นางเอช ศศิมาลี เอ็ม ซอยซา : การศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีและทางชีวฟิสิกส์ของไคโตพอรินจากแบคทีเรียที่ใช้และไม่ใช้ไคติน (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF CHITOPORINS FROM CHITINOLYTIC AND NON-CHITINOLYTIC BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร.วิภา สุจินต์, 253 หน้า.

ช่องจำเพาะต่อน้ำตาล, ไคโตพอริน, ไอโซเทอร์มอล ไตเตรชัน ไมโครคาลอริเมทรี, การวิเคราะห์ช่องโปรตีนเดี่ยว

ไคตินเป็นไบโอโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยน้ำตาล GlcNAc มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีตา-1,4-ไกลโคซิดิกและเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหลือเฟือสำหรับจุลินทรีย์ในทะเล วิทยานิพนธ์นี้ ประกอบด้วยสามส่วน ซึ่งส่วนแรกจะอธิบายเกี่ยวกับคุณลักษณะของไคโตพอรินที่ค้นพบใหม่ (เรียกว่า *Ec*ChiP) ที่ช่วยในการนำเข้าของน้ำตาลไคตินโอลิโกแซคคาร์ไรด์โดยแบคทีเรียไม่ใช้ไคติน *E. coli* โดยได้ทำการจำแนกยีน *chip* ทำการโคลนและการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 (Omp8) Rosetta การศึกษาช่องเดี่ยวโดยเทคนิค black lipid membrane (BLM) reconstitution พบว่า *Ec*ChiP สร้างช่องโมโนเมอร์เสถียรที่มีค่าสภาพการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 0.55±0.01 nS และมีความชอบต่อประจุบวก เมื่อหาค่าคงที่การจับ (K) ของช่องเดี่ยวด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์สามวิธีพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.4-1.0×10^5 M^{-1} การหาค่าเทอร์โมไดนามิกส์โดยวิธีไอโซเทอร์มอล ไตเตรชัน ไมโครคาลอริเมทรี (ITC) พบว่าอันตรกริยาระหว่างน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสกับช่อง *Ec*ChiP เป็นกระบวนการแบบเอนโดเทอร์มิก นอกจากนี้ การทดลองผลของอุณหภูมิพบว่าการขนส่งน้ำตาลผ่านช่อง *Ec*ChiP เป็นการแพระแบบฟาซิลิเทต และการศึกษาผลของ pH แสดงให้เห็นว่าหมู่อะซิทะมิโดที่ตำแหน่ง C2 ของไคโตเฮกซะโอสมีความสำคัญต่อสัมพรรคภาคของการจับของช่องต่อไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ การศึกษาโดยใช้ช่อง *Ec*ChiP เป็นต้นแบบให้องค์ความรู้ใหม่ว่ายีน *chip* ของแบคทีเรียกลุ่มที่ไม่ใช้ไคตินสามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกและสร้างไคโตพอรินที่ทำงานได้ ในงานส่วนที่สองทำการศึกษาไคโตพอรินเหมือน OccD จากเชื้อแบคทีเรียใช้ไคตินคือ *Serratia marcescens* (เรียกว่า *Sm*ChiP) การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของ *Sm*ChiP โดยวิธี Electrospray MS ให้ค่าเป็น 49,085 Da ซึ่งสอดคล้องกับค่าน้ำหนักโมเลกุลทางทฤษฎี การหาค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์พบว่าน้ำตาลไคโตเฮกซะโอสจับกับช่องด้วยกระบวนการที่ขับคลื่นด้วยเอนโทรปี การทดลองด้าน BLM พบว่า *Sm*ChiP สร้างช่องเดี่ยวโมโนเมอร์ที่เสถียรที่มีสภาพการนำไฟฟ้าเฉลี่ยเท่ากับ 0.54±0.01 nS ใน 1M KCl โดย *Sm*ChiP ก็มี

ความจำเพาะต่อน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ ผลการทดลองแสดงหน้าที่ของช่องไคโตพอรินที่เหมือน OccD ในการนำเข้าไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์เป็นครั้งแรกในแบคทีเรียกลุ่มไช้ไคติน ในงานส่วนที่สามเกี่ยวข้องกับคุณลักษณะของไคโตพอรินจากเชื้อ *Vibrio cholerae* (เรียกว่า *Vc*ChiP) จากผลการทดลองที่สอดคล้องกันระหว่างการศึกษาโดย BLM และการดูการเคลื่อนของโปรตีนบนแผ่นเจล SDS-PAGE พบว่า *Vc*ChiP สร้างช่องไตรเมอร์ โดย *Vc*ChiP แสดงคุณสมบัติที่ถูกเหนี่ยวนำโดยความต่างศักย์ไฟฟ้า โดยที่ช่องจะปิดที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำ ๆ เช่น -25 mV และจะเปิดมากขึ้นที่ความต่างศักย์สูง ๆ เช่น -150 mV โดยมีสภาพความสามารถในการนำไฟฟ้าอยู่ที่ 1.6±0.2 nS จากการศึกษาการการผ่านของน้ำตาลเข้าช่องโปรตีนที่ฝังอยู่บนไลโปโซมพบว่าช่อง *Vc*ChiP มีลักษณะเป็นช่องจำเพาะต่อไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ การศึกษาด้านเซลล์พบว่าเซลล์ Omp-deficient *E. coli* ที่มียีน *chip* สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimum medium ที่มีน้ำตาลไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์อยู่ ส่วนเซลล์ที่ไม่มียีน *chip* ไม่สามารถเติบโตได้ โดยรวมผลการทดลองในส่วนนี้แสดงถึงบทบาทของไคโตพอรินในวิถีการใช้ไคตินของแบคทีเรียก่อโรค *V. cholerae.*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเคมี ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

H. SASIMALI M. SOYSA : BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF CHITOPORINS FROM CHITINOLYTIC AND NON-CHITINOLYTIC BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WIPA SUGINTA, Ph.D. 253 PP.

SUGAR-SPECIFIC CHANNEL, CHITOPORIN, ISOTHERMAL TITRATION MICROCALORIMETRY, PROTEIN SINGLE CHANNEL ANALYSIS

Chitin, a biopolymer of β-1,4-glycosidic linked GlcNAc residues, is an abundant source of carbon and nitrogen for marine microorganisms. This thesis is divided into three parts. The first part describes the characterization of a novel chitoporin (so-called *Ec*ChiP) which helps to uptake chitin oligosaccharides in non-chitinolytic *E. coli*. The *chip* gene was identified, cloned and functionally expressed in the Omp-deficient *E. coli* BL21 (Omp8) Rosetta host. Single channel study by black lipid membrane (BLM) reconstitution demonstrated that *Ec*ChiP could readily form a stable monomeric channel, with an average conductance of 0.55±0.01 nS, and showing a slight preference for cations. The binding constant (K) of a single channel binding chitohexaose (the sugar with greatest affinity) was estimated by three mathematical methods and values of 0.4-1.0×10^5 M^{-1} were consistently obtained. Thermodynamic assessment by isothermal titration microcalorimetry (ITC) suggested that chitohexaose-*Ec*ChiP channel interactions are driven by an endothermic process. Moreover, temperature dependence experiments reveal that chitosugar translocation through *Ec*ChiP was achieved by facilitated diffusion. The importance of the acetamido group at C2 of the chitooligosacharide chain for the binding affinity of *Ec*ChiP and its

substrate was demonstrated in pH-dependence experiments. Taking *E. coli* as a model, this study offers the first evidence that non-chitinolytic bacteria can activate a quiescent *chip* gene to express a functional chitoporin. The second part is involved with an OccD-like chitoporin from chitinolytic *S. marcescens* (so called *Sm*ChiP). The molecular mass obtained by electrospray ionization spectrometry for the purified *Sm*ChiP was 49,085 Da, which is in good agreement with theoretical molecular weight. The measured ITC parameters indicating that chitosugar binding to *Sm*ChiP is primarily entropy-driven. BLM experiments showed stable monomeric channel with average conductance of 0.54±0.01 nS in 1 M KCl. The channel showed specificity toward chitosugars. For the first time, these data provide insights into chitooligosaccharide uptake by OccD-like chitoporin in chitinolytic bacteria. The third part is involved with the characterization of chitoporin from *V. cholerae* (so called *Vc*ChiP). *Vc*ChiP was shown to be voltage-inducible, being closed at low voltages (i.e. at -25 mV) and more open at high voltages (i.e. -150 mV), and exhibited an average channel conductance of 1.6 ± 0.2 nS. Observed bulk permeation of various chitooligosaccharides through the *Vc*ChiP-reconstituted liposomes together with cell studies confirmed that *Vc*ChiP is a chitooligosaccharide-uptake channel. Cell studies showed that the growth of Omp-deficient *E. coli* cells expressing *chip* gene could be stimulated in the minimum medium supplemented with small chitooligosacharides, while the cells in the absence of *chip* gene could not survive. Overall, the results obtained from this study help to elucidate the role of chitoporin in the chitin utilization pathway of the pathogenic *V.cholerae*.

School of Chemistry Student's signature _____

Academic Year 2016 Advisor's signature _____