

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์การทำงานของยีน <i>sakA</i> และ <i>atfA</i> ในเชื้อ <i>Penicillium marneffei</i> ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดแบบออกซิเดทีฟ	
ผู้เขียน	นางสาวปัญจพร นิ่มมณี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ศ.ดร. นงนุช วัฒนชัยนาคม ผศ.ดร. สิริดา ยังนิม ผศ.ดร. มณฑิษา ป็องป้อม	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

เพนนิซิลเลียม มาร์เนฟไฟโอ เป็นเชื้อราสองรูปที่เป็นสาเหตุของโรคเพนนิซิลิโอซิส มาร์เนฟไฟโอซึ่งเป็นโรคติดเชื้อแบบแพร่กระจาย และเป็นอันตรายถึงชีวิตในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยเฉพาะผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวี เพื่อที่จะเจริญและมีชีวิตรอด เชื้อราชนิดนี้จะต้องมีการปรับตัวต่อสภาวะความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมทั้งภายนอกและภายในเซลล์เจ้าบ้าน ประกอบไปด้วย สภาวะความเครียดที่เกิดจากความร้อน ความดันออสโมติก ออกซิเดทีฟ และการขาดแคลนอาหาร และการปรับตัวนี้ต้องการเส้นทางการส่งสัญญาณความเครียดและการควบคุมการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะความเครียดหลากหลายชนิด อย่างไรก็ตามกลไกที่เชื้อราชนิดนี้ใช้ในการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมยังไม่เป็นที่ชัดเจน

ในการศึกษานี้ได้แสดงคุณลักษณะของยีน stress activated kinase (*sakA*) ที่ถอดรหัสเป็น mitogen activated protein (MAP) kinase และยีน activating transcription factor (*atfA*) ที่ถอดรหัสเป็น bZip-type transcription factor ในเชื้อเพนนิซิลเลียม มาร์เนฟไฟโอ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน *sakA* ของเชื้อเพนนิซิลเลียม มาร์เนฟไฟโอถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มี TXY phosphorylation lip ที่พบในโปรตีนในตระกูล stress high osmolarity glycerol 1 (Hog1)/Spc1/p38 MAPK และยีน *atfA* ถอดรหัสได้เป็นโปรตีนซึ่งมีส่วนอนุรักษ์ที่เป็น basic-leucine zipper (bZip) domain พบในตระกูล bZip transcription factor จากผลของ RT-PCR

พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีน *sakA* ในโคนีเดีย ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจาก 1 mM hydrogen peroxide และความร้อนที่ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *atfA* ไม่มีการเพิ่มขึ้นในสภาวะใดๆ

เพื่อระบุหน้าที่ของยีนเหล่านี้ เชื้อกลายพันธุ์ที่ไม่มียีน *sakA* และ *atfA* ได้ถูกสร้างขึ้นด้วยวิธีซึ่งตัดแปลงจาก split marker recombination ลักษณะทางกายภาพและความไวต่อสภาวะความเครียดต่างๆ ประกอบด้วยความเครียดที่เกิดจากความดันออสโมติก ออกซิเดทีฟ ความร้อน รังสียูวี และความเครียดต่อผนังเซลล์ของเชื้อกลายพันธุ์เปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ wild type และ complement ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน *sakA* แต่ไม่ใช่ยีน *atfA* มีบทบาทในการสร้างโคนีเดียและการเปลี่ยนรูปเป็นยีสต์ของเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิโอในหลอดทดลองและภายในเซลล์มาโครฟาจของคนและหนู นอกจากนี้ทั้งยีน *sakA* และ *atfA* ไม่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดที่เกิดจากความดันออสโมติกและรังสียูวี สำหรับการตอบสนองต่อความเครียดแบบออกซิเดทีฟ ยีน *sakA* มีส่วนในการตอบสนองของโคนีเดียของเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิโอต่อ hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide แต่ไม่ใช่ menadione ในขณะที่ยีน *atfA* เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ *tert*-butyl hydroperoxide เท่านั้น สำหรับความแข็งแรงของผนังเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีน *sakA* เกี่ยวข้องกับการกระจายตัวของไคตินบนสายราชของเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิโอ แต่ไม่จำเป็นต่อการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดต่อผนังเซลล์ที่เกิดจาก calcofluor white ที่ 25 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามทั้งยีน *sakA* และ *atfA* มีบทบาทต่อการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดที่เกิดจาก sodium dodecyl sulphate ซึ่งเป็นสารที่ทำลายความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับความเครียดที่เกิดจากความร้อน ยีน *sakA* มีความจำเป็นต่อการมีชีวิตอยู่ของโคนีเดียของเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิโอที่ 39 องศาเซลเซียสในขณะที่ยีน *atfA* ไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญของโคนีเดียทั้งที่ 39 และ 42 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม quantitative real-time PCR แสดงให้เห็นว่า สภาวะความเครียดที่เกิดจากความร้อนที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลายี่สิบนาที สามารถกระตุ้นระดับการแสดงออกของ mRNA ของทั้งยีน *sakA* และ *atfA* ในการทดลองการติดเชื้อในมาโครฟาจ การฟื้นคืนของสปอร์ในเชื้อกลายพันธุ์ของยีน *sakA* และ *atfA* หลังจากติดเชื้อในมาโครฟาจของหนูและคนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ของเชื้อสายพันธุ์ wild type and complement ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่ายีน *sakA* และ *atfA* มีความจำเป็นต่อเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิโอภายใต้สภาวะความเครียดที่จำเพาะ และอาจจำเป็นต่อการต่อสู้กับเซลล์ภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านในช่วงแรกของการติดเชื้อ

<b>Thesis Title</b>	Functional Analysis of <i>Penicillium marneffei sakA</i> and <i>atfA</i> Genes Involved in Oxidative Stress Response	
<b>Author</b>	Ms. Panjaphorn Nimmanee	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Microbiology)	
<b>Advisory Committee</b>	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Sirida Youngchim	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Monsicha Pongpom	Co-advisor

### ABSTRACT

*Penicillium marneffei*, the pathogenic dimorphic fungus is a causative agent of a fatal systemic disease, penicilliosis marneffei, in immunocompromised hosts especially in HIV patients. For growth and survival outside and inside host cells, this fungus has to adapt to environmental stresses including heat, osmotic, oxidative or nutrient stress and this adaptation requires stress signaling pathways and regulation of gene expression under various kinds of stresses. However, the strategies used by this fungus in response to environmental stresses are still unclear.

In the present study, the stress activated kinase (*sakA*) gene encoding the mitogen activated protein (MAP) kinase and activating transcription factor (*atfA*) gene encoding bZip-type transcription factor of *P. marneffei* were characterized. Results demonstrated that the *P. marneffei sakA* gene encoded a putative protein containing TXY phosphorylation lip found in the stress high osmolarity glycerol 1 (Hog1)/Spc1/p38 MAPK family and *P. marneffei atfA* gene encoded a putative protein including conserved basic-leucine zipper (bZip) domain found in the bZip transcription factor family. RT-PCR revealed the increase of *sakA* gene expression in conidia under treatment with 1 mM hydrogen peroxide and heat at 39°C for 1 h, whereas the expression of *atfA* gene did not increase in any conditions.

To determine functions of these genes, *sakA* and *atfA* mutant strains were constructed using the modified split marker recombination method. The phenotypes and susceptibility to varieties of stresses including osmotic, oxidative, heat, UV and cell wall stresses of the mutant strains were compared with the wild type and the complemented strains. The results demonstrated that *sakA* gene but not *atfA* gene played a role in conidiation (asexual development) and yeast cell transition of *P. marneffeii* *in vitro* and inside mouse and human macrophages. In addition, neither *sakA* nor *atfA* was involved in osmotic and UV stress responses. For oxidative stress response, *sakA* gene participated in response of *P. marneffeii* conidia against hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide but not menadione, whereas *atfA* gene was only associated with response to *tert*-butyl hydroperoxide. For cell wall integrity evaluation, the results showed that *sakA* gene was involved in chitin deposition along the hyphae of *P. marneffeii* but was not required for response against cell wall stress agent calcofluor white at 25°C. However, both *sakA* and *atfA* genes played a role in response to stress from sodium dodecyl sulphate which is a membrane destabilized agent. For heat stress, *sakA* gene was necessary for survival of *P. marneffeii* conidia at 39°C, whereas *atfA* gene was not involved in growth of the conidia at both 39°C and 42°C. Nevertheless, quantitative real-time PCR revealed that heat stress condition at 42°C for 20 min was able to activate the mRNA expression levels of both *sakA* and *atfA* genes. In macrophage infection experiment, recovery of *sakA* and *atfA* mutant conidia from the infected human or mouse macrophages was significantly decreased compared to those of wild type and complemented strains. The results from this study indicated that the *sakA* and *atfA* genes were required by *P. marneffeii* under specific stress conditions and might be necessary for fighting against host immune cells during the initiation of infection.