

# VAI TRÒ CỦA SEROTONIN TRANSPORTER (SERT) TRONG VIỆC HÌNH THÀNH MẮT RUỒI GIẤM *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Phạm Lê Anh Tuấn**

*Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Y Hà Nội*

## TÓM TẮT

Protein vận chuyển Serotonin (Serotonin transporter - SerT) là một protein có tính bảo tồn cao và sự tương đồng lớn giữa nhiều loài sinh vật khác nhau, bao gồm cả người, động vật có vú khác và côn trùng. SerT nắm vai trò quan trọng trong việc đảm bảo sức khỏe hệ thần kinh. Nhưng chức năng của protein này trong các cơ quan ngoại vi vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu về chức năng của SerT trong sự hình thành mắt của ruồi giấm (*Drosophila*). Khi giảm sự biểu hiện SerT (SerT-kd) bằng phương pháp GAL4/UAS, chúng tôi nhận thấy sự xuất hiện của nhiều tế bào chết, từ đó thúc đẩy cơ chế tăng sinh để bù vào khoảng trống của những tế bào đã mất đi. Thêm vào đó, chúng tôi nhận định SerT-kd cũng làm giảm sự hoạt động của protein Akt, và kiểu hình được giảm nhẹ đáng kể khi tăng cường biểu hiện của protein PI3K. Tóm lại, những kết quả trong nghiên cứu đã chỉ ra SerT có vai trò quan trọng trong sự hình thành mắt, bằng sự điều khiển chu trình chết của tế bào thông qua con đường tín hiệu PI3K/Akt.

*Từ khóa:* Hình thành mắt, PI3K/Akt, ruồi giấm, Serotonin transporter.

## MỞ ĐẦU

Serotonin là một chất dẫn truyền thần kinh quan trọng, chịu trách nhiệm điều hòa sự vui vẻ, thỏa mãn của hệ thần kinh Trung ương. Sự thiếu hụt hay tăng quá mức Serotonin là nguyên nhân chính của các bệnh lý tâm lý như: trầm cảm, rối loạn lưỡng cực hay hoang tưởng. Việc điều hòa hàm lượng Serotonin giữa các tế bào được thực hiện bởi 2 tổ hợp chính: một là các thụ thể serotonin (Serotonin receptor) có nhiệm vụ thu nhận Serotonin đến, và hai là Serotonin transporter (SerT) với nhiệm vụ loại bỏ Serotonin dư thừa, và cũng là trọng điểm nghiên cứu của chúng tôi. Tuy hầu hết những chức năng được ghi nhận của Serotonin đều nằm ở hệ thần kinh Trung ương, nhưng phải đến 95% tổng lượng Serotonin của cơ thể lại được tổng hợp ở ruột (Terry, Margolis, 2017). Điều này đưa đến một nhận định rằng phức hệ Serotonin, trong đó có SerT, còn thực hiện nhiều chức năng trên các bào quan ngoại biên nhưng chưa được nghiên cứu cận kề. Từ giả thuyết này, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu trên mô hình ruồi giấm. Đây là mô hình động vật phổ biến bởi giá thành rẻ, vòng đời nhanh, mà lại có sự tương đồng với bộ gen người lên tới 75%. Trong đó, mắt kép của ruồi giấm là một bào quan ngoại vi kết nối trực tiếp đến hệ thần kinh Trung ương và thường được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các gene trong quá trình phát triển. Nói cách khác, mắt kép của ruồi giấm là bào quan thích hợp nhất để thực hiện nghiên cứu mở đầu về hoạt động của SerT trên hệ ngoại vi. Nghiên cứu của chúng tôi cũng có đề cập tới con đường tín hiệu Phosphoinositide 3-kinases (PI3K)/Akt. Đây là một con đường tín hiệu quan trọng được kích hoạt bởi Insulin và điều khiển sự sinh trưởng và trao đổi chất của tế bào ở hầu hết các loài động vật (Bateman 2015; Palomero *et al.*, 2007). Có nhiều nghiên cứu đã chỉ ra được mối liên hệ của con đường tín hiệu này tới sự hình thành mắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã làm sáng tỏ được mối liên kết đó cả về chiều sâu và chiều rộng, giữa SerT, PI3K/Akt và sự hình thành mắt.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Các dòng ruồi

Ruồi được nuôi ở nhiệt độ 25°C ở trong thức ăn có chứa 0.65% agar, 10% glucose, 4% nấm men, và 5% bột ngô. Ruồi mang gen UAS-dSerT-IR686-1079 (SerT-IR1) and UAS-dSerT-IR1740-1760 (SerT-IR2) được mua từ Vienna *Drosophila* Resource Center (#100584; Vienna, Áo) và Bloomington *Drosophila* Stock Center (#62985; Bloomington, Mỹ), Các dòng ruồi UAS-gfp, UAS-diap1, UAS-p35, UAS-PI3K được mua từ Bloomington *Drosophila* Stock Center. Lai ruồi bằng cách bắt 10 ruồi cái và 20 ruồi đực theo phép lai được xác định trước, được đưa vào trong cùng 1 ống thức ăn, thu F1 sau 12-14 ngày. Giảm biểu hiện gen SerT trên ruồi được thực hiện bằng phương pháp lai sử dụng nguyên lý GAL4/UAS. Ruồi cái mang driver GMR và protein GAL4, ruồi đực mang trình tự lặp đối (inverted repeat) của gen SerT kèm protein UAS. Chỉ ruồi F1 mang cả protein GAL4 và UAS mới bị giảm biểu hiện SerT trên vùng quy định của driver GAL4. Việc biểu hiện quá mức các gen gfp, diap1 và p35 cũng bằng phương pháp lai thông thường với các dòng ruồi đã mua kể trên.

**Nhuộm miễn dịch**

Xác định số lượng tế bào đang tăng sinh trên đĩa mắt ruồi sử dụng bộ kit nhuộm Click-iT EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Alexa Fluor 594 (Invitrogen, Mỹ). Các kháng thể sau được sử dụng: anti-Drosophila SerT (1:200; S1001-25H, USBio, Mỹ), anti-cleaved caspase-3 (1:500; Sigma-Aldrich, Mỹ), anti-phosphorylated-Drosophila Akt (Ser505) (1:200; Cell Signaling Technology, Mỹ). Sau khi nhuộm với kháng thể 1, mẫu được rửa và nhuộm tiếp với kháng thể 2 phù hợp bắt màu Alexa488 hoặc Alexa 594. Mẫu được gắn lên đĩa lam và chụp dưới kính hiển vi điện tử huỳnh quang Fluoview Fv10i-0 (Olympus, Nhật Bản).

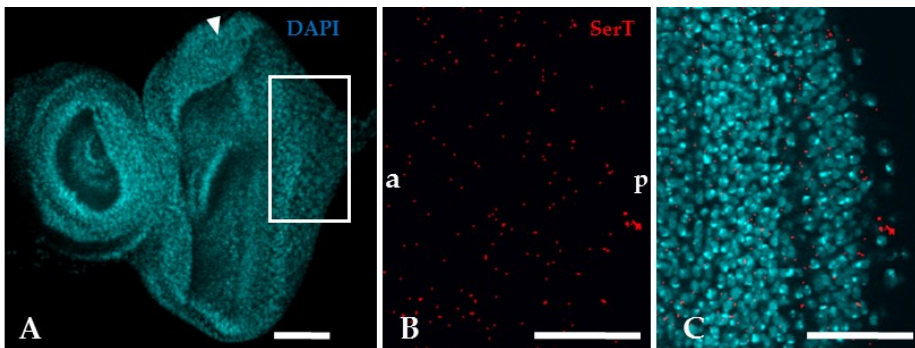
**Thông kê**

Tín hiệu được đếm bằng phần mềm Metamorphs (Molecular Devices, Mỹ) và xử lý bằng phần mềm Prism 8.0 (Graphpad, Mỹ). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần. Nghiên cứu sử dụng hàm thống kê Student's *t*-test và one-way ANOVA. Giá trị *p* < 0.05 được coi là có ý nghĩa.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

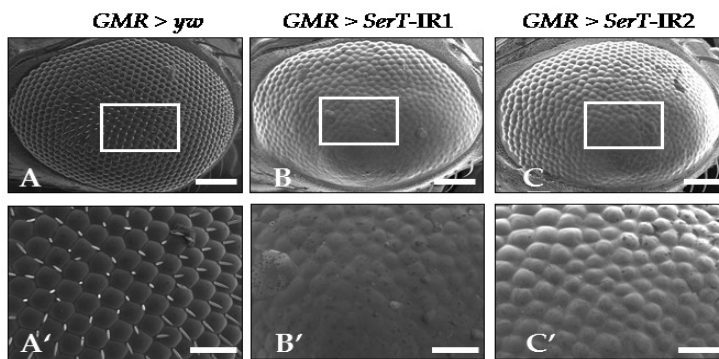
**Biểu hiện của protein SerT trên mắt ruồi giấm**

Cho đến nay chưa có một nghiên cứu nào đã kiểm tra sự biểu hiện của protein SerT trên mắt ruồi giấm. Ở giai đoạn ấu trùng, mắt của ruồi giấm tồn tại dưới dạng các đĩa phân sinh, sau đó qua quá trình biến thái hoàn toàn mới trở thành mắt hoàn chỉnh.



**Hình 1. Biểu hiện của protein SerT trên đĩa mắt ruồi giấm. (A):** Toàn bộ đĩa mắt của ruồi ở giai đoạn ấu trùng 3 được nhuộm bởi DAPI (thuốc nhuộm DNA). **(B):** Vùng posterior của đĩa mắt được nhuộm bởi kháng thể SerT. **(C):** Tương tự hình B với cả 2 thuốc nhuộm kháng thể SerT và DAPI. Thước đo: 100 μm.

Chúng tôi nhuộm kháng thể đặc hiệu cho protein SerT (màu đỏ) và nhận thấy biểu hiện rất mạnh của SerT ở đây (Hình 1), đưa đến khả năng cao rằng SerT có vai trò trong hoạt động của mắt.



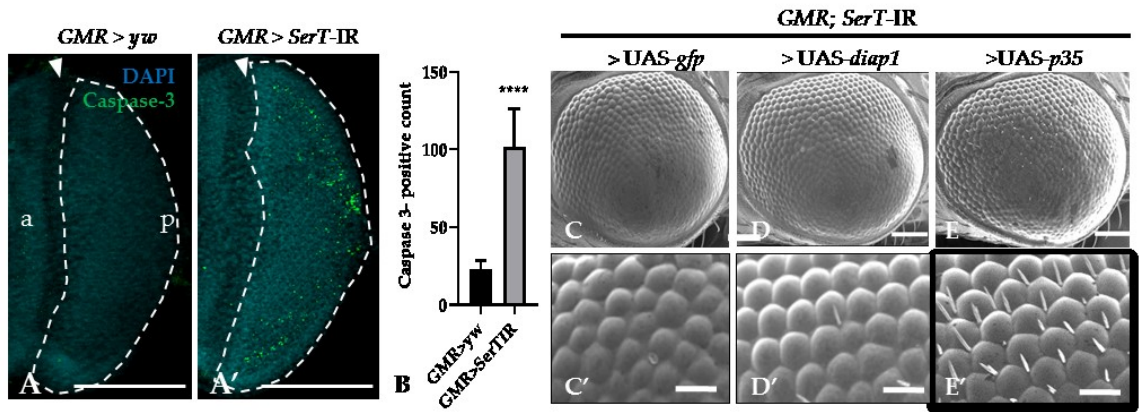
**Hình 2. Kiểu hình mắt nhám trên ruồi SerT-kd. Ảnh chụp mắt. Ảnh chụp kính hiển vi SEM mắt của ruồi (A):** chứng, **(B):** SerT-kd dòng 1, **(C):** SerT-kd dòng 2. **(A', B', C')**: Hình ảnh phóng đại lớn hơn của vùng được đóng khung. Thước đo: **(A,B,C):** 100 μm, **(A',B',C')**: 30 μm

Do đó chúng tôi đã tiến hành giảm biểu hiện gen SerT (gọi tắt là SerT-kd) trên vùng posterior của mắt bằng driver GMR-GAL4. Mắt của ruồi giấm trưởng thành là 1 tổ hợp của hơn 750 mắt đơn giống hệt nhau và sắp xếp theo cấu

trúc xác định. Kiểu hình ở hình B, B' và C, C' cho thấy từng mắt đơn đã bị biến dạng, sắp xếp chèn lên nhau, gây nên kiểu hình chúng tôi gọi là “mắt nhám”; khác hẳn so với mắt bình thường ở hình A, A'. Điều này khẳng định rõ ràng sự thiếu hụt của protein SerT đã gây ảnh hưởng tới sự phát triển bình thường của mắt.

**SerT-kd làm tăng mạnh sự chết của tế bào**

Một trong những nguyên nhân gây ra kiểu hình mắt nhám là do sự chết sớm của các tế bào. Chúng tôi kiểm tra nghi vấn này bằng cách nhuộm kháng thể đặc hiệu đối với Caspase-3 (màu xanh), một enzyme xúc tác mạnh mẽ cho quá trình phá hủy DNA của những tế bào đang chết theo chu trình. Hình 3A' cho thấy tín hiệu enzyme Caspase-3 tăng mạnh ở ruồi SerT-kd, biểu thị các tế bào đang chết rất nhanh, đặc biệt là ở vùng rìa phải của đĩa mắt, điều mà bình thường sẽ không xảy ra bởi ở giai đoạn này các tế bào đang sinh trưởng và phân chia mạnh.

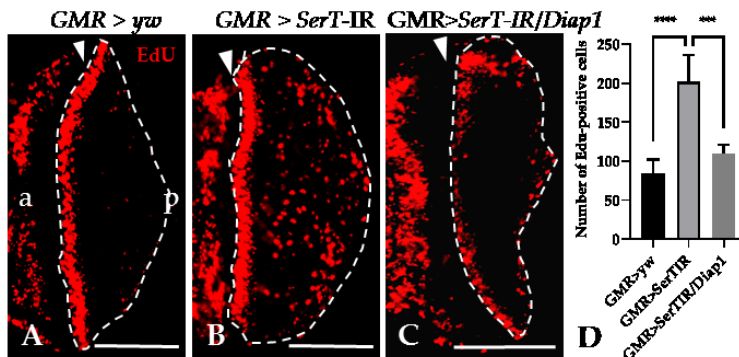


Hình 3. SerT-kd gây chết tế bào. Đĩa mắt được nhuộm với kháng thể Caspase-3 của ruồi (A): đối chứng, (A'): SerT-kd. (B): Đồ thị biểu diễn số lượng tín hiệu Caspase-3 trong vùng đóng khung, \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . Ảnh chụp kính hiển vi SEM của ruồi mang (C): SerT-kd và chèn gene đối chứng *gfp*, (D): SerT-kd và chèn gene *Diap1*, (E): SerT-kd và chèn gene *p35*. (C', D', E'): Ảnh phóng đại lớn hơn của C, D, E. Thước đo: (A, A', C-E): 100  $\mu$ m, (C'-E'): 30  $\mu$ m

Để kiểm tra lại vấn đề này, chúng tôi tiến hành ức chế khả năng chết theo chu trình của tế bào bằng cách biểu hiện quá mức hai gene ức chế, *diap1* hoặc *p35*, vào ruồi SerT-kd. Kết quả cho thấy những con ruồi SerT-kd được biểu hiện *diap1* và *p35* được “giải cứu” khỏi kiểu hình mắt nhám (hình 3D, D', E, E'), khẳng định chính việc tế bào chết quá mức đã gây ra kiểu hình mắt nhám này.

**SerT-kd thúc đẩy cơ chế tăng sinh bồi hoàn (compensatory proliferation mechanism)**

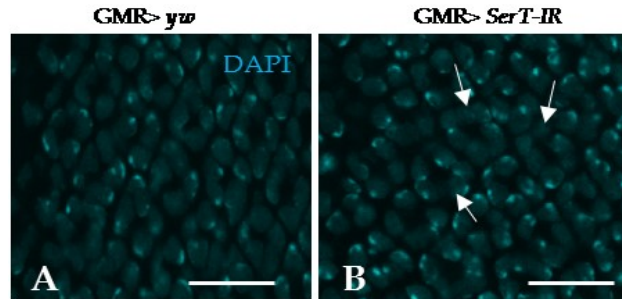
Số lượng tế bào trong đĩa mắt của ruồi giấm được giữ xấp xỉ 750 tế bào. 750 tế bào này qua quá trình sinh trưởng sẽ trở thành 750 mắt đơn của ruồi trưởng thành. Chúng tôi giả thuyết nếu tế bào bị chết nhiều sẽ gây ra thiếu hụt số lượng lớn, cơ chế tăng sinh bồi hoàn sẽ được kích hoạt ở những tế bào xung quanh tế bào đã chết. Thật vậy, Hình 4B cho thấy lượng tế bào đang tăng sinh (màu đỏ) được nhuộm bởi EdU tăng vọt ở mẫu SerT-kd, so với mẫu đối chứng hình 4A.



Hình 4. Cơ chế tăng sinh bồi hoàn được kích hoạt trên ruồi SerT-kd. Đĩa mắt được nhuộm EdU giúp phát hiện tế bào đang tăng sinh của ruồi (A): đối chứng, (B): SerT-kd, (C): SerT-kd được chèn gene *Diap1*. (D): Biểu đồ biểu diễn số lượng tế bào tăng sinh được đếm trong vùng đóng khung, \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . Thước đo: 100  $\mu$ m

Ngược lại, mẫu SerT-kd được biểu hiện quá mức gen ức chế chết theo chu trình, *Diap1*, lại cho thấy lượng tế bào tăng sinh không tăng đáng kể (Hình 4C). Điều này khẳng định sự chết theo chu trình của tế bào đã xảy ra trước, sau đó mới dẫn tới sự tăng sinh bồi hoàn, chứng minh giả thuyết của chúng tôi là chính xác.

Thêm vào đó, chúng tôi phát hiện hình dạng bất thường của nhân ở các tế bào nón (cone cell) khi nhuộm với thuốc thử DAPI.

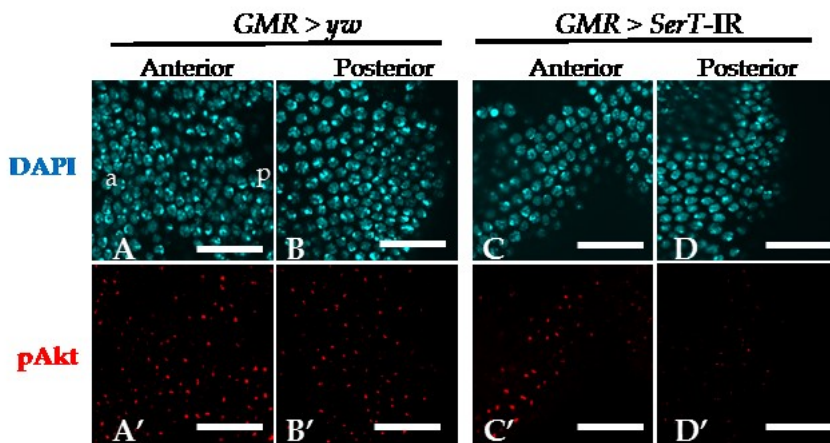


**Hình 5. Bất thường ở nhân của các tế bào nón. Nhân của tế bào nón được nhuộm với DAPI của ruồi (A): đối chứng và (B): SerT-kd. Mũi tên chỉ tới các vị trí nhân bất thường. Thước đo: 5  $\mu$ m**

Các tế bào nón ở giai đoạn này của đĩa mắt ruồi giảm được xếp theo tổ hợp từng 4 tế bào, qua quá trình biến thái sẽ tăng sinh và biệt hóa theo chiều sâu, và cuối cùng sẽ trở thành một phần của từng đơn vị mắt. Hình 5 cho thấy ở 1 vài tổ hợp tế bào nón có sự xuất hiện của 1 hoặc 2 dị nhân (mũi tên), khả năng cao là do các tế bào này tăng sinh quá mức do cơ chế bồi hoàn. Tuy cơ chế tăng sinh bồi hoàn chỉ được kích hoạt đủ để bổ sung lượng tế bào đã chết, cơ chế này diễn ra trong đúng quá trình phát triển của đĩa phân sinh mắt ruồi lại gây nên hậu quả khó sửa chữa. Chính các tế bào tăng sinh này đã tổng hợp nên quá nhiều DNA không kiểm soát, làm nhân tế bào phình ra (có thể xuất hiện nhân mới), ảnh hưởng tới sự sắp xếp của tổ hợp tế bào nón, từ đó gây ra hình dạng bất thường của các đơn vị mắt ở ruồi trưởng thành, và cuối cùng dẫn đến kiểu hình mắt nhám.

**SerT-kd gây ra kiểu hình thông qua con đường tín hiệu PI3K/Akt**

Tiếp theo, chúng tôi cần xác định con đường nào đã tham gia vào chuỗi tín hiệu bắt đầu từ SerT và gây ra kiểu hình mắt nhám. Con đường PI3K/Akt là một ứng cử viên sáng giá bởi: (1) PI3K/Akt được kích hoạt bởi Insulin và Insulin lại được điều tiết nhờ sự cảm ứng của Serotonin (Galagovsky *et al.*, 2014); (2) PI3K/Akt tham gia ổn định chu kỳ tế bào bằng cách ức chế sự chết theo chu trình (Meng *et al.*, 2017).



**Hình 6. SerT-kd làm giảm sự hoạt động của pAkt. Các tế bào ở đĩa cánh của 2 dòng ruồi (A,B,A',B'): đối chứng và (C,D,C',D'): SerT-kd ở 2 vùng khác nhau Anterior là vùng không bị ảnh hưởng bởi SerT-kd. Posterior là vùng bị ảnh hưởng bởi SerT-kd. (A,B,C,D): thuốc nhuộm DAPI cho nhân tế bào. (A',B',C',D'): kháng thể cho pAkt. Thước đo: 15  $\mu$ m**

Khi hoạt động, PI3K sẽ kích hoạt Akt bằng cách phosphoryl hóa Akt thành pAkt, pAkt sẽ đi vào nhân tế bào để thực hiện chức năng của mình. Vì vậy chúng tôi sử dụng kháng thể đặc hiệu cho pAkt để xác định sự hoạt động

của con đường tín hiệu này. Hình 6D' cho thấy ở vùng posterior bị ảnh hưởng bởi SerT-kd, tín hiệu pAkt bị giảm mạnh, so với mẫu đối chứng (hình 6A',B') hay kể cả vùng anterior trên cùng một đĩa mắt (hình 6C'). Kết quả này đã chứng minh được rằng SerT-kd thực sự đã làm giảm sự hoạt động của con đường tín hiệu PI3K/Akt. Như vậy, với việc sử dụng mô hình ruồi giấm, chúng tôi đã xác định được một chức năng mới của protein SerT trong quá trình phát triển mắt. Thiếu hụt SerT gây giảm hoạt động con đường PI3K/Akt, dẫn tới tăng mạnh sự chết của tế bào. Sau đó, cơ chế tăng sinh bởi hoàn được kích hoạt gây tăng sinh không kiểm soát ở những tế bào nón, làm cho chúng bị chèn ép và sắp xếp sai lệch và cuối cùng là tạo thành kiểu hình mắt nhám.

## KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh được mối liên kết giữa SerT và việc hình thành mắt của ruồi giấm. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng nghiên cứu cho các chức năng mới của SerT trên các bào quan ngoại vi. Trên người, SerT là đích nhắm cho nhiều loại thuốc chữa trị trầm cảm, nhưng nhiều tác dụng phụ của thuốc vẫn chưa được giải thích. Nghiên cứu này có thể là một gợi ý cho những nghiên cứu liên quan đến vấn đề trên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bateman, Joseph M (2015) Mechanistic Insights into the Role of MTOR Signaling in Neuronal Differentiation. *Neurogenesis* 2(1): e1058684.
- Galagovsky D, Wappner P (2014) The Drosophila Insulin-Degrading Enzyme Restricts Growth by Modulating the PI3K Pathway in a Cell-Autonomous Manner. *Mol Biol Cell* 25(6): 916–24.
- Meng Y, Wang W, Kang J, Wang X, Sun L(2017) Role of the PI3K/AKT Signalling Pathway in Apoptotic Cell Death in the Cerebral Cortex of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Exp Ther Med* 13(5): 2417–22.
- Palomero T, Sulis ML, Ferrando AA (2007) Mutational Loss of PTEN Induces Resistance to NOTCH1 Inhibition in T-Cell Leukemia. *Nat Med* 13(10): 1203–1210.
- Terry N, Margolis KG (2017) Serotonergic Mechanisms Regulating the GI Tract: Experimental Evidence and Therapeutic Relevance. *Handbook of Experimental Pharmacology* 239: 319–42.

## ROLE OF SEROTONIN TRANSPORTER IN EYE DEVELOPMENT OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Pham Le Anh Tuan**

*Department of Medical Technology, Hanoi Medical University*

### SUMMARY

Serotonin transporter (SerT) in the brain is an important neurotransmitter transporter involved in mental health. However, its role in peripheral organs is poorly understood. In this study, we investigated the function of SerT in the development of the compound eye in *Drosophila melanogaster*. We found that SerT knockdown led to excessive cell death and an increased number of cells in S-phase in the posterior eye imaginal disc. Furthermore, the knockdown of *SerT* in the eye disc suppressed the activation of Akt, and the introduction of *PI3K* effectively rescued this phenotype. These results suggested that SerT plays a role in the healthy eye development of *D. melanogaster* by controlling cell death through the regulation of the PI3K/Akt pathway.

*Keywords:* PI3K/Akt, eye development, *Drosophila*, Serotonin transporter.

\* Author for correspondence: Email: phamleanhtuan.2807@gmail.com