ชุติ เหล่าธรรมธร : การผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงวอกดัดแปลงพันธุกรรมจากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (Establishment of embryonic stem cell lines from transgenic rhesus monkey blastocyst) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 145 หน้า

การย้ายฝากนิวเคลียสโดยใช้เซลล์ร่างกายในสัตว์ตระกูลลิง เป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการทำโคลนนิ่งเพื่อการรักษาโรค การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงโดยการแยกเซลล์ ICM โดยวิธีกลจากตัวอ่อนปกติ ดัดแปลงพันธุกรรม และโคลนนิ่ง การศึกษาอายุของลิงต่อผลของการเก็บไข่พบว่า ลิงอายุ 5 ถึง 8 ปีจะให้ไข่ระยะ GV และ MII ปริมาณมากกว่าลิงอายุ 9 ถึง 15 ปี ไข่ระยะ MII จะถูกนำมากระตุ้นด้วย 5 μM Ionomycin และเลี้ยงในน้ำยาที่มี 6-DMAP นาน 4 ชั่วโมง (PA-4) หรือ 5 ชั่วโมง (PA-5) เพื่อตรวจสอบวิธีการกระตุ้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ผลการทดลองพบว่า PA-5 ช่วยสนับสนุนกระบวนการย้อนกลับของเซลล์ร่างกายและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งได้ดีกว่า PA-4 ดังนั้นการทดลองต่อมาจึงกระตุ้นตัวอ่อนโคลนนิ่งด้วยวิธี PA-5 การศึกษาประสิทธิภาพของการแยกเซลล์ ICM ด้วยวิธีการตัดเซลล์ตัวอ่อนบางส่วนออกหรือการเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบนั้นได้ทำการศึกษาจากตัวอ่อนดัดแปลงพันธุกรรมที่มีโรค Huntington (ICSI-HD) Alzheimer (ICSI-AD) ตัวอ่อนไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (ICSI-WT) ตัวอ่อนโคลนนิ่ง และตัวอ่อนจาก PA-5 เซลล์ต้นกำเนิดจำนวน 12 เซลล์ไลน์ (57.1%) ผลิตจากการตัดเซลล์ตัวอ่อนบางส่วนออก แบ่งเป็น 7 เซลล์ไลน์จาก 14 outgrowth (50%) ที่ผลิตจากเป็นตัวอ่อนที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (ADrES1, ADrES2, ADrES3, YMES15, HDrES1, HDrES2, HDrES3) 2 เซลล์ไลน์จาก 3 outgrowths (66.7%) ที่ผลิตจากตัวอ่อนไม่ดัดแปลงพันธุกรรม (YRES5, YRES6) 2 เซลล์ไลน์จาก 2 outgrowths (100%) ที่ผลิตจากตัวอ่อน PA (PAES1, PAES2) และ 1 เซลล์ไลน์จาก 2 outgrowths (50%) ที่ผลิตจากตัวอ่อนโคลนนิ่ง (NrES1) ขณะที่มีเพียง 1 เซลล์ไลน์จาก 12 (8.3%) outgrowths ผลิตจากการเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ (TrES1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แหล่งที่มาของการผลิตตัวอ่อนไม่มีผลกระทบต่อการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิง การแยกเซลล์ ICM โดยการตัดเซลล์ตัวอ่อนบางส่วนออกมีประสิทธิภาพดีในการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลิงมากกว่าการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนโดยวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนทั้งใบ รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่ผลิตเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนลูกผสมลิง (TrES1) ที่มีโรค HD ของคน และ GFP ในเซลล์ต้นกำเนิด และพบการแสดงออกของ ES cell marker การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด TrES1 ลงในสมองหนู SCID พบว่ามีการเกิดเนื้องอกหลังจากปลูกถ่าย จากการศึกษาการแสดงออกของโรค HD ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน TrES1 ตลอดช่วงการเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์ประสาทในจานเลี้ยงเซลล์พบว่าการแสดงออกของโรค HD มีการพัฒนาตลอดช่วงการเหนี่ยวนำ มีการสะสมของ oligomeric mutant htt และ intranuclear inclusions

(NIs) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากผลการทดลองแสดงว่า TrES1 สามารถใช้เป็นเซลล์ตัวอย่างสำหรับศึกษากระบวนการเกิดโรค HD และสามารถใช้สำหรับการทดสอบยาใหม่ๆ ได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHUTI LAOWTAMMATHRON : ESTABLISHMENT OF EMBRYONIC STEM CELL LINES FROM TRANSGENIC RHESUS MONKEY BLASTOCYST.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 145 PP.

EMBRYONIC STEM CELL/SOMATIC NUCLEAR TRANSFER/INNER CELL MASS/HUNTINGTON DISEASE/RHESUS MONKEY

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) in non-human primates (NHPs) is a powerful technique for therapeutic cloning. Objective of this study was to establish non human primate embryonic stem cells using mechanical isolation of ICM cells from wild type, transgenic and SCNT embryos. Results of this study indicated that age of oocyte donor affects the number of collected oocytes. Monkeys age of 5 to 8 years provide more number of GV and MII stage oocytes than monkey age of 9 to 15 years. The MII oocytes were activated with 5 μM Ionomycin and subsequently incubated in 6-DMAP for either 4h (PA-4) or 5h (PA-5) to access the activation protocol. The result indicated that PA-5 supports the somatic cell reprogramming and embryo development better than PA-4. Therefore, in subsequences experiments, the cloned embryos were activated by PA-5 protocol. To determine the efficiency of ICM isolation by partial dissected embryo or whole embryo culture of NHPs embryos derived from transgenic Huntington (ICSI-HD), Alzheimer (ICSI-AD), non-transgenic (ICSI-WT), SCNT and PA were used as source of embryo. Twelve nhpESC lines were established from 21 partial dissected embryos (57.1%). Among these, 7 nhpESC lines were established from 14 (50%) outgrowths derived transgenic embryos (ADrES1, ADrES2, ADrES3, YMES15, HDrES1, HDrES2, HDrES3), 2 nhpESC lines from 3 (66.7%) outgrowths derived from ICSI embryos (YRES5, YRES6), 2 nhpESC lines from 2 (100%) outgrowths derived from PA embryos (PAES1, PAES2) and1 nhpESC line from 2 (50%) outgrowths derived from SCNT embryos (NrES1). Only

one nhpESC line out of 12 (8.3%) was established from whole embryo cultured (TrES1). These results demonstrated that the source of embryo had no effect on nhpESC establishment. Mechanical isolation of the ICM by partial dissected embryo proved to be an effective way to derive new nhpESC lines rather than whole embryo cultured. TrES1 is the first reported of hybrid cell line of NHPs carrying human genetic disease, HD, and green fluorescent protein (GFP). The expression of ES cell markers was observed and teratoma formation developed after TrES1 implantation into SCID mice's brain. The progression of HD along *in vitro* neuronal differentiation was examined in the TrES1 cell line. HD cellular pathology developed along the differentiation steps. The accumulation of oligomeric mutant htt and intranuclear inclusions (NIs) dramatically increased along the *in vitro* differentiation to neuron. These results indicated that TrES1 could be use as a model to study the mechanism of HD and drug screening.

School of Biotechnology

Academic Year 2009

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____