

Tạo dòng gene mã hóa enzyme Sphingosine 1-phosphate Lyase ở người (SGPL1)

Vũ Minh Thiết*, Hồ Tá Giáp, Nguyễn Hoàng Danh

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

*vmthiet@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Sphingosine 1-phosphate (S1P) là phân tử lipid có hoạt tính sinh học quan trọng trong tế bào và cơ thể như điều khiển phân bào, vận động của các tế bào miễn dịch và điều hòa sinh mạch. S1P lyase là enzyme phân giải sphingosine 1-phosphate (S1P) bằng cách cắt chuỗi acyl ở vị trí carbon số 2 và 3, để tạo thành hexadecenal và ethanolamin phosphate, vì thế enzyme này là một trong những yếu tố tham gia điều hòa lượng S1P trong tế bào và cơ thể. Trong tế bào động vật, SGPL1 còn phân hủy một cơ chất khác là dihydro-S1P (dhS1P), một đồng phân no của S1P được tạo ra trong quá trình tổng hợp mới sphingolipid khởi đầu bằng quá trình cô động hóa serin và palmitoyl-CoA. Đến nay, dhS1P và S1P vẫn được sử dụng thay thế cho nhau với giả định cả hai cơ chất này đều đáp ứng hoàn toàn như nhau với hoạt tính enzyme của SGPL1. Mặc dù vậy, hai cơ chất này thể hiện nhiều vai trò sinh học trái ngược nhau và đáp ứng khác nhau với các tác nhân môi trường và thuốc điều trị ung thư. Để tìm câu trả lời chính xác cho mức độ đặc hiệu của SPGL1 lên hai cơ chất kể trên, chúng tôi tiến hành tạo dòng trình tự mã hóa cho SGPL1 của người vào trong hệ thống biểu hiện vi khuẩn, vector pQ60. Vector tái tổ hợp mang hSGPL1 này sẽ cung cấp nguyên liệu để biểu hiện và tinh sạch enzyme SGPL1 phục vụ cho các nghiên cứu hoạt tính và động học enzyme lên hai cơ chất dhS1P và S1P trong tương lai.

Nhận 24.12.2020

Được duyệt 03.06.2021

Công bố 15.07.2021

Từ khóa

Sphingosine 1-phosphate lyase, SGPL1, sphingosine 1-phosphate, nhân dòng, S1P, dhS1P.

© 2021 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

1.1 Enzyme Sphingosine 1-phosphate lyase

Sphingosine 1-phosphate lyase (SGPL1; (E.C.4.1.2.27) là enzyme phân giải sphingosine 1-phosphate (S1P) bằng cách cắt chuỗi acyl tại gốc carbon số 2 và 3 của S1P, để tạo thành hexadecenal và ethanolamin phosphate (Hình 1). [1] Cụ thể, quá trình sinh tổng hợp SL bắt đầu bởi phản ứng cô động L-Serin và axit béo Palmitate để cuối cùng tạo thành dihydrosphingosine (dhSph). Lipid trung gian được tổng hợp thành ceramide, là cơ chất trung tâm của con đường chuyển hóa hình thành nên các SL phức tạp hơn như sphigomyelin (SM) hay Glucosylsphingolipid (GluSL), cũng như được thủy

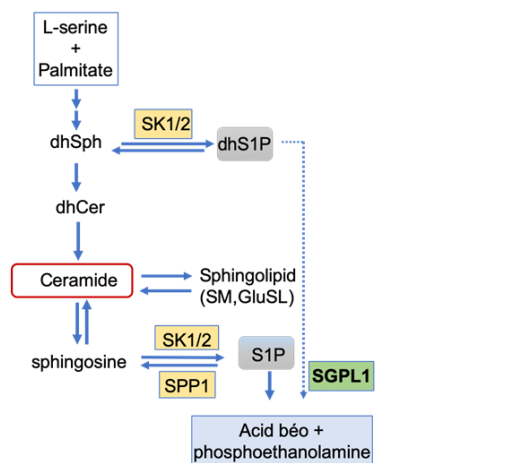
phân để tạo thành sphingosine, là cơ chất của enzyme phosphoryl hóa SK để tổng hợp thành S1P trước khi được phân hủy S1P bởi SGPL1 tạo thành chuỗi axit béo và phosphoethanolamine. Phản ứng thực hiện bởi SGPL1 là bước cuối cùng của con đường dị hóa SL, giúp các SL rời khỏi chu kì chuyển hóa. Đây là bước phản ứng cuối cùng không thể đảo ngược của con đường dị hóa sphingolipid (SL) (Hình 1), vì thế SPGL1 đóng vai trò quan trọng trong điều hòa lượng S1P trong tế bào và cơ thể. S1P là một phân tử lipid có hoạt tính sinh học tham gia vào nhiều quá trình sống của tế bào và cơ thể như điều khiển phân bào, vận động của các tế bào miễn dịch và điều hòa sinh mạch máu. [1]

1.2 Chức năng của SGPL1

SGPL1 biểu hiện ở hầu hết các tế bào trong cơ thể ngoại trừ tiểu cầu và hồng cầu, vì đây là 2 tế bào dự trữ S1P với mục đích cung cấp S1P để duy trì nồng độ cao S1P trong hệ tuần hoàn. Thiếu hụt hoàn toàn hoặc 1 phần hoạt tính SGPL1 trong cơ thể làm tăng lượng S1P trong mô dẫn đến rối loạn quá trình vận động các tế bào lympho T và từ đó ảnh hưởng nghiêm trọng đến vai trò của hệ miễn dịch và gây ra hàng loạt các sinh lý bệnh khác nhau như: ung thư, thoái hóa thần kinh. [2 - 4] Ở người thiếu hụt hay mất chức năng gene SGPL1 được mô tả bệnh lý suy thận và dị tật não bẩm sinh, gọi chung là hội chứng thiếu hụt hoạt tính SGPL1 (SPLIS). [5]

Chính vì đóng vai trò lớn trong điều hòa miễn dịch mà SGPL1 được Novartis và AbbVie xác định là một đối tượng tiềm năng để phát triển thuốc trong điều trị thoái hóa thần kinh, viêm khớp và bệnh viêm ruột (IBD). [6,7] Lexicon Pharmaceuticals, Inc. cũng đã phát triển thuốc bất hoạt SGPL1 với tên gọi LX2931 đang đi vào pha II trong điều trị tăng nhãn áp và viêm khớp. [8] Tuy nhiên, các loại thuốc đang được đánh giá cẩn thận bởi các tác dụng phụ có thể xảy ra do thuốc gây tích tụ S1P.

Ngoài S1P, SGPL1 còn phân hủy 1 cơ chất khác là dihydro-S1P (dhS1P), cũng là một sản phẩm của quá trình phosphoryl hóa dihydrosphingosine bởi sphingosine kinase (SK1/2) (Hình 1).

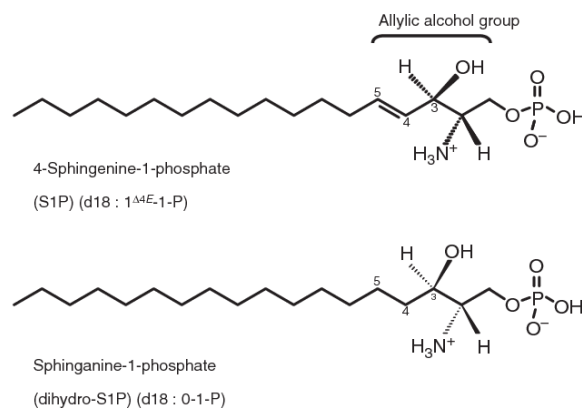


Hình 1 Sơ đồ con đường chuyển hóa SL

Hai cơ chất này chỉ khác nhau ở một nối đôi trên mạch sphingosine ở vị trí C4 và C5 (Hình 2). Đáng chú ý là 2 cơ chất này của SGPL1 thể hiện những tác động sinh học không giống nhau mà chưa biết lí do. Ví dụ như dhS1P không thể hiện vai trò bảo vệ tế bào khỏi

apoptosis như S1P. [9] Trong một nghiên cứu khác dhS1P thể hiện tác dụng phosphoryl hóa lên cAMP và Smad mạnh hơn so với S1P ở các tế bào dòng thần kinh. [10] Các tác giả cũng chỉ ra rằng với cùng một lượng S1P và dhS1P ngoại bào ủ với tế bào thì S1P ngoại bào giảm nhanh hơn so với dhS1P, điều này có thể do sự khác nhau của độ hấp thụ giữa 2 lipid này qua màng tế bào trước khi bị phân hủy SGPL1. Một giả thuyết khác là SGPL1 có thể hiệu quả khác nhau lên từng cơ chất, hoặc có thể có sự tồn tại của một S1P lyase khác đặc hiệu cho dhS1P. Mặc dù vậy, cho đến nay chỉ duy nhất 1 isoform của SGPL1 được mô tả ở động vật và người. Tuy nhiên giả thuyết về sự tồn tại của một SGPL1 khác được hỗ trợ bởi các nghiên cứu gần đây cho thấy, ở một số vi khuẩn gây bệnh ở người có mang nhiều hơn 2 phiên bản S1P lyase khác nhau và có hoạt tính khác biệt tùy thuộc vào loại cơ chất được sử dụng. [11]

Cho đến nay dhS1P và S1P vẫn được sử dụng thay thế cho nhau với giả định cả 2 cơ chất này đều đáp ứng hoàn toàn giống nhau với hoạt tính phân giải của SGPL1. Trong một nghiên cứu về động học của SGPL1, cả 2 cơ chất được sử dụng và kết quả cho thấy dhS1P cho giá trị Km lớn hơn so với S1P. [12]



Hình 2 Cấu trúc khác nhau giữa S1P và dhS1P

Tuy nhiên, do mục tiêu của nghiên cứu trên không phải so sánh 2 cơ chất này, nên vị trí và phương pháp đánh dấu cho dhS1P và S1P hoàn toàn khác nhau, điều có thể gây ra sự khác biệt về hiệu quả tác động của enzyme. Vì thế, SGPL1 thật sự có hiệu quả như nhau đối với 2 cơ chất này hay không vẫn chưa có câu trả lời.

Trong nghiên cứu này, gene mã hóa cho SGPL1 ở người sẽ được nhân dòng và biểu hiện trong hệ thống Escherichia coli BL21 (DE3). Kết quả thu được của nghiên cứu này tạo tiền đề cho việc biểu hiện và thu

nhận SGKPL1 cho các thử nghiệm về hoạt tính khác biệt của SGKPL1 lên dhS1P và S1P trong các nghiên cứu tiếp theo.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Trình tự gen (cDNA) mã hóa cho protein hSGPL1 ở người được thu nhận trên cơ sở dữ liệu Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) với mã số protein là “UniProtKB - O95470 (SGPL1_HUMAN)”. Sau đó, trình tự DNA này được tổng hợp bằng dịch vụ tổng hợp của Biobasic (<https://www.synbio-tech.com/gene-synthesis/>) để tối ưu hóa codon cho biểu hiện hSGPL1 ở hệ thống vi khuẩn *Escherichia coli*. Vector biểu hiện trong nghiên cứu này là pQE-60 (kích thước 3431 bp) được cung cấp bởi hãng Biobasic (Canada). Phản ứng PCR sử dụng cặp mồi hSGPL1-F: 5'-CCAGGACTACGCAAGATAGAG-3' và hSGPL1-R: 5'-CTATAACAACCAATGATGAGCC-3' được tổng hợp tại Công ty PHUSA Biochem (Việt Nam)

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Chuẩn bị tế bào khả nạp

Để tạo tế bào khả nạp, khuẩn lạc đơn *E. coli* DH5 α được nuôi trong 25 mL môi trường LB lỏng (1 % trypton, 0,05 % Yeast extract, 1 % NaCl, hóa chất của hãng Himedia) ở nhiệt độ 37 °C khoảng (3 - 4) giờ, nuôi cấy lắc 250 rpm. Ủ bình nuôi cấy trong đá lạnh khoảng 10 phút rồi tiến hành li tâm thu sinh khối trong 3 phút 6 000 rpm. Bổ sung 10 mL CaCl₂ 0,1 M (Sigma) và ủ vào đá lạnh trong 20 phút và lại li tâm trong 3 phút 6 000 rpm để thu sinh khối. Để bảo quản tế bào khả nạp thu được, bổ sung thêm 5 mL CaCl₂ 0,1M pha trong glycerol 15 % (Sigma) lạnh. Dịch tế bào được chia đều vào các ống eppendorf 1,5 mL và bảo quản ở -80 °C để sử dụng.

2.2.2 Tạo plasmid tái tổ hợp

Nghiên cứu sử dụng các vật liệu sau: vector biểu hiện pQE-60, đoạn gene mã hóa hSGPL1 và các enzyme cắt giới hạn *Nco*I và *Bam*HI-HF (Neb) và enzyme nối *T4* DNA Ligase (Neb). Trình tự mã hóa hSGPL1 (cDNA) được thu nhận từ vector pUCSP-hSGPL1 bằng cặp enzyme *Nco*I và *Bam*HI-HF. Vector pQE-60 cũng được xử lý với *Nco*I và *Bam*HI-F để tạo vị trí bắt cặp đặc hiệu cho phép ghép nối với đoạn cDNA hSGPL1.

Các sản phẩm cắt được điện di, tinh sạch và định lượng trước khi sử dụng để ghép nối. Tổng thành phần cho phản ứng ghép nối (10 μ L) bao gồm đệm *T4* DNA Ligase (1 đơn vị), Vector pQE-60 (50 ng), hSGPL1 (18 ng) và nước siêu sạch. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 16 °C qua đêm sau đó được làm nóng lên 65 °C để bất hoạt enzyme ligase. Sản phẩm sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5 α .

2.2.3 Biến nạp plasmid mang gene mã hóa hSGPL1 vào tế bào khả nạp

Phương pháp biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli* DH5 α dùng là phương pháp sốc nhiệt. Dùng pipet để trộn đều 2 μ L plasmid từ phản ứng nối ghép với 50 μ L tế bào khả nạp đã chuẩn bị sẵn trong ống eppendorf 1,5 mL. Hỗn hợp được đem ủ 30 phút trong đá lạnh rồi sốc nhiệt ở 42 °C trong 30 giây sau đó ngay lập tức cho vào đá lạnh ủ trong 2 phút. Để hồi phục tế bào, 950 μ L môi trường lỏng LB được bổ sung vào eppendorf rồi đem đi nuôi lắc 180 rpm ở 37 °C. Sau 1 giờ, ống eppendorf được quay li tâm 8 000 rpm trong 1 phút loại bỏ 900 μ L dịch nổi. Phần dịch tế bào còn lại được cấy trải trên đĩa LB agar chứa 50 μ g/mL ampicillin (Bioline) và ủ ở 37 °C qua đêm.

2.2.4 Sàng lọc khuẩn lạc mang gene mã hóa hSGPL1

Để kiểm tra các tế bào biến nạp mang gene mã hóa hSGPL1, các khuẩn lạc đơn được chọn ngẫu nhiên từ đĩa nuôi cấy, mỗi khuẩn lạc được hòa tan trong 5 μ L H₂O dùng làm khuôn cho phản ứng PCR khuẩn lạc. Phản ứng gồm 30 chu kỳ luân nhiệt với 98 °C trong 10 giây, 62 °C trong 1 phút và 72 °C trong 1 phút. Tiến hành điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1 %. Chủng *E.coli* DH5 α dòng hóa thành công được bảo quản trong dung dịch glycerol 25 % ở nhiệt độ - 80 °C.

2.2.5 Giải trình tự

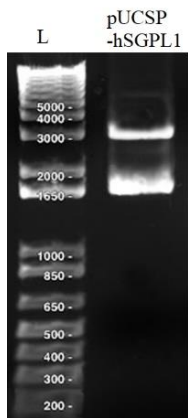
Plasmid được giải trình tự bởi Công ty 1st Base (<https://base-asia.com/dna-sequencing-services>).

3 Kết quả và biện luận

3.1 Thu nhận gene mã hóa hSGPL1

Vector pUCSP-hSGPL1 được cắt bằng cặp enzyme *Nco*I và *Bam*HI-HF.

Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn cho thấy đã thu nhận được gene hSGPL1 (Hình 3).

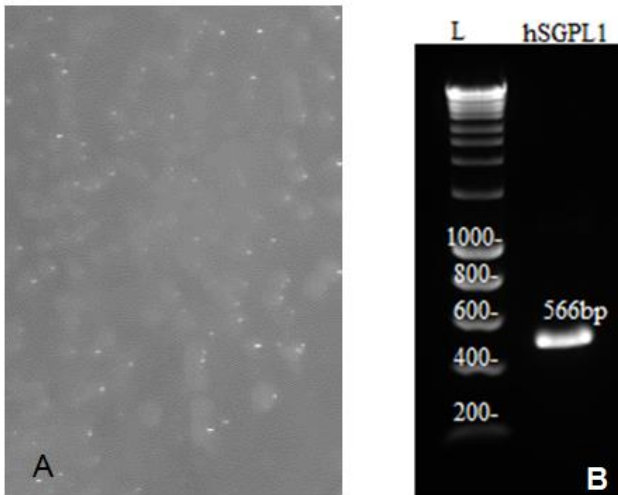


Hình 3 Điện di gel agarose sản phẩm cắt vector pUCSP-hSGPL1 bằng NcoI và BamHI-HF.

Chú thích: L là thang chuẩn DNA, pUCSP-hSGPL1 là sản phẩm cắt vector pUCSP-hSGPL1 bằng cặp enzyme NcoI và BamHI-HF.

Hình chụp sản phẩm điện di cho thấy thu được 2 băng sáng rõ ở kích thước khoảng (1.7 - 3) kb, tương ứng kích thước của gene hSGPL1 (1 715 bp) và của vector pUCSP (2 909 bp). Băng sản phẩm kích thước 1.7 kp được thu nhận và tinh chế DNA. Sản phẩm DNA tinh chế được gắn với vector biểu hiện pQE60 nhờ T4 DNA ligase.

3.2 Tạo dòng gene *hSGPL1* lên vector pQE60 và sàng lọc chủng *E. coli* mang vector tái tổ hợp

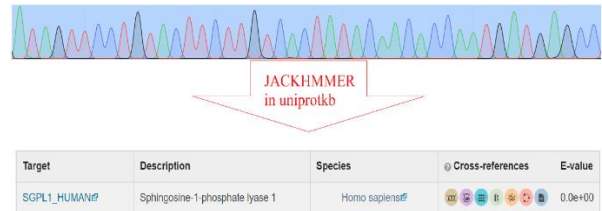


Hình 4 (A) Khuẩn lạc *E. coli* biến nạp trên LB agar bổ sung ampicillin (50 µg/mL). (B) Sản phẩm PCR colony để kiểm tra sự có mặt của gene *hSGPL1* trên gel agarose 1 %.

Sản phẩm của phản ứng nối ghép DNA (ligation) giữ hSGLPL1 và pQE60 đã được biến nạp vào *E. coli* DH5α và nuôi trên môi trường chọn lọc, kết quả cho thấy thu nhận được rất nhiều khuẩn lạc (Hình 4A). Để kiểm tra kết quả tạo dòng phương pháp Colony PCR được sử dụng, các khuẩn lạc ngẫu nhiên được đánh dấu và thu nhận một phần vào trong 5 µL nước cất để sử dụng làm mẫu cho phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp môi hSGPL1-F và hSGPL1-R. Sản phẩm PCR

được kiểm tra trên gel agarose 1 % (Hình 4B). Sản phẩm điện di cho băng có kích thước tương đương với kích thước dự đoán là 566 bp. Kết quả trên cho thấy khuẩn lạc kiểm tra có mang trình tự hSGPL1.

Để kết luận được thì cần có kết quả giải trình tự vector pQE60-hSGPL1. Chủng *E. coli* có kết quả Colony PCR mang gene hSGPL1 được tăng sinh và tách plasmid, sau đó, plasmid được gửi giải trình tự tại Công ty 1st Base với ID là 189303, Access Code là BtAeRL1 (Hình 5).



Hình 5 Peak sản phẩm giải trình tự và kết quả blast trên cơ sở dữ liệu uniprotkb

Kết quả giải trình tự được chuyển sang trình tự axit amin để so sánh với cơ sở dữ liệu Uniprot. Kết quả thu được cho thấy trình tự của nghiên cứu tương đồng với trình tự SGPL1_HUMAN với Evaluate xấp xỉ bằng 0. Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công gene hSGPL1 lên vector pQE60.

4 Kết luận và kiến nghị

Chúng tôi đã nhân dòng thành công trình tự mã hóa enzyme S1P lyase ở người vào trong vector pQE60. Để đảm bảo khả năng biểu hiện của hSGPL1 người trong hệ thống vi khuẩn, trình tự nucleotide cho hSGPL1 đã được tối ưu mã codon.

Kết quả nghiên cứu này là tiền đề trong mục tiêu xa hơn là thu nhận được enzyme hSGPL1 tinh sạch nhằm đánh giá hiệu quả phân giải trên hai cơ chất là dhS1P và S1P. Từ đó có thể cung cấp thông tin giải thích sự khác biệt về nồng độ dhS1P và S1P trong một số tế bào và điều kiện sinh lí bệnh khác nhau.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ - Đại học Nguyễn Tất Thành, đề tài mã số 2020.01.009 /HD-NCKH.

Tài liệu tham khảo

1. *Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease* - Nature Reviews Molecular Cell Biology. <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.107>.
2. Degagné, E. et al. *Sphingosine-1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs*. J. Clin. Invest. 124, 5368-5384 (2014).
3. Kumar, A. et al. *S1P lyase regulates DNA damage responses through a novel sphingolipid feedback mechanism*. Cell Death Dis. 2, e119–e119 (2011).
4. Mitroi, D. N. et al. *SGPL1 (sphingosine phosphate lyase 1) modulates neuronal autophagy via phosphatidylethanolamine production*. Autophagy 13, 885-899 (2017).
5. Choi, Y.-J. & Saba, J. D. *Sphingosine phosphate lyase insufficiency syndrome (SPLIS): A novel inborn error of sphingolipid metabolism*. Adv. Biol. Regul. 71, 128-140 (2019).
6. Weiler, S. et al. *Orally active 7-substituted (4-benzylphthalazin-1-yl)-2-methylpiperazin-1-yl]nicotinonitriles as active-site inhibitors of sphingosine 1-phosphate lyase for the treatment of multiple sclerosis*. J. Med. Chem. 57, 5074-5084 (2014).
7. Dinges, J. et al. *Hit-to-lead evaluation of a novel class of sphingosine 1-phosphate lyase inhibitors*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 26, 2297-2302 (2016).
8. *Lexicon Pharmaceuticals Reports Preliminary Results From Two Phase I Studies*. Fierce Pharma <https://www.fiercepharma.com/pharma/lexicon-pharmaceuticals-reports-preliminary-results-from-two-phase-1-studies>.
9. Van Brocklyn, J. R. et al. *Dual Actions of Sphingosine-1-Phosphate: Extracellular through the Gi-coupled Receptor Edg-1 and Intracellular to Regulate Proliferation and Survival*. J. Cell Biol. 142, 229-240 (1998).
10. Callihan, P. et al. *Distinct generation, pharmacology, and distribution of sphingosine 1-phosphate and dihydro-sphingosine 1-phosphate in human neural progenitor cells*. Neuropharmacology 62, 988-996 (2012).
11. McLean, C. J. et al. *Characterization of homologous sphingosine-1-phosphate lyase isoforms in the bacterial pathogen Burkholderia pseudomallei*. J. Lipid Res. 58, 137-150 (2017).
12. Bandhuvula, P., Fyrst, H. & Saba, J. D. *A rapid fluorescence assay for sphingosine-1-phosphate lyase enzyme activity*. J. Lipid Res. 48, 2769-2778 (2007).

Cloning of human sphingosine 1-phosphate lyase gene into expression vector pQE60

Vu Minh Thiet*, Ho Ta Giap, Nguyen Hoang Danh,

¹NTT Hi-Tech institute – Nguyen Tat Thanh University

*vmthiet@ntt.edu.vn

Abstract The bioactive lipid and second messenger sphingosine-1-phosphate (S1P) has emerged as key regulator in cancer progression by modulating a variety of cellular processes, such as proliferation, migration, platelet aggregation, or angiogenesis. Sphingosine 1-phosphate lyase (SGPL1) irreversibly cleaves sphingosine 1-phosphate (S1P) into hexadecenal and ethanolamine phosphate thereby controlling the concentrations of S1P. In mammalian cell, SGPL1 also targets dihydroS1P (dhS1P), a saturated form of S1P, which its precursor dihydroS1P is exclusively produced in de novo synthesis pathway from serine and palmitoyl condensation. These two lipids are being used interchangeably in the assay for SGPL1 enzymatic activity. However, dhS1P and S1P exhibit opposite effects in certain cellular processes and their levels respond differently to environmental stressed including cancer therapies. In order to better understand the enzymatic kinetics of SGPL1 toward these two substrates we cloned a coding sequence of human SGPL1 (hSGPL1) into a bacterial expression system pQ60 vector. In further study, this material will provide the material for expression and purification of recombinant human SGPL1 and the enzyme will be used to study its specificity and efficacy on dhS1P and S1P.

Keywords *Sphingosine 1-phosphate lyase, SGPL1, sphingosine 1-phosphate, cloning, S1P, dhS1P.*