ส่งตีพิมพ์บทความเรื่อง ระบบ quorum sensing BpsIR ของเชื้อ *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. 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.

ส่ง repint มาพร้อมกับรายงานนี้

<u>การศึกษาความสามารถในการเข้าไปในเซลและอยู่รอดในเซลของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ระบบ AHL quorum sensing</u>

หลังจากตีพิมพ์บทความการศึกษาระบบ AHL quorum sensing *bpsIR* ไปแล้ว ได้มีโอกาสร่วมมือกับ ดร. พงษศักดิ์ อุทัยสินเจริญ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำการทดสอบการอยู่รอดของเชื้อ *B. pseudomallei* ที่ถูก knockout ยีน quorum sensing ใน เซล macrophage และเซล epithelial โดยที่ ดร. พงษศักดิ์ มีความชำนาญในการทดลองเชื้อ *B. pseudomallei* กับเซลทั้ง 2 ชนิดมาก่อนแล้ว ตามผลงานดังนี้

-เซล 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.)

-เซล epithelial

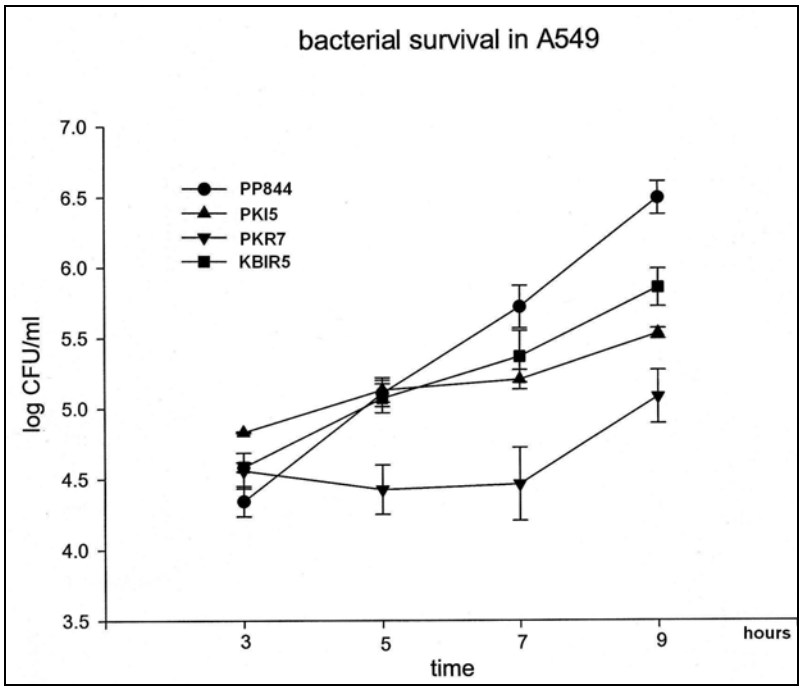
(Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Lengwehasatit I, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Burkholderia pseudomallei stimulates low interleukin-8 production in the human lung epithelial cell line A549. Clinical & Experimental Immunology. 2004;138:61–65.)

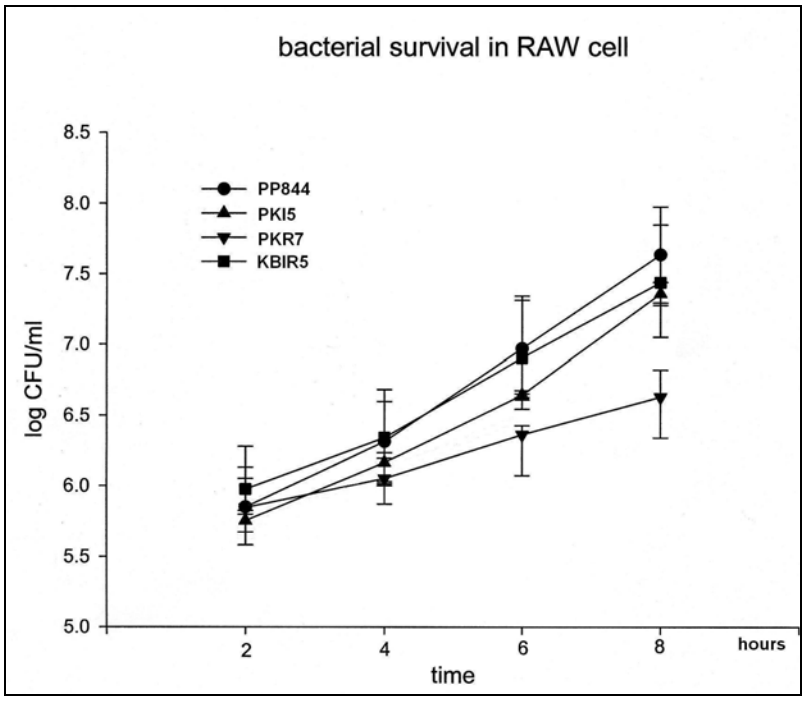
ในการทดลองได้นำเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ 844 (wild type), PKI5 (Δ*bpsI*), PKR7 (Δ*bpsR*), และ KBIR5 (Δ*bpsIR*) ที่เลี้ยงใน Trypticase soy broth มาล้างในน้ำเกลือ phosphate-buffered saline (PBS) 3 ครั้ง และเจือจางโดยการวัด OD 650 nm จนได้ความหนาแน่นที่เหมาะสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงร่วมกับ เซล macrophage (RAW 264.7) ซึ่งเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงเซล Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM)ผสม 10% fetal bovine serum (FBS) หรือ เซล alveolar basal epithelial (A549) ซึ่งเลี้ยงใน น้ำเลี้ยงเซล Ham's F-12 ผสม 10% fetal bovine serum (FBS) โดยเพาะเลี้ยงในตู้อบ 37°C ซึ่งมี 5% CO_2 ผสมในบรรยากาศ

ทำการเพาะเลี้ยงร่วม (co-culture) ระหว่างเซลและแบคทีเรีย โดยอัตราส่วนของเชื้อ *B. pseudomallei* กับเซล A549 เป็น 10 ต่อ 1 เรียกเป็นศัพท์เทคนิคว่า multiplicity of infection (MOI) of 10:1 เพราะโอกาสที่เชื้อแบคทีเรียจะเข้าเซล epithelial มีน้อย ในขณะที่ อัตราส่วนของเชื้อ *B. pseudomallei* กับเซล RAW 264.7 เป็น 2 ต่อ 1 (MOI of 2:1) เท่านั้น เพราะเซล macrophage สามารถกินเชื้อแบคทีเรียเข้าเซลได้ หลังจากปล่อยให้แบคทีเรียเข้าเซลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการล้างแบคทีเรียที่เกินอยู่นอกเซล โดยล้างเซลด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วฆ่าแบคทีเรียที่ยังเหลืออยู่นอกเซลโดยเพาะเลี้ยงเซลในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผสม kanamycin 250 µg/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเซลต่อไปในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผสม kanamycin 20 µg/ml ไปตลอดเวลาการทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลไปในระยะเวลาต่างๆ ทำการจำนวนแบคทีเรียที่มีเพิ่มขึ้นหรือเหลือรอดอยู่โดยนำเซลออกมาย่อยด้วย 0·1% Triton X-100 แล้ว กระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy agar เพื่อนับจำนวนโคโลนีโดยทำเป็น 3 เพลทในแต่ละช่วงแล้วนำมาเฉลี่ยกัน

ผลการทดลอง เมื่อเทียบระหว่างเซล พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าในเซล macrophage ได้ดีกว่า epithelial เซล ตลอดช่วงเวลาตามคาดหมาย เมื่อดูจำนวนแบคทีเรียภายในเซลเมื่อเวลาผ่านไปพบว่าเชื้อ *B.pseudomallei* สามารถอยู่รอดและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นภายในเซลทั้งสองชนิด โดยที่เชื้อตัวดั้งเดิม มีจำนวนมากที่สุด ในขณะที่เชื้อที่ถูก knockout ยีนระบบ AHL quorum sensing มีจำนวนในเซลน้อยกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สายพันธ์ PKR7 (Δ*bpsR*) เห็นได้ชัดเจนที่สุด และปรากฏชัดในเซล epithelial มากกว่า อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน BpsR เป็น transcription activator ที่สำคัญสำหรับยีนที่จำเป็นในการอยู่รอดภายในเซล ในขณะที่มีตัวสังเคราะห์ AHL ได้หลายตัวที่อาจทดแทน bpsI ได้ ที่น่ากังขาคือการที่ KBIR5 ซึ่งขาดทั้ง bpsIR แต่กลับมีจำนวนโคโลนีมากกว่า PKR7 เป็นไปได้ว่าเป็นความแปรผันของการทดลอง



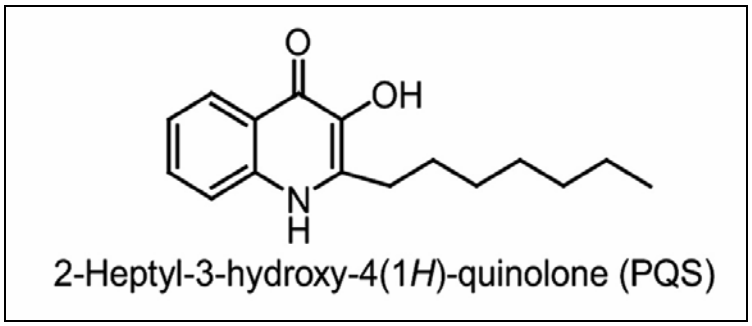


Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) Quorum Sensing System

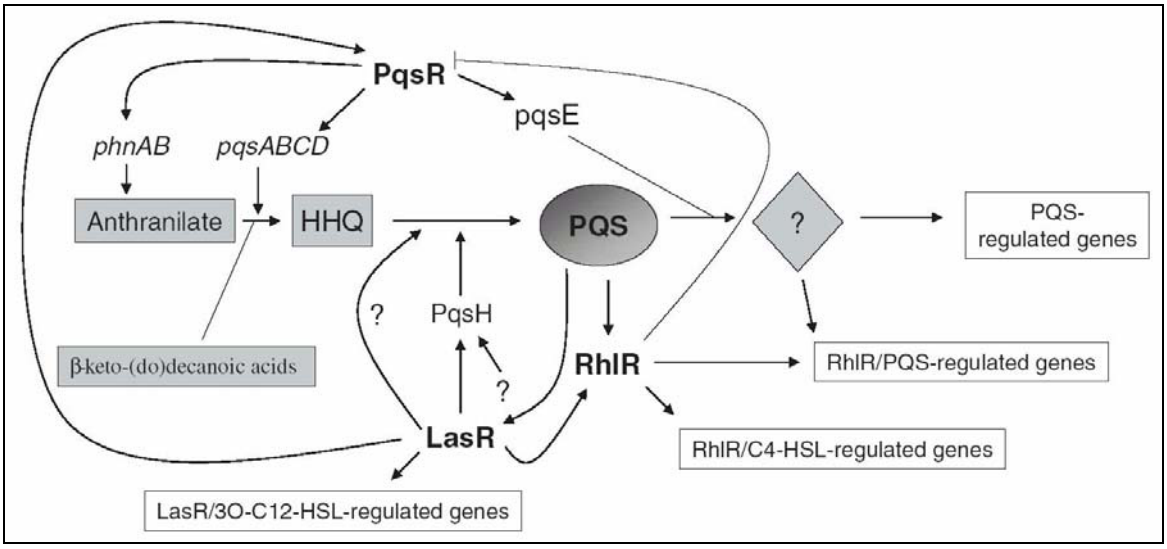
<u>การศึกษาลักษณะยีนของระบบ quinolone quorum sensing ในเชื้อ *B. pseudomallei* โดยอาศัยข้อมูลจากระบบ quinolone quorum sensing ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*</u>

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 แต่ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone โดยเรียกสารนี้ว่า <u>P</u>seudomonas <u>Q</u>uinolone <u>S</u>ignal หรือเรียกโดยย่อว่า PQS

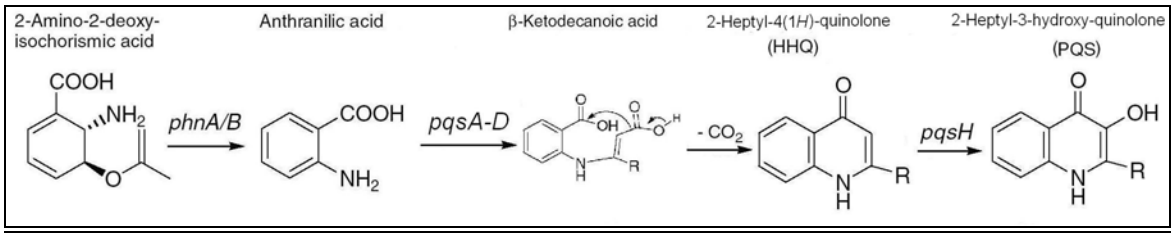


พบว่า PQS เป็น ตัวสื่อสารใน ระบบ quinolone quorum sensing ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของ virulence factors และการสร้าง biofilm นอกจากนี้ PQS ยังเป็นส่วนหนึ่งในระบบ quorum sensing อันซับซ้อนของ *P. aeruginosa* ที่ ประกอบด้วย AHL ทั้งระบบ Rhl และ ระบบ Las ดังรูป

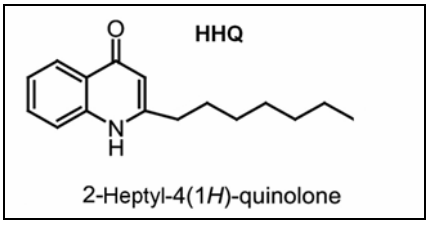


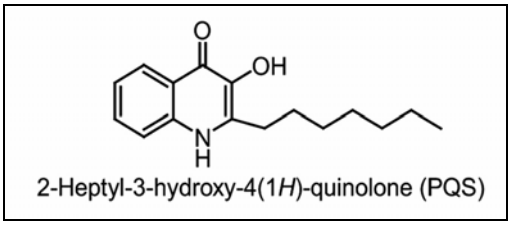
ยีนที่ควบคุมการสร้าง PQS

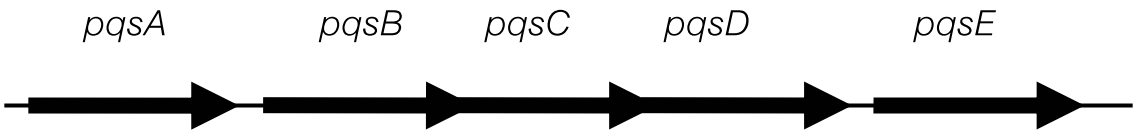
PQS ถูกควบคุมการสร้างด้วยยีน *phn*A/B, *pqs* operon (*pqsABCD*), และ *pqs*H ดังนี้ โดย phnA/B สร้าง anthranilic acid ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น β-ketodecanoic acid โดย *pqsABCD* และถูกเปลี่ยนเป็น 4-quinolone ในที่สุดโดยเสีย co_2 ไป สำหรับ AHQ ที่เป็น precursor ของ PQS ซึ่งมีหมู่ sidechain เป็น hydrocarbon อิ่มตัว 7 carbon คือ 2-Heptyl -4(1H)-quinolone (HHQ) โดย HHQ ถูกเปลี่ยนเป็น PQS โดยโปรตีนจากยีน *pqs*H



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







DNA Blast

ผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูล *pqs* operon (*pqs*ABCDE) 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 *pqs*B และ E โดยที่มีเพียง *P. aeruginosa* และ *B. pseudomallei* (*B. thailandensis* ด้วย) เท่านั้นที่ มียีน *pqs*ABCDE ครบ ดังแสดงในตาราง S1

Table S1. Multiple *Pseudomonas, Burkholderia* and *Ralstonia* Species Possess *P. aeruginosa pqs* Gene Homologues

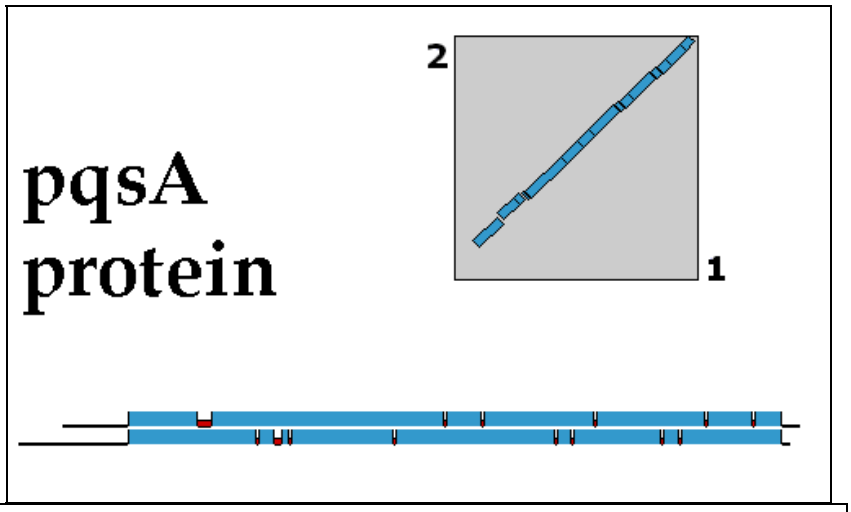
Species	Strain	*pqsA*	*pqsB*	*pqsC*	*pqsD*	*pqsE*
P. aeruginosa	**PAO1**	+	+	+	+	+
P. aeruginosa	**PA14**	+	+	+	+	+
P. aeruginosa	**2192**	+	+	+	+	+
P. aeruginosa	**C3719**	+	+	+	+	+
P. syringae	B728a	+	-	+	+	-
P. syringae	DC3000	-	-	+	+	-
P. putida	KT2440	+	-	+	+	-
P. putida	F1	+	-	+	+	-
P. fluorescens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

โปรตีน pqsABCDE Alignment ระหว่างเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ*B. pseudomallei* K96243

เมื่อนำยีน *pqsABCDE* ไปแปลเป็นการเรียงลำดับกรดอมิโนของโปรตีน PqsABCDE แล้วนำมาเปรียบเทียบโดยทำการ alignment ระหว่าง โปรตีน PqsABCDE ของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 และ *B. pseudomallei* K96243 โดยใช้ เครื่องมือในเวบของ NCBI ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi ผลเป็นดังนี้

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

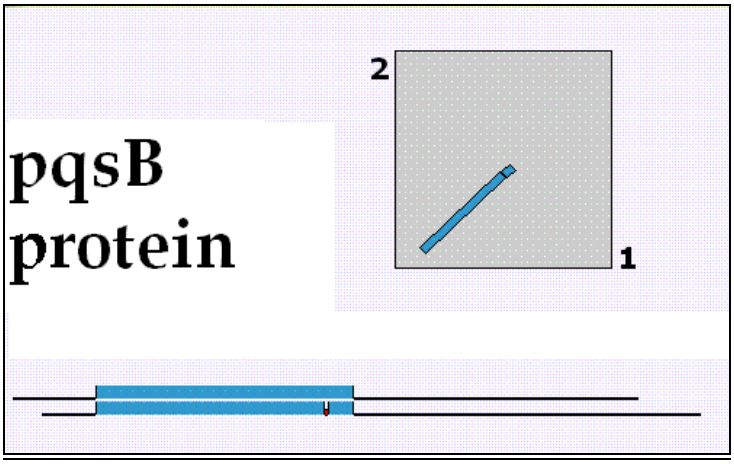
The alignment of two protein sequences. Blue rectangles: local alignment segments; red lines: gaps; light gray lines represent the regions of low complexity on query sequence. Reference: Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999). Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. FEMS Microbiol Lett. 174:247-250



pqsA

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

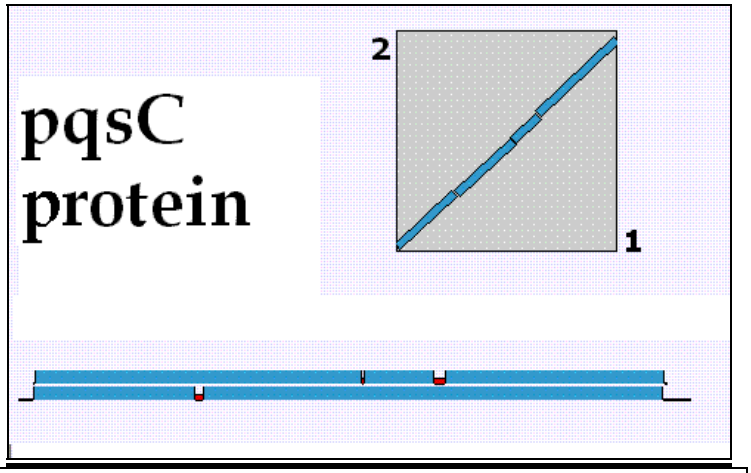
```
Query  50   LKPGDRVVLALNDSPSLACLFLACIAVGAIPAVINPKSREQALADIAADCQ---------  100
            L PG+RV+L    + P LA  + A +  G +     P  R   L+ + A  Q
Sbjct  83   LVPGNRVLLHGTNHPFLAAAWFAIVKAGGVVVTTMPLLRAGELSKVIAQAQVTHALCEAA  142

Query  101  --ASLVVREADAPSLSGPLAPLTLRAAAGRPLLDDFSLDALVGPADLDWSAFHRQDPAAA  158
              A L    A AP ++      T  AAA  PLL   +      P D       R D
Sbjct  143  VSAELRAAMAAAPGVAFARYYETDDAAAFEPLLH--ACPRTFEPVDT------RADEP--  192

Query  159  CFLQYTSGSTGAPKGVMHSLRNTLGFCRAFATELLALQAGDRLYSIPKMFFGYGMGNSLF  218
            C + +TSG+TG PK  +H  R+ +  C  F   +L   A D     P + F +G+G  L
Sbjct  193  CIVAFTSGTTGRPKATVHFHRDVMAICHCFPQHVLKPNADDVFCGSPPLAFTFGLGALLL  252

Query  219  FPWFSGASALLDDTWPSPERVLENLVAFRPRVLFGVPAIYASLRPQAREL-LSSVRLAFS  277
            FP   GAS +L      P+R+L  + A R  +LF  PA Y ++  +  E  ++S+R
Sbjct  253  FPLSVGASVVLLQR-AKPQRLLAAIGAHRVSILFTAPAAYRAMLDELGEHDIASLRKCVC  311

Query  278  AGSPLPRGEFEFWAAH-GLEICDGIGATEVGHVFLANRPGQARADSTGLPLPGYECRLVD  336
            AG  LP      W A  G+ I DGIGATE+ H+F +    QA+  + G  +PGY   ++D
Sbjct  312  AGEALPVPTRNAWLARTGIRIIDGIGATEMLHIFASADETQAKEGAIGKAVPGYRLAILD  371

Query  337  REGHTIEEAGRQGVLLVRGPGLSPGYWRASEEQQARFA-GGWYRTGDLFERDESGAYRHC  395
              G  +      G L V+GP    G    ++ +Q  +   GW  TGD    DE G   +
Sbjct  372  ERGERLPPY-HVGRLAVQGP---TGCRYLNDARQRDYVRHGWNLTGDAAYLDEDGYLFYQ  427

Query  396  GREDDLFKVNGRWVVPTQVEQAICRHLPEVSEAVLVPTCRLHDGLRPTLFVTLATPLD--  453
             R DDL    G  + P +VE+A+  H  +V E  +V      DG   TL      P
Sbjct  428  SRADDLIISLGYTISPAEVEEALLSH-ADVLECGVVGA---PDGRGGTLVCAHVVPRPGV  483

Query  454  DNQILLAQRIDQHLAEQIPSHMLPSQLHVLPA-LPRNDNGKLARAELRHLAD  504
                L   + QH+  +I  +  P ++    A LPRND+GKL R +LR  A+
Sbjct  484  HGCDALTAALQQHVKARIAPYKYPRRIEYHAAGLPRNDSGKLQRFKLRQAAE  535
```



pqsB

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

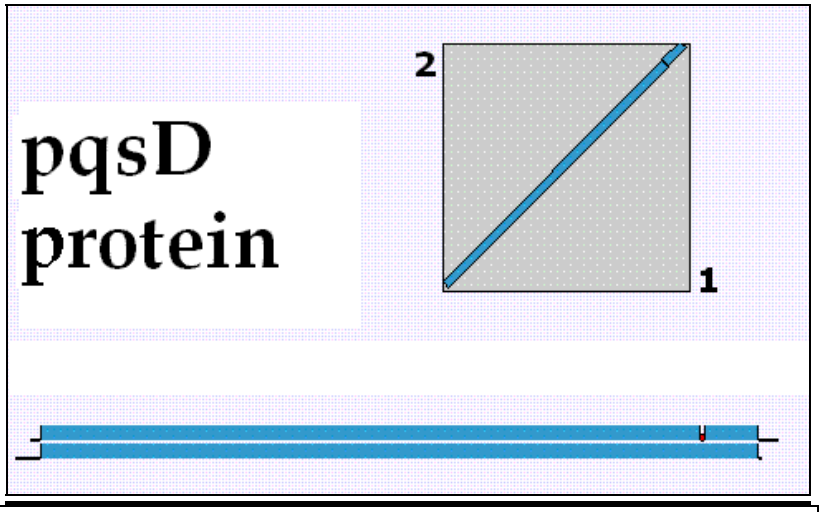
```
Query  39   LPAVREALDEAAVKPEEIDLIVGLALSPDHLIENRDIMAPKIGHPLQKVLGANRAHVFDL  98
            L A R+AL +A    P E+DLIV L++SP+ + +   I  P++ HP+Q+ L A+ A VFDL
Sbjct  26   LKAARQALAKARCLPSELDLIVSLSVSPNRMADAAPIAGPRLAHPVQRDLRASNAAVFDL  85

Query  99   TDSSLARALYVVDTLASDQGYRNVLVVRGESSQGLEVDSESGFALADGALALLCRP  154
             D+    AL +V +     GYR  LVV+ E+   +E     G+  ADGA A++  P
Sbjct  86   LDADWTLALDLVQSHCRQLGYRRALVVKAEALADVEGAQAGGY--ADGAGAIVLAP  139
```



pqsC

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

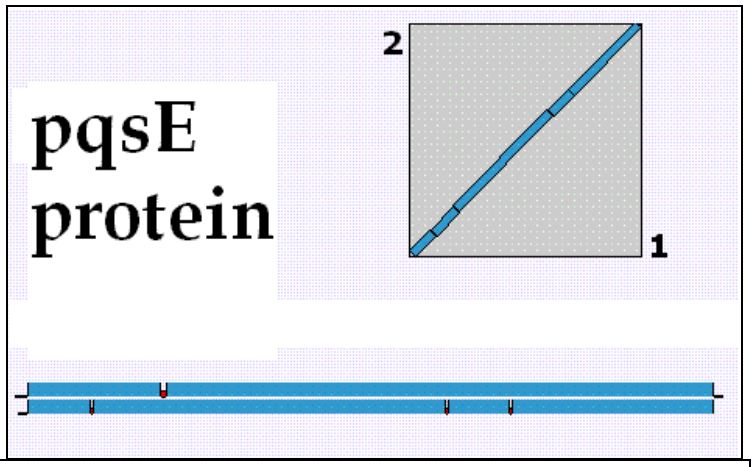
```
Query  2    HKVKLAAITCELPARSYENDDPVFAAVPDLSESWWQFWGVNRRGYFDPRNGENEFSLVVR  61
            + V++A++ C LP+R   NDD  F  V  +   WWQFWG+  R   DP  GE+E ++  R
Sbjct  10   YNVRMASLACNLPSRLLRNDDAAFDEVEPIPSEWWQFWGIESRYVIDPHAGESELAMAER  69

Query  62   AAERLLRSSDTAPDSVDMLICSASSPIMTDAGDVLPDLRGRLYPRMANVLSKQLGLSRAL  121
             A + L  +      +D+++ + +SP +T A     D   R  PR++  L ++LG  RAL
Sbjct  70   TARQALARAGVDAAELDLVLFNITSPFVTAA-----DGARRFAPRLSRTLRERLGARRAL  124

Query  122  PLDSQMECASFLLNLRLAASMIRQGKAEKVLVVCSEYISNLLDFTSRTSTLFADGCAVAL  181
              D +MECASF+L ++LAA++I+QG+ ++ LV  SE +S ++D+ S++ST F DG A A+
Sbjct  125  DADVEMECASFVLQMQLAANLIKQGRVKRALVCSSERMSAVVDYASKSSTTFGDGAAAAV  184

Query  182  LTRG--DDDSCDLLASAEHSDATFYEVATGRWRLPENPTGEAKPR-------LYFSLFSD  232
            L     D    D L +   SDAT Y +AT +WR P+ P                YF+L  +
Sbjct  185  LVADAHDPHGADWLNAVYRSDATHYALATMQWRYPKPPADRDDAERQAERFGAYFTLKPE  244

Query  233  GQNKMASFVPTNVPIAMRRALEKAGLGSDDIDYFVFHQPAPFLVKAWAEGIGARPEQYQL  292
             Q ++A F+P  +P  + R L K GL +DDID  VFHQP+  LV+AWA+ +G  P+QY +
Sbjct  245  AQEQIARFMPEAIPDIVERLLRKTGLRTDDIDAMVFHQPSEILVRAWAQRLGLAPDQYVI  304

Query  293  TMGDTGVMISVSIPYTLMTGLREGKIRPGDRIVMAGAATGWGFAAQVWQLGEVLV  347
             + D   ++S ++P  L   +R G ++PG ++V+AGA  GWGF AQ+W+ GE +V
Sbjct  305  RLADCACLVSAAVPLALYESIRRGVVKPGSQVVIAGAGAGWGFGAQLWRWGETVV  359
```



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   IAGLGHALPQRIVDNDEVARVIDTSDAFIRTRTGVRHRRYLAPGQQLADLACPAAERAMA  72

Query  66   AAGLLPEDIDLLLVNTLSPDHHDPSQACLIQPLLGLRHIPVLDIRAQCSGLLYGLQMARG  125
             AG+ P DIDLL+VNTLSPDHHDPSQAC +QP LGLR IP  DIRAQCSG LYG+++AR
Sbjct  73   EAGVAPADIDLLIVNTLSPDHHDPSQACYMQPRLGLREIPCFDIRAQCSGGLYGIEIARH  132

Query  126  QILAGLARHVLVVCGEVLSKRMDCSDRGRNLSILLGDGAGAVVVSAGESLEDGLLDLRLG  185
             + +GL R+VL++C E LS+R+D S+ GRNLSILL DGA A+V+ A      GL+DL LG
Sbjct  133  FVASGLYRNVLLICAEALSRRIDTSNAGRNLSILLSDGAAAMVLRAQPDATRGLIDLALG  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  RMPAGQLNLLVTYGAGATWACALYR  337
```

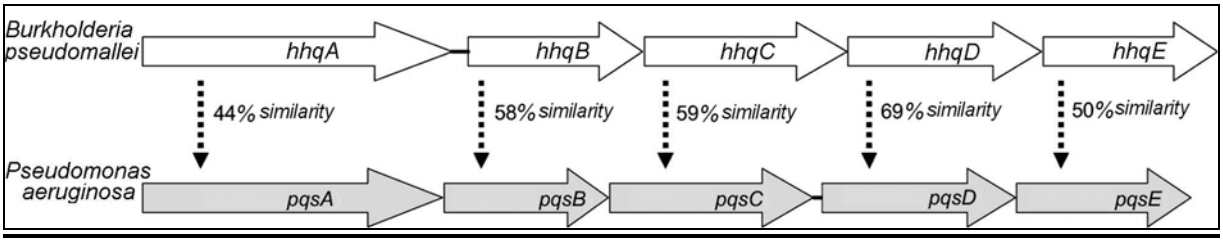


pqsE

Identities = 94/294 (31%), Positives (Similarities) = 149/294 (50%), Gaps = 6/294 (2%)

```
Query  7    PGQLDDDLCLLGDVQVPVFLLRLGEASWALVEGGISRDAELVWADLCRWVADPSQVH---  63
            PG++D  L ++G   VP++++   EA+  LVEGG+S   ELVW  L   ++D   +
Sbjct  6    PGRIDSRLAIVGTADVPLYVIVNDEAA-TLVEGGLSGMTELVWRQLHELLSDYGGIRHLR  64

Query  64   YWLITHKHYDHCGLLPYLCPRLPNVQVLASERTCQAWKSESAVRVVERLNRQLLRAEQRL  123
            YWLITH HYDHC LL  L PR+P + ++ S  T  A +S SA R +  L+ Q   A + +
Sbjct  65   YWLITHSHYDHCSLLGTLAPRMPWLHIVGSAATADALQSPSACRTIRALDAQACAAWEPV  124

Query  124  PEACAWDALPVRAVADGEWLELGPRHRLQVIEAHGHSDDHVVFYDVRRRRLFCGDALGEF  183
              A     +P+  +  G  L++G   R++ +   GHS   + ++  +   LF  DALGE+
Sbjct  125  AAAAELSDIPLYPLNPGRSLDIGEGMRMRALALPGHSACLLGYHCPQLDLLFVSDALGEY  184

Query  184  DEAEGVWRPLVFDDMEAYLESLERLQRLPTLLQLIPGHGGLLRGRLAADGAESAYTECLR  243
              A   W PLVF D+ AY  SL+ ++R     ++  GH G++ G +A      A
Sbjct  185  -HAPTQWLPLVFQDLAAYRLSLDAIER-QHASRIALGHHGIVGGGIARHAVRHARDGLAA  242

Query  244  LCRRLLWRQSMGESLDELSEELHRAWGGQSVDFLPGELHLGSMRRMLEILSRQA  297
                    +   +   L+ +    +  +S + +P  LHL SM RM+++  R A
Sbjct  243  RDDEARAARGDANATRALARQWTERYAARSANVVPRALHLKSMERMIDLFQRAA  296
```

สรุปผลการ Alignment

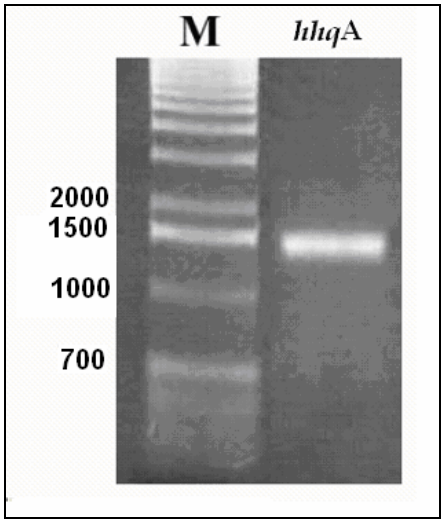


แม้ว่าสืบค้นโดยวิธี blast ในฐานข้อมูล genomes เชื้อแบคทีเรีย ของ NCBI มีเพียง *P. aeruginosa*, *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* เท่านั้นที่ มียีน *pqs*ABCDE ครบ ดังแสดงในตาราง S1 แล้วนั้น แต่ผู้วิจัยไม่พบว่า *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* มียีน *pqs*H แต่อย่างใด ดังนั้นจึงคาดว่า ระบบ quinolone 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* (*hhq*ABCDE)ตามชื่อ ของ HHQ ซึ่งเป็นสาร AHQ ที่เป็น precursor ของ PQS

<u>การทำ PCR ของยีน *hhq*A</u>

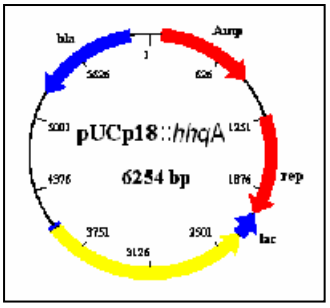
ขั้นต่อไปจึงได้ออกแบบ oligonucleotide primers เพื่อทำ PCR ยีน *hhq*A มาเพื่อใช้ศึกษาเหตุที่เลือก ยีน *hhq*A มา เพื่อให้เป็นตัวแทน ของยีนที่มีส่วนในการสร้าง HHQ

PCR primers สำหรับยีน *hhq*A คือ primer HAF (5′-CGAATTCACGATGGACAACTTTTGCCGCAC-3′) ซึ่งมี EcoRI restriction site (ขีดเส้นใต้) และ primer HAR (5′-TGGATCCGCCTCGTTATCGAATGGGTTGGT-3′) ซึ่งมี BamHI restriction site (ขีดเส้นใต้) โดย primers คู่นี้จะเพิ่มจำนวน DNA ชิ้นขนาด 1,709 bp นำ primers ดังกล่าวข้างต้นมาทำ PCR โดยใช้ genomic DNA ของ *B. pseudomallei* pp844 เป็นแม่แบบ ได้ชิ้น DNA ขนาด ดังคาด ตามรูป



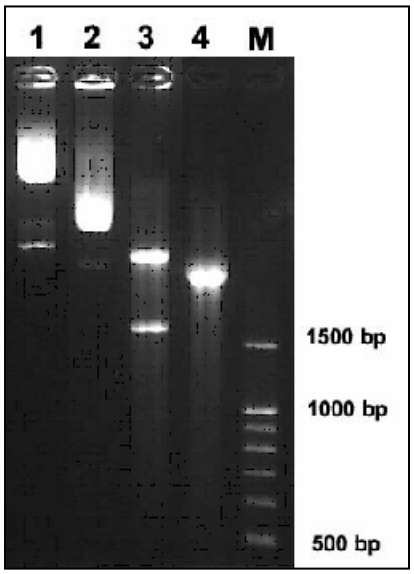
รูปแสดง agarose gel electrophoresis ของ *hhq*A PCR

<u>การโคลนยีน *hhq*A เข้าไปใน plasmid pUC18</u>



PCR products จาก primer HAR และ HAF ถูกนำไปตัดด้วย EcoRI และ BamHI แล้วโคลนเข้า ที่ multiple cloning siteใน plasmid pUC18 ซึ่งใส่ใน *E. coli* DH5α

ได้พิสูจน์ pUC18::*hhq*A โดย recombinant plasmid มีขนาด 6,254 bp ประกอบด้วย ชิ้น DNA complete gene ***hhq***A 1,697 bp, และ and pUCp18 ขนาด 4,557 bp

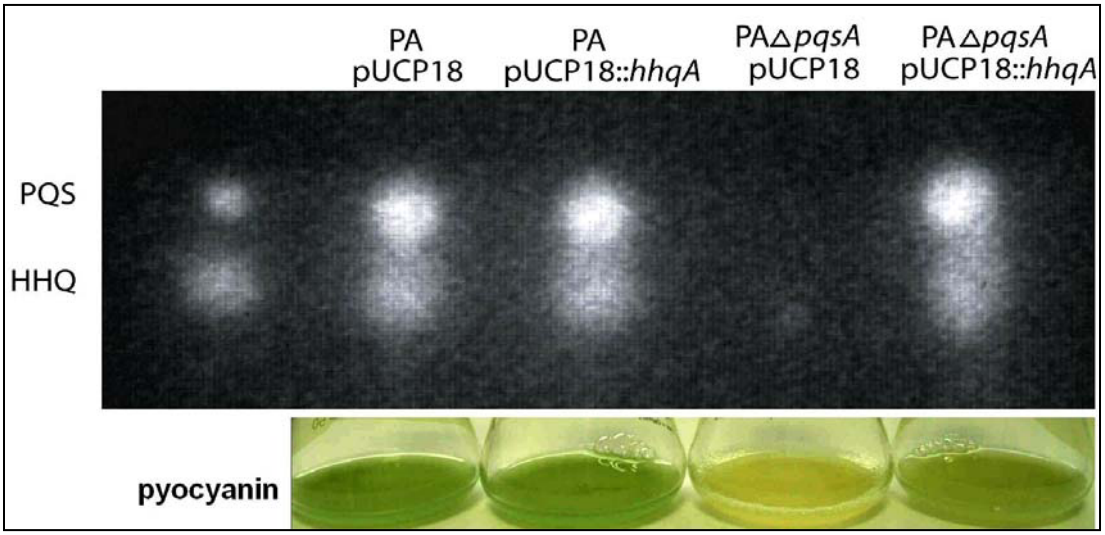


รูป agarose gel electrophoresis
เลน 1 pUC18::*hhq*A
เลน 2 pUC18
เลน 3 pUC18::*hhq*A ตัดด้วย EcoRI และ BamHI
เลน 4 pUC18 ตัดด้วย EcoRI และ BamHI

<u>ยีน *hhq*A ของ *B. pseudomallei* สามารถทำหน้าที่ทดแทนยีน *pqs*A ที่ขาดหายไปใน *P. aeruginosa* ได้</u>

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

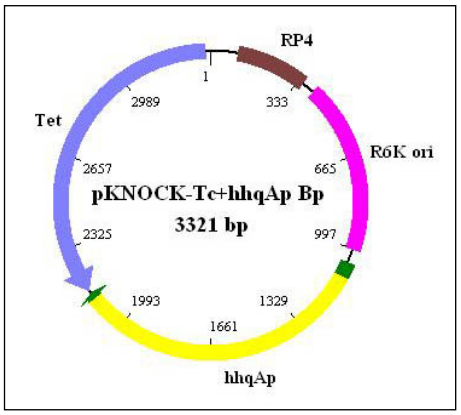
PAO1Δ*pqs*A นี้ไม่สามารถสร้าง ทั้ง HHQ และ PQS ได้ ส่งผลให้ ไม่สามารถสร้าง pyocyanin ได้ เนื่องจาก pyocyanin ถูกควบคุมโดย PQS quinolone quorum sensing (Functions Required for Extracellular Quinolone Signaling by Pseudomonas aeruginosa. Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, and Manoil C.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

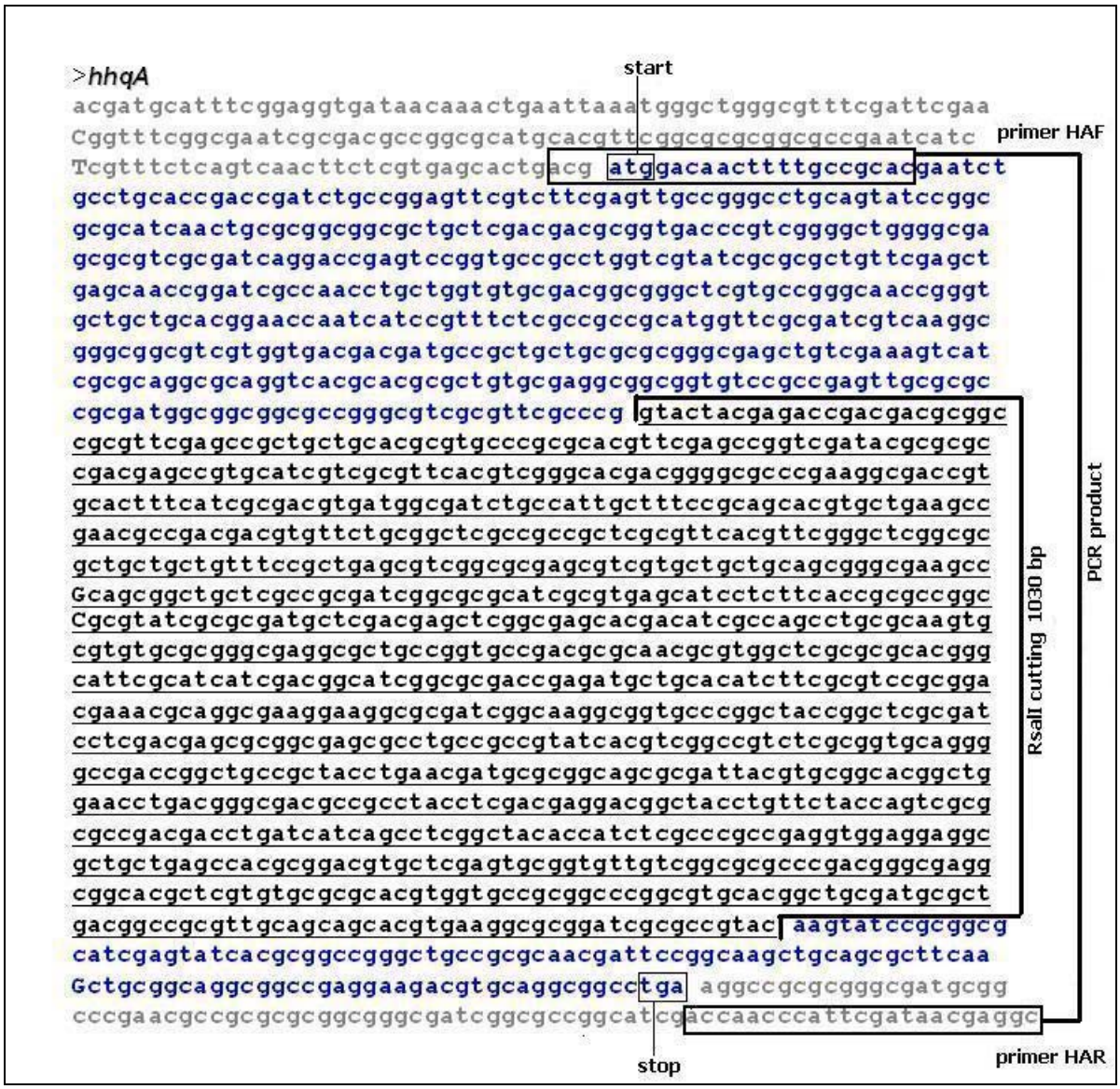


การทดลอง transcomplementation ของ *hhq*A รูปบนแสดง thin layer chromatography plate ที่ลาดด้วย LB agar ซึ่งมี quinolone bioluminescent reporter PAO1*lec*A::luxΔ*pqs*A นำมาแยกสาร quinolone จากน้ำเลี้ยงเชื้อของเชื้อ *P. aeruginosa* PAO1 ที่ใส่ pUC18 ธรรมดา และ pUC18::*hhq*A ซึ่งสกัดด้วย ethyl acetate ทำแห้งแล้วละลายใน methanol โดยเลนซ้ายสุดเป็นสารตัวอย่าง PQS และ HHQ ต่อไปใน 2 เลนแรกเป็นตัวควบคุม เลนที่ 3 คือ PAO1Δ*pqs*A ที่ใส่ pUC18 ธรรมดา และเลนที่ 4 คือ PAO1Δ*pqs*A ที่ใส่ pUC18::*hhq*A เมื่อแยกสารแล้ว นำมาดูด้วย luminograph detector ส่วนล่างของรูปแสดงสีของน้ำเลี้ยงเชื้อ ถ้ามี pyocyanin จะเป็นสีเขียว จากผลของ PAO1Δ*pqs*A ที่ใส่ pUC18::*hhq*A แสดงให้เห็นว่า *hhqA* สามารถทำหน้าที่แทน *pqsA* ได้

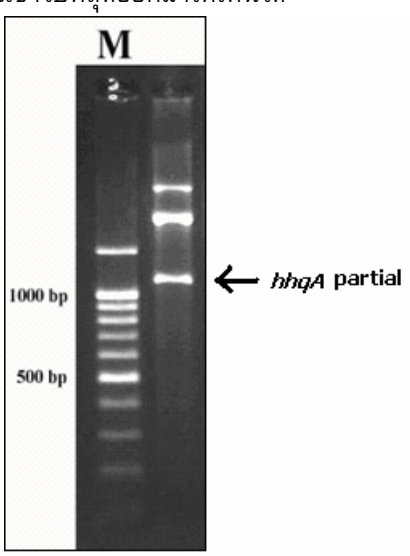
การศึกษา หน้าที่ของระบบ quinolone quorum sensing
โดยการสร้าง เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A

ทำการสร้างสายพันธ์ *hhq*A knock-out สร้างโดย นำชิ้นส่วน DNA 1030 fragment ที่ได้จากการตัด HAF/HAR PCR product ด้วย restriction enzyme RsaIนำไป ligate แบบ blunt end ใน pKNOCK-TC ที่ตัดด้วย *Sma*I ได้เป็นพลาสมิดขนาด 3321 bp (รูป) รูป ยีน *hhqA* แสดงตำแหน่ง PCR primer และชิ้นส่วนที่ตัดด้วย *Rsa*I





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

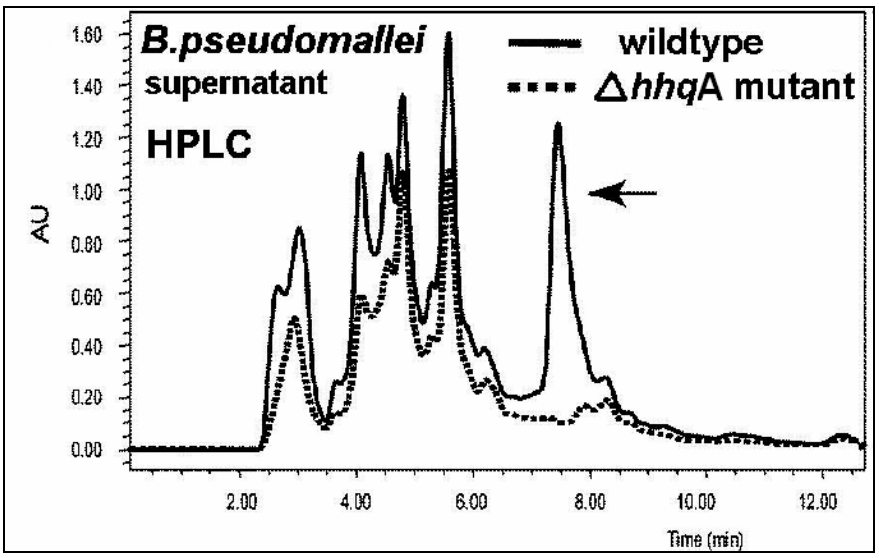


ต่อมาใช้ *E. coli* S17-1 λ*pir* เป็นตัว conjugate pKNOCK-Tc +*hhqA*p นี้ ลงไปไปใน *B. pseudomallei* pp844 ซึ่งจะทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนยีนโดยวิธี crossing over ระหว่างโครโมโซมของ *B. pseudomallei* กับ pKNOCK ผลที่ได้ในโครโมโซมของ *B. pseudomallei* pp844 จะมีส่วนของพลาสมิด pKNOCK แทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่งยีนที่เราต้องการ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

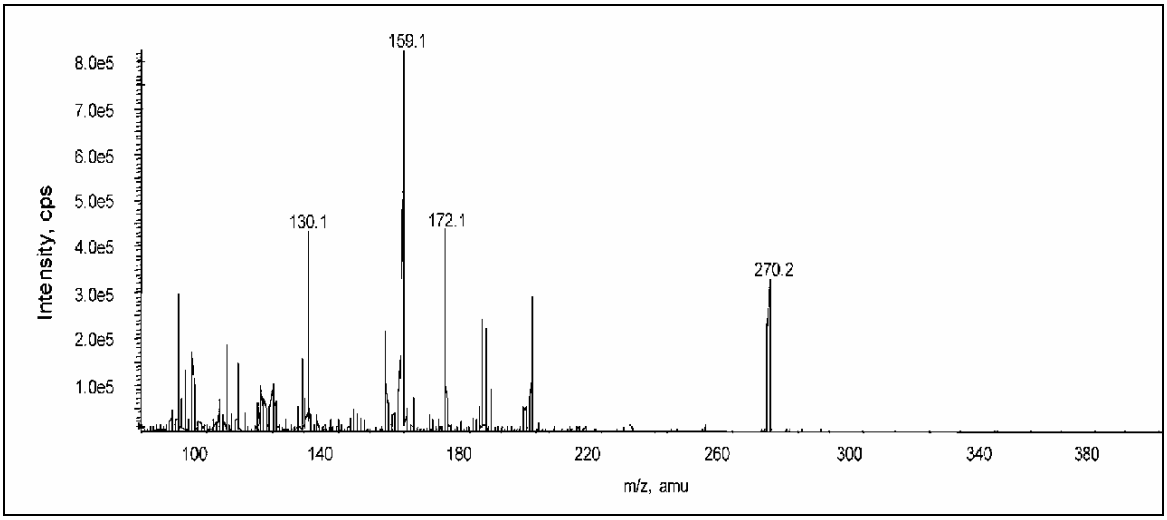
<u>การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* 844 สายพันธ์ดั้งเดิม กับ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A (BpΔ*hhq*A) โดยการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC และ เปรียบเทียบ phenotypes ต่าง ๆ</u>

<u>การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ดั้งเดิม กับที่ถูก knockout ยีน *hhqA* โดยการวิเคราะห์น้ำเลี้ยงเชื้อด้วย HPLC</u>

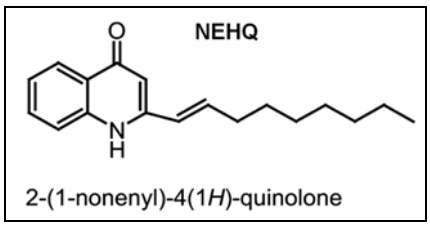
น้ำเลี้ยงเชื้อสายพันธ์ ดั้งเดิม 844 และสายพันธ์ BpΔ*hhq*A มาสกัดด้วย ethyl acetate แล้วทำให้แห้ง และทำให้ละลายด้วย methanol ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ที่ ห้องปฏิบัติการ Quorum Sensing ของสถาบัน Institute of Infection, Immunity & Inflammation, Centre for Biomolecular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

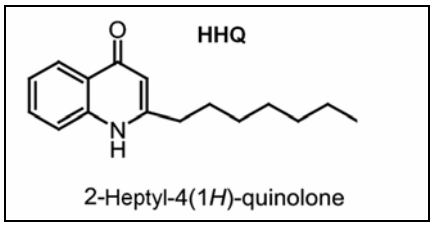


ผลการวิเคราะห์ HPLC ตามรูป ปรากฏว่า ในสายพันธ์ดั้งเดิม pp844 ไม่พบ HHQ ซึ่งควรจะถูก elute ออกมาที่ 6.5 นาที แต่กลับพบว่า เชื้อ BpΔ*hhq*A มีความแตกต่างจากสายพันธ์ดั้งเดิม pp844 คือที่ส่วน peak ที่ elute เมื่อ 7.75 นาที หายไป (ตามลูกศรชี้)



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 C_7 อิ่มตัว (Heptyl) กลับกลายเป็น $C_{9:1}$ ไม่อิ่มตัวที่ carbon ตำแหน่งที่ 1 (nonenyl) ใช้ชื่อย่อว่า NEHQ

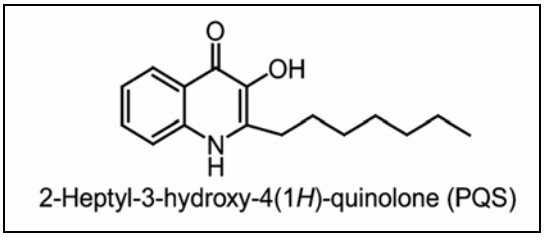




ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการสืบค้นถึงการสร้างสาร quinolone ในเชื้อสายพันธ์ต่างๆเพื่อดูว่ามีความแตกต่างที่หลากหลายของการสร้างสารนี้ในเชื้อ Burkholderia และ Pseudomonas สายพันธ์ต่างๆ หรือไม่

<u>เชื้อสายพันธ์ต่าง ๆมีการสร้าง HHQ หรือ Quinolone ชนิดอื่น ๆอย่างไร</u>

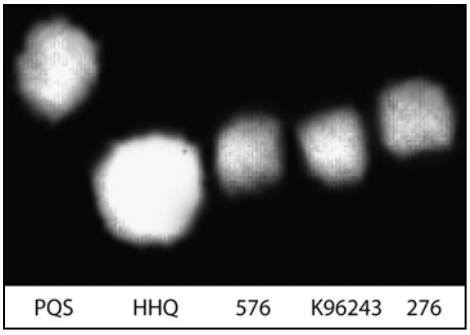
ตามที่กล่าวไปแล้วว่า เชื้อ *P. aeruginosa* สร้างสารในกลุ่มของ Alkyl Hydro Quinolone (AHQ) (สูตรเคมี 2-alkyl-4(1H)-quinolone) มาให้ตรวจพบได้ใน supernatant หลายชนิด แต่ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ 2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone โดยเรียกสารนี้ว่า <u>P</u>seudomonas <u>Q</u>uinolone <u>S</u>ignal หรือเรียกโดยย่อว่า PQS



เชื้อ *P. aeruginosa* มีการสร้าง สาร AHQ หลายชนิด โดยต้องสร้าง HHQ ซึ่งเป็น precursor ของ PQS ด้วย และบางสายพันธ์ ก็มีการสร้าง NEHQ ดังที่พบในสายพันธ์ 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.)

<u>การนำน้ำเลี้ยงเชื้อ มาแยกด้วย TLC ที่ overlaid ด้วย bioluminescent reporter ที่ตอบสนองต่อ AHQ เพื่อดูการสร้าง AHQ ชนิดต่าง ๆ</u>

เพื่อต้องการทราบว่า เชื้อ *Burkholderia* สายพันธ์อื่นๆ นอกจาก *B. pseudomallei* pp844 รวมทั้ง เชื้อ *B. thailandensis* จะมีการสร้าง AHQ แบบใด จึงมีการนำเอาเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ 576, 10276, และ k96243 มาสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant culture) แล้วนำมาตรวจสอบโดยการแยกด้วย TLC ที่ overlaid ด้วย bioluminescent reporter ที่ตอบสนองต่อ AHQ (เป็น *E.coli* ที่มีพลาสิดซึ่งมี promoter ของ pqsA) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ผลปรากฏว่า เชื้อทั้งสามชนิด มีการสร้าง HHQ (รูปด้านขวา) จึงเป็นไปได้ว่า เป็นความแตกต่าง (variation) ของ *B. pseudomallei* pp844 ที่มีการสร้าง AHQ ที่แตกต่างจาก *Burkholderia* อื่น



เมื่อใช้วิธี bioluminescent reporter TLC เทียบกับสารมาตรฐานนี้ มาตรวจสอบกับ น้ำเลี้ยงเชื้อเชื้อชนิดอื่นๆ รวมทั้ง *B. thailandensis* สายพันธ์ 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

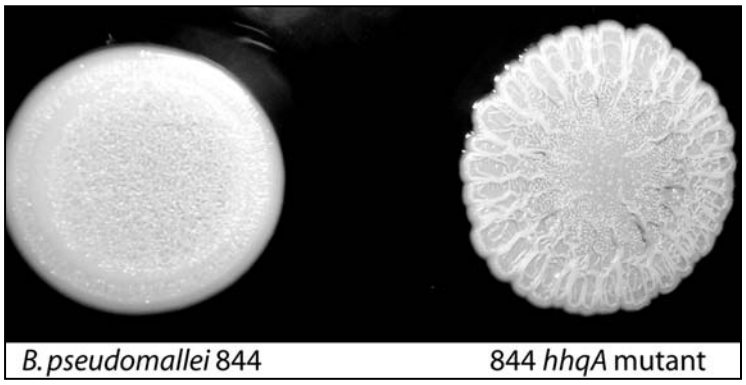
Strain	PQS	AHQ[a]	Source
P. aeruginosa PAO1	+	+	Wound infection
P. aeruginosa PA14	+	+	Burn wound
P. mendocina ATCC25411	—	—	Environmental
P. aureofaciens 30–84	—	—	Wheat rhizosphere
P. diminuta CIP7129	—	—	Soil
P. fluorescens CHAO	—	—	Soil
P. putida KT2440	—	+	Biosafety strain
P. syringae DC3000	—	—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

<u>การเปรียบเทียบลักษณะของ เชื้อ *B. pseudomallei* 844 สายพันธ์ดั้งเดิม กับ เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A (BpΔ*hhq*A) โดย การเปรียบเทียบ phenotypes ต่าง ๆ</u>

<u>เปรียบเทียบลักษณะโคโลนี</u>

เชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ ดั้งเดิม 844 และสายพันธ์ BpΔ*hhq*A มีลักษณะที่แตกต่างกันที่สังเกตไดชัดเจนแต่แรกคือ ลักษณะของโคโลนีเมื่อเพาะเลี้ยงบนเพลท LB agar หรือ เพลท blood agar 2-3 วัน มีความแตกต่างกัน คือ โคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธ์ wild type 844 มีลักษณะตามปรกติของเชื้อ *B. pseudomallei* คือ ขอบเรียบ mucoid ในขณะที่โคโลนีของสายพันธ์ BpΔ*hhq*A มีลักษณะเหี่ยวย่นชัดเจน (รูปโคโลนี)



<u>เปรียบเทียบ Exoproteases, Siderophores, Hemolysin, Elastase</u>

เมื่อนำเชื้อ *B. pseudomallei* สายพันธ์ ดั้งเดิม 844 และ สายพันธ์ BpΔ*hhq*A มาเปรียบเทียบ phenotype ต่างๆ โดยเพาะเลี้ยงบน

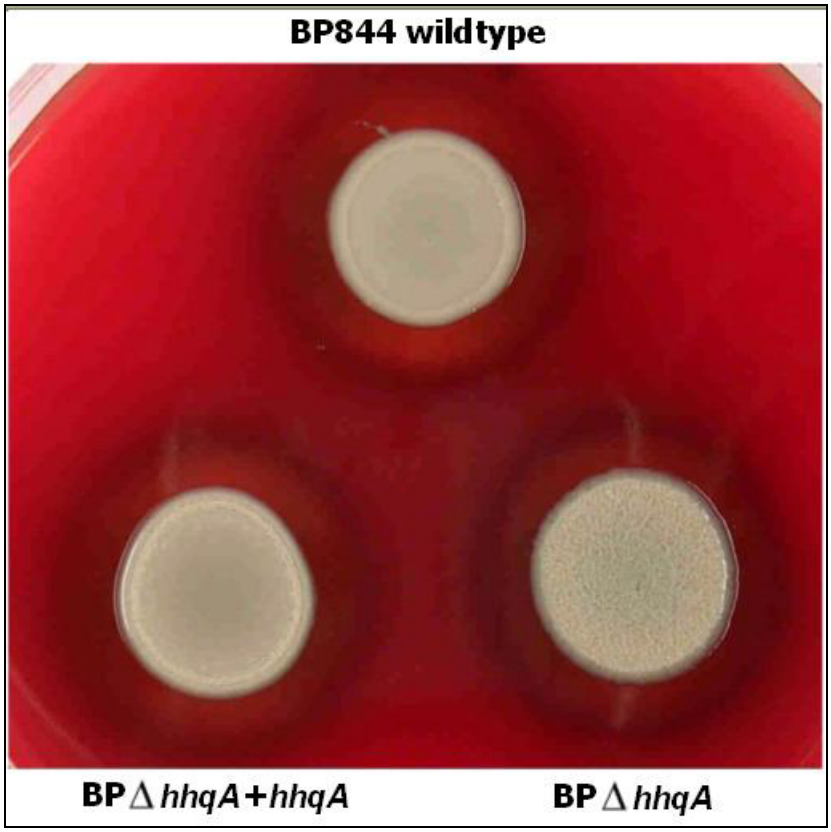
เพลท skim milk agar เพื่อดู exoproteases,

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

เพลท blood agar เพื่อดู hemolysin, และ

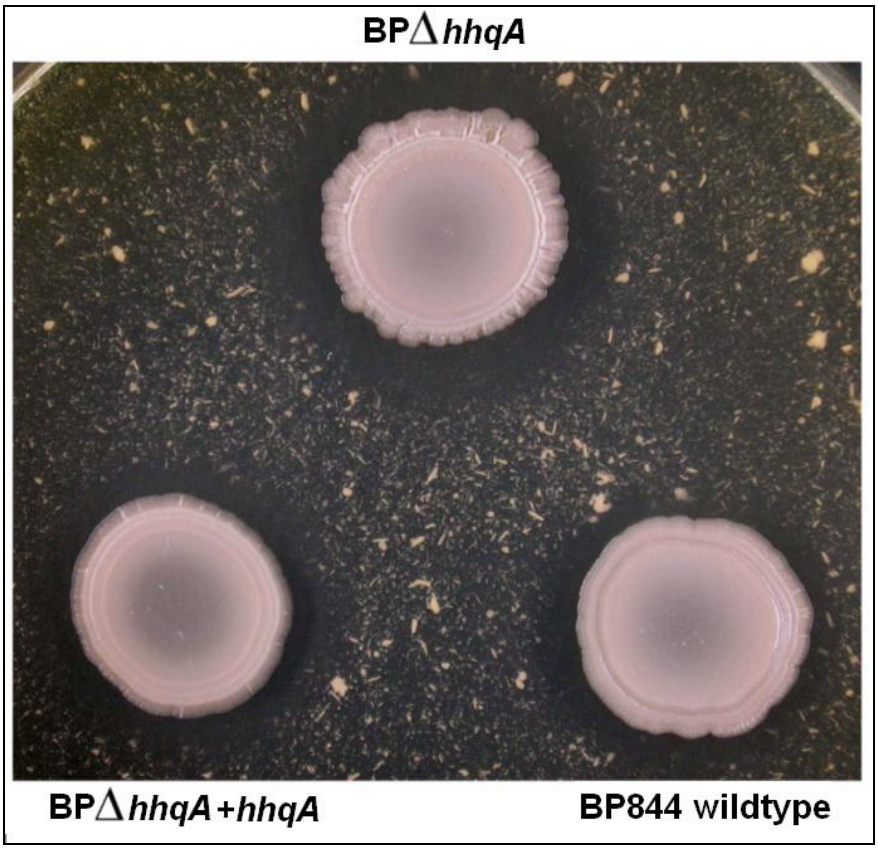
เพลท elastin agar เพื่อดู elastase

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 BpΔ*hhq*A, wildtype และ เมื่อทดแทนยีน *hhqA* มีขนาดโซนไม่แตกต่างกัน

แต่ทว่าในเพลท elastin agar พบว่าโซนของ สายพันธ์ BpΔ*hhq*A มีขนาด 9.8 mm ± 1 mm ใหญ่กว่า โซนของ สายพันธ์ wild type 844 ที่มีขนาดเพียง 5.3 mm ± 0.5 mm อย่างชัดเจน และเมื่อนำพลาสมิด pUC19 ที่มียีน *hhqA* ใส่ไปในสายพันธ์ BpΔ*hhq*A เพื่อทดแทนการทำหน้าที่ของ *hhqA* ก็ทำให้โซนลดขนาดลงมาเป็น 5.4 mm ± 0.5 mm เช่นเดียวกับเมื่อเติม HHQ ลงไปในเพลท สายพันธ์ BpΔ*hhq*A ก็ทำให้โซนลดลงมาขนาดเท่ากับ โซนของ wild type 844 เช่นกัน (รูป) แสดงว่าสาร HHQ ทำหน้าที่ใน negative regulation ของ elastase



รูปเพลท elastin agar แสดงว่า BpΔ*hhq*A 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 ซึ่งร่วมมือกับนักวิทยศาสตร์ 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 repint มาพร้อมกับรายงานนี้

Output ที่ได้จากโครงการ

สิ่งที่ได้ค้นพบ

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. พบว่า AHL autoiducer 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 autoiducerที่สร้างด้วยโปรตีน 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 โดยเฉพาะพิสูจน์ว่าการแสดงออกของโปรตีน DpsA ซึ่งทำให้เชื้อสามารถทนต่อ oxidative stress ได้นั้น ถูกควบคุมโดยระบบ bpsIR
6. 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 PQS ได้ สร้างได้แต่ตัวสารตั้งต้นของ PQS คือ สาร HHQ จึงตั้งชื่อยีนที่พบในเชื้อ *B. pseudomallei* ว่า *hhqABCDE*
2. พิสูจน์การสร้างสาร AHQ ของเชื้อแกรมลบ สายพันธ์ต่างๆ 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* รวมทั้งได้สร้างเชื้อกลายพันธ์ *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. โคโลนีของสายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A มีลักษณะเหี่ยวย่นมากกว่าโคโลนีของ *B. pseudomallei* สายพันธ์ wild type อย่างชัดเจน
   5.5. สายพันธ์ที่ถูก knockout ยีน *hhq*A 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.