

PHÂN TÍCH ĐẶC ĐIỂM PHÂN TỬ VÀ VAI TRÒ CỦA GEN C9 TRONG HỆ MIỄN DỊCH Ở LỢN

Analyzing Molecular Characterization and the Role of Porcine Gene C9 in the Immune System

Đỗ Võ Anh Khoa

Bộ môn Chăn nuôi, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Địa chỉ email tác giả liên hệ: dvakhoa@ctu.edu.vn

Ngày gửi đăng: 25.01.2010; Ngày chấp nhận: 9.03.2010

TÓM TẮT

Cơ chế điều hoà miễn dịch tự nhiên của phức hợp bổ thể ở hầu hết các loài động vật đã được hiểu rõ, đặc biệt là vai trò của gen C9 trong sự thành lập phức hợp tấn công màng (Membrane Attack Complex, MAC) dẫn đến sự tự dung giải của tế bào vi sinh vật. Mục tiêu của nghiên cứu là để phân tích chuỗi cDNA và cấu trúc phân tử của protein C9 ở lợn, làm cơ sở cho việc đánh giá chức năng của gen C9 trong những nghiên cứu tiếp theo. Kết quả phân tích chỉ ra sự giống nhau trong cấu trúc cDNA và protein C9 giữa lợn và các loài động vật hữu nhũ. Với 11 exon, gen C9 dài 2536 bp đã mã hoá 534 axit amin. C9 chứa nhiều miền protein chức năng giàu cysteine như TSP1, LDLa và MACPF. Những miền protein này đóng vai trò quan trọng trong cơ chế miễn dịch của động vật hữu nhũ chống lại mầm bệnh xâm nhiễm. Kết quả gợi ý C9 là một trong những gen tiềm năng cho sức kháng bệnh tự nhiên ở lợn.

Từ khóa: Chức năng, C9 gen, đặc điểm, lợn.

SUMMARY

The natural immune regulation mechanism of the complement system, especially the important role of complement component C9 in the formation of the Membrane Attack Complex (MAC) causing self-dissolution of microorganisms, has been clearly understood in most of animal species. The present study aimed at identification of cDNA sequence and molecular structural analysis of protein C9 for evaluation of its function in further studies in pigs. As results, C9 cDNA and protein sequence showed high homology between pigs and vertebrate species. With 2536 bp in length and 11 exons, porcine C9 cDNA encodes 534 amino acids. Additionally, porcine C9 contained rich-cysteine protein domains such as thrombospondin type I (TSP1), low-density lipoprotein receptor domain Class A (LDLa) and MAC/perforin domain (MACPF) playing key function in immune mechanism of the mammalian animals against the invading pathogens. The results, therefore, suggests C9 as a potential gene for natural disease resistance in pigs.

Key words: Characterization, C9, function, immune, pigs.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phức hợp bổ thể là một trong những hệ thống phòng vệ sinh học của cơ thể vật chủ chống lại mầm bệnh (Yonemasu và cs., 1978; Wimmers và cs., 2003). Phức hợp có trên 30

protein khác nhau tuần hoàn trong máu (Volanakis, 1998). Khi có mầm bệnh xâm nhiễm, những protein C1 (complement component 1), MBL (Mannose - Binding Lectin), Factor B lần lượt kích hoạt phức hợp bổ thể từ 3 hướng khác nhau (classical, lectin

và alternative pathway) dẫn đến sự thành lập của protein C3, thành phần trung tâm của phức hợp bổ thể đồng thời cùng là enzyme chính trong việc thúc đẩy sự hình thành tập hợp MAC (C5b-9). Từ đây, MAC sẽ tạo những lỗ nhỏ trên màng tế bào mục tiêu, gây nên sự trao đổi chất bên trong và ngoài tế bào. Kết quả là làm cho tế bào liên tục bị mất nước, chất điện giải,... dẫn đến tự tiêu hủy. MAC là tập hợp của một phân tử C5b, C6, C7, C8 và 6-18 phân tử C9 (Muller-Eberhard, 1986; Tschopp và cs., 1984; Podack và cs., 1982; Kolb và cs., 1972). Do bởi tầm quan trọng của MAC trong cơ chế điều hoà miễn dịch tự nhiên của cơ thể động vật hữu nhũ, đặc biệt là protein cuối cùng C9 có vai trò cực kỳ quan trọng trong sự thành lập MAC cũng như sự điều hoà của phức hợp bổ thể chống lại mầm bệnh (Rosado và cs., 2007), nhiều nghiên cứu trên protein C9 đã được tiến hành trên người. Sự thiếu hụt C9 có thể dẫn đến nhiều bệnh khác nhau: viêm màng não (meningococcal meningitis), dermatomyositis,... (Vázquez - Bermúdez và cs., 2003; Zhu và cs., 2000; Eng, 1980; Haeney và cs., 1980, Ichikawa và cs., 2001). Trong nghiên cứu này, trình tự chuỗi cDNA (complementary DNA) của C9 ở lợn (pC9) sẽ được giải mã và phân tích, làm cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về vai trò của C9 trong cơ chế miễn dịch tự nhiên của vật chủ.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Động vật thí nghiệm và cách lấy mẫu

Đối tượng thí nghiệm là 6 lợn từ các giống Hampshire (n=1), Duroc (n=1), Landrace (n=1), Pietrain (n=1), Berlin Miniature Pig (n=1) (từ Trại Giống vật nuôi của Trường Đại học Bonn, CHLB Đức) và Mường Khương (n=1) (hộ dân ở huyện Mường Khương, tỉnh Lào Cai). Các mẫu gan sau khi thu thập được đông lạnh nhanh trong dung dịch ni tơ lỏng hoặc dung dịch mRNA-later (QIAGEN, Hilden, Germany) và được bảo quản tại -40°C cho đến khi phân tích.

2.2. Phân lập mRNA và tổng hợp cDNA

Tổng số mRNA được phân lập từ mẫu gan của động vật thí nghiệm sử dụng TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, CHLB Đức). Sau đó chuỗi cDNA được tổng hợp nhờ vào oligo (dT)₁₃ VN primer (Promega, Mannheim, CHLB Đức), random hexamer primers (Promega, Mannheim, CHLB Đức) và Super ScriptTM III Rnase H (Invitrogen, Karlsruhe, CHLB Đức) (Wimmers và cs., 2003).

2.3. Thiết kế môi

Dựa vào những chuỗi gen đã biết: Genbank số BP139003.1, CJ007506.1, BX920671, CF363669 và công cụ Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000), những cặp môi đặc hiệu sẽ được thiết kế dọc theo chuỗi cDNA của pC9 và được gửi đến Công ty Sigma-Aldrich (Taufkirchen, CHLB Đức) để tổng hợp (Bảng 1).

2.4. Phản ứng PCR (Polymerase chain reaction)

Tổng số 20 µl dung dịch phản ứng PCR gồm 50 ng cDNA, 0,2 mM mỗi (forward or reverse primer), 50 µM dNTP (Roth, Karlsruhe; CHLB Đức), 0,5 U Taq polymerase (Sigma - Aldrich, Taufkirchen, CHLB Đức), 1xTaq buffer và 1,5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, CHLB Đức). Chu trình nhiệt được thiết kế với nhiệt độ biến tính ban đầu 94°C trong 4 phút, theo sau bởi chu trình khuếch đại 40 vòng (94°C trong 30 giây, 60°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút) và kết thúc ở 72°C trong 5 phút sử dụng T1 Research Thermocycler (Biometra, Göttingen, CHLB Đức). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% nhuộm với ethidium bromide. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng phương pháp kết tủa ethanol trước khi gửi đến Viện Sinh học gia súc FBN - Dummerstorf, CHLB Đức để giải mã trình tự bằng thiết bị ABI 310 Gene Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, CHLB Đức).

Bảng 1. Những cặp mồi được dùng để đọc trình tự chuỗi cDNA

Tên cặp mồi	Đoạn mồi (exon)	Vị trí, nt ^(*)	Chiều dài, bp	Nhiệt độ annealing, °C
C9.1	up 5'-cctttgcagatgcattttaga-3' (1)	112-133	618	60
	down 3'-ttctgaaattttgtcaactttgg-5' (5)	706-729		
C9.2	up 5'-aaagaggcgcctctgtgta-3' (4)	428-447	708	62
	down 3'-tgggtccataggttccaa-5' (7)	1116-1135		
C9.3	up 5'-tattctgcatgtcaaaggag-3' (7)	979-999	606	50
	down 3'-ccaagtttttctttaggttg-5' (10)	1561-1584		
C9.4	up 5'-atgctccgggtctcataaat-3' (9)	1492-1511	526	55
	down 3'-ccgcatatttgactgctgac-5' (11)	1998-2017		

^(*) Vị trí của đoạn mồi theo GenBank số DQ333198

2.5. Nhận diện sự đa hình (Single nucleotide polymorphism, SNP)

Các đột biến điểm (SNP) được nhận diện dựa trên sự so sánh chuỗi cDNA của các động vật thí nghiệm. Các SNP sẽ được tái xác định bằng phương pháp PCR - RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) sử dụng enzyme phân cắt giới hạn *BsrDI* (Fermentas, www.fermentas.com) và *HpyCH4III* (Biolabs, www.biolabs.com).

3. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm chuỗi cDNA

Toàn bộ chiều dài vùng mã hoá của pC9 đã được nhận diện và được xác định thuộc nguồn GenBank số DQ333198. Chuỗi cDNA của pC9 dài 2536 bp gồm 11 exon (sự phân biệt exon dựa trên nguyên tắc cấu trúc DNA: exon 1-GT.intron.AG-exon 2). Với công thức nguyên tử $C_{2748}H_{4301}N_{753}O_{836}S_{30}$, trọng lượng phân tử pC9 được ước lượng khoảng 62.23 kDa (ProtParam tool). Chuỗi cDNA C9 ở lợn, người và bò có sự tương đồng cao ($\geq 78\%$) trong cấu trúc (Bảng 2).

3.2. Đặc điểm cấu trúc bậc một của phân tử protein

Chiều dài chuỗi cDNA mã hoá 534 axit amin. Dấu hiệu polypeptide được nhận diện giữa axit amin (a.a) thứ 20 và 21 (SignalP 3.0 Server, www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Một số vùng trên protein pC9 có đặc điểm

giống như các miền protein chức năng giàu cysteine như thrombospondin type I (TSP1, a.a 45-95), low-density lipoprotein receptor domain Class A (LDLa, a.a 100-136) và MAC/perforin domain (MACPF, a.a 297-507) (SMART, smart.embl-heidelberg.de/smart) (Hình 2).

Protein pC9 có 19 cyteine tương ứng với 9 cầu nối disulfide được thành lập: Cys¹-Cys¹¹, Cys²-Cys¹⁴, Cys³-Cys¹⁹, Cys⁴-Cys⁵, Cys⁶-Cys¹⁵, Cys⁷-Cys⁹, Cys⁸-Cys¹³, Cys¹⁰-Cys¹⁸, Cys¹²-Cys¹⁶ (DiANNA 1.1, clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA). Các miền protein chức năng TSP1, LDLa và MACPF lần lượt có 5, 6 và 2 cysteine. Hai vị trí N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) tại a.a 35 và 455 (NetNGlyc 1.0 Server, www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), C-mannosylation motif (WGEW) trong miền TSP1 (a.a 48-51) (NetCGlyc 1.0 Server, www.cbs.dtu.dk/services/NetCGlyc/) và hai vị trí O-glycosylation (Thr²⁴ và Thr³⁷) (NetOGlyc 3.1 Server, www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/) được nhận diện. Các glycated lysines được tìm thấy tại a.a. 207, 210, 231, 232, 242, 280, 296, 321, 336, 368, 415, 444, 494 và 536 (NetGlycate 1.0 Server predictor, www.cbs.dtu.dk/services/NetGlycate/) (Hình 1). Sự tương đồng cao (>50%) ở chuỗi protein giữa các loài hữu nhũ được ghi nhận, đặc biệt giữa các loài lợn, bò và người (67 - 71%) (ClustalW2, http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) (Bảng 2).

Bảng 2. Sự đồng dạng trong chuỗi cDNA và protein C9 giữa các loài động vật (%)

Loài ^(*)	cDNA			Axit amin		
	GenBank số	bp	%	GenBank số	a.a	%
<i>S. scrofa</i>	DQ333198	2536	100	ABD13966	543	100
<i>E. caballus</i>	NM_001081950	2661	79	NP_001075419	547	71
<i>B. taurus</i>	BC105174	2697	78	AAI05175	548	70
<i>H. sapiens</i>	BC020721	2094	78	AAH20721	559	67
<i>O. cuniculus</i>	NM_001082346	2018	77	NP_001075815	557	66
<i>M. mulatta</i>	XM_001084671	2774	73	XP_001084671	561	69
<i>C. familiaris</i>	XM_536494	1840	72	XP_536494	589	65
<i>R. norvegicus</i>	NM_057146	2083	66	NP_476487	567	61
<i>M. domestica</i>	XM_001372031	1572	66	XP_001372068	523	52
<i>M. musculus</i>	BC011137	1767	64	AAH11137	561	55

^(*) *S.scrofa*: lợn, *E. caballus*: ngựa, *B. taurus*: bò, *H. sapiens*: người, *O. cuniculus*: thỏ, *M. mulatta*: khỉ, *C. familiaris*: chó, *R. norvegicus*: chuột bạch, *M. domestica*: ruồi, *M. musculus*: chuột nhà

<i>R. norvegicus</i>	MLLRTPLPRLRSGMASGVTITLAI AIFALEINAQAP EPTPREEPSAD--ALLPIDCRMST	58
<i>M. musculus</i>	MLCKPPGLPRSSMASGMAITLALAI FALGVNAQMPIV SREEQEQH--YPIPIDCRMSP	58
<i>S. scrofa</i>	-----MRVRRRFTFAV CILEISILS AGPTPSYHPKPVDCGTPSPIDCRMSP	47
<i>B. taurus</i>	-----MSAGQRFAF AICILEIS LLRAGPTPSYD--PAERQGTPLPIDCRMSS	45
<i>M. mulatta</i>	-----MSACWSFAAA ICILEIS VLTA EYTPSYDPQPTESRGASASHIDCRMSP	47
<i>H. sapiens</i>	-----MSACRSFAVA ICILEIS ILTAQYTTSDPEL TESSGSASHIDCRMSP	47

TSP1 domain (45-95)

<i>R. norvegicus</i>	WSQWS QCDPCLKQFRFRSRSM EVFGQFGKSCADALGDRQHCEPTQEEVQENCG-NDFQ	117
<i>M. musculus</i>	WSNWS ECDPCLKQFRFRSRSILAFGQFNGKSCVDVLGDRQGC EPTQEEI QENCG-NDFQ	117
<i>S. scrofa</i>	WGEWS RCDPCLKQMFRRSRIETFGQFNGQKCVDAVGDRRCVPTPECEDELEDCG-SDF	106
<i>B. taurus</i>	WSEWS KCDPCLKQMFRRSRIETFGQFNGRKCVDVAVGDRQC VPTEACEDEPEEGCG-NDFQ	104
<i>M. mulatta</i>	WSEWS QCDPCLRQMFRRSRIEVFGQFNGKSC TDAVGDRRCVPTPECEDAEDDCG-NDFQ	106
<i>H. sapiens</i>	WSEWS QCDPCLRQMFRRSRIEVFGQFNGKRCTDAVGDRRCVPTPECEDAEDDCG-NDFQ	106

LDLa domain (100-136)

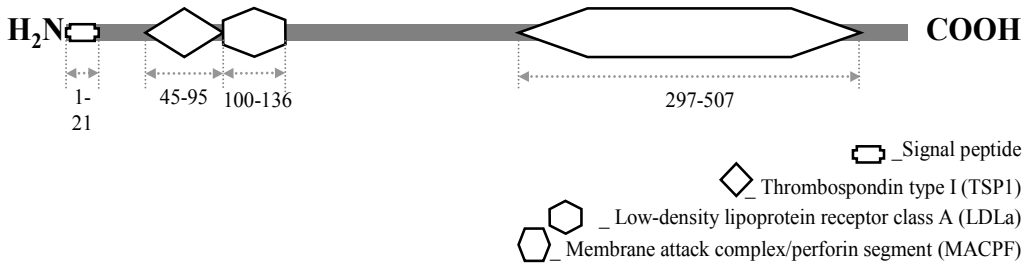
<i>R. norvegicus</i>	CETGR CIK RRLLCNGDNDCGDFSD ESDCEDPRLP CRDRVVEESELGRTAGYGINILGMD	177
<i>M. musculus</i>	CETGR CIK RRLLCNGDND CGDYSDENDCDDDP RTPCRDRVAE ESELGLTAGYGINILGME	177
<i>S. scrofa</i>	CGTGR CIK RRLLCNGDND CGDFSD EDED CDSDPRPPCRERVVEESELARTAGYGINILGMD	166
<i>B. taurus</i>	CGTGR CIK RRLLCNGDNDCGDYSDENDCQDPRPPCRNRVVEESELARTAGYGINILGMD	164
<i>M. mulatta</i>	CGTGR CIK RRLLCNGDNDCGDFSD EDEDCEGDPRPPCRDRVVEESELARTAGYGINILGMD	166
<i>H. sapiens</i>	CGTGR CIK MRLRCNGDND CGDFSD EDEDCESEPRPPCRDRVVEESELARTAGYGINILGMD	166
<i>R. norvegicus</i>	PLGTPFDNEFYNGLCDRVRDGNTLTYYRKPWNVAFLAYETKADKNFR TENYEEQFEMFKT	237
<i>M. musculus</i>	PLRTPFDNEFYNGLCDRVRDEK--TYRKPWNVSLIYETKADKSFRTENYDEHLEVFKA	235
<i>S. scrofa</i>	PLTTPFDNEFYNGLCDRVRDGNTLTYYRKPWNVAAL IYETKVDKNFRTEYHERQIQVLKT	226
<i>B. taurus</i>	PLSTPFDNQYNGLCDRVWDGNTLTYYRRPWNVASLTYDTKADKNFRTENHEESIQLIRT	224
<i>M. mulatta</i>	PLSTPFDNEFYNGLCDNRDRD GNTLTYYRRPWNVASLIYETKGEKNLRTHEHYEQIEAFKS	226
<i>H. sapiens</i>	PLSTPFDNEFYNGLCDNRDRD GNTLTYYRRPWNVASLIYETKGEKNFRTEHYEEQIEAFKS	226
<i>R. norvegicus</i>	IVRDRTTSFNANLALKFTI TEAP IKK-VGVDEV SPE--KNSSKPKDSSVDFQF SYFKKEN	294
<i>M. musculus</i>	INREKTSNFNAD FALKFSATEVPEK--GAGEVSPA--EHSKPTNISAKFKFSYFMGKN	290
<i>S. scrofa</i>	IIEEK K SNFNADLTIKFTPT EAIEQLKSKNVELANE-ENSNP--MNNKAHFRFTYSKTET	283
<i>B. taurus</i>	IIEEKLNFNAGLSVKYTPVEAIEKNKCV DLEHSDKGSTSSPKLAAEAKFRFTYSKDDI	284
<i>M. mulatta</i>	IVQEKTSNFNADISLKFIPTEANK----VKTEKSSE-KQASSNSLRGQGSFRFYSKNET	281
<i>H. sapiens</i>	IIQEKTSNFNAAISLKFIPTE TN-----KAEQCE-ETASSISLHGKGSFRFYSKNET	279
<i>R. norvegicus</i>	FQRLSSYLSQTKKMFLHVRGM IQLGRFVMMNRGVM LTTTFLDDVKALPVSYEKGEYFGL	354
<i>M. musculus</i>	FRRLSSYFSQSKMFVHLRGV VQLGRFVMMNRD VVLRSTFLDDVKALPTS YEKGEYFGL	350
<i>S. scrofa</i>	YKLLLSYSSKKEKIFLHVKGVIHLGRFVMRKR DVMLTKTFLDDVKYLPSTY YK GEYFAFL	343
<i>B. taurus</i>	YRLLSYSAKQEKMF LHVKGKVLHLGRFVMSR DVMLQTTFLLDSINTLPPTYEKGEYFAFL	344
<i>M. mulatta</i>	YQLFLSYSSKKEKMFLHVKGEIHLGRFMMNRD VVLTTFVDDIKALPTTYEKGEYFAFL	341
<i>H. sapiens</i>	YQLFLSYSSKKEKMFLHVKGEIHLGRFVMMNRD VVLTTFVDDIKALPTTYEKGEYFAFL	339

Hình 1. So sánh chuỗi protein C9 giữa các loài động vật sử dụng nguồn GenBank ở bảng 2

<i>R. norvegicus</i>	ETYGTHYSSSGSLGGLYELIYVLDKASMKEKGVELSDVKRC LGFNLDVSLYTPLQTALEG	414
<i>M. musculus</i>	ETYGTHYSTSGSLGGQYEVIVYVLDKASMKEKGVLDNDVKHC LGFNMD--LRIPLQDDLKD	408
<i>S. scrofa</i>	ETYGTHYSSSGSLGGLYELIYVLDKATMTEKGIELRDVHRC LGFNLDLSLN-----FG	396
<i>B. taurus</i>	ETYGTHYSSSGSLGGLYELIYVLDKKSMEQKDIELRDVQRC LGFDLDLSLK-----VG	397
<i>M. mulatta</i>	ETYGTHYSSSGSLGGLYELIYVLDKASMNRRKGVELKDVKRC LGYHLDVSLDF-----SK	395
<i>H. sapiens</i>	ETYGTHYSSSGSLGGLYELIYVLDKASMKRRKGVELKDIKRC LGYHLDVSLAF-----SE	393
	*****:*.*:* *:*:***** * .*.:*: *:*:***** .:*	
MACPF domain (297-507)		
<i>R. norvegicus</i>	PSLTANVNHSDCLKTGDGKVVNISRDHIIDDVISFIRGGTRKQAVLLKEKLLRGAKTIDV	474
<i>M. musculus</i>	ASVTASVNADGCIKTDNGKTVNITRDNIIDDVISFIRGGTREQAILLKEKILRGDKTFDK	468
<i>S. scrofa</i>	VEIKGKIDSENCLKRGDGKTENIMNDDFIDDVISFIRGGTRKYATELKEKLLGAKMTIIV	456
<i>B. taurus</i>	VEVTGNFDSKLCSSKKGMQTEFNPEADLFDVITFIRGGTRKYATELKEKLLRGARMINV	457
<i>M. mulatta</i>	ISAGAKADKDDCVKRGEGRAVNITSDHLIDDVISLIRGGTRQYAFELKEKLLRG-TMIDV	454
<i>H. sapiens</i>	ISVGAEFNKDDCVKRGEGRAVNIITSENLIIDDVSLIRGGTRKYAFELKEKLLRG-TVIDV	452
 * :*:*:***** * *:*:***** .:	
<i>R. norvegicus</i>	NDFINWASSLDDAPALISQKLSPIYNLIPLTMKDAYAKKQNMKEAIEDYVNEFSARKCYP	534
<i>M. musculus</i>	TDFANWASSLANAPALISQRMSPINLIPLKIKDAYIKKQNLKAVEDEYIDEFSTKRCYP	528
<i>S. scrofa</i>	TDFVNWASSLNDAPVLIHQKLSPIYDLIPVKLNDAHLKQNLERAIEDYINEFNVRKMP	516
<i>B. taurus</i>	TDFVNWAASLNHAPVLIHQKLSPIYDLIPVKMKDAHLKKQNLERAIEDYINEFSVRKQ	517
<i>M. mulatta</i>	TDFVNWASSINDAPVLIHQKLSPIYNLVPVKMKNAHLKKQNLERAIEDYINEFSVRK	514
<i>H. sapiens</i>	TDFVNWASSINDAPVLIHQKLSPIYNLVPVKMKNAHLKKQNLERAIEDYINEFSVRK	512
	.** *:*:*. *.*.*.*.*:*: * *:*:***** :*: *:*:***** :*: *:*:***** .:	
<i>R. norvegicus</i>	CQNGGTAILLDGOCMCSCTIKFKGIACEISKQR-----	567
<i>M. musculus</i>	CLNGGTIILLDGOCLCSCPMMFRGMACEIHQKI-----	561
<i>S. scrofa</i>	VPEWRDSDSAGWTVFVFLPKQISGNCL-----	543
<i>B. taurus</i>	CQNGGTVVLLDGEVCSCPKFKGVACEIKK-----	548
<i>M. mulatta</i>	CQNGGTAILLMDGKCLCTCPFKFEGIACEISKQKVSEGLPALDFPREK	561
<i>H. sapiens</i>	CQNGGTVILMDGKCLCACPFKFEKIACEISKQKISEGLPALEFPNEK	559
	: : * .	

Hình 1 (tiếp theo)

Đoạn in nghiêng đậm đầu tiên là dấu hiệu peptide. Các cysteine được tô màu xám. Những đoạn được gạch dưới liên tục để phân biệt các miền protein chức năng giàu cysteine. Vị trí N-glycosylation ở người (NET và NIT) và ở lợn (NGT và NVT) được in nổi và gạch dưới. Vị trí C-manoglycated (W) được in đậm. Chuỗi axit amin (DCGDF/YSDE) có khả năng kết nối apoprotein B và E. Vị trí glycated lysines được in nghiêng đậm.

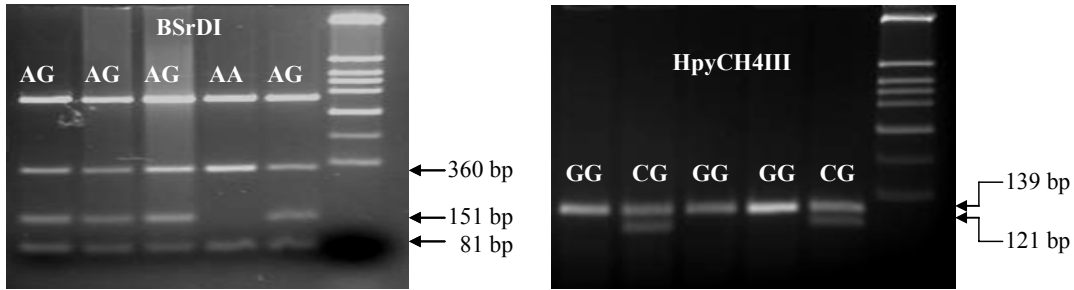


Hình 2. Các miền protein chức năng giàu Cysteine trong cấu trúc của C9 ở lợn

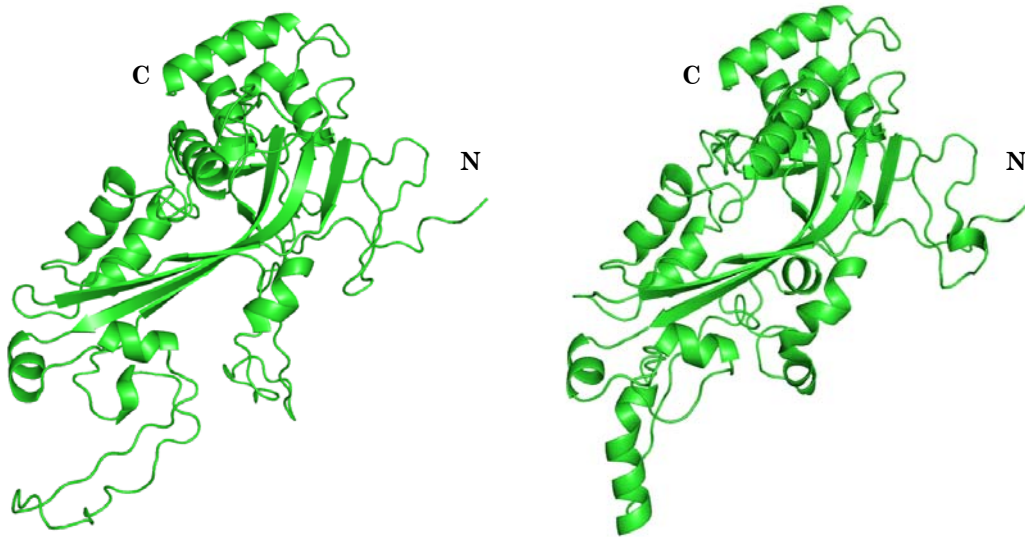
3.3. Sự đa hình của gen

So sánh chuỗi cDNA giữa các động vật thí nghiệm đã phát hiện 2 đột biến điểm tại nucleotide 350A→G/*BsrDI* (codon 87CAA

→ CAG) trên miền TSP1 và 407C → G/*HpyCH4III* (codon 106CAC → CAG) trên miền LDLa của gen pC9. Đột biến điểm trên miền LDLa làm thay đổi a.a His → Gln (Hình 3).



Hình 3. Mẫu đại diện cho sự phân cắt của các enzyme giới hạn tại các điểm đột biến



Hình 4. Cấu trúc 3D tương đồng giữa đoạn protein C9 ở lợn (trái) và người (phải)

3.4. Thảo luận

Gen pC9 đã được định vị trên chromosome 16q1.4 b bằng phương pháp fluorescence in situ hybridization (Thomsen và cs., 1998). Giống với C9 ở người, pC9 có vùng 3UTR khá dài (815 bp). Chính vùng này đóng vai trò quan trọng trong sự thể hiện chức năng của C9 đối với tế bào mục tiêu (DiScipio và cs., 1984). C9 kết nối với các thành phần C5b, C6, C7, C8A, C8B, C8G để thành lập phức hợp MAC (Taylor và cs., 1997). Những thành phần cuối cùng trong phức hợp bổ thể có cấu trúc tương đối giống nhau, nhưng khác nhau về kích cỡ và hoàn

toàn phức tạp (Hobart, 1998). Riêng ở lợn, protein pC9 trình diễn sự đồng dạng 22-27% so với pC6 (GenBank số ABD13967), pC7 (GenBank số AAD45918), pC8A (GenBank số ABD13968) và pC8B (GenBank số ABD13969). Có lẽ những thành phần này được sinh ra từ một gen tổ tiên chung và ở đó C6 và C7 được xuất hiện sớm nhất để hình thành những vị trí kết nối với các thành phần còn lại (Mondragón-Palomino và cs., 1999, Katagiri và cs., 1999).

Chuỗi protein C9 ở lợn ngắn hơn ở *E.caballus*, *B.Taurus*, *O.cuniculus*, *H.sapiens*, *M.musculus*, *M.mulatto*, và

R.norvegicus, nhưng dài hơn *M.domestica*. Khoảng 7,8% thành phần C9 là carbohydrate (Biesecker và cs., 1982, Biesecker và cs., 1980). Carbohydrate thường gắn kết với các protein huyết tương tại vị trí N - glycosylation với đặc điểm chuỗi Asn - X - Ser/Thr (Clamp và cs., 1975). Cả hai C9 ở lợn và người (DiScipio và cs., 1984, DiScipio và Huglis, 1985; Stanley và cs., 1985) có hai N-glycosylation nhưng không trùng lặp vị trí của nhau trên chuỗi. Protein pC9 có 145 axit amin kỵ nước (ALIVMW) và 265 axit amin ưa nước (DEKNQRST). Đầu amino (-NH₂) giàu cysteine hơn đầu carboxyl (-COOH). Vì vậy, có thể nhiều cầu nối disulfide sẽ được hình thành ở vùng amino. Những protein có nhiều cầu nối disulfide sẽ có cấu trúc chuỗi polypeptide bền vững hơn (Stanley và cs., 1985; Lengweiler và cs., 1996).

Protein pC9 là một đại phân tử glycoprotein được cấu thành từ những phân tử nhỏ hơn có cấu trúc giống như những protein giàu cysteine (TSP1, LDLa, MACPF). Các miền protein này đóng vai trò khác nhau trong sự điều hoà và biểu hiện của gen. Hầu hết miền LDLa ở các loài động vật có chuỗi Asp-Cys-X-Asp-Gly-Ser-Asp-Glu có chức năng kết nối với apoprotein B và E (Yamamoto và cs., 1984; Stanley và cs., 1985). Những kháng thể đặc hiệu sẽ liên kết với LDLa của C6, C7 và C9 để chống lại mầm bệnh (Tschopp và cs., 1986). Trong khi đó chuỗi đồng dạng với TSP1 giữ vai trò quan trọng trong cơ chế chống lại vật chủ của ký sinh trùng sốt rét (Goundis và cs., 1988). Trong quá trình hình thành MAC, C9 kết nối với C8A nhờ vào miền MACPF của C8A (Slade và cs., 2006). Các protein chứa MACPF giữ vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch của động vật có xương sống, cũng sự phát triển giai đoạn đầu và sự phát triển của tế bào thần kinh (Rosado và cs., 2007). Cấu trúc của MACPF gần giống với sự hình thành kẽ hở cholesterol-dependent cytolysins (CDCs) của vi khuẩn Gram dương. Vì thế những protein chứa MACPF có khả

năng làm phá vỡ màng tế bào như cơ chế của CDC (Rosado và cs., 2007). Theo Stanley và cs. (1985), những protein giàu cysteine khá bền đối với proteases. Vì thế, chức năng của C9 sẽ bộc lộ sau sự thành lập MAC. Khác với người (Ullrich và cs., 1984), protein C9 ở lợn không có miền EGF (Epidermal Growth Factor).

Sự đa hình gen được tìm thấy trên các miền protein chức năng. Một trong hai SNP đã làm thay đổi thành phần axit amin. Điều này có thể ảnh hưởng đến cấu trúc, chức năng của miền, protein, cũng như vai trò kháng bệnh của pC9. Đột biến là một trong những nguyên nhân dẫn đến sự miễn cảm và tái nhiễm khuẩn cầu não, non-Hodgkin lymphoma đã được nghiên cứu ở người (Witzel-Schlmp và cs., 1997; Khajooe và cs., 2003; Cerhan và cs., 2009). Vì thế sự liên kết giữa các điểm đột biến pC9 và các thông số miễn dịch sẽ được đầu tư trong những nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

C9 là thành phần cuối cùng của phức hợp bổ thể cũng như tập hợp MAC, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế miễn dịch tự nhiên của vật chủ. Ở lợn, protein C9 là một đại phân tử có cấu trúc khá tương đồng với các loài động vật hữu nhũ. pC9 được cấu thành từ những phân tử nhỏ hơn (TSP1, LDLa, MACPF), có chức năng tích cực trong việc chống lại mầm bệnh xâm nhiễm. Sự đa hình được tìm thấy ở gen pC9 là cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn về sự liên kết di truyền của pC9 với hoạt động tiêu máu (hemolytic complement activity) cũng như vai trò của pC9 trong cơ chế miễn dịch ở lợn.

Lời cảm ơn

Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Nghiên cứu Giáo dục CHLB Đức (BMBF) và sự chỉ dẫn khoa học của GS.TS. Klaus Wimmers (Viện Nghiên Cứu Sinh học gia súc FBN-Dummerstorf, CHLB Đức).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biesecker, G., C. Gerard, T.E. Hugli TE (1982). An amphiphilic structure of the ninth component of human complement. *J Biol Chem* 257, 2584-2590.
- Biesecker, G., H.J. Muller - Eberhard (1980). The ninth component of human complement: purification and physicochemical characterization. *J Immunol* 124, 1291-1296.
- Clamp, J,R, (1975). The plasma proteins: structure, function and genetic control. *In: Putnam FW (Eds.). The Plasma Proteins. Academic, New York* 2, 163-211.
- Cerhan, J.R., A.J. Novak , Z.S. Fredericksen, A.H. Wang, M. Liebow, T.G. Call, A. Dogan, T.E. Witzig, S.M. Ansell, T.M. Habermann, N.E. Kay, S.L. Slager (2009). Risk of non - Hodgkin lymphoma in association with germline variation in complement genes. *Br J Haematol* 145: 614 - 623.
- DiScipio, R.G., M.R. Gehring, E.R. Podack, C.C. Kan, T.E. Hugli, G.H. Fey (1984). Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of human complement component C9. *Proc Nat Acad Sci* 81, 7298 - 7302.
- DiScipio, R.G., T.E. Hugli (1985). The architecture of complement component C9 and poly(C9). *J Biol Chem* 260, 14802-14809.
- Eng, R.H.K. (1980). Bactericidal screening test for late complement component deficiencies or defects. *J Clin Microbiol* 11, 631-634.
- Goundis, D., K.B.M. Reid (1988). Properdin, the terminal complement components, thrombospondin and the circumsporozoite protein of malaria parasites contain similar sequence motifs. *Nature* 335, 82 - 85.
- Haeney, M.R., R.A. Thompson, J. Faulkner, P. Mackintosh, A.P. Ball (1980). Recurrent bacterial meningitis in patients with genetic defects of terminal complement components. *Clin Exp Immunol* 40, 16 - 24.
- Hobart, M. (1998). The evolution of the terminal complement genes: ancient and modern. *Exp Clin Immunogenet* 15, 235 - 243.
- Ichikawa, E., J. Furuta, Y. Kawachi, S. Imakado, F. Otsuka F (2001). Hereditary complement (C9) deficiency associated with dermatomyositis. *Br J Dermatol*, 1080-1083.
- Katagiri, T., I. Hirono, T. Aoki (1999). Molecular analysis of complement component C8 β and C9 cDNAs of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenet* 50, 43 - 48.
- Khajoev, V., K. Ihara, R. Kira, M. Takemoto, H. Torisu, Y. Sakai, J. Guanjun, P.M. Hee, K. Tokunaga, T. Hara (2003). Founder effect of the C9 R95X mutation in Orientals. *Hum Genet* 112: 244-248.
- Kolb, W.P., J.A. Haxby, C.M. Arroyave, H.J. Muller-Eberhard HJ (1972). Molecular analysis of the membrane attack mechanism of complement. *J Exp Med* 135, 549 - 566.
- Lengweiler S., J. Schaller, E.E. Rickli (1996). Identification of disulfide bonds in the ninth component (C9) complement. *FEBS Letters* 380, 8-12.
- Mondragón-Palomino, M., D. Piñero, A. Nicholson-Weller, J. Lacleste, P. Lacleste (1999). Phylogenetic analysis of the homologous proteins of the terminal complement complex supports the emergence of C6 and C7 followed by C8 and C9. *J Mol Evol* 49, 282-289.
- Muller - Eberhard, H.J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annual Review Immunol*, 503-528.
- Podack, E.R., J. Tschoop, H.J. Muller - Eberhard (1982). Molecular organization of C9 within the membrane attack

- complex of complement. Induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly. *J Exp Med* 156, 268-282.
- Rosado, C.J., A.M. Buckle, R.H. Law RH, R.E. Butcher, W.T. Kan, C.H. Bird, K. Ung, K.A. Browne, K. Baran, T.A. Bashtannyk-Puhlovich, N.G. Faux, W. Wong, C.J. Porter, R.N. Pike, A.M. Ellisdon, M.C. Pearce, S.P. Bottomley, J. Emsley, I.A. Smith, I. Rossjohn, E.L. Hartland, I. Voskoboinik, J.A. Trapani, P.I. Bird, M.A. Dunstone, J.C. Whisstock (2007). A Common Fold Mediates Vertebrate Defense and Bacterial Attack. *Science* 317, 1548-1551.
- Rozen, S., H.J. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols. Methods Mol Biol* 132, 365 - 386.
- Slade, D.J., B. Chiswell, J.M. Sodetz (2006). Functional studies of the MACPF domain of human complement protein C8alpha reveal sites for simultaneous binding of C8beta, C8gamma, and C9. *Biochemistry* 45, 5290 - 5296.
- Stanley, K.K., H.P. Kocher, J.P. Luzio, P. Jackson, J. Tschopp (1985). The sequence and topology of human complement component C9. *EMBO J* 4, 375-382.
- Taylor, K.M., A.R. Trimby, A.K. Campbell (1997). Mutation of recombinant complement component C9 reveals the significance of the N-terminal region for polymerization. *Immunology* 91, 20-27.
- Thomsen, D.P., A.K. Winterú, M. Fredholm M (1998). Chromosomal assignments of 19 porcine cDNA sequences by FISH. *Mamm Genome* 9, 394-396.
- Tschopp, J. (1984). Circular polymerization of the membranolytic ninth component of complement. Dependence on metal ions. *J Biol Chem* 259, 10569-10573.
- Tschopp, J. (1984). Ultrastructure of the membrane attack complex of complement: heterogeneity of the complex caused by different degree of C9 polymerization. *J Biol Chem* 259, 7857-7863.
- Tschopp, J., D. Masson, K.K. Stanley (1986). Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T - lymphocyte - mediated cytolysis. *Nature* 322, 831-834
- Ullrich, A., L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger J, et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., S. Barroso, K. Walter, A.J. Alvarez, A. Alarcón, M. López-Trascasa, I. Wichmann, F. Aguilar F, A. Núñez-Roldán, B. Sánchez (2003). Complement component C7 deficiency in a Spanish family. *Clin Expl Immunol* 133, 240-246.
- Volanakis, J.E. Overview of the complement system. *In: Volanakis JE, Frank M, editors (1998). The human complement system in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc, 9-32.*
- Wimmers, K., S. Mekchay, K. Schellander, S. Ponsuksili (2003). Molecular characterization of the pig C3 gene and its association with complement activity. *Immunogenetics* 54, 714-724.
- Witzel-Schlömp, K., P.J. Späth PJ, M.J. Hobart, B.A. Fernie, C. Rittner, T. Kaufmann, P.M. Schneider (1997). The human complement C9 gene: identification of two mutations causing deficiency and revision of the gene structure. *J Immunol* 158:5043-5049.
- Yamamoto, T., C.G. Davis, M.S. Brown, W.J. Schneider, M.L. Casey, J.L. Goldstein, D.W. Russell (1984). The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with

- multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39, 27 - 38.
- Yonemasu, K., H. Kitajima, S. Tanabe, T. Ochi, H. Shinkai (1978). Effect of age on C1q and C3 levels in human serum and their presence in colostrums. *Immunology* 35, 523 - 530.
- Zhu, Z.B., T.P. Atkinson, K.T. Hovanky, S.B. Boppana, Y.L. Dai, P. Densen, R.C.P. Go, J.S. Jablecki, J.E. Volanakis (2000). High prevalence of complement component C6 deficiency among African-Americans in the South-eastern USA. *Clin Exp Immunol* 119, 305-310.