สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา : โปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับออคท์โฟร์ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์และการผลิตเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์ของมนุษย์ (IDENTIFICATION OF OCT4 ASSOCIATED PROTEINS IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND PRODUCTION OF HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มารินา เกตุทัต-คาร์นส์, 156 หน้า.

เทคโนโลยีชีวภาพสามารถนำมาเป็นเครื่องมือในการศึกษาชีววิทยาเซลล์ต้นกำเนิด การศึกษานี้ได้ทำการสำรวจโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับออคท์โฟร์ (OCT4) ในเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์ (hESCs) โดยใช้เทคโนโลยีทาเลนต์ (TALENs) เพื่อสร้าง hESCs ที่สามารถสร้างโปรตีน OCT4 ที่เชื่อมต่อกับโปรตีน FLAG และไบโอติน (FLAG-Biotin-tagged OCT4) จากนั้นใช้เทคนิคการทำให้บริสุทธิ์แบบสัมพรรคภาพ (Affinity purification) ร่วมกับแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry) เพื่อระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ OCT4 จากผลการทดลองพบว่า OCT4 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทรานสคริปชั่น ทรานสเลชั่น การเปลี่ยนแปลงโครมาติน การซ่อมแซมดีเอ็นเอ การตัดแต่งอาร์เอ็นเอ การย้ายหมู่กลูโคส (ไกลโคซิเลส) และโปรตีนที่ควบคุมกระบวนการเอพิเจเนติก เช่น NuRD, SWI/SNF และ FACT complexes นอกจากนี้ได้ทำการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนบางตัว (BEND3, FUS, RBM25, WDR82 และ SFPQ) เพื่อทดสอบว่าโปรตีนดังกล่าวมีผลต่อ hESCs หรือไม่ จากการทดลองพบว่าหลังจากการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน SFPQ ส่งผลให้เซลล์ตาย โดยอาจจะเป็นไปได้ว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่าง SFPQ กับ OCT4 มีความเกี่ยวพันธ์กับกลไกที่ควบคุมกระบวนการทรานสคริปชั่น, การซ่อมแซมดีเอ็นเอ และการบำรุงรักษาโครโมโซมซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความเป็น hESCs การทดลองนี้เผยให้เห็นถึงโปรตีนต่างๆที่มีปฏิสัมพันธ์กับ OCT4 ซึ่งเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะใช้ในการศึกษากลไกการทำงานของ OCT4 เพื่อให้เข้าใจเครื่อข่ายที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติพลูริโพเทนท์ของ hESCs โดยในอนาคตต้องมีการศึกษาว่าปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนต่างๆ กับ OCT4 มีบทบาท และหน้าที่อย่างไร

การศึกษานี้ยังได้แสดงวิธีการที่ง่ายและมีประสิทธิภาพในการผลิตเบสิคไฟโบรบลาสต์โกรธแฟคเตอร์ของมนุษย์ (hbFGF) โดยได้มีการทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต hbFGF เช่น ฟิวชั่นโปรตีนที่ติดแท็ก ชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน (BL21(DE3) หรือ ArcticExpress®RIL) ความเข้มข้นของ IPTG ระยะเวลาที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการสร้าง และ วิธีการทำให้

บริสุทธิ์ พบว่าภายใต้สภาวะที่ดีที่สุดสามารถผลิต hbFGF ได้ 60-80 มิลลิกรัมโปรตีน ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และ hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้มีคุณสมบัติทางชีวภาพหลังจากทดสอบกับเซลล์ NIH3T3 hESCs และเซลล์ต้นกำเนิดจากการเหนี่ยวนำของมนุษย์ (iPSCs) อีกทั้งยังพบว่า ฟิวชั่นโปรตีนที่ติดแท็กอยู่กับ hbFGF (6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF) ไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพ และ 6xHis-hbFGF และ Trx-6xHis-hbFGF บริสุทธิ์ที่ได้สามารถนำมาใช้เลี้ยงเซลล์ hESCs และ iPSCs โดยเซลล์ดังกล่าวหลังจากการเลี้ยงหลายรุ่น (passage) ยังคงรูปร่าง คุณสมบัติพลูริโพเทนท์ และการแสดงออกของยีนบางยีนที่ศึกษา ไม่ต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงด้วย hbFGF ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จากการนำ hbFGF ที่ผลิตด้วยวิธีการผลิตที่ง่าย และมีประสิทธิภาพนี้มาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดมนุษย์สามารถลดต้นทุนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ประมาณ 30-60 เปอร์เซ็นต์ จึงมีความเป็นได้ที่จะสามารถนำกระบวนการนี้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนไซโตไคน์ และโกรธแฟคเตอร์ตัวอื่นๆ เพื่อใช้ในงานวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SUMETH IMSOONTHORNRUKSA : IDENTIFICATION OF OCT4 ASSOCIATED PROTEINS IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND PRODUCTION OF HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MARIENA KETUDAT-CAIRNS, Ph.D., 156 PP.

PROTEIN-PROTEIN INTERACTION/OCT4 INTERACTOME/HUMAN STEM CELL/RECOMBINANT PROTEIN/BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR

Biotechnology provides powerful and useful tools to study stem cell biology. Here, OCT4 associated proteins in human embryonic stem cells (hESCs) were surveyed. TALENs technology was used to engineer hESCs to express FLAG-Biotin-tagged OCT4. Then, affinity purification techniques in combination with mass spectrometry were used to purify and identify OCT4 associated proteins. OCT4 was shown to associate with proteins related to transcription, translation, chromatin remodeling, DNA repair, RNA processing, glycosylation as well as epigenetic regulation machineries including NuRD, SWI/SNF and FACT complexes. Validation of some interactors (BEND3, FUS, RBM25, WDR82 and SFPQ) revealed that knockdown expression of SFPQ protein led to hESC dysfunction and death. This novel result demonstrated that SFPQ-OCT4 interaction may provide a novel protein-protein interaction complex that plays crucial function for maintaining hESC pluripotency. Here, some OCT4 interacting proteins were uncovered. This knowledge will be a resource to help with the investigation of OCT4 function. However, further analysis of the listed candidates at the functional level will be needed to assist in the understanding of the hESC pluripotency network.

An easy and efficient expression system for in-house human basic fibroblast growth factor (hbFGF) production was also performed. Several parameters for optimizing the expression of soluble hbFGF, including fusion tagged strategy (6xHis-hbFGF and Trx-6xHis-hbFGF), *E. coli* expression host strains (BL21(DE3) or ArcticExpress®RIL), concentration of IPTG used for induction, duration of induction and affinity purification procedures were investigated. Under the optimal condition, approximately 60-80 mg of hbFGF fusion proteins was obtained from 1 liter culture broth. The biological activity of purified hbFGF was assessed using NIH3T3 cells and undifferentiated hESCs and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The results demonstrated that the N-terminal fusion tags of 6xHis-hbFGF and Trx-6xHis-hbFGF fusion proteins did not interfere with their biological activities. Human ESCs and iPSCs supplemented with the fusion proteins could maintain undifferentiated stage for several passages. No significant differences in the stem cells morphology and gene expression were observed when supplement with our purified hbFGF fusion proteins or commercialized hbFGF. The use of the fusion proteins in our laboratory was found to significantly reduce the cost of media preparation, approximately 30-60%. We have demonstrated an easy and efficient expression system for in-house hbFGF production, and this system may not only facilitate further production of recombinant hbFGF, but also allow possible large-scale production of other biologically active cytokines and growth factors used for stem cell research.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____