

TẠO MÔ HÌNH RUỒI GIẤM CHUYỂN GEN BIỂU HIỆN PROTEIN α -SYNUCLEIN NHẪM ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU CƠ CHẾ PHÁT SINH BỆNH PARKINSON

Nguyễn Thị Tường Vy, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bảng nhiều mô hình nghiên cứu khác nhau, đặc biệt là mô hình động vật chuyển gen, các nhà khoa học đang ngày càng có nhiều bước tiến trong nghiên cứu bệnh di truyền ở người và cơ chế sinh học phân tử của bệnh. Với nhiều ưu điểm nổi trội, mô hình ruồi giấm *Drosophila melanogaster* đã và đang được sử dụng nhiều trong nghiên cứu y sinh. Nhiều kết quả nghiên cứu bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư, tiểu đường, tim mạch, rối loạn biến dưỡng... trên mô hình ruồi giấm đã được công bố trên các tạp chí khoa học như Nature, Science, đóng góp lớn cho các hiểu biết khoa học về cơ chế bệnh. Mặc dù vậy, tại Việt Nam, việc tạo ra và sử dụng các mô hình ruồi giấm chuyển gen còn khá mới, hầu như chưa có phòng thí nghiệm nào triển khai. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu tạo mô hình ruồi giấm chuyển gen α -synuclein (*SNCA*) nhằm ứng dụng trong nghiên cứu cơ chế bệnh Parkinson. Các công bố trước đây cho thấy sự hiện diện của thể vùi Lewy, có thành phần chủ yếu là protein α -synuclein, làm thoái hóa dần các tế bào thần kinh sản sinh dopamine và là nguyên nhân chủ yếu gây ra bệnh. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử chúng tôi chuyển cDNA gen α -synuclein của người vào trứng ruồi giấm đã thụ tinh nhằm sàng lọc thu nhận các dòng ruồi mang gen *SNCA*. Chúng tôi đã tạo thành công ba dòng ruồi mang gen *SNCA* và hai dạng đột biến thay thế acid amin A30P và A53T. Hơn thế nữa, chúng tôi cũng đã thành công trong việc sử dụng hệ thống UAS-GAL4 nhằm biểu hiện định hướng gen *SNCA* ở não ruồi nhằm tìm hiểu cơ chế tác động của sự tích tụ *SNCA* trên hoạt động của hệ thần kinh trong các nghiên cứu sau.

Từ khóa: Bệnh Parkinson, α -synuclein, thể Lewy, *Drosophila melanogaster*, hệ thống UAS-GAL4

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Parkinson (PD, Parkinson Disease) là bệnh thoái hóa thần kinh gây ra bởi sự thiếu hụt dopamine trong não giữa. Tuy tình hình bệnh hiện nay rất phức tạp, lan rộng và mang tính nghiêm trọng, nhưng những nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh, liệu pháp phòng bệnh, các mô hình nghiên cứu mô phỏng và trị bệnh vẫn chưa mang lại những đáp án mong đợi. Nhiều câu hỏi lớn về bệnh Parkinson vẫn chưa có câu trả lời. Những nghiên cứu gần đây bắt đầu hướng về mục tiêu phát hiện những đột biến đơn có liên quan đến sự di truyền của một số kiểu bệnh PD, điều này cho phép chúng ta hiểu sâu hơn về cơ chế phân tử của bệnh PD thông qua việc thiết lập các mô hình nghiên cứu sử dụng động vật chuyển gen có kiểu hình bệnh PD (Feany, Bender, 2000; Bilen, Bonini, 2005; Pendleton *et al.*, 2002). Không những có thể đáp ứng nhu cầu nghiên cứu các nguyên lý gây bệnh ở mức sinh học phân tử, mô hình nghiên cứu này còn cho phép nghiên cứu sàng lọc các chất hóa học có hoạt tính trị bệnh (Sang, Jackson, 2005).

Mô hình chuột chuyển gen đã và đang được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu các bệnh trên người. Tuy nhiên, mô hình này thường tồn nhiều chi phí

cũng như cần một khoảng thời gian khá dài. Một trong các đối tượng sinh vật có thể sử dụng làm mô hình nghiên cứu bệnh trên người là mô hình ruồi giấm *Drosophila* chuyển gen. Đây là một mô hình hữu ích cho việc sàng lọc rộng rãi các gen gây bệnh với chi phí thấp và thời gian ngắn. Ở mô hình ruồi giấm chuyển gen chúng ta có thể nghiên cứu và mô phỏng một cách rõ ràng mạng lưới các gen liên quan, điều hòa gen gây bệnh. Với các ưu điểm này, mô hình ruồi giấm chuyển gen đã và đang được ứng dụng trong các nghiên cứu bệnh trên người (Bilen, Bonini, 2005; Pendleton *et al.*, 2002; Sang, Jackson, 2005).

Bệnh Parkinson thường được biết đến là bệnh liệt rung, đây là bệnh thoái hóa thần kinh theo độ tuổi, gây ảnh hưởng đến khả năng vận động, giữ thăng bằng và kiểm soát cơ thể của bệnh nhân. Ở Việt Nam, đây là một bệnh tương đối phổ biến với tỷ lệ mắc bệnh là 90-100 người trên 100000 dân. Sự thoái hóa dần các tế bào sản sinh dopamine được cho là nguyên nhân chính dẫn đến bệnh Parkinson (Gandhi, Wood, 2005; Moore *et al.*, 2005). Yếu tố môi trường và yếu tố di truyền có liên quan chặt chẽ tới sự thoái hóa này.

Các nghiên cứu cho thấy sự hình thành thể vùi Lewy là nguyên nhân chính dẫn đến các rối loạn chức năng ty thể đưa đến stress oxy hóa cùng với việc dopamine bị oxy hóa và trở nên gây độc cho tế bào (Feany, Bender, 2000). Giả thiết đưa ra là α -synuclein, parkin và DJ-1 có liên quan đến quá trình tích tụ của protein để hình thành nên thể Lewy. Trong đó α -synuclein đóng vai trò trung tâm trong bệnh Parkinson vì đây là thành phần chính trong thể Lewy (Rosner *et al.*, 2008).

Protein synuclein được biết đến và công bố năm 1988 bởi Maroteaux khi nghiên cứu về loài *Torpedo californica*, có các dạng chính là α -synuclein, β -synuclein, và γ -synuclein, synoretin; được tạo ra do quá trình splicing để hình thành mRNA tương thành. Trong đó α -synuclein có vai trò khá quan trọng trong quá trình điều hòa chu trình hình thành túi tiết tại synap và điều hòa tiết dopamine (Perez *et al.*, 2002). Các nghiên cứu *in vitro* cho thấy dạng monomer không gấp cuộn có thể tích tụ thành các dạng oligomer nhỏ, cấu trúc này có thể được ổn định bởi những tương tác giống β -sheet và sau đó hình thành dạng có trọng lượng phân tử cao hơn, không tan gọi là fibril, đây là dạng cấu trúc được tìm thấy khá phổ biến trong các thể Lewy. Ngoài ra các nghiên cứu còn cho thấy không chỉ sự tích tụ của protein α -synuclein được tìm thấy trong các thể Lewy đặc trưng cho bệnh Parkinson mà còn có các đột biến khác trên gen *SNCA* mã hóa cho α -synuclein. Các dạng đột biến như sau: dạng đột biến điểm amino acid alanine bị thay thế bởi threonine ở vị trí protein thứ 53 (A53T) hoặc proline tại vị trí protein thứ 30 (A30P), một số ít trường hợp là dạng amino acid glutamic bị thay thế bởi lysine tại vị trí protein thứ 46 (G46L), và dạng đột biến làm gia tăng số lượng bản sao của gen *SNCA* dẫn tới dư thừa lượng α -synuclein (Polymecopoulos *et al.*, 1997).

Tuy vậy, cơ chế của sự tích tụ α -synuclein trong môi trường hợp của bệnh Parkinson vẫn chưa được hiểu một cách đầy đủ. Do đó, việc xây dựng mô hình nghiên cứu sự tác động của gen α -synuclein lên hệ thần kinh có vai trò then chốt trong việc tìm ra cơ chế phân tử phát sinh bệnh Parkinson.

Ở nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng ruồi giấm để xây dựng mô hình nghiên cứu bệnh Parkinson. Trong những năm qua, nhóm các nhà khoa học Châu Âu và Mỹ đã xây dựng mô hình ruồi để nghiên cứu bệnh Parkinson như mô hình ruồi chuyển gen biểu hiện vượt mức gen α -synuclein, DJ1, parkin. (Feany, Bender, 2000). Mặc dù về kỹ thuật, mô hình ruồi giấm chuyển gene α -synuclein mang tính kế

thừa các thành tựu đã công bố, nhưng tại Việt Nam đây là nghiên cứu đầu tiên hướng tới việc sử dụng mô hình ruồi giấm để nghiên cứu bệnh Parkinson. Kết quả nghiên cứu cũng là tiền đề cho việc thiết kế các mô hình ruồi giấm chuyển gen để sàng lọc các chất chiết xuất tự nhiên để trị bệnh Parkinson tại phòng thí nghiệm của chúng tôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector tái tổ hợp pBlue/*SNCA* (Viện Khoa học Công nghệ Kyoto, Nhật Bản) mang cDNA của gen *SNCA* mã hóa cho protein α -synuclein.

Vector pUAST (Viện Khoa học Công nghệ Kyoto, Nhật Bản) mang gen kháng kháng sinh *amp^r* giúp cho việc sàng lọc các thể biến nạp mang vector tái tổ hợp. Vùng MCS, vùng chứa duy nhất một vị trí nhận biết của các enzyme cắt giới hạn cần thiết cho dòng hóa gen mục tiêu vào vector. Ngoài ra, trên vector còn có các yếu tố cho phép chèn gen vào nhiễm sắc thể ruồi giấm như: nhân tố chuyển gen P, gen chỉ thị *white* cho phép kiểm tra trạng thái mất do ở ruồi giấm đột biến gen mắt trắng, trình tự UAS (Upstream Activation Sequence).

Chủng *Escherichia coli* DH5 α [*FendA1 hsdR17* (r_1^+ / r_1^-) *supE44 thi-1-recA1 gyrA96 Δ lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15)] (Bộ môn Công nghệ sinh học phân tử và môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh) dùng trong dòng hóa gen.

Các dòng ruồi giấm *Drosophila melanogaster*: dòng ruồi giấm dùng trong chuyển gen Δ 2-3, mắt trắng, dòng ruồi mang balancer P{w, sp/eyoGFP; pre/TM6B}; dòng P{+, Elav-GAL4/cyo; +} (8765) biểu hiện tại mô não có kiểu hình cánh cong; dòng P{+; +, Ddc-GAL4} (7009) chứa promoter của gen DOPA decarboxylase giúp biểu hiện tại các tế bào thần kinh sản sinh dopamine; dòng ruồi hoang dại đối chứng CantonS P{+; +; +} và dòng biểu hiện β -galactosidase P{+;+;UAS-LacZ} (Ngân hàng ruồi giấm Bloomington, Mỹ).

Phương pháp

Tạo dòng *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp pUAST/*SNCA*

cDNA *SNCA* thu được từ vector pBlue/*SNCA* bằng phản ứng PCR với enzyme *Pfu* polymerase (Fermentas, Singapore) được cắt bằng *XhoI* và *BglII*

(Fermentas, Singapore) và nối vào vector pUAST để tạo vector tái tổ hợp pUAST/*SNCA*. Vector tái tổ hợp này được biến nạp vào *E. coli* DH5 α bằng hóa biến nạp và sàng lọc trên môi trường LB-Amp100.

Khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Amp được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuếch đại với cặp mồi trên plasmid bao quanh vị trí chèn gen *wiz1/wiz2*. Sau đó, những khuẩn lạc cho sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với kích thước dự đoán sẽ được nuôi cấy để thu nhận plasmid bằng phương pháp SDS-kiểm. Vector thu được từ các khuẩn lạc trên được PCR với cặp mồi đặc hiệu gen và kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *BglII*. Trình tự gen mục tiêu trên vector tái tổ hợp được giải trình tự bằng phương pháp Sanger và phân tích bằng phần mềm Jellyfish.

Phương pháp tạo mô hình ruồi giấm chuyển gen

Vì tiêm

Thu trứng ruồi của dòng ruồi $\Delta 2-3$ mắt trắng mới được thụ tinh ở giai đoạn 0-3 giờ và thực hiện vi tiêm vector tái tổ hợp pUAST/*SNCA* vào phần đuôi của trứng ở nhiệt độ 18°C. Trứng ruồi sau khi vi tiêm được nuôi trên môi trường dinh dưỡng ở 25°C thu cả thể Fo.

Sàng lọc ruồi mang vector tái tổ hợp đã sát nhập vào bộ gen

Ruồi Fo được thu nhận và lai với ruồi đột biến mắt trắng W118 nhằm phát hiện thể hệ ruồi lai F1 mang gen mục tiêu có kiểu hình mắt đỏ do gen chi thị u⁺ qui định. Các dòng ruồi chuyển gen sau đó được lai với ruồi mang balancer để xác định vị trí chèn gen trên nhiễm sắc thể ruồi và làm thuần nham từ các dòng đồng hợp tử gen mục tiêu *SNCA*. Sự hiện diện của gen *SNCA* trong ruồi chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR với mồi đặc hiệu gen và mồi bắt trên nhiễm sắc thể, bao quanh gen mục tiêu *SNCA*.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein α -synuclein của các dòng ruồi chuyển gen tại mô não

Các dòng ruồi giấm chuyển gen α -synuclein đã được tạo và kiểm tra sẽ được tiến hành từ các ruồi cái còn trinh và lai với dòng biểu hiện protein GAL4 (sử dụng dòng *Elav-GAL4/Cyo*) nhằm kiểm tra sự biểu hiện của protein α -synuclein tại mô não. *Elav-GAL4/Cyo* là dòng ruồi mang promoter chuyên biệt cho mô não, do đó khi lai dòng ruồi này với các dòng UAS-*SNCA* thì chỉ những tế bào thần kinh mới biểu hiện protein α -synuclein. Thể hệ con lai F1

được chọn lọc dựa vào kiểu hình do các balancer quy định, vì vậy các cá thể ruồi lai F1 mang UAS-*SNCA* và *Elav-GAL4* được lựa chọn có kiểu hình cánh thẳng. Protein tổng từ các mẫu đầu ruồi được thu nhận và tiến hành điện di phân tích bằng SDS-PAGE và kiểm chứng bằng Western blot với kháng thể đặc hiệu kháng α -synuclein.

Dòng ruồi *Elav-GAL4* không mang balancer và là dòng mang promoter chuyên biệt giúp biểu hiện tại các tế bào thần kinh sản sinh dopamine. Các thể hệ ruồi lai F1 được sử dụng khảo sát sự biểu hiện protein α -synuclein tại các mô thần kinh chuyên biệt sản sinh dopamine bằng phương pháp hóa mô miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu kháng α -synuclein.

Nhuộm hóa mô miễn dịch huỳnh quang (Immunohistochemistry)

Ruồi lai F1 được 25 ngày tuổi được chọn dùng để tách não và nhuộm hóa mô miễn dịch huỳnh quang. Não ruồi được tách trong dung dịch PBS và cố định mô bằng dung dịch paraformaldehyde 4%, pha trong PBS ở nhiệt độ phòng 30 phút. Sau đó rửa bằng dung dịch PBS-0.3% TritonX100 (v/v) và khòa mẫu mô bằng dung dịch huyết thanh dê (Normal goat serum) 10% trong PBS-0.15% TritonX100 (v/v) ở nhiệt độ phòng 30 phút. Mẫu mô não được ủ với kháng thể sơ cấp kháng α -synuclein ở 4°C qua đêm. Sau đó mẫu mô được rửa 4-5 lần bằng dung dịch PBS-0.3% TritonX100 và được ủ với kháng thể thứ cấp phát huỳnh quang FITC 484nm ở nhiệt độ phòng 2-3 giờ. Não được rửa sạch và tách não cố định lên lame và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Hình ảnh được phân tích bằng chương trình ImageJ, thống kê bằng kiểm định t-test của Microsoft Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector mang và biểu hiện gene *SNCA* trong ruồi giấm

Chúng tôi tiến hành thu nhận cDNA gen *SNCA* bằng phản ứng PCR từ khuôn mẫu là plasmid pBlue/*SNCA* và chèn vào vector pUAST bằng phản ứng nối nhờ enzyme *T4* DNA ligase. Vector tái tổ hợp pUAST *SNCA* sau đó được sàng lọc và kiểm tra bằng phương pháp PCR với mồi đặc hiệu và phương pháp cắt giới hạn. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp cho thấy vector này mang gen *SNCA* thể hiện trên sản phẩm PCR kích thước 435bp tương ứng với kích thước cDNA gen mục tiêu (dữ liệu thực nghiệm

không trình bày tại đây). Đồng thời kết quả xử lý với enzyme cắt giới hạn và kết quả kiểm tra trình tự gen cũng cho thấy gen *SNCA* được chèn vào vector có trình tự giống 100% với trình tự cDNA của *SNCA* trên ngân hàng gen. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công vector tái tổ hợp mang gen *SNCA*. Bên cạnh đó, các kết quả đồng hoá tương tự trên hai dòng gen *SNCA* đột biến cũng cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc thu nhận hai vector mang 2 dạng đột biến A30P_ *SNCA* và A53T_ *SNCA*. Các vector này sau đó được tách chiết từ tế bào *E. coli* để vi tiêm vào trứng ruồi.

Sàng lọc ruồi mang vector tái tổ hợp đã sát nhập vào bộ gen

Sau khi vi tiêm, nhờ vào yếu tố chuyển vị transposon P trên vector pUAST (Bachmann, Knust, 2008), gen *SNCA* được sát nhập vector tái tổ hợp một cách ngẫu nhiên vào bộ gen ruồi giấm. Các dòng ruồi chuyển gen có kiểu hình mất đỏ được lựa chọn dựa vào gen chỉ thị *w⁺*. Chúng tôi tiến hành làm thuần các dòng ruồi chuyển gen thu nhận được và sử dụng phép lai với ruồi mang balancer để xác định vị trí gen chèn trên nhiễm sắc thể ruồi giấm, kết quả phân tích cho thấy chúng tôi thu nhận được 03 dòng ruồi chuyển gen như trình bày trên bảng 1.

Sau khi làm thuần và xác định nhiễm sắc thể mang gen mục tiêu, chúng tôi tiếp tục tiến hành kiểm tra phân tích các dòng ruồi này. Trước tiên, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự hiện diện của phức hợp gen *UAS-SNCA* (hoặc *UAS-A30P-SNCA*: *UAS-A53T-SNCA*) trong cơ thể ruồi chuyển gen bằng phương pháp PCR với cặp mỗi đặc hiệu bao quanh vùng gen mục tiêu (Hình 1A). Theo lý thuyết, dưới

tác động của yếu tố chuyển vị gen P, khi vector pUAST/*SNCA* được đưa vào phôi ruồi, với hoạt động của transposase, phức hợp *UAS-SNCA* nằm giữa các trình tự IR của yếu tố P sẽ được chèn vào nhiễm sắc thể của ruồi giấm. Trong thiết kế thí nghiệm chuyển gen của chúng tôi, enzyme transposase chỉ hiện diện duy nhất trong thể hệ P (phôi ruồi) khi chuyển gen. Các thể hệ sau đó, enzyme transposase hoàn toàn không hiện diện, do vậy, sự chèn gen vào nhiễm sắc thể là sự chèn gen ổn định. Chúng tôi thu nhận DNA bộ gen của ruồi chuyển gen dự tuyển và sử dụng làm khuôn trong phản ứng PCR kiểm tra với mỗi đặc hiệu cho phức hợp gen mục tiêu. Kết quả phản ứng PCR với khuôn là DNA bộ gen của ruồi chuyển gen cho vạch có kích thước như dự đoán ứng với 2 cặp mỗi khi so sánh với vạch chuẩn dương (Hình 1B, giếng 2, 3) như sau: 1 vạch có kích thước 435bp ứng với cặp mỗi đặc hiệu cho gen *SNCA* (Hình 1B, giếng 9, 11, 13). 1 vạch có kích thước 585bp ứng với cặp mỗi đặc hiệu bao quanh vùng ngoài gen *wiz1/wiz2* (Hình 1B, giếng 8, 10, 12). Đồng thời ở dòng ruồi đối chứng CantonS không có xuất hiện vạch gen trên hình khi PCR với cả 2 cặp mỗi trên (Hình 1B, giếng 6, 7). Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công 3 dòng ruồi giấm chuyển gen mang gen *u-synuclein* với vị trí chèn gen trên nhiễm sắc thể như sau: *UAS-WT-SNCA* (nhiễm sắc thể II); *UAS-A30P-SNCA* (nhiễm sắc thể II); *UAS-A53T-SNCA* (nhiễm sắc thể X) (Bảng 1).

Các dòng ruồi này tiếp tục được kiểm tra khả năng biểu hiện protein α -synuclein trong mô não bằng phương pháp Western blot và nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể đặc hiệu kháng α -synuclein.

Bảng 1 Các dòng ruồi chuyển gen biểu hiện gen α -synuclein

STT	Tên dòng ruồi chuyển gen	Phức hợp gen	NST nhận gen chèn	Đặc điểm
1	Dro-AlphaSyn WT	UAS-SNCA	II	Đồng hợp
2	Dro-Syn A30P	UAS-A30P_ <i>SNCA</i>	II	Đồng hợp
3	Dro-Syn A53T	UAS-A53T_ <i>SNCA</i>	X	Đồng hợp

Biểu hiện protein α -synuclein trong mô não

Để nghiên cứu chức năng của α -synuclein trên mô hình ruồi giấm chuyển gen, chúng tôi sử dụng hệ thống *UAS-GAL4* nhằm biểu hiện vượt mức protein α -synuclein tại vị trí các mô cần khảo sát. Hệ thống này gồm 2 phần, *UAS* (upstream activation

sequence) là đoạn trình tự được thiết kế trước gen mục tiêu, và *GAL4* được thiết kế nằm sau promoter biểu hiện định hướng mô. Bệnh Parkinson như được biết là bệnh thoái hóa thần kinh, do đó chúng tôi chọn dòng ruồi *Elav-GAL4* giúp biểu hiện protein chuyển biệt tại mô não. Khi lai các dòng ruồi *UAS-SNCA* với dòng *Elav-GAL4*, ở thể hệ F1, *GAL4*

được tổng hợp sẽ gắn lên trình tự UAS và gen mục tiêu dưới sự kiểm soát của UAS sẽ được phiên mã giúp biểu hiện định hướng protein α -synuclein tại mô não ruồi (Hình 2A). Đồng thời dựa vào kiểu hình của F1, chúng tôi chọn con lai có kiểu hình cánh thẳng sẽ mang phức hợp của UAS-SNCA và Elav-GAL4

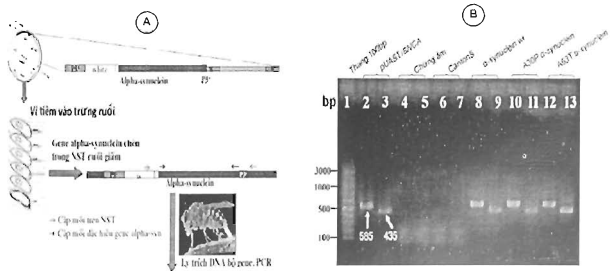
Kết quả điện di SDS-PAGE mẫu đầu ruồi trưởng thành (Hình 2B) cho thấy con lai F1 từ dòng ruồi đối chứng CantonS không được chuyển cDNA *SNCA* (Hình 2B, giếng 2) không thể biểu hiện protein tương ứng. Ở các mẫu protein từ các con lai F1 (Hình 2B, giếng 3, 4, 5) của các dòng ruồi chuyển gen mục tiêu cho thấy có biểu hiện protein mục tiêu có kích thước khoảng 18kDa so với thang protein chuẩn.

Đồng thời kết quả Western blot với kháng thể đặc hiệu kháng α -synuclein (Hình 2B, giếng 3, 4, 5) cho thấy các dòng ruồi lai này đều biểu hiện protein α -synuclein. Như vậy, protein α -synuclein ở dạng hoang dại và 2 dạng đột biến A30P, A53T đều được biểu hiện định hướng thành công tại mô não của cả thể ruồi lai F1.

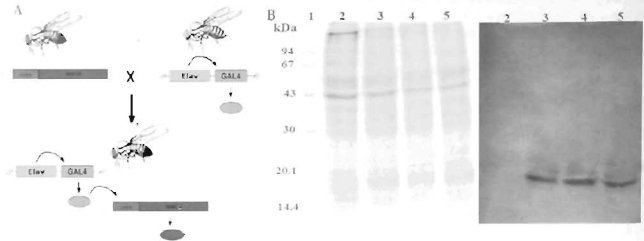
Mặt khác, chúng tôi đánh giá sự biểu hiện α -synuclein và các dạng đột biến trên mô não ruồi tại các tế bào thần kinh sản sinh dopamine, dựa trên cơ chế tổng hợp dopamine (Yu *et al.*, 2005), chúng tôi

biểu hiện định hướng α -synuclein trong tế bào thần kinh sản sinh dopamine dưới sự điều hoà của promoter Ddc (DOPA decarboxylase), một promoter điều hoà tổng hợp DOPA decarboxylase - enzyme có vai trò trong con đường sinh tổng hợp dopamine. Chúng tôi thiết lập các dòng ruồi chuyển gen mang phức hợp gen Ddc-GAL4>UAS-SNCA và thu nhận mô não ruồi chuyển gen, nhuộm hóa mô miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng α -synuclein. Kết quả kiểm tra biểu hiện protein α -synuclein trong tế bào thần kinh sản sinh dopamine (Hình 3 A) cho thấy một số vùng trên mô não ở ruồi mang gen biểu hiện α -synuclein đang không đột biến và đang đột biến A30P, A53T cho tín hiệu huỳnh quang ở các cụm tế bào sinh dopamine (vùng được khoanh tròn) khi đối chiếu trên mô hình các vùng sản sinh dopamine được công bố bởi White và đồng tác giả năm 2010 (Hình 3. A3). Các dòng ruồi đối chứng Ddc-GAL4 và Ddc-GAL4>UAS-LacZ không cho tín hiệu lai với kháng thể kháng α -synuclein (Hình 3 A1, A2).

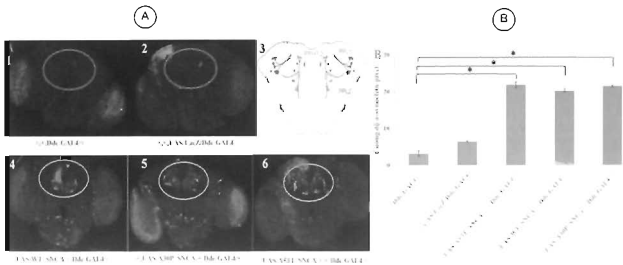
Kết quả nhuộm mô được xác định cường độ tín hiệu bằng chương trình ImageJ và thống kê thể hiện qua biểu đồ hình 3. B cho thấy cường độ tín hiệu huỳnh quang thu được từ các dòng ruồi có biểu hiện protein α -synuclein cao hơn nhiều gấp 4-5 lần so với các dòng đối chứng và có ý nghĩa thống kê khi phân tích bằng kiểm định t-test với các giá trị $p < 0.05$, $n=3$.



Hình 1. Chèn gen α -synuclein vào nhiễm sắc thể ruồi giấm và sàng lọc dòng ruồi chuyển gene. A: Mô phỏng vị trí gene chèn trên nhiễm sắc thể ruồi giấm và vị trí các cặp mồi dung trong sàng lọc ruồi chuyển gene. B: Kết quả PCR kiểm tra sự hiện diện của gene α -synuclein trong nhiễm sắc thể các dòng ruồi chuyển gene. Các giếng 3, 5, 7, 9, 11, 13: Kết quả PCR với mồi đặc hiệu gene α -synuclein; Các giếng 2, 4, 6, 8, 10, 12: Kết quả PCR với cặp mồi trên nhiễm sắc thể của ruồi giấm, bao quanh vị trí chèn gene.



Hình 2 Biểu hiện định hướng protein α -synuclein trên dòng ruồi giấm Elav-GAL4/Cyo tại mô não. **A** Biểu hiện định hướng gen SNCA tại mô não ruồi bằng hệ thống UAS-GAL4. **B** Điện di SDS-PAGE và Western blot với kháng thể kháng α -synuclein. 1. Thang protein, 2. Đối chứng F1(+; Elav-GAL4/+); 3. F1(+;UAS-SNCA/Elav-GAL4,+); 4. F1(+;UAS-A30P-SNCA/Elav-GAL4,+); 5. F1(UAS-A53T-SNCA/+;Elav-GAL4/+;+).



Hình 3 Biểu hiện định hướng α -synuclein trên mô não ruồi tại các vùng tế bào thần kinh dopamine. **A**. Nhuộm hóa mô miễn dịch huỳnh quang mô não với kháng thể kháng α -synuclein, **B** Biểu đồ cường độ tín hiệu α -synuclein/pixel với $^*p < 0.05$, $n = 3$.

KẾT LUẬN

Các kết quả trình bày trên cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng các vector tái tổ hợp mang gen mã hóa protein α -synuclein pUAST-SNCA và tiến hành vi tiêm thành công vào ruồi giấm *Drosophila melanogaster* để tạo mô hình ruồi giấm chuyển gen SNCA ứng dụng trong nghiên cứu cơ chế phát sinh bệnh Parkinson. Đồng thời chúng tôi cũng đã thành công bước đầu trong việc biểu hiện protein α -synuclein tại mô não ruồi nhằm tiếp cận gần hơn với mô hình ruồi

Parkinson. Mặc dù mô hình này đã được Feany và đồng tác giả công bố tại tạp chí Nature năm 2000 nhưng đây là mô hình ruồi giấm chuyển gen đầu tiên được tạo thành công tại Việt Nam, điều này minh chứng cho việc chúng ta có thể làm chủ các kỹ thuật để tạo thành các mô hình ruồi chuyển gen nhằm phục vụ các nghiên cứu bệnh trên người. Cùng với việc tạo thành mô hình này, chúng tôi sẽ tiếp tục nghiên cứu nhằm làm sáng tỏ các câu hỏi chung của giới nghiên cứu về vai trò chức năng cũng như cơ chế hoạt động của α -synuclein trong hoạt động của hệ thần kinh.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí từ DH Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh. Chúng tôi trân trọng sự hỗ trợ nhiệt tình của Giáo sư Yamaguchi Masamitsu, Viện khoa học kỹ thuật Kyoto, Nhật Bản

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bachmann A, Knust E (2008) The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods Mol Biol* 420: 61-77
- Bilen J, Bonini NM (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39: 153-71.
- Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404: 394-8
- Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Okamoto Y, Yamaguchi M, Toda T (2008) Heat shock transcription factor 1-activating compounds suppress polyglutamine-induced neurodegeneration through induction of multiple molecular chaperones. *J Biol Chem* 283: 26188-97
- Gandhi S, Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 2749-55
- Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310: 847-50.
- Hashimoto R, Yamaguchi M (2006) Genetic link between beta-sarcoglycan and the Egr1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 212-21
- Higashiyama H, Hirose F, Yamaguchi M, Inoue YH, Fujikake N, Matsukage A, Kakizuka A (2002) Identification of tcr94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ* 9: 264-73.
- Hirth F (2010) *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9(4): 504-23
- Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM (2005) Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annu Rev Neurosci* 28: 57-87.
- Nagai Y, Fujikake N, Ohno K, Higashiyama H, Popiel HA, Rahadian J, Yamaguchi M, Strittmatter WJ, Burke JR, Toda T (2003) Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12: 1253-9
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441: 1157-61
- Pendleton RG, Parvez F, Sayed M, Hillman R (2002) Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 91-6.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ (2002) A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22: 3090-9.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Duara A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-7
- Rosner S, Giladi N, Orr-Urtreger A (2008) Advances in the genetics of Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin* 29: 21-34
- Sang TK, Jackson GR (2005) *Drosophila* models as neurodegenerative disease. *NeuroRx* 2: 438-46
- Sugano W, Ohno K, Yoneda-Kato N, Kato JY, Yamaguchi M (2008) The myeloid leukemia factor interacts with COP9 signalosome subunit 3 in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J* 275: 588-600
- Whitworth AJ (2011) *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Adv Genet* 73: 1-50
- Yu S, Ueda K, Chan P (2005) Alpha-synuclein and dopamine metabolism. *Mol Neurobiol* 31: 243-54

ESTABLISHMENT OF α -SYNUCLEIN EXPRESSING TRANSGENIC FLY MODEL FOR STUDY ON PARKINSON DISEASE MECHANISM

Nguyễn Thị Tường Vy, Dang Thi Phuong Thao*, Tran Linh Thuoc

University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

By many different tools and research models, particularly transgenic animal model plays a very important role; scientists over the world have been successful in uncovering deeply either in study on human genetic diseases or investigation of disease mechanism. Bearing many good points for being a research model, *Drosophila melanogaster* has been widely used in health science study. Numerous studies on neurodegenerative diseases, cancer, diabetes, cardiovascular, metabolic diseases, and so on had been carried on *Drosophila* model and the results of those studies had been published on Nature, Science, and so on. Those publications gave great contribution on knowledge to understand wisely disease mechanism. Although the transgenic *Drosophila* model has been widely used on the world, it is quite new in Vietnam and so far in our country, there is no laboratory working on this model for studying human disease's mechanism. In this study, we present our results on successful establishment of *Drosophila* model bearing α -synuclein (*SNCA*) gene for study mechanism of Parkinson Disease (PD). It is well known that an existence of Lewy body which is created mostly either by overexpression or mis-folding of α -synuclein protein in patient's brain caused neuron cell degradation and stayed as main reason that causes PD. Using molecular biology techniques, we transferred human *SNCA* cDNA into fertilized fly embryos in order to screen for *SNCA* transgenic fly lines. We succeed on establishment of three fly lines, which carry *SNCA* gene and two mutant types for amino acid shifted A30P and A53T. Furthermore, we also succeed on using UAS-Gal4 system for directly expression of *SNCA* gene in *Drosophila* brain. The models will be useful in further study on effect of α -synuclein accumulation in brain.

Keywords: Parkinson disease, α -synuclein, Lewy body, *Drosophila melanogaster*, UAS-GAL4 system

* Author for correspondence: Tel: +84 -8-38307079; E-mail: thaodp@hcmus.edu.vn