

ผลของแมงกานีสต่อการแสดงออกของ virulence genes ในเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มีวแทนส์

นาง ประทานพร อารีราชการณ์ย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE EFFECT OF MANGANESE ON VIRULENCE GENE EXPRESSION IN *Streptococcus mutans*

Mrs. Pratanporn Arirachakaran

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Oral Biology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

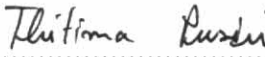
Academic year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492096

Thesis Title THE EFFECT OF MANGANESE ON VIRULENCE GENE EXPRESSION
IN *Streptococcus mutans*.
By Pratanporn Arirachakaran
Field of study Oral Biology
Thesis Advisor Associate Professor Em-on Benjavongkulchai
Thesis Co-advisor Dr. Somkiat Luengpailin
Thesis Co-advisor Professor Jeffrey A. Banas


Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree


.....Dean of the Faculty of Dentistry
(Assistant Professor Thitima Pusiri)

THESIS COMMITTEE

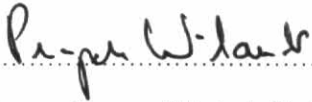
..... Chairman
(Associate Professor Prasit Pavasant, D.D.S, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Em-on Benjavongkulchai, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Somkiat Luengpailin, D.D.S., Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Jeffrey A. Banas, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Ratana Serinirach, D.D.S., Ph.D.)





..... Member
(Professor Prapon Wilairat, Ph.D.)

ประธานพร อารีราชการัญย์ : ผลของแมงกานีสต่อการแสดงออกของ virulence genes ใน เชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ (THE EFFECT OF MANGANESE ON VIRULENCE GENE EXPRESSION IN *Streptococcus mutans*) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. เอมอร์ เบญจวงค์ กุลชัย, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ทพ. ดร. สมเกียรติ เหลืองไพรินทร์, Professor Jeffrey A. Banas, 147 หน้า.

ทดสอบผลของแมงกานีสต่อการเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีนที่แสดงศักยภาพก่อโรคใน เชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ โดยการเลี้ยงเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ ซีโรทัยป์ซี สายพันธุ์ UA159, UA130, 3209, Ingbritt, LT11, ATCC25175 และ GS-5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด chemically defined medium ที่ขาดหรือมีแมงกานีสที่ความเข้มข้นต่างๆกันใน 3 สภาวะคือ บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5, คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ร่วมกับออกซิเจนเสริม และสภาวะขาดออกซิเจน นอกจากนี้ยังได้ ทดสอบผลของแมงกานีสต่อการสร้างไบโอฟิล์มในเชื้อ UA159 ภายใต้สภาวะขาดออกซิเจน พบว่าเชื้อสาย พันธุ์ GS-5 ไม่สามารถแพร่พันธุ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดแมงกานีส ส่วนสายพันธุ์ UA159, UA130, 3209 และ Ingbritt ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดขาดแมงกานีสเจริญได้น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม แมงกานีสในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ยิ่งไปกว่านั้นสายพันธุ์ 3209, Ingbritt, LT11 และ ATCC25175 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้หากเลี้ยงในภาวะที่มีออกซิเจน สายพันธุ์ UA159, UA130, 3209 และ Ingbritt สามารถเจริญดีในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดขาดแมงกานีสในภาวะขาดออกซิเจน ในขณะที่เชื้อสาย พันธุ์ LT11 และ ATCC 25175 เจริญได้น้อยมาก เชื้อสายพันธุ์ UA130 ถูกกระทบน้อยที่สุดจากการขาด แมงกานีส และพบว่าแมงกานีสในปริมาณสูงมีผลต่อเชื้อแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน แมงกานีสมีผลต่อ โครงสร้างของไบโอฟิล์มทั้งในภาวะที่มีและไม่มีน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลจาก microarray ของ เชื้อสายพันธุ์ UA159 แสดงให้เห็นว่าแมงกานีสมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะและ อันตรกิริยากับกลูแคน การเลือกศึกษาจีนบางชนิดด้วย northern blot, immunoblot และ RT-PCR ในเชื้อ ทั้งแปลงโตนิคและไบโอฟิล์มในอาหารที่ขาดหรือมีแมงกานีส 50 ไมโครโมลาร์ พบว่าภายใต้สภาวะขาด แมงกานีสทั้งเชื้อแปลงโตนิคและไบโอฟิล์มมีการแสดงออกของยีน *gbpC* และ *gtfB* ลดลง แต่ *wapA* เพิ่มขึ้น ส่วน *gbpA* และ *gbpD* มีปริมาณสูงเฉพาะในไบโอฟิล์ม และ *gtfC* มีปริมาณลดลงเฉพาะในแปลง โตนิค การแสดงออกของยีน *spaP* มีระดับต่ำในแปลงโตนิคแต่สูงในไบโอฟิล์ม ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็น ว่าปริมาณของแมงกานีสมีผลต่อการตั้งถิ่นฐานของเชื้อสเตรปโตค็อกคัส มิวแทนส์ และ/หรือศักยภาพในการ ก่อโรคฟันผุ สรุปได้ว่าแมงกานีสมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่แสดงศักยภาพก่อโรคซึ่งขึ้นกับสภาวะการ เจริญเติบโตของเชื้อ

สาขาวิชาชีววิทยาของปาก

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4476452032 : MAJOR ORAL BIOLOGY

KEY WORDS : *Streptococcus mutans*/ MANGANESE / GROWTH/
VIRULENCE FACTORS / GENE EXPRESSION


PRATANPORN ARIRACHAKARAN: THE EFFECT OF MANGANESE ON
VIRULENCE GENE EXPRESSION IN *Streptococcus mutans*.

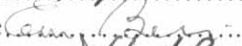
THESIS ADVISOR: ASSOCIATE PROFESSOR EM-ON BENJAVONGKULCHAI

THESIS CO-ADVISORS: SOMKIAT LUENGPAILIN, DDS, PH.D, PROFESSOR
JEFFREY A. BANAS, 147 pp.


Streptococcus mutans was tested for its ability to grow in the absence or presence of various concentrations of manganese. The effect of manganese on the expression of virulence genes in *Streptococcus mutans* was also tested. Planktonic cultures of *S. mutans* serotype c strains UA159, UA130, 3209, Ingbritt, LT11, ATCC 25175 and GS-5 were grown in semi-chemically defined medium in the absence or various concentrations of manganese under three different atmospheric conditions: 5% CO₂, O₂-enriched 5% CO₂, and anaerobic. Strain UA159 was tested for biofilm formation in the presence or absence of manganese under anaerobiosis. *S. mutans* GS-5 did not survive in manganese-depleted media. Strains UA159, UA130, 3209 and Ingbritt showed a decrease in population density when grown in manganese-depleted medium in CO₂. Furthermore, strain 3209, LT11 and ATCC 25175 did not multiply in an O₂-enriched 5% CO₂ atmosphere. When cultured in an anaerobic environment, the UA159, UA130, 3209 and Ingbritt strains showed significant growth in manganese-depleted media, whereas strains LT11 and ATCC 25175 grew poorly. Strain UA130 was affected the least by manganese deprivation. Strain variability was also observed in the presence of high levels of manganese. Both sucrose-dependent and -independent biofilm architectures were affected by the absence of manganese. A microarray analysis suggested the potential for manganese effects on virulence genes whose products mediate adherence and interactions with glucans. Selected virulence genes were investigated by performing northern blots, western blots, and reverse transcriptase polymerase chain reaction under conditions of planktonic and biofilm growth in manganese-depleted media or in media containing 50 μM manganese. Manganese-depleted conditions resulted in decreased expression of *gfpC* and *gtfB*, and increased expression of *wapA*, in both planktonic and biofilm cultures. The expression levels of *gfpA* and *gfpD* were enhanced in the manganese-depleted state, but only in biofilm cultures. The expression of *gtfC* was reduced in the absence of manganese only in planktonic cultures. The *spaP* gene was expressed less in manganese-depleted planktonic cultures but expressed more highly in manganese-depleted biofilm cultures. These results suggest that manganese levels may influence colonization with particular strains of *S. mutans* and/or its overall cariogenic potential. It can be concluded that manganese availability affects the expression of *S. mutans* virulence genes and that these effects depend on the growth state of the organism.

Field of study Oral Biology
Academic year 2006

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the chairman of Oral Biology Program, Associate Professor Prasit Pavasant for giving me the second chance to do what I did. My deepest gratitude and highest respect goes out to my mentors, Associate Professor Em-on Benjavongkulchai, for not only giving me invaluable advice but encouragement and her continued moral support to keep me going when I was in the darkness, Dr. Somkiat Luengpailin, who introduced me to the whole new world of how manganese could affect microorganisms and who provided advice and encouragement when it was most required, Professor Jeffrey A. Banas for his guidance, kindness, and endless support to get me through such challenging work while I was in his lab and thereafter. He was always available when I needed his advice. His integral view on research has made a deep impression on me.

I would like to express my gratefulness to previous and present faculty members at the Department of Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand. To mention a few: Associate Professor Ratana Serinirach and Associate Professor Porjai Ruangsri for their generous support and for giving me the opportunity to continue to do what I did.

I am grateful to those whom I have worked with in the Microbiology and Biochemistry Departments, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University. I thank all the members in the Banas lab at the Center for Immunology and Microbial Disease, Albany Medical College, Albany, New York. I have gained so much from such a short period of time, not just academically, but also through their way of life, helpfulness and support. Thank you Tamara, Tracey, Sarah, Dave, Min, Aparna, Amanda, Kristen and Seth. Many have been my surrogate family during my stay there. I would like to thank many special friends who have touched my life in so many aspects, the valuable lessons and experiences that I have learned through the course of study. I recognize also the valuable contribution made by Professor Dragana Ajdic at the Department of Microbiology, University of Oklahoma Health Science Center on the *S. mutans* UA159 custom Affymetrix array chips. I would also like to thank all members of my thesis committee for taking effort in reading and providing me with valuable comments.

Thank to my mother, Mrs. Sukont Prapaiwong, and my late father, Dr. Thammanoon Prapaiwong, for giving me a gift of life. They have taught me to love learning and to work hard towards accomplishing my aims in life. They have formed part of my vision and taught me good things that really matter in life. The memory of my father still provides a persistent inspiration for my life's journey. Last but not least, I am indebted to members of my family, my husband, Dr. Srihasak Arirachakaran, and my two precious daughters, Amy Alisara and Ally Achaya for their understanding, their endless patience and putting up with me all these years since I have been back in school. Without you, I would not have had the courage to do this.

Going back to school for a Ph.D. was one of the best decisions I've made. It is a sacred task that has guided me towards seeing the good in everything and helped keep me going to be a constructive part of a whole.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS.....	vii
LISTS OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I. INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II. LITERATURE REVIEW.....	2
Historical background.....	2
Taxonomy.....	2
Epidemiology.....	8
Cariogenesis.....	8
Virulence of <i>Streptococcus mutans</i>	9
Exoenzymes and glucan-binding proteins.....	9
Surface proteins.....	11
Acidogenicity and acid tolerance.....	12
Production of intracellular polysaccharides.....	12
Trace metal and dental caries.....	13
Cellular function of manganese.....	13
Hypotheses.....	16
Objectives of the study.....	16
CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS.....	18
Bacterial Strains and Media.....	18
Culture Conditions.....	19
Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) and Image Processing.....	23
Protein Extraction.....	23
Western Immunoblot.....	24

Gtf and Ftf Gel Activity Assay.....	25
Extraction of Total RNA.....	25
Microarrays.....	26
Northern Blot Analysis.....	27
Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.....	28
Adherence Assay.....	30
CHAPTER IV. RESULTS.....	31
The effect of manganese on planktonic growth.....	31
The effect of manganese on virulence genes of <i>S. mutans</i>	47
Microarrays.....	47
Western Immunoblot.....	50
Northern Blot Analysis.....	51
Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.....	52
Adherence Assay.....	54
Gtf and Ftf Gel Activity.....	55
The effect of manganese on biofilm architecture	56
CHAPTER V. DISCUSSION.....	61
Conclusion.....	68
Future study.....	69
REFERENCES.....	70
APPENDIX.....	86
CURRICULUM VITAE.....	147

LIST OF TABLES

Table		Page
Table 2.1	Differential characteristics of mutans streptococci group	5
Table 2.2	Classification of the mutans streptococci group	7
Table 3.1	Modification of Terleckyj's medium	21
Table 3.2	PCR primers used in this study.....	29
Table 4.1	Maximum optical densities \pm standard error of mean (S.E.) for <i>S. mutans</i> cultures grown with and without manganese in different atmospheres.....	32
Table 4.2	Categorization of strains according to conditions.....	32
Table 4.3	Percent growth yield in Mn-depleted medium.....	45
Table 4.4	Selected microarray results of <i>S.mutans</i> genes.....	48
Table 4.5	Adherence to saliva-coated polystyrene wells.....	54
Table 4.6	COMSTAT comparisons of quantitative differences in <i>S.</i> <i>mutans</i> UA159 biofilms formed in the presence and absence of manganese.....	60

LIST OF FIGURES

Figure		Page
Figure 2.1	Phylogenetic relationship among oral streptococci group.....	3
Figure 2.2	Diagram of cell wall components.....	6
Figure 2.3	Schematic diagram of research work.....	17
Figure 4.1	Growth curves of <i>S. mutans</i> culture in 5% CO ₂ atmosphere.....	33
	Figure 4.1a <i>S. mutans</i> UA159.....	33
	Figure 4.1b <i>S. mutans</i> UA130.....	34
	Figure 4.1c <i>S. mutans</i> 3209.....	34
	Figure 4.1d <i>S. mutans</i> Ingbritt.....	35
	Figure 4.1e <i>S. mutans</i> LT11.....	35
	Figure 4.1f <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	36
Figure 4.2	Growth curves of <i>S. mutans</i> culture in O ₂ -enriched 5% CO ₂ atmosphere.....	38
	Figure 4.2a <i>S. mutans</i> UA159.....	38
	Figure 4.2b <i>S. mutans</i> UA130.....	38
	Figure 4.2c <i>S. mutans</i> 3209.....	39
	Figure 4.2d <i>S. mutans</i> Ingbritt.....	39
	Figure 4.2e <i>S. mutans</i> LT11.....	40
	Figure 4.2f <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	40
Figure 4.3	Growth curves of <i>S. mutans</i> cultures in anaerobic atmosphere.....	42
	Figure 4.3a <i>S. mutans</i> UA159.....	42
	Figure 4.3b <i>S. mutans</i> UA130.....	42
	Figure 4.3c <i>S. mutans</i> 3209.....	43
	Figure 4.3d <i>S. mutans</i> Ingbritt.....	43
	Figure 4.3e <i>S. mutans</i> LT11.....	44
	Figure 4.3f <i>S. mutans</i> ATCC 25175.....	44
Figure 4.4	Western immunoblot.....	51
Figure 4.5	Northern Blot Analysis.....	52
Figure 4.6	Reverse transcriptase PCR of RNA from planktonic cultures grown in Mn-supplemented or Mn-depleted media.....	53

Figure 4.7	Reverse transcriptase PCR of RNA from biofilm cultures grown in Mn-supplemented or Mn-depleted media.....	54
Figure 4.8	Reverse transcriptase PCR of RNA from biofilm cultures grown in Mn-supplemented or Mn-depleted media. Total RNA from bacteria were serially diluted prior to amplification with <i>rgg</i> -specific primers	55
Figure 4.9	Gtf and Ftf Gel activity Assay.....	56
Figure 4.10	Whole-well images of biofilms formed in polystyrene dishes.....	58
	Figure 4.10a 5% sucrose biofilms.....	58
	Figure 4.10b Non-sucrose biofilms formed over saliva coating.....	58
Figure 4.11	Confocal microscopic images of fluorescently stained bacteria adhered to the substratum.....	59
	Figure 4.11a Biofilms at the substratum after growth in SCDM plus 5% sucrose and without manganese or with manganese.....	59
	Figure 4.11b Biofilms grown in SCDM within saliva-coated wells without manganese or with manganese.....	59

ABBREVIATIONS

BHI	Brain heart infusion
CSLM	Confocal scanning laser microscopy
CSPD	Chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase detection
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DIG-11dUTP	Digoxigenin-11-uridine-triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FTFs	Fructosyltransferase
<i>ftf</i>	Gene encoding fructosyltransferase
GBL	Glucan binding lectin
Gbp	Glucan binding protein
<i>gbp</i>	Gene encoding glucan binding protein
<i>gpmA</i>	phosphoglycerate mutase gene
GSTB agar	Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar
GTF	Glucosyltransferase enzymes
<i>gtf</i>	Gene encoding glucosyltransferase
<i>gyrA</i>	Gene encoding gyrase A subunit
IPS	Intracellular polysaccharides
kDa	Kilodalton
LTA	Lipoteichoic acid
MS agar	Mitis salivarius agar
MSB	Mitis salivarius agar with bacitracin

MSKB	Mitis salivarius agar, sorbitol, kanamycin sulfate, bacitracin and potassium tellurite.
NAES	Sodium acetate, EDTA, SDS buffer
NRAMP	Natural resistance associated macrophage protein
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGM	Phosphoglycerate mutase
PGP	Polyglycerol phosphate
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCDM	Semi-chemically defined medium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sIgA	Secretory immunoglobulin A
SSC solution	Sodium chloride and trisodium citrate solution
SOD	Superoxide dismutase
TYCSB agar	Trypticase, yeast extract, cysteine
TSY20B	Trypticase soy agar, yeast extract, sucrose and bacitracin