DNA METHYLATION STATUS OF IMPRINTED GENE H19 AND IGF2 IN AMNIOTIC FLUID STEM CELLS

SUJEEPORN SRIPRADITE 4936481 SIBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NEDNAPIS TIRAWANCHAI, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), TATSANEE PHERMTHAI, Ph.D. (BIOTECHNOLOGY), WANNA THONGNOPPAKHUN, Ph.D. (BIOCHEMISTRY), VITAYA TITAPANT, M.D.

ABSTRACT

The amniotic fluid stem cell is the intermediate stem cell between the embryonic stem cell (ESC) and adult stem cell (ASC). This stem cell gives more advantages for medical therapy than other stem cells due to its appropriate proliferation potential, it has no teratoma formation as reported in ESC and it has higher proliferation potential than ASC to generate an adequate cell. Therefore, the factor that regulates AFS proliferation is quite interesting. DNA methylation is the one major mechanism of epigenetics that controls cell activity by regulation of gene action. The DNA methylation pattern is stable and has inheritable characteristics. Once it is established, it is maintained and passed through the daughter cells. The unique gene called the imprinted gene is also affected by DNA methylation mechanism. This gene is a susceptible gene due to its monoallelic methylation. The alteration of DNA methylation status on only one allele can lead to different cell characteristics. Some imprinted genes are involved in cell proliferation. The intensively studied imprinting cluster which regulates cell proliferation is the IGF2-H19 imprinting cluster. This imprinting cluster comprises 2 homeostatic imprinted genes. The *IGF2* encodes an insulin-like growth factor to trigger cell proliferation whereas the non-translated *H19* downregulates cell proliferation. The gene action of *IGF2* and *H19* is regulated by a DNA methylation pattern at the CTCF6 binding region upstream of H19, which has been suggested as the Imprinting Control Region (ICR). In addition, the Differentially Methylated Region (DMR) within IGF2 is also suggested as the regulatory region due to its imprinting methylation pattern. The methylation pattern at these regions was studied in various cell types including embryonic stem cells, embryonic tissues, various cancer cells and cells from patients suffering growth retardation such as from Bechwith-Weidmann Syndrome (BWS), and Silver Russel Syndrome. However, the DNA methylation at these regions in AFS has never been reported. Therefore, this study investigated the DNA methylation pattern at both DMR and ICR in the IGF2-H19 imprinting cluster in AFS using bisulfite sequencing technique. It also defined the methylation pattern separately at different passages, P8 and P15. The results showed that all CpG sites in both DMR and ICR are differentially methylated. Only some CpG sites in ICR at passage8 (P8) displayed biallelic methylation. The study concluded that the DNA methylation at DMR and ICR in the IGF2-H19 imprinting cluster of AFS cell was imprinting pattern. Additionally, the change of methylation pattern at ICR can occur during *in vitro* cultured process.

KEY WORDS: AMNIOTIC FLUID STEM CELL/ DNA METHYLATION/ IMPRINTING/ IGF2/ H19

135 pages

การศึกษารูปแบบ DNA METHYLATION ของยีนฝังจำ H19 และ IGF2 ในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ (DNA METHYLATION STATUS OF IMPRINTED GENE H19 AND IGF2 IN AMNIOTIC FLUID STEM CELLS)

ศุจีภรณ์ ศรีประดิษฐ์ 4936481 SIBC/M

วท.ม.(ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: เนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย, Ph.D., ทัศนีย์ เพิ่มไทย, Ph.D., วรรณา ทองนพคุณ, Ph.D., วิทยา ถิฐาพันธ์, M.D.

บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำจัดเป็นเซลล์ต้นกำเนิดทารก ซึ่งมีศักยภาพอยู่ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ทำหน้าที่นั้นจะเห็นได้ว่าเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์อื่นได้น้อยกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน ดังนั้น เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำจึงมีศักยภาพในการนำไปใช้ในการรักษาต่ำกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในแง่ของความหลากหลายในการสร้างเซลล์ทำหน้าที่ แต่ในแง่ของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนนั้น เซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำกลับมีความได้เปรียบในการนำไปใช้รักษามากกว่าเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเนื่องจากมีศักยภาพที่ไม่มากเกินไปจนก่อให้เกิดมะเร็งดั่งเช่นเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนและไม่น้อยเกินดั่งที่เป็นข้อจำกัดของเซลล์ต้นกำเนิดตัวเต็มวัย ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้สนใจถึงปัจจัยควบคุมการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งการทำงานของยีนฝังจำใน IGF2-H19 imprinting cluster เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างมากและมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับความบกพร่องทางการเจริญเติบโตหลายๆโรคด้วยกัน โดยยีนฝังจำในกลุ่มนี้ประกอบด้วย 2 ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของการแบ่งเซลล์ ได้แก่ ยีน Insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) ซึ่งส่งเสริมการแบ่งเซลล์ และ ยีน H19 ซึ่งยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยีนในกลุ่มนี้จะมีการทำงานสัมพันธ์กันภายใต้การควบคุมของ DNA methylation ที่บริเวณ ICR เหนือยีน *H19* และ DMR ของยีน *IGF2* ดังนั้น เราจึงสนใจศึกษารูปแบบ methylation ที่บริเวณ ICRและ DMR ในเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน และนอกจากนี้ยังได้ทำการเปรียบเทียบรูปแบบ methylation ระหว่างเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำที่ passage ต่างกันด้วย (passage8 และ passage15) การศึกษานี้ใช้เทคนิค Bisulfite sequencing เพื่อระบุถึงรูปแบบ methylation ของ CpG ทุกตำแหน่งในบริเวณที่สนใจ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารูปแบบ methylation ที่บริเวณ ICR เหนือ *H19* ของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำเป็นแบบ imprinting คือมีความแตกต่างกันระหว่างอัลลีล แต่อย่างไรก็ตามบางตัวอย่างพบรูปแบบ hypermethylation แทนที่ CpG บางตำแหน่ง ซึ่งเมื่อพิจารณาต่อไปพบว่า เซลล์ต้นกำเนิดที่มี hypermethylation CpG นั้นเป็นเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำ passage8 ทั้งหมด และสำหรับการศึกษารูปแบบ methylation ที่บริเวณ DMR ของ *IGF2* พบว่ามีรูปแบบ methylation เป็นแบบ imprinting ทั้งหมด แต่ imprinting methylation นั้นไม่ได้เกิดขึ้นบนอัลลีลเดียวกัน CpG บางตำแหน่งเกิด methylation ขึ้นที่อัลลีลหนึ่งแต่ CpG ใกล้เคียงกลับ methylation ที่อัลลีลอื่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ารูปแบบ methylation ของเซลล์ต้นกำเนิดน้ำคร่ำเป็นแบบ imprinting ทั้งที่บริเวณ ICR และ DMR ซึ่งรูปแบบ methylation ที่ ICR อาจเปลี่ยนแปลงได้ระหว่างการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

135 หน้า