Thesis Title Identification and Isolation of Virulent Genes Differentially Expressed by *Penicillium marneffei* During Macrophage Infection

Author Miss Sophit Thirach

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Advisory Committee
Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Pichart Uparanukraw Member
Assist. Prof. Dr. Sirida Youngchim Member

ABSTRACT

Penicillium marneffei is an intracellular dimorphic fungus that can cause an emerging disseminated opportunistic human disease, penicilliosis marneffei. The disease has been suggested to be an AIDS-defining illness, especially in the endemic areas. Both the exact route and the mechanism of infection by *P. marneffei* as well as the host immune response are still poorly understood. Patients might probably inhale the conidia from the environment and phagocytic cells are likely to be the primary line of host defense against this fungus. In this study, phagocytosis and killing activity of mouse macrophage J774.1 against conidia of *P. marneffei* were examined in comparison with non-pathogenic *Penicillium citrinum in vitro*. The phagocytosis and killing assays were determined using microscopy and viable colony plate count. The results indicated a highly efficient phagocytosis effect of J774.1 cells against both species of *Penicillium*. There was no difference among the percentages of phagocytosis in either fungus. However, the phagocytic indices of *P. marneffei* at 60,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

120 and 240 min of infection were significantly higher than those of *P. citrinum*. Moreover, in the early stage of phagocytosis, the percentage killing of *P. citrinum* was significantly higher than that observed in *P. marneffei*. The conidia of *P. marneffei* seemed to be more resistant to being killed by macrophages than the non-pathogenic fungus, *P. citrinum*.

The *P. marneffei* genes of interest were isolated and characterized by cDNA and gDNA library screening with homologous probes. The copper, zinc superoxide dismutase gene, designated *sodA*, could be isolated and characterized. The putative SodA polypeptide consisted of 154 amino acids and exhibited a significant level of similarity to other fungal Cu, Zn SODs. The other gene of interest, *gapdh* encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) which is an enzyme in glycolytic pathway, was identified. The deduced 337 amino acid sequence of the *gapdh* clone showed significant identity to the GAPDHs from other fungal species. Furthermore, phylogenetic analysis of the GAPDH amino acid sequences relating to the position of introns indicated that GAPDH could be useful for the determination of evolutionary relationships in fungi. The catalase and calmodulin genes of *P. marneffei* were partial characterized and their low abundant transcripts were found in only conidia of *P. marneffei*. A more detailed characterization of their role in the *P. marneffei* infection process will need further investigation.

The differential gene expression in different phases and during macrophage infection was examined by semi-quantitative RT-PCR and Northern blot analysis. By using both methods, it was revealed that *sodA* and *cpeA* transcripts accumulated in conidia, with being downregulated in the mycelial phase. Interestingly, the high expressions of both genes were seen in yeast phase as well as during macrophage infection. Using the RT-PCR assay, no significant difference of *gapdh*, isocitrate lyase gene (*acuD*) and *hsp70* expressions could be observed in different phases and during macrophage infection. However, some distinct differential expressions were obtained by Northern blot analysis. For *hsp70* and *gapdh*, the transcripts were accumulated in the conidia, with low expressions in both mycelial and yeast phases. In an infection experiment, the *hsp70* transcript of control conidia was turned over after prolong incubation, whereas the transcript of infective conidia was maintained until 8 h of incubation. At this time point, the expression of *hsp70* was higher than

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

that in the control conidia. An increased expression of the *acuD* could be observed in both the yeast phase and during macrophage infection. In contrast, the expression of *gapdh* was downregulated in the infective stage. The significantly high expressions of the *sodA*, *cpeA* and *hsp70* transcript during macrophage infection suggest that these genes might play an important role in stress responses and in the adaptation of *P. marneffei* to the internal macrophage environment. Furthermore, the increase of *acuD* transcript during macrophage infection indicated the induction of an alternative carbon metabolism (glyoxylate cycle) for fungal adaptation to poor-glucose condition inside macrophages, while the expression of *gapdh* gene that involved in glycolysis pathway was repressed in such condition. Collectively, the results provide insight into how these relevant genes may act as virulence factors of *P. marneffei* infection.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพิสูจน์และการแยกยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเพนนิซิเลี่ยมมาร์เนฟฟีไอ ขณะที่เกิดการติดเชื้อในแมคโครฟาจ

ชื่อผู้เขียน นางสาวโศภิต ธิราช

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม	ประธานกรรมการ
รศ.ดร. พิชาติ อุปรานุเคราะห์	กรรมการ
ผศ.ดร. สิริดา ยังฉิม	กรรมการ

บทคัดย่อ

เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ เป็นเชื้อราสองรูปชนิดที่พบการติดเชื้อภายในเซลล์ของผู้ที่เป็นโรคฉวยโอกาสแบบแพร่กระจาย หรือเรียกว่าโรคเพนนิซิลิโอซิส มาร์เนฟฟีไอ มักพบในผู้ป่วยโรคเอดส์โดยเฉพาะในบริเวณที่การระบาดของเชื้อนี้ สำหรับช่องทางการได้รับเชื้อรวมทั้งการตอบสนองของผู้ที่ติดเชื้อนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ผู้ป่วยอาจจะได้รับเชื้อโดยการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อจากอากาศเข้าไป และคาดว่าการตอบสนองเบื้องต้นของร่างกายต่อเชื้อนี้ผ่านทางเซลล์ฟาโกซัยท์ของผู้ที่ได้รับเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดสอบในหลอดทดลอง ถึงความสามารถของแมคโครฟาจหนูชนิด J774.1 ในการกินและการฆ่าสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ เปรียบเทียบกับเชื้อราไม่ก่อโรค เพนนิซิเลี่ยม ซิทรินัม การทดสอบการกินและการฆ่าได้ใช้วิธีตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการนับจำนวนเซลล์เชื้อราที่มีชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแมคโครฟาจของหนูมีประสิทธิภาพในการกินสปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิด โดยประสิทธิภาพการกินไม่มีความแตกต่างกัน แต่ ณ เวลา 60, 120 และ 240 นาทีหลังจากติดเชื้อ พบว่าแมคโครฟาจสามารถกินสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ ได้มากกว่าสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม ซิทรินัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในช่วงแรกของการทดสอบ ยังพบว่าสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม ซิทรินัม ถูกฆ่าได้มากกว่าสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งดูเหมือนว่าสปอร์ของเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ สามารถทนต่อการฆ่าของแมคโครฟาจมากกว่าเชื้อราที่ไม่ก่อโรคอย่างเพนนิซิเลี่ยม ซิทรินัม

ในการทดลองนี้ ได้ทำการแยกและพิสูจน์ ยีนที่น่าสนใจของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ จากธนาคารคอมพลีเมนต์ทารีดีเอนเอ (cDNA) และจีโนมิคดีเอนเอ (gDNA) โดยการตรวจคัดกรองด้วย homologous probes ยีนที่ตรวจพบคือยีนที่กำหนดการสร้าง Cu, Zn superoxide dismutase โดยใช้ชื่อเป็น *sodA* จากการวิเคราะห์โพลีเปปไทด์ที่คาดว่าจะมีจำนวน 154 กรดอะมิโนของยีนนี้แสดงให้เห็นถึงความเหมือนกันในระดับที่มีนัยสำคัญ กับ Cu, Zn superoxide dismutase ของเชื้อราอื่น นอกจากยีนนี้แล้วยังได้ทำการตรวจสอบยีน *gapdh* ที่กำหนดการสร้าง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการสลายกลูโคส (glycolytic pathway) กรดอะมิโนจำนวน 337 ที่ถูกกำหนดมาจากโคลนของยีน *gapdh* มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญกับ GAPDHs ของเชื้อราอื่น นอกจากนั้น การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนใน GAPDH พบว่ามีความสัมพันธ์กับตำแหน่งของ intron ซึ่งสามารถใช้ GAPDH ในการหาวิวัฒนาการในความเกี่ยวข้องกันของเชื้อราแต่ละชนิด สำหรับยีน catalase และ calmodulin ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอได้ทำการพิสูจน์เพียงบางส่วนเท่านั้น และตรวจพบการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ ๆ เฉพาะในสปอร์ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอเท่านั้น สำหรับบทบาทของยีนทั้งสองนี้และความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ จะได้มีการศึกษาต่อไป

ในการทดสอบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในแต่ละรูปของเชื้อและขณะที่เกิดการติดเชื้อในแมคโครฟาจใช้ วิธี RT-PCR แบบกึ่งหาปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR) และ Northern blot analysis ผลจากทั้งสองวิธีพบการแสดงออกของยีน *sodA* และ *cpeA* ในสปอร์ของเชื้อในระดับหนึ่งและลดลงเมื่ออยู่ในรูปของสายรา ที่น่าสนใจคือการแสดงออกของทั้งสองยีนจะพบมากเมื่ออยู่ในรูปยีสต์และขณะที่ติดเชื้อในแมคโครฟาจ โดยวิธี RT-PCR ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการแสดงออกของยีน *gapdh*, isocitrate lyase gene (*acuD*) และ *hsp70* ทั้งในรูปที่ต่างกันของเชื้อหรือแม้กระทั่งเชื้อที่เจริญในแมคโครฟาจ อย่างไรก็ตามพบการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนเหล่านี้ได้โดยวิธี Northern blot analysis โดยพบการแสดงออกของ *hsp70* และ *gapdh* ในสปอร์ของเชื้อ และพบต่ำลงในเชื้อรูปสายราและยีสต์ ในการทดสอบขณะที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์ พบการแสดงออกของ *hsp70* ในสปอร์ที่ไม่ได้ถูกกิน ลดลงเรื่อย ๆ หลังจากที่บ่มเป็นเวลานานขึ้น ส่วนเชื้อราที่ถูกกินและอยู่ในแมคโครฟาจนั้นจะรักษาระดับการแสดงออกของ *hsp70* จนถึงเวลา 8 ชั่วโมง โดยที่เวลานี้สามารถตรวจพบการแสดงออกที่แตกต่างกันของ *hsp70* ซึ่งมากกว่าในรูปสปอร์ที่ไม่ถูกกิน ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

gapdh พบต่ำลงในระยะที่มีการติดเชื้อ การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของ *sodA, cpeA* และ *hsp70* ขณะที่ติดเชื้อภายในแมคโครฟาจแสดงให้เห็นว่ายีนเหล่านี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดและการปรับตัวของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ ภายในแมคโครฟาจ นอกเหนือจากนี้การเพิ่มขึ้นของ *acuD* ขณะที่ติดเชื้อแสดงให้เห็นว่าเกิดกระบวนการใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่น ซึ่งได้แก่ glyoxylate cycle เพื่อการปรับตัวของเชื้อราต่อสภาวะที่มีกลูโคสต่ำลงภายในแมคโครฟาจ โดยในสภาวะนี้มีผลทำให้การแสดงออกของ *gapdh* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายกลูโคส (glycolysis pathway) นั้นลดลงด้วย จากผลทั้งหมดทำให้เห็นภาพรวมถึงบทบาทของยีนเหล่านี้ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคติดเชื้อราเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved