Thesis Title	Phenotypic Characterization of *Penicillium marneffei*, Mannoprotein-like Protein Six Gene Deletion Strain
Author	Miss. Pritsana Sawutdeechaikul
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Dr. Monsicha Pongpom Advisor
	Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Co-advisor

ABSTRACT

Penicillium marneffei is a dimorphic pathogenic fungus that causes penicilliosis in immunocompromised people. It is present in the mold form at 25 ^{o}C, while it appears as the yeast pathogenic form at 37 ^{o}C. Mannoproteins are found abundantly on the cell wall of all fungi. Studies from several pathogenic fungi found that mannoproteins are good antigens that can elicit both cell-mediated and humoral mediated immunity. In *P. marneffei*, 14 homologous mannoproteins were grouped into a mannoprotein superfamily. Mp1p was the first isolated mannoprotein in *P. marneffei*. It has demonstrated the ability to utilize fatty acids to create an energy source. Besides the Mplp, no other mannoproteins function has been studied in *P. marneffei*. Our objective of this study is to identify the role of mannoprotein-like protein 6 (Mplp6), which is one of the Mp1p homologous proteins. Previous study has found that the Mplp6 could induce high antibody production in *P. marneffei*-infected patients. Additionally, expression of *MPLP6* gene was found only in the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

yeast. From these properties it would be interesting to apply this protein as a diagnostic marker or as a drug target in the treatment of disease caused by *P. marneffei*.

In this study, an *MPLP6* deletion mutant (Δ*MPLP6*) was generated by using targeted gene deletion approach. Southern blot analysis demonstrated the absence of *MPLP6* gene; however, integrations of knockout construct also occurred at the other sites inside the genome. Subsequently, an *MPLP6* complemented strain was constructed for phenotypic comparison. Phenotypic study was performed with both the mold and yeast forms of wild type SPM4,Δ *MPLP6* and complemented strains. No difference has been found in macroscopic-, microscopic-morphology, septation, conidiation and tolerance to stressor including sodium dedecyl sulfate (SDS), calcofluor white (CFW), hydrogen peroxide (H_2O_2) and sorbitol. High homology levels have been found from alignment results between Mplp6 and functional domain LBD2 of Mp1p, especially at the important residues for binding to palmitic acid (long chain fatty acid). We speculate that these two proteins have similar and compensate function. Preliminary experiment was performed. All strains were cultured on media substituted with fatty acids; tween-20, tween-40, and tween-80, to serve as sole carbon sources instead of glucose. We found that all of them were able to grow without any different appearances on all media at both 25 °C and 37 °C. The absence of *MPLP6* gene did not influence the growth on fatty acids containing media; other homologous genes in the same superfamily may have compensated its function or *MPLP6* may not involve with fatty acid utilization. Additionally, other more suitable fatty acids should be further tested.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In summary, the *MPLP6* deletion strain was generated successfully. The deletion of this gene did not affect to the phenotype, response to certain stressors and the ability to grow on fatty acid containing media. However, conclusion can be made that the *MPLP6* gene is dispensable, its absence did not cause lethal effect in *P. marneffei*. This result may be explained by the existence of several gene homologues inside its genome. Further investigation should be done to clarify its exact role.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อ *Penicillium marneffei* สายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของยีนแมนโนโปรตีนไลค์โปรตีนซิกซ์

ผู้เขียน นางสาวปริศนา สวัสดีชัยกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ. ดร. มณสิชา ป้องป้อม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Penicillium marneffei เป็นเชื้อราสองรูปที่ก่อให้เกิดโรค Penicilliosis ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ที่อุณหภูมิ 25 °C เชื้อจะอยู่ในรูปราสาย เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เชื้อจะอยู่ในรูปของยีสต์ แมนโนโปรตีนเป็นโปรตีนที่พบเป็นจำนวนมากบนผนังเซลล์ของเชื้อราทุกชนิดและพบว่าแมนโนโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่ดี สามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันได้ทั้งแบบผ่านเซลล์และสารน้ำ ในเชื้อ *P. marneffei* มีแมนโนโปรตีน (ที่มาจากรากเดียวกัน) อยู่ถึง 14 ชนิด ถูกจัดให้อยู่รวมกันในกลุ่ม mannoprotein superfamily โดยมี Mp1p เป็นแมนโนโปรตีนตัวแรกที่ค้นพบในเชื้อ *P. marneffei* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการจับไขมันเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน นอกจาก Mp1p แล้ว ยังไม่มีการศึกษาถึงหน้าที่ของ mannoprotein ตัวอื่นในเชื้อ *P. marneffei* งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน mannoprotein-like protein 6 (Mplp6) ซึ่งเป็นหนึ่งในโปรตีน ที่มีรากเดียวกันกับ Mp1p และเนื่องด้วยในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีน Mplp6 มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีในผู้ติดเชื้อ *P. marneffei* ได้สูง อีกทั้งยังมีการแสดงออกเฉพาะในสภาวะยีสต์ คุณสมบัติเหล่านี้ทำให้โปรตีนชนิดนี้มีความน่าสนใจที่จะประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับการตรวจวินิจฉัย หรือเป็นเป้าหมายของยาในด้านการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก *P. marneffei*

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสร้างเชื้อ *P. marneffei* สายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของยีน *MPLP6* (Δ*MPLP6*) โดยใช้หลักการ targeted gene deletion จากการวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot พบว่ามีการขาดหายไปของยีน *MPLP6* อย่างไรก็ดีพบว่ามีการแทรกของ knockout construct ที่ตำแหน่งอื่นภายในโครโมโซมด้วย ต่อมาได้มีการสร้าง complemented strain ขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางฟีโนไทป์ จากการศึกษาไม่พบความแตกต่างทางด้านรูปร่างโคโลนี รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การสร้างผนังกั้นเซลล์ การสร้างโคนิเดีย รวมถึงความสามารถในการทนต่อสารต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อเซลล์ ได้แก่ sodium dodecyl sulfate (SDS), calcofluor white (CFW), hydrogen peroxide (H_2O_2) และ sorbitol ของเชื้อสายพันธุ์ที่มียีนปกติ (SPM4), Δ*MPLP6* และ complemented strain ทั้งในรูปแบบราสายและยีสต์ จากผล alignment ระหว่าง Mplp6 กับส่วนที่เป็น functional domain LBD2 ของ Mp1p พบความคล้ายกันสูง ทำให้คาดว่าหน้าที่ของโปรตีนทั้งสองน่าจะคล้ายกันและทดแทนกันได้ การศึกษาเบื้องต้นได้ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เติมกรดไขมัน tween-20, tween-40 และ tween-80 สำหรับให้เชื้อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส พบว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญได้ไม่แตกต่างกันบนอาหารแต่ละชนิดทั้งที่ 25 °C และ 37°C แสดงว่าการขาดยีน *MPLP6* ไม่ส่งผลต่อการเจริญบนอาหารที่มีกรดไขมัน คาดว่าอาจมีการทำหน้าที่แทนโดยยีนอื่นใน family เดียวกัน หรือยีน *MPLP6* อาจไม่เกี่ยวข้องกับการใช้กรดไขมัน นอกจากนี้ควรใช้ไขมันชนิดอื่นที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

โดยสรุป สามารถสร้าง *P. marneffei* สายพันธุ์ที่มีการขาดหายไปของยีน *MPLP6* ได้สำเร็จ โดยการขาดหายไปของยีนดังกล่าวไม่ส่งผลต่อลักษณะทางฟีโนไท ป์ของเชื้อและความทนต่อสารก่อความเครียด รวมถึงความสามารถในการเจริญบนอาหารที่ มีกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามสรุปได้ว่าเชื้อ *P. marneffei* ไม่จำเป็นต้องมียีน *MPLP6* การขาดยีนนี้ไม่ทำให้เชื้อตาย ซึ่งอาจอธิบายได้จากการที่มียีนคล้ายกันหลายชนิดในจีโนมของเชื้อ และหน้าที่ที่แท้จริงของยีนนี้ยังควรจะต้องมีการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved