สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนพัฒนานักวิจัย ปี ๒๕๔๗

การศึกษาระบบ Quorum Sensing ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

สัญญาเลขที่ RSA 4780017

โดย รศ. นพ. มงคล คุณากร

๓๐ พฤศจิกายน ๒๕๕๐

สัญญาเลขที่ RSA 4780017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการทุนพัฒนานักวิจัย ปี ๒๕๔๗

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 *bpsIR*	6
การทำ PCR, cloning, และ sequencing ยีน *bpsIR*	8
การวิเคราะห์ Sequences ของโปรตีน BpsIR โดยการ alignment	10
การสร้าง *bpsIR*-knockout mutants	13
การพิสูจน์ AHL ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei*	18
ความสัมพันธ์ระบบ *bpsIR* กับการสร้างโปรตีน DpsA และการทนต่อ oxidative stress	19
ความสัมพันธ์ระบบ *bpsIR* กับสามารถในการเข้าเซลและอยู่รอดในเซล	25
Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) Quorum Sensing System	27
Genome blast: พบ *hhqABCDE*	29
การวิเคราะห์ Sequences ของโปรตีน HhqABCDE โดยการ alignment	30
การทำ PCR, cloning, และสร้าง knockout mutant ของ ยีน *hhqA*	33
พิสูจน์ functional homologue ของยีน *hhqA*	33
การพิสูจน์ AHQ ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei*	36
การเปรียบเทียบ phenotypes ของ *hhqA*-knockout mutant กับ wildtype	43
Output ที่ได้จากโครงการ	
สรุปสิ่งที่ได้ค้นพบ	47
ผลงานตีพิมพ์	48
ภาคผนวก	49
Reprint	

สัญญาเลขที่ RSA 4780017

โครงการ: การศึกษาระบบ Quorum Sensing ของเชื้อ *Burkholderia pseudomallei*

รายงานฉบับสมบูรณ์

บทคัดย่อ

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคเมลิออยโดซิส เมื่อติดเชื้อเฉียบพลัน ก็มีความรุนแรง และยังแสดงการติดเชื้อเรื้อรัง เหมือนเชื้อวัณโรค โดยเชื้อสามารถมีชีวิตรอดภายในเซล phagocyte งานวิจัยนี้ศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงของเชื้อ เช่น virulence factors และกลไกที่ทำให้เชื้ออยู่รอดในเซลได้ โดยศึกษาระบบควบคุมการแสดงออกของยีน โดยการรับรู้ความหนาแน่นของหมู่คณะตน (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 ได้นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ *bpsIR* แสดงให้เห็นว่ายีน *bpsR* มีส่วนสำคัญในการทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดภายในเซล 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 โคโลนีของเชื้อที่ถูก knockout ยีน *hhq*A เหี่ยวย่นมากกว่าโคโลนีของ wild type และสาร HHQ เป็น negative regulation ของ elastase แต่การขาดยีน *hhqA* ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ hemolysin, exoproteases, และ siderophores การเข้าใจกลไกของตัวเชื้อ *B. pseudomallei* ทำให้เข้าใจถึงกลไกพยาธิสภาพของโรคเมลิออยโดซิสมากขึ้น 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 และ 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 *hhq*A-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 เมื่อติดเชื้อในคนทำให้เกิดโรคเมลิออยโดซิส เชื้อนี้มีลักษณะที่พิเศษกว่าเชื้ออื่น คือเมื่อเป็นลักษณะติดเชื้อเฉียบพลัน ก็มีความรุนแรง เกิด gram negative septic shock ที่รุนแรงกว่าเชื้อ gram negative ตัวอื่นๆ ทำให้เสียชีวิตในเวลารวดเร็ว แต่ทว่าเชื้อนี้ยังสามารถแสดงลักษณะเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง โดยสามารถมีชีวิตรอดภายในเซล phagocyte เหมือนเชื้อวัณโรค และทำให้เกิด granulomatous inflammation ได้เช่นเดียวกัน การศึกษานี้ พยายามศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกในด้านต่างๆของเชื้อ เช่น virulence factors และกลไกที่ทำให้เชื้ออยู่รอดในเซลได้ 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* โดยการทำ PCR โคลนนิ่งยีน ทำ sequencing และ ทำ alignment เปรียบเทียบกับยีน homologue อื่น พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน
2. ได้สร้างเชื้อกลายพันธ์ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน *bpsI, bpsR* และ *bpsIR* รวมทั้งสร้างเชื้อที่มีการทดแทน (complement) ยีนดังกล่าวด้วยยีนที่อยู่ในพลาสมิด เพื่อใช้ในการศึกษาบทบาทของยีน
3. พิสูจน์ชนิดของ AHL autoiducer ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* รวมทั้ง พิสูจน์ว่าชนิดของ autoiducerที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI
4. พิสูจน์ความสัมพันธ์ของระบบ AHL quorum sensing BpsIR กับการทนต่อ oxidative stress โดยเฉพาะพิสูจน์ว่าการแสดงออกของโปรตีน DpsA ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อ oxidative stress ได้นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ *bpsIR*
5. แสดงให้เห็นว่ายีน *bpsR* มีส่วนสำคัญในการทำให้แบคทีเรียมีชีวิตอยู่รอดภายในเซล 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) ได้ สร้างได้แต่ตัวสารตั้งต้นของ PQS คือ สาร Heptyl Hydro Quinolone (HHQ) จึงตั้งชื่อยีนที่พบในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่า *hhqABCDE*

2. พิสูจน์การสร้างสาร AHQ ของเชื้อแกรมลบ สายพันธ์ต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างที่หลากหลาย
3. ทำ PCR โคลนนิ่ง และ หา sequence ของยีน *hhqA* ในเชื้อ *B. pseudomallei* รวมทั้งได้สร้างเชื้อกลายพันธ์ *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. โคโลนีของสายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A มีลักษณะเหี่ยวย่นมากกว่าโคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธ์ wild type อย่างชัดเจน
    5.2. สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A 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 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเมลิออยโดซิส (melioidosis) พบเชื้อตัวนี้ในบริเวณที่มีการระบาดของโรคในประเทศทางแถบเอเชียอาคเนย์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากดินและแหล่งน้ำนิ่งในบริเวณที่เกิดการระบาดของโรค การติดเชื้อ acute septicemic melioidosis มีอาการแสดงที่มีความรุนแรงกว่าเชื้อแกรมลบอื่นๆ ผู้ป่วยจะช็อคและเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว นอกจากนี้ ภายหลังจากได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกาย อาจเป็นการติดเชื้อแบบไม่มีอาการแล้วเป็นเวลาหลายสิบปี แล้วจึงเริ่มแสดงอาการ ซึ่งแสดงถึงสภาวะแอบแฝง (dormant state) ของเชื้อ โดยที่เชื้อนี้สามารถมีชีวิตแบ่งตัวได้ภายในเซลหลังจากถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน

กลไกสำหรับควบคุมการแสดงออกของเชื้อเมลิออยโดสิส มีระบบในเซลแบคทีเรียที่ใช้สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนเมื่อมีความหนาแน่นของเชื้อสูง เรียกว่าระบบรับรู้หมู่คณะ (quorum sensing) โดยการ ปล่อยสารที่เรียกว่า autoindecer ออกมานอกเซลอยู่ตลอดเวลา เมื่อสารดังกล่าวสะสมจนมีความเข้มข้นพอ ก็จะไปจับกับ transcription activator เพื่อเปิดการแสดงออกของยีนที่ต้องการได้ ซึ่งในเชื้อแบคทีเรียต่างๆระบบนี้เป็นระบบที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของ 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 vietnamensis* (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 แต่ดูคล้าย RpoS กลับถูกควบคุมโดยระบบ quorum sensing (14) ดังนั้นการศึกษาระบบ quorum sensing จึงเป็นสิ่งน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง

<u>เอกสารอ้างอิงสำหรับหน้านี้</u>

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., Lestrate, 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 Fogliono, 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 vietnamiensis. 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. Flavier, 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* โดยการสร้างเชื้อกลายพันธ์ของระบบ quorum sensing โดยได้แยกการศึกษาเป็นระบบ quorum sensing 2 ระบบใหญ่ๆคือ

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

Acyl Homoserine Lactone (AHL) Quorum Sensing System

<u>การอธิบายลักษณะยีนของระบบ AHL quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei*</u>

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

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

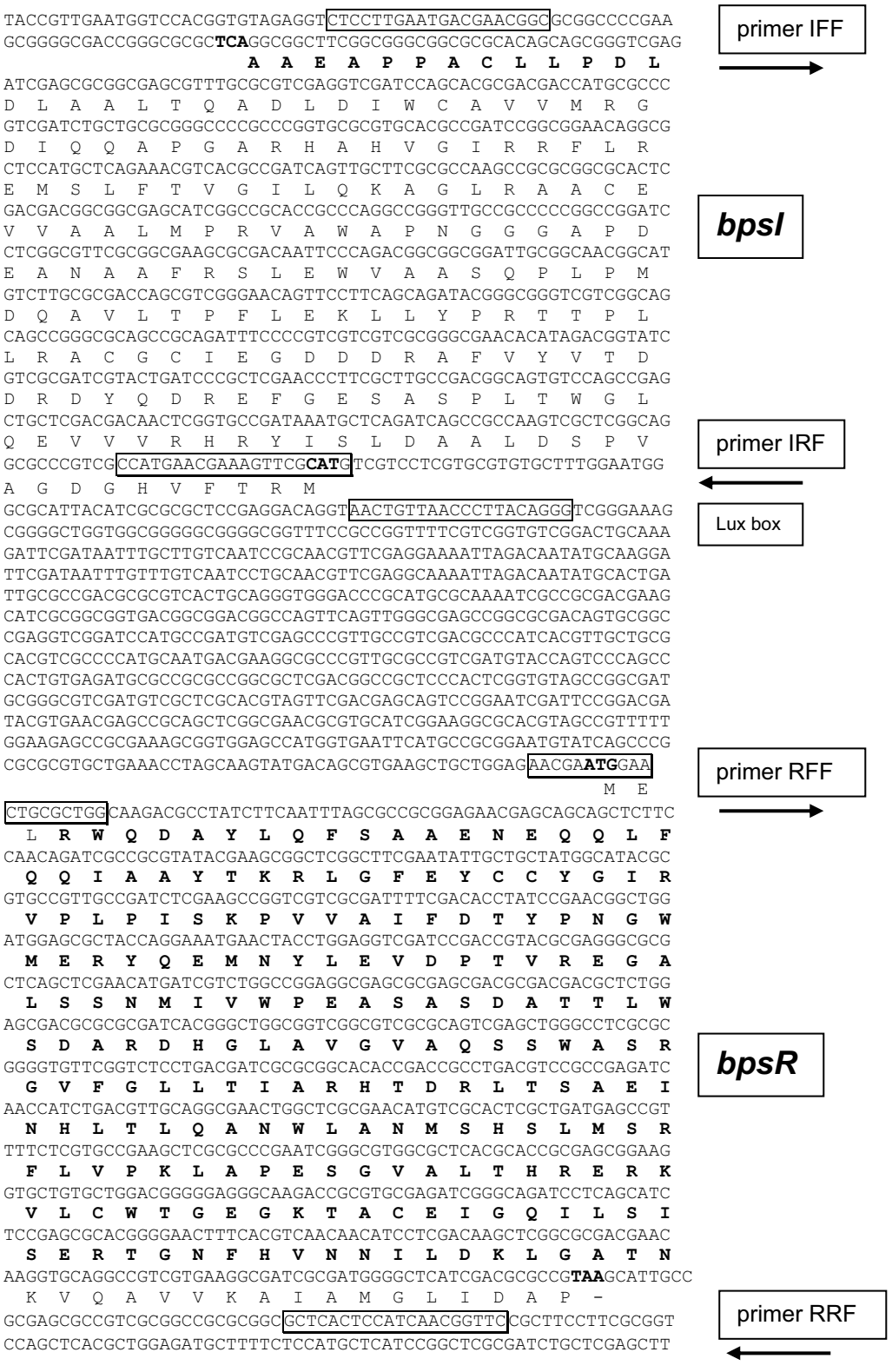
ได้ทำสายพันธ์ knockout และ สายพันธ์ complements ของระบบยีนดังกล่าวแล้ว

ได้ทำการศึกษา autoiducer ของเชื้อ *B. pseudomallei* และ พิสูจน์ autoiducerที่สร้างด้วยโปรตีน BpsI

<u>การสืบค้นจาก</u> <u>Genome database</u>

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

ยีน *bpsI* มีความยาว 612 คู่เบส เป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับสร้างโปรตีนขนาดยาว 204 กรดอมิโน บริเวณโปรโมเตอร์ก่อนจุดเริ่มต้นของยีน *bpsI* มีรหัสของ lux box ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ยีนนี้ถูกควบคุมด้วยระบบ quorum sensing ตามปรกติของยีนที่สร้าง auto inducer ซึ่งจะควบคุมตัวเองผ่าน lux box นี้ ส่วนยีน *bpsR* มีความยาว 720 คู่เบส สำหรับสร้างโปรตีนขนาดยาว 240 กรดอมิโน ยีนทั้งสองหันมีจุดเริ่มต้นที่ตั้นด้วย intergenic region ขนาด 801 คู่เบส แล้ว transcribe ออกไปจากกัน (โปรดดูรูป) รหัสพันธุกรรมและการเรียงตัวของกรดอมิโนของยีนทั้งสองได้แสดงไว้ในรูปต่อไปนี้ ในรูปได้แสดง primer ที่จะไว้ใช้ในการทำ PCR เพื่อนำยีนทั้งสองมาใช้ศึกษาต่อไป

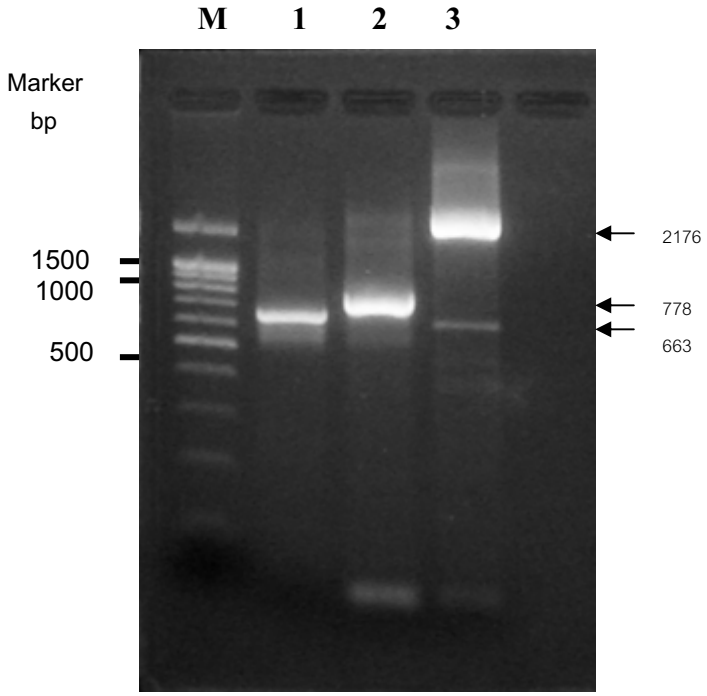

primer IFF
bpsI
primer IRF
Lux box
primer RFF
bpsR
primer RRF

การทำ PCR, cloning, และ sequencing

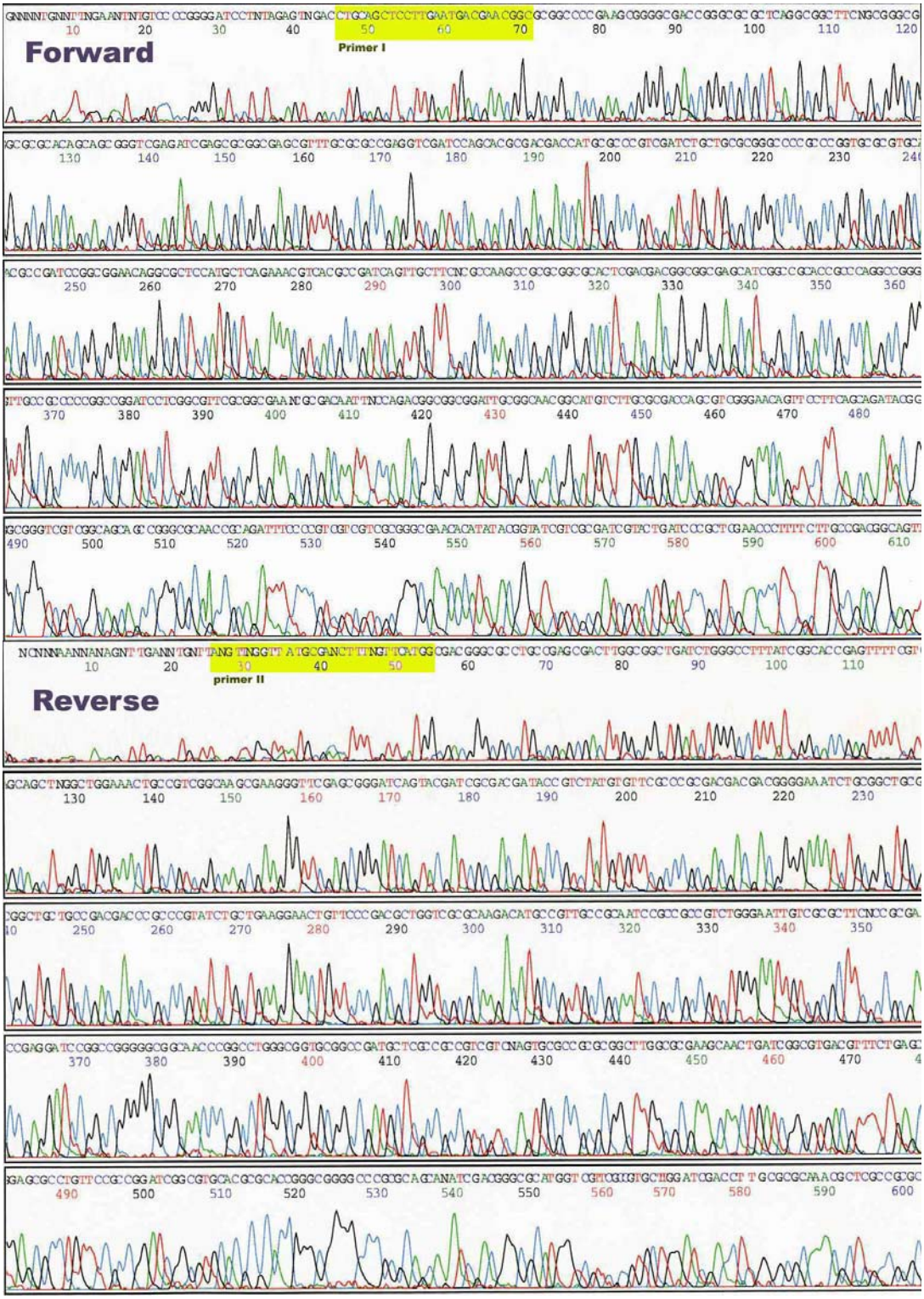
PCR primers สำหรับ *bpsI* คือ

primer IFF 5′-**CTGCAG**CTCCTTGAATGACGAACGGC-3′

และ primer IRF, 5′-**AAGCTT**CATGCGAACTTTCGTTCATGG-3′ PCR primers สำหรับ *bpsR* คือ primer RFF 5′-**AAGCTT**AACGAATGGAACTGCGCTGG-3′ และ primer RRF 5′-**CTGCAG**GAACCGTTGATGGAGTGAGC-3′ (รูปก่อนหน้านี้) ในการสั่งสังเคราะห์ primers ได้มีการเพิ่มรหัสสำหรับให้ถูกตัดได้ด้วย restriction endonuclease *Hind*III และ*Pst*I เข้าไปที่ปลายด้าน 5' (ตัวหนา) เพื่อให้สามารถนำดีเอ็นเอไปโคลนเข้าพลาสมิด pUC19 ได้โดยสะดวก PCR ทำโดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ 844 ได้ PCR products ของ *bpsI* ขนาด 663 bp (ช่อง 1), ของ *bpsR* 778 bp (ช่อง 2) และชิ้นดีเอ็นเอที่มีทั้งสองยีนโดยใช้ primers I และ IV ขนาด 2,176 bp (ช่อง 3)



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


Forward
Primer I
Reverse
primer II

การวิเคราะห์ Sequences โดยการ alignment

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

BpsI

```
                *         20         *         40         *         60
844.     : MRTFVHGDGRLPSDLAAGLSLYRHRVFVEQLGWKLPSASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDGEICGCAR :  69
k96243.  : MRTFVHGDGRLPSDLAADLSIYRHRVVVEQLGWTLPSASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDGEICGCAR :  69
KHW.     : MRTFVHGDGRLPSDLAADLGLYRHRVFVEQLGWKLPSASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDGEICGCAR :  69
           MRTFVHGDGRLPSDLAAdLs6YRHRVfVEQLGWkLPSASEGFERDQYDRDDTVYVFARDDDGEICGCAR

           *         80         *        100         *        120         *         1
844.     : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNLAWAVRPMLAAVVECAARLGA : 138
k96243.  : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMLAAVVECAARLGA : 138
KHW.     : LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNPAWAVRPMLAAVVECAARLGA : 138
           LLPTTRPYLLKELFPTLVAQDMPLPQSAAVWELSRFAANAEDPAGGGNpAWAVRPMLAAVVECAARLGA

           40         *        160         *        180         *        200
844.     : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRTGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAEAA : 203
k96243.  : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRAGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAEAA : 203
KHW.     : KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRAGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAEAA : 203
           KQLIGVTFLSMERLFRRIGVHAHRaGPAQQIDGRMVVACWIDLDAQTLAALDLDPLLCAPPAEAA
```

BpsR

```
                *         20         *         40         *         60
KHW.     : MELRWQDAYLQFSAAENEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTYPNGWMERYQEM :  69
844.     : MELRWQDAYLQFSAAENEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTYPNGWMERYQEM :  69
k96243.  : MELRWQDAYLQFSAAENEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTYPNGWMERYQEM :  69
           MELRWQDAYLQFSAAENEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFDTYPNGWMERYQEM

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

           40         *        160         *        180         *        200
KHW.     : SAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHRREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
844.     : SAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHRRKVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
k96243.  : SAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHRREVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV : 207
           SAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHRReVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTV

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

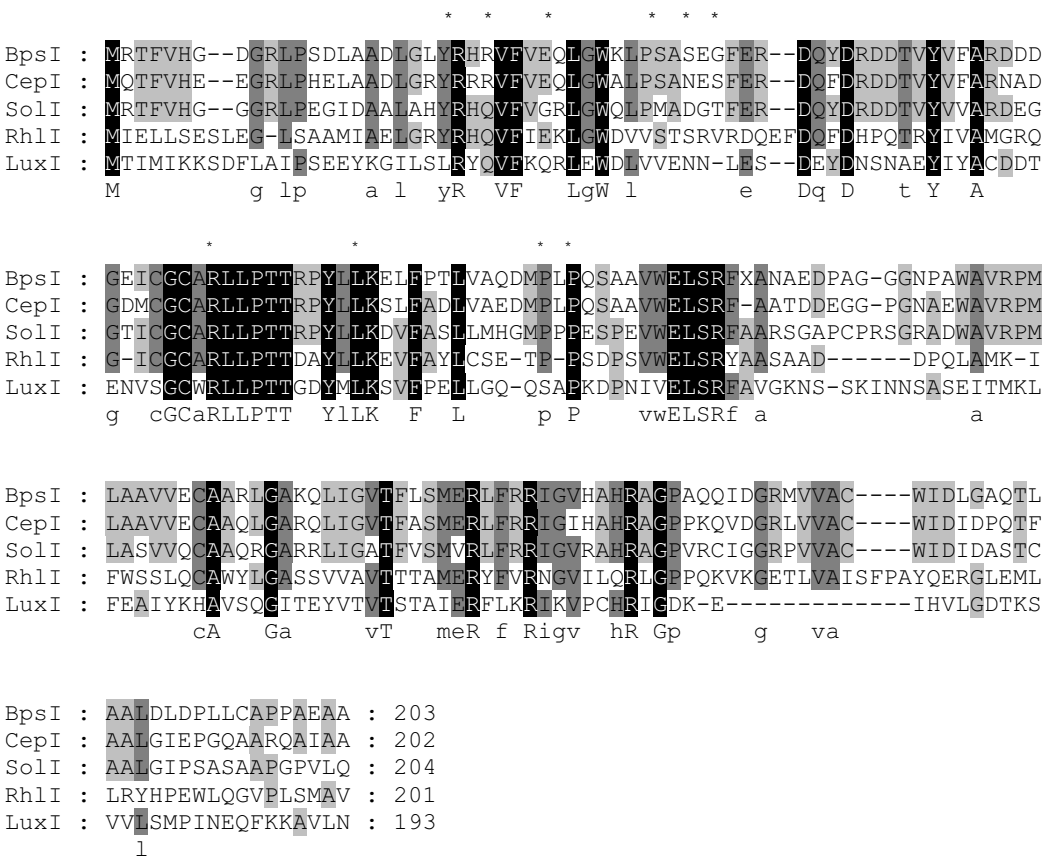
โปรตีน BpsI และ BpsR ของเชื้อ *B. pseudomallei* ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธ์ มีความเหมือนกันมากดังแสดงในตารางต่อไปนี้

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. solanacearu* 75%, เหมือนกับ โปรตีน RhlI ของเชื้อ *P. aeruginosa* 60%, และ เหมือนกับ โปรตีน LuxI ของเชื้อ *V. fischeri* 51% ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปต่อไปนี้



ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำรหัสโปรตีน BpsR ของเชื้อ *B. pseudomallei* ไปเปรียบเทียบกับโปรตีนตระกูลเดียวกัน (LuxR homologue) ของเชื้ออื่นๆ ได้ผลว่า โปรตีน BpsR มีความเหมือนกับ โปรตีนCepR ของเชื้อ *B. cepacia* 88%, เหมือนกับ โปรตีน SolR ของเชื้อ *R. solanacearu* 81%, เหมือนกับ โปรตีน RhlR ของเชื้อ *P. aeruginosa* 52%, และ เหมือนกับ โปรตีน LuxR ของเชื้อ *V. fischeri* 46% ดังแสดงการเปรียบเทียบในรูปต่อไปนี้ ตำแหน่งที่สีเข้มสุดเป็นตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์ในทุกโปรตีนที่นำมาเปรียบเทียบ

```
BpsR : MELR-----WQDAYL---QFSAAENEQQLFQQIAAYTKRLGFEYCCYGIRVPLPISKPVVAIFD
CepR : MELR-----WQDAYQ---QFSAAEDEQQLFQRIAAYSKRLGFEYCCYGIRVPLPVSKPAVAIFD
SolR : MEPD-----FQDAYH---AFRTAEDEHQLFREIAAIARQLGFDYCCYGARMPLPVSKPAVAIFD
RhlR : MRNDGGFLLWWDGLRS--EMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLGFDYYAYGVRHTIPFTRPKTEVHG
LuxR : MKNIN----ADDTYRIINKIKACRSNNDINQCLSDMTKMVHCEYYLLAIIYPHSMVKSDISILD
       M          D y              f         lgf Y  yg r p p  kp   i d

BpsR : TYPNGWMERYQEMNYLEVDPTVREGALSSNMIVW----PEASASDATTLWSDARDHGLAVGVAQ
CepR : TYPDGWMAHYQAQNYIEIDSTVRDGALNTNMIVW----PDVDRIDPCPLWQDARDFGLSVGVAQ
SolR : TYPAGWMQHYQASGFLDIDPTVRAGASSSDLIVW----PVSIRDDAARLWSDARDAGLNIGVAR
RhlR : TYPKAWLERYQMQNYGAVDPAILNGLRSSEMVVW----SDSLFDQSRMLWNEARDWGLCVGATL
LuxR : NYPKKWRQYYDDANLIKYDPIVDYSNSNHSPINWNIFENNAVNKKSPNVIKEAKTSGLITGFSF
       tYP  W   Yq  n    Dp v  g      ivW             lw  Ard GL  G

BpsR : SSWASRGVFGLLTIAR-HTDRLTSAEINHLTLQANWLANMSHSLMSRFLVPKLAPESGVALTHR
CepR : SSWAARGAFGLLSIAR-HADRLTPAEINMLTLQTNWLANLSHSLMSRFMVPKLSPAAGVTLTAR
SolR : SSWTAHGAFGLLTLAR-HADPLTAAELGQLSIATHWLANLAHTLMSPFLVPQLVPESNAVLTTR
RhlR : PIRAPNNLLSVLSVAR-DQQNISSFEREEIRLRLRCMIELLTQKLTDLEHPMLMSNP-VCLSHR
LuxR : PIHTANNGFCMLSFAHSEKDNYIDSLFLHACMNIPLIVPSLVDNYRKINIANNKSNN--DLTKR
               fg L  Ar   d     e                        p l       Lt R

BpsR : ERKVLCWTGEGKTACEIGQILSISERTGNFHVNNILDKLGATNKVQAVVKAIAMGLIDAP----
CepR : DREVLCWTAEGKTACEIGQILSISERTVNFHVNNILEKLGATNKVQAVVKAISAGLIEAP----
SolR : EREVLCWTGEGKTAYEIGQILRISERTVNFHVNNVLLKLAATNKVQAVVKAIATGLI-------
RhlR : EREILQWTADGKSSGEIAIILSISESTVNFHHKNIQKKFDAPNKTLAAAYAAALGLI-------
LuxR : EKECLAWACEGKSSWDISKILGCSERTVTFHLTNAQMKLNTTNRCQSISKAILTGAIDCPYFKN
       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** ซึ่งแทบจะเหมือนกับ lux box ของยีน *cepI* ตารางต่อไปนี้ แสดงการเปรียบเทียบ lux box ของยีน *luxI*, *cepI*, *soll* and *RhlI* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน ตำแหน่งที่มีดาว⋆ แสดงถึงตำแหน่งที่มีความอนุรักษ์

```
luxI: ACCTGTAGGATCGTACAGGT
bpsI: CCCTGTAAGGGTTAACAGTT
cepI: CCCTGTAAGAGTTACCAGTT
solI: CCCTGTCAATCCTGACAGTT
RhlI: CCCTACCAGATCTGGCAGGT
       ***           *** *
```

การศึกษาบทบาทหน้าที่ของระบบ quorum sensing ต่อการแสดงออกของยีนต่าง ๆ เพื่ออธิบายลักษณะของบทบาทของระบบ quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยการสร้างเชื้อกลายพันธ์ของระบบ quorum sensing

การสร้างเชื้อกลายพันธ์ของระบบ quorum sensing

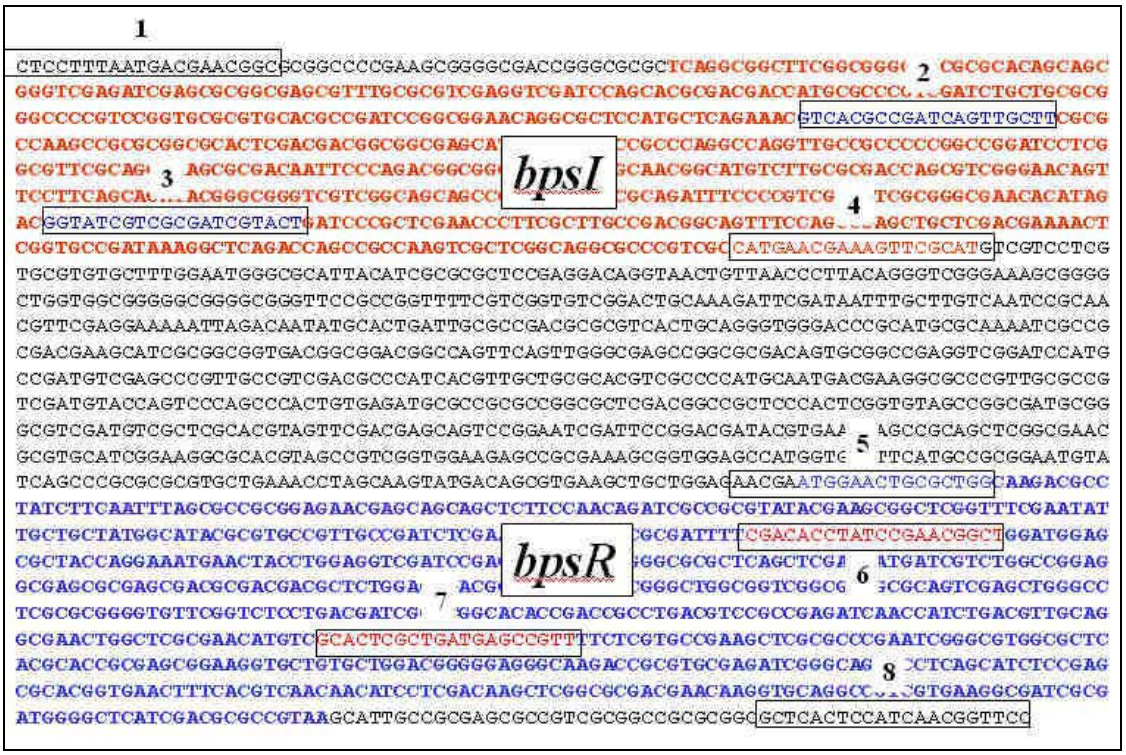
การสร้างเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ที่ไม่ให้มีการมีการแสดงออกของยีนในระบบ quorum sensing โดยสร้างสายพันธ์ที่เป็น knock-out mutant ทำโดยใช้ พลาสมิด pKnock ซึ่งเมื่อต้องการ knock-out ยีนใด ก็เพียงทำ PCR ชิ้น DNA ยีนนั้นแล้วแทรกลงไปใน cloning site ของ pKnock ต่อไปใช้ *E. coli* S17-1 λ*pir* เป็นตัว conjugate pKnock ที่มียีนที่ต้องการ ลงไปไปใน *B. pseudomallei* ซึ่งจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนโดยวิธี crossing over ระหว่างโครโมโซมของ *B. pseudomallei* กับ pKnock-Tc (สำหรับเลือกด้วยยา tetracyclin) ผลที่ได้ในโครโมโซมของ *B. pseudomallei* จะมีส่วนของพลาสมิด pKnock-Tc แทรกเข้าไปอยู่ในยีนที่เราต้องการ ทำให้เกิดสายพันธ์ที่เป็นยีน knock-out ได้ ในการศึกษานี้ เราได้ สร้างสายพันธ์ ที่เป็นยีน knock-out มา 3 มา 3 ชนิด ตามชิ้น DNA PCR ที่แสดงไว้ในหน้า 5 ได้แก่ สายพันธ์ที่เป็นยีน knock-out ของ *bpsI, bpsR,* และ double knock-out ทั้ง *bpsI* และ *bpsR* โดยสายพันธ์ PKI5 เป็นสายพันธ์ *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 คัดกรองโดยด้วยเพลทที่มี pseudomonas base agar เสริมด้วย tetracycline 60 μg ml^{-1} จึงได้ สายพันธ์ PKI5 มา

สายพันธ์ PKR7 เป็นสายพันธ์ *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 μg ml^{-1} จึงได้ สายพันธ์ PKR7 มา

สายพันธ์ KBIR5 เป็นสายพันธ์ที่เป็น double knock-out ทั้ง *bpsI* และ *bpsR* ทำโดยนำพลาสมิด pKBR ไป conjugate เข้าไปในสายพันธ์ PKI5 ทำการ คัดกรองโดยด้วยเพลทที่มี pseudomonas base agar เสริมด้วยทั้ง tetracycline 60 μg ml^{-1} และ chloramphenicol 40 μg ml^{-1} จึงได้ สายพันธ์ KBIR5 มา

ทำการพิสูจน์ สายพันธ์ 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 สายพันธ์ PKI5 มี *bpsIp*::pknock-Tc plasmid แทรกเข้าไปในยีน *bpsI* ทำให้ได้ PCR product ขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 2589 bp+612 bp ตามคาด สายพันธ์ PKR75 มี *bpsR*p::pknock-Cm plasmid แทรกเข้าไปในยีน *bpsR* ทำให้ได้ PCR product ขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 2186 bp+720 bp ตามคาด ในขณะที่สายพันธ์ KBIR5 ทั้งยีน *bpsI* และ *bpsR* มีขนาดเพิ่มขึ้นทั้งสองยีน



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′-AAGCTTCATGCGAACTTTCGTTCATGG-3′)

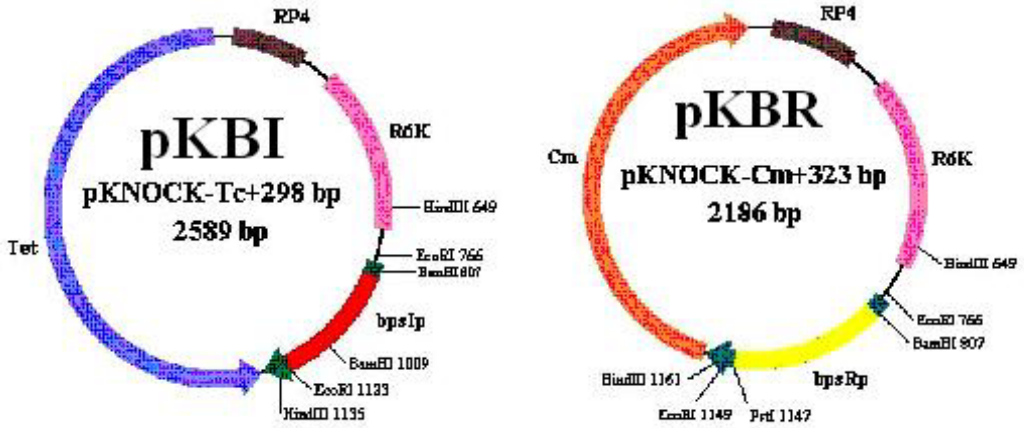
5: RFF (5′-AAGCTTAACGAATGGAACTGCGCTGG-3′)

6: RFP (5′-CGACACCTATCCGAACGGCT-3′)

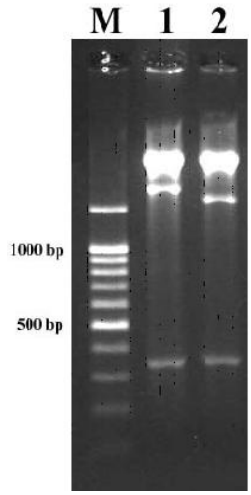
7: RRP (5′-AACGGCTCATCAGCGAG TGC-3′)

8: RRF (5′-CTGCAGGAACCGTTGATGGAGTGAGC-3′)

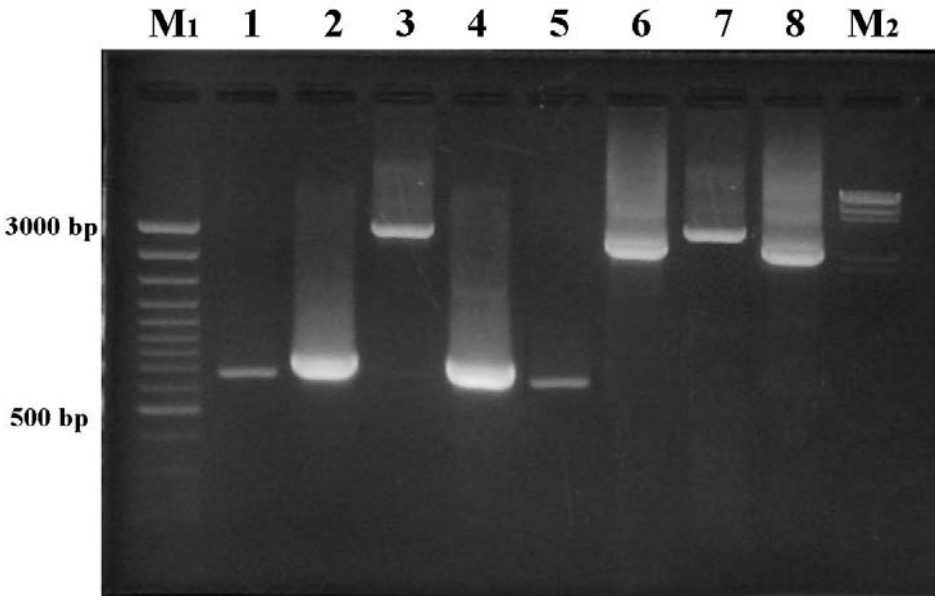
pKBI: ***bpsI*p gene on pknock-Tc** pKBR**: *bpsR*p gene on pknock-Cm**



<u>รูป pKNOCK</u> แสดง พลาสมิด pKnock ที่เติมยีน bpsI และ bpsRที่ต้องการ knockout เข้าไป กลายเป็น pKBI และ pKBR



<u>รูป</u> แสดง พิสูจน์พลาสมิด pKBI (lane 1) เมื่อตัดด้วย EcoR1 ได้ ชิ้นส่วน 2232 bp และ 357 bp ตามคาด และ พิสูจน์พลาสมิด pKBR (lane 2) เมื่อตัดด้วย EcoR1 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*

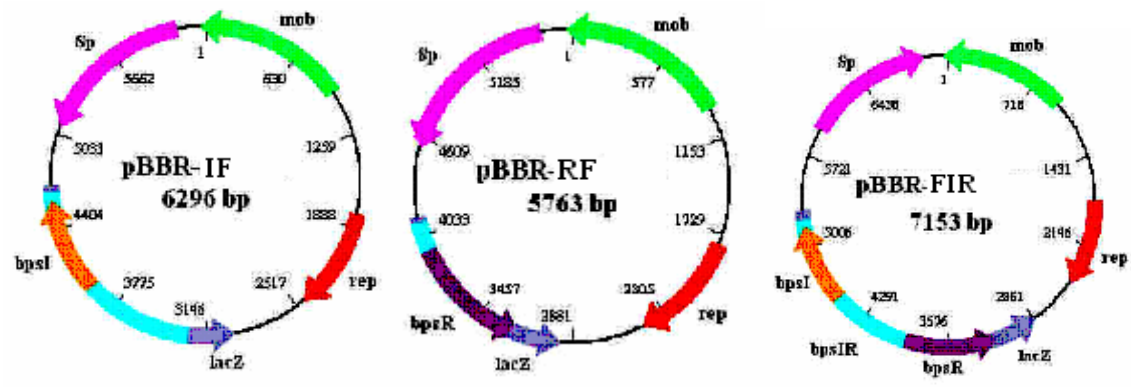
Lane 5: PKR7 *bpsI* Lane 6: PKR7 *bpsR*

Lane 7: KBIR5 *bpsI* Lane 8: KBIR5 *bpsR*

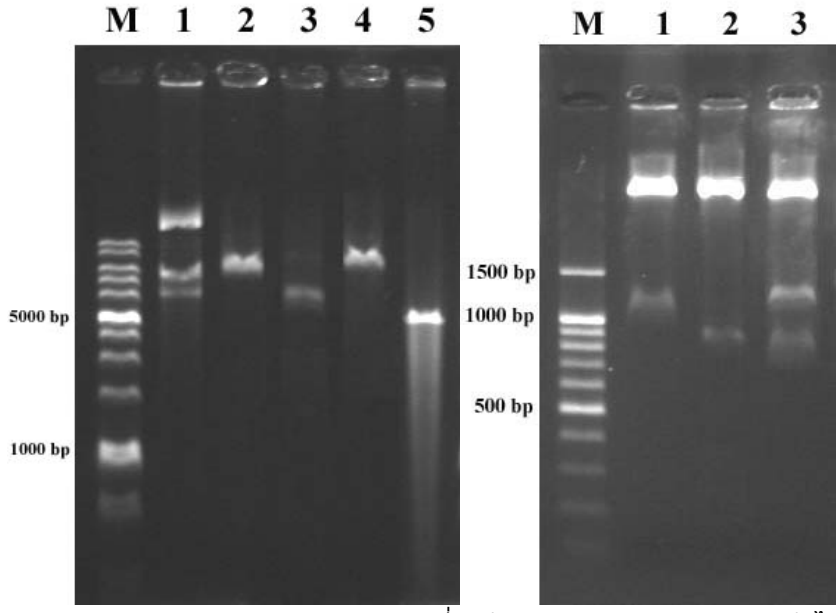
<u>การทำให้เชื้อกลายพันธ์ของระบบ quorum sensing ครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไป</u>

สายพันธ์ 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. **รูป**ขวา 2% gel แสดงพลาสมิดที่ถูกตัดด้วย PstI และ EcoRI เลน 1 pBBR-IF, เลน 2 pBBR-RF, เลน 3 pBBR-FIR

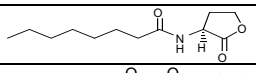
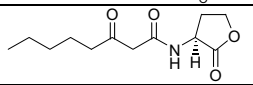
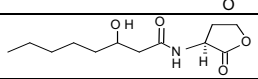
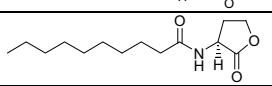
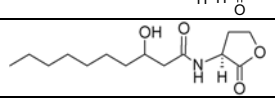
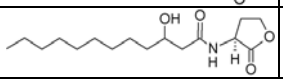
Complemented strains

นำพลาสมิด pBBR-IF, pBBR-RF, pBBR-FIR ใส่ไปในสายพันธ์ PKI5, PKR7, และ KBI5 ตามลำดับ ได้เชื้อกลายพันธ์ knockout ของระบบ quorum sensing ครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไป และจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป นอกจากนี้ พลาสมิด pBBR-IF ยังถูกนำไปใส่ใน *E. coli* DH5α เพื่อใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์ Acyl Homoserine Lactone โดย BpsI ด้วย

การศึกษาลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ดั้งเดิม เปรียบเทียบกับที่ถูก knockout

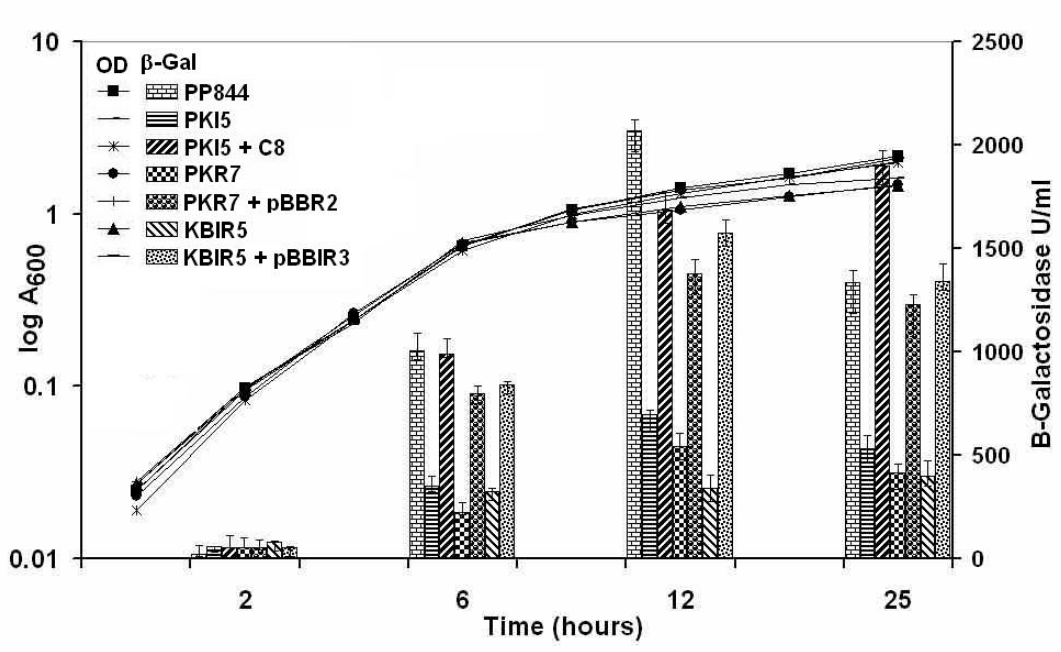
การศึกษา Acyl Homoserine Lactone ที่สร้างจากเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ดั้งเดิม เปรียบเทียบกับที่ถูก knockout

น้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธ์ต่างๆถูกสกัดด้วย 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 สายพันธ์ดั้งเดิม 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* ส่วนสายพันธ์ 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* DH5α ที่มี พลาสมิด pBBR-IF มาสกัดด้วย ethyl acetate และวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS ก็พบแต่ C8-HSL เท่านั้น ผลการวิเคราะห์ สรุปแสดงในตารางต่อไปนี้ แสดงว่า C8-HSLสร้างโดย BpsI อย่างแน่นอน และเป็นไปได้ว่า 3-oxo-C8-HSL สร้างโดยการทำงานร่วมกันของ BpsI และ autoinducer synthase ตัวอื่น ในเชื้อ *B. pseudomallei*

AHL		*m/z*	Retention time (min)	Principle fragment ions	844 (wild type)	PKI5 (*bpsI*-)	PKR7 (*bpsR*-)	*E. coli* (*bpsI*+)
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	+	+	+	-

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ BpsI และ BpsR กับการสร้างโปรตีน DpsA ของเชื้อ *B. pseudomallei* ซึ่งปกป้องแบคทีเรียจากภาวะที่เป็นอันตรายจาก Oxidative Stress</u>

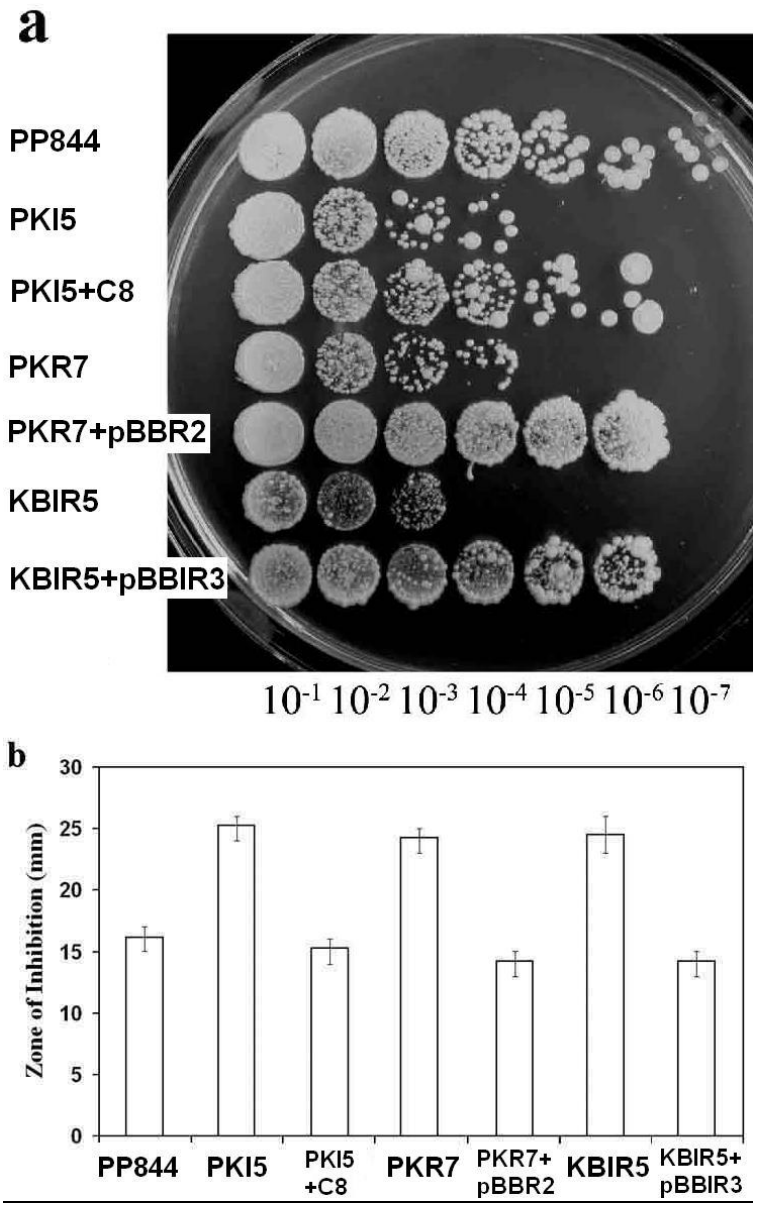
ในรายงานนี้ยังได้ พิสูจน์ว่า การแสดงออกของโปรตีน DpsA นั้นถูกควบคุมโดยระบบ bpsIR ด้วยโปรตีน DpsA เป็นโปรตีนที่สร้างภายในเซลของแบคทีเรียเพื่อปกป้องตนเองจาก oxidative stress เมื่อพิจารณา บริเวณ promoter ของยีน dpsA พบว่ามีบริเวณที่การเรียงลำดับเบสบ่งว่าน่าจะเป็น lux box ซึ่งเป็นที่สำหรับให้โปรตีน BpsR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



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

การศึกษาความสัมพันธ์ของระบบ BpsI และ BpsR กับการทนต่อ Oxidative Stressของเชื้อ *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* ทุกสายพันธ์ เลี้ยงใน M9 broath ปรับ OD A600 ให้เท่ากันแล้วเจือจางไป 10 เท่าเป็นลำดับไป มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยใช้นำมาหยดบน LB agar ที่มี *t*-BOOH 150 μM แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม เชื้อแต่ละสายพันธ์ขึ้นได้จนถึงความเจือจางเท่าใด ผลปรากฏว่า สายพันธ์ 844 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} ในขณะที่สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไปขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-3}-10^{-4} เท่านั้น ต่ำกว่าชัดเจน และในสายพันธ์ knockout ที่ยีนครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็กลับมาขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-6} แสดงในรูป **a** ต่อไปนี้

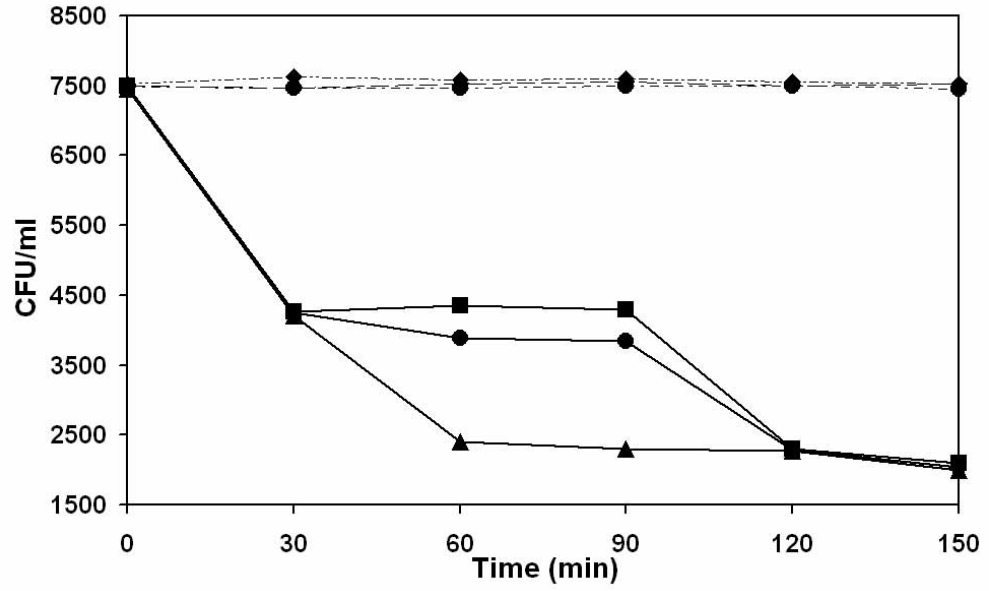


รูป a. แสดงการเติบโตได้ของเชื้อบนเพลทที่มี *t*-BOOH.

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

การทดลองที่สอง Disk Diffusion Test นำเชื้อ *B. pseudomallei* ทุกสายพันธ์ เลี้ยงใน M9 broath ปรับ OD A600 ให้เท่ากับ 1.0 ผสมกับ LB agar แล้วเททับบนเพลท LB agar แล้ววางกระดาษกรองรูปกลม disc ที่ชุบด้วย *t*-BOOH 250 µM แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม บริเวณที่เชื้อแต่ละสายพันธ์ไม่สามารถขึ้นได้รอบๆ disc มีเส้นผ่าศูนย์กลางเท่าใด ผลปรากฏว่า สายพันธ์ 844 มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 16 มม ในขณะที่ สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไป มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 25 มม และในสายพันธ์ knockout ที่ยีนครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็กลับมามีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยลดลงเป็น 15-16 มม (รูปb)

การทดลองที่สาม เพื่อดูว่า การที่เชื้อทนต่อ *t*-BOOH ลดลงเมื่อ ระบบ quorum sensing ถูก knockout เป็นผลมาจาก dpsA ที่ลดลงหรือไม่ โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ PP844, KBIR5, และ KBIR5 ที่ใส่ plasmid pBBIR3 ที่มียีน dpsA เพื่อให้สร้างโปรตีน dpsA นำเชื้อทั้งสามสายพันธ์ไปเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี *t*-BOOH 150 µM แล้วเก็บตัวอย่างมานับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เปรียบเทียบกัน ผลปรากฏว่า หลังจากใส่ มี *t*-BOOH ไปได้ 30 นาที เชื้อทั้งสามเริ่มลดจำนวนลง แต่ที่เวลา 30-นาที เริ่มเห็นความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่รอด จนถึงที่เวลา 90 นาที แล้วหลังจากนั้นก็ลดจำนวนลงไปพอๆกัน โดยที่เวลา 30-90 นาที สายพันธ์ 844 มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ 4500 CFU/ml ในขณะที่ สายพันธ์ KBIR5 ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ไป มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ลดลงเป็น 2500 CFU/ml และในสายพันธ์ KBIR5 ที่ถูก ครบกลับมาอีกครั้งหนึ่งด้วยการใส่ยีนที่ขาดไปก็กลับมา มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เพิ่มขึ้นเป็น 4000 CFU/ml ดังแสดงในรูปต่อไปนี้

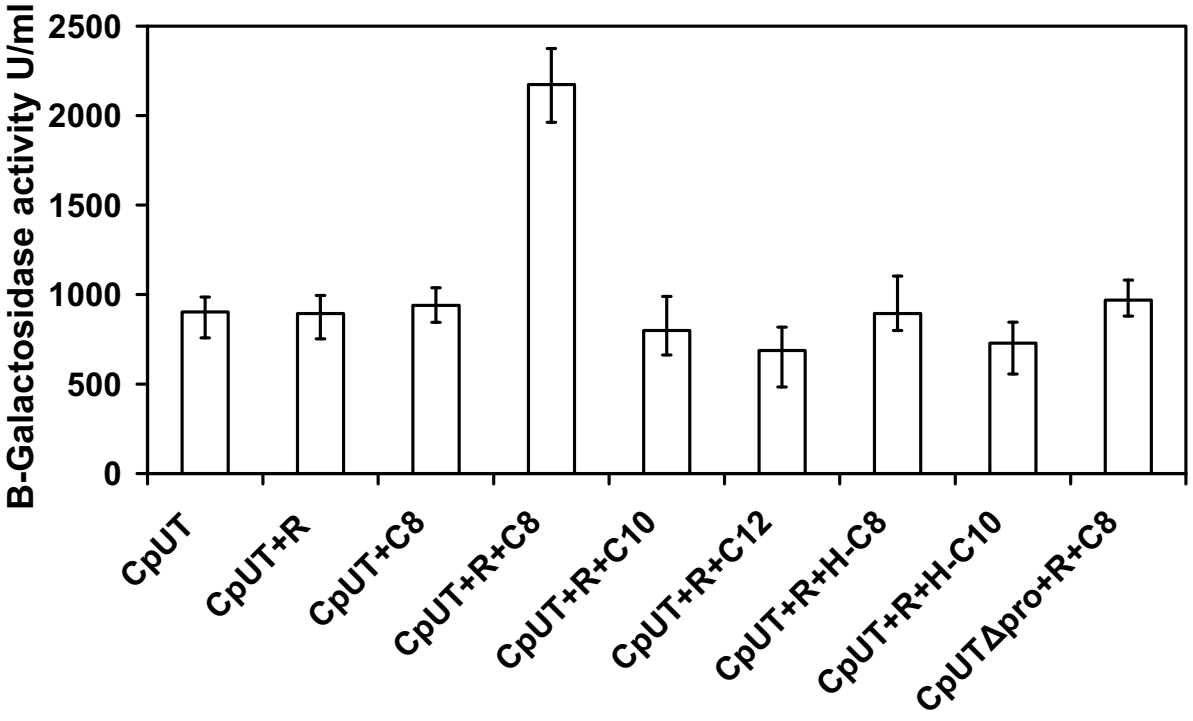


รูป แสดง เชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่เมื่อเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มี *t*-BOOH. เชื้อ PP844 (■), KBIR5 (▲), และ KBIR5 ที่ใส่ plasmid pBBIR3

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

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-HSLม OH-c8-HSL, และ OH-c10-HSL ผลปรากฏว่า เป็นไปตามที่คาดหมาย และ คือ ต้องมีโปรตีน BpsR ร่วมกับ c8-HSL ที่ สร้างโดย โปรตีน BpsI เท่านั้น ที่ให้สัญญาณสูงสุด ตามรูป



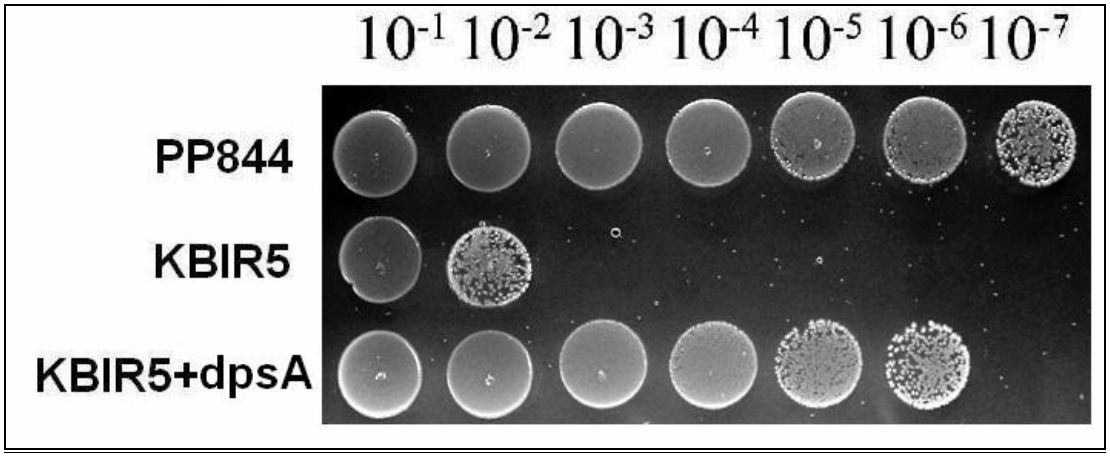
<u>การศึกษาว่าโปรตีน dpsA ช่วยปกป้องเชื้อ *B. pseudomallei* จาก Oxidative Stress</u>

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

- สายพันธ์ wild type (สายพันธ์ PP844)
- สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ทั้งยีน bpsI และ bpsR (สายพันธ์ KBIR5)
- สายพันธ์ KBIR5 ที่มี พลาสมิด pDps (ได้รับจาก ดร. สุวิทย์ ล้อประเสริฐ) ซึ่งมียีน dpsA ที่สามารถทำให้ มีการสร้างโปรตีน DpsA ได้

เลี้ยงเชื้อใน M9 broath ปรับ OD A600 ให้เท่ากันแล้วเจือจางไป 10 เท่าเป็นลำดับไป มาทดสอบการทนต่อ oxidative stress โดยใช้นำเชื้อที่ความเจือจางต่างๆมาหยดบน LB agar ที่มี *t*-BOOH 150 µM แล้วดูว่าหลังจาก 24 ชม เชื้อแต่ละสายพันธ์ขึ้นได้จนถึงความเจือจางเท่าใด ผลปรากฏว่า

-สายพันธ์ PP844 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-7} ตามคาด

-ในขณะที่สายพันธ์ KBIR5 ขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-2} เท่านั้น

-และสายพันธ์ KBIR5 ที่มีการสร้างโปรตีน DpsA ก็กลับมาขึ้นได้จนถึงความเจือจางที่ 10^{-6} (ตามรูป)