

รหัสโครงการ SUT1-102-52-24-02



## รายงานการวิจัย

การศึกษาหน้าที่ในการนำโมเลกุลผ่านเข้าช่องแพร่ผ่านพอรินของแบคทีเรีย (*Burkholderia pseudomallei*) ที่ก่อโรคมลิวติออยโตซิสโดยเทคนิค planar lipid bilayer reconstitution  
Functional study of the molecular uptake through a diffusion porin of the Meloidosis bacterium (*Burkholderia pseudomallei*) using planar lipid bilayer reconstitution technique

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2552-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กุมภาพันธ์ 2556

## บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia pseudomallei* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคmelioidosis ซึ่งเป็นโรคติดเชื้อในคนและในสัตว์ที่พบได้ในภาคเหนือและภาคอีสานของประเทศไทย การรักษาโรคมelioidosis ทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่สูง มีรายงานว่า การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากการที่ตัวยายาผ่านเข้าสู่ช่องพอรินที่อยู่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียได้ต่ำ งานวิจัยก่อนหน้านี้นักวิจัยได้ทำการแยกโปรตีนขนาด 38 กิโลดาลตันคือ BpsOmp38 จากเยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย Bps ได้ จากการทำนายโครงสร้างพื้นฐานและคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี liposome swelling assay พบว่า มี โปรตีนมีโครงสร้าง  $\beta$ -barrel ที่มีคุณสมบัติเป็นช่องแพร่ผ่านพอริน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค planar black lipid membrane reconstitution (BLM) ทำการศึกษาการทำงานของช่องเดี่ยวของโปรตีน Bps สามหน่วยย่อย โดยพบว่ามีความค่า conductance เท่ากับ  $2.7 \pm 0.3$  nS ในสารละลาย 1M KCl การวัดด้วยวิธี high time resolution BLM พบว่ายาปฏิชีวนะผ่านเข้าสู่ช่อง BpsOmp38 ในลักษณะขึ้นกับความเข้มข้นของสารโดยมีค่าคงที่อัตราการข้ามผ่านตามลำดับดังนี้ norfloxacin  $\gg$  ertapenem  $>$  ceftazidime  $>$  cefepime  $>$  imipenem  $>$  meropenem  $\gg$  penicillin G และพบว่าค่า dwell time ของยา ertapenem แปรผันในลักษณะ exponentially decay กับอุณหภูมิที่ทำการวัด ที่ค่า applied voltage เท่ากับ 100 mV ค่าพลังงานกีดขวางของการจับและการปล่อยของ ertapenem จากบริเวณจับที่อยู่ภายในช่อง BpsOmp38 มีค่าคำนวณเท่ากับ 12 kT และ 13 kT ตามลำดับ

## ABSTRACT

*Burkholderia pseudomallei* (Bps) is a Gram-negative bacterium that causes melioidosis, an infectious disease of animals and humans common in northern and north-eastern parts of Thailand. Successful treatment of melioidosis is difficult due to high intrinsic resistance of Bps to most antibacterial agents. It has been suggested that the antimicrobial resistance of this organism may result from poor permeability of the active compounds through porin channels located in the outer membrane (OM) of the bacterium. In previous work, a 38-kDa protein, named “BpsOmp38”, was isolated from the OM of Bps. A topology prediction and liposome-swelling assay suggested that BpsOmp38 comprises a  $\beta$ -barrel structure and acts as a general diffusion porin. The present study employed planar black lipid membrane (BLM) reconstitution to demonstrate the single-channel conductance of the trimeric BpsOmp38 to be  $2.7 \pm 0.3$  nS in 1 M KCl electrolyte. High-time resolution BLM measurements displayed ion current blockages of seven antimicrobial agents in a concentration-dependent manner with the translocation on-rate ( $k_{on}$ ) following the order: norfloxacin >> ertapenem > ceftazidime > cefepime > imipenem > meropenem >> penicillin G. The dwell time of a selected antimicrobial agent (ertapenem) decayed exponentially with increasing temperature. The energy barrier for the ertapenem binding to the affinity site inside the BpsOmp38 channel was estimated from the Arrhenius plot to be 12 kT and for the ertapenem release to be 13 kT at +100 mV.



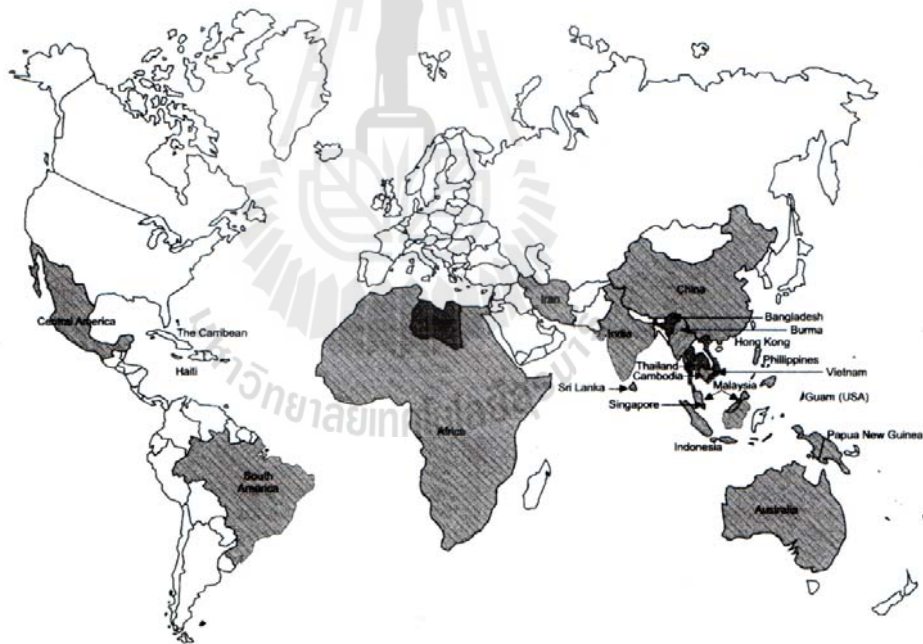
# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

*Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อร้ายแรงคือmelioidosis เชื้อนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบสัณฐานของโคโลนีสี่เหลี่ยมคี่ มีสีครีมหรือสีแทน สามารถเคลื่อนไหวโดยใช้ส่วนที่เรียกว่าแฟลกเจลลา (flagella) และสามารถย่อยสลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส มอลโตส แลคโตส แมนนิทอล และน้ำตาลโมเลกุลคู่ เซลโลไบโอสเพื่อนำไปใช้เป็นสารอาหารภายใต้แก๊ส เซลล์ (Delost, 1997)

ได้มีรายงานเกี่ยวกับการระบาดของโรคติดเชื้อmelioidosis ทั้งในคนและสัตว์ทั่วโลกโดยเฉพาะในภูมิภาคเขตร้อนครอบคลุมประเทศในแถบแอฟริกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (Woods et al., 1999) (รูปที่ 1.1) การศึกษาครั้งแรกพบว่าเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ในดินโคลนและแหล่งน้ำนิ่ง แต่สามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปในอากาศในสภาพร้อนชื้นและในช่วงหน้าฝน รูปที่ 1.1 แสดงพื้นที่บนแผนที่โลกที่มีการระบาดของโรค Melioidosis

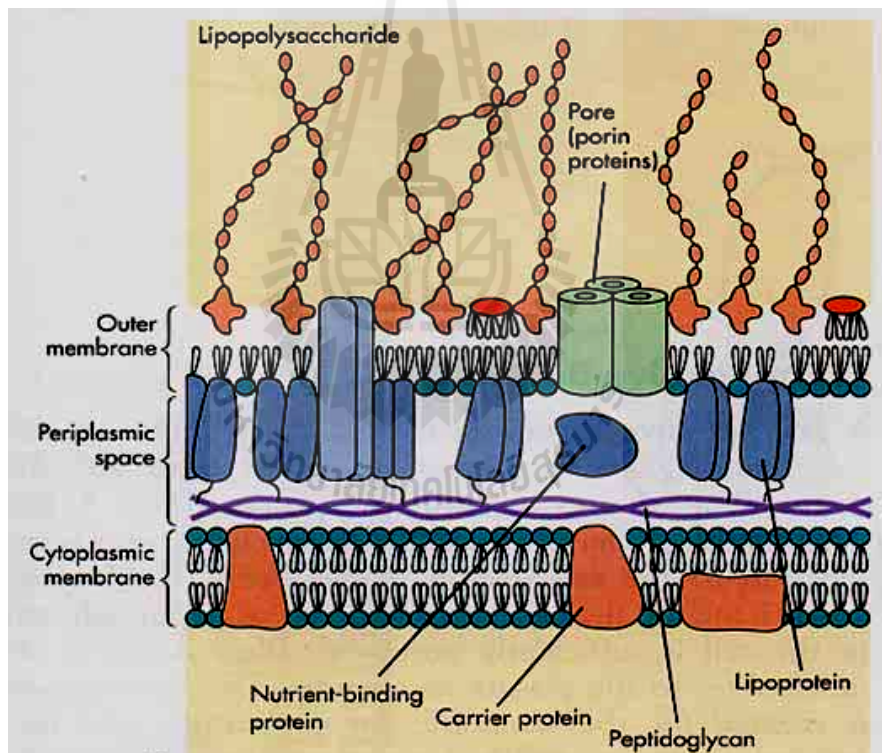


หมายเหตุ: พื้นที่สีเทาแสดงการพบเชื้อปนเปื้อนอยู่ตามแหล่งดินและน้ำ ส่วนพื้นที่สีดำแสดงการระบาดรุนแรง (Ellis and Titball, 1999)

อาการเจ็บป่วยอันเป็นสาเหตุมาจากการติดเชื้อ *B. pseudomallei* สามารถเกิดขึ้นได้ในหลายลักษณะทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และแบบเรื้อรัง ลักษณะอาการของโรคแบบเฉียบพลันโดยทั่วไปคือ ปอดบวม เป็นไข้ และเกิดสภาวะ leukocytosis ภายใน 2 ถึง 3 วัน หลังจากการติดเชื้อ ในกรณีผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงจะเกิดอาการระบบหายใจล้มเหลว เกิดฝีหนองบริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น สมอง เยื่อหุ้มหัวใจ ตับ และกระดูก เป็นต้น ส่วนผู้ที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังอาจมีพัฒนาการไปสู่โรควัณโรค

หรือโรคมะเร็งปอดได้ การติดเชื้อเกิดจากการหายใจเอาเชื้อที่ปะปนมากับฝุ่นละอองที่กระจายอยู่ในอากาศ หรือสัมผัสกับสิ่งของที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่ แต่การติดต่อสัมผัสโดยตรงระหว่างผู้ป่วยพบว่ามีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อย ผู้ป่วยด้วยโรคนี้อัตราการเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงถ้าไม่ได้เข้ารับการรักษาทันท่วงที โดยหนึ่งในสามของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะมีรายงานว่าเสียชีวิต

สำหรับกลไกการเกิดโรคนั้นมีการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. pseudomallei* ผลิตทอกซินบางชนิดซึ่งมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีนของ macrophage การที่เชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage เช่นเดียวกับ polynuclear phagocyte อาจเกี่ยวข้องกับการฟักตัวของเชื้อในผู้ป่วยเป็นเวลานาน ๆ ก่อนแสดงอาการ ได้มีรายงานว่าลักษณะโครงสร้างภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมีบทบาทต่อการทำงานเบื้องต้นของแบคทีเรีย (Gotoh et al., 1994) โดยภายในโครงสร้างของเยื่อหุ้มด้านนอกของเซลล์แบคทีเรียแกรมลบจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า พอริน (porin) โปรตีนนี้ทำหน้าที่เป็นช่องแพร่ผ่านโดยนำโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น กลูโคส กรดอะมิโน หรือสารอาหารขนาดต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ (Nakae, 1976) (รูปที่ 1.2)

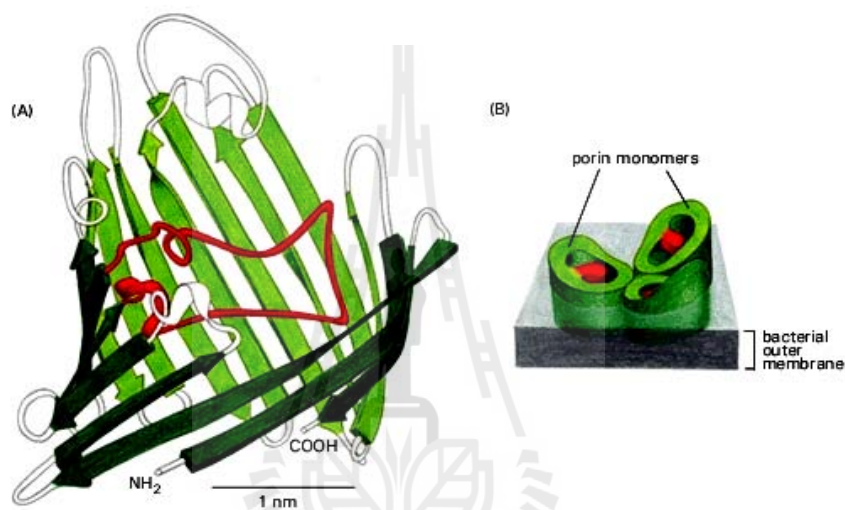


รูปที่ 1.2 ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ประกอบด้วยโปรตีนพอรินที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอก (แหล่งที่มา: <http://micro.digitalproteus.com/>)

โปรตีนพอรินส่วนใหญ่มีสามหน่วยย่อย (trimeric subunits) ฝังตัวอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) และมีคุณสมบัติให้โมเลกุลที่มีขั้วที่มีขนาดเล็กกว่า 600 ดาลตัน เช่น น้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ รวมทั้งยาปฏิชีวนะหลาย ๆ กลุ่ม ผ่านอาจจะโดยขบวนการแพร่ (non-specific diffusion) หรือแบบเลือกผ่าน (selective diffusion) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของช่องพอริน นอกจากนี้

ส่วนของโปรตีนที่อยู่ในชั้น peptidoglycan ยังมีส่วนร่วมในการรักษารูปร่างของเซลล์และทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ที่จำเพาะของ bacteriophage และ bacteriocin อีกด้วย (Albert I' et al., 1995)

โปรตีนพอรินที่ได้รับการศึกษามากทั้งทางด้านโครงสร้าง หน้าที่ และยีนที่แสดงออก ได้แก่ OmpF OmpC OmpA LamB และ PhoE โปรตีนพอรินเหล่านี้เป็นโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *E. coli* (Rocque and McGroarty, 1990; Cowan et al, 1995 และ Nikaido, 1994) จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของโปรตีน OmpF และ PhoE พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย ๆ สามหน่วยที่เหมือนกัน โดยแต่ละหน่วยจะประกอบด้วยสายบีต้า จำนวน 16 สายมาจัดเรียงตัวในทิศตรงข้ามกัน โดยส่วนที่เป็น loop จะทำหน้าที่เชื่อมสายบีต้า ทำให้เกิดโครงสร้าง barrel ที่มีลักษณะเป็นช่องขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 โครงสร้างสามมิติของพอรินที่พบบนเยื่อเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย *E. coli* (A) หน่วยย่อยของพอรินที่ประกอบด้วยสายบีต้า 16 สาย (B) โครงสร้างสามหน่วยย่อย (แหล่งที่มา: Molecular Biology of the Cell. 3<sup>rd</sup> edition)

การศึกษาการทำงานของพอริน OmpC และ PhoE โดยเทคนิค site-directed mutagenesis ช่วยอธิบายกลไกการนำสารผ่านเข้า-ออกของสารของแบคทีเรีย *E. coli* โดยพบว่าส่วนของ restriction loop ที่ยื่นเข้าไปในช่องของพอริน มีความสำคัญในการกำหนดขนาดของโมเลกุลที่จะผ่านเข้า-ออกสู่ช่องพอรินทั้งสอง (Cowan et al., 1992) พอรินอีกชนิดหนึ่งคือ OmpG จากเชื้อ *E. coli* เช่น สามารถสร้างช่องจากหน่วยย่อยเดียว โดยทำหน้าที่ในการผ่านของน้ำตาลโมโน-ได- และ ไตรแซคคาไรด์ (Behlau et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาโปรตีนพอรินในแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น จากเชื้อ *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Chlamydia trachomatis*, *Rhodopseudomonas capsulate*, *R. spaeroides*, *Paracoccus dentrificans*, *Neisseria gonorrhoeae* และเชื้อ *Brucella* หลาย ๆ ชนิด (Hancock et al., 1979; Douglas et al., 1981; Darveau et al., 1983; Bavoil et al., 1984; Douglas

et al., 1984; Flammann and Weckesser, 1984; Olesky et al., 2006; and Gotoh et al., 1989) จากการศึกษาโครงสร้างของพอรินจากแบคทีเรียหลายชนิดพบว่าพอรินมีโครงสร้างร่วมกันคือมีส่วนของสายปิต้าซีท เป็นองค์ประกอบหลัก (Nikaido and Vaara, 1985)

ผลงานวิจัยหลายชิ้นให้ข้อสรุปว่าพอรินมีบทบาทสำคัญในการกำหนดพยาธิสภาพของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคหลายชนิด โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้การรักษาโรคติดเชื้อโดยแบคทีเรียหลายโรคไม่ประสบความสำเร็จ ตัวอย่างการศึกษาได้แก่

1. พอริน MOMP จากเชื้อ *Chlamydia* เป็นโปรตีนขนาด 40 kDa มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิสภาพของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ ได้แก่ ทำให้เป็นหมัน การแท้งบุตร ตาบอด โรคปอดบวม หลอดลมอักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคหลอดเลือดอุดตัน และ Alzheimer's จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างพอริน MOMP ของแบคทีเรียหลายชนิด ประกอบกับการทดลองทำ Epitope Mapping Studies พบว่า โปรตีนนี้มี immunogenic epitopes ในส่วนของ variable segments ที่เหนี่ยวนำการสร้าง neutralizing antibodies ที่สามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อ *Chlamydia* ในแกะ ทำให้โมเลกุล MOMP เป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนา และวัคซีนป้องกันโรค (Wyllie et al., 1998; and 1999)
2. พอริน OpcPO ที่แยกจากเชื้อ *B. cepacia* พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการก่อโรค cystic fibrosis เนื่องจากโปรตีนนี้มี low susceptibility ต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม beta-lactam ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มนี้ (Tsujimoto et al., 1997)
3. พอริน OMF และ OMP จากการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียสามชนิดคือ เชื้อ *B. aeruginosa* เชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* และเชื้อ *B. cepacia* โดยวิธี Tripartite Efflux Systems พบว่าโปรตีนมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายกลุ่มโดยกลไกที่เรียกว่า Multi-resistance Mechanism
4. พอริน OM-1 และ OM-2 จากเชื้อ *B. pseudomallei* จากการการผ่านเข้าออกของสารผ่านช่องพอรินทั้งสองโดยวิธี liposome swelling assay และ antimicrobial agent susceptibility test พบว่าโปรตีน OM-1 ทำหน้าที่เป็นช่องผ่านของโมเลกุลมีขั้วขนาดเล็ก ๆ เช่น น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการดื้อยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactam aminoglycosides macrolides และ polymyxins ของเชื้อ *B. pseudomallei* (Gotoh et al., 1994)

งานวิจัยที่ผู้วิจัยได้ดำเนินการก่อนหน้าคือการแยกโปรตีนพอรินสองชนิดคือ *BpsOmp38* และ *BthOmp38* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ฝังอยู่ที่เยื่อเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ตามลำดับ พบว่าโปรตีนในสภาพธรรมชาติมีลักษณะเป็นสามหน่วยย่อยเหมือนกับโปรตีน OmpF มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 110,000 ดาลตัน และแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 39,000 ดาลตัน จากข้อมูลที่ได้จากการทำ peptide mass fingerprint ทำให้สามารถแยกยีน Omp38 จากโครโมโซมของเชื้อ *B. pseudomallei* และ *B. thailandensis* ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *BpsOmp38* และ *BthOmp38* พบว่าเหมือนกัน 98% และมีลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน

เหมือนกัน 99.7% (Siritapetawee et al., 2004a) นอกจากนี้ยังได้ทำการผลิตโปรตีน Omp38 ในแบคทีเรีย *E. coli* ในรูป inclusion bodies และทำให้กลับมา มีสภาพธรรมชาติโดยใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent® 3-14 (Siritapetawee et al., 2004b) จากการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิโดยเทคนิค FTIR และ CD spectroscopy พบว่าโปรตีน Omp38 มีองค์ประกอบหลักเป็น  $\beta$ -sheet จากการศึกษาหน้าที่ของพอรินด้วยวิธี liposome-swelling assays พบว่าโปรตีน Omp38 มีคุณสมบัติเป็น non-specific channel ที่มีความสามารถให้สารละลายน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 650 ดาลตัน ผ่านเข้า-ออกได้ จากการทำนายโครงสร้างของพอรินพบว่า มีโครงสร้างเป็น  $\beta$ -barrel ประกอบด้วย 16-stranded  $\beta$ -barrel 8 periplasmic turns และ 8 external loops เนื่องจากเชื้อ *B. pseudomallei* เป็นเชื้อที่ต่อต้านยาปฏิชีวนะเกือบทุกกลุ่ม กขไกการดื้อยาของแบคทีเรีย อาจเกิดได้หลายประการ เช่น การผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยสลายยาปฏิชีวนะก่อนถึงตำแหน่งเป้าหมาย การผลักตัวยาปฏิชีวนะออกจากเซลล์ผ่าน drug efflux pump รวมทั้งการลดการปริมาณการสร้างช่องพอรินหรือการเกิด intrinsic mutation ของพอรินเพื่อลดอัตราการนำเข้าของยาปฏิชีวนะเพื่อการอยู่รอดของเซลล์ การศึกษาการนำเข้ายาปฏิชีวนะผ่านช่องพอริน BpsOmp ของเชื้อ *B. pseudomallei* จึงเป็นหัวข้อวิจัยที่สำคัญที่อาจนำไปสู่การเข้าใจกลไกการต่อต้านยาปฏิชีวนะของเชื้อนี้ได้

## 1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเลือกผ่านของช่องพอรินของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* โดยเทคนิค planar lipid bilayer reconstitution
2. เพื่อศึกษากลไกการนำเข้าโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น อีออน น้ำตาล และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ ผ่านช่องพอริน Omp38
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเลือกผ่านของช่องพอริน

## 1.3. ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตเริ่มที่การเตรียมโปรตีน Omp38 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สกัดจากเยื่อเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *B. pseudomallei* เพื่อทำการศึกษาคูณลักษณะทั่วไปในการสร้างช่องพอริน โดยเทคนิคที่ใช้คือ planar lipid bilayer reconstitution และการวัดการแพร่ผ่านของอีออนของช่องโปรตีนเดี่ยว ๆ (single ion channel recordings) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวจะให้ความละเอียดของการวัดกระแสต่ำมาก ๆ ในระดับ pA งานวิจัยต่อมาจะทำการศึกษาคูณสมบัติในการเลือกนำสารโมเลกุลเล็กผ่านเข้าช่องพอริน

โมเลกุลที่สนใจศึกษาได้แก่ น้ำตาลแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุล <600 ดาลตันและสารอื่น ๆ เช่น กรดอะมิโน สารเหล่านี้เซลล์ผ่านเข้าช่องพอรินเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเซลล์แบคทีเรีย งานวิจัยในระยะสุดท้ายจะครอบคลุมการศึกษาการเลือกผ่านของช่องพอรินต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ และการศึกษาปัจจัยที่ควบคุมการเลือกนำยาปฏิชีวนะแต่ละกลุ่มเข้าสู่ช่องพอรินในอัตราที่แตกต่างกัน



#### 1.4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัยนี้ได้แก่

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัย เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีใครได้ดำเนินงานมาก่อน จึงคาดว่าผลสัมฤทธิ์จากการวิจัยจะสามารถตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor มากกว่า 1.5 ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และการเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์หรือการบรรยายอีก 1-2 ในที่ประชุมระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ครั้ง
2. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ผ่านหลักสูตรบัณฑิตศึกษาของสาขาวิชาชีวเคมีและสาขาวิชาเคมี ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีโดยเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยจัดเป็นความเชี่ยวชาญเฉพาะทางระดับสูงที่มีการถ่ายทอดน้อยมากในสถาบันการศึกษาอื่น ๆ ในประเทศไทย
3. องค์ความรู้ที่ได้เป็นการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับแนวทางป้องกันโรคติดเชื้อร้ายแรง melioidosis ซึ่งผลงานวิจัยจะเป็นการบริการข้อมูลที่สำคัญต่อหน่วยงานแพทย์ของรัฐและเอกชน และสถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติที่จะคิดค้นคว้าหาทางป้องกันโรคติดเชื้อดังกล่าว

หน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ศูนย์การแพทย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- สถาบันวิจัยทางการแพทย์ เช่น คณะแพทยศาสตร์ คณะเวชศาสตร์เขตร้อน ของมหาวิทยาลัยทั่วประเทศ
- หน่วยงานระดับนานาชาติ เช่น สถาบันวิจัยทางการแพทย์ระดับนานาชาติ และองค์การอนามัยโลก
- หน่วยงาน R & D ของหน่วยงานเอกชนที่มีเป้าหมายในการผลิตยาปฏิชีวนะหรือผลิตวัคซีนป้องกันโรค melioidosis

## บทที่ 2

## วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การแสดงออก และการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *BpsOmp38*

ทำการ transform พลาสมิด pET23d (+)/*BpsOmp38* เข้าสู่เซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) *Omp8* โดยวิธี  $\text{CaCl}_2$  เหตุผลที่ใช้ *E. coli* สายพันธุ์นี้เนื่องจากมียีนพอรินหลายชนิด ได้แก่ LamB OpmF OmpC และ OmpA ในจีโนมที่ถูก knockout (Prilipov et al., 1998) ทำให้มีความเหมาะสมในการใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพราะให้มั่นใจว่าพอรินที่สกัดจากผนังของเซลล์ *E. coli* เป็นโปรตีน *BpsOmp38* เท่านั้น ขั้นตอนในการแสดงออกการสกัดและการทำบริสุทธิ์มีดังนี้

การแสดงออกของยีน *BpsOmp38*

1. ทำการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* *Omp8* (pET23/*BpsOmp38*) บนอาหารแข็ง LB agar plate ที่เติม 100  $\mu\text{g/ml}$  Amp ในตู้บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
2. เชื้อโคลนเดี่ยวลงใน 250 มิลลิลิตร ของอาหารเหลว LB/Amp ในเตรียมใน flask ขนาด 1 ลิตร ทำการเขย่าในตู้เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C
3. ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว LB/Amp ปริมาตร 9x350 มิลลิลิตรในเตรียมใน flask ขนาด 1 ลิตร แล้วปรับค่า OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.1 ทำการเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนเซลล์มีการเจริญเติบโตถึงช่วง mid-log phase ทำการตรวจค่า OD<sub>600</sub> ให้เท่ากับ 0.5-0.8
4. เติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.4 mM เพื่อเหนี่ยวนำการผลิต recombinant *BpsOmp38* ทำการเลี้ยงเชื้อต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C
5. ปั่นเก็บเซลล์ด้วยความเร็ว 4,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ตั้งอุณหภูมิในการปั่นที่ 4°C
6. เก็บเซลล์ที่ในส่วนตะกอน ไว้ที่ -20°C

การสกัดโปรตีน *BpsOmp38* จากผนังเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (*Omp8*)

## - ขั้นตอนการสลายเซลล์

1. ทำการละลายเซลล์ด้วยอัตราส่วน 1 กรัมของน้ำหนักเซลล์เปียกต่อ 10 มิลลิลิตร ของ lysis buffer (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ )
2. เติม 100 ไมโครลิตรของ RNase A (10 mg/ml) และ 10 ไมโครลิตรของ DNase I (10 mg/ml) ต่อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ของบัพเฟอร์
3. สลายเซลล์ด้วย French Press homogenizer
4. เติม 20% (w/v) SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตรของ cell suspension ที่เตรียมได้ บ่มสารละลายเซลล์ที่ 60°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ
5. ปั่นเก็บส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นที่ความเร็วรอบ 22,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 60 นาที

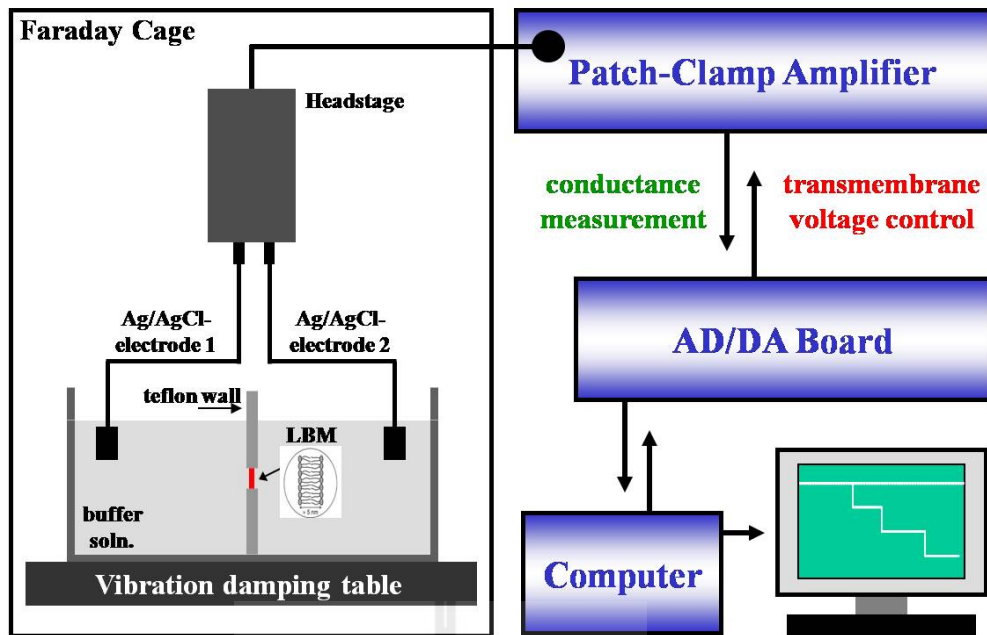
## - ขั้นตอน “Pre-extraction”

1. ล้างตะกอนด้วย 20 mM phosphate buffer pH 7.4 เพื่อกำจัด SDS ที่หลงเหลืออยู่

2. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของตะกอน
  3. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer ให้ละเอียดจนไม่เห็นก้อนตะกอนหลงเหลืออยู่
  4. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
  5. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 40 นาที
- ขั้นตอน “Extraction”
1. เติม 0.125% (v/v) octyl-POE เตรียมใน 20 mM phosphate buffer pH 7.4 สัดส่วนที่เติมคือ 5 มิลลิลิตรต่อ 1 กรัมของตะกอน
  2. บดตะกอนด้วย Potter-Elvehjem homogenizer ให้ละเอียดจนไม่เห็นก้อนตะกอนหลงเหลืออยู่อีกครั้ง
  3. บ่มสารละลายตะกอนที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเบา ๆ ขณะบ่ม
  4. ปั่นเก็บตะกอนที่ความเร็วในการปั่น 40,000 rpm ที่ 20°C เป็นเวลา 40 นาที
  5. ละลายตะกอนด้วย 5% (v/v) octyl-POE ในสารละลายบัฟเฟอร์ 20 mM phosphate, pH 7.4 ส่วนที่ละลายประกอบด้วย “BpsOmp38”

## 2.2. การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของช่องพอริน *BpsOmp38* โดยเทคนิค Black Lipid Membrane (BLM) reconstitution Technique

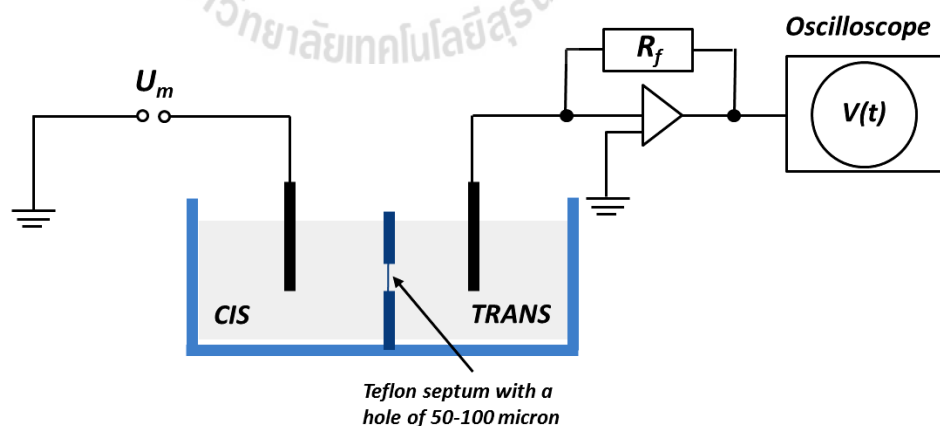
การวัดหา single ion channel conductance โดยวิธี BLM (Nestorovich et al, 2002) อาศัยหลักการ insert ของช่องพอรินบน artificial membrane ด้วยการเหนี่ยวนำด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าในช่วงไม่เกิน 200 mV องค์ประกอบของ BLM set-up แสดงให้เห็นในรูปที่ 2.1 จากรูป BLM set-up จะต้องอยู่ภายในกล่องฟาราเดย์ และมีระบบป้องกันการสั้นสะเทือนสูง เพื่อสามารถตรวจจับกระแสที่เกิดจากการวัดที่ระดับต่ำมาก ๆ ได้ กระแสที่เกิดขึ้นเกิดจากการเคลื่อนที่ของไอออนเช่น  $K^+$  หรือ  $Cl^-$  ในอิเล็กโตรไลต์ ผ่านช่องพอรินที่ฝังอยู่บน artificial membrane ที่คั่นระหว่าง chamber ด้าน cis และ trans การเคลื่อนที่ของไอออนเกิดขึ้นเมื่อให้ membrane potential ( $V_m$  or  $U_m$ ) ที่ค่าต่าง ๆ และสามารถตรวจวัดด้วยอิเล็กโตรดที่มีสองขั้ว ด้านหนึ่งคือขั้วลบและอีกด้านหนึ่งเป็นขั้วบวก ซึ่งจะแปลงรูปเป็นกระแสไฟฟ้า (I) ที่ระดับ pA โดยค่ากระแสที่วัดจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของไอออนที่เคลื่อนที่ผ่านช่องพอริน *BpsOmp38*



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบของ BLM set-up สำหรับการศึกษาคุนสมบัติของพอรินของเดี่ยว

การทดลองนี้ทำการตรวจหาคุนสมบัติของ  $B_{psOmp38}$  ที่เตรียมได้จากหัวข้อ 2.1 โดยวัดหาค่า single ion conductance โดย Montal-Mueller BLM technique มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการประกอบ teflon septum ที่มีความหนา 15 ไมครอน และมีรูขนาด 100-200 ไมครอน กับ cuvette เข้าด้วยกัน แผ่น Teflon จะแยก chamber ออกเป็นสองส่วนคือ ส่วน cis และ ส่วน trans อิเล็กโทรดด้าน cis ถือเป็น working electrode ส่วน electrode ด้าน trans เป็น reference electrode ดังรูปที่ 2.2.



รูปที่ 2.2 องค์ประกอบของ cuvette ที่ assembled แล้วด้วย Teflon foil และ working electrode ด้าน CIS และ reference electrode ด้าน TRANS

2. ทำการ pre-treat ทั้งสองด้านของ appature ด้วย 1% (v/v) hexadecane ใน n-hexane ที่ให้ตัวทำละลายระเหยให้หมดภายใน 5-10 นาที
3. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงใน chamber ทั้งสองด้าน
4. ใช้ Hampton syringe (ขนาด 10  $\mu$ l) ตูดสารละลายไขมัน diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่เตรียมในตัวทำละลาย n-pentane และหยดปริมาตร 2-3  $\mu$ l ลงในแต่ละด้านของ chamber ที่ให้ไขมันกระจายตัวดี ประมาณ 10-15 นาที
5. ทำการ reconstitute planar lipid membrane ด้วยการไปเปตสารละลายไขมันด้าน CIS ขึ้นลงเบา ๆ
6. ให้กระแสความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ เช่น  $\pm 50$   $\pm 100$   $\pm 150$  และ  $\pm 200$  mV ระบบควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้าคือ Axopatch 200B amplifier โดยใช้ voltage-clamp mode ถ้าเมมเบรนไม่ขาดแสดงว่า artificial membrane มีการจัดตัวดีแล้ว ที่ให้เมมเบรนคงที่อีก ประมาณ 5-10 นาที
7. เติมโปรตีน *BpsOmp38* ความเข้มข้นประมาณ 1-2 ng/ml เตรียมใน 1%(v/v) octyl-POE/20mM HEPES, pH 8.0 ลงในด้าน CIS ของ chamber ไปเปตขึ้นลงเบา ๆ
8. ให้ applied voltage ที่  $\pm 50$  mV รอจนมีกระทั้งมีการ insert ของช่องพอรินเดี่ยว บันทึกค่ากระแสที่ได้ที่  $\pm 50$ ,  $\pm 100$ ,  $\pm 150$  และ  $\pm 200$  mV ที่ค่า output gain ( $\alpha$ ) = 10 และใช้ four-pole low-pass Bessel filter ที่ 10 mHz
9. ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองหาค่า single channel conductance ตามกฎของโอห์ม

### 2.3. การศึกษาอัตราการนำเข้ายาปฏิชีวนะผ่านช่อง *BpsOmp38*

ในการศึกษานี้ทำการหาอัตราการเกิด translocation ของยาปฏิชีวนะใน 4 กลุ่มคือ กลุ่ม  $\beta$ -lactam (penicillin G) กลุ่ม cephalosporin (ceftazidime cefipime) กลุ่ม fluoroquinolone คือ noefloxacin และกลุ่ม cabapenem (imipenem meropenem ertapenem และ norfloxacin)

1. ทำการ reconstitute โปรตีน *BpsOmp38* ช่องเดี่ยว ดังอธิบายในหัวข้อ 2.2 (ขั้นตอนที่ 1-8)
2. เจือจางโปรตีนใน chamber ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อป้องกันการเกิด multiple insertion ทำการไตเตรทสารละลายยาปฏิชีวนะความเข้มข้น 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15 mg/ml ที่เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 ด้าน CIS ทำการ record ค่ากระแสที่ได้และการเกิด blockage เป็นเวลา 1 นาที วัดค่า blockage current ที่ความต่างศักย์  $\pm 50$  และ  $\pm 100$  mV
3. ทำการทดลองซ้ำในข้อที่ 1-2 โดยเติมสารละลายยาปฏิชีวนะที่ด้าน TRANS ของ chamber

4. วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม pClamp 10 หาค่าเฉลี่ยอัตราการ blockage ของช่องพอรินด้วยยาปฏิชีวนะโดยคำนวณหาค่าเฉลี่ย numbers of blockage event/sec แล้วหาค่า on-rate และ off-rate ของการเกิด translocation

#### 2.4. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการนำเข้าของ Ertapenem ผ่านช่อง BpsOmp

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการ translocation ของยาปฏิชีวนะผ่านเข้า-ออก ช่องพอริน BpsOmp38 เลือกใช้ ertapenem เพราะมีคุณลักษณะการ block ที่ดี สามารถสังเกตเห็นการ block ของหน่วยย่อยที่ 1 2 และ 3 ได้สมบูรณ์ การเตรียมเมมเบรนทำเหมือนกับการทดลองที่ 2.1 แต่ใช้ cuvette ที่มีปริมาตรน้อยและมี temperature controlled jacket ที่เข้ากันกับระบบควบคุมอุณหภูมิของ Dagan Corporation ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

1. ทำการ pre-treat ทั้งสองด้านของ appature ด้วย 2% (v/v) squalene ใน n-pentane ที่ทำให้ตัวทำละลายระเหยให้หมดภายใน 5-10 นาที
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงใน chamber ทั้งสองด้าน
3. ใช้ Hampton syringe (ขนาด 10  $\mu$ l) ตูดสารละลายไขมัน diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC) ความเข้มข้น 5 mg/ml ที่เตรียมในตัวทำละลาย n-pentane และหยดปริมาตร 2-3  $\mu$ l ลงในแต่ละด้านของ chamber ที่ให้ไขมันกระจายตัวดี
4. เปิดระบบควบคุมอุณหภูมิไปที่ 25°C ที่ไว้จนอุณหภูมิคงที่ ประมาณ 10-15 นาที
5. ทำการ reconstitute planar lipid membrane ด้วยการไปเปตสารละลายไขมันด้าน CIS ขึ้นลงเบา ๆ
6. ให้กระแสความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ค่าต่าง ๆ ด้วยระบบควบคุมความต่างศักย์ไฟฟ้า Axopatch 200B Amplifier Instrument โดยใช้ voltage-clamp mode ถ้าเมมเบรนไม่ขาดทำแสดงว่า artificial membrane มีการจัดตัวดีแล้ว ที่ให้เมมเบรนคงที่อีกประมาณ 5-10 นาที
7. เติมโปรตีน BpsOmp38 ความเข้มข้นประมาณ 1-2 ng/ml เตรียมใน 1%(v/v) octyl-POE/20mM HEPES, pH 8.0 ลงในด้าน CIS ของ chamber ไปเปตขึ้นลงเบา ๆ
8. รอจนมีกระทั้งมีการ insert ของช่องพอรินเดี่ยว ปรับค่า output gain ที่  $\alpha = 10$  และใช้ four-pole low-pass Bessel filter ที่ 10 mHz บันทึกค่ากระแสที่วัดได้ของแต่ละค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่  $\pm 50$ ,  $\pm 100$ ,  $\pm 150$  และ  $\pm 200$  mV
9. ปรับค่าอุณหภูมิในการวัดที่ 5 10 15 20 25 30 35 และ 40°C รอให้อุณหภูมิแต่ละค่าคงที่ ก่อนทำการวัดค่ากระแสของช่องพอรินเดี่ยว
10. เติม ertapenem ความเข้มข้น 2 mM ที่เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์ 1M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 ไปเปตเบา ๆ บันทึกค่ากระแสที่วัดได้ของแต่ละค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่  $\pm 50$ ,  $\pm 100$ ,  $\pm 150$  และ  $\pm 200$  mV
11. ทำการทดลองซ้ำโดยเติม ertapenem ในส่วน TRANS ของ chamber

12. วิเคราะห์ผลการทดลอง หาค่า  $k_{on}$   $k_{off}$  และค่า energy barrier ของ ertapenem translocation ทั้งด้าน CIS และด้าน TRANS

### 2.5. การศึกษาโมเดลโครงสร้างสามมิติของ *BpsOmp38* โดยวิธี multiple template search

ทำการสร้างโมเดลโครงสร้างสามมิติของ *BpsOmp38* จากโปรแกรม Modeller (Eswar et al, 2007) แรกทำการ search หาโครงสร้างสามมิติพอรินที่หลากหลาย ๆ ชนิดที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ *BpsOmp38* มากที่สุดจากโดยใช้ PSI-BLAST protein sequence search program ที่มีอยู่ใน pdb database ผลการ search ให้โครงสร้างพอรินห้าชนิดที่มีโครงสร้างไม่ซ้ำซ้อนกันที่นำมาใช้เป็นโครงสร้างต้นแบบในการสร้างโครงสร้างสามมิติจำลองของ *BpsOmp38* หลังจากได้แบบจำลองโครงสร้างสุดท้ายแล้วทำการตรวจสอบคุณภาพด้วยโปรแกรม PROCHECK (Wallner et al, 2005)

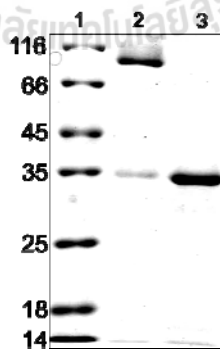


## บทที่ 3

## ผลการทดลองและข้อวิจารณ์

3.1. การเตรียม outer membrane protein *BpsOmp38* จากเชื้อ *E. coli* (Omp8)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้โดยทำการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *BpsOmp38* ใน *E. coli* BL21 Origami (DE3) cells (Siritapetawee et al., 2004a & b) พบว่าเซลล์ชนิดนี้ผลิตโปรตีนโมโนเมอร์เดี่ยวขนาด 38 กิโลดาลตันออกมาในรูปตะกอนที่เรียกว่า inclusion bodies เมื่อทำการทดสอบการ refolding ด้วย detergent หลาย ๆ ชนิดพบว่าโปรตีน *BpsOmp38* สามารถ refold ให้กลับสู่รูปร่างไตรเมอร์ที่ทำงานได้ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% (w/v) Zwittergent™ 3-14 อยู่ ปัญหาที่เกิดขึ้นคือการทดลอง refolding ให้ผลสำเร็จที่คาดเดาได้ยากและเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีน *BpsOmp38* ที่มีส่วนของ signal peptide อยู่ด้วยแล้วนำขึ้นของดีเอ็นเอเชื่อมต่อกับ pET23d(+) expression vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET23d(+)/*BpsOmp38* เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านคือ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) Omp8 เนื่องจาก *E. coli* สายพันธุ์ Omp8 มีการ knockout ของยีนพอรินหลายชนิดคือ OmpA OmpC OmpF และ LamB ดังนั้นจึงผลิตรีคอมบิแนนท์พอริน *BpsOmp38* บนผนังเซลล์เพียงอย่างเดียว เมื่อทำการสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วย 2% (w/v) SDS แล้วละลายตะกอนโปรตีนในการปั่นครั้งสุดท้ายที่ 40,000 rpm ด้วย 3% (v/v) octyl-POE แล้ววิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ของโปรตีนบน SDS-PAGE gel พบว่าโปรตีนที่สกัดได้มีคุณสมบัติเป็นไตรเมอร์เมื่อไม่ต้ม (รูปที่ 3.1 ช่องที่ 2) จะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100 กิโลดาลตัน เมื่อทำให้ไตรเมอร์แตกออกด้วยการต้มพบว่าโปรตีนเคลื่อนที่บน SDS-PAGE gel ใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของโมโนเมอร์คือ 38 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.1 ช่องที่ 3) รูปแบบการเคลื่อนที่ในสภาวะที่ต้มที่ต่างจากสภาวะต้มนี้เป็นคุณสมบัติเฉพาะของพอรินที่ไม่พบในโปรตีนอื่น ๆ



รูปที่ 3.1. การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *BpsOmp38* ที่ผลิตโดย *E. coli* สายพันธุ์

BL21(DE3)Omp8 ด้วย 12% SDS-PAGE gel (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-

Biomembranes, 2011)

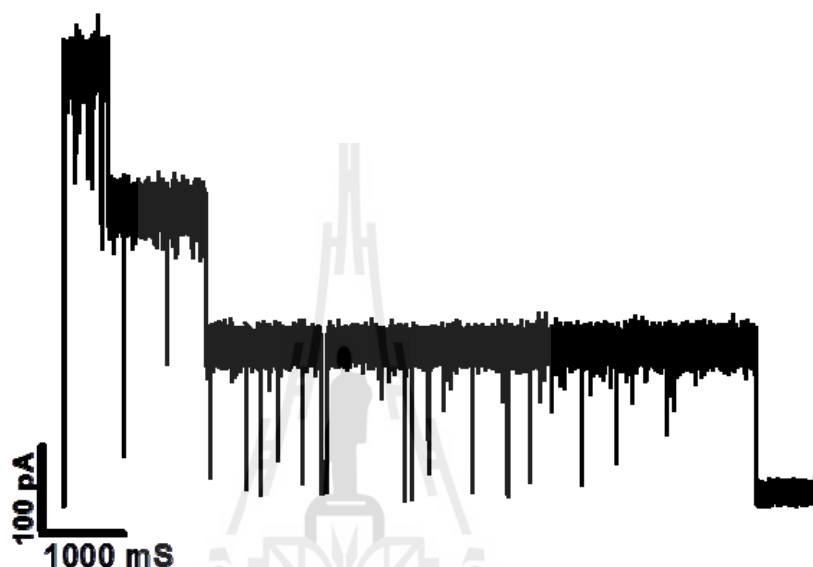
ช่องที่ 1 Low MW protein marker ช่องที่ 2 รูปไตรเมอร์ของรีคอมบิแนนท์ *BpsOmp38* และ

ช่องที่ 3 รูปโมโนเมอร์ของ *BpsOmp38*



### 3.2. การศึกษาคุณสมบัติของช่องพอรินเดี่ยวโดยเทคนิค BLM reconstitution

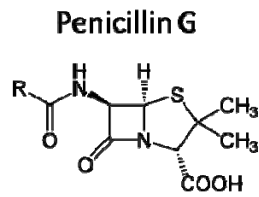
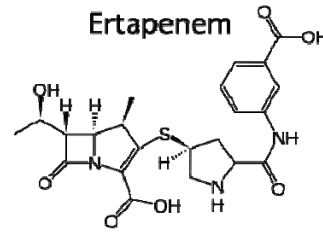
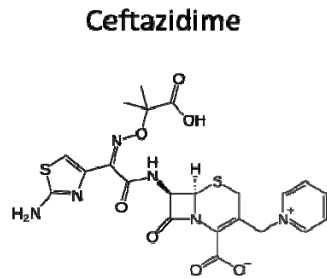
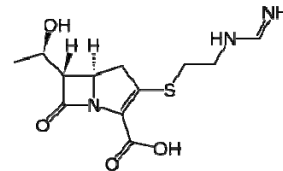
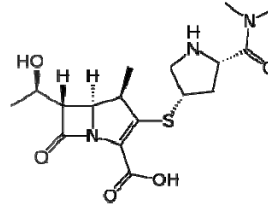
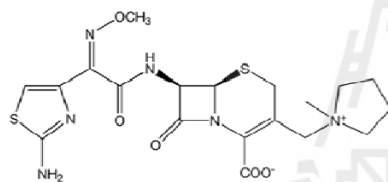
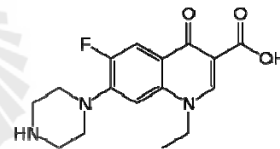
*BpsOmp38* trimeric *BpsOmp38* เข้าไปใน artificial lipid membrane bilayer พบว่าโปรตีนสร้างช่องโดยมีค่าเฉลี่ย conductance เท่ากับ  $2.7 \pm 0.3$  nS ในอิเล็กโตรไลต์ที่ประกอบด้วย 1 M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 และเมื่อให้ค่าความต่างศักย์สูงที่ 150-200 mV ช่องพอรินมีการปิดแบบเป็นลำดับเรียกขบวนการนี้ว่า gating โดยช่องพอรินจะ gate จาก trimer เป็น dimer เป็น monomer และสุดท้ายหน่วยย่อยทั้งสามจะปิดสนิทดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 การเหนี่ยวนำการเกิด three-stepwise closure ของช่องพอริน *BpsOmp38* ด้วยความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ +150 mV (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

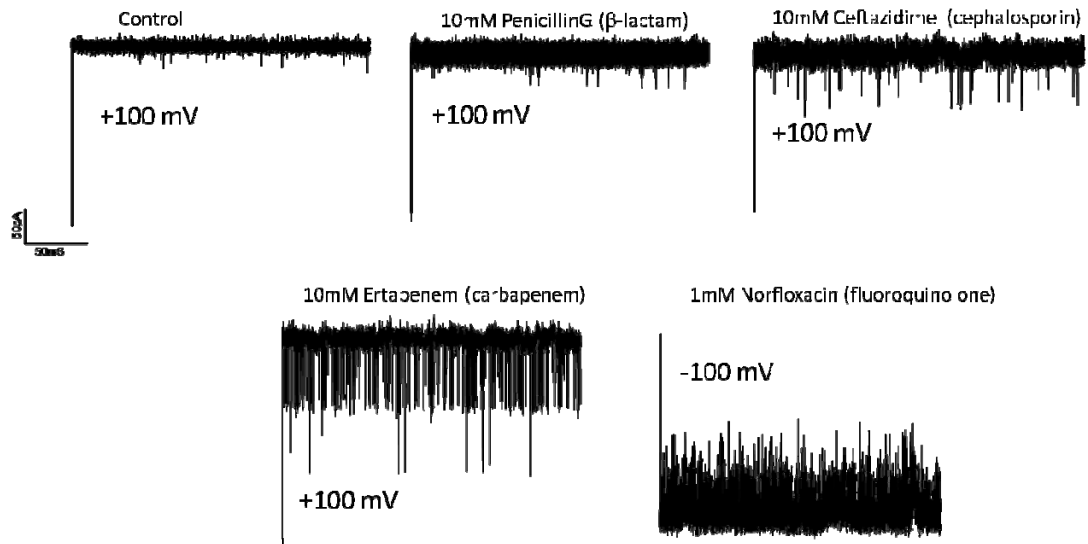
### 3.3. การศึกษาการนำเข้าของยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ ผ่านช่องพอรินเดี่ยวของ *BpsOmp38*

การศึกษาในขั้นต่อไปคือการวัดหาอัตราการนำเข้าของยาปฏิชีวนะเปรียบเทียบกับ 4 กลุ่มคือ 1) กลุ่ม  $\beta$ -lactam ได้แก่ penicillin G 2) กลุ่ม cephalosporins ได้แก่ cefepime, ceftazidime 3) กลุ่ม fluoroquinolone ได้แก่ norfloxacin และ 4) กลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem meropenem และ ertapenem โครงสร้างของยาปฏิชีวนะทั้งหมดแสดงในรูปที่ 3.3.

**Group 1:  $\beta$ -Lactams****Group 3: Carbapenems****Group 2: Cephalosporins****Imipenem****Meropenem****Cefepime****Group 4: Fluoroquinolones****Norfloxacin**

รูปที่ 3.3 โครงสร้างทางเคมีของยาปฏิชีวนะ 4 กลุ่มที่ใช้ในการศึกษาอัตราการนำเข้าผ่านช่องพอริน *BpsOmp38* (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

เมื่อทำการ reconstitute ช่องพอรินเดี่ยว *BpsOmp38* เข้าไปใน artificial membrane แล้ว เมื่อพบว่าช่องพอรินเปิดเต็มที่ในรูปไตรเมอร์ที่ conductance = 2.7 nS แล้วทำการเติมยาปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 2.5-15 mM ที่ด้าน CIS และ TRANS แล้ววัดหา ion current blockage ในช่วงไต่เตรชันดังกล่าวพบว่าการไต่เตรท *BpsOmp38* ด้วย penicillin G ให้ค่า ion current blockage น้อยมากโดยมีค่า on-rate constant หรือค่า  $k_{on}$  และค่า off-rate constant หรือค่า  $k_{off}$  ที่ไม่สามารถคำนวณได้ ส่วนยาปฏิชีวนะอื่นแสดง ion current blockage ที่สามารถวัดที่ค่าต่าง ๆ แสดงถึงการเกิด traslocation ข้ามช่องพอริน *BpsOmp38* ด้วยอัตราที่ไม่เท่ากัน คุณลักษณะในการเกิด blockage ก็ไม่เหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 เปรียบเทียบผลของยาปฏิชีวนะในกลุ่มต่าง ๆ ต่อ ion current blockage ของช่องเดี่ยวพอริน BpsOmp38 ที่ความเข้มข้น 10 mM และที่ applied potential เท่ากับ +100 mV สำหรับ penicillin G ceftazidime และ ertapenem ส่วนความเข้มข้นของ norfloxacin ที่ใช้คือ 1 mM และค่า applied potential เท่ากับ -100 mV ในอิเล็กโทรไลต์ 1M KCl/20 mM HEPES, pH 8.0 (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

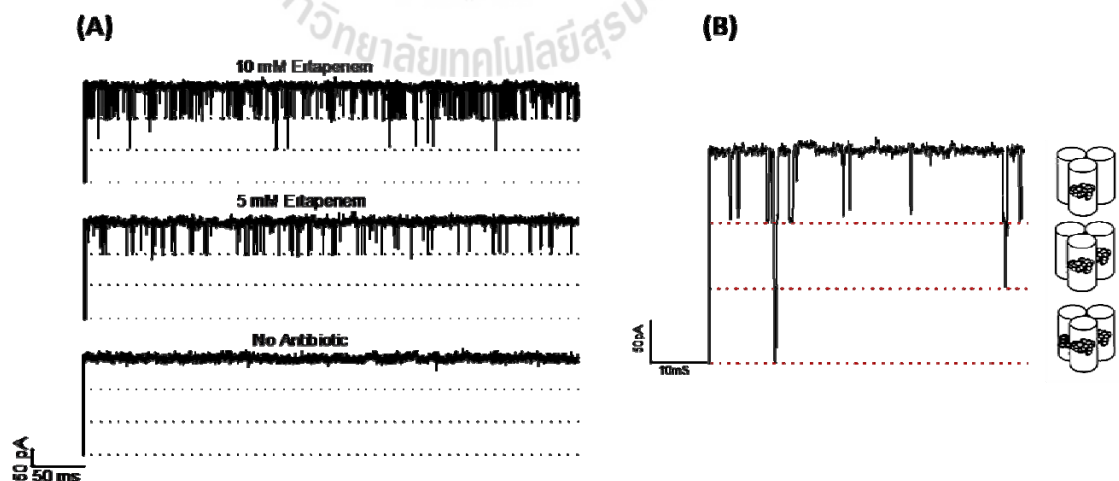
ถ้าพิจารณาค่า  $k_{on}$  ซึ่งแสดงถึงการเข้าจับที่ตำแหน่งจับหรือ binding site ที่อยู่ภายในช่อง BpsOmp38 ของยาปฏิชีวนะมีลำดับมากขึ้นดังนี้คือ meropenem  $\ll$  cefipime  $<$  imipenem  $<$  cetazidime  $<$  ertapenem  $\ll$  norfloxacin ส่วนค่า  $k_{off}$  ซึ่งแสดงถึงการหลุดออกจากตำแหน่งจับของยาปฏิชีวนะ 5 อันดับแรก ที่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักคืออยู่ในช่วง  $5,500 - 7,000 \text{ s}^{-1}$  ยกเว้น norfloxacin ที่ให้ค่าทั้งค่า  $k_{on}$  สูงกว่า ertapenem ซึ่งมีค่า  $k_{on}$  มากรองลงมา 14 เท่า และสูงกว่า meropenem ซึ่งให้ค่า  $k_{on}$  ต่ำสุดถึง 1,200 เท่า ส่วนค่า  $k_{off}$  ของ norfloxacin สูงกว่ายาปฏิชีวนะตัวอื่น 3 เท่า ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1. เป็นแสดงถึงความสามารถในการเข้าจับกับตำแหน่งจับมีผลต่ออัตราการเกิด translocation มากกว่าความสามารถในการปล่อยของยาปฏิชีวนะออกจากตำแหน่งจับภายในช่องพอริน

ตารางที่ 3.1. อัตราการเกิด translocation ของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ข้ามช่องพอริน *BpsOmp38* (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

Antibiotic	$k_{on(cis)} (s^{-1}M^{-1})$	$k_{off(cis)} (s^{-1})$
Penicillin G	n.d. <sup>a</sup>	n.d.
Meropenem	250	6,700
Cefepime	420	5,500
Imipenem	830	6,700
Ceftazidime	4,200	7,000
Ertapenem	22,000	5,500
Norfloxacin	300,000	20,000

<sup>a</sup> หมายถึงไม่สามารถวัดหาค่า ion current blockage ได้ในช่วง  $\mu S$ -mS time scale

การ block การผ่านแปรผันโดยตรงกับอัตราการ translocate ของยาปฏิชีวนะผ่านช่อง *BpsOmp* ในการทดสอบพบว่าอัตราการผ่านของปฏิชีวนะเข้าช่อง *BpsOmp* ขึ้นกับความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ รูปที่ 3.5A แสดงตัวอย่างการเกิด translocation ของยา ertapenem ที่ความเข้มข้น 0 5 และ 10 mM โดยพบว่าที่ความเข้มข้น 5 mM จะพบ blockage ของกระแสน้ำไอออนผ่านช่อง monomeric *BpsOmp* อย่างเดียว แต่ที่ความเข้มข้น 10 mM จะพบว่าเกิด blockage ของกระแสน้ำไอออนของ dimeric *BpsOmp* เมื่อ monomeric *BpsOmp* ถูกทำให้อิ่มตัวด้วยยา ertapenem และบางครั้งอาจเห็น trimeric blockage ด้วยดังแสดงในรูปที่ 3.5B ซึ่งลักษณะการ block ของยาปฏิชีวนะนี้พบในโปรตีน Omp อื่น ๆ เช่นกัน [27-35]



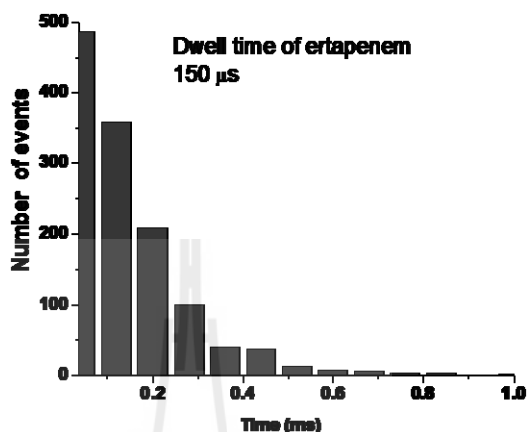
รูปที่ 3.5 การ translocation ของ ertapenem ผ่านช่อง *BpsOmp* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

A) การเกิด blockage ของกระแสน้ำไอออนที่ความเข้มข้น 0 5 และ 10 mM

B) ที่ความเข้มข้นของ ertapenem สูง สามารถเห็น mono- di- และ trimeric blockage ได้

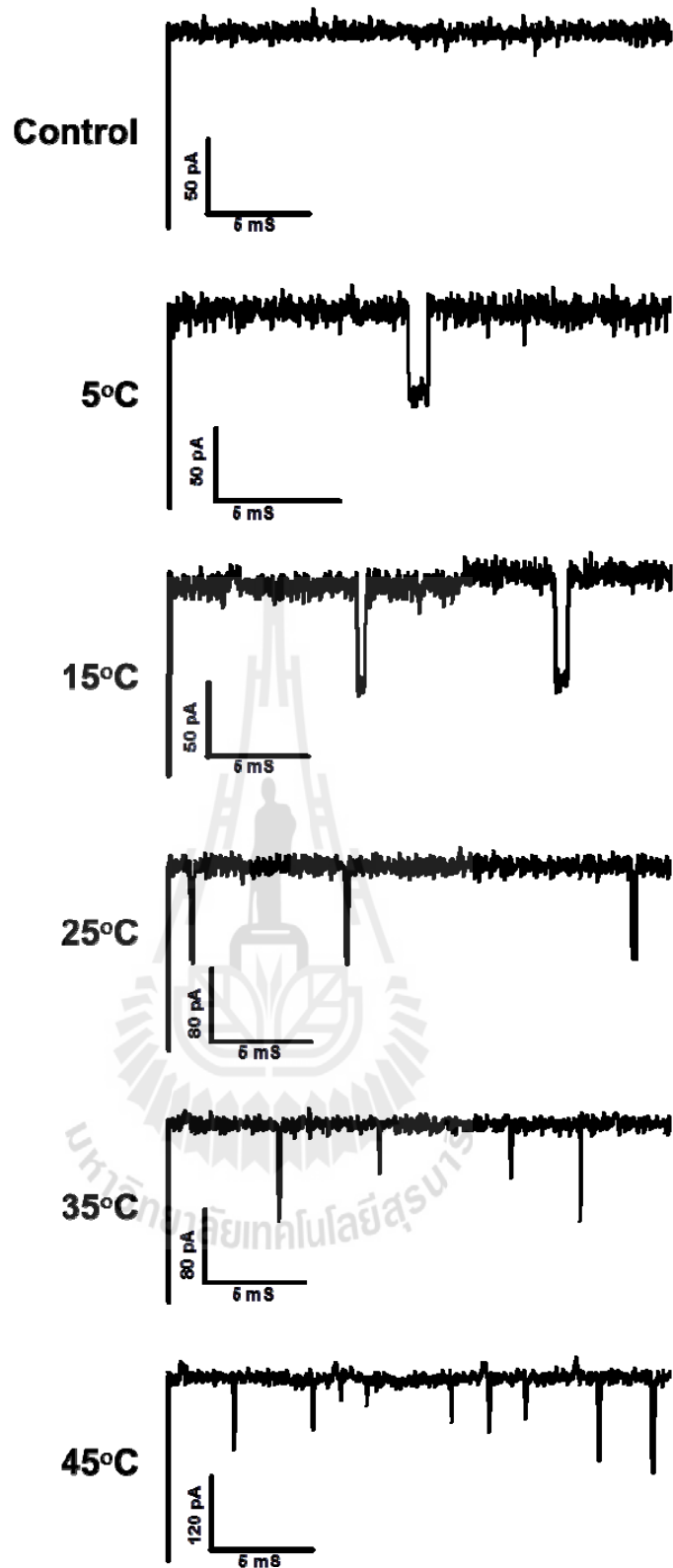
### 3.4. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการนำเข้าของยาปฏิชีวนะ ertapenem ผ่านช่องพอรินเดี่ยวของ *BpsOmp*

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการใช้ยา ertapenem เป็นตัวอย่างการศึกษาเนื่องจากยานี้มีรูปแบบการ blockage ที่สมบูรณ์ (complete blockage) โดยให้ค่า average dwell time อยู่ที่ 150  $\mu\text{s}$  ดังแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การหาค่า dwell time (T) ของ ertapenem ผ่านช่อง BpsOmp จากการ fit กราฟด้วย simple exponential decay algorithm (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

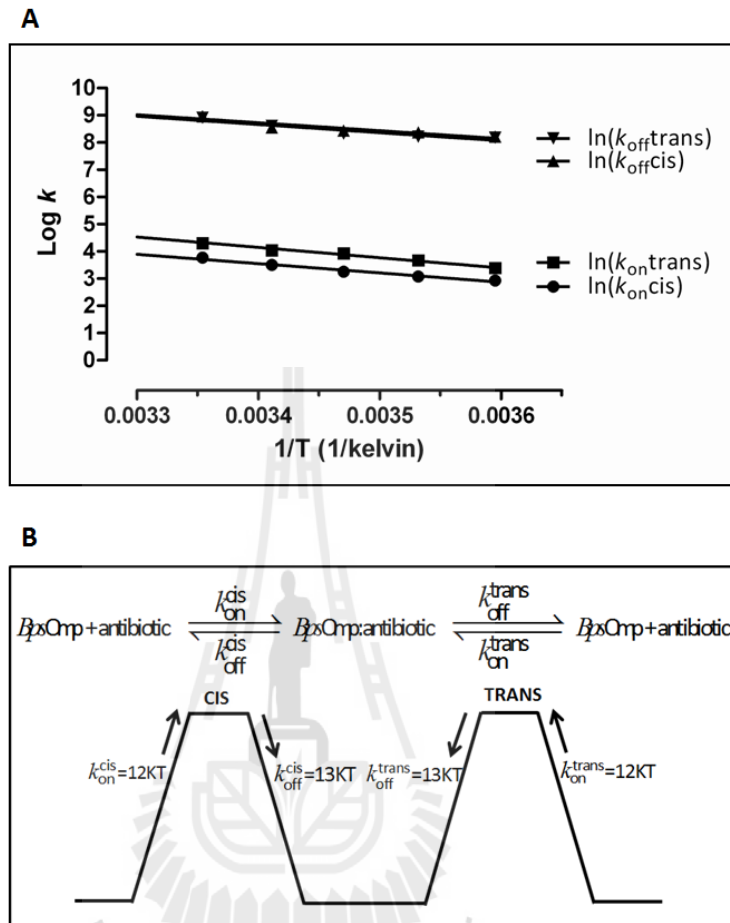
เมื่อทำการศึกษาอัตราการผ่านของ ertapenem ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5 ถึง 40°C ทั้งด้าน Cis และด้าน Trans พบว่าที่ความเข้มข้นของ ertapenem ที่ใช้ 200  $\mu\text{M}$  อัตราการเกิด transient blockage ที่ด้าน Trans เกิดขึ้นสูงกว่าด้าน CIS ในทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ โดยที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้ค่าการ blockage น้อยแต่เกิดขึ้นด้วย dwell time ที่นานขึ้น เช่นที่ 5°C ค่า  $k_{\text{on(cis)}}$  และ  $k_{\text{on(trans)}}$  มีค่าเป็น 12.5  $\text{s}^{-1}$  และ 30  $\text{s}^{-1}$  ส่วนที่ 25°C ค่า  $k_{\text{on(cis)}}$  และ  $k_{\text{on(trans)}}$  มีค่าเป็น 37  $\text{s}^{-1}$  และ 134  $\text{s}^{-1}$  ตามลำดับ ส่วนค่า dwell time ด้าน cis ที่อุณหภูมิต่ำ 5°C และ 25°C มีค่าเป็น 350  $\mu\text{s}$  และ 150  $\mu\text{s}$  ตามลำดับ ส่วนด้าน Trans ค่า dwell time ที่อุณหภูมิต่ำ 5°C และ 25°C มีค่าเป็น 500  $\mu\text{s}$  และ 150  $\mu\text{s}$  ตามลำดับรูปที่ 3.7 แสดงผลของอุณหภูมิต่ออัตราการนำเข้า ertapenem ผ่านช่อง *BpsOmp*



รูปที่ 3.7 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการ translocate ของ ertapenem ผ่านช่องพอริน *BpsOmp* (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมิมีผลต่อค่า  $k_{on}$  และค่า  $k_{off}$  ของการนำ ertapenem ผ่านช่อง *BpsOmp* ในลักษณะ exponential decay เมื่อทำการ plot กราฟค่า  $\log(k)$  กับค่า  $1/T$  ในหน่วย

เคลวิลจะได้กราฟเส้นตรงมีค่าความชันติดลบ (รูปที่ 3.8A) และได้ค่าคำนวณ energy barrier สำหรับการจับยาปฏิชีวนะ ertapenem กับ affinity site ทั้งด้าน cis และ trans เป็น 12 kT และค่า energy barrier ของการปล่อยของ ertapenem เป็น 13 kT (รูปที่ 3.8B)



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงการหาค่า energy barrier ของการจับและการปล่อยของ ertapenem (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

งานวิจัยส่วนสุดท้ายคือการทำนายโครงสร้างสามมิติจำลองของ *BpsOmp38* เนื่องจาก *BpsOmp* มีลำดับกรดอะมิโนไม่เหมือนกับพอรินอื่นๆ เพื่อความถูกต้องของโครงสร้างให้มากที่สุด จึงสร้างโครงสร้างจำลองของ *BpsOmp* จากโครงสร้างพอรินแม่แบบของแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ทำโครงสร้าง ได้แก่ OmpF (pdb code 3K1B) OmpC (pdb code 2IXX) Omp32 (pdb code 1E54), 1OSM (pdb code Ompk36) และ PorB (pdb code 3A2R) รูปที่ 3.9 แสดงการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของพอรินทั้งห้ากับ *BpsOmp*

```

OmpF A E I Y N K D G N K V D L Y G K A V G L H Y F S K G - G - - - - - E N S Y G G N G D M T Y - - - - - A R L G F K G E T Q I N S D
OmpC A E V Y N K D G N K L D L Y G K V D G L H Y F S D N K D - - - - - V D G D Q T Y - - - - - M R L G F K G E T Q V T D Q
Omp32 - - - - - S S V T L F G I V D T N V A Y V N K D A - - - - - A G D S - - R Y G L G T S G A S T S R L G R L G T E D L G G G
Ompk36 A E I Y N K D G N K L D L Y G K I D G L H Y F S D D K D - - - - - V D G D Q T Y - - - - - M R L G V K G E T Q I N D Q
PorB - - - - - Q V T L Y G T I K A G V E S R V K D A G T Y K A Q G G K S K T - - A T Q I A D F - - G S K I G F K G Q E D L G N G
Bps - - - - - Q S S V T L Y G V L D A G T Y Q S N V A T - - - - - P S G S G K L W S V G A G V D Q S R F G L R G S E D L G G G
          * * *

OmpF L T G Y G Q W E Y N F Q G N N S E G A D A Q T G N K T R L A F A G L K Y A D V G S F D Y G R N Y G V V Y D A L G Y T D M L P E - - - - -
OmpC L T G Y G Q W E Y Q I Q G N S A E N - - E N - N S W T R V A F A G L K F Q D V G S F D Y G R N Y G V V Y D V T S W T D V L P E - - - - -
Omp32 L K A G F W L E G E I F G D D G - - - - - N A S G F N F K R R S T V S L S G - N F G E V R L G R D L V P T S Q K L T S Y D L F S A T G - - - - -
Ompk36 L T G Y G Q W E Y N V Q A N N T E S - - S S D Q A W T R L A F A G L K F G D A G S F D Y G R N Y G V V Y D V T S W T D V L P E - - - - -
PorB M K A I W Q L E Q K A S I A G - - - - - T N S G W G N R Q S F I G L K G - G F G T V R A G N L N T V L K D - S G D N V N A W E S G S N T
Bps L K A I F T L E S G F N I G N G R - F N N G G G M F N R Q A F V L G S S - N Y G T V T L G R Q Y D A T Q D Y L S P L S A T G T - - - - -
          * * * * *

OmpF - - - F G G D T - A Y S - - - - - D D F F V G R V G G V A T Y R N S N F F G L V D G L N F A V Q Y L G K N E - - - - -
OmpC - - - F G G D T - Y G S - - - - - D N F M Q Q R G N G F A T Y R N T D F F G L V D G L N F A V Q Y Q G K N G N P S G E - - - - - G F T S
Omp32 - - - I G P F M G F R N W A A G Q G A D D N G I R A N N L I S Y Y T P N - - - - - F G G F N A G F Y A F D E K Q - - - - - T I
Ompk36 - - - F G G D T - Y G S - - - - - D N F L Q S R A N G V A T Y R N S D F F G L V D G L N F A L Q Y Q G K N G S V S - - - - - G E
PorB E D V L G L G T I G R - - - - - V E S R E I S V R Y D S P V - - - - - F A G F G S V Q Y V P R D N A - - - - - N D
Bps - - - W G G T Y F A H P L N N D R L N T N G D V A V N N T V K F T S A N Y - - - - - A G L Q F G G T Y S F S N N S - - - - -
          * * * * *

OmpF - - - - - R D T A R R S - - - - - N G D G V G G S I S Y E Y E - - G F G I V G A Y G A A D R T N - - - - - L Q E A - Q P L G
OmpC G V T N N G R D A L R Q - - - - - N G D G V G G S I T Y D - Y E - G F G I G G A I S S K R T D - - - - - A Q N T A A I Y G
Omp32 G - - - - - T A D S V G R Y I G G Y V A Y D N G - - P L S A S L G L A Q Q K T A V - - - - - G G -
Ompk36 G A T N N G R G A L K Q - - - - - N G D G F G T S V T Y D I F D - G I S A G F A Y A N S K R T D - - - - - D Q N Q - L L L G
PorB V D K - - - - - Y K H T K S S R - E S Y H A G L K Y E N A - - G F F G Q Y A G S F A K Y A D L N T D A E R V A V N T A N A H - -
Bps - - - - - Q F A N N - - - - - R A Y S A G A S Y Q F Q L K V G A A Y S Q A N N A G A N T T G A T D P L T G F N I G G T N A A S
          * * * * *
          L5

OmpF N G K K A E Q W A T G L K Y D A N N I Y L A A N Y G E T R N A T P I T N K F T N T S G F - - - - - A N K T Q D V L L V A Q Y
OmpC N G D R A E T Y T G G L K Y D A N N I Y L A A Q Y T Q T Y N A T R V G - - - - - S L G W - - - - - A N K A Q N F E A V A Q Y
Omp32 L A T D R D E I T L G A S Y N F G V A K L S G L L Q Q T K F - - - - - K R D - - - - - I G G I K T N S Y M L G A S A
Ompk36 E G D H A E T Y T G G L K Y D A N N I Y L A T Q Y T Q T Y N A T R A G - - - - - S L G F - - - - - A N K A Q N F E A V A A Q Y
PorB P V K D Y Q V H R V V A G Y D A N D L Y V S V A G Q Y E A A - - - - - K N N E V G S I K G K K H E Q T Q V A A T A A Y
Bps I Q G R S R V Y G A G A S Y A Y G P L Q G G L L W T Q S R L D N L A N - - - - - G A P - - - - - T I R A D N Y E A N V K Y
          *

OmpF Q F D F G L R P S I A Y T K S K A K D V E G - - - - - I G D V D L V N Y F E V G A T Y Y F N K N M S T Y V D Y I I N Q I D S D N K L G -
OmpC Q F D F G L R P S L A Y L Q S K G K N L G R - - - - - G Y D D E I L K Y V D V G A T Y Y F N K N M S T Y V D Y I I N L L D D N Q F T R D
Omp32 P V G G V G E V K L Q Y A L Y D Q K - - - - - A I D S K A H Q I T L G Y V H N L S K R T A L Y G N L A F L K N K D A S - - - - -
Ompk36 Q F D F G L R P S V A Y L Q S K G K D L N - - - - - G Y G D Q I L K Y V D V G A T Y Y F N K N M S T Y V D Y I I N L L D D N S F T R S
PorB R F - G N V T P R V S Y A H G F K A K V N G - - - - - V K D A N Y Q Y D Q V I V G A D Y D F S K R T S A L V S A G W L K Q G K G - - - - -
Bps N L T P A L G L G V A Y T Y T N A K A - - - - - N G E S T H W N Q V G V Q A D Y A L S K R T D V Y A Q A V Y Q R S S K N A N A S I
          * *

OmpF - - V G - - - - - S D D T V A G I V Y Q F
OmpC A G I N - - - - - T D N I V A L G L V Y Q F
Omp32 - T L G L Q A K G V Y A G G V Q A G E S Q T G V Q V G I R H A F
Ompk36 A G I S - - - - - T D D V V A L G L V Y Q F
PorB - - - - - A G K V E Q T A S M V G L R H K F
Bps Y N G D L S - - - - - T P F S T S I N Q T A A T V G L R H R F
          * *

```

รูปที่ 3.9 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ *BpsOmp* กับ multiple templates ของพอริน *OmpF* *OmpC* *Omp32* *Omp36* และ *PorB* ตำแหน่งที่ shade สีน้ำเงินคือกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับ antimicrobial translocation ที่พบใน *OmpF* หรือ *OmpC* ส่วนตำแหน่งที่ shade สีแดงแสดงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปที่พบใน *BpsOmp* (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

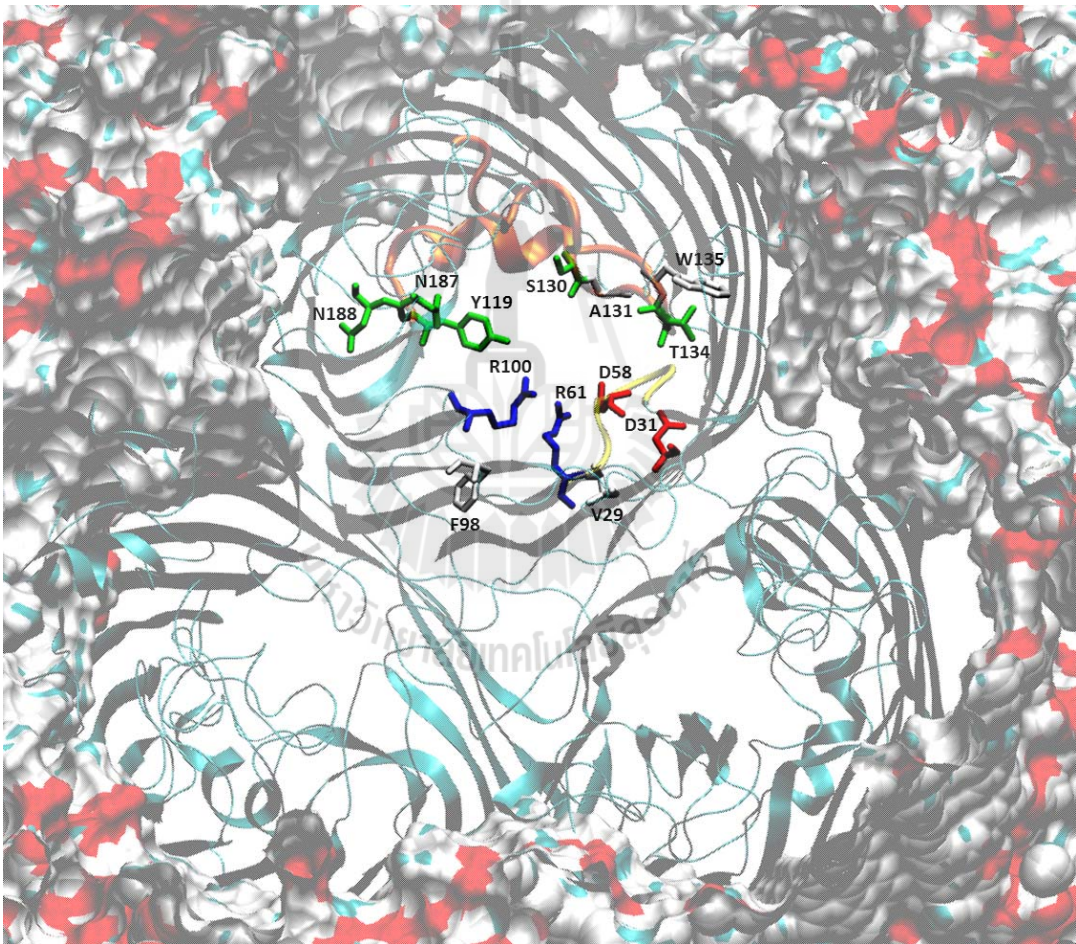
ผลการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนพบว่า *BpsOmp* มีความเหมือนของกรดอะมิโนกับพอรินอื่น ๆ ประมาณ 24% การเปรียบเทียบกรดอะมิโนแสดงตำแหน่ง insertions และ deletions ในส่วนของ extracellular loops และส่วน small protrusion ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนสี่ตัวที่ตรงการของสายปี้ด้า



สายที่ 2 (รูปที่ 3.10 สีเหลือง) ซึ่งพบมีการรายงานส่วน small pertusion ใน *E. coli* Omp32 เช่นกัน (Zeth K et al., 2000)

เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างสามมิติของ OmpF พบว่ามีกรดอะมิโนในหลายตำแหน่งของ BpsOmp ทำหน้าที่กำหนดคุณสมบัติของช่องพอรินที่ไม่เหมือนกัน เช่นที่ตำแหน่งของ L3 กรดอะมิโน arginine ที่ด้านบนของ loop และ basic cluster ที่ตำแหน่ง anti-L3 ที่พบใน OmpF ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดมากกว่า และกรดอะมิโนที่ conserved ที่แสดงในรูปที่ 3.9 สีน้าเงินคือกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับ antimicrobial translocation พบในลำดับกรดอะมิโนของ OmpF หรือ OmpC ส่วนตำแหน่งสีแดงแสดงกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปที่พบใน BpsOmp

รูปที่ 3.10 เป็นโครงสร้างจำลองไตรเมอร์ของ BpsOmp ที่แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีขั้วที่หันเข้าหา lumen ของช่องพอรินและน่าจะมีความสำคัญต่อการกำหนดขนาดของช่อง BpsOmp



รูปที่ 3.10 แสดงโครงสร้างจำลองไตรเมอร์ของ BpsOmp (แหล่งที่มา: Suginta et al., BBA-Biomembranes, 2011)

กรดอะมิโนที่แสดงเป็นกรดอะมิโนที่แทนที่กรดอะมิโนของ *E. coli* OmpF ได้แก่ K16V29, V20D31, K80F108, D113S130, F118W135, R167N187 และ R168N188 ในโครงสร้างของ OmpF กรดอะมิโนเหล่านี้ร่วมกันทำหน้าที่เป็นบริเวณจับเพื่อนำยาปฏิชีวนะผ่านช่อง OmpF [ref 34, 35].

## 1.1. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเตรียมรีคอมบิแนนท์พอริน *BpsOmp38* ของแบคทีเรีย *B. pseudomallei* โดยทำการโคลนยีนดังกล่าวเข้าไปในพลาสมิด pET23d (+) แล้วทำการแสดงออกในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Omp8 ที่มีการ knockout ของยีน OmpA, OmpC, OmpF และ LamB เพื่อให้ *E. coli* สายพันธุ์นี้ผลิตเฉพาะรีคอมบิแนนท์ *BpsOmp* เท่านั้น หลังจากทำการสกัดโปรตีนไตรเมอร์จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแล้วได้ทำการศึกษาคูณสมบัติของพอรินเดี่ยว เป็นครั้งแรกด้วยเทคนิค planar lipid bilayer reconstitution ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *BpsOmp38* สามารถสร้างช่องบน artificial lipid membranes ได้ให้ค่าเฉลี่ย conductance ของช่องเดี่ยวมีค่าเท่า 2.7 nS โดยช่องดังกล่าวสามารถนำเข้ายาปฏิชีวนะหลายชนิดในอัตราที่ไม่เท่ากันดังนี้คือ meropenem << cefipime < imipenem < cetazidime < ertapenem << norfloxacin นอกจากนี้อัตราการผ่านเข้าของยาปฏิชีวนะยังขึ้นกับอุณหภูมิในความสัมพันธ์แบบ exponential decay และการคำนวณค่า energy barrier พบว่าการจับของยาปฏิชีวนะเกิดขึ้นเพียงบริเวณจับเดี่ยว ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้ถือเป็นข้อมูลทางทฤษฎีที่สำคัญที่จะนำไปสู่การออกแบบโครงสร้างยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพที่มีผลบังคับสูงต่อแบคทีเรียก่อโรคเมลิออยโดซิส *B. pseudomallei* ในอนาคต

## 1.2. ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

Alberti S, Rodriguez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbusch JP, Benedi VJ. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun*. 1995, 63:903-910.

Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1984, 44:479-485.

Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*. 1992, 358:727-733.

Cowan SW, Garavito RM, Jansonius JN, Jenkins JA, Karlsson R, Konig N, Pai EF, Pauptit RA, Rizkallah PJ, Rosenbusch JP, et al. The structure of OmpF porin in a tetragonal crystal form. *Structure*. 1995, 3:1041-1050.

Darveau RP, MacIntyre S, Buckley JT, Hancock RE. Purification and reconstitution in lipid bilayer membranes of an outer membrane, pore-forming protein of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol*. 1983, 156:1006-1011

Delost, MD (1997). Introduction to diagnostic microbiology: a text and workbook. Walsworth, United State of America.

Douglas JT, Lee MD, Nikaido H. Protein I of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane is a porin. *FEMS Microbial Lett*. 1981, 12:305-302.

Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstrete DR, Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun*. 1984, 44:16-21.

Ellis JF, Titball RW. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. *Infect Dis Rev*. 1999, 1:174-181.

Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER, *Curr. Protoc. Protein Sci*. 2007, Chapter 2, Unit 2.9

Flammann HT, Weckesser J. Porin isolated from the cell envelope of *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol.* 1984, 159:410-412.

Gotoh N, Wakebe H, Yoshihara E, Nakae T, Nishino T. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J Bacteriol.* 1989, 171:983-990.

Gotoh N, White NJ, Chaowagul W, Woods D. Isolation and characterization of the outer-membrane proteins of *Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei*. *Microbiology* 1994, 140:797-805.

Hancock RE, Decad GM, Nikaido H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Biochim Biophys Acta.* 1979, 554:323-331.

Nakae T. Identification of the outer membrane protein of *E. coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976, 71:877-884.

Nestorovich EM, Danelon C, Winterhalter M, Bezrukov SM, Designated to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99:9789-9794.

Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985, 49:1-32. Review.

Nikaido H, 1994 Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994, 264:382-388. Review.

Olesky M, Zhao S, Rosenberg RL, Nicholas RA. Porin-mediated antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: ion, solute, and antibiotic permeation through PIB proteins with penB mutations. *J Bacteriol.* 2006, 188:2300-2308.

Prilipov A, Phale PS, Van Gelder P, Rosenbusch JP, Koebnik R, Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from *E. coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 19987, 163: 65-72.

Rocque WJ, McGroarty EJ. Structure and function of an OmpC deletion mutant porin from *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry.* 1990, 29:5344-51.

Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH, Suginta W. Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. *Biochem J.* 2004a, 377:579-587.

Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Suginta W. Expression and refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*, and its function as a diffusion porin. *Biochem J.* 2004b, 384:609-617.

Suginta W, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H. Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin BpsOmp38 from an ultrasensitive *Burkholderia pseudomallei* strain. *BBA-Biomembr.* 2011, 1808:1552-1559

Tsujimoto H, Gotoh N, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T. Tsujimoto et al. Cloning and expression of the major porin protein gene *opcP* of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*) *cepacia* in *Escherichia coli*. *Gene.* 1997, 186:113-118.

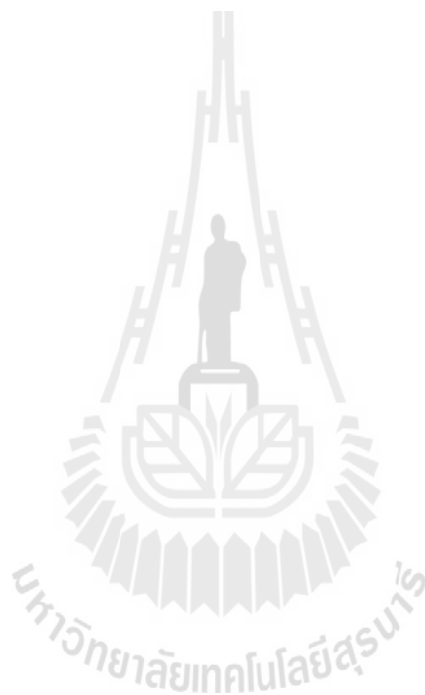
Wallner B, Elofsson A, Can correct proteins models be identified, *Protein Sci.* 2005, 12:1073-1086.

Woods DE, DeShazer D, Moore RA, Brett PJ, Burtnick MN, Reckseidler SL, Senkiw MD. Current studies on the pathogenesis of melioidosis. *Microbes Infect.* 1999, 1:157-162. Review.

Wyllie S, Longbottom D, Herring AJ, Ashley RH. Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *FEBS Lett.* 1999, 445:192-196.

Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun.* 1998, 66:5202-5207

Zeth K, Diederichs K, Welte W, Engelhardt H. Crystal structure of Omp32, the anion-selective porin from *Comamonas acidovorans*, in complex with a periplasmic peptide at 2.1 Å resolution. *Structure.* 2000, 8:981-892.



ภาคผนวก ก  
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

## 1.1. LB Medium (Luria-Bacterial Medium)

Per litre:

To 950 ml of deionised H<sub>2</sub>O add:

bacto-tryptone      10 g

bacto-yeast extract   5 g

NaCl                      10 g

Shake until the solutes have dissolved. Adjust the pH to 7.0 with 5 N NaOH (0.2 ml). Adjust the volume of the solution to 1 litre with deionised H<sub>2</sub>O. Sterilise by autoclaving for 20 min at 15lb/sq. in. on liquid cycle.

## 1.2. SDS-PAGE

- Solutions for preparing 12% resolving SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)		
	5 ml	10 ml	20 ml
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	6.6
30% (w/v) acrylamide mix	2.0	4.0	8.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.25	2.5	5.0
10% SDS	0.05	0.1	0.2
10% ammonium persulfate (freshly prepared)	0.05	0.1	0.2
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl

- Solutions for preparing 5% stacking SDS-polyacrylamide gel

Solution component	Component volume (ml)	
	2 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	1.4	3.4
30% (w/v) acrylamide mix	0.33	0.83
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.25	0.63
10% SDS	0.02	0.05
10% ammonium persulfate	0.02	0.05

(freshly prepared)		
TEMED	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l

- Buffers for SDS-PAGE
  - SDS-gel loading buffer (3 x stock)
    - 150 mM Tris.Cl (pH6.8)
    - 300 mM dithiothreitol
    - 6% SDS (electrophoresis grade)
    - 0.3 % bromophenol blue
    - 30% glycerol
  - Tris-Glycine electrophoresis buffer (5 x stock)
    - 250 mM Tris.Cl (pH 8.3)
    - 1.25 M glycine (electrophoresis grade) (pH 8.3)
    - 0.5 % SDS
  - Staining solution with Coomassie Brilliant Blue for Protein
    - Dissolve 0.25 g of Coomassie Brilliant Blue R250 in 90 ml of methanol:H<sub>2</sub>O (1:1v/v) and 10 ml of glacial acetic acid. Filter the solution through a Whatman No. 1 filter to remove any particulate matter.
  - Destaining Solution for Coomassie Stain
    - 30% methanol
    - 10% acetic acid
    - dH<sub>2</sub>O is added to bring volume to 100 ml.



## 1.3. Preparation of competent cells

1. Streak *E. coli* host cells on an LB plate+100 µg/ml Amp)
2. Allow cells to grow at 37°C overnight
3. Place one colony in 10 mL LB media (+antibiotic selection if necessary), grow overnight at 37°C
4. Transfer 5 mL overnight DH5a culture into 500 mL LB media in 2-L flask
5. Allow cell to grow at 37°C (250 rpm), until OD<sub>600</sub>= 0.6 (~2-3 hours)
6. Transfer cells to 2 centrifuge bottles (250 mL), and place cells on ice for 20 mins
7. Centrifuge cells in Sorval GSA rotor at 4°C for 10 mins at 3,000 g (2500 rpm). Cells must remain cold for the rest of the procedure
8. Pour off media and resuspend cells in 30 mL of cold 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. Transfer the suspended cells into 50 mL polypropylene falcon tubes, and incubate on ice for 30 mins
9. Centrifuge cells using rotor at 4 °C for 10 mins at 3,000 g
10. Pour supernatant and re-suspend cells (by pipetting) in 8 mL cold 0.1M CaCl<sub>2</sub> containing 15% glycerol. Transfer 100 µL into (1.5 mL) Eppendorff tubes placed on ice. Freeze the cells in liquid nitrogen. Cells stored at -80°C can be used for transformation for up to ~6 months.

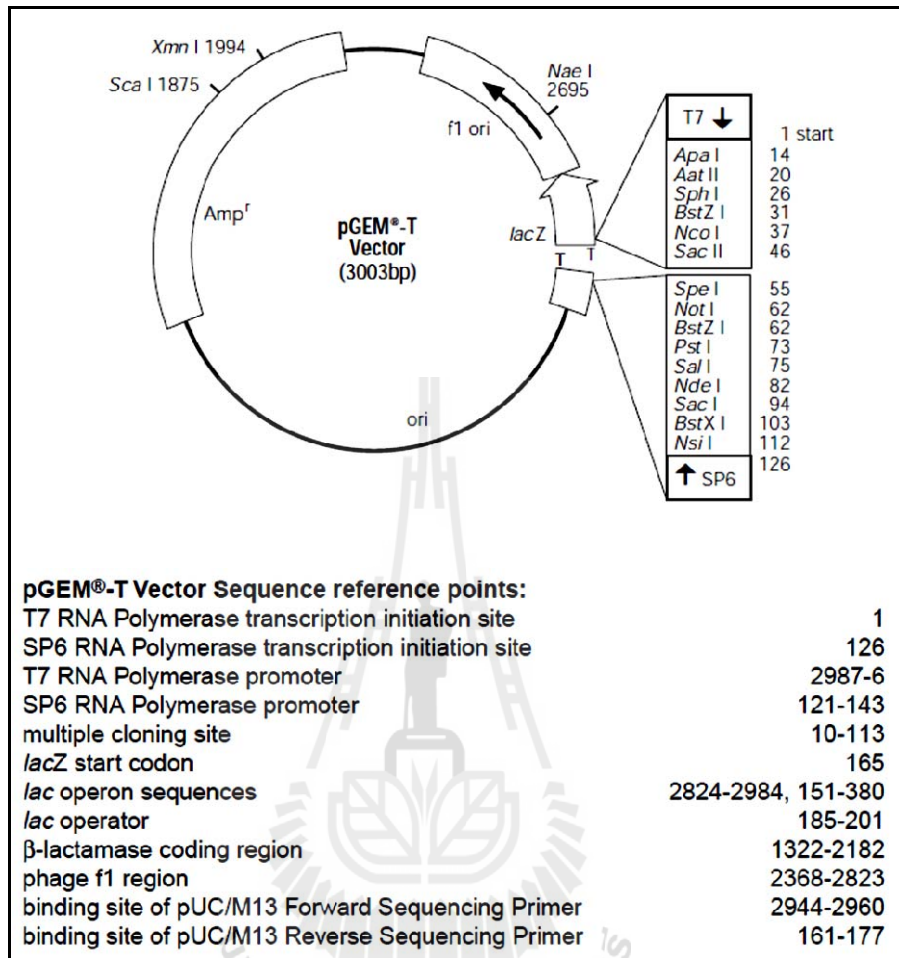
## 1.4. Buffers for Western blot analysis

## Phosphate-buffered saline plus Tween 20 (PBS-T)

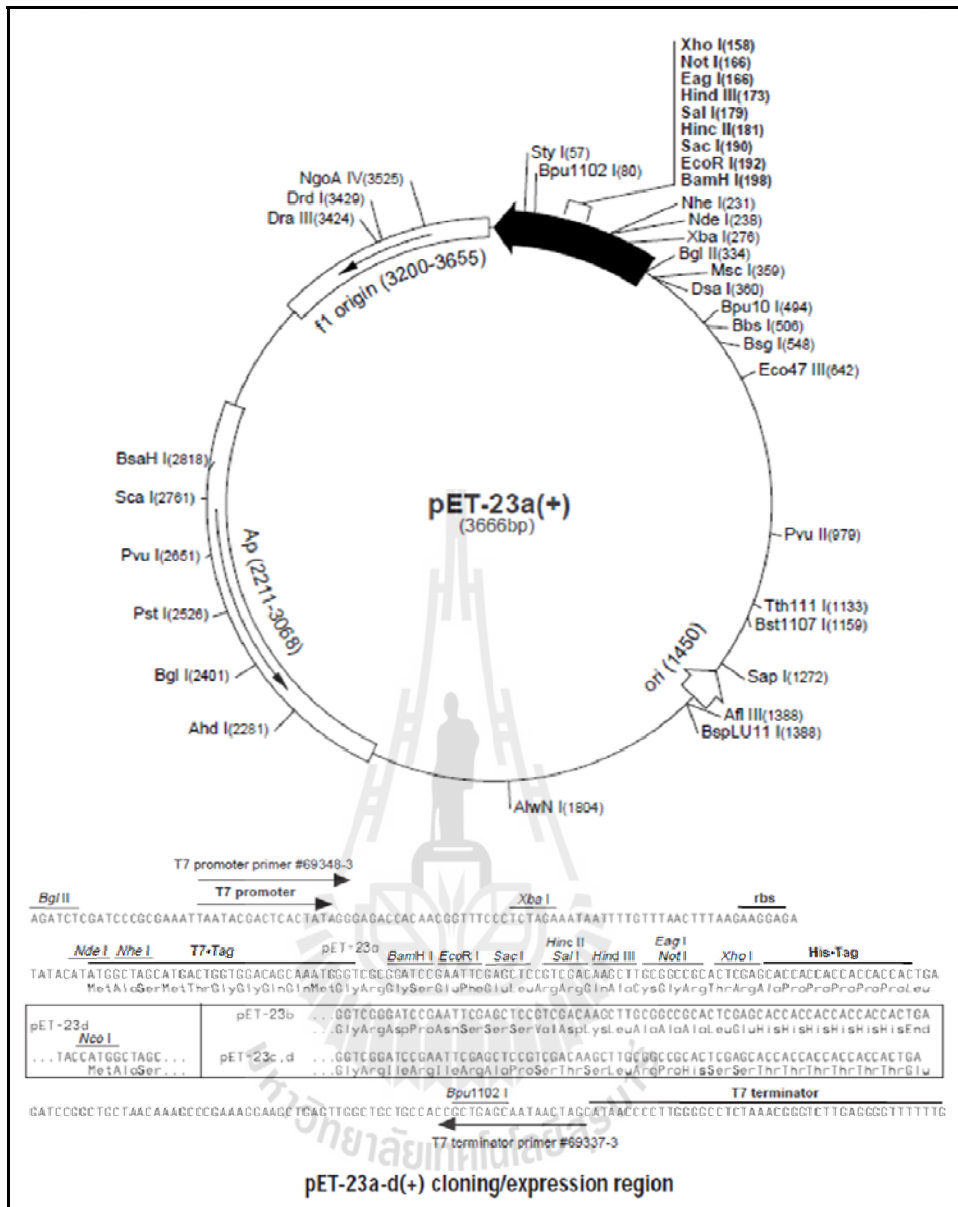
Dissolve 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.2 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 ml of distilled H<sub>2</sub>O. Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add H<sub>2</sub>O to 1 litre. 1% (v/v) of Tween 20 is added and stirred to prior to use.

## ภาคผนวก ข

- แผนที่พลาสมิด pGEM<sup>®</sup>-T cloning vector



- แผนที่พลาสมิด pET23a-d(+) expression vector



## ภาคผนวก ค

## ผลงานตีพิมพ์และการเผยแพร่

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 ผลงาน
  1. Suginta W\*, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H\*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *BpsOmp38* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. BBA-Biomembr. 1808, 1552-1559 (IF2010 = 4.647)
  
2. ผลงานนำเสนอในรูปแบบบรรยายหรือโปสเตอร์ในที่ประชุมระดับนานาชาติหรือระดับชาติ 2 ผลงาน
  1. Suginta W, Mahendran KR, Weingart H, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M. High-time resolution analysis of antibiotic translocation through *BpsOmp* porin from the highly drug-resistant bacterium *Burkholderia pseudomallei*. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p77. Poster presentation.
  2. SugintaW, Mahendran KR, Chumjan W, Weingart H, Winterhalter M. Molecular transport through the outer membrane porin of the Melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*, Alexander von Humboldt Network Meeting, Odenburg, Germany, October 7-9, 2010. Poster presentation.

**ภาคผนวก ง**  
**ประวัตินักวิจัย**

Name	(ไทย) วิภา สุจินต์ (English) Wipa Suginta
Affiliation	(ไทย) กลุ่มวิจัยชีวเคมี-เคมีไฟฟ้า สาขาวิชาเคมีและชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา 30000  (English) School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000 Thailand Tel: +66 44 22 4313; E-mail <a href="mailto:wipa@sut.ac.th">wipa@sut.ac.th</a>
Degree	Ph.D. (Biochemistry), The University of Edinburgh, UK  M.Sc. (Biochemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand B.Sc. (Genetics), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
Marital status	Married with one child
Current Position	Associate Professor in Biochemistry
Fellowships/Awards (year 2000 - present)	
2009-2012	“Alexander von Humboldt Fellowship for Experienced Researchers” from Alexander von Humboldt Foundation, Germany
2010	รางวัลพนักงานดีเด่น ประจำปี พ.ศ. 2553 สายวิชาการ <u>ด้านการวิจัย</u> มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
2006	Suranaree University of Technology Award for “Outstanding Academic Performance in Science”
2005	“For Women in Science Fellowship” from L’OREAL (Thailand)/UNESCO.
2004	A “General Travel Grant” from The Biochemical Society, United Kingdom.
2003	“DAAD Fellowship” from the German Academic Exchange Service (DAAD), Germany.
1999-2000	Wellcome Trust fellowship for Postdoctoral Research Study at Membrane Biology Group, The University of Edinburgh, United Kingdom.

### Research Interest

1. Structure and function of bacterial porins
2. Structure and function of chitinases and chitobiases from marine bacteria to humans

### List of publications

#### Peer-reviewed articles

1. Ranok A, Suginta W\*, Khunkaewla P\*. (2012) Human chitinase 3-like 2 protein (YKL-39): recombinant expression, monoclonal antibody production and GlcNAc-recognition-site identification. Manuscript in preparation for Clin. Biochem.
2. Suginta W\* & Sritho N (2012) Sodium azide inhibits a family-18 chitinase. Manuscript in preparation for J Biochem.
3. Sritho N & Suginta W\*. (2012) Additional roles of Asp313 in the refined catalytic cycle of chitin degradation by *Vibrio harveyi* chitinase A. Under review by Arch. Biochem. Biophys.
4. Sritho N & Suginta W\* (2012) Role of Tyr-435 of *Vibrio harveyi* chitinase A in chitin utilization. App Biochem Biotech, 166:1192–1202. (IF2010 = 1.88).
5. Pantoom S, Vetter I, Prinz, H & Suginta W\* (2011) Potent family-18 chitinase inhibitors: X-ray structures, affinities and binding mechanisms. J Biol Chem. 286, 24312-24323. (IF2010 = 5.328)
6. Suginta W\*, Mahendran KR, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M, Weingart H\*. (2011) Molecular analysis of antimicrobial agent translocation through the membrane porin *BpsOmp38* from an ultraresistant *Burkholderia pseudomallei* strain. BBA-Biomembr. 1808, 1552-1559 (IF2010 = 4.647)
7. Suginta W\*, Chuenark D, Masuhara M & Fukamizo T (2010) Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650: Cloning, expression,

enzymatic properties, and subsite identification. BMC Biochem. 11:40.  
(Highly accessed) (Unofficial IF2009 = 2.8)

8. Schulte A, Ruamchan S & Khunkaewla P, Suginta W\* (2009) The outer membrane protein *VhOmp* from *Vibrio harveyi*: The pore-forming properties in black lipid membranes. J Membr Biol. 230, 101-111. (IF2009 = 1.63)
9. Suginta W\*, Pantoom S & Prinz H (2009) Substrate binding modes and anomer selectivity of chitinase A from *Vibrio harveyi*. J Chem Biol. 2, 191-202.
10. Songsiriritthigul C, Pantoom S, Aguda AH, Robinson RC & Suginta W\* (2008) Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism. J Struct Biol. 162, 491-499. (IF2009 = 3.497)
11. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W\* (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. BMC-Biochem. 9:2. (unofficial IF = 2.8)
12. Suginta W\*, Songsiriritthigul C, Kobdaj A, Opassiri R & Svasti J (2007) Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A. BBA-General Subjects. 1770, 1151-1160. (IF2010 = 4.663)
13. Suginta W\* (2007) Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. Enzyme MicrobTech. 41, 212-220. (IF2010 =2.287)
14. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A, Prinz H & Suginta W\* (2005) Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of chitinase A from *Vibrio carchariae*. Acta Cryst. Section F. 61, 895-898. (IF2009 = 0.55)
15. Suginta W\*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Svasti J & Prinz H (2005) Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A

from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. FEBS J. 272, 3376-3386. (IF2010 = 3.129)

16. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C & Suginta W\* (2004) Expression, refolding of Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*, and its function as a diffusion porin. Biochem J. 384, 609–617. (IF2009 = 5.155)
17. Suginta W\*, Vongsuwan A, Songsiriritthigul C, Prinz H, Estibeiro P, Duncan RR, Svasti J & Fothergill-Gilmore LA (2004) An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: gene isolation, modelled structure topology, cloning and functional expression. Arch Biochem Biophys. 424, 171-180. (IF2010 = 3.022)
18. Siritapetawee J, Prinz H, Samosornsuk W, Ashley RH & Suginta W\* (2004) Functional reconstitution, gene isolation and topology modelling of porins from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. Biochem J. 377, 579-587. (IF2010 = 5.155)
19. Suginta W, Karoulias N, Aitkin A & Ashley RH\* (2001) Brain dynamin-1 interacts directly with the chloride intracellular channel protein CLIC4 in a complex containing actin and 14-3-3 proteins. Biochem J. 359, 55-64. (IF2010 = 5.155)
20. Suginta W, Robertson PAW, Austin B, Fry SC & Fothergill-Gilmore LA\* (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chi A from *Vibrio carchariae*. J Appl Microbiol. 89, 76-84. (IF2010 = 2.365)
21. Svasti J\*, Srisomsap C, Surarit R, Benjavongkulchai E, Suginta W, Khunyoshyeng S, Champattanachai V, Nilwarangkoon S & Rungvirayudx S (1996) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In Protein Structure-Function Relationship (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press. pp.249-257.
22. Surarit R, Svasti MR J, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E\* (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. In Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 251-255.



23. Suginta W & Svasti MRJ\* (1995) Purification and Properties of  $\beta$ -Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *ScienceAsia* 21, 183-186.
24. Suginta W & Svasti J\* (1995) Beta-Galactosidase from Thai Jute: Purification and Characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: Structure, Function and Applications* (Svasti, J. et al., eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 256-260.
25. Surarit R, Svasti MRJ, Srisomsap C, Suginta W, Khunyoshyeng S, Nilwarangkoon S, Harnsakul P & Benjavongkulchai E (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *ScienceAsia* 21, 293-303.

หมายเหตุ เครื่องหมาย \* แสดงผู้เขียนเป็น Corresponding author

#### Presentations at Scientific Meetings (Years 2005-present)

3. Suginta W. Structures and mechanisms of a family-18 chitinase in complex with novel chitinase inhibitors. The 37<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT37), Centara Grand Bangkok Convention Centre at Central World, Bangkok, Thailand, October 10-12, 2011, p44. Invited talk.
4. Chaocharoen W, Ranok A, and Suginta W. Expression and purification of human chitinase-like protein YKL-40. CHE-USDC Congress IV, The Zign Hotel, Pattaya, Chonburi. Sept 14-16, 2011. P136. Poster presentation.
5. Chumjan W, Schulte A, Weingart H, Benz R, Winterhalter M. Suginta W. Chitoporin (ChiP) from *Vibrio harveyi* 650: Gene isolation, recombinant expression and molecular translocation of chitin oligosaccharides. The Zign Hotel, Pattaya, Chonburi. Sept 14-16, 2011. P113. Poster presentation.
6. Ranok A, Khunkaewla P, Suginta W. Cloning, recombinant expression, and production of monoclonal antibody against osteoarthritis biomarker YKL-39. The Zign Hotel, Pattaya, Chonburi. Sept 14-16, 2011. P161. Poster presentation.
7. Chumjan W, Schulte A, Weingart H, Benz R, Winterhalter M. Suginta W. Chitoporin (ChiP) from *Vibrio harveyi* 650: Gene isolation, recombinant expression and molecular translocation of chitin oligosaccharides. The 6th Annual Symposium of

- the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, Aug30-Sept2, 2011, p75. An outstanding award for poster presentation.
8. Ranok A, Khunkaewla P, Suginta W. Cloning, recombinant expression, and production of monoclonal antibody against YKL-39, a human chitinase-like protein. The 6th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, Aug30-Sept2, 2011, p76. Poster presentation.
  9. Sritho N, Suginta W. Site-directed mutagenesis of active-site residues aspartate 313 and tyrosine 435 of chitinase from a marine bacterium *Vibrio harveyi*. The 6th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, Aug30-Sept2, 2011, p109-113. Proceedings 2.
  10. Suginta W, Mahendran KR, Weingart H, Chumjan W, Hajjar E, Schulte A, Winterhalter M. High-time resolution analysis of antibiotic translocation through *BpsOmp* porin from the highly drug-resistant bacterium *Burkholderia pseudomallei*. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p77. Poster presentation.
  11. Sritho N, Pantoom S & Suginta W. Roles of Asp313 and Tyr435 of *Vibrio harveyi* chitinase A on chitin hydrolysis. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p59. Poster presentation.
  12. Chumjan W, Schulte A, Lovelle M, Weingart H, Benz R, Winterhalter M & Suginta W. Identification and characterization of a chitoporin from *Vibrio harveyi*. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p67. Poster presentation.
  13. Chuenark D, Masuhara M, Fukamizo T & Suginta W. Novel  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from *Vibrio harveyi* 650. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p56. Poster presentation.
  14. Pantoom S, Vetter IR, Prinz H & Suginta W. Structural and mechanistic studies of *Vibrio harveyi* chitinase-inhibitor complexes: An implication for drug development.

- The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p19. An outstanding award for oral presentation.
15. Meekrathok P, Suginta W, Kukic P & Nielsen JE. Predicting the active site pKa values and pH-activity profiles of the GH-18 chitinases. The 5th Annual Symposium of the Protein Society of Thailand, Conventional Center, Chulabhorn Research Institute Bangkok, Thailand, June 23-26, 2010, p49. Poster presentation.
  16. Suginta W, Mahendran KR, Chumjan W, Weingart H, Winterhalter M. Molecular transport through the outer membrane porin of the Melioidosis bacterium *Burkholderia pseudomallei*, Alexander von Humboldt Network Meeting, Odenburg, Germany, October 7-9, 2010. Poster presentation.
  17. Sritho N & Suginta W. Mutational analysis of the active-site residues Aspartate313 and Tyr435 of Chitinase A from a marine bacterium *Vibrio harveyi*. 2<sup>nd</sup> SUT Graduate Conference 2009, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, January 21<sup>st</sup>-22<sup>nd</sup>, 2009. AG-P-13, *Poster presentation*.
  18. Ruamchan S, Schulte A & Suginta W. Ion channel activity of *Burkholderia pseudomallei* and *thailandensis* porins in black lipid membranes. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P53, *Poster presentation*.
  19. Chuenark D, Prinz & Suginta W. Cloning, expression, and characterization of two zincin-like fold containing chitobiases from *Vibrio harveyi*. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P73, *Poster presentation*.
  20. Sritho N, Songsiriththigul C & Suginta W. Mutational analysis of the reducing-end binding residues of chitinase A from *Vibrio harveyi*. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P50, *Poster presentation*.
  21. Pantoom S, Prinz H & Suginta W. Identification of novel inhibitors of chitinase A from *Vibrio harveyi* using a high-throughput screening approach. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”,

- Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P48, *Poster presentation*.
22. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W. Crystallization of wild-type chitinase A and mutants (W275G and W397F) from *Vibrio harveyi* in complex with potential inhibitors. 3<sup>rd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Frontiers in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, August 28<sup>th</sup>-29<sup>th</sup>, 2008. P46, *Poster presentation*.
  23. Suginta W & Prinz H. Substrate binding preference and anomer selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A as revealed by HPLC-MS. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P14, *Invited oral presentation*.
  24. Suginta W. Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P47. *Poster presentation*.
  25. Songsiriritthigul C, Kobdaj A & Suginta W. The active site residues Trp275 and Trp397 are important for the binding selectivity of chitinase A to soluble substrates. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P53. *Poster presentation*.
  26. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W. The influence of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. 2<sup>nd</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Odysseys in Protein Research”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, September 20<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>, 2007. P27. *Poster presentation*.
  27. Pantoom S, Songsiriritthigul C & Suginta W. The effect of the N-terminal residues on the enzymatic properties of *Vibrio carchariae* chitinase A. 1<sup>st</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Research Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25<sup>th</sup>, 2006. P61. *Poster presentation*.
  28. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & Suginta W. Structural analysis of *Vibrio carchariae* chitinase A reveals conformational changes during substrate hydrolysis.

- 1<sup>st</sup> Annual Symposium of the Protein Society of Thailand “Challenges in Protein Research in Thailand”, Chulabhorn Reserch Institute Conference Center, Bangkok, October 24-25<sup>th</sup>, 2006. P19. *Oral presentation.*
29. Songsiriritthigul C, Aguda A, Robinson RC & Suginta W. Structure of chitinase A from *Vibrio carchariae*. 2<sup>nd</sup> Protein Crystallization Workshop. Synchrotron Research Center, Nakhon Ratchasima, 20 – 23 July 2006. *Invited oral presentation by SC.*
30. Suginta W. On the structure and function of bacterial porins and chitinases. A Departmental Special Seminar, Department of Life Sciences, Faculty of Sciences and Agriculture, The University of the West Indies, Trinidad and Tobago, May 15<sup>th</sup>, 2006. *Invited oral presentation.*
31. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & Suginta W A study of substrate specificity of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P327. *Oral presentation.*
32. Songsiriritthigul C, Yuvaniyama J, Robinson RC, Vongsuwan A & Suginta W Expression, purification, crystallization, and preliminary crystallographic analysis of chitinases A from *Vibrio carchariae*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 18 – 20 October 2005. P335. *Poster presentation.*
33. Songsiriritthigul C, Vongsuwan A, Krittanai C & Suginta W Active-site mutation alters substrate specificity of chitinase A from *Vibrio carchariae*. The 2<sup>nd</sup> Protein Symposium Network, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, September 23<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>, 2005. *Invited oral presentation.*
34. Siritapetawee J, Prinz H, Krittanai C, Ashley RH & Suginta W Porin from *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. In 30<sup>th</sup> FEBS Congress & 9<sup>th</sup> IUBMB Meeting, Budapest, Hungary, July 2<sup>nd</sup>-7<sup>th</sup>, 2005. *FEBS J. Vol. 272, Supp. 1, P389. Poster presentation.*