

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5780031
ชื่อโครงการ : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของฮีโมโกลบิน
เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในการรักษาโรค
ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.ชนินทร์ นันทเสนามาตร์
E-mail Address : chanin.nan@mahidol.edu
ระยะเวลาโครงการ : 16 มิถุนายน 2557 – 16 มิถุนายน 2560

การถ่ายเลือด (Blood transfusion) เป็นกระบวนการรับผลิตภัณฑ์ของเลือดเข้าสู่ระบบไหลเวียน เพื่อทดแทนส่วนประกอบของเลือดที่เสียไป แม้ว่าการถ่ายเลือดจะมีประโยชน์อย่างมากทางการแพทย์ แต่มีข้อจำกัด ที่เป็นสิ่งกีดขวางในการรักษา เช่น เลือดของผู้บริจาคไม่เพียงพอต่อความต้องการ มีอายุ การเก็บรักษาที่สั้น ความยุ่งยากและความซับซ้อนในการเลือกเลือด หรือ การเกิดการกระตุ้นของระบบ ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยหลังจากการได้รับเลือด นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในการขนส่ง และสถานที่เก็บเลือด ไม่เพียงพอ จากปัญหาเหล่านี้นำไปสู่การพัฒนาและการสังเคราะห์เลือดเทียม โดยเฉพาะฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งเป็นโปรตีนส่วนประกอบสำคัญในเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปสู่ ส่วนต่างๆ ของร่างกาย แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าฮีโมโกลบินเมื่ออยู่นอกเม็ดเลือดแดงจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย ดังนั้น การศึกษาโครงสร้างและเข้าใจถึงกลไกการทำงานของฮีโมโกลบิน จึงมีความ น่าสนใจ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้การรักษาทางการแพทย์ในปัจจุบัน

โครงการนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อกลไกการทำงานของ และคุณสมบัติของฮีโมโกลบินที่เปลี่ยนแปลงไป ประกอบด้วย การศึกษาความสัมพันธ์ของฮีโมโกลบินและ การออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการจับ-ปล่อยออกซิเจน (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 1**) การศึกษาเกี่ยวกับสารที่สามารถกระตุ้นการเกิดการเปลี่ยนแปลงในโปรตีนสายเบต้าของฮีโมโกลบิน (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 2**) การศึกษาฐานข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของฮีโมโกลบินและความสามารถในการจับ- ปล่อยออกซิเจน (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 3**), การศึกษาสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดเม็ดเลือดแดงรูป เคี้ยว (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 4**) (5) การศึกษาสารสีที่มีคุณสมบัติในการลดปริมาณ methemoglobin ในเม็ด เลือดแดง (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 5**) และ (6) การศึกษาโครงสร้างและกลไกการทำงานของ อัลฟา-1-ไมโคร โกลบูลิน (alpha-1-microglobulin) และการจับกับฮีม (heme) (**ผลงานตีพิมพ์ที่ 6**) โดย **ผลงานตีพิมพ์ ที่ 1-5** เป็นศึกษาความสามารถของสารในระดับควอนตัม โดยใช้ความสัมพันธ์เชิงปริมาณระหว่าง ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและการออกฤทธิ์ของสาร (quantitative structure–activity relationship, QSAR) เพื่อนำมาคัดกรองสารที่มีศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยา **ผลงานตีพิมพ์ที่ 6** เป็นศึกษาการจับ

ของฮีม โดยวิธี tryptophan fluorescence quenching, UV-Vis spectrophotometry, circular dichroism spectrometer, surface plasmon resonance, electrophoretic migration shift, โครมาโตกราฟีแบบกรองผ่านเจล และ วิธีการจำลองแบบระดับโมเลกุล จากผลการทดลองพบว่า ตำแหน่งที่จับกับฮีมอยู่บริเวณ lipocalin และ ลูปที่ 1 และ 4 ของอัลฟา-1-ไมโครโกลบูลิน โดยปฏิกริยามีเกี่ยวข้องกับโซ่ด้านข้างของกรดอะมิโนต่าง ๆ ประกอบด้วย cysteine ตำแหน่งที่ 34 lysine ตำแหน่งที่ 92, 118 และ 130 และ histidine ตำแหน่งที่ 123 ดังนั้น จากการศึกษาในครั้งนี้ คาดว่าสามารถให้ข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับกลไกการทำงานและคุณสมบัติของฮีโมโกลบิน รวมทั้งความสัมพันธ์ของโครงสร้างสารทางเคมีและการทำงานของฮีโมโกลบิน นอกจากนี้ ความรู้ที่ได้จากการศึกษา สามารถนำไปวางแผนเพิ่มเติมเกี่ยวกับการสังเคราะห์สารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีฤทธิ์ หรือเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนและเซลล์เป้าหมายอื่น ๆ ตามที่ได้อธิบายไว้ในการศึกษาคุณสมบัติ และการทำงานของโปรตีนเรืองแสง (ผลงานตีพิมพ์ที่ 7), การศึกษาคุณสมบัติสารยับยั้ง P-glycoprotein (ผลงานตีพิมพ์ที่ 8), และสารยับยั้ง acetylcholinesterase (ผลงานตีพิมพ์ที่ 9), phosphodiesterase (ผลงานตีพิมพ์ที่ 10) ซึ่งความรู้และผลงานวิจัยได้สรุปเป็นบทความนิพนธ์ปริทรรศน์ 3 เรื่อง (ผลงานตีพิมพ์ที่ 11-13) และ หนังสือบทความทางวิชาการ 1 เรื่อง (ผลงานตีพิมพ์ที่ 14)

คำหลัก : ฮีโมโกลบิน, แบบจำลองเชิงโมเลกุล, ชีวสารสนเทศศาสตร์, เคมีสารสนเทศศาสตร์ และ การทำเหมืองข้อมูล

Abstract

Project Code : RSA5780031

Project Title : Exploring the Structure-Function Relationship of Hemoglobins for Therapeutic Applications

Investigator : Associate Professor Dr. Chanin Nantasenamat

E-mail Address : chanin.nan@mahidol.edu

Project Period : 16 June 2014 – 16 June 2017

Blood transfusion is a life-saving medical procedure that provides donor blood to recipients who had loss blood from surgery or traumatic injury. Although immensely beneficial there are some inherent problems with donated blood that had burdened blood banking systems such as limited availability, short shelf-life, practical limitations in blood delivery, inadequate storage facilities, infectious risk and blood group incompatibilities. Such concerns are impeding factors that are limiting people from donating blood or receiving them from transfusion. The development of safe and effective artificial blood may resolve such issues. A common approach to the development of artificial blood is to use hemoglobin and make it work outside the red blood cells. Hemoglobin is in the reduced and non-toxic state when it is in the protective confinement of the red blood cell but becomes toxic and reactive upon intravascular hemolysis. Therefore, it is of great interest to seek out ways to remedy this shortcoming of hemoglobin. Structural studies of hemoglobin can resolve this issue and this is supported by the abundance of available X-ray crystallographic structures of hemoglobin. This study had explored the origins of (i) oxygen affinity modulatory properties allosteric effectors (**Publication 1**), (ii) splice switching activity of hemoglobin β -globin gene modulators (**Publication 2**), (iii) oxygen binding properties of a large set of hemoglobin variants (**Publication 3**), (iv) anti-sickling activity of several series of synthetic compounds (e.g. ethacrynic acid, bezyloxy acid, phenoxy acid, benzoic acid, proline salicylate, and alkanolic acid) (**Publication 4**), (v) methemoglobin reduction potential by electron mediators based on color dyes (**Publication 5**) as well as (vi) structural and biochemical characterization of two heme binding sites on α 1-microglobulin (**Publication 6**). The first five studies employed quantum chemistry and machine learning to correlate structural features of the investigated compounds with their observed experimental biological

properties via quantitative structure-activity relationship (QSAR) modeling. Molecular insights on the origins of these biological properties can be deduced from the obtained set of informative molecular descriptors that had been shown in all cases to be pertinent in differentiating potent compounds from their non-potent counterpart. In the sixth study, heme binding was investigated by tryptophan fluorescence quenching, UV-Vis spectrophotometry, circular dichroism, SPR, electrophoretic migration shift, gel filtration, catalase-like activity and molecular simulation. The results suggest that one heme-binding site is located in the lipocalin pocket and a second binding site between loops 1 and 4. Reactions with the hemes involve the side-groups of C34, K(92, 118, 130) and H123. It is expected that the knowledge gained from this study would help provide key mechanistic insights into the structure-function relationship of hemoglobin that is pertinent for its multi-faceted therapeutic applications. To the best of our knowledge, this research project explored for the first time the origins of several functional properties of hemoglobin that had for the most part been unexplored in spite of the abundant big data that had accumulated over the past decades. Looking ahead, it can be envisioned that the computational framework proposed in this project holds great utility for further exploration on the structure-function relationship of other functional properties of hemoglobin that have not yet been investigated herein. We are also planning on further exploring the experimental validation of computationally designed small molecule modulators against their respective target proteins and cells. Moreover, this computational framework had also been extended to other biological properties as demonstrated herein on studying and predicting functional properties of fluorescent proteins (**Publication 7**) as well as modulatory properties of P-glycoprotein inhibitors (**Publication 8**), acetylcholinesterase inhibitors (**Publication 9**) and phosphodiesterase (**Publication 10**). The accumulated best practice and knowledge had also been summarized in the form of 3 invited editorial/review articles (**Publications 11-13**) and 1 invited book chapter (**Publication 14**).

Keywords : hemoglobin; molecular modeling; bioinformatics; cheminformatics; data mining