Thesis Title	The Role of *Penicillium marneffei* Laccases Against Stress Conditions
Author	Miss Ariya Sapmak
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Monsicha Pongpom Co-advisor

ABSTRACT

The opportunistic fungus *Penicillium marneffei* can cause a fatal disease in immunocompromised patients, especially in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). In Thailand, *P. marneffei* infection is one of the most common opportunistic diseases in HIV-infected patients. This study has focused on the laccase enzymes and laccase-encoding genes including their functions in *P. marneffei*.

Laccase and the product of this enzyme, melanin, have been reported as a virulence factor in human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. The presence of laccase in pathogenic fungi decreases the sensitivity to antifungal agents and increases the resistance to host immune cells. To study the role of laccase in

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Penicillium marneffei, laccase-encoding genes were characterized and function of their translational protein products, laccases, were investigated. The laccase-encoding genes were retrieved from the NCBI GenBank and analyzed an existing of conserved sequences for fungal laccases together with the relationship among fungal laccases. An expression of laccase in normal and stress conditions was determined in term of the level of laccase activity within fungal cells and the secreted form. Moreover, the expressions of each gene during growth at 37°C and during oxidative stress condition were identified. The localization of each laccase was monitored based on GFP-fusion protein technique. Transformants with *laccase* genes deletion were generated to study the affect of losing laccase and transformants of *laccase* gene complementation were also generated to verify the results.

The results showed the expression of laccases response to stress conditions such as acidic condition, oxidative stress, and low glucose condition. Performing of Blastn to search *P. marneffei* sequences similarity to laccases of other pathogenic fungi displayed four putative laccase-encoding genes in whole genome sequence of *P. marneffei*. Those four genes could be translated to be laccases containing the conserved region specified for fungal laccases. All laccases including Laccase1, Laccase2, Laccase3 and Arb2 laccase were related to other fungal laccases and the function could be analyzed by using phylogenetic tree. Study of level of gene transcription revealed that *lac1* and *lac3* genes were expressed in a very low level in normal culture condition while expressions of *lac1* and *lac2* genes were increased in oxidative stress condition. Generating of fungal strain that could produce GFP-fused laccase revealed the function of Arb2 laccase. This enzyme was displayed during

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

conidiation and played a role in pigment biosynthesis corresponding to phylogenetic analysis data. GFP-fused Arb2 laccase was localized within vesicles. These vesicles might be the transportation pathway of this enzyme to conidiation site. Genetic transformation mediated via homologous recombination demonstrated that losing of each gene did not affect growth ability of this fungus; however, deletion of *arb2* gene resulted in changing of color of fungal colony at 28°C. A single laccase gene deletion did not affect the resistance to stress. The quadruple gene deleted strain could produce melanin but laccase activity was dropped about two times. Interestingly, this strain was more sensitive to oxidative stress, cell wall stress, and antifungal agents such as itraconazole, fluconazole and clotrimazole. These findings indicate that laccases play a role in non-specific stress defense and their functions against stress could compensate each other. Besides, the strength of cell wall of *lac* genes deleted strain should decrease according to the increasing sensitivity to cell wall stressor. This mutant was more sensitive to oxidative stress, thus, this strain may be sensitive to antifungal activity of macrophage.

In this study, the function and expression of laccases are investigated to explain their role in fungal biology and their protective ability against stresses. Due to losing of laccases could increase sensitivity to antifungal agents, laccase might be a good candidate for drug target development.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ บทบาทของแลคเคสใน *Penicillium marneffei* ต่อการต้านสภาวะเครียด

ผู้เขียน นางสาวอาริยา ทรัพย์มาก

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. มณสิชา ป้องป้อม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ เชื้อราก่อโรคแบบฉวยโอกาส ซึ่งสามารถก่อโรครุนแรงและทำให้ผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี เสียชีวิตได้ ในประเทศไทย เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ เป็นเชื้อที่พบก่อโรคบ่อยในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ในการศึกษานี้ ได้เน้นการศึกษายีนที่กำหนดการสร้างแลคเคส และเอนไซม์แลคเคส รวมถึงศึกษาหน้าที่ของแลคเคส ในเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ

แลคเคสและผลิตผล คือ เมลานิน จัดเป็นปัจจัยส่งเสริมการก่อโรค ใน *Cryptococcus neoformans* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ การมีแลคเคสในเชื้อราก่อโรค ทำให้เชื้อมีความไวต่อยาต้านเชื้อราลดลง และเพิ่มความทนต่อการถูกทำลายจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อที่จะศึกษาถึงบทบาทของแลคเคสใน เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ จึงได้ทำการวิเคราะห์ยีนที่กำหนดการสร้างแลคเคส และศึกษาหน้าที่ของแลคเคส ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสยีน ยีนที่กำหนดการสร้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แลคเคสนำมาจากฐานข้อมูลยีนของ NCBI แล้วนำมาวิเคราะห์ว่ามีบริเวณที่จำเพาะเหมือนที่พบในแลคเคสของเชื้อราอื่นหรือไม่ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กันกับแลคเคสอื่นๆที่พบในเชื้อรา ในการศึกษาการแสดงออกของแลคเคสในสภาวะปกติและสภาวะเครียด ได้ทำการวัดระดับปฏิกิริยาของแลคเคสภายในเซลล์เชื้อราและเอนไซม์ที่เชื้อปล่อยออก นอกจากนี้ ได้ศึกษาการแสดงออกของแต่ละยีนในสภาวะการเจริญที่อุณหภูมิ 37˚C และในสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน ทำการติดตามตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ของแลคเคสแต่ละชนิด โดยอาศัยเทคนิคการสร้างแลคเคสที่ต่อกับโปรทีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ และได้ทำการสร้างเชื้อที่มีการเปลี่ยนแปลงยีน คือ เชื้อที่แลคเคสยีนถูกตัดออก ศึกษาผลกระทบจากการขาดหายไปของแลคเคส และทำการใส่ยีนกลับเข้าไปเพื่อยืนยันผลที่พบ

ผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของแลคเคสตอบสนองต่อสภาวะเครียด ได้แก่ สภาวะความเป็นกรด สภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน และสภาวะที่มีกลูโคสระดับต่ำ จากการทำ Blastn เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายกับแลคเคสของเชื้อราก่อโรคอื่นๆ พบ 4 ยีนที่น่าจะกำหนดการสร้างแลคเคส ซึ่งทั้งสี่ยีนสามารถถอดรหัสได้เป็นแลคเคสที่มีบริเวณที่มีความจำเพาะกับแลคเคสของเชื้อรา แลคเคสที่พบ คือ Laccase1, Laccase2, Laccase3 และ Arb2 laccase มีความสัมพันธ์กับแลคเคสของเชื้อราอื่นๆ และสามารถวิเคราะห์หน้าที่ได้จาก Phylogenetic tree ในการศึกษาการแสดงออกในระดับยีน พบว่ายีน *lac1* และ *lac3* มีการแสดงออกในระดับต่ำๆในสภาะการเจริญปกติ ขณะที่ยีน *lac1* และ *lac2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน จากการสร้างเชื้อที่สามารถผลิตแลคเคสที่ต่อกับโปรทีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ทำให้ทราบหน้าที่ของ Arb2 laccase พบว่าเอนไซม์นี้แสดงออกในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศและมีบทบาทในการสร้างสี ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree พบว่า Arb2 laccase ที่ต่อกับโปรทีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์อยู่ใน vesicles ซึ่ง vesicles เหล่านี้น่าจะเป็นระบบที่ใช้ในการขนส่งเอนไซม์นี้ไปยังตำแหน่งที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมด้วยกระบวนการ Homologous recombination แสดงให้เห็นว่า การขาดหายไปของยีนใดยีนหนึ่ง ไม่กระทบต่อความสามารถในการเจริญของเชื้อ แต่การขาดหายไปของยีน *arb2* ทำให้การสร้างสีของโคโลนีของเชื้อราที่อุณหภูมิ 28˚C เปลี่ยนไป การขาดหายไปของยีนใดยีนหนึ่งก็ไม่กระทบต่อความทนต่อสภาวะเครียด แต่เมื่อทั้งสี่ยีนถูกทำให้หายไป พบว่าระดับปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประมาณครึ่งหนึ่ง แต่ที่น่าสนใจคือ เชื้อมีความไวเพิ่มขึ้น ต่อสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน สภาวะเครียดที่ผนังเซลล์ และยาต้านเชื้อรา ได้แก่ itraconazole, fluconazole และ clotrimazole สิ่งที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าแลคเคสมีบทบาทในการต่อต้านสภาวะเครียดแบบไม่จำเพาะ และการทำงานในการต่อต้านสภาวะเครียดของแลคเคสแต่ละตัวสามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ นอกจากนี้ ความแข็งแรงของผนังเซลล์ของเชื้อที่ยีนขาดหายไปสี่ยีนน่าจะลดลง ทำให้เชื้อมีความไวต่อสารก่อความเครียดแก่ผนังเซลล์ เชื้อนี้ยังมีความไวเพิ่มขึ้นต่อสภาวะเครียดจากอนุมูลอิสระของออกซิเจน เป็นไปได้ว่าเชื้อน่าจะมีความไวต่อการกำจัดเชื้อราของแมคโครฟาจ

การศึกษาหน้าที่และการแสดงออกของแลคเคส ในการศึกษานี้ทำให้ทราบบทบาทของแลคเคสในระดับชีววิทยาของเชื้อราและความสามารถในการปกป้องเชื้อราจากสภาวะเครียดต่างๆ เมื่อมีการหายไปของทั้งสี่แลคเคส ทำให้เชื้อมีความไวเพิ่มขึ้นต่อยาต้านเชื้อรา แลคเคสน่าจะเป็นเป้าหมายในการพัฒนายาต้านเชื้อราต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved