หัวข้อวิทยานิพนธ์	บทบาทของยีน *yakA* และ *rttA* ต่อการเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และการตอบสนองต่อความเครียดของเชื้อ *Penicillium marneffei*	
ผู้เขียน	นางสาวสุมานันท์ สุวรรณคร	
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. สิริดา ยังฉิม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. มณสิชา ป้องป้อม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ เป็นเชื้อราสองรูปขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ซึ่งพบการก่อโรคได้สูงในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทั้งผู้ที่อาศัยภายในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้หรือผู้ที่เดินทางมาท่องเที่ยวยังเขตนี้ เชื้อนี้เจริญเป็นรูปราสายที่อุณหภูมิ 25°C โดยมีการสร้างสปอร์เป็นสายโซ่เกิดที่ปลายเส้นใยที่ทำหน้าที่ชูสปอร์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แต่จะเปลี่ยนการเจริญเป็นรูปยีสต์ที่อุณหภูมิ 37°C หรือภายในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ โดยเชื้อมีการแบ่งตัวแบบ binary fission การศึกษาก่อนหน้านี้ได้นำวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) มาใช้ สร้างเชื้อกลายพันธุ์ที่มีความบกพร่องจากปกติทางด้านรูปร่างและการสร้างโคนิเดีย ดังนั้นในการศึกษาครั้ง นี้ได้คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ได้จากวิธี AMT นี้ ชื่อสายพันธุ์ I231 และ I133 ซึ่งมีความผิดปกติของยีน *yakA* และ *rttA* ตามลำดับมาทำการศึกษาคุณลักษณะต่างๆ

เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *yakA* มีการสร้างโคนิเดียน้อยที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเทียบกับเชื้อ wild type และเชื้อที่มีการใส่ยีนกลับคืน นอกจากนี้ความผิดปกติของยีน *yakA* ที่เกิดจากกลายพันธุ์นี้มีผลให้มีการงอกของโคนิเดียเพิ่มขึ้นและรบกวนความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ เชื้อกลายพันธุ์นี้มีการกระจายตัวของไคตินที่ผิดปกติไปเมื่อเพาะเลี้ยงเฉพาะที่ 25°C แต่ไม่พบลักษณะผิดปกตินี้ที่ 37°C เป็นที่น่าสนใจว่า เมื่อบ่มเชื้อที่ทั้งสองอุณหภูมินี้ เชื้อกลายพันธุ์มีระดับของไคตินเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับการแสดงออกของยีน *chsB* และ *chsG* ที่ระดับ transcription โดย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีนเหล่านี้กำหนดการสร้าง chitin synthase B และ G นอกจากนี้ ระดับการแสดงออกของยีน *yakA* ระดับ transcription เพิ่มมากขึ้นในระยะ post-log phase และสภาวะกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 39°C อย่างไรก็ตาม ยีน *yakA* ของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอไม่มีบทบาทหลักสำหรับความรุนแรงในการก่อโรคและการเปลี่ยนรูปของเชื้อในการทดลองการติดเชื้อของตัวอ่อน *Galleria mellonella* ดังนั้นโดยสรุปแล้วพบว่ายีน *yakA* นั้นจำเป็นสำหรับรูปแบบการพัฒนาของเชื้อที่ปกติ ความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ การสะสมของไคติน การแสดงออกของ *chs* ที่เหมาะสม และการตอบสนองต่อความร้อนในเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ

ในการศึกษานี้ได้มีการศึกษาบทบาทของยีน *rttA* ในเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไออีกด้วย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rttA* มีการสร้างโคนิเดียน้อยลงที่อุณหภูมิ 25°C เมื่อเทียบกับเชื้อ wild type และเชื้อที่มีการใส่ยีนกลับคืน และพบว่ามีการงอกของโคนิเดียที่ลดลงอีกด้วย เชื้อกลายพันธุ์นี้มีความไวอย่างมากต่อสารที่มีผลกระทบทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สารพันธุกรรม นอกจากนี้ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งการตอบสนองของเชื้อกลายพันธุ์ต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน มีการแสดงออกระดับ transcription ที่ลดลงในสภาวะที่ เป็นยีสต์ สำหรับการแสดงออกของ *rttA* เมื่อเพาะเลี้ยงที่ 37°C พบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเมื่อตอบสนองต่อสารที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอ ในส่วนสำคัญได้พบว่า เชื้อกลายพันธุ์นี้มีความรุนแรงในการก่อโรคลดลงใน *Galleria* larvae เมื่อนำ *G. mellonella* ไปบ่มที่ 25°C หรือ 37°C หลังจากการติดเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ wild type และเชื้อที่มีการใส่ยีนกลับคืน จึงสรุปได้ว่า *rttA* gene นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการสร้างรูปร่าง เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การตอบสนองต่อความเครียด และความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อเพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟีไอ บ่งชี้ว่ายีนนี้น่าจะเป็นเป้าหมายสำหรับการพัฒนายาต้านเชื้อราต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Role of *yakA* and *rttA* Genes in Growth, Morphogenesis and Stress Response of *Penicillium marneffei*
Author	Miss Sumanun Suwunnakorn
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)
Advisory Committee	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Advisor Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim Co-advisor Asst. Prof. Dr. Monsicha Pongpom Co-advisor

ABSTRACT

Penicillium marneffei is a thermally dimorphic fungus that is a highly significant pathogen of immunocompromised persons living in or having traveled in Southeast Asia. At 25°C, *P. marneffei* grows filamentously. Under the appropriate conditions, these filaments (hyphae) produce conidiophores bearing chains of conidia. Yet, when incubated at 37°C or found within infected tissue, *P. marneffei* grows as a yeast form that divides by binary fission. Previously, an *Agrobacterium*-mediated transformation system was used to randomly mutagenize *P. marneffei*, resulting in the isolation of mutants defective in normal patterns of morphogenesis and conidiogenesis. The interrupted genes were identified as *yakA* (strain I231) and *rttA* (strain I133). In the current study, we investigated the role of *yakA* and *rttA* genes in the growth, morphogenesis, and stress response in *P. marneffei*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The *yakA* mutant produced less conidia than the wild type and the genetically complemented mutant strain at 25°C. In addition, disruption of *yakA* gene resulted in early conidial germination and perturbation of cell wall integrity. The *yakA* mutant exhibited abnormal chitin distribution while growing at 25°C, but not at 37°C. The *yakA* mutant also responded to cell wall weakening by increasing chitin levels. Interestingly, at both temperatures, the *yakA* mutant possessed increased chitin content, which was accompanied by amplified transcription of two chitin synthase genes, *chsB* and *chsG*. Moreover, the expression of *yakA* was induced during post-log-phase growth as well as by heat shock of 39°C. However, the *P. marneffei yakA* gene does not play critical roles in virulence and *in vivo* phase transition in a *Galleria mellonella* larvae infection model. Thus, *yakA* is required for normal patterns of development, cell wall integrity, chitin deposition, appropriate *chs* expression, and heat stress response in *P. marneffei*.

The role of the *rttA* gene in *P. marneffei* was also investigated in this study. The results showed that the *rttA* mutant produced less conidia than the wild type and the complemented mutant strain at 25°C. Slow conidial germination was observed in the mutant. The *rttA* mutant cells were hypersensitive to genotoxic agents. In addition, the genes associated with carbohydrate metabolism and oxidative stress were down-regulated in the yeast phase of the *rttA* mutant. Moreover, we also found that the expression of *rttA* was induced in response to DNA-damaging agents at 37°C. Importantly, the *rttA* mutant was less pathogenic in a *Galleria* larvae infection model than the wild type and complemented strains when the larvae were incubated at either 25 or 37°C. In conclusion, *rttA* gene plays important roles in morphogenesis,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

carbohydrate metabolism, stress response and pathogenesis in *P. marneffei*, suggesting that is may serve as a potential target for development of antifungal compounds.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved