การศึกษาความสัมพันธ์ของการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นเอง กับระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และวงจรการแบ่งเซลล์

นางสาว นริศร คงรัตนโชค

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3543-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TO STUDY THE ASSOCIATIONS BETWEEN ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAKS, DNA METHYLATION, AND CELL CYCLE

Miss Narisorn Kongruttanachok

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-3543-6

Copyright of Chulalongkorn University

492137

Thesis Title	To study the associations between Endogenous DNA double-strand breaks, DNA methylation, and cell cycle
By	Miss Narisorn Kongruttanachok
Field of Study	Biomedical Sciences
Thesis Advisor	Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

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

..... Member
(Professor Skorn Mongkolsuk, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Virote Sriuranpong, M.D., Ph.D.)

นริศร คงรัตนโชค : การศึกษาความสัมพันธ์ของการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นเอง กับระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันและวงจรการแบ่งเซลล์. (TO STUDY THE ASSOCIATIONS BETWEEN ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAKS, DNA METHYLATION, AND CELL CYCLE) อ. ที่ปรึกษา: ศ.นพ. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 100 หน้า. ISBN 974-14-3543-6.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง การลดระดับเมทิลเลชันทั่วทั้งจีโนม และการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ที่เกิดขึ้นเอง ซึ่งการลดระดับเมทิลเลชันทั่วทั้งจีโนม เป็นสาเหตุหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเกิดมะเร็ง โดยนำไปสู่ความไม่เสถียรของจีโนม สำหรับการขาดเองของดีเอ็นเอมีส่วนสำคัญทำให้เกิดมะเร็ง ถ้าการขาดของดีเอ็นเอนี้เกิดขึ้นหรือซ่อมแซมแบบกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยจะเกิดขึ้น ดังนั้นการลดระดับหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ จะทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนมได้ ถ้าหมู่เมทิลของสายดีเอ็นเอมีอิทธิพลต่อขบวนการของเซลล์ต่อการขาดแบบเกิดขึ้นเอง

ในวิทยานิพนธ์นี้เราพัฒนาเทคโนโลยี เพื่อที่จะวิเคราะห์หมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่ฉีกขาดที่เกิดขึ้นเอง ได้แก่ L1-EDSB-LMPCR และ COBRA-L1-EDSB เพื่อที่จะตรวจวัดปริมาณและหมู่เมทิลของสายดีเอ็นเอ อีกเทคนิคหนึ่งเป็นการตรวจดีเอ็นเอที่จับกับแกมม่าเอชทูเอเอ็กซ์ ซึ่งเป็นโปรตีนฮีสโตนที่จับกับสายดีเอ็นเอที่ขาดโดยการตอบสนองของเซลล์ การศึกษาครั้งนี้ต้องการเปรียบเทียบปริมาณและหมู่เมททิลของสายดีเอ็นเอที่ฉีกขาดกับสายดีเอ็นเอที่กำลังถูกซ่อม

เราค้นพบว่า 1. สามารถตรวจพบดีเอ็นเอที่ฉีกขาดที่เกิดขึ้นเองได้เสมอ และมีลักษณะการเติมหมู่เมทิลที่หนาแน่น 2. ระดับของดีเอ็นเอที่ฉีกขาดเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่จับกับแกมม่าเอชทูเอเอ็กซ์ มีลักษณะจำเพาะในแต่ละเซลล์ในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน ในขณะที่เม็ดเลือดขาวมีดีเอ็นเอที่ฉีกขาดมากกว่าเซลล์เยื่อบุผิว แต่กลับพบแกมม่าเอชทูเอเอ็กซ์มากในเซลล์เยื่อบุผิว ท้ายที่สุดเราพบว่าดีเอ็นเอที่ฉีกขาดจะถูกเข้าเฝือกในโครมาตินที่หนาแน่น ส่งผลให้ไม่เกิดการตอบสนองต่อการซ่อมแซมของสายดีเอ็นเอในเซลล์ การใส่ยาไตรโคสเตตินเอที่ยับยั้งฮีสโตนดีอะเซทิลเลท จะทำให้เกิดการคลายตัวของโครมาติน ส่งผลให้ดีเอ็นเอที่ฉีกขาดที่มีหมู่เมทิลหนาแน่นถูกปลดปล่อย ทำให้ปริมาณและความหนาแน่นของหมู่เมทิลของดีเอ็นเอที่จับแกมม่าเอชทูเอเอ็กซ์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการลดลงของหมู่เมทิลของสายดีเอ็นเอจะเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์ ถ้าการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ไม่มีหมู่เมทิลที่ฉีกขาดเอง มีความคลาดเคลื่อนง่าย

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

#458 96628 20 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES

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

NARISORN KONGRUTTANACHOK: TO STUDY THE ASSOCIATIONS BETWEEN ENDOGENOUS DNA DOUBLE-STRAND BREAKS, DNA METHYLATION, AND CELL CYCLE. THESIS ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., 100 pp. ISBN 974-14-3543 -6.

This study aimed to evaluate the association between global hypomethylation and endogenous DSBs (EDSBs). Global hypomethylation is one of the most common molecular events in the multistep carcinogenesis. This process leads to genomic instability. EDSBs could account for a substantial fraction of oncogenic events in human carcinomas If EDSBs do not arise uniformly or are not processed at equal rates across the genome; mutation hot spots should be present. Therefore, genome wide methylation depletion may cause genomic instability if DNA methylation influences EDSB processes.

In this thesis, we first developed a set of novel techniques to analyze the extent and methylation level of genomic EDSBs. The first is L1-EDSB-LMPCR and COBRA-L1-EDSB to quantitate level and methylation of EDSBs. The other is chromatin immunoprecipitating γ-H2AX, one of the earliest DSB repair responses. Then we evaluated the relation between quantity and methylation of EDSBs and the cellular DSB repair response.

Our study discovered first endogenous DNA breakages are universally detectable and are hypermethylated. Second, the levels of EDSBs and γ-H2AX-bound DNA are cell type specific and inversely related. Whereas WBCs possessed more L1-EDSB-LMPCR than did epithelial cells, epithelial had more γ-H2AX-bound L1s than WBCs. Finally, the EDSBs are concealed in heterochromatin, which obstructs the early cellular DSB repair response. Trichostatin A treatment, which inhibits histone deacetylase and disrupts heterochromatin, released methylated EDSBs and increased the quantity and methylation level of γ-H2AX-bound DNA. DNA hypomethylation can therefore be linked to a high mutation rate if the early repair response of unmethylated EDSBs is error prone.

Field of Study: Biomedical sciences

Academic Year: 2006

Student's Signature: Narisorn Kongruttanachok

Advisor's Signature: Apiwat Mutirangura

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis is by far the most significant scientific accomplishment in my life and it would be impossible without people who supported me. If your name is not listed, rest assured that my gratitude is not less than for those listed below.

Most of all, I wish to express my gratitude to my advisor, Professor Apiwat Mutirangura. He is not only a great scientist with deep vision but also a kind person. His trust and scientific excitement inspired me in the most important moments of making right decisions and I am glad to work with him. I could not have imagined having a better advisor and mentor for my Ph.D. study. Without his knowledge, discernment and cracking of the whip, I would never have finished. Besides of being an excellent advisor, He has been as close as a relative and a good parent to me.

I would like to express my appreciation to Assistant Professor Virote Sriuranpong, whose suggestions led me throughout this thesis. He has always been willing to answer my questions.

I wish to express my sincere thanks to Associate Professor Wilai Anomasiri for helping me get through the difficult times and encouragement. I am also very grateful to Assistant Professor Montakarn Tansatit for the kindness, generous and spiritual support.

The acknowledgement would not be completed without the mention of my colleague. This thesis could not have been accomplished without him. I would especially like to thank Mr. Wichai Pornthanakasam for cooperation during this research.

My special thanks to Miss Wanpen Ponyeam for her assistance and her friendship. I am also thankful to Miss Pattamawadee Yanatatsanajit, Mr. Supakit Kowudtitham and Miss Nusara Hourpai for the companionship and the emotional support.

I sincerely thank Dr. Keskanya Subbalekha, Miss Chotika Suyarnsestakorn and Dr. Amornpun Sereemaspun for looking at and editing this thesis for English style and grammar, correcting both of them and offering suggestions for improvement. Additionally, they have been my good friends.

I take this opportunity to express the profound gratitude from my deep heart to my beloved parents, my sisters, and brothers for their love and continuous support.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	iv
ABSTRACT (ENGLISH)	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF FIGURES	viii
LIST OF ABBREVIATIONS	x
CHAPTER	
I. INTRODUCTION	1
II. REVIEW OF RELATED LITERATURE	12
III. MATERIALS AND METHODS	29
IV. RESULTS	37
V. DISCUSSION	63
REFERENCES	66
APPENDIX	74
BIOGRAPHY	100

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	DSB repair via non homologous end-joining.	22
2.	DSB repair via homologous recombination.	25
3.	Alignment of H2A and H2AX C-terminal sequences downstream of the histone fold from the indicated organisms.	28
4.	Schematic illustration of L1-EDSB-LMPCR.	38
5.	An example of results of L1-EDSB-LMPCR by using realtime PCR.	39
6.	Intra- and inter-assay variations of L1-EDSB-LMPCR.	40
7.	L1-EDSB-LMPCR quantity in relation to % fragmented cells, documented by flow cytometry.	40
8.	L1-EDSB-LMPCR quantities in several cell types by using different direction of L1 primers.	41
9.	L1-EDSB-LMPCR quantities in several cancer cells and normal cells including sperm cell and white blood cells (WBCs) from several individuals.	42
10.	Schematic illustration of COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB.	44
11	A typical example of result from COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB experiments.	45
12.	Intra- and inter-assay variations of COBRA-L1 (L1) and COBRA-L1-EDSB (L1-EDSB).	46
13.	COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB comparison among cell types.	47
14.	Schematic illustration of L1-EDSB-LM-MSP	49
15.	An example of results of EDSB hot spots from L1-EDSB-LM-MSP.	50
16.	Percentage of methylation level in several cell lines from COBRA-L1, COBRA-L1-EDSB and L1-EDSB-LM-MSP.	51
17.	L1-EDSB-LMPCR quantities of HeLa cells in G0, G1/S at 0 h, and S phases at 3, and 5 h after the release into S phase from thymidine block, respectively.	53

18.	COBRA-L1 and COBRA-L1-EDSB levels of HeLa cells in several cell cycles.	54
19.	Level of γ-H2AX-bound DNA in HeLa cells after exposure to different doses of γ-radiation.	57
20.	Level of γ-H2AX-bound DNA in several cell types and during cell cycles.	58
21.	Methylation levels of different cell types and in different phases of the cell cycle.	59
22.	Western blots.	60
23.	Quantity of L1-EDSB-LMPCR in HeLa cells after TSA treatment.	61
24.	Level of γ-H2AX-bound DNA in HeLa cells after TSA treatment.	61
25.	Comparative EDSB methylation levels of γ-H2AX-bound DNA, L1s, and EDSBs between mock and TSA.	62
26.	EDSBs are hypermethylated; methylated EDSBs are retained in heterochromatin while unmethylated EDSBs undergo less-precise repair.	65

LIST OF ABBREVIATIONS

γ-H2AX	phosphorylation of histone
5-azadC	5-aza-2-deoxycytidine
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATR	Ataxia telangiectasia related protein
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
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
HDAC	Histone deacetylase
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
TSA	Trichostatin A
WBCs	White blood cells