Thesis Title Study of Selective Binding for G-Quadruplex of Perylene Derivatives with Different Charges

Author Mr. Thanachai Taka

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assist. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapikul Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon Member

Abstract

Since the discovery that telomerase is expressed in 85-90% of all human tumors but not in most normal somatic cells, it has become a potential specific target for the development of new anticancer drugs. Telomerase is responsible for the extension of the telomere length from the 3'-G-rich telomeric overhang primer, which is able to form G-quadruplex DNA structures. The formation of G-quadruplex prevents telomerase from accessing its normal substrate, thereby inhibiting its function. Many agents that induce and/or stabilize this G-quadruplex DNA structure successfully inhibit telomerase. One problem that faces many G-quadruplex ligands is non-specific cytotoxicity, which is believed to arise from their interaction with duplex DNA. In this study, we investigated the effect of different side chains of three new perylene-based G-quadruplex ligands, P-GLU, P-HIS, and P-TRIS toward G-quadruplex binding selectivity in comparison to the well characterized PIPER and $TmPyP_4$ by spectrophotometric and electrophoretic analysis. By using spectrophotometric methods, the spectra of each perylene derivative in the presence of various forms of DNA indicated that only the positively-charged perylene derivatives, PIPER, P-HIS, and positively-charged state of P-HIS show selective binding to G-quadruplex DNA. On the other hand, the negatively-charged perylene, P-GLU and the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

negatively-charged state of P-HIS fail to interact with any of the DNA forms. The effect of the side chain of each perylene derivative or $TmPyP_4$ was further analyzed by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). From the G-quadruplex binding and/or formation assays, P-GLU and P-HIS neither bind nor facilitate the formation of G-quadruplex. PIPER shows pH-dependent and concentration-dependent binding to G-quadruplex. PIPER preferentially binds to monomeric G-quadruplex at low concentration, but facilitates the formation of tetremeric G-quadruplex at high concentration. P-TRIS and $TmPyP_4$ both show concentration-dependent binding to monomeric G-quadruplex but do not facilitate the formation of tetrameric G-quadruplex like PIPER does. From the duplex/quadruplex competition assays, PIPER and P-TRIS bind preferentially to G-quadruplex DNA compared to double-stranded DNA. In contrast to PIPER and P-TRIS, $TmPyP_4$ binds preferentially to double-stranded DNA compared to G-quadruplex DNA. The G-quadruplex stabilizing assays also confirm that PIPER preferentially binds and stabilizes G-quadruplex, while $TmPyP_4$ loses its binding to G-quadruplex in the presence of duplex DNA. In addition to the above studies, the G-quadruplexes formed from telomeric oligonucleotide and the nuclease hypersensitivity element of c-myc gene promoter were also verified by DMS methylation protection assay. The data from this study will be beneficial for designing better perylene-based G-quadruplex stabilizing agents to use as antitelomerase agents.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาการจับอย่างจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้าง G-quadruplex ของอนุพันธ์ perylene ที่มีประจุต่างกัน

ผู้เขียน นายธนชัย ตาก๋ำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล ประธานกรรมการ

รศ. ดร. ลักษณา มกรแก้วเกยูร กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์เทโลเมอเรสมีการแสดงออกประมาณ 85-90% ของเซลล์มะเร็งมนุษย์ แต่ไม่มีการแสดงออกในเซลล์ปกติ ด้วยเหตุผลนี้เอนไซม์เทโลเมอเรส จึงได้รับความสนใจในการเป็นเป้าหมายของการพัฒนาของยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง โดยส่งผลข้างเคียงต่อเซลล์ปกติน้อย เอนไซม์เทโลเมอเรสต่อความยาวของเทโลเมียร์จากปลาย 3’ ของดีเอ็นเอ ที่มีกวานีนสูงและเป็นสายเดี่ยว ซึ่งปลายดีเอ็นเอนี้สามารถเกิดเป็นโครงสร้าง G-quadruplex ได้ การเกิดโครงสร้าง G-quadruplex สามารถป้องกันไม่ให้เอนไซม์เทโลเมอเรสเข้าจับกับปลายดีเอ็นเอปกติได้ จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ พบว่า สารหลายชนิดที่สามารถเหนี่ยวนำและรักษาเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรส ปัญหาหนึ่งที่สำคัญของสารที่จับกับ G-quadruplex คือมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเชื่อว่าเกิดขึ้นเนื่องจากการจับอย่างไม่จำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอสายคู่ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงได้ศึกษาผลของแขนข้างที่แตกต่างกันของอนุพันธ์สาร perylene ใหม่สามชนิดได้แก่ P-GLU, P-HIS และ P-TRIS ต่อการจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโครงสร้าง G-quadruplex โดยเปรียบเทียบกับสาร PIPER และ $TmPyP_4$ ซึ่งได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยใช้วิธีวัดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง และการศึกษาการเคลื่อนตัวของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) พบว่าอนุพันธ์ perylene ที่มีประจุบวกเช่น PIPER P-TRIS และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

P-HIS ในสถานะประจุบวก เท่านั้นที่แสดงการจับอย่างจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้าง G-quadruplex ส่วนอนุพันธ์ perylene ที่มีประจุลบ เช่น P-GLU และ P-HIS ในสถานะประจุลบไม่มีความสามารถที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในรูปแบบใดได้เลย นอกจากนี้ผลของแขนข้างของอนุพันธ์ perylene ต่อการจับอย่างจำเพาะเจาะจงต่อโครงสร้าง G-quadruplex โดยวิธี non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จากการทดลอง พบว่า P-GLU และ P-HIS ไม่สามารถที่จะจับและเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้าง G-quadruplex ได้ แม้จะเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชหรือเพิ่มความเข้มข้น ขณะที่ PIPER แสดงการจับและเหนี่ยวนำเป็นแบบที่ขึ้นกับพีเอช (pH-dependent) และขึ้นกับความเข้มข้น (concentration-dependent) โดย PIPER ชอบจับกับ monomeric G-quadruplex ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่สามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด tetrameric G-quadruplex ที่ความเข้มข้นสูง P-TRIS และ $TmPyP_4$ ต่างก็แสดงการจับกับ monomeric G-quadruplex แบบขึ้นกับความเข้มข้นแต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด tetrameric G-quadruplex ได้เหมือน PIPER นอกจากนี้ PIPER และ P-TRIS ชอบจับกับ G-quadruplex มากกว่าดีเอ็นเอสายคู่ ในทางตรงกันข้าม $TmPyP_4$ ชอบจับกับดีเอ็นเอสายคู่มากกว่า G-quadruplex จากข้อมูลการศึกษาการเคลื่อนตัวของดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้ายังแสดงให้เห็นว่า PIPER รักษาเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex ได้ดีกว่า $TmPyP_4$ นอกจากการศึกษาข้างต้นแล้ว ยังมีการใช้วิธี DMS methylation protection assay เพื่อยืนยันการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex จากสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเหมือนปลายเทโลเมียร์และพิสูจน์โครงสร้าง G-quadruplex จากสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสเหมือนส่วน NHE (nuclease hypersensitivity element) ของ c-myc โปรโมเตอร์ ข้อมูลของการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาสารในกลุ่ม perylene ให้เป็นสารที่สามารถรักษาเสถียรภาพของโครงสร้าง G-quadruplex เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved