ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การโคลน การศึกษาคุณลักษณะ และรูปแบบการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนฮีทช็อค 70 ของเชื้อราเพนนิซิเลี่ยมมาร์เนฟฟีไอ

ชื่อผู้เขียน นายอักษรากร คำมาสุข

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม

บทคัดย่อ

Penicillium marneffei เป็นเชื้อราก่อโรคชนิดฉวยโอกาสที่มีรูปร่าง 2 แบบ คือ รูปราสายที่ 25 องศาเซลเซียส และรูปส่าที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรค penicilliosis marneffei ซึ่งเป็นโรคที่ติดเชื้อในระบบน้ำเหลือง พบอุบัติการณ์การติดเชื้อนี้มากในเขตที่มีการระบาดซึ่งจำเพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางใต้ของประเทศจีน โดยพบควบคู่ไปกับการติดเชื้อเอชไอวี ได้มีการศึกษาทางโมเลกุลของเชื้อนี้มากขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบบทบาทของโปรตีนฮีทช็อคและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดของเชื้อ *P. marneffei* การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ทำการแยก ศึกษาคุณลักษณะ และวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนฮีทช็อค 70 ของเชื้อ *P. marneffei*

การตรวจคัดกรองหาโคลน คอมพลีเมนต์ทารีดีเอนเอ (cDNA) ที่กำหนดการสร้างโปรตีนฮีทช็อค 70 จาก cDNA library ซึ่งสร้างขึ้นจาก *P. marneffei* ที่อยู่ในรูปส่า โดยใช้ส่วนของยีน *P. marneffei hsp70* (clone H3) เป็นตัวติดตาม ปรากฏสัญญาณที่ให้ผลบวกทั้งหมด 21 ตำแหน่ง ซึ่งได้นำไปตรวจคัดกรองต่อไปด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ของ primers T7 และ H70-2 เพื่อหาโคลนที่คาดว่ามีความยาวสมบูรณ์ พบ 1 โคลนชื่อ ph20 จึงทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะ ได้ผลความยาวของยีน *hsp70* สมบูรณ์ขนาด 2,204 นิวคลีโอไทด์ โดยมีช่วงเปิดของยีนสำหรับการสร้างโปรตีนจากตำแหน่ง ATG จนถึง TAA ขนาด 1,911 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งกำหนดเป็นรหัสของโพลีเปปไทด์จำนวน 636 กรดอะมิโน โดยคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 69.5 กิโลดาลตัน และมี pI เท่ากับ 5.03 โคลน ph20 ประกอบด้วยส่วนปลาย 5’ และ 3’ ซึ่งไม่ถูกแปลงเป็นกรดอะมิโน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาด 96 และ 201 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ ส่วนของยีน *hsp70* ที่กำหนดการสร้างโปรตีนมี intron ที่มีขนาดต่างกันแทรกอยู่ 2 ท่อน โดย intron I มีขนาด 57 นิวคลีโอไทด์ และ intron II มีขนาด 198 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งคั่นกลางด้วย microexon ขนาด 3 นิวคลีโอไทด์ การเปรียบเทียบในระดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ClustalW และการทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA3 แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนของโปรตีนฮีทช็อค 70 ของเชื้อ *P. marneffei* จัดอยู่ในกลุ่มของ cytosolic Hsp70 ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Aspergillus nidulans* จากการศึกษาโดยวิธี Southern blot analysis แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของเชื้อ *P. marneffei* มีจำนวนชุดของยีน *hsp70* ที่กำหนดการสร้างโปรตีนฮีทช็อค 70 มากกว่า 1 ชุด

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *hsp70* ใน *P. marneffei* โดยวิธี Northern blot analysis พบการสะสมของ RNA transcript ใน conidia ซึ่งเป็นสภาวะสงบของเชื้อ แต่ในขณะที่เชื้อมีการเจริญเป็นสายรา ที่ 25 องศาเซลเซียสจะพบการลดลงของ RNA transcript ยกเว้นที่เวลา 48 ชั่วโมง พบการเพิ่มขึ้นของ RNA transcript เล็กน้อยในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนรูปจาก conidia หรือสายราเป็นส่าที่ 37 องศาเซลเซียส การเพิ่มอุณหภูมิจาก 37 เป็น 39 องศาเซลเซียส ทำให้ RNA transcript เพิ่มขึ้นอย่างมากภายใน 30 นาที แต่อย่างไรก็ตาม สภาวะที่มีความร้อนรุนแรงที่ 42 องศาเซลเซียส พบปริมาณของ RNA transcript ในระดับต่ำ การศึกษากระบวนการของอาร์เอนเอในระหว่างการเปลี่ยนรูปเป็นสภาวะผู้ย่อยสลาย (saprobic) หรือสภาวะปรสิต (parasitic) ในหลอดทดลองโดยวิธี RT-PCR พบ mRNA ที่สมบูรณ์ปริมาณมาก และพบ unspliced *hsp70* mRNA ในปริมาณเล็กน้อยระหว่างที่เชื้อมีการเปลี่ยนรูป จากการหาลำดับของดีเอนเอของท่อนที่มี intron นี้ พบเพียง intron II ของยีน *hsp70*

โดยสรุปได้ทำการแยกและศึกษายีน *hsp70* จากเชื้อ *P. marneffei* โดยลักษณะโครงสร้างของยีนมีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่น และมีลักษณะจำเพาะคือ พบ microexon ที่มีขนาด 3 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี intron ทั้งสองขนาบข้าง การเปรียบเทียบในระดับกรดอะมิแสดงให้เห็นว่าโปรตีนฮีทช็อค 70 ของเชื้อ *P. marneffei* จัดอยู่ในกลุ่มของ cytosolic Hsp70 ของเชื้อรา การศึกษาโดยวิธี Southern blot analysis แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของเชื้อ *P. marneffei* มีจำนวนชุดของยีน *hsp70* มากกว่า 1 ชุด จากผล RT-PCR พบการสะสมของ RNA transcript ของยีน *hsp70* ในระหว่างที่เชื้อมีการเปลี่ยนรูปเป็นสายราหรือส่า ซึ่งส่วนมากจะพบ mRNA ที่สมบูรณ์ และส่วนน้อยเป็น intron II-unspliced *hsp70* mRNA จากผล Northern blot analysis แสดงให้เห็นการแสดงออกของยีน *hsp70* ในระหว่างที่มีการเปลี่ยนรูปเป็นส่า โดยจะพบการแสดงออกเพิ่มขึ้นมาก ในระหว่างที่มีการเพิ่มอุณหภูมิจาก 37 เป็น 39 องศาเซลเซียส จากผลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนฮีทช็อค 70 อาจมีบทบาทที่สำคัญในการตอบสนองต่อความเครียด และการปรับตัวของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เชื้อในระหว่างที่มีการเปลี่ยนรูปเป็นส่า นอกจากนี้ยังอาจเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ โดยการทำให้เชื้อรอดชีวิตในอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านที่ 39 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Cloning, Characterization and Differential Expression of Hsp70-encoding Gene from *Penicillium marneffei*

Author Mr. Aksarakorn Kummasook

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom

Abstract

Penicillium marneffei is an opportunistic dimorphic fungus that has two forms: a saprobic mycelial form at 25°C and a parasitic yeast form at 37°C. It is the etiological agent of penicilliosis marneffei, the disease involving infection of the reticuloendothelial system. The infection has become more prevalent in the endemic areas, that restrict in Southeast Asia and Southern China, paralleling with the onset of HIV infection. Molecular studies of this fungus have been more frequent since 2000. However, the role of heat shock proteins (Hsps) and stress response-related proteins of *P. marneffei* is still unknown. The aim of this investigation was to isolate, characterize and analyse the differential expression of a gene encoding Hsp70 from *P. marneffei*.

Clones containing complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) encoding Hsp70s were isolated by screening a yeast-phase expression cDNA library of *P. marneffei* with a fragment of the *P. marneffei hsp70* gene (clone H3) as a probe. Twenty-one positive signals were screened further for a putative full length clone by PCR using a pair of T7 and H70-2 primers. A full length 2,204-nt *hsp70* cDNA clone, ph20, was isolated and characterized. An open reading frame of *hsp70* composed of 1,911 nucleotides was delimited by the well-known start (ATG) and stop (TAA) codons. The polypeptide consisted of 636 amino acids and had a calculated molecular mass of 69.5 kDa and a pI of 5.03. The clone ph20 contained 96 and 201 nucleotides of 5' and 3' untranslated regions, respectively. The coding

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

region of a *P. marneffei hsp70* gene was interrupted by two sections of different base length: 57 (intron I) and 198 (intron II) nucleotides. These flanked the 3-nt microexon. Comparison of amino acids using ClustalW and construction of a phylogenetic tree using MEGA3 program revealed that deduced amino acids of *P. marneffei* Hsp70 could be grouped in the fungal cytosolic Hsp70 family, with the closest relation to *Aspergillus nidulans*. Southern blot analysis of the genomic DNA suggested that the genome of *P. marneffei* contains more than one copy of the *hsp70* gene that encodes cytosolic Hsp70s.

Differential expression of the *hsp70* gene in *P. marneffei* was demonstrated by Northern blot analysis. The *hsp70* transcript accumulated in conidia (the dormant form of the organism). The *hsp70* transcript was downregulated during the development to mycelial phase at 25^{o}C, except at 48 h. The transcript was slightly upregulated in response to the yeast phase transition at 37^{o}C from conidia or mycelia of *P. marneffei*. The *hsp70* transcripts became rapidly abundant upregulated within 30 minutes after the temperature rose from 37^{o}C to 39^{o}C. However, a severe heat shock condition of 42^{o}C resulted in lowering the *hsp70* transcript. Analysis of *hsp70* mRNA processing during saprobic and parasitic phase transition *in vitro* by RT-PCR showed an abundant band corresponding to the mature mRNA and a small population of unspliced *hsp70* mRNA. The DNA sequence analysis of this intron-containing fragment showed that it contained only intron II of *hsp70* gene.

In conclusion, *hsp70* gene from *P. marneffei* could be isolated and characterized. The structure of *P. marneffei hsp70* was similar to other organisms, with a unique sequence of 3-nt microexon that flanked with two introns. Comparison of amino acids revealed that *P. marneffei* Hsp70 was grouped in the fungal cytosolic Hsp70s. Southern blot analysis suggested that the genome of *P. marneffei* contains more than one copy number of *hsp70*. From RT-PCR analysis, large population of mature mRNA and small population of intron II-unspliced *hsp70* mRNA were accumulated during phase transition. Northern blot analysis indicated that the expression of *hsp70* was generally upregulated during the yeast phase transition, with abundant upregulated during temperature increase from 37^{o}C to 39^{o}C. These results indicated that Hsp70 may play an important role in environmental stress response and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

adaptation of *P. marneffei* during yeast phase transition. It may also be a putative virulence factor of *P. marneffei* for cell survival at 39^{o}C in the host cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved