

บทคัดย่อ

Burkholderia pseudomallei (Bps) เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบที่ก่อโรคเมลลิออยโดซิสซึ่งเป็นโรคติดเชื้อร้ายแรงในคนและสัตว์ พบอุบัติการณ์ของโรคสูงในแถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โอกาสการรักษาโรคให้ได้ผลสำเร็จทำได้ยากสาเหตุมาจากการดื้อยาปฏิชีวนะเกือบทุกชนิดของเชื้อ Bps ได้มีการศึกษาพบว่า การดื้อยาของเชื้อ Bps อาจเกิดจากการที่เชื้อมีความสามารถในการต้านทานการนำเข้ายาปฏิชีวนะเนื่องจากมีช่องพอรินที่เยื่อเซลล์ด้านนอกที่มีคุณสมบัติในการนำเข้าของสารต่ำ ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ทำการแยกโปรตีนขนาด 38 kDa จากเยื่อเซลล์ด้านนอกของ Bps โดยให้ชื่อโปรตีนนี้ว่า 'BpsOmp38' จากโครงสร้างทำนายและการศึกษาอัตราการนำเข้าโดยวิธี liposome-swelling assay พบว่าโปรตีน BpsOmp38 ประกอบด้วยโครงสร้างแบบ β -barrel ทำหน้าที่เป็นช่องพอรินแบบ 'general-diffusion porin' การศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค planar black lipid membrane (BLM) reconstitution ในการแสดงคุณสมบัติการสร้างช่องเดี่ยวของ BpsOmp38 การวิเคราะห์แบบ high-time resolution BLM measurements แสดงให้เห็นว่าขณะที่โมเลกุลของยาปฏิชีวนะผ่านเข้าสู่ช่อง BpsOmp38 จะเกิดการลดระดับของกระแสการไหลของออสโมนอันเนื่องมาจากการขัดขวางการผ่านของออสโมนเข้าสู่ช่องโปรตีน โดยระดับของการขัดขวางการผ่านของออสโมนขึ้นกับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่ไม่เท่ากัน โดยค่า on-rate (k_{on}) ของการผ่านของยาเป็นไปตามลำดับดังนี้ norfloxacin >> ertapenem > ceftazidime > cefepime > imipenem > meropenem >> penicillin G ส่วน dwell time ของยาปฏิชีวนะที่เลือกนำมาศึกษาต่อคือ ertapenem มีค่าลดลงแบบชี้กำลังเมื่ออุณหภูมิขณะเกิดการส่งผ่านเพิ่มขึ้น การคำนวณจากกราฟ Arrhenius ให้ค่าพลังงานก่อกัมมันต์ของการเข้าจับของ ertapenem ที่ตำแหน่งจับมีค่าเป็น 12 kT ขณะที่ค่าพลังงานของการหลุดออกของยาจากตำแหน่งจับมีค่า 13 kT ที่ membrane potential ในการวัดเป็น +100 mV จากโครงสร้างทำนายพบว่ากรดอะมิโน Tyr-119 ที่อยู่ที่กลางของช่องพอรินน่าจะมีคุณสมบัติในการกำหนดขนาดและชนิดสารที่มีขั้วในการผ่านเข้าสู่ช่อง BpsOmp38 การทดสอบระดับการดื้อยาโดยเทคนิค antibiotic susceptibility assay พบว่า Omp-deficient *E. coli* ที่ผลิตพอรินกลายพันธุ์ BpsOmp38Y119A และ BpsOmp38Y119F มีความไวต่อยา meropenem และ ceftazidime มากกว่า แต่มีความไวต่อยา doripenem น้อยกว่าเชื้อ *E. coli* ที่ผลิตโปรตีน BpsOmp38 ดั้งเดิม การศึกษาเปรียบเทียบโดยเทคนิค liposome swelling assay พบว่าอัตราการแพร่ผ่านของน้ำตาลเข้าสู่ช่อง BpsOmp38 ดั้งเดิมและกลายพันธุ์มีความคล้ายกันคือมีอัตราการลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่อัตราการผ่านของยาปฏิชีวนะไม่ขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลโดยตรง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการผ่านเข้าของยาปฏิชีวนะไม่ขึ้นกับขนาดของโมเลกุลเพียงอย่างเดียว แต่อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของยาและกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบด้านในของช่องพอริน BpsOmp38 ก็มีความสำคัญอย่างมากต่อการผ่านเข้าของยาปฏิชีวนะด้วย

ABSTRACT

Burkholderia pseudomallei (Bps) is a Gram-negative bacterium that causes melioidosis, an infectious disease of animals and humans. This disease has high incidence 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 studied 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, namely “BpsOmp38”, was isolated from the OM of Bps. A topology prediction and liposome-swelling assay suggested that BpsOmp38 comprises a β -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. High-time resolution BLM measurements displayed ion current blockages of each antimicrobial agent 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. Topology prediction suggested that Tyr-119, located in the middle of the pore, may act as a pore-constricting residue that controls the permeability of hydrophilic species through BpsOmp38. Antibiotic susceptibility assay showed that the Omp-deficient *E. coli* expressing BpsOmp38Y119A and Y119F mutants were more susceptible to meropenem and ceftazidime, but less susceptible to doripenem when compared with the susceptibility of *E. coli* expressing BpsOmp38 wild-type. Liposome-swelling assay suggested that the permeability rate of neutral sugars through the BpsOmp38 variants increased as the molecular weight of the sugar decreased. However, the permeation of antibiotics through the BpsOmp38 porins showed modest correlation between the molecular weight and the diffusion rates. The result suggested that not only the pore diameter, but the interactions between the antibiotic and the residues lining the pore interior also play an important role in the molecular uptake through BpsOmp38.