MOLECULAR ANALYSIS OF PLANT PROTEINS THAT ARE INVOLVED IN THE REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING

CHOTIKA SMATHAJITT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-4448-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการถอดรหัสของยีนที่ไม่แสดงออกในพืชที่ผ่านการถ่ายยีน (MOLECULAR ANALYSIS OF PLANT PROTEINS THAT ARE INVOLVED IN THE REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING)

โชติกา สมรรถจิตต์ 4236957 SCBT/M

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จรัญญา ฉรงคะชวนะ, D.Agr.Sc.,
ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์ Ph.D.

บทคัดย่อ

พืชมีกลไกที่ซับซ้อนในการควบคุมการแสดงออกของยีน กลไกหนึ่งที่มีความสำคัญคือการควบคุมที่ระดับการถอดรหัสของยีน ถึงแม้ว่าการศึกษาการแสดงออกของยีนในระดับชีววิทยาโมเลกุลนั้นจะมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง แต่กระบวนการในการควบคุมระดับการแสดงออกของยีนก็ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โปรตีนชนิดหนึ่งที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ระดับการถอดรหัสคือ MOM1 เป็นที่น่าสนใจว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนโดย MOM1 นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นรวมไปถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่โปรตีนฮีสโตน จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า MOM1 มีแนวโน้มที่จะทำงานร่วมกับโปรตีนอื่นๆ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาบทบาทของโปรตีนที่มีส่วนควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับกระบวนการถอดรหัสร่วมกับ MOM1 จากการศึกษาโดย yeast two-hybrid system พบโปรตีนหลายชนิดที่อาจมีส่วน ในการควบคุมการแสดงออกของยีนร่วมกับ MOM1 ผู้ทำการวิจัยได้ทำการวิเคราะห์ยีนสองชนิดอย่างลึกซึ้ง คือ *SWI3A* และ *DAD1* จากการวิเคราะห์พืชที่มีมิวเตชั่นที่ยีน *SWI3A* หรือ *DAD1* พบว่ายีนทั้งสองชนิดมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เพราะพืชไม่สามารถมีชีวิตรอดได้หากพืชนั้นมีโฮโมไซกัสมิวเทชั่น จากผลการวิจัยสามารถกล่าวได้ว่า โปรตีนทั้งสองชนิดนั้นสามารถสร้าง complex กับ MOM1 อย่างไรก็ดีความสำคัญและหน้าที่ของโปรตีนทั้งสองชนิดยังจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป ผลการทดลองที่ได้นี้จะนำไปสู่ความเข้าใจในพื้นฐานของกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนในระดับ epigenetic ในพืช

147 หน้า ISBN 974-04-4448-2

MOLECULAR ANALYSIS OF PLANT PROTEINS THAT ARE INVOLVED IN THE REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING

CHOTIKA SMATHAJITT 4236957 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc. M.R. JISNUSON SVASTI, Ph.D. CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D. PRAMVADEE Y. WONGSAENGCHANTRA, Ph.D.

ABSTRACT

Metastable silencing and activation of gene transcription crucial for differentiation and environmental adaptation in multicellular eukaryotes are controlled by complex epigenetic mechanisms. Although the exact molecular mechanisms underlying epigenetic modifications are not yet known, they involve complex interplays between DNA methylation, chromatin remodeling, and histone modifications. Transcriptional gene silencing (TGS) is an example of epigenetic gene regulation.

This work aimed to study the role of proteins that are involved in maintenance of TGS. Previous study isolated the TGS regulator required for its maintenance in *Arabidopsis*, MOM1 (Morpheus' Molecule1), which seems to function independent of DNA methylation changes. The amino acid sequence analysis reveals two domains with homologies to the half-helicases of SWI2/SNF2 ATPase and chicken tensin, respectively. This raises the possibilities of complex formation between MOM1 and yet unidentified partners. We identified MOM1 interacting partners by yeast two-hybrid screening of *Arabidopsis* cDNA expression library using MOM1 regions covering both conserved domains as baits. We examined two candidates, *SWI3A* and *DAD1* in detail. SWI3A is a subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. DAD1 is an unknown protein with homology to proteins in other organisms across the kingdoms. We showed that both proteins play an essential role in *Arabidopsis* since homozygous mutant plants for each insertion were lethal. The specific interaction between MOM1 and DAD1 was further confirmed by *in vitro* pull-down assay. The functional relationship between MOM1 and the candidates was studied by the assessment of the release of TGS in lines carrying T-DNA insertions in the genes in question. Furthermore DNA methylation status and nuclear architecture were examined in these mutant lines. Currently, we can conclude that the two proteins interact with MOM1 and that both have functional importance during early development in *Arabidopsis*. The relevance of the two proteins in TGS requires further investigations using conditional mutant strains which are currently being constructed.

This investigation into proteins involved in TGS may provide important basic knowledge of the underlying the control of epigenetic regulation in plants.

KEY WORDS: GENE SILENCING/ DNA METHYLATION/CHROMATIN REMODELLING/MOM1
147P ISBN 974-04-4448-2