CHEMICAL INDUCTION OF FETAL HEMOGLOBIN PRODUCTION : POTENTIAL TREATMENT FOR β-THALASSEMIA

PREEYACHAN LOURTHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

CHEMICAL INDUCTION OF FETAL HEMOGLOBIN PRODUCTION : POTENTIAL TREATMENT FOR β-THALASSEMIA

PREEYACHAN LOURTHAI 4637298 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D., SUTHAT FUCHAROEN, M.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SUPAN FUCHAROEN, Ph.D.

ABSTRACT

Augmentation of fetal hemoglobin (HbF) synthesis can reduce the severity of β-thalassemia and β-globin chain hemoglobinopathies by improving the imbalance between α- and non-α-globin chains. This is supported by observations that β-thalassemia patients with Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) are transfusion independent. A number of pharmacological agents have also been found to induce HbF through various mechanisms. However, all known HbF inducers have a low efficacy and specificity and may result in long-term toxicity.

Reporter assays in human erythroleukemia K562 cell line and transgenic mice based on a bacterial artificial chromosome (EBAC) containing the human β-globin locus with an enhanced green fluorescence protein (EGFP) reporter cassette in-frame replacement at the $^{G}\gamma$- to $^{A}\gamma$- globin genes (pEBAC/148β:: $\Delta^{G}\gamma^{A}\gamma$ EGFP) were developed. An episomal reporter assay for the screening of agents that specifically mimic the effect of the HPFH mutation on HbF expression was created by the introduction of the -175(T→C) HPFH mutation into the construct. This assay was also used to compare the level of EGFP expression from this construct with the parent construct. HPFH mutation gave approximately a 2-fold increase of EGFP expression compared to that of the wild type.

K562 cell lines carrying stably integrated γ-globin reporter assay construct was used in high throughput screening of a 2132 chemical library. Corresponding pharmacological increases in γ-globin mRNA expression and HbF were confirmed in reporter assay, native K562 cell line and human primary erythroid progenitor cells. Fourteen out of 29 compounds were validated using both cell lines. Two nucleoside analogs showed increased ratios of HbF by 20% in primary erythroid culture derived from β-thalassemia/HbE patients.

In transgenic mice carrying the γ-globin reporter assay transgene, EGFP expression decreased during mouse γ- to β- globin switching, but persisted throughout the adult stage. Murine erythroid culture derived from fetal livers showed a response to induction by HbF-inducing compounds.

The cellular and transgenic reporter assays will greatly facilitate the identification and evaluation of HbF-inducing agents. This screening has successfully identified active compounds for further mechanistic and preclinical evaluation as potential therapeutic agents for β-thalassemia treatment.

Copyright by Mahidol University

KEY WORDS: β-THALASSEMIA / HEMOGLOBIN F / HPFH / DRUG DISCOVERY / TRANSGENIC MICE

230 pages

การกระตุ้นการสร้างฮีโมโกลบินเอฟด้วยสารเคมีเพื่อการรักษาเบต้าธาลัสซีเมีย
(CHEMICAL INDUCTION OF FETAL HEMOGLOBIN PRODUCTION : POTENTIAL TREATMENT FOR β-THALASSEMIA)

ปรียจรรย์ เหล่าไทย 4637298 SCBC/D

ปร.ด. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ม.ร.ว. ชินณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D., สุทัศน์ ฟู่เจริญ, พ.บ., ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D., สุพรรณ ฟู่เจริญ, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคเบต้า-ธาลัสซีเมียเป็นโรคที่เกิดจากการสร้างเบต้าโกลบินที่น้อยลงหรือสร้างไม่ได้เลย ซึ่งทำลายความสมดุลระหว่างสายแอลฟา สายเบต้าโกลบิน การลดภาวะไม่สมดุลโดยการกระตุ้นการแสดง ออกของยีนแกมม่าโกลบินทำให้มีการสร้างฮีโมโกลบินเอฟเพิ่มขึ้นจะสามารถบรรเทาอาการของโรคได้ ในธรรมชาติผู้ป่วยซึ่งมียีนเบต้า-ธาลัสซีเมียร่วมกับเอ๊ชพีเอฟเอ๊ชซึ่งเป็นสภาวะทางพันธุกรรมที่พบปริมาณฮีโมโกลบินเอฟในเลือดสูงในผู้ใหญ่นั้นจะมีระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่าผู้ป่วยโฮโมซัยกัสเบต้า-ธาลัสซีเมียที่มียีนเบต้า-ธาลัสซีเมียอย่างเดียว สารกระตุ้นฮีโมโกลบินเอฟที่พบจากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่มีประสิทธิ ภาพ ความจำเพาะต่ำ และยังมีความเป็นพิษสูง จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาได้

งานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างแบบจำลองเพื่อวิเคราะห์การกระตุ้นการสร้างแกมม่าโกลบินโดยใช้ชิ้นส่วนของกลุ่มยีนเบต้าโกลบินของมนุษย์ทั้งชนิดปกติและที่มีการกลายพันธุ์ตำแหน่ง -175 ของแกมม่ายีนเป็นเอ๊ชพีเอฟเอ๊ช มีการแทนที่เนื้อยีนแกมม่าโกลบินด้วยยีนสร้างโปรตีนเรืองแสง (EGFP) ทั้งในเซลล์ K562 และหนูทรานส์จีนิค พบว่าเซลล์ที่มียีนเอ๊ชพีเอฟเอ๊ชเรืองแสงมากกว่าเซลล์ปกติ 2 เท่า และเซลล์แบบจำลองดังกล่าวถูกนำมาใช้เพื่อคัดกรองสารกระตุ้นฮีโมโกลบินเอฟจากสารทั้งหมด 2,132 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยยาและสารสกัดจากธรรมชาติ สาร 14 ตัวอย่างจาก 29 ตัวอย่างที่ได้ผ่านการคัดกรองขั้นต้นถูกนำมาทดสอบการกระตุ้นการสร้างเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) ของแกมม่าโกลบินในเซลล์ K562 และการสร้างฮีโมโกลบินเอฟในเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนจากผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี พบว่าสารต้านไวรัส 2 ชนิดในกลุ่ม nucleoside analog สามารถเพิ่มการแสดงออกของฮีโมโกลบินเอฟได้ถึงประมาณร้อยละ 20

สำหรับหนูทรานสจีนิกที่เกิดจากการสอดใส่ชิ้นยีนกลุ่มเบต้าโกลบินที่มี EGFP ได้มีการสร้างโปรตีนเรืองแสงในเม็ดเลือดแดงแตกต่างกันในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต และพบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อนของหนูมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นฮีโมโกลบินเอฟจากดังกล่าวด้วย

การศึกษานี้ได้พัฒนาแบบจำลองในเซลล์ และหนูทรานส์จีนิคสำหรับการตรวจหาสารกระตุ้นฮีโมโกลบินเอฟ ซึ่งนำไปสู่การค้นพบสาร 2 ชนิดที่มีแนวโน้มในการใช้เพื่อการรักษาโรคเบต้า-ธาลัสซีเมียในอนาคต

230 หน้า

Copyright by Mahidol University