

สุเมธ อัมสุนทรรักษา : การแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนแมวในระยะก่อนฝังตัวที่เกิดจากการย้ายฝากนิวเคลียส (EXPRESSION OF GENES CRUCIAL FOR PREIMPLANTATION OF FELINE EMBRYOS DEVELOPMENT AFTER NUCLEAR TRANSFER) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 126 หน้า.

ปัจจุบันสัตว์ตระกูลแมวป่าถึง 36 ชนิด กำลังอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ ซึ่งเทคโนโลยีการช่วยการเจริญพันธุ์พื้นฐาน ไม่สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ในกลุ่มใกล้สูญพันธุ์ได้ เนื่องจากขาดแคลนตัวสัตว์ที่จะใช้นำมาเข้ากระบวนการผสมพันธุ์ ดังนั้นเทคโนโลยีการโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรก เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งในหลอดทดลอง จากผลการทดลองพบว่า น้ำยาที่นำมาใช้เลี้ยงไข่ระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง โดยไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา Emcare ให้อัตราการเจริญสู่ระยะblastocyst สูงกว่าไข่ที่เลี้ยงในน้ำยา 199H (33.3% และ 18.1% ตามลำดับ) การเลี้ยงตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งแบบ ไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนของแมวบ้าน ให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนไม่แตกต่างกัน (44.4% และ 38.0% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ด้วยไข่แมวบ้านหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูล่า ทั้งการเลี้ยงแบบ ไม่เลี้ยงร่วม หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนของแมวบ้าน (28.6% และ 32.6% ตามลำดับ) จากการใช้ไข่ของแมวบ้านและโค เป็นไซโตพลาสซึมสำหรับการทำโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ในสัตว์ตระกูลแมวพบว่า ตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งและตัวอ่อนโคโคลนนิ่ง มีอัตราการเจริญสู่ระยะblastocyst สูงกว่า ตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ด้วยไข่โค (34.4% กับ 29.6% และ 8.6% ตามลำดับ) และยังพบว่าตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ด้วยไข่โคหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะมอรูล่า (15.2%) จากการทดลองแรกสามารถสรุปได้ว่า น้ำยาที่ใช้เลี้ยงไข่ระหว่างกระบวนการทำโคลนนิ่งมีผลต่อการเจริญสู่ระยะblastocyst ของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อย่างไรก็ตามการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนไข่ไม่สามารถช่วยสนับสนุนให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง อีกทั้งยังพบว่าไข่ของแมวบ้านและโคสามารถช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ได้ถึงในระยะแรกของการพัฒนาตัวอ่อนเท่านั้น การทดลองที่สองเป็นศึกษาการแสดงออกของยีนที่เชื่อว่ามีผลต่อกระบวนการ nuclear reprogramming (Oct4 DNMT1 DNMT3a DNMT3b HAT1 และ HDAC1) ในตัวอ่อนแมวบ้านโคลนนิ่ง ตัวอ่อนแมวขาว และแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ด้วยไข่แมวบ้าน จากการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน Oct4 และ HAT1 ในตัวอ่อนแมวบ้าน

โคลนนิ่ง และเมื่อดาวโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ มีรูปแบบการแสดงออกคล้ายกับตัวอ่อนแมวบ้านที่เกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโตมีการแสดงออกของ Oct4 และ HAT1 mRNA ต่ำ จนกระทั่งถึงระยะ 8 เซลล์ และค่อยๆแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งแสดงออกสูงที่สุดในระยะบลาสโตซิสต์ ในทางตรงกันข้ามพบว่าตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์มีการแสดงออกของยีน Oct4 และ HAT1 ต่ำตลอดระยะของการเจริญเติบโต จนถึงระยะมอรูล่า และไม่พบการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในตัวอ่อนแมวลายหินอ่อนโคลนนิ่งข้ามสายพันธุ์ การศึกษาการแสดงออกของยีน HDAC1 ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่ง พบว่ามีความแปรปรวนสูง และมีรูปแบบการแสดงออกที่ต่างไปกับตัวอ่อน IVF ส่วนระดับการแสดงออกของยีน DNMT1 มีรูปแบบการแสดงออกที่ลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะ 2 เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่สูงกว่าตัวอ่อน IVF ตั้งแต่ระยะมอรูล่าจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ จากการศึกษาพบว่าตัวอ่อน IVF มีการแสดงออกของ DNMT3a ต่ำที่สุดที่ระยะ 4 เซลล์ แล้วค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งต่างกับตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวโคลนนิ่งที่ในระยะ 4 เซลล์ ยังมีการแสดงออกสูงกว่าตัวอ่อน IVF จากนั้นค่อยๆลดลงจนถึงระยะมอรูล่า และแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ บลาสโตซิสต์ รูปแบบการแสดงออกของยีน DNMT3b ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมว ทั้ง IVF และโคลนนิ่ง มีความคล้ายคลึงกัน โดยมีการแสดงออกต่ำมากในระยะ 4 เซลล์จนถึงระยะมอรูล่า จากนั้นมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน Oct4 ในตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวมีผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอ่อนสัตว์ตระกูลแมวที่เกิดจากการทำโคลนนิ่งมีการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) และการเติมหมู่อะซิetylบนโปรตีนฮิสโตน (histone acetylation) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจเกิดกระบวนการ nuclear reprogramming ที่ไม่สมบูรณ์ ของเซลล์ต้นแบบในการทำโคลนนิ่งในสัตว์ตระกูลแมว จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจถึงรูปแบบของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ reprogramming ในสัตว์ตระกูลแมว ซึ่งจะสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุง และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำโคลนนิ่งสัตว์ตระกูลแมวใกล้สูญพันธุ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

SUMETH IMSOONTHORNRUKSA : EXPRESSION OF GENES
CRUCIAL FOR PREIMPLANTATION OF FELINE EMBRYOS
DEVELOPMENT AFTER NUCLEAR TRANSFER. THESIS ADVISOR :
ASST. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 126 PP.

INTERSPECIES CLONING/FELINE EMBRYO/GENE EXPRESSION /NUCLEAR REPROGRAMMING

There are, in fact, 36 of 37 species of felid family classified as being threatened or endangered. The conventional assisted reproduction technique (ART) is inappropriate for producing endangered felid species, due to the lack of animals for breeding program. Interspecies cloning is a novel technology that may serve as a valuable model for study *in vitro* and *in vivo* development of cloned felid embryos. Two experiments were carried out in this research.

The first experiment aimed to investigate the *in vitro* development of cloned felid embryos. The results of this experiment indicated that the manipulation medium had an effect on the development rate of cloned domestic cat embryos. The Emcare holding medium gave significantly greater blastocyst formation than that of 199H (37.3 vs 21.9%, respectively). There was no significant difference between the developments to blastocyst stage of non co-culture (44.4%) and co-culture (38.0%) of the cloned domestic cat embryos with domestic cat oviductal epithelium cells. Moreover, the non co-culture and co-culture systems could not support the development of interspecies cloned marbled cat embryo beyond morula stage (28.6 vs 32.6%, respectively). The development to blastocyst stage of intraspecies of cloned

domestic cat (39.8%) and bovine (30.9%) was higher than that of interspecies cloned marbled cat with bovine oocytes (9.2%). The interspecies cloned domestic cat with bovine oocytes arrested development at morula stage (16.6%). These results demonstrated that the manipulation medium during the cloning process involved in the increased development to blastocyst stage of cloned felid embryos. However, the co - culture system of cloned felid embryos was not beneficial to the development. The domestic cat and bovine oocytes could support mitotic cleavage of felid nuclei only in the early stage of development.

In the second experiment, the transcription levels of genes believed to be crucial for nuclear reprogramming (Oct4, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HAT1 and HDAC1) were investigated in cloned felid species, domestic, leopard and marbled cats. The results showed that transcription levels of Oct4 and HAT1 were low at an early development stage and dramatically increased at 8-cell to blastocyst stage in cloned domestic and leopard cats and IVF derived embryos. In contrast, transcription levels of Oct4 and HAT1 in interspecies cloned marbled cat embryos were low throughout the development up to the morula stage. Moreover, the interspecies cloned marbled cat embryos with low transcription level of Oct4 and HAT1 could not develop into blastocyst. The development was arrested at the morula stage. The transcription levels of HDAC1 of cloned felid embryos had altered an expression pattern compared to IVF derived embryos. The DNMT1 transcript levels dramatically decreased throughout development of felid embryos. Cloned felid embryos showed higher transcript of the DNMT1 gene than IVF derived embryos. For mRNA level of DNMT3a, it was found that IVF derived embryos rarely had any transcript at 4- to 8-cell stages and increased at morula up to blastocyst stage whereas the transcription

levels decreased in an early development and increased again at the blastocyst stage of cloned felid embryos. The level of DNMT3b mRNA decreased from 2-cell to morula stages but became remarkably high at blastocyst stage. The results of the second experiment clearly demonstrated that Oct4 mRNA transcription levels in felid embryos had some effect on the *in vitro* development efficiency particularly at the blastocyst stage. The cloned felid embryos showed aberrant level of genes involved in DNA methylation and histone hypoacetylation. The results suggested that incomplete nuclear reprogramming of felid donor nuclei occur in cloned felid embryos. This research indicated that genome reprogramming in the felid species was abnormal which may not be enough for the establishment of embryonic totipotence. The nuclear transfer technique of felid species needs improvement, especially in the genome reprogramming to improve the efficiency of cloned felid embryos for the conservation of endangered felid species.

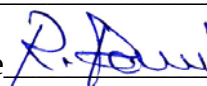
School of Biotechnonology

Academic Year 2008

Student's Signature



Advisor's Signature



Co-advisor's Signature

