

Thesis Title	Telomerase Inhibition by Perylene Derivatives and Ginger Extract	
Author	Mr. Thanachai Taka	
Degree	Doctor of Philosophy (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee		
	Asst. Prof. Dr. Wirote Tuntiwechapakul	Advisor
	Dr. Arisa Bonness	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Ariyapong Wongnoppavich	Co-advisor

ABSTRACT

Cancer cells evade replicative senescence by re-expressing telomerase, the specialized enzyme which maintains telomere length by adding telomeric DNA to the shortening telomere using its internal RNA as template. Since telomerase is presented mostly in cancer cells and not the normal somatic cells, it is an attractive target for cancer therapy and cancer prevention. Our research group has focused on finding telomerase inhibitors from both synthetic and natural compounds. In this thesis, telomerase inhibition by perylene derivatives and ginger extract are described. Our perylene derivatives, PM2 and PIPER, are synthetic G-quadruplex ligands which induce G-quadruplex formation from DNA segments derived from both telomeric DNA and hTERT promoter. G-quadruplex formation at the telomeric DNA could prevent the access of telomerase to its substrate, and G-quadruplex formation at hTERT promoter could act as transcriptional silencer. Therefore, these agents could potentially inhibit telomerase in two modes of action. The results showed that these compounds could

inhibit telomerase in a dose-dependent manner *in vitro*; and when treated in the A549 cancer cells, hTERT expression was down-regulated. Moreover, the crude protein extract from these treated cells showed less telomerase activity. These results confirmed that these perylenes could inhibit telomerase in both modes of action. In the long-term treatment of cancer cells with sub-cytotoxic doses of these perylenes, telomere shortening, reduction of cell proliferation and tumorigenicity, and cell senescence were observed. In addition to hTERT promoter, G-quadruplex motif has also been found in the promoter of many cancer-related genes, including VEGF, c-Myc, and Bcl-2. Our perylene derivatives were found to down-regulated these genes in A549 cells, emphasizing the effectiveness of G-quadruplex ligand as a transcriptional repressor on these genes. Moreover, the effect of PM2 as a VEGF gene suppressor is not cell-type specific, since PM2 could suppress VEGF gene expression in a variety of cancer cells, including MCF-7, HCT-15, and HeLa cells. Another section of this thesis focuses on the telomerase inhibition by ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract. The A549 treated with the ethyl acetate fraction of ginger extract showed a reduction in the mRNA and protein level of hTERT and c-Myc in a time- and concentration-dependent manner. The treated cells exhibited diminished telomerase activity. The reduction in telomerase activity is caused by the reduction in hTERT production rather than direct inhibition of telomerase since ginger extract did not inhibit telomerase in the *in vitro* TRAP assay. Altogether, this thesis shows that both perylene derivatives and ginger extract are effective telomerase inhibitors, and telomerase inhibition could lead to cancer cell senescence and reduction in cancer cell growth and tumorigenicity.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสโดยสารอนุพันธ์เพอร์ลีนและสารสกัดจากจิง	
ผู้เขียน	นายธนชัย ตาก้า	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์		
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ตันติเวชอภิกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ดร. อริสา บอนเนซซ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อริยพงษ์ วงษ์นพวิชญ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เซลล์มะเร็งหลบหลีกสภาวะเสื่อมสภาพของเซลล์จากการแบ่งตัวโดยทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์เทโลเมอเรสอีกครั้ง เอนไซม์พิเศษนี้ทำหน้าที่คงความยาวของเทโลเมียร์โดยการเติมดีเอ็นเอที่ปลายเทโลเมียร์โดยใช้อาร์เอ็นเอของตัวเองเป็นแม่พิมพ์ งานวิจัยของกลุ่มเราสนใจหาสารยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสจากทั้งสารสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติ ในงานวิจัยนี้ได้อธิบายการยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสของสารอนุพันธ์เพอร์ลีนและสารสกัดจากจิง (*Zingiber officinale*) สารอนุพันธ์เพอร์ลีน PM2 และ PIPER ของเราเป็นสารสังเคราะห์ที่ขบจับกับโครงสร้างดีเอ็นเอชนิด G-quadruplex โดยสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้าง G-quadruplex จากดีเอ็นเอส่วนเทโลเมียร์และดีเอ็นเอส่วนโปรโมเตอร์ของยีน hTERT การเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ที่ดีเอ็นเอส่วนเทโลเมียร์สามารถป้องกันเอนไซม์เทโลเมอเรสจับกับสับสเตรต และการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ที่ดีเอ็นเอส่วนโปรโมเตอร์ของยีน hTERT สามารถเป็นตัวกวดการแสดงออกของยีนระดับทรานสคริปชันด้วยเหตุนี้เองสารดังกล่าวจึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสจากทั้งสองกลไก ผลการทดลองแสดงว่าสารดังกล่าวสามารถยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารในหลอดทดลองและเมื่อเซลล์มะเร็งชนิด A549 ที่ถูกบ่มกับสารนี้เมื่อนำมาทดสอบพบว่าการแสดงออกของยีน hTERT ถูกทำให้ลดลง นอกจากนี้โปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งดังกล่าวมีการทำงานของเอนไซม์เทโลเมอเรสลดลงด้วย ผลการทดลองดังกล่าวนี้ยืนยันได้ว่าสารอนุพันธ์เพอร์ลีนสามารถยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสโดยทั้งสองกลไก ในการบ่มสารอนุพันธ์เพอร์ลีนที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษเฉียบพลันต่อเซลล์มะเร็งเป็นระยะเวลาสั้นพบว่าเกิด เทโลเมียร์หดสั้น ความสามารถในการแบ่งตัวและการก่อมะเร็งลดลง และเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์มะเร็ง นอกเหนือจากดีเอ็นเอส่วนโปรโมเตอร์ของยีน hTERT โครงสร้าง G-quadruplex สามารถพบได้ในยีน

ที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งเช่น VEGF c-Myc และ Bcl-2 สารอนุพันธ์เพอร์ลิทินของเราสามารถลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเซลล์มะเร็งชนิด A549 จากผลการทดลองดังกล่าวนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความมีประสิทธิภาพของสารขบับกับโครงสร้าง G-quadruplex ในการเป็นสารยับยั้งการแสดงออกของยีนดังกล่าว นอกจากนี้ผลของ PM2 ในการเป็นตัวลดการแสดงออกของยีน VEGF ไม่จำเพาะกับชนิดของเซลล์ โดยที่ PM2 สามารถลดการแสดงออกของยีน VEGF ในเซลล์มะเร็งชนิดต่างๆเช่นเซลล์ MCF-7 HCT-15 และ HeLa อีกส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้สนใจการยับยั้งเอ็นไซม์เทโลเมอเรสโดยสารสกัดจากขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) เซลล์มะเร็งชนิด A549 ที่ถูกบ่มกับสารสกัดจากขิงชั้นเอทิลอะซิเตตมีการลดลงของเอ็มอาร์เอ็นเอและโปรตีนของ hTERT และ c-Myc ในลักษณะที่ขึ้นอยู่กับเวลาและความเข้มข้นของสาร เซลล์ที่ถูกบ่มสารสกัดดังกล่าวมีการทำงานของเอ็นไซม์เทโลเมอเรสลดลงด้วย การลดลงของการทำงานของเอ็นไซม์เทโลเมอเรสเกิดจากการลดลงของการผลิตเอ็นไซม์มากกว่าการยับยั้งโดยตรงที่โมเลกุลเอ็นไซม์ เนื่องจากสารสกัดดังกล่าวไม่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เทโลเมอเรสโดยวิธี TRAP ในหลอดทดลอง การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งสารอนุพันธ์เพอร์ลิทินและสารสกัดจากขิงเป็นสารยับยั้งเอ็นไซม์เทโลเมอเรสที่มีประสิทธิภาพและการยับยั้งเอ็นไซม์เทโลเมอเรสนี้นำไปสู่การเสื่อมสภาพของเซลล์มะเร็ง การลดลงของความสามารถในการเจริญเติบโตและการก่อมะเร็ง