ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41015

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแอคติโนไมซีทที่แยกได้จากดินและเกิดขึ้นเองกับกระบวนการย่อยสลาย

นางสาววันเพ็ญ ทองขุนนท

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b00255404

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41015

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ที่มีเมทิลเลชันที่ฉีกขาดและเกิดขึ้นเองกับกระบวนการซ่อมแซม

นางสาว วันเพ็ญ พลเยี่ยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4 8 7 4 7 8 4 4 3 0

TO STUDY THE ASSOCIATION BETWEEN METHYLATED ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAK AND REPAIR PATHWAY

Miss Wanpen Ponyeam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title	TO STUDY THE ASSOCIATION BETWEEN METHYLATED ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAK AND REPAIR PATHWAY
By	Miss Wanpen Ponyeam
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Medicine

(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... External Member

(Professor Prapon Wilairat, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Montakarn Tansatit, M.D.,Ph.D.)

..... Member

(Oranart Matangkasombut, D.D.S., Ph.D)

วันเพ็ญ พลเยี่ยม : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ที่มีเมทิลเลชันที่ฉีกขาดและเกิดขึ้นเองกับกระบวนการซ่อมแซม (TO STUDY THE ASSOCIATION BETWEEN METHYLATED ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAK AND REPAIR PATHWAY) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 75 หน้า.

E41015

การฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ (DSBs) เกิดขึ้นโดยมีการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอทั้งสองสาย ซึ่งเป็นอันตรายมากต่อเซลล์ โดยในเซลล์ปรกตินั้น DSBs ที่เกิดขึ้นเองในระดับ background level จะเรียกว่า endogenous DSBs (EDSBs) จากงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า EDSBs มักมีสภาวะเมทิลเลชัน มากกว่าระดับปรกติ และการมีหมู่เมทิลที่มากนั้นไม่ได้ขึ้นกับการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ กระบวนการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอสายคู่ที่ฉีกขาดประกอบด้วยกระบวนการหลักอย่างน้อยสามกระบวนการ คือ กระบวนการซ่อมแซมโดยไม่อาศัยลำดับเบสที่เหมือนกัน (NHEJ) ที่ขึ้นกับ ATM กระบวนการ NHEJ ที่ขึ้นกับ DNA-PK และกระบวนการซ่อมแซมโดยอาศัยลำดับเบสที่เหมือนกัน (HR) กระบวนการ NHEJ นั้นจะมีความผิดพลาดในการซ่อมเกิดขึ้นได้จากการที่สายดีเอ็นเอต่อกันโดยตรง ทั้งกระบวนการ NHEJ ที่ขึ้นกับ ATM และ DNA-PK เกิดขึ้นที่ระยะ G0 ของ วัฏจักรเซลล์ส่วนกระบวนการ HR เป็นกระบวนการหลักที่ใช้ในการซ่อมแซมในระยะนี้มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอโดยอาศัยลำดับเบสที่เหมือนกันเป็นต้นแบบในการซ่อมแซม และ มีโปรตีน Rad51 เป็นโปรตีนสำคัญในกระบวนการนี้ โดยทำให้เกิดการแทรกตัวของสายดีเอ็นเอนที่ฉีกขาดเข้าไปยังสายของซิสเตอร์โครมาทิด ในการศึกษาครั้งนี้สนใจการศึกษากระบวนการที่ใช้ในการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอสายคู่ที่ฉีกและเกิดขึ้นเองในสภาวะเมทิลเลชันมากกว่าระดับปรกติ ทำการพิสูจน์สมมติฐานโดยอาศัยเทคนิค siRNA ในการกำจัดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมในแต่ละวิธีออกไป ประกอบด้วย ATM DNA-PKcs Ku86 และ Rad51 ทำการวัดระดับและสภาวะเมทิลเลชันบนสายของดีเอ็นเอที่ฉีกขาด โดยวิธี L1-EDSB-LMPCR และ COBRA-L1-EDSB ตามลำดับ

พบว่าเมื่อทำให้เกิดการลดลงของระดับ DNA-PKcs นั้นจะมีผลทำให้ระดับของ ATM ลดลงตามไปด้วย และจากการระดับเมทิลเลชันบนดีเอ็นเอที่ฉีกขาดนั้นพบว่าในเซลล์ที่ขาด DNA-PKcs มีระดับเมทิลเลชันที่ต่ำกว่าในเซลล์ที่ขาด ATM โดยเฉพาะในระยะ G0 จึงคาดว่ากระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอสายคู่ที่มีเมทิลเลชันที่ฉีกขาดและเกิดขึ้นเองนั้นน่าจะใช้กระบวนการ NHEJ ที่ขึ้นกับ ATM เป็นกระบวนการหลัก ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีความแม่นยำในการซ่อมแซมสูงกว่ากระบวนการ NHEJ ที่ขึ้นกับ DNA-PK ซึ่งอาจทำให้การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ฉีกขาดในส่วนที่มีหมู่เมทิลมีความถูกต้องสูงกว่าในสายดีเอ็นเอที่ฉีกขาดในส่วนที่ไม่มีหมู่เมทิล และจากการศึกษาระดับเมทิลเลชันในเซลล์ขาด Rad51 เทียบกับเซลล์ปรกติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสนับสนุนว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่เพิ่มขึ้นเองเนื่องจากระดับเมทิลเลชันที่ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับการใช้กลไกที่ต่างกันในการซ่อม EDSBs ในบริเวณที่มีหรือไม่มีหมู่เมทิล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

487 47844 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAKS / CHROMOSOMAL INSTABILITY / GLOBAL HYPOMETHYLATION

WANPEN PONYEAM: TO STUDY THE ASSOCIATION BETWEEN METHYLATED ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAK AND REPAIR PATHWAY

THESIS ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D. Ph.D., 75 pp.

E 41015

DNA double-strand breaks (DSBs) are the type of DNA damage that is very harmful to cells. This event occurs when both of DNA strands are damaged. Spontaneous DSBs at the background level are called endogenous DSBs (EDSBs). From previous study, we found that EDSBs are generally hypermethylated and the hypermethylation is replication independent. EDSBs repair pathways are composed of at least three major pathways namely, ATM-dependent non-homologous end joining (NHEJ), DNA-PK-dependent NHEJ and homologous recombination (HR). NHEJ pathway is the cause of error-prone repair since the mechanism of this repair is the direct ligation of DNA ends. Both ATM and DNA-PK dependent NHEJ occur in G0 phase of the cell cycle. HR pathway is the major mechanism in S phase for error-free repair using an undamaged homologous sequence as a template for repair. Rad51, which catalyses the invasion of the broken ends of the DSB into the intact sister chromatid, is the key protein in this pathway. In this study, we aimed to identify which pathways are involved in the repair of hypermethylated EDSBs. We established siRNA technique to reduce the key proteins in each repair pathway, namely ATM, DNA-PKcs, Ku86 and Rad51. To measure the level and methylation of EDSBs in transfected cells, we performed L1-EDSB-LMPCR and COBRA-L1-EDSB, respectively.

Stable transfection of DNA-PKcs siRNA in HeLa cells caused down-regulation not only of DNA-PKcs but also of ATM. EDSB methylation levels of DNA-PKcs siRNA cells are significantly lower than that of ATM siRNA transfected cells, especially in G0 phase, suggesting that the loss of DNA-PKcs compensated the influence of ATM deficiency on the methylation level of accumulated EDSBs. Thus, methylated EDSB is possibly repaired by ATM-dependent NHEJ, which is more precise than DNA-PK-dependent NHEJ. Additionally, there was no different in the level and methylation of EDSBs in Rad51 knock-down cells, indicating that hypermethylation of EDSBs does not depend on DNA replication. This study supports the notion that the increase of spontaneous mutation rate in genomic hypomethylation may be related to how differently the methylated and unmethylated EDSBs are processed.

Field of study Medical Science Student's Signature.....Wanpen Ponyeam.....

Academic year: 2007 Advisor's Signature.....Apiwat Mutirangura.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to all these people who gave me the possibility to complete this thesis. I want to thank the committee of Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work. I am deeply indebted to my advisor Professor Apiwat Mutirangura, for his stimulating guidance and support. I thank my other committee and special members, Associate Professor Wilai Anomasiri, Professor Prapon Wilairat, Assistant Professor Montakarn Tansatit and Doctor Oranat Matungkasombut for their helpful suggestions, edit thesis and insightful comments during my study.

I am so appreciate to these persons, Miss Narisorn, Mr. Wichai, Miss Chotika, Mrs. Kadekunya, Miss Pattamawadee, Mr. Suphakit and for their assistance. If I lacked them, this work would not be accomplished. Finally, I would like to express my deepest gratitude to my family for their love and understanding all the time.

This thesis was partially supported by Affairs Thesis grants for graduate students in Public Universities, Graduate school, Chulalongkorn University.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (THAI)..... IV

ABSTRACT (ENGLISH)..... V

ACKNOWLEDGEMENT..... VI

TABLE OF CONTENTS..... VII

LIST OF FIGURES..... XI

LIST OF ABBREVIATIONS..... X

CHAPTER I: INTRODUCTION 1

Background and Rationale..... ..1

Objectives, Research Questions, Hypotheses, Key Words, Expected Benefit..... 3

Conceptual Framework..... 4

CHAPTER II: REVIEW OF RELATED LITERATURE..... 5

Endogenous DNA Double-strand Breaks (EDSBs)..... 5

EDSB Repair..... 7

I. Homologous recombination..... 8

II. DNA-PK dependent Non-homologous end joining..... 11

III. ATM dependent Non-homologous end joining..... 13

Genomic Instability and Carcinogenesis..... 14

I. Microsatellite Instability and Carcinogenesis..... 14

II. Chromosomal Instability and Carcinogenesis..... 15

DNA Methylation..... 17

Global Hypomethylation..... 18

Global Hypomethylation and Carcinogenesis..... 19

I. Oncogene Activation..... 19

II. Reactivation of Transposable Elements..... 20

The association between Global Hypomethylation and Chromosal Instability..... 21

CHAPTER III: MATERIALS AND METHODS..... 24

Cell culture, Cell Synchronization and siRNA..... 24

High-molecular-weight (HMW) DNA preparation..... 26

L1-EDSB ligation-mediated realtime PCR (L1-EDSB-LMPCR).....26
Bisulfite Treatment.....27
COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB.....27
Western blotting.....29
Statistical Analyses.....30
CHAPTER IV: RESULTS.....33
Ku86 in NHEJ did not prefer to repair methylated EDSBs.....33
ATM dependent NHEJ preferentially repair methylated EDSBs.....36
Hypermethylated EDSBs and HR repair.....39
CHAPTER V: DISSCUSSION.....42
REFERENCES.....45
APPENDICES.....55
BIOGRAPHY.....75

FIGURE PAGE

1. DSB repair via homologous recombination.....10

2. DSB repair via non homologous end-joining.....12

3. Cytosine methylation.....18

4. Schematic Illustration of L1-EDSB-LMLPCR.....32

5. Schematic Illustration of COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB.....32

6. Western Blotting of Ku86 in HeLa cells transfected with siRNA.....34

7. L1-EDSB-LMPCR Quantities in Ku86 defected cells.....34

8. Inhibition of Ku86 did not affect the EDSBs methylation status.....35

9. Western Blotting of DNA-PKcs and ATM in HeLa Cells transfected with siRNA.....37

10. L1-EDSB-LMPCR Quantities in NHEJ defected cells.....37

11. Inhibition of DNA-PKcs Leads to Accumulation of Unmethylated EDSBs while Downregulation of ATM Increases Methylation Level of EDSBs.....38

12. Western Blotting of RAD51 in HeLa Cells Transfected with siRNA.....39

13. L1-EDSB-LMPCR Quantities in HR defected cells with cell Synchronization.....40

14. Inhibition of Rad51 did not affect the EDSBs methylation status.....41

LIST OF ABBREVIATIONS

ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATR	Ataxia telangiectasia related protein
CIN	Chromosomal instability
COBRA	Combined with bisulfite restriction analysis
COBRA-L1	COBRA of L1s
COBRA-L1-EDSB	COBRA of L1-EDSB
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase
DNMTs	DNA methyltransferases
DSBs	DNA double-strand breaks
EDSBs	Endogenous DNA double-strand breaks
HMW	High-molecular-weight
HR	Homologous recombination
IR	Ionizing radiation
IRSPCR	Interspersed repetitive sequence PCR
L1-EDSB-LM-MSP	L1-EDSB-LM methylation specific PCR
L1-EDSB-LMPCR	LINE-1 (L1) human retrotransposons
LINE-1 or L1	Long Interspersed Nuclear Element type 1
LMPCR	Ligation-mediated polymerase chain reaction
LOH	Loss of heterozygosity
MIN	Microsatellite instability
MMR	Mismatch repair
MRN	RAD50–MRE11–NBS1
NHEJ	Non-homologous end-joining
PIKK	PI-3 kinase-like family
RPA	Replication protein A

SCEs	Sister chromatid exchanges
SSDNA	Single-strand DNA
SSBs	Single-strand breaks
SSLs	Single-strand lesions