

PROTEIN LIPIN ĐIỀU KHIỂN SỰ HÌNH THÀNH CÁNH Ở RUỒI GIẤM

Phạm Lê Anh Tuấn^{1*}, Trần Duy Bình², Phạm Lê Anh Minh³

¹ Khoa Kỹ thuật Y học, Trường Đại học Y Hà Nội

² Học viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản

³ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Lipin hoạt động chủ yếu trên các mô mỡ, các cơ điều khiển xương, và trong hoạt động của gan; thực hiện đồng thời hai chức năng (1) dưới dạng enzym Phosphatidate phosphatase trong lưới nội chất và (2) chức năng phiên mã các gen oxi hóa axit béo trong nhân tế bào. Tuy nhiên, nhiều bằng chứng vẫn đề ngỏ vai trò của lipin các quá trình phát triển của sinh vật. Trong nghiên cứu này, sử dụng mô hình ruồi giấm (*Drosophila melanogaster*), chúng tôi tiến hành xác định vai trò của Lipin trên sự hình thành cánh của chúng. Cụ thể, ruồi bị knockdown (giảm biểu hiện gen) lipin cho kiểu hình cánh bất thường. Hơn thế nữa, chúng tôi xác định kiểu hình này được gây ra bởi sự đứt gãy của các DNA trong tế bào đĩa cánh và sự xuất hiện của số lượng lớn các tế bào chết. Điều này dẫn tới sự tích tụ vượt mức các tế bào trong kỳ tăng sinh, trong khi các tế bào này lại bị ngăn chặn tiến vào kỳ phân bào. Tóm lại, kết quả của nghiên cứu này cho thấy Lipin tham gia vào sự tổng hợp DNA và đóng góp vào sự điều hòa chu kỳ tế bào trong sự hình thành cánh ở ruồi giấm. Nghiên cứu này mở ra một chức năng mới của một gen điều phối sự tích tụ năng lượng như Lipin trên sự phát triển, ở cả trên người và động vật.

Từ khóa: Hình thành cánh, Lipin, ruồi giấm.

MỞ ĐẦU

Lipin có hai chức năng chính. Trong lưới nội chất, Lipin giữ vai trò của một enzyme dạng phosphatidate phosphatases (PAP). Lipin xúc tác cho phản ứng dephosphorylation chuyển hóa phosphatidic acid (PA) thành diacylglycerol (DAG). DAG sau đó lại được chuyển hóa thành triacylglycerol (TAG), là dạng lipid chính được các bào quan mỡ tích tụ dự trữ trong tế bào (Coleman & Lee 2004). Điều này cho thấy, Lipin có vai trò rất quan trọng trong sự trao đổi năng lượng - nguồn sống của tế bào cũng như cơ thể. Chức năng thứ hai của Lipin được thực hiện trong nhân tế bào. Tại đây Lipin hoạt động dưới dạng yếu tố kích hoạt phiên mã. Lipin cùng một số yếu tố khác hình thành nên hai phức hợp: Proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) và Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Hai phức hợp này đóng vai trò thiết yếu trong sự điều hòa các gen điều khiển hoạt động ty thể và quá trình oxi hóa các axit béo (sản phẩm phụ của quá trình giải phóng năng lượng) (Lin *et al.*, 2005; Santos-Rosa *et al.*, 2005). Các chức năng này của Lipin đã được chứng minh là bảo toàn từ sinh vật đơn bào cho tới động vật có vú. Ở con người, chúng ta đã phát hiện được 3 protein lipin lần lượt đặt tên là lipin 1, 2 và 3, phân biệt ở các bào quan mà chúng hoạt động (Péterfy *et al.*, 2001). Lipin 1 có phạm vi hoạt động rộng nhất: trong các bào quan mỡ, hệ tuần hoàn, hệ cơ xương và cũng là protein Lipin được nghiên cứu kỹ lưỡng nhất. Trong khi đó, Lipin 2 được tìm thấy nhiều trong gan, Lipin 3 thì xuất hiện nhiều ở hệ tiêu hóa. Chức năng của Lipin được các nhà khoa học nhận định không chỉ dừng lại ở đó, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra mối liên hệ giữa Lipin và mạng lưới insulin, hoạt động của lưới nội chất, hệ miễn dịch... Trong nghiên cứu này, chúng tôi xét đến mối liên quan của Lipin tới chu kỳ tế bào và sự phát triển của cơ thể.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các dòng ruồi, phương pháp lai và knockdown

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 gene UAS-*dLipin-IR*₂₆₅₋₂₇₂ và UAS-*dLipin-IR*₂₇₇₋₃₈₀ được mua từ Vienna *Drosophila* Resource Center (Vienna, Áo) và Bloomington *Drosophila* Stock Center (Bloomington, Mỹ), Các dòng ruồi khác 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, đưa vào trong cùng 1 ống thức ăn, thu F1 sau 12-14 ngày. Giảm biểu hiện gen Lipin 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 Lipin kèm protein UAS. Chỉ ruồi F1 mang cả protein GAL4 và UAS mới bị giảm biểu hiện Lipin trên vùng quy định của driver GAL4 (Binh *et al.*, 2019).

Nhuộm miễn dịch

Tất cả các đĩa cánh đều được lấy ở ấu trùng giai đoạn 3 (3rd-instar larvae). Xác định số lượng tế bào đang tăng sinh trên đĩa cánh ruồi sử dụng bộ kit nhuộm Click-iT EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Alexa Fluor 594 Kit (Invitrogen, Mỹ) (Pinto *et al.*, 2013). Các kháng thể sử dụng: anti-*Drosophila* Lipin (1:2000; cung cấp bởi Prof. Dr. Michael Lehmann- University of Arkansas, Arkansas, Mỹ), anti-cleaved caspase-3 (1:500; Sigma-Aldrich, Mỹ),

anti-phosphorylated-Histone 3 (Ser10) (1:200; Cell Signaling Technology, Mỹ), và anti-γH2Av antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, 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 (Pham *et al.*, 2020). Mẫu được gắn lên đĩa lam và chụp dưới kính hiển vi điện tử huỳnh quang Fluoview Fv10i-0 (Olympus, Nhật Bản).

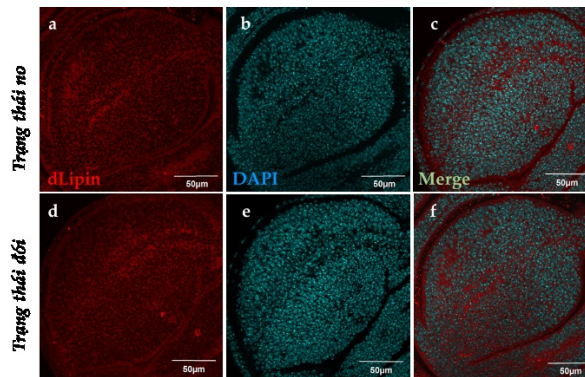
Thống kê

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 one-way ANOVA. Giá trị $p < 0.05$ được coi là có ý nghĩa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

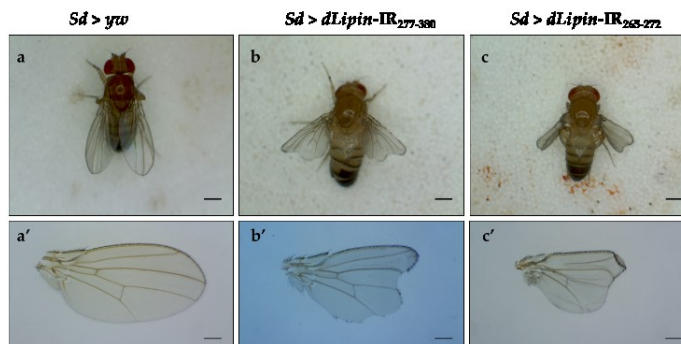
Vị trí biểu hiện của protein Lipin trên đĩa cánh ruồi giấm

Ở giai đoạn ấu trùng, cánh của ruồi giấm tồn tại dưới dạng các đĩa phân sinh, sau đó qua quá trình biến thái hoàn toàn mới trở thành cánh hoàn chỉnh. Đầu tiên, chúng tôi kiểm tra sự biểu hiện của protein Lipin trên đĩa cánh ở ấu trùng giai đoạn 3 của ruồi giấm.



Hình 1. Biểu hiện của protein Lipin trên vùng “pouch” của đĩa cánh ruồi giấm. (a,b,c): Đĩa cánh tách từ ấu trùng đang ở trạng thái no được nhuộm với (a) kháng thể kháng Lipin (màu đỏ), (b) DAPI (màu xanh, thuốc nhuộm DNA) và (c) kết hợp. (d,e,f): Đĩa cánh tách từ ấu trùng đang ở trạng thái đói được nhuộm với (d) kháng thể kháng Lipin (màu đỏ), (e) DAPI (màu xanh, thuốc nhuộm DNA) và (f) kết hợp

Hình 1 cho thấy Lipin biểu hiện rất nhiều trên vùng “pouch” của đĩa cánh và đều nằm ngoài nhân (đánh dấu bởi màu xanh). Đồng thời, chúng tôi tiến hành thí nghiệm này trên cả ấu trùng ở trạng thái no và đói để xác định sự hoạt động của Lipin trên đĩa cánh liệu có phụ thuộc vào năng lượng. Kết quả cho thấy ở cả 2 trạng thái, lượng Lipin là không thay đổi, dẫn tới kết luận chức năng của Lipin trên cánh là một chức năng riêng biệt, không liên quan tới hai chức năng chính đã biết.



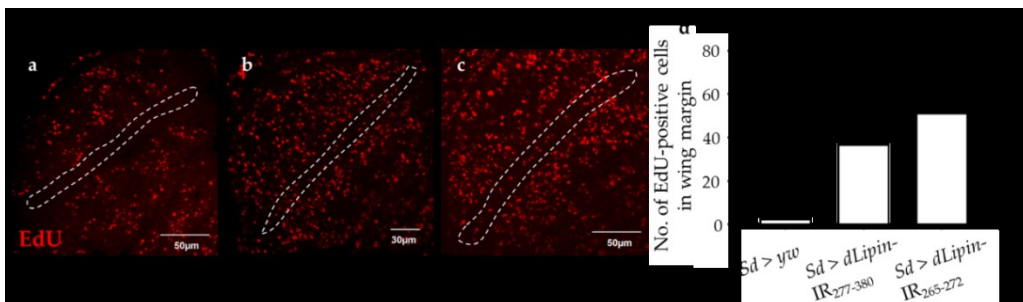
Hình 2. Kiểu hình cánh bất thường trên ruồi Lipin-kd.

Ảnh chụp cánh của ruồi (a,a’): đối chứng, (b,b’): Lipin-kd dòng 1, (c,c’): Lipin-kd dòng 2

Do sự biểu hiện mạnh mẽ của Lipin trên đĩa cánh, chúng tôi đã tiến hành knockdown gen Lipin (gọi tắt là Lipin-kd) trên vùng túi (pouch) và viền (margin) của đĩa cánh bằng driver *sd-GAL4*. Chúng tôi thu được kiểu hình cánh “khuyết” ở đời F1, khẳng định rõ ràng sự thiếu hụt của protein Lipin đã gây ảnh hưởng tới sự phát triển bình thường của cánh. Hơn nữa, vùng bị khuyết đó lại phù hợp với vị trí mà vùng pouch và margin của đĩa cánh sẽ trở thành.

Lipin-kd làm tăng số lượng các tế bào đi vào pha S, nhưng lại ngăn cản tế bào đi vào pha M

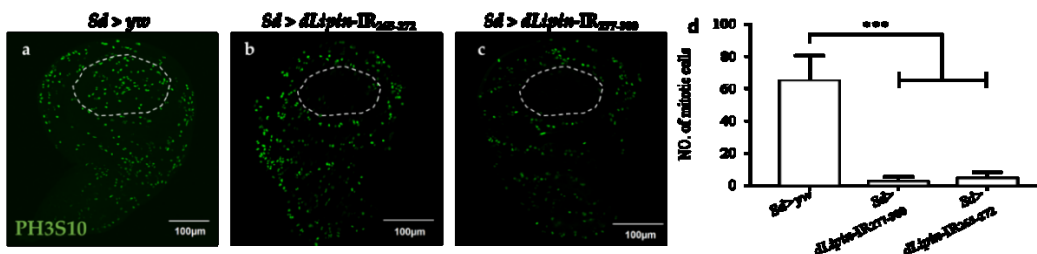
Cánh của ruồi là một bào quan được hình thành từng bước qua quá trình biến thái hoàn toàn, các tế bào ở mỗi vùng trên cánh được tăng sinh, phân chia và di chuyển theo lực và hướng xác định để tạo thành đôi cánh hoàn chỉnh. Chính vì vậy, chu kỳ tế bào có vai trò rất lớn trong việc hình thành cánh. Từ kiểu hình cánh khuyết, chúng tôi nhận định chu kỳ của các tế bào ở cánh đã bị ảnh hưởng lớn. Do đó, chúng tôi kiểm tra số lượng các tế bào ở trong 2 pha S và M của chu kỳ tế bào lần lượt bằng thuốc nhuộm EdU (Hình 3) và kháng thể kháng Histone 3 đã phosphoryl hóa tại vị trí Serine 10 (pH3S10, Hình 4).



Hình 3. Lipin-kd đẩy mạnh tế bào đi vào pha S

Đĩa cánh được nhuộm với thuốc nhuộm EdU giúp phát hiện tế bào đang trong pha S của ruồi (a): đối chứng, (b): Lipin-kd dòng 1 và (c) Lipin-kd dòng 2. (d): Biểu đồ biểu diễn số lượng tế bào trong pha S trong vùng margin (bao quanh bởi đường kẻ đứt), ***p < 0.001

Hình 3 cho thấy số lượng tế bào đang ở trong pha S (pha tăng sinh để tổng hợp vật chất di truyền) ở 2 dòng ruồi Lipin-kd tăng cao hơn rất nhiều so với đối chứng, đặc biệt là ở trong vùng margin. Trong khi đó, hình 4 lại cho thấy điều ngược lại ở pha M (pha phân bào khi các tế bào sẽ phân chia), số lượng tế bào pha M ở vùng bị ảnh hưởng bởi Lipin-kd giảm mạnh. Điều này đặt tới một giả thiết rằng có thể Lipin-kd đã ngăn chặn sự dịch chuyển của tế bào từ pha S sang M, hay nói cách khác là chốt chặn G2 giữa 2 pha này đã được kích hoạt ngoài ý muốn.

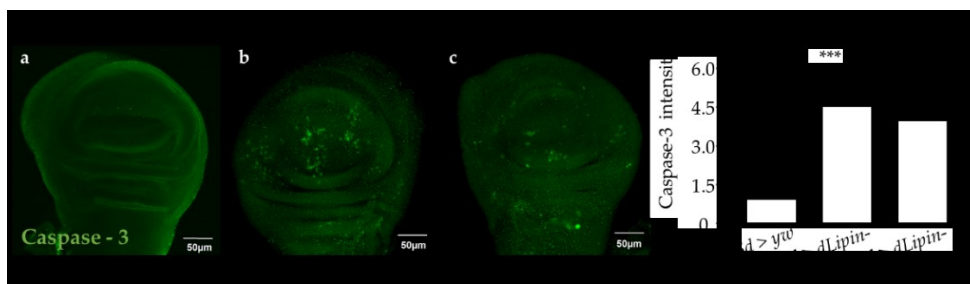


Hình 4. Lipin-kd ngăn cản tế bào đi vào pha M

Đĩa cánh được nhuộm với kháng thể PH3S10 giúp phát hiện tế bào đang trong pha M của ruồi (a): đối chứng, (b): Lipin-kd dòng 1 và (c) Lipin-kd dòng 2. (d): Biểu đồ biểu diễn số lượng tế bào trong pha M trong vùng pouch (bao quanh bởi đường kẻ đứt). ***p < 0.001

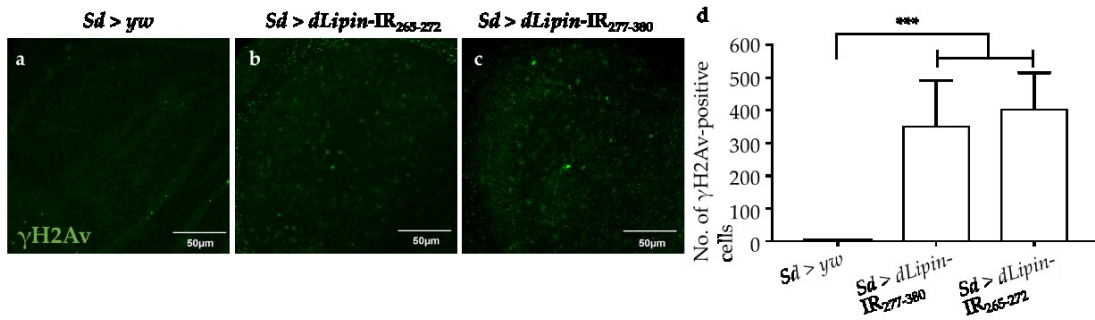
Lipin-kd gây đứt gãy DNA dẫn tới chết tế bào

Một trong những nguyên nhân chính gây ra sự dừng dịch chuyển của tế bào từ G2 vào pha M là sự chết tế bào. Chúng tôi sử dụng kháng thể cho Caspase-3, một enzyme quan trọng tham gia vào quá trình phân giải các tế bào chết, để kiểm tra giả thiết này. Quả thật, chúng tôi nhận thấy sự tăng mạnh của tín hiệu Caspase-3 ở 2 dòng ruồi Lipin-kd (hình 5), đồng nghĩa với việc số lượng tế bào chết tăng cao.



Hình 5. Lipin-kd làm tăng cường sự chết của tế bào

Vùng pouch của đĩa cánh được nhuộm kháng thể đặc hiệu kháng Caspase-3 của ruồi (a): đối chứng, (b): Lipin-kd dòng 1 (c): Lipin-kd dòng 2. (d): Biểu đồ biểu diễn số lượng tín hiệu Caspase-3, ***p < 0.001



Hình 6. Lipin-kd làm đứt gãy DNA

Vùng pouch của đĩa cánh được nhuộm kháng thể đặc hiệu kháng γ H2Av của ruồi (a): đối chứng, (b): Lipin-kd dòng 1 (c): Lipin-kd dòng 2. (d): Biểu đồ biểu diễn số lượng tín hiệu γ H2Av, ***p < 0.001

Từ đây chúng tôi đặt ra một nghi vấn, Lipin-kd đã làm thúc đẩy mạnh các tế bào tăng sinh và tổng hợp DNA trong pha S, nhưng các tế bào này lại không đi vào được pha M, vậy thì liệu rằng chính các vật chất di truyền được tổng hợp quá mức này đã ngăn cản diễn tiến của chu kỳ tế bào. Chúng tôi sử dụng kháng thể cho Histone 2 tiểu phần gamma (γ H2Av). Đây là một marker thường được dùng để phát hiện sự đứt gãy của DNA. Kết quả trong hình 6 cũng đồng tình với giả thiết đó của chúng tôi, khi lượng DNA đứt gãy xuất hiện nhiều ở 2 dòng ruồi Lipin-kd. Tóm lại, việc tổng hợp DNA dư thừa ở pha S đã làm xuất hiện đứt gãy hàng loạt, các tế bào với DNA hỏng này không thể vượt qua chốt chặn G2 và lập tức bị đào thải chết đi, trước khi kịp đi vào pha M.

KẾT LUẬN

Sử dụng mô hình ruồi giấm, chúng tôi đã xác định được một chức năng mới của protein Lipin trong quá trình phát triển cánh. Thiếu hụt Lipin làm chu kỳ tế bào bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Các tế bào đang phát triển bị đẩy mạnh vào pha S để tổng hợp DNA không kiểm soát gây nên đứt gãy tổn thương hàng loạt. Tế bào không thể sửa chữa những DNA này nên tự chết đi theo chu trình và không thể tiến vào pha M, tạo nên sự không đồng bộ trong chu kỳ tế bào. Trên diện rộng, các tế bào tăng sinh pha S nhiều nhưng không phân chia làm sự dịch chuyển của các tế bào trong giai đoạn sinh trưởng của cánh bị ảnh hưởng. Kết cục, chuỗi hoạt động sai này dẫn tới việc thiếu hụt tế bào tại các vùng rìa của cánh và gây nên kiểu hình cánh khuyết.

Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh được mối liên kết giữa Lipin và việc hình thành cánh ở ruồi giấm. Kết quả nghiên cứu mở ra hướng nghiên cứu cho các chức năng mới của Lipin mà không liên quan tới năng lượng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Binh T, Pham T, Tran M, Thao, D, and Kaeko K (2019). LSD-2 Dysfunction Induces DFoxO-Dependent Cell Death in the Wing of *Drosophila Melanogaster*. *Biochem Biophys Res Com* 509(2): 491-97.
- Coleman R, Douglas L (2004). Enzymes of Triacylglycerol Synthesis and Their Regulation. *Prog Lipid Res* 43(2): 134-76.
- Lin J, Christoph H, Bruce MS (2005). Metabolic Control through the PGC-1 Family of Transcription Coactivators. *Cell Metabol* (6): 361-70.
- Péterfy M, Phan J, Xu P, Reue K (2001). Lipodystrophy in the Fld Mouse Results from Mutation of a New Gene Encoding a Nuclear Protein, Lipin. *Nature Genet* 27(1): 121-24.
- Pham T, Tran DB, Guanchen L, Thanh N, Yen N, Ritsuko S, Tran M, Kaeko K (2020). Role of Serotonin Transporter in Eye Development of *Drosophila Melanogaster*. *Int J Mol Sci* 21(11): 4086.
- Pinto S, Katrin S, Stefanie E, Hans-Jürgen S, Petra B, Bruno K (2013). An Organotypic Coculture Model Supporting Proliferation and Differentiation of Medullary Thymic Epithelial Cells and Promiscuous Gene Expression. *J Immunol* 190(3): 1085-93.
- Santos-Rosa H, Joanne L, Neil G, Sew P, Symeon S (2005). The Yeast Lipin Smp2 Couples Phospholipid Biosynthesis to Nuclear Membrane Growth. *EMBO Journal* 24(11): 1931-41.

ROLE OF LIPIN IN WING DEVELOPMENT OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Pham Le Anh Tuan^{1*}, Tran Duy Binh², Pham Le Anh Minh³

¹ Hanoi Medical University

² Kyoto Institute of Technology, Japan

³ Vietnam University of Agriculture

SUMMARY

Lipin plays important roles in lipid metabolism in adipocyte tissue, skeletal muscle, and the liver. Lipin exhibits dual function (1) as phosphatidate phosphatase in endoplasmic reticulum, and (2) as transcriptional co-activator in nucleus. Still, multiple evidences suggest its functions during development, which is remains under investigation. In this study, we analyzed the role of *Drosophila* Lipin in wing development. Specifically, we showed that the tissue-selective knockdown of *Lipin* in the wing pouch led to an atrophied wing. Moreover, elevated DNA damage was observed in the wing imaginal disc of *Lipin*-knockdown flies and large numbers of dead cells were also found. Lipin dysfunction induced accumulation of cells in S phase and significantly reduced the number of mitotic cells. Thus, our results suggest that Lipin is involved in DNA synthesis and normal cell cycle regulation in wing development of *Drosophila melanogaster*. This research propose a novel function of a lipid-related gene in the development of both insects and human.

Keywords: *Drosophila*, Lipin, wing development.

* Author for correspondence: Tel: +84-438523798; Email: phamleanhtuan.2807@gmail.com