



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการทุนพัฒนานักวิจัย ปี ๒๕๕๗

**การศึกษาระบบ Quorum Sensing
ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei***

สัญญาเลขที่ RSA 4780017

โดย รศ. นพ. มงคล คุณากร

๓๐ พฤศจิกายน ๒๕๕๐

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการทุนพัฒนานักวิจัย ปี ๒๕๕๗

การศึกษาระบบ Quorum Sensing
ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

รศ. นพ. มงคล คุณากร
ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ / Abstract	2
Executive Summary	3
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	5
เนื้อหางานวิจัย	
วัตถุประสงค์งานวิจัย	6
Acyl Homoserine Lactone (AHL) Quorum Sensing System	6
Genome blast: พบ <i>bpsIR</i>	6
การทำ PCR, cloning, และ sequencing ยีน <i>bpsIR</i>	8
การวิเคราะห์ Sequences ของโปรตีน BpsIR โดยการ alignment	10
การสร้าง <i>bpsIR</i> -knockout mutants	13
การพิสูจน์ AHL ที่สร้างจากเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	18
ความสัมพันธ์ระบบ <i>bpsIR</i> กับการสร้างโปรตีน DpsA	
และการทนต่อ oxidative stress	19
ความสัมพันธ์ระบบ <i>bpsIR</i> กับสามารถในการเข้าเซลล์และอยู่รอดในเซลล์	25
Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) Quorum Sensing System	27
Genome blast: พบ <i>hhqABCDE</i>	29
การวิเคราะห์ Sequences ของโปรตีน HhqABCDE โดยการ alignment	30
การทำ PCR, cloning, และสร้าง knockout mutant ของ ยีน <i>hhqA</i>	33
พิสูจน์ functional homologue ของยีน <i>hhqA</i>	33
การพิสูจน์ AHQ ที่สร้างจากเชื้อ <i>B. pseudomallei</i>	36
การเปรียบเทียบ phenotypes ของ <i>hhqA</i> -knockout mutant กับ wildtype	43
Output ที่ได้จากโครงการ	
สรุปสิ่งที่ได้ค้นพบ	47
ผลงานตีพิมพ์	48
ภาคผนวก	49
Reprint	

โครงการ: การศึกษาระบบ Quorum Sensing ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*
รายงานฉบับสมบูรณ์

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคเมลิอยโดซิส เมื่อติดเชื้อเฉียบพลัน ก็มีความรุนแรง และยังสามารถติดเชื้อเรื้อรัง เหมือนเชื้อวัณโรค โดยเชื้อสามารถมีชีวิตรอดภายในเซลล์ phagocyte งานวิจัยนี้ศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงของเชื้อ เช่น virulence factors และกลไกที่ทำให้เชื้ออยู่รอดในเซลล์ได้ โดยศึกษาระบบควบคุมการแสดงออกของยีน โดยการเรียนรู้ความหนาแน่นของหมู่คณะตน (quorum sensing) ด้วยการสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็ก (autoinducer) โดยศึกษาระบบ Acyl Homoserine Lactone (AHL) ที่ยีน *bpsI* และ *bpsR* และระบบ Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) ที่ยีน *hhqA* ได้พิสูจน์ชนิดของ AHL ที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI คือ C8-HL พิสูจน์ว่าการแสดงออกของโปรตีน DpsA ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อ oxidative stress ได้ นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ *bpsIR* แสดงให้เห็นว่ายีน *bpsR* มีส่วนสำคัญในการทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดภายในเซลล์ epithelial และ macrophage สำหรับระบบ AHQ พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มียีน *pqsABCDE* homologue แต่ไม่มียีน *pqsH* homologue เลย ทำให้ไม่สามารถสร้าง PQS ได้ สร้างได้แต่สาร HHQ จึงตั้งชื่อยีนที่พบในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่า *hhqABCDE* พิสูจน์ว่ายีน *hhqA* ทำหน้าที่ทดแทน ยีน *pqsA* ได้ โคลนของเชื้อที่ถูก knockout ยีน *hhqA* เติบโตช้ากว่าโคโลนีของ wild type และสาร HHQ เป็น negative regulation ของ elastase แต่การขาดยีน *hhqA* ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ hemolysin, exoproteases, และ siderophores การเข้าใจกลไกของตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้เข้าใจถึงกลไกพยาธิสภาพของโรคเมลิอยโดซิสมากขึ้น ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาการป้องกันและรักษาผู้ป่วยโรคนี้

Abstract

Gram negative bacteria *Burkholderia pseudomallei* is causative agent of melioidosis. Acute infection is very virulent and chronic infection can be dormant as in tuberculosis. The bacteria can survive in phagocyte. This research investigated quorum sensing mechanisms for regulating the expression of virulence factors and intracellular survival. The Acyl Homoserine Lactone (AHL) with *bpsI* and *bpsR* genes the Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) with *hhqA* were studied. BpsI was shown to synthesized C8-HL. DpsA, a protein that protect bacteria from oxidative stress was also shown to be under *bpsIR* control. We also showed that *bpsR* was essential for bacterial survival inside epithelial and macrophage. In AHQ system, *B. pseudomallei* has *pqsABCDE* homologue lacks *pqsH* homologue which is the reason that it was unable to produced PQS but only HHQ. The *pqsABCDE* homologue thus named *hhqABCDE*. Gene *hhqA* had shown to be functional homologue of *pqsA*. Colonies of *hhqA*-knockout strain is more wrinkle than those of the wildtype. HHQ was also shown to be negative regulation of elastase but lacking *hhqA* had no effect on expression hemolysin, exoproteases, and siderophores. Understanding of *B. pseudomallei* machinery will shed more insight into melioidosis pathogenesis and could be useful in development of prevention and treatment of the patients affected by this disease.

Executive Summary

บทนำ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่พบในดินของเอเชียอาคเนย์ การติดเชื้อนี้พบในผู้ที่มีอาชีพสัมผัสกับดินเช่น ชาวนา ทหาร หรือ คนทำเหมืองแร่ เมื่อติดเชื้อในคนทำให้เกิดโรคmelioidosis เชื้อนี้มีลักษณะที่พิเศษกว่าเชื้ออื่น คือเมื่อเป็นลักษณะติดเชื้อเฉียบพลัน ก็มีความรุนแรง เกิด gram negative septic shock ที่รุนแรงกว่าเชื้อ gram negative ตัวอื่นๆ ทำให้เสียชีวิตในเวลารวดเร็ว แต่ทว่าเชื้อนี้ยังสามารถแสดงลักษณะเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง โดยสามารถมีชีวิตรอดภายในเซลล์ phagocyte เหมือนเชื้อวัณโรค และทำให้เกิด granulomatous inflammation ได้เช่นเดียวกัน การศึกษานี้ พยายามศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกในด้านต่างๆของเชื้อ เช่น virulence factors และกลไกที่ทำให้เชื้ออยู่รอดในเซลล์ได้ โดยศึกษาไปที่ระบบควบคุมการแสดงออกของยีน ต่อเมื่อเชื้อแบคทีเรียทวีจำนวนมากขึ้น โดยแบคทีเรียสามารถรับรู้ความหนาแน่นของหมู่คณะตนได้ (quorum sensing) ด้วยการสร้างและใช้สารโมเลกุลขนาดเล็ก ที่แพร่ออกและเข้าตัวแบคทีเรียได้ (autoinducer) โดยศึกษาลงไปในระบบของ autoinducer 2 ระบบคือ ระบบ Acyl homoserine lactone และระบบ Alkyl hydro quinolone

วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ของระบบ quorum sensing ต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยได้แยกการศึกษาเป็นระบบ quorum sensing 2 ระบบใหญ่ๆคือ ระบบที่ใช้สาร Acyl Homoserine Lactone (AHL) เป็น inducer และ ระบบที่ใช้สาร Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) เป็น inducer

สิ่งที่ได้ค้นพบและผลงาน

ระบบ Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing

1. ค้นพบและอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHL quorum sensing *bpsI* และ *bpsR* ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการทำการ PCR โคลนนิ่งยีน ทำ sequencing และ ทำ alignment เปรียบเทียบกับยีน homologue อื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน
2. ได้สร้างเชื้อกลายพันธุ์ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน *bpsI*, *bpsR* และ *bpsIR* รวมทั้งสร้างเชื้อที่มีการทดแทน (complement) ยีนดังกล่าวด้วยยีนที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของยีน
3. พิสูจน์ชนิดของ AHL autoinducer ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* รวมทั้ง พิสูจน์ว่าชนิดของ autoinducer ที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI
4. พิสูจน์ความสัมพันธ์ของระบบ AHL quorum sensing BpsIR กับการทนต่อ oxidative stress โดยเฉพาะ พิสูจน์ว่าการแสดงออกของโปรตีน DpsA ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อ oxidative stress ได้นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ *bpsIR*
5. แสดงให้เห็นว่ายีน *bpsR* มีส่วนสำคัญในการทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดภายในเซลล์ epithelial และ macrophage ได้

ระบบ Alkyl Hydro Quinolone Quorum Sensing

1. ค้นพบและอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHQ quorum sensing ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทียบจาก *pqsABCDE* operon และยีน *pqsH* ของ *P. aeruginosa* พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มียีน *pqsABCDE* homologue แต่ไม่มียีน *pqsH* homologue เลย ทำให้ไม่สามารถสร้างสาร Pseudomonas Quinolone

Signal (PQS) ได้สร้างได้แต่ตัวสารตั้งต้นของ PQS คือ สาร Heptyl Hydro Quinolone (HHQ) จึงตั้งชื่อยีนที่พบในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่า *hhqABCDE*

2. พิสูจน์การสร้างสาร AHQ ของเชื้อแกรมลบ สายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างที่หลากหลาย
3. ทำ PCR โคลนนิ่ง และ หา sequence ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* รวมทั้งได้สร้างเชื้อกลายพันธุ์ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* รวมทั้งสร้างเชื้อที่มีการทดแทน (complement) ยีนดังกล่าวด้วยยีนที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของยีน
4. พิสูจน์หน้าที่ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* ทำหน้าที่ทดแทน ยีน *pqsA* ในเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (functional homologue)
5. ศึกษาหน้าที่ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า
 - 5.1. โคโลนีของสายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากกว่าโคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ wild type อย่างชัดเจน
 - 5.2. สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* มีการทำงานของ elastase มากขึ้น และสาร HHQ ทำหน้าที่ negative regulation ของ elastase
 - 5.3. การขาดยีน *hhqA* ไม่มีผลต่อ hemolysin, exoproteases, และ siderophores

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. P. Lumjiaktase, S. P. Diggle, S. Loprasert, S. Tungpradabkul, M. Daykin, M. Camara, P. Williams and M. Kunakorn. Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. Microbiology. 2006;152:3651-3659.
2. Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M, Williams P. Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* and Related Bacteria. Chem Biol. 2006;13:701-710.

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

Burkholderia pseudomallei เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเมลลิออยโดซิส (melioidosis) พบเชื้อตัวนี้ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคในประเทศทางแถบเอเชียอาคเนย์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากดินและแหล่งน้ำนิ่งในบริเวณที่เกิดการระบาดของโรค การติดเชื้อ acute septicemic melioidosis มีอาการแสดงที่มีความรุนแรงกว่าเชื้อแกรมลบอื่นๆ ผู้ป่วยจะช็อคและเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ ภายหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย อาจเป็นการติดเชื้อแบบไม่มีอาการแล้วเป็นเวลาหลายสิบปี แล้วจึงเริ่มแสดงอาการ ซึ่งแสดงถึงสภาวะแอบแฝง (dormant state) ของเชื้อ โดยที่เชื้อนี้สามารถมีชีวิตแบ่งตัวได้ภายในเซลล์หลังจากถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน

กลไกสำหรับควบคุมการแสดงออกของเชื้อเมลลิออยโดซิส มีระบบในเซลล์แบคทีเรียที่ใช้สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนเมื่อมีความหนาแน่นของเชื้อสูง เรียกว่าระบบรับรู้หมู่คณะ (quorum sensing) โดยการปล่อยสารที่เรียกว่า autoinducer ออกมานอกเซลล์อยู่ตลอดเวลา เมื่อสารดังกล่าวสะสมจนมีความเข้มข้นพอ ก็จะไปจับกับ transcription activator เพื่อเปิดการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ ซึ่งในเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ระบบนี้เป็นระบบที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของ virulence factors เช่น elastase, proteinase, การจับธาตุเหล็ก, ใช้ควบคุมการแสดงออกของการดื้อยา, ของการสร้างสารต่างๆ เป็นต้น ระบบนี้อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ virulent factors ในเชื้อ *B. pseudomallei* ได้

ยีนของระบบรับรู้หมู่คณะได้ถูกพิสูจน์ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เป็นญาติใกล้ชิดกับเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เช่นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (9), *Burkholderia cepacia* (10) รวมถึง *Burkholderia vietnamsensis* (11) ทำให้คาดได้ว่า ระบบนี้น่าจะเป็นตัวควบคุมทั่วไปที่สำคัญตัวหนึ่งเช่นเดียวกับ alternate Sigma factor RpoS ความเกี่ยวพันระหว่างระบบ quorum sensing และระบบ alternate sigma factor RpoS นั้น ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *R. solanacearum* ระบบ quorum sensing ถูกควบคุมโดย RpoS (12, 13) ส่วนใน *Burkholderia cepacia* RpoS ไม่ได้ควบคุม ระบบ quorum sensing แต่ถูกคล้าย RpoS กลับถูกควบคุมโดยระบบ quorum sensing (14) ดังนั้นการศึกษาระบบ quorum sensing จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิงสำหรับหน้านี้

1. Leelarasamee A. and Bovornkitti S. 1989. Melioidosis: Review and update. Rev. Infect. Dis. 11:413-425.
2. Jones, A. L., T. J. Beveridge, and D. E. Woods. 1996. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. Infect Immun. 64:782-90.
3. Swift, S., Downie, J.A., Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Salmond, G.P. and Williams P. (2001) Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. Adv. Microb. Physiol. 45, 199-270.
4. Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L. and Iglewski, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science. 260, 1127-1130.
5. Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S. and Williams, P. (1999) Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. Infect. Immun. 67, 5192-5199.
6. Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M.L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. and Letesson, J.J. (2002) Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 70, 3004-3011.
7. Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J. Bacteriol. 181, 748-756.
8. Conway, B.A., Venu, V. and Speert, D.P. (2002) Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. J. Bacteriol. 184, 5678-5685.
9. MK Winson, M Camara, A Latifi, M Foglioni, SR Chhabra, M Daykin, M Bally, V Chapon, GPC Salmond, BW Bycroft, A Lazdunski, GSAB Stewart, and P Williams. Multiple N-Acyl-L-Homoserine Lactone Signal Molecules Regulate Production of Virulence Determinants and Secondary Metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995 September 26; 92 (20): 9427-9431
10. Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J Bacteriol. 1999 Feb;181(3):748-56.
11. Conway BA, Greenberg EP. Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamsensis*. J Bacteriol. 2002 Feb;184(4):1187-91.
12. Whiteley, M., M. R. Parsek, and E. P. Greenberg. 2000. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 182:4356-4360.
13. Flavie, A. B., M. A. Schell, and T. P. Denny. 1998. An RpoS (sigmaS) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. 28:475-486.
14. Aguilar C, Bertani I, Venturi V. Quorum-sensing system and stationary-phase sigma factor (rpoS) of the onion pathogen *Burkholderia cepacia* genomovar I type strain, ATCC 25416. Appl Environ Microbiol. 2003 Mar;69(3):1739-47.

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์งานวิจัย

เพื่ออธิบายลักษณะยีนและศึกษาบทบาทหน้าที่ของระบบ quorum sensing ต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ เพื่ออธิบายลักษณะของบทบาทของระบบ quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของระบบ quorum sensing โดยได้แยกการศึกษาเป็นระบบ quorum sensing 2 ระบบใหญ่ๆ คือ

- ระบบที่ใช้สาร Acyl Homoserine Lactone (AHL) เป็น inducer
- ระบบที่ใช้สาร Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) เป็น inducer

Acyl Homoserine Lactone (AHL) Quorum Sensing System

การอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHL quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei*

ได้สืบค้นหายีนระบบ quorum sensing ของเชื้อ genus Burkholderia เพื่อเป็นแนวทางในการหายีนระบบนี้ในเชื้อ *B. pseudomallei*

ได้โคลนยีนระบบ quorum sensing ของเชื้อ *B. pseudomallei* คือยีนระบบ *bpsIR*

ได้ทำสายพันธุ์ knockout และ สายพันธุ์ complements ของระบบยีนดังกล่าวแล้ว

ได้ทำการศึกษา autoinducer ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ พิสจูน์ autoinducer ที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI

การสืบค้นจาก Genome database

โดยการใช้ยีน *cepI* และ ยีน *cepR* จาก *Burkholderia cepacia* โดยยีน *cepI* เป็นยีนที่สร้าง auto inducer และ ยีน *cepR* เป็นยีนที่เป็น transcriptional activator ของ autoinducer นั้น ในการสืบค้นจากด้วยวิธี BLASTX ในฐานข้อมูลจีโนมของ *B. pseudomallei* ที่ สถาบัน Sanger (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pseudomallei) พบ open reading frames ที่มีการเรียงลำดับเบสสอดคล้องกัน 2 ORFs ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ตั้งชื่อว่า *bpsI* and *bpsR*

ยีน *bpsI* มีความยาว 612 คู่เบส เป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับสร้างโปรตีนขนาดยาว 204 กรดอะมิโน บริเวณโปรโมเตอร์ก่อนจุดเริ่มต้นของยีน *bpsI* มีรหัสของ lux box ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ยีนนี้ถูกควบคุมด้วยระบบ quorum sensing ตามปกติของยีนที่สร้าง auto inducer ซึ่งจะควบคุมตัวเองผ่าน lux box นี้ ส่วนยีน *bpsR* มีความยาว 720 คู่เบส สำหรับสร้างโปรตีนขนาดยาว 240 กรดอะมิโน ยีนทั้งสองหันมีจุดเริ่มต้นที่คั่นด้วย intergenic region ขนาด 801 คู่เบส แล้ว transcribe ออกไปจากกัน (โปรตูดูรูป) รหัสพันธุกรรมและการเรียงตัวของกรดอะมิโนของยีนทั้งสองได้แสดงไว้ในรูปต่อไปนี้ ในรูปได้แสดง primer ที่จะใช้ในการทำ PCR เพื่อนำยีนทั้งสองมาศึกษาต่อไป

TACCGTTGAATGGTCCACGGTGTAGAGGTCTCCTTGAATGACGAACGGCGCGGCCCCGAA
 GCGGGGCGACCGGGCGCGCTCAGGCGGCTTCGGCGGGCGGCGCGCACAGCAGCGGGTCGAG
 A A E A P P A C L L P D L
 ATCAGAGCGCGGCGAGCGTTTTCGCGCTCGAGGTCGATCCAGCACGCGACGACCATGCGCCC
 D L A A L T Q A D L D I W C A V V M R G
 GTCGATCTGCTGCGGGGGCCCCGGTTCGCGCTGCAGCGCGATCCGGCGGAACAGGCG
 D I Q Q A P G A R H A H V G I R R F L R
 CTCCATGCTCAGAAACGTACGCGGATCAGTTGCTTCGCGCAAGCCGCGCGGCGCACTC
 E M S L F T V G I L Q K A G L R A A C E
 GACGACGGCGGCGAGCATCGGCCGACCGCCAGGCCGGTTCGCGCCCCGCGCGGATC
 V V A A L M P R V A W A P N G G A P D
 CTCGGCGTTTCGCGGAAGCGGACAATTCAGAGCGCGGCGGATTGCGGCAACGGCAT
 E A N A A F R S L E W V A A S Q P L P M
 GTCTTGCGGACGAGCTCGGGAACAGTTCTTCAGCAGATACGGGCGGGTCGTCGGCAG
 D Q A V L T P F L E K L L Y P R T T P L
 CAGCCGGGCGAGCCGAGATTTCCCGTCGTCGTCGCGGCGAACACATAGACGGTATC
 L R A C G C I E G D D D R A F V Y V T D
 GTCGCGATCGTACTGATCCCGCTCGAACCTTCGCTTGCCGACGGCAGTGTCCAGCCGAG
 D R D Y Q D R E F G E S A S P L T W G L
 CTGCTCGACGACAACCTCGGTGCCGATAAATGCTCAGATCAGCCGCCAAGTCGCTCGGCAG
 Q E V V V R H R Y I S L D A A L D S P V
 GCGCCCGTCGCGCATGAACGAAAGTTCCGATCTCGTCTCGTGTGCTTTGGAATGG
 A G D G H V F T R M
 GCGCATTACATCGCGCGCTCCGAGGACAGGTAAGTGTAAACCTTACAGGGTCGGGAAAG
 CGGGGCTGGTGGCGGGGGCGGGCGGTTTCCGCCGTTTTCGTCGGTGTGCGACTGCAAA
 GATTCGATAATTTGCTTGTCAATCCGCAACGTTTCGAGGAAAATTAGACAATATGCAAGGA
 TTCGATAATTTGTTTGTCAATCCTGCAACGTTTCGAGGCAAAATTAGACAATATGCACTGA
 TTGCGCCGACGCGCGTCACTGCAGGGTGGGACCCGATGCGCAAAATCGCCGCGACGAAG
 CATCGCGGCGGTGACGGCGGACGGCCAGTTTCAGTTGGGCGAGCCGGCGCGACAGTTCGGC
 CGAGGTCGGATCCATGCCGATGTCGAGCCCGTTGCCGTCGACGCCCATCACGTTGCTGCG
 CACGTCGCCCCATGCAATGACGAAGGCGCCCGTTGCCCGTCGATGTACCAGTCCCAGCC
 CACTGTGAGATGCGCGCGCGCGCGCTCGACGGCCGCTCCCACTCGGTGTAGCCGCGCAT
 GCGGGCGTCGATGTCGCTCGCACGTAGTTTCGACGAGCAGTCCGGAATCGATTCCGGACGA
 TACGTGAACGAGCCGAGCTCGGCGAACGCGTGCATCGGAAGGCGCACGTAGCCGTTTTC
 GGAAGAGCCGCGAAAGCGGTGGAGCCATGGTGAATTCATGCCGCGGAATGTATCAGCCCG
 CGCGCGTGTGAAACCTAGCAAGTATGACAGCGTGAAGCTGCTGGAGAACGAATGGAA
 M E
 CTGCGCTGGCAAGACGCCTATCTTCAATTTAGCGCCGCGGAGAACGAGCAGCAGCTCTTC
 L R W Q D A Y L Q F S A A E N E Q Q L F
 CAACAGATCGCCGCTATACGAAGCGGCTCGGCTTCGAATATTGCTGCTATGGCATAACG
 Q Q I A A Y T K R L G F E Y C C Y G I R
 GTGCGGTTGCCGATCTCGAAGCCGGTTCGTCGCGATTTTCGACACCTATCCGAACGGCTGG
 V P L P I S K P V V A I F D T Y P N G W
 ATGGAGCGCTACCAGGAAATGAATACCTGGAGGTCGATCCGACCGTACGCGAGGGCGCG
 M E R Y Q E M N Y L E V D P T V R E G A
 CTCAGCTCGAACATGATCGTCTGGCCGAGGCGAGCGGAGCGACGCGACGACGCTCTGG
 L S S N M I V W P E A S A S D A T T L W
 AGCGACGCGCGGATCACGGGCTGGCGGTTCGGCGTCGCGCAGTCGAGCTGGGCCTCGCGC
 S D A R D H G L A V G V A Q S S W A S R
 GGGGTGTTTCGGTCTCCTGACGATCGCGCGGCACACCGACCGCTGACGTCCGCCGAGATC
 G V F G L L T I A R H T D R L T S A E I
 AACCATCTGACGTTGACGGCGAACTGGCTCGCGAACATGTGCACTCGCTGATGAGCCGT
 N H L T L Q A N W L A N M S H S L M S R
 TTTCTCGTGCCGAAGCTCGCGCCGAATCGGGCGTGGCGCTCACGCACCGCGAGCGGAAG
 F L V P K L A P E S G V A L T H R E R K
 GTGCTGTGCTGGACGGGGAGGGCAAGACCGCTGCGAGATCGGGCAGATCCTCAGCATC
 V L C W T G E G K T A C E I G Q I L S I
 TCCGAGCGCACGGGAACTTTCAGCTCAACAACATCCTCGACAAGCTCGGCGCGAGCAAC
 S E R T G N F H V N N I L D K L G A T N
 AAGGTGCAGCCGTCGTGAAGGCGATCGCGATGGGGCTCATCGACGCGCCGTAAAGCATGGCC
 K V Q A V V K A I A M G L I D A P -
 GCGAGCGCGTCGCGGCGCGCGCGGCTCACTACTCCATCAACGGTTTCGCTTCCTTCGCGGT
 CCAGCTCACGCTGGAGATGCTTTTCTCCATGCTCATCCGGCTCGCGATCTGCTCGAGCTT

primer IFF

bpsI

primer IRF

Lux box

primer RFF

bpsR

primer RRF

การทำ PCR, cloning, และ sequencing

PCR primers สำหรับ *bpsI* คือ

primer IFF 5'-**CTGCAGCTCCTTGAATGACGAACGGC**-3'

และ primer IRF, 5'-**AAGCTTCATGCGAACTTTCGTTTCATGG**-3' PCR primers

สำหรับ *bpsR* คือ primer RFF 5'-**AAGCTTAACGAATGGAAGTGGCGCTGG**-3' และ

primer RRF 5'-**CTGCAGGAACCGTTGATGGAGTGAGC**-3' (รูปก่อนหน้า) ในการสัง

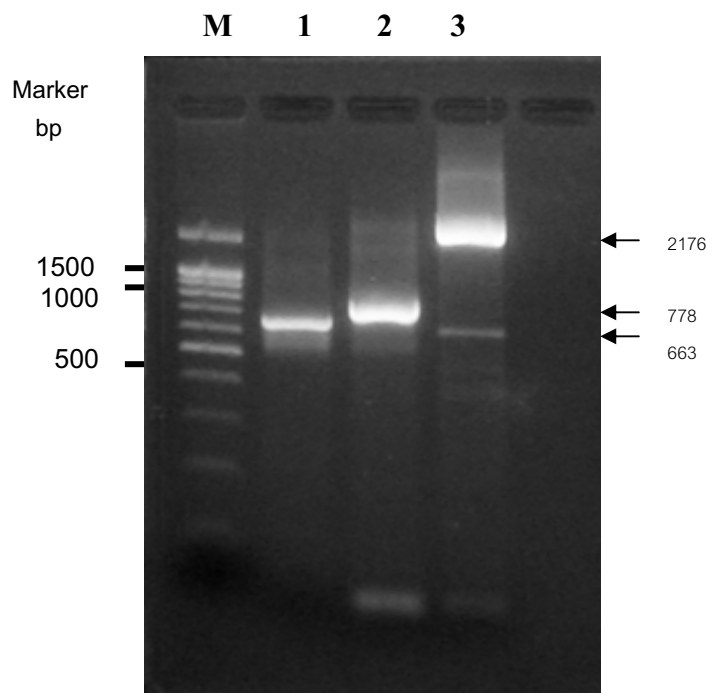
เคราะห์ primers ได้มีการเพิ่มรหัสสำหรับให้ถูกตัดได้ด้วย restriction endonuclease

HindIII และ *PstI* เข้าไปที่ปลายด้าน 5' (ตัวหนา) เพื่อให้สามารถนำดีเอ็นเอไปโคลนเข้า

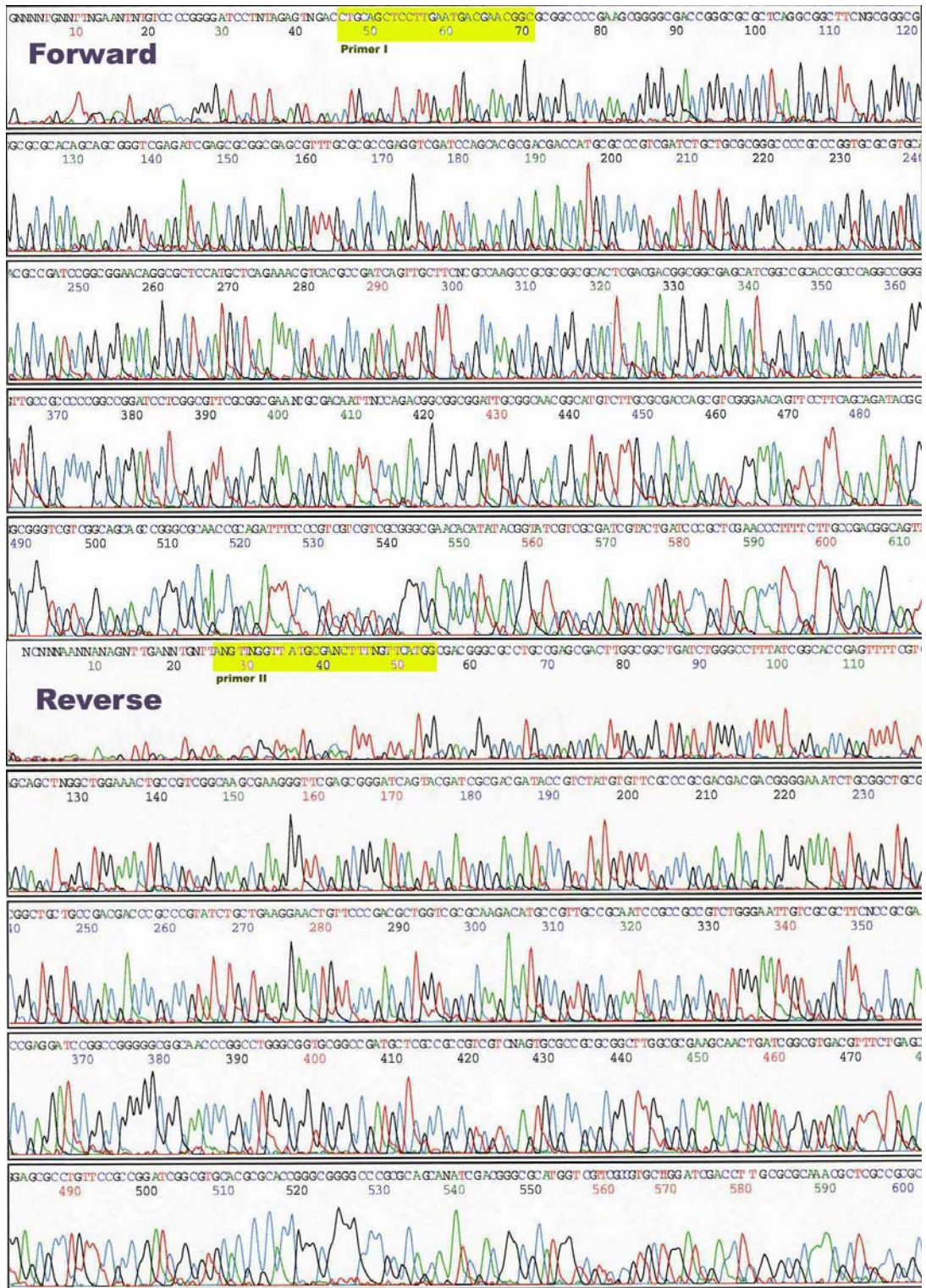
พลาสมิด pUC19 ได้โดยสะดวก PCR ทำโดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์

844 ได้ PCR products ของ *bpsI* ขนาด 663 bp (ช่อง 1), ของ *bpsR* 778 bp (ช่อง 2) และ

ชิ้นดีเอ็นเอที่มีทั้งสองยีนโดยใช้ primers I และ IV ขนาด 2,176 bp (ช่อง 3)



PCR products เหล่านี้ได้ถูกโคลนใส่เข้าไปในพลาสมิด pUC19 แล้วจึงถูกนำไปหาการ
เรียงลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencing รูปต่อไปนี้แสดงผล chromatograms m
ทั้งสองทิศทางของ sequence ของ *bpsI*



การวิเคราะห์ Sequences โดยการ alignment

รหัสพันธุกรรมของยีน *bpsI* และ *bpsR* จากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 844 ถูกนำไปแปลงเป็นรหัสกรดอะมิโน เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนดังกล่าวของเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ K96243 และ สายพันธุ์ KHW (J. Bacteriol. 2005; 187, 785-790) ผลคือรหัสแบบจะเหมือนกันทั้งสามสายพันธุ์ดังแสดงการ alignment ในรูปต่อไปนี้

BpsI

```

      *           20           *           40           *           60
844. : MRTFVHGDGRLPDLSAAGLSLYRHRVFVEQLGWKLPASASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDDGEICGCAR : 69
k96243. : MRTFVHGDGRLPDLSAADLSLYRHRVFVEQLGWKLPASASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDDGEICGCAR : 69
KHW. : MRTFVHGDGRLPDLSAADLSLYRHRVFVEQLGWKLPASASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDDGEICGCAR : 69
      MRTFVHGDGRLPDLSAAdLs6YRHRVFVEQLGWKLPASASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDDGEICGCAR

      *           80           *           100           *           120           *           1
844. : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMIAAVVECAARLGA : 138
k96243. : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMIAAVVECAARLGA : 138
KHW. : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMIAAVVECAARLGA : 138
      LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMIAAVVECAARLGA

      40           *           160           *           180           *           200
844. : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRTGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAAEAA : 203
k96243. : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRTGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAAEAA : 203
KHW. : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRTGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAAEAA : 203
      KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRTGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAAEAA

```

BpsR

```

      *           20           *           40           *           60
KHW. : MELRWQDAYLQFSAANEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTPNGWMERYQEM : 69
844. : MELRWQDAYLQFSAANEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTPNGWMERYQEM : 69
k96243. : MELRWQDAYLQFSAANEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTPNGWMERYQEM : 69
      MELRWQDAYLQFSAANEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTPNGWMERYQEM

      *           80           *           100           *           120           *           1
KHW. : NYLEVDPPTVREGALSSNMIVWPEASASDATTLSWDARDHGLAVGVAQSSWASRGVFGLLTIARHTDRLT : 138
844. : NYLEVDPPTVREGALSSNMIVWPEASASDATTLSWDARDHGLAVGVAQSSWASRGVFGLLTIARHTDRLT : 138
k96243. : NYLEVDPPTVREGALSSNMIVWPEASASDATTLSWDARDHGLAVGVAQSSWASRGVFGLLTIARHTDRLT : 138
      NYLEVDPPTVREGALSSNMIVWPEASASDATTLSWDARDHGLAVGVAQSSWASRGVFGLLTIARHTDRLT

      40           *           160           *           180           *           200
KHW. : SAEINHLLTQANWLANMSHSLMSRFLVPKLPAPESGVALTHREREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
844. : SAEINHLLTQANWLANMSHSLMSRFLVPKLPAPESGVALTHREREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
k96243. : SAEINHLLTQANWLANMSHSLMSRFLVPKLPAPESGVALTHREREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
      SAEINHLLTQANWLANMSHSLMSRFLVPKLPAPESGVALTHREREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV

      *           220           *
KHW. : NFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP : 239
844. : NFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP : 239
k96243. : NFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP : 239
      NFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP

```

โปรตีน BpsI และ BpsR ของเชื้อ *B. pseudomallei* ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความเหมือนกันมากดังแสดงในตารางต่อไปนี้

BpsI	844	K9624	KHW
844	1.000	0.970	0.980
K9624	---	1.000	0.980
KHW	---	---	1.000

BpsR	844	K9624	KHW
KHW.	1.000	0.995	1.000
844	---	1.000	0.995
K9624	---	---	1.000

เมื่อนำรหัสโปรตีน BpsI ของเชื้อ *B. pseudomallei* ไปเปรียบเทียบกับโปรตีนตระกูลเดียวกัน (LuxI homologue) ของเชื้ออื่นๆ ได้ผลว่า โปรตีน BpsI มีความเหมือนกับ โปรตีน

CepI ของเชื้อ *B. cepacia* 86%, เหมือนกับ โปรตีน SolI ของเชื้อ *R. solanacearum* 75%,
 เหมือนกับ โปรตีน RhlI ของเชื้อ *P. aeruginosa* 60%, และ เหมือนกับ โปรตีน LuxI ของ
 เชื้อ *V. fischeri* 51% ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปต่อไปนี้

```

          *   *   *           *   *   *
BpsI : M R T F V H G -- D G R L P S D L A A D L G L Y R H R V F V E Q L G W K L P S A S E G F E R -- D Q Y D R D D T V Y V F A R D D D
CepI : M Q T F V H E -- E G R L P H E L A A D L G R Y R R R V F V E Q L G W A L P S A N E S F E R -- D Q F D R D D T V Y V F A R N A D
SolI : M R T F V H G -- G G R L P E G I D A A L A H Y R H Q V F V G R L G W Q L P M A D G T F E R -- D Q Y D R D D T V Y V V A R D E G
RhlI : M I E L L S E S L E G - L S A A M I A E L G R Y R H Q V F I E K L G W D V V S T S R V R D Q E F D Q F D H P Q I R Y I V A M G R Q
LuxI : M T I M I K K S D F L A I P S E E Y K G I L S L R Y Q V F K Q R L E W D L V V E N N - L E S -- D E Y D N S N A E Y I Y A C D D T
          M           g l p       a l   y R   V F       L g W   l           e   D q   D   t   Y   A
    
```

```

          *           *           *   *
BpsI : G E I C G C A R L L P T T R P Y L L K E L F P T L V A Q D M F L P Q S A A V W E L S R F X A N A E D P A G - G G N P A W A V R P M
CepI : G D M C G C A R L L P T T R P Y L L K S L F A D L V A E D M F L P Q S A A V W E L S R F - A A T D D E G G - P G N A E W A V R P M
SolI : G T I C G C A R L L P T T R P Y L L K D V F A S L L M H G M P P E S P E V W E L S R F A A R S G A P C P R S G R A D W A V R P M
RhlI : G - I C G C A R L L P T T D A Y L L K E V F A Y L C S E - T P - P S D P S V W E L S R Y A A S A A D - - - - - D P Q L A M K - I
LuxI : E N V S G C W R L L P T T G D Y M L K S V E P E L L G Q - Q S A P K D P N I V E L S R F A V G K N S - S K I N N S A S E I T M K L
          g   c G C a R L L P T T   Y L L K   F   L           p   P           v w E L S R f   a           a
    
```

```

BpsI : L A A V V E C A A R L C A K Q L I G V T F L S M E R L F R R I G V H A H R A G P A Q Q I D G R M V V A C - - - - - W I D L G A Q T L
CepI : L A A V V E C A A Q L G A R Q L I G V T F A S M E R L F R R I G I H A H R A G P P K Q V D G R L V V A C - - - - - W I D I D P Q T F
SolI : L A S V V Q C A A Q R G A R R L I G A T E V S M V R L F R R I G V R A H R A G P V R C I G G R P V V A C - - - - - W I D I D A S T C
RhlI : F W S S L Q C A W Y L G A S S V V A V T T A M E R Y F V R N G V I L Q R L G P P Q K V K G E T L V A I S F P A Y Q E R G L E M L
LuxI : F E A I Y K H A V S Q C I T E Y V T V T S T A I E R F L K R I K V P C H R I G D K - E - - - - - I H V L G D T K S
          c A       G a       v T       m e R   f   R i g v       h R   G p           g       v a
    
```

```

BpsI : A A L D L D P L L C A P P A E A A : 203
CepI : A A L G I E P G Q A A R Q A I A A : 202
SolI : A A L G I P S A S A A P G P V L Q : 204
RhlI : L R Y H P E W L Q G V E L S M A V : 201
LuxI : V V L S M P I N E Q F K K A V L N : 193
    
```

1

ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำรหัสโปรตีน BpsR ของเชื้อ *B. pseudomallei* ไปเปรียบเทียบกับ โปรตีนตระกูลเดียวกัน (LuxR homologue) ของเชื้ออื่นๆ ได้ผลว่า โปรตีน BpsR มีความ เหมือนกับ โปรตีนCepR ของเชื้อ *B. cepacia* 88%, เหมือนกับ โปรตีน SolR ของเชื้อ *R. solanacearu* 81%, เหมือนกับ โปรตีน RhIR ของเชื้อ *P. aeruginosa* 52%, และ เหมือนกับ โปรตีน LuxR ของเชื้อ *V. fischeri* 46% ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปต่อไปนี้ ตำแหน่งที่สี เข้มสุดเป็นตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ในทุกโปรตีนที่นำมาเปรียบเทียบ

```

BpsR : MELR-----WODAYL---QFSAAEENEQQLFQQIAAYTKRLGFEEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFD
CepR : MELR-----WODAYQ---QFSAAEDEQQLFORIAAYSKRLGFEEYCCYGIRVPLPVSKPAVAIFD
SolR : MEPD-----FODAYH---AFRTAEDEHQLFREIAAIARQLGFDYCCYGARMPLPVSKPAVAIFD
RhIR : MRNDGGFLLWWDGLRS--EMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRRLGFDYAYGVVRHTIIFTRPKTEVHG
LuxR : MKNIN---ADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMVHCEYLLAIYIPHSMVKSDISILD
      M          D y          f          lgf Y yg r p p kp i d

```

```

BpsR : TYPNGWMERYOEMNYLEVDPTVREGALSSNMIVW----PEASASDATTLLWSDARDHGLAVGVAQ
CepR : TYPDGWMAHYQAOYIEIDSTVRDGAINTNMIVW----PDVDRIDPCPLWQDARDFGLSVGVAQ
SolR : TYPAGWMQHYCASGFLDIDPTVRAGASSDLIVW----PVSIRDDAARLWSDARDAGLNIGVAR
RhIR : TYPKAWLERYQMONYGAVDPAILNGLRSEMIVW----SDSLFDQSRMLWNEARDWCLCVGATL
LuxR : NYBKKWRQYDDANLIKYPDIYDYSNSNHSPINWNIFENNAVNKKSPNVIKEAKTSGIITGFSF
      tYP W Yq n Dp v g ivW          lw Ard GL G

```

```

BpsR : SSWASRGVFGLLTIAR-HTDRLTSAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHR
CepR : SSWAARGAFGLLSIAR-HADRLTPAEINMLTLQTNWLANLSHSLMSRFMVPKLSPAAGVTLTAR
SolR : SSWTAHGAFGLLTIAR-HADPLTAAELGQLSIATHWLANLAHTLMSPFLLVQVLPESNAVLTTR
RhIR : PIRAPNNLLSVLSVAR-DQQNISSEFREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLHPMLMSNP-VCLSHR
LuxR : PIHTANNGFGMLSFHSEKDNIDSLFLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSN--DLTKR
      fg L Ar d e          p l          Lt R

```

```

BpsR : ERKVLWCWTGEGKTACEIGQILSISERTGNFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP----
CepR : DREVLCWTAEGKTACEIGQILSISERTVNFHVNNILEKLGATNKVQAVVKAIASAGLIEAP----
SolR : EREVLCWTGEGKTAYEIGQILSISERTVNFHVNNVLLKLAATNKVQAVVKAIATGLI-----
RhIR : EREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNTQKKFDAPNKTAAAYAAALGLI-----
LuxR : ERKCLAWACEGKSSWDISKILGCSERTVTFHLTNAQMKINTNRCQSISKAILTATDCPYFKN
      ere L Wt eGK eI IL iSErTvnFH N Kl atNk qa kAi GLI

```

บริเวณโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง 60 เบสก่อนจุดเริ่มต้นของยีน *bpsI* (-60 bp from strat codon) ได้พบรหัสซึ่งควรเป็น lux box คือ **CCCTGTAAGGGTTAACAGTT** ซึ่งแทบจะ เหมือนกับ lux box ของยีน *cepl* ตารางต่อไปนี้ แสดงการเปรียบเทียบ lux box ของยีน *luxI*, *cepl*, *soll* and *RhII* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน ตำแหน่งที่มีดาว* แสดงถึงตำแหน่งที่มี ความอนุรักษ์

```

luxI: ACCTGTAGGATCGTACAGGT
bpsI: CCCTGTAAGGGTTAACAGTT
cepl: CCCTGTAAGAGTTACCAGTT
soli: CCCTGTCAATCCTGACAGTT
RhII: CCCTACCAGATCTGGCAGGT
      ***          *** *

```

การศึกษาบทบาทหน้าที่ของระบบ quorum sensing ต่อการแสดงออกของ
ยีนต่าง ๆ เพื่ออธิบายลักษณะของบทบาทของระบบ quorum sensing ใน
เชื้อ B. pseudomallei โดยการสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของระบบ quorum
sensing

การสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของระบบ quorum sensing

การสร้างเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ไม่ให้มีการมีการแสดงออกของยีนในระบบ quorum sensing โดยสร้างสายพันธุ์ที่เป็น knock-out mutant ทำโดยใช้ พลาสมิด pKnock ซึ่งเมื่อต้องการ knock-out ยีนใด ก็เพียงทำ PCR ขึ้น DNA ยีนนั้นแล้วแทรกลงไปใน cloning site ของ pKnock ต่อไปใช้ *E. coli* S17-1 λ pir เป็นตัว conjugate pKnock ที่มียีนที่ต้องการ ลงไปใน *B. pseudomallei* ซึ่งจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนโดยวิธี crossing over ระหว่างโครโมโซมของ *B. pseudomallei* กับ pKnock-Tc (สำหรับเลือกด้วยยา tetracycline) ผลที่ได้ในโครโมโซมของ *B. pseudomallei* จะมีส่วนของพลาสมิด pKnock-Tc แทรกเข้าไปอยู่ในยีนที่เราต้องการ ทำให้เกิดสายพันธุ์ที่เป็นยีน knock-out ได้ ในการศึกษา นี้ เราได้ สร้างสายพันธุ์ ที่เป็นยีน knock-out มา 3 มา 3 ชนิด ตามขึ้น DNA PCR ที่แสดง ไว้ในหน้า 5 ได้แก่ สายพันธุ์ที่เป็นยีน knock-out ของ *bpsI*, *bpsR*, และ double knock-out ทั้ง *bpsI* และ *bpsR* โดยสายพันธุ์ PKI5 เป็นสายพันธุ์ *bpsI* knock-out สร้างโดย นำชิ้นส่วน DNA ขนาด 298 bp ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน *bpsI* โดยสร้างจาก PCR ใช้ primer IFP (5'-GTCACGCCGATCAGTTGCTT-3') และ primer IRP (5'-AGTACGATCGCGACGATACC-3') (รูป PCR fragment) นำไป ligate ใน pKNOCK-TC สร้างเป็น pKBI แล้วนำ pKBI ไป conjugate เข้าใน *B. pseudomallei* 844 ทำการ คัดกรอง โดยด้วยเพลทที่มี pseudomonas base agar เสริมด้วย tetracycline 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ จึงได้ สายพันธุ์ PKI5 มา

สายพันธุ์ PKR7 เป็นสายพันธุ์ *bpsR* knock-out สร้างโดย นำชิ้นส่วน DNA 323 bp fragment ของยีน *bpsR* ที่สร้างจาก PCR โดย primer RFP (5'-CGACACCTATCCGAACGGCT-3') และ primer RRP (5'-AACGGCTCATCAGCGAGTGC-3') (รูป PCR fragment) นำไป ligate ใน pKNOCK-CM สร้างเป็น pKBR แล้วนำ pKBR ไป conjugate เข้าใน *B. pseudomallei* 844 ทำการ คัดกรองโดยด้วยเพลทที่มี pseudomonas base agar เสริมด้วย chloramphenicol 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ จึงได้ สายพันธุ์ PKR7 มา

สายพันธุ์ KBIR5 เป็นสายพันธุ์ที่เป็น double knock-out ทั้ง *bpsI* และ *bpsR* ทำโดยนำ พลาสมิด pKBR ไป conjugate เข้าไปในสายพันธุ์ PKI5 ทำการ คัดกรองโดยด้วยเพลทที่มี pseudomonas base agar เสริมด้วยทั้ง tetracycline 60 $\mu\text{g ml}^{-1}$ และ chloramphenicol 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ จึงได้ สายพันธุ์ KBIR5 มา

ทำการพิสูจน์ สายพันธุ์ PKI5, PKR7, และ KBIR5 โดยนำเชื้อ knock-outed ดังกล่าวมาทำ PCR ยีน *bpsI* ด้วย Primers IFF และ IRF ซึ่งเดิมควรให้ PCR product ขนาด 612 bp และ

ทำ PCR ยีน *bpsR* ด้วย Primers RFF และ RRF ซึ่งเดิมควรให้ PCR product ขนาด 720 bp แต่พบว่า สายพันธุ์ PKI5 มี *bps/p::pknock-Tc* plasmid แทรกเข้าไปในยีน *bpsI* ทำให้ได้ PCR product ขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 2589 bp+612 bp ตามคาด สายพันธุ์ PKR75 มี *bpsRp::pknock-Cm* plasmid แทรกเข้าไปในยีน *bpsR* ทำให้ได้ PCR product ขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 2186 bp+720 bp ตามคาด ในขณะที่สายพันธุ์ KBIR5 ทั้งยีน *bpsI* และ *bpsR* มีขนาดเพิ่มขึ้นทั้งสองยีน

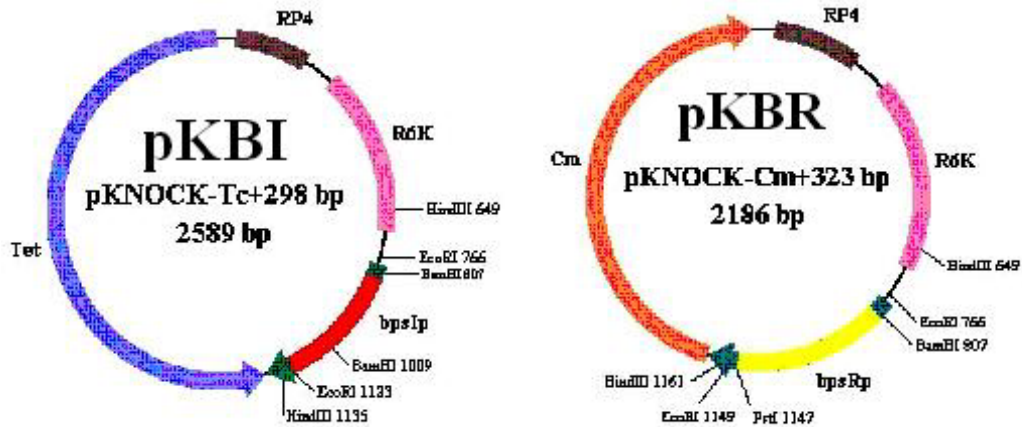
1	
CTCCTTTAATGACGAACGGC	BOGGCCCCGAAGCGGGGCGACCGGGCGCGCTCAGGCGGGCTTCGGCGGG
GGGTCGAGATCGAGCGCGGCGAGCGTTTGC	CGCGCACAGCAGC
GGCCCGTCCGGTGC	GGCGGATCCGCGGAAACAGGCGCTCCATGCTCAGAAAC
CCAAAGCGCGCGGGCGACTCGACGACGGCGGCGAGCA	CGCGCCAGGCCAGGTTGCCGCCCGGGCGGATCCTCG
GGCTTCGCA	AGCGCGACAATTCCAGACGGCGG
TCCTTCAGCA	ACGGGCGGGTCCTCGGCGAGCGC
ACGGTATCGTCGCGATCGTACT	ATCCCGCTCGAACCTTCGCTTGC
CGGTGCCGATAAGGCTCAGACCAGCCGCAAGTCGCTCGGCGAGCGCCGCTCGC	CATGAACGAAAGTTCGCATGTCGTCTCG
TGCGTGTGCTTTGGAATGGGCGCATTACATCGCGCGCTCCGAGGACAGGTAAC	GTTAACCCCTTACAGGGTCCGGAAAGCGGGG
CTGGTGGCGGGGGCGGGGCGGTTCCGCCGTTTTCGTCGGTGTCCGACTGCAAA	GATTTCGATAAATTTGCTTGTCAATCCGCAA
CGTTCGAGGAAAAATTAGACAATATGCACTGATTGCGCCGACGCGCGTCACT	GCAAGGTTGGGACCCGCATGCGCAAAATCGCCG
CGACGAAGCATCGCGGCGGTGACGGCGGACGGCCAGTTCACTTGGGCGAGCCG	CGCGACAGTGC
CCGATGTGAGGCCGTTGCGCTCGACGCCCATCACGTTGCTGCGCACGTGCGCC	CATGCAATGACGAAGGCGCCGTTGCGCGG
TGATGTACAGTCCAGCCCACTGTGAGATGCGCCGCGCGCGCTGACCGCCGCT	CCCACTCGGTGTAGCCGGCGATGCGG
GGCTCGATGTGCTCGCACGTAGTTCCGACGACGTCCGGAATCGATTCCGGAC	GATACGTGA
GGCTGCATCGGAAGGCGACGTAGCCGTGCGTGGAAAGAGCCGCGAAAGCGGT	GGAGCCATGGT
TCAGCCCGCGCGCTGCTGAAACCTAGCAAGTATGACAGCGTGAAGCTGCTGGA	AACGAATGGAAGTGCCTGG
TATCTCAATTTAGCGCCGCGGAGAACGAGCAGCAGCTCTTCCAACAGATCG	CGCGGTATACGAGCGGCTCGGTTTCGAATAT
TGCTGCTATGGCATAACGCTGCCGTTGCCGATCTCGA	CGCGATTT
CGCTACCGAGAAATGAAC	TACCTGGAGGTCGATCCGA
GCGAGCGCGAGCGACGCGACGCTCTGGA	ACG
TCGCGCGGGGTGTTGCGTCTCTGACGATCG	GGCACACCGACGCGCTGACGTCCGCGAGATCAACATCTGACGTTGCAG
GGCAACTGGCTCGCGAACATGTC	CACTCGCTGATGAGCGGTT
ACGCAACCGCGAGCGGAAGGCTGCTGCTGGACGGGGAGGGCAAGACCGCTG	CGAGATCGGGCAG
CGCACGGGTGAACCTTACGCTCAACAACATCCTCGACAGCTCGGCGCGACGA	AAAGGTGAGGCC
ATGGGGCTCATCGACGCGCGGTAAAGCATTGCCGCGAGCGCGGTGCGCGCGCG	GGCTCACTCCATCAACGGTTCC

รูป PCR fragment แสดง ยีน *bpsI* และ *bpsR* ของ *B. pseudomallei* โดย ORF ของยีน *bpsI* และยีน *bpsR* ORF มีขนาด 612 และ 720 bp ตามลำดับ ตัวเลขแสดงตำแหน่งของ PCR primers ที่ใช้ในการศึกษานี้

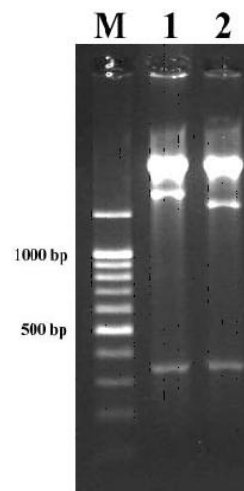
- 1: IFF (5'-CTGCAGCTCCTTGAATGACGAACGGC-3')
- 2: IFP (5'-GTCACGCCGATCAGT TGCTT-3')
- 3: IRP (5'-AGTACGATCGCGACGATACC-3')
- 4: IRF (5'-AAGCTTCATGCGAACTTTCTGTTTCATGG-3')
- 5: RFF (5'-AAGCTTAACGAATGGAAGTGCCTGG-3')
- 6: RFP (5'-CGACACCTATCCGAACGGCT-3')
- 7: RRP (5'-AACGGCTCATCAGCGAG TGC-3')
- 8: RRF (5'-CTGCAGGAACCGTTGATGGAGTGAGC-3')

pKBI: *bpsI* gene on pknock-Tc

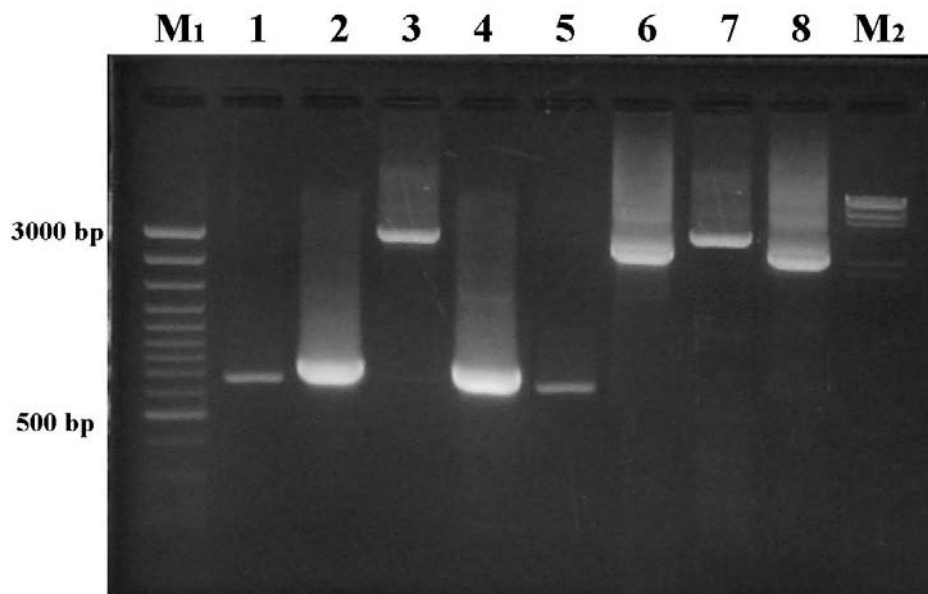
pKBR: *bpsRp* gene on pknock-Cm



รูป **pKNOCK** แสดง พลาสมิด pKnock ที่เติมยีน *bpsI* และ *bpsRp* ที่ต้องการ knockout เข้าไป กลายเป็น pKBI และ pKBR



รูป แสดง พิสูจน์พลาสมิด pKBI (lane 1) เมื่อตัดด้วย *EcoRI* ได้ ชิ้นส่วน 2232 bp และ 357 bp ตามคาด และ พิสูจน์พลาสมิด pKBR (lane 2) เมื่อตัดด้วย *EcoRI* ได้ ชิ้นส่วน 1803 bp และ 383 bp ตามคาด



รูป แสดง PCR products ของ *bpsI* and *bpsR* genes จาก *B.pseudomallei* 844 wildtype และ knockout mutants PKI5, PKR7, และ KBIR5 บน 1% agarose gel electrophoresis.

Lane M1: 100 bp ladder

Lane M2: 1 kb ladder

Lane 1: 844 *bpsI*

Lane 2: 844 *bpsR*

Lane 3: PKI5 *bpsI*

Lane 4: PKI5 *bpsR*

Lane 5: PKR7 *bpsI*

Lane 6: PKR7 *bpsR*

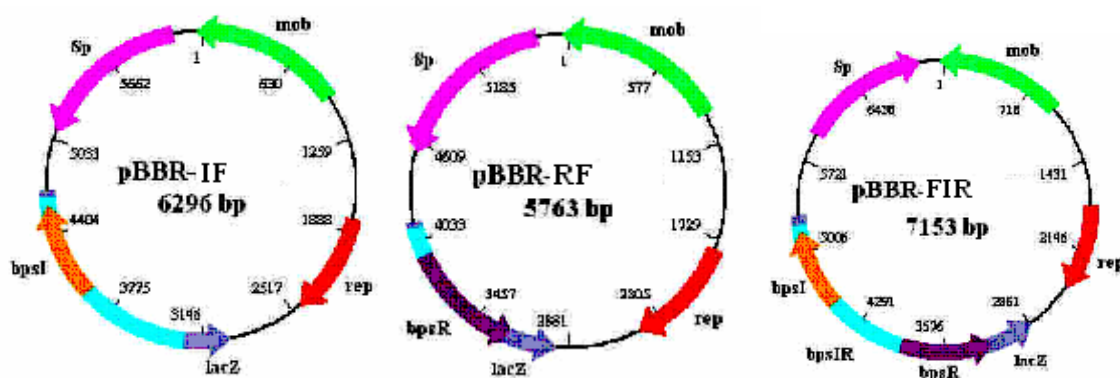
Lane 7: KBIR5 *bpsI*

Lane 8: KBIR5 *bpsR*

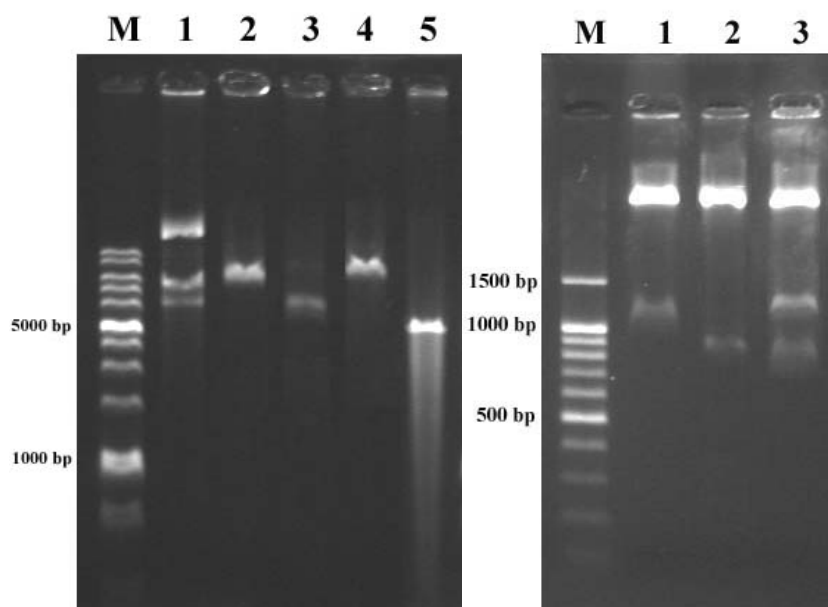
การทำให้เชื้อกลายพันธุ์ของระบบ quorum sensing ควบคุมกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วย
การใส่ยีนที่ขาดไป

สายพันธุ์ PKI5, PKR7, และ KBIR5 ถูกนำมาใส่ยีนที่ขาดไป โดยเริ่มจาก

- ทำการ ทำ PCR ด้วย Primers IFF และ RRF ได้ชิ้น DNA ขนาด 2.5 kb
- เมื่อตัดด้วย EcoR1 ได้เป็นชิ้น DNA 1,288 bp ซึ่งมียีน *bpsI* ที่สมบูรณ์อยู่ และได้ชิ้น 962 bp ซึ่งมียีน *bpsR* ที่สมบูรณ์อยู่พร้อมด้วย lux box
- ทำการโคลนชิ้น DNA 1,288 bp เข้าไปในพลาสมิด pBBR-Sp ได้เป็นพลาสมิด pBBR-IF
- ทำการโคลนชิ้น DNA 962 bp เข้าไปในพลาสมิด pBBR-Sp ได้เป็นพลาสมิด pBBR-RF
- และ ทำการโคลนชิ้น DNA 2.5 kb เข้าไปในพลาสมิด pBBR-Sp ได้เป็นพลาสมิด pBBR-FIR และพิสูจน์โดยการตัดด้วย restriction enzymes



รูป แสดงพลาสมิด pBBR ที่ใส่ยีน *bpsI*, *bpsR* และ *bpsIR* ตามลำดับ



รูปซ้าย 1% gel แสดงพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย HindIII เลน 1 pBBR ยังไม่ถูกตัด, เลน 2 pBBR-IF, เลน 3 pBBR-RF, เลน 4 pBBR-FIR เลน 5 pBBR. รูปขวา 2% gel แสดงพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย PstI และ EcoRI เลน 1 pBBR-IF, เลน 2 pBBR-RF, เลน 3 pBBR-FIR

Complemented strains

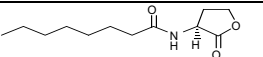
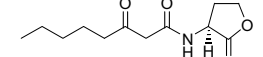
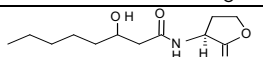
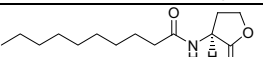
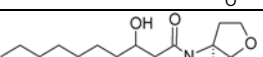
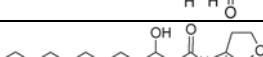
นำพลาสมิด pBBR-IF, pBBR-RF, pBBR-FIR ใส่ไปในสายพันธุ์ PKI5, PKR7, และ KBI5 ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธุ์ knockout ของระบบ quorum sensing ครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไป และจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ พลาสมิด pBBR-IF ยังถูกนำไปใส่ใน *E. coli* DH5 α เพื่อใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ Acyl Homoserine Lactone โดย BpsI ด้วย

การศึกษาลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ดั้งเดิม เปรียบเทียบกับที่ถูก knockout

การศึกษา Acyl Homoserine Lactone ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ดั้งเดิม เปรียบเทียบกับที่ถูก knockout

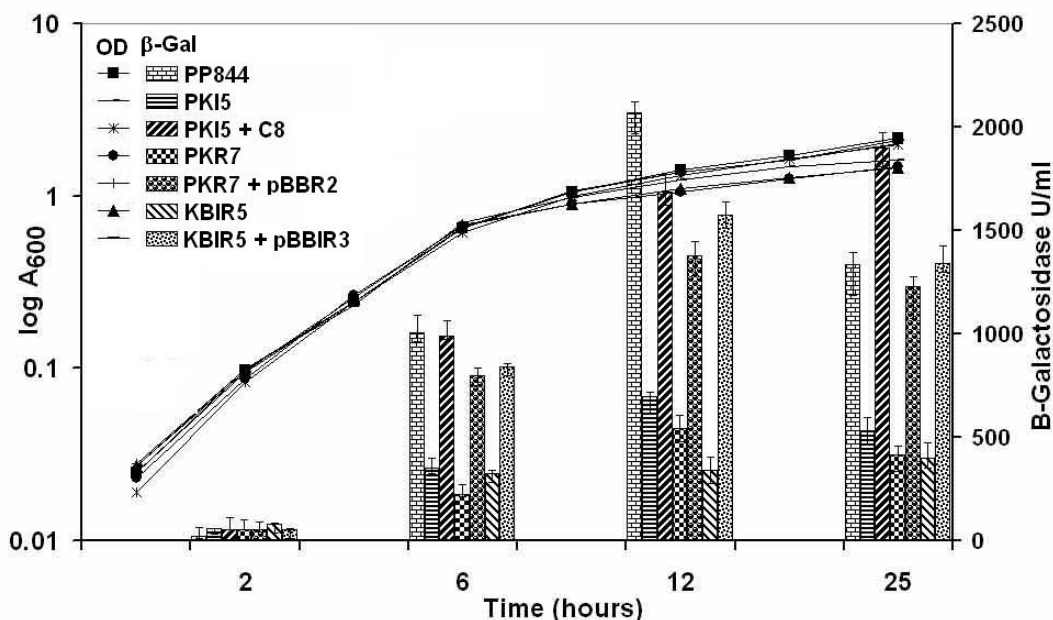
น้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ต่างๆถูกสกัดด้วย ethyl acetate แล้วทำให้แห้ง และทำให้ละลายด้วย methanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Liquid Chromatography /Mass

Spectrophotometry (LC/MS) ที่ ห้องปฏิบัติการ Quorum Sensing ของสถาบัน Institute of Infection, Immunity & Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham โดยร่วมมือกับ Prof. Paul Williams, Director ของสถาบันดังกล่าว ผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม 844 สร้าง Acyl Homoserine Lactone (AHL) ถึง 6 ชนิด คือ C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL และ 3-hydroxy-C12-HSL โดยที่ 3-hydroxy-C8-HSL และ 3-hydroxy-C12-HSL ไม่เคยถูกรายงานมาก่อนว่าสร้างมาจากเชื้อ *B. pseudomallei* ส่วนสายพันธุ์ PKI5, และ PKR7 ทั้งหมดพบว่า AHL หายไป 2 ชนิด คือ C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL อันเป็นการแสดงว่า ระบบ quorum sensing bpsIR นี้ สร้างและใช้ AHL 2 ชนิดนี้ ในการทำงาน เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *E. coli* DH5 α ที่มี พลาสมิด pBBR-IF มาสกัดด้วย ethyl acetate และวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS ก็พบแต่ C8-HSL เท่านั้น ผลการวิเคราะห์ สรุปแสดงในตารางต่อไป่นี้ แสดงว่า C8-HSLสร้างโดย BpsI อย่างแน่นอน และเป็นไปได้ว่า 3-oxo-C8-HSL สร้างโดยการทำงานร่วมกันของ BpsI และ autoinducer synthase ตัวอื่น ในเชื้อ *B. pseudomallei*

AHL		<i>m/z</i>	Retention time (min)	Principle fragment ions	844 (wild type)	PKI5 (<i>bpsI</i> -)	PKR7 (<i>bpsR</i> -)	<i>E. coli</i> (<i>bpsI</i> +))
C8-HSL		228	5.9	228, 127, 102	+	-	-	+
3-oxo-C8-HSL		242	4.8	242, 141, 102	+	-	-	-
3-hydroxy-C8-HSL		244	4.6	244, 226, 125, 102	+	+	+	-
C10-HSL		256	8.5	256, 155, 102	+	+	+	-
3-hydroxy-C10-HSL		272	5.4	272, 254, 153, 102	+	+	+	-
3-hydroxy-C12-HSL		300	7.9	300, 282, 181, 102	+	+	+	-

การศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ BpsI และ BpsR กับการสร้างโปรตีน
DpsA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งปกป้องแบคทีเรียจากภาวะที่เป็น
อันตรายจาก Oxidative Stress

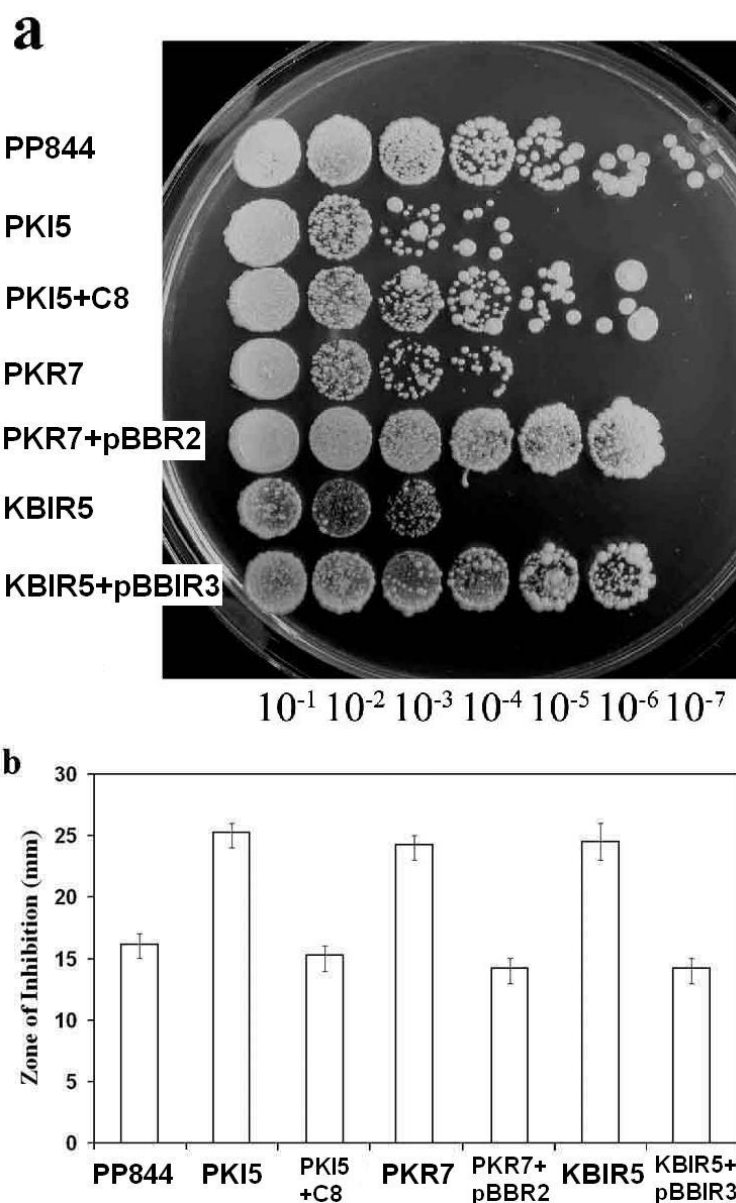
ในรายงานนี้ยังได้ พิสูจน์ว่า การแสดงออกของโปรตีน DpsA นั้นถูกควบคุมโดยระบบ bpsIR ด้วยโปรตีน DpsA เป็นโปรตีนที่สร้างภายในเซลล์ของแบคทีเรียเพื่อปกป้องตนเองจาก oxidative stress เมื่อพิจารณา บริเวณ promoter ของยีน dpsA พบว่ามีบริเวณที่การเรียงลำดับเบสที่น่าจะเป็น lux box ซึ่งเป็นที่สำหรับให้โปรตีน BpsR ซึ่งทำหน้าที่เป็น transcription activator มาจับและทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ โปรตีน DpsA ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ BpsI และ BpsR กับการสร้างโปรตีน DpsA ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยใช้ mini-transposon TnpD ซึ่งมี promoter ของยีน dpsA ต่ออยู่กับ ยีน beta-galactosidase (*lacZ*) (ได้รับ mini-transposon TnpD จาก ดร. สุวิทย์ ล้อประเสริฐ แห่งสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์) ใส่ลงไปในเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งจะทำให้มีชิ้น DNA ที่มี promoter ของยีน dpsA ต่ออยู่กับ ยีน *lacZ* แทรกลงไปในโครโมโซมของเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ ทำให้สามารถวัดระดับ activity ของ beta-galactosidase จากทุกสายพันธุ์เมื่อใส่ substrate o-nitrophenyl- β -D-galactoside ลงไป ผลทำให้ทราบได้ว่า การโปรตีน dpsA ที่สะท้อนด้วย promoter ของยีน dpsA ได้อิทธิพลจากระบบ quorum sensing BpsIR โดยเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ 844 สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไปมีค่า beta-galactosidase activity ต่ำกว่าชัดเจน และในสายพันธุ์ knockout ที่ยีนครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็มี ค่า beta-galactosidase activity สูงขึ้นมาอีก (รูปด้านล่าง)



รูป แสดง growth curve และ beta-galactosidase activity ของ สายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่มีชิ้น DNA ที่มี promoter ของยีน dpsA ต่ออยู่กับ ยีน *lacZ* แทรกลงไปในโครโมโซม

การศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ BpsI และ BpsR กับการทนต่อ Oxidative Stress ของเชื้อ *B. pseudomallei*

นำเชื้อ *B. pseudomallei* มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยใช้ *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) เป็น ตัวทดสอบ โดยทำเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองแรก การทนต่อ *t*-BOOH นำเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ เลี้ยงใน M9 broth ปรับ OD A600 ให้เท่ากันแล้วเจือจางไป 10 เท่าเป็นลำดับไป มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยใช้นำมาหยดบน LB agar ที่มี *t*-BOOH 150 μ M แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม เชื้อแต่ละสายพันธุ์ขึ้นได้จนถึงความเจือจางเท่าใด ผลปรากฏว่า สายพันธุ์ 844 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} ในขณะที่สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไปขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-3} - 10^{-4} เท่านั้น ต่ำกว่าชัดเจน และในสายพันธุ์ knockout ที่ยีนครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็กลับมาขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-6} แสดงในรูป a ต่อไปนี้

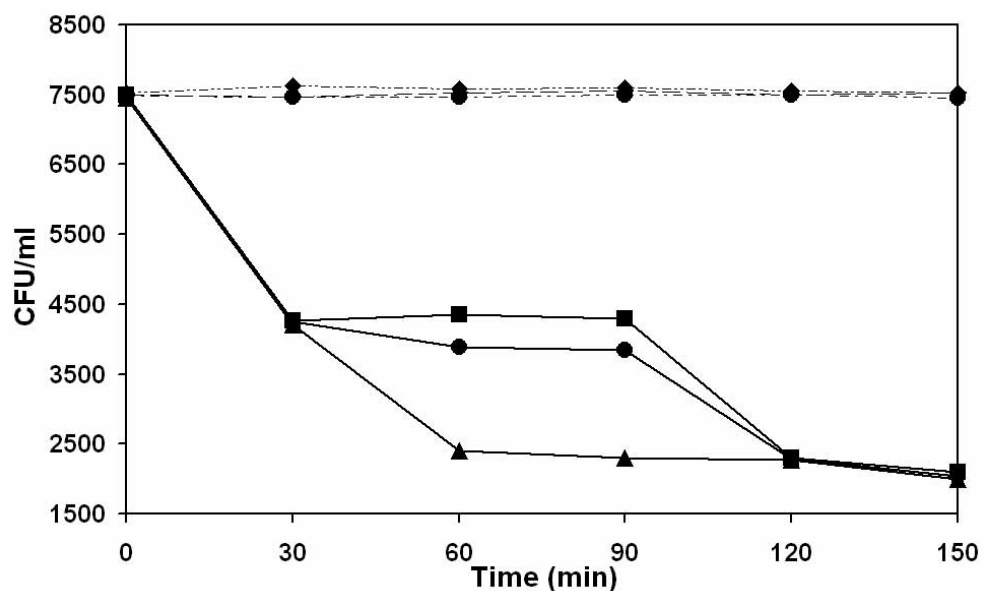


รูป a. แสดงการเติบโตได้ของเชือบนเพลทที่มี *t*-BOOH.

รูป b. แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางของ *t*-BOOH disk diffusion.

การทดลองที่สอง Disk Diffusion Test นำเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธุ์ เลี้ยงใน M9 broth ปรับ OD A600 ให้เท่ากับ 1.0 ผสมกับ LB agar แล้วเททับบน เพลท LB agar แล้ววางกระดาษกรองรูปกลม disc ที่ชุบด้วย *t*-BOOH 250 μ M แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม บริเวณที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์ไม่สามารถขึ้นได้รอบๆ disc มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่าใด ผลปรากฏว่า สายพันธุ์ 844 มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 16 มม ในขณะที่ สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไป มี เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 25 มม และในสายพันธุ์ knockout ที่ยีนครบ กลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็กลับมามีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยลดลง เป็น 15-16 มม (รูปb)

การทดลองที่สาม เพื่อดูว่า การที่เชื้อทนต่อ *t*-BOOH ลดลงเมื่อ ระบบ quorum sensing ถูก knockout เป็นผลมาจาก dpsA ที่ลดลงหรือไม่ โดยเปรียบเทียบ ระหว่างเชื้อ PP844, KBIR5, และ KBIR5 ที่ใส่ plasmid pBBIR3 ที่มียีน dpsA เพื่อให้สร้างโปรตีน dpsA นำเชื้อทั้งสามสายพันธุ์ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี *t*-BOOH 150 μ M แล้วเก็บตัวอย่างมานับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เปรียบเทียบกัน ผลปรากฏว่า หลังจากใส่ มี *t*-BOOH ไปได้ 30 นาที เชื้อทั้งสามเริ่มลดจำนวนลง แต่ที่เวลา 30-นาที เริ่มเห็นความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่รอด จนถึงที่เวลา 90 นาที แล้วหลังจากนั้นก็ลดจำนวนลงไปพอกัน โดยที่เวลา 30-90 นาที สายพันธุ์ 844 มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ 4500 CFU/ml ในขณะที่ สายพันธุ์ KBIR5 ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไป มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ลดลงเป็น 2500 CFU/ml และในสายพันธุ์ KBIR5 ที่ถูก ครอบกลับมามีอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาด ไปก็กลับมา มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เพิ่มขึ้นเป็น 4000 CFU/ml ดังแสดงในรูป ต่อไปนี้

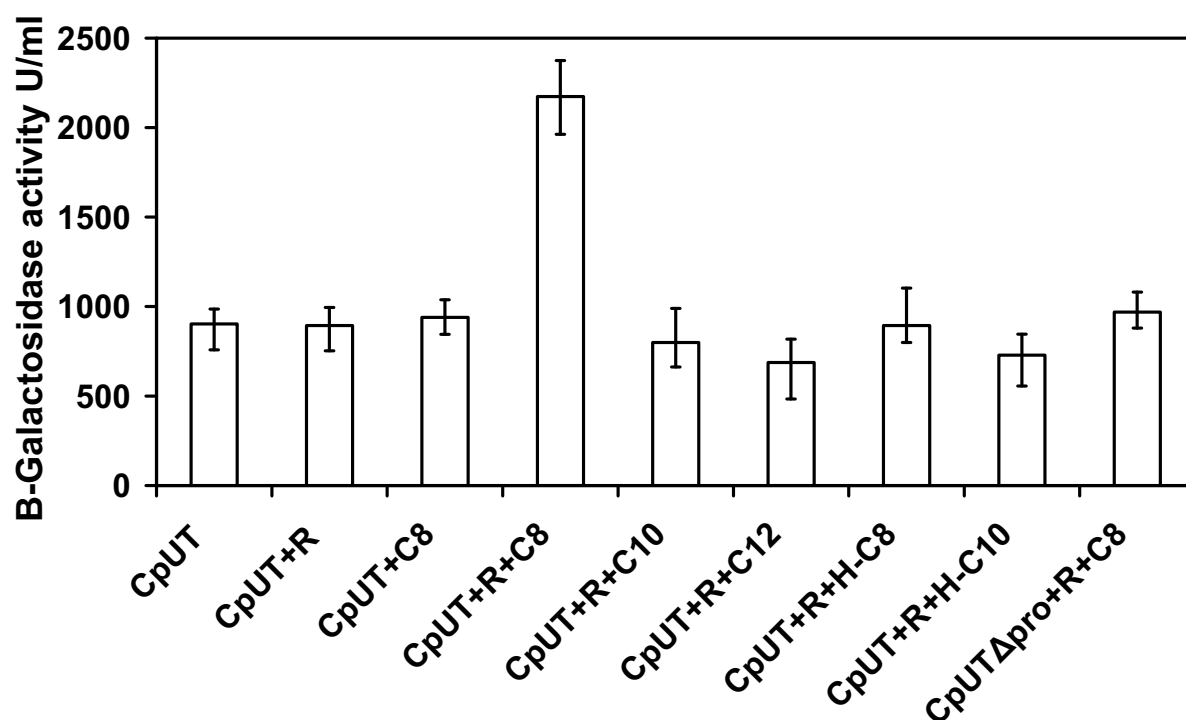


รูป แสดง เชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี *t*-BOOH. เชื้อ PP844 (■), KBIR5 (▲), และ KBIR5 ที่ใส่ plasmid pBBIR3

การพิสูจน์กลไกของระบบ Acyl homoserine lactone (AHL) quorum sensing BpsIR
กับการสร้างโปรตีน DpsA ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการวัดสัญญาณ beta-
galactosidase จาก dpsA promoter

เพื่อเป็นการพิสูจน์ให้ชัดเจนยิ่งขึ้นว่า โปรตีน DpsA ถูกควบคุมด้วย ระบบ quorum sensing bpsIR โดยพิสูจน์กลไกว่าทำโดยที่ โปรตีน BpsR กับ AHL autoinducer c8-HSL ไปจับที่ promoter ของยีน dpsA

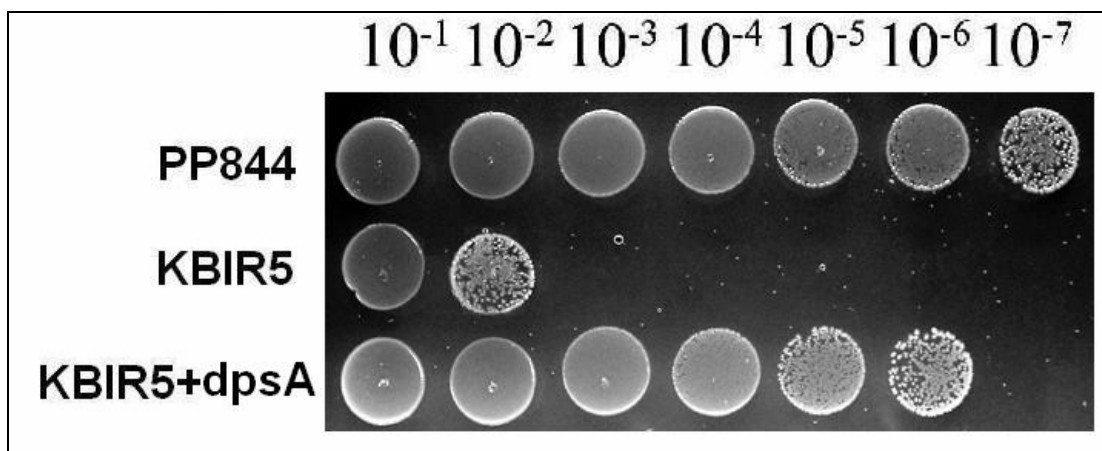
ดังนั้นจึงได้ทำการใส่ dpsA promoter เพิ่มลงไปข้างหน้ายีน dpsA-lacZ ในพลาสมิดที่อยู่ใน *E. coli* (CpUT) แล้ววัด สัญญาณ beta-galactosidase เทียบกัน เมื่อมีและไม่มี พลาสมิดโปรตีน BpsR, และ เมื่อมีและไม่มี AHL ชนิดต่างๆ ที่พบใน *B. pseudomallei* ได้แก่ c8-HSL, c10-HSL, c12-HSL, OH-c8-HSL, และ OH-c10-HSL ผลปรากฏว่า เป็นไปตามที่คาดหมาย และ คือ ต้องมี โปรตีน BpsR ร่วมกับ c8-HSL ที่ สร้างโดย โปรตีน BpsI เท่านั้น ที่ให้สัญญาณสูงสุด ตามรูป



การศึกษาว่าโปรตีน dpsA ช่วยปกป้องเชื้อ *B. pseudomallei* จาก Oxidative Stress

นอกจากนี้ ได้ทำการพิสูจน์ลึกเข้าไปอีกระดับหนึ่งว่าโปรตีน dpsA ช่วยปกป้องเชื้อจาก oxidative stress โดย นำเชื้อ *B. pseudomallei* มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยเลี้ยงเชื้อบน *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) agar โดยเปรียบเทียบ ระหว่าง

- สายพันธุ์ wild type (สายพันธุ์ PP844)
 - สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ทั้งยีน *bpsI* และ *bpsR* (สายพันธุ์ KBIR5)
 - สายพันธุ์ KBIR5 ที่มี พลาสมิด pDps (ได้รับจาก ดร. สุวิทย์ ล้อประเสริฐ) ซึ่งมี ยีน *dpsA* ที่สามารถทำให้ มีการสร้างโปรตีน DpsA ได้
- เลี้ยงเชื้อใน M9 broth ปรับ OD A600 ให้เท่ากันแล้วเจือจางไป 10 เท่าเป็นลำดับไป มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยใช้เชื้อที่ความเจือจางต่าง ๆ มาหยดบน LB agar ที่มี *t*-BOOH 150 μ M แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม เชื้อแต่ละสายพันธุ์ขึ้นได้จนถึงความเจือจางเท่าใด ผลปรากฏว่า
- สายพันธุ์ PP844 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} ตามคาด
 - ในขณะที่สายพันธุ์ KBIR5 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-2} เท่านั้น
 - และสายพันธุ์ KBIR5 ที่มีการสร้างโปรตีน DpsA ก็กลับมาขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-6} (ตามรูป)



ส่งตีพิมพ์บทความเรื่อง ระบบ quorum sensing BpsIR ของ
เชื้อ *B. pseudomallei* และการควบคุม โปรตีน DpsA

การศึกษาระบบ Acyl homoserine lactone (AHL) sensing BpsIR ของเชื้อ *B. pseudomallei* และความสัมพันธ์ของระบบ quorum sensing BpsIR กับการสร้างโปรตีน DpsA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ได้ถูกรวบรวมเป็นบทความเรื่อง “Quorum sensing regulates dpsA and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*” ส่งไปเสนอตีพิมพ์ในวารสาร Microbiology ของ Society for General Microbiology ประเทศอังกฤษ



และได้รับการตอบรับลงเผยแพร่ในวารสาร Microbiology ฉบับเดือนธันวาคม ปี 2006 Volume 152 หน้า 3651-3659 โดยอ้างอิงดังนี้

P. Lumjiaktase, S. P. Diggle, S. Loprasert, S. Tungradabkul, M. Daykin, M. Camara, P. Williams and **M. Kunakorn**. Quorum sensing regulates dpsA and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. Microbiology. 2006;152:3651-3659.

ส่ง reprint มาพร้อมกับรายงานนี้

การศึกษาความสามารถในการเข้าไปในเซลล์และอยู่รอดในเซลล์ของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ระบบ AHL quorum sensing

หลังจากตีพิมพ์บทความการศึกษาระบบ AHL quorum sensing *bpsIR* ไปแล้ว ได้มีโอกาสร่วมมือกับ ดร. พงษ์ศักดิ์ อุทัยสินเจริญ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการทดสอบการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ใน เซลล์ macrophage และเซลล์ epithelial โดยที่ ดร. พงษ์ศักดิ์ มีความชำนาญในการทดลองเชื้อ *B. pseudomallei* กับเซลล์ทั้ง 2 ชนิดมาก่อนแล้ว ตามผลงานดังนี้

-เซลล์ macrophage

(Utaisincharoen P, Tangthawornchaikul N, Kespichayawattana W, Anuntagool N, Chaisuriya P, Sirisinha S. Kinetic studies of the production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in macrophages stimulated with Burkholderia pseudomallei endotoxin. Clin Exp Immunol 2000; 122: 324–9.)

-เซลล์ epithelial

(Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Burkholderia pseudomallei stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A549. Clinical & Experimental Immunology. 2004;138:61–65.)

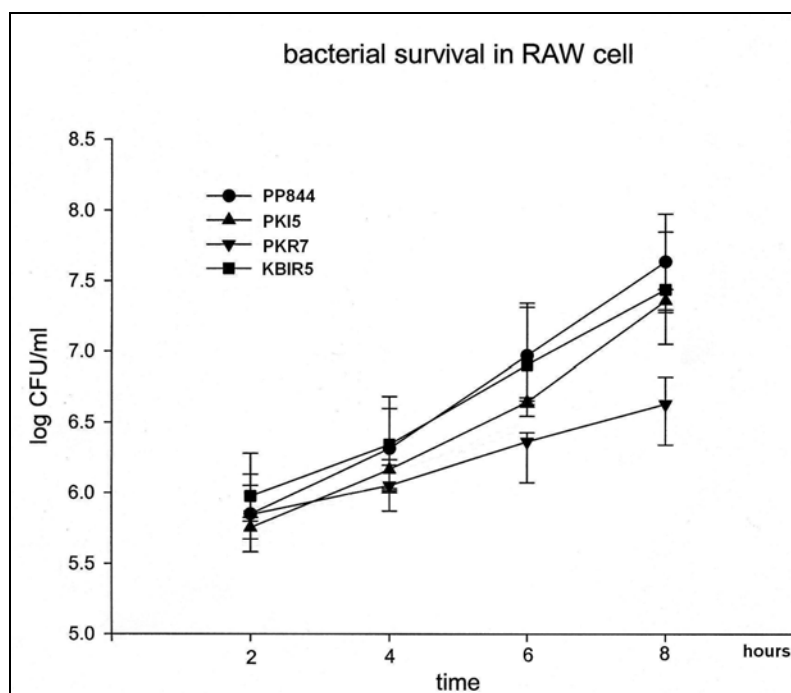
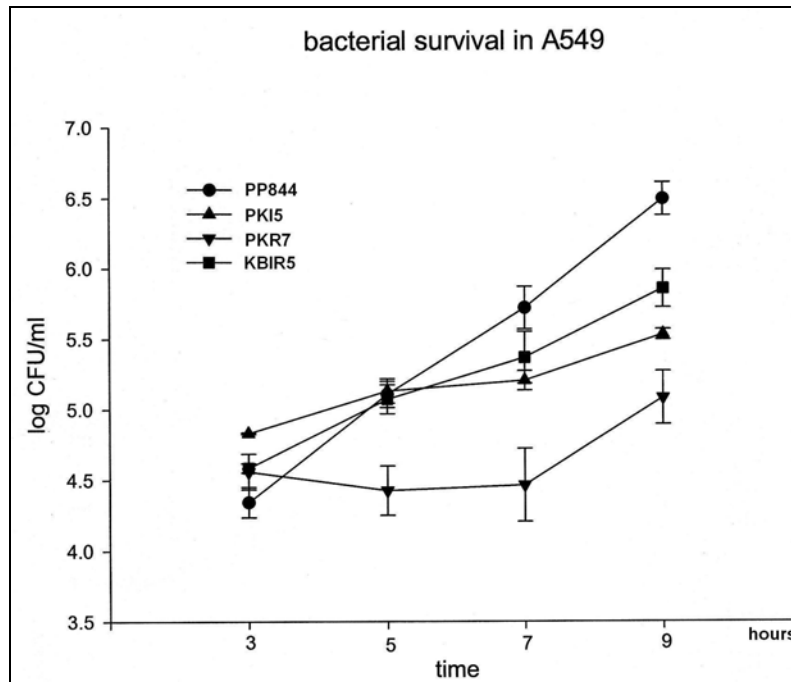
ในการทดลองได้นำเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ 844 (wild type), PKI5 ($\Delta bpsI$), PKR7 ($\Delta bpsR$), และ KBIR5 ($\Delta bpsIR$) ที่เลี้ยงใน Trypticase soy broth มาล้างในน้ำเกลือ phosphate-buffered saline (PBS) 3 ครั้ง และเจือจางโดยการวัด OD 650 nm จนได้ความหนาแน่นที่เหมาะสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ เซลล์ macrophage (RAW 264.7) ซึ่งเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM)ผสม 10% fetal bovine serum (FBS) หรือ เซลล์ alveolar basal epithelial (A549) ซึ่งเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงเซลล์ Ham's F-12 ผสม 10% fetal bovine serum (FBS) โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 37°C ซึ่งมี 5% CO₂ ผสมในบรรยากาศ

ทำการเพาะเลี้ยงร่วม (co-culture) ระหว่างเซลล์และแบคทีเรีย โดยอัตราส่วนของเชื้อ *B.*

pseudomallei กับเซลล์ A549 เป็น 10 ต่อ 1 เรียกเป็นศัพท์เทคนิคว่า multiplicity of infection (MOI) of 10:1 เพราะโอกาสที่เชื้อแบคทีเรียจะเข้าเซลล์ epithelial มีน้อย ในขณะที่ อัตราส่วนของเชื้อ *B. pseudomallei* กับเซลล์ RAW 264.7 เป็น 2 ต่อ 1 (MOI of 2:1) เท่านั้น เพราะเซลล์ macrophage สามารถกินเชื้อแบคทีเรียเข้าเซลล์ได้ หลังจากปล่อยให้แบคทีเรียเข้าเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างแบคทีเรียที่เกินอยู่นอกเซลล์ โดยล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วนำแบคทีเรียที่ยังเหลืออยู่นอกเซลล์โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผสม kanamycin 250 µg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผสม kanamycin 20 µg/ml ไปตลอดเวลาการทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไปในระยะเวลาต่างๆ ทำการจำนวนแบคทีเรียที่มีเพิ่มขึ้นหรือเหลือรอดอยู่โดยนำเซลล์ออกมาด้วย 0.1% Triton X-100 แล้ว กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy agar เพื่อนับจำนวนโคโลนีโดยทำเป็น 3 เพลทในแต่ละช่วงแล้วนำมาเฉลี่ยกัน

ผลการทดลอง เมื่อเทียบระหว่างเซลล์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าไปในเซลล์ macrophage ได้ ดีกว่า epithelial เซลล์ ตลอดช่วงเวลาตามคาดหมาย เมื่อดูจำนวนแบคทีเรียภายในเซลล์เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าเชื้อ *B.pseudomallei* สามารถอยู่รอดและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นภายในเซลล์ทั้งสองชนิด โดยที่เชื้อตัวดั้งเดิม มีจำนวนมากที่สุด ในขณะที่เชื้อที่ถูก knockout ยีนระบบ AHL quorum sensing มีจำนวนในเซลล์น้อยกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สายพันธุ์ PKR7 ($\Delta bpsR$) เห็นได้ชัดเจน ที่สุด และปรากฏชัดในเซลล์ epithelial มากกว่า อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน BpsR เป็น transcription activator ที่สำคัญสำหรับยีนที่จำเป็นในการอยู่รอดภายในเซลล์ ในขณะที่มีตัวสังเคราะห์ AHL ได้ หลายตัวที่อาจทดแทน bpsI ได้ ที่น่ากังวลคือการที่ KBIR5 ซึ่งขาดทั้ง bpsIR แต่กลับมีจำนวนโคโลนีมากกว่า PKR7 เป็นไปได้ว่าเป็นความแปรผันของการทดลอง

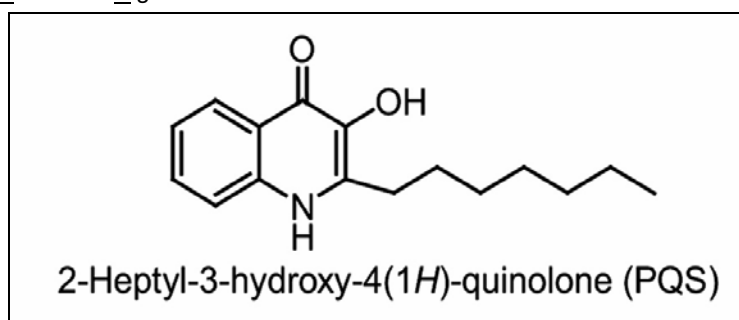


Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) Quorum Sensing System

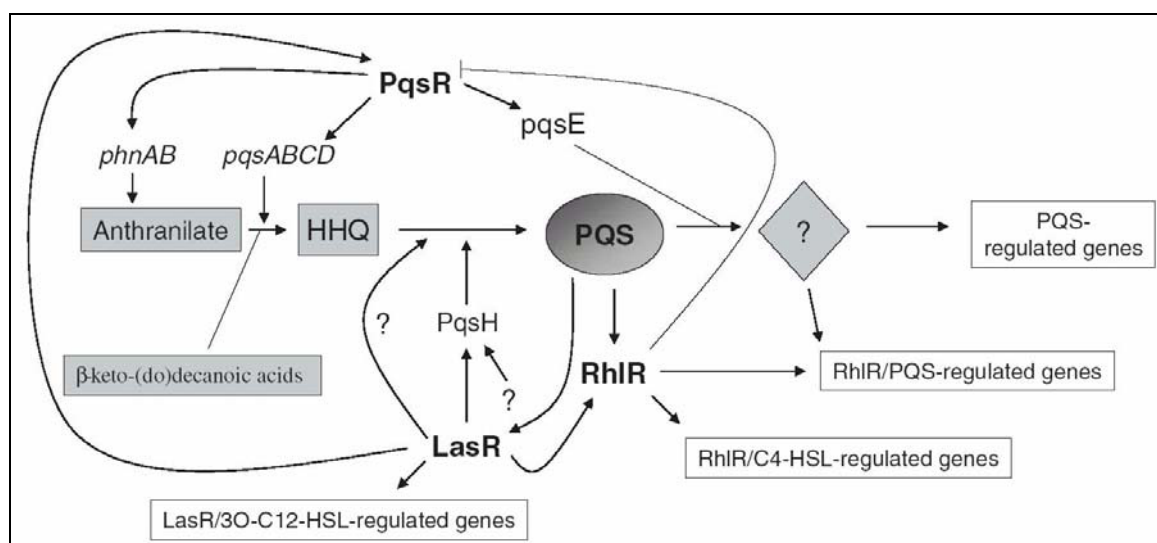
การศึกษาลักษณะยีนของระบบ quinolone quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยอาศัยข้อมูลจากระบบ quinolone quorum sensing ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

ในขณะที่ระบบ Acyl homoserine lactone (AHL) quorum sensing นั้นมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด แต่ระบบ quinolone quorum sensing คือการสื่อสารกันระหว่างแบคทีเรียโดยใช้โมเลกุล quinolone เป็นตัวกลางนั้น กลับมีการศึกษากันในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เท่านั้น ดังนั้นเพื่อที่จะศึกษายีนของระบบ quinolone quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei* เราจึงต้องไปอาศัยข้อมูลของระบบ quinolone quorum sensing จากเชื้อ *P. aeruginosa*

โดยที่ เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างสารในกลุ่มของ Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) (สูตรเคมี 2-alkyl-4(1H)-quinolone) มาให้ตรวจพบได้ใน supernatant หลายชนิด แต่ที่มีการศึกษา มากที่สุด คือ 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone โดยเรียกสารนี้ว่า *Pseudomonas* Quinolone Signal หรือเรียกโดยย่อว่า PQS

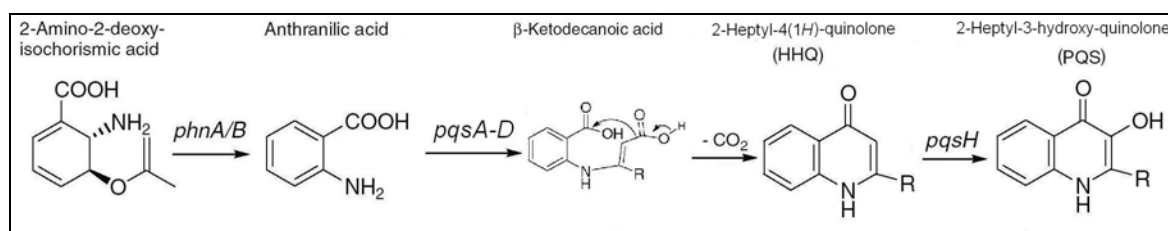


พบว่า PQS เป็น ตัวสื่อสารใน ระบบ quinolone quorum sensing ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของ virulence factors และการสร้าง biofilm นอกจากนี้ PQS ยังเป็นส่วนหนึ่งในระบบ quorum sensing อันซับซ้อนของ *P. aeruginosa* ที่ ประกอบด้วย AHL ทั้งระบบ Rhl และ ระบบ Las ดังรูป

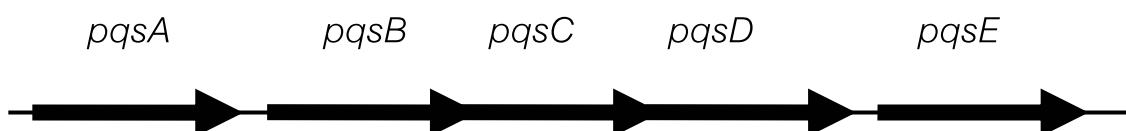
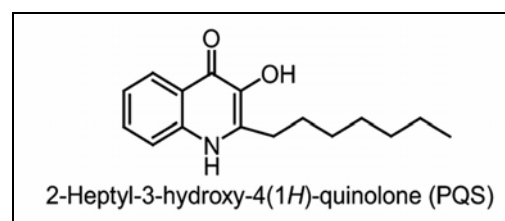
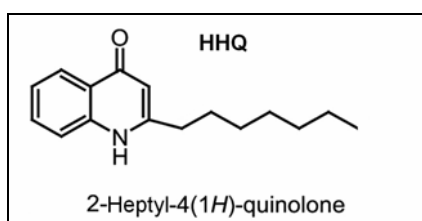


ยีนที่ควบคุมการสร้าง PQS

PQS ถูกควบคุมการสร้างด้วยยีน *phnA/B*, *pqs* operon (*pqsABCD*), และ *pqsH* ดังนั้น โดย *phnA/B* สร้าง anthranilic acid ซึ่งจะถูกละลายเป็น β -ketodecanoic acid โดย *pqsABCD* และ ถูกเปลี่ยนเป็น 4-quinolone ในที่สุดโดยเสีย CO_2 ไป สำหรับ AHQ ที่เป็น precursor ของ PQS ซึ่งมีหมู่ sidechain เป็น hydrocarbon อิ่มตัว 7 carbon คือ 2-Heptyl-4(1H)-quinolone (HHQ) โดย HHQ ถูกเปลี่ยนเป็น PQS โดยโปรตีนจากยีน *pqsH*



ความจริง *pqs* operon ยังมี ยีน *pqsE* อยู่ในชุดด้วย (*pqsABCDE*) แต่ *pqsE* ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวกับการสร้าง β -ketodecanoic acid แต่อย่างใด แต่เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับการควบคุม phenotypes ต่างๆ โดยระบบ quinolone quorum sensing



DNA Blast

ผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูล *pqs* operon (*pqsABCDE*) มาสืบค้นโดยวิธี blast ในฐานข้อมูล genomes เชื้อแบคทีเรีย ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi> ก็พบว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดมียีนใน operon นี้ แต่จะไม่ครบทุกยีน โดยมากจะขาดยีน *pqsB* และ *E* โดยที่มีเพียง *P. aeruginosa* และ *B. pseudomallei* (*B. thailandensis* ด้วย) เท่านั้นที่มียีน *pqsABCDE* ครบ ดังแสดงในตาราง S1

Table S1. Multiple <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i> and <i>Ralstonia</i> Species Possess <i>P. aeruginosa</i> <i>pqs</i> Gene Homologues						
Species	Strain	<i>pqsA</i>	<i>pqsB</i>	<i>pqsC</i>	<i>pqsD</i>	<i>pqsE</i>
<i>P. aeruginosa</i>	PAO1	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	PA14	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	2192	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	C3719	+	+	+	+	+
<i>P. syringae</i>	B728a	+	-	+	+	-
<i>P. syringae</i>	DC3000	-	-	+	+	-
<i>P. putida</i>	KT2440	+	-	+	+	-
<i>P. putida</i>	F1	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i>	Pfo-1	+	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i>	Pf-5	+	-	+	+	-
<i>R. eutropha</i>	JMP134	+	-	+	+	-
<i>R. metallidurans</i>	CH34	+	-	+	+	-
<i>R. solanacearum</i>	GMI1000	+	-	+	+	-
<i>R. solanacearum</i>	UW551	+	-	+	+	-
<i>B. ambifaria</i>	AMMD	+	-	+	+	+
<i>B. vietnamiensis</i>	G4	+	-	+	+	-
<i>B. dolosa</i>	AUO158	+	-	+	+	-
<i>B. cenocepacia</i>	PC184	+	-	+	+	-
<i>B. cenocepacia</i>	HI2424	+	-	+	+	-
<i>B. cenocepacia</i>	AU 1054	+	-	+	+	-
<i>B. pseudomallei</i>	K96243	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	S13	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	1655	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	1106a	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	1106b	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	668	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	Pasteur	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	1710a	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i>	406e	+	+	+	+	+
<i>B. thailandensis</i>	E264	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i>	ATCC23344	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	2002721280	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	10229	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	SAVP1	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	NCTC 10247	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	10399	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	JHU	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	FMH	+	-	+	+	-
<i>B. mallei</i>	GB8 horse 4	+	-	+	+	-
<i>B. xenovorans</i>	LB400	+	-	+	+	-
<i>A. vinelandii</i>	AvOP	+	-	-	-	-

โปรตีน pqsABCDE Alignment ระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ *B. pseudomallei*

K96243

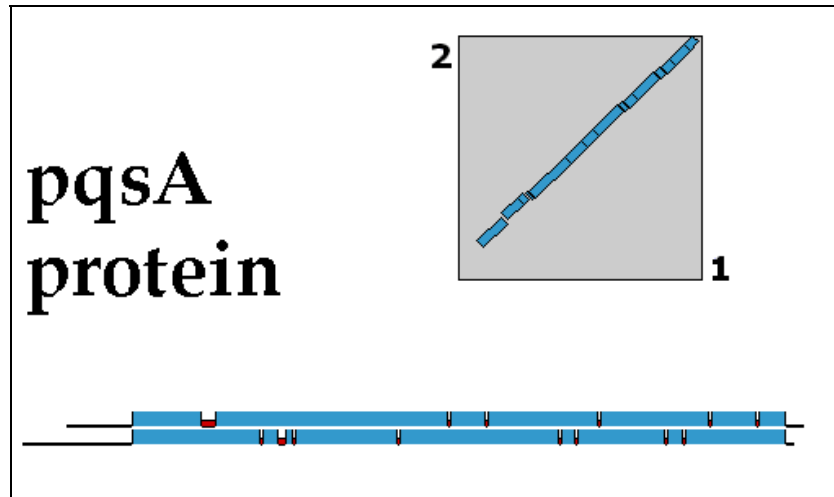
เมื่อนำยีน *pqsABCDE* ไปแปลเป็นการเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PqsABCDE แล้วนำมาเปรียบเทียบโดยทำการ alignment ระหว่าง โปรตีน PqsABCDE ของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ *B. pseudomallei* K96243 โดยใช้ เครื่องมือในเว็บของ NCBI ที่

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi> ผลเป็นดังนี้

โดยที่ *P. aeruginosa* PAO1 คือชื่อที่ 1 (Query) และ *B. pseudomallei* K96243 คือชื่อที่ 2 (Subject)

The alignment of two protein sequences. Blue rectangles: local alignment segments; red lines: gaps; light gray lines represent the regions of low complexity on query sequence.

Reference: Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999). Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett. 174:247-250

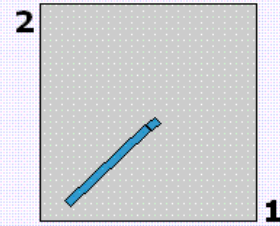


pqsa

Identities = 147/472 (31%), Positives (Similarities) = 210/472 (44%), Gaps = 36/472 (7%)

Query	50	LKPGDRVVLALNDSPSLACLFLACIAVGAIPAVINPKSREQALADIAADCQ-----	100
		L PG+RV+L + P LA + A + G + P R L+ + A Q	
Sbjct	83	LVPGNRVLLHGTNHPFLAAAWFAIVKAGGVVVTMPLLRAGELSKVIAQAQVTHALCEAA	142
Query	101	--ASLVVREADAPSLSGPLAPLTLRAAAGRPLDDFSLDALVGPADLDWSAFHRQDPAAA	158
		A L A AP ++ T AAA PLL + P D R D	
Sbjct	143	VSAELRAAMAAAPGVAFARYYETDDAAAFEPLLH--ACPRTFEPVDT-----RADEP--	192
Query	159	CFLQYTSGSTGAPKGMHSLRNTLGFCAFATELLALQAGDRLYSIPKMFFGYGMGNSLF	218
		C + +TSG+TG PK +H R+ + C F +L A D P + F +G+G L	
Sbjct	193	CIVAFTSGTTGRPKATVHFHRDVMACHCFPHVLKPNADDVFCGSPPLAFTFGLGALLL	252
Query	219	FPWFSGASALLDDTWSPSPERVENLVAFRPRVLFGVPAIYASLRPQAREL-LSSVRLAFS	277
		FP GAS +L P+R+L + A R +LF PA Y ++ + E ++S+R	
Sbjct	253	FPLSVGASVLLQR-AKPQRLLAAIGAHRSILFTAPAAAYRAMLDDELGEHDIASLRKVC	311
Query	278	AGSPLPRGEFEFWAAH-GLEICDGIGATEVGHVFLANRPGQARADSTGLPLPGYECRLVD	336
		AG LP W A G+ I DGIGATE+ H+F + QA+ + G +PGY ++D	
Sbjct	312	AGEALVPVTRNAWLARTGIRIIDGIGATEMLHIFASADETQAKEGAIGKAVPGYRLAILD	371
Query	337	REGHTIEEAGRQGVLLVRGPGLSPGYWRASEEQQARFA-GGWYRTGDLFERDESGAYRHC	395
		G + G L V+GP G ++ +Q + GW TGD DE G +	
Sbjct	372	ERGERLPPY-HVGR LAVQGP---TGCRYLNDARQDYVRHGWNLTGDAAYLDEDGYLFYQ	427
Query	396	GREDDLKVNWRWVPTQVEQAICRHLPEVSEAVLVPTCRLHDGLRPTLFVTLATPLD--	453
		R DDL G + P +VE+A+ H +V E +V DG TL P	
Sbjct	428	SRADDLIISLGYTISPAEVEEALLSH-ADVLECGVGA---PDGRGGTLVCAHVVP RPVG	483
Query	454	DNQILLAQRIDQHLAEQIPSHMLPSQLHVLPA-LPRNDNGKLARAELRHLAD	504
		L + QH+ +I + P ++ A LPRND+GKL R +LR A+	
Sbjct	484	HGCDALTAALQQHV KARIAPYKYPRIEYHAAGLPRND SGKLQRFKLRQAAE	535

pqsB protein



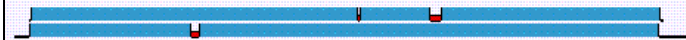
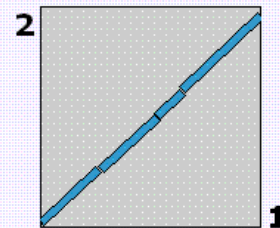
pqsB

Identities = 46/116 (39%), Positives (Similarities) = 68/116 (58%), Gaps = 2/116 (1%)

Query	39	LP	AV	REAL	DEAA	VKPEE	ID	LIV	GL	AL	SP	DH	LI	EN	RD	IM	AP	KI	GH	PL	QK	VL	GA	NR	AH	VF	DL	98							
Sbjct	26	L	A	R	+	A	L	+	A	P	E	+	DL	I	V	L	+	SP	+	+	I	P	+	+	HP	+	Q	+	L	A	+	A	VF	DL	85

Query	99	TD	SS	LA	RA	LY	VV	DT	LA	SD	QGY	RNV	LV	VR	GE	SS	QGL	EV	DS	ES	GF	AL	AD	GA	LA	LL	CR	P	154
Sbjct	86	LD	AD	WT	LA	LD	LV	QSH	CR	QL	GY	RR	AL	VV	KA	EA	LA	DV	GA	QAG	GY	--	AD	GA	AI	VL	AP	139	

pqsC protein

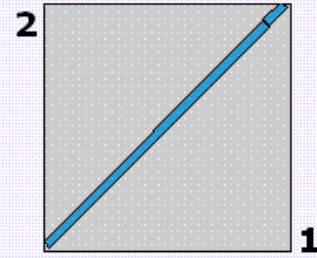


pqsC

Identities = 137/355 (38%), Positives (Similarities) = 210/355 (59%), Gaps = 14/355 (3%)

Query	2	HKVKLAAITCELPARSYENDDPVFAAVPDLSESWWQFWGVNRRGYFDRNGENEFSLVVR	61
Sbjct	10	+ V++A++ C LP+R NDD F V + WWQFWG+ R DP GE+E ++ R YNVRMASLACNLPSRLLRNDDAAFDEVEPIPSEWWQFWGIESRYVIDPHAGESELAMAER	69
Query	62	AAERLLRSSDTAPDSVDMLICASSPIMTDAGDVLPLDRGLYPRMANVLSKQLGLSRAL	121
Sbjct	70	A + L + +D+++ + +SP +T A D R PR++ L ++LG RAL TARQALARAGVDAAE LDLVLFNITSPFVTAA-----DGARRFAPRLSRTLRLRGARRAL	124
Query	122	PLDSQMECASFLLNRLRLAASMIROGKAQKVLVVCSEYISNLLDFTSRTSTLFDAGCAVAL	181
Sbjct	125	D +MECASF+L ++LAA++I+QG+ ++ LV SE +S ++D+ S++ST F DG A A+ DADVEMECASFVLQMQLANLIKQGRVKRALVCSSERMSAVVDYASKSSTTFGDGAAAV	184
Query	182	LTRG--DDDSCDLLASAEHSDATFYEVATGRWRLPENPTGEAKPR-----LYFSLFSD	232
Sbjct	185	L D D L + SDAT Y +AT +WR P+ P YF+L + LVADAHDPHGADWLNAVYRS DATHYALATMQWRYPKPPADRDDAERQAERFGAYFTLKPE	244
Query	233	GQNKMASFVPTNVPIAMRRALEKAGLGSDDIDYFVFHQ PAPFLVKAWAEGIGARPEQYQL	292
Sbjct	245	Q ++A F+P +P + R L K GL +DDID VFHQ+P LV+AWA+ +G P+QY + AQEQIARFMPEAIPDIVERLLRKLTGLRTDDIDAMVFHQPSEILVRAWAQRLGLAPDQYVI	304
Query	293	TMGDTGVMSISVIPYTLMTGLREGKIRPGDRIVMAGAATGWGFAAQVWQLGEVLV	347
Sbjct	305	+ D ++S ++P L +R G ++PG ++V+AGA GWGF AQ+W+ GE +V RLADCACLVSAAVPLALYESIRGVVKPGSQVVIAGAGAGWGFQAQLWRWGETV	359

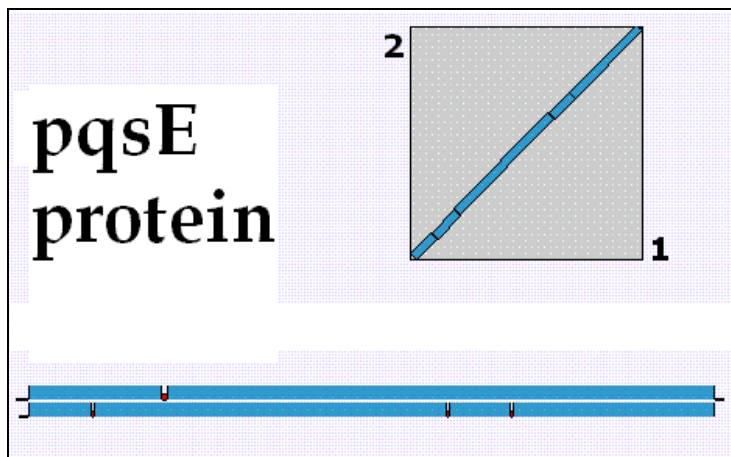
pqsD protein



pqsD

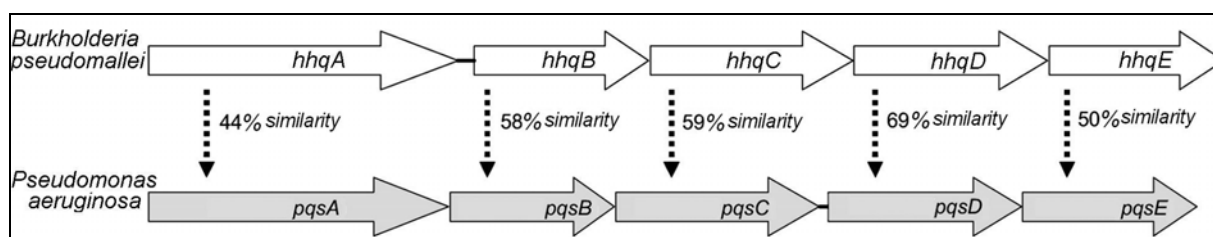
Identities = 175/325 (53%), Positives (Similarities) = 226/325 (69%), Gaps = 2/325 (0%)

Query	6	LAGLGFSLPKRQVSNHDLVGRINTSDEFIVERTGVRTRYHVEPEQAVSALMVPAARQAIE	65
		+AGLG +LP+R V N ++ I+TSD FI RTGVR R ++ P Q ++ L PAA +A+	
Sbjct	13	IAGLGHALPQRIVDNDEVARVIDTSDAFIRTRTGVRHRRYLAPGQQLADLACPAERAMA	72
Query	66	AAGLLPEDIDLLLVTLSPDHHDPSQACLIQPLLGLRHIPVLDIRAQCSGLLYGLQMARG	125
		AG+ P DIDLL+VNTLSPDHHDPSQAC +QP LGLR IP DIRAQCSG LYG+++AR	
Sbjct	73	EAGVAPADIDLLIVNTLSPDHHDPSQACYMQPRLGLREIPCFDIRAQCSGGLYGIEIARH	132
Query	126	QILAGLARHVLVVCGEVLSKRMDCSRGRNLSILLGDGAGAVVVSAGESLEDGLDLRLG	185
		+ +GL R+VL++C E LS+R+D S+ GRNLSILL DGA A+v+ A GL+DL LG	
Sbjct	133	FVASGLYRNVLICAEALSRIDTSNAGRNLILLSDGAAAMVLRAQPDATRGLIDLALG	192
Query	186	ADGNYFDLLMTAAPGSASPTFLDENVLREGGGEFLMRGRPMFEHASQTLVRIAGEMLAAH	245
		ADG FDLL T APG+ P F+D + + G F MRG MF A++ +V ML H	
Sbjct	193	ADGTQFDLLCTEAPGAKRPNFIDADDIAAGRHYFRMRGADMFADATRRIVDACRRMLDKH	252
Query	246	ELTLDDIDHVICHQPNLRILDAVQEQLGIPQHKFAVTVDRLGNMASASTPVTLAMFWPD-	304
		L L DI V+ HQPNLRI+DAV EQLG+P+ + ++V+ LGNMASA+ PV L++	
Sbjct	253	RLALGDIGLVVPHQPNLRIIDAVIEQLGLPRERCMISVEDLGNMASAAFPVALSLAREQG	312
Query	305	-IQPGQRVLVLTYGSGATWGAALYR	328
		+ GQ L++TYG+GATW ALYR	
Sbjct	313	RMPAGQLNLLVITYGAGATWACALYR	337



pqsE		Identities = 94/294 (31%), Positives (Similarities) = 149/294 (50%), Gaps = 6/294 (2%)	
Query	7	PGQLDDDLCLLDVQVPVFLRLGEASWALVEGGISRDAELVWADLCRWVADPSQVH---	63
		PG++D L ++G VP++++ EA+ LVEGG+S ELVW L ++D +	
Sbjct	6	PGRIDSRLAIVGTADVPLYVIVNDEAA-TLVEGGLSGMTLVWRQLHELLSDYGGIRHLR	64
Query	64	YWLITHKHVDHCGLLPYLCPRLPNVQVLASERTCQAWKSES AVRVRVRLNRQLLRAEQRL	123
		YWLITH HYDHC LL L PR+P + ++ S T A +S SA R + L+ Q A + +	
Sbjct	65	YWLITHSHYDHCSSLGLTAPRMPWLHIVGSAATADALQSPSACRTIRALDAQACAWEFV	124
Query	124	PEACAWDALPVRVADGEWLELGPRLRLQVIEAHGHSDDHVVFYDVRRLFCGDALGEF	183
		A +P+ + G L++G R++ + GHS + ++ + LF DALGE+	
Sbjct	125	AAAAELSDIPLYPLNPGRSLDIGEGMRMRALALPGHSACLLGYHCPQLDLLFVSDALGEY	184
Query	184	DEAEGVWRPLVFDMEAYLESRLRLPTLLQLIPGHGGLLRGLAADGAESAYTECLR	243
		A W PLVF D+ AY SL+ ++R ++ GH G++ G +A A	
Sbjct	185	-HAPTQWLPLVFQDLAAYRLSLDAIER-QHASRIALGHHGIVGGGIARHAVRHARDGLAA	242
Query	244	LCRRLLRQSMGESLDELSEELHRAWGGQSVDFLPGELHLGSMRRLMELSRQA	297
		+ + L+ + + +S + +P LHL SM RM+++ R A	
Sbjct	243	RDDEARAARGDANATRALARQWTERYAARSANVVPRALHLKSMERMIDLFQRAA	296

สรุปผลการ Alignment



แม้ว่าสืบค้นโดยวิธี blast ในฐานข้อมูล genomes เชื้อแบคทีเรีย ของ NCBI มีเพียง *P. aeruginosa*, *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* เท่านั้นที่มียีน *pqsABCDE* ครบ ดังแสดงในตาราง S1 แล้วนั้น แต่ผู้วิจัยไม่พบว่า *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* มียีน *pqsH* แต่อย่างใด ดังนั้นจึงคาดว่า ระบบ quorum sensing ของ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* คงจะสร้างได้เพียงถึง alkyl quinolone เช่น HHQ เท่านั้น คงจะไม่สามารถสร้าง alkyl hydroxy quinolone ดังเช่น PQS ได้ จึงได้ตั้งชื่อ ยีน homologues ของ *pqs* operon ว่าเป็น *hhq* (*hhqABCDE*) ตามชื่อ ของ HHQ ซึ่งเป็นสาร AHQ ที่เป็น precursor ของ PQS

การทำ PCR ของยีน *hhqA*

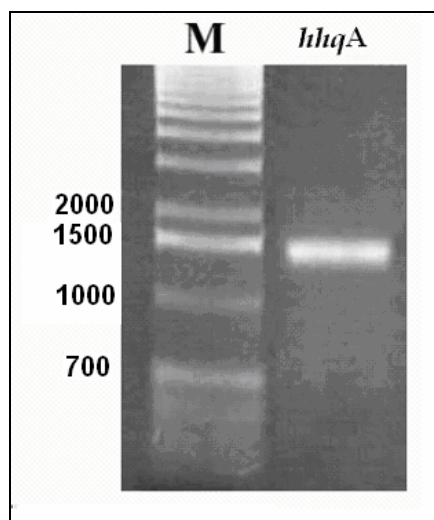
ขั้นตอนต่อไปจึงได้ออกแบบ oligonucleotide primers เพื่อทำ PCR ยีน *hhqA* มาเพื่อใช้ศึกษา เหตุที่เลือก ยีน *hhqA* มา เพื่อให้เป็นตัวแทน ของยีนที่มีส่วนในการสร้าง HHQ

PCR primers สำหรับยีน *hhqA* คือ primer HAF (5'-

CGAATTCACGATGGACAACCTTTTGCCGCAC-3') ซึ่งมี EcoRI restriction site (ขีดเส้นใต้)

และ primer HAR (5'-TGGATCCGCCTCGTTATCGAATGGGTGGT-3') ซึ่งมี BamHI

restriction site (ขีดเส้นใต้) โดย primers คู่นี้จะเพิ่มจำนวน DNA ขึ้นขนาด 1,709 bp นำ primers ดังกล่าวข้างต้นมาทำ PCR โดยใช้ genomic DNA ของ *B. pseudomallei* pp844 เป็นแม่แบบ ได้ ชิ้น DNA ขนาด ดังคาด ตามรูป



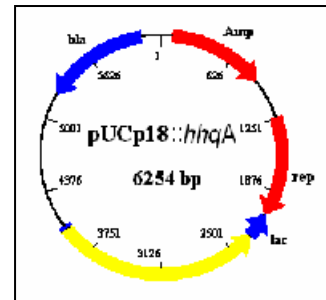
รูปแสดง agarose gel electrophoresis ของ *hhqA* PCR

การโคลนยีน *hhqA* เข้าไปใน plasmid pUC18

PCR products จาก primer HAR และ HAF ถูกนำไป
ตัดด้วย EcoRI และ BamHI แล้วโคลนเข้าที่ multiple
cloning site ใน plasmid pUC18 ซึ่งใส่ใน *E. coli*

DH5 α

ได้พืสุจน์ pUC18::*hhqA* โดย recombinant plasmid มี
ขนาด 6,254 bp ประกอบด้วย ชิ้น DNA complete
gene *hhqA* 1,697 bp, และ pUCp18 ขนาด 4,557 bp



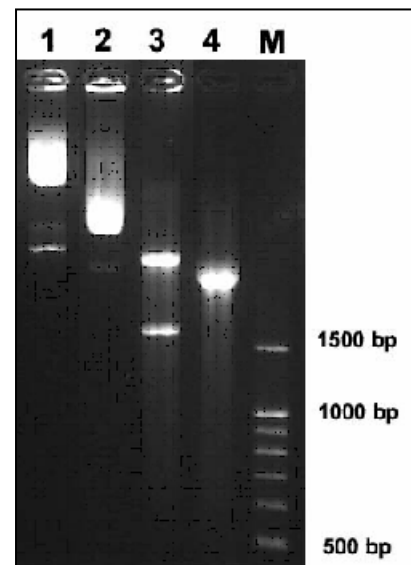
รูป agarose gel electrophoresis

เลน 1 pUC18::*hhqA*

เลน 2 pUC18

เลน 3 pUC18::*hhqA* ตัดด้วย EcoRI และ
BamHI

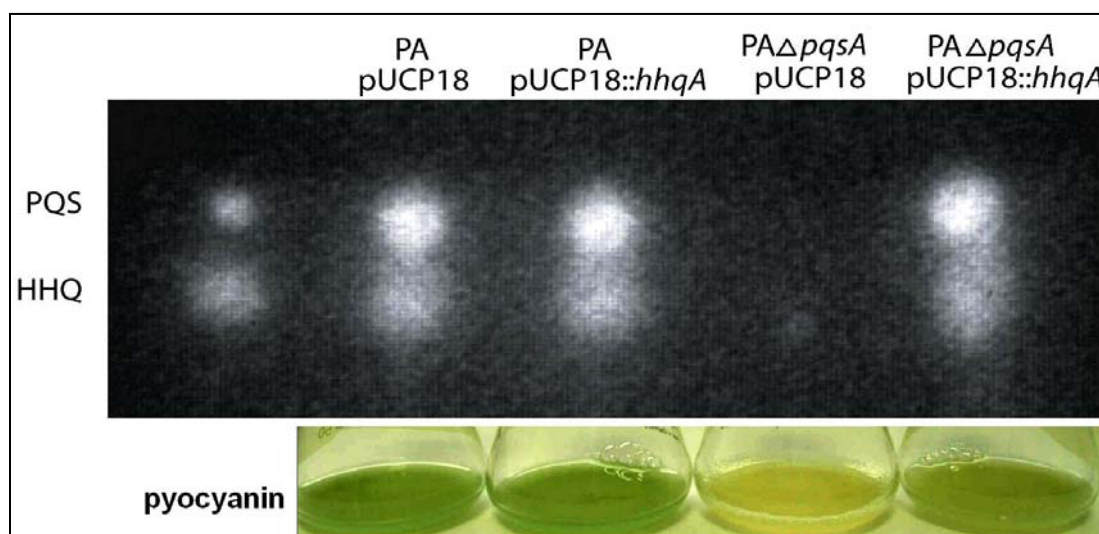
เลน 4 pUC18 ตัดด้วย EcoRI และ BamHI



ยีน *hhqA* ของ *B. pseudomallei* สามารถทำหน้าที่ทดแทนยีน *pqsA* ที่ขาดหายไปใน *P. aeruginosa* ได้

เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่ายีน *hhqA* ของ *B. pseudomallei* สามารถทำหน้าที่ทดแทนยีน *pqsA* ที่ขาดหายไปใน *P. aeruginosa* ได้ จึงนำ plasmid pUC18 ซึ่งมียีน *hhqA* (pUC18::*hhqA*) ใส่เข้าไปในเชื้อ *P. aeruginosa* POA1 ที่ได้ถูก knockout ยีน *pqsA* ไปแล้ว (PAO1Δ*pqsA*) (ได้จาก Professor Paul Williams, University of Nottingham)

PAO1Δ*pqsA* นี้ไม่สามารถสร้าง ทั้ง HHQ และ PQS ได้ ส่งผลให้ ไม่สามารถสร้าง pyocyanin ได้ เนื่องจาก pyocyanin ถูกควบคุมโดย PQS quinolone quorum sensing (Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by Pseudomonas aeruginosa. Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, and Manoil C. J. Bacteriol. 2002;184:6472-6480.) สำหรับ pyocyanin นั้น ปรกติทำให้โคโลนีของ *P. aeruginosa* มีสีเขียว ดังนั้น โคโลนีและน้ำเลี้ยงเชื้อของ PAO1Δ*pqsA* จึงไม่มีสีเขียว แต่เมื่อใส่ เข้าไป ปรากฏว่า PAO1Δ*pqsA* ที่มี pUC18::*hhqA* สามารถสร้าง HHQ และ PQS ได้อีกครั้งหนึ่ง และโคโลนีและน้ำเลี้ยงเชื้อก็กลับมาสีเขียวด้วย จึงเป็นการแสดงว่ายีน *hhqA* ของ *B. pseudomallei* นอกจากจะมี sequence ที่คล้าย *pqsA* แล้ว ยังสามารถทำหน้าที่ทดแทนยีน *pqsA* ได้ด้วย (function analogue)



การทดลอง transcomplementation ของ *hhqA* รูปบนแสดง thin layer chromatography plate ที่ลาดด้วย LB agar ซึ่งมี quinolone bioluminescent reporter

PAO1*ecA::luxΔpqsA* นำมาแยกสาร quinolone จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 ที่ใส่ pUC18 ธรรมดา และ pUC18::*hhqA* ซึ่งสกัดด้วย ethyl acetate ทำแห้งแล้ว ละลายใน methanol โดยเลนซ้ายสุดเป็นสารตัวอย่าง PQS และ HHQ ต่อไปใน 2 เลนแรก เป็นตัวควบคุม เลนที่ 3 คือ PAO1Δ*pqsA* ที่ใส่ pUC18 ธรรมดา และเลนที่ 4 คือ PAO1Δ*pqsA* ที่ใส่ pUC18::*hhqA* เมื่อแยกสารแล้ว นำมาดูด้วย luminograph detector ส่วนล่างของรูปแสดงสีของน้ำเลี้ยงเชื้อ ถ้ามี pyocyanin จะเป็นสีเขียว จากผลของ PAO1Δ*pqsA* ที่ใส่ pUC18::*hhqA* แสดงให้เห็นว่า *hhqA* สามารถทำหน้าที่แทน *pqsA* ได้

การศึกษาหน้าที่ของระบบ *quinolone quorum sensing*

โดยการสร้าง เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA*

ทำการสร้างสายพันธุ์ *hhqA* knock-out

สร้างโดย นำชิ้นส่วน DNA 1030

fragment ที่ได้จากการตัด HAF/HAR

PCR product ด้วย restriction enzyme

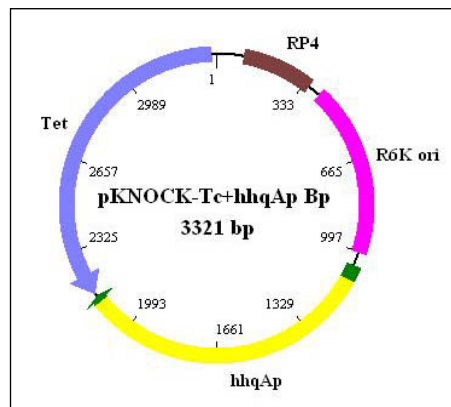
RsaI นำไป ligate แบบ blunt end ใน

pKNOCK-TC ที่ตัดด้วย *SmaI* ได้เป็นพ

ลาสมิตขนาด 3321 bp (รูป) รูป ยีน

hhqA แสดงตำแหน่ง PCR primer และ

ชิ้นส่วนที่ตัดด้วย *RsaI*



>*hhqA*

acgatgcatttcggaggtgataacaaactgaattaaatgggctgggctgttcgattcgaa
Cggtttcggcggaatcgcgacgcccggcgcatgcacgttcggcgcgccggcgccgaatcattc primer HAF
Tcgtttctcagtcacttctcgtgagcactgacg atggacaacttttgcgcgacgaatct
gcctgcaccgacgcatctgcggaggttcgtcttcgagttgccgggctgcagtatccggc
gcgcatcaactgcgcgccggcgctgctcgacgacggtgacccgtcggggctggggcga
gcgcgctcgcgatcaggaccgagtcgggtgcccgtggtcgatcgcgcgctgttcgagct
gagcaaccggatcgccaacctgctgggtgtgcgacggcgggctcgtgcggggcaaccgggt
gctgctgcacggaaccaatcattcgtttctcgccgcgcgcatgggttcgcatcgtcaaggc
gggcgggctcgtgggtgacgacgataccgctgctgcgcgggcgagctgtcgaaagtcatt
cgcgcgaggcgacgggtcagcgacgctgctgcgaggcgggcggtgtccgcccaggtgcgcgc
cgcgatggcgggcgggcgccggcgctcgcgcttcgcccgtactacgagaccgacgacgggc
cgcgcttcgagccgctgctgcacgctgcccgcgcacgttcgagccggctcgatacgcgcg
cgacgagccgtgcatcgtcgcttcacgtcgggcacgacggggcgccgaaggcgacccgt
gcactttcatcgcgacgtgatggcgatctgccattgctttccgacgacgtgctgaaacc
gaacgccgacgacgtgttctgcggctcgccgcccgcgcgcttcacgttcgggctcggcgc
gctgctgctgtttccgctgagcgctcgcgcgagcgtcgtgctgctgcagcgggcgaaacc
Gcagcggtgctgcgcgcgatacgcgcgcatcgcgtagcatcctcttcaccgcgccggc
Cgcgtatcgcgcgatgctcgacgagctcggcgagcacgacatcgccagcctgcgcaagt
cgtgtgcgcggcgagggcgctgcgggtgccgacgcgcaacgcgtggctcgcgcgacggg
cattcgcatcatcgacggcatcggcgcgaccgagatgctgcacatcttcgctccgcgga
cgaaaacgcaggcgaaaggagggcgatcggaaggcggtgccgggtaccggctcgcgat
cctcgacgagcgcgggcgagcgctgccgcccgtatcacgtcgggcgctctcgcggtgcaagg
gccgacgggtgcccgtacctgaacgatacgcgggcagcgcgattacgtgcggcacggctg
gaacctgacggggcgacgcccctacctcgacgaggacgggtacctgttctaccagtcgcg
cgccgacgacctgatcatcagcctcggttacacattctcgcccgccgaggtggaggaggc
gctgctgagccacggcgacgtgctcgagtgctgggtgtgtcgggcgcccgacggggcagg
cggcacgctcgtgtgcgcgcacgtgggtgccgcgcccgggcggtgcacggctgcgagtcgct
gacggccgctgtgcagcagcacgtgaaaggcgcggaatcgcgccgtacaaagtatccgcgggc
catcgagtatcacggcgccgggtgccgcgcaacgattccggcaagctgcagcgcttcaa
Gctgcggcaggcgggcgagggaagacgtgcaggcgggcctgaaggccgcgcggggcgatgcgg
cccgaacgcgcgcgcggcgggcgatcgcgcgccggcatcgaccaaccattcgataaccgaggc

start

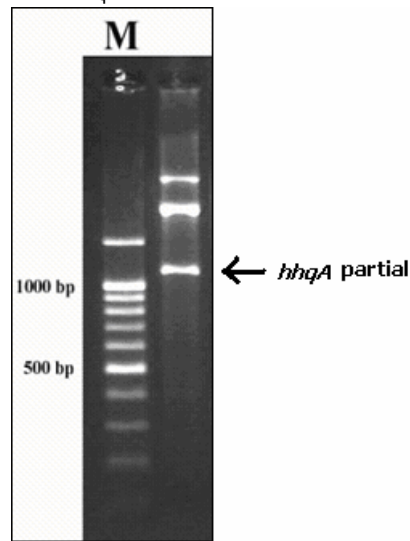
stop

RsaI cutting 1030 bp

PCR product

primer HAR

ทำการพิสูจน์พลาสมิด pKNOCK-TC ที่มีชิ้น DNA บางส่วนของยีน *hhqA* นี้ โดยนำมาตัดด้วย *EcoRI* ซึ่งมี sites อยู่ 2 ข้างของ multiple cloning sites จะทำให้ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ 1030 bp ที่โคลนเข้าไปหลุดออกมาให้เห็นได้

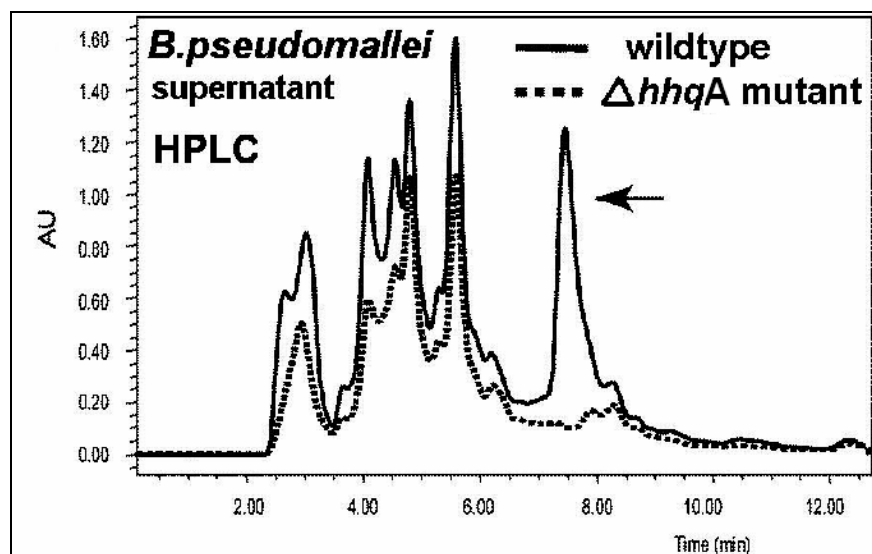


ต่อมาใช้ *E. coli* S17-1 λ pir เป็นตัว conjugate pKNOCK-Tc + *hhqA*p นี้ ลงไปไปใน *B. pseudomallei* pp844 ซึ่งจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนโดยวิธี crossing over ระหว่างโครโมโซมของ *B. pseudomallei* กับ pKNOCK ผลที่ได้ในโครโมโซมของ *B. pseudomallei* pp844 จะมีส่วนของพลาสมิด pKNOCK แทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่งยีนที่เราต้องการ ทำให้เกิดสายพันธ์ที่เป็นยีน *hhqA* knock-out ได้ ($Bp\Delta hhqA$)

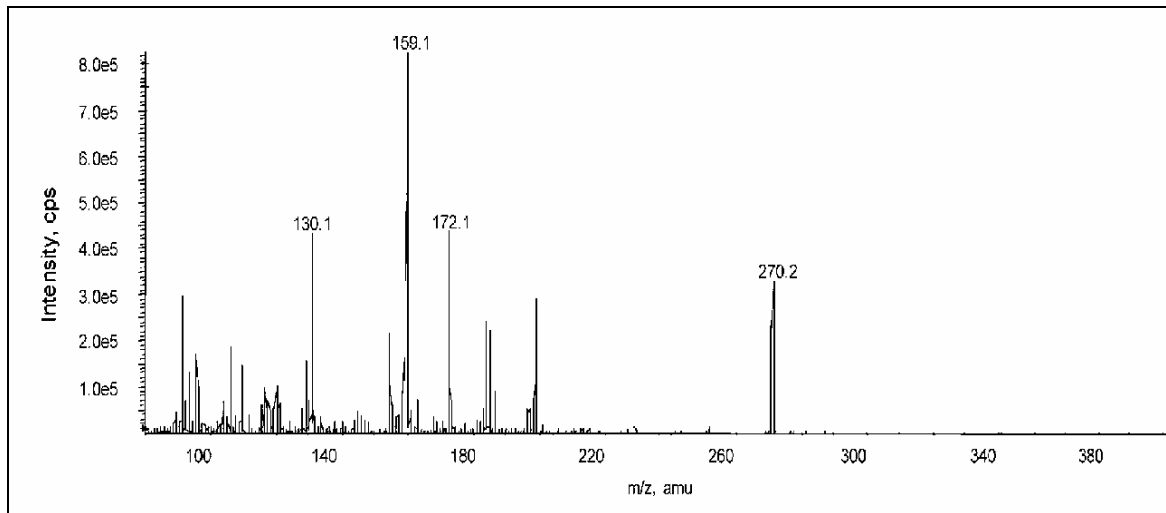
การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* 844 สายพันธุ์ดั้งเดิม กับ
เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* (*BpΔhhqA*)
โดยการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC และ เปรียบเทียบ phenotypes ต่าง ๆ

การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ดั้งเดิม กับที่
ถูก knockout ยีน *hhqA* โดยการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC

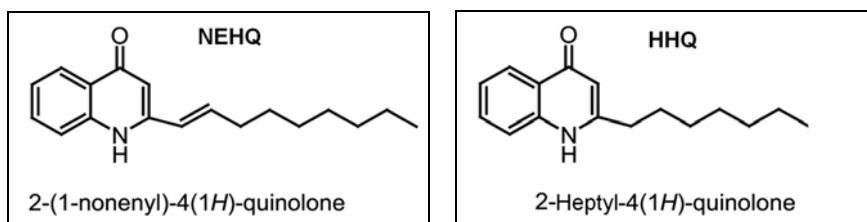
น้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ ดั้งเดิม 844 และสายพันธุ์ *BpΔhhqA* มาสกัดด้วย ethyl acetate แล้วทำให้แห้ง และทำให้ละลายด้วย methanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ที่ ห้องปฏิบัติการ Quorum Sensing ของสถาบัน Institute of Infection, Immunity & Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham โดยร่วมมือกับ Prof. Paul Williams, Director ของสถาบันดังกล่าว



ผลการวิเคราะห์ HPLC ตามรูป ปรากฏว่า ในสายพันธุ์ดั้งเดิม pp844 ไม่พบ HHQ ซึ่งควรจะถูก elute ออกมาที่ 6.5 นาที แต่กลับพบว่า เชื้อ *BpΔhhqA* มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม pp844 คือที่ส่วน peak ที่ elute เมื่อ 7.75 นาที หายไป (ตามลูกศรชี้)



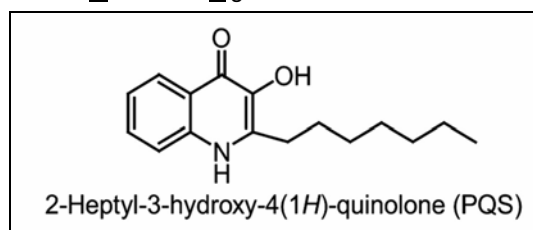
จึงได้นำ peak จาก wildtype ที่หายไปใน mutant ดังกล่าว ไปพิสูจน์ว่าเป็นสารอะไร โดยนำไปพิสูจน์ด้วย Liquid Chromatography/Mass Spectrophotometry (LC/MS) โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ที่ University of Nottingham มี พบว่า สารนั้นมีคุณสมบัติเหมือนกับสาร 2-(1-nonenyl)-4(1H)-quinolone ซึ่งเป็นสาร AHQ ที่คล้ายกับ HHQ ต่างกันเพียงที่ หมู่ hydrocarbon side chain แทนที่จะเป็น C₇ อิ่มตัว (Heptyl) กลับกลายเป็น C_{9:1} ไม่อิ่มตัวที่ carbon ตำแหน่งที่ 1 (nonenyl) ใช้ชื่อย่อว่า NEHQ



ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการสืบค้นถึงการสร้างสาร quinolone ในเชื้อสายพันธุ์ต่างๆเพื่อดูว่ามีความแตกต่างที่หลากหลายของการสร้างสารนี้ในเชื้อ Burkholderia และ Pseudomonas สายพันธุ์ต่างๆหรือไม่

เชื้อสายพันธุ์ต่างๆมีการสร้าง HHQ หรือ Quinolone ชนิดอื่น ๆอย่างไร

ตามที่ได้กล่าวไปแล้วว่า เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างสารในกลุ่มของ Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) (สูตรเคมี 2-alkyl-4(1H)-quinolone) มาให้ตรวจพบได้ใน supernatant หลายชนิด แต่ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone โดยเรียกสารนี้ว่า Pseudomonas Quinolone Signal หรือเรียกโดยย่อว่า PQS

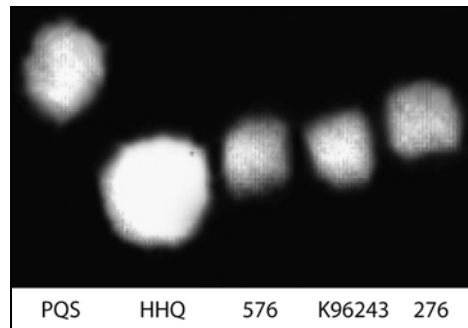


เชื้อ *P. aeruginosa* มีการสร้าง สาร AHQ หลายชนิด โดยต้องสร้าง HHQ ซึ่งเป็น precursor ของ PQS ด้วย และบางสายพันธุ์ ก็มีการสร้าง NEHQ ดังที่พบในสายพันธุ์ 844 ที่ใช้ศึกษาในรายงานนี้ด้วย (Le' pine, F., De' ziel, E., Milot, S., and Rahme, L.G. A stable isotope dilution assay for the quantification of the Pseudomonas quinolone signal in Pseudomonas aeruginosa cultures. Biochim. Biophys. Acta.2003;1622, 36–41.)

การนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาแยกด้วย TLC ที่ overlaid ด้วย bioluminescent reporter ที่ตอบสนองต่อ AHQ เพื่อดูการสร้าง AHQ ชนิดต่าง ๆ

เพื่อต้องการทราบว่า เชื้อ *Burkholderia* สายพันธุ์อื่นๆ นอกจาก *B. pseudomallei* pp844 รวมทั้ง เชื้อ *B. thailandensis* จะมีการสร้าง AHQ แบบใด จึงมีการนำเอาเชื้อ *B.*

pseudomallei สายพันธุ์ 576, 10276, และ k96243 มาสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant culture) แล้วนำมาตรวจสอบโดยการแยกด้วย TLC ที่ overlaid ด้วย bioluminescent reporter ที่ตอบสนองต่อ AHQ (เป็น *E.coli* ที่มีพลาสมิดซึ่งมี promoter ของ pqsA) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ผลปรากฏว่า เชื้อทั้งสามชนิด มีการสร้าง HHQ (รูปด้านขวา) จึง



เป็นไปได้ว่า เป็นความแตกต่าง (variation) ของ *B. pseudomallei* pp844 ที่มีการสร้าง AHQ ที่แตกต่างจาก *Burkholderia* อื่น

เมื่อใช้วิธี bioluminescent reporter TLC เทียบกับสารมาตรฐานนี้ มาตรวจสอบกับ น้ำเลี้ยงเชื้อ
เชื้อชนิดอื่นๆ รวมทั้ง *B. thailandensis* สายพันธุ์ E30 ก็พบว่า

-เชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดไม่มีการสร้าง AHQ

-เชื้อที่สร้าง AHQ ได้แก่ เชื้อ *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cenocepacia*, *P. putida* และ *P. aeruginosa* โดยที่

- *P. aeruginosa* PAO1 และ PA14 สร้าง PQS และ HHQ
- *B. pseudomallei* K96243, 576, 276, *B. cenocepacia* J415, *P. putida* KT2440
สร้าง HHQ
- *B. pseudomallei* pp844 สร้าง NEHQ
- *B. thailandensis* E30 สร้าง AHQ หลายชนิดรวมทั้ง HHQ, NEHQ แต่ไม่สร้าง
PQS

สรุปตามตารางต่อไปนี้

Strain	PQS	AHQ ^a	Source
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	+	+	Wound infection
<i>P. aeruginosa</i> PA14	+	+	Burn wound
<i>P. mendocina</i> ATCC25411	—	—	Environmental
<i>P. aureofaciens</i> 30–84	—	—	Wheat rhizosphere
<i>P. diminuta</i> CIP7129	—	—	Soil
<i>P. fluorescens</i> CHAO	—	—	Soil
<i>P. putida</i> KT2440	—	+	Biosafety strain
<i>P. syringae</i> DC3000	—	—	Tomato
<i>P. stutzeri</i> ATCC17588	—	—	Environmental
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	—	—	Spanish tomato rhizosphere
<i>P. fragi</i> ATCC4973	—	—	Environmental
<i>P. pickettii</i> ATCC27511	—	—	Soil
<i>B. pseudomallei</i> K96243	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand
<i>B. pseudomallei</i> 576	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand
<i>B. pseudomallei</i> 10276	—	+	Clinical melioidosis isolate, Bangladesh
<i>B. pseudomallei</i> 844	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand
<i>B. thailandensis</i> E30	—	+	Environmental
<i>B. cenocepacia</i> J415	—	+	CF isolate
<i>B. stabilis</i>	—	—	CF isolate
<i>B. vietnamiensis</i> G4	—	—	CF isolate
<i>B. anthina</i>	—	—	Environmental soil

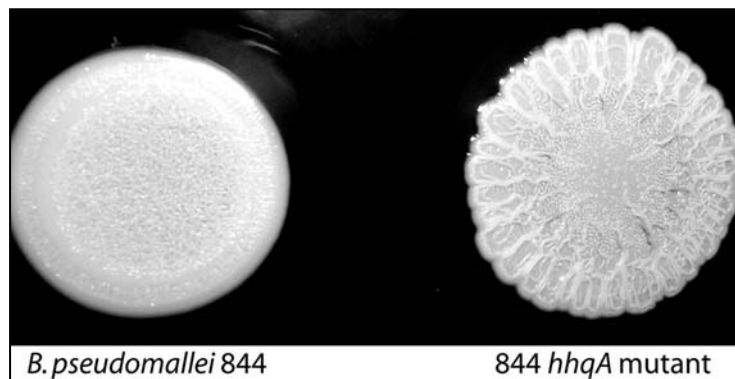
B. thailandensis E30 produced HHQ, NHQ, NQNO, UDHQ, HEHQ, NEHQ, and UDEHQ.

^a All AHQ-positive strains produced HHQ, except for 844, which produced NEHQ.

การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* 844 สายพันธุ์ดั้งเดิม กับ
เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* (*BpΔhhqA*)
โดย การเปรียบเทียบ phenotypes ต่างๆ

เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี

เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ ดั้งเดิม 844 และสายพันธุ์ *BpΔhhqA* มีลักษณะที่แตกต่างกันที่สังเกตเห็นชัดเจนแต่แรกคือ ลักษณะของโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนเพลท LB agar หรือ เพลท blood agar 2-3 วัน มีความแตกต่างกัน คือ โคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ wild type 844 มีลักษณะตามปกติของเชื้อ *B. pseudomallei* คือ ขอบเรียบ mucoid ในขณะที่โคโลนีของสายพันธุ์ *BpΔhhqA* มีลักษณะเหี่ยวแห้งชัดเจน (รูปโคโลนี)



เปรียบเทียบ Exoproteases, Siderophores, Hemolysin, Elastase

เมื่อนำเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ ดั้งเดิม 844 และ สายพันธุ์ Bp Δ hhqA มาเปรียบเทียบ phenotype ต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงบน

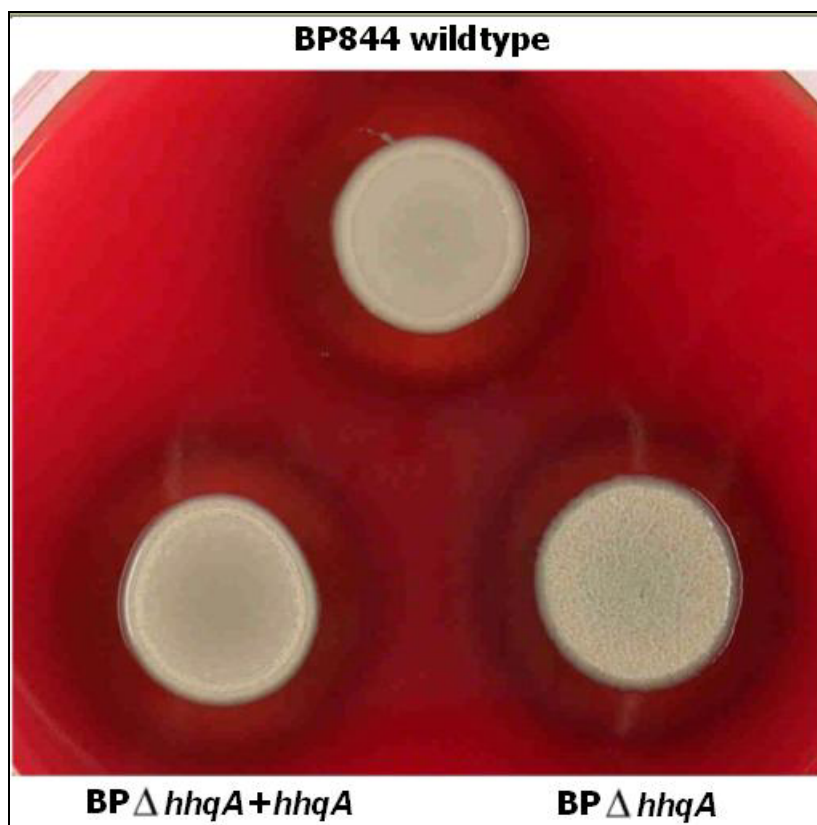
เพลท skim milk agar เพื่อดู exoproteases,

เพลท chrome azurol S-iron (CAS) agar เพื่อดู siderophores,

เพลท blood agar เพื่อดู hemolysin, และ

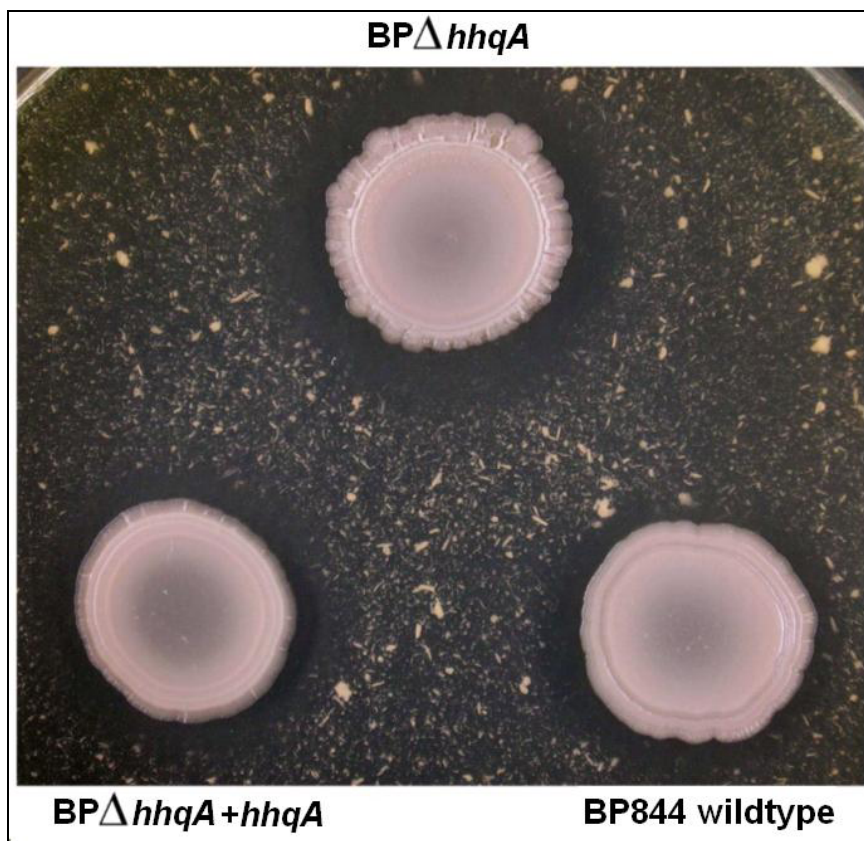
เพลท elastin agar เพื่อดู elastase

ผลปรากฏว่า ไม่มีความแตกต่างกันในโซนของเพลท skim milk agar, เพลท CAS agar, และ เพลท blood agar แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ใน phenotypes exoproteases, siderophores, และ hemolysin ของเชื้อทั้งสอง



รูปเพลท blood agar แสดงว่า Bp Δ hhqA, wildtype และ เมื่อทดแทนยีน *hhqA* มีขนาดโซนไม่แตกต่างกัน

แต่ทว่าในเพลท elastin agar พบว่าโซนของ สายพันธุ์ Bp Δ hhqA มีขนาด 9.8 mm $\pm$ 1 mm ใหญ่กว่า โซนของ สายพันธุ์ wild type 844 ที่มีขนาดเพียง 5.3 mm $\pm$ 0.5 mm อย่างชัดเจน และเมื่อนำพลาสมิด pUC19 ที่มียีน hhqA ใส่ไปในสายพันธุ์ Bp Δ hhqA เพื่อทดแทนการทำหน้าที่ของ hhqA ก็ทำให้โซนลดขนาดลงมาเป็น 5.4 mm $\pm$ 0.5 mm เช่นเดียวกับเมื่อเติม HHQ ลงไปในเพลท สายพันธุ์ Bp Δ hhqA ก็ทำให้โซนลดขนาดมาขนาดเท่ากับ โซนของ wild type 844 เช่นกัน (รูป) แสดงว่าสาร HHQ ทำหน้าที่ใน negative regulation ของ elastase



รูปเพลท elastin agar แสดงว่า Bp Δ hhqA มีขนาดโซนใหญ่ขึ้นกว่า wildtype และเล็กลงเมื่อทดแทนยีน hhqA

สรุปการศึกษาระบบ Quinolone quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei*

สาร alkyl-quinolone เป็น diffusible quorum sensing signal molecule อีกชนิดหนึ่งที่พบในแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบในเชื้อ *P. aeruginosa* ก่อน แต่ในรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า ในเชื้อ *B. pseudomallei* ก็มีการใช้ สาร alkyl-quinolone เป็น diffusible quorum sensing signal molecule เช่นเดียวกัน โดยเราพบทั้งยีนที่สังเคราะห์ alkyl-quinolone และพิสูจน์ว่ายีนนั้นทำหน้าที่ทดแทนยีนที่ homolog กันใน *P. aeruginosa* ได้ การ knockout ยีนนี้ทำให้ ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *B. pseudomallei* เปลี่ยนไป และทำให้มีการแสดงออกของ elastase มากขึ้น นอกจากนี้ ยังทำการตรวจกรองพบสาร alkyl-quinolone โดยเฉพาะ HHQ จากเชื้อ หลายชนิด ในขณะที่ พบสาร PQS ได้เฉพาะในเชื้อ *P. aeruginosa* เนื่องจาก HHQ เป็นสารตั้งต้นของ PQS จึงอาจเป็นไปได้ว่า HHQ เป็น alkyl-quinolone ที่ เป็นเสมือนภาษาสากลของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่ PQS เป็นภาษาท้องถิ่นที่ใช้สื่อสารเฉพาะในเชื้อ *P. aeruginosa*

ส่งตีพิมพ์ผลงานการศึกษา ระบบ quinolone quorum sensing

การศึกษาเรื่องระบบ quinolone quorum sensing ซึ่งร่วมมือกับนักวิทยาศาสตร์ จาก U. of Nottingham นำไปเขียนเป็นบทความเรื่อง “Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* and Related Bacteria” ส่งไปเสนอตีพิมพ์ในวารสาร Chemistry & Biology ของ สำนักพิมพ์ Elsevier Science ประเทศอังกฤษ และได้รับการตอบรับลงเผยแพร่ในวารสาร Chemistry & Biology ปี 2006 Volume 13 หน้า 701-710 โดยอ้างอิงดังนี้

Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M, Williams P. Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* and Related Bacteria. Chem Biol. 2006;13:701-710.

ส่ง reprint มาพร้อมกับรายงานนี้

Output ที่ได้จากโครงการ

สิ่งที่ได้ค้นพบ

ระบบ Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing

1. ค้นพบและอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHL quorum sensing *bpsI* และ *bpsR* ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการทำการ PCR โคลนนิ่ง ยีน ทำ sequencing และ ทำ alignment เปรียบเทียบกับยีน homologue อื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน
2. ได้สร้างเชื้อกลายพันธุ์ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน *bpsI*, *bpsR* และ *bpsIR* รวมทั้งสร้างเชื้อที่มีการทดแทน (complement) ยีนดังกล่าวด้วยยีนที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของยีน
3. พบว่า AHL autoinducer ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* 6 ชนิด 6 ชนิด คือ C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL และ 3-hydroxy-C12-HSL โดยที่ 3-hydroxy-C8-HSL และ 3-hydroxy-C12-HSL ไม่เคยถูกรายงานมาก่อนว่าสร้างมาจากเชื้อ *B. pseudomallei*
4. พิสูจน์ว่า autoinducer ที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI ได้แก่ C8-HSL และเป็นไปได้ว่า 3-oxo-C8-HSL สร้างโดยการทำงานร่วมกันของ BpsI และ autoinducer synthase ตัวอื่นในเชื้อ *B. pseudomallei*
5. พิสูจน์ความสัมพันธ์ของระบบ AHL quorum sensing BpsIR กับการทนต่อ oxidative stress โดยเฉพาะ พิสูจน์ว่าการแสดงออกของโปรตีน DpsA ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อ oxidative stress ได้ นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ bpsIR
6. แสดงให้เห็นว่ายีน *bpsR* มีส่วนสำคัญในการทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดภายในเซลล์ epithelial และ macrophage ได้

ระบบ Alkyl Hydro Quinolone Quorum Sensing

1. ค้นพบและอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHQ quorum sensing ของเชื้อ *B. pseudomallei* โดยเทียบจาก *pqsABCDE* operon และยีน *pqsH* ของ *P. aeruginosa* พบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* มียีน *pqsABCDE* homologue แต่ไม่มียีน *pqsH* homologue เลย ทำให้ไม่สามารถสร้างสาร PQS ได้ สร้างได้แต่ตัวสารตั้งต้นของ PQS คือ สาร HHQ จึงตั้งชื่อยีนที่พบในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่า *hhqABCDE*
2. พิสูจน์การสร้างสาร AHQ ของเชื้อแกรมลบ สายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างที่หลากหลายคือ
 - เชื้อแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดไม่มีการสร้าง AHQ
 - เชื้อที่สร้าง AHQ ได้แก่ เชื้อ *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cenocepacia*, *P. putida* และ *P. aeruginosa* โดยที่
 - *P. aeruginosa* PAO1 และ PA14 สร้าง PQS และ HHQ
 - *B. pseudomallei* K96243, 576, 276, *B. cenocepacia* J415, *P. putida* KT2440 สร้าง HHQ
 - *B. pseudomallei* pp844 สร้าง NEHQ
 - *B. thailandensis* E30 สร้าง AHQ หลายชนิดรวมทั้ง HHQ, NEHQ แต่ไม่สร้าง PQS
3. ทำ PCR โคลนนิ่ง และ หา sequence ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* รวมทั้งได้สร้างเชื้อกลายพันธุ์ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* รวมทั้งสร้างเชื้อที่มีการทดแทน (complement) ยีนดังกล่าวด้วยยีนที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของยีน
4. พิสูจน์หน้าที่ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่าทำหน้าที่ทดแทน ยีน *pqsA* ในเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (functional homologue)

5. ศึกษาหน้าที่ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* พบว่า
 - 5.4. โคโลนีของสายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* มีลักษณะเหี่ยวแห้งมากกว่าโคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธุ์ wild type อย่างชัดเจน
 - 5.5. สายพันธุ์ที่ถูก knockout ยีน *hhqA* มีการทำงานของ elastase มากขึ้น และสาร HHQ ทำหน้าที่ negative regulation ของ elastase
 - 5.6. การขาดยีน *hhqA* ไม่มีผลต่อ hemolysin, exoproteases, และ siderophores

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

1. P. Lumjiaktase, S. P. Diggle, S. Loprasert, S. Tungpradabkul, M. Daykin, M. Camara, P. Williams and M. Kunakorn. Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*. Microbiology. 2006;152:3651-3659.
2. Diggle SP, Lumjiaktase P, Dipilato F, Winzer K, Kunakorn M, Barrett DA, Chhabra SR, Camara M, Williams P. Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* and Related Bacteria. Chem Biol. 2006;13:701-710.

ภาคผนวก

Reprint

Quorum sensing regulates *dpsA* and the oxidative stress response in *Burkholderia pseudomallei*

Putthapoom Lumjiaktase,¹ Stephen P. Diggle,² Suvit Loprasert,³ Sumalee Tungpradabkul,⁴ Mavis Daykin,² Miguel Cámara,² Paul Williams² and Mongkol Kunakorn¹

Correspondence
Mongkol Kunakorn
ramkn@mahidol.ac.th

¹Department of Pathology, Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

²Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, UK

³Department Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, Lak Si, Bangkok, 10210, Thailand

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a fatal human tropical disease. The non-specific DNA-binding protein DpsA plays a key role in protecting *B. pseudomallei* from oxidative stress mediated, for example, by organic hydroperoxides. The regulation of *dpsA* expression is poorly understood but one possibility is that it is regulated in a cell population density-dependent manner via *N*-acylhomoserine lactone (AHL)-dependent quorum sensing (QS) since a *lux*-box motif has been located within the *dpsA* promoter region. Using liquid chromatography and tandem mass spectrometry, it was first established that *B. pseudomallei* strain PP844 synthesizes AHLs. These were identified as *N*-octanoylhomoserine lactone (C8-HSL), *N*-(3-oxooctanoyl)homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL), *N*-(3-hydroxyoctanoyl)homoserine lactone (3-hydroxy-C8-HSL), *N*-decanoylhomoserine lactone (C10-HSL), *N*-(3-hydroxydecanoyl)homoserine lactone (3-hydroxy-C10-HSL) and *N*-(3-hydroxydodecanoyl)homoserine lactone (3-hydroxy-C12-HSL). Mutation of the genes encoding the LuxI homologue BpsI or the LuxR homologue BpsR resulted in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis, demonstrating that BpsI was responsible for directing the synthesis of these AHLs only and that *bpsI* expression and hence C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL production depends on BpsR. In *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants, *dpsA* expression was substantially down-regulated. Furthermore, *dpsA* expression in *Escherichia coli* required both BpsR and C8-HSL. *bpsIR*-deficient mutants exhibited hypersensitivity to the organic hydroperoxide *tert*-butyl hydroperoxide by displaying a reduction in cell viability which was restored by provision of exogenous C8-HSL (*bpsI* mutant only), by complementation with the *bpsIR* genes or by overexpression of *dpsA*. These data indicate that in *B. pseudomallei*, QS regulates the response to oxidative stress at least in part via the BpsR/C8-HSL-dependent regulation of DpsA.

Received 16 June 2006
Revised 24 August 2006
Accepted 25 August 2006

INTRODUCTION

Burkholderia pseudomallei is the causative agent of melioidosis, a fatal tropical disease endemic in areas of Southeast Asia and Australia (Wuthiekanun *et al.*, 1995). The organism can be isolated from soil and water. Human infections occur mainly through skin abrasions and

inhalation of contaminated aerosols. Frequent relapse has been observed after apparent cure and serological studies have shown that a significant proportion of individuals in endemic areas can be infected asymptotically (Cheng & Currie, 2005). *In vitro* studies have demonstrated that *B. pseudomallei* can survive and multiply inside phagocytes (Jones *et al.*, 1996). To survive inside the phagolysosome, the

Abbreviations: AHL, *N*-acylhomoserine lactone; C8-HSL, *N*-octanoylhomoserine lactone; C10-HSL, *N*-decanoylhomoserine lactone; 3-hydroxy-C8-HSL, *N*-(3-hydroxyoctanoyl)homoserine lactone; 3-hydroxy-C12-HSL, *N*-(3-hydroxydodecanoyl)homoserine lactone; 3-oxo-C8-HSL, *N*-(3-oxooctanoyl)homoserine lactone; LC MS/MS, liquid chromatography tandem mass spectrometry; QS, quorum sensing; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide.

organism has to endure both acid and oxidative stress. DNA-binding protein from starved cells (Dps) is an abundant protein in stationary-phase *Escherichia coli* cells (Almiron *et al.*, 1992). Although Dps was originally described as a non-specific DNA-binding protein involved in resistance to oxidative stress, it is actually a bacterioferritin and there are examples of Dps proteins which both bind DNA and sequester iron (Martinez & Kolter, 1997; Stillman *et al.*, 2005). These are thought to protect DNA from damage both as a physical shield and by inhibiting oxyradical formation catalysed by the Fenton reaction. Recently, the crystal structures of two Dps proteins (DpsA and DpsB) from *Lactococcus lactis* have been described; both proteins were demonstrated to bind DNA via an N-terminal α -helix (Stillman *et al.*, 2005).

In *B. pseudomallei*, DpsA has been shown to protect DNA from damage by both acid and oxidative stress (Loprasert *et al.*, 2004). The *dpsA* gene in the *B. pseudomallei* genome is located downstream of *katG*, which encodes a bifunctional enzyme with both catalase and peroxidase activities. Although the mechanism by which DpsA is regulated is not well understood, it is known that expression increases in response to oxidative stress through increased transcription of the *katG* (catalase peroxidase) promoter, which is OxyR-dependent (Loprasert *et al.*, 2004). Furthermore, *dpsA* can also be transcribed from its own promoter in an OxyR-independent manner (Loprasert *et al.*, 2004).

Quorum sensing (QS) is a term used to describe the phenomenon where bacteria coordinate the production of a diverse array of phenotypic behaviours in accordance with their cell population size via production of diffusible cell-to-cell signal molecules (Swift *et al.*, 2001; Cámara *et al.*, 2002). Once a threshold concentration has been reached, a response is triggered that leads to changes in gene expression and consequently the phenotype of the cells. In Gram-negative bacteria, the most intensively studied QS systems rely upon the interaction of *N*-acylhomoserine lactone (AHL) signal molecules, synthesized via LuxI-type AHL synthases, with LuxR-type transcriptional regulator proteins. Together, the LuxR-type protein and its cognate AHL then activate the expression of specific target genes (Swift *et al.*, 2001). Many Gram-negative bacteria possess more than one LuxR and/or LuxI gene and produce multiple AHLs. For example, the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* contains two LuxRI systems which operate in a hierarchical manner to regulate an arsenal of virulence determinants and secondary metabolites (Cámara *et al.*, 2002; Lazdunski *et al.*, 2004).

In *B. pseudomallei*, a LuxRI AHL-dependent QS system termed BpsRI was first described in 2002 by P. Lumjiaktase and co-workers (GenBank accession no. AF501236). Subsequently, Valade *et al.* (2004) reported that the PmlI-PmlR QS system is required for full virulence in *B. pseudomallei* strain 008 as a *pmlI* mutant was significantly less virulent than the parental strain in a murine infection model. The PmlI protein exhibits 98 % sequence identity to

BpsI (Valade *et al.*, 2004). In *B. pseudomallei* strain KHW, a LuxRI pair closely related to BpsI-BpsR was described by Song *et al.* (2005), who reported that it positively regulated phospholipase C but negatively regulated siderophore production. Both *bpsI* and *bpsR* mutants were attenuated in a *Caenorhabditis elegans* virulence assay (Song *et al.*, 2005). Using HPLC and bioassays of *B. pseudomallei* spent culture supernatants, Valade *et al.* (2004) tentatively identified *N*-decanoylhomoserine lactone (C10-HSL), which they attributed to PmlI although they did not examine the supernatant of the *pmlI* mutant or express *pmlI* in *E. coli* to establish whether PmlI was indeed responsible for C10-HSL synthesis. Song *et al.* (2005) expressed *bpsI* in *E. coli* and, by HPLC, tentatively identified *N*-octanoylhomoserine lactone (C8-HSL) but did not examine the AHL profile of a *B. pseudomallei* *bpsI* mutant. Recently, three LuxRI pairs together with two additional LuxR homologues have been identified in *B. pseudomallei* DD503 (Ulrich *et al.*, 2004a). DD503 was reported to produce at least five AHLs, including C8-HSL, C10-HSL, *N*-(3-hydroxyoctanoyl) homoserine lactone (3-hydroxy-C8-HSL), *N*-3-hydroxydecanoyl homoserine lactone (3-hydroxy-C10-HSL) and *N*-3-oxotetradecanoyl homoserine lactone (3-oxo-C14-HSL). Mutation of individual *B. pseudomallei* *luxI* homologues was reported to have no effect on the AHL profile (Ulrich *et al.*, 2004a).

The regulation of *dpsA* expression in *Burkholderia* is poorly understood but one possibility is that it is regulated via AHL-dependent QS since there is a *lux* box motif located within its promoter region. Here we define the nature of the AHLs synthesized by *B. pseudomallei* PP844 and show that *dpsA* expression and resistance to oxidative stress is dependent on QS via BpsIR and C8-HSL.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. Bacterial strains and plasmids used are shown in Table 1. Unless otherwise stated, bacteria were cultured using Luria-Bertani (LB) broth or agar with appropriate antibiotics at 37 °C. In the case of mixed cultures, e.g. conjugations, incubations were at 30 °C. *Pseudomonas* agar base supplemented with SR 103E (cetrimide, fucidin and cephaloridine) from Oxoid was used, after conjugation, as a selective medium to inhibit growth of *E. coli*. M9 minimal medium with 2 % (w/v) glucose was used for β -galactosidase activity assays. Antibiotics were used at the following concentrations when required: ampicillin 100 μ g ml⁻¹, trimethoprim 200 μ g ml⁻¹ for *B. pseudomallei* and 100 μ g ml⁻¹ for *E. coli*, spectinomycin 800 μ g ml⁻¹ for *B. pseudomallei* and 200 μ g ml⁻¹ for *E. coli*, tetracycline 60 μ g ml⁻¹ and chloramphenicol 40 μ g ml⁻¹.

Amplification and cloning of *bpsI* and *bpsR* genes. Using the *cepI* and *cepR* genes of *Burkholderia cepacia* as a template for the BLAST program (<http://www.ncbi.nih.gov/blast/>), homologues of this AHL synthase and its cognate transcriptional activator were identified in the *B. pseudomallei* genome database (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pseudomallei/) and designated *bpsI* and *bpsR* respectively. A PCR product of 663 bp containing the full-length *bpsI* was amplified from *B. pseudomallei* strain PP844 genomic DNA using primers BPSIF (5'-CTGCAGCTCCTTGAATGACGAACGGC-3') and BPSIR (5'-AAGCTTCATGCGAACTTTCGTTTCATGG-3')

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or characteristic(s)*	Source or reference
<i>B. pseudomallei</i>		
PP844	Wild-type, virulent clinical isolate	Loprasert <i>et al.</i> (2000)
PKI5	PP844 containing pKNOCK:: <i>bpsI</i> p, Tc ^r	This study
PKR7	PP844 containing pKNOCK:: <i>bpsR</i> p, Cm ^r	This study
KBIR5	PP844 containing pKNOCK:: <i>bpsR</i> p; pKNOCK:: <i>bpsI</i> p, Tc ^r Cm ^r	This study
PKR7 + R	PKR7 containing pBBR-R2, Cm ^r Sp ^r	This study
KBIR5 + IR	KBIR5 containing pBBR-IR3, Tc ^r Cm ^r Sp ^r	This study
KBIR5 + <i>dpsA</i>	KBIR5 containing pDps, Tc ^r Cm ^r Sp ^r	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$) <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1 relA1 gyrA96</i>	Hanahan (1983)
S17-1 λ pir	RP4-2- <i>tet::Mu-1 kan::Tn7</i> (Tp ^r Sm ^r) <i>thi proA hsdR recA</i>	Simon <i>et al.</i> (1983)
CC118	Strain used as a host for conjugation of transposable element pUT-mini-Tn5Cm	De Lorenzo <i>et al.</i> (1990)
CpUT	CC118 containing TnpD vector, Tp ^r	Loprasert <i>et al.</i> (2004)
CpUT + R	CpUT containing pBBR-R2, Tp ^r Sp ^r	This study
EBP1	DH5 α containing pUCI, Amp ^r	This study
Plasmids		
pUCI	pUC19 containing the full-length <i>B. pseudomallei bpsI</i> gene, Amp ^r	This study
pKNOCK-Tc	Mobilizable suicide vector for construction of gene knockouts in Gram-negative bacteria, Tc ^r	Alexeyev (1999)
pKNOCK-Cm	Mobilizable suicide vector for construction of gene knockouts in Gram-negative bacteria, Cm ^r	Alexeyev (1999)
pBBR-Sp	Broad-host-range cloning vector, Sp ^r	Loprasert <i>et al.</i> (2004)
pKBI	pKNOCK containing a 298 bp internal segment of <i>B. pseudomallei bpsI</i>	This study
pKBR	pKNOCK containing a 323 bp internal segment of <i>B. pseudomallei bpsR</i>	This study
pBBR-R2	pBBR-Sp containing full-length <i>B. pseudomallei bpsR</i>	This study
pBBR-IR3	pBBR-Sp containing full-length <i>B. pseudomallei bpsIR</i>	This study
pDps	pBBR-Sp containing full-length <i>B. pseudomallei dpsA</i>	Loprasert <i>et al.</i> (2004)
TnpD	A 654 bp fragment containing the 5' end of <i>dpsA</i> and 400 bp of upstream <i>dpsA</i> sequence inserted upstream of <i>lacZ</i> in pUT-Tn5 <i>lacZ1</i> , Tp ^r	Loprasert <i>et al.</i> (2004)

*Amp^r, ampicillin resistant; Tc^r, tetracycline resistant; Cm^r, chloramphenicol resistant; Sp^r, spectinomycin resistant; Tp^r, trimethoprim resistant.

and cloned into the *Hind*III and *Pst*I sites of pUC19 to create pUCI. A PCR product of 2.5 kbp containing both *bpsI* and *bpsR* (*bpsIR*) was amplified using primers BPSIF and BPSRR (5'-CTGCAGG-AACCGTTGATGGAGTGAGC-3') and cloned into pBBR-Sp by blunt-ended ligation to create pBBR-IR3. The 2.5 kbp PCR product was cut by *Eco*RI to obtain a 1288 bp DNA fragment containing full-length *bpsR* gene; this was cloned into pBBR-Sp to create pBBR-R2. The sequences of *bpsI* and *bpsR* from *B. pseudomallei* strain PP844 were deposited in GenBank (accession no. AF501236).

Construction of *B. pseudomallei bpsI* and *bpsR* knockout and complemented mutants. *bpsI* (PKI5), *bpsR* (PKR7) and *bpsIR* (KBIR5) mutants were constructed in *B. pseudomallei* strain PP844. Briefly, A 298 bp fragment of the *bpsI* gene was amplified from PP844 using primers BIPF (5'-GTACGCGGATCAGTT-GCTT-3') and BIPR (5'-AGTACGATCGCGACGATACC-3'). The blunt-ended product was ligated into the suicide vector pKNOCK-Tc to create pKBI, which was then mobilized from *E. coli* S17-1 λ pir into PP844 by conjugation. Single-crossover insertion mutants were selected on pseudomonas base agar containing 60 μ g tetracycline ml⁻¹. A blunt-ended 323 bp fragment of the *bpsR* gene was amplified using primers BRPF (5'-CGACACCTATCCGAACGGCT-3') and BRPR (5'-AACGGCTCATCAGCGAGTGC-3'). The resulting fragment was ligated into pKNOCK-Cm to create pKBR. After

conjugation into PP844, mutants were selected on pseudomonas base agar containing 40 μ g chloramphenicol ml⁻¹. Finally, the double *bpsIR* mutant KBIR5 was created by conjugating pKBR into the PKI5 mutant and selecting on pseudomonas base agar containing 60 μ g tetracycline ml⁻¹ and 40 μ g chloramphenicol ml⁻¹. For complementation of the knockout strain, pBBR-R2 was conjugated into PKR7 to create PKR7 + R, which was selected on pseudomonas base agar containing 800 μ g spectinomycin ml⁻¹ and 40 μ g chloramphenicol ml⁻¹. Plasmid pBBR-IR3 was conjugated into KBIR5 to create KBIR5 + IR, which was selected on pseudomonas base agar containing 800 μ g spectinomycin ml⁻¹, 60 μ g tetracycline ml⁻¹ and 40 μ g chloramphenicol ml⁻¹.

Construction of *dpsA::lacZ* transcriptional fusion strains.

TnpD is a mini-transposon vector containing the *dpsA* promoter fused to *lacZ* and maintained in *E. coli* CC118 (CpUT) as described in previous studies (Loprasert *et al.*, 2004). Integration of the *dpsA* promoter::*lacZ* transcriptional fusion into the chromosome of *B. pseudomallei* PP844, the QS mutants PKI5, PKR7 and KBIR5 and their corresponding complemented strains was achieved by conjugation of TnpD on plates containing trimethoprim (200 μ g ml⁻¹). In order to express the DpsA protein in KBIR5, pDps (Loprasert *et al.*, 2004) was transformed into this mutant to create KBIR5 + *dpsA*. To determine whether BpsR regulated *dpsA* directly, pBBR-R2 was

introduced into *E. coli* CpUT to generate *E. coli* CpUT+R. The bacteria were selected on agar containing trimethoprim (100 µg ml⁻¹) and spectinomycin (200 µg ml⁻¹).

Assay for β -galactosidase activity. Cell lysates taken from different phases of growth of *B. pseudomallei* strains grown in MM9 medium with 0.5 µM NaCl and with or without C8-HSL (200 nM) at 37 °C were prepared using bacterial protein extraction reagent (Pierce) and assayed for β -galactosidase activity in Miller units using *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside as a substrate (Miller, 1972). Similar assays were undertaken for *E. coli* CpUT and CpUT+R grown in the absence or presence of C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL (100 nM).

Growth on oxidant agar plates. Bacterial cultures were grown overnight in M9 low-glucose medium, adjusted to OD₆₀₀ 1.0 and 10-fold serially diluted. Ten microlitres of each dilution was spotted onto LB agar containing 150 µM *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) and the extent of growth was observed after 24 h incubation at 37 °C (Loprasert *et al.*, 2004).

Growth inhibition zone assay. Bacterial cultures grown overnight in M9 low-glucose medium were adjusted to OD₆₀₀ 1.0 and added to 3 ml warm top LB agar. The mixtures were overlaid onto LB agar plates. Paper discs containing *t*-BOOH (250 µM) were placed on the cell lawn. The diameters of growth inhibition zones were measured after 24 h incubation (Loprasert *et al.*, 2004).

Synthesis of AHLs. A range of AHLs with acyl side chains from C₄ to C₁₄ in length, with or without 3-oxo or 3-hydroxy substituents, were synthesized as described by Chhabra *et al.* (1993, 2003).

AHL extraction and LC MS/MS analysis. *B. pseudomallei* strains were grown to OD₆₀₀ 1.6 in 2 l tryptic soy broth at 37 °C with shaking at 250 r.p.m. Cells were removed by centrifugation and the supernatant was extracted twice with equal volumes of acidified ethyl acetate (100 µl glacial acetic acid per litre of ethyl acetate) and concentrated by rotary evaporation at 40–45 °C. The residue was resuspended in 50 µl methanol prior to liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). AHLs were separated by reverse-phase chromatography (RP-HPLC) using an Exsil Pure C18 MS 5µ column (250 × 2.1 mm; Alltech Associates) coupled to a tandem mass spectrometer (Applied Biosystems 4000 Q-TRAP) and eluted with a 35–70% w/v acetonitrile/water gradient as described by Yates *et al.* (2002). Enhanced product trap experiments (EPI) were triggered by precursor ion (*m/z* 102) scanning for the *m/z* range 150–350. The precursor ion *m/z* 102 is characteristic of the

homoserine lactone ring moiety. EPI spectra (*m/z* range 80–400) containing an ion at *m/z* 102 were compared with the product mass spectra of the corresponding synthetic AHL standard.

RESULTS

B. pseudomallei strain PP844 produces multiple AHLs

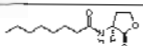
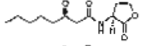
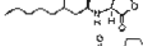
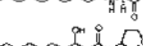
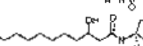
Spent stationary-phase culture supernatants prepared from *B. pseudomallei* strain PP844 were extracted with ethyl acetate and subjected to LC MS/MS. The data obtained are summarized in Table 2. Six AHLs were unequivocally identified by comparison of their retention times, and their molecular and principal fragment ions with synthetic standards. These AHLs were C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL.

C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL production is dependent on *bpsI* and *bpsR*

The gene encoding the LuxI homologue *bpsI* was cloned from the *B. pseudomallei* PP844 chromosome and sequenced. *bpsI* is 97% and 98% identical to the corresponding genes from *B. pseudomallei* strains K96243 and KHW respectively (data not shown). Since the identity of the AHL(s) synthesized via BpsI have not been unequivocally chemically identified, the *bpsI* gene was expressed in *E. coli* EBPI. Ethyl acetate extracts of EBPI culture supernatants were subjected to LC MS/MS and a molecule with *m/z* 228 was identified with fragmentation ions of *m/z* 127 and 102, characteristic of C8-HSL (Table 2).

To evaluate the impact of *bpsI* and *bpsR* mutations on the AHL profile of *B. pseudomallei* PP844, we constructed *bpsI* (PK15) and *bpsR* (PKR7) mutants. Table 2 compares the AHL profiles derived from LC MS/MS analysis of the corresponding spent culture supernatants. In both mutants, the only compounds absent are C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL, a finding which indicates that *bpsI* is responsible for their synthesis in *B. pseudomallei* PP844 and that the BpsIR system does not affect the expression of the other AHL

Table 2. AHL profiles, by LC MS/MS analysis, of the spent culture supernatants of *B. pseudomallei* PP844, its QS mutants, and an *E. coli* strain harbouring *bpsI*

AHL	Structure	<i>m/z</i>	Retention time (min)	Principal fragment ions	PP844 (wild-type)	PK15 (BpsI ⁻)	PKR7 (BpsR ⁻)	EBPI (<i>E. coli</i> + <i>bpsI</i>)
C8-HSL		228	5.9	228, 127, 102	+	–	–	+
3-Oxo-C8-HSL		242	4.8	242, 141, 102	+	–	–	–
3-Hydroxy-C8-HSL		244	4.6	244, 226, 125, 102	+	+	+	–
C10-HSL		256	8.5	256, 155, 102	+	+	+	–
3-Hydroxy-C10-HSL		272	5.4	272, 254, 153, 102	+	+	+	–
3-Hydroxy-C12-HSL		300	7.9	300, 282, 181, 102	+	+	+	–

synthases present in this organism. Table 2 also shows that *bpsI* is regulated by BpsR, since mutation of *bpsR* results in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis.

Expression of *dpsA* in *B. pseudomallei* is BpsIR/C8-HSL-dependent

In the promoter region (−74 to −55) of *dpsA*, we identified a 20 bp sequence (GCATCCCGcATCGGGcATGC) as a *lux* box motif characteristic of genes which are regulated via LuxR/AHL-dependent QS. Without the lower-case c, this motif will be perfectly palindromic. Nevertheless, this motif matches the consensus sequence for the *Vibrio fischeri luxI lux* box at 11 out of 21 positions as well as the *P. aeruginosa rhII lux* box (12/20 bases). To assess whether QS is involved in regulating the response of *B. pseudomallei* to oxidative stress, we first introduced a *dpsA::lacZ* transcriptional fusion via TnpD onto the chromosome of *B. pseudomallei* PP844, the isogenic *bpsI* (PK15), *bpsR* (PKR7) mutants and the *bpsIR* double mutant (KBIR5) as well as the corresponding complemented strains.

Fig. 1 shows that *dpsA* expression is induced in the late exponential phase of growth (6 h post-inoculation). The *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants all exhibited substantially reduced levels of β -galactosidase activity throughout growth when compared to the PP844 wild-type, indicating that *dpsA* is regulated via *bpsIR*. Provision of exogenous, synthetic C8-HSL to the *bpsI* mutant (PK15) or genetic complementation of the *bpsR* (PKR7) and *bpsIR* (KBIR5) mutants completely restored *dpsA* expression (Fig. 1), suggesting that *dpsA* is directly or indirectly regulated by the *bpsIR* QS system. Fig. 1 also demonstrates that mutations in the *bpsIR* QS system have no adverse effects on the growth of *B. pseudomallei* under these culture conditions and that exogenous synthetic C8-HSL is unable to overcome the growth-phase dependency of *dpsA* expression.

B. pseudomallei bpsIR QS mutants show increased sensitivity to oxidative stress due to reduction of *dpsA* expression

Mutation or overexpression of *dpsA* in *B. pseudomallei* confers hypersensitivity or increased resistance respectively to organic oxidants such as the organic hydroperoxide *t*-BOOH (Loprasert *et al.*, 2004). To determine the sensitivity of the *bpsI*, *bpsR* and *bpsIR* mutants to oxidative stress, each strain was grown on oxidant agar plates containing 150 μ M *t*-BOOH. Each of the mutants was more sensitive to *t*-BOOH than the wild-type or the corresponding complemented strains (Fig. 2a). The wild-type and complemented strains grew when diluted to 10^{-6} – 10^{-7} c.f.u. ml $^{-1}$; however, in contrast, the QS mutants only grew when diluted to 10^{-3} – 10^{-4} c.f.u. ml $^{-1}$. This suggests that PK15, PKR7 and KBIR5 are 1000–10 000 times more sensitive to hydroperoxide stress.

To evaluate whether the increased sensitivity of the QS mutants was a consequence of reduced *dpsA* expression, we analysed the response of the wild-type PP844, *bpsIR* mutant KBIR5 and KBIR5 carrying pDps (KBIR5 + *dpsA*). Plasmid pDps carries a copy of *dpsA* and was previously shown to enhance the resistance of *B. pseudomallei* to *t*-BOOH (Loprasert *et al.*, 2004). Fig. 2(b) shows that the wild-type grew to the dilution of 10^{-7} c.f.u. ml $^{-1}$ and KBIR5 to 10^{-2} c.f.u. ml $^{-1}$, whereas KBIR5 + *dpsA* grew to 10^{-6} c.f.u. ml $^{-1}$. Taken together, these results demonstrate that the *bpsI* and *bpsR* QS mutants are more sensitive to oxidative stress and this is likely to be due to a reduction in *dpsA* expression and hence DpsA production. The growth inhibition zone assay (Fig. 2c) further confirmed that both wild-type and complemented *B. pseudomallei* strains were more resistant to *t*-BOOH than were the QS mutants on LB agar. The *dpsA*-complemented strain also showed more resistance to *t*-BOOH, as expected.

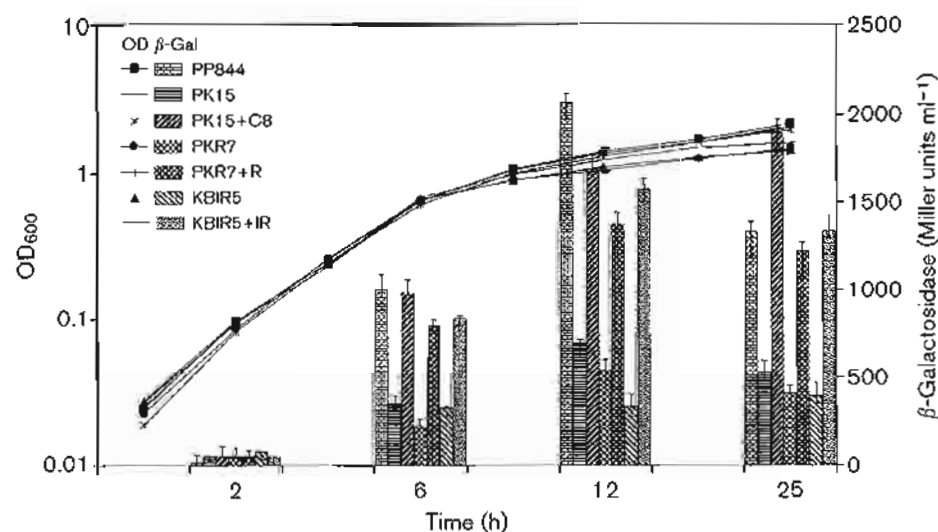


Fig. 1. Expression of *dpsA* promoter during growth of *B. pseudomallei*. β -Galactosidase activities (means $\pm$ range) from triplicate experiments in crude extracts of the *dpsA-lacZ* transcription fusion integrated into *B. pseudomallei* parent strain PP844, *bpsI* knockout mutant (PK15), *bpsI* knockout mutant supplied with 200 nM exogenous C8-HSL (PK15 + C8), *bpsR* mutant (PKR7), *bpsR* knockout mutant complemented with *bpsR* plasmid pBBR-R2 (PKR7 + R), *bpsIR* double knockout mutant (KBIR5) and *bpsIR* double knockout mutant complemented with the *bpsIR* plasmid pBBR-IR3 (KBIR5 + IR) are shown by the patterned bars. The negative control used was the PP844 parent strain without the *dpsA-lacZ* transcriptional fusion. Growth (OD $_{600}$) is shown by the symbols and graph lines.

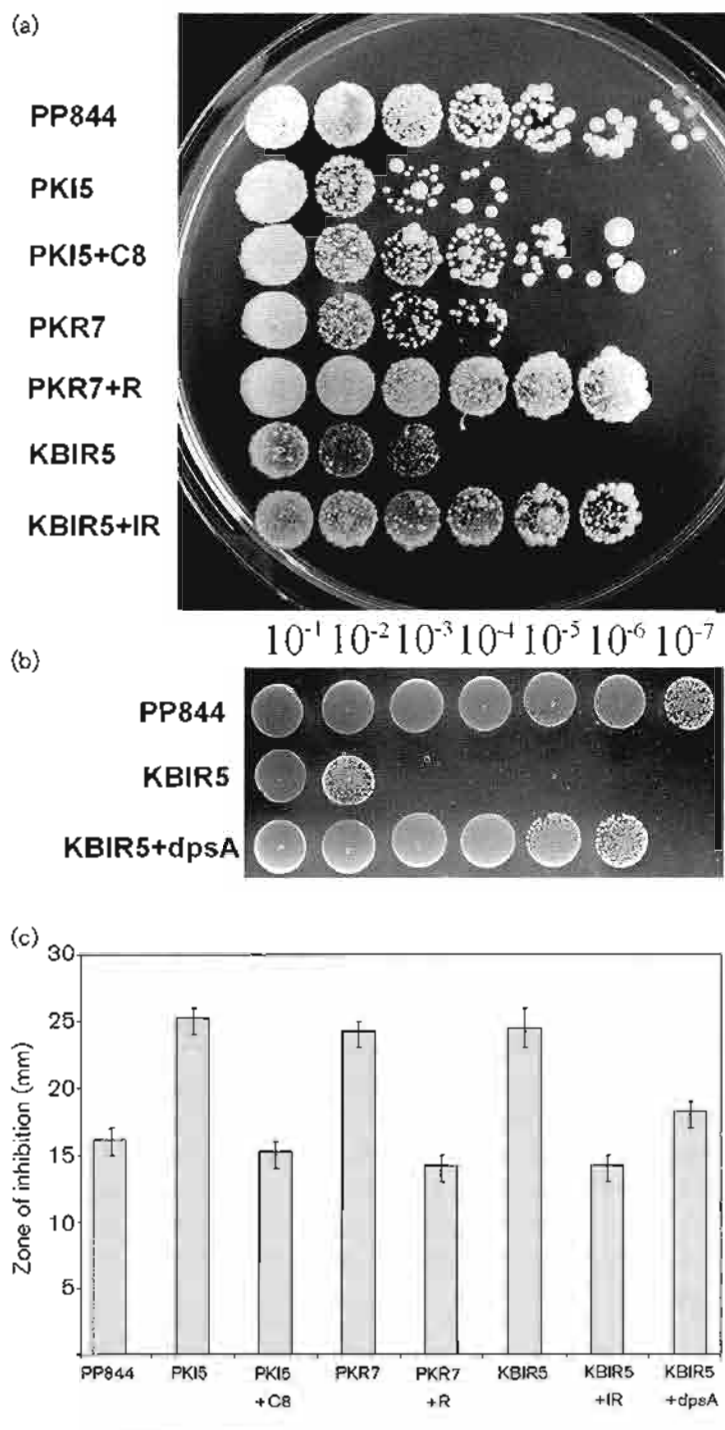


Fig. 2. Sensitivity of *B. pseudomallei* QS mutants to *t*-BOOH: determination of the levels of resistance to *B. pseudomallei* *t*-BOOH killing in the parent strain PP844, PKI5, PKI5 with exogenous C8-HSL (PKI5+C8), PKR7, PKR7+R, KBIR5, KBIR5+IR and KBIR5+dpsA. (a, b) Growth on oxidant agar plates assay. Serial 10-fold dilutions of cultures were spotted. (c) Growth inhibition zone assay. The diameters of the growth inhibition zone are shown (means $\pm$ range of triplicate assays).

BpsR and C8-HSL are required for maximum expression of *dpsA* in *E. coli*

To determine whether BpsR directly regulated the expression of *dpsA* in the presence or absence of AHLs, we used *E. coli* CpUT harbouring the *dpsA::lacZ* transcriptional fusion plasmid, TnpD, together with pBBR-R2 to give *E. coli* strain

CpUT+R. Fig. 3 shows that *dpsA* promoter activity in *E. coli* CpUT is ~ 800 Miller units ml^{-1} and remains unchanged on introducing *bpsR* (*E. coli* CpUT+R). Exogenous provision of C8-HSL to *E. coli* CpUT+R but not *E. coli* CpUT increased *dpsA* expression approximately threefold (to ~ 2200 Miller units ml^{-1}). None of the other AHLs produced by *B. pseudomallei* strain PP844 enhanced *dpsA* expression.

DISCUSSION

In common with Gram-negative bacteria such as *P. aeruginosa* (Winson *et al.*, 1995), *Rhizobium leguminosarum* (Lithgow *et al.*, 2000) and *Yersinia pseudotuberculosis* (Atkinson *et al.*, 1999), *B. pseudomallei* possesses several LuxI homologues and produces multiple AHL QS signal molecules. *B. pseudomallei* PP844 is an extremely virulent strain isolated from a patient who died from the most severe clinical manifestation of melioidosis (Utaisincharoen *et al.*, 2001). PP844 produces six AHLs with C₈, C₁₀ and C₁₂ acyl side chains with or without C-3 position substituents. Of these, 3-oxo-C8-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL have not previously been identified in *B. pseudomallei* while C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL and 3-hydroxy-C10-HSL were previously reported by Ulrich *et al.* (2004a) in *B. pseudomallei* strain DD03. This strain also made 3-oxo-C14-HSL, an AHL which was not present in *B. pseudomallei* PP844 culture supernatants. In bacteria which possess multiple LuxRI homologues, these QS systems are usually interdependent. In *B. pseudomallei* DD03, mutation of any of the three individual AHL synthase genes had no effect on the AHL profile apart from the *pmlI* mutant, which did not produce 3-hydroxy-C14-HSL. These data do not however define which AHLs are synthesized by which LuxI homologue and suggest that there is substantial redundancy in the system. Here we have shown that mutation of *bpsI* results in the specific loss of two AHLs, C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL, from the AHL profile of the parental PP844 strain. To confirm these data, *bpsI* was expressed in *E. coli*. However, only C8-HSL was synthesized, suggesting either that *E. coli* is unable to synthesize 3-oxo-C8-HSL via BpsI or that 3-oxo-C8-HSL is produced via a different AHL synthase, the expression of which depends on the presence of C8-HSL. When expressed in a heterologous host, LuxI homologues do not always generate the same AHL profile as in the original bacterium (Atkinson *et al.*, 1999) and this is the most likely explanation for our observation. Our unequivocal demonstration that BpsI directs the synthesis of C8-HSL is consistent with the HPLC and bioassay data reported by Song *et al.* (2005) for *B. pseudomallei* strain KHW. However, it is not possible to conclude that C10-HSL is the main AHL produced via PmlI (the equivalent gene to *bpsI*) in *B. pseudomallei* strain 088 since the authors only examined culture supernatants from the parent strain (Valade *et al.*, 2004), which produces multiple AHLs.

In *B. pseudomallei* and the closely related obligate animal pathogen *Burkholderia mallei*, QS mutants are highly

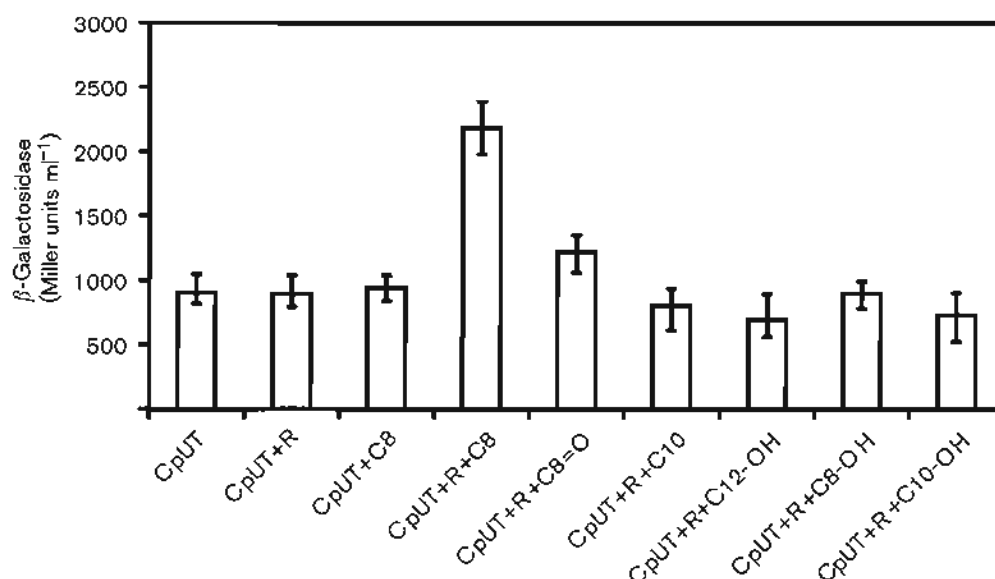


Fig. 3. Expression of *dpsA* in *E. coli* in the presence and absence of *bpsR* and AHLs (100 nM). The β -galactosidase activities were determined for *E. coli* carrying the *dpsA::lacZ* fusion without (*E. coli* CpUT) or with *bpsR* (*E. coli* CpUT+R) in the absence or presence of the AHLs produced by *B. pseudomallei* PP844. C8, C8-HSL; C8=O, 3-oxo-C8-HSL; C10, C10-HSL; C12-OH, 3-hydroxy-C12-HSL; C8-OH, 3-hydroxy-C8-HSL; C10-OH, 3-hydroxy-C10-HSL. Data are means $\pm$ range of triplicate experiments.

attenuated in experimental animal infection models (Ulrich *et al.*, 2004a, b). Although *B. mallei* appears to possess only two *luxI* homologues, nevertheless it also produces C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL and 3-hydroxy-C10-HSL (Ulrich *et al.*, 2004b) whereas the non-pathogenic *Burkholderia thailandensis* does not produce any of the 3-hydroxy or 3-oxo compounds although it does synthesize C6-HSL, C8-HSL and C10-HSL (Ulrich *et al.*, 2004c). It is therefore possible that the QS systems employing the substituted AHLs are more closely associated with the regulation of virulence.

Mutation of *bpsR* in PP844 also resulted in the loss of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL synthesis, indicating that BpsR is required for the synthesis of these two AHLs, presumably by controlling *bpsI* expression. Indeed, Song *et al.* (2005) have shown that C8-HSL is required to activate transcription of both *bpsI* and *bpsR*. Our data also indicate that the *bpsIR* system does not control the expression of the two other *luxI* homologue systems present in *B. pseudomallei* although it remains possible that the other LuxR proteins and AHLs may influence *bpsIR* expression.

The organic hydroperoxide *t*-BOOH has been shown to cause DNA damage in mammalian cells because it reacts with metals to generate *tert*-butoxyl radicals (Altman *et al.*, 1994). DpsA-type proteins have previously been demonstrated to prevent iron-dependent hydroxy radical formation (Yamamoto *et al.*, 2002) and in *B. pseudomallei*, DpsA conferred protection against *t*-BOOH (Loprasert *et al.*, 2004). As *bpsI* and *bpsR* mutants exhibit reduced expression

of *dpsA*, we thought it likely that they would show increased sensitivity to *t*-BOOH. This was indeed the case, with both mutants being more sensitive to *t*-BOOH. This defect could be complemented by provision of C8-HSL to the *bpsI* mutant or by genetic complementation of the *bpsR* and *bpsRI* mutants. In addition, the viability of the QS mutants was reduced in the presence of *t*-BOOH when compared with the parent strain cultured under similar conditions. Protection against *t*-BOOH could also be achieved in the *bpsRI* mutants by increasing the expression of *dpsA*. The data suggest that the increased sensitivity to *t*-BOOH observed in the *bpsRI* mutants is due specifically to a reduction in *dpsA* expression. Thus the response of the *B. pseudomallei* wild-type to oxidative stress is partially controlled in a cell population density dependent manner through QS as demonstrated in this study, perhaps reflecting the need to protect DNA from oxidative damage in high-density 'overcrowded' stationary-phase cultures. In *P. aeruginosa*, the response to oxidative stress imposed by hydrogen peroxide and the O₂⁻-generating agent phenazine methosulphate is also QS controlled since *sodA*, *sodB* and *kata* are regulated by both the *las* and *rhl* QS systems (Hassett *et al.*, 1999).

B. pseudomallei can resist phagocytic intracellular killing (Egan & Gordon, 1996) and remain dormant within a host for many years (Nathan *et al.*, 2005). It has evolved a variety of mechanisms to protect its DNA from oxidative damage from either cellular metabolism or the environment, and under such conditions will produce high levels of the non-specific DNA-binding protein DpsA, which effectively

protects DNA against oxidants (Almiron *et al.*, 1992; Loprasert *et al.*, 2004). In *B. pseudomallei* (and also *Burkholderia cenocepacia* strain J2315) *dpsA* is located adjacent to *katG*. In the former, the two genes are co-transcribed during oxidative stress but under conditions where *katG* is not highly induced, *dpsA* is transcribed from a second promoter within the *katG-dpsA* intergenic region (Loprasert *et al.*, 2003). This region also contains a *lux* box motif and here we have shown that *dpsA* expression is positively controlled by the BpsRI QS system. In *B. cepacia* ATCC 25416, Aguilar *et al.* (2003) identified a genomic clone (P80) that was activated in an *E. coli* strain carrying CepR when supplied with C8-HSL. Although they were unable to identify the target gene(s) regulated by CepR in ATCC 25416, from the sequence data obtained they noted that a *DpsA* homologue was present 200 bp downstream of the identified sequence in *B. cenocepacia* J2315, a strain whose genome has been sequenced. Although no direct evidence was presented, it is possible that the response of *B. cepacia* complex to oxidative stress may also be QS controlled.

In *B. pseudomallei*, *dpsA* expression is not completely dependent on *bpsRI* since β -galactosidase activities of ~ 450 Miller units ml^{-1} are observed in the QS mutants (Fig. 1). It is therefore likely that *dpsA* expression is also subject to control by a number of regulatory systems where QS provides the population density signal required to trigger *dpsA* expression in combination with other environmental signals. This is a characteristic of many AHL-dependent QS systems (Withers *et al.*, 2001). Furthermore, it is noteworthy that *dpsA* expression was not advanced in *B. pseudomallei* by provision of exogenous C8-HSL and remained population and growth-phase dependent. This phenomenon has also been noted in *P. aeruginosa*, where provision of exogenous AHLs at the start of growth does not induce early induction of QS-dependent virulence determinants (Diggle *et al.*, 2002, 2003).

In conclusion, we show that (a) *B. pseudomallei* PP844 synthesizes six AHLs, two of which (3-oxo-C8-HSL and 3-hydroxy-C12-HSL) have not previously been identified in *B. pseudomallei*; (b) BpsI directs the synthesis of C8-HSL and 3-oxo-C8-HSL; and (c) BpsR, in conjunction with C8-HSL, contributes to the oxidative stress response by positively regulating *dpsA* expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Thailand Research Fund grant RSA 4780017, the Melioidosis network research grants from the National Health Foundation Thailand, and the Biotechnology and Biological Sciences Research Council, UK. P. Lumjiaktase was supported by Thailand Research Fund Royal Golden Jubilee PhD Program (PHD/0187/2544). The authors would like to thank W. Whangskul and R. Sallabhan at the Laboratory of Biotechnology, Chulabhorn Research Institute, and Catherine Ortori at the Centre for Analytical Bioscience, University of Nottingham, for help with the LC MS/MS.

REFERENCES

- Aguilar, C., Friscina, A., Devescovi, G., Kojic, M. & Venturi, V. (2003). Identification of quorum-sensing-regulated genes of *Burkholderia cepacia*. *J Bacteriol* 185, 6456–6462.
- Alexeyev, M. F. (1999). The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *Biotechniques* 26, 824–826.
- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D. & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* 6, 2646–2654.
- Altman, S. A., Zastawny, T. H., Randers, L., Lin, Z., Lumpkin, J. A., Remacle, J., Dizdaroğlu, M. & Rao, G. (1994). *tert*-Butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 306, 35–44.
- Atkinson, S., Throup, J. P., Stewart, G. S. A. B. & Williams, P. (1999). A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. *Mol Microbiol* 33, 1267–1277.
- Cámara, M., Williams, P. & Hardman, A. (2002). Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect Dis* 2, 667–676.
- Cheng, A. C. & Currie, B. J. (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev* 18, 383–416.
- Chhabra, S. R., Stead, P., Bainton, N. J., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B., Williams, P. & Bycroft, B. W. (1993). Autoregulation of carbapenem biosynthesis in *Erwinia carotovora*. *J Antibiot* 46, 441–454.
- Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D. I. & Bycroft, B. W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal quorum sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *J Med Chem* 46, 97–104.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172, 6568–6572.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P. & Cámara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184, 2576–2586.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M. & Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50, 29–43.
- Egan, A. M. & Gordon, D. L. (1996). *Burkholderia pseudomallei* activates complement and is ingested but not killed by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 64, 4952–4959.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G. & 10 other authors (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 34, 1082–1093.
- Jones, A. L., Beveridge, T. J. & Woods, D. E. (1996). Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* 64, 782–790.
- Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. (2004). Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2, 581–592.

- Lithgow, J. K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodenas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P. & Downie, J. A. (2000). The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* 37, 81–97.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2000). Characterization and mutagenesis of *fur* gene from *Burkholderia pseudomallei*. *Gene* 254, 129–137.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2003). Regulation of the *katG-dpsA* operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress. *FEBS Lett* 542, 17–21.
- Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R. & Mongkolsuk, S. (2004). DpsA protects the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* against organic hydroperoxide. *Arch Microbiol* 182, 96–101.
- Martinez, A. & Kolter, R. (1997). Protection of DNA during oxidative stress by the non-specific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* 179, 5188–5194.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352–355. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Nathan, S. A., Qvist, R. & Puthucherry, S. D. (2005). Kinetic studies of bioactive products nitric oxide and 8-iso-PGF(2 α) in *Burkholderia pseudomallei* infected human macrophages, and their role in the intracellular survival of these organisms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43, 177–183.
- Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Song, Y., Xie, C., Ong, Y. M., Gan, Y. H. & Chua, K. L. (2005). The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Bacteriol* 187, 785–790.
- Stillman, T. J., Upadhyay, M., Norte, V. A. & 9 other authors (2005). The crystal structures of *Lactococcus lactis* MG1363 Dps proteins reveal the presence of an N-terminal helix that is required for DNA binding. *Mol Microbiol* 57, 1101–1112.
- Swift, S., Downie, J. A., Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Salmond, G. P. & Williams, P. (2001). Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol* 45, 199–270.
- Ulrich, R. L., Deshazer, D., Brueggemann, E. E., Hines, H. B., Oyston, P. C. & Jeddalo, J. A. (2004a). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. *J Med Microbiol* 53, 1053–1064.
- Ulrich, R. L., Deshazer, D., Hines, H. B. & Jeddalo, J. A. (2004b). Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* 72, 6589–6596.
- Ulrich, R. L., Hines, H. B., Parthasarathy, N. & Jeddalo, J. A. (2004c). Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. *J Bacteriol* 186, 4350–4360.
- Utaisinchaoen, 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, 307–313.
- Valade, E., Thibault, F. M., Gauthier, Y. P., Palencia, M., Popoff, M. Y. & Vidal, D. R. (2004). The PmlI-PmlR quorum-sensing system in *Burkholderia pseudomallei* plays a key role in virulence and modulates production of the MprA protease. *J Bacteriol* 186, 2288–2294.
- Winson, M. K., Cámara, M., Latifi, A. & 10 other authors (1995). Multiple *N*-acylhomoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *P. aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9427–9431.
- Withers, H., Swift, S. & Williams, P. (2001). Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks. *Curr Opin Microbiol* 4, 186–193.
- Wuthiekanun, V., Smith, M. D., Dance, D. A. & White, N. J. (1995). Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89, 41–43.
- Yamamoto, Y., Poole, L. B., Hantgan, R. R. & Kamio, Y. (2002). An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J Bacteriol* 184, 2931–2939.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C. & 8 other authors (2002). *N*-Acyl homoserine lactones undergo lactonysis in a pH- temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70, 5635–5646.

Functional Genetic Analysis Reveals a 2-Alkyl-4-Quinolone Signaling System in the Human Pathogen *Burkholderia pseudomallei* and Related Bacteria

Stephen P. Diggle,^{1,4,*} Putthapoom Lumjiaktase,^{3,4}
 Francesca Dipilato,¹ Klaus Winzer,¹
 Mongkol Kunakorn,³ David Barrett,²
 Siri Ram Chhabra,¹ Miguel Cámara,¹
 and Paul Williams¹

¹Institute of Infection, Immunity & Inflammation
 Centre for Biomolecular Sciences

²School of Pharmacy
 University Park
 University of Nottingham
 Nottingham NG7 2RD
 United Kingdom

³Department of Pathology
 Faculty of Medicine-Ramathibodi Hospital
 Mahidol University
 270 Rama VI Road
 Bangkok 10400
 Thailand

Summary

Pseudomonas aeruginosa synthesizes diverse 2-alkyl-4(1*H*)-quinolones (AHQs), including the signaling molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (PQS), via the *pqsABCDE* locus. By examining the genome databases, homologs of the *pqs* genes were identified in other bacteria. However, apart from *P. aeruginosa*, only *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis* contained a complete *pqsA–E* operon (termed *hhqA–E*). By introducing the *B. pseudomallei* *hhqA* and *hhqE* genes into *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* mutants, we show that they are functionally conserved and restore virulence factor and PQS production. *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cenocepacia*, and *P. putida* each produced 2-heptyl-4(1*H*)-quinolone (HHQ), but not PQS. Mutation of *hhqA* in *B. pseudomallei* resulted in the loss of AHQ production, altered colony morphology, and enhanced elastase production, which was reduced to parental levels by exogenous HHQ. These data reveal a role for AHQs in bacterial cell-to-cell communication beyond that seen in *P. aeruginosa*.

Introduction

Bacterial cells are highly interactive and capable of cell-to-cell communication through the production and detection of small, diffusible signal molecules that coordinate gene expression as a function of cell population density. This phenomenon has been termed “quorum sensing” (QS) [1]. While there is considerable chemical diversity in the nature of signal molecules employed, QS systems are conserved throughout the bacterial kingdom [2]. In Gram-negative bacteria such as the opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, QS signal molecules regulate virulence, secondary

metabolism, swarming motility, and biofilm development via an intricate global gene regulatory network [2–4]. This network incorporates two *N*-acylhomoserine lactone (AHL)-dependent QS systems, the *las* and *rhl* systems [5–7]. These consist of a response regulator protein (LasR or RhlR) activated upon binding the cognate AHL, either *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) or *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), which are synthesized via LasI or RhlI, respectively [6–8] (Figure 1A). *P. aeruginosa* also produces a variety of 2-alkyl-4(1*H*)-quinolones (AHQs), some of which were originally identified from their antibacterial properties [9–12] (Figure 1A). Indeed, *P. aeruginosa* has been shown to produce over 50 AHQs [12], although the biological function of many of these is not known. One of these compounds, 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (PQS), was discovered to function as a diffusible signal molecule and was termed the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS; Figure 1A) [3]. Subsequently, PQS was shown to regulate *P. aeruginosa* virulence gene expression [13–15] and to function as an integral component of the QS network, since PQS production is modulated by both the *las* and *rhl* systems [3, 14, 16]. Furthermore, *P. aeruginosa* strains carrying mutations in the MexGHI-OpmD efflux pump are unable to produce PQS [15] and are severely attenuated in both mouse and plant experimental infection models. PQS has been found in the lungs of cystic fibrosis patients infected with *P. aeruginosa* [17], and it exhibits potent immune modulatory activity [18]. It is derived from anthranilate [19], and its biosynthesis requires a functional *pqsABCDE* operon [20]. The PQS biosynthetic genes *pqsA–D* [20] are responsible for the production of more than 50 AHQs, including the PQS precursor 2-heptyl-4(1*H*)-quinolone (HHQ) (Figure 1A) ($R = n\text{-C}_7\text{H}_{15}$) [14, 19]. Although the precise enzymatic contribution of each *pqs* biosynthetic gene to AHQ biosynthesis has not been determined, it is clear from isotope-labeling experiments that AHQs are synthesized in *P. aeruginosa* via a “head-to-head” condensation of anthranilate and β -keto fatty acids [21] (Figure 1B). From sequence comparisons, *pqsA* codes for a putative coenzyme A ligase, *pqsB* and *pqsC* code for two β -keto-acyl-acyl carrier protein synthases, and *pqsD* is predicted to be a transacetylase homologous to FabH1. The last gene in the *pqs* operon is *pqsE*. Since *pqsE* mutants produce parental levels of PQS and HHQ but do not exhibit any PQS-associated phenotypes [14, 19, 20], PqsE is considered to facilitate the response to PQS [14, 22].

Many QS signal molecules are derived from primary cellular metabolites such as *S*-adenosyl-L-methionine (SAM), which is required for AHL and autoinducer-2 (AI-2) synthesis, while fatty acids are required for both AHL and AHQ production [23]. AHQ biosynthesis also requires anthranilate, an intermediate in aromatic amino acid metabolism. Given that AHQ synthesis employs common substrates from primary metabolism, this suggests that other bacteria may also be capable of making AHQ signal molecules, although, to our knowledge,

*Correspondence: steve.diggle@nottingham.ac.uk

⁴These authors contributed equally to this work.

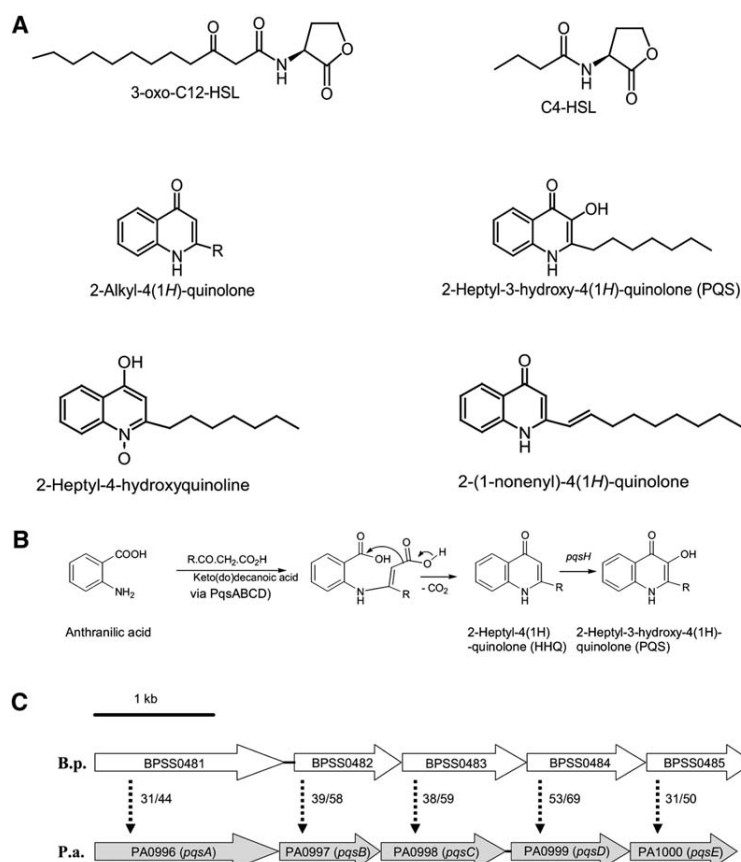


Figure 1. Quorum Sensing Signal Molecules Produced by *P. aeruginosa*, and a Putative *pqsABCDE* Operon in *B. pseudomallei*

(A) *N*-acyl homoserine lactones (AHLs) and 2-alkyl-4(1H)-quinolones (AHQs) known to be produced by *P. aeruginosa*.

(B) Scheme showing the biosynthesis of HHQ and PQS from anthranilate via PqsABCD.

(C) Comparison of the *B. pseudomallei* K96243 (B.p.) *hhqABCDE* operon and the *P. aeruginosa* PAO1 (P.a.) *pqsABCDE* operon. Values represent identity/similarity from a direct protein-protein comparison with the blastp program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

these have not been isolated from any other species of bacteria except *P. aeruginosa*. Previously, Lépine et al. [22] assayed culture supernatants of several species of *Pseudomonas*, including *P. fluorescens*, *P. fragi*, and *P. syringae*, for PQS and the *N*-oxide isomer of PQS, but they did not detect either quinolone.

Examination of the currently completed bacterial genomes revealed that many species of both Gram-positive and Gram-negative bacteria contain putative *pqs* gene homologs, but we focused on several species of the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia*, which contain genes that could potentially be involved in AHQ biosynthesis. Here, we show that the human pathogens *B. pseudomallei* and *B. cenocepacia* and the nonpathogenic *B. thailandensis* and *P. putida* produce AHQs. While none of the strains examined synthesized PQS, all produced HHQ; *B. thailandensis* produced a range of AHQs; and at least one *B. pseudomallei* strain made 2-nonenyl-4(1H)-quinolone (NEHQ). Mutation of *hhqA* in *B. pseudomallei* resulted in the loss of AHQ synthesis, altered colony morphology, and enhanced elastase synthesis. Exogenous HHQ reduced elastase production in the *B. pseudomallei* *hhqA* mutant, consistent with a role for HHQ in cell-cell signaling. In addition, the *B. pseudomallei* *hhqA* and *hhqE* genes both complemented the corresponding *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* mutants, demonstrating that the genes required for AHQ synthesis and response are functionally conserved across the two genera, and that AHQ signaling is not restricted to *P. aeruginosa*.

Results

Identification of Putative AHQ Biosynthesis Genes in *Burkholderia* and *Pseudomonas*

A search of completed and uncompleted microbial genomes (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) revealed that several species belonging to the genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* as well as the plant pathogen *Ralstonia* contain putative homologs of the *P. aeruginosa* *pqs* biosynthetic genes *pqsA*, *pqsC*, and *pqsD*, respectively (Table S1; see the Supplemental Data available with this article online). However, apart from *P. aeruginosa*, only strains of the primary human pathogen *B. pseudomallei* and the serologically and genetically related *B. thailandensis* were found to contain a complete, putative *pqsABCDE* operon (Figure 1C) located on chromosome 2. When compared with *P. aeruginosa*, the *B. pseudomallei* gene products exhibit from 31% to 53% identity (Figure 1C). Similarly, the *B. thailandensis* *pqsA*–*E* genes demonstrate a high level of DNA sequence identity with those from *B. pseudomallei* (*pqsA*, 92%; *pqsB*, 89%; *pqsC*, 94%; *pqsD*, 94%; *pqsE*, 91%). Interestingly, neither *B. pseudomallei* nor *B. thailandensis* possess a homolog of the *P. aeruginosa* *pqsH* gene. This gene facilitates the conversion of HHQ to PQS in *P. aeruginosa*, and its absence from *B. pseudomallei* would suggest that production of PQS was unlikely in this organism. Therefore, we have designated the putative *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* AHQ biosynthesis operon *hhqABCDE*.

Transcomplementation of *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* Genes with the Corresponding *B. pseudomallei* Homologs

The identification of a putative *pqsABCDE* AHQ biosynthetic operon in *B. pseudomallei* (Figure 1C) suggested that these genes may be functionally equivalent to those of *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 strains. To test this hypothesis, we separately cloned the *hhqA* (BPSS0481) and *hhqE* (BPSS0485) genes into the plasmid pUCP18 [24] and introduced the constructs into *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* mutants, respectively. Figure 2A shows that the loss of PQS (and HHQ) production in the *pqsA* mutant can be restored by complementation with the *hhqA* gene from *B. pseudomallei*, which also restores pyocyanin synthesis (Figure 2B). In *P. aeruginosa*, mutation of *pqsE* has little effect on PQS synthesis, as PqsE is required for the response of the organism to PQS [20]. The introduction of the *B. pseudomallei* *hhqE* gene did not affect PQS biosynthesis when introduced into the PAO1 *pqsE* mutant (data not shown). However, Figure 2B shows that pyocyanin production was restored in the *P. aeruginosa* *pqsE* mutant when transcomplemented with the *hhqE* gene. Previously, we have demonstrated that mutation of the *pqsE* gene results in the loss of production of the galactophilic lectin, LecA (PA-IL) [14]. To investigate whether this defect could also be complemented by the *hhqE* gene from *B. pseudomallei*, we introduced a *lecA::lux* reporter gene fusion into the chromosome of a PAO1 *pqsE* mutant. In this genetic background, there is an 80% reduction in the level of *lecA* expression (Figure 2C). The introduction of a plasmid-borne copy of the *B. pseudomallei* *hhqE* gene restores *lecA* expression to ~45% that of the parent strain, indicating that the *hhqE* gene has a similar function in both *P. aeruginosa* and *B. pseudomallei*.

Burkholderia pseudomallei and *Burkholderia thailandensis* Produce AHQs

The presence of a putative PQS biosynthetic operon and the ability of the *hhqA* and *hhqE* genes to complement the corresponding *P. aeruginosa* mutants suggested that *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* were likely to employ AHQ-dependent QS. To determine whether they produced AHQs, cell-free culture supernatants were extracted with acidified ethyl acetate and subjected to thin-layer chromatography (TLC), and the plate was overlaid with the AHQ bioreporter PAO1 *lecA::lux* Δ *pqsA* as described in the Experimental Procedures. This reporter responds sensitively to a range of AHQs, including both PQS and HHQ (to be described in detail elsewhere). Figure 3A shows that three *B. pseudomallei* strains and one *B. thailandensis* strain (E30) produce at least one compound capable of activating the AHQ bioreporter. However, the migration of this compound on TLC suggested that it is not PQS, but a closely related AHQ, possibly HHQ. To unequivocally identify the *B. pseudomallei* K96243 compound(s), the solvent-extracted culture supernatant was examined by LC-MS/MS. A compound with a molecular ion of *m/z* 244 [M + H] was identified with fragmentation ions of *m/z* 172 and 159 (Figure 3B), which are characteristic of HHQ (Figure 3D) rather than PQS (Figure 3C) and are produced by cleavage of the C7 alkyl chain [12]. *B. thailandensis* E30 culture supernatants contained a number

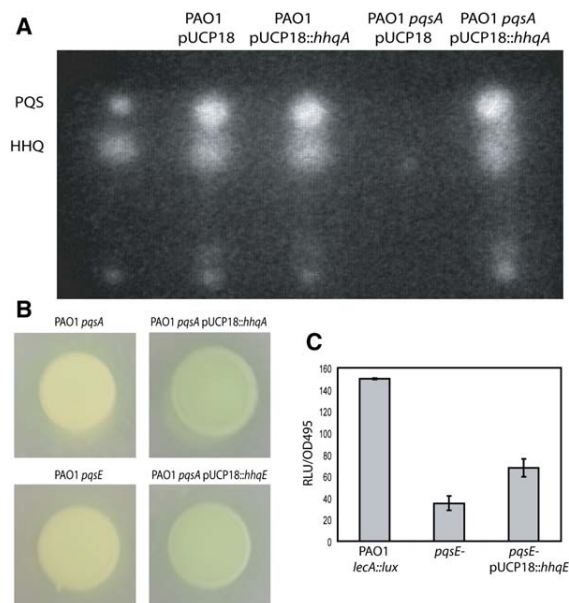


Figure 2. The *B. pseudomallei* Genes *hhqA* and *hhqE* Are Functionally Equivalent to the *P. aeruginosa* Genes Required for PQS Biosynthesis and Response

(A) TLC overlaid with an AHQ bioreporter and viewed with a Bertold Luminograph photon video camera. AHQs are visualized as bioluminescent spots. This demonstrates that the *B. pseudomallei* *hhqA* gene introduced on pUCP18 restores AHQ production in a *P. aeruginosa* *pqsA* mutant.

(B) *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* mutants grown on LB agar do not produce the green phenazine pigment pyocyanin. Complementation with the *B. pseudomallei* *hhqA* or *hhqE* genes restores pyocyanin production.

(C) Expression of a *lecA::lux* fusion in the parent strain PAO1 *lecA::lux*, the *P. aeruginosa* *pqsE* mutant (*pqsE*) and the *P. aeruginosa* *pqsE* mutant complemented with *hhqE* on pUCP18 (*pqsE*+*hhqE*). Error bars represent two standard errors of three independent measurements.

of AHQs incorporating either a saturated or unsaturated alkyl chain at position 2. Also an *N*-oxide, analyzed to be 2-nonyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, was identified. All of these derivatives have previously been described in *P. aeruginosa*. The results are summarized in Table 1.

HHQ Production in *B. cenocepacia* and *P. putida*

Using TLC in conjunction with the AHQ bioreporter PAO1 *pqsA* *lecA::lux*, a range of *Burkholderia* and *Pseudomonas* species were screened for AHQ production. The results are summarized in Table 2. Apart from *P. aeruginosa* strains PAO1 and PA14, which produce both PQS and HHQ, no other species tested produced PQS. *P. putida* KT2440 and a clinical isolate of *B. cenocepacia* (J415) both produced detectable amounts of a compound comigrating with HHQ on TLC (data not shown). Consequently, cell-free supernatants from *P. putida* and *B. cenocepacia* were subjected to LC-MS/MS, and consistent with the TLC data, HHQ was identified from the molecular ion *m/z* 244 [M + H] and daughter ions (*m/z* 172 and 159; data not shown). Neither PQS nor any other AHQs were detected in *B. cenocepacia* or *P. putida* cell-free supernatants. Furthermore, no AHQs could be detected in spent supernatants from *P. mendocina*,

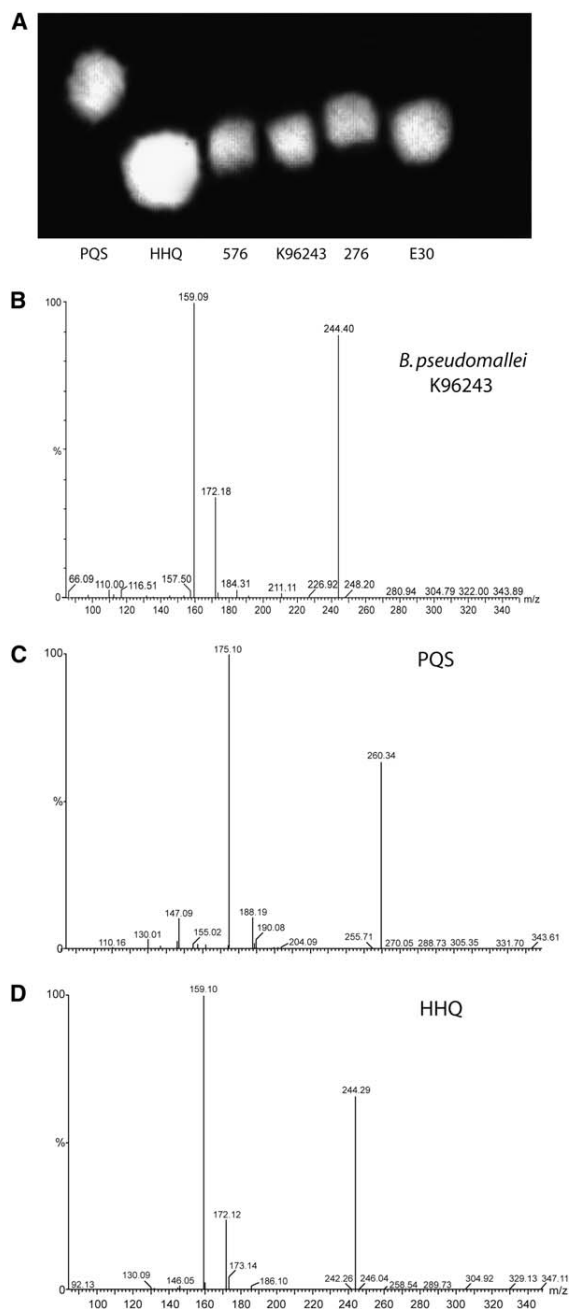


Figure 3. HHQ Is Produced by *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*
(A) TLC analysis of solvent-extracted, cell-free supernatants from *B. pseudomallei* strains 576, K96243, and 276 and *B. thailandensis* strain E30. After chromatography, the TLC plate was overlaid with PAO1 *lecA::luxΔpqsA* and viewed under a Berthold Luminograph. AHQs are visualized as bioluminescent spots.
(B) MS spectrum of a solvent-extracted culture supernatant prepared from *B. pseudomallei* K96243 showing the presence of HHQ.
(C) LC-MS/MS fragmentation pattern of PQS.
(D) LC-MS/MS fragmentation pattern of HHQ.

P. fragi, *P. diminuta*, *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. stutzeri*, *P. picketti*, *P. chlororaphis*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, or *B. anthina*.

Table 1. AHQ Molecules Identified in *B. thailandensis* E30

Saturated AHQs	[M + H] ⁺	Major Fragment Ions
C ₇ (HHQ); 2-heptyl-4(1 <i>H</i>)-quinolone	244	159, 172
C ₉ (NHQ); 2-nonyl-4(1 <i>H</i>)-quinolone	272	159, 172
C ₉ (NQNO); 2-nonyl-4 hydroxyquinoline N-oxide	288	159, 172, 186
C ₁₁ (UDHQ); 2-undecyl-4(1 <i>H</i>)-quinolone	300	159, 172
Unsaturated AHQs		
C _{7:1} (HEHQ); 2-(1-heptenyl)-4-(1 <i>H</i>)-quinolone	242	159, 172, 184
C _{9:1} (NEHQ); 2-(1-nonenyl)-4(1 <i>H</i>)-quinolone	270	159, 172, 184
C _{11:1} (UDEHQ); 2-(1-undecenyl)-4(1 <i>H</i>)-quinolone	298	159, 172, 184

The *B. pseudomallei* *hhqA* Gene Is Required for AHQ Biosynthesis—Identification of NEHQ

To demonstrate that the putative *hhq* biosynthesis operon from *B. pseudomallei* was responsible for the production of AHQs, we mutated the *hhqA* gene in *B. pseudomallei* 844 by inserting a 1026 bp internal fragment of BPSS0481 on pKNOCK-Tc into the gene. Figure 4A shows an HPLC comparison of solvent-extracted supernatants prepared from the parent strain and an *hhqA* mutant recorded at 335 nm. A compound eluting at 7.75 min was identified in the parent strain and is absent from the *hhqA* mutant. This compound possesses a similar spectral profile (212, 247, 335 nm) to HHQ (data not shown) that has characteristic absorbance peaks at 213, 231, and 315 nm. However, using these HPLC conditions, HHQ elutes at 6.5 min; therefore, these data suggest that the compound eluting at 7.75 min is not HHQ, but a related AHQ. MS/MS analysis revealed that this compound has a molecular ion of *m/z* 270 [M + H] and major fragment ions at *m/z* 172, 159, and 130 (Figure 4B). These are consistent with NEHQ (Figure 1A), which has an unsaturated C₉ alkyl side chain and has previously been identified in *P. aeruginosa* culture supernatants [22]. The position of the double bond in NEHQ is inferred from its MS data by the presence of a fragment ion at 172, assignable to 2-vinyl-4(1*H*)-quinolone arising from the loss of the C₇H₁₄ portion of the chain.

Disruption of AHQ Signaling in *B. pseudomallei* Results in Altered Colony Morphology and Increased Elastase Synthesis

To begin characterizing the QS signaling function of HHQ in *B. pseudomallei*, we investigated the effect of mutating *hhqA* on the synthesis of exoproteases, siderophores, elastase, and AHLs as well as the response to oxidative stress. Plate assays to detect siderophores and exoproteases revealed no obvious differences between the parent and *hhqA* mutant (data not shown). However, growth on LB plates revealed striking morphological differences between wild-type and *hhqA* mutant colonies. Wild-type *B. pseudomallei* colonies were typically pigmentless, rounded, and smooth-edged, with a mucoid phenotype, while the *hhqA* mutant presented with a wrinkled appearance with bacterial growth over the primary colony (Figure 5). Complementation with the *hhqA* gene restored colony morphology to

Table 2. PQS and AHQ Production in Clinical and Environmental Strains of *Pseudomonas* and *Burkholderia*

Strain	PQS	AHQ ^a	Source	Reference
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	+	+	Wound infection	Holloway collection
<i>P. aeruginosa</i> PA14	+	+	Burn wound	[39]
<i>P. mendocina</i> ATCC25411	—	—	Environmental	ATCC (American Type Culture Collection)
<i>P. aureofaciens</i> 30–84	—	—	Wheat rhizosphere	W.W. Bockus
<i>P. diminuta</i> CIP7129	—	—	Soil	Source unknown
<i>P. fluorescens</i> CHAO	—	—	Soil	[40]
<i>P. putida</i> KT2440	—	+	Biosafety strain	[41]
<i>P. syringae</i> DC3000	—	—	Tomato	[42]
<i>P. stutzeri</i> ATCC17588	—	—	Environmental	ATCC
<i>P. chlororaphis</i> PCL1391	—	—	Spanish tomato rhizosphere	[43]
<i>P. fragi</i> ATCC4973	—	—	Environmental	ATCC
<i>P. pickettii</i> ATCC27511	—	—	Soil	ATCC
<i>B. pseudomallei</i> K96243	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand	[44]
<i>B. pseudomallei</i> 576	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand	[45]
<i>B. pseudomallei</i> 10276	—	+	Clinical melioidosis isolate, Bangladesh	[45]
<i>B. pseudomallei</i> 844	—	+	Clinical melioidosis isolate, Thailand	Srinagarind Hospital, Thailand
<i>B. thailandensis</i> E30	—	+	Environmental	[46, 47]
<i>B. cenocepacia</i> J415	—	+	CF isolate	[48]
<i>B. stabilis</i>	—	—	CF isolate	[48]
<i>B. vietnamiensis</i> G4	—	—	CF isolate	[48]
<i>B. anthina</i>	—	—	Environmental soil	[49]

B. thailandensis E30 produced HHQ, NHQ, NQNO, UDHQ, HEHQ, NEHQ, and UDEHQ.

^a All AHQ-positive strains produced HHQ, except for 844, which produced NEHQ.

that of the wild-type (data not shown). The *hhqA* mutant exhibited an increase in elastase production when grown on elastin agar plates. A zone of clearing of 9.8 mm (± 1 mm) was observed for the mutant, compared to 5.3 mm (± 0.5 mm) for the wild-type and 5.4 mm (± 0.5 mm) for the complemented mutant. The enhanced elastase synthesis observed in the *hhqA* mutant could be abolished by incorporating HHQ into the elastin agar plate assay (data not shown).

B. pseudomallei possesses an AHL-based QS system that is required for full virulence [25] and is also involved

in controlling the response to oxidative stress (P.L., unpublished data). As PQS signaling has previously been shown to be integrated into the AHL-dependent QS system of *P. aeruginosa*, we wanted to determine whether mutation of the *B. pseudomallei* *hhqA* gene had any effect on AHL production and on the response of *B. pseudomallei* to oxidative stress. The *B. pseudomallei* 844 strain produces C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, and 3-hydroxy-C12-HSL (P.L., unpublished data). Analysis of the *B. pseudomallei* 844 *hhqA* mutant culture supernatant revealed that this strain produced the same spectrum of AHLs produced by the parent strain (data not shown). Furthermore, both the parent and the *hhqA* mutant were similarly susceptible to the organic hydroperoxide *tert*-butyl hydroperoxide.

Discussion

P. aeruginosa produces over 50 different AHQ molecules that exhibit diverse biological activities [4, 9–12, 18, 19]. Of these, PQS is a key QS signal molecule that regulates elastase, LecA lectin, rhamnolipid, and pyocyanin production [3, 14, 20] and enhances biofilm

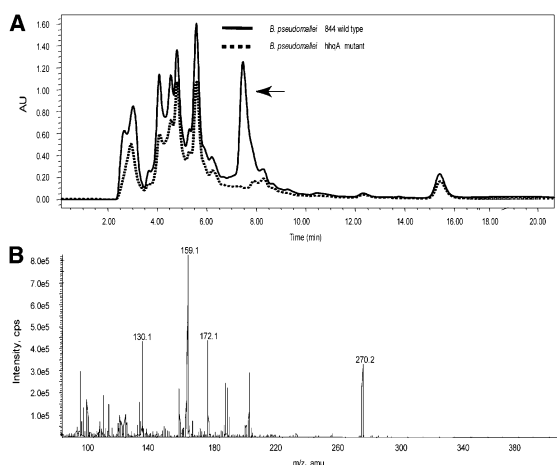


Figure 4. *B. pseudomallei* 844 Produces 2-(1-Nonenyl)-4(1H)-Quinolone, which Is Abolished in an *hhqA* Mutant

(A) HPLC analysis of solvent-extracted, cell-free culture supernatants from *B. pseudomallei* strain 844 and the corresponding *hhqA* mutant. The arrow marks the position of the major peak eluting at 7.75 min, which is lacking in the *hhqA* mutant.

(B) LC-MS/MS spectrum for the peak eluting at 7.75 min, which has a parent *m/z* 270 ion [*M* + *H*] and major daughter ions at *m/z* 172, 159, and 130, consistent with NEHQ.

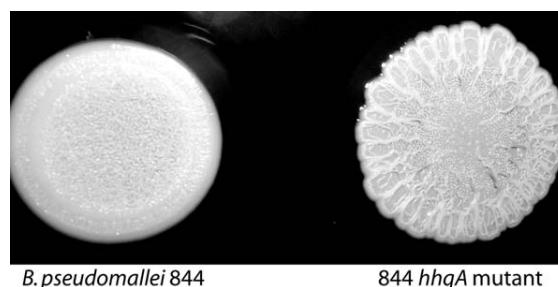


Figure 5. A *B. pseudomallei* *hhqA* Mutant Displays an Altered Colony Morphology

development [14]. A mutation in *pqsR* (*mvfR*) that positively regulates PQS biosynthesis renders *P. aeruginosa* PA14 avirulent in both plant and animal assays, with 320-fold less growth of *Arabidopsis* and a 65% reduction of mortality in mice [26]. In addition, mutation of the MexGHI-Opmd multidrug efflux pump, which results in the loss of PQS biosynthesis, also leads to the attenuation of virulence in both rat and plant experimental infection models [15]. PQS therefore plays a key role in regulating the virulence of *P. aeruginosa*, and, consequently, PQS biosynthesis and signaling are potential targets for novel antimicrobials. It was therefore of considerable interest to determine whether AHQ-dependent signaling is also employed by other bacteria.

Since AHQs are synthesized from common bacterial metabolites (anthranilate and β -keto fatty acids), and given that genes exhibiting homology with the *P. aeruginosa* *pqs* biosynthetic genes are present in related bacteria that share similar ecological niches, it is likely that AHQ signaling is employed by organisms other than *P. aeruginosa*. For bacteria such as *P. fluorescens*, *P. syringae*, and *P. fragi*, neither PQS nor HHQ, nor any other AHQs, were detected in cell-free spent culture supernatants, even though they possess genes that share some homology with *pqsA*, *pqsC*, and *pqsD*. However, these bacteria lack a complete AHQ biosynthetic operon, and the *pqs* genes are scattered throughout their respective chromosomes. Furthermore, no homolog of *pqsE*, which is required for the response to PQS in *P. aeruginosa* [14, 20, 27], could be identified in any of the genomes of sequenced strains belonging to these genera. A systematic search of completed bacterial genomes revealed that, apart from *P. aeruginosa*, only two bacterial species (*B. pseudomallei* and *B. thailandensis*) contained putative *pqsB* and *pqsE* homologs.

B. pseudomallei and the closely related *B. thailandensis* both contain a putative *pqsABCDE* operon on chromosome 2 similar to that of *P. aeruginosa*. *B. pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, an infectious disease of major public health importance in southeast Asia and northern Australia [28], and it is even found in survivors of the recent Asian tsunami [29]. It is also regarded as a potential bioterror agent [28]. There is, therefore, considerable interest in gaining new insights into the mechanisms by which virulence and persistence are regulated in *B. pseudomallei*. Here, we have obtained evidence for the functional equivalence of the *B. pseudomallei* genes corresponding to the *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* genes that are involved in the control of *P. aeruginosa* virulence via AHQ-dependent QS. This was obtained by transcomplementing the *P. aeruginosa* *pqsA* and *pqsE* mutants with the *B. pseudomallei* *hhqA* and *hhqE* genes, respectively. Both PQS and pyocyanin synthesis were restored in the *pqsA* mutant, and the production of pyocyanin and lectin was restored in the *pqsE* mutant. These data indicate that both the biosynthesis of and the response to PQS can be reestablished in *P. aeruginosa* by introducing the *hhqA* and *hhqE* genes, respectively, from *B. pseudomallei*. While PqsA is required for PQS biosynthesis in *P. aeruginosa*, the function of PqsE remains unclear, as a *pqsE* mutant produces wild-type levels of both PQS [20] and HHQ [19] but does not produce pyocyanin or the galactophilic lectin, LecA [14, 20] and makes reduced amounts of

elastase [14]. Furthermore, addition of exogenous PQS to a *P. aeruginosa* *pqsE* mutant does not restore pyocyanin, lectin, or elastase production [14], suggesting that either PqsE is required for the cellular response to PQS [20] or that PqsE is involved in generating an, as yet, unidentified signaling molecule from PQS, as the protein has structural similarities to members of the metallo- β -lactamase protein superfamily. Nevertheless, these data indicated that AHQ-dependent cell-to-cell communication was likely to be functional in *B. pseudomallei* and in other bacteria that possess homologs of the *P. aeruginosa* *pqs* biosynthetic genes.

A *P. aeruginosa* *pqsA* mutant does not make any AHQs, but when complemented with *B. pseudomallei* *hhqA*, it produces both HHQ and PQS. This finding raised the question as to the identity of the AHQ(s) synthesized in *B. pseudomallei* itself since this human pathogen does not possess a homolog of the putative monooxygenase PqsH, which is required for the conversion of HHQ to PQS (Figure 1B). This is also the case for other bacteria that possess *pqs* homologs but lack *pqsH*. To assay for AHQ biosynthesis in different bacterial genera, we developed a rapid method for screening culture supernatants that employs a *P. aeruginosa* bioreporter (to be described in detail elsewhere) that cannot synthesize AHQs as a consequence of the *pqsA* mutation, but responds to exogenously supplied AHQs that activate a chromosomally located *lecA::lux* promoter fusion. The bioreporter can be incorporated within agar and used as an overlay after TLC of the solvent-extracted culture supernatants. AHQs such as PQS and HHQ are readily identified as bioluminescent spots upon activation of the reporter. By using this bioreporter, we observed that none of the *Pseudomonas* or *Burkholderia* species examined produced PQS. However, *B. pseudomallei* strains 276, 576, and K96243, *B. thailandensis* strain E30, *B. cenocepacia* strain J415, and *P. putida* strain KT2440 all activated the reporter, and the active spot migrated on TLC with an R_f value close to that of the HHQ standard. The identity of the active compound as HHQ in *B. pseudomallei* K96243, *P. putida*, *B. thailandensis*, and *B. cenocepacia* was confirmed by LC-MS/MS. In addition, *B. pseudomallei* strain 844 and *B. thailandensis* produced NEHQ, a C9 analog of HHQ with an unsaturated alkyl side chain. Furthermore, we also identified HNQ, NQNO, UDHQ, HEHQ, NEHQ, and UDEHQ in *B. thailandensis*. These AHQs are all produced by *P. aeruginosa* [12]. It is interesting that both pathogenic (*B. pseudomallei*, *B. cenocepacia*, and *P. aeruginosa*) and nonpathogenic species (*B. thailandensis* and *P. putida*) can be AHQ producers. Furthermore, our data also show that AHQ synthesis does not only take place in bacteria where the *pqs/hhq* genes are clustered as an operon, since *P. putida* KT2440 produces HHQ, but the *hhq* homologs are scattered throughout the chromosome. This organism also lacks a readily identifiable *pqsE* homolog, suggesting that *hhqE/pqsE* may not always be required for AHQ signal transduction.

Both the complementation of a *P. aeruginosa* *pqsA* mutant with *hhqA* and the loss of AHQ synthesis upon mutation of *hhqA* unequivocally demonstrate the requirement of this gene for AHQ biosynthesis in *B. pseudomallei*. Furthermore, the loss of AHQ synthesis in *B. pseudomallei* resulted in a striking change in colony

morphology and increased elastase production, which could be reversed by providing exogenous HHQ, suggesting that AHQ signaling is involved in the control of at least two different phenotypes. The enhanced elastase production observed in the *hhqA* mutant may be due to increased levels of the *B. pseudomallei* metalloprotease, MprA [30]. Whether AHQ-dependent QS is required for the regulation of virulence in *B. pseudomallei* has yet to be established. In *P. aeruginosa*, the AHL- and AHQ-dependent signaling pathways are closely interlinked [3, 14]. *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* both possess three AHL synthases and five AHL response regulators and produce multiple AHLs [25, 31]. In *B. pseudomallei*, mutations in the AHL-dependent QS system reduced the time to death in Syrian hamsters [25], while, in *B. thailandensis*, mutation of the QS system affected several cellular processes, including lipase production, swarming, and twitching motility [31]. It is therefore possible that AHL and AHQ signaling in *B. pseudomallei*/*B. thailandensis* are also interlinked. It is interesting to note that in *B. thailandensis*, mutation of the LasR/RhlR homologous *btaR3* gene resulted in a significant wrinkled phenotype [31] similar to that observed in the *B. pseudomallei* *hhqA* mutant in this study. This suggests that AHL and AHQ signaling may constitute a regulatory cascade in these bacteria. However, examination of the AHL profile of the *hhqA* mutant revealed no obvious differences when compared with that of the parent strain. Whether *B. pseudomallei* AHL mutants show either altered colony phenotypes or AHQ levels has yet to be determined. Indeed, such a finding would imply the existence of a regulatory link between AHL and AHQ signaling in *B. pseudomallei*, such as occurs in *P. aeruginosa* [14].

In *P. aeruginosa*, HHQ is released into the external milieu by the producing cells and is subsequently taken up by neighboring bacterial cells, where it is converted into PQS [19]. The conversion of HHQ to PQS is mediated by the *pqsH*-encoded putative FAD-dependent monooxygenase [19], which is under partial AHL-dependent control via LasR/3-oxo-C12-HSL [19, 20]. HHQ has been suggested to function as a messenger molecule that is converted to PQS rather than being a signal molecule per se, since its activity was reported to depend on the conversion of HHQ to PQS [19]. However, *B. pseudomallei*, for example, lacks a *pqsH* homolog, does not synthesize PQS, and employs HHQ as a signal molecule, at least in the context of colony morphology and elastase production. This raises the question as to whether HHQ can function as a signal molecule in *P. aeruginosa* and whether the ability of the latter to convert HHQ to PQS offers an ecological advantage by conferring a novel functionality. Recent work in this laboratory has revealed that, when introduced onto the chromosome of a *P. aeruginosa* *pqsH* mutant, a *lecA::lux* gene fusion responds to exogenously supplied HHQ (unpublished data). This suggests that HHQ is able to function in *P. aeruginosa* as a signal molecule per se since the *pqsH* mutant cannot produce PQS. It is therefore possible that the oxidation of both endogenous and exogenous HHQ to PQS by *P. aeruginosa* ensures that other bacteria occupying the same ecological niche are unable to exploit PQS as a signal molecule. Since *P. aeruginosa* can respond to both AHQs, it may be able not

only to “tune in” to cell-to-cell communication between other bacterial genera, but also to interfere with such signaling. However, confirmation of this hypothesis will require extensive investigations of the response of HHQ-producing bacteria to PQS.

Significance

Cell-to-cell communication (quorum sensing) is now recognized to play a pivotal role in coordinating the physiological behavior of unicellular microorganisms with respect to secondary metabolite production, biofilm development, and virulence. Communication within and between bacterial species depends on the deployment of chemically diverse QS signal molecules. Understanding the chemical and biological bases for such signaling systems and their function and conservation within the bacterial kingdom is central to their exploitation particularly as targets for novel antibacterial agents. Using a combination of bioinformatics, bioreporters, and analytical chemistry together with bacterial genetics, we show for the first time, to our knowledge, that AHQ signaling is employed not just by *P. aeruginosa*, but also by other important human pathogens, including *B. pseudomallei*, which is responsible for the life-threatening disease melioidosis, a major public health threat in southern Asia and northern Australia. Furthermore, this organism is a concern, as it has potential uses as a bioterrorist weapon. Little is understood about the lifestyle of this dangerous organism, and, consequently, new findings, particularly those associated with virulence, are important. Our study has revealed that while the *B. pseudomallei* genes required for AHQ biosynthesis (*hhqA*) and response (*hhqE*) are functionally homologous to those of *P. aeruginosa*, the strains *B. pseudomallei*, *B. thailandensis*, *B. cenocepacia*, and *P. putida* do not produce the *P. aeruginosa* signal molecule PQS but do produce the PQS precursor, HHQ. Mutation of *hhqA* in *B. pseudomallei* resulted in the loss of AHQ production, altered colony morphology, and enhanced elastase production. These data demonstrate a role for AHQ signaling in *B. pseudomallei* and highlight the future challenges with respect to the nature of the AHQ regulon, its contribution to virulence gene regulation, and the mechanism through which AHQ signaling is transduced via HhQE/PqsE in both *B. pseudomallei* and *P. aeruginosa*.

Experimental Procedures

Bacterial Strains, Plasmids, and Growth Conditions

The strains and plasmids used in this study include the *P. aeruginosa* strains wild-type PAO1, a *pqsA* mutant [20], a *pqsE* mutant [20], and an AHQ bioreporter PAO1 *lecA::luxΔpqsA* strain (to be described elsewhere). Other strains of bacteria used in this study can be found in Table 2. For complementation studies, plasmids were transformed into *P. aeruginosa* by electroporation [32]. All bacterial strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) at either 37°C or 30°C with shaking (200 rpm) in 25 ml broth in 250 ml Erlenmeyer flasks. Carbenicillin (300 µg/ml) and tetracycline (60 µg/ml) were added to cultures where required.

DNA Isolation and Manipulation

DNA was isolated as previously described [33]. Sequence analysis and database searches were performed with the Lasergene

(DNASTar) software package and the NCBI BLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Complementation of PAO1 *pqsA* and *pqsE* Mutants by *B. pseudomallei* *hhqA* and *hhqE* Genes

Using *B. pseudomallei* chromosomal DNA isolated from strain 844, *hhqA* (BPSS0481; 1697 bp, BamHI, EcoRI) and *hhqE* (BPSS0485; 912 bp, SmaI, EcoRI) were cloned into similarly digested pUCP18 and electroporated into the relevant *P. aeruginosa* strain. Mutants containing the complementing plasmids were identified by their ability to grow in LB containing carbenicillin (300 µg/ml).

Construction of a *B. pseudomallei* *hhqA* Insertion Mutant

An *hhqA* insertion mutant was created in *B. pseudomallei* 844 by cloning a 1026 bp internal fragment of the BPSS0481 gene into pKNOC-Tc by using SmaI restriction sites [34]. The construct was conjugated into *B. pseudomallei*, and mutants were selected by their ability to grow in LB agar containing tetracycline (60 µg/ml). The fidelity of the mutation was confirmed by PCR. The *B. pseudomallei* *hhqA* mutant was complemented by introducing a plasmid-borne copy of *hhqA* cloned into pUCP18. The construct was conjugated into *B. pseudomallei* and selected on pseudomonas base agar containing 60 µg/ml tetracycline and 500 µg/ml carbenicillin.

Extraction of AHQs from *Pseudomonas* and *Burkholderia* Cultures

Aliquots of stationary phase cell-free supernatants were extracted as previously described [14]. Briefly, aliquots of 10 ml *P. aeruginosa* were extracted with 10 ml acidified ethyl acetate, vortexed vigorously, and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The organic phase was transferred to a fresh tube and dried to completion under a stream of nitrogen gas. The solute was resuspended in 50 µl methanol for future analysis. Sterile supernatants of other *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains, including *B. pseudomallei* and *B. thailandensis* cultures, were extracted in the same way, although 50 ml supernatant was extracted in 50 ml acidified ethyl acetate and resuspended in 50 µl methanol.

Synthesis of AHQs and AHLs

AHLs and AHQs were synthesized as previously described [14, 35]. Briefly, AHQs were synthesized as follows: 2-heptyl-4(1*H*)-quinolone (HHQ), m.p. 145°C–146°C, was synthesized by the acid-catalyzed cyclocondensation of ethyl 3-oxodecanoate with aniline in 50% yield. Starting from HHQ, 3-formyl-2-heptyl-4(1*H*)-quinolone, m.p. 245°C–248°C (dec.), and 2-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-quinolone (PQS), m.p. 195°C–197°C, were synthesized in 40% and 70% yields, respectively. PQS analogs were dissolved in methanol before being added to growth media at the indicated concentrations.

Thin-Layer Chromatography Analysis of AHQs with a Bioreporter Assay

Samples of ethyl acetate-extracted culture supernatants were spotted onto a normal phase silica 60_{F254} (Merck) TLC plate that had been previously soaked for 30 min in 5% w/v KH₂PO₄ and activated at 100°C for 1 hr. Synthetic HHQ and PQS (1 or 2 µl of a 10 mM stock concentration, respectively) were used as positive controls. Spots were dried, and the TLC plate was developed by using dichloromethane:methanol (95:5) as the mobile phase. TLC plates were visualized with a UV transilluminator and photographed. To confirm the presence of AHQs, TLC plates were overlaid with a thin film of 0.3% (w/v) LB agar seeded with the AHQ bioreporter PAO1 *lecA::lux::pqsA* (which responds to a range of AHQs, including PQS and HHQ, and will be described in detail elsewhere), and incubated at 37°C for 6 hr. Bioluminescence was detected with a Luminograph LB 980 photon video camera (EG and G Berthold).

HPLC and LC-MS/MS of AHQs

HPLC analysis of AHQs was conducted with a Waters 996 Photodiode Array Detector (PDA) coupled with a Waters 625 Quaternary pump, and the data were collated by using Empower software (Waters Corporation, UK). Acidified ethyl acetate extracts of cell-free culture supernatants were eluted isocratically with 80% v/v acetonitrile in water as the mobile phase and an Exsil Pure C18 MS 5 µm column (250 × 2.1 mm internal diameter; Alltech Associates, Inc.).

For LC-MS/MS, analyses were performed by using reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with an Exsil Pure C18 MS 5 µm column (250 × 2.1 mm) coupled with LC-MS/MS (Applied Biosystems 4000 Q-TRAP) and eluted with a 35%–70% w/v acetonitrile/water gradient. The fragmentation ions of each of the anticipated AHQs were monitored by using the positive ion electrospray mode.

Phenotypic Assays

For elastase production, 10 µl of an overnight culture was spotted onto nutrient agar containing 0.3% w/v elastin (Sigma) [36] with or without 20 µl of a 100 µM solution of HHQ. Plates were incubated at 37°C for 48 hr and stored at 4°C for 4 days, and the zones of clearing were measured. Siderophore activity was determined by spotting 10 µl aliquots of an overnight culture onto CAS plates that were incubated overnight at 37°C [37]. To evaluate bacterial resistance to oxidative stress, cultures were grown overnight in M9 low-glucose medium and adjusted to an OD₆₀₀ of 1.0 and 10-fold serially diluted. A total of 10 µl of each culture was spotted onto LB agar containing 150 µM *tert*-butyl hydroperoxide, and the extent of growth was noted after 24 hr of incubation at 37°C [38].

Time and Cell Population Density-Dependent Measurement of Bioluminescence

Bioluminescence was determined as a function of cell density by using a combined, automated luminometer-spectrometer (the Anthos Labtech LUCYI) as previously described [14].

Supplemental Data

Supplemental Data include Table S1, which shows *pqs* gene homologs in *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Ralstonia* species, and are available at <http://www.chembiol.com/cgi/content/full/13/7/1377> ■ ■ ■/DC1/.

Acknowledgments

This work was supported by research grants from the Biotechnology and Biological Sciences Research Council, UK (to P.W., M.C., S.P.D., and D.B.) and a Royal Golden Jubilee PhD Program from the Thailand Research Foundation (to P.L.). We would like to thank Mavis Daykin, Alex Truman, and Catherine Otori for invaluable technical support. Finally, we would like to acknowledge Mark Stevens (Institute for Animal Health, Compton, UK) for providing sterile culture supernatants of *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*.

Received: January 30, 2006

Revised: April 27, 2006

Accepted: May 1, 2006

Published: July 28, 2006

References

1. Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269–275.
2. Swift, S., Downie, J.A., Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Salmond, G.P.C., and Williams, P. (2001). Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. In *Advances in Microbial Physiology, Volume 45*, R.K. Poole, ed. (London: Academic Press), pp. 199–270.
3. Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Igilewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11229–11234.
4. Diggle, S.P., Cornelis, P., Williams, P., and Camara, M. (2006). 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 83–91.
5. Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Igilewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 197–201.
6. Pearson, J.P., Passador, L., Igilewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1995). A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by

- Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1490–1494.
7. Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., et al. (1995). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9427–9431.
8. Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. 179, 5756–5767.
9. Hays, E.E., Wells, I.C., Katzman, P.A., Cain, C.K., Jacobs, F.A., Thayer, S.A., Doisy, E.A., Gaby, W.L., Roberts, E.C., Muir, R.D., et al. (1945). Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 159, 725–750.
10. Wells, I.C., Elliott, W.H., Thayer, S.A., and Doisy, E.A. (1952). Ozonization of some antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 196, 320–330.
11. Machan, Z.A., Taylor, G.W., Pitt, T.L., Cole, P.J., and Wilson, R. (1992). 2-heptyl-4-hydroxyquinoline *N*-oxide, an antistaphylococcal agent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 30, 615–623.
12. Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., He, J.X., and Rahme, L.G. (2004). Electrospray/mass spectrometric identification and analysis of 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15, 862–869.
13. Calfee, M.W., Coleman, J.P., and Pesci, E.C. (2001). Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 11633–11637.
14. Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Camara, M., and Williams, P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol. Microbiol. 50, 29–43.
15. Aendekerk, S., Diggle, S.P., Song, Z., Hoiby, N., Cornelis, P., Williams, P., and Camara, M. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. Microbiol. 151, 1113–1125.
16. McGrath, S., Wade, D.S., and Pesci, E.C. (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). FEMS Microbiol. Lett. 230, 27–34.
17. Collier, D.N., Anderson, L., McKnight, S.L., Noah, T.L., Knowles, M., Boucher, R., Schwab, U., Gilligan, P., and Pesci, E.C. (2002). A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. FEMS Microbiol. Lett. 215, 41–46.
18. Hooi, D.S.W., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Williams, P., and Pritchard, D.I. (2004). Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. Infect. Immun. 72, 6463–6470.
19. Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J.X., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, L.G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 1339–1344.
20. Gallagher, L.A., McKnight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C., and Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 184, 6472–6480.
21. Bredenbruch, F., Nimtz, M., Wray, V., Morr, M., Muller, R., and Haussler, S. (2005). Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. J. Bacteriol. 187, 3630–3635.
22. Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., and Rahme, L.G. (2003). A stable isotope dilution assay for the quantification of the *Pseudomonas* quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Biochim. Biophys. Acta 1622, 36–41.
23. Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2003). LuxS and autoinducer-2: Their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. In Advances in Applied Microbiology, Volume 53, A.I. Laskin, J.W. Bennet, and G.M. Gadd, eds. (London: Elsevier Academic Press), pp. 291–396.
24. Schweizer, H.P. (1991). *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. Gene 97, 109–112.
25. Ulrich, R.L., DeShazer, D., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., Oyston, P.C., and Jeddalo, J.A. (2004). Role of quorum sensing in the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. J. Med. Microbiol. 53, 1053–1064.
26. Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., and Rahme, L.G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14613–14618.
27. Deziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lepine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G.P., and Rahme, L.G. (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of *N*-acyl-L-homoserine lactones. Mol. Microbiol. 55, 998–1014.
28. Cheng, A.C., and Currie, B.J. (2005). Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev. 18, 383–416.
29. Athan, E., Allworth, A.M., Engler, C., Bastian, I., and Cheng, A.C. (2005). Melioidosis in tsunami survivors. Emerg. Infect. Dis. 11, 1638–1639.
30. Lee, M.-A., and Liu, Y. (2000). Sequencing and characterization of a novel serine metalloprotease from *Burkholderia pseudomallei*. FEMS Microbiol. Lett. 192, 67–72.
31. Ulrich, R.L., Hines, H.B., Parthasarathy, N., and Jeddalo, J.A. (2004). Mutational analysis and biochemical characterization of the *Burkholderia thailandensis* DW503 quorum-sensing network. J. Bacteriol. 186, 4350–4360.
32. Smith, A.W., and Iglewski, B.H. (1989). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Nucleic Acids Res. 17, 10509.
33. Diggle, S.P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., and Camara, M. (2002). Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. J. Bacteriol. 184, 2576–2586.
34. Alexeyev, M.F. (1999). The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. Biotechniques 26, 824–828.
35. Chhabra, S.R., Harty, C., Hooi, D.S.W., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Pritchard, D.I., and Bycroft, B.W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. J. Med. Chem. 46, 97–104.
36. Ohman, D.E., Cryz, S.J., and Iglewski, B.H. (1980). Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. J. Bacteriol. 142, 836–842.
37. Schwyn, B., and Nylands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47–56.
38. Loprasert, S., Whangsuk, W., Sallabhan, R., and Mongkolsuk, S. (2004). DpsA protects the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* against organic hydroperoxide. Arch. Microbiol. 182, 96–101.
39. Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolford, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268, 1899–1902.
40. Voisard, C., Bull, C., Keel, C., Laville, J., Maurhofer, M., Schnider, U., Defago, G., and Haas, D. (1994). Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches. In Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms, F. O’Gara, D.N. Downling, and B. Boesten, eds. (Weinheim, Germany: VCH Publishers), pp. 67–89.
41. dos Santos, V.A.P.M., Heim, S., Moore, E.R.B., Stratz, M., and Timmis, K.N. (2004). Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. Environ. Microbiol. 6, 1264–1286.

42. Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., et al. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10181–10186.
43. Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P., Tichy, H.V., et al. (1998). Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1069–1077.
44. Holden, M.T.G., Titball, R.W., Peacock, S.J., Cerdeno-Tarraga, A.M., Atkins, T., Crossman, L.C., Pitt, T., Churcher, C., Mungall, K., Bentley, S.D., et al. (2004). Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14240–14245.
45. Stevens, M.P., Haque, A., Atkins, T., Hill, J., Wood, M.W., Easton, A., Nelson, M., Underwood-Fowler, C., Titball, R.W., Bancroft, G.J., et al. (2004). Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type III secretion mutant in murine models of melioidosis. *Microbiol.* **150**, 2669–2676.
46. Brett, P.J., DeShazer, D., and Woods, D.E. (1998). *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 317–320.
47. Woods, D.E., Jeddeloh, J.A., Fritz, D.L., and DeShazer, D. (2002). *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a temperate bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. *J. Bacteriol.* **184**, 4003–4017.
48. Mahenthiralingam, E., Coenye, T., Chung, J.W., Speert, D.P., Govan, J.R.W., Taylor, P., and Vandamme, P. (2000). Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 910–913.
49. Vandamme, P., Henry, D., Coenye, T., Nzula, S., Vancanneyt, M., LiPuma, J.J., Speert, D.P., Govan, J.R.W., and Mahenthiralingam, E. (2002). *Burkholderia anthina* sp. nov., and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **33**, 143–149.

Accession Numbers

The *hhqA* gene from *Burkholderia pseudomallei* K29643 has been deposited in GenBank under ID code 823560.