

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกใน
สาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานการวิจัย

กระบวนการทางชีวสารสนเทศเชิงโครงสร้างสำหรับการพัฒนายา:
ความเข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ/โรคไข้หวัดใหญ่
Structural bioinformatic approaches for drug development:
understanding molecular basis of emerging diseases/influenza A virus

โดย

ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ สมพรพิสุทธิ์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. ธัญญดา รุ่งโรจน์มงคล	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. ปทุมวดี อินทรเทพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ดร. ณีฎฐาเนตร นันทบุตร	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

กันยายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยของโครงการวิจัยนี้ขอขอบคุณ อาจารย์ นักวิจัยและลูกศิษย์ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ รวมทั้งภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ทำให้งานวิจัยดำเนินไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย กระบวนการทางชีวสารสนเทศเชิงโครงสร้างสำหรับการพัฒนา: ความเข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ/โรคไข้หวัดใหญ่

ชื่อผู้วิจัย สุพจน์ หารหนองบัว พรเทพ สมพรพิสุทธิ์ ธัญญดา รุ่งโรจน์มงคล ปทุมวดี อินทรเทพ ณิชฎาเนตร นันทบุตร

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยใช้กระบวนการทางเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อออกแบบและจำลองสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของโมเลกุลของโปรตีนจากไวรัสโรคไข้หวัดใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ฮีแมกกลูตินิน นิวรามินิเดส และ M2 แชนแนล การศึกษาโปรตีนฮีแมกกลูตินินเพื่ออธิบายในเรื่องการยึดจับระหว่างไกลโคโปรตีนของเชื้อไวรัสและตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ที่พบในเซลล์ของมนุษย์ การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของโปรตีนฮีแมกกลูตินินจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ H1-1918, H1-1930, H1-2005, และ H1-2009 ซึ่งยึดเกาะกับตัวรับในมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่าตัวรับมีอันตรกิริยาที่สำคัญกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเฉพาะที่กรดอะมิโนตำแหน่ง Y95 บริเวณลูป-130 เกลียว-190 และ ลูป-220 กรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับกับตัวรับ ได้แก่ V135 T136 A137 K222 และ Q226 อันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกับที่พบในฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H1 ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ แต่ค่อนข้างแตกต่างจากจากฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H3 H5 และ H9 การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลเพื่อการศึกษาอิทธิพลอัลโลสแตอริกซ์จากการยับยั้งการส่งผ่านโปรตอนในช่องโปรตีน M2 ด้วยยาปริมาณต่ำที่สภาวะปิด, อินเตอร์มีเดียต และสภาวะเปิด โมเลกุลของปริมาณต่ำที่สภาวะเปิดในตำแหน่งด้านนอกช่อง M2 และอยู่ระหว่างซับยูนิตและอยู่ใกล้บริเวณ W41 ในสภาวะปิดพบว่าช่อง M2 มีการสร้างโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนของยากับ D44-W41 เป็นผลให้ประจุของ W41 ปิดและทำให้ช่อง M2 ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ โครงข่ายพันธะไฮโดรเจนไม่พบที่สภาวะอินเตอร์มีเดียต ส่วนในสภาวะเปิด พบว่าแรงผลักของประจุบวกของ H37 ทำให้เกิดการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของ W41 เป็นลักษณะเปิด และทำให้น้ำสามารถผ่านเข้ามาภายในช่อง M2 ได้ ในการศึกษาโปรตีนนิวรามินิเดสชนิด wild-type และ mutants ที่ตำแหน่งต่าง ๆ สำหรับสายพันธุ์ H1N1-2009 กับการยึดจับกับยาทานิฟลู โดยวิธีการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล พบว่าอันตรกิริยาระหว่างประจุและพันธะไฮโดรเจนระหว่างยาและนิวรามินิเดสชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E119V และ R292K ลดลงอย่างมาก จึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการดื้อยา การทำนายแนวโน้มของประสิทธิภาพของยาตามความสามารถในการยึดจับได้เป็นลำดับดังนี้ wild-type > N294S > H274Y > E119V > R292K

คำสำคัญ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ฮีแมกกลูตินิน นิวรามินิเดส M2 แชนแนล การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title	Structural bioinformatic approaches for drug development: understanding molecular basis of emerging diseases/influenza A virus
Investigators...	Supot Hannongbua, Pornthep Sompompisut, Thanyada Rungrotmongkol, Pathumwadee Intharathep
Year	September 2011

Abstracts

This research employed computational chemistry methods to model and simulate structural and dynamical properties of three influenza viral proteins that are hemagglutinin, neuraminidase and M2 channel. The study of hemagglutinin was carried out to describe the binding between the viral glycoprotein and α -2,6 human receptor. Molecular dynamics (MD) simulations of four hemagglutinin subtypes including H1-1918, H1-1930, H1-2005, และ H1-2009 in complex with the human receptor were performed. The MD results revealed significant interactions between the receptor and hemagglutinin of all the four subtypes, especially with residues at position Y95, the 130-loop and the 220-loop of the protein. Residues which are crucial for the receptor binding include V135, T136, A137, K222 and Q226. The interactions between the receptor and hemagglutinin were similar to all H1 subtypes but substantially different from H3, H5 and H9. MD simulations for studying an allosteric effect due to the inhibition of proton transport in M2 channel by rimantadine were carried out at the closed, intermediate and open states. Rimantadine were placed outside the M2 pore, and between transmembrane subunits and near W41. In the closed state, a hydrogen bond network between the drug and D44-W41 was found, giving rise to the closed gate of W41, and thus the proton transport was completely inhibited. The network of hydrogen bond was not detected in the intermediate. In the open state, the electrostatic repulsion of the positive charge H37 results in conformational changes of W41. As a result, water molecules were able to penetrate the channel pore. In the study of neuraminidase subtype H1N1-2009, MD simulations of the wild-type and mutants complexed with tamiflu were performed. The results revealed electrostatic interactions and hydrogen bonding between the drug and the E119V and R292K significantly decreased with respect to the wild-type. This finding is expected to be associated with the drug resistance. The drug susceptibility ranging from the greatest to the lowest was predicted according to the following trend: wild-type > N294S > H274Y > E119V > R292K.

Keywords: Influenza virus, Hemagglutinin, Neuraminidase, M2 channel, MD simulation

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 มุมเหตุจูงใจ และที่มา	1
1.2 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่	2
1.3 โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัส	2
1.4 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา	5
1.5 วัตถุประสงค์	10
1.6 วัสดุและอุปกรณ์	10
บทที่ 2 เนื้อหาและผลการวิจัย	12
2.1 ผลงานวิจัยเรื่อง "Evaluating how rimantadines control the proton gating of the influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations." <i>J Enzyme Inhib Med Chem.</i> ; 26,162-8.	12
2.2 ผลงานวิจัยเรื่อง "Evolution of human receptor binding affinity of H1N1 hemagglutinins from 1918 to 2009 pandemic influenza A virus." <i>J Chem Inf Model.</i> , 2010, 50, 1410-7. (IF=3.882)	21
2.3 ผลงานวิจัยเรื่อง "Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin" <i>Monatshefte Fur Chemie</i> , 2010, 141, 801-807. (IF=1.312)	29
2.4 ผลงานวิจัยเรื่อง "Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach." <i>Amino Acids.</i> , 2010, 39, 393-8. (IF=3.877)	33
2.5 ผลงานวิจัยเรื่อง "Proton transport through the influenza A M2 channel: three-dimensional reference interaction site model study." <i>J Am Chem Soc.</i> , 2010, 132, 9782-8. (IF=8.588)	40
บทที่ 3 การอภิปรายผล	44
บทที่ 4 สรุปการวิจัย	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาพผนวก	48

สารบัญตาราง

	หน้า	
ตารางที่ 2.1.1	เปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนในสถานะ 0H, 1H และ 3H ของ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ ระหว่าง i) RMT และ โปรตีน M2 ii) เรสิดิว Asp44 และ Trp41	15
ตารางที่ 2.2.1	แสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนในบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์	23
ตารางที่ 2.4.1	ค่า binding free energy ระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์นิวรามิनिเดสสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทำนายได้จากวิธี linear energy interaction (LIE) เปรียบเทียบกับค่าพลังงานที่เปลี่ยนมาจากค่า IC_{50} และ K_i ที่ได้จากการทดลอง	38

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 1.1	ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่พบในคนกับช่วงการแพร่ระบาด	2
รูปที่ 1.2	โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัส	3
รูปที่ 1.3	บทบาทของฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส	4
รูปที่ 1.4	โครงสร้างสามมิติของ HA (a) โมโนเมอร์ และ (b) ไตรเมอร์	6
รูปที่ 1.5	โครงสร้างของ SA α 2,3Gal (A), SA α 2,6Gal (B),	6
รูปที่ 1.6	กรดอะมิโนที่จำเพาะและ conserved ซึ่งอยู่บริเวณยึดจับที่สำคัญของ HA	7
รูปที่ 1.7	sequence alignment ของ M2 (A), แบบจำลองโครงสร้าง M2 ในเมมเบรน (B) และ โครงสร้างของยา Amantadine และ Rimantadine (C)	8
รูปที่ 1.8	โครงสร้างของ sialic acid, zanamivir และ oseltamivir , โครงสร้าง x-ray และที่บริเวณ binding site ของ NA (A), sequence alignment ของ NA (B)	9
รูปที่ 2.1.1	โครงสร้างเริ่มต้นของ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ในวอเตอร์-ลิปิดไบเลเยร์	13
รูปที่ 2.1.2	รูทมีนแอสควร์ดิสเพลสเม้นท์ (Root mean square displacement, RMSD) ของ M2- 4RMTs คอมเพล็กซ์ที่สภาวะ OH, 1H และ 3H	14
รูปที่ 2.1.3	การกระจายของระยะทาง d1-d4 (ตามที่กำหนดในรูปที่ 2.1.1) ของระบบ OH, 1H และ 3H ที่สับยูนิต I-IV ของช่อง M2	16
รูปที่ 2.1.4	ความหนาแน่นของน้ำและตำแหน่งของ His37 (พื้นที่สี่เหลี่ยม) และ Trp41 (พื้นที่สี่เหลี่ยม อ่อน) ในระบบ M2 อิสระ และ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ ที่สภาวะ OH, 1H และ 3H	17
รูปที่ 2.1.5	มุมทอร์ชัน CA - CB - CG - CD2 ของประติ Trp41 ของสับยูนิต I-IV ในระบบ M2- 4RMTs คอมเพล็กซ์ที่สภาวะ OH, 1H และ 3H	18
รูปที่ 2.1.6	โพเทนเชียลออฟมีนฟอร์ซ (potential of means force, PMF) ของการเคลื่อนที่ของ โปรตอนผ่านช่อง M2 ที่สภาวะ OH, 1H และ 3H ในระบบ M2 อิสระ, M2-RMTin และ M2-RMTout	19
รูปที่ 2.2.1	พื้นผิวความมีขั้ว-ไม่มีขั้วในบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินทั้ง 4 สายพันธุ์	22
รูปที่ 2.2.2	การกำหนดมุม torsion	24
รูปที่ 2.2.3	กราฟแสดงลักษณะการกระจายของมุม torsion ทั้ง 9 ของตัวรับมนุษย์ในไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์	25
รูปที่ 2.2.4	แสดงเปอร์เซ็นต์และจำนวนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างตัวรับและโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ของไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์	26
รูปที่ 2.2.5	แสดงพื้นผิวศักย์ไฟฟ้าของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 222, 225 และ 227 ของโปรตีนฮี แมกกลูตินินและตัวรับ	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 2.3.1	แสดงการทำ sequence alignment ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และไข้หวัดใหญ่หมู	30
รูปที่ 2.3.2	แสดงบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และตัวรับแอลฟา 2,6	30
รูปที่ 2.3.3	แสดงกราฟความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่จะพบ torsion ของตัวรับแอลฟา 2,6	31
รูปที่ 2.3.4	บน แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนและตัวรับ ส่วน แสดง amino acid decomposition energy	31
รูปที่ 2.4.1	การจับของยาทามิฟลูที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ NA และตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ศึกษา (สีแดง)	33
รูปที่ 2.4.2	โครงสร้างจำลองการจับแบบจำเพาะระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์ N1 ของเชื้อไข้หวัดที่ใช้น้ำการคำนวณเชิงโมเลกุลวิธีไดนามิกซิมูเลชัน	35
รูปที่ 2.4.3	พันธะไฮโดรเจนที่สร้างขึ้นระหว่างยาทามิฟลูและกรดอะมิโนในบริเวณกระตุ้นของเอนไซม์นิวรามินิเดสในสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไข้หวัดใหญ่ H1N1-2009	37
รูปที่ 2.5.1	โครงสร้างโปรตีน M2 ของไวรัสไข้หวัดนกที่ฝังอยู่ในเมมเบรน	40
รูปที่ 2.5.2	การแพร่ของน้ำ (สีฟ้า) และไอออนไฮโดรเนียม (สีแดง) ผ่านโปรตีน M2	41
รูปที่ 2.5.3	พลังงาน PMF (kJ/mol) ของการแพร่ของน้ำ (ซ้าย) และไอออนไฮโดรเนียม (ขวา) ผ่านโปรตีน M2 ในแนวที่สภาวะต่าง ๆ	42
รูปที่ 2.5.4	สมมติฐานกลไกการส่งผ่านโปรตอนที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี 3D-RISM	43

รายการสัญลักษณ์

คำย่อ และสัญลักษณ์

HA	Hemagglutinin ฮีแมกกลูตินิน
H1, H3, H5	Hemagglutinin subtype 1, 3, 5 ตามลำดับ
NA	Neuraminidase นิวรามินิเดส
M2	Matrix Protein 2
SA α 2,6Gal	sialic acid- α 2,6-galactose receptor
SA α 2,3Gal	sialic acid- α 2,3-galactose receptor
MD	Molecular Dynamic
AMD	Amantadine
RMD, RMT	Rimantadine
MMPB/SA	Molecular Mechanic Possion-Boltzmann/Solvent Accessible Surface Area
RMSD	Root mean square displacement
OH	Non-protonated state of M2
1H, 2H, 3H, 4H	Mono-, di-, tri-, tetraprotonated states of M2 ตามลำดับ
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PMF	Potential of mean force
ns	nanosecond
LIE	Linear interaction energy

บทที่ 1

บทนำ

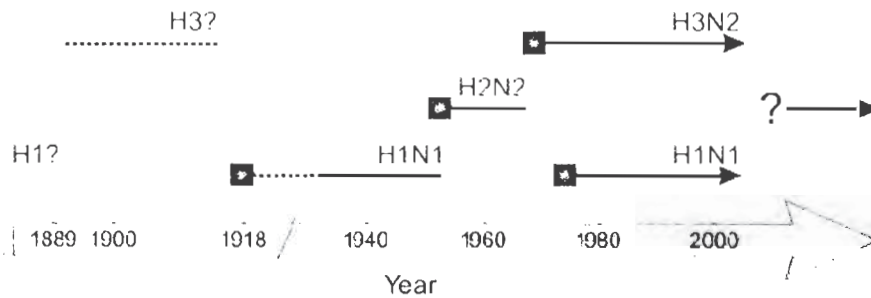
1.1 มูลเหตุจูงใจ และที่มา

ประมาณเดือนเมษายน ค.ศ. 2009 มีรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสโรคไขหวัดใหญ่ (influenza A virus) สายพันธุ์ใหม่ 2009 (H1N1) ที่ประเทศเม็กซิโก ซึ่งหลังจากนั้น ไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวแพร่ระบาดในทวีปอเมริกา ยุโรป เอเชีย และลุกลามไปในหลายประเทศทั่วโลก มีรายงานผู้ติดเชื้อเป็นจำนวนมาก แม้ว่าการรักษาโรคด้วยยาทามิฟลู (tamiflu) หรือโอเซลทามิเวียร์ (oseltamivir) ยังใช้ได้ผล แต่ผู้ติดเชื้อส่วนหนึ่งเสียชีวิตลง แม้ว่าจำนวนผู้เสียชีวิตจะน้อยกว่าการระบาดของไวรัสสายพันธุ์ 1918 หรือ Spanish flu H1N1 (ผู้เสียชีวิตกว่า 50 ล้านคน) หรือ 1956-1958 Asian flu H2N2 (ผู้เสียชีวิตประมาณ 1-4 ล้านคน) หรือ 1968-1969 Hong Kong flu H3N2 (ผู้เสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคน) (รูปที่ 1.1) แต่ดูเหมือนว่าเปอร์เซ็นต์ผู้เสียชีวิตเนื่องจากติดเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่นี้จะมีมากกว่าไขหวัดใหญ่ตามฤดูกาล หรือ seasonal flu จึงเป็นไปได้ว่าร่างกายยังไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ 2009 ดังนั้น ผู้ป่วยจำนวนไม่น้อยมีอัตราเสี่ยงที่จะเสียชีวิตมากกว่าไขหวัดใหญ่ตามฤดูกาล อีกทั้งเริ่มมีรายงานการกลายพันธุ์ของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่ทำให้ดีอียาทามิฟลู นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่อันตรายมาก ดังนั้นหน่วยงานสาธารณสุขจากที่ต่างๆ ในหลายประเทศทั่วโลก รวมทั้ง องค์การอนามัยโลก ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค หรือ CDC ของสหรัฐอเมริกา หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องในหลายประเทศจึงมีระบบและมาตรการเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ทั้งในคนและสัตว์อย่างต่อเนื่อง

ประเทศไทยได้รับผลกระทบที่เกิดจากการแพร่ระบาดของโรคไขหวัดใหญ่ โดยเฉพาะการแพร่ระบาดของไขหวัดนกในปี ค.ศ. 2004 และไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ปี ค.ศ. 2009 ซึ่งนอกจากก่อให้เกิดการสูญเสียชีวิตคนแล้ว ยังสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ สังคมและการพัฒนาประเทศอย่างมาก

การเตรียมความพร้อมเพื่อการป้องกัน การรักษา และการควบคุมการแพร่ระบาดจำเป็นต้องทำ ความรู้จักและเข้าใจอย่างดีเกี่ยวกับเชื้อโรค ซึ่งหมายถึง วงจรชีวิต พฤติกรรม โครงสร้างและ องค์ประกอบในระดับโมเลกุล รวมทั้งกลไกการทำงานในส่วนต่างๆ ความรู้ความเข้าใจเหล่านี้จะได้จาก การศึกษาวิจัยซึ่งภาครัฐต้องให้การสนับสนุน การศึกษาเพื่อให้รู้และเข้าใจในด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐาน ในระดับโมเลกุลที่เกี่ยวกับโรคจึงเป็นเรื่องหนึ่งที่สำคัญในการสร้างองค์ความรู้เพื่อช่วยในกระบวนการหา วิธีการควบคุมและแก้ไขปัญหา

Influenza A virus subtypes in the human population



รูปที่ 1.1 ไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ที่พบในคนกับช่วงการแพร่ระบาด

1.2 เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่หรือไวรัสอินฟลูเอนซา (Influenza Virus) เป็นโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ สามารถแบ่งออกได้เป็น ชนิด A, B, และ C ไวรัสชนิด A เป็นไวรัสที่พบได้ในสัตว์ปีก โดยเฉพาะพวกนกป่า หรือ wild aquatic bird และพบในมนุษย์ สำหรับมนุษย์ ไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิด A เป็นสายพันธุ์ที่อันตรายมากที่สุด เมื่อเทียบกับชนิด B และ C ซึ่งน่าเชื่อได้ว่าเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดการระบาดไปทั่วโลกในปี 1918, 1957 และ 1968

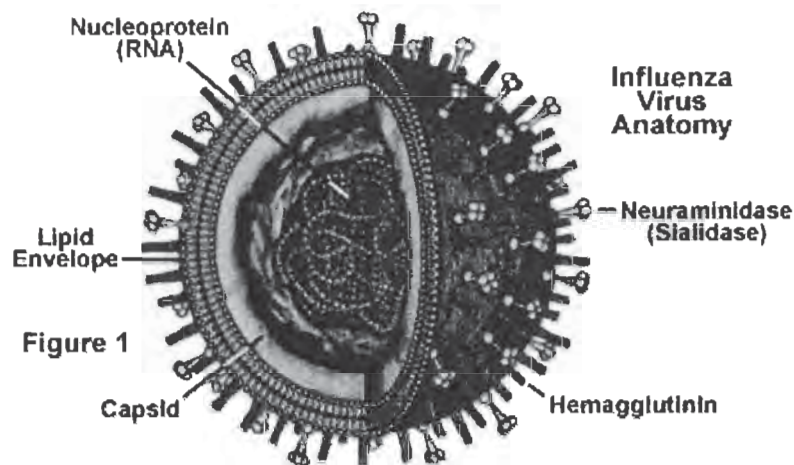
ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด B พบส่วนใหญ่ในมนุษย์ แต่ไม่กว้างขวางเท่าไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A นอกจากนี้พบเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด B ในเมื่อน้ำและสัตว์จำพวกพังพอน

ไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด ชนิด C พบได้ในมนุษย์ สุนัขและสุนัข ไวรัสชนิด A สายพันธุ์หรือ subtype ของไวรัสอินฟลูเอนซาชนิด A สามารถแบ่งตามชนิดของไกลโคโปรตีนหรือ แอนติเจน 2 ชนิดที่ฝังอยู่บนผิวเมมเบรนหรือเปลือกของไวรัส คือ ฮีแมกกลูตินิน (Hemagglutinin, HA) และนิวรามินิเดส (Nueraminidase, NA) ในปัจจุบันนี้มี HA ถูกค้นพบ 16 subtype และ NA อีก 9 subtype ฮีแมกกลูตินินเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ยึดจับไวรัสให้ติดกับเซลล์พาหะ (Host cell) ส่วนนิวรามินิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดไกลโคโปรตีนบริเวณยึดจับ (receptor site) บนผิวเซลล์ทำให้ไวรัสที่เกิดใหม่เป็นอิสระจากเซลล์

1.3 โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัส

ไวรัสไข้หวัดใหญ่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 ถึง 120 นาโนเมตร ภายในเซลล์ไวรัสห่อหุ้มสารพันธุกรรมหรืออาร์เอ็นเอ (RNA) โดยทั่วไป ไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นไวรัสชนิดลบในทางรหัสอาร์เอ็นเอ ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 8 ชิ้น ซึ่งถอดรหัสสร้างโปรตีนทั้งหมด 10-11 ชนิด คือ HA (hemagglutinin), NA(neuraminidase), M1 และ M2 (Matrix protein 1 และ 2) NS1 และ NEP (non-structural protein), NP (nucleoprotein) PA, PB1, PB1-F2, และ PB2 (RNA polymerase) โปรตีนแต่ละชนิดมีหน้าที่เฉพาะที่แตกต่างกันและบทบาทในกระบวนการ replication ของไวรัส การจำแนกสายพันธุ์ (subtype) ของไวรัสไข้หวัดใหญ่อาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequence) ของ HA และ NA โดย HA ที่พบในปัจจุบันมี 16 ชนิด คือ H1 ถึง H16 และ NA ที่พบมี 9 ชนิด คือ N1 ถึง N9 (รูปที่

1.2) ความรู้ความเข้าใจหน้าที่และการทำงานของโปรตีนต่างๆ เหล่านี้จะนำไปสู่กระบวนการค้นหาหรือวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับการต่อสู้กับเชื้อไวรัส



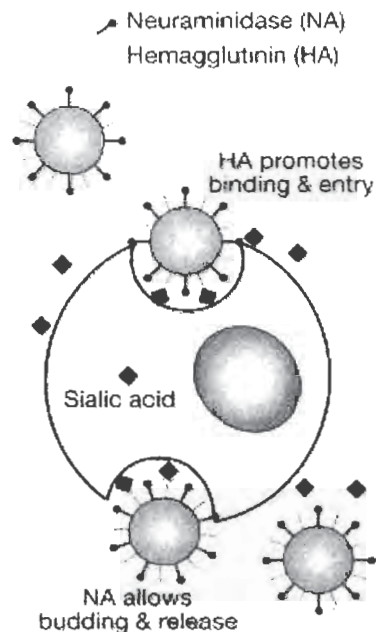
รูปที่ 1.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัส

(ที่มา <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>)

1.3.1 Hemagglutinin

เป็นไกลโคโปรตีนที่อยู่บริเวณเปลือกผิวชั้นนอกของไวรัสโดยมีบางส่วนฝังในชั้นเมมเบรน Hemagglutinin ทำหน้าที่ในการจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ ทำให้ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ receptor site นี้ พบได้ในเมือกที่ปกคลุมทางเดินหายใจ และพบบนผิวของเม็ดเลือดแดง ฮีแมกกลูตินินมีสมบัติในการทำให้เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่มีหมู่เลือดโอ และสัตว์บางชนิด เช่น ไก่ และหนูตะเภา เกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination) คุณสมบัตินี้นำมาใช้ตรวจหาไวรัสได้ แอนติบอดีต่อฮีแมกกลูตินินจัดเป็น neutralizing antibody subtype ที่พบมีทั้งหมด 16 ชนิด ใช้ลำดับกรดอะมิโนเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์ ฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ type A พบได้ทั่วไปในสัตว์ปีกจำพวกนก แต่เชื้อไวรัสที่พบในมนุษย์ในปัจจุบันมีอยู่ 3 subtypes คือ H1, H2, และ H3 ส่วน subtypes อื่นๆ มีการติดเชื้อในสัตว์ต่างๆ กัน เช่น สุกร ม้า แมวน้ำ และปลาวาฬ เชื้อไข้หวัด ใหญ่ types B และ C ยังไม่มีการแบ่งฮีแมกกลูตินินออกเป็น subtype

ในกระบวนการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสหรือการติดเชื้อไวรัส HA ถือว่าเป็นกุญแจแรกที่ไวรัสใช้สำหรับผ่านด่านประตูของ host cell ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการ replication เพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส การทำงานของ HA มีสองขั้นที่สำคัญ คือ ขั้นตอนการเข้าจับกับ host cell (รูปที่ 1.3) และขั้นตอนการรวมตัวกับ host cell ในขั้นแรก HA มีบทบาทในการเข้าจับกับตัวรับ (receptor) ของ host cell ซึ่งเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่มีหมู่ sialic acid เป็นส่วนหลัก และเมื่อเข้าจับแล้ว จะมีเอนไซม์มากกระตุ้นให้ HA ทำงานในขั้นที่สอง คือการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างเยื่อหุ้มของไวรัสกับเซลล์เมมเบรนของ host ขั้นตอนนี้เรียกว่า membrane fusion ซึ่งเป็นหนึ่งใน กระบวนการ endocytosis



รูปที่ 1.3 บทบาทของฮีแมกกลูตินินและนิวรามินิเดส -

1.3.2 Neuraminidase

Neuraminidase เป็น receptor destroying enzyme (RDE) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการปลดปล่อยไวรัสที่กำเนิดใหม่ออกจากเซลล์ (รูปที่ 1.3) NA เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไกลโคโปรตีนเป็น receptor site บนผิวเซลล์ โดยการตัดหมู่ sialic acid ซึ่งเชื่อมระหว่าง host cell กับอนุภาคไวรัสที่กำเนิดใหม่ subtype ทำให้ไวรัสหลุดเป็นอิสระจากเซลล์เนื่องจากโมเลกุลของ ไกลโคโปรตีนนี้พบได้ในเมือกที่ปกคลุมทางเดินหายใจด้วย subtype ที่พบมีทั้งหมด 9 ชนิด ใช้ลำดับกรดอะมิโนเป็นเกณฑ์ในการจำแนกสายพันธุ์เช่นเดียวกับ HA NA เป็นเป้าหมายของยาต้านเชื้อไวรัสได้แก่ โอเซลทามิเวียร์ (Oseltamivir) และซานามิเวียร์ (Zanamivir) โดยโอเซลทามิเวียร์เป็นยาที่นิยมใช้เพราะสามารถรับประทานได้โดยตรงโดย โอเซลทามิเวียร์มีชื่อทางการค้าว่าทามิฟลู (Tamiflu) ส่วนซานามิเวียร์มีชื่อทางการค้าว่า Relenza ซึ่งมีลักษณะเป็นยาฉีดพ่น จึงเป็นยาที่ใช้ยากกว่า โอเซลทามิเวียร์ ไม่เหมาะกับผู้ป่วยที่มีอาการหอบหืด และถุงลมโป่งพองหรือผู้ป่วยที่เป็นโรคทางเดินหายใจ

1.3.3 M2

Matrix Protein 2 หรือ M2 เป็นเมมเบรนโปรตีนโปรตอนแชนแนล (Proton channel) ที่มีบทบาทในกระบวนการลอกเยื่อหุ้มเมมเบรน (membrane uncoating process) ของไวรัส การลอกเยื่อหุ้มไวรัสเนื่องจากความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นภายในอนุภาคของไวรัส ซึ่งเกิดจากการทำงานของ M2 โดยการลำเลียงโปรตอน (H^+ หรือ H_3O^+) ผ่านแชนแนล เข้าสู่เซลล์ไวรัส เมื่อเยื่อหุ้มเมมเบรนถูกลอกออก

สารพันธุกรรมต่างๆ จึงหลุดออกจากอนุภาคไวรัสปะปนอยู่ในไซโทพลาสซึม ซึ่งเป็นสภาพก่อนที่สารพันธุกรรมเหล่านี้จะเข้าสู่กระบวนการ RNA transcription ต่อไป

1.4 ทฤษฎีและงานวิจัยที่ผ่านมา

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 (09H1N1) จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ (Influenza A virus) ซึ่งมีสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอจำนวน 8 ชิ้นที่สามารถแสดงออกเป็นโปรตีนได้ 10-11 ชนิด ดังที่ได้กล่าวในข้างต้น งานวิจัยในกลุ่มที่กำลังดำเนินการอยู่ในขณะนี้มุ่งเป้าโปรตีนจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จำนวน 3 ชนิด คือ hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) และ M2 ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการทำงานของโปรตีนทั้งสามสรุปโดยสังเขปดังนี้

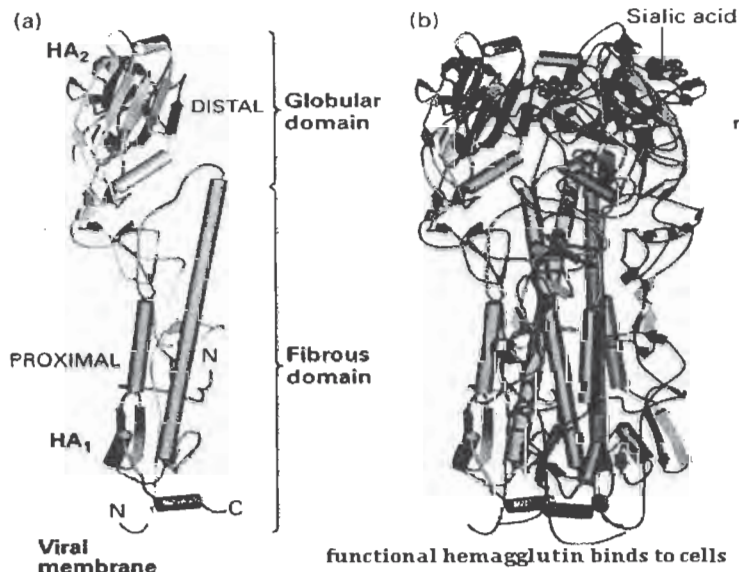
โครงสร้างสามมิติและพลวัตของโปรตีนให้ข้อมูลที่สามมารถเชื่อมโยงกับกลไกการทำงานของโปรตีนได้ โปรตีนทั้งสามชนิดที่กล่าวมามีการศึกษาโครงสร้างในระดับโมเลกุลกันมากพอสมควร โดยพิจารณาได้จากการจำแนกโครงสร้างสามมิติที่ศึกษาจากเทคนิคผลึกศาสตร์รังสีเอ็กซ์ [1-3] และเทคนิค NMR [4-5] ของโปรตีนในไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Protein Data Bank (www.rcsb.org) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างกลไกการทำงานกับโครงสร้างของโปรตีน รวมถึงการทำงานของยาและกลไกการดื้อยาเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเชื้อยังไม่ชัดเจน และมีความจำเป็นที่จะต้องได้รับการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ระเบียบวิธีการออกแบบและการจำลองเชิงโมเลกุลเป็นกระบวนการทางชีวสารสนเทศเชิงโครงสร้างที่นำมาใช้วัตถุประสงค์ดังกล่าว ความรู้ที่ได้จากการศึกษาจะเป็นประโยชน์การพัฒนาและทางการแพทย์

ประเด็นปัญหาสำหรับงานวิจัยโดยแบ่งเป็น 3 ส่วนดังนี้

- ก. การทำงานของ HA กับความจำเพาะในการเข้าจับกับ receptor
- ข. การทำงานของยาในกลุ่ม M2 inhibitor
- ค. การทำงานของยาในกลุ่ม NA inhibitor

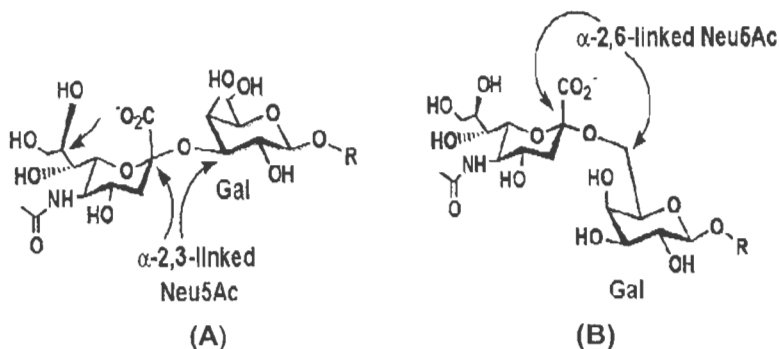
1.4.1 การทำงานของ HA กับความจำเพาะในการเข้าจับกับ receptor

โครงสร้างสามมิติของ HA ให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับการยึดจับในระดับโมเลกุลระหว่างโปรตีนของไวรัสกับรีเซพเตอร์ของ Host HA เป็นโมเลกุลโปรตีนประเภท homotrimer (รูปที่ 1.4) แต่ละโมโนเมอร์มีกรดอะมิโนประมาณ 560 เรซิดิวส์ โมเลกุลของ HA ติดอยู่ที่ผิวไวรัสได้โดยมีส่วนท่อนทรานสเมมเบรน (transmembrane segment) ผิงอยู่ในเมมเบรนของไวรัส ส่วนของ HA ที่ยื่นออกมานอกผิวไวรัสประกอบด้วยส่วนของโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นเกลียวอัลฟายาวซึ่งเรียกว่า stalk หรือ Fibrous domain และส่วนที่มีลักษณะเป็น Globular เรียกว่า headpiece ส่วนที่เป็น Globular domain นี้จะมี binding site สำหรับยึดจับกับหมู่ของกรดเซียริก (sialic acid) ซึ่งเป็นรีเซพเตอร์ของ Host cell



รูปที่ 1.4 โครงสร้างสามมิติของ HA (a) โมโนเมอร์ และ (b) ไตรเมอร์

ส่วนของ receptor ที่ติดอยู่บริเวณเมมเบรนของ host cell และสำหรับให้ HA ยึดจับเป็นโมเลกุลประเภท oligosaccharide หมู่ของกรดเซียริกจะเป็นส่วนที่อยู่ปลายสุดของ Host cell receptor โมเลกุลของน้ำตาลที่ต่อกับหมู่ sialic acid ในโมเลกุล oligosaccharide เป็นน้ำตาลชนิดกาแลกโทส (Galactose) เมื่อพิจารณาตำแหน่งที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่ของกรดเซียริกกับน้ำตาลกาแลกโทส สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ SA α 2,6Gal และ SA α 2,3Gal (รูปที่ 1.5) ความแตกต่างของการเชื่อมต่อเป็นผลให้คอนฟอร์เมชันของโมเลกุล host cell receptor แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อความจำเพาะในการยึดจับกับ HA subtype ชนิดต่างๆ เซลล์ในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนบนของคนจะมี receptor แบบ SA α 2,6Gal เป็นส่วนใหญ่ และเซลล์ในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างของคนจะมี receptor แบบ SA α 2,3Gal มีข้อมูลรายงานวิจัยพบความจำเพาะในการเข้าจับของ HA กับ receptor ทั้งสองกลุ่มนั้นแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น HA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนมีความจำเพาะในการเข้าจับกับ SA α 2,6Gal ในขณะที่ HA จากไวรัสไข้หวัดใหญ่นก มีความจำเพาะในการเข้าจับกับ SA α 2,3Gal [6-8]



รูปที่ 1.5 โครงสร้างของ SA α 2,3Gal (A), SA α 2,6Gal (B),

จากการวิเคราะห์โครงสร้าง x-ray และลำดับกรดอะมิโนบริเวณยึดจับระหว่าง HA กับ receptor ในคน สุนัข และนกพบความแตกต่างเกี่ยวกับคอนฟอร์เมชันอย่างมีนัยสำคัญ และน่าจะเกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนที่จำเพาะและ conserved ซึ่งอยู่บริเวณยึดจับ (รูปที่ 1.6) กรดอะมิโนดังกล่าวประกอบด้วย QEG (Gln-Glu-Gly) สำหรับไวรัสอินฟลูเอนซาในคน และ QSG (Gln-Ser-Gly) สำหรับไวรัสอินฟลูเอนซาในนก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าความแตกต่างดังกล่าวสามารถอธิบายด้วยการศึกษาทางโครงสร้างและการคำนวณทางทฤษฎีได้หรือไม่อย่างไร

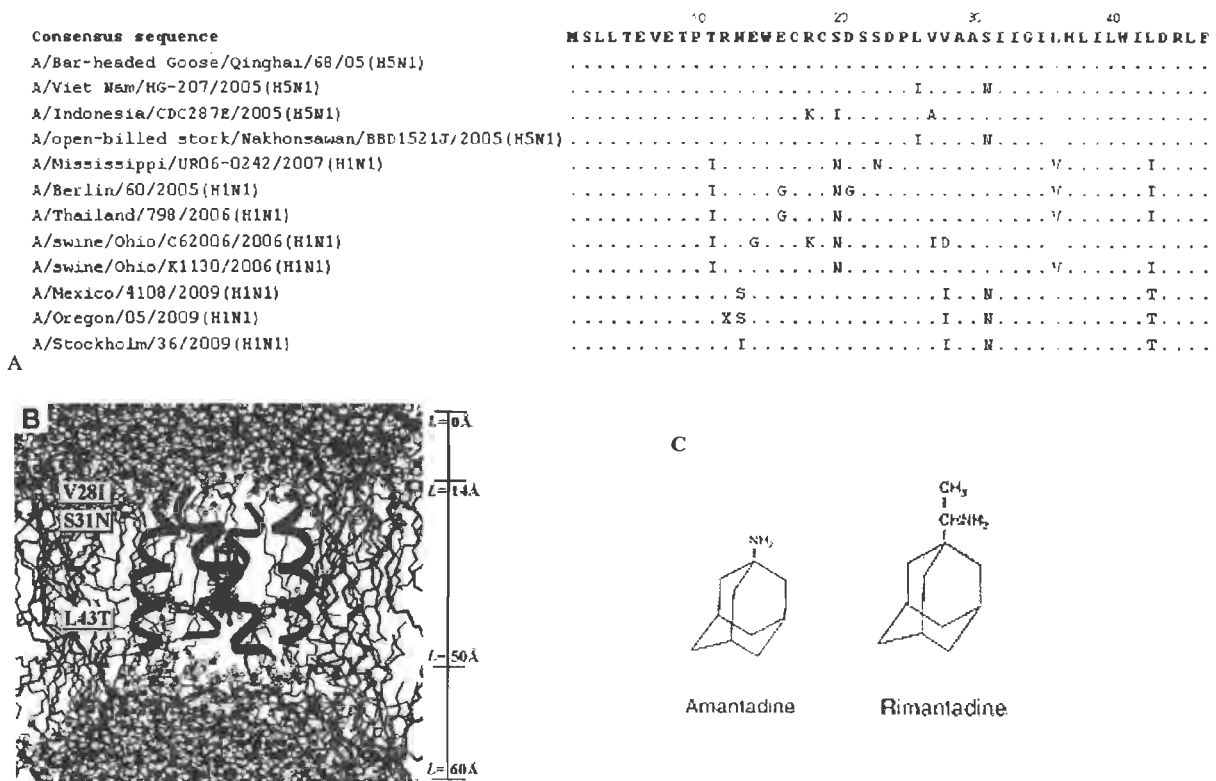
Alignment of HA		Receptor Binding site
		240
	A/Nonthaburi/102/2009 (H1N1)
	A/Arizona/01/2009 (H1N1)
	A/Auckland/1/2009 (H1N1)
	A/Brisbane/1/2009 (H1N1)
	A/California/04/2009 (H1N1)
	A/Canada-AB/RV1532/2009 (H1N1)
	A/Christchurch/2/2009 (H1N1)
	A/Colorado/03/2009 (H1N1)
	A/Delaware/02/2009 (H1N1)
	A/Denmark/313/2009 (H1N1)
	A/El Salvador/213/2009 (H1N1)
	A/England/195/2009 (H1N1)
	A/Florida/04/2009 (H1N1)
	A/Indiana/03/2009 (H1N1)
	A/Kansas/02/2009 (H1N1)
	A/Korea/01/2009 (H1N1)
	A/Maryland/05/2009 (H1N1)
	A/Massachusetts/06/2009 (H1N1)
	A/Mexico/39355/2009 (H1N1)
	A/Michigan/03/2009 (H1N1)
	A/Nebraska/03/2009 (H1N1)
	A/Netherlands/602/2009 (H1N1)
	A/New Hampshire/02/2009 (H1N1)
	A/New Jersey/01/2009 (H1N1)
	A/New Mexico/01/2009 (H1N1)
	A>New York/04/2009 (H1N1)
	A/Ohio/03/2009 (H1N1)
	A/Oregon/01/2009 (H1N1)
	A/South Carolina/09/2009 (H1N1)
	A/Tennessee/05/2009 (H1N1)
	A/Texas/04/2009 (H1N1)
	A/Virginia/04/2009 (H1N1)
	A/Washington/09/2009 (H1N1)
	A/Wisconsin/03/2009 (H1N1)
	A/Thailand/03/06 (H1N1)
	A/Thailand/04/06 (H1N1)
	A/Thailand/03/06 (H1N1)
	Swine/Chaengbasa/NIH557/2005 (H1N1)
	Swine/Chonburi/05CBI/2005 (H1N1)
	Swine/Chonburi/05CB2/2005 (H1N1)
	Chicken/Thailand/CU-F2/2004 (H5N1)
	Cider/Thailand/KU-T/2004 (H5N1)
	Goose/Thailand/KU-02/04 (H5N1)
	Goose/Thailand-Suphanburi/KU-02/04 (H5N1)
	A/Thailand/HK165/2005 (H5N1)

รูปที่ 1.6 กรดอะมิโนที่จำเพาะและ conserved ซึ่งอยู่บริเวณยึดจับที่สำคัญของ HA

1.4.2 การทำงานของยาในกลุ่ม M2 inhibitor

โปรตีน M2 เป็นไอออนแชนแนล (ion channel) ที่มีบางส่วนฝังอยู่ในชั้นเมมเบรนของไวรัสทำหน้าที่การคัดกรองโปรตอนเพื่อลำเลียงผ่านเข้าออกเซลล์ M2 ประกอบด้วย 97 กรดอะมิโน แต่มีส่วนที่อยู่ชั้นเมมเบรนซึ่งเรียกว่าท่อนทรานสเมมเบรน (transmembrane segment) อยู่ประมาณ 30 กรดอะมิโน ตั้งแต่เรซิดิวที่ 22 ถึง 42 (ดังรูปที่ 1.7A) โครงสร้างของท่อนทรานสเมมเบรนนี้มีลักษณะเป็นเกลียวอัลฟา (α -helix) ในการลำเลียงไอออน จากการศึกษพบว่าโปรตอนจะเดินทางผ่านโพรง (pore) หรือช่องแชนแนลที่เกิดจากการรวมกันของท่อนทรานสเมมเบรนจำนวน 4 ท่อน [9] ดังนั้นรูปแบบที่ M2 ทำงานนั้นมีลักษณะเป็น tetramer (รูปที่ 1.7B) โครงสร้างสามมิติของ M2 ที่ศึกษาด้วย

เทคนิค x-ray และ NMR มีความแตกต่างกัน แต่มีการวิเคราะห์ว่าอาจเป็นโครงสร้างที่อยู่คนละสภาวะ เนื่องจาก M2 ทำงานเปิดและปิดโพรงโดยการเปลี่ยนคอนฟอร์เมชันของท่อนทรานสเมมเบรน โดยมี H37 และ W41 ทำหน้าที่เสมือนประตูด หรือ gate ควบคุมการผ่านเข้าออกของโปรตอน [10]

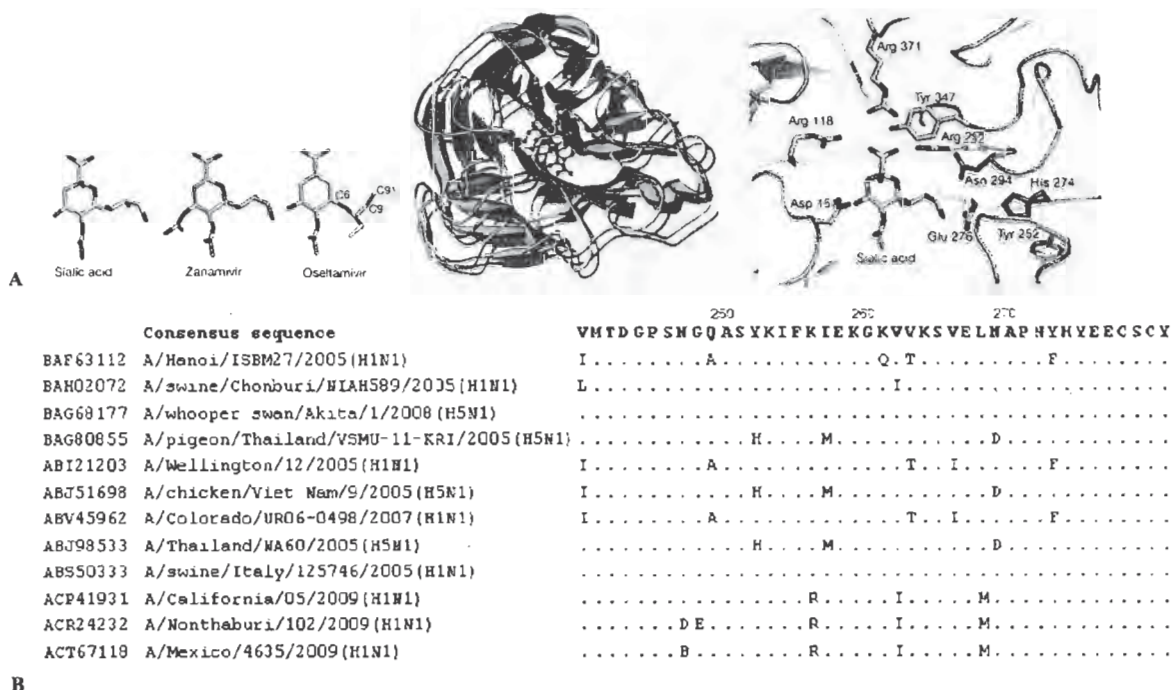


รูปที่ 1.7 sequence alignment ของ M2 (A), แบบจำลองโครงสร้าง M2 ในเมมเบรน (B) และ โครงสร้างของยา Amantadine และ Rimantadine (C)

Amantadine (AMD) และ Rimantadine (RMD) (รูปที่ 1.7) เป็นยาต้านเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ M2 กลไกการยับยั้งการลำเลียงโปรตอนของ M2 ด้วย AMD มีสองแนวทางที่ถูกนำเสนอจากรายงานวิจัย [11] คือ กลไกแบบอุดโพรงภายใน M2 และกลไกแบบล็อกโครงสร้างท่อนทรานสเมมเบรน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนบนโปรตีน M2 หลายตำแหน่งที่ทำให้ติดต่อยา AMD ตำแหน่งที่เปลี่ยนแปลงในเชื้อไวรัส 2009 ได้แก่ V27I และ S31N โดยเฉพาะที่ตำแหน่ง A30T และ S31N ใน H5N1 สายพันธุ์เวียดนามมีรายงานว่าระดับการติดยาสูงมาก [12] ดังนั้นจึงคำอธิบายที่ว่าเหตุใดยา AMD และ RMD จึงใช้ไม่ได้ผลสำหรับผู้ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 การศึกษาทาง molecular modeling จะให้ข้อมูลสนับสนุนสาเหตุการติดยาได้อีกทางหนึ่ง และอาจนำไปสู่กระบวนการปรับปรุงโครงสร้างของยาในกลุ่มนี้

1.4.3 การทำงานของยาในกลุ่ม NA inhibitor

Oseltamivir และ Zanamivir เป็นยาในกลุ่ม NA inhibitor ประเภท substrate-analogue inhibitor (รูปที่ 1.8) เนื่องจากโครงสร้างมีลักษณะคล้ายหมู่ sialic acid ซึ่งเอนไซม์ NA จะเข้าไปจับและเกิดปฏิกิริยา cleavage โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ Neuraminidase กับยาต้านเชื้อไวรัสทามิฟลูหรือ Oseltamivir ทำให้เข้าใจถึงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับยาได้เป็นอย่างดี ที่บริเวณ binding site นี้ กลุ่มกรดอะมิโนของ NA ที่เกี่ยวข้องกับการยึดจับกับ oseltamivir ได้แก่ D151, E119, R 118, W178, R224, R276, N294, R292 และ R371 จากรายงานการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง H274 (หรือ H275 นับตามระบบของ N1) เป็น Y274 ทำให้ระดับการดื้อยา oseltamivir สูงมาก[13-15] นอกจากนี้ยังมีตำแหน่ง I223R, N294S, E119V และ R292K ที่มีรายงานว่าดื้อยา oseltamivir เช่นกัน สำหรับ N1 ใน H1N1 2009 ส่วนใหญ่ยังไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 274 นี้ อย่างไรก็ตามมีรายงานพบการดื้อยาซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นตำแหน่งใด (รูปที่ 1.8)



รูปที่ 1.8 โครงสร้างของ sialic acid, zanamivir และ oseltamivir , โครงสร้าง x-ray และ ที่บริเวณ binding site ของ NA (A), sequence alignment ของ NA (B)

(ที่มาจาก <http://www.jbc.org/content/285/37/28403.full>)

1.5 วัตถุประสงค์

ปัจจัยสำคัญ 3 ประการที่นำมาสู่โครงการวิจัยเพื่อความเข้าใจพื้นฐานและความแตกต่างเชิงโครงสร้างระดับโมเลกุลที่มีผลต่อการทำงานของฮีแมกกลูตินินและการยับยั้งเอนไซม์นิวรามิनिเดสระหว่างมนุษย์และสัตว์ปีก คือ ประการแรกเป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่มีแนวโน้มว่าจะมีความรุนแรงและเป็นอันตรายต่อมนุษย์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม ทำให้ไวรัสปรับตัวเข้ากับ host ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนของ HA เพื่อเข้าจับกับ human-host receptor หรือของ NA เพื่อหลีกเลี่ยงการเข้าจับของ antibody อีกทั้งการกลายพันธุ์ของ M2 ทำให้ตัวยาด้านเชื้อไวรัสในกลุ่ม M2 inhibitor ได้แก่ amantadine และ rimantadine ซึ่งเดิมใช้ได้กับไวรัสสายพันธุ์ H3N2 หากการแพร่ระบาดของไวรัสสายพันธุ์ใหม่ทำให้มีผู้ติดเชื้อมากขึ้นจะทำให้มีข้อจำกัดในการเลือกใช้ยา ประการที่สองเริ่มมีรายงานพบการกลายพันธุ์ของเอนไซม์ NA (เช่น H274Y) ทำให้ไวรัสตัวยาด oseltamivir และมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเป็นรูปแบบ antigenic drift ที่พบในไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล ประการที่สามคือ เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่นี้มีส่วนผสมของสารพันธุกรรมจากไข้หวัดใหญ่ชนิด เอ จากคน สุนัขและนก จึงความเป็นไปได้ที่จะเกิด genetic reassortment ระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในคนกับสัตว์อีก ซึ่งอาจกลายเป็นไวรัสสายพันธุ์ที่อันตรายมากขึ้นกว่าเดิม

การดำเนินงานวิจัยโดยกลุ่มวิจัยเคมีคอมพิวเตอร์ งานวิจัยหลักของกลุ่มคือการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างโมเลกุลและการทำงานของโปรตีน ศึกษาการยึดจับและอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลยาและโปรตีน รวมทั้งศึกษาอธิบายการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเนื่องมาจากโปรตีนกลายพันธุ์ซึ่งทำให้ไวรัสตัวยาด งานวิจัยใช้กระบวนการทางเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อออกแบบและจำลองโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนของไวรัสโรคไข้หวัดใหญ่ ทั้งที่เป็นโปรตีนเป้าหมายทางยาทั้งสองกลุ่ม (คือ neuraminidase และ M2 inhibitors) และโปรตีนเป้าหมายใหม่ที่มีศักยภาพในการพัฒนาหาสารยับยั้ง (คือ hemagglutinin) ลักษณะและวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ประกอบด้วย

- ศึกษาความแตกต่างทางโครงสร้างของ hemagglutinin ในไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่ที่มีความจำเพาะต่อ host receptor
- ศึกษาการยึดจับระหว่าง oseltamivir หรือ zanamivir กับ neuraminidase ในไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่
- ศึกษาในในกลุ่ม adamantane กับการยับยั้งกระบวนการ proton transport ใน โปรตีน M2

1.6 วัสดุและอุปกรณ์

1.6.1 Hardware

- คอมพิวเตอร์ส่วนตัว
- คอมพิวเตอร์แม่ข่าย (Server) โดยใช้ระบบคอมพิวเตอร์สมรรถนะสูง (High Performance Computing System) ของ Computational Chemistry Unit Cell (CCUC) ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.6.2 Software

- โปรแกรม HyperChem ใช้สำหรับสร้างโครงสร้างแบบจำลอง 3 มิติของโมเลกุลขนาดเล็ก และปรับโครงสร้างโมเลกุลให้เสถียร
- โปรแกรม Gaussian 03 ใช้สำหรับสร้างโครงสร้างแบบจำลอง 3 มิติของโมเลกุลขนาดเล็ก และปรับโครงสร้างโมเลกุลให้เสถียร ด้วยระเบียบวิธีที่มีความถูกต้องสูง
- โปรแกรม SSH Secure File Transfer Client ใช้ในการโอนถ่ายข้อมูลระหว่าง
- ชุดโปรแกรม AMBER ใช้สำหรับทำ Energy minimization, Molecular Dynamic Simulation, MM/PBSA calculation, trajectory analysis ศึกษาระบบโปรตีน HA และ NA
- ชุดโปรแกรม GROMACS 3.2.1 ใช้สำหรับทำ Energy minimization, Molecular Dynamic Simulation, trajectory analysis เพื่อศึกษา ระบบโปรตีน M2
- โปรแกรม Discovery Studio สำหรับ sequence alignment, homology modeling
- โปรแกรมใช้สำหรับ Molecular visualization ได้แก่ Weblab viewer, Pymol, VMD
- โปรแกรมสำหรับสร้างกราฟ และจัดการข้อมูล

บทที่ 2

เนื้อหาและผลการวิจัย

เนื้อหาในบทนี้กล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับผลงานวิจัยจำนวน 5 เรื่องที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ซึ่งแต่ละเรื่องจะมีประเด็นปัญหาวิจัยของตนเอง ดังนั้นเพื่อให้เนื้อหาของรายงานมีความต่อเนื่องซึ่งทำให้ง่ายต่อการทำความเข้าใจและไม่สับสน จึงใช้แนวทางการรายงานการวิจัยแยกเป็นแต่ละบทความ โดยในแต่ละบทความประกอบด้วยการสรุปเนื้อหาของงานวิจัย วิธีการดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย อภิปรายและวิจารณ์ สรุปและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

2.1 ผลงานวิจัยเรื่อง

Intharathep P, Rungrotmongkol T, Decha P, Nunthaboot N, Kaiyawet N, Kerdcharoen T, Sompornpisut P, **Hannongbua S.** "Evaluating how rimantadines control the proton gating of the influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations." *J Enzyme Inhib Med Chem.*; 26,162-8.

2.1.1 สรุปเนื้อหา

เพื่อให้เข้าใจถึงวิธีการที่ยาริมานตาดีน (rimantadine, RMT) เข้าไปยับยั้งการส่งผ่านโปรตอนในช่องโปรตีน M2 ของไวรัสไข้หวัดใหญ่ผ่านกลไกแบบ อัลโลสเตอริกซ์ (allosteric) จึงได้จำลองพลวัตโมเลกุลของระบบโปรตีน M2 โดยมียาริมานตาดีน 4 ตัวถูกวางในตำแหน่งการยึดจับที่อยู่ด้านนอกช่อง M2 ระหว่างขั้วยูนิตต่างๆบริเวณ Trp41 ซึ่งทำหน้าที่เป็นประตูเปิด-ปิด ในช่องโปรตีน M2 ในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาที่ 3 สภาวะคือ สภาวะปิด, สภาวะอินเตอร์มีเดียต และสภาวะเปิด ในสภาวะปิดพบว่าช่อง M2 มีลักษณะแคบมากซึ่งพบว่าการสร้างโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างเรสิดิว RMT-Asp44-Trp41 ทำให้ประตู Trp41 จัดวางตัวในลักษณะปิด ดังนั้นที่สภาวะนี้พบว่าน้ำที่ผ่านช่อง M2 ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับที่สภาวะอินเตอร์มีเดียตพบว่าไม่ปรากฏโครงข่ายพันธะไฮโดรเจน RMT-Asp44-Trp41 มีเพียงพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่าง RMT-Asp44 เท่านั้น ทำให้มีการแกว่งของเรสิดิว Trp41 ส่งผลให้ประตูของช่อง M2 มีลักษณะที่ปิดไม่สนิท ส่วนในสภาวะเปิดนั้นพบว่าแรงผลึกของประจุบวกบนเรสิดิว His37 ทำให้ Trp41 เปลี่ยนการวางตัวเป็นลักษณะเปิดซึ่งยากต่อการสร้างโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเรสิดิว RMT-Asp44-Trp41 จึงทำให้ที่สภาวะนี้น้ำสามารถผ่านเข้ามาภายในช่อง M2 ได้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องเป็นอย่างดีกับการวัดค่าโพเทนเชียลออฟเฟนพอร์ชที่พบว่าที่สภาวะปิดมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือสภาวะอินเตอร์มีเดียต และมีค่าน้อยที่สุดในสภาวะเปิด

2.1.2 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

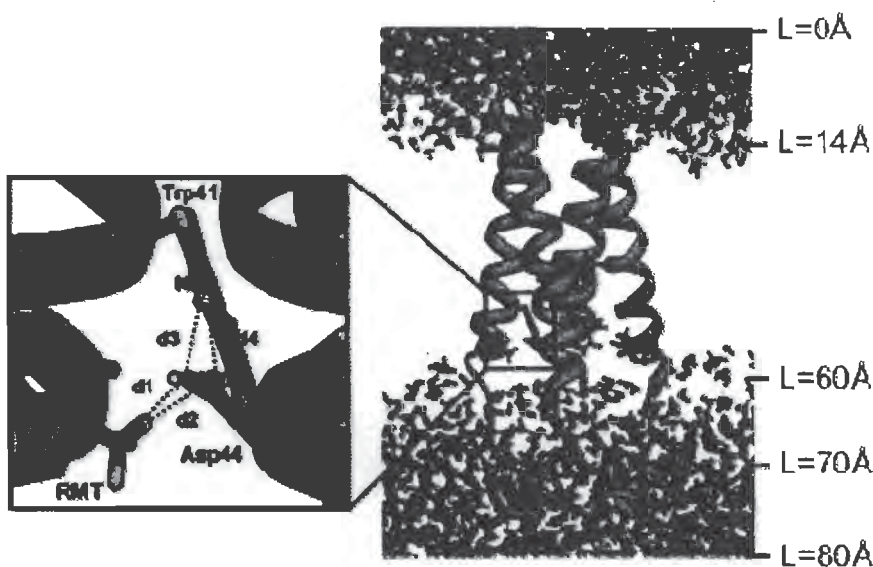
2.1.2.1 เตรียมระบบ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์สำหรับจำลองโมเลกุลาร์ไดนามิกส์ (Molecular dynamics, MD)

2.1.2.1.1 นำโครงสร้าง NMR ของ M2 จาก PDBcode: 2RLF ซึ่งเป็นโครงสร้างของ M2 เตตระเมอร์ที่มียา RMT 4 โมเลกุลจับอยู่ที่บริเวณยึดจับด้านนอกที่อยู่ใกล้กับประตูด Trp41 ทั้ง 4 บริเวณ

2.1.2.1.2 โมเดล M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ ให้มีสถานะทางโปรตอนเป็น 3 แบบ โดยทำการโปรโตเนตที่เรสิดิว His37 ของแต่ละหน่วยย่อย ดังนี้ สถานะปิด (His37 ทุกหน่วยย่อยไม่ถูกโปรโตเนต, 0H), สถานะอินเตอร์มีเดียต (His37 จำนวนหนึ่งหน่วยย่อยถูกโปรโตเนต, 1H) และสถานะเปิด (His37 จำนวนสามหน่วยย่อยถูกโปรโตเนต, 3H)

2.1.2.1.3 นำ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ในแต่ละสถานะทางโปรตอนใส่ลงในวอเตอร์-ลิปิดไบเลเยร์ ที่มีขนาด $70 \times 70 \times 80 \text{ \AA}^3$ ที่ประกอบด้วย POPC 77 โมเลกุลและน้ำ 3,760 โมเลกุล ดังรูปที่ 2.1.1

2.1.2.2 ทำการจำลองโมเลกุลาร์ไดนามิกส์โดยใช้โมดูลใน GROMACS 3.2.1 เพคเกจ เป็นเวลา 16 นาโนเซคกัล และใช้ข้อมูลจาก 8 นาโนเซคกัล สุดท้ายในการวิเคราะห์ผล

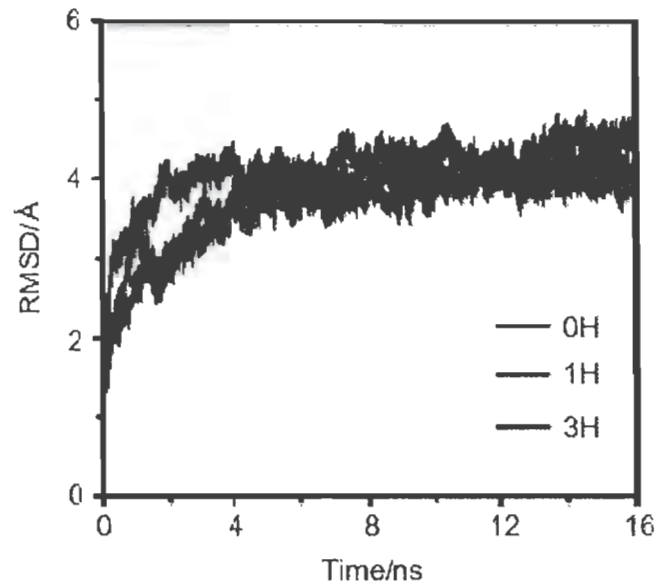


รูปที่ 2.1.1 โครงสร้างเริ่มต้นของ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ในวอเตอร์-ลิปิดไบเลเยร์

2.1.3 ผลการวิจัย

2.1.3.1 เสถียรภาพของระบบ

ทำการตรวจสอบว่าระบบได้เข้าสู่สมดุลหรือไม่โดยการวิเคราะห์ค่า RMSD ซึ่งพบว่าทั้ง 3 ระบบได้เข้าสู่สมดุลหลังจากการทำ MD เป็นเวลา 8 นาโนเซคกัลดังแสดงรูปที่ 2.1.2



รูปที่ 2.1.2 รุทมีนแสดควร์ดิสเพลสเมนต์ (Root mean square displacement, RMSD) ของ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ที่สภาวะ 0H, 1H และ 3H

2.1.3.2 อันตรกิริยาระหว่างโปรตีน-โปรตีน และ โปรตีน-ยา ของระบบ M2-4RMTs

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่าโครงข่ายพันธะไฮโดรเจน RMT-Asp44-Trp41 มีความสำคัญต่อการยึดจับของยาที่บริเวณด้านนอกของช่องโปรตีน M2 จึงได้ทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดไฮโดรเจนของเรลิติวดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 2.1.1 พร้อมทั้งได้แสดงกราฟของระยะทางการเกิดพันธะไฮโดรเจนในรูปที่ 2.1.3 ซึ่งระยะ d1-d4 นิยามไว้ในรูปที่ 2.1.1 โดย d1-d2 แสดงระยะทางระหว่าง RMT และ Asp44 และ d3-d4 แสดงระยะระหว่าง Asp44 และ Trp41 โดยพล็อตแยกให้เห็นชัดเจนทั้ง 4 สับยูนิตของทั้ง 3 ระบบ

สำหรับระบบ 0H พบว่ามีโครงข่ายพันธะไฮโดรเจน RMT-Asp44-Trp41 เกิดขึ้น โดยเฉพาะที่สับยูนิต II พบว่า d1 และ d2 ระหว่าง RMT-Asp44 มีค่า ~ 3.5 Å (รูปที่ 2.1.3B) และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจน 31% และ 14% ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันพบระยะ d3 ระหว่าง Asp44 และ Trp41 มีค่า ~ 3.5 Å (รูปที่ 3C) เช่นเดียวกันและมีพันธะไฮโดรเจนสูงถึง 80% (ตารางที่ 2.1.1) ซึ่งลักษณะดังกล่าวทำให้ประตู Trp41 วางตัวในลักษณะปิด

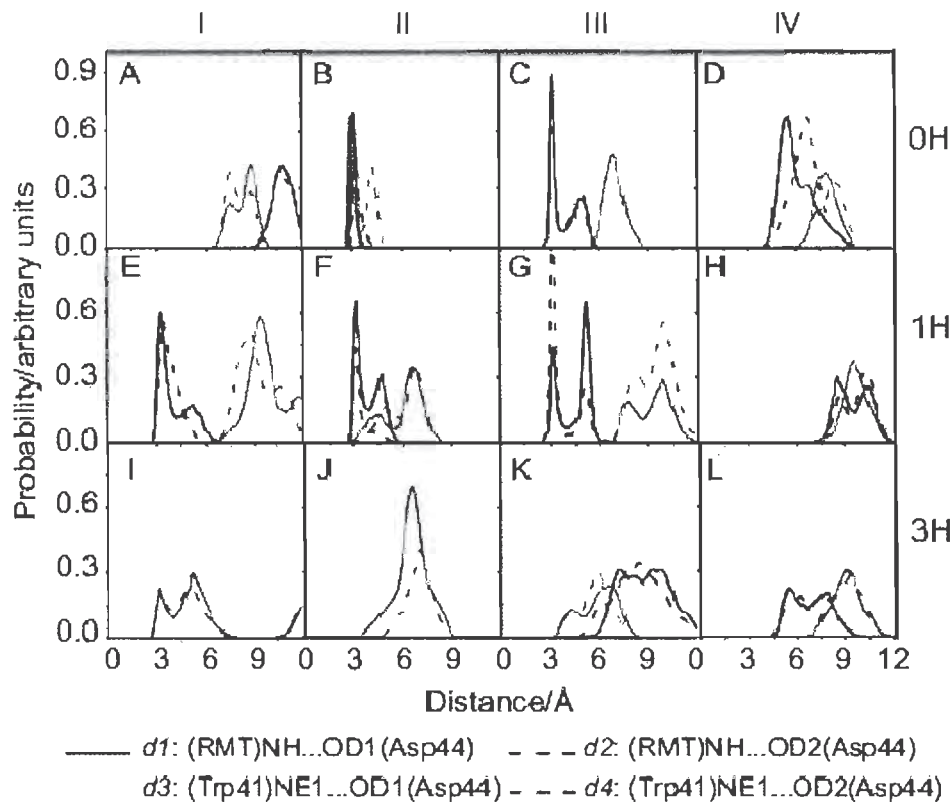
ในกรณีของ M2-4RMTs ในระบบ 1H พบว่ามีเพียงแค่ ระยะ d1-d2 (รูปที่ 2.1.3E-G) ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ แต่ระยะ d3-d4 มีระยะห่างมาก $\sim 7-10$ Å (รูปที่ 3E-H) ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนอย่างอ่อนระหว่าง RMT และ Asp44 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจน $\sim 20\%$ (ตารางที่ 2.1.1) และไม่มีค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง Asp44 และ Trp41

สำหรับสภาวะ 3H พบว่า d1-d4 (รูปที่ 2.1.3I-L) มีระยะที่ไกลมากและไม่พบค่าเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่าง 3 เรลิติวนี้เลย

ตารางที่ 2.1.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนในสภาวะ 0H, 1H และ 3H ของ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ ระหว่าง i) RMT และ โปรตีน M2 ii) เรสิดิว Asp44 และ Trp41

Interaction	% Hydrogen bond occupancy
<i>(i) RMT-M2:</i>	
0H state	
d1: (RMT-II)NH...OD1(Asp44-II)	31
d2: (RMT-II)NH...OD2(Asp44-II)	14
d1: (RMT-III)NH...OD1(Asp44-III)	10
d2: (RMT-III)NH...OD2(Asp44-III)	9
(RMT-III)NH...O(Trp41-IV)	11
(RMT-IV)NH...O(Phe48-I)	44
1H state	
d1: (RMT-I)NH...OD1(Asp44-I)	11
(RMT-I)NH...O(Asp44-I)	25
(RMT-I)NH...O(Phe47-I)	49
d1: (RMT-II)NH...OD1(Asp44-II)	12
d2: (RMT-II)NH...OD2(Asp44-II)	16
(RMT-II)NH...O(Asp44-II)	47
(RMT-III)NH...O(His57-IV)	58
3H state	
(RMT-III)NH... O(Arg45-IV)	26
(RMT-IV)NH... O(Asp44-IV)	5
(RMT-IV)NH... O(Leu46-IV)	10
<i>(ii) Asp44-Trp41*:</i>	
0H state	
d3: (Asp44-II)OD1...NE1(Trp41-III)	80

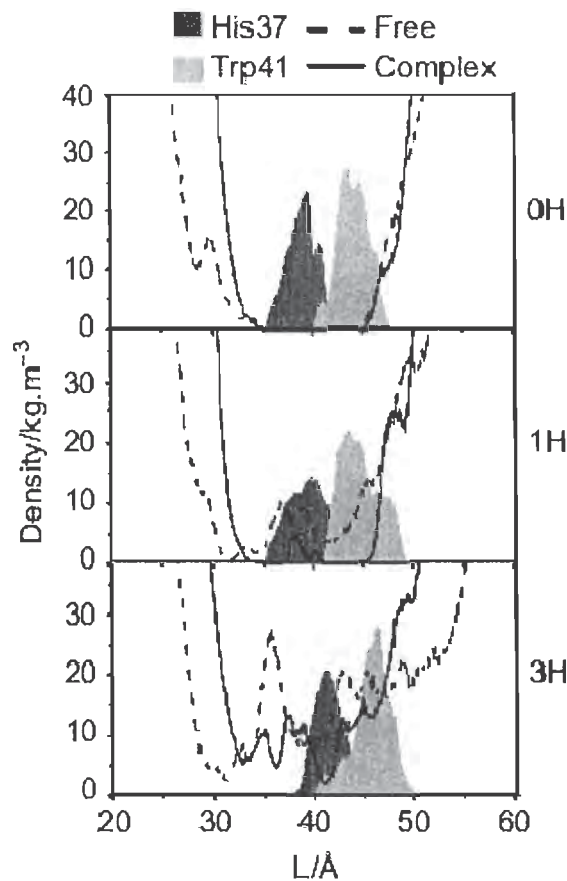
*No hydrogen bond was found for the 1H and 3H states



รูปที่ 2.1.3 การกระจายของระยะทาง $d1$ - $d4$ (ตามที่กำหนดในรูปที่ 2.1.1) ของระบบ OH, 1H และ 3H ที่สับยูนิต I-IV ของช่อง M2

2.1.3.3 ความหนาแน่นของน้ำในช่องโปรตีน M2

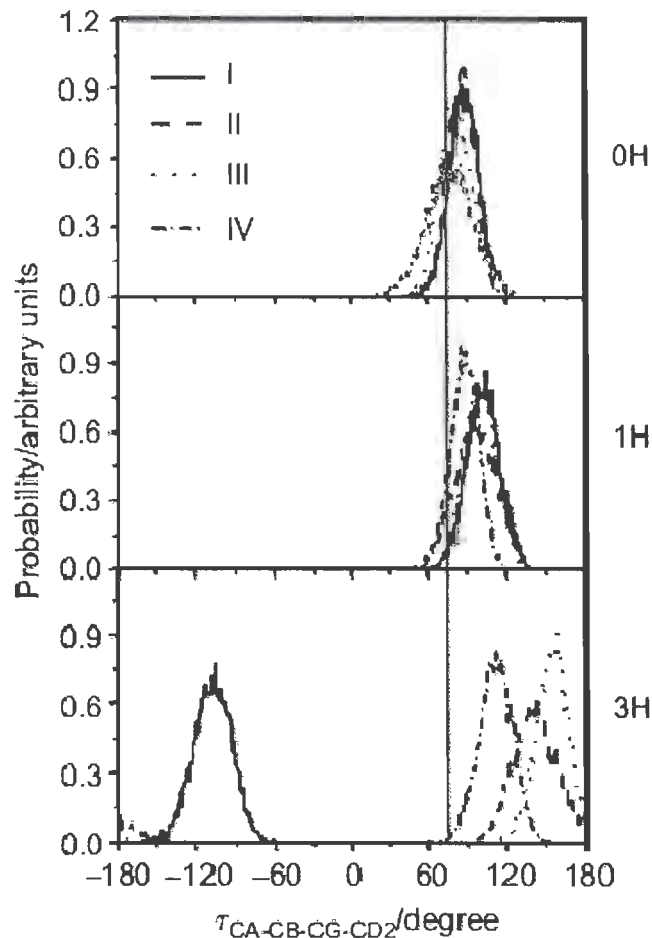
เมื่อทำการวัดค่าความหนาแน่นของน้ำในช่องโปรตีน M2 เปรียบเทียบกันระหว่าง M2 อิสระที่ไม่มียา และ M2-4RMTs พบว่าในระบบ OH ความหนาแน่นของน้ำเป็นศูนย์เช่นเดียวกับ M2 อิสระ ในกรณี 1H พบว่ามีค่าความหนาแน่นปรากฏที่บริเวณประตู His37 และ Trp41 เพียงเล็กน้อย ส่วนบริเวณอื่น ๆ ความหนาแน่นของน้ำเป็นศูนย์ จากผลการทดลองที่ได้นี้ทำให้สรุปได้ว่ายาที่จับอยู่ที่ด้านนอกของช่อง M2 จะทำให้โครงสร้างในสภาวะปิดของ M2 มีความเสถียรมากขึ้นและช่วยยับยั้งไม่ให้น้ำเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปด้านในของช่อง M2 ได้ ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในกรณีของระบบ 1H (รูปที่ 2.1.4, 1H) สำหรับสภาวะ 3H พบว่าค่าความหนาแน่นของน้ำมีค่าสูงตลอดช่อง M2 ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถอธิบายข้อมูลทางการทดลอง ที่ระบุว่า การยึดจับของยาด้านนอกช่อง M2 เป็นเพียงบริเวณการยึดจับรอง โดยที่บริเวณการยึดจับหลักของช่อง M2 นั้นอยู่ด้านใน ซึ่งสามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่านของน้ำได้แม้กระทั่งที่สภาวะเปิด (3H) การที่ยึดจับที่บริเวณด้านนอกของช่อง M2 ไม่สามารถยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่านของน้ำที่สภาวะ 3H ได้เนื่องมาจากการสูญเสียโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนที่สำคัญดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้ไม่สามารถล็อกประตู Trp41 ให้วางตัวในลักษณะแบบปิดได้



รูปที่ 2.1.4 ความหนาแน่นของน้ำและตำแหน่งของHis37 (พื้นที่สีเทาเข้ม) และ Trp41 (พื้นที่สีเทาอ่อน) ในระบบ M2 อีสระ และ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ ที่สภาวะ 0H, 1H และ 3H

2.1.3.4 รูปแบบการวางตัวของประตู Trp41

รูปที่ 2.1.5 แสดงมุมทอร์ชัน CA-CB-CG-CD2 เพื่อดูการบิดของวงอินโดของประตู Trp41 ซึ่งพบว่าในระบบ 0H และ 1H การบิดมุมทอร์ชันของ Trp41 มีความคล้ายคลึงกัน โดยที่มุมทอร์ชันอยู่ในช่วง 30° ถึง 120° โดยมีการกระจายสูงสุดอยู่ที่ 90° โดยที่วงอินโดของ Trp41 วางตัวอยู่ในลักษณะเกือบตั้งฉากกับแกนหลักของช่อง M2 ทำให้ประตู Trp41 สามารถปิดกั้นการเคลื่อนที่ผ่านของน้ำได้ ในทางกลับกันเมื่อพิจารณามุมทอร์ชันของ Trp41 ในระบบ 3H พบว่า มุมทอร์ชันของ Trp41 ทั้ง 4 สับยูนิตมีค่าดังนี้ -110° , 110° , 130° และ 170° สำหรับสับยูนิต I-IV ตามลำดับ การหมุนของวง Trp41 ค่อนข้างเยอะโดยเฉพาะในสับยูนิตที่ I แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลง ของประตู Trp41 ไปสู่สภาวะเปิด ซึ่งสอดคล้องกับค่าความหนาแน่นของน้ำที่พบในช่อง M2 ของทั้ง 3 ระบบ

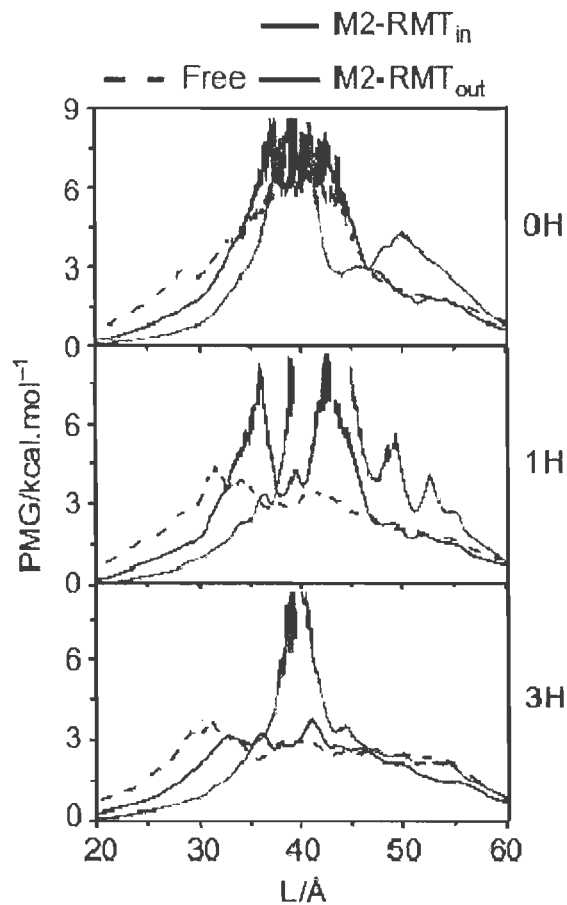


รูปที่ 2.1.5 มุมทอร์ชัน CA - CB - CG - CD2 ของประตู่ Trp41 ของสับยูนิต I-IV ในระบบ M2-4RMTs คอมเพล็กซ์ที่สภาวะ 0H, 1H และ 3H

2.1.3.5. ความสัมพันธ์ในแง่การซึมของน้ำผ่านช่อง M2

คำนวณค่าโพเทนเชียลออฟมีนฟอร์ซ (potential of means force, PMF) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านช่อง M2 โดยเปรียบเทียบระหว่าง M2 อีสระ, M2 ที่มียาจับที่ตำแหน่งด้านในช่อง M2 (M2-RMT_{in}) และ M2 ที่มียาจับที่ตำแหน่งด้านนอก (M2-RMT_{out}) จากผลการคำนวณพบว่าในกรณี M2 อีสระค่า PMF มีลำดับดังนี้ 0H>1H~3H โดยมีค่า PMF ~6 kcal/mol ในระบบ 0H และ ~3-4 kcal/mol ในระบบ 1H และ 3H ส่วน M2-RMT_{out} ค่า PMF เรียงลำดับดังนี้ 0H~1H>3H โดยค่า PMF มีค่า ~4-9 kcal/mol ในระบบ 0H และ 1H และลดลงเหลือ ~3 kcal/mol ในระบบ 3H

จากข้อมูล PMF พบว่าให้ค่าสอดคล้องกับข้อมูลต่างๆที่ผ่านมา โดยสรุปได้ว่าการยึดจับของ RMT ที่ตำแหน่งด้านนอกช่องโปรตีน M2 สามารถยับยั้งการส่งผ่านโปรตอนในสภาวะที่มี pH สูง เช่น 0H (pH~7.5) และ 1H (pH~7.0) เท่านั้น แต่เมื่อ pH สูงขึ้นเช่น 3H (pH~6.0) การยึดจับของยาต้านนอกไม่สามารถทำหน้าที่ยับยั้งการขนส่งโปรตอนผ่านช่อง M2 ได้



รูปที่ 2.1.6 โพลเทนเชียลออฟมีนฟอร์ซ (potential of means force, PMF) ของการเคลื่อนที่ของโปรตอนผ่านช่อง M2 ที่สภาวะ 0H, 1H และ 3H ในระบบ M2 อิสระ, M2-RMT_{in} และ M2-RMT_{out}

2.1.4 อภิปรายและวิจารณ์

จากงานวิจัยบนพื้นฐานวิธีการจำลองโมเลกุลาร์ไดนามิกส์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีน M2 ด้วยยาต้านไวรัส ในการเข้ายับยั้งของยาที่ตำแหน่งยึดจับด้านนอกช่อง M2 หรือเรียกว่าตำแหน่งอัลโลสเตอริกนั้นให้ผลอย่างชัดเจนว่า การยึดจับที่ตำแหน่งนี้มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งของยาน้อยกว่าการเข้ายึดจับด้านในช่อง M2 โดยมีพารามิเตอร์ที่สำคัญที่ส่งผลให้การเข้ายึดจับของยาด้านนอกสามารถทำงานได้นั้นคือ การสร้างโครงข่ายไฮโดรเจนของยากับเรสิดิว Asp44 เพื่อสามารถไปล๊อคประตู Trp41 ไม่ให้เปิดออก แต่โครงข่ายนี้จะถูกทำลายเมื่อระบบมี pH ต่ำลง เนื่องจาก His37 ถูกโปรโตเนทมากขึ้น การผลักรันของประจุบวกที่ His37 มีผลอย่างมากต่อแรงแวนเดอร์วาลส์ของวงอินโดของ Trp41 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างจากการวางตัวในลักษณะปิดเปลี่ยนแปลงไปเป็นการวางตัวในลักษณะเปิดซึ่งทำให้โครงข่ายพันธะไฮโดรเจนที่สำคัญไม่สามารถเกิดขึ้นได้ จึงทำให้ที่ pH ต่ำน้ำสามารถเคลื่อนที่ผ่านช่อง M2 ได้อย่างเดียวกับในกรณีของ M2 อิสระ ซึ่งจากงานวิจัยชิ้นนี้สามารถอธิบายได้ดีถึงกลไกการยับยั้งของ RMT ที่ตำแหน่งยึดจับด้านนอกช่องโปรตีน M2 ในระดับโมเลกุล ที่ชี้ให้เห็นได้ชัดเจนว่ากลไกการยึดจับแบบนี้สามารถยับยั้งได้ในกรณีที่ pH สูงเท่านั้น แต่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ที่ pH ต่ำ

2.1.5 ข้อเสนอแนะและประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

การศึกษาในระดับโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิคการจำลองทางเคมีคอมพิวเตอร์เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อที่จะเข้าใจสมบัติพื้นฐานเชิงโครงสร้าง รวมไปถึงสมบัติเชิงพลวัต ในการอธิบายและเข้าใจกลไกการเข้าไปยับยั้งของยาในช่อง M2 ในระดับโมเลกุลซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมาก ต่อการนำไปสู่การออกแบบและพัฒนาายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น ต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน M2 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่

2.2 ผลงานวิจัยเรื่อง

Nunthaboot N, Rungrotmongkol T, Malaisree M, Kaiyawet N, Decha P, Sompornpisut P, Poovorawan Y, **Hannongbua S.** "Evolution of human receptor binding affinity of H1N1 hemagglutinins from 1918 to 2009 pandemic influenza A virus." *J Chem Inf Model.*, 2010, 50, 1410-7.(IF=3.882)

2.2.1 สรุปเนื้อหา

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 จากคนสู่คนได้รับความสนใจ ติดตาม และเฝ้าระวังเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อมีการกลายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงได้ กระบวนการแพร่พันธุ์ของเชื้อไวรัสในมนุษย์นั้นเริ่มต้นจากการยึดจับระหว่างไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัส และตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ที่พบในเซลล์ของมนุษย์ งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบสมบัติทางโครงสร้างและทางพลวัตของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A H1N1 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไข้หวัดใหญ่สเปน (H1-1918) ไข้หวัดใหญ่หมู (H1-1930) ไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1-2005) และไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (H1-2009) ซึ่งยึดเกาะกับตัวรับในมนุษย์ พบว่าทั้ง 4 ระบบนั้น ตัวรับมีอันตรกิริยาที่สำคัญกับโปรตีนฮีแมกกลูตินิน โดยเฉพาะที่กรดอะมิโนตำแหน่ง Y95 บริเวณลูป-130 เกลียว-190 และลูป-220 อย่างไรก็ตามพบว่าการเพิ่มกรดอะมิโนที่มีประจุ คือ K145 และ E227 ในบริเวณที่มีการยึดจับกับตัวรับของฮีแมกกลูตินินในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่นั้น ทำให้ประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างโปรตีนและตัวรับดีขึ้นเมื่อเทียบกับอีก 3 สายพันธุ์ที่เหลือซึ่งไม่มีกรดอะมิโนที่มีประจุในตำแหน่งดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตำแหน่ง 225 กรดอะมิโนกรดแอสปาดิกสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้มากกว่าและแข็งแรงกว่ากรดอะมิโนไกลซีน บริเวณการยึดจับกับตัวรับของฮีแมกกลูตินินที่มีลักษณะความเป็นขั้วเพิ่มมากขึ้นในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่น่าจะเป็นพัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิมที่มีการรายงานมาแล้ว ข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้เข้าใจถึงประสิทธิภาพในการยึดจับระหว่างตัวรับและโปรตีนฮีแมกกลูตินินสายพันธุ์ชนิดต่างๆ

2.2.2 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

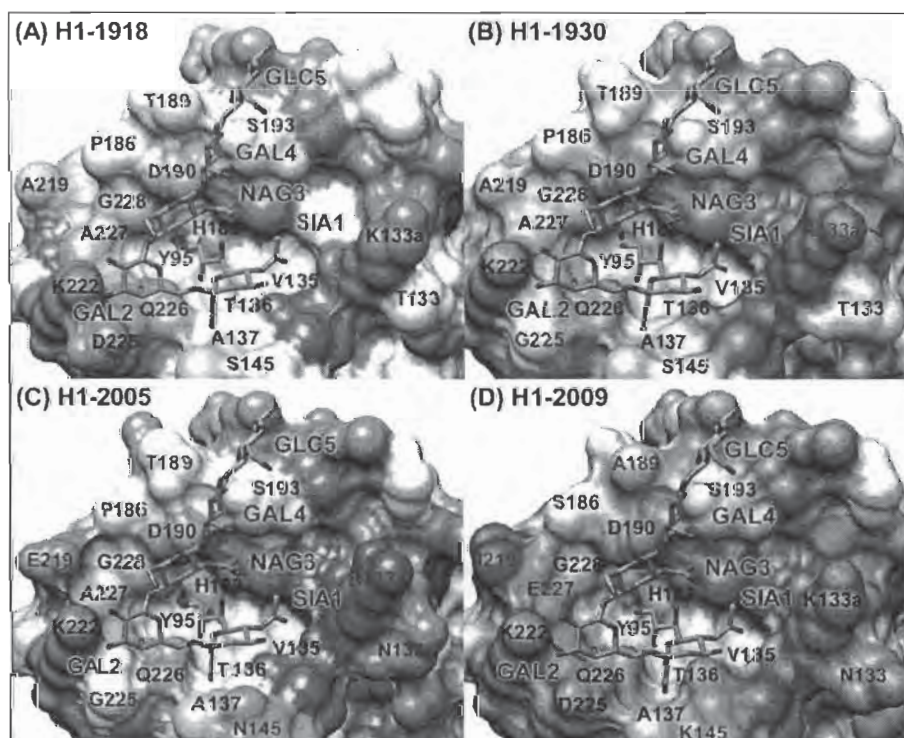
การเตรียมโครงสร้างเริ่มต้นของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินิน และตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ไข้หวัดใหญ่หมู (H1-1930) ดาวโนโหลตโครงสร้างจากธนาคารโปรตีน รหัส 1RVT ไข้หวัดใหญ่สเปน (H1-1918) มีเพียงโปรตีน คือ 1RUZ การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนกับตัวรับ ทำได้โดย ทำการ superimpose อะตอมโปรตีนของ 1RUZ เข้ากับอะตอมโปรตีนของไข้หวัดหมู คือ 1RVT จากนั้นลบโคออร์ดิเนตของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดหมูออก ก็จะได้สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สเปนและตัวรับในมนุษย์

สารประกอบเชิงซ้อนของไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (H1-2005) และไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (H1-2009) เตรียมโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินโดยเทคนิคโฮโมโลยีโมเดลลิง จากโปรแกรม Discovery Studio โดยใช้โครงสร้างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดหมูเป็นแม่แบบ จากนั้นสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 โดยใช้ขั้นตอนเช่นเดียวกับกรณีไข้หวัดใหญ่สเปน

การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล นำโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 4 ระบบ มาเติมน้ำ จากนั้นคำนวณ minimization เพื่อปรับโครงสร้างให้เสถียร แล้วทำการคำนวณซิมูเลชันนาน 6.5 ns ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในช่วง 1.5-6.5 ns

2.2.3 ผลการวิจัย

เพื่อศึกษาลักษณะความมีขั้วและไม่มีขั้วของกรดอะมิโนในบริเวณ active site ของฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยการพล็อตพื้นผิวความมีขั้ว-ไม่มีขั้วของโปรตีนในบริเวณดังกล่าว (รูป 2.2.1) เมื่อเทียบเปรียบทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ มีลักษณะความเป็นขั้วในบริเวณ active site มากกว่าสายพันธุ์ชนิดอื่นๆ ดังจะเห็นได้จากพื้นผิวน้ำเงิน ซึ่งพบได้มากกว่า และจากการเปรียบเทียบชนิดของกรดอะมิโนในบริเวณ active site (ตาราง 2.2.1) ก็พบว่าในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ มีกรดอะมิโนที่มีประจุ มากกว่า สายพันธุ์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะการเพิ่มเข้ามาของ K145 และ E227

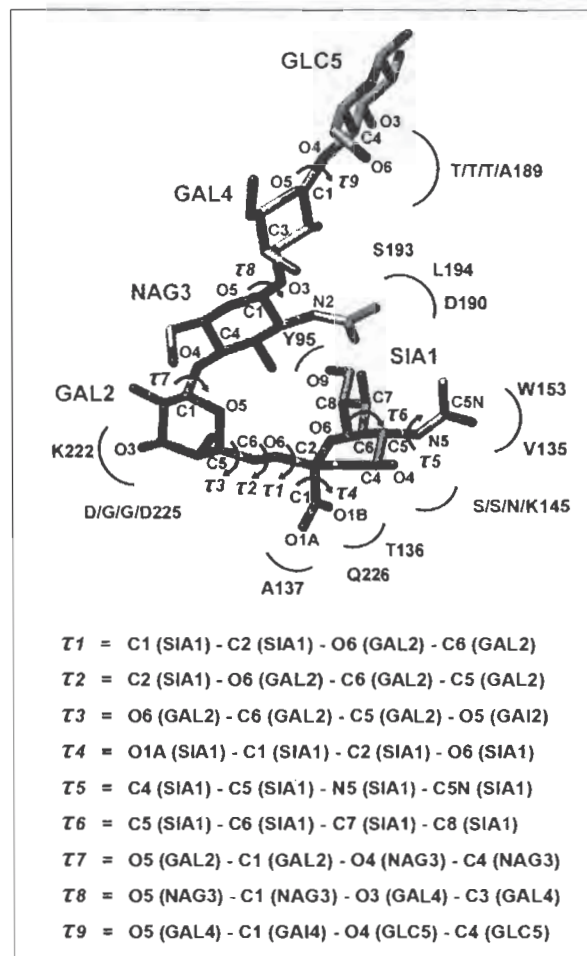


รูป 2.2.1 พื้นผิวความมีขั้ว-ไม่มีขั้วในบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินทั้ง 4 สายพันธุ์

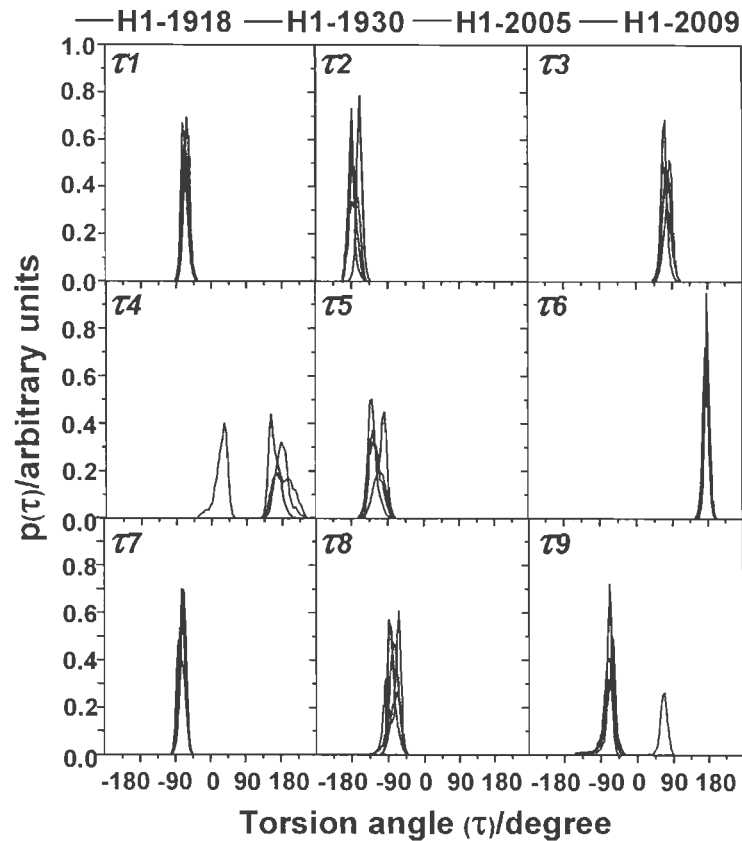
ตาราง 2.2.1 แสดงผลการเปรียบเทียบกรดอะมิโนในบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์

Residue ID	H1N1 HA strains			
	H1-1918	H1-1930	H1-2005	H1-2009
95	Y	Y	Y	Y
133	T	T	<u>N</u>	<u>N</u>
133a	K	<u>R</u>	<u>R</u>	K
134	G	G	G	G
135	V	V	V	V
136	T	T	T	T
137	A	A	A	A
138	A	A	A	A
145	S	S	<u>N</u>	<u>K</u>
153	W	W	W	W
155	T	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>
183	H	H	H	H
185	P	P	P	P
186	P	P	P	<u>S</u>
189	T	T	T	<u>A</u>
190	D	D	D	D
192	Q	Q	Q	Q
193	S	S	S	S
194	L	L	L	L
219	A	A	<u>E</u>	<u>I</u>
222	K	K	K	K
225	D	<u>G</u>	<u>G</u>	D
226	Q	Q	Q	Q
227	A	A	A	<u>E</u>
228	G	G	G	G

นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า ตัวรับของมนุษย์นั้นอยู่ใน cis-conformation ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ ตัวรับชนิดแอลฟา2,6 ที่พบได้ทั่วไป



รูป 2.2.2 การกำหนดมุม torsion

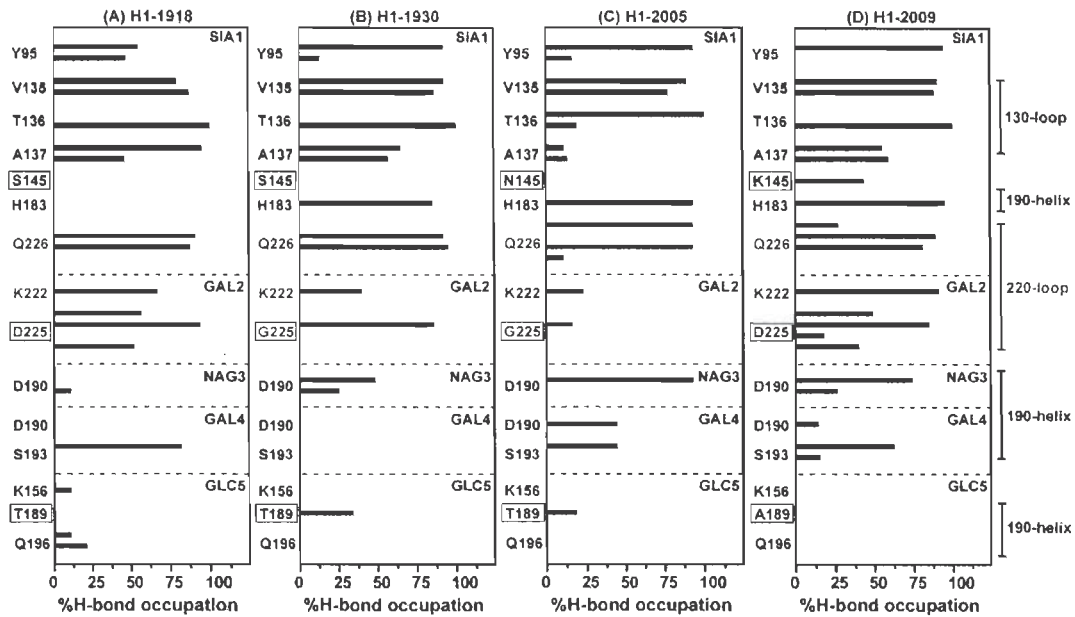


รูป 2.2.3 กราฟแสดงลักษณะการกระจายของมุม torsion ทั้ง 9 ของตัวรับมนุษย์ในไขหวัดใหญ่ ทั้ง 4 สายพันธุ์

2.2.3.2 อันตรกิริยาระหว่างตัวรับและโปรตีน

ประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างตัวรับและโปรตีน ดูได้จากจำนวนและเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจน แม้ว่าทั้ง 4 สายพันธุ์นั้น อันตรกิริยาส่วนใหญ่มาจากส่วนที่เป็น sialic acid ของตัวรับ แต่ที่สังเกตได้ชัดเจน คือ การเพิ่มกรดอะมิโนชนิดบวก คือ K145 ของไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ sialic acid ของตัวรับได้ ในขณะที่ ณ ตำแหน่งเดียวกันของ สายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งมีกรดอะมิโนแบบไม่มีประจุ นั้น ไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้ นอกจากนี้ยังพบว่า K222 ของไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ และไขหวัดใหญ่สเปนเกิดอันตรกิริยาผ่านพันธะไฮโดรเจนกับ galactose ของตัวรับได้ดี เมื่อเทียบกับไขหวัดหมูและไขหวัดตามฤดูกาล

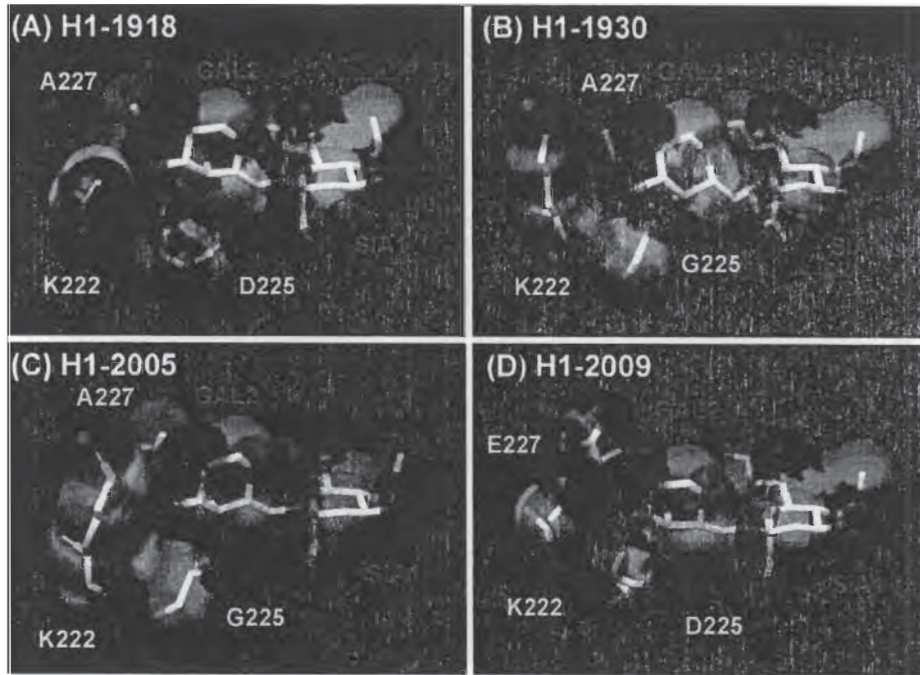
และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าในตำแหน่ง 225 ซึ่งพบกรดอะมิโนชนิดประจุลบคือ Asp225 ในไขหวัดใหญ่สเปนและไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ในขณะที่พบกรดอะมิโนชนิดไม่มีประจุ คือ Gly225 ในไขหวัดใหญ่หมูและไขหวัดใหญ่ตามฤดูกาล Asp225 สามารถสร้างพันธะพันธะไฮโดรเจนเยาะและแข็งแรงกว่า Gly225 ดังนั้น Asp225 อาจจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ระบาดของไขหวัดใหญ่



รูป 2.2.4 แสดงเปอร์เซ็นต์และจำนวนการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างตัวรับและโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่ทั้ง 4 สายพันธุ์

2.2.3.3 ผลของกรดอะมิโนที่มีประจุต่อประสิทธิภาพการยึดจับระหว่างตัวรับและโปรตีน

รูป 2.2.5 แสดงพื้นผิวศักย์ไฟฟ้าของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 222, 225 และ 227 ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินและตัวรับ สีน้ำเงินหมายถึงศักย์ไฟฟ้าบวก และสีแดง หมายถึงศักย์ไฟฟ้าลบ พบว่าทั้ง 4 ระบบต่างก็มีศักย์ไฟฟ้าลบเหมือนกันตรงตำแหน่ง sialic acid และ galactose และศักย์ไฟฟ้าบวก คือ ตำแหน่ง K222 ส่วนบริเวณที่ต่างกันได้แก่ตำแหน่ง Asp/Gly225 และ Ala/Glu227 โดยประจุของกรดอะมิโนน่าจะมีผลต่อการยึดจับระหว่างโปรตีนและตัวรับ อธิบายได้ดังนี้ ในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ K222 เกิด charge-charge interaction กับกรดอะมิโน Asp225 และ Glu227 ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ช่วย stabilize conformation ของ K222 ดังนั้น side chain ของ K222 จึงเข้าไปหาบริเวณ active site และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้ดี ในขณะที่ไข้หวัดใหญ่สเปน K222 เกิด charge-charge interaction กับ Asp225 เพียงตัวเดียว จึงเกิดพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้ในระดับปานกลาง ในขณะที่ในกรณีของไข้หวัดหมูและไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลนั้น กรดอะมิโนในตำแหน่ง 225 และ 227 ไม่มีประจุ ทำให้ K222 ไม่สามารถสร้าง charge-charge interaction ได้ ดังนั้น side chain ของ K222 จึงหันออกด้านนอก active site และสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้เพียงบางส่วนเท่านั้น ข้อมูลนี้สอดคล้องอย่างดีกับข้อมูลของพันธะไฮโดรเจน



รูป 2.2.5 แสดงพื้นผิวศักย์ไฟฟ้าของกรดอะมิโนในตำแหน่ง 222, 225 และ 227 ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินและตัวรับ

2.2.4 อภิปรายและวิจารณ์

จากการศึกษาผลของการมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันในบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินิน ของไข้หวัดใหญ่ของเชื้อไวรัส H1N1 ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไข้หวัดใหญ่สเปน ไข้หวัดใหญ่หมู ไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล และไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ พบว่าการมีกรดอะมิโนชนิดที่มีประจุในบริเวณดังกล่าว ของฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ส่งผลให้โปรตีนยึดจับกับตัวรับได้ดีขึ้นโดยเกิดผ่านพันธะไฮโดรเจน การมีกรดอะมิโน K145 สามารถสร้าง lysine fence กับกรดอะมิโน K133, K156 และ K222 ซึ่ง lysine fence ที่เกิดจากกรดอะมิโนทั้ง 4 นี้ เป็นลักษณะเฉพาะของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตำแหน่ง 225 ของฮีแมกกลูตินิน อาจพบกรดอะมิโน glycine หรือ aspartic acid โดยพบ Asp225 ในสายพันธุ์ที่มีการระบาด คือ ไข้หวัดใหญ่สเปนและไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ส่วน glycine พบใน ไข้หวัดใหญ่หมูและไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล จะเห็นได้ว่า Asp225 สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้ดีและได้มากกว่ากรณีของ Gly225 จึงเป็นไปได้ว่าหากเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มี Asp225 เป็นองค์ประกอบในฮีแมกกลูตินิน จะทำให้การติดเชื่อเกิดขึ้นได้ดี และส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างต่อไป

นอกจากนี้ในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ยังมีกรดอะมิโนในตำแหน่ง 227 ที่แตกต่างจากสายพันธุ์ H1N1 อื่นๆ ที่ผ่านมากล่าวคือ ณ ตำแหน่งดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุคือ Glu227 ขณะที่สายพันธุ์ H1N1 อื่นๆ มีกรดอะมิโนชนิดไม่มีประจุ คือ Ala227 ลักษณะดังกล่าวเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่พิเศษของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ ส่วนกรดอะมิโน ในตำแหน่ง Gln226 และ Gly228 ยังพบได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ หรือกล่าวได้ว่า ลักษณะลำดับกรดอะมิโนแบบ QEG พบในไข้หวัด H1N1 สายพันธุ์ใหม่

ขณะที่ QAG พบในเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 สายพันธุ์เดิม จะเห็นได้ว่า Glu227 มีผลทางอ้อมต่อการยึดจับกับตัวรับ โดยช่วย stabilize โครงสร้างของ K222 ให้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับตัวรับได้ดียิ่งขึ้น

จากการเปรียบเทียบอันตรกิริยาของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 กับตัวรับพบว่าในไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ มีความแข็งแรงมากกว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สเปน ไข้หวัดใหญ่หมู และไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องในโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่มีลักษณะความเป็นขั้วเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นพัฒนาการที่เปลี่ยนแปลงไปจากสายพันธุ์เดิมที่มีการรายงานมาแล้ว

2.2.5 ข้อเสนอแนะและประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

ช่วยให้เข้าใจกระบวนการการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มากขึ้น และสามารถใช้เป็นแนวทางในการออกแบบยาหรือตัวยับยั้งที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัส H1N1 มากขึ้น

2.3 ผลงานวิจัยเรื่อง

Nunthaboot N, Rungrotmongkol T, Malaisree M, Decha P, Kaiyawet N, Intharathep P, Sompornpisut P, Poovorawan Y, **Hannongbua S.** Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin” *Monatshefte Fur Chemie*, 2010, 141, 801-807. (IF=1.312)

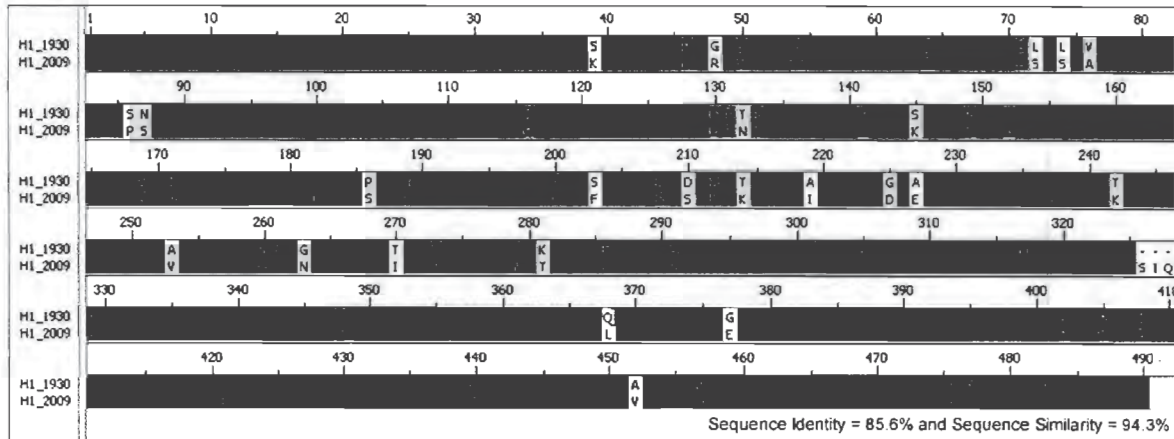
2.3.1 สรุปเนื้อหา

การระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ H1N1-2009 และการที่เชื่อดังกล่าวสามารถแพร่จากคนสู่คนได้ก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพของมนุษย์โลก การยึดจับระหว่างไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ H1N1-2009 และตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ที่พบในเซลล์ของมนุษย์ ถือเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการแพร่พันธุ์ของเชื้อไวรัส ในงานวิจัยนี้ได้สร้างแบบจำลองโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ H1N1-2009 2009 และตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ด้วยระเบียบวิธีการเทียบเคียงความคล้ายคลึงและการจำลองพลวัต พบว่าตัวรับสามารถยึดจับกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้เป็นอย่างดี โดยสร้างพันธะกับกรดอะมิโนในบริเวณลูป-130 เกลียว-190 และลูป-220 กรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับได้แก่ V135 T136 A137 K222 และ Q226 ซึ่งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกับที่พบในฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H1 ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ แต่ค่อนข้างแตกต่างจากจากฮีแมกกลูตินินใน กลุ่มของ H3 H5 และ H9

2.3.2 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

สร้างโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 โดยเทคนิคโฮโมโลยีโมเดลลิง จากโปรแกรม Discovery Studio โดยใช้โครงสร้างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดหมู (1RVT.pdb) เป็นแม่แบบ เนื่องจากการทำ sequence alignment พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีลำดับกรดอะมิโน ใกล้เคียงกันมาก (รูป 2.3.1)จากนั้นสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 โดยซ้อนทับหรือ superimpose โครงสร้างโปรตีนไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่เข้ากับไข้หวัดใหญ่หมู จากนั้นลบโคออร์ดิเนตของโปรตีนไข้หวัดหมูออก ก็จะได้โครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ H1N1 2009 กับตัวรับชนิดแอลฟา 2,6

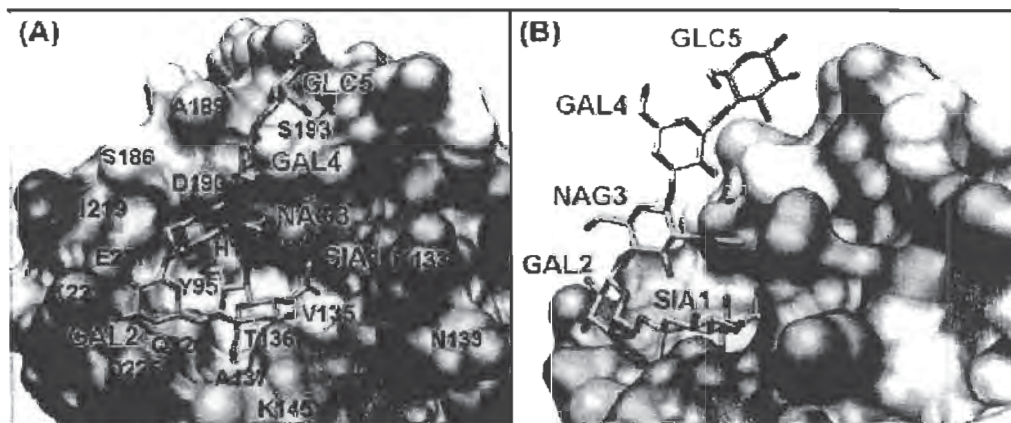
จากนั้นทำการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล โดยนำโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ มาเติมน้ำ จากนั้นคำนวณ Minimization เพื่อปรับโครงสร้างให้เสถียร แล้วทำการคำนวณซิมูเลชันนาน 6.5 ns ทำการวิเคราะห์ข้อมูลในช่วง 4 ns



รูป 2.3.1 แสดงการทำ sequence alignment ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่และไข้หวัดใหญ่หมู

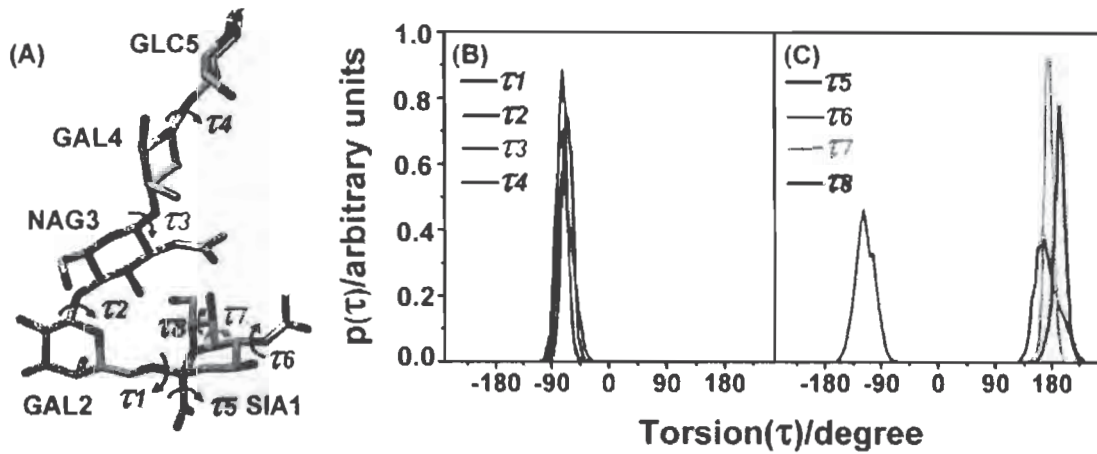
2.3.3 ผลการวิจัย

จากการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และตัวรับแอลฟา 2,6 พบว่าตัวรับวางตัวและ fit ในบริเวณ active site ของโปรตีนได้ดี ดังรูป 2.3.2



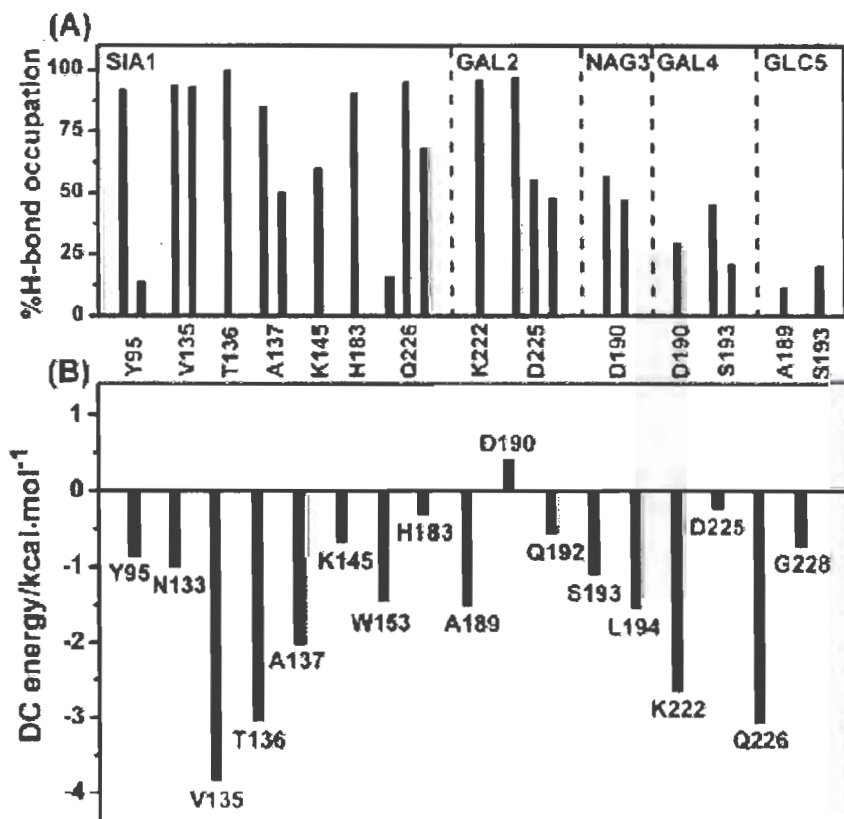
รูป 2.3.2 แสดงบริเวณ active site ของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 และตัวรับแอลฟา 2,6

เมื่อศึกษา conformation ของ ตัวรับ พบว่าตัวรับอยู่ในลักษณะ cis-conformation (รูป 2.3.3) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของตัวรับชนิดแอลฟา 2,6 พบได้ทั่วไป เช่นเดียวกับกรณีของไข้หวัดสายพันธุ์อื่นๆ เช่น H3N2 หรือ H5N1



รูป 2.3.3 แสดงกราฟความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่จะพบ torsion ของตัวรับแอลฟา 2,6

จากการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนฮีแมกกลูตินินกับตัวรับพบว่า อันตรกิริยาหลักเกิดขึ้นจาก sialic acid ของตัวรับ กับกรดอะมิโนในบริเวณรูป-130 เกลียว-190 และรูป-220 (รูป 2.3.4 บน) กรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับได้แก่ V135 T136 A137 K222 และ Q226 (รูป 2.3.4 ล่าง) ซึ่งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกับที่พบในฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H1 ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ แต่ค่อนข้างแตกต่างจากจากฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H3 H5 และ H9



รูป 2.3.4 บน แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนและตัวรับ ล่าง แสดง amino acid decomposition energy

2.3.4 อภิปรายและวิจารณ์

เนื่องจากการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 H1N1 ได้รับการสนใจและติดตามเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามในขณะนั้นยังไม่มีกลุ่มทดลองใดหาโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนฮีแมกกลูตินินได้ ดังนั้นการสร้างแบบจำลองโครงสร้าง 3 มิติ ของโปรตีนดังกล่าวจึงจำเป็นและสำคัญมาก เพราะจะทำให้เข้าใจถึงลักษณะทางโครงสร้างตลอดจนอันตรกิริยาที่เกิดกับตัวรับได้

2.3.5 ข้อเสนอแนะและประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

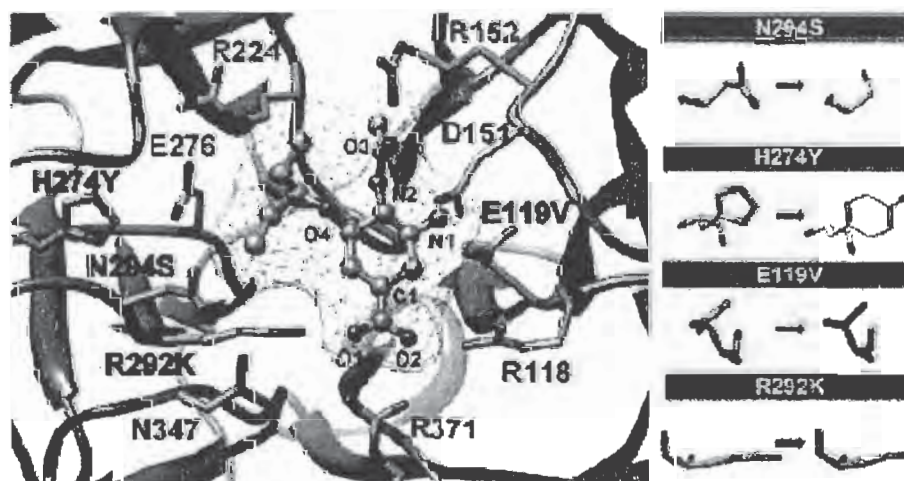
ช่วยให้เข้าใจกระบวนการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ H1N1 สายพันธุ์ใหม่ 2009 และสามารถนำไปเปรียบเทียบกับไข้หวัดใหญ่ H1N1 สายพันธุ์ดั้งเดิม เพื่อศึกษาความแตกต่างของประสิทธิภาพในการติดเชื้อ ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางการติดตามและรับมือกับกรแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส H1N1 อาจเกิดขึ้นในอนาคต

2.4 ผลงานวิจัยเรื่อง

Rungrotmongkol T, Malaisree M, Nunthaboot N, Sompornpisut P, **Hannongbua S.** "Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach." *Amino Acids.* , 2010, 39, 393-8. (IF=3.877)

2.4.1 สรุปเนื้อหา

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาประสิทธิภาพของยาทามิฟลูในการยับยั้งไข้หวัดใหญ่ 2009 สายพันธุ์ทั่วไป และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่าง ๆ ที่พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อยาต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (H274Y) และในตำแหน่งที่เป็นไปได้ว่าจะพบการดื้อยาในอนาคต (E119V N294S และ R292K) โดยใช้ระเบียบวิธีทางโมเลกุลาร์ไดนามิกซิมูเลชัน ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าแรงกระทำเชิง electrostatic interaction และพันธะไฮโดรเจนระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์นิวรามินิเดสชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E119V และ R292K ลดลงอย่างมาก นอกจากนี้ยังสามารถทำนายประสิทธิภาพในการรักษาโรคของยาทามิฟลูได้ตามลำดับดังนี้ สายพันธุ์ทั่วไป > N294S > H274Y > E119V > R292K ดังนั้นถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R292K แล้วจะเป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อทามิฟลูอย่างรุนแรงมาก ขณะที่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่น ๆ จะดื้อต่อยาทามิฟลูน้อยกว่า จึงเป็นเหตุจำเป็นอย่างเร่งด่วนในการพัฒนายาตัวใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อใช้รักษาและป้องกันการระบาดครั้งใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ในอนาคต



รูปที่ 2.4.1 การจับของยาทามิฟลูที่บริเวณกระตุ้นของเอนไซม์ NA และตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ศึกษา (สีแดง)

2.4.2 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

การใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ในการคำนวณในระบบที่ใช้ในการศึกษาจะใช้ 2 วิธี โดยวิธีแรกเป็นการคำนวณโดยระเบียบวิธีทางเคมีควอนตัม เพื่อหาค่า atomic charge และพารามิเตอร์ (parameters) ในการคำนวณแรงกระทำระหว่างเอนไซม์กับยาทามิฟลู จากนั้นจึงสร้างแบบจำลองการจับแบบจำเพาะระหว่างเอนไซม์ N1 ทั้งสายพันธุ์ทั่วไป (wild-type strain) และสายพันธุ์ดื้อยาทามิฟลู (H274Y, N294S, E119V and R292K mutated strains) กับยาทามิฟลู (รูปที่ 2.4.1) เพื่อใช้ในการคำนวณหาอันตรกิริยาและคุณสมบัติต่างๆ โดยระเบียบวิธีทางโมเลกุลาร์ไดนามิกซิมูเลชัน (molecular dynamics simulations) และ linear interaction energy (LIE) methods ต่อไป

2.4.2.1 Quantum calculations

แบบจำลองในส่วนของ quantum model ประกอบด้วยยาทามิฟลู โดยใช้ระเบียบวิธีการคำนวณคือ HF/6-31G* จากนั้นนำโครงสร้างและผลที่ได้ไปคำนวณหา atomic charge ชนิด RESP และพารามิเตอร์สำหรับยา

2.4.2.2 Molecular dynamics simulations in couple with linear interaction energy (LIE) methods

โครงสร้างเริ่มต้นของเอนไซม์นิวรามินิเดส N1 สายพันธุ์ทั่วไป (wild-type strain) และสายพันธุ์ดื้อยาทามิฟลูจะถูกนำไปศึกษา โดยโครงสร้างของเอนไซม์ที่อยู่ในรัศมี 25 Å จากจุดศูนย์กลางของ binding site เนื่องจากโครงสร้างเริ่มต้นไม่มีอะตอมไฮโดรเจนและโมเลกุลน้ำ จึงต้องเติมอะตอมไฮโดรเจนและโมเลกุลน้ำเข้าไปในโครงสร้างเพื่อให้ได้โครงสร้างที่สมบูรณ์และสอดคล้องกับสภาพจริงในห้องปฏิบัติการ ส่วนตำแหน่งของอะตอมไฮโดรเจนและโมเลกุลน้ำที่เติมเข้าไปจะได้จากการคำนวณโดยระเบียบวิธี molecular mechanics และโครงสร้างนี้จะใช้เป็นโครงสร้างเริ่มต้นที่ใช้ในการคำนวณขั้นต่อไป (รูปที่ 2.4.2)



รูปที่ 2.4.2 โครงสร้างจำลองการจับแบบจำเพาะระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์ N1 ของเชื้อไข้หวัดที่ใช้นำการคำนวณเชิงโมเลกุลาร์ไดนามิกซิมูเลชัน

แบบจำลองการจับแบบจำเพาะระหว่างเอนไซม์ N1 ทั้งสายพันธุ์ทั่วไป (wild-type strain) และสายพันธุ์ดื้อยาทามิฟลู เมื่อเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับยาทามิฟลูจึงใหญ่เพียงพอในการคำนวณอันตรกิริยาที่สำคัญที่มีต่อโครงสร้างและพลังงานของ binding site และ ยาทามิฟลู โดยจะถูกคำนวณด้วยระเบียบวิธี Molecular dynamics simulations เป็นระยะเวลา 20 ns จากนั้นนำค่าพลังงานทั้งหมดหลังจากที่ระบบเข้าสู่สมดุลแล้วมาคำนวณมาหาค่า binding free energy ซึ่งเป็นพลังงานที่บ่งบอกถึงความสามารถในการจับของยาทามิฟลูหรือสารประกอบกับเอนไซม์นิวรามิनिเดส โดยใช้ระเบียบวิธี linear interaction energy (LIE) จากนั้นจึงวิเคราะห์เชิงลึกเพื่อหาอันตรกิริยาที่สำคัญในการจับของยาทั้งทางโครงสร้างและแต่ละส่วนประกอบย่อยกับเอนไซม์นิวรามิनिเดสสายพันธุ์ทั่วไปแล้วเปรียบเทียบกับอันตรกิริยาที่สูญเสียไปเมื่อเอนไซม์นิวรามิनिเดสเกิดการกลายพันธุ์และดื้อยา

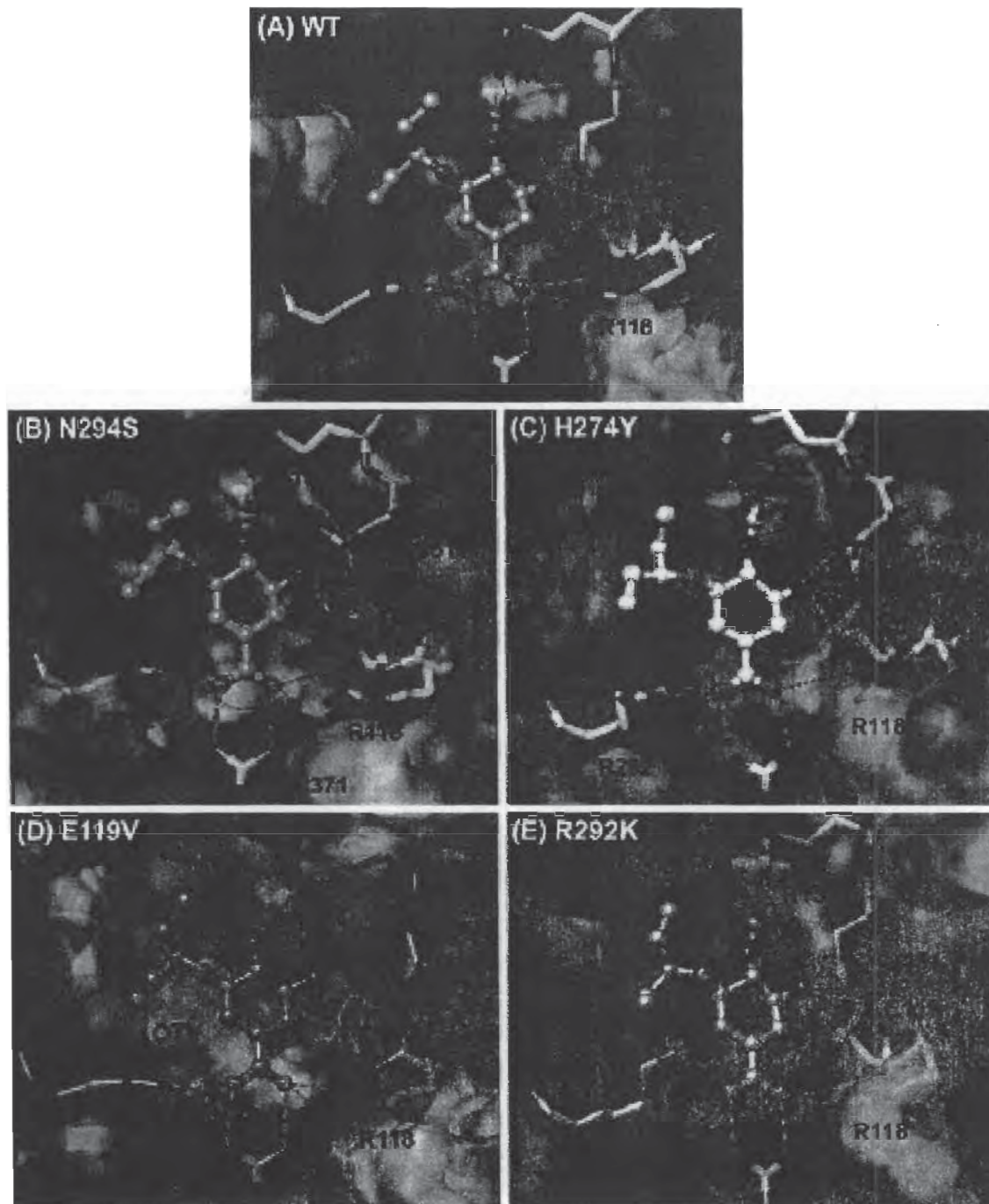
2.4.3 ผลการวิจัย

ตั้งแต่มีการระบาดของไข้หวัดนกในปี พ.ศ. 2547 และไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ในเดือนเมษายนปีนี้เป็นต้นมาพบว่า มีการศึกษาเรื่องไข้หวัดทั้งสองชนิดกันอย่างกว้างขวางทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยงานวิจัยเรื่องนี้ผู้ทำการวิจัยได้ศึกษาการยับยั้งไข้หวัดไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ด้วยยาทามิฟลูที่เอนไซม์นิวรามินิเดส

ในการศึกษาและหาสาเหตุของการดื้อยาทามิฟลูกับเอนไซม์ NA สายพันธุ์ดื้อยาโดยมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y, N294S, E119V and R292K ในเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ตามลำดับ

โดยใช้ระเบียบวิธีโมเลคิวลาร์ไดนามิกซิมูเลชันควบคู่กับวิธี linear interaction energy โดยใช้โครงสร้างจำลองของเอนไซม์ NA ที่ถูกสร้างขึ้น [Rungrotmongkol et. al., Biochem Biophys Res Commun 2009] เป็นโครงสร้างเริ่มต้นในการคำนวณ ผลที่ได้หลังจากทำการคำนวณเป็นระยะเวลา 20 ns พบว่ายาทามิฟลูสามารถรักษาไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ชนิดนี้ได้ดี เนื่องจากยาสามารถเข้าจับในบริเวณ binding site ของเอนไซม์นิวรามิเนเดส N1 ได้อย่างเหมาะสม (รูปที่ 2.4.3A) แต่ถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง H274Y ไม่สามารถป้องกันการหมุนของ E276 เพื่อทำอันตรกิริยากับ R224 ได้ แต่การกลายพันธุ์จะส่งผลให้ขนาดของ binding site ของยาทามิฟลูลดลงดังที่พบในงานวิจัยก่อนหน้า [Malaisree et. al., Amino Acids 2010] ขณะที่ในการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง N294S พบว่าการดื้อยาทามิฟลูไม่รุนแรงนัก เนื่องจากขนาดของ binding site ของยาทามิฟลูมีขนาดค่อนข้างเท่าเดิม และ E276 เป็นจุดศูนย์กลางในการเกิดอันตรกิริยากับ R224 และ S294 ขณะที่การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E119V และ R292K จะส่งผลให้ยาไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปได้ ดังแสดงในรูปที่ 3D และ 3E ตามลำดับ

นอกจากนี้นักวิจัยยังได้ทำการศึกษาและทำนายการกลายพันธุ์ของเชื้อไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่งต่าง ๆ ดังนี้ H274Y, N294S, E119V และ R292K จากผลการคำนวณที่แสดงในตารางที่ 2.4.1 พบว่าลำดับการดื้อยาทามิฟลูเป็นดังนี้ R292K (-7.7 kcal/mol) > E119V (-9.3 kcal/mol) ~ H274Y (-9.8 kcal/mol) > N294S (-10.8 kcal/mol) ซึ่งให้เห็นว่าถ้าเกิดการกลายพันธุ์ทำให้ประสิทธิภาพการจับของยาทามิฟลูลดลงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ทั่วไป (-12.8 kcal/mol) จะส่งผลทำให้เกิดการดื้อยาต่อยาทามิฟลูรุนแรงมากที่สุด ซึ่งในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 พบว่าการกลายพันธุ์ของไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่ตำแหน่ง H274Y ของเอนไซม์นิวรามิเนเดสส่งผลให้เกิดการดื้อยาทามิฟลู



รูปที่ 2.4.3 พันธะไฮโดรเจนที่สร้างขึ้นระหว่างยาทามิฟลูและกรดอะมิโนในบริเวณกระตุ้นของ
 เอนไซม์นิวรามินิเดสในสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไข้หวัดใหญ่ H1N1-2009

ตารางที่ 2.4.1 ค่า binding free energy ระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์นิวรามิनिเดสสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ทำนายได้จากวิธี linear energy interaction (LIE) เปรียบเทียบกับค่าพลังงานที่เปลี่ยนมาจากค่า IC_{50} และ K_i ที่ได้จากการทดลอง

NA strain	ΔG_{bind} (kcal mol ⁻¹)				
	WT	N294S	H274Y	E119V	R292K
Predictive					
A/California/04/2009(H1N1)	-12.8 ± 0.9	-10.4 ± 0.9	-9.3 ± 1.0	-9.3 ± 0.8	-7.7 ± 0.7
Experimental*					
A/WSN/53 (H1N1) ^b	-12.1	-9.3	-8.5	-	-
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ^c	-11.4	-8.8	-8.1	-	-
A/Vietnam/1203/04 (H1N1) ^c	-13.0	-11.2	-8.5	-	-
A/Vietnam/1203/04 (H5N1) ^d	-13.1	-10.5	-9.3	-	-
A/Sydney/597 (H3N2) ^e	-12.8	-8.3	-	-8.6	-7.3
A/Wuhan/359/05 (H3N2) ^e	12.4	-	-	9.1	6.2

Means and standard deviations are derived from four separate 5-ns simulations

The experimental ΔG_{bind} for different strains of N1 and N2, converted from the K_i inhibitory and IC_{50} values, are also given for comparison

* $\Delta G_{experimental}$ was calculated from the experimental data using the following references: (b) Abed et al. 2008, (c) Yen et al. 2007, (d) Collins et al. 2008 and (e) Yen et al. 2005

2.4.4 อภิปรายและวิจารณ์

จากการระบาดของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ (2009 Influenza A subtype H1N1) ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้ยกระดับเตือนภัยเป็นระดับ 6 ที่เป็นระดับของการแพร่กระจายไปทั่วโลก ทางกลุ่มวิจัยได้ติดตามและลงมือทำการวิจัยตั้งแต่วันที่ 27 เมษายน พ.ศ. 2552 พบว่ายาทามิฟลูสามารถรักษาไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ชนิดนี้ได้ดี เนื่องจากยาสามารถเข้าจับในบริเวณ binding site ของเอนไซม์นิวรามินิเดส N1 ได้อย่างเหมาะสมและจับได้ดีกว่าเอนไซม์นิวรามินิเดส N1 ของไข้หวัดนก H5N1 [Rungrotmongkol et. al., Biochem Biophys Res Commun 2009] จากนั้นกลุ่มวิจัยได้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องและทำนายการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ โดยทำการเปลี่ยนตำแหน่งกรดอะมิโนตำแหน่งต่างๆ ดังนี้ H274Y, N294S, E119V และ R292K จากผลการวิจัยพบว่าลำดับการดื้อยาทามิฟลูเป็นดังนี้ R292K > E119V ~ H274Y > N294S ซึ่งชี้ให้เห็นว่าถ้าเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง R292K จะส่งผลให้เกิดการดื้อยาต่อยาทามิฟลูรุนแรงมากที่สุด ซึ่งในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 พบว่าการกลายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ที่ตำแหน่ง H274Y ของเอนไซม์นิวรามินิเดสส่งผลให้เกิดการดื้อยาทามิฟลู

2.4.5 ข้อเสนอแนะและประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

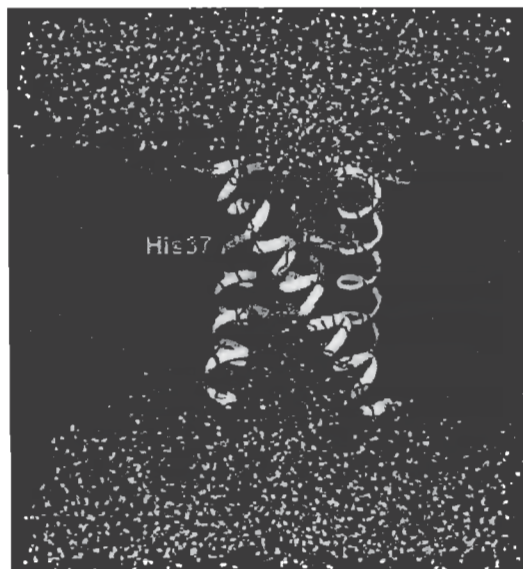
ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเพิ่มความรู้ความเข้าใจมากยิ่งขึ้นเกี่ยวกับกระบวนการหรือกลไกการยับยั้งการแพร่พันธุ์ของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกและไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ 2009 ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลในการติดตามการกลายพันธุ์หรือการอุบัติขึ้นของไข้หวัดสายพันธุ์ใหม่ในปีต่อๆ ไปอีกด้วย

2.5 ผลงานวิจัยเรื่อง

Phongphanphanee S, Rungrotmongkol T, Yoshida N, **Hannongbua S**, Hirata F. "Proton transport through the influenza A M2 channel: three-dimensional reference interaction site model study." *J Am Chem Soc.*, 2010, 132, 9782-8. (IF=8.588)

2.5.1 สรุปเนื้อหา

ศึกษากลไกการแพร่ของน้ำและไอออนไฮโดรเนียมผ่านโปรตีน M2 ของไข้หวัดชนิด A ที่สภาวะปิดและเปิด ซึ่งแทนด้วยการเติมโปรตอนทีกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 ด้วยระเบียบวิธี 3D-RISM จากผลการแพร่ของน้ำในระบบ 0H, 1H และ 2H ซึ่งให้เห็นว่าโปรตีน M2 อยู่ในสภาวะปิด ขณะที่การแพร่ของไอออนไฮโดรเนียมจะไม่เกิดขึ้นเลย แต่ในสภาวะเปิด (โปรตีน M2 ในระบบ 3H และ 4H) จะพบการแพร่ผ่านของไอออนไฮโดรเนียมในช่อง M2 โดยค่าพลังงานการแพร่ในระบบ 3H จะมีค่าต่ำกว่าระบบ 4H ประมาณ 2 kcal/mol จากข้อมูลที่ได้จากการคำนวณสามารถนำไปใช้ตั้งสมมติฐานกลไกการแพร่ของน้ำและไอออนไฮโดรเนียมผ่านโปรตีน M2 ของไข้หวัดชนิด A ได้ดังนี้ ไอออนไฮโดรเนียมจะส่งผ่านโปรตอนให้กับกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 ผ่านทางพันธะไฮโดรเจน หลังจากนั้นกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 อีกตัวที่ถูกโปรตอนจะปล่อยโปรตอนให้กับโมเลกุลน้ำ ซึ่งน้ำตัวนี้ก็ส่งโปรตอนต่อไปสู่น้ำโมเลกุลอื่นถัดไป



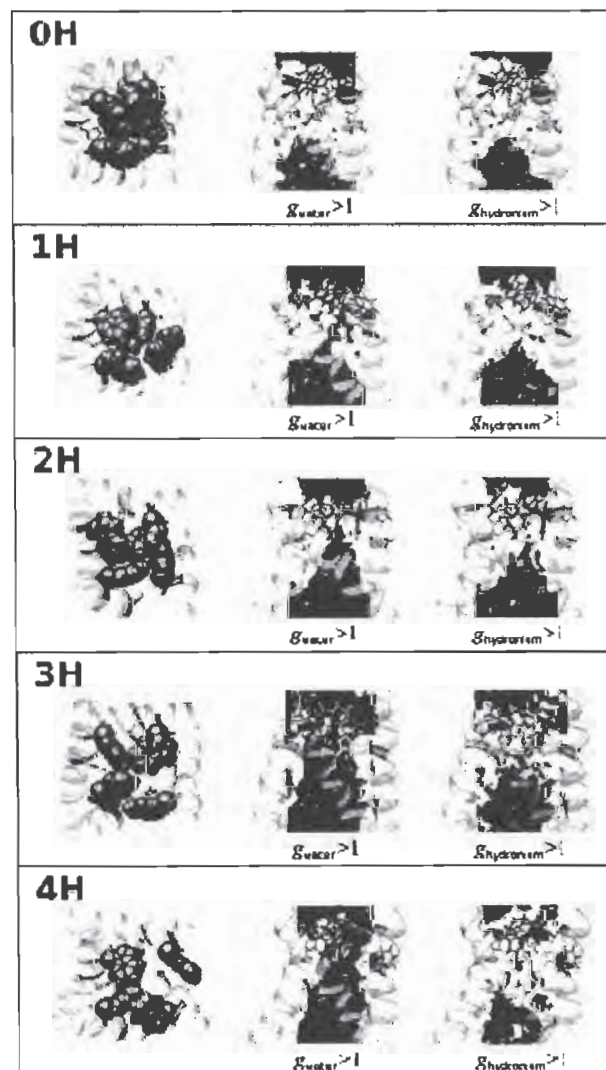
รูปที่ 2.5.1 โครงสร้างโปรตีน M2 ของไวรัสไข้หวัดนกที่ฝังอยู่ในเมมเบรน

2.5.2 วิธีการดำเนินการวิจัยโดยสังเขป

ใช้โครงสร้างจำลองสามมิติของ โปรตีน M2 ที่อยู่ในสารละลายที่ pH ต่างๆ ที่ได้ตีพิมพ์ไปก่อนหน้านี้ [Intharathep et. al., Journal of molecular graphics and modeling 2008] เป็นโครงสร้างเริ่มต้นในการศึกษาด้วยวิธีคำนวณทางเคมีคอมพิวเตอร์แบบใหม่ คือ ทรีไดเมนชันนอลเรฟเฟอเรนซ์อินเตอร์แอคชันไซต์โมเดล (three-dimensional reference interaction site model, 3D-RISM) เพื่อศึกษากลไกการส่งผ่านโปรตอนผ่านท่อโปรตีน M2 เมื่อ pH มีค่าต่ำลง โดยใช้สารละลาย HCl เข้มข้น 0.01 M และพารามิเตอร์ของโปรตีนได้จาก AMBER99

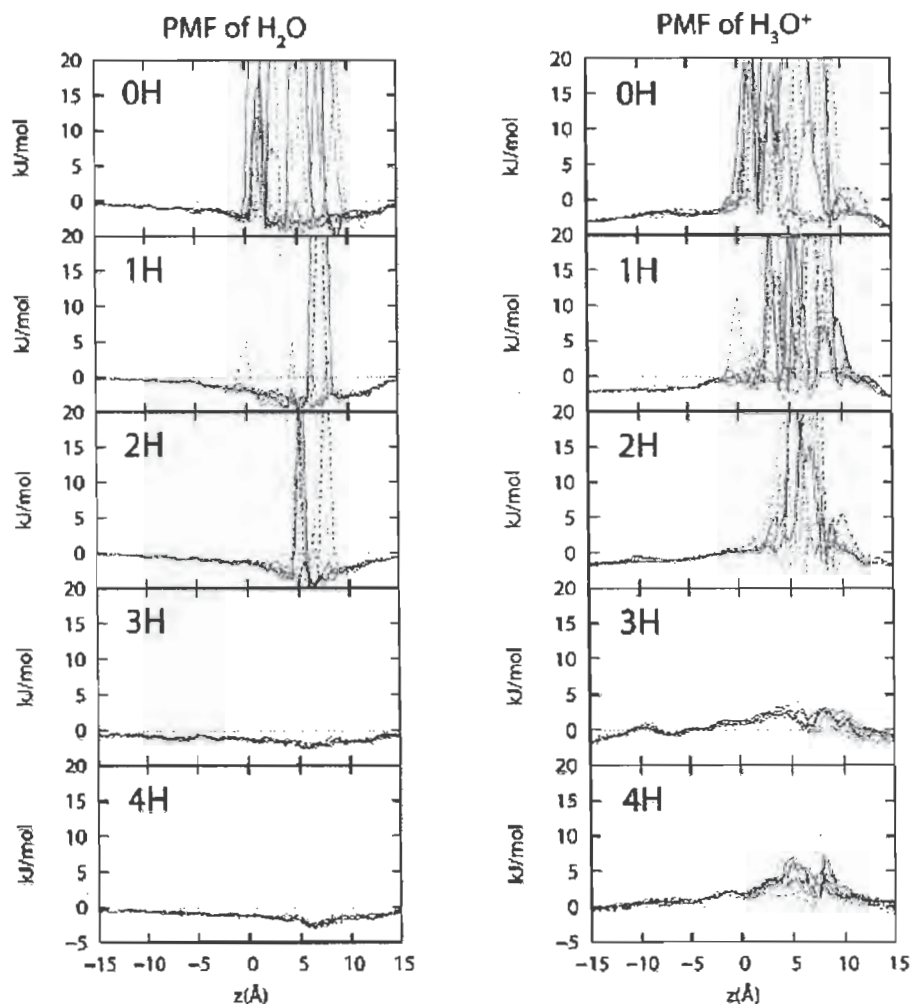
2.5.3 ผลการวิจัย

การแพร่ผ่านของน้ำและไอออนไฮโดรเนียมผ่านโปรตีน M2 ที่สภาวะต่าง ๆ ที่คำนวณด้วยระเบียบวิธี 3D-RISM แสดงในรูปที่ 2.5.2



รูปที่ 2.5.2 การแพร่ของน้ำ (สีฟ้า) และไอออนไฮโดรเนียม (สีแดง) ผ่านโปรตีน M2

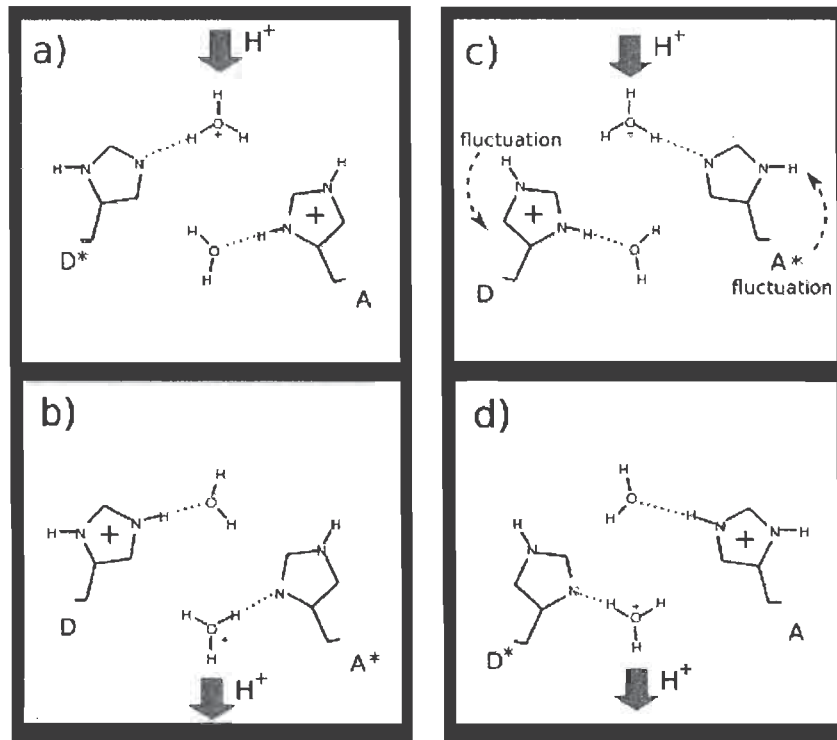
รูปที่ 2.5.2 แสดงให้เห็นว่าน้ำจะสามารถแพร่ผ่านท่อ M2 ในระบบ 3H และ 4H ซึ่งแทนสภาวะที่ pH ต่ำเท่านั้น ขณะที่ไอออนไฮโดรเนียมไม่สามารถแพร่ผ่านท่อ M2 ได้เลย ซึ่งสอดคล้องกับพลังงาน PMF ของน้ำและไอออนไฮโดรเนียมในรูปที่ 2.5.3 กล่าวคือ ในระบบ 0H, 1H และ 2H ซึ่งแทนสภาวะ pH สูง ต้องให้พลังงานแก่ระบบมากกว่า 20 kJ/mol เพื่อให้ น้ำและไอออนไฮโดรเนียมผ่านท่อ M2 แต่ในระบบ 3H และ 4H นั้นไม่ต้องให้พลังงานเลยโมเลกุลน้ำก็สามารถแพร่ผ่านได้ (spontaneous water transport) ตรงข้ามกับไอออนไฮโดรเนียมที่ยังต้องให้พลังงานแก่ระบบประมาณ 3-5 kJ/mol ในระบบ 3H และที่น่าสนใจก็คือ เมื่อระบบอยู่ในสภาวะที่ pH ต่ำมากๆ หรือระบบ 4H นั้น ต้องใช้พลังงานแก่ระบบมากขึ้นประมาณ 2 kJ/mol ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าไอออนไฮโดรเนียมมีแรงผลักรุนแรงกับกรดอะมิโน His37 ในผนังท่อ M2 จำนวน 4 ตัวที่มีประจุบวกทั้งหมดในระบบ 4H



รูปที่ 2.5.3 พลังงาน PMF (kJ/mol) ของการแพร่ของน้ำ (ซ้าย) และไอออนไฮโดรเนียม (ขวา) ผ่านโปรตีน M2 ในแนวที่สภาวะต่าง ๆ

2.5.4 อภิปรายและวิจารณ์

ผลจากการคำนวณข้างต้นสามารถนำไปใช้ตั้งสมมติฐานกลไกการแพร่ของน้ำและไอออนไฮโดรเนียมผ่านโปรตีน M2 ของไข้หวัดได้ดังรูปที่ 2.5.4



รูปที่ 2.5.4 สมมติฐานกลไกการส่งผ่านโปรตอนที่ได้จากการคำนวณด้วยวิธี 3D-RISM

ไอออนไฮโดรเนียมจะส่งผ่านโปรตอนให้กับกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 (D*) ผ่านทางพันธะไฮโดรเจน หลังจากนั้นกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 อีกตัวที่ถูกโปรตอน (A) จะปล่อยโปรตอนให้กับโมเลกุลน้ำ ซึ่งน้ำตัวนี้ก็ส่งโปรตอนต่อไปสู่น้ำโมเลกุลอื่นถัดไป จากนั้นกรดอะมิโนฮิสติดีน His37 ทั้งสองก็จะมีการเปลี่ยนแปลงคอนฟอร์เมชันเพื่อรับและส่งผ่านโปรตอนในวงจรครั้งต่อไป

2.5.5 ข้อเสนอแนะและประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัยที่ได้

ผลของงานวิจัยเป็นความรู้พื้นฐานของการส่งผ่านโปรตอนในโปรตีน M2 ของเชื้อไข้หวัดนก สามารถนำไปใช้อธิบายกลไกของโปรตีนนี้ในเชื้อไข้หวัดชนิด A สายพันธุ์อื่นๆ ที่ใกล้เคียงกับไข้หวัดนกได้

บทที่ 3

การอภิปรายผล

งานวิจัยใช้กระบวนการทางเคมีคอมพิวเตอร์เพื่อออกแบบ จำลองและศึกษาสมบัติทางโครงสร้างและพลวัตของโมเลกุลของโปรตีนจากไวรัสโรคไขหวัดใหญ่ 3 กลุ่ม คือ ฮีแมกกลูตินิน นิวรามินิเดส และ M2 แชนแนล การศึกษาโปรตีนฮีแมกกลูตินินเพื่ออธิบายในเรื่องการยึดจับระหว่างไกลโคโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสและตัวรับชนิดอัลฟา 2,6 ที่พบในเซลล์ของมนุษย์ งานวิจัยเปรียบเทียบสมบัติทางโครงสร้างและทางพลวัตของโปรตีนฮีแมกกลูตินินของเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่สายพันธุ์ A H1N1 จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ H1-1918, H1-1930, H1-2005, และ H1-2009 ซึ่งยึดเกาะกับตัวรับในมนุษย์ พบว่าทั้ง 4 ระบบนั้น ตัวรับมีอันตรกิริยาที่สำคัญกับโปรตีนฮีแมกกลูตินินโดยเฉพาะที่กรดอะมิโนตำแหน่ง Y95 บริเวณลูป-130 เกลียว-190 และลูป-220 กรดอะมิโนที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับระหว่างฮีแมกกลูตินินกับตัวรับ ได้แก่ V135 T136 A137 K222 และ Q226 ซึ่งอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายกับที่พบในฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H1 ของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ แต่ค่อนข้างแตกต่างจากจากฮีแมกกลูตินินในกลุ่มของ H3 H5 และ H9

การศึกษา M2 แชนแนลเพื่อให้เข้าใจถึงวิธีการที่ยาริมานดาตินเข้าไปยับยั้งการส่งผ่านโปรตอนในช่องโปรตีน M2 ของไวรัสไขหวัดใหญ่ผ่านกลไกแบบอัลโลสเตอริก (allosteric mechanism) งานวิจัยนี้จำลองพลวัตเชิงโมเลกุลของระบบโปรตีน M2 โดยมีโมเลกุลของยาริมานดาติน 4 โมเลกุลถูกวางในตำแหน่งด้านนอกช่อง M2 และอยู่ระหว่างซับยูนิตที่อยู่ใกล้บริเวณ Trp41 ได้ทำการศึกษาที่ 3 สภาวะคือ สภาวะปิด, สภาวะอินเตอร์มีเดียต และสภาวะเปิด ในสภาวะปิดพบว่าช่อง M2 มีการสร้างโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงระหว่างเรสิดิว RMT- Asp44-Trp41 ทำให้ประจุ Trp41 จัดวางตัวในลักษณะปิด ดังนั้นที่สภาวะนี้พบว่าน้ำที่ผ่านช่อง M2 ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับที่สภาวะอินเตอร์มีเดียตพบว่าไม่ปรากฏโครงข่ายพันธะไฮโดรเจน RMT- Asp44-Trp41 มีเพียงพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่าง RMT-Asp44 เท่านั้น ส่วนในสภาวะเปิดนั้นพบว่าแรงผลักรวมของประจวบกับเรสิดิว His37 ทำให้ Trp41 เปลี่ยนการวางตัวเป็นลักษณะเปิดซึ่งยากต่อการสร้างโครงข่ายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเรสิดิว RMT-Asp44-Trp41 จึงทำให้ที่สภาวะนี้ น้ำสามารถผ่านเข้ามาภายในช่อง M2 ได้ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องเป็นอย่างดีกับการวัดค่าโพเทนเชียลออฟมินฟอร์ซที่พบว่าที่สภาวะปิดมีค่ามากที่สุด รองลงมาคือสภาวะอินเตอร์มีเดียต และมีค่าน้อยที่สุดในสภาวะเปิด

การศึกษาโปรตีนนิวรามินิเดสชนิด wild-type และ mutants ที่ตำแหน่งต่าง ๆ สำหรับสายพันธุ์ H1N1-2009 กับการยึดจับกับยาทามิฟลู โดยใช้ระเบียบวิธีทางโมเลกุลาร์ไดนามิกซิมูเลชัน ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าแรงกระทำเชิง electrostatic interaction และพันธะไฮโดรเจนระหว่างยาทามิฟลูและเอนไซม์นิวรามินิเดสชนิดกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง E119V และ R292K ลดลงอย่างมาก ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องการดื้อยาของ mutant ดังกล่าว การทำนายประสิทธิภาพของยาทามิฟลูตามความสามารถในการยึดจับได้เป็นลำดับดังนี้ wild-type > N294S > H274Y > E119V > R292K

บทที่ 4

สรุปการวิจัย

รายงานวิจัยเรื่องกระบวนการทางชีวสารสนเทศเชิงโครงสร้างสำหรับการพัฒนา: ความเข้าใจพื้นฐานระดับโมเลกุลของโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำ/โรคไข้หวัดใหญ่ ได้เสนอข้อมูลและผลการวิจัยที่ดำเนินในช่วงระหว่างปี 2552-2554 โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาในระดับโมเลกุลของโปรตีนจากเชื้อไวรัสโรคไข้หวัดใหญ่ 3 ชนิด ได้แก่ ฮีแมกกลูตินิน (hemagglutinin), นิวรามินิเดส (neuraminidase) และ M2 membrane protein การดำเนินงานวิจัยอาศัยทั้งวิธีทางทฤษฎีร่วมกับข้อมูลจากการทดลองเพื่อให้เข้าใจพื้นฐานเชิงโครงสร้างระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮีแมกกลูตินิน ในเรื่องเกี่ยวกับความจำเพาะที่มีต่อชนิดของตัวรับใน host cell ชนิดต่างๆ ได้แก่ คน นกและหมู ศึกษาอันตรกิริยาระหว่างยากับเอนไซม์นิวรามินิเดส หรือกับโปรตีน M2 ชนิด wild-type และ mutants ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มี impact factor

เอกสารอ้างอิง

1. R.J. Russell, L.F. Haire, D.J. Stevens, P.J. Collins, Y.P. Lin, G.M. Blackburn, A.J. Hay, S.J. Gamblin, J.J. Skehel, The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design, *Nature*. 443 (2006) 45-49.
2. P.M. Colman, J.N. Varghese, W.G. Laver, Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase, *Nature*. 303 (1983) 41-44.
3. J. Stevens, O. Blixt, T.M. Tumpey, J.K. Taubenberger, J.C. Paulson, and I.A. Wilson, Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* 312 (2006) 404-410.
4. Kukol, A., Adams, P.D., Rice, L.M., Brunger, A.T., and Arkin, I.T. Experimentally based orientational refinement of membrane protein models: a structure for the influenza A M2 H⁺ channel. *J. Mol. Biol.* 286 (1999) 951-962.
5. Wang, J., Kim, S., Kovacs, F., and Cross, T.A.. Structure of the transmembrane region of the M2 protein H⁺ channel. *Protein Sci.* 10(2001) 2241-2250.
6. A.C. Bateman, M.G. Busch, A.I. Karasin, N. Bovin, and C.W. Olsen, Amino acid 226 in the hemagglutinin of H4N6 influenza virus determines binding affinity for alpha-2,6-linked sialic acid and infectivity levels in primary swine and human respiratory epithelial cells. *Journal of Virology* 82 (2008) 8204-8209.
7. A.S. Gambaryan, A.I. Karasin, A.B. Tuzikov, A.A. Chinarev, G.V. Pazynina, N.V. Bovin, M.N. Matrosovich, C.W. Olsen, and A.I. Klimov, Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Research* 114 (2005) 15-22.
8. M.N. Matrosovich, A.S. Gambaryan, S. Teneberg, V.E. Piskarev, S.S. Yamnikova, D.K. Lvov, J.S. Robertson, and K.A. Karlsson, Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233 (1997) 224-234.
9. Sakaguchi, T., Tu, Q., Pinto, L.H., and Lamb, R.A.. The active oligomeric state of the minimalistic influenza virus M2 ion channel is a tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(1997), 5000-5005.
10. Hu, J., Fu, R., Nishimura, K., Zhang, L., Zhou, H.-X., Busath, D.D., Vijayvergiya, V., and Cross, T.A. Histidines, heart of the hydrogen ion channel from influenza A virus: Toward an understanding of conductance and proton selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006). 6865-6870.

11. Duff, K.C., and Ashley, R.H. The transmembrane domain of influenza A M2 protein forms amantadine-sensitive proton channels in planar lipid bilayers. *Virology* 190 (1992) 485-489.
12. C. Laohpongspaisan, T. Rungrotmongkol, P. Intharathep, M. Malaisree, P. Decha, O. Aruksakunwong, P. Sompornpisut, S. Hannongbua. "Why amantadine loses its function in influenza m2 mutants: MD simulations", *J Chem Inf Model.* 49(2009) 847-52.
13. P.A. Reece, Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses, *J. Med. Virol.* 79 (2007) 1577–1586.
14. J.L. McKimm-Breschkin, P.W. Selleck, T.B. Usman, M.A. Johnson, Reduced sensitivity of influenza A (H5N1) to oseltamivir, *Emerg. Infect. Dis.* 13 (2007) 1354-1357.
15. O. Ferraris, B. Lina, Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance, *J. Clin. Virol.* 41 (2008) 13-19.

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติที่มี Impact factor (IF) ในฐานะข้อมูล ISI จำนวน 5 เรื่อง ดังนี้

1. Nunthaboot N, Rungrotmongkol T, Malaisree M, Kaiyawet N, Decha P, Sompornpisut P, Poovorawan Y, **Hannongbua S.** “Evolution of human receptor binding affinity of H1N1 hemagglutinins from 1918 to 2009 pandemic influenza A virus.” *J Chem Inf Model.*, 2010, 50, 1410-7.(IF=3.882)
2. Intharathep P, Rungrotmongkol T, Decha P, Nunthaboot N, Kaiyawet N, Kerdcharoen T, Sompornpisut P, **Hannongbua S.** “Evaluating how rimantadines control the proton gating of the influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations.” *J Enzyme Inhib Med Chem.*; 26,162-8.
3. Phongphanphanee S, Rungrotmongkol T, Yoshida N, **Hannongbua S,** Hirata F. “Proton transport through the influenza A M2 channel: three-dimensional reference interaction site model study.” *J Am Chem Soc.*, 2010, 132, 9782-8. (IF=8.588)
4. Nunthaboot N, Rungrotmongkol T, Malaisree M, Decha P, Kaiyawet N, Intharathep P, Sompornpisut P, Poovorawan Y, **Hannongbua S.** Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin” *Monatshefte Fur Chemie*, 2010, 141, 801-807. (IF=1.312)
5. Rungrotmongkol T, Malaisree M, Nunthaboot N, Sompornpisut P, **Hannongbua S.** “Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach.” *Amino Acids.* , 2010, 39, 393-8. (IF=3.877)

Evolution of Human Receptor Binding Affinity of H1N1 Hemagglutinins from 1918 to 2009 Pandemic Influenza A Virus

Nadtanet Nunthaboot,[†] Thanyada Rungrotmongkol,^{‡,§} Maturros Malaisree,[‡] Nopporn Kaiyawet,[‡] Panita Decha,^{||} Pornthep Sompornpisut,[‡] Yong Poovorawan,[⊥] and Supot Hannongbua^{*,‡}

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, 44150, Thailand, Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand, Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand, Computational Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung 93110, Thailand, and Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Received January 27, 2010

The recent outbreak of the novel 2009 H1N1 influenza in humans has focused global attention on this virus, which could potentially have introduced a more dangerous pandemic of influenza flu. In the initial step of the viral attachment, hemagglutinin (HA), a viral glycoprotein surface, is responsible for the binding to the human SIA α 2,6-linked sialopentasaccharide host cell receptor (hHAR). Dynamical and structural properties, based on molecular dynamics simulations of the four different HAs of Spanish 1918 (H1-1918), swine 1930 (H1-1930), seasonal 2005 (H1-2005), and a novel 2009 (H1-2009) H1N1 bound to the hHAR were compared. In all four HA–hHAR complexes, major interactions with the receptor binding were gained from HA residue Y95 and the conserved HA residues of the 130-loop, 190-helix, and 220-loop. However, introduction of the charged HA residues K145 and E227 in the 2009 HA binding pocket was found to increase the HA–hHAR binding efficiency in comparison to the three previously recognized H1N1 strains. Changing of the noncharged HA G225 residue to a negatively charged D225 provides a larger number of hydrogen-bonding interactions. The increase in hydrophilicity of the receptor binding region is apparently an evolution of the current pandemic flu from the 1918 Spanish, 1930 swine, and 2005 seasonal strains. Detailed analysis could help the understanding of how different HAs effectively attach and bind with the hHAR.

INTRODUCTION

The emerging influenza pandemic of the 2009 influenza A/H1N1 virus, with readily detected human–human transmission rates, has raised serious global concern for human health in recent times. Among the known targets determining the virus life's cycle, the initial step of viral attachment is mediated by HA binding the virion to the host cell receptor, α 2,6 linked sialopentasaccharide (SIA-2,6-GAL; hHAR) in the case of humans. Amino acid mutations in the HA receptor binding domain could potentially introduce an outbreak of a new influenza virus. Relative to the 1918 Spanish (H1-1918), the 1930 swine (H1-1930), and the 2005 seasonal (H1-2005) H1N1 viruses, the HA binding pocket of the 2009 H1N1 (H1-2009) virus was found to display a notably higher hydrophilicity than the other three viral HAs. Such types of electronic effects, in cooperation with the structural differences due to the amino acid components (Table 1) in the

binding pocket of the four HAs, are supposed to affect their susceptibility. A detailed and comparative understanding of the HA–hHAR binding among the four H1N1 strains is, then, the rational goal of this study.

On June 11, 2009, the WHO raised the alert status of the 2009 influenza A/H1N1 to level 6.¹ This novel H1N1 pandemic has caused at least 18 000 deaths in many countries around the world (as of July 2010). The most devastating influenza pandemic, 1918 H1N1 Spanish Flu, killed more than 40 million people worldwide.^{2–4} The replication cycle of influenza virus is initiated by the attachment of the viral HA to sialylated glycans on the target cell-surface receptor, allowing for viral penetration into the host cell. While the adopted sialic acid α 2,3-galactose linkage with a short glycan chain and cone-like topology is more favorable in avian influenza virus, the human and swine influenza viruses preferentially recognizes the sialic acid α 2,6-galactose with longer glycan chains and an umbrella like topology,^{5–10} hereafter referred to the hHAR. Besides HA functions, the M2-proton channel and neuraminidase (NA) are associated with the proton transport and the release of the newly synthesized viral particles in the viral replication cycle. Although the antiviral drugs approved against M2 ion channel and NA proteins are currently used for the treatment of influenza virus infections, the limitation of drug resistances because of amino acid mutations has led to an effort to

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +66 22 187602. Fax: +66 22 187603. E-mail: supot.h@chula.ac.th.

[†] Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University.

[‡] Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

[§] Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University.

^{||} Computational Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University.

[⊥] Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

Table 1. Comparison of Amino Acids in the HA Receptor Binding Domain of the Four Different H1N1 Influenza Viruses: The 1918 Spanish Flu (H1-1918), 1930 Swine Flu (H1-1930), 2005 Seasonal Flu (H1-2005), and 2009 Novel Flu (H1-2009)^a

residue ID	H1N1 HA strains			
	H1-1918	H1-1930	H1-2005	H1-2009
95	Y	Y	Y	Y
133	T	T	<u>N</u>	<u>N</u>
133a	K	R	R	K
134	G	G	G	G
135	V	V	V	V
136	T	T	T	T
137	A	A	A	A
138	A	A	A	A
145	S	S	<u>N</u>	K
153	W	W	<u>W</u>	<u>W</u>
155	T	<u>V</u>	<u>V</u>	<u>V</u>
183	H	H	H	H
185	P	P	P	P
186	P	P	P	S
189	T	T	T	A
190	D	D	D	D
192	Q	Q	Q	Q
193	S	S	S	S
194	L	L	L	L
219	A	A	E	I
222	K	K	K	K
225	D	G	G	D
226	Q	<u>Q</u>	<u>Q</u>	Q
227	A	A	A	E
228	G	G	G	G

^a Residues are numbered (residue ID) according to 1918 Spanish flu sequence. Using H1-1918 as the reference, the residue differences in the other three isolates are shown in bold and underlined. Residue K133a is an inserted amino acid specific to H1.

discover new potent inhibitors. Impacts of drug-resistant mutant strains of these two targeted proteins and their relevant commercial agents have been extensively studied.^{11–14}

The viral genetic sequences in the HA receptor binding domain of the four different H1N1 influenza viruses, that is, the 1918 Spanish flu, 1930 swine flu, 2005 seasonal flu, and 2009 novel flu, are compared and are summarized in Table 1 (see multiple sequence alignment in Figure S1, Supporting Information). Using the original 1918 H1N1 HA as the reference, the amino acids at 7 Å spherical radius around the hHAR in the binding pockets of the H1-1930, H1-2005, and H1-2009 HAs contain three (K133aR, T155V, and D225G), six (T133N, K133aR, S145N, T155V, A219E, and D225G), and seven (T133N, S145K, T155V, P186S, T189A, A219I, and A227E) substitutions (shown in bold and underlined in Table 1), respectively. From a comparison of the hydrophobic plots (Figure 1), the 2009 HA binding pocket displays considerably higher hydrophilic characteristics (represented by the blue surface) than those of the other three HA strains. Since the residues 190 and 225 are known to be a key factor determining the HA–hHAR binding in all H1N1 subtypes,^{15–20} and the HAs of all H1N1 strains contain D190, therefore, interest is focused on residue 225 in which G225 was found in the 1930 swine and 2005 seasonal viruses, whereas D225 was detected in the HAs of the two pandemic strains, H1-1918 and H1-2009 (Table 1). In addition, residue A227, which is the receptor binding site that is commonly conserved as “Q226–A227–G228” (QAG) was replaced by E227 in the novel 2009 influenza virus. Substitution of A227 by the negatively charged E227 residue

(QEG) is supposed to affect the orientation of the surrounding residues.¹⁸ As a consequence, the increase of the hydrophilicity and the replacement of the QAG by the QEG receptor binding site of the H1-2009 HA are possibly involved in the recognition and familiarity-strength in the binding to the hHAR of the newly emerged flu.

To examine the influence of the electronic and structural changes in the four HA binding pockets, molecular dynamics (MD) simulations of the hHAR bound to the four HA A/H1N1 influenza viruses were carried out. The HA–hHAR binding, as well as the structural and dynamical properties, were analyzed and are extensively discussed. The observed information at the atomic level could essentially provide a better understanding and a prediction of the new H1N1 influenza pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

System Preparation. The cocrystal structure of the 1930 swine influenza A/H1N1 HA (H1-1930) with the hHAR and the crystal structure of the apo form of the 1918 influenza A/H1N1 HA (H1-1918), were retrieved from the Protein Data Bank (PDB entry codes 1RVT and 1RUZ, respectively)²¹ and were used as the starting structures for the MD simulations. To prepare the hHAR bound to the H1-1918 HA, superposition of the H1-1930 and the H1-1918 HA proteins over the backbone carbon atoms was performed, and the H1-1930 coordinates were then removed, retaining the coordinates of hHAR. The structure of the 2005 seasonal H1N1 HA complexed with the hHAR was prepared in a similar fashion of the H1-2009.²² Briefly, using the structure of 1930 swine flu²¹ as a template and amino acid sequences of the isolated Influenza A/swine/Chachoengsao/NIAH587/2005(H1N1),²³ the 3D-structure of the 2005 HA protein was created by homology modeling technique using the module implemented in Discovery Studio 2.0.²⁴ The hHAR bound to the H1-2005 HA was set up in a similar manner to that of the aforementioned H1-1918.

Molecular Dynamics Simulations. All calculations of the HA–hHAR complexes were carried out using the AMBER 10 software package.²⁵ The HA proteins and the hHAR were parametrized using the AMBER03²⁶ and GLYCAM06 force fields,²⁷ respectively. Protonation of the ionizable amino acids was assigned at pH 7.0 using the PROPKA program.^{28,29} All missing hydrogen atoms were added using the LEaP module implemented in AMBER 10.²⁵ The simulated system was subsequently solvated by TIP3P water molecules in a cubic box with dimensions of 65 × 68 × 143 Å³ for H1-1918, 65 × 68 × 141 Å³ for H1-1930, and 67 × 68 × 141 Å³ for H1-2005. This is almost comparable to that of 66 × 69 × 141 Å³ used before for the H1-2009 complex.²² The electroneutrality of the simulated systems was treated by adding 1, 0, 4, and 5 chloride counterions for H1-1918, H1-1930, H1-2005, and H1-2009, respectively. The periodic boundary condition in the isobaric–isothermal (NPT) ensemble with a constant pressure of 1 atm and temperature of 310 K was set up, whereas a Berendsen coupling time of 0.2-ps was employed to control the temperature. Nonbonded interactions were calculated with a 12 Å residue-based cutoff, and the Particle Mesh Ewald method³⁰ was applied to treat the long-range electrostatic interactions. A 2-fs step size with the SHAKE algorithm³¹ was used along the simulations.

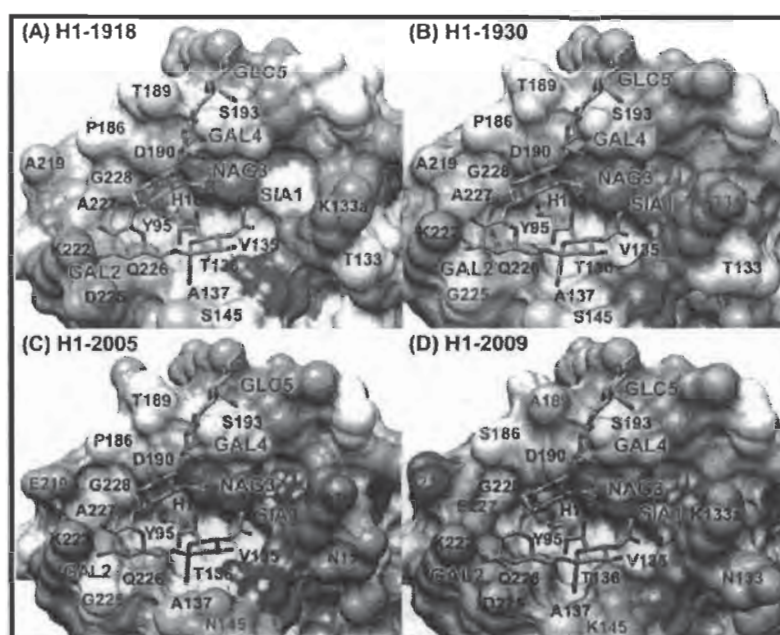


Figure 1. The hHAR in the binding pocket of the four viral influenza A/H1N1 HAs: (A) 1918 Spanish flu (H1-1918), (B) 1930 swine flu (H1-1930), (C) 2005 seasonal flu (H1-2005), and (D) 2009 novel pandemic flu (H1-2009). For H1-1930, H1-2005, and H1-2009, the residues that differ from the reference H1-1918 sequence are shown in red. The hydrophilic and hydrophobic surfaces are colored by blue and orange, respectively.

The water molecules were first relaxed with 500 steps of steepest descent (SD) and 1000 steps of conjugated gradient minimizations, while the HA and hHAR coordinates were kept fixed. The whole system was consequently optimized by performing 1,000 steps of SD and 1,000 steps of conjugated gradient minimizations. Afterward, the systems were heated to 310 K over 100-ps simulation and pre-equilibrated for 400 ps with position restraints on the hHAR atoms with factors of 20 and 10 kcal·mol⁻¹·Å⁻² to maintain their coordinates inside the receptor-binding pocket. Finally, 6.5-ns simulations were carried out for each HA-hHAR complex and the structural coordinates from the last 5-ns (1.5–6.5-ns) simulations, a production period, were collected for analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Changes of the Receptor Conformation Inside the H1 Binding Pocket. The attachment of the viral surface homotrimeric glycoprotein HA to the host membrane via the hHAR is believed to be the primary step in the viral replication cycle. To differentiate the receptor's conformation in the binding pocket of the HAs of the Spanish flu (H1-1918), swine flu (H1-1930), seasonal flu (H1-2005), and a novel pandemic flu (H1-2009), the distributions of the torsion angles ($\tau 1$ – $\tau 9$ in Figure 2) were measured and are plotted in Figure 3. As defined in Figure 2, $\tau 1$ – $\tau 9$ were classified in three important regions providing three different characters of the receptor binding: (i) $\tau 1$ – $\tau 3$, conformations of terminal sialic acid (SIA1) $\alpha 2,6$ -linked to galactose (GAL2) of the hHAR; (ii) $\tau 4$ – $\tau 6$, orientations of the three side chains of the SIA1 functional groups; and (iii) $\tau 7$ – $\tau 9$, bridging between the saccharide units 2–5 of the receptor.

The distributions of the torsion angle plots (Figure 3), excluding $\tau 9$ of H1-1930 and $\tau 4$ of H1-2005, reveal clearly that all torsion angles of the four HA-hHAR systems show

a sharp peak at almost the same position, suggesting that the hHAR adapts itself very well to reach its optimal structure within the four H1N1 HA binding sites.

The $\tau 1$ – $\tau 3$ angles on the single bonds linking between the six-membered rings of the SIA1 terminus and the GAL2 unit show a sharp peak at approximately -65° , -165° and 70° , respectively, indicating an identical orientation of these two sugars puckered into the HA pocket site. The $\tau 1$ glycosidic torsion of approximately -65° represents their cis-conformation on the α -ketosidic linkage corresponding to those commonly observed in the SIA- $\alpha 2,6$ -GAL receptor (hHAR) bound to other HAs by both experimental and theoretical studies.^{21,32–35} Considering the orientations of the three side chains of the SIA1, the difference was only found at the carboxylate group of the H1-2005 in which its $\tau 4$ was detected at $\sim 30^\circ$ relative to $\sim 180^\circ$ for the other HAs, that is, in difference from the other systems, the O1A group (see Figure 2) of the H1-2005 was rotated into the binding site to interact with the HA residues. The $\tau 6$ angle of the hydrophilic moiety displayed a sharper peak than the $\tau 4$ of the $-\text{COO}^-$ and $\tau 5$ of the $-\text{NHAc}$ groups, indicating that these two side chains are slightly more flexible in a narrow range in comparison with the hydrophilic group of the terminal SIA1.

For the remaining sugar moieties lying on the surface-exposed region of the hHAR protein (see Figure 1), the structural conformations of the NAG3 and GAL4 were found to be similar among the four HAs, as presented by the same degrees of $\tau 7$ and $\tau 8$ angles (-70° and -80° , respectively, in Figure 3). However, the orientation of the last glycan unit, GLC5, in the H1-1930 ($\tau 9$ of 65° , red line) was somewhat different from the other three HAs ($\tau 9$ of -65°). Therefore, different intermolecular interactions of the terminal GLC5 sugar of the saccharide chain with the protein surface residues

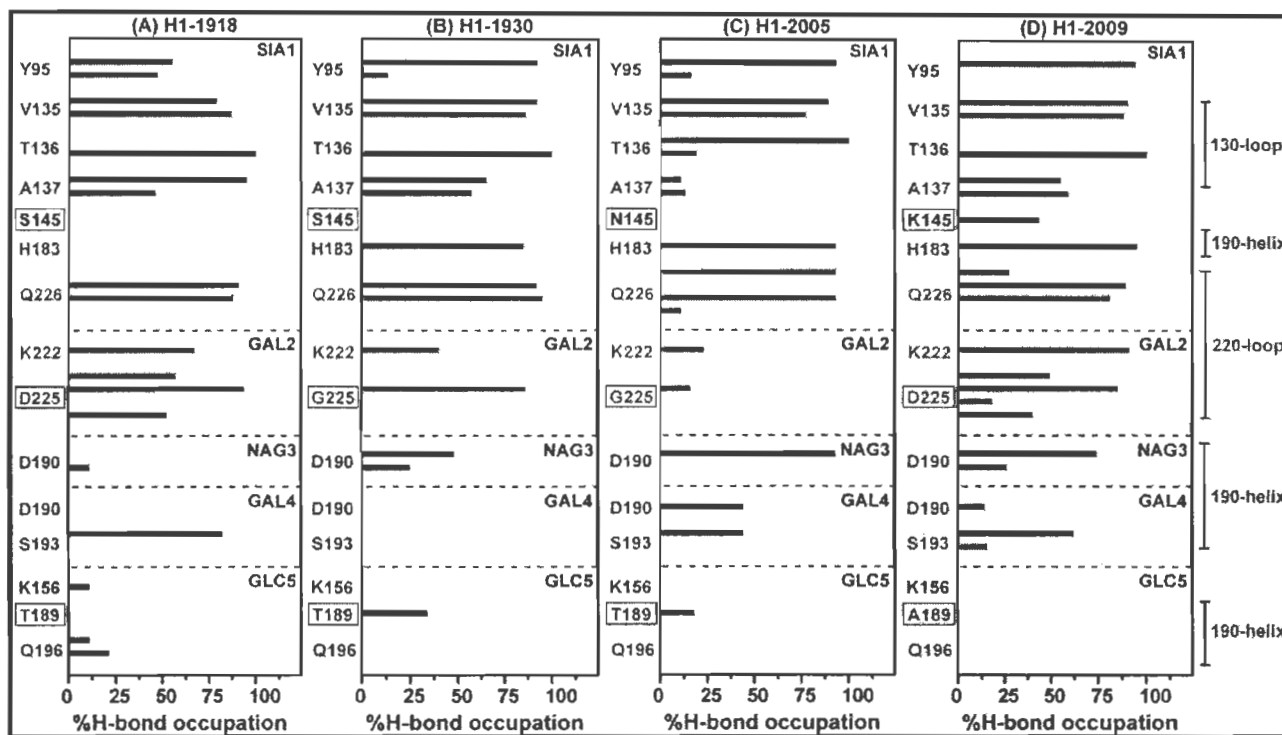


Figure 4. Hydrogen bond occupation between the five saccharide units (SIA1, GAL2, NAG3, GAL4, and GLC5) of the hHAR and the HA binding residues of (A) Spanish flu (H1-1918), (B) swine flu (H1-1930), (C) seasonal flu (H1-2005), and (D) a novel flu (H1-2009). The residues which are different among the four HAs are shown with a box around the label (see Figure 1 for residue positions). Residues of the 130-loop, 190-helix, and 220-loops are colored by red, blue, and green, respectively.

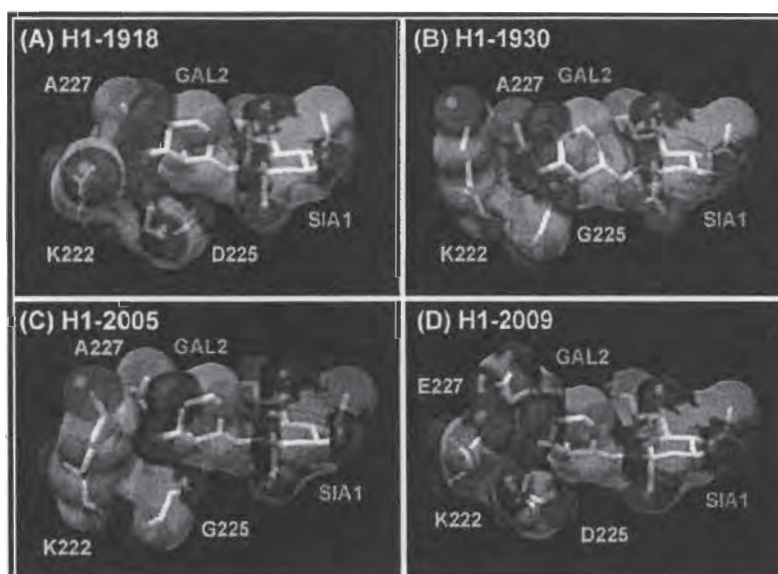


Figure 5. Electrostatic potential map of hHAR and HA binding residues K222, D/G/G/D225 and A/A/A/E227 of (A) Spanish flu (H1-1918), (B) swine flu (H1-1930), (C) seasonal flu (H1-2005), and (D) novel flu (H1-2009). Positive and negative electrostatic potentials are represented by blue and red, respectively.

(see Figure 5D and more discussion in the next section), whereas only D225 was observed to stabilize K222 in the case of H1-1918. This is in contrast with what was found for the H1-1930 and H1-2005 viruses, where both the G225 and A227 residues are hydrophobic, leading to a lowering of the electrostatic potential in this region, relative to those of the other two systems. This provides a clear reason why K222 could not form a stable hydrogen bond with GAL2 in the H1-1930 and H1-2005 HAs (Figure 4B and C, respectively). This hypothesis is further analyzed in terms of the

electrostatic potential plot in the next section. A crucial role of residue 225 has been reported previously,^{16–18} with the additional hypothesis that mutation of this residue could result in a reduced viral binding affinity to the hHAR. It has also been experimentally found that the presence of the G225 residue in the HA of H1-1930 and H1-2005 apparently reduced the binding efficiency of the virus to the hHAR.^{3,16,18}

With respect to the NAG3, GAL4, and GLC5 saccharide units, which lay on the surface exposed region (Figure 1), far from the binding pocket, and are supposed to play only

a minor role in holding the receptor in place, a lower percentage and number of hydrogen bonds were found (Figure 4) in comparison to those observed at the first two units (SIA1 and GAL2) of the receptor. Their interactions were moderately strong with 190-helix residues T/T/A189, D190, and S193.

Taking into account all the above given data, the order of hydrogen bond strengths of the hHAR binding to the H1N1 HAs was H1-2009 > H1-1918 > H1-2005 \cong H1-1930. The increase of binding affinity in the novel H1-2009 (H1N1) HA to the hHAR is mainly because of the higher hydrophilicity at the receptor binding domain, in which residues 145, 225, and 227 were found to play a critical role. The transmissibility of the 2009 H1N1 virus (depending upon several external factors and determined by the basic reproduction number, R_0 of 1.2–1.6) falls within the range of the 1918 Spanish flu (R_0 of 1.4–2.8) but is higher than that of seasonal influenza virus (R_0 of 0.9–2.1).^{37,38} This transmission ability is supposed to relate, somewhat, to the predicted enzyme-receptor binding affinity. Note that the pathogenesis and transmission studies of the 2009 H1N1 influenza virus indicated that a novel flu was observed to be more pathogenic than the seasonal H1N1 virus.^{38,39} Since the 2009 influenza virus could deeply penetrate into the airways and exhibits more extensive viral replication in the respiratory tract, its severity could potentially increase in comparison with seasonal virus.^{38,39}

Effect of Charged Residues on the Receptor Binding Affinity. As already mentioned, hydrogen bond analysis revealed that introduction of charged amino acids in the receptor binding domain of the novel HA influenza virus could effectively contribute to the binding with the hHAR, in particular HA residues 222, 225, and 227. Therefore, to provide an additional perspective on the contribution of the polar residues to the hHAR-HA binding, the electrostatic isosurface maps of the hHAR and the HA 222, 225, and 227 residues were plotted in Figure 5. The positive and negative electrostatic potentials are indicated by blue and red, respectively.

In all systems, the negative electrostatic potentials (Figure 5, red) were found around the SIA1 and GAL2 units of the hHAR, while a positive electrostatic potential was generated over the K222 residue (Figure 5, blue). Differences between the four viral HAs are clearly and obviously observed in the region around the 225 and 227 residues. Here, changing the negatively charged D225 residue in the 1918- and 2009-H1N1 models to a nonpolar G225 residue (Table 1) leads to the negative electrostatic potential around residue 225 almost totally disappearing (the red regions in Figure 5A and D change to white in Figure 5B and C, respectively). In addition, the substitution of a nonpolar A227 residue of the 1918-, 1930-, and 2005-H1N1 HAs (Table 1) with a negatively charged E227 residue in the HA of H1-2009 leads additionally to an enhanced negative electrostatic potential around the 227 residue (the red region, which is only observed in Figure 5D).

As a consequence, the electrostatically negative potentials near residues D225 and E227 are unique in the H1-2009 H1N1 isolate (of the four studied) and the enhanced electronegative isosurface could potentially stabilize the ionic network of the 220-loop residues K222, D225, and E227. This helps the K222 residue to adjust its conformation to be

in optimal contact with the GAL2 moiety of the hHAR, leading to the formation of a strong hydrogen bond in the H1-2009 HA-hHAR complex (Figure 4D), as previously discussed. On the other hand, the electrostatic potentials that result from the combination of the charged- and noncharged residues (D225 and A227) can potentially induce the moderate K222-GAL2 hydrogen bond formation in the H1-1918 HA-hHAR interaction (Figure 4A). This is not the case for the H1-1930 and H1-2005 HAs (Figure 4B and C, respectively), where this hydrogen bond is very weak because both G225 and A227 are fully uncharged and could not establish such ionic network with the K222.

Role of the Nonconserved Residue 227. Although residue 227 was found to vary between the influenza A viral strains, the receptor binding residues Q226 and G228 are highly conserved, forming a “Q226-X227-G228” pattern or so-called “QXG” site, where QSG and QGG sites are found in the avian H3 or H5 and H2 influenza virus HAs, respectively.^{18,40} In this study, both the 1918-, 1930-, and 2005-H1N1 strains contain the QAG sequences, whereas the 2009-novel flu (H1-2009) shows a unique QEG site. The increased hydrophilicity in the receptor binding region is apparently the development of the current pandemic flu from the 1918 Spanish, the 1930 swine, and the seasonal 2005 influenzas. As shown and described in the previous sections, substitution of the noncharged A227 residue with the negatively charged E227 improves the binding of HA to the hHAR, and this is potentially attained by establishing the ionic network with the K222 and D225 residues. This finding thus indicates that the nonconserved residue 227 possibly plays a critical role in the evolution of a new and potentially more pathogenic H1N1 influenza virus. Note that among the three residues in the HA QXG site of the four H1 strains under this study, Q226 is the only residue that interacts directly with the hHAR via strong hydrogen bonds (Figure 4).

Human HAR Solvation. Solvation of the hHAR was monitored in terms of atom-atom radial distribution functions, RDFs, $g_{xy}(r)$, the probability of finding a particle of type y within a sphere radius r around the particle of type x . The RDFs from all heteroatoms of the hHAR to the oxygen atom of water were evaluated. The selected RDFs and the corresponding running coordination numbers, $n(r)$, are shown in Figure 6.

For all HA-hHAR complexes, the major differences in the $g(r)$ at the SIA1 terminus takes place only on the O1B atom (see Figure 2 for atomic label), where the plot for the H1-2005 complex shows the first sharp peak at ~ 2.7 Å with the corresponding coordination number $n(r)$ integrated up to its first minimum of 2.8 water molecules (Figure 6B, right axis). This indicates that the water was firmly coordinated to the O1B atom of the H1-2005, but not in the HA-hHAR systems of H1-1918, H1-1930, and H1-2009. This is because of the interchange of the O1A and O1B positions due to the rotation of the τ_4 angle (see Figure 3).

Although no significant difference was found in terms of the peak position of the RDFs of the other atoms of the SIA1 (Figure 6A, C, and D), the $n(r)$ of the H1-1918, H1-1930, and H1-2005 show a higher average number of water molecules located around this glycan unit than that detected in the H1-2009. In other words, the SIA1 of the hHAR in the HA-hHAR complex of the H1-2009 virus is less solvated than that with the other three HAs. This is consistent with the hydrogen bond

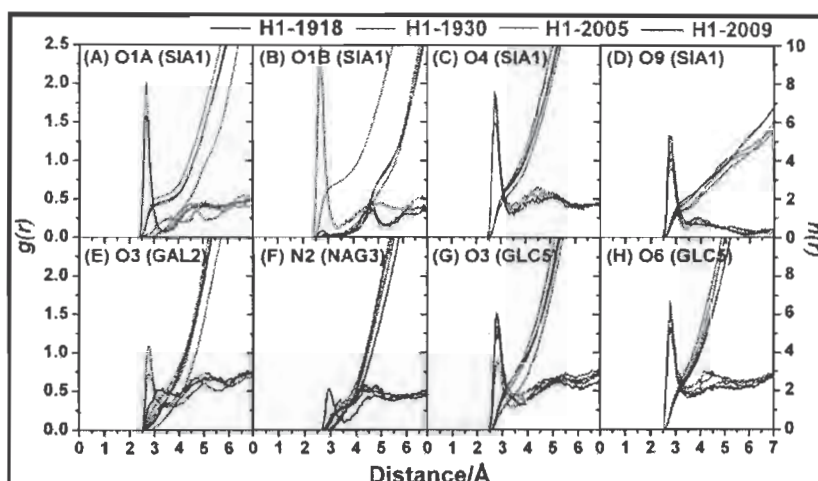


Figure 6. Radial distribution function, $g(r)$, centered on the selected heteroatoms of the hHAR (see Figure 2 for atomic labels) to oxygen atoms of water molecules and the running coordination number, $n(r)$, for the four simulated HA–hHAR systems.

data (Figure 4), where a greater level of direct contact leads to the formation of more hHAR–HA hydrogen bonds with the H1-2009 than with the other three viral strains. A clear example is the moderate hydrogen bonding between the O4 atom of SIA1 of the hHAR and the guanidinium group of the HA K145 residue that only takes place in H1-2009 (Figure 4D). Another example that supports the degree of the solvation of O9 atom (Figure 6D) is the strong hydrogen bonding between this oxygen and the HA H183 residue, which is in a reverse order of the first shell coordination numbers for O9 of 1.5, 1.5, 2.0, and 2.5 water molecules for H1-2005, H1-1930, H1-2009, and H1-1918, respectively.

For the other four glycan units, the following significant differences were found: O3 of GAL2 (Figure 6E), N2 of NAG3 (Figure 6F), and O3 of GLC5 (Figure 6G), in which the degree of solvation also supports the hydrogen bond data discussed previously (Figure 4).

CONCLUSION

In the present work, MD simulations of the hHAR bound to the four different HAs of the 1918-, 1930-, 2005-, and 2009-H1N1 influenza viruses were studied and compared in terms of hydrogen bond formation, receptor conformational changes, the role of the receptor binding residues and the receptor solvation level.

In all complexes, the glycosidic torsion angle linking the terminal sialic acid and the adjoining GAL2 of approximately -65° confirmed the preferentially favorable *cis*-conformation of the hHAR, similar to that detected with other HA strains.^{34,35} The SIA1 terminus was found to interact strongly with the HA Y95 residue and with the conserved residues of the HA receptor binding domain, which consists of the 130-loop (V135, T136 and A137), 190-helix (H183, except for H1-1918), and 220-loop (K222 and Q226) through many strong hydrogen bonds, whereas the GAL2 and the last three glycan units (NAG3, GAL4 and GLC5) of the hHAR established hydrogen bonds with amino acids in the HA 220-loop and 190-helix, respectively. More importantly, the crucial presence of a positively charged K145 residue in the HA of the novel H1-2009 can potentially make a lysine fence with residues K133, K156, and K222 and provides an optimal contact to hydrogen bond with the SIA1 of the hHAR. Because of the presence of an uncharged

S/S/N145 residue in place of the K145, such an ionic network was not created in the Spanish 1918, swine 1930, or seasonal 2005 virions, resulting in the lower potency of HA–hHAR binding. As observed in the all H1N1 strains,^{15,18,20} HA residue 225 plays a critical role in the hHAR GAL2 binding efficiency. The presence of a negatively charged D225 residue in the HAs of the H1-1918 and H1-2009 could provide a larger number of hydrogen bonds in the HA–hHAR complex than that observed in H1-1930 and H1-2005, where a noncharged G225 residue exists instead. Q226 of the QAG (1918-, 1930-, and 2005-H1N1) or QEG (2009-H1N1) HA sequence directly interacts with the hHAR SIA1 terminus via hydrogen bonds, while the nonconserved 227 residue was found to play a role in stabilizing the enzyme structure around the K222 residue. Introduction of the negatively charged HA E227 residue in the H1-2009 substantially enhanced the HA–hHAR binding efficiency through hydrogen bonds formation between the HA K222 residue and the GAL2 unit of the hHAR. The lower hydrogen bonding interactions in the H1-1918, H1-1930, and H1-2005 HAs were compensated by a higher degree of water accessibility to the hHAR.

In conclusion, the efficiency of the hHAR binding to the HA of the novel 2009 H1N1 viral strain is greater than that in the 1918 Spanish and the 2005 seasonal (which is comparable to the 1930 swine) influenza viruses, respectively. A major contribution to the virion HA–cellular hHAR binding in H1-2009 is apparently gained from the charged residues existing in the HA binding pocket. Our simulated results provide a better understanding of how the viral surface glycoprotein HA of different H1N1 strains efficiently attach and bind to the hHAR.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF), the Commission Higher Education (CHE), and the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture. N.N. (grant No. MRG5180298) and T.R. (grant No. TRG5280035) acknowledge the TRF grant for the new research. P.S. gratefully acknowledges the support from the Emerging Diseases and Bio-Warefare project, the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University.

Supporting Information Available: Multiple sequence alignment of all four H1N1 strains and hydrogen bond descriptions. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

REFERENCES AND NOTES

- World Health Organization. Global Alert and Response (GAR). <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html> (accessed July 10, 2010).
- Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **2009**, *459*, 931–939.
- Shen, J.; Ma, J.; Wang, Q. Evolutionary trends of A(H1N1) influenza virus hemagglutinin since 1918. *PLoS One* **2009**, *4*, e7789.
- Krug, R. M.; Aramini, J. M. Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 269–277.
- Chandrasekaran, A.; Srinivasan, A.; Raman, R.; Viswanathan, K.; Raguram, S.; Tumpey, T. M.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 107–113.
- Bateman, A. C.; Busch, M. G.; Karasin, A. I.; Bovin, N.; Olsen, C. W. Amino acid 226 in the hemagglutinin of H4N6 influenza virus determines binding affinity for 2,6-linked sialic acid and infectivity levels in primary swine and human respiratory epithelial cells. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8204–8209.
- Gambaryan, A. S.; Karasin, A. I.; Tuzikov, A. B.; Chinarev, A. A.; Pazyninab, G. V.; Bovin, N. V.; Matrosovich, M. N.; Olsen, C. W.; Klimov, A. I. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus. Res.* **2005**, *114*, 15–22.
- Matrosovich, M. N.; Gambaryan, A. S.; Teneberg, S.; Piskarev, V. E.; Yamnikova, S. S.; Lvov, D. K.; Robertson, J. S.; Karlsson, K. A. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* **1997**, *23*, 224–234.
- Rogers, G. N.; D'Souza, B. L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* **1989**, *173*, 317–322.
- Bewley, C. A. Illuminating the switch in influenza viruses. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 60–62.
- Laohongspaisan, C.; Rungrotmongkol, T.; Intharathep, P.; Malaisree, M.; Decha, P.; Aruksakunwong, O.; Sompornpisut, P.; Hannongbua, S. Why amantadine loses its function in influenza M2 mutants: MD simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 847–852.
- Ghosh, A.; Nandy, A.; Nandy, P.; Gute, B. D.; Basak, S. C. Computational study of dispersion and extent of mutated and duplicated sequences of the H5N1 influenza neuraminidase over the period 1997–2008. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2627–2638.
- Udommaneeethanakit, T.; Rungrotmongkol, T.; Bren, U.; Freerer, V.; Stanislav, M. Dynamic behavior of avian influenza A virus neuraminidase subtype H5N1 in complex with oseltamivir, zanamivir, peramivir, and their phosphonate analogues. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2323–2332.
- Rungrotmongkol, T.; Intharathep, P.; Malaisree, M.; Nunthaboot, N.; Kaiyawet, N.; Sompornpisut, P.; Payungporn, S.; Poovorawan, Y.; Hannongbua, S. Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *385*, 390–394.
- Glaser, L.; Stevens, J.; Zamarin, D.; Wilson, I. A.; Garcia-Sastre, A.; Tumpey, T. M.; Basler, C. F.; Taubenberger, J. K.; Palese, P. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11533–11536.
- Stevens, J.; Blixt, O.; Tumpey, T. M.; Taubenberger, J. K.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* **2006**, *312*, 404–410.
- Taubenberger, J. K. Influenza hemagglutinin attachment to target cells: "Birds do it, we do it". *Future Virol.* **2006**, *1*, 415–418.
- Matrosovich, M.; Tuzikov, A.; Bovin, N.; Gambaryan, A.; Klimov, A.; Castrucci, M. R.; Donatelli, I.; Kawaoka, Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* **2000**, *74*, 8502–8512.
- Yang, Z. Y.; Wei, C. J.; Kong, W. P.; Wu, L.; Xu, L.; Smith, D. F.; Nabel, G. J. Immunization by avian H5 influenza hemagglutinin mutants with altered receptor binding specificity. *Science* **2007**, *317*, 825–828.
- Stevens, J.; Blixt, O.; Glaser, L.; Taubenberger, J. K.; Palese, P.; Paulson, J. C.; Wilson, I. A. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1143–1155.
- Gamblin, S. J.; Haire, L. F.; Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Xiao, B.; Ha, Y.; Vasisht, N.; Steinhauer, D. A.; Daniels, R. S.; Elliot, A.; Wiley, D. C.; Skehel, J. J. The structure and receptor-binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* **2004**, *303*, 1838–1842.
- Nunthaboot, N.; Rungrotmongkol, T.; Malaisree, M.; Decha, P.; Kaiyawet, N.; Intharathep, P.; Sompornpisut, P.; Poovorawan, Y.; Hannongbua, S. Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin. *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 801–807.
- Influenza virus resource. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/SwineFlu.html> (accessed Apr 25, 2009).
- Discovery Studio 2.0; Accelrys Inc: San Diego, CA, 2007.
- Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, III, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Crowley, M.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvary, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Mathews, G. C. D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Kollman, P. A. *AMBER10*; University of California: San Francisco, CA, 2008.
- Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M. C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T.; Caldwell, J.; Wang, J.; Kollman, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1999–2012.
- Tessier, M. B.; Demarco, M. L.; Yongye, A. B.; Woods, R. J. Extension of the GLYCAM06 biomolecular force field to lipids, lipid bilayers and glycolipids. *Mol. Simulat.* **2008**, *34*, 349–364.
- Li, H.; Robertson, A. D.; Jensen, J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins* **2005**, *61*, 704–721.
- Bas, D. C.; Rogers, D. M.; Jensen, J. H. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes. *Proteins* **2008**, *73*, 765–783.
- Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- Ryckaert, J.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- Lin, T.; Wang, G.; Li, A.; Zhang, Q.; Wu, C.; Zhang, R.; Cai, Q.; Song, W.; Yuen, K. Y. The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology* **2009**, *392*, 73–81.
- Kumari, K.; Gulati, S.; Smith, D. F.; Gulati, U.; Cummings, R. D.; Air, G. M. Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Viol. J.* **2007**, *4*, 42–53.
- Li, M.; Wang, B. Computational studies of H5N1 hemagglutinin binding with SA- α -2, 3-Gal and SA- α -2, 6-Gal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 662–668.
- Xu, D.; Newhouse, E. I.; Amaro, R. E.; Pao, H. C.; Cheng, L. S.; Markwick, P. R.; McCammon, J. A.; Li, W. W.; Arzberger, P. W. Distinct glycan topology for avian and human sialopentasaccharide receptor analogues upon binding different hemagglutinins: A molecular dynamics perspective. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 465–491.
- Soundararajan, V.; Tharakaraman, K.; Raman, R.; Raguram, S.; Shriver, Z.; Sasisekharan, V.; Sasisekharan, R. Extrapolating from sequence—the 2009 H1N1 "swine" influenza virus. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 510–513.
- Coburn, B. J.; Wagner, B. G.; Blower, S. Modeling influenza epidemics and pandemics: insights into the future of swine flu (H1N1). *BMC. Med.* **2009**, *7*, 30–37.
- Munster, V. J.; de Wit, E.; van den Brand, J. M.; Herfst, S.; Schrauwen, E. J.; Bestebroer, T. M.; van de Vijver, D.; Boucher, C. A.; Koopmans, M.; Rimmelzwaan, G. F.; Kuiken, T.; Osterhaus, A. D.; Fouchier, R. A. Pathogenesis and transmission of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus in ferrets. *Science* **2009**, *325*, 481–483.
- Maines, T. R.; Jayaraman, A.; Belser, J. A.; Wadford, D. A.; Pappas, C.; Zeng, H.; Gustin, K. M.; Pearce, M. B.; Viswanathan, K.; Shriver, Z. H.; Raman, R.; Cox, N. J.; Sasisekharan, R.; Katz, J. M.; Tumpey, T. M. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice. *Science* **2009**, *325*, 484–487.
- Chen, J.; Fang, F.; Yang, Z.; Liu, X.; Zhang, H.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Chen, Z. Characterization of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from poultry markets in central China. *Virus. Res.* **2009**, *146*, 19–28.

RESEARCH ARTICLE

Evaluating how rimantadines control the proton gating of the influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations

Pathumwadee Intharathap^{1,2}, Thanyada Rungrotmongkol^{1,3}, Panita Decha⁴, Nadtanet Nunthaboot⁵, Nopporn Kaiyawet¹, Teerakiat Kerdcharoen², Pornthep Sompornpisut¹, and Supot Hannongbua^{1,3}

¹Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, ²Physics Department and Centre of Nanoscience and Nanotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, ³Centre of Innovative Nanotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, ⁴Computational Chemistry Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University, Phattalung, Thailand, and ⁵Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand

Abstract

In order to understand how rimantadine (RMT) inhibits the proton conductance in the influenza A M2 channel via the recently proposed "allosteric mechanism", molecular dynamics simulations were applied to the M2-tetrameric protein with four RMTs bound outside the channel at the three protonation states: the 0H-closed, 1H-intermediate and 3H-open situations. In the 0H-closed state, a narrow channel with the RMT-Asp44-Trp41 H-bond network was formed, therefore the water penetration through the channel was completely blocked. The Trp41-Asp44 interaction was absent in the 1H-intermediate state, whilst the binding of RMT to Asp44 remained, which resulted in a weakened helix-helix packing, therefore the channel was partially prevented. In the 3H-open state it was found that the electrostatic repulsion from the three charged His37 residues allowed the Trp41 gate to open, permitting water to penetrate through the channel. This agreed well with the potential of the means force which is in the following order: 0H > 1H > 3H.

Keywords: H1N1 strain; protonation state; potential of means force; proton transport

Introduction

The influenza A viruses, both the impending isolates such as H5N1 and the recent new strain (H1N1), are a vital and emergent problem of the global flu pandemic [1–2]. One of the important targets for disruption of the replication process is based on the fact that the integral M2 membrane protein pH gated channel is required in the early and late stages of infection [3–5]. Amantadine (AMT) and rimantadine (RMT) are the first effective drugs licensed for influenza treatment and function as antivirals via inhibition of the function of the M2 proton transporter. Besides pore blocking [6–7], which is a conventional mechanism, a new novel allosteric mechanism where four RMTs were found to bind outside the pore, was recently proposed based on an NMR study [8].

This highlights the need to understand how RMT controls the gating residue of the M2-channel. The present study aims to provide information at the molecular level for the development of more effective drugs.

The M2 protein of the influenza A virus functions as a proton selective channel that is activated at the low pH of the endosome after endocytosis of the virus. In the early stages of infection, the M2 proton transporter leads to acidification of the viral interior from the acidic endosomal compartment following cellular endocytosis and this is required for the unpacking of the viral genome via release of viral nucleoproteins prior to viral replication. Whilst in the later stages of infection, the M2 proton port is required to transport protons from the transgolgi membrane to the host cell cytoplasm to

Address for Correspondence: Supot Hannongbua, Centre of Innovative Nanotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel: +66 22 187602; Fax: + 66 22 187603; E-mail: supot.h@chula.ac.th

(Received 15 January 2010; revised 18 March 2010; accepted 23 March 2010)

ISSN 1475-6366 print/ISSN 1475-6374 online © 2010 Informa UK Ltd
DOI: 10.3109/14756366.2010.482530

<http://www.informahhealthcare.com/enz>



equalise the pH and so prevent premature conformational rearrangement of the newly synthesised haemagglutinin during transport to the host cell surface membrane [5]. The M2 protein is structurally a homotetramer which is stabilised in part by the disulphide bridges between the N terminal domain cysteine residues near the membrane, with each 97 amino acid monomer being composed of a 24-residue N-terminal extracellular domain, an α -helix single trans-membrane (TM) domain of 19 residues and a 54-residue cytoplasmic domain [9]. The TM helix of M2 (M2-TM) spans the hydrophobic region of the membrane and includes a few hydrophilic residues at either end. The M2-TM forms tetrameric bundles and binds adamantane-based drugs, acting as the full M2 protein does, both in the micelles [10] and in the lipid bilayers [11–14].

Although the model structures of M2-TM are experimentally [12–17] and computationally available [18–29], high resolution structures have only recently been determined [7,8]. X-ray diffraction analysis has been used to solve the M2-TM structures under neutral and low pH conditions. The crystal structure revealed that a single AMT molecule in the pore of the channel was surrounded by Val27, Ala30, Ser31 and Gly34 [27,28]. In contrast, Schnell and Chou reported an NMR structure for the peptide spanning residues 18–60 in detergent micelles at high pH [8], where four RMT molecules were bound outside of the protein helix, facing the lipid bilayer and located in the membrane environment at the end of the helix towards the cytoplasmic face of the channel (Figure 1). Drug binding includes interactions with Leu40-Arg45 residues and, in particular the hydrogen bond formation between the $-\text{NH}_2$ group of RMT and the $-\text{COO}^-$ group of Asp44 appears to be important [8]. This newly proposed channel inhibition model is known as the allosteric mechanism [29]. The novel external drug binding was suggested to stabilise the closed state, thus making the channel more rigid and difficult to rearrange the four helices to allow the channel to open. Although the NMR structure of the M2-TM region

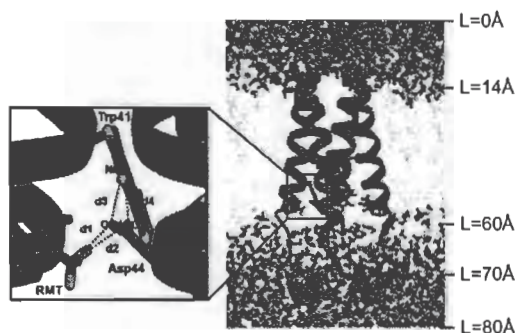


Figure 1. The initial structure of the tetrameric M2 protein complexed with four rimantadines (RMTs) bound outside the channel in the pre-equilibrated lipid bilayer-water pieces where L represents the distance along a channel axis starting from the extracellular site. The structure of the His37 tetrad has been coloured orange. Close view of the RMT-Asp44-Trp41 hydrogen bond network with definitions of the d1–d4 distances are also shown. (See colour version of this figure online at www.informahealthcare.com/enz)

seems to be very well solved, the drug-binding site around Asp44 is not well defined and RMT adopts too many possible conformations. Even within a single NMR structure, each of the four RMT molecules displays a noticeable variability in the hydrogen bond and hydrophobic interactions with the M2 binding residues [30].

In the present study, molecular dynamics (MD) simulations were carried out for the tetrameric M2 protein channel complexed with four RMTs at the three protonation states of the His37 tetrad, corresponding to: the closed (0H), intermediate (1H) and open (3H) channel conformations. The main goal was to provide detailed information at the molecular level of how RMT inhibits the M2 proton conductance through the allosteric mechanism in terms of drug-target interactions, the conformation of the Trp41 channel gate, the water density and the potential of mean force (PMF) of water permeation along the channel axis.

Methodology

Preparation of the simulated systems

The NMR structures of the M2 tetrameric helix (residues 18–60) with the C-terminal base complexed with four RMTs, as taken from the Protein Data Bank [PDB entry code: 2RLF [8], were used as the initial coordinates for the MD simulations. The simulations were carried out for the three different protonation states of the His37 residues, where all four His37 residues were considered neutral entities for the closed channel, one was positively charged for the intermediate channel and three of them were positively charged for the open channels, as a function of pH [8,12,31,32]. For simplicity, the simulations were denoted hereafter as 0H, 1H and 3H for the non-, mono- and triple-protonated states, respectively. In all the complexes, the protonation state of the ionisable amino acid residues were assigned in the following manner: side chain of Asp(24,44) and Glu(56) were considered to be negatively charged while that of Arg(45,53) was treated as positively charged. Therefore, the interhelical salt bridge between the Asp44 and Arg45 was well formed [8]. Regarding drug interactions, the relatively high pK_a values of 10.4 [33] made the side chain of the RMT have a protonated form (R-NH_3^+) [28] and consequently this $-\text{NH}_3^+$ group was in contact with the $-\text{COO}^-$ group of Asp44 at the allosteric binding region [8]. Each system was separately built according to the designed protonation state of the His37 tetrad with the RMT inhibitor bound and then inserted into a pre-equilibrated lipid bilayer, initially made up of 77 molecules of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine (POPC) lipid [34] embedded in 3760 molecules of FLEXSPC water [35]. The simulated systems were neutralised by counterions and the solvated box dimensions were set to $70 \text{ \AA} \times 70 \text{ \AA} \times 80 \text{ \AA}$.

MD simulations

All calculations were performed using the GROMACS 3.2.1 package [36] with the GROMACS force field [37]. The inhibitor's topology file was taken from our previous studies [28, 38].

The whole structure was optimised by the steepest descent minimisations. In the next stage, the system was equilibrated for 0.5 ns with position restraints on the protein atoms to improve the packing of the lipid bilayer around the protein, followed by a free MD simulation of 16 ns during which time the structural coordinates were saved every 0.5 ps.

For all the simulations, the periodic boundary condition with fixed pressure P , temperature T , and number of atoms N (NPT ensemble) was employed. The LINCS algorithm [39] was applied to constrain the bond lengths and the angles involving hydrogen atoms and a 2 fs time step was used. The systems were coupled separately to a Berendsen temperature bath [40] at 310 K using a coupling constant $\tau_T=0.1$ ps. The pressure (1 bar) was kept constant by semi-isotropic coupling of the system to a Berendsen pressure bath [40]. The long-range interactions were restricted to within the twin-range cutoffs of 1.2 nm for both van der Waals interactions and electrostatic interactions, computed using the Particle Mesh Ewald (PME) algorithm [41]. The analysis phase was from 8 ns to 16 ns, in which the convergences of energies, temperature, pressure and global root mean square displacement (RMSD) were used to verify the equilibrium of the system.

Free energy barrier for water permeation

The energy barrier of the water transport throughout the M2 channel was calculated with an analogous treatment according to Raschke and Levitt [43]. The PMF of the water permeation along the channel axis can be derived from the water density plot according to:

$$\text{PMF} = -RT \ln w(r) \quad (1)$$

where R is the gas constant, T is the temperature in Kelvin and $w(r)$ is the probability density of the water distribution in a spherical region within a radius of r . Here, the probability density is given as:

$$w(r) = \frac{\rho_r}{\rho_{\text{total}}} \quad (2)$$

where ρ_r and ρ_{total} are the local and total water densities, respectively. In the water density calculation, r is extended to 80 Å to ensure that water molecules in the aqueous zone (bulk water) are taken into account. ρ_{total} represents the bulk water, which presumably has a total probability equal or near to 1. By employing this assumption, ρ_{total} has the maximum value of ρ_r .

Results and discussion

System stability

The RMSD for the M2-RMT complexes in the 0H, 1H and 3H states were calculated and used for monitoring the stability of the systems. The calculations were carried out relative to the initial structure (heavy atoms only) of the M2-RMT complexes and the results are shown in Figure 2. The RMSD plots indicated that all systems reached equilibrium after the 8 ns simulations.

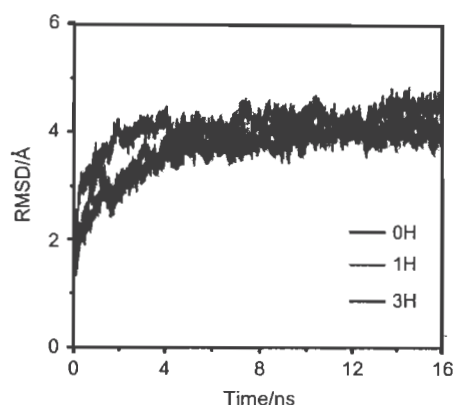


Figure 2. The root mean square displacements (RMSD) for the M2-RMT complexes in the 0H, 1H and 3H states. (See colour version of this figure online at www.informahealthcare.com/enz)

Protein-protein and drug-protein interactions

The hydrogen bond network of RMT-Asp44-Trp41 (Figure 1) has been proposed to be a vital determinant in the inhibitory mechanism of RMT when bound outside of the M2 channel [8]. To extract such information from the MD simulations, the percentage hydrogen bonding of the important central residue (Asp44) with the RMT inhibitor (RMT-Asp44), and the channel gating residue Trp41 (Asp44-Trp41) at the adjacent subunit, were evaluated based on the criteria of a proton donor-acceptor distance ≤ 3.5 Å and a donor-H-acceptor bond angle of $\geq 120^\circ$ (Table 1). The RMT-Asp44-Trp41 hydrogen bond network was described in terms of the four distances, $d1-d4$ (Figure 1), which represent the RMT-Asp44 ($d1-d2$) and Asp44-Trp41 ($d3-d4$) pair interactions (Figure 3). The plots were separately determined for the four subunits (I–IV) of the 0H, 1H and 3H protonated states of the M2 protein.

The complete RMT-Asp44-Trp41 hydrogen bond network was only present in the 0H-closed state, where the RMT-Asp44 and Asp44-Trp41 interactions were strongly and clearly detected. The sharp and narrow peaks for subunit II at the $d1$ and $d2$ distances of ~ 3.5 Å (Figure 3B) indicated the two hydrogen bonds between the RMT and Asp44, with occupations of 31% and 14% (Table 1). At the same time, a strong and more secure hydrogen bond was formed between the Asp44 of subunit II and the Trp41 of subunit III at $d3$ of about 3.5 Å (Figure 3B), with an occupancy of 80% (Table 1). The presence of this hydrogen bond network among RMT, Asp44 and Trp41 indicated that close contact between the RMT ammonium group and the Asp44 carboxylate group could bring the bulky Trp41 indole ring into van der Waals contact to form a more stable Trp41 channel gate. In addition, the RMT-Asp44 interactions at subunit III (Figure 3C), indicated by the sharp peaks of the $d1$ and $d2$ at ~ 3.5 Å, also facilitate the formation of the closed conformation of the M2 channel.

In the case of the intermediate channel conformation seen with the mono-protonated (1H) state, the shortest hydrogen bond distances were found for the RMT-Asp44 ($d1-d2$) interactions at the three subunits, I, II and III (Figures 3E–3G), whilst the Asp44-Trp41 ($d3-d4$) distances were between ~ 7

and ~ 10 Å (Figures 3E–3H). Therefore, only the rather weak interactions between the RMT and Asp44 were found (<20% occupation, Table 1). The results indicated that Asp44 in the 1H state cannot play a role as the centre of the hydrogen bond network between the inhibitor and the gating residue Trp41. The situation is totally different for the higher protonated

Table 1. Percentage of hydrogen bonds in the three (0H, 1H and 3H) protonation states between (i) the ammonium group of RMT and M2 residues and (ii) the Asp44 and Trp41 gating residues.

Interaction	% Hydrogen bond occupancy
<i>(i) RMT-M2:</i>	
0H state	
d1: (RMT-II)NH...OD1(Asp44-II)	31
d2: (RMT-II)NH...OD2(Asp44-II)	14
d1: (RMT-III)NH...OD1(Asp44-III)	10
d2: (RMT-III)NH...OD2(Asp44-III)	9
(RMT-III)NH...O(Trp41-IV)	11
(RMT-IV)NH...O(Phe48-I)	44
1H state	
d1: (RMT-I)NH...OD1(Asp44-I)	11
(RMT-I)NH...O(Asp44-I)	25
(RMT-I)NH...O(Phe47-I)	49
d1: (RMT-II)NH...OD1(Asp44-II)	12
d2: (RMT-II)NH...OD2(Asp44-II)	16
(RMT-II)NH...O(Asp44-II)	47
(RMT-III)NH...O(His57-IV)	58
3H state	
(RMT-III)NH... O(Arg45-IV)	26
(RMT-IV)NH... O(Asp44-IV)	5
(RMT-IV)NH... O(Leu46-IV)	10
<i>(ii) Asp44-Trp41*:</i>	
0H state	
d3: (Asp44-II)OD1...NE1(Trp41-III)	80

*No hydrogen bond was found for the 1H and 3H states

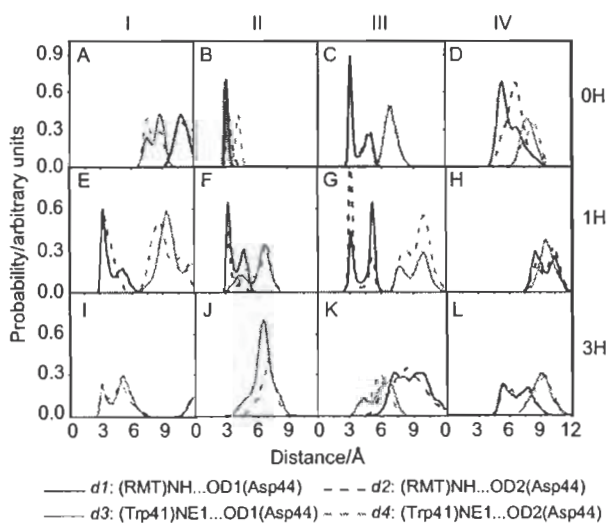


Figure 3. The distributions of the d1–d4 distances, as defined in Figure 1, for the three simulated systems: 0H, 1H and 3H, at the subunits I–IV of the M2 channel.

state, 3H, where almost no interaction amongst these three molecules was detected. This can be seen as the broad peak positions at longer distances of d1–d4 (Figures 3I–3L), without any hydrogen bond occupancy (Table 1). This observation implies that the strong electrostatic repulsion among the three protonated His37 imidazole rings in the 3H state destabilises the helix–helix packing, leading to the conformational rearrangement to break interactions between Trp41 and Asp44, and so allow the Trp41 gate to flip open (more details in the “Conformation of the Trp41 gating residue” section) and reduces the ability of RMT to bind to Asp44.

Water density across the M2 channel

To determine the inhibition ability of RMT at the allosteric site of the M2 channel, the water density profile as a function of the distance (L) along the pore-axis of the channel, starting from the N-terminal site, was evaluated. In addition, the distribution patterns of the His37 proton selectivity and the Trp41 gate opening residues were analysed in order to illustrate the movement of these critical residues (Figure 4).

In the 0H-closed state of the M2 channel, a zero water density was observed in the channel pore at $35 \text{ Å} < L < 45 \text{ Å}$ for both the free and the RMT-bound forms. This indicated that water cannot penetrate through the channel when all four His37 residues are uncharged. With respect to the intermediate state (1H), although water entry was fully inhibited at $\sim 30 \text{ Å}$ in the free form (Figure 4), a degree of water density was observed in the area of the His37 and Trp41 residues. Interestingly, in contrast a zero water density was found across this area in the M2-RMT complex. The results detected for both 0H and 1H states lead us to conclude that the four RMTs bind to the external pore side (lipid facing pocket) in the systems with neutral (pH=7.5) or one charged (pH=7) histidine residues and this not only helps to stabilise the

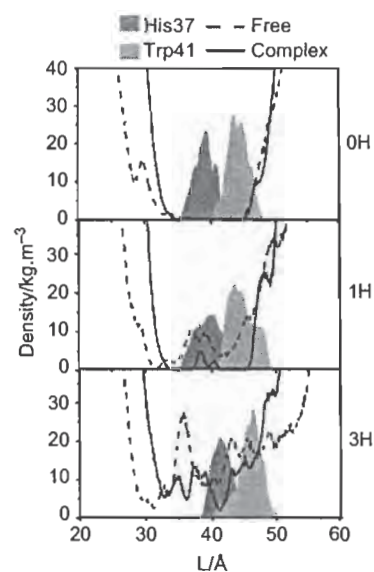


Figure 4. The water densities and the distribution patterns of the His37 selectivity and Trp41 gating residue positions in the free M2 protein and M2-RMTs complex.

M2-channel in its closed conformation but also blocks water penetration.

In contrast to the 0H and 1H protonation states discussed above, a zero water density in the RMT bound M2 channels was not observed in the 3H state (Figure 4). Although the water density in the M2-RMT complex was significantly lower than that of the free channel, the four RMT drugs bound outside the pore did not inhibit the water transport. This observation is in good agreement with a previous electrophysiological study where the binding of RMT outside of the M2 channel was found to not be the primary site for pharmacological inhibition or proton transport [30]. In contrast, water penetration was completely prevented in the 3H state when RMT was bound inside the M2 pore [28]. A clear picture of water passing through the pH sensor His37 and proton gate Trp41 residues in the 3H state can be ascribed as follows. At $\text{pH} \leq 6$, the His37 imidazole ring is protonated leading to destabilisation of the helix-helix packing due to the strong electrostatic repulsion. This conformational rearrangement leads to a breaking of the interaction between Trp41 and Asp44 residues (see Figure 3 and details discussed in the "Protein-protein and drug-protein interactions" section) and allows the gate to flip to an open form. Therefore, adding of RMT to the channel at $\text{pH} \leq 6$, when the channel is in the open form, cannot facilitate the tetrad Asp44 to play a role as a locking residue for the M2 channel.

The above notion agrees very well with the protein-protein and drug-protein interactions, in terms of the RMT-Asp44-Trp41 hydrogen bond network, where the complete hydrogen bond network was only found in the 0H state, and only moderate RMT-Asp44 hydrogen bonds were detected in the 1H state, while those interactions were completely lost for the highest (3H) protonated state.

Conformation of the Trp41 gating residue

Figure 5 shows the CA-CB-CG-CD2 torsion angle of the indole ring of the gating residue Trp41 in the three different channels. In the 0H and 1H states, the orientations of the torsional angles of the Trp41 indole rings of the four M2 subunits are considerably similar. All rotations occur within the range of 30° to 120° with a maximum at 90° . The implication is that, at the low (0H and 1H) protonation states, the tryptophans mostly lie in a configuration that is almost perpendicular to the channel axis, i.e. the channel is closed by the four indole rings, explaining why water cannot pass through the 0H and 1H channels as discussed previously. In contrast, considerable variation in the torsion angles of the four tryptophan sidechains was found between the four subunits in the 3H state; namely at -110° , 110° , 130° and 170° for subunits I-IV, respectively. The dramatic rotation by $\sim 180^\circ$ in the Trp41 of M2 subunit-I and the moderate rotation in the Trp41 residues of the other three M2 subunits on changing from the 0H and 1H state to the 3H state indicates the transformation of the channel from the closed (0H and 1H) to the open (3H) conformation, supported by the water density detected along the pore (Figure 5).

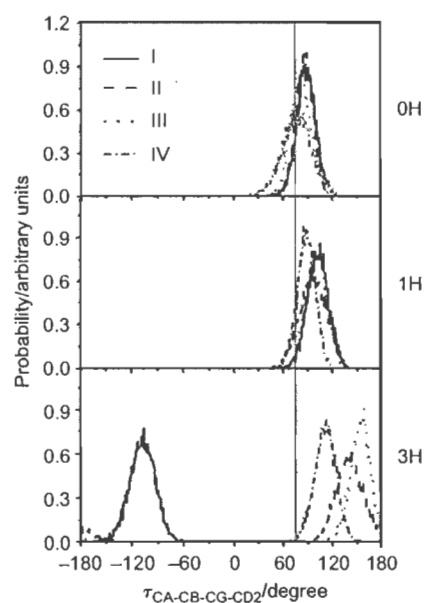


Figure 5. The rotational angle defined by CA, CB, CG and CD2 of the M2 Trp41 gate when M2 is complexed with the four RMTs outside the pore at different protonation states (0H, 1H and 3H). I-IV denote the four M2 subunits. Here, the vertical grey solid line (at 75°) represents the torsional angle of the closed conformation of the Trp41 indole ring obtained from NMR structure.

Affinity of water permeation

To investigate how difficult it may be for water molecules to move through the M2 channel in the free and RMT complexed forms of both four RMTs binding outside- ($\text{M2-RMT}_{\text{out}}$) and a RMT binding inside- ($\text{M2-RMT}_{\text{in}}$) mediate in which the data of $\text{M2-RMT}_{\text{in}}$ was taken from our previous study [28], the PMFs of water permeation along the channel axis (L) starting from the N-terminal site were evaluated and compared in Figure 6.

It is clearly seen that the energy barriers between the $\text{M2-RMT}_{\text{out}}$ complex and the free M2 protein for the 0H and 3H states are not notably different. However, this is not the case for the 1H state, where the maximum energy barrier of $\sim 7.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the complex at $L = -36 \text{ \AA}$ and -43 \AA is significantly higher than that of the free form ($\sim 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ at $L = -32 \text{ \AA}$). In addition, the energy barriers for these free and $\text{M2-RMT}_{\text{out}}$ complexed forms were found in the following order: $0\text{H} > 1\text{H} > 3\text{H}$. In contrast, the PMFs for $\text{M2-RMT}_{\text{in}}$ observed at $L = -40, 42, 40 \text{ \AA}$ of 0H, 1H and 3H states, respectively, are significantly higher than those of the free and $\text{M2-RMT}_{\text{out}}$ complexes for all the protonation states.

In the free form, the PMF barrier (taken from the maximum of each plot) of $-6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the 0H state was significantly reduced to $-3\text{--}4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ in the 1H and 3H states. This supports the experimental evidence, where in the absence of RMT binding to the M2 channel water permeation was observed in the mono- (1H) and triple- (3H), but not the non- (0H) protonated states [22,28].

Regarding the M2 channel with RMTs bound outside, the 0H and 1H states display relatively high PMF energies of $\sim 4\text{--}9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, suggesting that water permeation is energetically

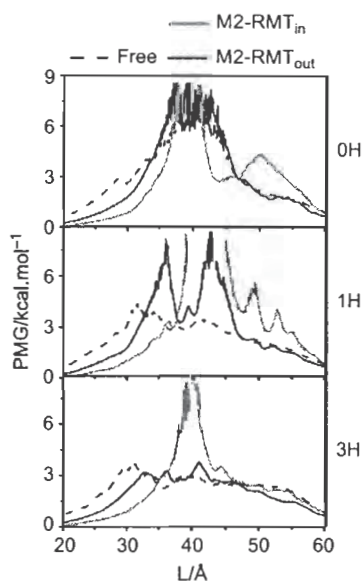


Figure 6. The potential of mean force (PMF) of the excess proton along the pore channel axis (L) starting from the N-terminal site for the three protonation states, 0H, 1H and 3H of the free M2 (dashed line) and RMT complexes where the four RMTs were located outside (black solid line, M2-RMT_{out}) and inside the ion channel (grey solid line, M2-RMT_{in}).

unfavourable in these systems. This is consistent with the zero water density plots of both the 0H and 1H states (Figure 4). In contrast, the energy barrier for water transport is significantly lower at ~ 3 kcal \cdot mol $^{-1}$ in the 3H state of the M2-RMT_{out} complex, consistent with the non-zero water density observed throughout the channel. Interestingly, the PMFs for M2-RMT_{in} complexes in all the protonation states are significantly higher than ~ 7.5 kcal \cdot mol $^{-1}$ indicating no water transport was processed where a single RMT blocking inside the M2 channel. These results clearly demonstrated that the RMT binding inside the M2 pore has potentially inhibited the M2 machinery rather than the RMTs allosteric binding outside.

In summary, the information here leads us to conclude that the RMT-mediated inhibition via their binding to the outside of the pore in the closed and intermediate conformations at high pH conditions can prevent proton conductance by interrupting the formation of the water wire along the channel. In contrast, the transportation cannot be inhibited at a low pH condition, i.e. in the 3H-open conformation.

Conclusion

Based on the MD simulated results presented here, the inhibition efficiency of the four RMTs bound outside the M2 channel pore was considerably lower than that observed when bound inside the channel. The key parameter determining the drug outside binding efficiency is based on the hydrogen bond network centred on the Asp44 residue which interacts with RMT to further stabilise the gating channel by inter-subunit hydrogen bonding with the Trp41 gating residue. This network was eliminated when the positive charge was increased

on the selective His37 residue, due to the decreased van der Waals contact of the Trp41 indole ring being affected by the strong electrostatic repulsion. The effect was manifested at pH ≤ 6 (triple protonation state on the His37 tetrad) where the RMT-Asp44-Trp41 hydrogen bond network was completely lost, leading to a rearrangement of the indole ring of the Trp41 gate to flip to an open conformation. The water permeation throughout the M2 channel that was consequently observed was ranked as 0H < 1H < 3H which is inversely consistent with the observed PMF. Taken together, the MD-based simulation results have clearly explained the role of RMT at the molecular level in the allosteric binding site of the M2 channel at high pH conditions but not at a low pH.

Acknowledgements

P.I. thanks the Post-Doctoral programme from the Commission on Higher Education. S.H. thanks the Centre of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University. Research facilities, software packages and computing time were provided by the Computer Centre for Advanced Research and the Computational Chemistry Unit Cell, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIH P41 RR-01081).

Declaration of interest

This work was supported by The Thailand Research Fund.

References

1. WHO, Global Alert and Response (GAR), Online at: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/en/, accessed September 2009.
2. WHO, Global Alert and Response (GAR), Online at: http://www.who.int/csr/don/2009_10_09/en/index.html, accessed October 2009.
3. Helenius A. Unpacking the incoming influenza-virus. *Cell* 1992;69: 577-578.
4. Ciampor F, Bayley PM, Nermut MV, Hirst EM, Sugrue RJ, Hay AJ. Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conversion of influenza virus A hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic trans Golgi compartment. *Virology* 1992;188:14-24.
5. Lamb RA, Holsinger LJ, Pinto LH. In: Wimmer E, ed. *Receptor-mediated Virus Entry into Cells*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994:303-321.
6. Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.
7. Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, Tereshko V, Nanda V, Stayrook S, DeGrado WF. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* 2008;451:596-599.
8. Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 2008;451:591-595.
9. Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: Characterization of the amantadine block. *J Virol* 1993;67:5585-5594.
10. Salom D, Hill BR, Lear JD, DeGrado WF. pH-dependent tetramerization and amantadine binding of the transmembrane helix of M2 from the influenza A virus. *Biochemistry* 2000;39:14160-14170.

11. Nishimura K, Kim S, Zhang L, Cross TA. The closed state of a H⁺ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry* 2002;41:13170-13177.
12. Hu J, Fu R, Nishimura K, Zhang L, Zhou HX, Busath DD, Vijayvergiya V, Cross TA. Histidines, heart of the hydrogen ion channel from influenza A virus: Toward an understanding of conductance and proton selectivity. *P Natl Acad Sci USA* 2006;103:6865-6870.
13. Cady SD, Hong M. Amantadine-induced conformational and dynamical changes of the influenza M2 transmembrane proton channel. *P Natl Acad Sci USA* 2008;105:1483-1488.
14. Witter R, Nozirov F, Sternberg U, Cross TA, Ulrich AS, Fu RQ. Solid-state F-19 NMR spectroscopy reveals that Trp(41) participates in the gating mechanism of the M2 proton channel of influenza a virus. *J Am Chem Soc* 2008;130:918-924.
15. Pinto LH, Dieckmann GR, Gandhi CS, Papworth CG, Braman J, Shaughnessy MA, Lear JD, Lamb RA, DeGrado WF. A functionally defined model for the M-2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *P Natl Acad Sci USA* 1997;94:11301-11306.
16. Wang JF, Kim S, Kovacs F, Cross TA. Structure of the transmembrane region of the M2 protein H⁺ channel. *Protein Sci* 2001;10:2241-2250.
17. Cady SD, Goodman C, Tatko CD, DeGrado WF, Hong M. Determining the orientation of uniaxially rotating membrane proteins using unoriented samples: A H-2, C-13, and N-15 solid-state NMR investigation of the dynamics and orientation of a transmembrane helical bundle. *J Am Chem Soc* 2007;129:5719-5729.
18. Sansom MSP, Kerr ID, Smith GR, Son HS. The influenza A virus M2 channel: A molecular modeling and simulation study. *Virology* 1997;233:163-173.
19. Zhong QF, News DM, Pattnaik P, Lear JD, Klein ML. Two possible conducting states of the influenza A virus M2 ion channel. *Febs Lett* 2000;473:195-198.
20. Zhong QF, Husslein T, Moore PB, News DM, Pattnaik P, Klein ML. The M2 channel of influenza A virus: a molecular dynamics study. *Febs Lett* 1998;434:265-271.
21. Ayton GS, Voth GA. Multiscale simulation of transmembrane proteins. *J Struct Biol* 2007;157:570-578.
22. Kass I, Arkin IT. How pH opens a H⁺ channel: The gating mechanism of influenza a M2. *Structure* 2005;13:1789-1798.
23. Chen HN, Wu YJ, Voth GA. Proton transport Behavior through the influenza a M2 channel: Insights from molecular simulation. *Biophys J* 2007;93:3470-3479.
24. Wu YJ, Voth GA. A computational study of the closed and open states of the influenza A M2 proton channel. *Biophys J* 2005;89:2402-2411.
25. Smondyrev AM, Voth GA. Molecular dynamics simulation of proton transport through the influenza A virus M2 channel. *Biophys J* 2002;83:1987-1996.
26. Yi M, Cross TA, Zhou HX. A secondary gate as a mechanism for inhibition of the M2 proton channel by amantadine. *J Phys Chem B* 2008;112:7977-7979.
27. Hay AJ, Wolstenholme AJ, Skehel JJ, Smith HH. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J* 1985;4:3021-3024.
28. Intharathep P, Laohpongspaisan C, Rungrotmongkol T, Loisuangsinsin A, Malaisree M, Decha P, Aruksakunwong O, Chuenpenit K, Kaiyawet N, Sompornpisut P, Pianwanit S, Hannongbu S. How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel. *J Mol Graph Model* 2008;27:342-348.
29. Huang RB, Du QS, Wang CH, Chou KC. An in-depth analysis of the biological functional studies based on the NMR M2 channel structure of influenza A virus. *Biochim Biophys Res Commun* 2008;377:1243-1247.
30. Jing XH, Ma CL, Ohigashi Y, Oliveira FA, Jardetzky TS, Pinto LH, Lamb RA. Functional studies indicate amantadine binds to the pore of the influenza A virus M2 proton-selective ion channel. *P Natl Acad Sci USA* 2008;105:10967-10972.
31. Cady S, Schmidt-Rohr K, Wang J, Soto C, DeGrado W, Hong M. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature* 2010;463:689-692.
32. Ma C, Polishchuk A, Ohigashi Y, Stouffer A, Schön A, Magavern E, Jing X, Lear J, Freire E, Lamb R, DeGrado W, Pinto L. Identification of the functional core of the influenza A virus A/M2 proton-selective ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:12283-12288.
33. Spector R. Transport of amantadine and rimantadine through the blood-brain barrier. *J Pharm Exp Ther* 1988;244:516-519.
34. Forrest LR, Tieleman DP, Sansom MSP. Defining the transmembrane helix of M2 protein from influenza A by molecular dynamics simulations in a lipid bilayer. *Biophys J* 1999;76:1886-1896.
35. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, Hermans J. Intermolecular Forces. In: Pullman B, ed. Dordrecht The Netherlands: D. Reidel Publishing Company, 1981. pp. 331-342.
36. Lindahl E, Hess B, Spoel Dvd. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Model* 2001;7:306-317.
37. Hermans J, Berendsen HJC, van Gunsteren WF, Postma JPM. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* 1984;23:1513-1518.
38. Rungrotmongkol T, Intharathep P, Malaisree M, Nunthaboot N, Kaiyawet N, Sompornpisut P, Payungporn S, Poovorawan Y, Hannongbua S. Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385:390-394.
39. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comp Chem* 1997;18:1463-1472.
40. Berendsen HJC, Postma JPM, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 1984;81:3684-3690.
41. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993;98:10089-10092.
42. Raschke TM, Levitt M. Detailed hydration maps of benzene and cyclohexane reveal distinct water structures. *J Phys Chem B* 2004;108:13492-13500.

Proton Transport through the Influenza A M2 Channel: Three-Dimensional Reference Interaction Site Model Study

Saree Phongphananee,[†] Thanyada Rungrotmongkol,[‡] Norio Yoshida,^{†,¶}
Supot Hannongbua,[§] and Fumio Hirata^{*,†,¶}

Department of Theoretical and Computational Molecular Science, Institute for Molecular Science, Okazaki 444-8585, Japan, Center of Innovative Nanotechnology and Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand, and Department of Functional Molecular Science, The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki 444-8585, Japan

Received March 31, 2010; E-mail: hirata@ims.ac.jp

Abstract: The three-dimensional distribution function (DF) and the potential of mean force (PMF) of water and hydronium ions in five protonated states of the influenza A M2 channel are calculated by means of the three-dimensional reference interaction site model (3D-RISM) theory in order to clarify the proton conduction mechanism of the channel. Each protonated state, denoted as H_i , where $i = 0-4$, has a different number of protonated histidines, from 0 to 4. The DF of water in each state exhibits closed structures of 0H, 1H, and 2H and open structures in 3H and 4H. In the closed form, the DF and PMF indicate that hydronium ions are excluded from the channel. In contrast, the ion can distribute throughout the opened channel. The barrier in PMF of 3H, $\sim 3-5$ kJ/mol, is lower than that of 4H, $5-7$ kJ/mol, indicating that 3H has higher permeability to protons. On the basis of the radial DFs of water and hydronium ions around the imidazole rings of His37, we propose a new mechanism of proton transfer through the gating region of the channel. In this process, a hydronium ion hands a proton to a non-protonated histidine through a hydrogen bond between them, and then the other protonated histidine releases a proton to a water molecule via a hydrogen bond. The process transfers a proton effectively from one water molecule to another.

1. Introduction

In early 2009, a new strain of H1N1 influenza A virus spread over many countries and has become a pandemic. It is an urgent task to understand this virus and to seek either vaccines or new drugs to cope with the infection. The M2 protein channel, which is found in the viral lipid envelope, has received a great deal of attention as a target for drug development due to its important role in proton transport and viral replication.^{1,2} It is known that a drug family called "amantadines" is effective against influenza A by blocking the M2 channel, which blocks proton conduction through the membrane and consequently causes inhibition of viral replication.³ However, the underlying mechanism of the proton blockade activity by amantadines is not yet clear. In addition, many new strains of influenza virus are resistant to amantadines. Therefore, understanding the mechanism of proton transport through the virus membrane is one of the central issues for drug design.

The M2 channel forms a homotetramer, each monomer comprising 97 amino acid residues. The monomer includes three

domains, the 24-residue N-terminal extracellular domain, the 19-residue transmembrane domain, and the 54-residue cytoplasmic domain.⁴ Several electrophysiological results have shown that the M2 channel is highly selective for protons and its gating is controlled by pH.⁵⁻⁹ A number of researchers have explored the relationship between functions and molecular structures of the M2 channel and have indicated the important role of His37 in its gating mechanism. Pinto and co-workers have demonstrated that mutants of the M2 channel with the His residue substituted by Gly, Ser, or Thr lose their proton selectivity and that the selectivity is restored upon addition of imidazole; this implies that the imidazole group plays an important role in proton selectivity.¹⁰ Concerning the pH-controlled gating mechanism, Hu et al. have made important suggestions based on their experiments that the pK_a 's associated with the four histidines in the gating region are different from one another and that the open forms are dominated by triply

[†] Department of Theoretical and Computational Molecular Science, Institute for Molecular Science.

[‡] Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University.

[§] Department of Functional Molecular Science, The Graduate University for Advanced Studies.

[¶] Department of Chemistry, Chulalongkorn University.

(1) Lamb, R. A.; Holsinger, L. J.; Pinto, L. H. In *Receptor-mediated Virus Entry into Cells*; Wimmer, E., Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1994; pp 303-321.

(2) Helenius, A. *Cell* **1992**, *69*, 577-578.

(3) Pinto, L. H.; Holsinger, L. J.; Lamb, R. A. *Cell* **1992**, *69*, 517-528.

(4) Holsinger, L. J.; Alams, R. *Virology* **1991**, *183*, 32-43.

(5) Lear, J. D. *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 17-22.

(6) Mould, J. A.; Li, H.; Dudlak, C. S.; Lear, J. D.; Pekosz, A.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8592-8599.

(7) Mould, J. A.; Drury, J. E.; Frings, S. M.; Kaupp, U. B.; Pekosz, A.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31038-31050.

(8) Chizhmakov, I. V.; Geraghty, F. M.; Ogden, D. C.; Hayhurst, A.; Antoniou, M.; Hay, A. J. *J. Physiol.* **1996**, *494*, 329-336.

(9) Vijayvergiya, V.; Wilson, R.; Chorak, A.; Gao, P. F.; Cross, T. A.; Busath, D. D. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1697-1704.

(10) Venkataraman, P.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21463-21472.

and quadruply protonated histidine.¹¹ These experimental results suggest that His37 acts as a pH sensor switch to turn the gate “on” and “off” and as a selective filter to allow the permeation of protons but not other cations. There is another suggestion based on experiments indicating that Trp41 also has an important role in the gating: namely, a protein in which Trp41 is replaced by residues with smaller size, Ala, Cys, or Phe, has higher proton conductivity compared with its wild type.¹² UV Raman spectra show the interaction between the protonated imidazole of His37 and the indole of Trp41, a cation- π interaction.^{13,14} These investigations suggest that the indole of Trp41 functions to occlude the channel pore. This residue behaves as a door to “open” or “close” the pore, which is controlled by protonated His due to the cation- π interaction.

Different techniques, including solid-state NMR (ssNMR), solution NMR, and X-ray, have revealed dramatically different and controversial results for the structures of M2 channels.^{15–17} Thus, molecular dynamics (MD) studies of the M2 channel, which simulated the M2 channel on the basis of different structure sources, show dissimilar results. The MD studies using the structures from X-ray and solution NMR demonstrated the second gating at Val27:^{18–20} the channel will close and disrupt the water profile at Val27. However, the MD studies based on the structures from ssNMR have never found the narrowest region at Val27.^{18,21} The experimental studies based on the mutagenesis are not conclusive concerning whether Val27 plays a role in gating. Holsinger et al. showed that the mutation of Val27 to Ala, Ser, or Thr does not change the current of protons.²² On the other hand, recent work by Pinto and co-workers indicates that replacement of Val27 by Ala or Asp increases the activity, while replacement by Ser, Thy, Gly, Lys, Arg, Phe, or Trp decreases the activity of proton transport.²³ Even replacement of Val27 by a smaller residue such as Ala or Gly shows either an increase or a decrease in the proton current. In addition, the MD simulations based on the X-ray structure are inconsistent among themselves. The study by Arkin and Leonov, in which the X-ray structure was directly applied to the simulation, showed that the channel always closes at Val27 in neutral, bi-protonation, and tri-protonation states of His37.¹⁸ On the other hand, Khurana et al. have not used the whole structure of the channel; they have chosen only a single transmembrane (TM) domain and duplicated the other three TM

domains.¹⁹ They found that at high pH the channel is in the Open_{out}–Close_{in} state (the channel is open at the Val27 gate and closed at His37), while at low pH the channel is in the Close_{out}–Open_{in} state (the channel is closed at the Val27 gate and open at His37). However, this result seems to be problematic, because the starting structure they have used, known as the D4 model, is closed at both the Val27 and His37 gates, and no evidence supports this model.

In contrast to the MD studies based on the X-ray structure, all of the MD results based on the ssNMR structure are consistent among each other, showing that the channel will close around the His37/Trp41 gate at low protonation state and open at high protonation state.^{18,21,24,25} The groups of Arkin and Hannongbua have shown that the accessibility of water to the channel pore is enhanced with increasing number of protonated states of histidine, and the channel is closed at low protonation state at the His37 and Trp41 regions.^{21,25} Voth and co-authors used the alternative simulation methodology to calculate the potential of mean force (PMF) and the diffusion coefficient of proton in the channels. Their results have shown that the 3H state has the highest proton permeability,²⁴ which agrees with the suggestion from the studies based on ssNMR that the channel becomes activated at the triple protonation state of His37.¹¹

In this report, we present an alternative approach to the problem based on the three-dimensional reference interaction site model (3D-RISM) theory.²⁶ The 3D-RISM theory is a statistical mechanics theory for molecular liquids. The theory has scored great success in exploring a variety of solvation processes occurring in biosystems, especially the “molecular recognition” process.^{27–33} The method describes the molecular recognition or binding of guest molecules trapped inside a cavity of a protein molecule in terms of the three-dimensional (3D) distribution of the ligands. Using this method, we investigate the 3D distribution of water molecules as well as hydronium ions, a model of protons, inside the M2 channel with different protonated states in order to clarify the molecular mechanism of gating and proton conduction in the channel. Considering the consistency of the previous MD studies based on the ssNMR structure, we adopt the protein structure from the MD simulation, which has been carried out previously by two of the authors,²⁵ for our calculations on the distribution of water and proton in the M2 channel.

- (11) Hu, J.; Fu, R.; Nishimura, K.; Zhang, L.; Zhou, H.; Busath, D. D.; Vijayvergiya, V.; Cross, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 6865–6870.
- (12) Tang, Y.; Zaitseva, F.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39880–39886.
- (13) Okada, A.; Miura, T.; Takeuchi, H. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6053–6060.
- (14) Takeuchi, H.; Okada, A.; Miura, T. *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 35–38.
- (15) Nishimura, K.; Kim, S.; Zhang, L.; Cross, T. A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13170–13177.
- (16) Schnell, J. R.; Chou, J. J. *Nature* **2008**, *451*, 591–595.
- (17) Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Costanzo, L. D.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. F. *Nature* **2008**, *451*, 596–599.
- (18) Leonov, H.; Arkin, I. T. *J. Mol. Model.* **2009**, *15*, 1317–1328.
- (19) Khurana, E.; Peraro, M. D.; DeVane, R.; Vemparala, S.; DeGrado, W. F.; Klein, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 1069–1074.
- (20) Yi, M.; Cross, T. A.; Zhou, H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7977–7979.
- (21) Kass, I.; Arkin, I. T. *Structure* **2005**, *13*, 1789–1798.
- (22) Holsinger, L. J.; Nichani, D.; Pinto, L. H.; Lamb, R. A. *J. Virol.* **1994**, *68*, 1551–1563.
- (23) Balannik, V.; Carnevale, V.; Fiorin, G.; Levine, B. G.; Lamb, R. A.; Klein, M. L.; DeGrado, W. F.; Pinto, L. H. *Biochemistry* **2010**, *49*, 696–708.

- (24) Chen, H.; Wu, Y.; Voth, G. A. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3470–3479.
- (25) Intharathep, P.; Laohpongpaian, C.; Rungrotmongkol, T.; Loisuangsinsin, A.; Malaisree, M.; Decha, P.; Aruksakunwong, O.; Chuenpennit, K.; Kaiyawet, N.; Sompornpisut, P.; Pianwanit, S.; Hannongbua, S. *J. Mol. Graph. Model.* **2008**, *27*, 342–348.
- (26) Kovalenko, A. In *Molecular Theory of Solvation*; Hirata, F., Ed.; Kluwer: Dordrecht, 2003; pp 169–275.
- (27) Imai, T.; Hiraoka, R.; Kovalenko, A.; Hirata, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15334–15335.
- (28) Imai, T.; Hiraoka, R.; Seto, T.; Kovalenko, A.; Hirata, F. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11585–11591.
- (29) Yoshida, N.; Phongphanphane, S.; Maruyama, Y.; Imai, T.; Hirata, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12042–12043.
- (30) Yoshida, N.; Imai, T.; Phongphanphane, S.; Kovalenko, A.; Hirata, F. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 873–886.
- (31) Phongphanphane, S.; Yoshida, N.; Hirata, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1540–1541.
- (32) Phongphanphane, S.; Yoshida, N.; Hirata, F. *J. Mol. Liq.* **2009**, *147*, 107–111.
- (33) Kiyota, Y.; Hiraoka, R.; Yoshida, N.; Maruyama, Y.; Imai, T.; Hirata, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3852–3853.

2. Methods

The detailed formulation of the 3D-RISM theory is provided in the references.^{26,30} Here, only a brief interpretation of the theory is provided in order to help readers to understand the “physical” aspect of the theory.

Let us consider the average density of water molecules at a position around a protein molecule. When the position is far from the protein molecule, so as to be regarded as in the bulk, the density will be constant, the same as in the pure liquid. On the other hand, when it is near the protein, the density will be “perturbed” significantly by the field due to the protein and will be different from that in the bulk, depending on the strength of the perturbation. The 3D-RISM theory can be interpreted as a “nonlinear” perturbation theory as follows.

Let us denote the constant density of solvent atom γ at the bulk, the density near the protein, and the density response to the perturbation as ρ_γ , $\rho_\gamma(\mathbf{r})$, and $\Delta\rho_\gamma(\mathbf{r})$, respectively. Then, the statement made above can be expressed as

$$\rho_\gamma(\mathbf{r}) = \rho_\gamma + \Delta\rho_\gamma(\mathbf{r}) \quad (1)$$

The density response to the perturbation can be expressed on the basis of 3D-RISM theory as

$$\Delta\rho_\gamma(\mathbf{r}) = \sum_\alpha \int \chi_{\gamma\alpha}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') \rho_\gamma c_\alpha(\mathbf{r}') d\mathbf{r}' \quad (2)$$

where $c_\alpha(\mathbf{r}')$ is the “re-normalized” perturbation due to the protein, for which several approximate equations have been devised. For example, the HNC approximation takes the following expression:

$$c_\gamma(\mathbf{r}) = \exp[-\beta u_\gamma(\mathbf{r}) + h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r})] - [h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r})] - 1 \quad (3)$$

In this expression, $u_\gamma(\mathbf{r})$ is the direct interaction potential exerted on water molecules from protein, and $h_\gamma(\mathbf{r})$ is the density fluctuation of water at position \mathbf{r} , normalized by the bulk density, namely,

$$h_\gamma(\mathbf{r}) = \Delta\rho_\gamma(\mathbf{r})/\rho \quad (4)$$

The three-dimensional distribution function (3D-DF) used in this study is defined from $h_\gamma(\mathbf{r})$ by

$$g(\mathbf{r}) = h(\mathbf{r}) + 1 \quad (5)$$

It is not only the direct interaction $u_\gamma(\mathbf{r})$ with protein that perturbs the density of water at a certain position but also interactions with water molecules at the other positions, whose density is also perturbed by the existence of the same protein. Such “indirect” perturbations are renormalized into the terms including $h_\gamma(\mathbf{r}) - c_\gamma(\mathbf{r})$. Such renormalization makes the perturbation highly “nonlinear”.

The response function $\chi_{\gamma\alpha}(\mathbf{r}, \mathbf{r}')$ is equivalent to the density pair correlation function of pure or bulk solvent,

$$\rho^2 \chi_{\alpha\gamma}(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \langle \delta\rho_\alpha^{(0)}(\mathbf{r}) \delta\rho_\gamma^{(0)}(\mathbf{r}') \rangle \quad (6)$$

where $\delta\rho_\sigma^{(0)}(\mathbf{r})$ is the density fluctuation of atom σ in the pure liquid, defined by $\delta\rho_\sigma^{(0)}(\mathbf{r}) = \rho_\sigma^{(0)}(\mathbf{r}) - \rho_\sigma$. This response function can be obtained in advance from the one-dimensional RISM theory.

The various initial structures of the proton-selective M2 channel of five different protonation states (PS) on the histidine residue His37 were extracted from the previous MD simulations which were based on the ssNMR structure (Figure 1);^{15,25} 11 conformations for each protonation state were chosen. The proton states are non-PS (0H), single PS (1H), double PS at diagonal position (2H), triple PS (3H), and quadruple PS (4H). For the calculation of solvent distribution with the 3D-RISM theory, all the coordinates related to solvent environment, water, ions, and lipids were removed, so

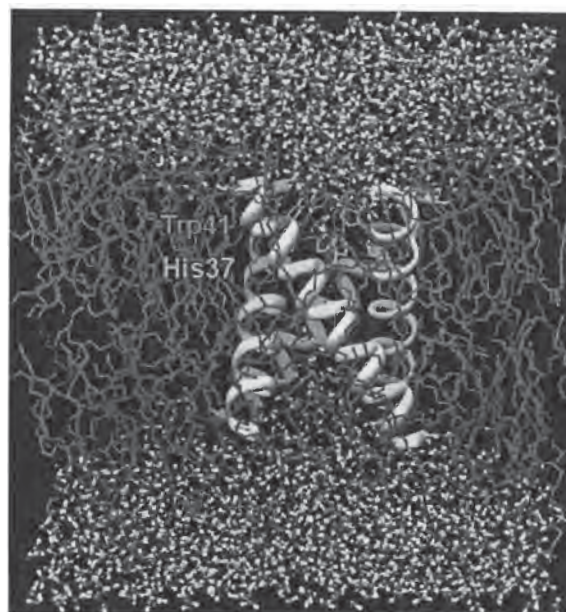


Figure 1. Simulation of the M2 tetramer in pre-equilibrated POPC lipid bilayer and modeled water. The His37-selective filter and Trp41 gating residues are also shown in yellow and orange, respectively.

that only those associated with the M2 helix bundle were used as the input of the protein coordinates. The protein was immersed in an aqueous solution of 0.01 M HCl, in which electrolytes are mimicked by a mixture of chloride and hydronium ions as in the previous studies.^{31,32} For closing the 3D-RISM equation, we chose the KH approximation for its advantage of rapid convergence.^{34,35} The PMFs were calculated by integrating 3D-DFs along the channel axis.³² The potential parameter and structure of solvent molecules were adopted from previous work.^{31,32} Amber-99 was employed to obtain potential parameters of the protein, M2.³⁶ 3D-RISM and KH-closure equations were solved on a grid of 128³ points in a cubic supercell of 64 Å³.

3. Results and Discussion

3.1. Distribution of Water in the M2 Channel. To investigate the mechanism of proton transfer in the M2 channel, we consider the distribution of water inside the channel as a function of the number of protonated state (PSs) of the histidine tetrad, from non-PS (0H) to quadruple PS (4H), which are regulated by changing the pH. For each state, we randomly pick coordinates for the M2 protein from a trajectory of the MD simulation which was carried out previously.²⁵ Because the results of various conformations in the same protonated state are similar among themselves, (see Supporting Information), one representative result for each protonated state is shown. The 3D-DF of water with $g(\mathbf{r}) > 1$ in the five different protonated states of the M2 channel is depicted in Figure 2. The figure indicates that the accessibility of water (cyan in Figure 2) to the channel pore increases with the protonated state of the channel in the order 0H < 1H < 2H < 3H < 4H. This result can be explained readily in terms of the pore diameter, which is enhanced due to the electrostatic repulsion among the protonated histidines His37. The structural change originated at His37 propagates to the bulky

(34) Kovalenko, A.; Hirata, F. *J. Phys. Chem.* **1999**, *103*, 7942–7957.

(35) Kovalenko, A.; Hirata, F. *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 10391–10402.

(36) Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049–1074.

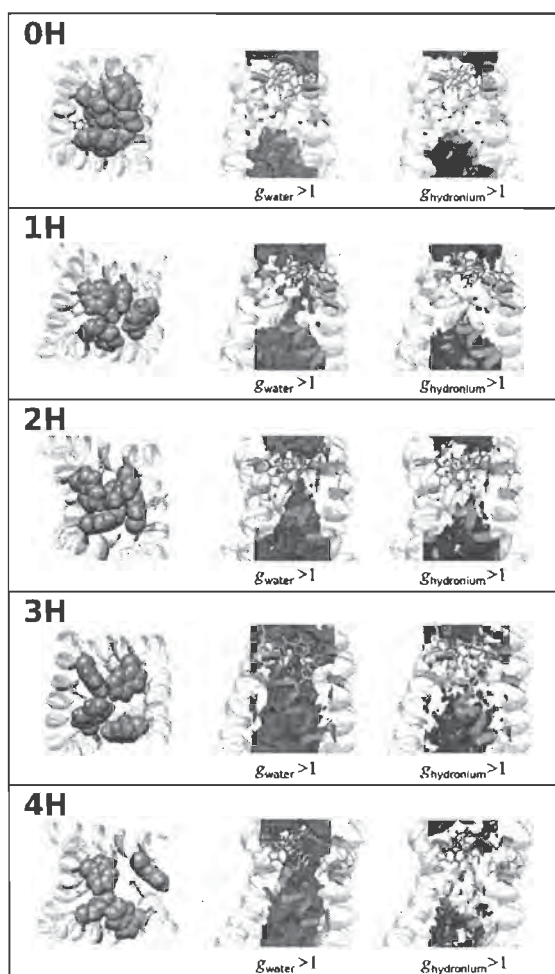


Figure 2. 3D-DFs of water in the channel (cyan) and hydronium ion (red), with $g(r) > 1$. Molecular structure of the channel gating region is also depicted at the left for protonation different states of the His37: Trp41, orange; His37, yellow.

indole rings of Trp41, which actually play the role of gating. The results suggest that there are two distinct states in the channel conformation, or “open” and “closed” forms. The 0H, 1H, and 2H forms are considered as closed forms, since water distributions are not observed at the selective filter regions of His37 (yellow stick in Figure 2) and at the gating region with the Trp41 residues (orange sphere and stick in Figure 2). On the other hand, the 3H and 4H forms, with a continuous water distribution along the pore, are identified as the open forms (Figure 2). In addition, the narrowest region in the 3D-DF of water in the channel, also the narrowest region of the pore, is located at the Trp41 region, which is regarded to play a role of “gating”. From the experimental results, Trp41 not only blocks inward proton transportation when the pH of the exterior is high but also blocks outward proton transportation when the interior environment is acidic.¹² The results suggest that the indole moiety of Trp41 should completely block water to reach His37 from the viral interior when the channel is closed, which is consistent with our results.

The PMFs of water along the channel of various conformations in each protonation state corresponding to the DF are shown in Figure 3, in which the high barriers are found only in the 0H, 1H, and 2H states. It is obvious that in the closed form

water cannot overcome the high barrier due to the steric hindrance between the channel atoms and water molecules. On the other hand, the PMF of water in the 3H and 4H states is negative along the entire channel pore, which indicates that water molecules in the channel are more stable than those in the bulk and that water permeates through the channel. The results are in harmony with previous theoretical studies carried out by different methods.^{21,24,25}

3.2. Distribution of Hydronium Ions in the M2 Channel and Gating Mechanism. The 3D distributions of hydronium ions inside the channels with $g(r) > 1$ are also depicted in Figure 2. For clarification, PMFs of the ion in various structures of the M2 channel in each protonated state are shown in the Figure 3.

In the three states of closed gate, or 0H, 1H, and 2H, hydronium ions exhibit behavior similar to that of water, but with lower distribution and higher barrier in PMFs compared to those of water (Figure 3). This indicates that a hydronium ion, or a proton, cannot distribute in the channel and is prevented from transporting across the channel. The results are consistent with those for the closed conformations of the M2 channel at high pH values reported in many experimental and theoretical studies.^{5–9,24}

In contrast to the distributions of water, the distributions of hydronium ion in the 3H and 4H states do not look much different from those in 0H to 2H. The difference is apparent, however, if one looks at Figure 3, where the PMFs of the hydronium ion in 3H and 4H exhibit entirely different behavior than those in 0H, 1H, and 2H. Protons in the 0H, 1H, and 2H forms have extremely high barriers, for the same reason as in the case of water, and no chance to get into the gating region of the channel, while the barrier heights in the 3H and 4H forms are just 2–3 and 5–7 kJ/mol, respectively, comparative to the thermal energy and are able to be overcome by the thermal fluctuation of the protein conformation. There is another interesting observation in the figure. The barrier height for protons is higher in 4H than in 3H, which is against the heuristic argument based on the pore size around the gating region.

All these observations suggest two competing factors working on the proton distribution as the protonated state of the channel is increased from 0H to 4H. One of those is the channel opening due to the increased repulsion among the protonated His residues, which tends to enhance the distribution of protons as well as water in the channel. The other factor is the electrostatic repulsion between protons and the protonated His residues, which will reduce the proton distribution with increasing number of protonated His. The two effects balance in the 3H state to maximize the proton distribution in the channel. These results are consistent with those reported by Voth et al.²⁴

3.3. Conduction of Hydronium Ions in the M2 Channel. Two models have been proposed to explain the mechanism of proton transport through the M2 channel. The first and the simplest model is called the “gating” or “shutter” mechanism, claiming that water can penetrate through the channel and form a proton wire whenever the gate is opened.^{24,37} A proton is transported from the hydronium ion to a neighboring water molecule through the H-bond train, or Grotthuss mechanism.³⁸ The model requires a well-defined hydrogen-bonded train of water molecules inside the channel in order to form a double-well potential with a shallow barrier in between, through which a proton may tunnel.

(37) Sansom, M. S. P.; Kerr, I. D.; Smith, G. R.; Son, H. S. *Virology* **1997**, *233*, 163–173.

(38) Agmon, N. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *244*, 456–462.

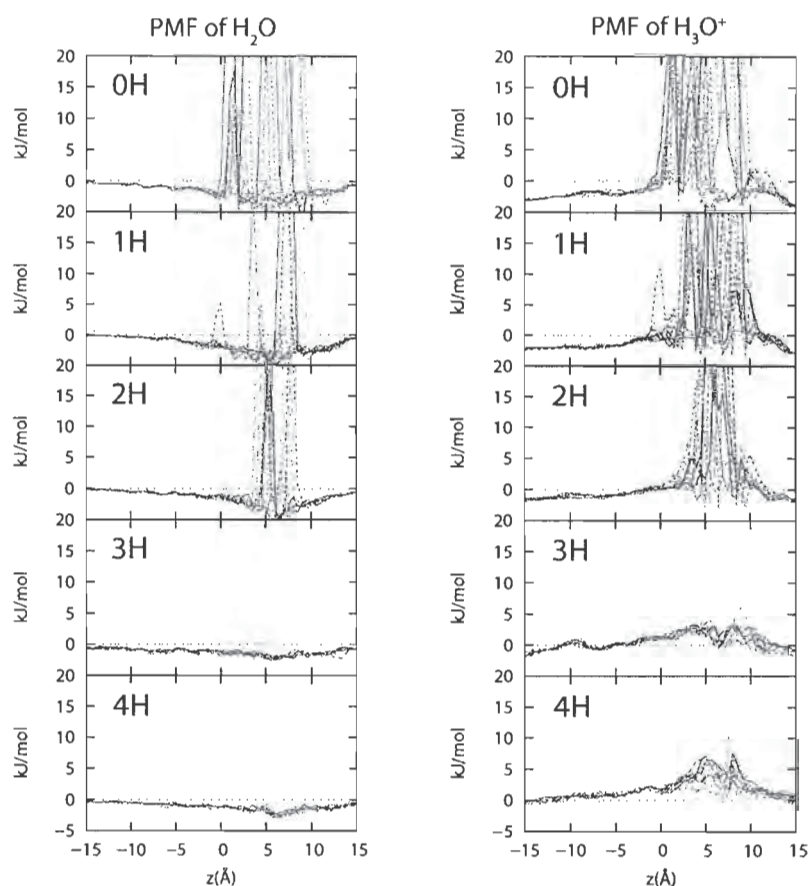


Figure 3. Potential of mean force of water and hydronium ion in each state. A line represents the PMF for a conformation in the state.

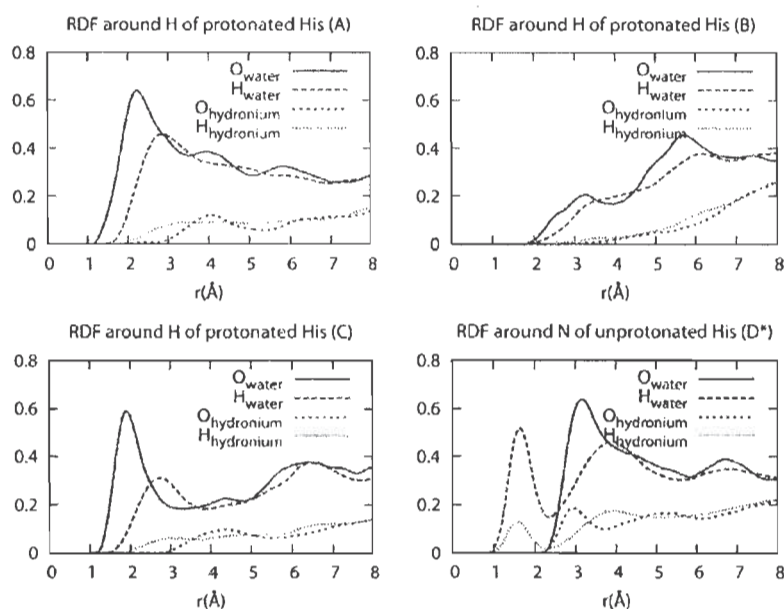


Figure 4. Radial distribution functions of oxygen and hydrogen of water and hydronium ion around the nitrogen of unprotonated imidazole and hydrogen of protonated imidazole: A, B, C and D in parentheses denote each helix, and an asterisk denotes an unprotonated histidine loop.

The model is unlikely, though, if one examines the distribution of water and hydronium ion in the channel in detail. Figure 4 shows the radial distribution function (RDF) of oxygen and hydrogen of water and hydronium ions around a nitrogen and

hydrogen atom of unprotonated and protonated imidazole in a His residue that is close to the channel surface (A, B, C and D in parentheses in the figure represent each helix, and * indicates unprotonated state of histidine in Figure 5). It indicates that

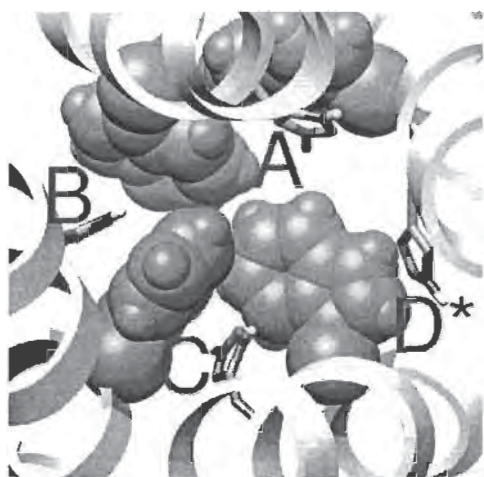


Figure 5. His37 (stick line) and Trp41 (orange sphere) in the 3H state.

hydrogen of a hydronium ion, as well as of water, is attracted to nitrogen of imidazole of non-protonated histidine (D* in Figures 4 and 5), and oxygen of water bonds to the hydrogen of protonated histidine. The hydrogen bond between imidazole and hydrogen of water or hydronium is illustrated schematically in Figure 6a. The figure strongly suggests that a water molecule or a hydronium ion in the channel is likely to make a hydrogen bond with the His residues rather than with other water molecules. Such water configurations will eliminate the possibility of the Grothuss mechanism through a hydrogen-bonded train of water molecules. Our finding is in accord with that reported by Voth and co-workers, who also concluded that the likelihood of the Grothuss mechanism working in the channel is low.

The second model is the so-called “shuttling” mechanism that requires at least one non-protonated histidine at the gating

region, with its two nitrogen atoms pointing toward the channel pore surface.³⁹ A proton transfers from a hydronium ion to the nitrogen atom of imidazole; the histidine is protonated and forms a bi-protonated intermediate. The other nitrogen atom of the *same* imidazole then releases the proton to a neighboring water molecule. Finally, the process is completed by flipping of imidazole, or tautomerization, to recover the initial configuration to prepare for the next proton. However, the model seems to be questionable, because in order for a His residue to behave as a proton relay, two nitrogens of the same histidine residue should be exposed to water inside the channel pore. Such a conformation of His was not found in the MD simulation studies.²⁵ Accordingly, the corresponding distribution of water hydrogens was not observed in the present study.

On the basis of the results shown in Figure 4, we propose a new model for a proton-transfer mechanism in the channel which is consistent with the experimental work, suggesting that the histidine residues play essential roles in proton transport. Our model requires two histidines, protonated and non-protonated, for a proton to be transferred. The RDFs shown in Figure 4 clearly indicate that a nitrogen atom of the non-protonated imidazole is hydrogen-bonded to a hydronium ion through a hydrogen atom of the ion, while the protonated imidazole is hydrogen-bonded to water oxygen through a hydrogen atom of the imidazole. The situation is illustrated in Figure 6a. We can construct a model of proton transfer in the channel that is consistent at least with our RDF results, which is illustrated Figure 6. The proton is transported from a hydronium ion to the nitrogen of imidazole, and the other imidazole releases the proton to a nearby water molecule. These two imidazoles switch their protonation states from protonated to non-protonated and vice versa, as shown in Figure 6a,b. To complete the process, the two histidines move to the appropriate positions due to conformational fluctuations of protein and start to transfer again (Figure 6c,d). This process can occur only in the 3H state. The

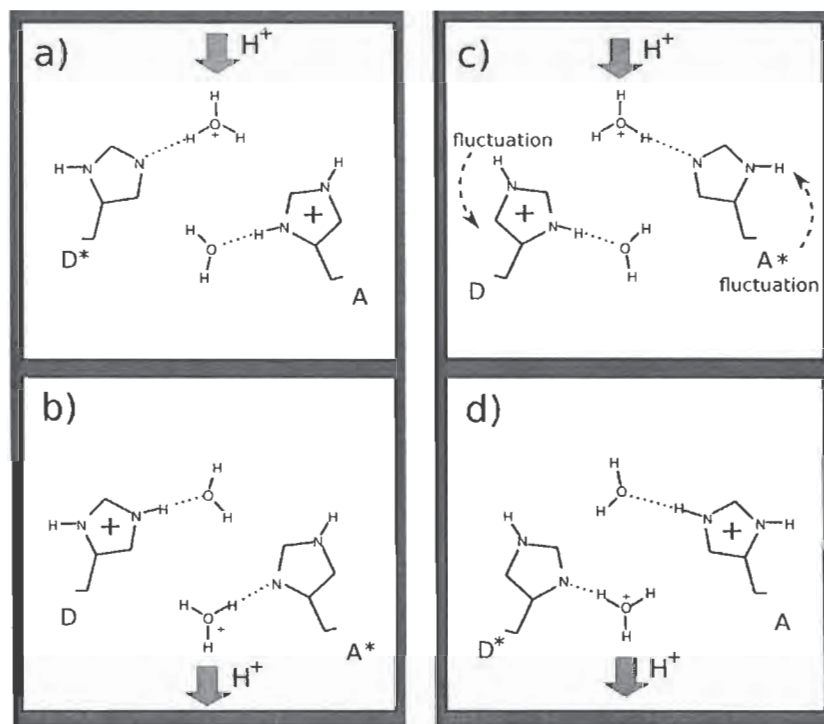


Figure 6. Schematic view of the proposed mechanism of proton transportation through the His.

first reason is that it requires at least one non-protonated histidine, bonded respectively to a water molecule and to a hydronium ion. This requirement excludes the possibility of the 4H state. Second, in the closed channels, 1H and 2H, all the Trp41 residues block water molecules from the gating area entirely, and no water molecules are available to hydrogen-bond to an imidazole at the interior channel. Consequently, a proton cannot be transported through this process in 1H, 2H, and 4H but can be in 3H.

4. Conclusions

The conduction of protons through the M2 channel in influenza viruses was investigated by means of the 3D-RISM/RISM method, the statistical mechanics theory of molecular liquids. The three-dimensional distribution functions and the potentials of mean force of the hydronium ions as well as water molecules inside the channel were calculated for five different states of the channel, which are distinguished by the number of protonated histidines (His37) at the gating region, from no histidine protonated (0H) to four histidines protonated (4H).

It was found from the calculation that the channels with zero, one, or two protonated histidines, which have been identified as "closed" forms in the previous studies, exclude both water molecules and hydronium ions from the gating region due to the steric effect of the Trp41 residues, which change conformation with the His37 residues. The results strongly indicate that neither water molecules nor protons can permeate through the channel with zero, one, or two protonated histidines. On the other hand, our results for the 3H and 4H cases indicate that

water and protons can permeate through the channel, although protons have to overcome small activation barriers resulting from the residues around the gating region. The barrier turns out to be lower in the 3H case than in the 4H case. This interesting behavior was explained in terms of an interplay of two effects as the protonation level increases: enhanced pore diameter due to the increased coulomb repulsions among the protonated histidines, and enhanced coulomb repulsion between the protonated histidines and hydronium ions.

On the basis of the radial distribution functions of water and hydronium ions around the imidazole rings of His37, we have proposed a new model of proton transfer through the gating region of the channel. Our model requires two histidines, protonated and non-protonated, for a proton to be transferred. In the model, a hydronium ion hands a proton to a non-protonated histidine through a hydrogen bond between them, and then another (protonated) histidine releases a proton to a water molecule via a hydrogen bond. The process thereby transports a proton from a water molecule to another water molecule. Further study to prove this hypothesis is in progress.

Acknowledgment. These works are supported by the Grant-in Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions" from the MEXT in Japan. We are also grateful to Next Generation Integrated Nanoscience Simulation Software, the project of the ministry, and JENESYS, the program under the JSPS exchange program for East Asian young researchers. Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package.⁴⁰

Supporting Information Available: Additional 3D-DFs of water and hydronium ion and table of rmsd's between the structures of the channel in each protonation state of His. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA1027293

- (39) Pinto, L. H.; Dieckmann, G. R.; Gandhi, C. S.; Papworth, C. G.; Braman, J.; Shaughnessy, M. A.; Lear, J. D.; Lamb, R. A.; Degradó, W. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11301–11306.
- (40) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.

Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin

Nadtanet Nunthaboot · Thanyada Rungrotmongkol · Maturros Malaisree ·
Panita Decha · Nopporn Kaiyawet · Pathumwadee Intharathep ·
Pornthep Sompornpisut · Yong Poovorawan · Supot Hannongbua

Received: 25 September 2009 / Accepted: 2 May 2010 / Published online: 27 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The current pandemic of the viral 2009 H1N1 influenza and its sustained human–human transmission has raised global concern for human health. The binding of the viral glycoprotein hemagglutinin (HA) and the human α -2,6-linked sialopentasaccharide (SIA-2,6-GAL) host cell receptor is a critical step in the viral replication cycle. Here, the complex structure of the 2009 H1N1 HA bound to the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor was constructed by using homology modeling and molecular dynamic simulations. The receptor was found to fit very well within the HA binding pocket and formed hydrogen bonds with the residues of the 130-loop, 190-helix, and 220-loop. Most receptor binding residues play a significant role in stabilizing the protein–receptor complex with major

contributions being provided by V135, T136, A137, K222, and Q226. The results are similar to the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor binding to H1 HA subtype, but are slightly different from those of H3, H5, and H9 HAs.

Keywords Computational chemistry · Hydrogen bonds · Molecular modelling · Sialopentasaccharide receptor · Per residue interactions · Molecular dynamics simulations

Introduction

Since the first identification of the novel A (H1N1) influenza virus in April 2009, the outbreak of this virus has rapidly spread and encircled over 100 countries worldwide, causing more than 3,000 human deaths (April–September 2009) [1]. The World Health Organization (WHO) announced a worldwide pandemic alert level at phase 6, indicating that a global human pandemic of this virus isolate is under way [1–3]. In the primary step of the viral replication cycle, influenza infection is initiated by the viral surface homotrimeric glycoprotein hemagglutinin (HA) binding to the host membrane sialylated glycans, which act as cell receptors. Understanding of this attachment and interaction can provide a basic knowledge of how the emerging virus infects humans and is thus the main goal of this study.

Hemagglutinin is an important target for the development of both vaccines and antiviral drugs against influenza viruses. Each monomer of the homotrimer is composed of two subunits, HA1 and HA2. Whilst HA1 is known to be responsible for the viral attachment to host cell, HA2 is associated with the release of the viral RNA complexed with the RNA polymerase through membrane fusion [4–7], and thus HA is essential to both host cell targeting and cell

N. Nunthaboot
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Maharakham University, Maharakham 44150, Thailand

T. Rungrotmongkol · M. Malaisree · P. Decha · N. Kaiyawet ·
P. Intharathep · P. Sompornpisut · S. Hannongbua (✉)
Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry,
Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: supot.h@chula.ac.th

T. Rungrotmongkol
Center of Innovative Nanotechnology,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Y. Poovorawan
Center of Excellence in Clinical Virology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

S. Hannongbua
Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals,
and Advanced Materials, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand

entry (infection). HA1 binds to host cell membrane receptors, glycans containing the terminal sialic acid which are attached to surface membrane proteins or lipids [6, 8, 9]. The specific topology, determined principally but not exclusively by the specific linkage of the terminal sialic acid to the galactose subunit and the glycan chain length, identifies the species and tissue specificity and avidity of binding, and thus its infectability and transmission rates [10]. The avian influenza virus preferentially recognizes the sialic acid α -2,3-galactose (SIA- α -2,3-GAL) linkage with a long glycan chain and cone-like topology, whilst the adopted sialic acid α -2,6-galactose (SIA- α -2,6-GAL) linkage is more favorable for both human and swine influenza viruses with longer glycan chains and an umbrella topology [10–14]. It is supposed that the alternation in host specificity of sialic acid linked to galactose from α -2,3- to α -2,6-linkage is a major barrier for influenza viruses to cross species barriers and adapt to a new host [7, 10, 15–18].

From the available information, it is clear that the binding domain of HA with the glycan receptors comprises several key structural components including the 190-helix, 130- and 220-loop domains, and several other conserved residues that give species and tissue specificity [9]. However, how this is derived is not clear and to date, the H1N1-2009 HA structures, either as free-form or receptor-bound conformation, have not yet been experimentally solved. Recently, a theoretically modeled structure of the HA-receptor complex has been published [19]. However, it represents a static view of protein-receptor interactions without dynamic capture of time-dependent properties. Therefore, in the present study, molecular dynamics (MD) simulations were performed on the homology modeled structure of the novel H1N1 HA complexed with the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide, a human preferential receptor, to investigate the fundamental structural characteristics, the role of conserved binding residues, and receptor binding specificity. Extensive analysis was focused on the structural properties and, in particular, on the enzyme-receptor interactions in terms of hydrogen bonding and per residue-receptor interactions.

Results and discussion

MD simulation of the novel H1N1 HA complexed with the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide, a human preferential receptor, was carried out over a period of 4 ns. In the last 2.5-ns simulation, the whole system is fairly stable as indicated by the small magnitude of root mean square deviation (RMSD) fluctuation of ca. 0.5 Å (Fig. 1). The simulation run could thus provide a suitable basis for the subsequent analyses.

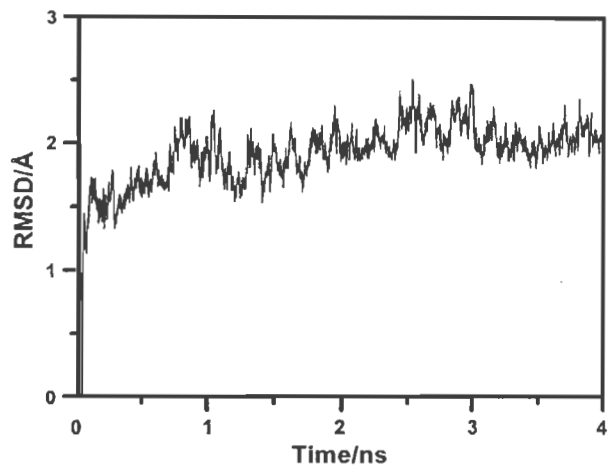


Fig. 1 Root mean square deviation (RMSD) of all heavy atoms of hemagglutinin and human SIA- α -2,6-GAL pentasaccharide receptor to the starting structure as a function of simulation time

The obtained human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor was found to properly occupy the binding pocket of the 2009 H1N1 hemagglutinin, similar to what has been observed experimentally in the other viral influenza HA strains [21, 28–30], where the potentially important contact residues of the 130-loop (K133a, N133, V135, T136, and A137), 190-helix (H183, D190, and S193), and 220-loop (K222, D225, Q226, and E227) as well as Y95 (see Fig. 2a for residue positions) were revealed. Structural properties, hydrogen bonds, and per residue-receptor interactions are extensively discussed in the following sections.

Sialopentasaccharide receptor conformation

To investigate the conformational character of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor, the distribution of eight important torsion angles, defined in Fig. 3a, from (1) τ 1– τ 4 bridging between the saccharide units and (2) τ 5– τ 8 of the functional groups of the terminal sialic acid, were measured and plotted in Fig. 3b and c, respectively.

It can clearly be seen in Fig. 3b that the τ 1 and τ 2 torsions of the first three saccharide units (SIA1, GAL2, and NAG3) show a single preferential and sharp peak, suggesting the high stability of these units which were well oriented and occupied in the binding pocket of the enzyme (Fig. 2a, b) and, therefore, that many hydrogen bonds with the HA residues were firmly formed (Fig. 4a, discussed later). The most probable glycosidic torsion angle (τ 1, black line in Fig. 3b) was found at ca. -68° indicating the adopted *cis*-conformation of the α -2,6-linked terminal sialic acid (SIA1) to the galactose (GAL2) of the receptor. This proposed conformation is consistent with what has

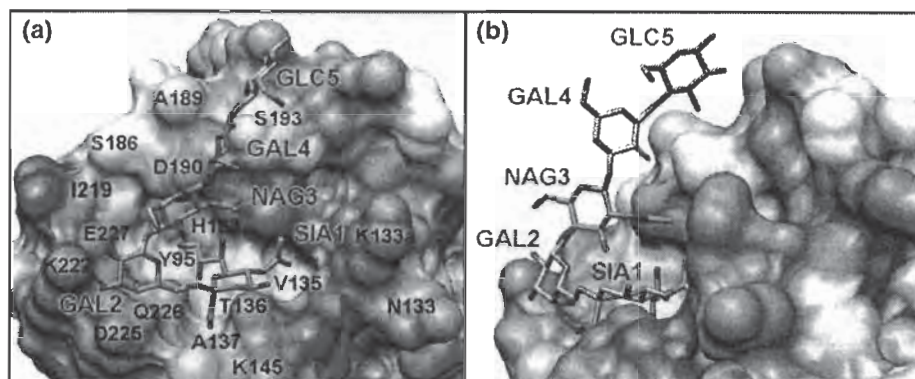
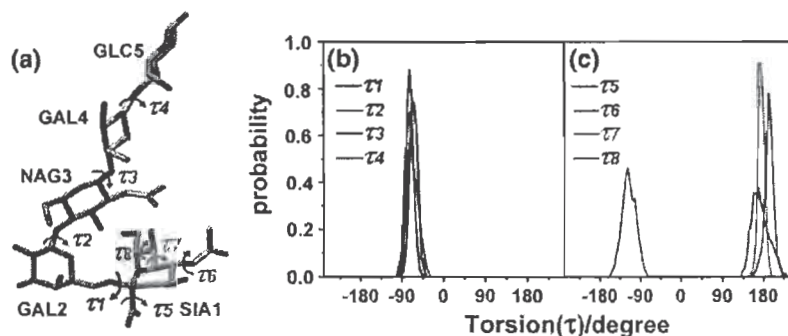


Fig. 2 **a** Top and **b** side views of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor bound to the binding pocket of the 2009 H1N1 influenza HA. The potential contact residues and five units of the receptor (SIA1, GAL2, NAG3, GAL4, and GLC5) are labeled.

Residue K133a is an inserted amino acid specific to the 2009 H1N1 HA. Blue and orange surfaces indicate the hydrophilic and hydrophobic features, respectively (color figure online)

Fig. 3 **a** Definition of torsion angles of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor. Probability distributions of the **b** torsion angles (τ_1 – τ_4) linking between each saccharide unit and **c** torsion angles (τ_5 – τ_8) of the functional groups of the terminal sialic acid



been observed both experimentally and theoretically for the human SIA-2,6-GAL receptor binding to the influenza HA subtypes H1, H3, and H5, whose glycosidic torsion angles were observed to fall within the range of between -50° and -70° [21, 30–33]. In the same fashion, the τ_3 and τ_4 angles linking between the last three saccharides (NAG3, GAL4, and GLC5) showed the single preferential sharp peak at ca. -73° (Fig. 3b) indicating their high rigidity throughout the simulation period.

To reveal the conformational change of the terminal sialic acid SIA1, the torsion angles of its functional groups were further evaluated and the results are shown in Fig. 3c. Amongst the four angles, τ_5 and τ_6 are slightly broader than the other two angles, τ_7 and τ_8 . This indicates that the $-\text{COO}^-$ and $-\text{NHAc}$ groups could feasibly rotate rather than the hydrophilic group.

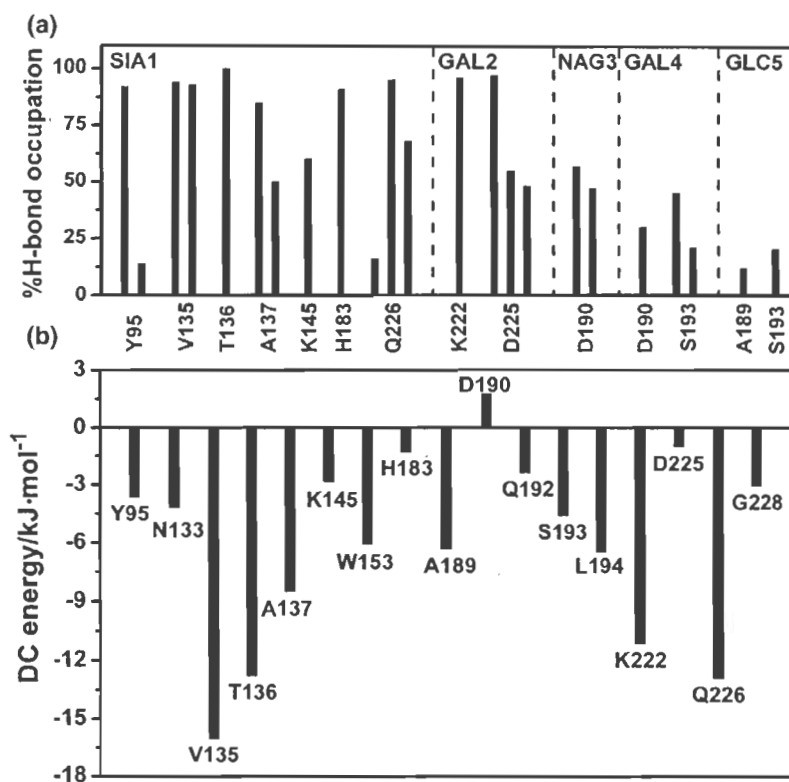
Enzyme–receptor hydrogen bonds

To determine the protein–receptor interactions, hydrogen bonding between the HA residues and the human SIA- α -2,6-GAL sialopentasaccharide receptor were calculated

according to the two criteria: (1) a proton donor (D) and acceptor (A) distance of 3.5 Å or less and (2) a D–H...A angle of 120° or more.

The number and percentage of hydrogen bond occupation of each of the 2009 HA binding residues and all five saccharides of the receptor were evaluated, and the results are shown in Fig. 4a (see description in Table 1). At the terminal sialic acid (SIA1, see Fig. 2a), extensive interactions were found with Y95 and the highly conserved residues of the 130-loop (V135, T136, and A137), 190-helix (H183), and 220-loop (Q226). The hydroxyl oxygen of the hydrophilic group forms a strong hydrogen bond to the phenyl group of Y95. Three strong hydrogen bonds were detected between the terminal sialic acid $-\text{COO}^-$ group and the three HA residues, T136 and A137 in the 130-loop and Q226 in the 220-loop, whilst the $-\text{NHAc}$ moiety established two strong hydrogen bonds with the backbone nitrogen and oxygen atoms of residue V135 in the 130-loop. In addition, the hydroxyl oxygen atoms of hydrophilic side chain form strong and moderate hydrogen bonds with the imidazole ring of H183 in the 190-helix and the amide group of Q226 in the 220-loop, respectively.

Fig. 4 **a** Hydrogen bonding occupation and **b** decomposition (DC) energy in kJ mol^{-1} of the individual residues of the 2009 H1N1 HA towards the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor (see Fig. 2 for residue labels)



Based on the numbers of hydrogen bonds (see Fig. 4a), the 130-loop is more likely to be in contact with SIA1 than the 190-helix and 220-loop, which is comparable to that of the other hemagglutinins complexed with the human receptor [21, 30, 33].

For the second unit of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor (GAL2), two strong hydrogen bonds were formed with the ammonium group of K222 and the backbone oxygen of D225. These hydrogen bonds were also detected in the case of the H5 HA-receptor complex, but not in the H3 and H9 HA-receptor complexes [33]. Moreover, two moderate hydrogen bonding interactions between the hydroxyl moieties of this saccharide and the carboxylate group of D225 were also found. Instead, G225, as in the crystal structure of the H1 HA-receptor complex [21, 30], forms hydrogen bonds through its backbone oxygen with the GAL2 unit. Finally, considering the other three units (NAG3, GAL4, and GLC5) of the sialopentasaccharide, they were all found to establish medium to rather weak hydrogen bond networks to the two 190-helix residues, D190 and S193, which are in agreement with the published results of the swine H1-receptor structure [21]. Interestingly, they are, however, different from what has been reported for the H3, H5, and H9 HA-receptor complexes where the last three glycans explicitly interact with the 150-loop and 190-helix [33].

Taking into account all the simulation results shown above, all important hydrogen bonds between the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor and the residues of the 130-loop, 190-helix, and 220-loop are considerably conserved and are more likely to be similar to those observed in the H1 HA-receptor complex structure [21, 30], indicating the likely reliability of the simulated structures of the human receptor bound to the pocket of the viral H1N1-2009 HA. In addition, the results also confirm the potentially important role of the 130-loop, 190-helix, and 220-loop of the viral surface HA in attaching to SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide glycan, which is the main receptor found in human respiratory tract host cells.

Per residue HA enzyme–SIA-2,6-GAL receptor interactions

To reveal the fundamental basis of the binding between the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor and the influenza HA, the interaction energies between each of the individual residues and the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide were evaluated by using the decomposition (DC) energy module implemented in AMBER 10. The energetic contribution was averaged over a set of 100 MD snapshots, taken at every 25 ps from the last 2.5-ns simulation.

Table 1 Hydrogen bond descriptions and interactions detected between heavy atoms of the human SIA- α -2,6-GAL pentasaccharide receptor and 2009-H1N1 hemagglutinin residues

Pentasaccharide	HA	Type	Occupation (%)
SIA1	Y95	Y95_OH_H...O8_SIA1	92
	Y95	Y95_OH...H_O9_SIA1	14
	V135	V135_N_H...O5N_SIA1	94
	V135	V135_O...H_N5_SIA1	93
	T136	T136_OG1_H...O1B_SIA1	100
	A137	A137_N_H...O1A_SIA1	85
	A137	A137_N_H...O1B_SIA1	50
	K145	K145_NZ_H...O4_SIA1	60
	H183	H183_NE2...H_O9_SIA1	91
	Q226	Q226_NE2_H...O1A_SIA1	16
	Q226	Q226_NE2_H...O1B_SIA1	95
	Q226	Q226_OE1...H_O8_SIA1	68
GAL2	K222	K222_NZ_H...O3_GAL2	96
	D225	D/G225_O...H_O4_GAL2	97
	D225	D225_OD1...H_O3_GAL2	55
	D225	D225_OD2...H_O3_GAL2	48
NAG3	D190	D190_OD1...H_N2_NAG2	57
	D190	D190_OD2...H_N2_NAG2	47
GAL4	D190	D190_OD1...H_O2_GAL4	30
	S193	S193_OG...H_O2_GAL4	45
	S193	S193_OG_H...O2_GAL4	21
GLC5	A189	T189_O...H_O6_GLC5	12
	S193	S193_OG...H_O3_GLC5	20

The evaluated DC energies of the HA residues located in the binding pocket are plotted in Fig. 4b, where the per residue interaction energies are seen to vary within the range of 2 to -17 kJ mol^{-1} . The major contribution to the enzyme-receptor interactions was gained from the conserved residues which are the members of the 130- and 220-loops: V135, T136, A137, K222, and Q226. The corresponding DC energies of less than -8 kJ mol^{-1} due to these residues agree well with the hydrogen bond data discussed above (Fig. 4a) and corroborate their important role in attaching the viral coat HA to the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor of susceptible host cells. The higher negative values of the DC data in Fig. 4b for the remaining residues of these two loops and the 190-helix residues (except for D190) also indicate their likely responsibilities in stabilizing the human receptor-HA complex. In some contrast, and in agreement with a previous theoretical report [34], the D190 residue was found to destabilize the protein-receptor complex.

Interestingly, as determined from their DC energies, the D225 and D190 residues do not significantly improve the enzyme-receptor binding affinity, although they interact

explicitly via three hydrogen bonds with the GAL2, NAG3, and GAL4 saccharides of the SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide, respectively (as discussed above). This can then be best understood in terms of their total interactions with the neighboring residues, since the DC energy is a summation of all interactions between a central residue and its environment, including the SIA-2,6-GAL receptor and all the residues of the respective HA enzyme. In other words, the D225 and D190 hydrogen bond energies can be destabilized by their repulsions with the other residues of the HA.

Conclusions

In the present study, the three-dimensional structure of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor bound to the recently detected 2009 H1N1 HA was modeled based on a homology modeling approach and consequently performed by molecular dynamic simulations. The structural properties and protein-receptor interactions, in terms of the receptor conformation, hydrogen bonds, and per residue interaction energies, were extensively discussed and compared to the binding between the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor and the other HAs. Basically, comparative molecular dynamics are complementary to experimental results (tissue binding, glycan microarrays, Scatchard analysis) and do not suffer the drawback of crystallographic methods in that the glycan and HA protein show considerable flexibility in conformation which is missed, by being only a single snapshot, by crystallographic methods.

Conformational analysis of the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor orientation throughout the simulation period confirms the adopted preferential *cis*-conformation of this receptor, as indicated by the glycosidic torsion angle between the terminal sialic acid (SIA1) and the adjacent galactose (GAL2) of ca. -68° . The simulated model of the 2009 H1 HA bound to the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor showed a well-oriented conformation of the receptor in the binding pocket of the HA enzyme and lays in the conserved regions including the 130-loop, 190-helix, and 220-loop. The sialic acid forms many strong hydrogen bonds with the HA residues V135, T136, A137, H183, and Q226. Furthermore, the GAL2 unit of the receptor was found to interact with the HA K222 and D225 residues, whilst the last three glycans established hydrogen bonds with D190 and S193. Based on a per residue interaction analysis, most receptor binding residues (especially V135, T136, A137, K222, and Q226) of the viral surface HA were found to play a stabilizing role in attaching to the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor of the host cell.

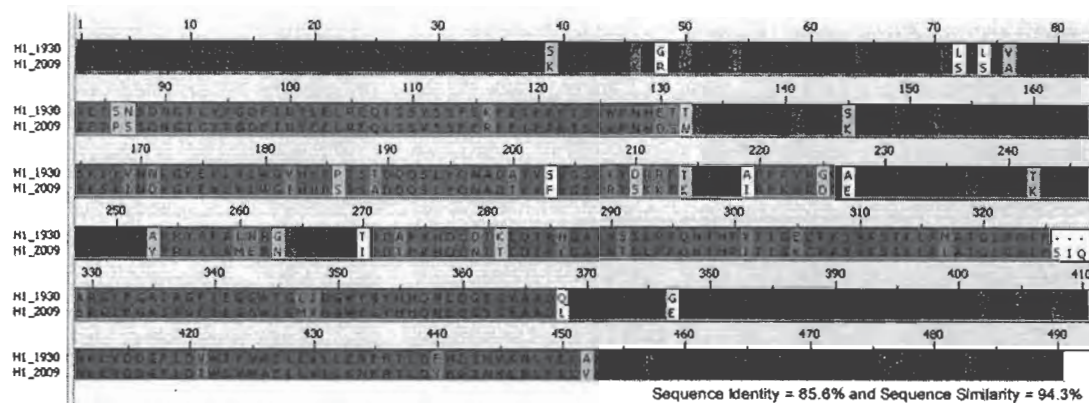


Fig. 5 Sequence alignment of 1930 and 2009 H1 hemagglutinins of influenza A (H1N1) viruses

In comparison to the other influenza HAs–human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor complexes, the simulated results of this receptor binding to the 2009 H1N1 influenza HA provided the highest similarity to those from the structure of the H1–receptor complex. This is mainly due to the fact that they belong to the identical HA subtype and so are likely to share the highest conformational as well as primary sequence similarity. In addition, the results also show somewhat similar properties to those evaluated and observed for the H3 and H5, and H9 HAs–SIA-2,6-GAL complexes. Although many experimental aspects of the 2009 H1N1 outbreak including its virulence and pandemic potential are still uncertain, our molecular information could provide a better understanding of the first step of the viral life cycle based on how the viral surface glycoprotein HA of the 2009 influenza A (H1N1) efficiently attaches and tightly binds with the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor.

Materials and methods

Model of 2009 H1N1 influenza hemagglutinin complexed with human receptor

The initial structure of the 2009 H1N1 influenza HA bound with the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor was modeled based on the sequence which was recently isolated from children in Southern California, A/California/04/2009(H1N1) [20]. To seek the most relevant structure of the 2009 HA protein, its amino acid sequence was preliminarily aligned to all seven available crystallographic H1N1 HA structures [21]. It was found that the highest amino acid sequence similarity, at 86% identical, was with the 1930 swine H1N1 HA structure (Fig. 5). Therefore, this HA enzyme structure complexed with the human SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide receptor (Protein Data Bank

entry code 1RVT) was chosen as the template [21] for building up the HA-2009 structure by homology modeling performed by using the module implemented in Discovery Studio 2.0 [22]. The novel H1N1 HA–receptor complex was then further refined by using energy minimization and followed by multiple stepwise MD simulations.

Molecular dynamics simulations

All simulations of HA–receptor complex were carried out using the SANDER module of the AMBER 10 software package [23]. The HA protein and SIA-2,6-GAL sialopentasaccharide were parameterized by using the AMBER03 [24] and the GLYCAM06 force fields [25], respectively. All missing hydrogen atoms were added by using the LEaP module [23] and the system was subsequently solvated by a cubic box with dimensions of $66 \times 69 \times 141 \text{ \AA}^3$ filled with TIP3P water molecules. Normal charge states of ionizable amino acids corresponding to pH 7.0 were treated and 5 Cl^- counterions were further added to maintain neutrality on the system. A periodic boundary condition in the isobaric–isothermal (NPT) ensemble with a constant pressure of 1 atm and a temperature of 310 K was set up, whilst a Berendsen coupling time of 0.2 ps was employed to control the temperature. The SHAKE algorithm [26] was applied to constrain all hydrogen bonds using a time step of 2 fs. Non-bonded interactions were calculated with a 12- \AA residue-based cutoff and the particle mesh Ewald method [27] was applied to treat the long-range electrostatic interactions. To remove unfavorable contact, the structure of the HA–receptor complexes was relaxed by performing 3,000 steps of conjugated gradient energy minimization. The whole system was subsequently heated from 0 to 310 K over 100 ps. The system was pre-equilibrated for two steps of 200-ps simulations with position restraints on the receptor atoms with the factors of 80 and 40 $\text{kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$,

to maintain their coordinates inside the protein binding pocket. Afterwards, the complex was fully simulated for 4 ns.

Acknowledgments This work was financially supported by the Thailand Research Fund (TRF) and the Commission Higher Education (CHE). N.N. (Grant No. MRG5180298) and T.R. (Grant No. TRG5280035) acknowledge the funding for New Research from TRF. The authors are grateful for the partial support by the Rachadapisek Sompoch Endowment Fund "Emerging Health Risk Cluster", Chulalongkorn University. The Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, is acknowledged.

References

- World Health Organization (2010) Global Alert and Response (GAR). <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>. Accessed 2 May 2010
- Zarocostas J (2009) World Health Organization declares A (H1N1) influenza pandemic. Available via http://www.bmj.com/cgi/content/extract/338/jun12_1/b2425. Accessed 2 May 2010
- Centers for Disease Control and Prevention (2010) 2009 H1N1 flu. <http://www.cdc.gov/h1n1flu/>. Accessed 2 May 2010
- Steinhauer DA (1999) *Virology* 258:1
- Horimoto T, Kawaoka Y (2001) *Clin Microbiol Rev* 14:129
- Cross KJ, Burleigh LM, Steinhauer DA (2001) *Exp Rev Mol Med* 6:1
- Stevens J, Blixt O, Tumpey TM, Taubenberger JK, Paulson JC, Wilson IA (2006) *Science* 312:404
- Wiley DC, Skehel JJ (1987) *Annu Rev Biochem* 56:365
- Skehel JJ, Wiley DC (2000) *Annu Rev Biochem* 69:531
- Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, Tumpey TM, Sasisekharan V, Sasisekharan R (2008) *Nat Biotechnol* 26:107
- Bateman AC, Busch MG, Karasin AI, Bovin N, Olsen CW (2008) *J Virol* 82:8204
- Gambaryan AS, Karasin AI, Tuzikov AB, Chinarev AA, Pazynina GV, Bovin NV, Matrosovich MN, Olsen CW, Klimov AI (2005) *Virus Res* 114:15
- Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA (1997) *Virology* 233:224
- Rogers GN, D'Souza BL (1989) *Virology* 173:317
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holl RE, Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y (2000) *J Virol* 74:11825
- Russell RJ, Stevens DJ, Haire LF, Gamblin SJ, Skehel JJ (2006) *Glycoconjugate J* 23:85
- van Riel D, Munster VJ, de Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus AD, Kuiken T (2007) *Am J Pathol* 171:1215
- Nicholls JM, Bourne AJ, Chen H, Guan Y, Peiris JSM (2007) *Respir Res* 8:73
- Soundararajan V, Tharakaraman K, Raman R, Raguram S, Shriver Z, Sasisekharan V, Sasisekharan R (2009) *Nat Biotechnol* 27:510
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2010) GenBank sequences from pandemic (H1N1) 2009 viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/SwineFlu.html>. Accessed 2 May 2010
- Gamblin SJ, Haire LF, Russell RJ, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, Vasisht N, Steinhauer DA, Daniels RS, Elliot A, Wiley DC, Skehel JJ (2004) *Science* 303:1838
- Discovery Studio 2.0, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA
- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Crowley M, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Yang L, Tan C, Mongan J, Hornak V, Cui G, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Kollman PA (2008) AMBER 10, University of California, San Francisco
- Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T, Caldwell J, Wang J, Kollman P (2003) *J Comput Chem* 24:1999
- Tessier MB, DeMarco ML, Yongye AB, Woods RJ (2008) *Mol Simulat* 34:349
- Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC (1977) *J Comput Phys* 23:327
- Darden T, York D, Pedersen L (1993) *J Chem Phys* 98:10089
- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11181
- Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC (1968) *Virology* 309:209
- Lin T, Wang G, Li A, Zhang Q, Wu C, Zhang R, Cai Q, Song W, Yuen KY (2009) *Virology* 392:73
- Kumari K, Gulati S, Smith DF, Gulati U, Cummings RD, Air GM (2007) *Virol J* 4:42
- Li MY, Wang BH (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 347:662
- Xu D, Newhouse EI, Amaro RE, Pao HC, Cheng LS, Markwick PRL, McCammon JA, Li WW, Arzberger PW (2009) *J Mol Biol* 387:465
- Iwata T, Fukuzawa K, Nakajima K, Aida-Hyugaji S, Mochizuki Y, Watanabe H, Tanaka S (2008) *Comput Biol Chem* 32:198

Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach

Thanyada Rungrotmongkol · Matusros Malaisree ·
Nadtanet Nunthaboot · Pornthep Sompornpisut ·
Supot Hannongbua

Received: 2 July 2009 / Accepted: 14 December 2009 / Published online: 27 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract To predict the susceptibility of the probable 2009 influenza A (H1N1-2009) mutant strains to oseltamivir, MD/LIE approach was applied to oseltamivir complexed with the most frequent drug-resistant strains of neuraminidase subtypes N1 and N2: two mutations on the framework residues (N294S and H274Y) and the two others on the direct-binding residues (E119V and R292K) of oseltamivir. Relative to those of the wild type (WT), loss of drug–target interaction energies, especially in terms of electrostatic contributions and hydrogen bonds were dominantly established in the E119V and R292K mutated systems. The inhibitory potencies of oseltamivir towards the WT and mutants were predicted according to the ordering of binding-free energies: WT ($-12.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) > N294S ($-10.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) > H274Y ($-9.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) > E119V ($-9.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) > R292K ($-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$), suggesting that the H1N1-2009

influenza with R292K substitution, perhaps, conferred a high level of oseltamivir resistance, while the other mutants revealed moderate resistance levels. This result calls for an urgent need to develop new potent anti-influenza agents against the next pandemic of potentially higher oseltamivir-resistant H1N1-2009 influenza.

Keywords 2009-H1N1 influenza A neuraminidase · Oseltamivir resistance · Mutations · Molecular dynamics simulations

Introduction

The 2009 influenza A (H1N1) virus has rapidly spread across the world with an evidence of human to human transmission. The probable mutation in the neuraminidase (NA) genes could cause resistance to the available drugs, especially oseltamivir. A new drug-resistant strain probably leads to a large scale outbreak of novel pandemic flu and an increase the national and global public health concerns. Common mutations in N1 (a subtype in NA group 1) are detected at N294S and H274Y, while the E119V and R292K mutations are mostly found in the N2 and N9 subtypes (in NA group 2), with oseltamivir resistance levels relative to the wild type (WT) of 20–80, 700–1,700, 20–1,000 and 1,500–10,000-fold higher, respectively (Abed et al. 2008; Collins et al. 2008; Yen et al. 2005, 2007). To date, oseltamivir has been found to effectively inhibit this new virus [2009 A (H1N1)] due to the following reasons: the N1 of the new H1N1 influenza and N9 share an identical active site (Rungrotmongkol et al. 2009a, b), and oseltamivir was designed to fit well to the active site of the NA group 2. With an increase in medical use and stockpile of oseltamivir for the recent

T. Rungrotmongkol and M. Malaisree have equally contributed to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00726-009-0452-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Rungrotmongkol · M. Malaisree · P. Sompornpisut ·
S. Hannongbua (✉)
Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry,
Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Bangkok 10330, Thailand
e-mail: supot.h@chula.ac.th

T. Rungrotmongkol
Center of Innovative Nanotechnology,
Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

N. Nunthaboot
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Maharakham University, Maharakham 44150, Thailand

outbreak, the question arises, and is the main goal of this study, can we predict the inhibitory activity of oseltamivir with respect to those frequent mutations that take place in the influenza A (H1N1-2009) strain, and thus the potential evolution and spread of resistant strains. The oseltamivir-resistant influenza NA mutants would perhaps serve as the emergence of a potential pandemic strain of the 2009-H1N1 virus.

Oseltamivir is an antiviral drug against NA that functions by preventing viral replication in the last step of the viral life cycle. It was found to directly interact with the catalytic residues of the NA active site, while the framework residues stabilized the enzyme structure (Fig. 1) (Ferraris and Lina 2008). Mutations at the conserved residues of NA appear to associate with oseltamivir resistance in a subtype specific manner. Thus, the mutated framework residues H274Y and N294S are regularly indentified in N1, while in the N2 and N9 sub-types, mutations on the binding residues (E119V and R292K) of oseltamivir were detected after treatment in infected patients with high oseltamivir resistance (Abed et al. 2008; Boivin and Goyette 2002; Collins et al. 2008; Mishin et al. 2005; Zürcher et al. 2006).

To provide information at the molecular level to aid the control and prevention of emerging potential pandemic strains of the 2009-H1N1 influenza, multi-molecular dynamics (MD) simulations in conjunction with the linear interaction energy (LIE) method have been performed on complexes of oseltamivir bound to each of the four most likely 2009-H1N1-mutated strains; that is, with the H274Y, N294S, E119V and R292K substitutions. The structural property, drug–target interaction and the binding affinity of oseltamivir against the mutated models are extensively discussed and compared with those recently published for the wild-type strain of the 2009-H1N1 influenza A virus (Rungrotmongkol et al. 2009a, b).

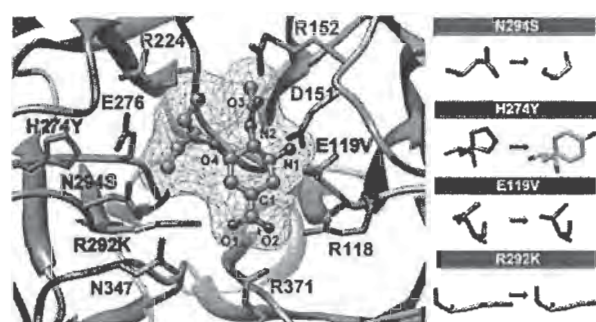


Fig. 1 Modeled structure of oseltamivir bound to the wild-type strain of 2009-H1N1 influenza neuraminidase. Among the labeled residues, four residues colored in red are singly mutated for investigation in this work: there are N294S, H274Y, E119V and R292K mutations. The selected atoms of oseltamivir are numbered for simplicity in the discussion

Materials and methods

The homology model of oseltamivir bound to the wild-type NA (OTV-WT) of the 2009-H1N1 virus (Rungrotmongkol et al. 2009a, b) was used as the initial structure for the modeling of the four single mutations: N294S, H274Y, E119V and R292K. To prepare each mutant, the specific residue was changed using the LEaP module of the AMBER 10 program package (Case et al. 2008), keeping the backbone and identical side chain atoms. All mutated NA strains with oseltamivir bound were then set-up and treated in accordance with the 20-ns MD simulations for the wild-type novel H1N1 influenza (Rungrotmongkol et al. 2009a, b), as follows.

Each simulated system was performed by MD simulations with spherical boundary condition under the surface constrained all atom solvent model (King and Warshel 1989) using the Q-program (Marelius et al. 1998), version 5. The atomic charges of oseltamivir were taken from our previous study (Malaisree et al. 2008). The AMBER force field (Case et al. 2008) was applied to the amino acid and inhibitor atoms. To set-up the environment for oseltamivir to be the most similar in all simulated systems and to take the conformational change of the oseltamivir into consideration, the C1 atom of oseltamivir was then chosen to be the center of simulation and the whole oseltamivir structure was thus considered as ligand. In the simulations, the system was capped by a 25 Å sphere of TIP3P water molecules centered on the C1 atom of oseltamivir (see Fig. 1 for atomic label). Atoms positioned further than 25 Å from the C1 center were taken into consideration as structural restrains. All acidic and basic side chains of residues lying within a 22 Å sphere were fully charged. In contrast, these ionizable residues positioning between 22 Å and 25 Å distances were neutralized, except for the pairs of charged residues with a probable formation of hydrogen-bonding interactions. The rest ionizable residues located outside a 25 Å sphere were considered as uncharged entities. Local reaction field approximation was employed for calculating the long-range electrostatic (ES) interactions, with a 10-Å cut-off radius for the non-bonded interactions. The SHAKE algorithm (Ryckaert et al. 1977) was applied to fix all bonds involving hydrogen atom. The NVT ensemble was performed, and a 2-fs time step was used. Initially, locations of the water molecules were simulated by MD simulations at 5 K, keeping all other atoms fixed to their initial positions, and the whole structure was then relaxed by four steps of simulations. Afterwards, the system was heated to 298 K over 300 ps, followed by equilibration phase. At last, the four equilibrated structures were randomly chosen for employing a production phase of 5-ns simulation.

To predict the binding-free energies (ΔG_{bind}) of oseltamivir towards the NA mutants, the LIE method (Åqvist

Table 1 Changes in the electrostatic and van der Waals interactions for the four substituent functional groups of oseltamivir in the bound states of the modeled H1N1 mutant relative to those of wild type

Functional group	$\langle \Delta \Delta U^{ES} \rangle_{\text{bound}}$ (kcal mol ⁻¹)			
	N294S	H274Y	E119V	R292K
(a) Electrostatic interactions				
-COO ⁻	8.3 ± 0.2	11.3 ± 0.1	5.4 ± 0.1	14.1 ± 0.2
-NH ₃ ⁺	-2.7 ± 0.4	-2.8 ± 0.5	11.1 ± 0.6	2.3 ± 1.2
-NHAc	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	4.2 ± 0.2
-OCH ₂ Et ₂	1.3 ± 0.6	0.6 ± 0.6	1.5 ± 0.9	4.3 ± 1.2
Oseltamivir	10.0 ± 0.6	11.1 ± 0.6	23.9 ± 0.9	24.9 ± 1.2
Functional group	$\langle \Delta \Delta U^{vdW} \rangle_{\text{bound}}$ (kcal mol ⁻¹)			
	N294S	H274Y	E119V	R292K
(b) Van der Waals interactions				
-COO ⁻	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.3
-NH ₃ ⁺	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.0	-0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1
-NHAc	0.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	-0.7 ± 0.1
-OCH ₂ Et ₂	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	3.2 ± 0.2
Oseltamivir	2.5 ± 0.0	3.4 ± 0.0	1.2 ± 0.0	4.2 ± 0.2

Means and standard deviations are derived from four separate 5-ns simulations

et al. 1994; Hansson et al. 1998) was used. The total binding-free energy, which includes the van der Waals (vdW) (U^{vdW}) and the ES interaction energies (U^{ES}), of the two simulated states: (1) the solvated ligand (free state), and (2) the ligand bound to the solvated protein (bound state) were evaluated using the equation:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha (\langle U^{vdW} \rangle_{\text{bound}} - \langle U^{vdW} \rangle_{\text{free}}) + \beta (\langle U^{ES} \rangle_{\text{bound}} - \langle U^{ES} \rangle_{\text{free}}) + \gamma \quad (1)$$

where α and β are the empirical scaling coefficients for the vdW and ES interaction energies, respectively, and γ is a constant. Here, Wall's coefficients ($\alpha = 0.472$, $\beta = 0.122$ and $\gamma = 2.603$), which were efficiently derived from a statistical analysis of the inhibitor sets binding to the relevant NA enzyme (Wall et al. 1999) were chosen to fit the LIE equation due to the three following reasons. (1) Because the outbreak of the novel H1N1 pandemic flu was just arisen in April 2009, the experimental inhibitory activities required for the construction and validation the LIE model for the training set are not available. (2) This set of coefficients was successfully applied on the avian influenza A (H5N1) virus in prediction, the inhibitory activity of oseltamivir against both WT and mutant strains (Rungrotmongkol et al. 2009a, b). (3) The four single mutated strains of 2009-H1N1 neuraminidase virus in the present study were built by a specific mutation on the wild-type strain modeled from the crystal structure of the H5N1 neuraminidase with the sequence identity of 91%

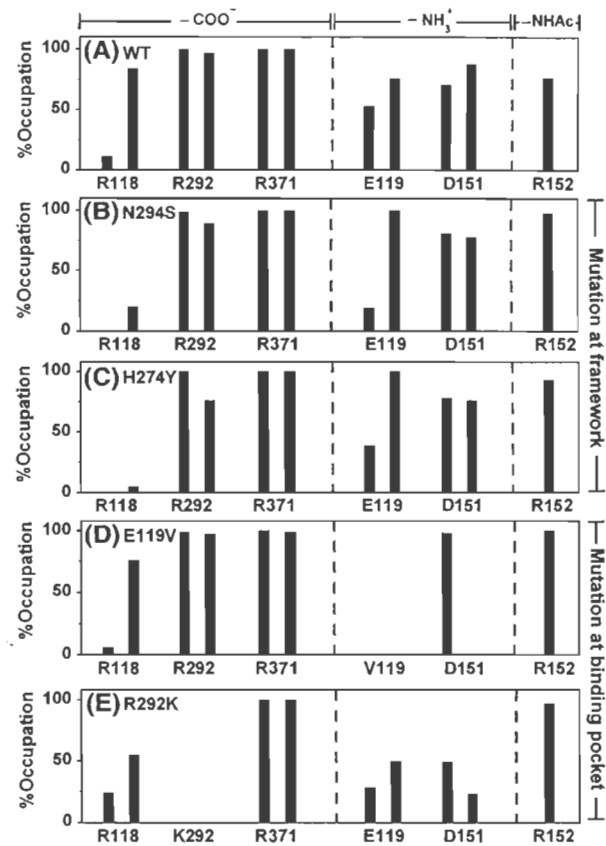


Fig. 2 Percentage occupation of H-bonds between the functional groups of oseltamivir and the NA residues (see Fig. 1 for residue positions) in the mutant models with the single substitution at two distinct regions: the framework residues closed to the hydrophobic pocket (N294S and H274Y), and the direct-binding residues (E119V and R292K)

(Rungrotmongkol et al. 2009a, b). Therefore, both WT and mutant NA strains of 2009-H1N1 are relatively similar to the H5N1 NA enzyme.

Results and discussion

Reduced oseltamivir binding to probable H1N1-2009 mutants

To examine oseltamivir susceptibility within the neuraminidase pocket of the 2009-H1N1 mutant models, intermolecular hydrogen-bond (H-bond), ES and vdW interactions between the oseltamivir's side chains and the NA residues were evaluated and compared with those of the WT (Rungrotmongkol et al. 2009a, b). The ES and vdW energetic differences were evaluated using Eqs. 2a and 2b, and are summarized in Table 1:

$$\langle \Delta \Delta U^{\text{ES}} \rangle_{\text{bound}} = \langle U^{\text{ES}} \rangle_{\text{bound}}[\text{mutant}] - \langle U^{\text{ES}} \rangle_{\text{bound}}[\text{wild type}]. \quad (2a)$$

$$\langle \Delta \Delta U^{\text{vdW}} \rangle_{\text{bound}} = \langle U^{\text{vdW}} \rangle_{\text{bound}}[\text{mutant}] - \langle U^{\text{vdW}} \rangle_{\text{bound}}[\text{wild type}]. \quad (2b)$$

The positive and negative values of the energy components indicate that the selected moiety of oseltamivir in the mutants decreases and increases its binding potency, relative to that of the WT, respectively. The H-bonds were calculated according to the two criteria that (1) the proton donor (D) and acceptor (A) distance is $\leq 3.5 \text{ \AA}$ and (2) the D–H..A angle is $\geq 120^\circ$. The results are shown in Fig. 2, whereas the descriptions are given in Table S1 of the supplementary materials. The schematic views of hydrogen bonds formed between oseltamivir and

its binding residues extracted from the simulations were given in Fig. 3.

Lower oseltamivir binding-free energies to the probable H1N1-2009 mutants were observed in terms of the H-bonds, ΔU^{ES} and ΔU^{vdW} energies relative to the WT, depending on where the mutation is located. As expected, the ES effect of single mutation at the framework residues (H274Y and N294S) is drastically less than that at the direct-binding residues (E119V and R292K), which leads to the ΔU^{ES} reduction being in the range of c.a. 10–11 and 24–25 kcal mol⁻¹, respectively (Table 1a).

For the H1N1 WT, the strong oseltamivir–NA interactions were found via five, three and one H-bonds ($\geq 75\%$) with the $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$ and $-\text{NHAc}$ moieties, respectively (Figs. 2a, 3a). In the two framework region mutations, it can be seen that the $-\text{COO}^-$ group of oseltamivir

Fig. 3 Electrostatic potential of five different NA strains complexed with oseltamivir where negative regions are in red and positive regions are in blue: a wild type, b N294S, c H274Y, d E119V and e R292K. Closeup of oseltamivir, hydrogen bonds to its binding residues are represented by red dashed line

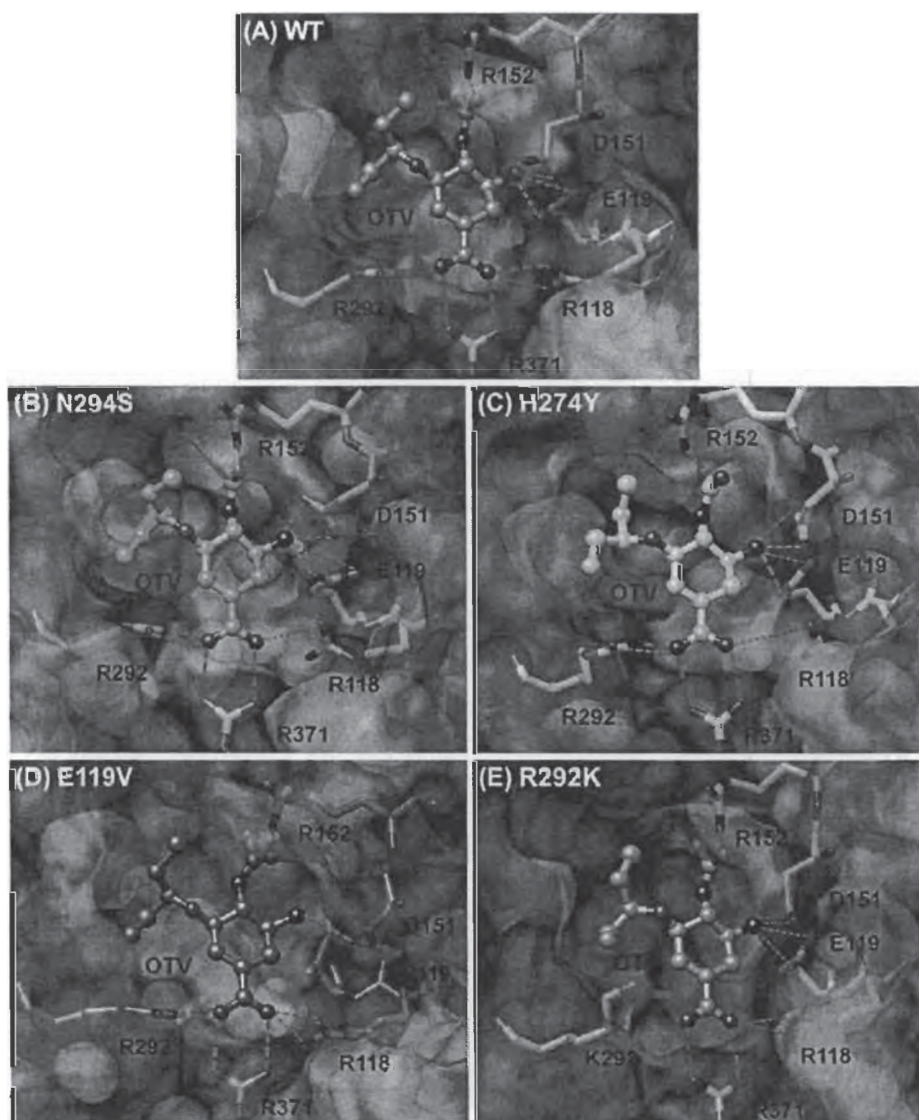


Table 2 MD/LIE binding-free energies (ΔG_{bind}) of oseltamivir towards the 2009-H1N1 influenza neuraminidases [A/California/04/2009(H1N1)] for the wild type (WT) and the probable single mutations: N294S, H274Y, E119V and R292K

NA strain	ΔG_{bind} (kcal mol ⁻¹)				
	WT	N294S	H274Y	E119V	R292K
Predictive					
A/California/04/2009(H1N1)	-12.8 ± 0.9	-10.4 ± 0.9	-9.8 ± 1.0	-9.3 ± 0.8	-7.7 ± 0.7
Experimental ^a					
A/WSN/33 (H1N1) ^b	-12.1	-9.3	-8.5	-	-
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ^c	-11.4	-8.8	-8.1	-	-
A/Vietnam/1203/04 (H1N1) ^c	-13.0	-11.2	-8.6	-	-
A/Vietnam/1203/04 (H5N1) ^d	-13.1	-10.5	-9.8	-	-
A/Sydney/5/97 (H3N2) ^b	-12.8	-8.3	-	-8.6	-7.3
A/Wuhan/359/95 (H3N2) ^e	-12.4	-	-	-9.1	-6.2

Means and standard deviations are derived from four separate 5-ns simulations

The experimental ΔG_{bind} for different strains of N1 and N2, converted from the K_i inhibitory and IC_{50} values, are also given for comparison

^a $\Delta G_{\text{experiment}}$ was calculated from the experimental data using the following references: (b) Abed et al. 2008, (c) Yen et al. 2007, (d) Collins et al. 2008 and (e) Yen et al. 2005

has almost lost the H-bonds with R118 (see Figs. 2b, 3b for N294S; Figs. 2c, 3c for H274Y) in correspondence with the $\Delta U^{\text{ES}}(-\text{COO}^-)$ reduction of 11.3 kcal mol⁻¹ in H274Y and 8.3 kcal mol⁻¹ in N294S (Table 1a). As expected (Table 1b), the decreased ΔU^{vdW} (oseltamivir) of 2.5 kcal mol⁻¹ by N294S and of 3.4 kcal mol⁻¹ by H274Y were mainly contributed from the loss of vdW interactions at the bulky OCHET₂ group (~1.5 kcal mol⁻¹). Previous theoretical studies on the influenza NA mutants have already explained how the H274Y mutation confers oseltamivir resistance by a meaningful change of E276's sidechain conformation with a consequent effect upon the shape and size of the hydrophobic pocket for the -OCHET₂ moiety (Malaisree et al. 2009; Rungrotmongkol et al. 2009a, b; Wang and Zheng 2009) while E276 in the N294S mutant acted as the center of H-bond network between R224 and S294 (Rungrotmongkol et al. 2009a, b) similar to that found in the crystal structure of the oseltamivir-resistant H5N1 N294S variant (Collins et al. 2008).

With a relatively high reduction in the ES contribution to oseltamivir in the mutations at the binding residues (E119V and R292K, Table 1a), the mutated residues V119 and K292 showed a complete loss of H-bond interactions with the -NH₃⁺ and -COO⁻ moieties of oseltamivir (Figs. 2d, 3d for E119V; Figs. 2e, 3e for R292K), supported by an increase in the $\Delta U^{\text{ES}}(-\text{NH}_3^+)$ by 11.1 kcal mol⁻¹ and in the $\Delta U^{\text{ES}}(-\text{COO}^-)$ by 14.1 kcal mol⁻¹. In addition, only one H-bond with D151 in the E119V mutant was maintained, while lower H-bond strengths in the R292K mutant were observed at R118, E119 and D151. Moreover, a reduced vdW interaction of 3.2 kcal mol⁻¹ was found at the -OCHET₂ group in the R292K mutant

because the side chain of K292 (Fig. 3e) is smaller and shorter than that of R292 (Fig. 3a). The results of the R292K mutation were somewhat comparable to the computational study of the sialic acid analogs binding to the R292K mutated NA subtype N9 (Chachra and Rizzo 2008).

Prediction of inhibitory activity against the H1N1 mutated strains

Based on the MD/LIE approach, the binding affinities of oseltamivir towards different mutant models of the 2009-H1N1 influenza [A/California/04/2009(H1N1)], according to Eq. 1, were predicted and are summarized in Table 2. As expected, oseltamivir's binding-free energy against the WT is the most favorable one at -12.8 kcal mol⁻¹. Only moderate binding-free energy values were found for the N294S, H274Y and E119V mutated strains, in which the corresponding ΔG_{bind} of -10.4, -9.8 and -9.3 kcal mol⁻¹, respectively. The lowest favorable binding of oseltamivir is found in the R292K mutant with a predicted ΔG_{bind} of -7.7 kcal mol⁻¹. All the calculated binding-free energies were found to fall within the ranges of those experimentally determined for various WT and mutant strains of the other influenza N1 and N2 subtypes (Table 2) (Abed et al. 2008; Boivin and Goyette 2002; Collins et al. 2008; Mishin et al. 2005; Zürcher et al. 2006).

Taking all the above data into consideration, it seems likely that oseltamivir will be significantly less potent an inhibitor for all the modeled mutants of the 2009-H1N1 strains, with the ranked order of: R292K < E119V < H274Y < N294S.

Conclusions

In the present study, multi-MD simulations in conjunction with the LIE method was performed on oseltamivir–NA-bound complexes for the four probable NA mutants of influenza A (H1N1-2009): two mutations on the framework residues (N294S and H274Y) and the two others on the direct-binding residues (E119V and R292K) of oseltamivir. Reduction in the oseltamivir–enzyme interaction energies, particularly in the ES term, and in the hydrogen bonding were both observed in the two mutated systems with substitution on the direct-binding residues, E119V and R292K.

Based on the MD/LIE approach, the inhibitory potencies of oseltamivir towards the WT and mutants were predicted in accordance with their derived binding-free energies (ΔG_{bind}) with: WT ($-12.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) > N294S ($-10.4 \text{ kcal mol}^{-1}$) > H274Y ($-9.8 \text{ kcal mol}^{-1}$) > E119V ($-9.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) > R292K ($-7.7 \text{ kcal mol}^{-1}$). This means that oseltamivir (which, to date, effectively inhibits the current H1N1-2009 wild-type strain) is less effective in protection and/or treatment of patients with these probable mutants, and especially with the R292K variant. Therefore, surveillance of any mutations in the influenza A (H1N1-2009) needs to be closely watched, and prompt action taken for preparation for the next pandemic of potentially higher oseltamivir-resistant H1N1 influenza strains. This calls for the urgent development of new potent anti-influenza agents against both native and mutants forms of H1N1-2009.

Acknowledgments This work was supported by the Thailand Research Fund (TRF). T.R. thanks the TRF Grant for New Research (Grant No. TRG5280035) and M.M. thanks the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. 3.C.CU/48/F.1) from the TRF. T.R. also thanks the Post-Doctoral Program from the Commission on Higher Education. The Computational Chemistry Unit Cell, Chulalongkorn University, provided the computing facilities. The Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Chulalongkorn University, is acknowledged.

References

- Abed Y, Nehmé B, Baza M, Boivin G (2008) Activity of the neuraminidase inhibitor A-315675 against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of N1 and N2 subtypes. *Antiviral Res* 77:163–166
- Åqvist J, Medina C, Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng* 7:385–391
- Boivin G, Goyette N (2002) Susceptibility of recent Canadian influenza A and B virus isolates to different neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 54:143–147
- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Crowley M, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Yang L, Tan C, Mongan J, Hornak V, Cui G, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Kollman PA (2008) AMBER10 University of California San Francisco
- Chachra R, Rizzo RC (2008) Origins of resistance conferred by the R292K neuraminidase mutation via molecular dynamics and free energy calculations. *J Chem Theory Comput* 4:1526–1540
- Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, Skehel JJ, Martin SR, Hay AJ, Gamblin SJ (2008) Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature* 453:1258–1261
- Ferraris O, Lina B (2008) Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* 41:13–19
- Hansson T, Marelus J, Åqvist JJ (1998) Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *J Comput Aided Mol Des* 12:27–35
- King G, Warshel A (1989) A surface constrained all-atom solvent model for effective simulations of polar solutions. *J Chem Phys* 91:3647–3661
- Malaisree M, Rungrotmongkol T, Decha P, Intharathep P, Aruksakunwong O, Hannongbua S (2008) Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins* 71:1908–1918
- Malaisree M, Rungrotmongkol T, Nunthaboot N, Aruksakunwong O, Intharathep P, Decha P, Sompornpisut P, Hannongbua S (2009) Source of oseltamivir resistance in avian influenza H5N1 virus with the H274Y mutation. *Amino Acids* 37:725–732
- Marelus J, Kolmodin K, Feierberg I, Åqvist J (1998) Q: a molecular dynamics program for free energy calculations and empirical valence bond simulations in biomolecular systems. *J Mol Graph Model* 16:213–225
- Mishin VP, Hayden FG, Gubareva LV (2005) Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4515–4520
- Rungrotmongkol T, Intharathep P, Malaisree M, Nunthaboot N, Kaiyawet N, Sompornpisut P, Payungporn S, Poovorawan Y, Hannongbua S (2009a) Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus. *Biochem Biophys Res Commun* 385:390–394
- Rungrotmongkol T, Udommaneethanakit T, Malaisree M, Nunthaboot N, Intharathep P, Sompornpisut P, Hannongbua S (2009b) How does each substituent functional group of oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 influenza mutants? *Biophys Chem* 145:29–36
- Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC (1977) Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* 23:327–341
- Wall ID, Leach AR, Salt DW, Ford MG, Essex JW (1999) Binding constants of neuraminidase inhibitors: an investigation of the linear interaction energy method. *J Med Chem* 42:5142–5152
- Wang NX, Zheng JJ (2009) Computational studies of H5N1 influenza virus resistance to oseltamivir. *Protein Sci* 18:707–715
- Yen HL, Herlocher LM, Hoffmann E, Matrosovich MN, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA (2005) Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4075–4084
- Yen HL, Ilyushina NA, Salomon R, Hoffmann E, Webster RG, Govorkova EA (2007) Neuraminidase inhibitor-resistant recombinant A/Vietnam/1203/04 (H5N1) influenza viruses retain their replication efficiency and pathogenicity in vitro and in vivo. *J Virol* 81:12418–12426
- Zürcher T, Yates PJ, Daly J, Sahasrabudhe A, Walters M, Dash L, Tisdale M, McKimm-Breschkin JL (2006) Mutations conferring zanamivir resistance in human influenza virus N2 neuraminidases compromise virus fitness and are not stably maintained in vitro. *J Antimicrob Chemother* 58:723–732

Curriculum Vitae
Prof. Dr. Supot Hannongbua

Birth:

April 13, 1959, Khon-Kaen, Thailand

Education:

- 1981 B.Sc.(Chemistry), Khon-Kaen University, Khon-kaen, Thailand
- 1983 M.Sc.(Physical Chemistry), Mahidol University, Bangkok, Thailand
- 1985 Ph.D.(Computational Chemistry), Innsbruck University, Austria

Academic Position:

- 1986 Lecturer, Chemistry Department, Faculty of Science,
Chulalongkorn University
- 1989 Assistant Professor, Chemistry Department, Faculty of Science,
Chulalongkorn University
- 1992 Associate Professor, Chemistry Department, Faculty of Science,
Chulalongkorn University
- 2005 Professor, Chemistry Department, Faculty of Science,
Chulalongkorn University

Administrative/Other Position:

- 1996-1999 General Secretary, the Science Society of Thailand under the
Patronage of his Majesty the King
- 1996-2004 Deputy Director, Metallurgy and Material Science Research
Institute, Chulalongkorn University
- 1999-present Vice President, the Science Society of Thailand under the
Patronage of his Majesty the King
- 2004-present Coordinator ASEA UNINET
- 2004-2007 Director, Metallurgy and Material Science Research
Institute, Chulalongkorn University
- 2002-present Editor, *J. Metallurgy Material and Mineral (J. Met. Mat. Min.)*
- 2000-present Editorial board, journal *ScienceAsia*
- 2007 Dean, Faculty of Science, Chulalongkorn University

International Scientific Collaboration:

1991-1996	Institute for Physics of Condensed Matter, Ukrainian Academy of Science, Lviv, Ukraine
2001-2005	Institute of Theoretical Chemistry, Technical University of Munich, Germany
1988-present	Innsbruck University, Austria
1988-present	Max-Planck Institute fuer Chemie, Mainz, Germany.
1995-present	Institute of Solution Chemistry, Ivanovo, Russia
1999-present	Leipzig University, Leipzig, Germany
2000-present	Institute of Theoretical Chemistry, University of Vienna, Austria
2001-present	Institute of Theoretical Chemistry, Utah, USA
2003-present	Bayreuth University, Germany
2004-present	Biochemistry Department, Michigan Sate University, USA

Scholarship/Research Grant:

1989-1994	Exchange Scientists Program, University of Innsbruck
1990-1994	Exchange Scientists Program, Max-Planck Institut fuer Chemie, Germany
1990-1994	Research Grant from the National Research Council of Thailand in cooperation with Max-Planck Institute Fuer Chemie, Germany and Ukrainian Academy of Science, Ukrain
1996-1998	Research Grant from the Thailand Research Fund
1998-1999	Research Grant from the Tore Foundation, Thailand
2003-2004	Research Project from the Thailand Research Fund, "Foresight Project on Physical Science on Eight State Universities in Thailand"
2004-2007	Research Grant from the National Research Council of Thailand in cooperation with Leipzig University, Germany
2004-present	The TRF Senior Scholarship, The Thailand Research Fund
2004-present	Research Grant from Chulalongkorn University, "Center for Innovative Nonotechnology" Chulalongkorn University.
2005	Research Project from the Commission on Higher Education, "Foresight Project on Physical Science and Biological Science on Eight State Universities in Thailand"

- 2005 Research Project from the Commission on Higher Education,
"Online-software Development for Teaching and Research Ranking of
Thai Universities"
- Award/Honor:
- 1989-1990 Junior Outstanding Research Award
(Faculty of Science, Chulalongkorn University).
- 1990 Outstanding Research Project
(Chulalongkorn University)
- 1991 Outstanding Research Project
(National Research Council of Thailand)
- 1992 Young Scientist Award
(Foundation for the Promotion of Science and Technology under the
Patronage of his Majesty the King).
- 1998 Outstanding Research Project
(Chulalongkorn University)
- 1999 1998 TWAS Prize for Young Scientists in Thailand
(Third World Academy of Science)
- 2001 The National Award for the Distinguished Researcher in the Field of
Physical Science and Mathematics
(National Research Council of Thailand)
- 2003 2003 Outstanding Scientist
(Foundation for the Promotion of Science and Technology under the
Patronage of his Majesty the King)
- 2003 The TRF Senior Scholarship
(The Thailand Research Fund)
- 2003 Most Cited TRF-Research Publication Award in the Field of Physical
Science and Engineering
(National Research Council of Thailand)

Publications:

1. Rode, B. M. and Hannongbua, S. "Quantum Chemical Calculations on Structure and Bonding of Macrocyclic Complexes of Li(I) and Na(I)", *Inorg. Chem. Acta*, **96**, 91(1985).
2. Hannongbua, S. and Rode, B. M. "Quantum Chemical Investigations on the Interaction of Alkali and Alkaline Earth Metal Ions with Macrocyclic Compounds", *Inorg. Chem.*, **24**, 2577(1985).
3. Hannongbua, S. and Rode, B. M. "An Intermolecular Potential Functions for Cyclen-Water Derived From *Ab-Initio* Molecular orbital Calculation" *Z. Naturforsch.*, **40a**, 644(1985).

4. Hannongbua, S. and Rode, B. M. "Monte Carlo Simulations of a Cyclen Molecule in Water", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **82**, 1021 (1986).
5. Hannongbua, S. and Rode, B. M. "A Monte Carlo Study on the Influence of Macrocyclic Compounds on the Structure of Water", *J. Sci. Soc. Thailand*, **11**, 135 (1985).
6. Kokpol, S. U., Hannongbua, S., Rode, B. M. and Limtrakul, J. P. "Investigation of Metal ion Induced Conformational Change in N-Acetyl Alanine Methyl Ester", *Inorg. Chim. Acta*, **125**, 107 (1986).
7. Rode, B. M., Ruangpornvisuti, V. W. and Hannongbua, S. "The Role of Solvation for the Macrocyclic Effect", *J. Sci. Soc. Thailand*, **13**, 47 (1987).
8. Limtrakul, J. P., Hannongbua, S., Kokpol, S. U. and Rode, B. M. "Cation Binding Effect on Hydrogen Bonded Dimer of Imidazole and Water", *Inorg. Chim. Acta*, **138**, 131 (1987).
9. Hannongbua, S., Kokpol, S. U., Kheawsrikul, S., Polman, S. and Rode, B. M. "Intermolecular Potential Function for Ammonia-Lithium Ion Based on Ab-Initio Calculations", *Z. Naturforsch.*, **43a**, 143 (1988).
10. Hannongbua, S., Ishida, T., Spohr, E. and Heinzinger, K. "A Molecular Dynamic Simulation of Lithium Ion in Liquid Ammonia" *Z. Naturforsch.* **43a**, 572 (1988).
11. Kokpol, S. U., Doungdee, P. B., Hannongbua, S., Limtrakul, J. P. and Rode, B. M. "An Ab-initio Study on the Hydration of Glycine Zwitterion", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **84**, 1789 (1988).
12. Kokpol, S. U., Hannongbua, S., Thongrit, N., Polman, S., Rode, B. M. and Schwendinger, M. G. "Quantum Pharmacological Studies on Primaquine Antimalarial Activity", *Analytical Science*, **4**, 565 (1988).
13. Kheawsrikul, S., Hannongbua, S., kokpol, S. U. and Rode, B. M. "A Monte Carlo Study on Preferential Solvation of Lithium(I) in Aqueous Ammonia", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, **85**, 643 (1989).
14. Hannongbua, S., Kheawsrikul, S. and Probst, M. M. "A Potential Function for Magnesium Ammonia Derived by Ab-Initio Calculations", *J. Sci. Soc. Thailand*, **15**, 203 (1989).
15. Hannongbua, S., Kokpol, S. U. and Limtrakul, J. P. "An Analysis of the Pathways for Magnesium Ion in the Field of a Macrocyclic Ligand", *Can. J. Chem.*, **67**, 1298 (1989).
16. Kokpol, S. U., Hannongbua, S., Yentongchai, W. and Rode, B. M. "Conformational Analysis of Be(II) and Mg(II) Complexes of N-Acetyl Alanine Methyl Ester", *Inorg. Chim. Acta*, **166**, 12 (1989).
17. Rode, B. M., Schwendinger, M. G., Kokpol, S. U., Hannongbua, S. and Polman, S. "Quantum Pharmacological Studies on Antimalaria Drugs", *Monatsh. Chem.*, **120**, 913 (1989).

18. Polman, S., Kokpol, S. U., Hannongbua, S. and Rode, B.M. "Quantum Pharmacological Analysis of Structure-Activity Relationships for Mefloquine Antimalarial Drugs", *Analytical Science*, 5, 641(1989).
19. Kokpol, S.U., Hannongbua, S., Limtrakul, J. P. and Rode, B. M. "The Influence of Na(I) on Neighbouring Hydrogen Bonds of Aliphatic Amino Acid", *Monatsh. Chem.*, 120, 491(1989).
20. Kokpol, S. U., Hannongbua, S. and Sangsoontorn, T. "Conformational Analysis of Metal Complexes of N-Acetyl Alanine Methyl Ester by CNDO/2 Method", *J. Sci. Soc. Thailand*, 15, 215 (1989).
21. Hannongbua, S. "A Molecular Dynamic Simulation of the Structure of Sodium Ion in Liquid Ammonia", *Aust. J. Chem.*, 44, 447(1991).
22. Khewsrikul, S., Hannongbua, S. and Rode, B. M. "Monte carlo Simulation of Magnesium Ion in 18.45 mol% Aqueous Ammonia Solution", *Z. Naturforsch*, 46a, 111(1991).
23. Kokpol, S. U., Doungdee, P., Hannongbua, S. and Chuankrerkkul, N. "The Rotational Barrier of the Hydrated Glycine Zwitterion", *J. Sci. Soc. Thailand*, 18, 175(1992).
24. Hannongbua, S., "Macrocyclic Effect and Conformational Analysis of the Mixed-Donor Macrocyclic 12-ANE N_2O_2 by Means of Quantum Chemical Methods", *Inorg. Chim. Acta*. 202, 85(1992).
25. Hannongbua, S. and Rode, B. M. "Monte Carlo Simulations of Magnesium Ion in Liquid Ammonia", *Chem. Phys.* 162, 257(1992).
26. Hannongbua, S. Kerdcharoen, T. and Rode, B. M. "Zinc(II) in Liquid Ammonia: Intermolecular Potential including 3-body terms and Monte Carlo Simulations", *J. Chem. Phys.*, 96, 6945(1992).
27. Gurskii, Z., Hannongbua, S. and Heinzinger, K. "On the Structure of Concentrated Lithium-Ammonia Solutions. A Molecular Dynamics Study" *Mol. Phys.*, 78, 461(1993). (IF=1.634)
28. Gurskii, Z., Kushaba, V., Hannongbua, S. and Heinzinger, K. "On Unusually Strong Temperature Dependences of Interatomic Potentials in Metal-Ammonia Solutions" *J. Met. Phys. Adv. Tech.*, 17, 62(1995). (IF=)
29. Suwannachot, Y., Hannongbua, S* and Rode, B.M. "Solvation of Lithium Chloride in Water-Hydroxylamine Mixtures" *J. Chem. Phys.*, 102, 7602(1995). (IF= 3.093)
30. Hannongbua, S*. "The Solvation of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane in Aqueous Solution as Studied by Monte Carlo Method" *J. Phy. Chem.*, 100, 17655(1996). (IF=)
31. Hannongbua, S*. "The Role of Non-Additive Effect in the First Solvation Shell of Na(I) and Mg(II) in Liquid Ammonia: Monte Carlo Studies Including Three-body Corrections" *J. Chem. Phys.* 106, 6076(1997). (IF= 3.149)

32. Aree, T* and Hannongbua, S. "Ab-initio Study of Collisions between Li and C₆₀" *Chem. Phys. Lett.*, 226, 427(1997). (IF= 2.169)

33. Aree, T* and Hannongbua, S. "Characteristics of the Li_nC₆₀ Complexes, n=1-6 and 12:Ab-initio Study" *J. Phys. Chem.* 101, 5551(1997). (IF= 2.899)

34. Chantrapromma, S. and Hannongbua, S. "Computer Simulations of the Solvent Structure around Magnesium Ion: A Monte Carlo Study", *Songkhanakarin J. Sci. Tech.*, 19, 49(1997). (IF=)

35. Hannongbua, S* and Udomsub, S. "The Solvation of Macrocyclic Compound in Water-Ammonia Mixture: Monte Carlo Simulations", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II*, 93, 3045(1997). (IF=)

36. Tongraar, A*, Hannongbua, S. and Rode, B. M. "Molecular Dynamics Simulations of Potassium Ion and in Liquid Ammonia", *Chem. Phys.* 219, 279(1997). (IF=2.291)

37. Hannongbua, S., Kokopol, S. U., Gurskii, Z. and Heinzinger, K*, "Cluster Structure of Concentrated Lithium-Liquid Ammonia Solutions: A Monte Carlo Study", *Z. Naturforsch.* 52a, 828(1997). (IF=)

38. Aree, T*, Kerdcharoen, T. and Hannongbua, S. "Charge Transfer, Polarization and Stability of Li-C₆₀ Complexes" *Chem. Phys. Lett.* 285, 221(1998). (IF= 2.169)

39. Hannongbua, S*. "On the Solvation of Lithium Ion in Liquid Ammonia: Monte Carlo Simulations with a Three-body Potential", *Chem. Phys. Lett.* 288, 663(1998). (IF= 2.169)

40. Sidhisoradej, W., Ruffolo, D. and Hannongbua, S*. "Three-body Effect in Calcium(II)-Ammonia Solution: Molecular Dynamics Simulations", *Z. Naturforsch.* 53a, 756(1998). (IF=0.737)

41. Kerdcharoen, T* and Hannongbua, S. "Ab initio Study of Ion-Ammonia Complexes: Geometry and Many-body Interactions" *Chem. Phys. Lett.* 301, 333(1999). (IF=2.169)

42. Hannongbua, S*. Kiselev, M. and Heinzinger, K. "Molecular Dynamics simulations of supercritical ammonia and metal-ammonia solutions" *Cond. Matt. Phys.* 3, 381(2000). (IF=)

43. Hannongbua, S*. "The best structure data of liquid Ammonia based on the pair Approximation: the first Principle Monte Carlo Simulation" *J. Chem. Phys.* 113, 4707(2000). (IF= 3.149)

44. Kiselev, M., Kerdcharoen, T., Hannongbua, S* and Heinzinger, K. "The Structure of Supercritical Ammonia as Studied by Molecular Dynamics Simulations", *Chem. Phys. Lett.* 327, 425(2000). (IF=2.169)

45. Bussai, C., Hannongbua, S* and Haberlandt, R. "Understanding the Movement, Encapsulation and Energy Barrier of Water Molecule via Diffusion in Silicalite using Ab-initio Calculations", *J. Phys. Chem.* 105, 3409(2001). (IF= 3.471)

46. Kiselev, M., Noskov, S*, Puhovski, Y., Kerdcharoen, T. and Hannongbua, S. "The Study of hydrophobic hydration in water-methanol mixture at supercritical region", *J. Mol. Graph. Mol. Model.* 19, 11(2001). (IF=2.347)

47. Krishtal, S., Kiselev, M., Puhovski, Y., Kerdcharoen, T., Hannongbua, S. and Heinzinger, K*. "The study of the hydrogen bond network in sub- and supercritical water by molecular dynamics simulations", *Z. Naturforsch.*, 56a, 579(2001). (IF= 0.737)

48. Jaiboon, N*, Yos-In, K., Ruangchaitaweesuk, S., Chaichit, N., Thutivoranath, R., Siraleartmukul, K. and Hannongbua, S. "New orthorhombic form of 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]benzeneacetic acid (Diclofenac acid)" *Analytical Science* 17, 1465(2001). (IF=1.735)

49. Bussai, C., Haberlandt, R., Hannongbua, S., Jost, And Fritzsche, S*. "Computer Simulations of Water in Zeolites", *Studies in Surface Science and Catalysis*, 135, 2263(2001). (IF=)

50. Bussai, C., Hannongbua, S*, Fritzsche, S. and Haberlandt, R. "Ab initio Intermolecular Potential and Molecular Dynamics Simulations for the Determination of Diffusion Coefficient of Water in Silicalite", *Chem. Phys. Lett.* 354, 310(2002). (IF= 2.169)

51. Bussai, C., Liu, H., Vasenkov, S., Hannongbua, S., Fritzsche, S*, Haberlandt, R. And Kaerger, J." On the Diffusion of Water in Silicalite: PFG-NMR Measurement and MD Simulations Using Fully *Ab initio* Potential", *J. App. Cat.* 59, 232(2002). (IF= 3.190)

52. Muangsin, N*, Prajaubsook, M., Chaichit, N., Siraleartmukul, K. and Hannongbua, S. "Crystal structure of a unique sodium distorted linkage in diclofenac sodium pentahydrate" *Analytical Sciences*, 18, 967(2002). (IF=1.735)

53. Kongsuk, S., Kerdcharoen, T. and Hannongbua, S*. "How many Water in the Hydration Shell of 18-crown-6? Monte Carlo Simulations Based on Ab Initio Derived Potential Energy Surface", *J. Phys. Chem.* 107, 4175(2003). (IF= 4.189)

54. Hannongbua, S*. "Monte Carlo Simulation of 1,4,7, 10-tetraazacyclododecane/lithium Complex in Aqueous Solution", *Inorg. Chem.* 42, 4147(2003). (IF= 4.147)

55. Bussai, C., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S*, "Formation of Low Density Water Cluster in the Silicalite-1 Cage: A Molecular Dynamics Simulation" *J. Phys. Chem.*, 107, 12444(2003). (IF=4.189)

56. Hannongbua, S*, Kiselev, M., Remsungnen, T. and Heinzinger, K. "Structure and Dynamics Properties of Concentrated Lithium-Ammonia Solution as Studied by Molecular Dynamics Simulations", *Cond. Matt. Phys.*, 35, 459(2003).

57. Lee, V. S., Wittayanarakul, K., Remsungnen, T., Parasuk, V., Sompornpisut, P., Chantratita, W., Sangma, J., Vannarat, S., Srichaikul, P., Hannongbua, S*, Saparpakorn, P., Treesuwan, W., Aruksakulwong, O., Pasomsub, E., Promsri, S., Chuakheaw, D. and Hannongbua, S. "Structure and Dynamics of SARS Coronavirus Proteinase: The Primary Key to the Designing and Screening for Anti- SARS Drugs", *Science Asia*, 29, 181(2003).

58. Loirungsin, A*, Fritzsche, S* and Hannongbua, S*. "Newly developed ad initio Fitted Potentials for Molecular Dynamics Simulations of *n*-Pentane in the Zeolite Silicalite-I", *Chem. Phys. Lett.* 390, 485(2004). (IF= 2.169)

59. Muangsin, N*, Prajuasook, M., Chimsook, P., Chantarasiri, N., Siraleartmukul, K., Chaichit, N. and Hannongbua, S. "Structure determination of diclofenac in a diclofenac-containing chitosan matrix using conventional X-ray powder diffraction data", *J. Appl. Cryst.* 37, 288(2004). (IF= 3.212)

60. Bussai, C., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S*. " A Novel Müller-Plesset Perturbation Based Potential to Determine the Structural and Dynamical Properties of Methane in Silicalite-I: A Molecular Dynamics Study", *J. Phy. Chem.*, 108, 2104(2004). (IF=4.189)

61. Siraleartmukul, K., Siriwong, K., Remsungnen, T*, Udomkitchdecha, W. and Hannongbua, S*. "Solvation Structure of Glucosamine in Aqueous Solution as studied by Monte Carlo Simulation Using Newly Developed Ab-initio Fitted Potential", *Chem. Phys. Lett.* 395, 233(2004). (IF= 2.169)

62. Promsri, S., Saenghiran, V., Pinitklang, S., Parasuk, V. and Hannongbua, S*. "Molecular and Electronic Properties of HIV-1 Protease Inhibitor C₆₀-derivatives as Study by ONIOM Method, *THEOCHEM*, 715, 47(2005). (IF= 1.167)

63. Wittayanarakul, K., Aruksakunwong, O., Chantratita, W., Parasuk, V., Sompornpisut, P* and Hannongbua, S. "Insights into Saquinavir Resistance in the G48V HIV-1 Protease: Quantum Calculations and Molecular Dynamic Simulations", *J. Bio. Phys.* 88, 867(2005). (IF=4.683)

64. Wittayanarakul, K., Aruksakunwong, O., Sompornpisut, P., Saenghiran Lee, V., Parasuk, V., Pinitklang, S. and Hannongbua, S*. "Structure, Dynamics and Solvation of HIV-1 Protease/Saquinavir Complex in Aqueous Solution and their Contributions to Drug Resistance: Molecular Dynamic Simulations", *J. Chem. Inf. Model.* 45, 300(2005). (IF= 3.643)

65. Saengsawang, O., Remsungnen, T., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S*. "Structure and Energetic of Water-Silanol Binding on the Surface of Silicalite-I: Quantum Chemical Calculations", *J. Phys. Chem B.* 109, 5684(2005). (IF=4.189)

66. Fritzsche, S*, Osotchan, T., Hannongbua, S. and Kaerger, J. "Is there a Coupling of Rotational and Translational motion of methane in silicalite-1 and AlPO_{4.5}", *Chem. Phys. Lett.*, 411, 423(2005). (IF= 2.169)

67. Bussai, C., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S*. "Concentration Dependence of the Methane Structure in Silicalite-1: A Molecular Dynamics Study Using the Müller-Plesset-base Potential", *Langmuir*, 13, 5847(2005). (IF=4.097)

68. Saengsawang, O*, Remsungnen, T., Loirungsin, A., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S. "Energy barrier of water and methane molecules due to the silanol groups on the

(010) surface of the silicalite-1 as studied by quantum chemical calculations", *Studies in Surface Science and Catalysis*, 158, 947(2005).

69. Lee, V. S., Wittayanarakul, K., Remsungnen, T., Parasuk, V., Sompornpisut, P., Chantratita, W., Sangma, J., Vannarat, S., Srichaikul, P., Hannongbua, S., Saparpakorn, P., Treesuwan, W., Aruksakulwong, O., Pasomsab, E., Promsri, S., Chuakheaw, D., and Hannongbua, S*. "Dimer of SARS Coronavirus main Protease as Studied by Molecular Dynamics Simulations" *J. Mol. Structure: THEOCHEM*. revised (2005). (IF=3.419)

70. Remsungnen, T*, Kormilets, V., Loisruangsin, A., Schuring, A., Fritzsche, S., Haberlandt, R. and Hannongbua, S. "Optimal Binding Site of a Methane Molecule on the Silanol Covered(010) Surface of Silicalite-1: ONION Calculations" *J. Phys. Chem. B*. 110, 11932(2006). (IF= 4.189)

71. Kongsuk, S., Kerdcharoen, T. and Hannongbua, S*. "The Hydration Structure of 18-crown-6/K⁺ Complexes Studied by Monte Carlo Simulation Using Ab-initio Fitted Potential" *J. Mol. Graph. Model.*, 25, 55(2006). (IF=2.347)

72. Wijtkosoom, A., Tonmunphean, S., Hannongbua, S. and Truong, T. N*. "Structure and Dynamics Properties of Full-length HIV-1 Integrase: Molecular Dynamics Simulations" *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 23(6), 613(2006). (IF= 1.289)

73. Aruksakulwong, O., Wittayanarakul, K., Sompornpisut, P., Lee, V. S., Parasuk, V. and Hannongbua, S*. "Structure and Dynamic Properties of Different Protonated states of Mutant HIV-1 Protease Complexed with the Saquinavir Inhibitor Studied by Molecular Dynamic Simulations" *JMGM*. 25, 324(2006). (IF=2.347)

74. Pinsook, U*. and Hannongbua, S. "Model of Saturated Lithium Ammonia as a Single-Component Liquid" *J. Chem. Phys.* 124, 0747021-3(2006). (IF= 3.149)

75. Kongsuk, S., Kerdcharoen, T., Kiselev, M. and Hannongbua, S*. "Solvation Structures of the 18-crown-6 in Carbon Tetrachloride as Studied by Monte Carlo Simulation Based on Ab-Initio Potential Models" *Chem. Phys.*, 324, 447(2006). (IF=1.961)

76. Aruksakulwong, O., Hannongbua, S*. and Wolschann, P. "Hydrogen bonding in molecular recognition by HIV-1 Protease" *J. Mol. Struct.* 790, 174(2006). (IF= 1.594)

77. Chuichay, P., Vladimirov, E., Siriwong, K., Hannongbua, S. and Rosch, N*. "Molecular Dynamics Simulations of Pyronine 6G and Rhodamine 6G Dimers in Aqueous Solution" *J. Mol. Model.* 12, 885(2006). (IF= 2.018)

78. Tongraar, A*, Kerdcharoen, T. and Hannongbua, S. "Simulations of liquid ammonia based on combined quantum mechanical/molecular mechanical(QM/MM) approach", *J. Phys. Chem.A* 110, 4924(2006). (IF=2.871)

79. Panich, N*, Wangyao, P., Hannongbua, S., Sricharoenchai, P. and Sun, Y. "Tribological Study of Nano-multilayered Ultra-Hard Coatings Based on TiB₂", *Rev. Adv. Mater. Sci.* 13, 25-32 (2006). (IF= 0)

80. Aruksakunwong, O., Malaisree, M., Decha, P., Sompornpisut, P., Parasuk, V., Pianwanit, S. and Hannongbua, S*. "On the Lower Susceptibility of Oseltamivir to Influenza Neuramini Subtype N1 than to in N2 and N9", *Biophysical*, 92, 798(2006). (IF= 4.683)

81. Panich, N*, Wangyao, P., Hannongbua, S., Sricharoenchai, P. and Sun, Y. "Nanoindentation and Microscratch of Annealed Nanostructure TiB₂ Coatings", *HIGH TEMPERATURE MATERIALS AND PROCESSES*, 25, 285(2006). (IF=0)

82. Aruksakunwong, O., Wolschann, P., Hannongbua, S. And Sompornpisut, P*. "Molecular Dynamic and Free Energy Studies of Primary Resistance Mutations in HIV-1 Protease-Ritonavir Complexes.", *J. Chem. Inf. Model.* 46, 2092(2006). (IF=3.643)

83. Kritayakornnupong, C* and Hannongbua, S. "Structure and Dynamics of high-spin Ru²⁺ in aqueous solution: Ab initio QM/MM molecular dynamics simulation.", *Chem. Phys.*, 332, 95(2007). (IF=1.961)

84. Aruksakulwong, O., Promsri, S., Wittayanarakul, K., Nimmanpipug, P., Lee, V. S., Wijitkosoom, A., Sompornpisut, P. and Hannongbua, S*. "Cuurently Developed HIV-1 Protease Inhibitos", *Current Computer-Aided Drug Design*, 3, 201(2007). (IF= 1.680)

85. Lee, S*. V., Nimmanpipug, P., Aruksakunwong, O., Promsri, S., Sompornpisut, P. And Hannongbua, S. "Structure Analysis of Lead Fullerene-Based Inhibitor Bound to Human Immunodeficiency Virus Type Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease in Solutions From Molecular Dynamics Simulations.", *J.MOL.GRAPH. MODEL.* 26, 558(2007). (IF= 2.347)

86. Saen-oon, S., Aruksakunwong, O., Witayanarakul, K., Sompornpisut, P. and Hannongbua, S*. "Insight into Analysis of Interactions of saquinavir with HIV-1 Protease in comparison between wild-type, G48V and G48V/L90M mutant: base on QM and QM/MM caculations." *J.MOL.GRAPH. MODEL.* 26, 720(2007). (IF=2.347)

87. Nimmanpipug, P., Jitonnom, J., Ngaojampa, C., Hannongbua, S. and Lee, V.S*, "A Computational H5N1 Neuraminidase Model and Its Commercial Drugs", *Molecular Simulations*, 33, 487(2007). (IF=1.325)

88. Panich, N*, Wangyao, P., Hannongbua, S., Sricharoenchai, P. and Sun, Y. "Fabrication, Structural and Mechanical Characterizations of Nanostruced Ti/TiB₂ Multilayer Coatings on High-Speed Steel". *High Temperature Materials and Processes*, 26(3), 177(2007). (IF=0)

89. Loiraungsin, A., Fritzsche, S. and Hannongbua, S*. "An alternative approach for ab initio fitted potentials The n-pentane/silicalite-1 system" *Chemical Physics*, 344, 1(2008). (IF= 2.277)

90. Panich, N*, Hannongbua, S. and Sun, Y. "Effect Of Argon-Nitrogen Mixing Gas During Magnetron Sputtering on Titanium Interlayer Deposition with TiB₂ Coatings on high speed steel". *Rev. Adv. Mater. Sci* 16, 80(2007). (IF= 0)
91. Panich, N*, Hannongbua, S. and Sun, Y. "Effect of Polytetrafluorethylene Doping on Tribological Property Improvement of MoS₂ Nano-Thin Films on Ti-Substrate." *Rev. Adv. Mater. Sci* 16, 88(2007). (IF= 0)
92. Tongraar, A* and Hannongbua, S. "Solvation structure and dynamics of ammonium(NH₄⁺) in liquid ammonia studied by HF/MM and B3LYP/MM molecular dynamics simulations." *J. Phys. Chem. B* 112, 885(2008). (IF= 3.471)
93. Wittayanarakul, K., Hannongbua, S. and Feig, M*. "Accurate prediction of protonation state as a prerequisite for reliable MM-PB(GB)SA binding free energy calculations of HIV-1 Protease inhibitors" *J. Comput. Chem*, 29,673(2008). (IF= 3.769)
94. Saengsawang, O., Schüring, A., Remsungnen, T., Loiruangsinn, A., Hannongbua, S., Magusin, P. and Fritzsche, S*. "Rotational relaxation of pentane in the flat γ -cages of zeolite KFI" *J. Phys. Chem C*, 112,5922(2008). (IF=)
95. Malaisree, M., Rungrotmongkul, T., Decha, P., Intharathep, P., Aruksakunwong, O. and Hannongbua, S*. "Understanding of Known Drug-Target Interaction in the Catalytic Pocket of Neuraminidase Subtype N₁" *PROTEINS: Structure Function and Bioinformatics*, 71,1908(2008). (IF=3.419)
96. Pianwanit, A., Kritayakornupong, C., Vongachariya, A., Selpusit, N., Ploymeerusmee, T., Remsungnen, T., Nuntasri, D., Fritzsche, S. and Hannongbua, S*. "The Optimal Binding Sites of CH₄ and CO₂ Molecules on the Metal-Organic Framework MOF-5: ONIOM Calculations" *Chem Phys*, 349,77(2008). (IF=2.277)
97. Pinsook, U*., Scheicher, R., Ahuja, R. and Hannongbua, S. "Internal Vibrations of the Li(NH₃)₄⁺ Complex Analyzed from Ab Initio, Density Functional Theory, And the Classical Spring Network Model" *J. Phys. Chem. A*, 112, 5323(2008). (IF=2.871)
98. Nukoolkarn, S, V., Saen-oon, S., Rungrotmongkol, T., Hannongbua, S., Ingkaninan, K., and Suwanborirux, K*. "Petrosamine, a potent anticholinesterase pyridoacridine alkaloid from a Thai marine sponge *Petrosia n. sp.*" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6560(2008). (IF=3.075)
99. Siriwong, K., Chuichay, P., Saen-oon, S., Suparpprom, C., Vilaivan, T. and Hannongbua, S*, "Insight Into Why PyrrolidinyI Peptide Nucleic Acid Binding to DNA is More Stable Than the DNA ●DNA Duplex." *Biochem Bioph Res Co*, 372, 765(2008). (IF= 2.64)
- Decha, P., Rungrotmongkul, T., Intharathep, P., Malaisree, M., Aruksakunwong, O., Laohongspaisan, J., Parasuk, V., Sompornpisut, P., Pianwanit, S., Kokpol, S. and Hannongbua, S*.

"Source of High Pathogenicity of Avian Flu H5N1: Why HS is Better Cleared by Furin" *Biophysics J*, 95,128 (2008). (IF= 4.683)

101. Rungrotmongkol, T., Decha, P., Malaisree, M., Sompornpisut, P. and Hannongbua, S*. Comment on "Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin" *Journal: Amino Acids* 35(2):511(2008). (IF=3.877)

102. Nukoolkarn, V., Lee, S.V., Malaisree, M., Aruksakulwong, O. and Hannongbua, S*, "Molecular Dynamic Simulations Analysis of Ritonavir and Lopinavir as SARS-CoV 3CL^{pro} Inhibitor" *Journal of Theoretical Biology*, 254, 861(2008). (IF= 2.574)

103. Intharathep, P., Laohpongspaisan, J., Rungrotmongkol, T., Loisuangsinsin, A., Malaisree, M., Decha, P., Aruksakunwong, O., Chuenpennit, K., Kaiyawet N., Sompornpisut, P., Pianwanit, S.1 and Hannongbua, S*. "How Amantadine and Rimantadine Inhibit Water transportation in the M2 Protein Channel". *J.MOL.GRAPH. MODEL.*, 27, 342(2008). (IF=)

104. Malaisree, M., Rungrotmongkol, T., Nunthaboot, N., Aruksakunwong, O., Intharathep, P., Decha, P., Sompornpisut, P. and Hannongbua, S*. "Source of oseltamivir resistance in avian influenza H5N1 virus with the H274Y mutation" *Amino Acids*, 37,725(2009). (IF=3.877)

105. Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Udommaneethanakit, T. and Hannongbua, S*. Comment on "Another look at the molecular mechanism of the resistance of H5N1 influenza A virus neuraminidase (NA) to oseltamivir (OTV)" *Biophys Chem.* 141,131(2009). (IF= 2.276)

106. Rungrotmongkol, T., Freceer, V., De-Eknamkul, W., Hannongbua, S. and Miertus, S. " Design and in silico screening of combinatorial library of oseltamivir analogs inhibiting neuraminidase of avian influenza virus H5N1." *Antivir Res.* 82, 51(2009). (IF=3.612)

107. Laohpongspaisan, C., Rungrotmongkol, T., Intharathep, P., Malaisree, M., Decha, P., Aruksakunwong, O., Sompornpisut, P., and Hannongbua, S*. "Why amantadine loses its function in influenza M2 mutants: MD simulations". *J. Chem. Inf. Model.* 49,847(2009). (IF= 3.882)

108. Thompho, S., Chanajaree, R., Remsungnen, T., Hannongbua, S., Bopp, P. and Fritzsche, S*. "The permeation of methane molecules through silicalite-1 surfaces" *J. Phys. Chem.* 113,2004(2009). (IF=2.899)

109. Rungrotmongkol, T., Decha, P., Sompornpisut, P., Malaisree, M., Intharathep, P., Nunthaboot, N., Udommaneethanakit, T., Aruksakunwong, O., Hannongbua, S*. "Combined QM/MM mechanistic study of the acylation process in furin complexed with the H5N1 avian influenza virus hemagglutinin's cleavage site." *Proteins.* 76(1), 62(2008). (IF= 3.085)

110. Nimmanpipug, P*, Lee, V. S.; Wolschann, Peter,; Hannongbua, S. "Litchi Chinensis-derived terpenoid as anti-HIV-1 protease agent: Structural design from molecular dynamics simulations", *Molecular Simulation*, 35, 673(2009). (IF=1.028)

111. Rungrotmongkol, T., Intharathep, P., Malaisree, M., Nunthaboot, N., Kaiyawet, N., Sompornpisut, P., Payungporn, C., Poovorawan, Y., and Hannongbua, S*. "Susceptibility of Antiviral Drugs Against 2009 Influenza A (H1N1) Virus" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385, 390(2009). (IF= 2.548)
112. Laiwattanapaisal W* , Kunanuvat U, Intharachuti W, Chinwongamorn C, Hannongbua S , Chailapakul O . "Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria" *TALANTA*, 79, 1104(2009). (IF= 3.290)
113. Rungrotmongkol, T., Udommaneethanakit, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N., Intharathep, P., Sompornpisut, P. Hannongbua, S*. "How does each substituent functional group of oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 mutants?", *Biophysical Chemistry*, 145, 29(2009). (IF=2.276)
114. Iamsamai, C., Hannongbua, S., Ruktanonchai, U., Soottitantawat, A. and Dubas, S*. T. "The effect of the degree of deacetylation of chitosan on its dispersion of carbon nanotubes", *CARBON*, 48, 25(2010). (IF= 4.504)
115. Tongraar, A*., Hannongbua, S. and Rode, B.M. "QM/MM MD Simulations of Iodide Ion (I-) in Aqueous Solution: A Delicate Balance between Ion-Water and Water-Water H-Bond Interactions" *J. Phys. Chem. A*, 114, 4334(2010). (IF= 2.899)
116. Kritayakornpong, C*., Hannongbua, S. "Temperature Effects on the Structure and Dynamics of the Jahn-Teller distorted Cr²⁺ ion in water: A QM/MM molecular dynamics simulations". *DALTON TRANSACTIONS*, 39, 1176(2010). (IF=4.081)
117. Saengsawang, O., Schüring, A., Remsungnen, T., Hannongbua, S., Newsome, D.A., Dammers, A.J., Coppens, M.O. and Fritzsche, S*. "Diffusion of *n*-pentane in the zeolite ZK5 studied by high-temperature configuration-space exploration" *Chemical Physics* 368, 121(2010). (IF=2.277)
118. Rungrotmongkol, T. Malaisree, M. Nunthaboot, N. Sompornpisut, P. and Hannongbua, S. "Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: Molecular modelling approach" *Amino Acids*. 39, 393(2010). (IF=3.877)
119. Nunthaboot, N. Rungrotmongkol, T. Malaisree, M. Decha, P. Kaiyawet, N. Intharathep, P. Sompornpisut, P. Poovorawan, Y. and Hannongbua, S. "Molecular insights of human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin" *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 141, 801 (2010). (IF=1.312)
120. Phongphanphanee, S., Rungrotmongkol, T., Yoshida, N., Hannongbua, S., Hirata, F. "Proton transport through the Influenza A M2 channel: 3D-RISM Study". *J.AM.CHEM.SOC*, 132, 9782(2010). (IF=8.580)
121. Nunthaboot, N. Rungrotmongkol, T. Malaisree, M. Kaiyawet, N. Decha, P. Sompornpisut, P. and Hannongbua, S. "Evolution of the human-receptor binding affinity of influenza

A (H1N1) 2009 pandemic hemagglutinin from 1918- and 1930-H1N1 influenza viruses" *J. Chem. Inf. Model* , 50, 1410(2010).(IF=3.882)

122. Rungrotmongkol, T. Nunthaboot, N. Malaisree, M. Kaiyawet, N. Intharathep, P. Meeprasert, A. and Hannongbua, S. "Molecular Insight into the Specific Binding of ADP-ribose to the nsP3 Macro Domains of Chikungunya and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses: Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Calculations". *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 29,347(2010).(IF=2.169)

123. Arsawang, U., Saengsawang, O., Rungrotmongkol, T., Sornmee, P., Remsungnen T. and Hannongbua, S. "How does carbon nanotube serve as a carrier for gemcitabine transport in drug delivery system?". *JMGM*, 29,591-596.(2011),

124. Chokbunpiam, T., Thamyongkit, P., Saengsawang O and Hannongbua, S. "Molecular Structure and Electronic Properties of Porphyrin?Thiophene?Perylene using Quantum Chemical Calculation" *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHOTOENERGY Advances in Astronomy*, 2010,1-9.(2010) (IF=1.494).

125. Iamsamai, C., Soottitantawat, A. Ruktanonchai, U., Hannongbua, S., and Dubas, S*. T. " Simple method for the layer-by-layer surface modification of multiwall carbon nanotubes. *Carbon* 49(6),2039-2045,2010

126. Woods, C., Malaisree, M., Hannongbua, S. and Mulholland, A. "A water-swap reaction coordinate for the calculation of absolute protein-ligand binding free energies". *JCP.*, 134, 054114 (2011).

127. Decha, P., Intharathep, P., Udommaneethanakit, T., Sompornpisut, P., Hannongbua, S., Wolschann, P. and Parasuk, V. "Theoretical studies on the molecular basis of HIV-1RT/NNRTIs interactions" *JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY* ,26,29,2011

128. Intharathep, P. Rungrotmongkol, T., Decha, P. Nunthaboot, N. Kaiyawet, N. Kerdcharoen, T. Sompornpisut, P. and Hannongbua, S. "Evaluating how rimantadines control the proton gating of the Influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations" *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26,162-168, 2010.

129. Rungrotmongkol, T., Arsawang, U., Iamsamai, C., Vongachariya, A., Dubas, S, T., Ruktanonchai, U., Soottitantawat, A. and Hannongbua, S. "Increased dispersion and solubility of carbon nanotubes noncovalently modified by the polysaccharide biopolymer, chitosan: MD simulations" *Chemical Physics Letters*,507,134-137.(2011)

130. Sornmee, P., Rungrotmongkol, T., Saengsawang, O., Arsawang, U., Remsungnen, T. and Hannongbua, S. "Understanding of molecular properties of the doxorubicin anticancer drug filling inside and wrapping outside the single-walled carbon nanotube". accepted 2010

131. Lee, V. S.; Nimmanpipug, P., Traisathit, P.; Prasitwattanaseree, S.; Hannongbua, S.; Gasteiger, J.; Chaijaruanich, J. "Virtual screening HIV-1 inhibitors of Thailand Natural Product Database using Self-organizing Map", *J. Comput. Aid. Mol. Des.* Submitted, 2009.

132. Lee, V. S.; Jitonnom, J.; Decha, P., Nimmanpipug, P., Hannongbua, S. "Molecular dynamics and binding free energy studies for high and low pathogenic avian influenza of HAT complexed with the cleavage loop of hemagglutinin", *in prepar.*

133. Kaiyawet, N. Rungrotmongkol, T. and Hannongbua, S. "Identification of the probable novel strains of high pathogenic influenza A H5N1 virus in human". Submitted

134. Vongachariya, A., Iamsamai, C., Saengsawang, O., Rungrotmongkol, T., Dubas, S., Parasuk, V. and Hannongbua*, S. "On the effect of surface curvature of carbon nanotube on its cation- π interaction with monovalent cations," Submitted.

135. Khuntawee, W., Rungrotmongkol, T. and Hannongbua*, S. "Phosphorylation Inhibition of Cyclin Dependent Kinase 6/Cyclin D Complex with Flavonoid Using Molecular Dynamics Simulations," in preparation.

136. Rungrotmongkol, T., Mulholland* A. J. and Hannongbua*, S. "Asp185 is likely to serve as the catalytic base in the enzymatic reaction of HIV-1 reverse transcriptase: QM/MM approach," in preparation.

137. Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Freceer, V., Hannongbua, S. and Miertus*, S. "Inhibitory efficiency of oseltamivir phosphonate against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of H5N1 and novel pandemic H1N1 viruses: A MD/LIE approach", in preparation.

138. Decha, P., Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N., Intharathep, P., Kaiyawet, N., Parasuk, V., Sompornpisut, P., Wolschann, P. and Hannongbua*, S. "Determinants of the inserted sequences of high pathogenicity H5N1 hemagglutinin specificity with furin: molecular dynamics simulations," in preparation.

Curriculum Vitae
PORNTHAP SOMPORNPIST

Birthdate: March 31, 1968

Nationality: Thai

Gender: Male

Contact Address

Department of Chemistry, Faculty of Science

Chulalongkorn University

254 Phayathai Rd., Pratumwan

Bangkok 10330 THAILAND

Phone: (662) 218-7602-4

Fax: (662) 2187598

Email: spornthe@hotmail.com, pornthep.s@chula.ac.th

Appointments

2006- 2007

University of Chicago

Visiting Research Professor

1999-2001

University of Virginia

Postdoctoral Research Associate

2009-present

Chulalongkorn University, Thailand

Associate Professor

1999-2009

Chulalongkorn University, Thailand

Assistant Professor

1997-1999

Chulalongkorn University, Thailand

Lecturer

Education

1993-1996

Ph.D. (Chemistry), University of Florence, Italy

Advisor: Prof. I. Bertini

Research on the determination of solution structures of paramagnetic metalloproteins using NMR techniques

1991-1993

M.Sc. (Chemistry), Chulalongkorn University, Thailand

Advisors: Assoc. Prof. S. Kokpol and Prof. B. M. Rode

Research on quantum calculations and Monte Carlo simulations of an alkaline ion in inorganic liquid

1987-1991

B.Sc. (Chemistry), Chulalongkorn University, Thailand

Advisors: Assoc.Prof. S. Kokpol and Assoc.Prof. C.Thammachareon

Research on QSAR study for dihydrofolate reductase inhibitor by a quantum pharmacological approach

Awards:

2006 Awardee of the Most Cited Research Award in Physical Sciences, Faculty of Science, Chulalongkorn University

2005 Young Scientist Award in Physical Sciences; Faculty of Science, Chulalongkorn University

Research interest

- Membrane protein research, Bimolecular modeling & simulation, Computational chemistry, Biophysics, NMR and EPR techniques
- Development of computational approach for protein structure determination

Publications

1. P. Intharathep, T. Rungrotmongkol, P. Decha, N. Nunthaboot, N. Kaiyawet, T. Kerdcharoen, **P. Sompornpisut**, and S. Hannongbua*, Evaluating how rimantadines control the proton gating of the Influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2011**; 26(2):162-168.
2. N. Nunthaboot, T. Rungrotmongkol, M. Malaisree, N. Kaiyawet, P. Decha, **P. Sompornpisut**, Y. Poovorawan, S. Hannongbua. "Evolution of human receptor binding affinity of H1N1 hemagglutinins from 1918 to 2009 pandemic influenza A virus." *J Chem Inf Model.* 2010;50(8):1410-7.
3. P. Decha, P. Intharathep, T. Udommaneethanakit, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua, P. Wolschann, V. Parasuk. "Theoretical studies on the molecular basis of HIV-1RT/NNRTIs interactions." *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2011; 26(2): 162-8.
4. S. Chakrapani, **P. Sompornpisut**, P. Intharathep, B. Roux, E. Perozo. "The activated state of a sodium channel voltage sensor in a membrane environment." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(12):5435-40.
5. T Rungrotmongkol, M. Malaisree, N. Nunthaboot, **Sompornpisut P**, S. Hannongbua. "Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: molecular modeling approach." *Amino Acids.* 2010;39(2):393-8.
6. T. Rungrotmongkol, T. Udommaneethanakit, M. Malaisree, N. Nunthaboot, P. Intharathep, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. "How does each substituent functional group of oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 influenza mutants?" *Biophys. Chem* 2009; 145(1), 29-36.
7. M. Malaisree, T. Rungrotmongkol, N. Nunthaboot, O. Aruksakunwong; P. Intharathep, P. Decha, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. "Source of oseltamivir resistance in avian influenza H5N1 virus with the H274Y mutation" *Amino Acids*, 2009; 37(4), 725-732.
8. T. Rungrotmongkol, P. Intharathep, M. Malaisree, N. Kaiyawet, **P. Sompornpisut**, S. Payungporn, Y. Poovorawan, S. Hannongbua. "Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus", *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(3):390-4.
9. C. Laohpongspaisan, T. Rungrotmongkol, P. Intharathep, M. Malaisree, P. Decha, O. Aruksakunwong, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. "Why amantadine loses its function in influenza m2 mutants: MD simulations", *J Chem Inf Model.* 2009, 49(4):847-52.
10. K. Phakthanakanok, K. Ratanakhanokchai, K.L. Kyu, **P. Sompornpisut**, A. Watts A, Pinitglang S. "A computational analysis of SARS cysteine proteinase-octapeptide substrate interaction: implication for structure and active site binding mechanism." *BMC Bioinformatics.* 2009;10 Suppl 1:S48.
11. T. Rungrotmongkol, P. Decha, **P. Sompornpisut**, M. Malaisree, P. Intharathep, N. Nunthaboot, T. Udommaneethanakit, O. Aruksakunwong, S. Hannongbua. "Combined QM/MM mechanistic study of the acylation process in furin complexed

- with the H5N1 avian influenza virus hemagglutinin's cleavage site." Proteins. 2009 76(1):62-71.
12. T. Rungrotmongkol, P. Decha, M. Malaisree, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. Comment on "Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin" Amino Acids. 35, 2(2008) -511:512.
 13. **P. Sompornpisut**, B. Roux , E. Perozo . "Structural refinement of membrane proteins by restrained molecular dynamics and solvent accessibility data" Biophys J. 2008 Aug 1. (ISSN: 0006-3495, Impact Factor = 4.757)
 14. P. Decha, T. Rungrotmongkol, P. Intharathap, M. Malaisree, O. Aruksakunwong, C. Laohpongspaisan, V. Parasuk, **P. Sompornpisut**, S. Pianwanit, S. Kokpol, S. Hannongbua "Source of high pathogenicity of an avian influenza virus H5N1: why H5 is better cleaved by furin" Biophys J. 95, 1(2008): 128-134 (ISSN: 3495-0006, Impact Factor = 4.757)
 15. S. Saen-oon, O. Aruksakunwong, K. Wittayanarakul, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. "Insight into analysis of interactions of saquinavir with HIV- 1protease in comparison between the wild-type and G48V and G48V/L90M mutants based on QM and QM/MM calculations", J Mol Graph Model. 26, 4 (2007) 720-727 (ISSN: 3263-1093, Impact Factor = 2.371).
 16. V.S. Lee, P. Nimmanpipug, O. Aruksakunwong, S. Promsri, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua. "Structural analysis of lead fullerene-based inhibitor bound to human immunodeficiency virus type 1 protease in solution from molecular dynamics simulations" J Mol Graph Model. 26, 2 (2007): 558-570 (ISSN: 3263-1093, Impact Factor = 2.371)
 17. O. Aruksakunwong, M. Malaisree, P. Decha, **P. Sompornpisut**, V. Parasuk, S. Pianwanit, S. Hannongbua. "On the lower susceptibility of oseltamivir to influenza neuraminidase subtype N1 than those in N2 and N9" Biophys J. 92, 3 (2007): 798-807 (ISSN: 3495-0006, Impact Factor = 4.757).
 18. O. Aruksakunwong, Wolschann P, S. Hannongbua, ***P. Sompornpisut**. "Molecular dynamic and free energy studies of primary resistance mutations in HIV- 1protease-ritonavir complexes." J Chem Inf Model. 46, 5 (2006-2085:(2092 (ISSN: 1549-9596, Impact Factor = 3.423).
 19. O. Aruksakunwong, K. Wittayanarakul, **P. Sompornpisut**, Sanghiran V, V. Parasuk, S. Hannongbua. "Structural and dynamical properties of different protonated states of mutant HIV- 1protease complexed with the saquinavir inhibitor studied by molecular dynamics simulations." J Mol Graph Model. 25, 3 (2006-324:(332 (ISSN: 3263-1093, Impact Factor = 2.371).
 20. K. Wittayanarakul, O. Aruksakunwong, **P. Sompornpisut**, V. Sanghiran-Lee, V. Parasuk, S. Pinitglang, S. Hannongbua. "Structure, dynamics and solvation of HIV- 1 protease/saquinavir complex in aqueous solution and their contributions to drug resistance: molecular dynamic simulations." J Chem Inf Model. 45, 2 (2005:(-300 308 (ISSN: 1549-9596, Impact Factor = 3.423).
 21. K. Wittayanarakul, O. Aruksakunwong, S. Saen-oon, W. Chantratita, V. Parasuk, ***P. Sompornpisut**, S. Hannongbua, "Insights into saquinavir resistance in the G48V HIV-1 protease: quantum calculations and molecular dynamic simulations" Biophysical J. 88, 2)2005): 879-867 (ISSN: 3495-0006, Impact Factor = 4.757).
 22. **P. Sompornpisut**, A. Wijitkosoom, V. Parasuk, W. Sirawaraporn "Molecular Dynamics Simulation of the Human Apo-Dihydrofolate Reductase: an Investigation of an Unstable Enzyme" Mol. Sim. 29, (2003): 111-121 (ISSN: 0892-7022, Impact Factor = 1.084).

23. V. Sanghiran Lee et al “Structure and Dynamics of SARS Coronavirus Proteinase: The Primary Key to the Designing and Screening for Anti-SARS drugs” ScienceAsia (2003), 29, 181-188
24. **P. Sompornpisut**, N. Deechalao, J. Vongsvivut “An Inclusion Complex of β -cyclodextrin-L-Phenylalanine: ^1H NMR and molecular docking studies” ScienceAsia 28, (2002): 263-270 (ISSN: 1513-1874).
25. Perozo E, Cortes DM, **Sompornpisut P**, Kloda A, Martinac B. “Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels” Nature (2002) **418**, 942-8. Impact factor = 30.979
26. Y.S. Liu, **P.Sompornpisut**, E. Perozo “Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state” Nat. Struct. Biol. (2001), **8**, 883-887. . Impact factor = 11.579
27. **P.Sompornpisut** , Y.S. Liu, E. Perozo “Calculation of rigid-body conformational changes using restraint-driven Cartesian transformations” Biophys. J., (2001) **81**: 2530-2546. . Impact factor = 4.463
28. G. Rastelli, W. Sirawaraporn, **P. Sompornpisut**, T. Vilaivan, S. Kamchonwongpaisan, Y. Thebtaranonth, Y. Yuthavong, G. Lowe and R. Quarrel “Interactions of pyrimethamine, cycloguanil, WR99210 and their analogues with *Plasmodium falciparum* Dihydrofolate Reductase: Structural Basis of Antifolate Resistance” Bioorg Med Chem (2000) **8**,1117-28. . Impact factor = 2.185
29. **P. Sompornpisut** “Structure Determination of Paramagnetic Proteins through NMR” J.Sci.Soc.Thailand (1998) **24**, 101-122.
30. **P. Sompornpisut**, S. Kokpol, B.M.Rode “Lithium ion in liquid hydroxylamine: intermolecular potential function and Monte Carlo simulation” Chem.Phys. (1993), **172/1**, 7.
31. L. Banci, I. Bertini, K.L. Bren, H.B. Gray, **P. Sompornpisut**, P, Turano “ The solution structure of oxidized cytochrome *c*: hints to understand its function and folding” Biochemistry (1997) **36**, 8992-9001.
32. L. Banci, I. Bertini, M. Bruschi , **P. Sompornpisut**, P, Turano “NMR characterization and solution structure determination of the oxidized cytochrome *c*7 from *Desulfuromonas acetoxidans*.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996), **93(25)**, U.S.A 14396-14400
33. L. Banci, I. Bertini, K.L. Bren, H.B. Gray, **P. Sompornpisut**, P, Turano “ The three-dimensional solution structure of the cyanide adduct of *Saccharomyces cerevisiae* Met80Ala-iso-1-cytochrome *c*. Identification of ligand-residue interaction in the distal heme cavity” Biochemistry (1995), **34**, 11385-11398.
34. L. Banci, I. Bertini, A.Dikiy, D.H.W. Kastrau, C. Luchinat, **P. Sompornpisut** “The three dimensional solution structure of the reduced high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium vinosum* through NMR” Biochemistry (1995), **34**, 206-219.
35. I. Bertini, A.Dikiy, D.H.W. Kastrau, C. Luchinat, **P. Sompornpisut** “The three dimensional solution structure of the oxidized high-potential iron-sulfur protein from *Chromatium vinosum* through NMR. comparative analysis with the solution structure of the reduced species” Biochemistry (1995), **34**, 9851-9858.
36. **P. Sompornpisut**, S. Kokpol, B.M.Rode “Chloride ion in liquid hydroxylamine: pair potential function and Monte Carlo simulation” Zeitschrift fuer Naturforschung. (1994), **49a**, 797-801.

Book & Review

1. E. Perozo, L.G. Cuello, D.M. Cortes, Y.S. Liu and **P. Sompornpisut**. “EPR approaches to ion channel structure and function” in G. Bock and J.A. Goode Editors Ion Channels: From Atomic Resolution: Physiology to Functional Genomics 146-158. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England (2002).
2. O. Aruksakunwong, S. Promsri, K. Wittayanarakul, P. Nimmanpipug, VS Lee, A. Wijitkosoom, **P. Sompornpisut**, S. Hannongbua “Current development on HIV-1 protease inhibitors” in Current Computer-Aided Drugs Design Vol. 3: 201-213 Bentham Science Publ Ltd. SharJah, U. Arab Emirate (2007).
3. พรเทพ สมพรพิสุทธิ, เคมีชีวอนินทรีย์เบื้องต้น, พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552, 249 หน้า จัดจำหน่ายทั่วไป

Curriculum Vitae

1

Dr. Thanyada Rungrotmongkol

PERSONAL DETAILS

Current position: Researcher
Current institution & address: Center of Innovative Nanotechnology,
and Computational Chemistry Unit Cell,
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
254 Phayathai Rd., Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand
Birth: January 14 1979, Ratchaburi, Thailand
Gender: Female
Nationality: Thai
Phone Number: +66-2218-7602
Fax Number: +66-2218-7603
E-mail address: t.rungrotmongkol@gmail.com

EDUCATION

Kasetsart University, Bangkok, Thailand

- Ph.D. in Physical Chemistry 2006
The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, Thailand Research Fund, Thailand
- B.Sc. in Chemistry (with First Class Honors) 2001
The Development and Promotion of Science and Technology talents project of Thailand (DPST)

ACADEMICAL EXPERIENCE

Researcher (2009-present)

Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Postdoctoral fellow (2006-present)

Computational Chemistry Unit Cell, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

International expert and Consultant (2008-2009)

International Centre for Science and High Technology, United Nations Industrial Development Organization (ICS-UNIDO), Trieste, Italy

COOPERATION ABROAD

Professor Dr. Adrian J. Mulholland

School of Chemistry, University of Bristol, Bristol BS8 1TS, UK

Professor Dr. Stanislav Miertus

Area of Pure and Applied Chemistry, ICS-UNIDO, AREA Science Park, Padriciano 99, Trieste 34012, Italy

Professor Dr. Fumio Hirata

Department of Theoretical and Computational Molecular Science, Division of Theoretical Molecular Science II, Institute of Molecular Science, Okazaki, Japan

Professor Dr. Karl Peter Wolschann

Institute of Theoretical Chemistry, University of Vienna, Währinger Strasse, 17 A-1090 Vienna, Austria

SCHOLARSHIPS, GRANTS AND FUNDING:**RESEARCH GRANTS**

- | | |
|------|---|
| 2011 | Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University, Thailand
(Postdoctoral Research Fund, 2 years: January 2011-present) |
| 2010 | Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University, Thailand
(Postdoctoral Research Fund, 1 year: December 2009-November 2010) |
| 2009 | TRF Grant for New Researcher, Thailand Research Fund, Thailand
(2 years: March 2009-present) |
| 2007 | Postdoctoral Research Fund, Commission on Higher Education. Thailand
(Postdoctoral Research Fund, 2 years: January2007-December2008) |

SCHOLARSHIPS FOR SHORT TERM VISIT

- | | |
|------|---|
| 2011 | Institute for Molecular Science (IMS), Okazaki Japan
(JENESYS fellowship, 1.5 month: May-June 2011) |
| 2011 | Institute of Theoretical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria
(OEAD and university scholarships, 3 months: January 2011-present) |
| 2010 | Institute of Theoretical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria
(ASEA-UNINET scholarship, 1 month: August-September 2010) |
| 2010 | Institute for Molecular Science (IMS). Okazaki, Japan
(Research grant, 1.5 month: February-March 2010) |
| 2009 | International Centre for Science and High Technology, United Nations Industrial
Development Organization (ICS-UNIDO), Trieste, Italy
(6 months: May-October 2009) |
| 2009 | Institute for Molecular Science (IMS), Okazaki Japan
(JENESYS fellowship (JSPS), 2 months: February-March 2009) |
| 2008 | International Centre for Science and High Technology, United Nations Industrial
Development Organization (ICS-UNIDO), Trieste, Italy
(6 months: May-October 2008) |
| 2007 | International Centre for Science and High Technology, United Nations Industrial
Development Organization (ICS-UNIDO), Trieste, Italy
(Fellowship, 10 months: March-December 2007) |

AWARDS

1. Oral presentation award of The Royal Golden Jubilee Ph.D. Congress VI. Thailand (2005)
2. Poster presentation award from Development and Promotion of Science and Technology talents project of Thailand (DPST). (2000)

RESEARCH INTERESTS

- The structural information and drug-target interactions in four drug targets of life cycle of avian influenza subtype H5N1: hemagglutinin, neuraminidase, M2 integral membrane protein (M2-ion channel), and polymerases PA and PB1
 - Rotational drug designs against influenza A neuraminidase subtype H5N1
 - Reaction mechanism of enzymatic reaction: acylation process of hemagglutinin subtype H5 by specific serine protease, furin
 - Chikungunya and venezuelan equine encephalitis viruses
 - Dengue serine protease
 - Cancer
 - Drug delivery and development through carbon nanotube serving as the drug carrier
 - Hepatitis C virus (HCV): NS3/4A, NS5A and NS5B targets
-

INVITED LECTURER

QM/MM (Quantum & Molecular Mechanics)/(P&A)*, BIF 632 การออกแบบและการค้นหายาใหม่ (Drug Design & Discovery) 3 credits (3-0-9), Bioinformatics & Systems Biology Program, KMUTT, December 22, 2010

PUBLICATIONS

1. **T. Rungrotmongkol**, S. Hannongbua* and A. J. Mulholland, Mechanistic study of HIV-1 reverse transcriptase at the active site based on QM/MM method, *Journal of Theoretical and Computational Chemistry* **2004**; 3(4): 491-500. (IF2009 = 0.958)
2. **T. Rungrotmongkol**, A. J. Mulholland and S. Hannongbua*, Active site dynamics and combined quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) modelling of a HIV-1 reverse transcriptase/DNA/dTTP complex, *Journal of molecular graphics and modelling* **2007**; 26(1): 1-13. (IF2009 = 2.169)
3. M. Malaisree, **T. Rungrotmongkol**, P. Decha, P. Intharathep, O. Aruksakunwong, and S. Hannongbua*, Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2008**; 71(4): 1908-1918. (IF2009 = 3.085)
4. P. Decha, **T. Rungrotmongkol**, P. Intharathep, M. Malaisree, O. Aruksakunwong, C. Laohpongspaisan, V. Parasuk, P. Sompornpisut, S. Pianwanit, S. Kokpol and S. Hannongbua*, Source of high pathogenicity of an avian influenza virus H5N1: Why H5 is better cleaved by furin, *Biophysical Journal* **2008**; 95(1): 128-134. (IF2009 = 4.390)
5. P. Intharathep, C. Laohpongspaisan, **T. Rungrotmongkol**, A. Loisuangsinsin, M. Malaisree, P. Decha, O. Aruksakunwong, K. Chuenpenit, N. Kaiyawet, P. Sompornpisut, S. Pianwanit, and S. Hannongbua*, How amantadine and rimantadine inhibit proton transport in the M2 protein channel, *Journal of molecular graphics and modelling* **2008**; 27(3): 342-348. (IF2009 = 2.169)
6. V. Nukoolkarn, S. Saen-oon, **T. Rungrotmongkol**, S. Hannongbua, K. Ingkaninan, K. Suwanborirux*, Petrosamine, a potent anticholinesterase pyridoacridine alkaloid from a Thai marine sponge *Petrosia n. sp.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**; 16(13): 6560-6567. (IF2009 = 2.822)
7. **T. Rungrotmongkol**, P. Decha, M. Malaisree, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua*, Comment on "Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin" [Amino Acids 2008, January 31, Doi: 10.1007/s00726-007-0611-3], *Amino Acids* **2008**; 35: 511-512. (IF2009 = 3.877)
8. M. Malaisree, **T. Rungrotmongkol**, N. Nunthaboot, O. Aruksakunwong, P. Intharathep, P. Decha, P. Sompornpisut and S. Hannongbua*, Source of Oseltamivir Resistance in Avian Influenza H5N1 Virus with the H274Y Mutation. *Amino Acids* **2009**; 37(4):725-732. (IF2009 = 3.877)
9. **T. Rungrotmongkol**, P. Decha, P. Sompornpisut, M. Malaisree, P. Intharathep, N. Nunthaboot, T. Udommaneethanakit, O. Aruksakunwong, and S. Hannongbua*, Combined QM/MM mechanistic study of the acylation process in furin complexed with the H5N1 avian influenza virus hemagglutinin's cleavage site. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2009**; 76(1): 62-71. (IF2009 = 3.085)
10. C. Laohpongspaisan, **T. Rungrotmongkol**, P. Intharathep, M. Malaisree, P. Decha, O. Aruksakunwong, P. Sompornpisut, S. Hannongbua*, Why amantadine loses its function in influenza

M2 mutants: MD simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2009**; 49(4):847-52. (IF2009 = 3.882)

11. **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, T. Udommaneethanakit and S. Hannongbua*, Comment on "Another look at the molecular mechanism of the resistance of H5N1 influenza A virus neuraminidase (NA) to oseltamivir (OTV)" *Biophysical Chemistry* **2009**; 141: 131-132. (IF2009 = 2.276)

12. **T. Rungrotmongkol**, V. Frecer, W. De-Eknamkul, S. Hannongbua, and S. Miertus*, Design and in silico screening of combinatorial library of oseltamivir analogs inhibiting neuraminidase of avian influenza virus H5N1. *Antiviral Research* **2009**; 82(1):51-8. (IF2009 = 3.612)

13. **T. Rungrotmongkol**, P. Intharathep, M. Malaisree, N. Nunthaboot, N. Kaiyawet, P. Sompornpisut, S. Payungporn, Y. Poovorawan, and S. Hannongbua*, Susceptibility of antiviral drugs against 2009 influenza A (H1N1) virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2009**; 385(3):390-4. (IF2009 = 2.548)

14. **T. Rungrotmongkol**, T. Udommaneethanakit, M. Malaisree, N. Nunthaboot, P. Intharathep, P. Sompornpisut and S. Hannongbua*, How does each substituent functional group of oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 influenza mutants? *Biophysical Chemistry* **2009**; 145(1):29-36. (IF2009 = 2.276)

15. T. Udommaneethanakit, **T. Rungrotmongkol**, U. Bren, V. Frecer and S. Miertus*, Dynamic Behavior of Avian Influenza A Virus Neuraminidase Subtype H5N1 in Complex with Oseltamivir, Zanamivir, Peramivir, and their Phosphonate Analogues, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2009**; 49:2323-2332. (IF2009 = 3.882)

16. **T. Rungrotmongkol**, T. Udommaneethanakit, V. Frecer, and S. Miertus, Combinatorial design of avian influenza neuraminidase inhibitors containing pyrrolidine core with a reduced susceptibility to viral drug resistance, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2010**; 13(3):268-77. (IF2009 = 2.464)

17. **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, N. Nunthaboot, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua*, Molecular prediction of oseltamivir efficiency against probable influenza A (H1N1-2009) mutants: Molecular modelling approach, *Amino Acids* **2010**; 39(2):393-398. (IF2009 = 3.877)

18. N. Nunthaboot, **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, P. Decha, N. Kaiyawet, P. Intharathep, P. Sompornpisut, Y. Poovorawan and S. Hannongbua*, Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin, *Monatshefte fur Chemie - Chemical Monthly* **2010**; 141(7):801-807. (IF2009 = 1.312)

19. P. Intharathep, **T. Rungrotmongkol**, P. Decha, N. Nunthaboot, N. Kaiyawet, T. Kerdcharoen, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua*, Evaluating how rimantadines control the proton gating of the Influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **in press**. (IF2009 = 1.496)

20. S. Phongphanphanee, **T. Rungrotmongkol**, N. Yoshida, S. Hannongbua, F. Hirata*, Proton transport through the influenza A M2 channel: 3D-RISM study, *Journal of American Chemical Society* **2010**;132(28):9782-9788. (IF2009 = 8.580)

21. N. Nunthaboot, **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, N. Kaiyawet, P. Decha, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua*, Evolution of the human-receptor binding affinity of influenza A (H1N1) 2009 pandemic hemagglutinin from 1918- and 1930-H1N1 influenza viruses *Journal of Chemical Information and Modeling* **2010**;50:1410-1417. (IF2009 = 3.882)
22. **T. Rungrotmongkol***, N. Nunthaboot, M. Malaisree, N. Kaiyawet, P. Intharathep, A. Meeprasert and S. Hannongbua, Molecular Insight into the Specific Binding of ADP-ribose to the nsP3 Macro Domains of Chikungunya and Venezuelan Equine Encephalitis Viruses: Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Calculations *Journal of molecular graphics and modelling* **2010**;29:347–353. (IF2009 = 2.169)
23. P. Sornmee, **T. Rungrotmongkol**, O. Saengsawang, U. Arsawang, T. Remsungnen and S. Hannongbua*, Understanding of molecular properties of the doxorubicin anticancer drug filling inside and wrapping outside the single-walled carbon nanotube *Journal of Computational and Theoretical Nanosciences* **2010**; in press. (IF2009 = 0.899)
24. U. Arsawang, O. Saengsawang, **T. Rungrotmongkol**, P. Sornmee, T. Remsungnen and S. Hannongbua*, How do carbon nanotubes serve as carriers for gemcitabine transport in drug delivery system? *Journal of molecular graphics and modelling* **2011**;29:591-596. (IF2009 = 2.169)
25. **T. Rungrotmongkol**, U. Arsawang, C. Iamsamai, A. Vongachariya, S. Dubas, U. Ruktanonchai, A. Soottitantawat and S. Hannongbua*, Increase in dispersion and solubility of carbon nanotubes noncovalently modified by chitosan-polysaccharide biopolymer: MD simulations, **Revised**.
26. N. Kaiyawet, **T. Rungrotmongkol** and S. Hannongbua*, Identification of the probable novel strains of high pathogenic influenza A H5N1 virus in human, **Submitted**.
27. A. Vongachariya, C. Iamsamai, O. Saengsawang, **T. Rungrotmongkol**, S. Dubas, V. Parasuk and S. Hannongbua*, On the effect of surface curvature of carbon nanotube on its cation- π interaction with monovalent cations, **Submitted**.
28. W. Khuntawee, **T. Rungrotmongkol**, and S. Hannongbua*, Phosphorylation Inhibition of Cyclin D Dependent Kinase 6/Cyclin D Complex with Flavonoid Using Molecular Dynamics Simulations, **Submitted**.
29. **T. Rungrotmongkol**, A. J. Mulholland* and S. Hannongbua*, Asp185 is likely to serve as the catalytic base in the enzymatic reaction of HIV-1 reverse transcriptase: QM/MM approach, **in preparation**.
30. **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, V. Frecer, S. Hannongbua and S. Miertus*, Inhibitory efficiency of oseltamivir phosphonate against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of H5N1 and novel pandemic H1N1 viruses: A MD/LIE approach, **in preparation**.

BOOK, PROCEEDING AND MEETING ABSTRACT

1. **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, P. Decha, C. Laohppongspaisan, O. Aruksakunwong, P. Intharathep, S. Pianwanit, P. Sompornpisutl, V. Parasuk, E. Megnassan, V. Frecer, S. Miertus, S. Hannongbua, Understanding of drug-target interactions: a case study in influenza virus A subtype H5N1. AIP Conference Proceedings **2007**, 963 (Computation in Modern Science and Engineering, Volume 2, Part B), 913-916.

2. **T. Rungrotmongkol**, M. Malaisree, P. Decha, P. Intharathep, O. Aruksakunwong, S. Pianwanit, V. Parasuk, S. Hannongbua, Susceptibility and drug-resistance of highly pathogenic A H5N1 to the neuraminidase inhibitors: molecular dynamics simulations. FEBS Journal **2007**, 274 (32nd Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS) Vienna, AUSTRIA, July 07-12, 2007), 365-365.
3. **T. Rungrotmongkol**, T. Udommaneethanakit, V. Frecer, S. Hannongbua and S. Miertus, Combinatorial drug designs and drug-target interactions in neuraminidase of avian influenza virus subtype H5N1. Book of selected papers of invited experts, ICS-UNIDO International Conference, **2009**, 91-103.

INTERNATIONAL CONFERENCES AND PRESENTATIONS:

ORAL PRESENTATIONS:

1. T. Rungrotmongkol, A. J. Mulholland and S. Hannongbua. Modelling the enzymatic reaction of HIV-1 RT based on combined QM/MM approach. Workshop on Modeling Interactions in Biomolecules II, Czech University of Agriculture, Prague, Czech, September 5-9 **2005**.
2. T. Rungrotmongkol, P. Decha, M. Malaisree, C. Laohpongspaisan, O. Aruksakunwong, P. Intharathep, S. Pianwanit, P. Sompornpisut, V. Parasuk, E. Megnassan, V. Frecer, S. Miertus and S. Hannongbua. Influenza Virus A Subtype H5N1: Structural basis, Drug-Target Interactions and Molecular properties. Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON), Bangkok, Thailand, January 31-February 1 **2008**.
3. T. Rungrotmongkol, M. Malaisree, P. Intharathep, P. Decha, N. Nunthaboot, C. Laohpongspaisan, O. Aruksakunwong, T. Udommaneethanakit, S. Sompornpisut and S. Hannongbua. Concerns, recent outbreak and molecular insight into H5N1 and pandemic H1N1-2009 influenza A viruses. 14th International Annual Symposium on Computational Science and Engineering, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand, March 23-26, **2010**. (*Invited speaker*)
4. T. Rungrotmongkol, N. Nunthaboot, P. Intharathep, M. Malaisree, N. Kaiyawet, P. Sompornpisut and S. Hannongbua, Computational studies on H5N1 and pandemic H1N1 influenza A viruses, The 3rd National Seminar on Computer-Aided Drug Design: Virtual Screening, Gurney Hotel, Penang, Malaysia, December 2-3, **2010**. (*Invited speaker*)

POSTER PRESENTATIONS:

1. T. Rungrotmongkol and S. Hannongbua. Structural Calculations of Dihydrofolate Reductase Inhibitor, Cycloguanil. The International Conference on Bioinformatics 2002: North-South Networking (INCOB 2002), Le Royal Meridien, Bangkok, Thailand, February 6-8 **2002**.
2. T. Rungrotmongkol, A. J. Mulholland and S. Hannongbua. Modelling the structure and mechanism of HIV-1 reverse transcriptase. MGMS Young Modellers' Forum in Conjunction with the RSC MMG, London, U.K., December 1 **2003**.
3. T. Rungrotmongkol, A. J. Mulholland and S. Hannongbua. Mechanistic study of HIV-1 Reverse Transcriptase at the active site based on QM/MM method. 1st Asian Pacific Conference on Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC1), Institute for Molecular Science (IMS), Okazaki, Japan, May 12-15 **2004**.
4. T. Rungrotmongkol, A. J. Mulholland and S. Hannongbua. Molecular mechanics and combined quantum mechanical and molecular mechanical (QM/MM) simulations on enzymatic reaction of

HIV-1 RT active. 2nd Asian Pacific Conference on Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC2), Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, May 2-6 **2005**.

5. T. Rungrotmongkol, M. Malaisree, P. Decha, C. Laohpongspaisan, O. Aruksakunwong, P. Intharathep, S. Pianwanit, P. Sompornpisut, V. Parasuk, E. Megnassan, V. Frecer, S. Miertus and S. Hannongbua. Structural Information and Drug-Target Interaction of Influenza Virus A Subtype H5N1. Bangkok International Conference on Avian Influenza 2008: Integration from Knowledge to Control. Bangkok, Thailand, January 23-25 **2008**.

6. T. Udommaneethanakit, T. Rungrotmongkol, U. Bren, V. Frecer and M. Stanislav. Binding free energy calculations of inhibitors bound to neuraminidase subtype N1 of avian influenza A virus. Drug Design and Discovery for Developing Countries, Trieste, Italy, July 3-5 **2008**.

7. T. Rungrotmongkol, P. Decha, P. Sompornpisut, M. Malaisree, P. Intharathep, N. Nunthaboot, T. Udommaneethanakit, O. Aruksakunwong, and S. Hannongbua. Molecular modelling on the acylation process in furin complexed with the cleavage site of hemagglutinin H5. Drug Design and Discovery for Developing Countries, Trieste, Italy, July 3-5 **2008**.

8. T. Rungrotmongkol, T. Udommaneethanakit, M. Malaisree, N. Nunthaboot, P. Intharathep, and S. Hannongbua. How does oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 mutants? Sokendai Asian Winter School, Okazaki, Japan, December 9-12, **2008**.

9. T. Rungrotmongkol, M. Malaisree, S. Hannongbua, S. Phongphanphanee, N. Yoshida, F. Hirata, Neuraminidase and M2-channel of influenza A viruses H5N1 and pandemic H1N1: molecular modelling and 3D-RISM, The Inaugural CU-IMS Joint Symposium, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, October 19-21, **2010**.

Curriculum Vitae
Dr. Pathumwadee (Intharathep) Yotmanee

Personal details:

Current position: Researcher
Current institution & address: Center of Innovative Nanotechnology,
and Computational Chemistry Unit Cell,
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Chulalongkorn University,
254 Phayathai Rd., Patumwan, Bangkok, 10330, Thailand
Birth: January 17 1979, Nakhon Si thammarat, Thailand
Gender: Female
Nationality: Thai
Phone Number: +66-2218-7602
Fax Number: +66-2218-7603
Mobile phone: +66-891118920
E-mail address: pathumwadeei@hotmail.com

Education:

1997-2000 B.Sc. (Chemistry, GPA 3.09), Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand
2001-2006 Ph.D. (Physical Chemistry, GPA 3.75), Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

Area of interests:

- Quantum Chemistry
 - QM/MM calculation
 - Molecular Dynamics Simulation
 - Binding Free Energy Calculation using MM-PB(GB)SA method
 - Computer Aided Molecular (Drug) Design
-

Computational skills:

- Computational Chemistry, Molecular Modeling and Drug Design software packages such as Gaussian, CHARMM, AMBER, GROMACS, Autodock
 - Unix and Windows operating system
 - Programing languages: Fortran
-

Experiences:

- Teaching Assistant, School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand (2001)
 - Scholar Visitor, the Institute for Materials and Processes in Energy System (IWW-3), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany (2005)
 - Scholar Visitor, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, United State (2006)
 - Researcher, Chulalongkhon University, Bangkok, Thailand (2007)
 - Postdoctoral Fellowship, Mahidol University, Bangkok, Thailand (2008-2009)
-

Scholarships:

- The Royal Golden Jubilee (RGJ) Ph.D. scholarship from Thailand Research Fund (TRF) (2001-2006)
 - Postdoc Fellowship from Comission on higher education (2008-2009)
 - Postdoc Fellowship from Graduate School, Chulalongkorn University (2010)
-

Publications:

1. **Intharathep, P.**, Tongraar, A., and Sagarik, K. (2005). Structure and dynamics of hydrated NH_4^+ : An *ab initio* QM/MM molecular dynamics simulation. *Journal of Computational Chemistry*. 26 : 1329-1338. (CA: Tongraar, A, IF2009: 3.769)

2. **Intharathep, P.**, Tongraar, A., and Sagarik, K. (2006). *Ab initio* QM/MM dynamics of H_3O^+ in water. *Journal of Computational Chemistry*. 27: 1723-1732. (CA: Tongraar, A., IF2009: 3.769)
3. Malaisree, M., Rungrotmongkol, T., Decha, P., **Intharathep, P.**, Aruksakunwong, O., Hannongbua, S. (2008). Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 71: 1908-1918. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 3.085)
4. Decha P., Rungrotmongkol T., **Intharathep P.**, Malaisree M., Aruksakunwong O., Laohpongspaisan C., Parasuk V., Sompornpisut P., Pianwanit S., Kokpol S., Hannongbua S. (2008). Source of high pathogenicity of an avian influenza virus H5N1: why H5 is better cleaved by furin. *Biophysical Journal*. 95: 128-134. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 4.390)
5. **Intharathep, P.**, Laohpongspaisan, C., Rungrotmongkol, T., Loiruangsinsin, A., Malaisree, M., Decha, P., Aruksakunwong, O., Chuenpenit, K., Kaiyawet, N., Sompornpisut, P., Pianwanit, S., Hannongbua, S. How Amantadine and Rimantadine Inhibit Proton Transport in the M2 Protein Channel. (2008) *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 27: 342-348. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 2.169)
6. Malaisree, M., Rungrotmongkol, T., Nunthaboot, N., Aruksakunwong, O., **Intharathep, P.**, Decha, P., Sompornpisut, P., Hannongbua, S. (2008). Source of Oseltamivir Resistance in Avian Influenza H5N1 Virus with the H274Y Mutation. *Amino acids*. doi: 10.1007/s00726-008-0201-z. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 3.877)
7. Rungrotmongkol, T., Decha, P., Sompornpisut, P., Malaisree, M., **Intharathep, P.**, Nunthaboot, N., Udommaneethanakit, T., Aruksakunwong, O., Hannongbua, S. (2008). Combined QM/MM mechanistic study of the acylation process in furin complexed with the H5N1 avian influenza virus hemagglutinin's cleavage site. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 76: 62-71. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 3.085)
8. Laohpongspaisan, C., Rungrotmongkol, T., **Intharathep, P.**, Malaisree, M., Decha, P., Aruksakunwong, O., Sompornpisut, P., Hannongbua, S. (2009). Why amantadine loses its function in influenza M2 mutants: MD simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49: 847-852. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 3.882)
9. Rungrotmongkol, T., **Intharathep, P.**, Malaisree, M., Nunthaboot, N., Kaiyawet, N., Sompornpisut, P., Payungporn, C., Poovorawan, Y., and Hannongbua, S. (2009) Susceptibility of Antiviral Drugs Against 2009 Influenza A (H1N1) Virus, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385: 390-394. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 2.548)
10. Rungrotmongkol, T., Udommaneethanakit, T., Malaisree, M., Nunthaboot, N., **Intharathep, P.**, Sompornpisut, P. Hannongbua, S. (2009). How does each substituent functional group of oseltamivir lose its activity against virulent H5N1 mutants?, *Biophysical Chemistry*, 145: 29-36. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 2.276)
11. Nunthaboot, N., Rungrotmongkol, T., Malaisree, M., Decha, P., Kaiyawet, N., **Intharathep, P.**, Sompornpisut, P., Poovorawan, Y., Hannongbua, S. (2009). Molecular insights into human receptor binding to 2009 H1N1 influenza A hemagglutinin. *Monatshfte Fur Chemie*, DOI 10.1007/s00706-010-0319-z. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 1.312)
12. Decha, P., **Intharathep, P.**, Udommaneethanakit, T., Sompornpisut, P., Hannongbua, S., Wolschann, P., Parasuk, V. (2009). Theoretical studies on the molecular basis of HIV-1RT/NNRTIs interactions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, DOI: 10.3109/14756360903563393. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 1.496)
13. Chakrapani, S., Sompornpisut, P., **Intharathep, P.**, Roux, B., Perozo, E. (2009). The Activated State of a Sodium Channel Voltage Sensor in a Membrane Environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, doi: 10.1073/pnas.0914109107. (CA: Perozo, E. IF2009: 9.432)
14. **Intharathep, P.**, Rungrotmongkol, T., Dechad, P., Nunthaboot, N., Kaiyaweta, N., Kerdcharoen, T., Sompornpisuta, P., Hannongbua, S. (2010). Evaluating how rimantadines control the proton gating of the Influenza A M2-proton port via allosteric binding outside of the M2-channel: MD simulations. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, DOI: 10.3109/14756366.2010.482530. (CA: Hannongbua, S., IF2009: 1.496)

15. Decha, P., Kaiyawet, N., Meeprasert, A., **Intharathep, P.**, Hannongbua, S. and Sompornpisut, P. (2010). Insight into the role of QXG residues in the receptor binding domain of the avian and human hemagglutinin. preparation. (CA: Hannongbua, S., IF2009:)
16. **Intharathep, P.**, Rungrotmongkol, T., Kerdcharoen, T., Sompornpisut, P., Hannongbua, S. (2010). How rimantadines lose its ability to control the proton gating in Influenza A M2 mutant via allosteric binding outside of the M2-pore: MD simulations. preparation. (CA: Hannongbua, S., IF2009:)
17. **Yotmanee, P.**, Rungrotmongkol, T., Wichapong, K., Roslim, R., Wahab, H.A., Sompornpisut, P., Hannongbua, S. (2010). Insight into Polypeptide Substrates of Dengue virus Type 2 Cleaved by its NS2B-NS3(Pro) Serine Protease : Molecular Dynamics Simulations. preparation. (CA: Hannongbua, S., IF2009:)

Presentations:

1. **Pathumwadee Intaratap**, Anan Tongraar, Kritsana Sagarik. (April 25-27, 2003). Investigation of hydration structure of ammonium ion using *ab initio* QM/MM molecular dynamics simulation. **RGJ-Ph.D. Congress IV**. Jomtien Palm Beach Hotel&Resort, Chonburi, Thailand.
2. **Pathumwadee Intharathep**, Anan Tongraar and Kritsana Sagarik. (July, 21-23 2004). Quantum-Mechanical based simulations of an ammonium ion in aqueous solution. **The 8th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE8)**. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
3. **Pathumwadee Intharathep**, Anan Tongraar and Kritsana Sagarik. (October 19-21, 2004). Dynamical properties of NH_4^+ in water studied by *ab initio* QM/MM MD simulation. **30th Congress on Science and Technology of Thailand (STT30th)**. IMPACT Muang Thong Thani, Bangkok, Thailand.
4. **Pathumwadee Intharathep**, Anan Tongraar and Kritsana Sagarik (May 2-6, 2005). *Ab initio* QM/MM dynamics of H_3O^+ in water. **2nd Asian Pacific Conference on Theoretical & Computational Chemistry (APCTCC2)**. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
5. **Pathumwadee Intharathep**, Anan Tongraar and Kritsana Sagarik. (October 18-20, 2005). Effects of electron correlation on the structural properties of H_3O^+ in water: Combined *ab initio* QM/MM molecular dynamics simulations. **31st Congress on Science and Technology of Thailand (STT31st)**. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
6. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Arthorn Loisruangsin, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Onjira Aruksakunwong, Krit Chuenpenit, Nopphorn Kaiyawet, Pornthep Sompornpisut, Somsak Pianwanit and Supot Hannongbua. (March 27-29, 2008). Interaction between an Amantadine drug and the Influenza A M2 Protein Channel in Phospholipid Studied by MD simulations. **The 12th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE12)**. Ubon Rajathanee University , Ubonratchathani, Thailand.
7. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Arthorn Loisruangsin, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Onjira Aruksakunwong, Krit Chuenpenit, Nopphorn Kaiyawet, Pornthep Sompornpisut, Somsak Pianwanit and Supot Hannongbua. (January 30 – Feb 1, 2008). Machinery of inhibited M2 Protein Channel by Amantadine and Rimantadine inhibitors. **Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2008)**. Sofitel Centara Grand Bangkok, Bangkok, Thailand.
8. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Arthorn Loisruangsin, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Onjira Aruksakunwong, Krit Chuenpenit, Nopphorn Kaiyawet, Pornthep Sompornpisut, Somsak Pianwanit, Supot Hannongbua. (April 18, 2008). Molecular Dynamics Simulation of Amantadine and Rimantadine Inhibit Water Transport through the Influenza A virus M2 Channel. **ประชุมประจำปี กลุ่มวิจัยเมธีอรุโส 2551**. Asia Hotel, Bangkok, Thailand.

9. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Pornthep Sompornpisut, Teerakiat Kerdcharoen, Supot Hannongbua. (March 25-27, 2009). Allosteric Interaction between an Rimantadine drug and the Influenza A M2 Protein Channel in Phospholipid Studied by MD simulations. **The 13th Annual National Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE13)**. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
10. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Arthorn Loisruangsin, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Onjira Aruksakunwong, Krit Chuenpennit, Nopphorn Kaiyawet, Pornthep Sompornpisut, Somsak Pianwanit, Supot Hannongbua. (October 19-22, 2009). Susceptibility of Antiviral Drugs Against 2009 Influenza A (H1N1) Virus. **The 6th Thai Summer School of Computational Chemistry (6th TS₂C₂)**. Mahasarakham University, Mahasarakham, Thailand.
11. **Pathumwadee Intharathep**, Jittima Laohpongspaisan, Thanyada Rungrotmongkol, Arthorn Loisruangsin, Mathuros Malaisree, Panita Decha, Onjira Aruksakunwong, Krit Chuenpennit, Nopphorn Kaiyawet, Pornthep Sompornpisut, Somsak Pianwanit, Supot Hannongbua. (August 27-29, 2009). Machinery of inhibited M2 Protein Channel by Amantadine and Rimantadine inhibitors. **Commission on Higher Education Congress II-University Staff Development Consortium (CHE-USDC Congress II)**. Dusit Thani Pattaya Hotel, Chonburi, Thailand.
12. **Pathumwadee Intharathep**, Thanyada Rungrotmongkol, Teerakiat Kerdcharoen, Pornthep Sompornpisut and Supot Hannongbua. (December 21-23, 2009). On the Lower Susceptibility of Adamantane Drugs to Influenza A H1N1 2009 M2-protein Channel caused by Triple V28I, S31N and L43T Mutations. **4th Asian Pacific Conference on Theoretical & Computational Chemistry (APCTCC4)**. Port Dickson, Malaysia.

References:

1. **Prof.Dr.Supot Hannongbua**
Department of Chemistry, Faculty of Science
Chulalongkorn University
Phayathai Road, Patumwan
Bangkok 10330, THAILAND
Office: 1115 Mahamakut Building
Tel: 02-2187603
Fax: 02-2187602
E-mail: supot.h@chula.ac.th
2. **Assoc. Prof. Dr. Anan Tongraar**
School of Chemistry, Institute of Science
Suranaree University of Technology
Nakhon Ratchasima 30000, THAILAND
Tel: 044-224199
E-mail: anan@sut.ac.th
3. **Assist.Prof. Pornthep Sompornpisut**
Department of Chemistry, Faculty of Science
Chulalongkorn University
Phayathai Road, Patumwan
Bangkok 10330, THAILAND
Office: 1115 Mahamakut Building
Tel: 02-2187604
Fax: 02-2187598
E-mail: pornthep.s@chula.ac.th