การแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 และ LipL32 ในไต และตับ ของหนูแฮมเตอร์ที่ได้รับเชื้อแลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรค

นางสาวอลิษา โล่วาณิชย์พัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mRNA EXPRESSION OF TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 AND LipL32 IN KIDNEY AND LIVER OF HAMSTERS INFECTED WITH PATHOGENIC *LEPTOSPIRA*.

Miss Alisa Lowanitchapat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511006

Thesis Title	mRNA EXPRESSION OF TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 AND LipL32 IN KIDNEY AND LIVER OF HAMSTERS INFECTED WITH PATHOGENIC *LEPTOSPIRA*
By	Miss Alisa Lowanitchapat
Field of Study	Medical Science
Thesis Principal Advisor	Associate Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of the Faculty of Medicine
(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)

..... Thesis Principal Advisor
(Associate Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)

..... External Member
(Associate Professor Pattama Ekpo, Ph.D.)

..... Member
(Amornpun Sereemaspun, M.D., Ph.D.)

อลิษา โล่วาณิชย์พัฒน์: การแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 และ LipL32 ในไต และตับ ของหนูแฮมเตอร์ที่ได้รับเชื้อแลปโตสไปร่าที่ก่อให้เกิดโรค. (mRNA EXPRESSION OF TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 AND LipL32 IN KIDNEY AND LIVER OF HAMSTERS INFECTED WITH PATHOGENIC *LEPTOSPIRA*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.จินตนา จิรถาวร, 100 หน้า.

โรคแลปโตสไปโรซิสหรือโรคฉี่หนูเป็นโรคติดต่อจากสัตว์มาสู่คน เกิดจากการติดเชื้อแลปโตสไปร่าซึ่งเป็นแบคทีเรียประเภทเกลียว ผู้ที่ติดเชื้ออาจไม่แสดงอาการหรือมีอาการ เช่น มีไข้ อาเจียน ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ไปจนถึงอาการรุนแรง เช่น ตับและไตวาย และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ กลไกการเกิดพยาธิสภาพโดยการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากการสร้างเอนไซม์ และสารพิษมาทำลายเนื้อเยื่อแล้วยังมีรายงานสนับสนุนว่าการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันน่าจะมีบทบาทในการก่อพยาธิสภาพ มีการศึกษาการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยตัวเชื้อและส่วนประกอบของเชื้อโดยส่วนประกอบของเชื้อที่มีการศึกษามากคือโปรตีนที่ผิวเซลล์ส่วนนอก โดยเฉพาะ LipL32 ในรายงานส่วนใหญ่ทำการศึกษาการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง สำหรับการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α, IL-10, TGF-β และ IP-10 ในไตและตับของหนูแฮมเตอร์โดยตรง เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาต่อไปถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของไซโตไคน์หรือคีโมไคน์ในการเกิดพยาธิสภาพ โดยเลือกศึกษาในไตและตับซึ่งเป็นอวัยวะที่มักมีรายงานว่าพบพยาธิสภาพในผู้ป่วยติดเชื้อแลปโตสไปร่าโดยเฉพาะในรายที่มีอาการรุนแรง

การศึกษาทำโดยฉีดเชื้อ *Leptospira interrogans* serovar Pyrogenes เข้าไปในช่องท้องของแฮมเตอร์ เก็บเนื้อเยื่อไตและตับหลังจากฉีดเชื้อ 3, 5 และ 7 วัน มาสกัด RNA และนำไปทำ RT-PCR เพื่อดูการแสดงออกของ mRNA ของ TNF-α, IL-10, TGF-β และ IP-10 นอกจากนี้ยังศึกษาการแสดงออกของ LipL32 mRNA ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีรายงานว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ จากการศึกษาพบว่าการแสดงออกของ LipL32 ทั้งในไตและตับไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ดี การแสดงออกของไซโตไคน์/คีโมไคน์แตกต่างกันคือการติดเชื้อแลปโตสไปร่ากระตุ้นให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ IL-10 และ IP-10 ในไต แต่ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของทั้ง IL-10 และ IP-10 ได้ในตับทั้งๆที่การแสดงออกของ TNF-α และ TGF-β เพิ่มมากขึ้นในตับ การศึกษาเพิ่มเติม เช่น การศึกษาตำแหน่งที่พบการแสดงออกของไซโตไคน์เพื่อดูความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพและการศึกษาการแสดงออกของส่วนประกอบของเชื้อส่วนอื่นๆ นอกจากจะนำไปสู่ความเข้าใจการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแลปโตสไปร่าเพิ่มขึ้นเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการการผลิตวัคซีนป้องกันโรคแล้ว ยังมีประโยชน์ในการศึกษากลไกการเกิดพยาธิสภาพด้วย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....อลิษา โล่วาณิชย์พัฒน์.....

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

4974803830 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: LEPTOSPIROSIS / PATHOGENESIS / CYTOKINE / LipL32

ALISA LOWANITCHAPAT: mRNA EXPRESSION OF TNF-α, IL-10, TGF-β, IP-10 AND LipL32 IN KIDNEY AND LIVER OF HAMSTERS INFECTED WITH PATHOGENIC *LEPTOSPIRA*. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. CHINTANA CHIRATHAWORN, Ph.D., 100 pp.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by spirochetes of the genus *Leptospira*. The spectrum of human disease caused by leptospires is extremely wide, ranging from sub-clinical infection to a severe syndrome of multi-organ infection with high mortality. Leptospirosis pathogenesis mechanisms are not clearly understood. Various enzymes and toxins have been identified and suggested to be involved in tissue damage. In addition, it has been demonstrated that immune response to *Leptospira* may induce pathologies in infected organs. Cytokine and chemokine induction by *Leptospira* or *Leptospira* components have been demonstrated. Various *Leptospira* components have been studied; however, the most widely studied components are outer membrane proteins, especially LipL32. Most studies on cytokine induction by *Leptospira* were done *in vitro*. In this study, the expression of mRNA of TNF-α, TGF-β, Il-10 and IP-10 in kidneys and livers, the commonly affected organs in Leptospirosis were investigated.

Leptospira interrogans serovar Pyrogenes was intraperitoneally injected into Golden Syrian Hamsters. Kidney and liver tissues were collected at 3, 5 and 7 days after injection. RNA was extracted from tissues for RT-PCR to demonstrate cytokine/chemokine expression. The expression of LipL32 in kidneys and livers was also investigated since it has been demonstrated that this protein induced cytokine/chemokine expression. This study demonstrated that LipL32 was expressed in both kidneys and livers of infected hamsters. The level of LipL32 expression was similar in both tissues. However, the pattern of cytokine mRNA expression was different. IL-10 and IP-10 expression was induced in kidneys whereas they were undetectable in livers. TNF-α and TGF-β expression was enhanced in livers from infected hamsters. Further studies such as localization of cytokine expression in order to demonstrate the correlation with pathologies in kidneys and livers and the study of expression of other *Leptospira* components will provide further information not only on the immune response to *Leptospira* but also on pathogenesis of this infectious disease.

Field of study: Medical Science Student's signature: Alisa Lowanitchapat

Academic year: 2008 Principal advisor's signature: .....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to the following whose gave me the possibility to complete my thesis.

I would like to sincerely thank my advisor, Associate Professor Dr. Chintana Chirathaworn, Division of Immunology, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her excellent instructions, guidance and support throughout this thesis.

My thankfulness is also extended to my thesis committee, Associate Professor Dr. Vilai Chentanez, the Associate Dean of Graduate Affairs, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for kindly accepting to be the chairman of my thesis committee, Associate Professor Dr. Pattama Ekpo for being on my thesis committee and providing the *Leptospira* isolate to use in this study and Dr. Amornpun Sereemaspun for being on my thesis committee and for his encouragement.

I wish to thank Professor Dr. Yong Poovorawan, Dr. Sunchai Payungporn, Ms. Apiradee Theamboonlers, Ms.Woradee Luchachaiwong, Ms. Pattaratida Sa-nguanmoo and staffs at Viral Hepatitis Research Unit, Pediatric Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for kindly allowing me to utilize the real-time PCR equipment with invaluable advice.

I would like to thank Chulalongkorn University Medical Research Center (Chula MRC) and Division of Immunology, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for providing some research facilities.

I would like to thank all staffs at Division of Immunology, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their assistants and friendships.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents and my family for their love, understanding and encouragement extended throughout my study.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI)..... iv

ABSTRACT (ENGLISH)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... x

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF ABBREVIATIONS..... xiii

CHAPTER I. BACKGROUND..... 1

CHAPTER II. LITERRATURE REVIEW..... 6

2.1 Characteristic of *Leptospira*..... 8

2.2 Culture Methods..... 9

2.3 Molecular Biology..... 10

2.4 Taxonomy and Classification..... 10

2.5 Epidemiology..... 12

2.6 Clinical Features of Leptospirosis..... 16

2.6.1 Anicteric leptospirosis..... 16

2.6.2 Icteric leptospirosis..... 17

2.7 Diagnosis..... 18

2.7.1 Microscopic Demonstration..... 18

2.7.2 Molecular diagnosis..... 18

2.7.3 Serologic diagnosis..... 18

2.8 Pathogenesis..... 19

2.9 Immune response in *Leptospira* infection..... 26

CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS..... 31

3.1 Equipments..... 31

3.2 Chemicals and kits..... 32

Page

3.3 Bacteria and animals..... 33
3.4 RNA extraction..... 33
3.5 RT-PCR for *Leptospira* and hamster gene expression..... 34
3.5.1 cDNA synthesis..... 34
3.5.2 PCR..... 35
3.5.2.1 PCR for *Leptospira* 16S rRNA expression..... 35
3.5.2.2 PCR for LipL32 expression..... 35
3.5.2.3 PCR for HPRT expression..... 35
3.5.2.4 PCR for TNF-α expression..... 36
3.5.2.5 PCR for TGF-β expression..... 36
3.5.2.6 PCR for IL-10 expression..... 36
3.5.2.7 PCR amplification of IP-10..... 36
3.5.3 Agarose gel electrophoresis..... 37
3.5.4 DNA purification and sequencing..... 37
3.6 Real-time PCR for quantitation of LipL32 and IP-10 mRNA levels in hamster kidneys..... 38
3.6.1 Real-time PCR for quantitation of LipL32 mRNA levels..... 39
3.6.2 Real-time PCR for quantitation of IP-10 mRNA levels..... 39
CHAPTER IV. RESULTS..... 41
4.1 *Leptospira* 16S rRNA detection..... 41
4.2 LipL32 mRNA expression in kidneys and livers..... 44
4.3 HPRT, TNF-α, TGF-β, IL-10 and IP-10 mRNA expression..... 47
4.3.1 HPRT mRNA expression..... 47
4.3.2 TNF-α mRNA expression..... 50
4.3.3 TGF-β mRNA expression..... 55
4.3.4 IL-10 mRNA expression..... 60
4.3.5 IP-10 mRNA expression..... 64
4.4 Relative expression levels of LipL32 in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* determined by real-time PCR..... 68

Page

4.5 Relative expression levels of IP-10 in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* determined by real-time PCR..... 69

CHAPTER V. DISCUSSIONS..... 71

CHAPTER VI. CONCLUSION..... 76

REFERENCES..... 77

APPENDICES..... 96

APPENDIX A..... 97

APPENDIX B..... 98

BIOGRAPHY..... 100

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Molecular classification of Leptospira species	12
2	Primer sequences and product size	40

LISTS OF FIGURES

Figure **Page**

1 Reported cases and morbidity rate (per100,000 populations) of leptospirosis by year in Thailand, 1988-2006 7

2 The characteristic of *Leptospira interrogans* 8

3 16S rRNA expression in kidneys and livers of uninfected hamsters 41

4 16S rRNA expression in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 42

5 16S rRNA expression in livers of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 43

6 Detection of LipL32 gene expressions in uninfected kidneys and livers 44

7 LipL32 gene expression in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 45

8 LipL32 gene expression in livers of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 46

9 HPRT mRNA expression in kidneys and livers of uninfected hamsters 47

10 HPRT mRNA expression in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 48

11 HPRT mRNA expression in livers of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 49

12 TNF-α expression in kidneys and livers of uninfected hamsters 51

13 TNF-α mRNA expression in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 52

14 TNF-α mRNA expression in livers from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 54

15 TGF-β mRNA expression in kidneys and livers of uninfected hamsters 56

16 TGF-β mRNA expression in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira* 57

Figure **Page**

17 TGF-β mRNA expression in livers from hamsters infected with pathogenic *Leptospira*..... 59

18 IL-10 expression in kidneys and livers of uninfected hamsters..... 60

19 IL-10 mRNA expression in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira*..... 61

20 IL-10 mRNA expression in livers from hamsters infected with pathogenic *Leptospira*..... 63

21 IP-10 mRNA expression in kidneys and livers from uninfected hamsters..... 65

22 IP-10 mRNA expression in kidneys from hamsters infected with pathogenic *Leptospira*..... 66

23 IP-10 mRNA expression in livers of hamsters infected with pathogenic *Leptospira*..... 68

24 The relative expression level of LipL32 to 16S rRNA in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* by real-time quantitative SYBR-PCR..... 69

25 The relative expression level of IP-10 to HPRT in kidneys of hamsters infected with pathogenic *Leptospira* by real-time quantitative SYBR-PCR..... 70

LIST OF ABBREVIATIONS

%	Percentage
^{o}C	Degree Celsius
µg	Microgram
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
bp	Base pair
cDNA	Complementary DNA
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DNA	Deoxyrironucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
g (centrifugation speed)	Gravity
h.	Hour
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IL-10	Interleukin-10
IP-10	Interferon-inducible protein 10
kb	Kilo Base
L.	*Leptospira*
LPS	Lipopolysaccharide
LipL32	32-kDa leptospiral outer membrane lipoprotein
M	Molar
MAT	Microscopic agglutination test

MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
mM	Millimolar
mg	Milligram
$MgCl_2$	Magnesium Chloride
ml	Milliliter
nM	Nanomolar
OD	Optical density
OMP	Outer membrane protein
OmpL 1	Leptospiral outer membrane protein 1
PCR	Polymerase chain reaction
RANTES	Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
rRNA	Ribosomal RNA
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
RT	Reverse transcription
spp.	Specie
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TGF-β	Transforming growth factor beta
u.	unit
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta