

วรรณัญช์ สารวล : ตัวดัดแปลงที่อยู่เหนือพันธุกรรมที่ช่วยส่งเสริมการรีโปรแกรมของเซลล์
ร่างกายกระต่ายและเซลล์ต้นกำเนิดโอไฟเอสกระต่าย (EPIGENETIC MODIFIERS ENHANCE
THE REPROGRAMMING OF RABBIT SOMATIC CELLS AND RABBIT INDUCED
PLURIPOTENT STEM CELLS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย,
114 หน้า.

เซลล์ต้นกำเนิดโอไฟเอสกระต่าย/การรีโปรแกรม/การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน/อินแอคทิเวชันโครโมโซม X/
สถานะพลูริโพเทนต์

เซลล์ต้นกำเนิดโอไฟเอสกระต่าย (rbiPSC) มีลักษณะเฉพาะของไพรม์ (prime) พลูริโพเทนต์
ตามที่กำหนดไว้สำหรับสัตว์ฟันแทะและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เราทดสอบสมมติฐานที่ว่า การดัดแปลงที่
อยู่เหนือพันธุกรรมโดยการยับยั้งการทำงานของ histone deacetylase (HDACi) และ histone 3
lysine 9 methyltransferase (H3K9mei) จะปรับปรุงการรีโปรแกรมในเซลล์ต้นกำเนิดโอไฟเอส
กระต่าย ให้มีสถานะความเป็นนาอีฟ (naïve) สูงขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการรีโปรแกรมเซลล์ต้น
กำเนิดโอไฟเอส กระต่าย (B19-rbiPSCs) โดยใช้ตัวดัดแปลงที่อยู่เหนือพันธุกรรมและเพาะเลี้ยงเซลล์นี้
ในระบบที่ปราศจากเซลล์พี่เลี้ยง วิธีการเพาะเลี้ยงแบบใหม่นี้ส่งผลให้เกิดการกำหนดค่าการแสดงออก
ของยีนและอีพีเจเนติกใหม่ ซึ่งพิสูจน์ได้จากการให้ผลบวกต่อมาร์คเกอร์ที่จำเพาะต่อความเป็นนาอีฟ
ได้แก่ *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Stat3*, *Esrrb*, *Dppa5*, *Kdm4a* และเกิดกระบวนการปรับเปลี่ยนฮิสโตน
ที่เกี่ยวข้องกับสถานะความเป็นนาอีฟ นอกจากนี้การยับยั้งปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลที่ ฮิสโตน 3 ไล
ซีน 9 ของ H3K9 methyltransferase และการยับยั้งปฏิกิริยาการดึงหมู่เอทิลออกจากฮิสโตนของ
histone deacetylase ยังส่งเสริมการรีโปรแกรมโดยลดระดับของ H3K9 trimethylation
(H3K9me3) และเพิ่มระดับของ H3K14 acetylation (H3K14ac) โดยเซลล์ที่ถูกรีโปรแกรมมี
เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่แสดง X inactivation ลดลง ซึ่งสารยับยั้งเหล่านี้สามารถกระตุ้น reactivation
ของ X โครโมโซมให้กลับมาทำงานได้

นอกจากนี้ได้ทำการรีโปรแกรมเซลล์ไฟโบรบลาสต์กระต่ายและเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์
กระต่ายโดยใช้เซนไดไวรัส หรือการถ่าย mRNA ร่วมกับตัวดัดแปลงที่อยู่เหนือพันธุกรรม เซลล์
ไฟโบรบลาสต์กระต่ายแสดงการทรานส์ดักชันและประสิทธิภาพการทรานส์เฟกต์ที่สูงกว่าเซลล์ต้น
กำเนิดมีเซนไคม์กระต่าย กระบวนการรีโปรแกรมเซลล์ไฟโบรบลาสต์กระต่ายด้วยเซนไดไวรัส ที่
ประกอบด้วยทรานสคริปชันแฟกเตอร์ hKlf4, hOct3/4, hSox2 และ c-Myc ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่
เสริมด้วยสารยับยั้งการทำงานของ H3K9 methyltransferase A366 และ HDAC UF010 ได้สร้าง
โคลนที่เหมือน iPSCs ซึ่งมีการแสดงออกของยีนพลูริโพเทนต์กระต่าย ได้แก่ *Oct4* และ *Nanog* ส่วน
การแสดงออกของ *Sox2* นั้นไม่แตกต่างจากการแสดงออกของเซลล์โอไฟเอสกระต่าย นอกจากนี้การ

เพาะเลี้ยงในระบบที่ปราศจากเซลล์พี่เลี้ยง ยังช่วยลดความยุ่งยากในการเลือกและการเพิ่มจำนวนของ
โคลนที่ผ่านการรีโปรแกรม



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนักศึกษา อรอนันต์ สารอด
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [Signature]
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [Signature]

WORAWALAN SAMRUAN : EPIGENETIC MODIFIERS ENHANCE THE
REPROGRAMMING OF RABBIT SOMATIC CELLS AND RABBIT INDUCED
PLURIPOTENT STEM CELLS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN
PARNPAL, Ph.D., 114 PP.

RABBIT INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS/REPROGRAMMING/HISTONE
MODIFICATION/X INACTIVATION/PLURIPOTENCY STATUS

Rabbit induced pluripotent stem cells (rbiPSCs) exhibit the characteristic features of primed pluripotency as defined in rodents and primates. The hypothesis that epigenetic modifications by inhibition of histone deacetylase (HDACi) and inhibition of histone 3 lysine 9 methyltransferase (H3K9mei) would enhance reprogramming rbiPSCs toward the naïve state was tested. In the present study, the B19-rbiPSCs was reprogrammed using epigenetic modifiers and cultured them in a resetting medium on feeder-free system. This new culturing protocol resulted in transcriptional and epigenetic reconfiguration, as substantiated by the expression of naïve markers including *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Stat3*, *Esrrb*, *Dppa5*, *Kdm4a* and the presence of histone modifications associated with naïve pluripotency. Furthermore, H3K9 methyltransferase inhibition and HDAC inhibition promote reprogramming by downregulation of H3K9 trimethylation (H3K9me3) and upregulation of H3K14 acetylation (H3K14ac). The reprogrammed cells decreased the percentage of cells showing X inactivation, these inhibitors can reactivate the silent X chromosome.

The rabbit fibroblasts (rbFs) and rabbit mesenchymal stem cells (rbMSCs) were also reprogrammed using Sendai virus or mRNA transfection and epigenetic modifiers. The rbFs showed higher transduction and transfection efficiency than rbMSCs. The rbFs reprogramming process with Sendai virus carrying hKlf4, hOct3/4, hSox2 and c-Myc using medium supplemented with H3K9 methyltransferase inhibitor A366 and HDAC inhibitor UF010 generated iPSCs-like clones that expressed rabbit pluripotent transcription factors including *Oct4* and *Nanog*. The expression of *Sox2* was not different to that of B19-rbiPSCs.

Moreover, feeder-free culture medium simplifies the selection and the amplification of reprogrammed clones.



School of Biotechnology
Academic Year 2021

Student's signature Worawan Samran
Advisor's Signature [Signature]
Co-advisor's Signature [Signature]