

Abstract

Project Code : TRG5880057

Project Title : Role of *trpA* gene in morphogenesis and virulence of *Penicillium marneffe*

Investigator : Assist. Prof. Dr. Aksarakorn Kummasook, Division of Clinical Microbiology and Parasitology, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao

E-mail Address : aksarakorn.ku@up.ac.th

Project Period : July, 2015 – April, 2020

Talaromyces marneffe is a thermally dimorphic and opportunistic fungus that can cause infection in immune compromised persons, particularly in endemic areas including Southeast Asia and South of China. At the mold phase, the wild-type strain of *T. marneffe* exhibits a mycelial morphology that is marked by the development of specialized structures bearing conidia. At the yeast phase, the yeast cells are globose to oval with a unique divide by fission, and often have a central septum. Survival in the human body by development of the yeast cell appears to be requisite for pathogenesis. In a prior study using *Agrobacterium*-mediated transformation for random mutagenesis via T-DNA integration, a mutant defective in conidiation named I81. Subsequent sequencing and analysis of the nucleotides flanking the integration site revealed that a total of 5,355 bp consisting of the whole open reading frame of a DUF907 domain protein (GenBank Accession no. XM_002147624) covering 5' and 3' untranslated regions were apparently deleted. The deleted gene was designed as *trpA* gene according to the highly similar of deduced amino acids of an open reading frame of this gene to transient receptor potential (TRP) channels. Interestingly, the I81 show the defective in phialide production, leading to the conidia lie on the conidiophore as well as the lack of fission of yeast phase with large vacuole. Additionally, the conidial germination rate of the mutant is less than the wild type and complemented strains in mold phase, whereas in the yeast phase is slightly lower, and eventually almost equal after the incubation period at 24 h. The *trpA* gene is required for oxidative and osmotic stress response. The mutant I81 is sensitive to oxidative stress including H₂O₂, menadione, and *t*-BOOH, as well as hyperosmotic stress, which is sorbitol. Moreover, the *trpA* is crucial for cell wall stress response, leading to the hypersensitive to SDS. Given the presumption that *T. marneffe* infections are initiated following inhalation of conidia, and that pathogenesis is dependent upon survival inside macrophage with oxidative stress. Thus, transient receptor protein may be a promising target for potential therapeutic agent for combating infections by this medically important fungus.

Keywords : *Talaromyces marneffe*; dimorphic fungi; transient receptor protein; *trpA*

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5880057

ชื่อโครงการ : บทบาทของยีน *trpA* ในการสร้างรูปร่างและความรุนแรงต่อการก่อโรคของเชื้อเพนนิซิลีียม มาร์เนฟฟิไอ

ชื่อนักวิจัย : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อักษรกร คำมาสุข แขนงวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาคลินิก
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

E-mail Address : aksarakorn.ku@up.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2558 – 30 เมษายน 2563

Talaromyces marneffei จัดเป็นราสองรูปที่ฉวยโอกาสก่อโรคในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยมีพื้นที่ระบาดที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางใต้ของประเทศจีน ในสภาวะราสายเชื้อปกติจะสร้างสายราและมีโครงสร้างที่จำเพาะสำหรับการสร้างคอนิเดีย ในขณะที่สภาวะยีสต์เชื้อจะมีลักษณะกลมและแบ่งตัวแบบ fission โดยมีผนังกันแบ่งกลาง ซึ่งกลไกที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อนี้คือการอยู่รอดของยีสต์ในร่างกายของมนุษย์ โดยการศึกษาที่ผ่านมาได้ทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ด้วยหลักการใช้เชื้อ *Agrobacterium* เพื่อนำส่ง T-DNA เข้าไปแบบสุ่ม แล้วได้เชื้อกลายพันธุ์ที่มีความปกติในการสร้างคอนิเดียโดยตั้งชื่อว่า I81 เมื่อได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่าในการแทรกเกิดการขาดหายไปของท่อนยีนและส่วนหน้ากับส่วนหลังของยีนรวมกัน 5,355 bp โดยยีนที่ขาดหายไปมีความเหมือนทุกประการกับลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข GenBank Accession no. XM_002147624 และได้ตั้งชื่อยีน *trpA* เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนสูงสุดกับโปรตีน transient receptor potential (TRP) โดยเป็นที่น่าสนใจว่าเชื้อสายพันธุ์ I81 ไม่มีการสร้าง phialide ทำให้คอนิเดียที่สร้างขึ้นตั้งอยู่บน conidiophore และไม่พบการเกิด fission ของยีสต์นี้ แต่กลับพบว่ายีสต์มีขนาดของแควคิวโอที่ใหญ่ขึ้นอีก นอกจากนี้อัตราการงอกของเชื้อ I81 ในสภาวะราสายต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์ที่มีการใส่ยีนกลับ แต่ในสภาวะยีสต์จะพบความแตกต่างเล็กน้อยและมีอัตราการงอกใกล้เคียงกันที่สุดในที่สุดเมื่อครบ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *trpA* มีความจำเป็นต่อการตอบสนองต่อสภาวะเครียดแบบออกซิเดชันและออสโมติกอีกด้วย โดยพบว่าเชื้อ I81 จะมีความไวมากต่อสารที่ก่อให้เกิดสภาวะเครียดชนิดออกซิเดชันมากขึ้น เช่น H_2O_2 menadione และ *t*-BOOH เป็นต้น และเชื้อยังมีความไวต่อความเครียดแบบออสโมติก เช่น sorbitol นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ I81 มีความไวมากต่อสารที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของผนังเซลล์เช่น SDS จากการคาดคะเนว่าเชื้อ *T. marneffei* น่าจะมีการติดเชื้อมาทางเดินหายใจ ซึ่งการที่เชื้อจะก่อโรคได้ต้องเกิดการการที่เชื้อสามารถอยู่รอดได้ในเซลล์แมคโครฟาสในสภาวะที่มีความเครียดแบบออกซิเดชัน ดังนั้นโปรตีน transient receptor protein อาจเป็นเป้าหมายของยาต้านเพื่อต้านการติดเชื้อมาที่ก่อโรคที่สำคัญชนิดนี้

คำหลัก : ธาลาโรมัยเซสมาร์เนฟฟิไอ ราสองรูป ทรานเซียนรีเซปเตอร์โปรตีน ทีอาร์พีไอ