Thesis Title	Production of Lactoferrin-producing *Bacteroides uniformis* and Its Effect on Preneoplastic Lesion of Rat Colon Cancer Induced by Azoxymethane
Auther	Mr. Teera Chewonarin
Ph. D.	Biochemistry

Examining committee	Assoc. Prof. Dr. Usanee Vinitketkumnuen	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert	Member
	Assoc. Prof. Dr. Nirush Lertprasertsuke	Member
	Assist. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	Member
	Assoc. Prof. Dr. Porn-ngarm Limtrakul	Member
	Assoc. Prof. Dr. Puangrat Yongvanit	Member
	Prof. Dr. Yoshinari Ohnishi	Member

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Abstract

The human lactoferrin gene (*hLF*) was subcloned into a pVAL-1 to construct lactoferin-producing *Bacteroides uniformis*. A *Bam*HI/*Xho*I digested fragment from a pSKLF and a *nanH* (*Bacteroides* neuraminidase) promoter fusion *hLF* were inserted to the pVAL-1 produced recombinant plasmids named pVLFK and pVLFNp, respectively. Then, with *E. coli* strain HB101 (R751) carrying the pVAL-1, pVLFK or pVLFNp, individually, those genes were transferred into *B. uniformis* BU1001. The erythromycin resistant strains were selected and isolated as a plasmid containing strain. By using the PCR technique, the presence of *hLF* was shown as a 2.1Kb PCR product in *B. uniformis* strains BU1001 (pVLFK) and BU1001 (pVLFNp). The results suggested

that the *hLF* in the pVAL-1 was stable and also replicable in *B. uniformis*. The expression of the *hLF* was assessed by Northern hybridization and the gene product was subsequently detected by Western blot analysis. Human *LF* mRNA, 2.2 kb, was detectable in *B. uniformis* strain BU1001 (pVLFK) and BU1001 (pVLFNp), but not in strain BU1001 (pVAL-1). The transcriptional level of the *hLF* gene was lower in the strain harboring pVLFK than pVLFNp. Although the transcriptional level in *B. uniformis* strain BU1001 (pVLFK) seemed to be low, the specific protein in only this strain was detectable in a cell free extract using rabbit anti-human lactoferrin antisera. Subsequently, the result in this study indicated that the recombinant hLF (rhLF) was presented on the bacterial outer-membrane. However this protein could not be seen in culture supernatant, and the size of gene product in this strain was quite similar to standard commercial human LF (Sigma-Aldich) at 80 kDa. The results revealed that a lactoferrin gene bearing plasmid was expressed in only *B. uniformis* strain BU1001 (pVLFK). This phenomenon could not be observed in *B. uniformis* strain BU1001 (pVLFNp), which revealed a failure of translation for rhLF.

B. uniformis strain BU1001 (pVAL-1) or BU1001 (pVLFK) was individually co-cultivated with *E. coli* strain HB101. A culture of *B. uniformis* strain BU1001 (pVLFK) inhibited the growth of *E. coli* strain HB101 *in vitro* more than in the culture of strain BU1001 (pVAL-1). It was suggesting that the *B. uniformis* that expressed rhLF possessed a biological activity. To determine the effect of lactoferrin-producing *B. uniformis* on the formation of azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF), putative neoplastic lesions, 23-hours cultures of *Bacteroides* were given to rats as drinking water. Rats were injected AOM at a dose 15 mg/kg body weight twice at the second and third week of the administration of bacterial culture. The numbers of ACF and those having more than three crypts per focus significantly increased in the group treated by a culture of *B. uniformis* strain BU1001 (pVAL-1), compared with those in the non-treated group. However, rats treated with the culture of strain BU1001(pVLFK) showed a significantly lower number of ACF than rats treated with a culture of strain BU1001(pVAL-1) (34% reduction, $p<0.05$). The results suggested that rhLF-producing *B. uniformis* modulated the formation of ACF in the rat colon induced by AOM. The activity of fecal β-glucuronidase had not correlated with the ACF formation.

The strains of *Bacteroides*, which had no effect on the ACF formation in AOM-treated rat colon, were *B. eggethrii* ATCC27754, *B. thetaiotaomicron* Werner E50, *B. uniformis* ATCC8492, *B. vulgatus* ATCC8482, *B. caccae* JMC9498 and *B. stercoris* JMC9496. Harmful *Bacteroides* strains including *B. uniformis* BU1001, *B. distasonis* ATCC8503 and *B. ovatus* ATCC8483 promoted the formation of ACF. On the other hand, the strains that reduced the number of ACF in the rat colon were *B. thetaiotaomicron* KYU 1, *B uniformis* KYU 2, *B. fragillis* KYU 3, *B. ovatus* KYU 4 and *B. merdae*. *B. uniformis* strain KYU 2 was subsequently selected as a host for expressing *hLF* and it was investigated for a modulating effect on the AOM-induced ACF formation in the rat colon. The results showed that there was no significant inhibitory effect on the number of ACF between those in the AOM-treated group ($P>0.05$). It could be interpreted that *B. uniformis* strain KYU 2 was not the appropriate strain for expressing *hLF*.

In conclusion, human lactoferrin could be expressed in a bacterial system using *B. uniformis* as a host. The transconjugant *B. uniformis* had the bacteriostatic against *E. coli* HB101, which possible to modulate the intestinal bacterium profile and improve the health of the host. Lactoferrin-producing *B. uniformis* has the ability to modulate the formation of preneoplastic lesions in colon cancer induced by the colon carcinogen.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การสร้างแบคทีเรียสายพันธุ์แบคทีรอยดีส์ ยูนิฟอร์มิส ที่สามารถผลิตสารแลคโตเฟอรินและผลต่อการป้องกันรอยโรคก่อนเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับสารเอซอกซีมีเทน
ชื่อผู้เขียน	นายธีระ ชีโวนรินทร์
วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชาชีวเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ	กรรมการ
รศ. ดร. นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข	กรรมการ
ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย	กรรมการ
รศ. ดร. พรงาม ลิ้มตระกูล	กรรมการ
รศ. ดร. พวงรัตน์ ยงวณิชย์	กรรมการ
Prof. Dr. Yoshinari Ohnishi	กรรมการ

บทคัดย่อ

การสร้างแบคทีรอยดีส์ยูนิฟอร์มิส (*Bacteroides uniformis*) ให้สามารถผลิตแลคโตเฟอริน โดยทำการโคลนยีนของแลคโตเฟอริน (*hLF*) เข้าสู่พลาสมิด pVAL-1 โดยใส่ยีนแลคโตเฟอรินที่ย่อยจากพลาสมิด pSKLF ด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI และ *Xho*I และยีนแลคโตเฟอรินที่เชื่อมต่อกับ promotor ของ *nanH* (เอ็นไซม์ neuraminidase จาก *Bacteroides*) เข้าไปใน พลาสมิด pVAL-1 ได้พลาสมิด 2 ชนิดคือ pVLFK และ pVLFNp ตามลำดับ จากนั้น *E. coli* สายพันธุ์ HB101(R751) ที่มีพลาสมิด pVAL-1 pVLFK หรือ pVLFNp จะถ่ายยีนเหล่านี้เข้าสู่ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 จากนั้นทำการคัดเลือกเซลล์ที่ดื้อต่อ erythromycin สำหรับเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด และเมื่อตรวจสอบยีนแลคโตเฟอรินในพลาสมิดที่แยกออกมาจากสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยเทคนิค PCR พบยีนที่ถูก

เพิ่มจำนวนขนาด 2.1 กิโลเบสใน *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVLFK) และ BU1001 (pVLFNp) สามารถสรุปได้ว่ายีนแลคโตเฟอรินในพลาสมิด pVAL-1 มีความเสถียรและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน *B. uniformis* เมื่อทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธี Northern Blot Hybridization และโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนก็ตรวจสอบโดยวิธี Western blot analysis สามารถตรวจสอบพบ mRNA ของแลคโตเฟอริน ขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบสใน *B. uniformis* สายพันธุ์ pVLFK และ pVLFNp แต่ไม่พบในสายพันธุ์ pVAL-1 พบว่าระดับของ mRNA ของแลคโตเฟอรินในสายพันธุ์ pVLFK ต่ำกว่าในสายพันธุ์ pVLFNp แต่ถึงแม้ว่าการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ในสายพันธุ์ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVLFK) จะค่อนข้างต่ำแต่ว่าสามารถตรวจสอบการสร้างแลคโตเฟอรินโดยใช้แอนตบอดีส์ต่อแลคโตเฟอรินของมนุษย์ในส่วนของเซลล์เฉพาะสายพันธุ์นี้เท่านั้นและต่อมาได้พบว่าแลคโตเฟอรินที่ผลิตได้อยู่บริเวณผนังเซลล์ด้านนอก อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบได้ในส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยมีขนาดประมาณ 80 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับแลคโตเฟอรินบริสุทธิ์ที่ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldich ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ายีนแลคโตเฟอรินสามารถแสดงออกและสร้างเป็นโปรตีนสมบูรณ์ได้ใน *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVLFK) เท่านั้น ส่วน *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVLFNp) ไม่สามารถแปลระหัสเพื่อสร้างแลคโตเฟอรินได้

ได้นำ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVAL-1) หรือ BU1001 (pVLFK) แต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงร่วมกับ *E. coli* สายพันธุ์ HB101 พบว่า *B. uniformis* BU1001 (pVLFK) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* สายพันธุ์ HB101 ได้มากกว่า *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVAL-1) แสดงให้เห็นว่า *B. uniformis* ที่สร้างแลคโตเฟอรินมีผลทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของ *E. coli* เมื่อศึกษาต่อไปถึงผลของ *B. uniformis* ที่ผลิตแลคโตเฟอรินต่อการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เรียกว่า aberrant crypt focus (ACF) ที่เหนี่ยวนำโดยเอซอกซีมีเทน (AOM)โดยการให้เซลล์ของ *B. uniformis* แต่ละสายพันธุ์ในน้ำเลี้ยงตลอดการทดลอง หนูขาวจะได้รับAOM ขนาด 15 มก./ กก. น้ำหนักตัวสองครั้งในสัปดาห์ที่ 2 และสัปดาห์ที่ 3 หลังจากเริ่มต้นให้เซลล์แบคทีเรีย พบว่าจำนวน ACF และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 crypt/focus เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มของหนูขาวที่ได้รับน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVAL-1) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำแต่อย่างไรก็ตามหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำเลี้ยงของ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVLFK) มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (34% ที่ $p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเลี้ยงของ *B. uniformis* สายพันธุ์ BU1001 (pVAL-1) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า *B. uniformis* ที่ผลิตแลคโตเฟอรินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่ได้รับ AOM และพบว่าการทำงานของเอ็นไซม์ β-glucuronidase ในอุจจาระไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด ACF

Bacteroides สายพันธุ์ที่ไม่มีผลต่อการเกิด ACF ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับ AOM ได้แก่ *B. eggethrii* ATCC27754, *B. thetaiotaomicron* Werner E50, *B. uniformis* ATCC8492, *B. vulgatus* ATCC8482, *B. caccae* JMC9498, *B. stercoris* JMC9496ในขณะที่ *Bacteroides* ในกลุ่มของ *B. uniformis* BU1001, *B. distasonis* ATCC8503 และ *B. ovatus* ATCC8483 จะเพิ่มจำนวนของ ACF ในลำไส้ของหนูขาวแต่ในทางตรงกันข้ามยังมีสายพันธุ์ *Bacteroides* อีกกลุ่มหนึ่งซึ่งสามารถลดการเกิด ACF ในลำไส้ของหนูขาวได้ซึ่งได้แก่ *B. uniformis* KYU 1, *B. uniformis* KYU 2, *B. fragillis* KYU 3, *B. ovatus* KYU 4 และ *B. merdae* JMC9497 จึงได้เลือกเอา *B. uniformis* สายพันธุ์ KYU 2 เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการสร้างแลคโตเฟอรินและศึกษาผลของการเกิด ACF ในลำไส้ของหนูขาวที่ได้รับเอซอกซีมีเทน พบว่าจำนวน ACF และ ACF ที่มีขนาดใหญ่กว่า 3 crypt/focus ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่า *B. uniformis* สายพันธุ์ KYU 2 นั้นไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการสร้างแลคโตเฟอริน

ผลการทดลองสรุปได้ว่าสามารถสร้างแบคทีเรียให้ผลิตแลคโตเฟอรินโดยใช้ *B. uniformis* เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยที่แบคทีเรียที่สร้างแลคโตเฟอรินนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นซึ่งอาจมีผลต่อประชากรของแบคทีเรียในลำไส้ แบคทีเรียที่สร้างแลคโต-เฟอรินนี้ยังสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดรอยโรคเริ่มต้นของมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูขาวที่เหนี่ยวนำโดยสารก่อมะเร็งลำไส้