สายน้ำทิพย์ รังดิษฐ : บทบาทของยีน *AMT2* ต่อการสร้างปัจจัยความรุนแรงและกระบวนการผ่านแนวกั้นระหว่างหลอดเลือดและสมองของ *Cryptococcus neoformans* (THE ROLE OF *AMT2* GENE IN ASSOCIATION WITH VIRULENCE FACTORS AND TRANSMIGRATION PROCESS OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.มัณฑนา แจ่มกลาง, 59 หน้า.

คำสำคัญ: เชื้อ *Cryptococcus neoformans*/ ยีน *AMT2*/ แนวกั้นระหว่างหลอดเลือดกับสมอง

เชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นเชื้อก่อโรคชนิดมีแคปซูลหุ้มที่ก่อให้เกิดภัยคุกคามชีวิตด้วยการบุกรุกเข้าไปยังระบบประสาทส่วนกลางซึ่งพบได้บ่อยในกลุ่มผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องประกอบไปด้วย ผู้ป่วยโรคเอดส์ กลไกในการผ่านแนวกั้นระหว่างหลอดเลือดกับสมองของเชื้อ *Cryptococcus neoformans* เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อน จากการศึกษาก่อนหน้าในแบบจำลองแนวกั้นระหว่างหลอดเลือดและสมอง (ในหลอดทดลอง) พบว่า เชื้อ *C. neoformans* มีการแสดงออกของยีนบางกลุ่มในระดับจีโนมเพิ่มมากขึ้นขณะที่เชื้อมีการสัมผัสกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด หนึ่งในยีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นคือยีน ammonium transporter (*AMT2*) จากการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้านี้พบว่ายีน ammonium transporter มีความเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกทางคุณสมบัติของเซลล์ยีสต์ในการรุกรานเซลล์โฮสต์ได้ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อตรวจสอบบทบาทของยีน *AMT2* ในกระบวนการผ่านเข้าสู่สมองของเชื้อ *C. neoformans* ศึกษาความเกี่ยวข้องในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อ และเพื่อพิจารณาความเกี่ยวข้องของยีน *AMT2* ในการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. neoformans* ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า เชื้อ *C. neoformans* ที่ขาดยีน *AMT2* (*amt2Δ*) มีความสามารถในการผ่านเข้าสู่สมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (H99) ในแบบจำลองแนวกั้นระหว่างหลอดเลือดและสมอง นอกจากนี้ยังคาดว่า เชื้อ *C. neoformans* ผ่านเข้าสู่สมองด้วยกลไก transcellular ซึ่งทดสอบด้วยวิธี FITC-dextran permeability assay ในด้านการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถสร้างสายราเทียมภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัดไนโตรเจนได้ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการสร้างปัจจัยความรุนแรงของเชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์ *amt2Δ* ยังคงอยู่ ได้แก่ การเจริญที่อุณหภูมิ 37°C การสร้างเมลานิน การหลั่งเอนไซม์ยูรีเอส และการหลั่งของเอนไซม์ฟอสโฟลิเพส เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม นอกจากนี้ การเปรียบเทียบอัตราการเจริญบนอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนแตกต่างกันของเชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์และสายพันธุ์ดั้งเดิมยังคงไม่แตกต่างกัน จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า ยีน *AMT2* มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผ่านเข้าสู่สมองและส่งผลต่อความสามารถในการสร้างแคปซูล อย่างไรก็ตาม ยีน *AMT2* ไม่มีความสัมพันธ์กับ

ปัจจัยความรุนแรงอื่น เช่น การหลั่งเอนไซม์ยูรีเอส การหลั่งของเอนไซม์ฟอสโฟลิเพส และ การสร้างเมลานิน ของเชื้อ *C. neoformans* นอกจากนี้ เชื้อสายพันธุ์เชื้อสายพันธุ์กลายพันธุ์ *amt2Δ* ยังไม่พบความบกพร่องของการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะที่ถูกจำกัดไนโตรเจน สำหรับทิศทางการวิจัยต่อเนื่องในอนาคตคือ การศึกษากลไกของยีน *AMT2* ในกระบวนการผ่านเข้าสู่สมองของเชื้อ *C. neoformans*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาปรีคลินิก
ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนักศึกษา สายน้ำทิพย์ รังสิชัย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

SAINAMTHIP RANGDIST : THE ROLE OF *AMT2* GENE IN ASSOCIATION WITH VIRULENCE FACTORS AND TRANSMIGRATION PROCESS OF *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER. THESIS ADVISOR : MANTANA JAMKLANG, Ph.D. 59 PP.

Keyword: *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/ AMT2* GENE/ BLOOD-BRAIN BARRIER

*Cryptococcus neoformans (Cn)* is a pathogenic encapsulated yeast that cause life-threatening fungal invasion of the central nervous system (CNS) in immunocompromised individuals, including HIV patients. The mechanism of *Cn* in transmigration across the blood-brain barrier (BBB) is a complex process. Our previous data on cryptococcal transcriptome demonstrated that exposure of *C. neoformans* with the endothelial cells of the *in vitro* model of BBB upregulated some genes of *C. neoformans* including the amt family ammonium transporter (*AMT2*) whereas *C. neoformans* alone with no exposure to the BBB did not show the *AMT2* gene expression change. Previous studies elsewhere revealed that the *AMT2* induces an invasive phenotype expressing with pseudohyphal growth. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of the *AMT2* gene in the transmigration process of *C. neoformans* across the BBB and whether or not the *AMT2* gene are associated with other common virulence factors as well as determine the relevant of the gene in morphological changes in *C. neoformans.*

In this study, we found that the mutant strain of *C. neoformans* lacking *AMT2* gene (*amt2Δ*) showed a significantly decreased transmigration ability compared to the wild-type strain (H99) determined by the *in vitro* model of BBB. The mechanism of *C. neoformans* was suspected to be transcellular invasion determined by FITC-dextran permeability assays. The morphological changes under nitrogen-limiting conditions were observed by light microscope did not reveal pseudohyphal growth in both tested strains. The ability to generate virulence factors including melanin production, growth rate at 37°C (thermotolerance), urease and phospholipase activity of both tested strains were comparable and the results showed the *AMT2* deletion was not associated with some virulence factors whereas the polysaccharide capsule size of the mutant

strain was significantly decreased when compared to that of the wild-type strain. In addition, the comparison of the growth rate of the mutant and wild-type strain on the ammonium depletion agar was not significantly different. In conclusion, *AMT2* gene plays a significant role in transmigration process across the BBB and capsule production of *C. neoformans*. However, *AMT2* gene was not associated with other important virulence factors such as urease production, phospholipase production and melanin pigment found in *C. neoformans*. Moreover, the mutant strain has no defect on growth at 37°C and low concentration of ammonium. Future direction is to explore how *AMT2* gene play roles in transmigration process of *C. neoformans*.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Preclinical Sciences

Academic Year 2022

Student's Signature Sairamthip Rangdist.

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature Walee Pellu.