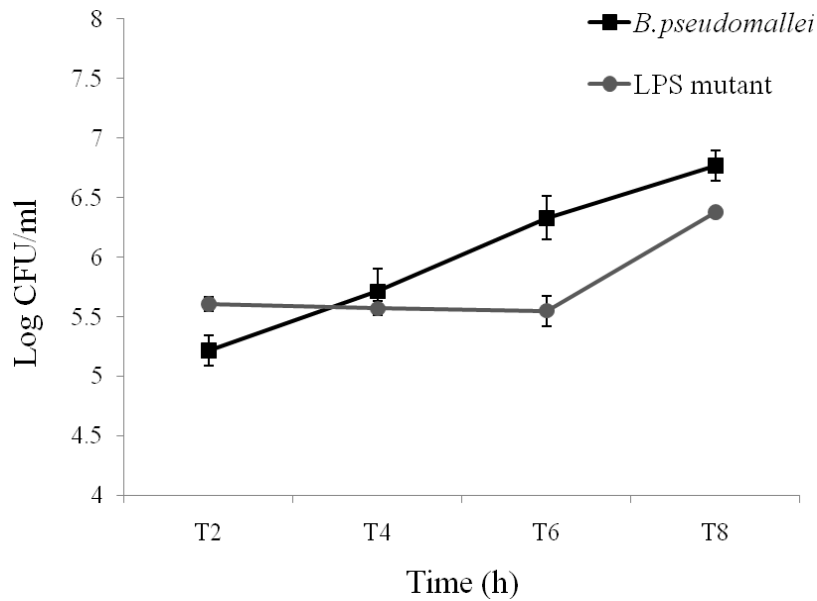


Figure 2. The intracellular survival of *B.pseudomallei* wild type and LPS mutant in mouse macrophages. The mouse monocytes (1×10^6) were infected with *B.pseudomallei* or LPS mutant at the MOI of 2:1. After 1 h of incubation, the cells were washed twice with PBS and then the media containing 250 μ g/ml of kanamycin was replaced to kill the extracellular bacteria. At 3 h of incubation, the cells were washed twice with PBS again and then the media containing 20 μ g/ml of kanamycin was replaced to kill the remaining extracellular bacteria. At the desired time, the cells were lysed with 0.1% Triton X-100 at 37°C for 48 h. The released bacteria were plated on 20 ml of TSA. The number of intracellular bacteria, expressed as log CFU, was determined by bacterial colony counting after incubated at 37°C for 48 h. Data presented are mean $\pm$ SEM for three separate experiments.

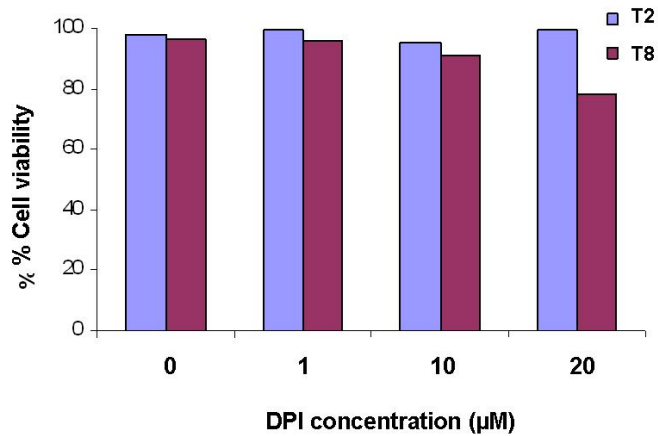
3.2 การทดสอบการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจ

การทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจสามารถทำได้โดยการวัดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งผลิตมาจากการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้น ในการทดลองนี้ได้กระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจในปริมาณที่เหมาะสมด้วย phorbol myristate acetate (PMA) ซึ่งเป็น positive control เพื่อวัดปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นทุกๆ 5 นาที ด้วยวิธี chemiluminescence ใน 96-well plate จากผลการทดลองพบว่า เซลล์แมคโครฟาจสามารถผลิต ROS หลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PMA แต่ก็อยู่ในปริมาณที่ต่ำมาก เช่น ที่เวลา 10 นาที พบว่าปริมาณ ROS ในเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นมีมากกว่าในเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นเพียง 1.6 เท่า ซึ่งปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดลองนี้อยู่ที่ 1 ล้านเซลล์ใน 96-well plate จากผลที่ได้ทำให้ทราบว่า NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจนั้นทำงานได้ แม้จะไม่มากก็ตาม

นอกจากนี้ ROS ที่ผลิตออกมานั้นยังสามารถถูกยับยั้งได้โดยการ treat เซลล์ด้วย NADPH oxidase inhibitor (diphenyleneiodonium; DPI) ก่อนการกระตุ้นเซลล์ ซึ่งได้ทำการหาปริมาณของ DPI ที่เหมาะสมต่อการทดสอบในเซลล์แมคโครฟาจ โดยทำการ pre-treat เซลล์แมคโครฟาจจำนวน 1 ล้านเซลล์ใน 6-well plate ด้วย DPI เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1, 10 และ 20 μM) ก่อนที่จะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปในอาหารที่ไม่มี DPI พบว่าความเข้มข้นของ DPI ที่ 1 และ 10 μM เป็นปริมาณสารที่เหมาะสมที่จะใช้ เนื่องจากเซลล์ยังคงมีความอยู่รอดมากกว่า 90% (รูปที่ 3A) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ DPI ที่ 1 μM อาจจะน้อยเกินไปที่จะยับยั้งการทำงานของ NADPH oxidase ดังนั้นความเข้มข้นที่ 10 μM จะมีความเหมาะสมมากกว่า และที่ความเข้มข้นนี้ไม่ได้ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. pseudomallei* อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3B) ดังนั้นในการทดลองต่อไปที่จะใช้ DPI นั้นจะใช้ในปริมาณ 10 μM

การทดลองต่อไปจะทดสอบการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

A



B

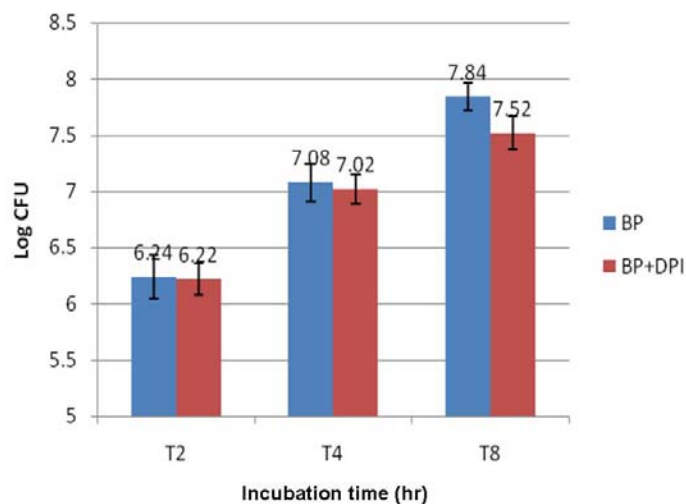


Figure 3. Effect of DPI on viability of macrophages and bacterial survival. The mouse macrophage cells (RAW 264.7) were plated on 6-well plate the day before infection at initial seeding of 1×10^6 cells. Mouse macrophages were treated with DPI at different concentration for 30 min before being infected with *B.pseudomallei* at the MOI of 2:1. After 1 h of infection, the infected mouse macrophages were washed twice with PBS before cultured in medium containing kanamycin. Cell viability of RAW264.7 was determined at indicated time by trypan blue exclusion and expressed as percentage (A). At the desired time, the cells were lysed with 0.1% Triton X-100 at 37°C for 48 h. The released bacteria were plated on 20 ml of TSA. The number of intracellular bacteria, expressed as log CFU, was determined by bacterial colony counting after incubated at 37°C for 48 h. Data presented are mean $\pm$ SEM for three separate experiments (B).

3.3 *B. pseudomallei* สามารถกระตุ้นให้เกิด ROS ได้น้อยในเซลล์แมคโครฟาจ

ปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์แมคโครฟาจหนึ่งล้านเซลล์ที่ได้รับหรือไม่ได้รับการ pre-treat ด้วย DPI ก่อนการกระตุ้นด้วย PMA, *B. pseudomallei* และ *S. typhi* (ใช้เป็นเชื้อก่อโรคเพื่อเปรียบเทียบ) ได้มีการวัดทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 70 นาที พบว่าเซลล์แมคโครฟาจมีการผลิต ROS ในปริมาณที่ต่ำมากๆจนแทบไม่เห็นความแตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่าง เมื่อลองทดสอบการวัดปริมาณ ROS ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ได้แก่ human neutrophil, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และ human monocytes ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย 200 ng/ml PMA พบว่าสามารถตรวจวัดปริมาณ ROS ได้มาก โดยปริมาณ ROS ที่วัดได้สูงสุดจะอยู่ที่ 10 นาที (รูปที่ 4) และสามารถเรียงลำดับชนิดของเซลล์ที่สามารถถูกกระตุ้นได้ดีด้วย PMA ดังนี้ neutrophil, PBMC, monocyte และ RAW264.7 เมื่อทำการตรวจสอบการผลิต ROS ใน neutrophil ที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* และ *S.typhi* พบว่าเชื้อสามารถกระตุ้นให้เซลล์ผลิต ROS ได้ โดยการตอบสนองในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *S.typhi* จะเร็วกว่าในเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* และการ pre-treat เซลล์ก่อนการได้รับเชื้อ ด้วย DPI สามารถยับยั้งการสร้าง ROS ได้ (รูปที่ 5)

เนื่องจากสามารถวัดปริมาณของ ROS ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* ได้ในปริมาณที่น้อยมาก จึงได้ทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อภายในเซลล์แมคโครฟาจหลังจากที่ได้รับเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า เชื้อภายในเซลล์มีปริมาณ 5.1 log CFU/ml ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อที่พบในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการ treat ด้วย DPI โดยอาจสรุปได้ว่า เชื้อ *B.pseudomallei* อาจมีกลไกในการยับยั้งการผลิต ROS ในเซลล์แมคโครฟาจ หรือเซลล์อาจจะผลิต ROS ในปริมาณที่เพียงพอต่อการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ แต่ไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย

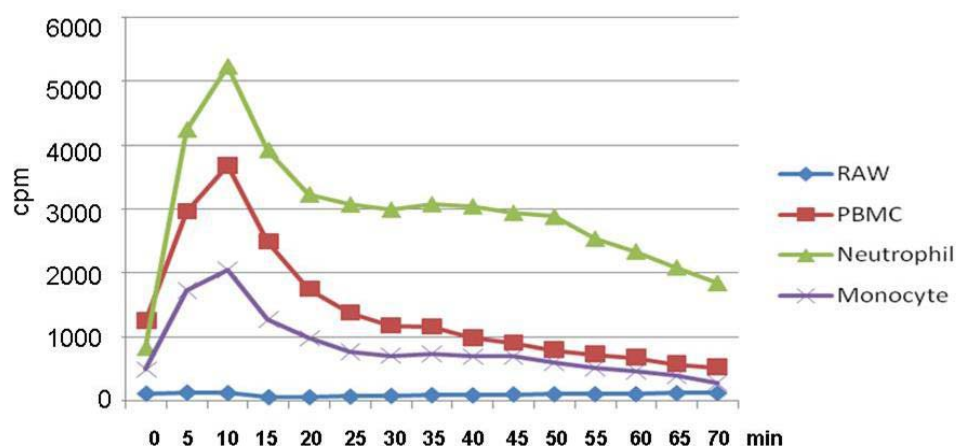


Figure 4. The reactive oxygen species (ROS) production in phagocytes. Phagocytic cells were mixed with 200 μ M of luminal and plated on 96-well plate before treated with 200 ng/ml of PMA. ROS which released from the cells was measured every 5 min by automated microplate reader (Wallac1420 ARVOsx).

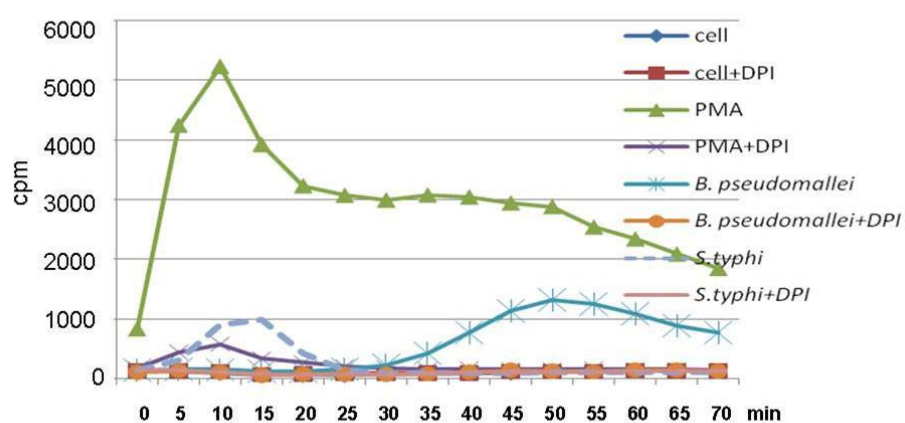


Figure 5. The ROS production in human monocytes. Monocytic (0.6×10^6) cells were mixed with luminal prior to infection. In case of inhibition NOX2 activity, cells were treated with 1 μ M of DPI for 30 min before infection. The cells were treated with PMA or infected with *B.pseudomallei* or LPS mutant at the MOI of 10:1. The chemiluminescence changes which represent ROS released from the cells were measured every 5 min interval during the next 2 h by automated microplate reader (Wallac Victor2 luminometer).

3.4 การตรวจวัดการแสดงออกของ NADPH oxidase subunits ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei*

เนื่องจาก ROS เป็นผลผลิตหนึ่งจากการทำงานของ NADPH oxidase เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของ NADPH oxidase subunit ต่างๆ ในระดับ mRNA และ โปรตีน พบว่าการแสดงออกของ NADPH oxidase subunits ที่ระดับ mRNA ของ gp91^{phox} และ p22^{phox} ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ MOI 2:1 เป็นเวลา 15, 30, 60 และ 120 นาที ไม่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ได้รับเชื้อ ส่วน NADPH oxidase subunit อื่นๆ ได้แก่ p40^{phox}, p47^{phox} และ p67^{phox} พบการเพิ่มขึ้นของ mRNA ตามเวลาที่ได้รับเชื้อ (รูปที่ 6) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน p40^{phox} ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* ภายใน 15 นาทีหลังการได้รับเชื้อ (รูปที่ 7) และมีการแสดงออกมากขึ้นตามเวลา โปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตหรือเกิดฟอสฟอริเลชัน ส่วนการแสดงออกของโปรตีน p47^{phox} ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ได้รับเชื้อ (รูปที่ 8) พบว่ามีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 30 นาที และจะลดลงเมื่อเวลามากขึ้น การแสดงออกของโปรตีน p67^{phox} ในส่วนของไซโตพลาสซึม (รูปที่ 7) พบว่ามีการลดลงในช่วง 30-60 นาทีของการได้รับเชื้อ และเพิ่มขึ้นที่เวลา 120 นาที แสดงว่าโปรตีนชนิดนี้มีการย้ายจากไซโตพลาสซึมไปที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PMA ก็ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนที่เป็น cytosolic subunits ของ NADPH oxidase ได้เช่นกัน สำหรับการทดสอบการแสดงออกของ NADPH oxidase subunits ที่ระดับ mRNA และโปรตีน ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ LPS mutant นั้น (รูปที่ 6-8) พบว่าไม่มีความแตกต่างไปจากเซลล์ที่ได้รับเชื้อ *B. pseudomallei* ผลการทดลองนี้บ่งบอกว่า NADPH oxidase สามารถทำงานได้ในระดับโมเลกุลเมื่อเซลล์แมคโครฟาจได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *B. pseudomallei* และ LPS ของเชื้อไม่ได้มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์แมคโครฟาจ

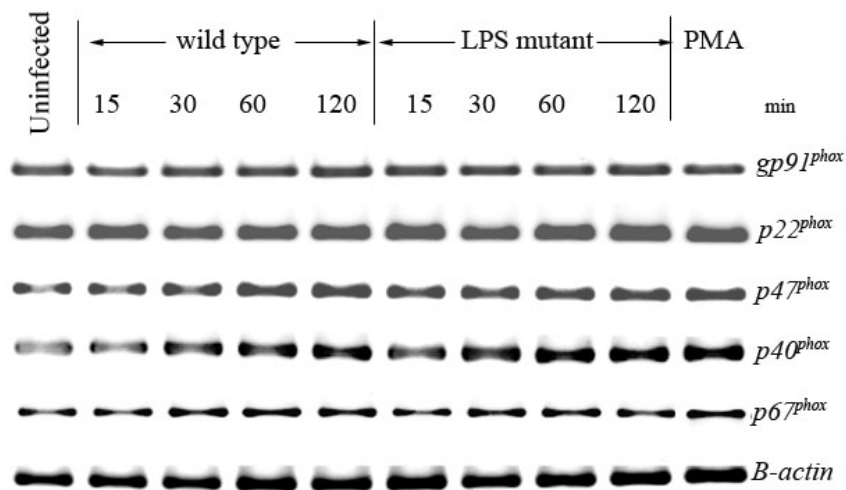


Figure 6. The mRNA expression of NOX2 subunits in mouse macrophages. The mouse macrophage (1×10^6) cells were plated on 6-well plate on the day before infection. Mouse macrophages were infected with wild type *B.pseudomallei* or LPS mutant at the MOI of 2:1 for 15, 30, 60 and 120 min. For positive control, mouse macrophages were treated with 200 ng/ml of PMA for 15 min. To determine the mRNA expression of all NOX2 subunit, the cells were harvested and lysed with lysis buffer to perform RT-PCR assay. The mRNA of *B-actin* was used as internal control.

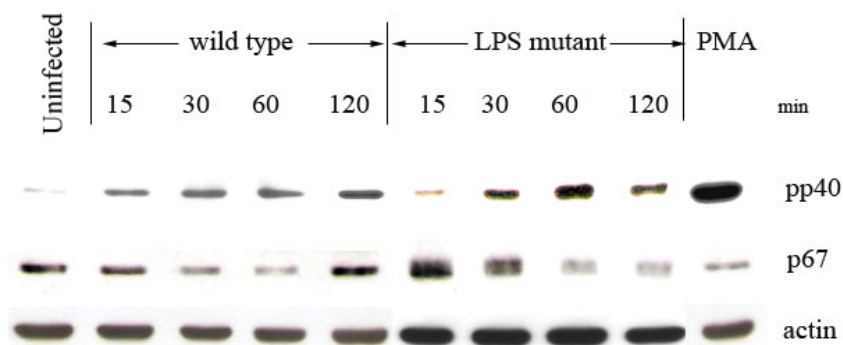


Figure 7. The protein expression of p40^{phox} and p67^{phox} in mouse macrophages. The mouse macrophage (1×10^6) cells were plated on 6-well plate the day before infection. Mouse macrophages were infected with wild type *B.pseudomallei* or LPS mutant at the MOI of 2:1 for 15, 30, 60 and 120 min. For positive control, mouse macrophages were treated with 200 ng/ml of PMA for 15 min. In order to study the phosphorylation of p40^{phox} and p67^{phox} expression, whole cell extraction of infected cells was used to perform immunoblotting using antibody against phosphorylation of p40^{phox} and antibody against cytosolic p67^{phox} and actin protein was used as internal control.

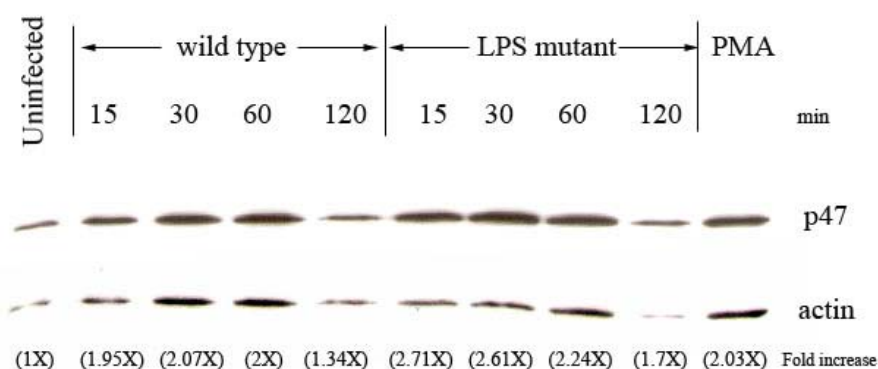


Figure 8. The protein expression of p47^{phox} in mouse macrophages. The mouse macrophage (1×10^6) cells were plated on 6-well plate the day before infection. Mouse macrophages were infected with wild type *B.pseudomallei* or LPS mutant at the MOI of 2:1 for 15, 30, 60 and 120 min. For positive control, mouse macrophages were treated with 200 ng/ml of PMA for 15 min. In order to evaluate the phosphorylation of p47^{phox}, the membrane fractions of infected cells were extracted and performed the immunoblotting using antibody against p47^{phox}. The expression of p47^{phox} protein was calculated by subtraction the intensity of p47^{phox} protein and actin protein and plotted as fold increase to those without infection or treatment (control cells).

3.5 เชื้อ *B.pseudomallei* กระตุ้นให้เกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจ

เนื่องจากเชื้อ *B.pseudomallei* สามารถหลบหนีจาก phagosome ของเซลล์แมคโครฟาจได้ ดังนั้นเซลล์น่าจะมีกลไกอื่นๆที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ เช่น การเกิด autophagy เป็นต้น โดยการทดลองนี้จะศึกษาการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* การเกิด autophagy เป็นกลไกหนึ่งของเซลล์ที่ตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity โดย autophagy นั้นจะทำลายเชื้อแบคทีเรียที่บุกรุกเข้ามาโดย phagophore ซึ่งมี LC3-I อยู่ จะฟอร์มตัวเป็น double-membrane และกลายเป็น autophagosome จากนั้นจะรวมตัวเข้ากับ lysosome เป็น autolysosome ซึ่งเชื้อสามารถถูกทำลายได้ ระหว่างที่เกิด autophagy นั้น LC3-I จะเปลี่ยนรูปเป็น LC3-II ซึ่งจะใช้เป็น marker ของการเกิด autophagy และสามารถตรวจวัดการแสดงออกของ LC3 ได้ โดยที่ LC3-II จะสามารถตรวจวัดได้เร็วกว่า LC3-I และหลังจากเกิด autolysosome แล้ว LC3-II จะหลุดออกมา

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหลังจากที่เชื้อ *B.pseudomallei* เข้ามาในเซลล์แมคโครฟาจจะพบการเพิ่มขึ้นของ LC3-II ที่ 15 นาที และลดลงภายใน 30 นาที (รูปที่ 9) ผลการทดลองนี้จะเหมือนกับ LC3-II ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยเชื้อ LPS mutant เพียงแต่ LC3-II โปรตีนจะแสดงออกน้อยกว่า นั่นแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิด autophagy ได้ในช่วงแรกๆของการได้รับเชื้อ ตัวเชื้อและโปรตีนอื่นๆใน autolysosome รวมถึง LC3-II จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วหลังจาก 30 นาทีที่ได้รับเชื้อ และโปรตีนนี้อาจจะถูกนำกลับไป phagophore นอกจากนี้อาจจะมี virulent factor อื่นๆนอกจาก LPS ของเชื้อที่ต้องการสำหรับการกระตุ้นให้เกิด autophagy

รายงานก่อนหน้านี้พบความสัมพันธ์ของ NADPH oxidase กับการเกิด autophagy ในเซลล์ RAW264.7 และ Henle-407 human epithelial cells (Huang et al, 2009) ดังนั้นการทดลองต่อไปจะหาความเกี่ยวข้องของ NADPH oxidase และการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei*

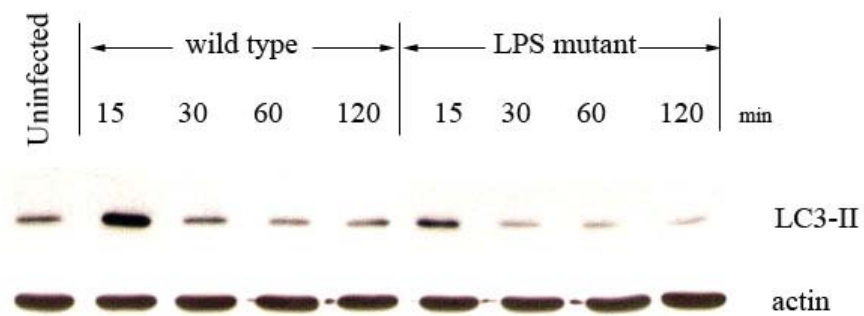
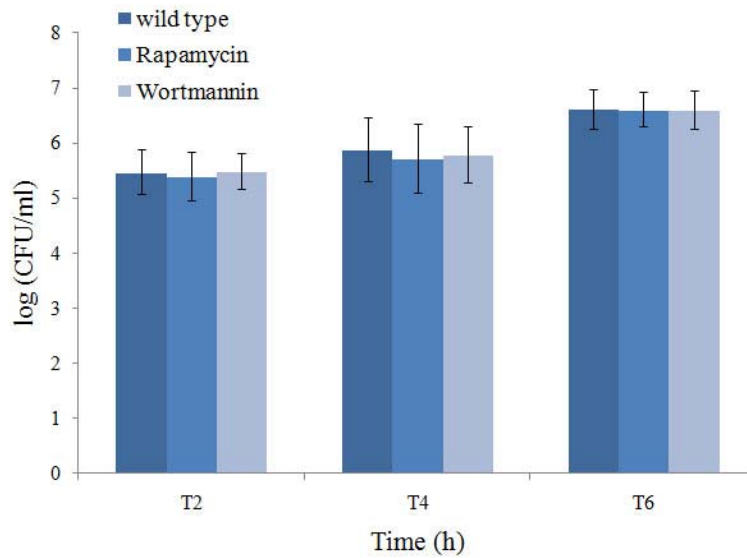


Figure 9. The protein expression of LC3-II in mouse macrophages. The mouse macrophage (1×10^6) cells were plated on 6-well plate the day before infection. Mouse macrophages were infected with wild type or LPS mutant at the MOI of 2:1 for 15, 30, 60 and 120 min. The whole cell extraction of cells were used to analyzed by performing immunoblotting using antibody against LC3-II. Actin protein was used as internal control.

3.6 บทบาทของ autophagy กับความอยู่รอดของเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจ

เนื่องจากเชื้อ *B.pseudomallei* เป็นเชื้อก่อโรคที่สามารถหลบหนีจาก endosome ออกมาสู่ cytoplasm ของเซลล์เจ้าบ้านได้ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อแบ่งตัว และติดต่อไปยังเซลล์ข้างเคียง การทดลองนี้จึงได้ทำการทดสอบบทบาทของ autophagy กับความอยู่รอดของเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจ เมื่อทำการกระตุ้นให้เกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจโดยการ treat เซลล์ด้วย rapamycin ก่อนทำการ infect เซลล์ด้วย *B.pseudomallei* ที่ MOI 10:1 เป็นเวลาต่างๆกัน พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป (ตั้งแต่ 2-6 ชั่วโมง) จำนวนแบคทีเรียในเซลล์ก็เพิ่มขึ้น (รูปที่ 10A) และที่เวลานั้นๆ จำนวนแบคทีเรียในเซลล์ที่ treat ด้วย rapamycin นั้นไม่ได้ลดลงแต่อย่างใดเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treat ณ เวลาเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อทำการยับยั้ง autophagy ด้วย wortmanin ก็ได้ผลเช่นเดียวกันกับเซลล์ที่ treat ด้วย rapamycin การที่ยับยั้ง autophagy ด้วย wortmanin แล้วไม่ได้ส่งผลให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นก็อาจจะเนื่องมาจากการกระตุ้นให้เกิด autophagy โดย rapamycin หรือเชื้อแบคทีเรียที่เรานั้นไม่ได้กระตุ้นให้เกิด autophagy มากไปกว่าระดับที่มีอยู่ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ LPS mutant ก็ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับ wild type (รูปที่ 10B) จึงอาจสรุปได้ว่าการเกิด autophagy ของเซลล์แมคโครฟาจในระบบของเราไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของเชื้อทั้งสองชนิด

A



B

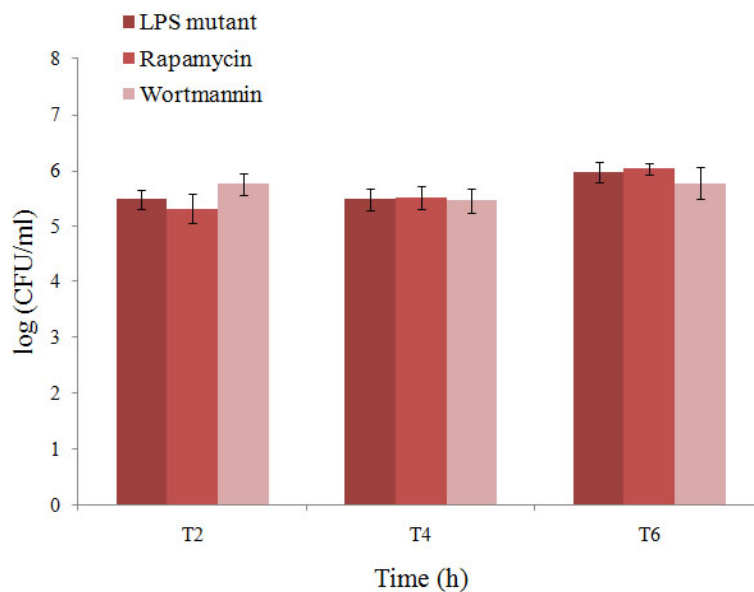


Figure 10. The intracellular survival of *B. pseudomallei* in cells pretreated with rapamycin or wortmannin. The mouse macrophage (1×10^6) cells were plated on 6-well plate the day before infection. Mouse macrophages were treated with 4 μ M of rapamycin or 100 nM of wortmannin for 1 h before infection with wild type *B.pseudomallei* (A) or LPS mutant (B) at the MOI of 10:1. After 1 h of infection, the infected mouse macrophages were washed twice with PBS before cultured in medium containing 250 μ g/ml kanamycin. At the next 2 h, the infected mouse macrophages were washed twice with PBS before cultured in medium containing 20 μ g/ml kanamycin. In the indicated time, the cells were lysed with 0.1% Triton X-100. The released bacteria were plated on 20 ml of TSA. The colonies of bacteria were counted after incubation at 37°C for 48 h. Data presented are mean $\pm$ SEM for three separate experiments.

3.7 ความสัมพันธ์ของ NADPH oxidase และการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei*

เนื่องจากมีรายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ autophagy และการผลิต ROS มีส่วนสำคัญในการเกิด autophagy ด้วยเช่นกัน การทดลองนี้จึงได้ทำการหาความสัมพันธ์ของ NADPH oxidase และการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* โดยได้ทำการ silence $p40^{phox}$ (ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของ NADPH oxidase) ในเซลล์แมคโครฟาจก่อนที่จะได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* และตรวจสอบการแสดงออกของ LC3-II โปรตีน หลังจาก 15 และ 60 นาทีของการได้รับเชื้อ หาก NADPH oxidase มีความสัมพันธ์กับการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* เซลล์ที่มีความผิดปกติของ NADPH oxidase ($p40^{phox}$ knockdown เซลล์) น่าจะส่งผลให้การเกิด autophagy ลดลงหรือการแสดงออกของ LC3-II ลดลงอย่างชัดเจนหรืออยู่ในระดับต่ำปกติ

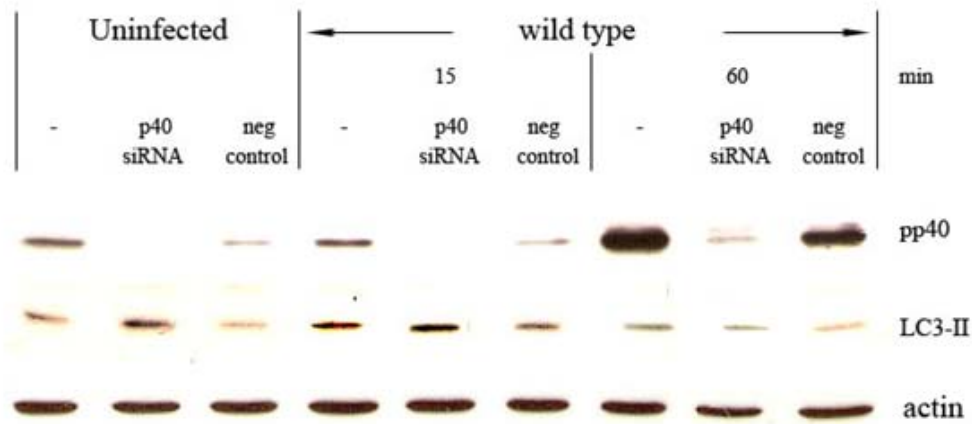
ในการทดลองนี้จะใช้โปรตีน small interfering RNA (siRNA) ต่อ $p40^{phox}$ โปรตีนของหนู mouse เพื่อยับยั้งการทำงานของ NADPH oxidase โดยมี sense โปรตีนคือ 5'-AUU UGG AGC UAA GUU UCA ATT-3' และ antisense คือ 5'-UUG AAA CUU AGC UCC AAU UTG-3' ผลการทดลองพบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของ $p40^{phox}$ โปรตีนได้ทั้งในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับและไม่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* (ดังรูปที่ 11A) แม้จะไม่สามารถยับยั้งได้โดยสมบูรณ์ก็ตาม และจากการนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์หลังการรับเชื้อของเซลล์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าในเซลล์ที่มีการยับยั้งการแสดงออกของ $p40^{phox}$ โปรตีน ไม่ได้มีเชื้อเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากันคือประมาณ $5.3 \log \text{ CFU/ml}$ นั่นคือ อาจเป็นไปได้ที่ปริมาณ ROS ที่เป็นผลจากการทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์หลังการได้รับเชื้อนั้น อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรีย หรือการได้รับการกระตุ้นของ NADPH oxidase subunits นั้นอาจจะเพียงพอต่อการสร้าง ROS ที่จะส่งสัญญาณไปยังยีนอื่นๆในระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเชื้อ *B.pseudomallei*

นอกจากนี้ เซลล์ปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* จะมีโปรตีน LC3-II แสดงออกในระดับต่ำ การ silence $p40^{phox}$ ในเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อไม่ได้ทำให้โปรตีน LC3-II แสดงออกมากขึ้นหรือลดลง แต่ใน $p40^{phox}$ knockdown เซลล์ที่ได้รับเชื้อที่ 15 และ 60 นาที พบว่าการแสดงออกของโปรตีน LC3-II ไม่ลดลง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเกิด autophagy นั้นไม่ได้เป็นผลจากการทำงานของ NADPH oxidase โดยตรง ในทางตรงกันข้ามกับ *B.pseudomallei* wild type การแสดงออกของ LC3-II นั้นจะลดลงเมื่อเซลล์ที่มีความบกพร่องในการทำงานของ NADPH oxidase ได้รับเชื้อ LPS mutant จึงบ่งบอกได้ว่า LPS mutant อาจจะกระตุ้น autophagy โดยผ่านการทำงานของ NADPH oxidase

นอกจากนี้หากทำการนับปริมาณเชื้อ *B.pseudomallei* ภายในเซลล์แมคโครฟาจที่มีการทำงานของ NADPH oxidase ผิดปกติไปก็ควรจะมีความเชื่อที่มากกว่าในเซลล์ปกติที่ได้รับเชื้อ แต่จากการทดลอง เมื่อทำการนับปริมาณเชื้อภายในเซลล์พบว่าแมคโครฟาจพบว่าในเซลล์แมคโครฟาจ

ที่ทำการ silence $p40^{phox}$ นั้นมีปริมาณเชื้อเท่ากับ $6.14 \pm 0.06 \log \text{ CFU/ml}$ ซึ่งไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อในเซลล์แมคโครฟาจปกติที่ได้รับเชื้อ ($6.16 \pm 0.12 \log \text{ CFU/ml}$) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า การอยู่รอดของเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจนั้นไม่ได้ขึ้นกับการทำงานของ NADPH oxidase หรือการทำงานของ NADPH oxidase นั้นไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ

A



B

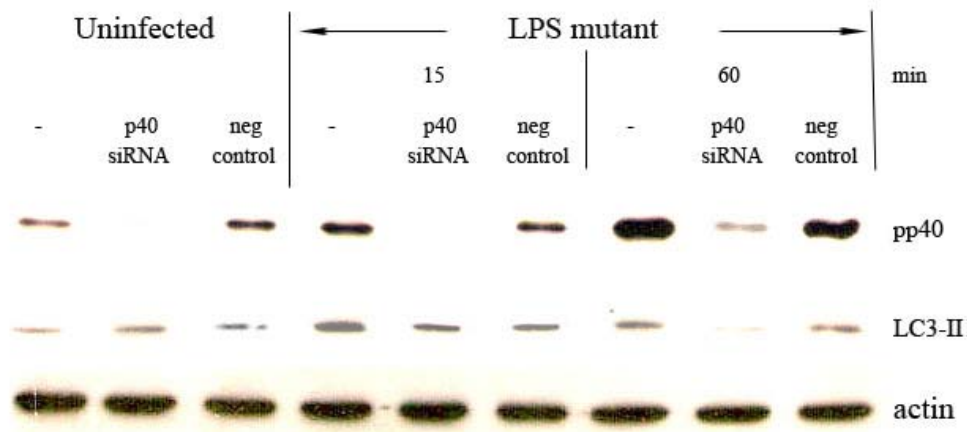


Figure 11. The expression of LC3-II protein and phosphorylated p40^{phox} protein in NOX2 - deficient mouse macrophages induced by *B.pseudomallei* or LPS mutant. The mouse macrophage RAW 264.7 cells were transfected with p40^{phox} siRNA. Mouse macrophages were infected with *B.pseudomallei* wild type (A) or LPS mutant (B) at the MOI of 2:1 for 15 min and 60 min. In order to study the phosphorylated p40^{phox} protein and LC3-II protein, whole cell extraction of infected cells was used to perform immunoblotting using antibody against phosphorylation of p40^{phox} and antibody against LC3-II. Actin protein was used as internal control. – represents cells without transfection reagent. p40siRNA represents cells with siRNA against *p40phox*. neg control represent cell treated with scramble siRNA.

4. บทวิจารณ์

โดยทั่วไปแล้วเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ถูกกลืนกินโดยแมคโครฟาจหรือโมโนไซต์จะเข้าสู่ฟาโกโซมและถูกทำลายโดย ROS และ RNS ที่ผลิตจากการทำงานของ NADPH oxidase (NOX2) และ iNOS ตามลำดับ จากนั้นฟาโกโซมจะหลอมรวมกับ endolysosome ซึ่งจะมีเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเพื่อทำลายเชื้อก่อโรค เชื้อแบคทีเรียที่สามารถหลบหนีออกมาจากฟาโกโซมหรือถุงไลโซโซมจะถูกกักและทำลายโดยกระบวนการ autophagy เชื้อ *B.pseudomallei* มีความสามารถในการหลบหนีจากฟาโกโซมมายังไซโตพลาสซึมโดยอาศัยโปรตีน bsa (type III secretion system) ทำให้เชื้อมีความสามารถในการอยู่รอดและเจริญเติบโตได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เจ้าบ้าน (Stevens et al., 2002; Stevens et al., 2003)

จากการศึกษาความเกี่ยวข้องของ NADPH oxidase ต่อการทำลายเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจ พบว่า การทำงานของ NOX2 สามารถตรวจพบได้ในเซลล์แมคโครฟาจโดยการตรวจวัดระดับ ROS ที่ผลิตออกมาในเซลล์หลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้น แต่ระดับ ROS ที่ผลิตออกมานี้อยู่ในระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับในเซลล์โมโนไซต์ นอกจากนี้ยังตรวจพบกิจกรรมของโปรตีนที่เป็น subunits ของ NOX2 ในช่วงเวลาสั้นๆ คือภายในสองชั่วโมงแรกของการได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* โดยมีการแสดงออกของโปรตีนในระดับสูงสุดที่ 15 นาทีแรก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า NOX2 นั้นทำงานได้ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ และเป็นช่วงที่เซลล์แมคโครฟาจยังมีชีวิตรอดอยู่ในปริมาณที่สูง นอกจากนี้เมื่อทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์แมคโครฟาจ ยังพบว่าไม่แตกต่างไปจากปริมาณเชื้อภายในเซลล์ที่ได้รับการ treat โดย DPI (inhibitor ของ NOX2) ก่อนการรับเชื้อ ในขณะเดียวกันแม้ว่าเซลล์โมโนไซต์ที่สามารถผลิต ROS ได้ในระดับที่สูงกว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ เชื้อสามารถมีชีวิตและแบ่งตัวได้ (unpublished data) ทำให้สรุปได้ว่า การทำงานของ NOX2 ในเซลล์แมคโครฟาจและโมโนไซต์นั้นไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ *B.pseudomallei* ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด เมื่อแบคทีเรียเข้าไปในเซลล์ เชื้อจะพบกับกลไกการป้องกันตัวของเซลล์เจ้าบ้าน เช่น superoxide anions (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และ hydroxyl radicals (OH) ซึ่งผลิตจาก respiratory burst เชื้อจะมีการป้องกันตัวเองจาก oxidative stress ต่างๆ โดยมีเอนไซม์ OxyR ควบคุมการทำงานของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้อง และ ยีน fur ที่ควบคุมการนำธาตุเหล็กของแบคทีเรียและเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนอื่นๆ โดยเฉพาะยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค (Loprasert et al., 2000) เชื้อ *B.pseudomallei* มีการผลิตเอนไซม์ catalase ในปริมาณมาก (Vellasamy et al., 2009) ซึ่งอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้ hydrogen peroxide ในเซลล์เจ้าบ้านทำงานไม่ได้ และสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ (Degroote et al, 1997)

การ treat เซลล์โมโนไซต์ด้วย DPI ส่งผลให้ปริมาณเชื้อภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (unpublished data) แสดงให้เห็นว่า NOX2 นั้นมีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์โมโน

ไซต์มากกว่าเซลล์แมคโครฟาจ ในขณะที่ iNOS มีบทบาทสำคัญในการทำลายเชื้อ *B.pseudomallei* ในเซลล์แมคโครฟาจ (Utaisinchao et al., 2003) จากรายงานที่ผ่านมาในเซลล์โมโนไซต์นั้นทำให้ทราบอีกว่า LPS mutant ไม่สามารถแบ่งตัวได้ในเซลล์โมโนไซต์ และการยับยั้งการทำงานของ NOX2 ส่งผลให้เชื้อ LPS mutant มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น นั้นบ่งบอกว่าอาจจะมีกลไกอื่นๆในโมโนไซต์ที่ควบคุมความอยู่รอดของ LPS mutant (unpublished data)

กระบวนการ autophagy เป็นกลไกหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าแม้ทั้งเชื้อ *B.pseudomallei* และ LPS mutant กระตุ้นให้เกิด autophagy ได้จากการเพิ่มขึ้นของ LC3 โปรตีนที่วัดได้ในเซลล์แมคโครฟาจ ในช่วงแรกๆของการได้รับเชื้อ การยับยั้งหรือการกระตุ้นการเกิด autophagy ในเซลล์ก่อนการได้รับเชื้อ ด้วย wortmannin หรือ rapamycin ตามลำดับ ไม่ส่งผลต่อปริมาณเชื้อภายในเซลล์เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ treat รายงานก่อนหน้านี้พบว่าการกระตุ้นกระบวนการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจด้วย rapamycin ก่อนการได้รับเชื้อ จะทำให้ความอยู่รอดของเชื้อ *B.pseudomallei* ลดลง (Cullinane et al, 2008) ซึ่งก็อาจเป็นไปได้ว่าเชื่อนั้นในที่สุดจะถูกทำลายใน autolysosome แต่การทดลองของ Cullinane et al. นั้นใช้เซลล์ RAW264.7 ซึ่งได้รับการ transfect ด้วย GFP-LC3 ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ LC3 ถูก overexpress อยู่แล้ว จึงทำให้เมื่อกระตุ้นการเกิด autophagy ด้วย rapamycin นั้นส่งผลให้เกิดประสิทธิภาพของ autophagy ในการทำลายแบคทีเรียได้มากขึ้น ซึ่งแตกต่างจากระบบของเราที่ใช้เซลล์แมคโครฟาจปกติที่ไม่ใช่ GFP-LC3 เซลล์

เชื้อแบคทีเรียบางชนิดสามารถเพิ่มจำนวนได้ภายในเซลล์ที่เกิดกระบวนการ autophagy และการผลิต ROS มีส่วนสำคัญในการเกิด autophagy ด้วยเช่นกัน ROS จากการการทำงานของ NOX2 อาจเป็นสัญญาณไปยัง phagophore-LC3 เพื่อจะจับเชื้อ *B.pseudomallei* ที่หนีรอดมาได้เข้าไปใน autophagosome อย่างไรก็ตามหลังจากที่ได้รับเชื้อ *B.pseudomallei* นั้น การแสดงออกของโปรตีน LC3 ไม่ได้ลดลงในเซลล์ที่มีความบกพร่องในหน้าที่ของ NADPH oxidase (p40^{phox} knockdown เซลล์) ในขณะที่ LPS mutant ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน LC3 ลดลง นั่นคือ NOX2 มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจที่ได้รับเชื้อ LPS mutant และดูเหมือนว่าทั้งเชื้อ *B.pseudomallei* wild type และ LPS mutant สามารถกระตุ้นให้เกิดกลไก autophagy ได้ในสัญญาณที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามกระบวนการเกิด autophagy ในเซลล์แมคโครฟาจนี้ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยู่รอดภายในเซลล์ของเชื้อทั้งสองชนิด

โดยสรุปแล้ว เชื้อ *B.pseudomallei* สามารถกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ NADPH oxidase ได้ในช่วงแรกของการได้รับเชื้อ โดยจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ การยับยั้งการทำงานของ NADPH oxidase ทำให้ปริมาณเชื้อ *B.pseudomallei* wild type และ LPS mutant ลดลงในเซลล์โมโนไซต์มากกว่าแมคโครฟาจ ดังนั้น NADPH oxidase ไม่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ การศึกษาใน p40^{phox} knockdown เซลล์ที่ได้รับเชื้อ LPS mutant

พบว่า NADPH oxidase มีความเกี่ยวข้องต่อกระบวนการ autophagy ในแมคโครฟาจ แต่กระบวนการ autophagy นี้ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมความอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตาม การทำงานของ NADPH oxidase ในเซลล์หลังการได้รับเชือนั้นสำคัญ แต่อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเซลล์แมคโครฟาจ

5. หนังสืออ้างอิง

Breitbach K, Klocke S, Tschernig T, van Rooijen N, Baumann U, Steinmetz I. (2006) Role of inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in early control of *Burkholderia pseudomallei* infection in mice. *Infect. Immun.* 74(11): 6300-6309.

Chaowagul W, White NJ, Dance DA, Wattanagoon Y, Naigowit P, Davis TM, Looareesuwan S, Pitakwatchara N. (1989) Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J Infect Dis.* 159(5): 890-899.

Cullinane M, Gong L, Li X, Lazer-Adler N, Tra T, Wolveetang E, *et al.* (2008) Stimulation of autophagy suppresses the intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei* in mammalian cell lines. *Autophagy* 4(6): 744-753.

DeGroote MA, Ochsner UA, Shiloh MA, Nathan C, McCord JM, Dinauer MC, *et al.* (1997) Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13997–14001.

Ekchariyawat P, Pudla S, Limposuwan K, Arjcharoen S, Sirisinha S, Utaisincharn P (2005) *Burkholderia pseudomallei*-Induced Expression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 and Cytokine-Inducible Src Homology 2-Containing Protein in Mouse Macrophages: a Possible Mechanism for Suppression of the Response to Gamma Interferon Stimulation. *Infect. Immun.* 73(11): 7332-7339.

Essex-Lopresti AE, Boddey JA, Thomas R, Smith MP, Hartley MG, Atkins T, *et al.* (2005) A type IV Pilin Pil A, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence *in vivo*. *Infect. Immun.* 73(2): 1260-1264.

Howe C, Sampath A, Spotnitz M. (1971) The *pseudomallei* group: a review. *Infect Dis.* 124(6): 598-606.

Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MAO, *et al.* (2009) Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidase. *PNAS.* 106(15): 6226-6231.

- Jones AL, Beveridge TJ, Woods DE. (1996) Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun.* 64(3):782-790.
- Kespichayawattana W, Rattanachetkul S, Wanun T, Utaisincharoen P, Sirisinha S. (2000) *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. *Infect Immun.* 68(9):5377-5384.
- Leelarasamee A, Bovornkitti S. (1989) Melioidosis: review and update. *Rev. Infect. Dis.* 11(3):413-425.
- Lengwehasatit I, Nuchtas A, Tungpradabkul S, Sirisinha S, Utaisincharoen P. (2008) Involvement of *B. pseudomallei* RpoS in apoptotic cell death in mouse macrophages. *Microb. Pathog.* 44: 238-245.
- Loprasert S, Sallabhan R, Whagsuk W, Mongkolsuk S. (2000) Characterization and mutagenesis of *fur* gene from *Burkholderia pseudomallei* . *Gene* 254(1-2): 129-137.
- Mays EE, Ricketts EA. (1975) Melioidosis: recrudescence associated with bronchogenic carcinoma twenty-six years following initial geographic exposure. *Chest.* 68(2):261-263.
- Pruksachartvuthi S, Aswapokee N, Thankerngpol K. (1990) Survival of *Pseudomonas pseudomallei* in human phagocytes. *J. Med. Microbiol.* 31(2):109-114.
- Stevens MP, Friebel A, Taylor LA, Wood MW, Brown PJ, Hardt WD, et al. (2003) A *Burkholderia pseudomallei* type III secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity. *J. Bacteriol.* 185(16): 4992-4996.
- Stevens MP, Wood MW, Taylor LA, Monaghan P, Hawes P, Jones PW, et al. (2002) An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behavior of the pathogen. *Mol. Microbiol.* 46(3): 649-659.
- Utaisincharoen P, Anuntagool N, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. (2003). Involvement of beta interferon in enhancing inducible nitric oxide synthase production and

antimicrobial activity of *Burkholderia pseudomallei*-infected macrophages. *Infect. Immun.* 71(6): 3053-3057.

Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W., Chaisuriya P, Sirisinha S. (2001) *Burkholderia pseudomallei* interferes with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiol. Immunol.* 45(4): 307-313.

Yabuuchi E, Arakawa M. (1993) *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: be aware in temperate area. *Microbiol. Immunol.* 37(11): 823-836.

Vellasamy KM, Vasu C, Puthucheary SD, Vadivelu J. (2009) Comparative analysis of extracellular enzymes and virulence exhibited by *Burkholderia pseudomallei* from different sources *Microbial. Pathog.* 47(3): 111-117.

Wikraiphat C, Charoensap J, Utaisincharoen P, Wongratanacheewin S, Taweekaisupapong S, Woods DE, et al. (2009) Comparative in vivo and in vitro analyzes of putative virulence factors of *Burkholderia pseudomallei* using lipopolysaccharide, capsule and flagellin mutants. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 56: 253-259.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Role of NADPH oxidase function in mouse macrophages in response to *B.pseudomallei* infection. Micobial. Pathog. (Manuscript in preparation)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำผลงานวิจัยไปใช้ในเชิงวิชาการ ดังนี้ คือ นำไปใช้ในการเรียนการสอนวิชา SCBT602 Gene regulation ในส่วนหนึ่งของหัวข้อ Animal cell death in cell culture หรือ Apoptosis in animal cell ปี ค.ศ. 2009, 2010 และ 2011 และมีการสร้างนักวิจัยใหม่ คือ นักศึกษาระดับปริญญาโท จำนวน 1 คน ได้แก่ นางสาว ทรายทอง มุณีแก้ว ซึ่งกำลังจะได้งานทำเป็นนักวิจัย

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

Muneekeaw, S., Satitaya, S., Utaisincharoen, P. and **Mungsantisuk, I.** (2009) Functional NADPH oxidase in macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*. Proceedings of the 21st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology; 2009, p605-612, Sept 24-25; Bangkok, Thailand; 2009. (International Meeting)

Mungsantisuk I, Muneekeaw, S., Satitaya, S., Utaisincharoen, P. (2009) Involvement of NADPH oxidase in the cell death of macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*. Thailand Research Fund Meeting. January 15-17, 2009, Thailand (Poster-Abstract in English, RMU5180046).

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1. ผลงานวิชาการที่เสนอในการประชุมนานาชาติเป็น Proceeding เรื่อง Functional NADPH oxidase in macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei* โดย Muneekaew, S., Satitaya, S., Utaisincharoen, P. and **Mungsantisuk, I.** Proceedings of the 21st Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology; 2009, p605-612, Sept 24-25; Bangkok, Thailand; 2009.

ภาคผนวก 2. ผลงานวิชาการที่เสนอในที่ประชุมเป็นบทคัดย่อ เรื่อง Involvement of NADPH oxidase in the cell death of macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*. โดย **Mungsantisuk I**, Muneekaew, S., Satitaya, S., Utaisincharoen, P. Thailand Research Fund Meeting. January 15-17, 2009, Thailand (Poster-Abstract in English, RMU5180046).

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
 TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
 24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

FUNCTIONAL NADPH OXIDASE IN MACROPHAGES INFECTED WITH *Burkholderia pseudomallei*

SAITONG MUNEEKAEW¹, STITAYA SIRISINHA³, PONGSAK UTAISINCHAROEN³,
 IDSADA MUNGSANTISUK^{1,2}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University

²Mahidol University and Osaka University, Collaborative Research Center for Bioscience and Biotechnology
 (MU-OU: CRC), Faculty of Science, Mahidol University

³Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

Bangkok 10400

Thailand

scilw@mahidol.ac.th

ABSTRACT

Phagocytes play an important role in the host defense mechanism as well as in maintaining healthy tissues. During phagocytosis of pathogens, NADPH oxidase complex (NOX2), which is a multisubunit enzyme complex and highly expressed in phagocytic cells, is activated and generates reactive oxygen species (ROS) for killing the pathogen. In this study, we aimed to investigate behaviors of NOX2 in RAW264.7 macrophage cell lines infected with *Burkholderia pseudomallei*. Mouse macrophages activated with phorbol myristate acetate (PMA) were found to generate less ROS than other phagocytes (peripheral blood mononuclear cells, monocytes and neutrophils). The mRNA expressions of cytosolic subunits of NOX2 (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) showed up-regulation in *B.pseudomallei*-infected RAW264.7 cells within 15 min. Up regulation of phosphorylated p47^{phox} and p40^{phox} were found in mouse macrophage cells infected with *B.pseudomallei* and activated with PMA. The increase of these subunits suggests that NOX2 functions in the early phase of infection. Furthermore, the function of NADPH oxidase may generate cellular signals to induce other genes to cope with *B. pseudomallei*.

Keywords: *B. pseudomallei*; NADPH oxidase; Reactive oxygen species (ROS)

INTRODUCTION

Burkholderia pseudomallei, the intracellular gram-negative bacteria which is the causative agent of "melioidosis" in endemic area of tropical region, especially in North Australia and Southeast Asia [1, 2]. The clinical manifestation of this disease is extremely variable being a localized, disseminated, asymptomatic infection including sepsis infection and can lead to death within a few days [3]. This bacterium can survive and replicate in both phagocytic and nonphagocytic cells [4, 5]. One of the unique characteristics of *B. pseudomallei* is the ability to lead to multinucleated giant cell. Moreover, *B. pseudomallei* can fight against host defense mechanism by inducing host cell to subsequently be actin-associated membrane protrusion, transmits from cell to the adjacent cell, and interfere inducible nitric oxide synthase (iNOS) production [6, 7]. However, the mechanism by which *B. pseudomallei* can escape the macrophage defense mechanisms is unclear. One of host defense mechanisms is the function of NADPH oxidase. One member of NADPH oxidase family that is highly expressed in phagocytic cells is NOX2 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase). During infection, bacteria are ingested in phagosomes which is subsequently, fused with lysosomes. NADPH oxidase is induced to generate superoxide anion and reactive oxygen species (ROS) which can kill the pathogen [8, 9, 10]. NADPH oxidase consists of membrane-bound proteins (gp91^{phox}, p22^{phox}) and cytosolic proteins

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

(p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} and RacGTPase) [9, 11, 12]. The aim of our study was to investigate the functional phagocyte NADPH oxidase (NOX2) using mouse macrophage cell line (RAW264.7) during *B. pseudomallei* infection. This study may help to understand the host defense mechanisms and pathogenesis of *B. pseudomallei*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and cell line preparation

Burkholderia pseudomallei strain 844 was collected from melioidosis patients admitted at Srinagarind Hospital in Khon Kaen, Thailand. The bacteria were cultured overnight in trypticase soy broth at 37°C with shaking at 150 rpm.

The mouse macrophage cell line (RAW264.7 cell) which obtained from ATCC was used in this study. The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM (Hyclone) supplemented with 10% fetal bovine serum, FBS (Hyclone) at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere.

Infection of macrophage cell line

On the day of infection, the bacteria were harvested by centrifugation and diluted in DMEM to give 1×10⁸ colonies forming unit (CFU/ml). Mouse macrophage cells (1×10⁶ cells/well) were cultured in six-well plate overnight. Fresh medium was added before cells were exposed to bacteria with multiplicities of infection MOI of 2 for 1 h. To eliminate extracellular bacteria after infection, the cells were washed twice with PBS and medium containing 250µg/ml kanamycin (Gibco) was replaced. After incubated for 2 h, the cells were washed twice with PBS and medium containing 20µg/ml kanamycin was replaced to eliminate remaining extracellular bacteria. The cell viability was measured by trypan blue dye solution (Gibco). To determine intracellular survival and multiplication of the bacteria, a standard antibiotic protection assay was performed [6]. The intracellular bacteria were liberated by lysing cells with 0.1% Triton X-100. The released bacteria were plated on 20 ml Trypticasein soy agar; TSA (Lab-scan). The number of intracellular bacteria, expressed as CFU, was determined by bacterial colony counting after incubation at 37°C for 48 h. All invasion and bacterial survival were performed in duplicate.

ROS measurement

The mouse macrophage cell lines were plated in 96-well plated. Cells were then mixed with luminal, a versatile chemical that exhibits chemiluminescence, before exposed to 200ng/ml phorbol myristate acetate (PMA). ROS, generated from the cells was measured every 5 min by automated microplate reader (Wallac1420 ARVOsx) following the protocol of this machine.

RT-PCR

Total mRNA was extracted from infected cells according to the manufacturer's instructions (Eppendorf) instructions. The first-stand cDNA was synthesized using iScriptTM cDNA synthesis kit (Biorad). The PCR was performed using cDNA as template with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) as well as the following primers: for NOX2 (gp91), sense (5'-GTT GAG TGG TGT GTG AAT GCC AG-3') and antisense (5'-TGG CGA TCT CAG CAA AAG GTG GT-3'); for p22^{phox}, sense (5'-CCC TCC ACT TCC TGT TGT C-3') and antisense (5'-CTG CCT CCT CTT CAC CCT -3'); for p47^{phox}, sense (5'-ACC TGA AAC TGC CCA CTG AC-3') and antisense, (5'-TTA TCT CCT CCC CAG CCT TC-3'); for p67^{phox}, sense (5'-CAA ATG AGA GGC AGG TGG C-3') and antisense (5'-TCT GCT TAC TGG CGT CTG AG-3'); for p40^{phox}, sense (5'-AGA GAG CGA CTT TGA GCA GC-3') and antisense

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

(5'-GTT GGT GGT GTC CTC GTC CT-3') and for β -actin, sense (5'-CCA GAG CAA GAG AGG TAT CC-3') and antisense (5'-CTG TGG TGG TGA AGC TGT AG-3'). The products of PCR were analyzed with 2% agarose gels and stained with ethidium bromide before being visualized under a UV lamp.

Cell membrane extraction

According to the manufacturer (Biovision), in brief, the 2×10^6 infected cells were collected by centrifugation at 600g for 5 min at 4°C, washed with ice-cold PBS and homogenized in 40 μ l of the Homogenize Buffer Mix on ice for 30-50 times. The homogenate was centrifuged in 700g for 10 min at 4°C. Supernatant was collected and then centrifuged at 10,000g for 30 min. at 4°C. Finally, the supernatant is the cytosol fraction and the pellet is the total cellular membrane protein (containing proteins from both plasma membrane and cellular organelle membrane). The pellet samples were diluted at the ratio 1:5 with 5X sample buffer. Sample buffer (5X) consisted of 0.3 M Tris-HCl, 10% (w/v) SDS, 25% (w/v) bromophenol blue and 50% (v/v) glycerol. Samples were boiled for 5 min in heat box before loading to the SDS-polyacrylamide gel.

Immunoblotting

The membrane protein samples were electrophoresed on 10% SDS-PAGE and then electrotransferred to nitrocellulose membrane (Amersham). The membrane was blocked with 10% blocking solution (Roche) for 1 h before incubating overnight with primary monoclonal antibody against p47^{phox} (1:500 dilution) (Santa Cruz), polyclonal anti pp40^{phox} antibody (1:1000 dilution) (Cell signaling) or polyclonal anti-actin antibody (1:20000), and the blot was allowed to incubate with horse-raddish peroxidase(HRP)-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz) followed by an enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (Roche). The signal intensity of protein bands was determined using densitometer. The expression of p47^{phox} protein was expressed as the ratio of the intensity of p47 protein and actin protein and plotted as the relative protein expression to those without infection or treatment (control cell).

RESULTS AND DISCUSSION

Viability of mouse macrophage cell lines

As shown in Figure 1A, the control (uninfected) cells and *B. pseudomallei*-infected cells showed 90.9%, 88% cell viability at 2 h of incubation, and 86.7%, 84.2% after 8 h-incubation, respectively. The percentage of cell viability of infected cells was not significantly different from that of the control cells. The cell viability should be maintained at high viability through the experimental period (2 and 8 h). The unique characteristic of *B. pseudomallei*-infected cells as membrane protrusion and multinucleated giant cell was shown at 8 h-incubation times (Fig. 1B).

Intracellular survival and multiplication of *B.pseudomallei*

The macrophages were infected with *B. pseudomallei* at MOI 2:1 for 30, 90, 120, 240, and 480 min. Although *B. pseudomallei* was reported to be able to multiply inside phagocytic cells [4,5], the number of log CFU did not show any significant difference in the early phase of the infection (30, 90 and 120 min) as shown in Figure 2. Unlike the results described from the early phase of infection, an increasing number of CFU was observed in mouse macrophage cells after 240-480 min. These results are consistent with the possibility that *B. pseudomallei* plays a role to against innate immune of host. For example, *B. pseudomallei* has the ability to induce host cell to be actin-associated membrane protrusion subsequently, the

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

transmission from cell to the adjacent cell for evading innate immune of host cells and *B. pseudomallei* was capable to interfere inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression [6,7]. In contrast, the innate immunity of host might play role at the early phase of infection, it has been shown that NADPH oxidase responds to resistance in the early phase of *B. pseudomallei*-infected C57BL/6 mice whereas iNOS is not essential [13].

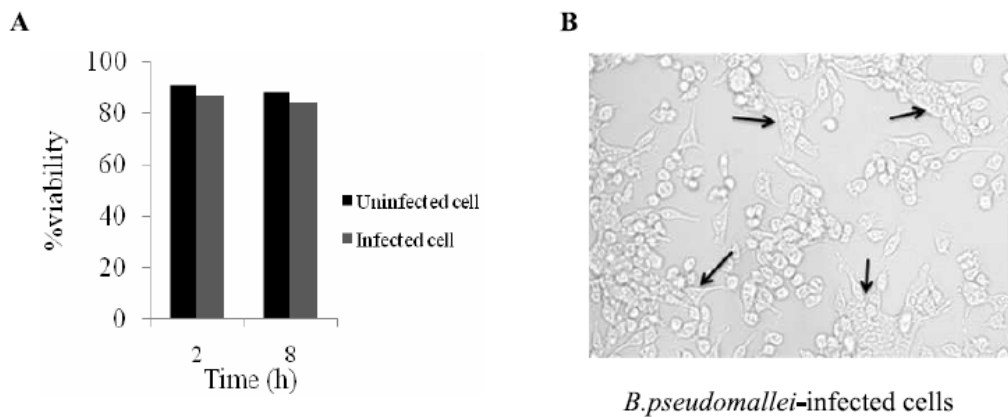


Figure 1: The viability of mouse macrophage cell lines (RAW264.7) and the unique characteristic of *B.pseudomallei*-infected cells. Cells were incubated with or without *B.pseudomallei* infection at 2 and 8 h incubation period (A). The MNGC (Multinucleated giant cell) formation (arrows) after 8 h of infection was observed by microscope (100x) (B).

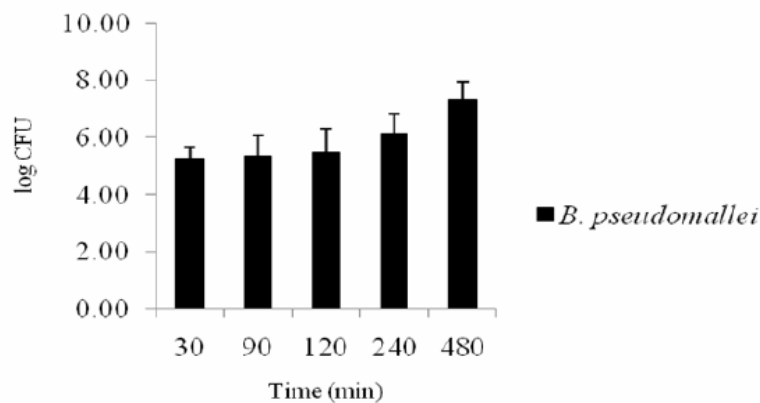


Figure 2: The intracellular survival and multiplication of *B.pseudomallei*. The mouse macrophages were lysed with 0.1% Triton X-100 after incubation with *B. pseudomallei* for 30, 90, 120, 240 and 480 min. The released bacteria were plated on 20 ml of TSA. The number of intracellular bacteria, expressed as CFU, was determined by bacterial colony counting after incubation at 37°C for 48 h.

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

ROS measurement

To investigate the function of NADPH oxidase in RAW264.7 cells, ROS production induced by phorbol myristate acetate (PMA) was determined. It was shown that ROS production could also be induced by PMA in human neutrophils [14]. Therefore, ROS production in PMA-induced RAW264.7 was compared to other cell types. Figure 3 shows that the high level of ROS could be found in human phagocytes (peripheral blood mononuclear cells (PBMC), neutrophils and monocytes) treated with PMA. In contrast, ROS was produced at very low level in PMA-induced mouse macrophage cell line (RAW264.7). It is thought that there is the limited sensitivity of this detection method since ROS production might be activated at low level in mouse macrophage, therefore the high sensitivity of detection is required to determine ROS production. However, these results showed the function of NADPH oxidase by generating ROS in early phase of the treatment. NOX2 functions in neutrophil showed the highest production of ROS, while macrophages activated with PMA were found to generate less ROS than others. Therefore, we investigated the functional NOX2 in macrophages by determining the mRNA and protein expression of NOX2 subunits in cultured cells.

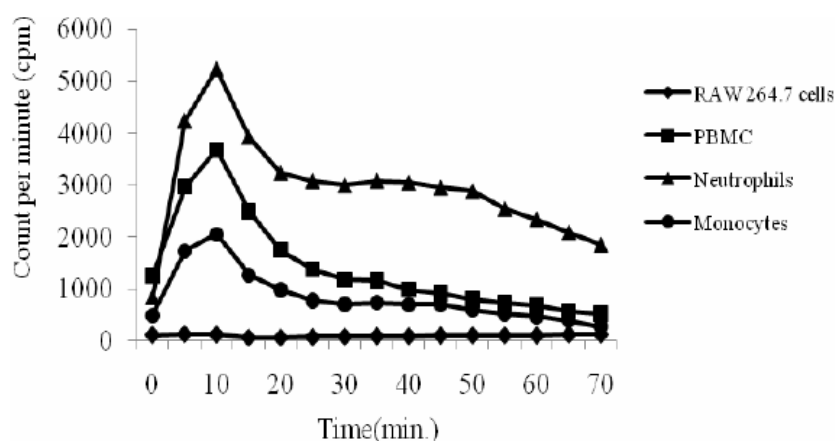


Figure 3: Mouse macrophage cells were mixed with luminal before exposed to 200 ng/ml of PMA. ROS, generated from the cells was measured every 5 min by automated microplate reader (Wallac1420 ARVOsx).

The mRNA expression of NOX2 subunits in mouse macrophages infected with *B.pseudomallei* and PMA.

Upregulation of mRNA expression for the cytosolic subunits ($p40^{\text{phox}}$, $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$) was detectable within 15 min and mRNA expression was slightly decreased after 1 h of incubation time. However, the membrane-bound complex ($gp91^{\text{phox}}$, $p22^{\text{phox}}$) showed the constitutive expression in both *B.pseudomallei* and PMA-treated macrophage cells (Fig. 4). The cytosolic subunits of NOX2 were required for the activation of NOX2, all of these were phosphorylated in the cytosol and then translocated to assemble with the transmembrane flavocytochrome b558 ($gp91^{\text{phox}}$, $p22^{\text{phox}}$) for generating ROS [15, 16, 17, 18, 19]. This is the essential regulation of the oxidase activation. In order to evaluate the functional NADH oxidase, the immunoblottings of $p40^{\text{phox}}$ and $p47^{\text{phox}}$ were performed.

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

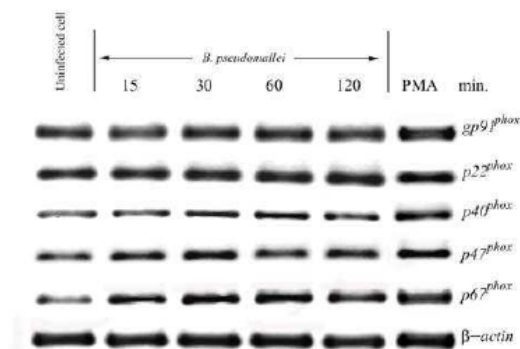


Figure 4: The activation of NOX2 subunits. Macrophage cells were infected with *B.pseudomallei* at MOI 2 for 15, 30, 60, 120 min and treated with 200 ng/ml of PMA for 15 min to determine the mRNA expression of all NOX2 subunit.

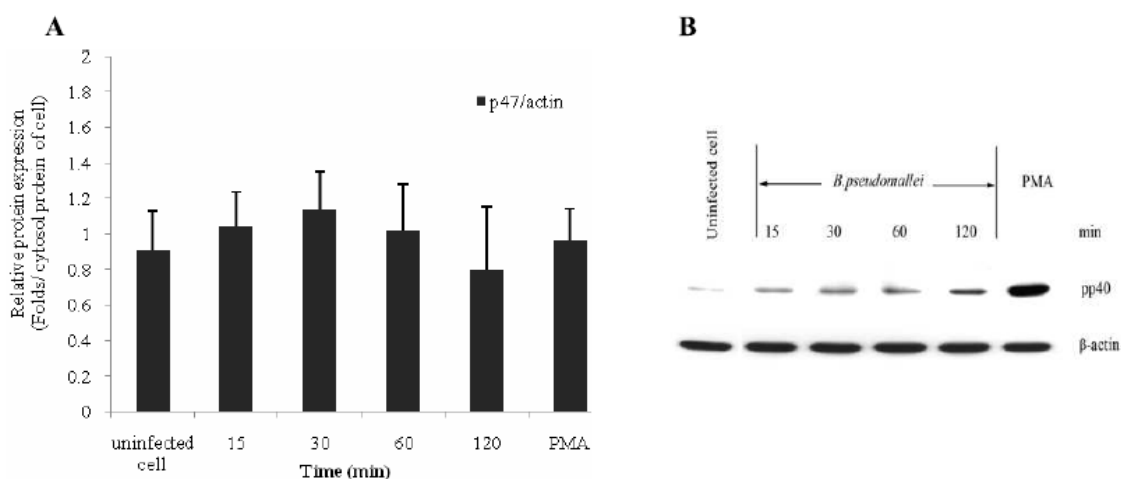


Figure 5: The activation of p40^{phox}, p47^{phox} protein. Macrophage cells were infected with *B.pseudomallei* at MOI 2 for 15, 30, 60, 120 min and treated with 200 ng/ml of PMA for 15 min. To evaluate the phosphorylation of p47^{phox}, the membrane fractions of infected cells were extracted and performed the immunoblotting using antibody against p47^{phox}. The expression of p47 protein was calculated by subtraction the intensity of p47 protein and actin protein and plotted as the relative protein expression to those without infection or treatment (control cell) (A). To study the phosphorylation of p40^{phox}, whole cell extraction of infected cells was used to perform immunoblotting using antibody against phosphorylation of p40^{phox} and actin protein was used as control (B).

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
 TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
 24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

The protein expression of NOX2 subunits in mouse macrophages infected with *B.pseudomallei* and PMA.

Similar to mRNA expression, the p47^{phox} proteins in the membrane fraction slightly increased 15 min after infection as shown in the relative units (Fig. 5A). This result implies that the phosphorylation p47^{phox} might occur within 15 min after infection or treatment with PMA. The phosphorylated p40^{phox} proteins also showed an upregulation within 15 min (Fig. 5B). From these results, it can be concluded that the function of NOX2 in mouse macrophage appears within 15 min of infection which suggests that the activation of cytosolic subunits might be enough to generate ROS to cope or act as a signal transducing to another gene dealing with *B.pseudomallei*. For example, the relationship between Toll-like receptors (TLRs) and NOX2 has been demonstrated resulting in an increased phagocytosis, respiratory burst, and IL-8 production [20]. In addition, evidence showed that NK-κB might regulate the NOX2 activation by inducing the expression of gp91^{phox} [21]. These findings suggest that ROS production from NADPH oxidase may play a more complex role in the innate immunity than simply killing bacteria.

CONCLUSIONS

B. pseudomallei (a virulent strain) can induce cellular changes such as cell fusion resulting in multinucleated giant cells in mouse macrophages. Various mechanisms that cells use to defend against *B. pseudomallei* have been studied. This study focused on the function of NADPH oxidase in mouse macrophages infected with *B. pseudomallei*. The result demonstrated that ROS production was found in human phagocytes activated by PMA in the early phase of activation. However, ROS was detectable in mouse macrophage RAW264.7 cells at low level. The result implies that NADPH oxidase functions very well in human PBMC, neutrophil and monocyte. Although induced macrophage cells produced low level of ROS, the mRNA expression of cytosolic subunits of NOX2 showed an upregulation. In addition an activation of phosphorylated p47^{phox} and p40^{phox} were observed. Therefore, it could be implied that NADPH oxidase functions in mouse macrophage cells in the early phase of infection with *B. pseudomallei*.

However, ongoing study is to investigate the rest of cytosolic protein expression of NOX2 subunits to confirm the functional NADPH oxidase in mouse macrophage cells. Furthermore, the activation of NADPH oxidase will be determined in mouse macrophage cells infected with *B. pseudomallei* or pretreated with NADPH oxidase inhibitor.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Thailand Research Fund (TRF) and the 60th Year Supreme Reign of His Majesty King Bhumibol Adulyadej, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.

REFERENCES

- [1] Wiersinga, W.J., Poll T., White T., Day N.P., and Peacock S.J. (2006). Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *Nat Rev Microbiol*, 4, 272–282.
- [2] White, N.J. (2003). Melioidosis. *Lancet*, 361, 715–722.
- [3] Cheng, A.C., and Currie, B.J. (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 383–416.
- [4] Jones, A.L., Beveridge, T.J., and Woods, D.E. (1996). Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect and Immunity*, 64, 782–790.
- [5] Harley, V.S., Dance, D.A.B., Tovey, G., McCrossan, M.V., and Drasar, B.S. (1998). An ultrastructural study of the phagocytosis of *Burkholderia pseudomallei*. *Microbios*, 94, 35–45.

The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
TSB 2009: "Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?"
24-25 September 2009: Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

- [6] Kespichayawattana, W., Rattanachetkul, R., Wanun, T., Utaisincharoen, P., and Sirisinha, S. (2000). *Burkholderia pseudomallei* induces cell fusion and actin-associated membrane protrusion: a possible mechanism for cell-to-cell spreading. *Infection and Immunity*, 68, 5377-5384.
- [7] Utaisincharoen, P., Tangthawornchaikul, N., Kespichayawattana, W., Chaisuriya, and P., Sirisinha, S. (2001). *Burkholderia pseudomallei* interfere with inducible nitric oxide synthase (iNOS) production: a possible mechanism of evading macrophage killing. *Microbiology and Immunology*, 45, 307-313.
- [8] Babior, B.M., Lambeth, J.D., and Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, 397, 342-344
- [9] Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4, 181-189
- [10] Segal, A.W. (2005). How neutrophils kill microbes. *Annual Reviews of Immunology*, 23, 197-223.
- [11] Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87, 245-313.
- [12] Janssen, R., Straaten, T., Diepen, A., and Diseel, J.T. (2003). Responses to reactive oxygen intermediate and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and Infection*, 5, 527-534.
- [13] Breitbach, K., Klock, S., Tschernig, T., Rooijen, N., Baumann, U., and Steinmetz, I. (2006). Role of inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in early control of *Burkholderia pseudomallei* infection in mice. *Infection and Immunology*, 74(11), 6300-6309.
- [14] Coursey, T.E., and Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2173-2193.
- [15] Forbes, L.V., Truong, O., Wientjes, F.B., Moss, S.J., and Segal, A.W. (1999). The major phosphorylation site of the NADPH oxidase component p67^{phox} is Thr²³³. *Journal of Biochemistry*, 338, 99-105.
- [16] Someya, A., Nunoi, H., Hasebe, T., and Nagaoka, I. (1999). Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *Journal of Leukocyte Biology*, 66, 851-857.
- [17] Hata, K., Takeshige, K., and Sumimoto, H. (1997). Roles for proline-rich regions of p47^{phox} and p67^{phox} in the phagocyte NADPH oxidase activation *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241, 226-231.
- [18] Benna, J.E., Dang, P.M.C., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., and Poidalo, M.A.G. (1997). Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67^{phox} during human neutrophil activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17204-17208.
- [19] Mendez, I., Homayounpour, N., and Leto, T.L. (1997). Specificity of p47^{phox} SF3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 17(4), 2177-2185.
- [20] Hayashi, F., Means, T.K., and Luster, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102, 2660-2669.
- [21] Anrather, J., Racchumi, G., and Iadecola C. (2006). NK-κB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91^{phox}. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5657-5667.

Involvement of NADPH oxidase in the cell death of macrophages infected with *Burkholderia pseudomallei*

Mungsantisuk, I.^{1,2*}, Muneekaew S.¹, Sirisinha, S.³, Utaisincharoen, P.³,

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

²Mahidol University and Osaka University, Collaborative Research Center for Bioscience and Biotechnology (MU-OU: CRC), Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

³Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of Melioidosis. Infection with this Gram-negative bacterium affects various organs throughout the body leading to death if host defense mechanism relapses. The aim of our study was to investigate the function of NADPH oxidase in macrophages infected with *B. pseudomallei* and its involvement in the death of infected cells. After internalization, *B. pseudomallei* could survive and multiply inside phagocytic cells. Morphological changes of the infected cells including cell-cell fusion and the formation of multinucleated giant cells were observed. To study the functional NADPH oxidase (NOX2) in mouse macrophages (RAW264.7), reactive oxygen species (ROS) production was determined. The result showed that phorbol myristate acetate (PMA)-induced RAW264.7 produced ROS at low level compared with ROS production in other phagocytes (PBMC, neutrophil and monocyte). ROS production was inhibited by DPI (NADPH oxidase inhibitor). Furthermore, study in mRNA expression of NADPH oxidase subunits in *B. pseudomallei*-infected RAW264.7 cells demonstrated the up-regulation of p40^{phox} and p22^{phox}. The p40^{phox} protein was increased with time of the infection. The ongoing research is to confirm the expression of mRNA and determine protein expression of all NADPH oxidase subunits. However, the results shown in this study implies that the function of NADPH oxidase may generate cellular signals to induce other genes to cope with *B. pseudomallei*.

Keywords: *Burkholderia pseudomallei*, NADPH oxidase, reactive oxygen species

*Corresponding author.

Tel.: 0-2201-5918; Fax: 0-2201-5926

E-mail: scilw@mahidol.ac.th