สุธาทิพย์ จิรันดร : รูปแบบของอิพิเจเนติกของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งข้ามสปีชีย์โดยเซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกัน (THE EPIGENETIC PROFILES OF GAUR INTER -SPECIES SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS USING DIFFERENT DONOR CELL GENDEN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 86 หน้า.

การย้ายฝากนิวเคลียสข้ามสายพันธุ์ (iSCNT) เป็นเทคนิคนี้ใช้สำหรับการผลิตตัวอ่อนโคลนข้ามสายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์สัตว์ใกล้สูญพันธุ์โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบและย้ายเข้าสู่ไข่ที่ถูกกำจัดนิวเคลียสของสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดหรือสายพันธุ์ที่ต่างออกไป อย่างไรก็ตามเทคนิค SCNT ยังคงมีประสิทธิภาพต่ำมากซึ่งส่งผลทำให้การพัฒนาของลูกอ่อนในครรภ์เกิดความผิดปกติ โดยการแสดงออกของการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของอิพีเจเนติก (epigenetic) ในนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย ดังนั้นการศึกษานี้ จึงได้ทำการตรวจสอบการเจริญของตัวอ่อนและการแสดงออกของยีน pluripotency และ epigenetic modification ของตัวอ่อนที่ได้จาก SCNT และ iSCNT ที่ได้จากเซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกันโดยใช้ตัวอ่อนที่ได้จาก IVF เป็นกลุ่มควบคุม โดยศึกษาการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์ไฟโบรบลาสเพศผู้และเพศเมียของโคและกระทิงย้ายเข้าสู่ไข่โคที่พร้อมปฏิสนธิที่ได้ถูกกำจัดนิวเคลียส นอกจากนี้ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน pluripotent (*Oct4*) และยีนที่แสดงออกของรูปแบบ epigenetic (*Hat1, Hdac1, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Igf2* และ *Igf2r*) ในตัวอ่อนเหล่านี้อีกทั้งทำการวิเคราะห์การแสดงออกของ Histone modifications (AcH4K5 and HDAC1) ด้วยวิธี immunostaining ในการทดลองที่ 1 พบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะบลาสโตซิสในกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเพศผู้และเพศเมีย (25% และ 23.1% ตามลำดับ) และกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์ต้นแบบกระทิงเพศผู้และเพศเมีย (27.5% และ 25.8% ตามลำดับ) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อน IVF ที่เจริญถึงระยะบลาสโตซิส ($P<0.05$) นอกจากนี้จำนวนเซลล์ของ inner cell mass (ICM) และ trophectoderm (TE) ที่ได้จากตัวอ่อนโคลนนิ่งทั้งสองกลุ่มมีน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จาก IVF ($P<0.05$) ในขณะที่อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิส จำนวนเซลล์ของ ICM TE และเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มตัวอ่อน SCNT และ iSCNT ที่ใช้เซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) การทดลองที่2 จากการศึกษาพบว่าระดับของยีน *Oct4* และ *Hat1* มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมาก ในขณะที่การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ *de novo* DNA methylation (*Dnmt3a* และยีน *DNMT3b*) มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในกลุ่มตัวอ่อน SCNT และ iSCNT เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอ่อนที่ได้จาก IVF นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มตัวอ่อน SCNT และ iSCNT มีรูปแบบการ

แสดงออกที่เหมือนกันของยีน *Oct4*, *Hat1*, *Hdac1* และ *Dnmt3a* ที่ระยะบลาสโตซิส และสิ่งที่น่าสนใจคือการแสดงออกของยีนในกลุ่ม imprintingคือ ยีน *Igf2* และ ยีน *Igf2r* นั้น มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มตัวอ่อน SCNT และ iSCNT ที่ใช้เซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกัน ($P<0.05$) ในการทดลองที่ 3 พบว่าระดับการแสดงออกของ histone acetylation ของระดับ AcH4K5 มีระดับต่ำในกลุ่มตัวอ่อน iSCNT ที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสของกระทิงเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ระยะบลาสโตซิสที่ได้จาก IVF ขณะที่ระดับการแสดงออกของ HDAC1 ในกลุ่มตัวอ่อนโคลนนิ่งทั้งสองกลุ่มโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มตัวอ่อน iSCNT ที่ใช้เซลล์ไฟโบรบลาสของกระทิงเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มตัวอ่อน IVF ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการเจริญของตัวอ่อนและการเปลี่ยนแปลงของ epigenetic ในกลุ่มตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ใช้เซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกันนั้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่ในการแสดงออกของยีนในกลุ่มรูปแบบการฝังจำบนสายดีเอ็นเอ (imprinting gene) ในกลุ่มตัวอ่อน SCNT และ iSCNT ที่ใช้เซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกันนั้น มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการแสดงออกของยีน *Igf2* และ *Igf2r* ดังนั้นจีโนมของนิวเคลียสเซลล์ร่างกายที่มาจากเซลล์ต้นแบบที่มีเพศแตกต่างกันใน SCNT และ iSCNT จะมีการแสดงออกของยีนรูปแบบการฝังจำบนสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญของตัวอ่อนโคลนนิ่งทำให้เกิดความผิดปกติในตัวอ่อนระยะหลังการฝังตัว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SUTATIP JIRUNDORN : THE EPIGENETIC PROFILES OF GAUR INTER-SPECIES SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EMBRYOS USING DIFFERENT DONOR CELL GENDER. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 86 PP.

INTRA-SPECIES SCNT (SCNT)/INTER-SPECIES SCNT (iSCNT)/SOMATIC CELL NUCLEI/DONOR CELL GENDER/EPIGENETIC MODIFICATION

Interspecies somatic cell nuclear transfer (iSCNT), is a technique for producing inter-species cloned embryos which are applied in endangered species using a somatic cell as a donor cell and transferred into the enucleated oocyte of a closely related species or different species. However, the SCNT technique is still extremely inefficient leading to abnormality of fetus development caused by aberrant expression of epigenetic modification in somatic cell nuclei. Thus, these studies investigated the different donor cell gender on embryonic development and transcript abundance of pluripotency and epigenetic modification genes in SCNT bovine and iSCNT gaur embryos. Embryos derived from *in vitro* fertilization (IVF) were used as the control group. Male and female bovine and gaur fibroblasts were transferred into matured enucleated bovine oocytes and the developmental competence of reconstructed embryos was investigated. Furthermore, the pluripotent (*Oct4*) and epigenetic genes (*Hat1, Hdac1, Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Igf2* and *Igf2r*) of these embryos were analyzed. Histone modifications (AcH4K5 and HDAC1) were analyzed by the immunostaining method. In Experiment 1, the blastocysts formation rates of cloned embryos were significantly decreased in SCNT (male SCNT and female SCNT; 25% and 23.1%, respectively) and iSCNT (male iSCNT and female iSCNT; 27.5% and 25.8%, respectively) embryos when compared with IVF embryos (34.6%, $P < 0.05$).

The cell numbers of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of SCNT and iSCNT embryos were significantly decreased compared with IVF embryos ($P<0.05$), whereas the blastocyst rate and the ICM, TE and total cell numbers in SCNT and iSCNT embryos with different donor cell gender were not significantly different ($P>0.05$). In Experiment 2, the mRNA level of *Oct4* and *Hat1* activity was dramatically lower; whereas the expression of *de novo* DNA methylation (*Dnmt3a*, and *DNMT3b*) was significantly increased in SCNT and iSCNT blastocysts reconstructed with different donor cell gender when compared with IVF blastocysts ($P<0.05$). Moreover, the relative transcription levels in SCNT and iSCNT blastocysts had similar expression patterns of *Oct4, Hat1, Hdac1* and *Dnmt3a* genes. Interestingly, the transcription levels of *Igf2* and *Igf2r* genes in SCNT and iSCNT blastocysts derived from different donor cell gender were significantly different ($P<0.05$). In Experiment 3, the histone acetylation levels of AcH4K5 were downregulated in iSCNT male gaur blastocysts compared with IVF control group; whereas the relative HDAC1 activity in all cloned embryos remarkably increased, especially in iSCNT male gaur compared with the IVF blastocysts control group. From this study, it can be concluded that the embryonic development and epigenetic modification of different somatic donor cell genders did not have a significant influence, except the *Igf2* and *Igf2r* imprinting genes expression did have an effect on SCNT and iSCNT embryos derived from the different donor cell gender. Thus, the somatic cell nuclei genome derived from different of donor cell gender in SCNT and iSCNT embryos would have an aberrant expression of imprinting genes which causes abnormality cloned embryos at post-implantation development.

School of Biotechnology Student's Signature Sutatip Jirundorn

Academic Year 2017 Advisor's Signature