

Đánh giá mức độ tăng biểu hiện protein màng Benchwarmer kiểu đại và đột biến E164K được chuyển nhiễm ở tế bào nuôi cấy

Vũ Minh Thiết^{1,2*}, Nguyễn Hoàng Danh¹, Đinh Hải Ngân¹

¹ Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành

² Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành

* vmthiet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Gen *Benchwarmer* (*BNCH*) mã hóa cho protein xuyên màng thuộc họ protein vận chuyển Major Facilitator Superfamily được tìm thấy trong lysosome ở mọi tế bào động vật. Các đột biến gen *BNCH* gây kiểu hình bất lợi như thoái hóa thần kinh, làm ngắn vòng đời và lão hóa sớm ở nhiều sinh vật mô hình. Tuy nhiên chức năng và cơ chất của protein BNCH trên màng lysosome vẫn chưa được mô tả. Để tìm hiểu chức năng của protein này, chúng tôi đã tạo dòng plasmid mang gen mã hóa BNCH hoang dại ở người và plasmid mang BNCH chứa đột biến mất chức năng E164K. Hai plasmid trên được chuyển nhiễm vào các tế bào HEK293 để tạo hai dòng tế bào tăng cường biểu hiện protein BNCH hoang dại và BNCH đột biến E164K, làm cơ sở để phát triển mô hình nghiên cứu xác định chức năng phân tử và cơ chất vận chuyển của BNCH. Các plasmid tái tổ hợp được đưa vào tế bào HEK293 bằng kỹ thuật chuyển nhiễm lipoplex và mức độ biểu hiện protein được kiểm tra bằng Western Blot. Kết quả cho thấy cả hai biến thể này của BNCH được tăng cường biểu hiện thành công và có mức độ biểu hiện tương đương nhau trong dòng tế bào HEK293. Đây là cơ sở quan trọng để chúng tôi sử dụng hai dòng tế bào này làm mô hình nghiên cứu chức năng của BNCH trong tương lai.

Nhận 01.08.2021

Được duyệt 10.09.2021

Công bố 10.11.2021

Từ khóa

Benchwarmer, đột biến E164K, protein vận chuyển màng, biểu hiện tạm thời

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Protein màng lysosome (lysosomal membrane protein - LMP) đóng vai trò quan trọng trong nhiều hoạt động của lysosome, ví dụ như LMP là bơm proton v-type ATPase trong duy trì pH axit và LMP vận chuyển các sản phẩm thủy phân ra khỏi lysosome cho tế bào tái sử dụng [1]. Mất chức năng các LMP dẫn đến rất nhiều bệnh lý nghiêm trọng ở người, đặc biệt là trẻ em [2]. Các LMP vận chuyển còn tham gia vào chức phát tín hiệu điều hòa biến dưỡng của lysosome nhờ khả năng tương tác và điều khiển hoạt động của hai phức hệ mTORC1 và mTORC2 trong đáp ứng với các nhân tố kích thích sinh trưởng [3]. Ở đây, các LMP vận chuyển đưa ra các thông tin về thành phần và lượng

dưỡng chất chính là các sản phẩm thủy phân của lysosome để cảm ứng cho hoạt động của phức hệ mTORC1/2 trong điều hòa các con đường biến dưỡng của tế bào [4, 5]. Mặc dù vậy, phần lớn các LMP vận chuyển đều chưa được xác định rõ cơ chất và vai trò sinh học đối với tế bào và cơ thể.

BNCH mã hóa cho một protein xuyên màng cùng tên BNCH thuộc họ Major Facilitator Superfamily (MFS), là một LMP chưa rõ chức năng [5, 6]. Các đột biến mất chức năng gen *BNCH* trong đó có đột biến thay thế glutamic vị trí 164 thành lysine (E164K) ảnh hưởng nghiêm trọng đến chức năng lysosome trong điều hòa hoạt động tự thực của tế bào (autophagy) [7, 8] và tác động xấu đến sự phát triển hệ thần kinh, rối

loạn hành vi tính dục, phát triển phôi và sức sống ở các động vật mô hình như giun tròn và ruồi giấm [9 - 13]. Để tìm hiểu chức năng của protein BNCH, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng gen mã hóa BNCH kiểu hoang dại (WT) và biến thể BNCH E164K của người trong vector pcDNA 3.1 [14]. Trong nghiên cứu này, hai protein trên được tăng cường biểu hiện ở tế bào HEK293, trong đó protein BNCH E164K sẽ được sử dụng làm đối chứng cho các thử nghiệm tìm hiểu chức năng phân tử của protein BNCH WT. Tuy nhiên, protein BNCH E164K cần phải được chứng minh có mức độ và vị trí biểu hiện tương tự như với protein BNCH WT để đảm bảo những kết quả quan sát trong nghiên cứu so sánh giữa hai dòng tế bào trên chỉ có thể là do sự khác biệt ở về chức năng phân tử do đột biến E164K gây ra. Để chứng minh điều này, chúng tôi sử dụng phương pháp chuyển nhiễm với lipoplex để biểu hiện các protein trong dòng tế bào HEK293 và sử dụng kháng thể đặc hiệu để đánh giá mức độ biểu hiện của hai biến thể protein bằng Western Blot.

2 Phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Vector tái tổ hợp, chủng vi sinh vật và dòng tế bào

Plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1/BNCH WT và pcDNA3.1/BNCH E164K được tạo dòng từ một nghiên cứu trước đó [14]. Chủng nhân dòng plasmid DNA là *E. coli* DH5 α . Dòng tế bào HEK293 được mua từ ATCC và được lưu trữ tại phòng thí nghiệm tế bào động vật (Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT - Đại học Nguyễn Tất Thành).

Hóa chất

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* DH5 α là LB (peptone 10 g/L, cao nấm men: 5 g/L, NaCl: 5 g/L, pH = 7.0) có bổ sung 10 μ g/mL ampicillin. Môi trường nuôi cấy tế bào HEK293 là Dulbecco Modified Eagle's medium - DMEM (GE healthcare), bổ sung 10 % fetal bovine serum (Gibco), 100 μ g/mL penicillin (Gibco) và 100 μ g/mL streptomycin (Gibco).

Bộ kit GeneJET Plasmid Maxiprep Kit và hóa chất chuyển nhiễm tế bào động vật Lipofectamin 2000 được mua từ Thermo Fisher Scientific (USA). Hóa chất điện di và Western Blot: màng lai nitrocellulose, TBS (Tris-buffered saline), Tween 20, sữa gầy được mua từ Sigma. Kháng thể kháng protein V5 tag (14440-1-AP), kháng thể kháng GAPDH (10494-1-

AP) và kháng thể thứ cấp HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit (SA00001-2) được mua từ Proteintech (USA).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thu nhận plasmid pcDNA3.1/BNCH và pcDNA 3.1/BNCH*

Chủng *E. coli* DH5 α mang plasmid pcDNA3.1/BNCH và pcDNA 3.1/BNCH E164K được nuôi cấy trong 10 mL LB (100 mg/mL Amp) ở 37 $^{\circ}$ C qua đêm. Sau đó, dịch nuôi cấy được cấy truyền vào 500 mL môi trường LB-Amp và tiếp tục nuôi ở 37 $^{\circ}$ C trong (12 - 14) giờ. Sinh khối tế bào vi khuẩn được thu nhận để tách chiết DNA plasmid bằng GeneJET Plasmid Maxiprep Kit.

2.2.2 Chuyển nhiễm plasmid DNA vào dòng tế bào HEK293

Plasmid pcDNA3.1 tái tổ hợp được tăng cường biểu hiện trong tế bào HEK293 qua phương pháp chuyển nhiễm lipoplexes nhờ lipofectamin 2000 (Invitrogen) theo quy trình cụ thể các bước như sau: ngày 0, tế bào HEK293 (0,5 x 10 6) được nuôi qua đêm trong đĩa 6 giếng (9,5 cm 2) trong 2 mL môi trường DMEM. Ngày 1, trước 30 phút chuyển nhiễm, tiến hành thay môi trường Opti-MEM cho tế bào. Chuẩn bị mẫu chuyển nhiễm: chuẩn bị 2 ống eppendorf 2 mL (kí hiệu A và B) chứa 250 μ L môi trường Opti-MEM, bổ sung 4 μ g DNA plasmid vào ống A và 10 μ L lipofectamine 2000 vào ống B rồi để 5 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp A và B sau đó được trộn vào nhau và để yên trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Nhỏ từng giọt dung dịch chứa huyền phù DNA-lipofectamin vào đĩa nuôi tế bào và đặt đĩa nuôi trở lại tủ nuôi ở 37 $^{\circ}$ C. Sau (4 - 6) giờ chuyển nhiễm, môi trường DMEM được thay thế và tế bào được tiếp tục nuôi qua đêm.

2.2.3 Kiểm tra mức độ biểu hiện của protein BNCH WT và BNCH E164K bằng Western Blot.

Sau (16 - 24) giờ chuyển nhiễm, tế bào được thu nhận bằng li tâm với tốc độ 10 000 rpm trong 5 phút ở 4 $^{\circ}$ C và được làm tan trong đệm li giải RIPA lạnh (10 mM Tris (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM, có bổ sung hỗn hợp ức chế protease với thể tích gấp 20 lần thể tích sinh khối tế bào). Tế bào được làm tan trong đệm RIPA trong 30 phút ở 4 $^{\circ}$ C với tốc độ lắc 400 rpm. Sau đó, cặn tế bào được loại bỏ bằng li tâm 12 000 rpm trong 15 phút và phần dịch nổi chứa protein tổng số được chuyển vào ống eppendorf 1,5 mL mới.



Nồng độ protein được đo bằng Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) và 50 µg protein tổng số được phân tách trên gel acrylamide 12 % trước khi được chuyển lên màng lai nitrocellulose bằng phương pháp thấm tích bán khô trên thiết bị Novex™ Semi-Dry Blotter (Thermo Fisher Scientific). Màng lai được phủ bằng dung dịch TBST (3 % sữa gầy) trong 1 giờ. Màng lai được rửa 3 lần bằng đệm TBST mỗi lần 10 phút sau đó được ủ với kháng thể kháng V5 (độ pha loãng 1:5 000) hoặc kháng thể kháng protein GAPDH (độ pha loãng 1:20 000) ở nhiệt độ phòng. Sau 1 giờ, màng được rửa bằng TBST 3 lần (mỗi lần 10 phút) trước khi được ủ với kháng thể thứ cấp với độ pha loãng 1:10 000 lần. Sau 1 giờ, màng lai được rửa lại 3 lần với đệm TBST (mỗi lần 10 phút). Cuối cùng, protein đặc hiệu với kháng thể trên màng lai được hiển thị nhờ tác nhân phát quang hóa học (ECL - Thermo Fisher Scientific), kết quả được ghi nhận trên hệ thống chụp và phân tích ảnh Model Gbox (Syngene).

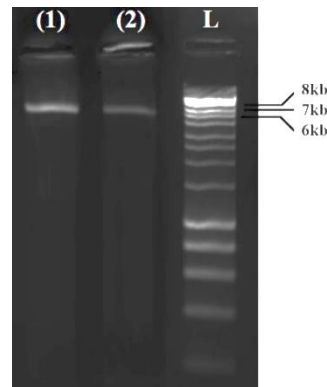
3 Kết quả và bàn luận

3.1 Kết quả

Thu nhận số lượng lớn plasmid pcDNA3.1/BNCH và pcDNA3.1/BNCH E164K

Để đạt hiệu quả cao trong chuyển nhiễm plasmid DNA vào tế bào động vật, plasmid DNA cần phải được tinh sạch và nồng độ cao (µg/µL) [15]. Do đó, chúng tôi sử dụng bộ kit GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen, ThermoScientific) để tách chiết số lượng lớn plasmid từ các dòng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp. Sản phẩm tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8 %. Hình ảnh kết quả điện di cho thấy các dòng plasmid ở giếng 1 và 2 là các sản phẩm tách chiết tương ứng từ chủng *E. coli* mang plasmid pcDNA3.1/BNCH WT và pcDNA3.1/BNCH E164K. Cả hai plasmid có kích thước là 6 978 bp phù hợp với kích thước trên ảnh điện di.

Chất lượng và nồng độ của DNA plasmid được kiểm tra trên máy đo OD ở bước sóng (260 và 280) nm. Kết quả được trình bày tại Bảng 1. Tỷ lệ OD 260/280 > 1,8 cho thấy plasmid thu nhận được có độ tinh sạch và nồng độ cao, sẵn sàng được sử dụng cho bước chuyển nhiễm vào tế bào động vật.



Hình 1 Điện di kết quả tách chiết vector tái tổ hợp trên gel agarose 0,8 %. Chú thích: giếng (1) – plasmid pcDNA3.1/BNCH, giếng (2) – plasmid pcDNA3.1/BNCH E164K, L – thang chuẩn 1kb (Bioline, UK).

Bảng 1 Nồng độ và thể tích plasmid thu được

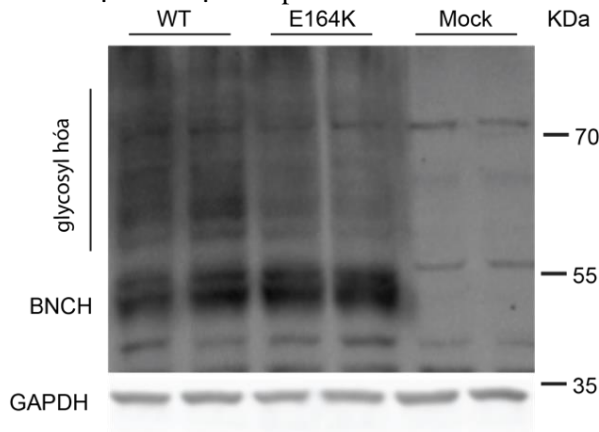
Plasmid	Nồng độ	Thể tích	Tỷ lệ OD 260/280
pcDNA3.1/BNCH WT	558 ng/µL	2 mL	2,057
pcDNA3.1/BNCH E164K	402 ng/µL	2 mL	1,954

Mức độ biểu hiện protein BNCH WT và đột biến E164K trong tế bào HEK293

Hai plasmid tái tổ hợp mang trình tự mã hóa cho protein BNCH WT và BNCH E164K ở người được chuyển nhiễm vào tế bào HEK293K và mức độ biểu hiện của hai protein này được kiểm tra bằng phương pháp Western Blot với kháng thể kháng peptide V5. Trên các plasmid tái tổ hợp, trình tự mã hóa peptide V5 gồm 14 axit amin (GKPIPNLLGLDST) tương ứng với 1,4 kDa được thêm vào đầu C của protein BNCH có chiều dài 528 axit amin tương ứng với 50,63 kDa. Kết quả Western Blot với kháng thể kháng V5 cho thấy mẫu tế bào chuyển nhiễm vector pcDNA3.1/BNCH và vector pcDNA3.1/BNCH E164K xuất hiện băng protein có khối lượng phân tử khoảng 51 kDa trong khi mẫu đối chứng âm MOCK (tế bào chuyển nhiễm với vector pcDNA3.1 không mang gen BNCH) đã không xuất hiện băng protein tương ứng (Hình 2). Như vậy, protein tái tổ hợp quan sát ở kết quả Western Blot có trọng lượng phân tử hoàn toàn phù hợp với tính toán lí thuyết của protein BNCH.

Kết quả này khẳng định hệ biểu hiện của vector pcDNA3.1 mang trình tự mã hóa protein BNCH đã hoạt động và biểu hiện thành công protein BNCH bên trong tế bào HEK293. Kết quả Western Blot cũng cho thấy mức độ biểu hiện protein BNCH WT và BNCH mang đột biến E164K gần như tương đương nhau khi được tăng cường biểu hiện ở dòng tế bào HEK293.

Điều này cho thấy, đột biến E164K không ảnh hưởng tới mức độ biểu hiện của protein BNCH.



Hình 2 Kết quả phân tích mức độ biểu hiện protein BNCH kiểu dại và BNCH E164K ở dòng tế bào HEK293 bằng Western Blot. WT:

tế bào HEK293 được chuyển nhiễm với vector pcDNA3.1/BNCH; E164K - tế bào được chuyển nhiễm với vector pcDNA3.1/BNCH E164K; Mock - tế bào được chuyển nhiễm với vector pcDNA3.1; GAPDH - protein chứng nội. Các protein màng được glycosyl có kích thước lớn hơn tạo thành nhiều băng ở phía trên protein BNCH.

BNCH là một protein màng nên thường được glycosyl hóa tại nhóm nitơ hoặc oxi của các axit amin khác nhau từ đó ảnh hưởng đến khả năng định vị của protein tại màng sinh chất. Mức độ glycosyl hóa dẫn đến sự thay đổi trọng lượng phân tử của protein trong điện di phân tách. Kết quả Western Blot cũng cho thấy sự xuất hiện của nhiều băng protein khối lượng phân tử lớn hơn thực tế 51 kDa (Hình 2, glycosyl hóa). Bằng chứng này cho thấy cả hai biến thể protein BNCH hoang dại và đột biến E164K đã biểu hiện đều được lưu trú tại các cấu trúc màng sinh học bên trong tế bào HEK293.

3.2 Thảo luận

Axit glutamic 164 trên protein BNCH của người là vị trí được bảo tồn cao ở nhiều sinh vật mô hình khác nhau và đột biến axit amin này thành lysine (E164K) đã được chứng minh gây ra các kiểu hình bất thường ở mức độ tế bào và cơ thể sinh vật so với BNCH WT. Chính vì thế, E164K là đột biến gây mất chức năng protein BNCH. Từ đó, chúng tôi lựa chọn đột biến này để tạo mô hình tế bào trong đó BNCH WT và BNCH E164K được tăng cường biểu hiện để tìm hiểu chức năng phân tử của protein BNCH. Trong nghiên cứu này, plasmid tái tổ hợp pcDNA3.1 mang trình tự mã hóa protein BNCH WT và BNCH E164K đã được

biểu hiện thành công ở tế bào HEK293 bằng phương pháp chuyển nhiễm sử dụng hóa chất tạo lipoplexes. Kết quả cho thấy hai protein này có mức độ biểu hiện tương đương nhau.

Mặc dù vậy chúng tôi vẫn chưa chứng minh được liệu đột biến E164K có làm thay đổi vị trí biểu hiện của protein BNCH trong tế bào HEK293. Khi tăng cường biểu hiện một protein màng ở mô hình tế bào nuôi cấy, vị trí tại màng của protein đích thường bị sai hỏng do sự tác động bởi quá trình glycosyl hóa protein xảy ra ở mạng lưới nội chất [16]. Mức glycosyl hóa từ đó tác động đến cấu trúc bậc ba và vị trí của protein tại lớp màng tế bào. Hình ảnh kết quả Western Blot ở phân đoạn glycosyl hóa cho thấy lượng BNCH E164K glycosyl hóa có thể ít hơn so với BNCH kiểu dại glycosyl hóa, trong khi đó lượng protein không glycosyl hóa lại không có nhiều thay đổi (Hình 2, glycosyl hóa). Điều đó dẫn đến việc BNCH E164K có thể đã có những tác động nhất định đến mức độ glycosyl hóa của protein BNCH hoặc đây có thể là hệ quả của sự thay đổi vị trí biểu hiện của BNCH E164K. Để kiểm chứng và định lượng những suy luận trên, chúng tôi sẽ cần quan sát vị trí biểu hiện của hai biến thể protein này bằng phương pháp lai miễn dịch huỳnh quang trong các nghiên cứu tiếp theo.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã tạo dòng và biểu hiện thành công protein BNCH WT và protein BNCH mang đột biến mất chức năng E164K trong tế bào HEK293. Cả hai biến thể này của BNCH có mức biểu hiện và thể hiện mức độ glycosyl hóa tương đương nhau. Vì thế mô hình tế bào HEK293 được tăng cường biểu hiện của hai biến thể này sẽ là công cụ thử nghiệm quan trọng để nghiên cứu xác định chức năng phân tử của BNCH. Ngoài ra, đây còn là một mô hình thêm chức năng (Gain of Function) thích hợp để tìm hiểu tác động sinh học của BNCH đối với lysosome và tế bào.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.034/HĐ-KHCN.

Nguyễn Hoàng Danh được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2020.ThS.30.

Tài liệu tham khảo

1. R. Puertollano, “mTOR and lysosome regulation,” *F1000Prime Rep.*, vol. 6, 2014.
2. M. Schwake, B. Schröder, and P. Saftig, “Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology,” *Traffic*, vol. 14, no. 7, pp. 739–748, 2013, doi: 10.1111/tra.12056.
3. B. Panic *et al.*, “mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids,” no. November, pp. 678–684, 2011.
4. M. Rebsamen *et al.*, “SLC38A9 is a component of the lysosomal amino acid sensing machinery that controls mTORC1,” *Nature*, vol. 519, no. 7544, pp. 477–481, 2015.
5. G. A. Wyant *et al.*, “mTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient,” *Cell*, vol. 171, no. 3, pp. 642–654.e12, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.09.046.
6. B. Dermaut *et al.*, “Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in *Drosophila* benchwarmer,” *J. Cell Biol.*, vol. 170, no. 1, pp. 127–139, 2005.
7. Y. Rong *et al.*, “Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 19, pp. 7826 LP – 7831, May 2011, doi: 10.1073/pnas.1013800108.
8. T. Sasaki *et al.*, “Aberrant autolysosomal regulation is linked to the induction of embryonic senescence: differential roles of Beclin 1 and p53 in vertebrate Spns1 deficiency,” *PLoS Genet.*, vol. 10, no. 6, p. e1004409, 2014.
9. K. Suzuki, N. Juni, and D. Yamamoto, “Enhanced mate refusal in female *Drosophila* induced by a mutation in the spinster locus,” *Appl. Entomol. Zool.*, vol. 32, no. 1, pp. 235–243, 1997.
10. Y. Nakano *et al.*, “Mutations in the Novel Membrane Protein Spinster Interfere with Programmed Cell Death and Cause Neural Degeneration in *Drosophila melanogaster*,” *Mol. Cell. Biol.*, 2001, doi: 10.1128/mcb.21.11.3775-3788.2001.
11. M. Han *et al.*, “C13C4. 5/Spinster, an evolutionarily conserved protein that regulates fertility in *C. elegans* through a lysosome-mediated lipid metabolism process,” *Protein Cell*, vol. 4, no. 5, pp. 364–372, 2013.
12. R. M. Young *et al.*, “Zebrafish yolk-specific not really started (nrs) gene is a vertebrate homolog of the *Drosophila* spinster gene and is essential for embryogenesis,” *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 223, no. 2, pp. 298–305, 2002.
13. S. Kishi *et al.*, “The identification of zebrafish mutants showing alterations in senescence-associated biomarkers,” *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 8, p. e1000152, 2008.
14. H. N. Danh and M. V. Thiet, “Cloning human Benchwarmer gene (BNCH) harboring E164K in vector pcDNA3.1 by site-directed mutagenesis method,” *J. Sci. Technol. - Nguyen Tat Thanh Univ.*, vol. 12, pp. 6–11, 2020, [Online]. Available: <https://vjol.info.vn/index.php/dh-NTT/article/view/58001>.
- [15] J. Andréll and C. G. Tate, “Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies,” *Mol. Membr. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 52–63, Feb. 2013, doi: 10.3109/09687688.2012.703703.
- [16] R. Grisshammer, “Understanding recombinant expression of membrane proteins,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 337–340, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.001>.

Transient overexpression levels of the wild type and the E164K harboring Benchwarmer protein in HEK293 cell

Vu Minh Thiet^{1,2,*}, Nguyen Hoang Danh¹, Dinh Hai Ngan¹

¹NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

² Faculty of Biotechnology, Nguyen Tat Thanh University

* vmthiet@ntt.edu.vn

Abstract Human *Benchwarmer* (*BNCH*) encodes a transmembrane helices protein belonging to the Major Facilitator Superfamily found in lysosomes. Genetic abrogations of *BNCH* caused neurodegeneration, accumulation of substances in lysosomes, shorter lifespan, and early onset of senescence in fruit flies, zebrafish, and roundworms. However, the molecular function of *BNCH* protein remains to be identified. To develop a cell assay to characterize the molecular function of the protein, we have cloned the coding sequences of the wild type *BNCH* and the *BNCH* carrying E164K loss of function mutation in the mammalian expression vector pcDNA 3.1 and expressed both vectors in the HEK293 cell line. The mutant E164 must be proved not to cause apparent changes in the expression levels and the location of the mutated *BNCH* thereby it can be used as a counter control in a cellular assay to assess the function of *BNCH*. In this study, we used lipoplexes to transfect and transiently express the WT *BNCH* and E164K *BNCH* in HEK293 cell line. The protein expression levels were evaluated by Western Blot by using the specific antibody. Our results show that both *BNCH* isoforms were successfully transfected and equally overexpressed in the HEK293 cells. Therefore, the cell lines will serve as important tool to investigate the molecular role of *BCHN* in the further study.

Keywords *Benchwarmer*, mutation E164K, lysosomal membrane protein, transient expression.