การพัฒนาเทคนิคฟลูออโรเมตรีใช้กับไมโครเพลทเพื่อตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส 1

นายปรัชญา เจตินัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF FLUOROMETRIC MICROPLATE SCREENING FOR TOPOISOMERASE I INHIBITORS

Mr. Pratchaya Jetinai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biomedicinal Chemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501413

Thesis Title	DEVELOPMENT OF FLUOROMETRIC MICROPLATE SCREENING FOR TOPOISOMERASE I INHIBITORS
By	Mr. Pratchaya Jetinai
Field of Study	Biomedicinal Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

D. Meksuriyen ..... Chairman
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)

Thitima Pengsuparp ..... Thesis Advisor
(Associate Professor Thitima Pengsuparp, Ph.D.)

Boonsri Ongpipattanakul ..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun ..... Member
(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

Pornchai Rojsitthisak ..... Member
(Assistant Professor Pornchai Rojsitthisak, Ph.D.)

ปรัชญา เจตินัย : การพัฒนาเทคนิคฟลูออโรเมตรีใช้กับไมโครเพลทเพื่อตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์โทโพไอโซเมอเรส 1. (DEVELOPMENT OF FLUOROMETRIC MICROPLATE SCREENING FOR TOPOISOMERASE I INHIBITORS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ธิติมา เพ็งสุภาพ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. บุญศรี องค์พิพัฒนกุล, 72 หน้า.

เอนไซม์ topoisomerase I เป็นเป้าหมายสำหรับยาต้านมะเร็งและยาต้านจุลชีพ วิธีดั้งเดิมในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์และตรวจหาสารยับยั้งเอนไซม์โดยทั่วไปคือ เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส ข้อเสียของวิธีนี้คือใช้เวลาในการทำการทดลองนานมากและตรวจหาสารยับยั้งได้ครั้งละจำนวนน้อย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจหาสารยับยั้งที่มีขั้นตอนที่ง่ายและรวดเร็วโดยการใช้สีเรืองแสงและใช้ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม สีเรืองแสงที่ใช้การศึกษาได้แก่ Hoechst 33258, Hoechst 33342, Picogreen และ Sybr Green I จากการศึกษาพบว่าสี Picogreen ให้ค่าความแตกต่างของสัญญาณต่ำสุดและสัญญาณสูงสุดมากที่สุด โดยมีค่า Z′ value เกิน 0.4 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่สามารถให้ค่า Z′ value เกิน 0.4 อยู่ในช่วง 50-1000 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในช่วงเวลาต่างๆโดยใช้สี Picogreen พบว่าให้ความไวเหนือกว่าวิธีการใช้เจล ได้นำวิธีการนี้มาใช้ตรวจสอบสารยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I (camptothecin, heparin, quercetin และ menadione) และ topoisomerase II (etoposide และ ellipticine) เพื่อยืนยันความสามารถในการวิเคราะห์ พบว่าได้ค่า IC_{50} ใกล้เคียงกัน แม้ว่าค่า IC_{50} ที่ได้จากวิธีฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ไมโครเพลทจะสูงกว่าวิธีการใช้เจล แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามวิธีฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ไมโครเพลทไม่สามารถวัดค่า IC_{50} ของ quercetin ได้ เนื่องจาก quercetin ยับยั้งการเรืองแสงของสี Picogreen ในการศึกษานี้พบการยับยั้งเอนไซม์ topoisomerase I โดย ellipticine ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง topoisomerase II ชนิดแทรกจับกับดีเอ็นเอซึ่งมีค่าการยับยั้งร้อยละ 100 ที่ 20 ไมโครโมลาร์ และสามารถยังยับยั้งการเรืองแสงของสี Picogreen อีกด้วย ได้นำสารที่ยังไม่ทราบฤทธิ์จำนวน 12 ชนิดมาตรวจหาการยับยั้งเอนไซม์ พบว่าสาร 4 ชนิดได้แก่ chelerythrine, sanguinarine, oxostephanine and fagarine มีร้อยละของการยับยั้ง (ด้วยวิธีการใช้เจล) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์เท่ากับ 41.1±18.9, 47.7±9.01, 84.3±23.4 และ 106±8.5 ตามลำดับ พบว่าวิธีฟลูออเรสเซนซ์โดยใช้ไมโครเพลทมีข้อจำกัดไม่สามารถตรวจหาการยับยั้งเอนไซม์กับสารที่มีคุณสมบัติแทรกจับกับดีเอ็นเอ ได้แก่ chelerythrine และ sanguinairine โดยสรุปงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาการตรวจหาสารยับยั้ง topoisomerase I ที่รวดเร็ว และตรวจสอบสารครั้งละมากๆได้โดยการใช้ Picogreen เป็นสารเรืองแสง แต่ถ้าสารที่จะมาทดสอบจับกับดีเอ็นเอได้ จะต้องใช้วิธีอื่น เช่น การใช้เจลอิเล็กโทรฟอเรซิส

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....ปรัชญา เจตินัย.....

สาขาวิชา...ชีวเวชเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4776577133 : MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEY WORD: TOPOISOMERASE I / FLUORESCENCE MICROPLATE ASSAY / TOPOISOMERASE I INHIBITOR / PICOGREEN / GEL ELECTROPHORESIS
PRATCHAYA JETINAI : THESIS TITLE. (THESIS TITLE) THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. THITIMA PENGSUPARP, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF. BOONSRI ONGPIPATTANAKUL, Ph.D., 72 pp.

Topoisomerase I has been recognized as a biological target for anticancer or antimicrobial agents. The conventional assay of the enzyme for enzyme activity and screening of enzyme inhibitors was typically agarose-gel electrophoresis. The disadvantages of this method were time-consuming and low throughput. Thus, the purpose of this study was to develop assays by using fluorescent dyes and 96-well microplate format to obtain the more simple and rapid method for screening inhibitor. Four fluorescent dyes including Hoechst 33258, Hoechst 33342, Picogreen and Sybr Green I were investigated. From this study, only Picogreen was most effective to separate minimum signal from maximum signal with the Z′ value above 0.4. Optimal DNA concentration to be used in Picogreen-based assay should be in range of 50-1000 ng/ml to obtain the Z′ value above 0.4. The time-course study of topoisomerase I activity using Picogreen was performed to compare between gel-based assay and fluorescence microplate assay. The study suggested that the fluorescence microplate assay was more sensitive than gel-based assay. The utility of our assay was comfirmed by mearsuring the effect of known topoisomerase I inhibitors (camptothecin, heparin, quercetin and menadione) and topoisomerase II inhibitors (etoposide and ellipticine). The IC_{50} values of topoisomerase I inhibitors from fluorescence method were comparable to that from gel-based method, even though the previous assay were higher IC_{50} value. However, it could not measure the IC_{50} value of quercetin because of an interference of the fluorescence intensity of Picogreen by quercetin. In this study, ellipticine, an intercalative topoisomerase II inhibitors exhibited inhibitory effect on topoisomerase I was 100% at 20 μM and it also interfere the fluorescence intensity of Picogreen. Tweleve unknown compounds were selected to screen by both assays. From gel-based assay, chelerythrine, sanguinarine, oxostephanine and fagarine could inhibit topoisomerase I at concentration of 50 μM for 41.1±18.9%, 47.7±9.01%, 84.3±23.4% and 106±8.5%, respectively. The limitation of fluorescence microplate assay was inability to detect intercalating agents such as chelerythrine and sanguinarine. In conclusion, we could develop a rapid assay for topoisomerase I inhibitors using Picogreen as fluorescent probes. If the compounds have DNA binding properties, gel-based assay should be used instead of the fluorescence microplate assay.

Department:.....Biochemistry..... Student's Signature:.....Pratchaya Jetinai

Field of Study:..Biomedicinal Chemistry... Advisor's Signature:.....Thitima Pengsuparp

Academic Year: 2007..... Co-advisor's Signature:.....Boonsri Ongpipattanakul

ACKNOWLEDGEMENTS

My sincere thanks to my advisor, Associate Professor Thitima Pengsuparp and my co-advisor, Assistant Professor Boonsri Ongpipattanakul, from the very first day of my study in Biomedicinal Chemistry program have given me the advices, supervision, encouragement throughout this study.

I am very much oblige and honored to the members of the Thesis Committee for their supportive attitude, constructive criticisms and for their invaluable discussions over my thesis.

I would like to thank to staffs and graduate students of the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their friendship and help during my work.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv

ABSTRACT (ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....viii

LIST OF FIGURES.....x

LIST OF ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW.....4

III MATERIALS AND METHODS.....13

IV RESULTS.....18

V DISSCUSSION AND CONCLUSION.....48

REFERENCES.....56

APPENDICES.....61

VITA.....72

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Summary of topoisomerase inhibitors.....7

2. Summary of topoisomerase assays.....11

3. List of fluorescence dyes used in this study 14

4. Intraday precision data and Z′ value
from the fluorescent assay validation.....21

5. Interday precision data and Z′ value
from the fluorescent assay validation.....22

6. The Z′ value of assay determined by
Picogreen at different DNA concentrations.....23

7. Comparison of IC_{50} values of topoisomerase I inhibitors
using gel-based and fluorescence microplate assay.....37

8. The % inhibition of unknown compounds
using gel-based assay.....41

9. The fluorescence intensity of dyes in various conditions.....63

10. The fluorescence intensity of supercoiled and relaxed DNA
determined by Picogreen as increasing DNA concentration.....64

11. The band intensity, the fluorescence intensity
and the percentage of relaxtion activity as function of time of incubation ...64

12. The percentage of inhibition of camptothecin 65

13. The percentage of inhibition of heparin 65

14. The band intensity and the fluorescence intensity
as a result of enzyme reaction incubating with quercetin 66

15. The percentage of inhibition of menadione 66

16. The fluorescence intensity of Picogreen as a result of
enzyme reaction incubating with topoisomerase II inhibitors.....67

Table **Page**

17. The fluorescence intensity of Picogreen as a result of enzyme reaction incubating with selected unknown compounds 68

18. The relative fluorescence of Picogreen among stop processes 68

19. The relative fluorescence of Picogreen among various enzyme amounts ...69

20. The fluorescence intensity, the relative fluorescence of Picogreen and the percentage of enzyme activity as function of time of incubation ...69

21. The percentage of inhibition of camptothecin and menadione.....70

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Conceptual framework of this study.....3

2. Fluorescence Effect of buffer and dye concentrations on fluorescence intensity of H 33258 and H 33342.....19

3. Fluorescence Effect of dyes on supercoiled and relaxed plasmid from enzyme reaction (intraday assay).....20

4. The fluorescence intensity of supercoiled and relaxed DNA determined by Picogreen as increasing DNA concentrations.....21

5. Time-course study of enzyme activity by gel based assay.....24

6. Time-course study of enzyme activity compared between gel-based assay and fluorescence microplate assay.....25

7. Correlation analysis between the % relaxation obtained from fluorescence microplate assay and the % relaxation obtained from gel-based assay.....26

8. Agarose-gel electrophoresis of camptothecin in a dose-response manner.....27

9. Camptothecin dose-response curve.....28

10. Correlation analysis of camptothecin inhibitory effect between the % inhibition obtained from fluorescence microplate assay and the % inhibition obtained from gel-based assay.....29

11. Agarose-gel electrophoresis of heparin in a dose-response manner.....30

12. Heparin dose-response curve.....31

13. Correlation analysis of Heparin inhibitory effect between the % inhibition obtained from fluorescence microplate assay and the % inhibition obtained from gel-based assay.....32

14. Agarose-gel electrophoresis of quercetin.....33

15. Histogram of response of quercetin.....34

Figure **Page**

16. Agarose-gel electrophoresis of menadione in a dose-response manner.....35

17. Menadione dose-response curve.....36

18. Correlation analysis of camptothecin inhibitory effect between the % inhibition obtained from fluorescence microplate assay and the % inhibition obtained from gel-based assay.....37

19. Agarose-gel electrophoresis of topoisomerase II inhibitor, etoposide and ellipticine.....38

20. Histogram of response of topoisomerase II inhibitors showing fluorescence intensity obtained from fluorescence microplate assay.....39

21. Agarose-gel electrophoresis of unknown compounds At concentration of 50 and 100 μM.....40

22. Histogram of response unknown compounds of showing fluorescence intensity obtained from fluorescence microplate assay.....42

23. Relative fluorescence of Picogreen compared between 3 stopped processes.....43

24. Effect of topoisomerase I amount on Relative fluorescence of Picogreen....44

25. Time-course study using fluorescence ratio assay.....45

26. Dose-response curve obtained form fluorescence ratio assay.....47

LIST OF ABBREVIATIONS

BSA	bovine serum albumin
cm	centrimetre (s)
CV	the coefficient of variation
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
g	gram (s)
hr	hour
HCl	hydrochloride
IC_{50}	median inhibitory concentration
mg	milligram (s)
µg	microgram (s)
µl	microlitre (s)
min	minute (s)
mM	millimolar
NaCl	sodium chloride
ND	Not determined
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
rel	relaxed DNA
sc	supercoiled DNA
SEM	standard error of mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBE	Tris borate EDTA buffer

TE	Tris EDTA buffer
TEN	Tris EDTA NaCl buffer
UV	ultraviolet
V	volt
v/v	volume by volume
w/v	weight by volume
%	percentage