Thesis Title Identification of Genes Associated with Fungal Morphogenesis in *Penicillium marneffei* by Random Insertional Mutagenesis

Author Mr. Aksarakorn Kummasook

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 a thermally dimorphic fungus that is a highly significant pathogen of immunocompromised persons living in or having traveled to Southeast Asia. The growth of *P. marneffei* can be divided into two phases: a natural saprobic mycelial phase that forms at 25^{o}C and parasitic yeast phase that develops at 37^{o}C. The pathogenicity of *P. marneffei* is associated with this dimorphic nature. Hence, many investigations have focused on morphogenetic mechanisms and other dimorphism-associated attributes that contribute to the pathogenicity of this fungus. In this study, *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) was employed to identify genes associated with the morphogenesis of *P. marneffei*. Additionally, AMT-derived transformants were screened for isolating mutants defective in cell wall production, dimorphic switch and melanin synthesis of this fungus. Furthermore, a selected mutant defective in conidiation, strain I6, was characterized.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

To develop an effective transformation system, uracil auxotrophs were derived. The *ura5* and *ura3* genes, which encode orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase) and orotidine-5'-phosphate decarboxylase (OMPdecase) proteins, from *P. marnefei* F4, were isolated and characterized. The nucleotide and amino acid sequences of *ura5* and *ura3* displayed strong homology to OPRTase and OMPdecase proteins in other fungi. Analysis of gene expression by RT-PCR revealed that the expression of the *ura5* gene was up-regulated during mycelium to yeast phase transition, and substantially up-regulated in mycelium cells exposed to 39^{o}C or treated with 1 mM of H_2O_2 for 30 min. Fourteen uracil auxotrophs of *P. marneffei* were isolated from 1.77 x 10^6 UV-irradiated conidia. All uracil auxotrophs exhibited the basic characteristics of this fungus, including sporulation and dimorphic transition. Seven isolates, which showed no OPRTase activity, with similar growth characteristics as the wild-type strain will be used as recipient strains for further genetic manipulation of *P. marneffei* using *ura5* as a selectable marker.

In the present study, an improved *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) system was developed and successfully employed in *P. marneffei* strain F4 as well as in *P. citrinum*. Optimal conditions for the AMT protocol included the use of conidia or pre-germinated conidia of *P. marneffei* and co-cultivation at 28°C for 36 hours. Bleomycin-resistant transformants were selected as yeast-like colonies following incubation at 37°C. Transformation efficiency was approximately 123 ± 3.27 and 239 ± 13.12 transformants per plate when using 5 x 10^4 conidia and pre-germinated conidia of *P. marneffei* as starting materials, respectively. Southern blot analysis demonstrated that 95% of transformants contained a single copy of T-DNA. Inverse PCR was employed for identifying nucleotide flanking sequences at the T-DNA insertion sites. Analysis of these sequences indicated that integration occurred as random recombination events. Among the isolated mutants, two were the previously described *stuA*- and *gasC*-defective strains. These AMT-derived mutants possessed single T-DNA integrations within their particular coding sequences. In addition, other morphological and pigmentation mutants possessing a variety of gene-specific defects were isolated, including two mutants having T-DNA integrations within putative promoter regions. Moreover, several mutants defective in cell wall production, melanin synthesis and dimorphic switch, were also isolated. Collectively,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

these results indicated that AMT could be used for large-scale, functional genetic analyses in *P. marneffei*. Such analyses can potentially facilitate the identification of those genetic elements related to morphogenesis and pathogenesis in this medically important fungus.

Mutant I6, a strain defective in conidiation, was isolated using AMT. Using inverse PCR, the T-DNA insertion site of this mutant was demonstrated to be within the gene encoding S-adenosylmethionine decarboxylase (*sadA*), an enzyme critical in spermidine biosynthesis. Supplementation of minimal medium with spermidine restored the ability of the mutant to produce conidia at 27°C. Complementation of the dysfunctional *sadA* gene with an intact wild-type copy also reinstated normal conidiation. Mutant I6 exhibited substantial growth reduction in minimal medium without spermidine, compared to that of the wild-type F4 and complemented strain C3. In contrast, the growth rate of mutant I6 in the presence of 3 mM spermidine was nearly that of wild-type F4 and the complemented strain C3. Moreover, a substantial decrease in the percentage of germinated conidia in mutant I6 was found in the absence of spermidine in the medium, with a gradual increase in the percentage of germinated conidia as the spermidine concentration was increased at both 27^{o}C and 37^{o}C. Furthermore, given the presumption that *P. marneffei* infections are initiated following inhalation of conidia, this study suggests that the spermidine biosynthetic pathway may serve as a potential target for combating the pathogenesis of this medically important fungus.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจพิสูจน์ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรูปร่างของเชื้อเพนนิซิเลี่ยมมาร์เนฟฟิไอ โดยวิธีการทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบแทรกสุ่ม

ผู้เขียน นายอักษรากร คำมาสุข

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

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

บทคัดย่อ

เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ เป็นเชื้อราสองรูปที่พบการก่อโรคได้บ่อยในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ทั้งผู้ที่อาศัยอยู่ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้หรือผู้ที่เดินทางมาท่องเที่ยวในเขตนี้ การเจริญของเชื้อนี้สามารถแบ่งออกได้เป็นสองแบบ กล่าวคือ เชื้อเจริญในธรรมชาติเป็นสภาวะที่ไม่ก่อโรคในรูปราสายที่อุณหภูมิ 25°C และเจริญเป็นสภาวะปรสิตรูปส่าที่อุณหภูมิ 37°C โดยความสามารถในการก่อโรคของ เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ นี้ มีความความสัมพันธ์กับความเป็นราสองรูป ดังนั้นในหลายๆการศึกษาได้มุ่งหากลไกที่มีผลต่อรูปร่างของเชื้อ และคุณลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปของเชื้อซึ่งมีส่วนทำให้เชื้อนี้สามารถก่อโรคได้ ในการศึกษานี้ได้นำวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) มาใช้เพื่อจำแนกหายีนที่มีความเกี่ยวข้องกับสร้างรูปร่างของเชื้อ และยังนำเชื้อที่ได้จากการสร้างด้วยวิธี AMT มาตรวจคัดกรองเพื่อแยกเชื้อที่มีความบกพร่องในการสร้างผนังเซลล์ การเปลี่ยนรูปและการสร้างเมลานิน นอกจากนี้ได้คัดเลือกเชื้อที่มีความบกพร่องในการสร้างคอนิเดีย ชื่อ I6 มาศึกษาคุณลักษณะอีกด้วย

เพื่อพัฒนาระบบการทำ transformation อย่างมีประสิทธิภาพ ได้มีการสร้างเชื้อ uracil auxotroph โดยทำการแยกและศึกษาคุณลักษณะของยีน *ura5* และ *ura3* ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน OPRTase และ OMPdecase ตามลำดับ พบว่าลักษณะนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *ura5* และ *ura3* มีความเหมือนในระดับที่สูงกับยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน OPRTase และ OMPdecase ของเชื้อราชนิดอื่นๆ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RT-PCR พบว่ายีน *ura5* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระหว่างที่มีการเปลี่ยนรูปจากราสายเป็นรูปส่า และพบการแสดงออกมากขึ้นเมื่อนำเชื้อในรูปราสายมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 39°C หรือ เลี้ยงในสภาวะที่มี H_2O_2 เข้มข้น 1 mM เป็นเวลา 30 นาที ในการแยกเชื้อที่เป็น uracil auxotroph พบเชื้อ 14 ตัว จากเชื้อตั้งต้นที่นำไปผ่านรังสียูวีจำนวนทั้งหมด 1.77 x 10^6 ตัว โดยพบว่าเชื้อ uracil auxotroph ทั้งหมดยังคงลักษณะจำเพาะที่สำคัญของเชื้อนี้ไว้ ซึ่งประกอบด้วย การสร้างสปอร์ และการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อ เมื่อนำไปทดสอบหาความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของโปรตีน OPRTase พบเชื้อ 7 ตัวที่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้เหมือนกับเชื้อ wild-type ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์ตัวรับสำหรับการศึกษายีนใน เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ ในอนาคต โดยใช้ยีน *ura5* เป็นตัวคัดเลือก

ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธี AMT ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น และมีการนำมาใช้ได้สำเร็จทั้งใน เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ สายพันธุ์ F4 และ เพนนิซิเลี่ยม ซิทรินัม สภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี AMT ประกอบด้วยการใช้ คอนิเดีย หรือ คอนิเดียที่จะเริ่มงอก และ สภาวะบ่มร่วมกันที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เชื้อที่ได้จากการทำ transformation จะมีลักษณะโคโลนีเหมือนยีสต์ เนื่องจากได้มาจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C โดยเชื้อจะทนต่อ bleomycin ประสิทธิภาพของการทำ transformation อยู่ที่ประมาณ 123 ± 3.27 และ 239 ± 13.12 transformant ต่อเพลท เมื่อใช้จำนวนเชื้อตั้งต้นเป็นคอนิเดีย และคอนิเดียที่เริ่มงอก จำนวน 5 x 10^4 ตัว ตามลำดับ จากการศึกษาด้วยวิธี Southern blot analysis แสดงให้เห็นว่าร้อยละ 95 ของเชื้อที่ได้มีจำนวนของ T-DNA 1 ชุด ได้มีการนำ inverse PCR มาใช้จำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณข้างตำแหน่งที่มีการแทรกของ T-DNA โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่า การแทรกเกิดขึ้นแบบสุ่ม และในจำนวนเชื้อที่นำมาศึกษาพบว่า มีการแทรกในตำแหน่งของยีน *stuA* และ *gasC* โดยในเชื้อทั้งหมดที่นำมาศึกษาพบการแทรกของ T-DNA ภายในส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีนของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่มีความผิดปกติในการสร้างรูปร่าง และการสร้างสี มีการแทรกของ T-DNA ในยีนที่หลากหลาย โดยมีเชื้อ 2 ตัวที่พบการแทรกในตำแหน่งที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์ ของยีน นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อที่มีความความผิดปกติในการสร้างผนังเซลล์ การสร้างเมลานิน และการเปลี่ยนรูปร่างของเชื้อได้ โดยสรุป ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า วิธี AMT สามารถใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนในเชื้อรา เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ อย่างกว้างขวาง ซึ่งการศึกษาด้วยวิธีนี้สามารถนำไปจำแนกยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างรูปและความสามารถในการก่อโรค ในเชื้อราที่มีความสำคัญทางการแพทย์ชนิดนี้ ได้อย่างสะดวกมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการแยกเชื้อกลายพันธุ์ I6 ที่ได้จากวิธี AMT ซึ่งสูญเสียความสามารถในการสร้างคอนิเดีย โดยการจำแนกหาตำแหน่งที่มีการแทรกของ T-DNA ด้วยวิธี inverse PCR พบว่า มีการแทรกในยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน S-adenosylmethionine decarboxylase (*sadA*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการสร้างสาร spermidine เมื่อทำการเติม spermidine ลงในอาหาร minimal medium พบการคืนกลับของความสามารถในการสร้าง คอนิเดียเมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C สำหรับการใส่ยีน *sadA* ที่ได้จากเชื้อ wild-type กลับเข้าไปในเชื้อกลายพันธุ์พบการกลับมาสร้าง คอนิเดียได้ เชื้อกลายพันธุ์ I6 มีการเจริญลดลงอย่างมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีสาร spermidine เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ wild-type สายพันธุ์ F4 และเชื้อที่ได้จากการใส่ยีนกลับคืน สายพันธุ์ C3 ในทางกลับกันในอาหารที่มี spermidine ที่มีความเข้มข้น 3 mM เชื้อกลายพันธุ์ I6 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับเชื้อ F4 และ เชื้อ C3 นอกจากนี้พบเชื้อกลายพันธุ์ I6 มีเปอร์เซนต์การงอกของ คอนิเดีย ลดลงอย่างมากในอาหารที่ไม่มี spermidine และพบการงอกเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ spermidine เพิ่มขึ้น โดยพบลักษณะนี้ทั้งในสภาวะที่อุณหภูมิ 27°C และ 37°C ดังนั้นจากที่ทราบว่า การติดเชื้อ เพนนิซิเลี่ยม มาร์เนฟฟิไอ เกิดขึ้นหลังจากที่มีการหายใจเอา คอนิเดีย เข้าไป และจากการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่าในกระบวนการสร้าง spermidine น่าจะมีส่วนที่เป็นเป้าหมายที่มีศักยภาพในการต่อต้านการก่อโรคของเชื้อราที่สำคัญทางการแพทย์ชนิดนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved