อนุวัต อุ่นคำ : การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนที่เยื่อเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียก่อโรค (STRUCTURE AND FUNCTION OF OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM PATHOGENIC BACTERIA). อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 193 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาโครงสร้าง และหน้าที่ของช่องโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคสองสายพันธุ์ที่มีชื่อว่า *Bps*Omp38 จากเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* และ *Vh*ChiP จากเชื้อ *Vibrio harveyi*

*Bps*Omp38 มีคุณสมบัติเป็นช่องแพร่ผ่านสารที่ไม่จำเพาะ ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย ที่เหมือนกัน 3 หน่วย จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของผลึกโปรตีน ซึ่งสามารถหักเหรังสีเอกซ์ได้ความละเอียด 2.8 อังสตรอม พบว่าแต่ละหน่วยย่อยมีโครงสร้างโดยรวมประกอบด้วย 16 anti β-strands ต่อด้วย 8 loop ขนาดยาวที่ยื่นออกไปด้านนอกเซลล์ และ 7 loop ขนาดสั้นที่ยื่นเข้าไปใน periplasmic ลักษณะภายในช่องโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรฟีลิคสูง ซึ่งจากโครงสร้างพบว่า กรดอะมิโน Tyr119 ยื่นเข้าไปตรงกลางของช่องโปรตีน และจากการศึกษาผลของยาต่อเชื้อ *B. pseudomallei* ด้วยวิธี Minimum inhibitory concentration (MIC) พบว่า เชื้อมีการต้านทานต่อยาเกือบทุกชนิดยกเว้นยา 2 ชนิด คือ ceftazidime และ meropenem ผลการทดลองสอดคล้องเป็นอย่างดีกับการศึกษาการแพร่ผ่านของยา ด้วยเทคนิค liposome swelling และ เทคนิค planar lipid membrane (BLM) ยาสองชนิดนี้แพร่ผ่านช่องโปรตีนได้ดีกว่ายาชนิดอื่น ๆ และจากการศึกษาผลการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน Tyr119 มีหน้าที่สำคัญต่อการควบคุมการแพร่ผ่านของยา และน้ำตาลผ่านช่อง *Bps*Omp38 ซึ่งการดัดแปลงกรดอะมิโน Tyr119 ให้เป็น Ala ส่งผลให้มีการแพร่ผ่านของยาและน้ำตาลเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดอะมิโน Ala มีขนาดเล็กกว่า Tyr จึงทำให้ช่องของโปรตีนมีขนาดกว้างขึ้น การแพร่ผ่านของสารจึงแพร่ผ่านได้ดีขึ้น

*Vh*ChiP มีคุณสมบัติ เป็นช่องแพร่ผ่านสารที่จำเพาะสูงต่อน้ำตาลไดโตเฮกซะโอส จากการศึกษาผลการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน Typ136 ด้วยวิธีการทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ พบว่าน้ำตาลไดโตโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยป้องกันการเสียสภาพ ในระดับโครงสร้างทุติยภูมิ และตติยภูมิของช่องโปรตีน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอัตราการจับของน้ำตาล กับช่องโปรตีนด้วยวิธีอุณหพลศาสตร์ และเทคนิค fluorescence spectroscopy ผลการศึกษาช่วยยืนยันว่า Typ136 มีบทบาทสำคัญต่อการแพร่ผ่านของน้ำตาลผ่านช่องพอรินชนิด *Vh*ChiP จากการศึกษาโครงสร้างสามมิติของผลึกโปรตีน *Vh*ChiP refolded และ *Vh*ChiP native ที่ถูกหักเหด้วยรังสีเอกซ์ ด้วยความละเอียดสูงถึง 1.9 อังสตรอม ซึ่งโครงสร้างโดยทั่วไปของ *Vh*ChiP พอริน ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกันสามหน่วย แต่ละหน่วยย่อยประกอบด้วย 16 strand ที่ถูกเชื่อมต่อด้วย 8 loop ขนาดยาวที่อยู่ด้านนอกผนังเซลล์ และ 7 loop ขนาดสั้นที่

ยื่นเข้าไปใน periplasmic อย่างไรก็ตาม โครงสร้างของโปรตีนทั้งสองมีความแตกต่างกัน โดยโครงสร้างของ *Vh*ChiP refolded ในส่วนของ *N*-terminus จะยื่นออกไปด้านนอกของช่องโปรตีน แต่โครงสร้างของ *Vh*ChiP native จะยื่นเข้าไปอุดอยู่ ในช่องโปรตีนที่อยู่ติดกัน ส่วนของ *N*-terminus นี้ อาจมีผลช่วยต่อการนำเข้าน้ำตาล ผ่านช่อง *Vh*ChiP พอริน โครงสร้างของโปรตีน *Vh*ChiP refolded ที่จับกับไคโตเฮกซะโอสพิสูจน์ให้เห็นว่า กรดอะมิโนที่เป็นวงแหวน จะจับกับวงแหวนของน้ำตาลด้วยแรงไฮโดรโฟบิค และกระอะมิโนที่มีประจุ หรือมีขั้ว จะจับกับ หมู่ C_2- อะซีดามิโด และ ไฮดรอกซิล ของน้ำตาล ด้วยเครือข่ายพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ก็พบว่าน้ำตาลไคโตเตตระโอส สามารถจับกับโครงสร้างของโปรตีน *Vh*ChiP native และมีผลทำให้ *N*-terminus หลุด และยื่นออกมาจากภายนอกช่องโปรตีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา อนุวัต ฉุ่นคำ

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ANUWAT AUNKHAM : STRUCTURE AND FUNCTION OF OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM PATHOGENIC BACTERIA.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 193 PP.

STRUCTURE AND FUNCTION OF OUTER MEMBRANE PROTEINS FROM PATHOGENIC BACTERIA

Two outer membrane channels from two Gram-negative pathogenic bacteria, namely *Bps*Omp38 from *Burkholderia pseudomallei* and *Vh*ChiP from *Vibrio harveyi*, together with their mutants were expressed and characterised.

*Bps*Omp38 was shown to act as a general diffusion channel, consisting of three identical subunits. The crystal structure revealed that *Bps*Omp38 was solved to highest resolution of 2.8 Å. The final model of *Bps*Omp38 showed that each *Bps* barrel consists of 16 anti β-strands with eight extracellular long loops and seven periplasmic turns. The channel interior is highly hydrophilic with Tyr119 amino acid protruding in the centre of the pore. Minimum inhibitory concentration (MIC) and liposome swelling assays showed that clinical *B. pseudomallei* strain was resistant to most antimicrobial agents. However, high sensitivity was observed for ceftazidime and meropenem. This observation was in good agreement with the BLM experiments of *Bps*Omp38 where translocation was observed for two sensitive drugs; ceftazidime and meropenem. In contrast, no channel blockage was seen for the drugs to which the *Bps* was resistant to even at high concentration. Meanwhile, mutation of the residue Tyr119 greatly affected the permeability of antimicrobial agents and neutral sugars. The results indicated the important role of Tyr119 in regulating the passage of these molecules through

*Bps*Omp38 channel. The higher permeability of *Bps*Omp38Y119A was ascribed to the widening of the pore interior as a result of the substitution of the bulky Tyr with the smaller Ala residue.

*Vh*ChiP was identified to be highly selective for chitohexaose uptake. The essential role of Typ136 in kinetic binding affinity was proven by the observation of increased midpoint temperature (T_m) of secondary and tertiary structural thermal unfolding for protein-chitooligosaccharide complex. Thermodynamic parameters of protein-chitooligosaccharide interactions obtained from fluorescent quenching technique also supported this phenomenon. In the later part of this study, the 3D structures of trimeric *Vh*ChiP both in refolded and native forms were solved to highest resolution of 1.9 Å. The overall structures of the native and refolded channels were essentially identical, to which each of the trimeric barrels comprised 16 strands, connected by 8 extracellular loops, and 7 periplasmic turns. However, the *N*-terminus in the refolded channel swings outside the β-barrel, making the channel interior more accessible to the sugar substrate. This *N*-terminal segment that protrudes towards the protein lumen in the native channel was presumed to help in regulating sugar translocation and stabilising the structure of *Vh*ChiP. The crystal structure of the refolded *Vh*ChiP in the presence of chitohexaose revealed that the four GlcNAc rings were in stacking position with the regional amino acid residues. Besides, the C_2-acetamido and OH groups of the GlcNAc units also interact with several charge or polar residues. The *N*-terminus of the native protein was displaced by chitohexaose.

School of Chemistry — Student's signature Anuwat Aunkham

Academic Year 2016 — Advisor's signature Wipa Suk