ทัศนีย์ สุทีวรรณ : Epigenetics ของตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งและลูกอ่อน และลูกโคโคลนนิ่ง (EPIGENETICS OF CLONED SWAMP BUFFALO EMBRYOS, CLONED CATTLE FETUSES AND CALVES) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 117 หน้า. ISBN 974-533-471-5

ปัจจุบันถึงแม้จะมีรายงานความสำเร็จในการผลิตสัตว์ที่ลอกเลียนพันธุกรรมสัตว์ต้นแบบได้สำเร็จในหลายสปีชีส์โดยเทคโนโลยีโคลนนิ่งแต่เทคโนโลยีนี้ยังคงต้องการการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เนื่องจากปัญหาความผิดปกติที่พบได้ในสัตว์โคลนนิ่ง รวมทั้งการแท้งของสัตว์โคลนนิ่งในอัตราสูงระหว่างการตั้งครรภ์จากรายงานการศึกษาพบว่าความผิดปกติเหล่านี้เกี่ยวเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงในกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนซึ่งเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตที่เรียกว่า ‘Epigenetics’ ที่มีต่างจากสัตว์ปกติ ได้แก่ การเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA methylation) การเติมหมู่อะซิติลบนโปรตีนฮีสโตน (histone acetylation) และ รูปแแบบการฝังจำบนสายดีเอ็นเอ (gene imprinting)

กระบือปลัก (Swamp buffalo) เป็นสัตว์ที่พบได้ในประเทศไทย และแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งพบว่าการโคลนนิ่งกระบือปลักประสบปัญหาเดียวกันกับการโคลนนิ่งสัตว์ในสปีชีส์อื่น เราจึงทำการศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน (epigenetics) ได้แก่ รูปแบบ DNA methylation และ histone acetylation ในตัวอ่อน (embryo) กระบือปลักระยะก่อนฝังตัวด้วยเทคนิค immunostaining และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ซึ่งใช้ในการเกิด DNA methylation ได้แก่ เอนไซม์ DNA methyltransferase (*DNMTs*) ชนิด 1, 3A และ 3B และ histone acetylation ได้แก่ เอนไซม์ histone (de)acetyltransferase (*HDAC* และ *HAT*) ชนิด 1 ในตัวอ่อนกระบือปลักระยะก่อนฝังตัว จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งในระยะนี้มีการลดระดับเมทิลบนสายดีเอ็นเอ (DNA demethylation) ที่ผิดปกติ นอกจากนี้พบว่าการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะนี้ แปรผันตามระดับความสัมพันธ์ของ DNA methylation และ histone acetylation ด้วย ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้าง DNA methylation และ histone acetylation พบว่าตัวอ่อนกระบือปลักโคลนนิ่งมีระดับ *DNMT1* สูงกว่าปกติในระยะแรก ระดับเอนไซม์ *DNMT3A* และ *3B* สูงกว่าปกติในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส และ ระดับเอนไซม์ *HDAC1* และ *HAT1* สูงกว่าปกติเล็กน้อยในตัวอ่อนโคลนทุกระยะด้วย

นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนฝังจำ (imprinted gene) โดยศึกษายีน *IGF2r* จากลูกอ่อนระยะฝังตัว (fetus) ในช่วงอายุวันที่ 25, 45 และ 75 หลังการตั้งครรภ์ จากลูกอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากการแท้ง จากสัตว์โคลนนิ่งซึ่งตายภายในระยะเวลาอันสั้น

คลอด และ สัตว์โคลนนิ่งที่มีสุขภาพสมบูรณ์ เราได้ศึกษารูปแบบของการเลือกแสดงออกของยีนที่ฝังจำ (allellic imprinted gene pattern) โดยใช้เทคนิค SSCP จากการศึกษาพบว่าสัตว์โคลนนิ่งทุกชนิดมีรูปแบบการแสดงออกของยีนฝังจำที่ผิดปกติรวมทั้งในสัตว์โคลนนิ่งที่มีสุขภาพสมบูรณ์ด้วยแต่พบว่าลูกอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากการแท้งมีการแสดงออกของอัลลีลที่ผิดปกติมากอย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ เราได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *IGF2r* ในลูกอ่อนโคลนนิ่งอายุ 25, 45 และ75 วัน และพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน *IGF2r* ไม่มีความแตกต่างจากลูกอ่อนปกติในระยะเดียวกัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

TATSANEE SUTEEVUN : EPIGENETICS OF CLONED SWAMP BUFFALO EMBRYOS, CLONED CATTLE FETUSES AND CALVES. THESIS ADVISOR : RANGSUN PARNPAI, Ph.D. 117 PP.
ISBN 974-533-471-5

CHROMATIN REMODELING/DNA METHYLATION/EPIGENETICS/GENE IMPRINTING/HISTONE ACETYLATION/NUCLEAR TRANSFER

Nuclear transfer or cloning is a potential technology for the production of genetically identical animals, and cloned offsprings have been reported in many species. However, this technology needs more improvement due to the high rate of loss that has been observed during gestation and the abnormalities that have been found in cloned animals. Epigenetic alterations such as DNA methylation, histone acetylation and genetic imprinting, lead to improper control of gene expression during the developmental period and have been suspected to be the cause of the myriad abnormalities observed in clones.

Swamp buffalo, a multipurpose animal that is widely found in South East Asia and Thailand, has also been successfully cloned with blastocyst formation reported but unfortunately low cloned birth rates have been obtained. We study first here the epigenetic characteristic of cloned and IVF swamp buffalo embryos during preimplantation development. DNA methylation and histone acetylation are the key mechanisms examined in our study. Global DNA methylation and histone acetylation were observed using immunostaining and expression levels of genes that control DNA methylation; *DNA methyltransferase 1*, *3A* and *3B*, and histone acetylation; *histone* throughout developmental stages. To study imprinted genes; the expression pattern of

IGF2r gene was examined in fetal cloned calves during gestation periods at day 25, 45 and 75 of gestation and aborted fetuses and clones calves derived from death shortly after birth and normal living clones. Allelic imprinted gene expression patterns were identified using SSCP. Real time RT-PCR was performed to study the *IGF2r* expression levels in cloned and control fetuses at days 25, 45 and 75 of gestation.

Aberrant global demethylation patterns were observed in cloned swamp buffalo embryos during the preimplantation developmental stage. Although, histone acetylation was not expressed as an aberrant global pattern during this period, improper interactions between DNA methylation and histone acetylation was obviously marked in cloned embryos at the 8-cell stage, at which high rates of developmental failure are observed in clones. The mRNA expression patterns of genes responsible for these mechanisms, *DNMT1*, *3A*, *3B*, *HAT1* and *HDAC1* showed comparable patterns between cloned and IVF preimplantation embryos. Clones showed higher mRNA levels of *DNMT1* at an early stage, whereas, hyper-expression of *DNMT3A* and *3B* were illustrated at the blastocyst stage as compared to IVF embryos. Consistent to the results of *de novo* DNA methylation gene expression, the *HAT1* and *HDAC1* mRNA levels displayed higher levels in cloned embryos. For imprinted gene observations in cloned cattle, improper allelic expression patterns were found in many organs of aborted cloned fetuses. However the tissue derived from healthy living cloned also showed the slightly different allelic expression pattern when compared to those derived *in vivo*. The result of *IGF2r* gene expression displays comparable expression levels in most organs of interest between cloned and control fetuses derived at day 25, 45 and 75 of gestation.

We summarize that the aberrant DNA demethylation pattern in cloned swamp

buffalo embryos during the preimplantation stage may be the cause of developmental failure as has been reported in other species. We suggest that the loss of optimal interaction between histone acetylation and DNA methylation may relate to development malfunction during the early embryonic stages. Our investigations in different cattle tissues also support that the fidelity of allelic imprinting gene expression patterns relates to normal fetal development.

School of Biotechnology

Academic Year 2005

Student's Signature Tatsanee Sakigusa

Advisor's Signature

Co-advisor's Signature