

Giảm biểu hiện gen *ABCC4* (ATP-binding cassette subfamily C) liên quan đến rối loạn tự kỷ trên mô hình ruồi giấm

Trần Quốc Đạt*, Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 3/2/2020; ngày chuyển phản biện 12/2/2020; ngày nhận phản biện 27/3/2020; ngày chấp nhận đăng 14/4/2020

Tóm tắt:

Rối loạn phổ tự kỷ là tình trạng rối loạn thần kinh phức tạp, bao gồm những khiếm khuyết trong tương tác xã hội, phát triển ngôn ngữ và kỹ năng giao tiếp kết hợp với hành vi cứng nhắc, lặp đi lặp lại. Việc nghiên cứu bệnh ở mức độ phân tử và tế bào gặp nhiều khó khăn bởi tính phức tạp trong việc lựa chọn, xây dựng mô hình thực nghiệm. Hầu hết các nghiên cứu cơ bản đều dừng lại ở mức độ *in vitro*, tập trung vào việc phát hiện đột biến gen được cho là liên quan đến bệnh mà chưa đi sâu vào nghiên cứu ở mức độ *in vivo*. Ruồi giấm đã có lịch sử nghiên cứu hơn 100 năm, với bộ gen nhỏ nhưng lại có mức tương đồng với gen người khá cao, cho thấy đây là một mô hình di truyền vô cùng ưu việt. Do đó, nghiên cứu này đặt ra mục tiêu xây dựng mô hình ruồi giấm biến đổi gen *ABCC4* và nghiên cứu sự thiếu hụt của gen này với biểu hiện đặc trưng của bệnh tự kỷ. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy sự tương tác giữa các cá thể trong quần thể giảm mạnh giữa nhóm mang gen bệnh và nhóm chứng. Ruồi biến đổi gen *ABCC4* bị rối loạn nhịp thức - ngủ so với con có kiểu gen *ABCC* hoang dại. Các biểu hiện ghi nhận được tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người. Đây là những kết quả bước đầu góp phần làm sáng tỏ vai trò của protein này trong cơ chế phân tử của bệnh tự kỷ.

Từ khóa: ABCC, rối loạn phổ tự kỷ, ruồi giấm.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Rối loạn phổ tự kỷ là một bệnh lý rối loạn về phát triển thần kinh phức tạp ở trẻ em được giả thuyết do sự phơi nhiễm với các chất độc hoặc do thay đổi về những yếu tố di truyền. Những rối loạn về hành vi thường phát triển trong những năm đầu tiên của cuộc đời. Đây là căn bệnh đang có xu hướng phát triển với một tốc độ đáng báo động không chỉ ở Việt Nam mà còn trên toàn thế giới [1]. Ở nước ta, nghiên cứu về bệnh chủ yếu tập trung vào dịch tễ học, biểu hiện lâm sàng và các yếu tố nguy cơ, trong khi các mô hình động vật thực nghiệm còn nhiều hạn chế. Các protein có vai trò quan trọng liên quan đến con đường vận chuyển và dự trữ năng lượng của tế bào thần kinh còn khá mới mẻ và chưa được đầu tư nghiên cứu. Việc ứng dụng mô hình ruồi giấm để nghiên cứu vai trò và chức năng của các protein này, làm sáng tỏ cơ chế bệnh sinh là một hướng đi mới mẻ và thiết thực.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu sử dụng ruồi giấm làm sinh vật mô hình để mô phỏng bệnh lý rối loạn tự kỷ ở người với mục tiêu xác định được tác động của các yếu tố về gen, môi trường đến các hành vi, biểu hiện, khả năng vận động, khả năng sống sót, các thay đổi về nhịp sinh học và biến đổi trong cấu trúc thần kinh ruồi giấm [2-4]. Năm 2018, nghiên cứu của

Ueoka và cs [3] nhận thấy ở ruồi giấm có chứa gen *CG1718* (nằm trên vùng 19F3 của nhiễm sắc thể X) có trình tự và chức năng tương đồng như gen *ABCA13* ở người. Do đó, nghiên cứu hướng đến gen này trên ruồi và gọi tắt là *Drosophila ABCA13* (*dABCA13*). Kết quả của việc giảm biểu hiện (knockdown) gen *dABCA13* tại mô não của ruồi giấm cho thấy sự giảm tương tác rõ rệt giữa các cá thể trong quần thể, ruồi bị rối loạn nhịp thức - ngủ và cấu trúc thần kinh cơ bị biến đổi thể hiện rõ nhất ở các nút thần kinh. Kiểu hình ghi nhận được trên mô hình này tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người. Bên cạnh đó, đột biến gen *ABCA13* cũng đã được chứng minh là có liên quan đến rối loạn tự kỷ trên khỉ [5]. Bên cạnh *ABCA13*, gen *ABCC4* cũng là một thành viên thuộc họ gen *ABC* - mã hoá cho protein có cấu trúc tương tự như protein *ABCA13* gồm 2 vùng xuyên màng (membrane spanning domain - MSD) MSD1 và MSD2, mỗi vùng chứa 6 chuỗi helix, 2 vùng gắn nucleotide (NBD1 và NBD2) và vùng N-tận với khoảng 12 axit amin với nhiều chức năng như vận chuyển các chất qua màng tế bào (bao gồm lipid, ion, các phân tử thuốc), thụ thể trên bề mặt tế bào và bài tiết độc tố. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra vai trò của nó trong việc điều hoà cân bằng nội môi và truyền tin nội bào, điều khiển quá trình lão hoá của tế bào tủy xương và tuyến ức [6]. Ngoài ra, protein này còn đóng vai trò trong sinh bệnh học khối u (u xo

*Tác giả liên hệ: Email: tranquocdat.hus@gmail.com

Reduction of the ATP-binding cassette sub-family C member 4 (*ABCC4*) related to the expression of autism spectrum disorder on *Drosophila melanogaster* model

Quoc Dat Tran*, Trong Tue Nguyen

Hanoi Medical University

Received 3 February 2020; accepted 14 April 2020

Abstract:

Autism spectrum disorders (ASDs) are complex neurodevelopmental disabilities that have core diagnostic features including impaired social interaction, language development, and interpersonal skills with repetitive and restrictive behaviors. Researching this type of disorder in terms of the molecular and cellular mechanism has met many difficulties because of the complexity in choosing and creating an experimental model organism. In Vietnam, most of the studies have focused on identifying the mutation relating to ASDs at *in vitro* level without any in-depth study at *in vivo* level. *Drosophila melanogaster* has been widely used as an advantaged model organism in classical and modern genetics for more than 100 years because its genome was small and simple but having homologues for at least 75% of human disease genes, thereby indicating that this has been an extremely excellent genetic model. Therefore, this study aimed to elucidate the physiological role of the *ABCC4* gene mutant *Drosophila model* by specifically knocked down this protein in all neurons of these flies and investigated the deficiency of this gene in terms of autism features. The result exhibited that the interaction between individuals in the population was sharply reduced between the gene mutant carrier group and the control group. The knockdown of *dABCC4* protein in all neurons induced early onset of evening activity and hyperactivity during morning peaks and evening peaks. The *ABCC4* genetically modified flies had a rhythm sleep disorder compared to the wild-type flies (*ABCC* genes). These phenotypes were similar to defects observed in humans with autism spectrum disorder. These preliminary results have contributed to elucidate the role of this protein in the molecular mechanism of the autism.

Keywords: *ABCC*, autism spectrum disorder, *Drosophila*.

Classification number: 3.5

ngang, u não) và một số bệnh thoái hoá thần kinh (Parkinson, Alzheimer...) [7, 8].

Mặc dù tương đồng về cấu trúc và chức năng với *ABCA13* nhưng vai trò của *ABCC4* đối với hệ thần kinh và ảnh hưởng đến rối loạn tự kỷ lại chưa được biết đến và cũng chưa có một nghiên cứu nào trên mô hình động vật xác định được vai trò sinh bệnh học của gen này [3-5]. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với hai mục tiêu chính: (1) knockdown gen *dABCC4* trên mô não của ruồi giấm sử dụng hệ thống *GAL4/UAS* và (2) phân tích các biểu hiện hành vi trên ruồi knockdown *ABCC4* trong mối liên quan đến bệnh tự kỷ. Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới, góp phần làm sáng tỏ vai trò của gen này trong cơ chế phân tử của bệnh, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho những nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các dòng ruồi giấm chuyển gen thu thập từ các trung tâm lưu trữ lớn trên thế giới như Vienna Stock Center, Italy và Bloomington *Drosophila* Stock Center - Indiana, USA. Trong đó bao gồm:

- w; +; *elav-GAL4* (mã số #8760 - Bloomington Stock Center): dòng driver định hướng biểu hiện protein *GAL4* tại mô não ruồi giấm.

- w; *UAS-GFP-IR*; + (mã số #56179 - Vienna Stock Center): biểu hiện dsRNA của gen *GFP*.

- w; *UAS-dABCC-IR*₆₃₋₁₅₅; + (mã số CG7627/v2808 - Vienna Stock Center): biểu hiện dsRNA của gen *ABCC4* trên ruồi giấm, mã hoá cho protein *dABCC4* bị phân giải từ axit amin thứ 63 đến axit amin thứ 155.

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản (bao gồm 0,65% agarose, 10% glucose, 4% nấm men, 5% bột ngô và 3% bột cám gạo) và trong điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian chiếu sáng chu kỳ 12 giờ sáng: 12 giờ tối.

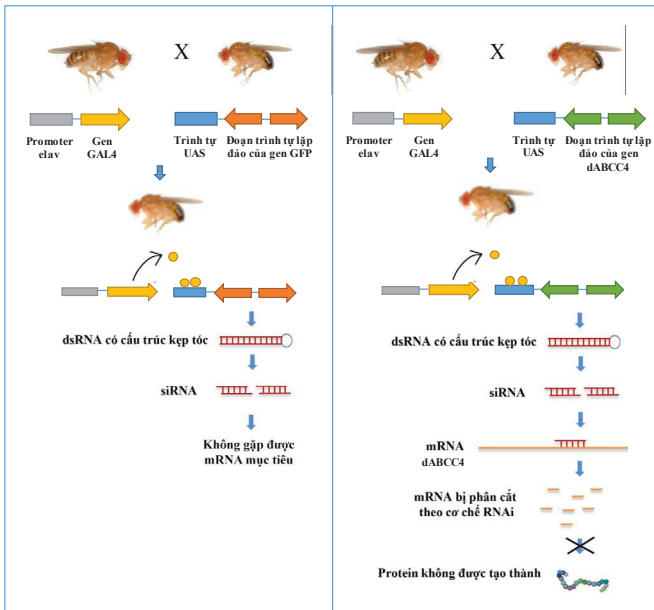
Ngoài ra, nghiên cứu cũng sử dụng: kháng thể đặc hiệu cho protein *dABCC4* (rabbit anti-*ABCC4* - Sigma-Aldrich); kháng thể đặc hiệu cho protein α -tubulin (rabbit anti-tubulin - Thermo Scientific) và Protein G Mag Sepharose™ Xtra (GE Healthcare) để tinh sạch kháng thể; các hoá chất và thiết bị dùng trong sinh học phân tử.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp lai tạo dòng ruồi giấm knockdown biểu hiện *dABCC4* tại mô não của ruồi: để knockdown gen *ABCC4* tại các tế bào thần kinh trong mô não của ruồi giấm, chúng tôi sử dụng hệ thống biểu hiện *elav-GAL4/UAS*. Trong đó, *elav* là promoter điều khiển sự biểu hiện cho protein *GAL4* tại các tế bào thần kinh trên não; protein *GAL4* sẽ bám vào vùng trình tự *UAS* trên phức hệ gen *UAS-dABCC4-IR* và kích hoạt quá trình tạo ra sợi RNA *dABCC4* mang trình tự lặp lại ngược chiều

nhau, sợi RNA này sẽ hình thành cấu trúc sợi đôi dạng “kẹp tóc”. Từ đó, hoạt hoá con đường RNAi để knockdown gen *dABCC4* tại các tế bào thần kinh ở thể hệ con lai F1.

Cách thực hiện: chúng tôi tiến hành lai theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. Sơ đồ mô tả quá trình lai tạo các dòng ruồi giấm trong nghiên cứu và cơ chế hoạt động của các thành phần trong con lai F1.

Phương pháp đánh giá biểu hiện của protein ABCC4 tại mô não ruồi giấm bằng kỹ thuật Western Blotting: dòng ruồi giấm sau khi lai tạo sẽ được tiến hành đánh giá hiệu quả knockdown protein trên mô não bằng kỹ thuật Western Blotting, sử dụng kháng thể đặc hiệu với protein ABCC4. Alpha-tubulin được sử dụng như chứng nội kiểm.

Phương pháp đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành (Climbing assay): thí nghiệm dựa trên tập tính leo trèo ngược chiều trọng lực khi có lực tác động cùng chiều trọng lực của ruồi giấm [9]. Dựa trên nguyên tắc này, khi ruồi biến đổi gen bị ảnh hưởng đến khả năng vận động sẽ bị ảnh hưởng tới khả năng leo trèo của chúng. Do ruồi cái bị ảnh hưởng bởi quá trình mang thai và đẻ trứng nên toàn bộ các thí nghiệm được tiến hành trên ruồi đực để đảm bảo tính ổn định. Các thí nghiệm được tiến hành song song giữa nhóm bệnh (knockdown gen *ABCC4*) và nhóm chứng (knockdown gen *GFP*).

- Ruồi giấm được lựa chọn làm thí nghiệm sẽ được gây mê bằng CO₂, sau đó chuyển vào ống thủy tinh (15-20 con/ống) có chia vạch từ 1 đến 5, mỗi vạch cách nhau 2 cm. Để 10 phút cho ruồi ổn định, dùng tay đập mạnh liên tục 5 lần để đưa ruồi về đáy ống thủy tinh (về cùng vạch xuất phát). Cho ruồi bò lên trong 30 s, ghi lại bằng camera, lặp lại động tác 5 lần.

- Sử dụng dữ liệu video ghi được tại 5 s đầu tiên sau khi kết thúc mỗi lần đập để phân tích, so sánh khả năng leo trèo của

ruồi ở các nhóm thí nghiệm.

- Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Image-J và thống kê bằng Excel và SPSS.

Phương pháp đánh giá khả năng tương tác cộng đồng (social space assay): phương pháp dựa theo mô tả trong nghiên cứu của Simon và cs [10]; sử dụng một buồng thí nghiệm hình tam giác cân nằm trong hai tấm kính vuông (18x18 cm), cách nhau bằng một tấm đệm acrylic 0,5 cm cho phép ruồi hoạt động trong không gian hai chiều. Thí nghiệm chỉ sử dụng ruồi đực trưởng thành ở giai đoạn 3-4 ngày tuổi để đảm bảo tính ổn định. Ruồi đực knockdown gen *GFP* được lựa chọn làm nhóm chứng.

Chọn ngẫu nhiên 40 ruồi đực mỗi nhóm, đem gây mê và chuyển vào buồng thí nghiệm, đợi chúng tỉnh lại. Đập nhẹ buồng thí nghiệm đảm bảo toàn bộ ruồi ở đáy buồng. Cho ruồi tự do vận động, giao tiếp với nhau trong 20 s. Quá trình này được ghi lại bằng camera. Sau đó phân tích khoảng cách gần nhất giữa các cá thể ruồi bằng phần mềm Image-J.

Phương pháp đánh giá nhịp sinh học của ruồi giấm (activity assay): ruồi giấm trưởng thành được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 25°C, chu kỳ sáng tối cách nhau 12 giờ trước khi sử dụng cho thử nghiệm đánh giá nhịp thức ngủ [11]. Mỗi cá thể ruồi trưởng thành được cho vào một ống thủy tinh đường kính 5 mm với một đầu có chứa thức ăn và đặt trong một thiết bị đo chuyên dụng. Toàn bộ hoạt động của ruồi được ghi nhận 24/24 h liên tục trong vòng 7-10 ngày nhờ thiết bị cảm biến kết nối với máy tính. Qua đó có thể đo được thời gian và cường độ hoạt động ban ngày/ban đêm của ruồi nhóm bệnh so với nhóm chứng.

Phân tích kết quả: kết quả của thử nghiệm tương tác cộng đồng, thử nghiệm đánh giá khả năng vận động, đánh giá nhịp sinh học của ruồi giấm, được xử lý bằng phần mềm phân tích hình ảnh Image-J, sau đó phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS. Giá trị p được tính toán sử dụng Kruskal-Wallis test.

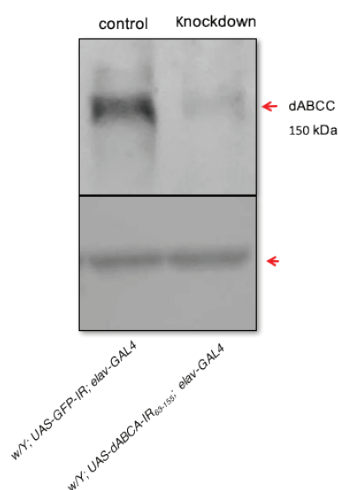
Kết quả

Mức độ tương đồng giữa protein *ABCC4* của người và protein *CG7627* ở ruồi giấm

Trình tự axit amin của protein *CG7627* ở ruồi giấm được trích xuất từ cơ sở dữ liệu UniProt (mã số Q9VLN6) và so sánh với trình tự của các thành viên trong họ protein *ABCC* ở người, sử dụng công cụ FASTA và BLAST. Kết quả so sánh cho thấy, giữa protein *CG7627* ở ruồi giấm và protein *ABCC4* ở người có tỷ lệ tương đồng (identity) là 44% và mức độ giống nhau (similarity) là 63%, cao nhất trong số các thành viên khác thuộc họ protein *ABCC*. Kết quả so sánh cũng cho thấy mức độ tương đồng về cấu trúc protein *ABCC4* giữa người và ruồi giấm với hai vùng xuyên màng (TMD) và hai vùng bám nucleotid (NBD). Các vùng chức năng này ở cả hai loài cũng được xác định với tỷ lệ tương đồng cao (TMD1 và TMD2 có tỷ lệ tương đồng lần lượt là 72 và 81%. Tỷ lệ này ở vùng NBD1 và NBD2 lần lượt là 87,5 và 100%).

Knockdown protein ABCC4 tại mô não ruồi giấm

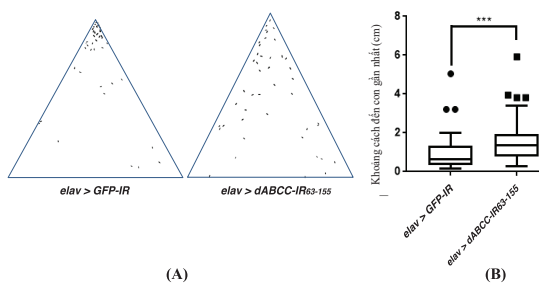
Chúng ruồi giấm sau khi lai tạo sẽ được tiến hành đánh giá hiệu quả knockdown protein trên mô não bằng kỹ thuật Western Blotting, sử dụng kháng thể đặc hiệu với protein dABCC4.



Hình 2. Kết quả Western Blotting đánh giá mức độ biểu hiện của protein dABCC4 ở mô não của ruồi giấm nhóm bệnh lý (knockdown) và nhóm đối chứng (control).

Kết quả cho thấy, xuất hiện băng protein kích thước 150 kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của protein dABCC4 ở nhóm knockdown *w/Y;UAS-dABCC4-IR₆₃₋₁₅₅;elav-GAL4* với cường độ thấp hơn so với băng protein cùng kích thước ở nhóm chứng *w/Y;UAS-GFP-IR; elav-GAL4* (hình 2). Điều này chứng tỏ mức độ biểu hiện của protein dABCC4 tại mô não của ruồi giấm ở nhóm knockdown giảm đáng kể so với nhóm chứng, khẳng định hiệu suất của quá trình knockdown và tính đặc hiệu của kháng thể. Ngoài việc sử dụng kháng thể bậc 1 đặc hiệu cho protein đích dABCC4, nghiên cứu cũng sử dụng kháng thể đặc hiệu cho alpha-tubulin làm đối chứng cho lượng protein đưa vào ở từng mẫu thí nghiệm.

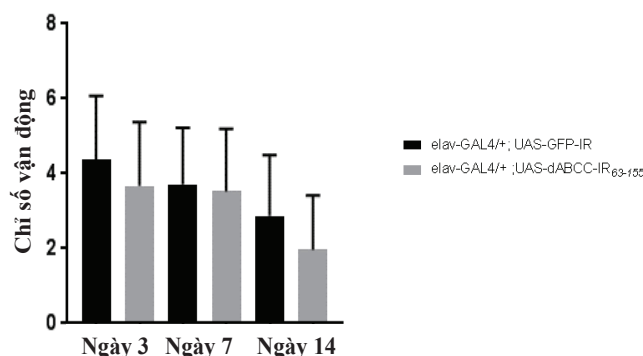
Khả năng vận động và tương tác cộng đồng



Hình 3. Thử nghiệm hành vi tương tác cộng đồng trên ruồi giấm trưởng thành.

(A) Phân bố của quần thể ruồi trong không gian. (B) Kết quả phân tích khoảng cách tương tác không gian của ruồi giấm giữa nhóm bệnh knockdown dABCC4 (*elav>dABCC4-IR₆₃₋₁₅₅*) và nhóm chứng knockdown GFP (*elav>GFP-IR*) (n=40); ***: p<0,01.

Kết quả cho thấy, ruồi giấm knockdown gen *dABCC4* có mức độ tương tác với quần thể giảm rõ rệt (hình 3). Trên 80% cá thể ruồi giấm ở nhóm bệnh có khoảng cách đến con gần nhất trên 1,5 cm, trong khi ở nhóm chứng chỉ là dưới 0,5 cm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,01$. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng tiến hành thử nghiệm leo trèo (climbing assay) trên chính quần thể ruồi này để khẳng định rằng: sự phân bố ngẫu nhiên rải rác trong không gian của ruồi giấm ở nhóm knockdown không phụ thuộc vào sự thay đổi trong khả năng vận động của chúng. Ruồi được đánh giá tại các thời điểm 3, 7 và 14 ngày tuổi. Kết quả thu được cho thấy, khả năng vận động của nhóm ruồi bệnh lý knockdown gen *dABCC4* và nhóm chứng knockdown gen *GFP* là tương đương nhau (hình 4). Do vậy, khả năng leo trèo không ảnh hưởng đến mức độ tương tác và phân bố của quần thể ruồi trong không gian.

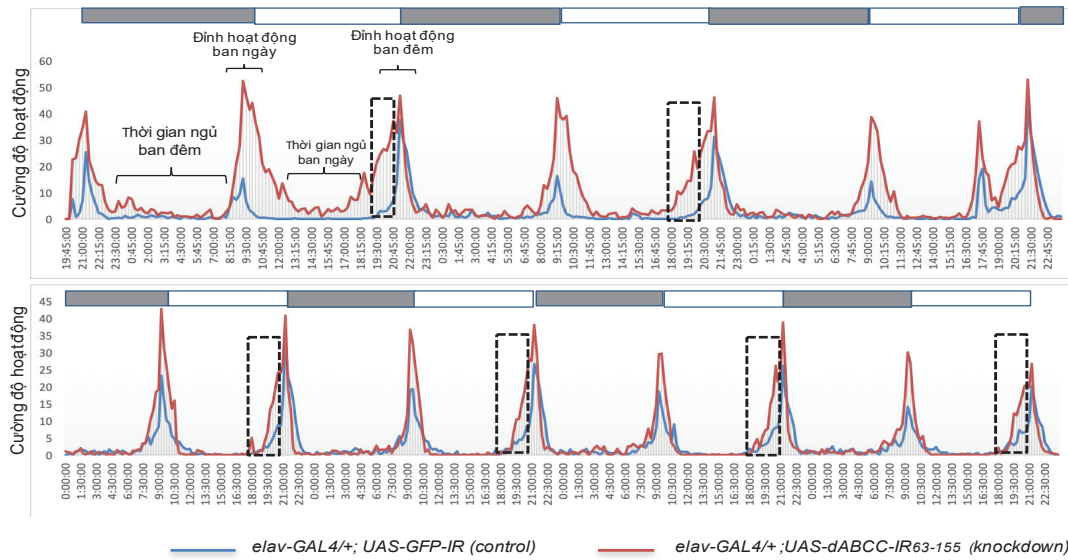


Hình 4. Kết quả thử nghiệm leo trèo xác định khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành ở thời điểm 3 ngày tuổi, 7 ngày tuổi và 14 ngày tuổi.

Kết quả không có sự khác biệt giữa nhóm ruồi bệnh lý knockdown dABCC4 và nhóm chứng knockdown GFP (n=40).

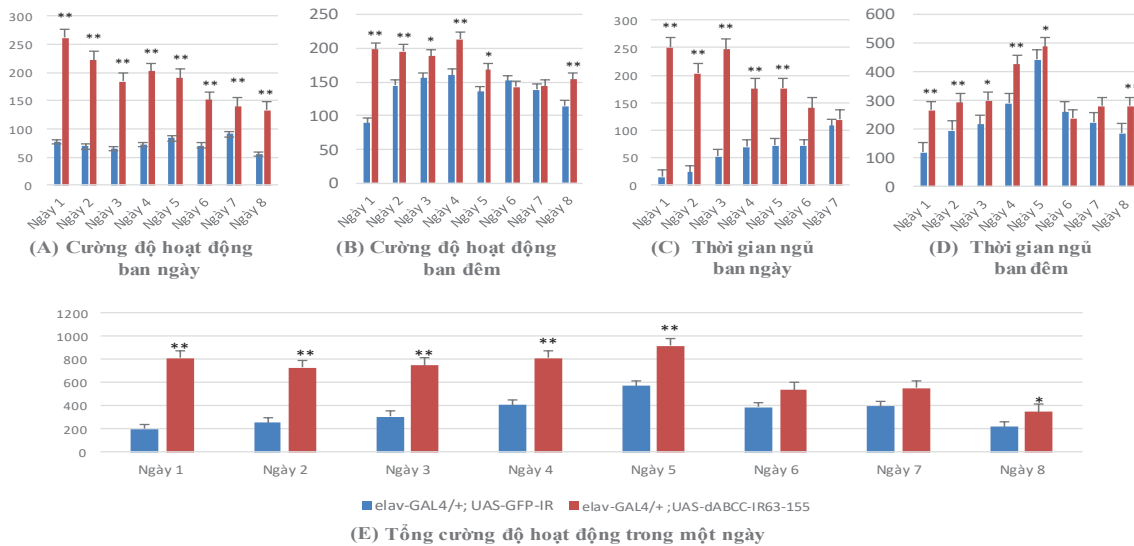
Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm

Một trong những yếu tố chẩn đoán cốt lõi của rối loạn tự kỷ là những thay đổi trong nhịp sinh học, bao gồm tổng thời gian hoạt động trong ngày, thời gian thức và ngủ. Để đánh giá tác động của việc knockdown gen *dABCC* lên nhịp sinh học ở ruồi giấm, nghiên cứu tiến hành theo dõi hoạt động thức - ngủ của 40 cá thể ở nhóm bệnh và nhóm chứng. Ruồi giấm ở cả hai nhóm được lựa chọn ở thời điểm 3-4 ngày tuổi, được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản, nhiệt độ 25°C, độ ẩm 60% và dưới điều kiện chiếu sáng 12 giờ sáng: 12 giờ tối trong tối thiểu 2 ngày, sau đó, mỗi cá thể được đưa vào 1 ống thủy tinh trong suốt đường kính 5 mm và đặt vào thiết bị đo có gắn cảm biến kết nối với máy tính. Thí nghiệm được tiến hành trong vòng 7 ngày. Tần suất hoạt động của ruồi tại mỗi khoảng thời gian được ghi nhận là số lần ruồi di chuyển qua đèn laser cảm biến. Kết quả được thống kê và phân tích bằng Microsoft Excel.



Hình 5. Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm. Trục hoành biểu thị các mốc thời gian trong một ngày. Trục tung biểu thị cường độ hoạt động của ruồi.

elav-GAL4/+; UAS-dABCC-IR⁶³⁻¹⁵⁵: ruồi knockdown dABCC4
elav-GAL4/+; UAS-GFP-IR: ruồi knockdown protein GFP làm đối chứng.



Hình 6. Kết quả phân tích nhịp thức - ngủ ở ruồi giấm bao gồm cường độ hoạt động ban ngày (A), ban đêm (B); thời gian ngủ ban ngày (C), ban đêm (D) và tổng thời gian hoạt động trong một ngày (E) giữa dòng ruồi knockdown mang kiểu gen *w/Y; UAS-dABCC-IR⁶³⁻¹⁵⁵*; *elav-GAL4/+* và dòng đối chứng *w/Y; UAS-GFP-IR; elav-GAL4/+*.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

Kết quả xác định nhịp sinh học của ruồi giấm cho thấy, ruồi hoạt động chủ yếu vào hai thời điểm trong ngày tương ứng với hai đỉnh có cường độ tín hiệu cao nhất (hình 5). Thời điểm từ 8-10 h là đỉnh hoạt động ban ngày (morning peak) và thời điểm từ 20h30-21h30 là đỉnh hoạt động ban đêm (evening peak). Theo đó, thời gian ngủ ban ngày (midday siesta) được tính là khoảng thời gian giữa hai đỉnh trong cùng một ngày còn thời gian ngủ ban đêm (nighttime sleep) được tính từ đỉnh hoạt động ban đêm của ngày hôm trước đến đỉnh hoạt động

ban ngày của ngày hôm sau. Tiến hành so sánh và phân tích cường độ hoạt động của ruồi trong một ngày nhận thấy ruồi giấm knockdown dABCC4 có xu hướng hoạt động nhiều hơn, thời gian ngủ ban ngày và thời gian ngủ ban đêm cũng dài hơn so với nhóm chứng (hình 6). Ngoài ra, ở nhóm ruồi bị biến đổi gen *dABCC4* tại mô não còn có hiện tượng khởi phát sớm đỉnh hoạt động ban đêm. Cụ thể, đỉnh hoạt động ban đêm ở nhóm ruồi bệnh lý khởi phát từ thời điểm 18h30 thay vì 20h30 như nhóm ruồi đối chứng.

Bàn luận

Với ưu thế vòng đời ngắn, dễ nuôi trong phòng thí nghiệm, có thể cung cấp số lượng nhiều trong cùng một thời điểm, hệ gen đã được giải trình tự toàn bộ và đã được chứng minh về mức độ tương đồng tới 70% gen gây bệnh trên người, ruồi giấm là mô hình thuận lợi và lý tưởng cho việc nghiên cứu bệnh liên quan đến yếu tố di truyền. Với cấu trúc hệ thần kinh hoàn thiện và chức năng hoàn toàn tương đồng trên người, ruồi giấm cũng được sử dụng làm mô hình để nghiên cứu về các bệnh lý thần kinh và vận động [12]. Trong nghiên cứu này, kết quả so sánh mức độ tương đồng của gen *ABCC4* ở người và ruồi giấm đã cho thấy mức độ bảo tồn cao giữa các vùng chức năng của gen, gợi ý về chức năng của protein là tương tự nhau cho mỗi loài.

Việc giảm biểu hiện của *dABCC* ở mô não đã gây nên một loạt những thay đổi trong khả năng tương tác xã hội và nhịp sinh học ở ruồi giấm. Nhiều nghiên cứu trước đây cũng sử dụng ruồi giấm làm sinh vật mô hình để chứng minh mối liên quan giữa một số gen như *dABCA13*, *rugose* với hội chứng rối loạn tự kỷ [3, 4, 13]. Ruồi giấm mang gen đột biến bị giảm khả năng tương tác xã hội và thay đổi nhịp thức - ngủ. Cường độ hoạt động của ruồi ở mức cao và kéo dài liên tục trong nhiều ngày. Ngoài ra, ruồi giấm mang gen *dABCA13* đột biến cũng có hiện tượng khởi phát sớm đỉnh hoạt động ban đêm [3]. Kiểu hình tương tự như ruồi giấm knockdown gen *dABCC4* và tương tự như triệu chứng rối loạn tự kỷ ở người.

Việc tổng hợp dữ liệu của nhiều nghiên cứu sử dụng mô hình ruồi giấm biến đổi gen cho bệnh tự kỷ cũng góp phần xác định được vai trò các nhóm gen liên quan, làm sáng tỏ cơ chế phân tử của bệnh. Trong họ gen *ABC* ở người, gen *ABCC* có vai trò vận chuyển nhiều loại cơ chất qua màng tế bào, trong đó có lipid [7]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra, hệ thần kinh trung ương là cơ quan tập trung hàm lượng lipid cao thứ hai, chỉ sau các mô mỡ. Do đó, chức năng vận chuyển lipid qua màng tế bào của *ABCC* đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định con đường tín hiệu và duy trì cân bằng nội môi ở các tế bào trong hệ thần kinh trung ương. Dựa trên sự tương đồng với động vật bậc cao về cấu trúc gen và trình tự axit amin mã hoá, *dABCC* ở ruồi giấm cũng được dự đoán là có vai trò vận chuyển lipid qua màng tế bào và duy trì cân bằng nội môi. Việc giảm biểu hiện của gen ở mô não là nguyên nhân gây nên sự thiếu hụt chức năng của protein này, từ đó ảnh hưởng đến các con đường truyền tin nội bào, hệ quả là làm giảm khả năng tương tác xã hội và thay đổi nhịp sinh học ở ruồi giấm. Mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu này có thể tiếp tục được sử dụng để xác định những thay đổi trong hình thái cấu trúc tế bào thần kinh, đánh giá sự thay đổi ở mức độ phân tử, từ đó xác định các gen/nhóm gen có khả năng tương tác với *dABCC* và liên quan đến rối loạn tự kỷ ở người.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được mô hình ruồi giấm biến đổi gen *ABCC* và xác định được mối liên quan với các biểu hiện của bệnh tự kỷ. Đây là những kết quả bước đầu góp phần làm

sáng tỏ vai trò của protein này trong cơ chế phân tử của bệnh, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài tiềm năng “Nghiên cứu vai trò của gen *ABCC* liên quan đến hội chứng tự kỷ bằng mô hình ruồi giấm và ứng dụng mô hình này trong sàng lọc dược liệu”, thuộc Đề án hỗ trợ nghiên cứu và xuất bản quốc tế của Trường Đại học Y Hà Nội. Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ từ phía GS Matsamitsu Yamaguchi - Khoa Sinh học ứng dụng, Học viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Faras, N. Al Ateeqi, L. Tidmarsh (2010), “Autism spectrum disorders”, *Ann. Saudi Med.*, **30**(4), pp.295-300.
- [2] Y. Tian, Z.C. Zhang, J. Han (2017), “Drosophila studies on autism spectrum disorders”, *Neurosci. Bull.*, **33**(6), pp.737-746.
- [3] I. Ueoka, H. Kawashima, A. Konishi, et al. (2018), “Novel drosophila model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A”, *Exp. Neurol.*, **300**, pp.51-59.
- [4] A. Wise, L. Tenezaca, R.W. Fernandez, et al. (2015), “Drosophila mutants of the autism candidate gene neurobeachin (*rugose*) exhibit neurodevelopmental disorders, aberrant synaptic properties, altered locomotion, impaired adult social behavior and activity patterns”, *J. Neurogenet.*, **29**, pp.135-143.
- [5] S. Iritani, Y. Torii, C. Habuchi, et al. (2018), “The neuropathological investigation of the brain in a monkey model of autism spectrum disorder with *ABCA13* deletion”, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **71**, pp.130-139.
- [6] F. Kyle-Cezar, J. Echevarria-Lima, V.M. Rumjanek (2007), “Independent regulation of *ABCB1* and *ABCC* activities in thymocytes and bone marrow mononuclear cells during aging”, *Scandinavian Journal of Immunology*, **66**(2-3), pp.238-248.
- [7] M.J. Henderson, M. Haber, A. Porro, et al. (2011), “*ABCC* multidrug transporters in childhood neuroblastoma: clinical and biological effects independent of cytotoxic drug efflux”, *J. Natl. Cancer Inst.*, **103**(16), pp.1236-1251.
- [8] H. Bronger, J. König, K. Kopplow, H.H. Steiner, et al. (2005), “*ABCC* drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier”, *Cancer Research*, **65**(24), pp.11419-11428.
- [9] S.T. Madabattula, J.C. Strautman, A.M. Bysice, et al. (2015), “Quantitative analysis of climbing defects in a drosophila model of neurodegenerative disorders”, *J. Vis. Exp.*, **100**, e.52741.
- [10] A.F. Simon, M.T. Chou, E.D. Salazar, et al. (2012), “A simple assay to study social behavior in drosophila: measurement of social space within a group”, *Genes Brain Behav.*, **11**(2), pp.243-252.
- [11] J.C. Chiu, K.H. Low, D.H. Pike, et al. (2010), “Assaying locomotor activity to study circadian rhythms and sleep parameters in drosophila”, *J. Vis. Exp.*, **43**, e.2157.
- [12] J. Bilen and N.M. Bonini (2005), “Drosophila as a model for human neurodegenerative disease”, *Annual Review of Genetics*, **39**(1), pp.153-171.
- [13] M. Coll-Tané, A. Krebbers, A. Castells-Nobau, et al. (2019), “Intellectual disability and autism spectrum disorders “on the fly”: insights from drosophila”, *Disease Models & Mechanisms*, **12**(5), DOI: 10.1242/dmm.039180.