Thesis Title Cloning and Analysis of Genes Encoding Antigenic Proteins from *Penicillium marneffei*

Author Miss Patthama Pongpom

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut Member
Assoc. Prof. Dr. Pichart Uparanukraw Member

ABSTRACT

Penicillium marneffei is a fungal pathogen that causes an emerging disseminated opportunistic human disease, penicilliosis marneffei. This disease is important because the increasing rate of the infection coincides with the epidemic of AIDS in Northern Thailand. Several antigenic proteins of *P. marneffei* were reported by the use of Western immunoblot analysis. However, most of them have not been purified or characterized. The objective of this study was to clone and analyze antigenic protein-encoding genes from the yeast phase of *P. marneffei* since this morphology represents the *in vivo* form of this fungus.

Initially, a cDNA library was constructed from the yeast form of *P. marneffei*. High quality mRNA from yeast cells was enriched by using an oligo(dT) cellulose binding column. The cDNA library was constructed by using RNaseH-reverse transcriptase and λZipLox vector. A primary library contained 2.5 x 10^5 pfu/ml and an amplified library titer resulted in 5 x 10^9 pfu/ml. Both libraries yielded up to 98% recombinant phages, indicating a high efficiency of cDNA cloning. Moreover, cDNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

clones encoding actin and hsp70, two housekeeping proteins, were readily identified by screening the library with a DNA probe and a monoclonal antibody, respectively.

Subsequently, the cDNA library was screened for the clones encoding antigenic proteins of *P. marneffei*. The screening assay was performed by using purified antibody from pooled sera of five *P. marneffei*-infected patients. Twenty-eight positive clones were isolated from screening approximately 100,000 pfu. The positive clones were categorized into 18 groups by DNA hybridization assays. DNA sequence analysis found that 10 groups of the clones encoded proteins with known function, whereas 7 groups were of unknown function. One group was discarded because it contained no inserted gene. Genes in groups of known function encoded catalase-peroxidase, heat shock protein 30, fructose-1,6-bisphosphatase, 60S ribosomal protein, cytochrome C oxidase, NADH-ubiquinone oxidoreductase, Mp1p-like protein, glutathione peroxidase, thymine synthase, and stearic acid desaturase. They were the clones in group 1 (P1, P2, P4, P8, P16, P19, P20), 3 (P5, P23), 6 (P9), 7 (P10), 9 (P12, P25, P27), 10 (P13), 12 (P15, P18), 13 (P17), 16 (P24), and 18 (P28), respectively. The clones of unknown function were in group 2 (P3), 4 (P6), 5 (P7), 8 (P11), 11 (P14), 14 (P21), and 17 (P26). Group 15 (P22; no insert) was discarded.

Group 1, which contained the gene-encoding catalase-peroxidase designated *cpeA*, was chosen for further study. This group contained the highest number of clones. Southern blot analysis showed that the *P. marneffei* genome contains only single copy of this gene. Northern blot analysis showed differential expression of *cpeA*, depending on temperature and time of incubation. Specifically, expression seemed to be induced by incubation at 37 °C, during which the fungus was developing into the yeast form. The *cpeA* gene fragment was subcloned into vector pRSET B. The fusion protein derived from this subclone was inducible. The CpeA-His tag fusion protein was then used in Western immunoblot assay. Antibodies to the recombinant protein were found in 8 of 15 (53.3%) serum samples from *P. marneffei*-infected AIDS patients. Sera obtained from normal healthy people in the endemic area possessed negative to weak reactivity to the fusion protein. Moreover, sera derived from patients with candidiasis, aspergillosis, histoplasmosis, cryptococcosis, and tuberculosis were negative to the fusion protein. These results suggested the potential use of this CpeA fusion protein as diagnostic marker of penicilliosis marneffei.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	โคลนนิ่งและการวิเคราะห์ยีนส์ที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดที่เป็นแอนติเจนจากเชื้อเพนนิซิเลี่ยมมาร์เนฟฟีไอ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวปัทมา ป้องป้อม
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม ประธานกรรมการ รศ.ดร. นพพร สิทธิสมบัติ กรรมการ รศ.ดร. พิชาติ อุปรานุเคราะห์ กรรมการ

บทคัดย่อ

Penicillium marneffei เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อฉกฉวยโอกาสแบบแพร่กระจายในมนุษย์ หรือ penicilliosis marneffei โรคนี้มีความสำคัญโดยเฉพาะในภาคเหนือของประเทศไทยเนื่องจากมีอัตราการติดเชื้อที่สูงควบคู่ไปกับการระบาดของโรคเอดส์ ได้มีการรายงานโปรตีนแอนติเจนหลายชนิดของเชื้อ *P. marneffei* โดยใช้วิธี Western immunoblot อย่างไรก็ตาม โปรตีนแอนติเจนส่วนใหญ่ยังไม่ได้มีการแยกและศึกษาคุณลักษณะ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทำการโคลนและวิเคราะห์ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* ในรูปแบบยีสต์เนื่องจากเป็นรูปแบบของเชื้อที่พบในร่างกายผู้ป่วย

ในขั้นตอนแรกได้ทำการสร้างธนาคารคอมพลีเมนต์ทารีดีเอนเอ (cDNA) ขึ้นจากเชื้อ *P. marneffei* ในรูปยีสต์ โดยแยก mRNA ที่มีคุณภาพจากยีสต์เซลล์ให้มีสัดส่วนที่มากขึ้น ด้วยวิธีการใช้ oligo(dT) cellulose binding column จากนั้น ทำการสร้างธนาคาร cDNA โดยใช้ RNaseH-reverse transcriptase และ λZipLox vector ธนาคาร cDNA เริ่มต้นมีขนาด 2.5×10^5 pfu/ml และหลังการเพิ่มจำนวนแล้ว เพิ่มขึ้นเป็น 5×10^9 pfu/ml ธนาคาร cDNA ทั้งคู่มีฝาจลูกผสมอยู่ถึงร้อยละ 98 บ่งชี้ว่าการโคลน cDNA มีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ ยังสามารถตรวจพบโคลนที่กำหนดการสร้าง actin และ hsp70 ซึ่งเป็น housekeeping proteins ได้ในทันทีเมื่อทำการคัดกรองธนาคาร cDNA ด้วย DNA probe และ monoclonal antibody ตามลำดับ

ต่อมาได้ทำการตรวจกรองธนาคาร cDNA เพื่อหาโคลนที่มียีนส์กำหนดการสร้างโปรตีนแอนติเจนของเชื้อ *P. marneffei* การคัดกรองได้ใช้แอนติบอดีที่แยกจากซีรัมรวมของผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อ *P. marneffei* จำนวน 5 ราย จากการคัดกรองประมาณ 100,000 pfu สามารถแยกโคลนที่ให้ผลบวกทั้งหมด 28 โคลน จากนั้น โคลนได้ถูกจัดกลุ่มออกได้เป็น 18 กลุ่มโดยวิธี DNA hybridization การวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่ามีกลุ่มที่ทราบหน้าที่ของยีนที่อยู่ภายในจำนวน 10 กลุ่ม ที่ไม่ทราบหน้าที่อยู่ 7 กลุ่ม และมี 1 กลุ่มที่ทิ้งไปเนื่องจากไม่มียีนแทรกอยู่ภายในนั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยีนส์ในกลุ่มที่ทราบหน้าที่ พบว่ากำหนดการสร้าง Catalase-peroxidase, Heat shock protein 30, Fructose-1,6-bisphosphatase, 60S Ribosomal protein, Cytochrome C oxidase, NADH-ubiquinone oxidoreductase, Mp1p-like protein, Glutathione peroxidase, Thymine synthase และ Stearic acid desaturase โดยเป็นโคลนในกลุ่มที่ 1 (P1, P2, P4, P8, P16, P19, P20), 3 (P5, P23), 6 (P9), 7 (P10), 9 (P12, P25, P27), 10 (P13), 12 (P15, P18), 13 (P17), 16 (P24) และ 18 (P28) ตามลำดับ สำหรับโคลนที่ไม่ทราบหน้าที่ได้แก่กลุ่มที่ 2 (P3), 4 (P6), 5 (P7), 8 (P11), 11 (P14), 14 (P21) และ 17 (P26) โคลนในกลุ่มที่ 15 (P22 ซึ่งไม่มียีนแทรกอยู่) ได้ถูกทิ้งไป

ได้ทำการเลือกโคลนในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมียีนที่กำหนดการสร้าง catalase-peroxidase ให้ชื่อว่า *cpeA* เพื่อศึกษารายละเอียดเพิ่มเติม กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีจำนวนโคลนอยู่มากที่สุด จากการศึกษาโดยวิธี Southern blot analysis พบว่ายีนนี้มีจำนวน 1 ชุดภายในโครโมโซมของเชื้อ *P. marneffei* การวิเคราะห์โดยวิธี Northern blot analysis พบมีความแตกต่างในรูปแบบการแสดงออกของยีน *cpeA* โดยขึ้นกับอุณหภูมิและเวลาในการเพาะเชื้อ การแสดงออกของยีนมีการเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะหลังการเพาะเชื้อที่ 37 °C ซึ่งเชื้อมีการพัฒนาเป็นยีสต์ จากนั้นได้ทำการ subclone ส่วนของ *cpeA* เข้าไปในเวคเตอร์ pRSET B และเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ fusion protein จาก subclone นี้ใน *E. coli* ได้นำ CpeA-His tag fusion protein มาใช้ใน Western immunoblot assay พบว่าสามารถตรวจพบแอนติบอดีในผู้ป่วยเอดส์ที่มีการติดเชื้อ *P. marneffei* ได้จำนวน 8 คน จากการทดสอบจำนวน 15 คน (คิดเป็น 53.3%) สำหรับซีรัมที่ได้จากคนปกติที่อาศัยอยู่ในถิ่นระบาด พบว่าให้ปฏิกิริยาเป็นลบถึงอย่างอ่อนๆ กับ fusion protein นอกจากนี้ซีรัมจากผู้ป่วยโรค candidiasis, aspergillosis, histoplasmosis, cryptococcosis และ tuberculosis ก็ให้ผลเป็นลบกับโปรตีนนี้ ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ ในการนำ CpeA fusion protein นี้มาใช้เป็น diagnostic marker สำหรับ penicilliosis marneffei

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved