PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ENZYMES INVOLVED IN DNA METHYLATION FROM RICE

PALIKA KANJANAVECHAKUL

With ... ...ds
of

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

Copyright by Mahidol University

TH
P162P
1995

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขบวนการเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในข้าว

ผู้วิจัย พาลิกา กาญจนเวชกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

จรัญญา ณรงคะชวนะ, D Agr Sc

ม ร ว ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, Ph D

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, Ph D

วันที่สำเร็จการศึกษา 21 สิงหาคม พ ศ 2538

บทคัดย่อ

กลไกการทำงานของขบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชั่น เป็นกลไกหนึ่งซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต พบได้ทั้งในแบคทีเรีย, สัตว์ และพืช ขบวนการเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอ เกิดขึ้นโดยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส [DNA methyltransferase, DNA MTase] ซึ่งมีหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิล [methyl group] จาก methyl donor [S-adenosyl-L-methionine, SAM] ไปยังตำแหน่งจำเพาะของดีเอ็นเอเบส ปัจจุบันขบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืชเริ่มมีการศึกษากันมากขึ้น แต่ก็ยังมีการศึกษาไม่กว้างนักเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย, และเซลล์สัตว์ ได้มีรายงานการค้นพบบทบาทต่างๆของขบวนการนี้ในพืช แต่ในแง่ของเอนไซม์ในขบวนการเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืชยังมีการศึกษาน้อยมาก การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสโดยใช้ข้าวพันธุ์กข 23 เป็นโมเดล ทำการแยกสกัดเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พร้อมทั้งศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ เพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทการทำงานและการควบคุมกลไกเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืชได้ดียิ่งขึ้น

การวิจัยนี้เริ่มจากการศึกษาวิธีสกัดเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสให้บริสุทธิ์ โดยการแยกสกัดจากส่วนต่างๆ ของข้าว พบว่าเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสจากยอดอ่อนของข้าว [rice shoot] มี specific activity ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนรากข้าว และสูงกว่าในส่วนใบและรากข้าวจากต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ค่า enzyme activity มากที่สุดที่อายุการงอกของข้าว 10 วัน ฉะนั้นยอดอ่อนของข้าวจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการศึกษาเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส ขั้นต่อไปจึงได้ทำการแยกสกัดเอนไซม์จาก crude homogenate และ nuclei ที่เตรียมจากส่วนยอดข้าวที่มีอายุการงอก 10 วัน ผ่านขบวนการทางชีวเคมีวิเคราะห์คือ ion exchange chromatography, gel filtration และ affinity chromatography สำหรับ crude homogenate เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสที่แยกได้มีค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น [purification fold] 17 เท่า ในขณะที่เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสที่สกัดได้จากส่วน nuclei เมื่อผ่านขบวนการชีวเคมีวิเคราะห์ salt extraction, ion exchange chromatography และ affinity chromatography สามารถเพิ่มค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์มากถึง 41 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับnuclei และ 706 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ crude homogenate จากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE, native-PAGE และ western blotting ด้วยแอนติบอดีของเอนไซม์นี้จากข้าวสาลี ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสในข้าวประกอบด้วย subunit ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa มากกว่า 1 subunit และมีน้ำหนักโมเลกุลโดยรวมประมาณ 130

kDa ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสคือ pH 7 6 โดยอุณหภูมิที่ให้ activity สูงสุดคือ 25 ^{o}C แต่อย่างไรก็ตาม แม้อุณหภูมิตลอดทำการทดลองจะถูกควบคุมที่ 4 ^{o}C เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสยังคงมีการเสีย activity อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง การเก็บรักษาเอนไซม์นี้ไว้ในที่อุณหภูมิต่ำถึง -80 ^{o}C ก็ยังพบการลดลงของactivity พบว่า glycerol และ dithiothreitol สามารถช่วยรักษา activity ของเอนไซม์ไว้ได้ แต่ protease inhibitor (pepstatin A, leupeptin, chymostatin) และ preservative agent (sucrose, PEG) ไม่สามารถช่วยรักษา activity ของเอนไซม์ จากการศึกษา enzyme kinetic พบว่า ค่า Km ของเอนไซม์นี้ต่อ salmon testis DNA เท่ากับ 50 µg/ml เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีเมื่อใช้ substrate เป็น cytosine un-methylated DNA ที่เตรียมจากแบคทีเรีย และ hemimethylated DNA ที่เตรียมจากข้าว แสดงว่าสามารถทำงานได้ทั้งในลักษณะ maintenance และ *de novo* methylation การทำงานของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้ในสภาวะที่มีเกลือต่างๆ เช่น NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, tricationic amine และ tetracationic amine อีกด้วย ตัวยับยั้งอื่นที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส คือ สารที่มีโครงสร้างคล้าย methyl donor [substrate analog] ซึ่งได้แก่ S-adenosylhomocysteine และ ethionine ส่วน demethylating agent (5-azacytosine) และ phytohormone (N^{6}-benzyladenine) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้เช่นกัน

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Purification and characterization of enzymes involved in DNA methylation from rice

Name Palika Kanjanavechakul

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Supervisory Committee

Jarunya Narangajavana, D.Agr.Sc

MR. Jisnuson Svasti, Ph D

Saovanee Dharmsthiti, Ph.D.

Date of Graduation 21 August B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

DNA methylation is a specific post-replicative modification of DNA involving the covalent attachment of methyl groups to certain major bases by enzymatic action *in vivo* This phenomenon is catalyzed by the enzyme DNA methyltransferase (DNA MTase) which transfers methyl groups from S-adenosyl-L-methionine (methyl donor) to the specific DNA bases. DNA methylation has long been postulated as one possible mechanism of regulation of gene expression, genome imprinting and epigenetic defect in eukaryotes. Understanding the biosynthesis and functions of methylated DNA base in plant DNA requires knowledges on the structure and specificity of DNA MTase However, these enzymes have been difficult to purify and characterize for many years, and most previous studies have dealt with rather few DNA MTase isolated from mammalian cells On the contrary, there is a distinct lack of information about the enzymology of DNA methylation in plants. In this research, we have attempted to purify and characterize the enzyme DNA MTase from rice (*Oryza sativa* ssp. Indica cv RD 23).

Copyright by Mahidol University

DNA MTase activity has been observed in nuclei from hydroponically grown-rice shoot A crude homogenate was further purified for DNA MTase by ion exchange chromatography, gel filtration chromatography and affinity chromatography, respectively The purification fold was 17 In parallel, nuclear DNA MTase was extracted from nuclei by salt extraction and subsequently purified by ion exchange and affinity column chromatography The purified enzyme has specific activity increase about 41 folds as compared to those of the nuclei preparation and 706 folds when compared to the crude homogenate. The single band of DNA MTase has a molecular mass of 130 kDa using native-PAGE and that of 55 kDa by SDS-PAGE It should be noted that the purified enzyme can be recognized by the wheat DNA MTase antibody using western blot technique. The optimum assay condition was studied using ^{3}H-S-adenosyl-L-methionine as a methyl donor. The optimum pH for enzyme activity is 7.6 and its optimum temperature is 25 °C DNA MTase activity was found to be maximum in 10-days old rice shoots, than in mature leaves or roots, and its activity gradually decreased after 10 days germination The purified enzyme rapidly loses activity within 24 h even if stored at 4 °C in buffer containing specific protease inhibitors (pepstatin A, leupeptin and chymostatin) and several preservative agents (sucrose, PEG) The apparent Km value for salmon testis DNA substrate was 50 μg/ml. The efficient methylation of both bacterial cytosine un-methylated DNA and rice hemimethylated DNA indicated that rice DNA MTase can function in maintenance and *de novo* methylation. The enzyme activity was strongly inhibited by NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, tricationic amine (spermidine) and tetracationic amine (spermine). Moreover, other aspects of this enzyme was to be inhibited by S-adenosylhomocysteine and DL-ethionine which are methyl donor analogs. DNA MTase is also strongly affected by DNA base analogs such as N^6-benzyladenine and 5-azacytosine.

Copyright by Mahidol University