

RNA VÒNG 0087207 THÚC ĐẨY QUÁ TRÌNH CHẾT THEO CHƯƠNG TRÌNH TRÊN TẾ BÀO HẠCH THẦN KINH VÕNG MẠC BIỆT HÓA TỪ TẾ BÀO GỐC VẠN NĂNG CỦA BỆNH NHÂN LEBER

Nguyễn Hoàng Long¹, Trần Thị Thanh Huyền¹, Phan Thị Tố Như¹,
Nguyễn Nữ Hải Yến¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu này nhằm tìm ra một RNA vòng tiềm năng—đóng vai trò là yếu tố thứ cấp—tham gia vào cơ chế bệnh sinh Leber. **Phương pháp:** các dòng TBHTKVM được biệt hóa từ tế bào gốc vạn năng nhân tạo (TBGVNNT) có nguồn gốc từ người mang gen ND4 bình thường, người mang đột biến ND4 của bệnh Leber và bệnh nhân Leber. Chúng tôi so sánh sự biểu hiện của RNA vòng giữa các dòng TBHTKVM từ nguồn trên để chọn ra RNA vòng tiềm năng. Sau đó, Chúng tôi tiếp tục tăng hoặc giảm biểu hiện RNA vòng tiềm năng này trên các dòng TBHTKVM để tìm hiểu về vai trò của RNA vòng trong cơ chế bệnh Leber. **Kết quả:** TBGVNNT được tạo ra từ các tế bào máu ngoại vi có nguồn gốc từ người mang gen ND4 bình thường, người mang đột biến ND4 của bệnh Leber và bệnh nhân Leber được biệt hóa thành công thành TBHTKVM. Các TBHTKVM nguồn gốc từ bệnh nhân Leber có tỉ lệ chết theo chương trình cao hơn đáng kể so với các dòng TBHTKVM còn lại. Kết quả RT-PCR xác nhận RNA vòng 0087207 là RNA vòng có mức biểu hiện khác biệt nhất trong các TBHTKVM nguồn gốc từ bệnh nhân Leber so với hai dòng TBHTKVM còn lại. Sự biểu hiện quá mức của RNA vòng 0087207 đã làm tăng tỉ lệ chết theo chương trình trong các TBHTKVM mang đột biến ND4 của bệnh Leber nhưng không thay đổi mức chết theo chương trình trong các TBHTKVM mang gen ND4 bình thường. Thêm vào đó, việc loại bỏ RNA vòng 0087207 làm giảm tỉ lệ chết theo chương trình trong các TBHTKVM có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber. **Kết luận:** Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng sự biểu hiện RNA vòng 0087207 có thể thay đổi tỉ lệ chết theo chương trình của TBHTKVM trong bệnh Leber. Việc điều chỉnh RNA vòng 0087207 trong TBHTKVM có thể đem đến hướng tiếp cận điều trị mới cho bệnh nhân Leber.

Từ khóa: Chết theo chương trình, Leber, RNA vòng, tế bào hạch thần kinh võng mạc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thần kinh thị giác di truyền Leber (bệnh Leber) là một bệnh võng mạc di truyền được đặt tên bởi Theodore Leber, một bác sĩ nhãn khoa người Đức, người đã chẩn đoán và mô tả bệnh lý này ở bệnh nhân của ông vào năm 1871 [1]. Căn bệnh võng mạc di truyền này do đột biến nguyên phát ở ty thể và có thể gây ra tổn thương tế bào hạch thần kinh võng mạc (TBHTKVM), cuối cùng dẫn đến mù lòa [2]. Tình trạng mất thị lực này của bệnh nhân Leber đặc biệt phát triển ở nam

thanh thiếu niên từ 10-30 tuổi. Ngay khi một bên mắt bị mất thị lực, bên mắt còn lại sẽ phát triển vấn đề tương tự trong vòng 2 tháng. Các nghiên cứu dịch tễ học cho thấy tỷ lệ hiện mắc lần lượt là 1 trên 31.000, 1 trên 39.000 và 1 trên 50.000 ở miền bắc Vương quốc Anh, Hà Lan và Phần Lan [3]. Bên cạnh đó, bệnh Leber là bệnh thần kinh phổ biến nhất do đột biến ty thể nguyên phát gây ra, cụ thể ở G11778A / ND4, G3460A / ND1, và T14484C / ND6 của các gen ty thể [4, 5]. Trong số các đột biến này, đột biến ND4 chiếm tới 70% số ca bệnh trên toàn thế giới [3]. Đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu về bệnh Leber kể từ khi nó được phát hiện ra, tuy nhiên cơ chế của bệnh vẫn còn nhiều điểm chưa sáng tỏ và hiện tại vẫn chưa có phương pháp điều trị hiệu quả cho bệnh nhân Leber [6].

¹Bộ môn Y học cơ sở, Khoa Dược lý-Dược lâm sàng, Trường Đại học Dược Hà Nội

Tác giả chịu trách nhiệm khoa học:

Nguyễn Hoàng Long

Tác giả thực hiện chính: Nguyễn Hoàng Long

Email: longnh@hup.edu.vn

Ngày tiếp nhận: 13/02/2023

Ngày phản biện: 12/3/2023

Ngày chấp nhận đăng: 30/3/2023

Trong những năm gần đây, nhờ các phương pháp giải trình tự và định dạng sinh học, RNA vòng đã được phát hiện và thu hút được sự chú ý rộng rãi và thúc đẩy các nhà nghiên cứu tìm hiểu vai trò của chúng [12]. RNA vòng được chứng minh là có liên quan đến việc điều chỉnh sự biểu hiện gen thông qua việc ngăn chặn RNA nhỏ [13]. Các nghiên cứu đã báo cáo rằng các RNA vòng cũng đóng các vai trò khác trong các chức năng cơ bản của tế bào, chẳng hạn như điều hòa phiên mã, dịch mã m6A, điều hòa chu kỳ tế bào và gắn protein [14]. Không giống con đường trưởng thành của RNA thông tin (mRNA), sự hình thành RNA vòng khi một đầu của exon liên kết với đầu kia của exon hoặc thậm chí intron [15], dẫn đến sự hình thành của cấu trúc hình tròn ổn định.

So với bệnh nhân Leber, người mang gen bệnh thường không có triệu chứng, cho thấy sự tồn tại những yếu tố bổ sung phối hợp với đột biến ở ty thể để gây nên các triệu chứng ở người bệnh. Trong nghiên cứu này, đầu tiên chúng tôi tạo lập tế bào gốc vạn năng từ các nguồn: người mang gen ND4 bình thường, người mang gen đột biến ND4 và bệnh nhân Leber có đột biến ND4. Tế bào hạch thần kinh võng mạc biệt hóa từ ba dòng tế bào gốc vạn năng, sau đó chúng tôi so sánh sự biểu hiện khác biệt của RNA vòng trên các dòng tế bào. Chúng tôi đã xác định được RNA vòng có biểu hiện khác biệt nhất trong tế bào hạch thần kinh võng mạc có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber so với nhóm có nguồn gốc từ người mang đột biến ND4 và người không mang đột biến ND4.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: từ 17/02/2020 đến 10/02/2022

Địa điểm: Khoa Nghiên cứu Y học, Bệnh viện Đa khoa Cựu chiến binh Đà Bắc, Đà Bắc, Đà Loan

2.2. Nguyên liệu

Các tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (TĐNTMN) của các thành viên gia đình của bệnh nhân Leber, bao gồm người mang gen ND4 bình thường (bố), người mang gen đột biến ND4 (mẹ) và bệnh nhân Leber do đột biến ND4 (con trai). TĐNTMN được nuôi trên đĩa 24 giếng và được duy trì trong môi trường thích hợp trong bốn ngày. Sau đó, các tế bào được lập trình lại nhờ virus Sendai mang bốn yếu tố Yamanaka, sử dụng bộ kit lập trình lại Sendai CytoTune®-iPS 2.0 (ThermoFisher, A16518) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hai mươi bốn giờ sau, tế bào được thu hoạch và nuôi cấy trong 1mL môi trường thích hợp trong hai ngày, sau đó được duy trì trong môi trường StemPro®-34 không có cytokine. Dung dịch nuôi được làm mới hai ngày một lần và tế bào được ủ trong môi trường có độ ẩm 95% và 5% CO₂ ở 37°C. Sau các quy trình trên, các dòng Dòng tế bào gốc vạn năng nhân tạo (TBGVNNT) đã được tạo ra.

2.3 Các kỹ thuật

2.3.1 Biệt hóa TBGVNNT thành tế bào hạch thần kinh võng mạc (TBHTKVM)

Sau khi đạt đến số lượng đủ, TBGVNNT môi trường StemFlex được tách ra thành các tế bào đơn lẻ nhờ Versene (Gibco). Sau đó, những tế bào này được chuyển sang môi trường gồm StemFlex và dung dịch cảm ứng thần kinh có chứa Advanced DMEM / F12 (Gibco), axit amin không thiết yếu, bổ sung 1% N2 (Invitro-gen) và 2 mg / mL heparin (Sigma) để biệt hóa thành embryoid bodies. Dung dịch nuôi được thay mới cách ngày. Vào ngày 16, các tế bào được nuôi cấy với môi trường biệt hóa võng mạc có chứa Advanced DMEM / F12 (3: 1), bổ sung 2% B27 (có Vitamin A, Invitrogen) và axit amin không thiết yếu trong 10 ngày liên tục. Các tế bào thần kinh được chuyển sang các đĩa phủ laminin để hình thành TBHTKVM. Ba mươi lăm ngày sau khi bắt đầu quy trình, sự phát triển của tế bào thần kinh có thể được quan sát lại một cách dễ dàng.

Từ 3 dòng TBGVNNT, chúng tôi biệt hóa được 3 dòng TBHTKVM: TBHTKVM thường (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT mang gen ND4 bình thường), TBHTKVM mang (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT mang gen đột biến ND4), TBHTKVM bệnh (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT của bệnh nhân Leber do đột biến ND4)

2.3.2 Kỹ thuật đánh giá mức độ chết theo chương trình trong tế bào

Bộ xét nghiệm nhuộm kép Annexin V / PI (BD Pharmingen™) được sử dụng để phát hiện tỷ lệ phần trăm tế bào ở trạng thái sống sót hoặc chết theo chương trình. Tế bào TBHTKVM được nhuộm bằng dung dịch annexin-V - propidium iodide (PI) trong bóng tối. Kết quả được phân tích bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy trên máy đếm tế bào dòng chảy.

2.3.3 Tách chiết RNA và định lượng phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (qRT-PCR)

Tách chiết RNA được tiến hành bằng TRIzol (Invitrogen Life Technologies) theo quy trình của nhà sản xuất. Nồng độ và chất lượng mẫu của RNA được xác định bằng máy NanoDrop. DNA được tổng hợp từ 5 µg RNA bằng cách sử dụng bộ kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), sau đó DNA được pha loãng 20 lần trước khi tiến hành kỹ thuật PCR với bộ kit SYBR®qPCR Master Mix (Invitrogen). qRT-PCR được thực hiện trên hệ thống PCR thời gian thực StepOnePlus™. Các môi được sử dụng cho qRT-PCR được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mỗi dùng cho kỹ thuật qRT-PCR

Tên	Trình tự xuôi	Trình tự ngược
RNA vòng 0065113	TGCGCAAAGATGTGATTTGGA	TCTGAAGGCCAGGTATCCCC
RNA vòng 0059800	TCGTGCAGGCAGTAGGAAA	CATGACTGGGGTGTCTAGAGC
RNA vòng 0076986	GAAGTCTGGTGATGCTGCCA	CAGTACCAATACCCAAAGGTGGA
RNA vòng 0064904	CATGCAACAACAAGGCATCT	AATCCGTTGACTCCGACCTTC
RNA vòng 0025181	CAGTTGCCATGTAGACCCCT	CGCCCAATACGACCAAATCC
RNA vòng 0087207	GCAGGAACAGTGTGGTGAA	GGGAAATTCCAAGTTCTCTTCCA
RNA vòng 0060304	TACCTCCCCTGTCTCGCAC	TGTGTCCCTGGAGGATTTTCG
RNA vòng 0063263	AGGAAAGTGACAGCGAGGG	GGACTTCTAACAGCCCTAGACC
RNA vòng 0089763	GGTGGGCCATACGGTAGTATTTA	TCACCTCAACCCAAAAAGGCAT
RNA vòng 0089762	TTGTAGACCTACTTGCCTGCTG	CTACGAGTACACCGACTACGG
RNA vòng 0089761	AGGGGAAGTAGCGTCTTGTAG	CCCTAGCCAACCCCTTAAACA
GAPDH	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC
ALDH1A1	TGAAATGTGACCCCCAAGTCC	AGGGAAAGAAGCTAAATGCAACT
Gamma Synuclein	TGTGGTGAGCAGCGTCAACACT	TTGGATGCCACACCCTCCTGTT
Beta III Tubulin	TCAGCGTCTACTACAACGAGGC	GCCTGAAGAGATGTCCAAAGGC
Brn3a	TATGCGGAGAGCCTGTCTTCCA	TCTTGCTCTGGGAGACGATGTC
NANOG	CTCCAACATCCTGAACCTCAGC	CGTCACACCATTGCTATTCTTCG
c-Myc	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG
SOX2	GCTACAGCATGATGCAGGACCA	TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT

2.3.4 Kỹ thuật chuyển gen bằng plasmid

Quá trình giảm hoặc tăng biểu hiện của RNA vòng 0087207 trong TBHTLVM được thực hiện bằng cách sử dụng Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) 1 ngày sau khi nuôi cấy thành TBHTKVM

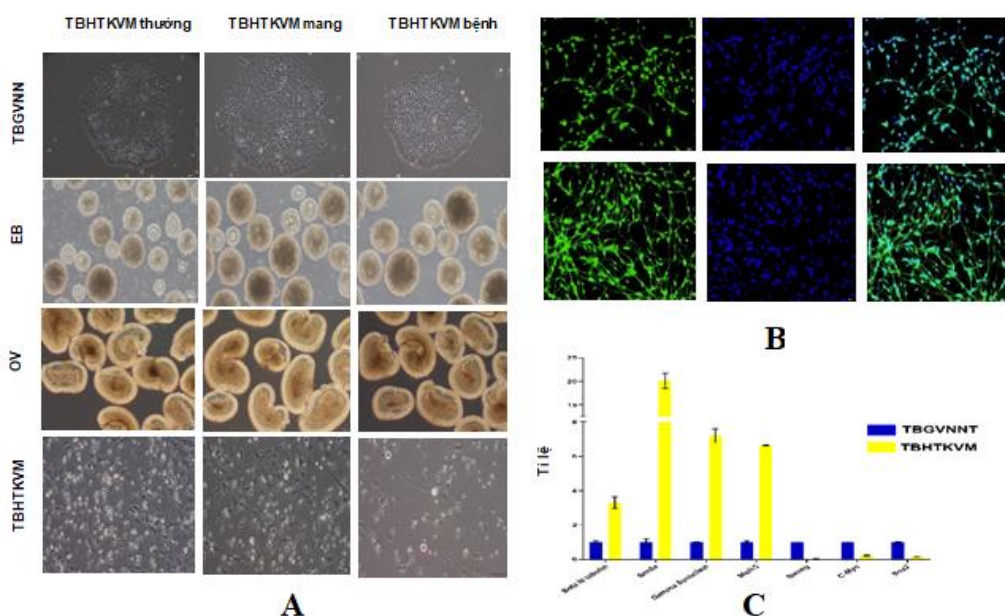
theo quy trình của nhà sản xuất. 5µL P3000™, 7,5µL Lipofectamine™ 3000 với 250µL Opti-MEM (Gibco) và 2,5µg plasmid làm giảm/tăng biểu hiện RNA vòng 0087207 hoặc plasmid đối chứng được pha loãng trong môi trường RDM

cho một giếng trên đĩa 6 giếng. Các tế bào được thu hoạch sau 48 giờ để phân tích.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Các TBHTKVM có nguồn gốc từ TBGVNNT thể hiện các dấu ấn của tế bào thần kinh trong khi dấu ấn tế bào gốc giảm rõ rệt TBHTKVM là tế bào chủ yếu bị ảnh hưởng trong bệnh Leber, vì vậy chúng tôi đã biệt hóa ba dòng TBGVNNT thành TBHTKVM. Hình thái của từng giai đoạn qua sự biệt hóa được biểu diễn trên hình 1A. Hình thái của TBGVNNT ở ngày thứ 4 khi chúng bắt đầu hình thành đám tế bào. Sự tạo thành embryoid body (EB) ở ngày thứ 6 với cấu trúc ba chiều. Optic vesicle (OV), dấu hiệu hình thái đầu tiên của sự hình thành mắt, vào ngày 22 cho thấy cấu trúc nhiều lớp. Vào ngày 25, nuôi

cấy TBHTKVM được thực hiện; sau đó vào ngày 27, chúng ta có thể thấy sợi trục phát triển từ TBHTKVM. Sau khi biệt hóa, kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang được thực hiện với ba dấu ấn thần kinh: Beta-3 tubulin, Gamma-synuclein và Brn-3a. Như kết quả thể hiện trong hình 1B, các dấu ấn này đều biểu hiện mạnh ở TBHTKVM. Để củng cố thêm kết quả, chúng tôi tách chiết RNA sau đó sử dụng qRT-PCR để so sánh các dấu ấn thần kinh và tế bào gốc giữa các TBGVNNT và TBHTKVM sau khi biệt hóa. Kết quả qRT-PCR cho thấy các TBHTKVM biểu hiện mạnh các dấu ấn thần kinh như Math-5, Beta-3 tubulin, Brn-3a, Gamma-synuclein trong khi các dấu ấn tế bào gốc (Nanog, C-Myc, Sox2) bị giảm xuống (Hình 1C).



Hình 1. Đặc điểm của TBHTKVM có nguồn gốc từ TBGVNNT

(A) Hình thái của TBGVNNT; EB; OV; TBHTKVM của ba dòng tế bào. (B) Nhuộm miễn dịch huỳnh quang cho thấy sự biểu hiện của dấu ấn tế bào thần kinh Beta III tubulin, Gamma synuclein trong TBHTKVM. (C) qRT-PCR cho thấy sự biểu hiện cao của các dấu hiệu tế bào thần kinh (Beta III tubulin, Brn3a, Gamma synuclein và Math5) và sự suy giảm các dấu ấn tế bào gốc (Nanog, C-Myc, Sox2) trong các TBHTKVM được biệt hóa từ TBGVNNT.

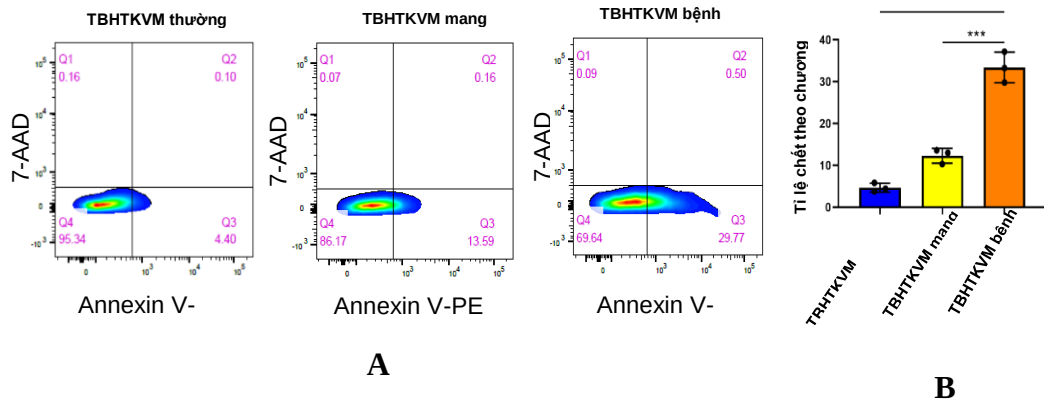
3.2. Đánh giá mức độ chết theo chương trình trong TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT

Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng mức độ chết theo chương trình tăng

lên trong các tế bào cybrid mang đột biến ND4. Do đó, đánh giá mức độ chết theo chương trình trong các TBHTKVM nên là bước tiếp theo. Chúng tôi sử dụng phương pháp nhuộm kép Annexin V-PE/PI cho xét

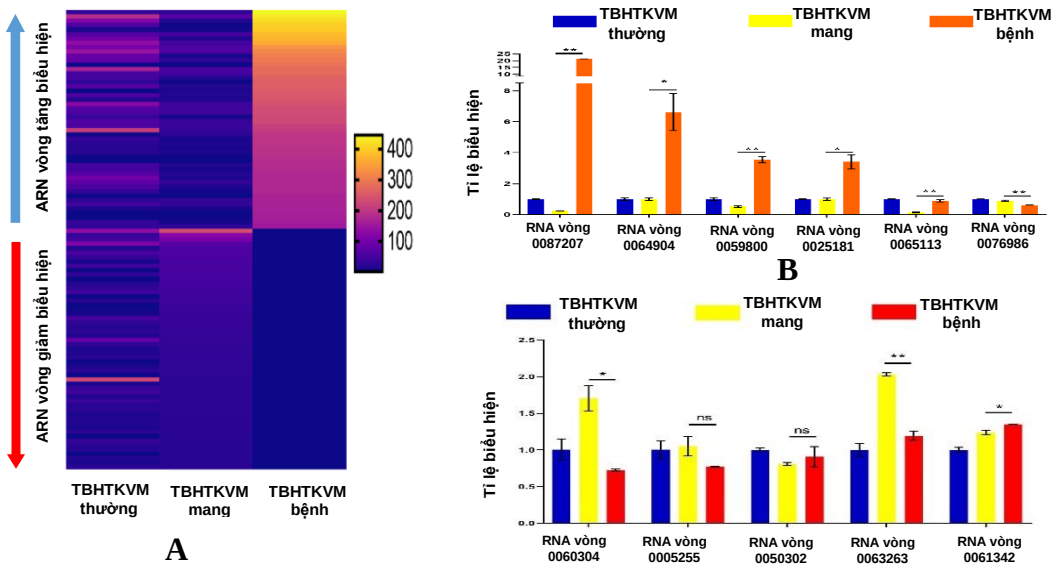
nghiệm chết theo chương trình. Quá trình nhuộm tuân theo quy trình có sẵn sau đó tín hiệu huỳnh quang được ghi lại bằng hệ thống đo tế bào dòng chảy ở các bước sóng tương ứng. Hình 2A biểu thị tỷ lệ chết theo chương trình của TBHTKVM thường, TBHTKVM mang, TBHTKVM bệnh lần lượt là 4,4%, 13,59% và 29,77%. Thí nghiệm này được lặp lại ba lần trên

các lô khác nhau. Kết quả trong Hình 2B cho thấy tỷ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM nguồn gốc từ bệnh nhân Leber do đột biến ND4 tăng có ý nghĩa thống kê so với hai nhóm còn lại ($p < 0,01$). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây rằng các tế bào chứa đột biến ND4 có tỷ lệ chết theo chương trình cao hơn và dẫn đến cái chết của các TBHTKVM.



Hình 2. Đánh giá mức độ chết theo chương trình trong TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT (A) Đánh giá tỷ lệ chết theo chương trình được thực hiện bằng cách phương pháp nhuộm kép annexin V-PE và 7-amino-actinomycin D (7-AAD) trong TBHTKVM thường, TBHTKVM mang và TBHTKVM bệnh. (B) Tỷ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM bệnh cho thấy sự gia tăng đáng kể so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang ($n = 3$, $p < 0,01$).

3.3 RNA vòng 0087207 là một ứng cử viên tiềm năng để nghiên cứu thêm về cơ chế bệnh Leber



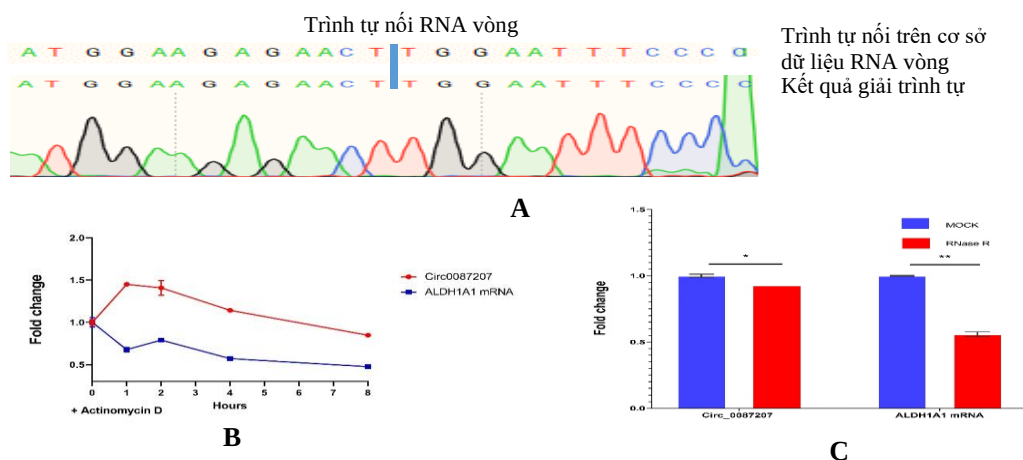
Hình 3. Xác định RNA vòng tiềm năng trong cơ chế bệnh Leber

(A) Danh sách RNA vòng tăng và giảm ở TBHTKVM bệnh so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang được chọn từ dữ liệu NGS. (B,C) Kết quả qRT-PCR của các RNA vòng tăng và giảm trong TBHTKVM bệnh so với TBHTKVM thường, và TBHTKVM mang.

Để hiểu được vai trò của vòng sinh học trong cơ chế bệnh sinh LHON, chúng tôi đã thực hiện giải trình tự gen (NGS) trên các TBHTKVM biệt hóa từ 3 nguồn đã nêu. Từ danh sách các RNA vòng tăng hoặc giảm trong dòng TBHTKVM bệnh so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang, chúng tôi đã chọn ra các RNA vòng tiềm năng như được trình bày trong hình 3A. RT q-PCR được thực hiện trong ba loại TBHTKVM để xác nhận mức độ biểu hiện của các RNA vòng này. Hình 3B cho thấy RNA vòng 0087207, RNA vòng 0059800, RNA vòng 0065113 tăng đáng kể ở TBHTKVM bệnh của bệnh nhân so với TBHTKVM mang (với $p < 0,01$). Với RNA vòng giảm biểu hiện trong hình 3C, RNA vòng 0063263 cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa nhất với giá trị p dưới 0,01. RNA vòng 0087207 được chọn cho nghiên cứu của chúng tôi vì mức độ biểu hiện khác biệt nhất ở TBHTKVM bệnh so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang.

3.4. Đặc điểm của RNA vòng 0087207

Chúng tôi đã tìm hiểu đặc điểm của RNA vòng 0087207 trước khi nghiên cứu chức năng của nó trong các TBHTKVM có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber. ALDH1A1 mRNA là gen gốc của RNA vòng 0087207. RNA vòng 0087207 được tạo ra bằng cách nối exon 6 với exon 12 của ALDH1A1 mRNA tạo ra đoạn trình tự nối đặc trưng cho RNA vòng 0087207 này. Sản phẩm RT q-PCR cho RNA vòng 0087207 đã được gửi để giải trình tự. Trình tự đặc trưng của RNA vòng 0087207 trùng khớp với thông tin trong hệ thống dữ liệu về RNA vòng (Hình 2A), cho thấy rằng RNA vòng 0087207 đã được biểu hiện trong các TBHTKVM. Để củng cố thêm tính chất RNA vòng, RNase R exonuclease và actinomycin D được sử dụng cho Patient TBHTKVM. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của RNA vòng là ổn định trong khi ALDH1A1 mRNA bị suy giảm trong cả hai thí nghiệm (Hình 4B, 4C).



Hình 4. Đặc điểm của RNA vòng 0087207

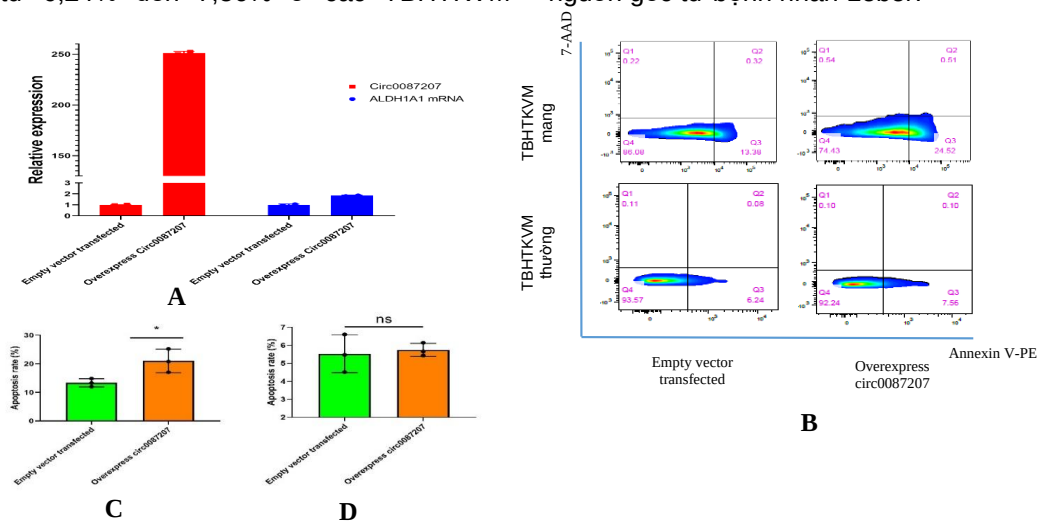
(A) Trình tự nối của RNA vòng 0087207 được tìm thấy trong kết quả giải trình tự qRT-PCR khớp với cơ sở dữ liệu RNA vòng trên Circular RNA Interactome. (B, C) Mức độ biểu hiện của RNA vòng 0087207 ít bị ảnh hưởng bởi Actinomycin D (B) và RNase R (C) trong khi ALDH1A1 mRNA giảm đáng kể.

3.5. Ảnh hưởng của sự biểu hiện quá mức RNA vòng 0087207 đối với quá trình chết theo chương trình trên TBHTKVM thường và TBHTKVM mang.

Để xác định vai trò của RNA vòng 0087207 trong các TBHTKVM có nguồn gốc từ LHON, chúng tôi đã thiết kế hệ thống tăng biểu hiện bằng cách chuyển trình tự trưởng thành của RNA vòng

0087207 vào plasmid pcDNA3.1 (+) ZKSCAN1 MCS. Kết quả quá trình này đã làm tăng cao sự biểu hiện của RNA vòng 0087207 nhưng không phải gen chủ của nó (Hình 5A). Các TBHTKVM được truyền plasmid pcDNA3.1 (+) ZKSCAN1 MCS được coi là nhóm đối chứng. Phân tích bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy sau khi nhuộm PE-7AAD được thực hiện để xác định tỉ lệ chết theo chương trình ở các TBHTKVM thường và TBHTKVM mang sau khi tăng biểu hiện RNA vòng 0087207. Kết quả cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức của RNA vòng 0087207 làm thay đổi tỉ lệ chết theo chương trình ở các TBHTKVM mang từ 13,38% lên 24,52% và từ 6,24% đến 7,56% ở các TBHTKVM

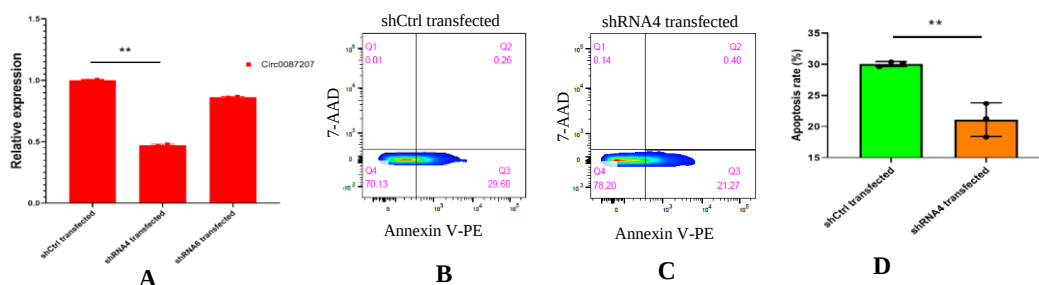
thường (Hình 5B). Ba lần đo tỉ lệ chết theo chương trình cho thấy tỷ lệ chết theo chu kỳ tăng có ý nghĩa thống kê ở TBHTKVM mang khi RNA vòng 0087207 tăng ($p < 0,05$) (Hình 5C). Tuy nhiên, sự biểu hiện quá mức của RNA vòng 0087207 không làm thay đổi tỉ lệ chết theo chương trình ở các TBHTKVM thường (Hình 5D). Những kết quả này cho thấy rằng sự thay đổi của RNA vòng 0087207 chỉ ảnh hưởng đến tỉ lệ chết theo chương trình khi đột biến ND4 cùng tồn tại. Nó hỗ trợ giả thuyết của chúng tôi rằng RNA vòng 0087207 có thể là yếu tố thứ phát kết hợp với đột biến ND4 m.11778G> để điều chỉnh tỉ lệ chết theo chương trình trong các TBHTKVM có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber.



Hình 5. Biểu hiện quá mức RNA vòng 0087207 gia tăng tỉ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM mang

(A) Kết quả q-RT PCR cho thấy mức độ RNA vòng 0087207 tăng lên đáng kể sau khi chuyển nạp plasmid. (B) Tỷ lệ chết theo chương trình được phân tích bằng phương pháp đo tế bào dòng chảy ở TBHTKVM thường và TBHTKVM mang sau khi tăng biểu hiện RNA vòng 0087207. (C) Tỷ lệ chết theo chương trình tăng có ý nghĩa thống kê ở TBHTKVM mang sau khi tăng biểu hiện RNA vòng 0087207 ($n = 3$, $p < 0,01$). (D) Sự biểu hiện quá mức của RNA vòng 0087207 không ảnh hưởng đến tỉ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM thường.

3.6. Tác động của giảm biểu hiện RNA vòng 0087207 đối với tỉ lệ chết theo chương trình trên TBHTKVM bệnh.



Hình 6. Giảm biểu hiện RNA vòng 0087207 làm giảm tỷ lệ chết theo chương trình ở pat TBHTKVM bệnh

(A) RNA vòng 0087207 giảm có ý nghĩa thống kê sau khi chuyển nạp shRNA4 vào TBHTKVM bệnh. (B, C) Nhuộm kép PE-7AAD cho thấy tỷ lệ chết theo chương trình của TBHTKVM bệnh được chuyển nạp plasmid đối chứng và shRNA4 lần lượt là 29,6% và 21,27%. (D) Tỷ lệ chết theo chương trình của TBHTKVM bệnh sau khi giảm biểu hiện RNA vòng 0087207 giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($n = 3$, $p < 0,01$).

Để củng cố chức năng của RNA vòng 0087207 trong TBHTKVM, chúng tôi đã thiết kế RNA ngắn (shRNA) nhắm vào trình tự đặc trưng của RNA vòng 0087207, để giảm biểu hiện của RNA vòng này trên Patient TBHTKVM. Sau khi chuyển nạp shRNA4, RNA vòng 0087207 đã giảm đáng kể ở TBHTKVM bệnh (Hình 6A). Phương pháp nhuộm kép PE-7AAD cho thấy rằng việc giảm RNA vòng 0087207 có thể ức chế quá trình chết theo chương trình ở TBHTKVM bệnh (Hình 6B, 6C, 6D). Những kết quả này một lần nữa ủng hộ giả thuyết của chúng tôi rằng RNA vòng 0087207 có thể là yếu tố thứ cấp thay đổi tỷ lệ chết theo chương trình ở các TBHTKVM.

4. BÀN LUẬN

Leber là một bệnh di truyền hiếm gặp do đột biến điểm trong phức hợp I của ty thể. Các nghiên cứu trước đây cho thấy hiện tượng chết của TBHTKVM—liên quan đến việc tăng mức độ ROS và chết theo chương trình—là lý do gây giảm thị lực ở bệnh nhân Leber. Kiểu hình mang đột biến nhưng không biểu hiện các triệu chứng ở mắt cho thấy cơ chế sinh bệnh phức tạp của bệnh Leber, trong đó các yếu tố khác kết hợp với đột biến ty thể gây mất thị lực. Hút thuốc, rượu và các hormone sinh dục là những yếu tố thứ cấp được đề cập trong những nghiên cứu trước đây về bệnh

Leber. Các yếu tố khác được đề cập có thể đóng vai trò là yếu tố thứ cấp trong cơ chế bệnh Leber như yếu tố của nhân tế bào. Do cơ chế của sự thoái hóa TBHTKVM không rõ ràng, cho đến nay vẫn chưa có phương pháp điều trị hiệu quả nào được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ chấp thuận. Mặc dù điều trị bằng Idebenone cho thấy sự cải thiện thị lực trong một số nghiên cứu và liệu pháp gen là một phương pháp đầy hứa hẹn, các hướng tiếp cận mới nên được áp dụng để làm rõ thêm cơ chế bệnh sinh của Leber và mở ra các phương pháp mới cho căn bệnh này.

Trong các nghiên cứu trước đây, tế bào cybrid có chứa đột biến Leber thường được sử dụng để khảo sát cơ chế bệnh sinh. Do nguồn gốc nguyên bào sợi, các tế bào cybrid không có tất cả các đặc điểm của TBHTKVM. Trong nghiên cứu của chúng tôi, các TBHTKVM có nguồn gốc từ TBGVNNT - mang đột biến ND4 trong ty thể - được sử dụng để tìm hiểu về bệnh Leber. TBGVNNT có nguồn gốc từ một gia đình: mang gen ND4 bình thường từ người bố, mang gen đột biến ND4 từ người mẹ và bệnh nhân Leber do đột biến ND4 từ người con trai. Sau đó, các TBGVNNT được biệt hóa thành ba dòng TBHTKVM: TBHTKVM thường (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT mang gen ND4 bình

thường), TBHTKVM mang (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT mang gen đột biến ND4), TBHTKVM bệnh (TBHTKVM biệt hóa từ TBGVNNT của bệnh nhân Leber do đột biến ND4). Phương pháp nhuộm kép PE-7 AAD được thực hiện để đo tỉ lệ chết theo chương trình ở các TBHTKVM. Kết quả của chúng tôi cho thấy tỷ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM bệnh tăng lên đáng kể so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang. Sự gia tăng chết theo chương trình ở TBHTKVM bệnh có thể giải thích tại sao bệnh nhân Leber bị mất thị lực.

RNA vòng, được đề cập trong nhiều con đường sinh lý và bệnh lý, là một yếu tố nhân của tế bào. Điều hòa gen thông qua RNA nhỏ (miRNA) là một chức năng được biết đến rộng rãi của RNA vòng; con đường này đã được chỉ ra trong một số nghiên cứu về sự thoái hóa thần kinh trước đây. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi nhận thấy rằng RNA vòng 0087207 tăng biểu hiện nhiều lần ở TBHTKVM bệnh so với TBHTKVM thường và TBHTKVM mang. Để tìm hiểu thêm về chức năng RNA vòng 0087207 trong các TBHTKVM, hệ thống plasmid làm tăng và giảm biểu hiện của RNA vòng này đã được thiết lập. Sau khi tăng biểu hiện RNA vòng 0087207, tỷ lệ chết theo chương trình ở TBHTKVM mang đã tăng lên đáng kể nhưng không có sự thay đổi ở TBHTKVM thường. RNA vòng 0087207 đã điều hòa quá trình chết theo chương trình khi tồn tại đột biến ND4, ủng hộ giả thuyết của chúng tôi rằng nó có thể là yếu tố thứ cấp trong bệnh sinh Leber. Chức năng của RNA vòng 0087207 đã được củng cố khi giảm biểu hiện nó ở TBHTKVM bệnh làm giảm mức độ chết theo chương trình.

5. KẾT LUẬN

Chúng tôi phát hiện ra RNA vòng 0087207 tăng cao trong TBHTKVM biệt hóa từ tế bào gốc có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber và có thể là một dấu ấn sinh học đầy hứa hẹn cho bệnh Leber. Hơn nữa, lần đầu tiên chúng tôi tìm được bằng

chứng RNA vòng 0087207 có thể là yếu tố thứ cấp phối hợp với đột biến ND4-Leber để điều chỉnh mức độ chết theo chương trình ở TBHTKVM có nguồn gốc từ bệnh nhân Leber, tiết lộ một cơ chế mới của bệnh này. Nghiên cứu này có thể mở ra một cách tiếp cận mới cho cơ chế bệnh sinh Leber và một dấu ấn sinh học cho bệnh này.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu trường Đại học Dược Hà Nội, Giáo sư Shih-Hwa Chiou (Khoa Nghiên cứu Y học, Bệnh viện Đa khoa Cựu chiến binh Đài Bắc); Khoa Dược lý-Dược lâm sàng, Bộ môn Y học cơ sở, PGS.TS Nguyễn Thủy Dương đã tạo điều kiện và giúp đỡ chúng tôi hoàn thành nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Wallace D. A new manifestation of Leber's disease and a new explanation for the agency responsible for its unusual pattern of inheritance. *Brain*. 1970; 93:121–132.
- Bi R, Logan I, Yao YG. Leber hereditary optic neuropathy: a mitochondrial disease unique in many ways. *Handb Exp Pharmacol*. 2017; 240:309–36.
- Majander A, Robson AG, Joaõ C, Holder GE, Chinnery PF, Moore AT, Votruba M, Stockman A, Yu-Wai-Man P. The pattern of retinal ganglion cell dysfunction in Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion*. 2017; 36:138–49.
- Newman NJ. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:517–523.
- Riordan-Eva P. Neuro-ophthalmology of mitochondrial diseases. *Curr Opin Ophthalmol*. 2000;11:408–412.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Martinuzzi, A., Carelli, V., Rugolo, M., 2005. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure

- and mediated by AIF and endonuclease G. *Chết theo chương trình* 10, 997–1007.
7. Danielson, S.R., Wong, A., Carelli, V., Martinuzzi, A., Schapira, A.H.V., Cortopassi, G.A., 2002. Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-induced *chết theo chương trình*. *J. Biol. Chem.* 277, 5810–5815.
 8. Yen MY, Wang AG, Wei YH. Leber's hereditary optic neuropathy: a multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res.* 2006 Jul;25(4):381-96. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.002. Epub 2006 Jul 7. PMID: 16829155.
 9. Sanger HL, Klotz G, Riesner D, Gross HJ, Kleinschmidt AK. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Nov;73(11):3852-6.
 10. Pasman Z, Been MD, Garcia-Blanco MA. Exon circularization in mammalian nuclear extracts. *RNA.* 1996 Jun;2(6):603-10.
 11. Vo JN, Cieslik M, Zhang Y, Shukla S, Xiao L, Zhang Y, Wu YM, Dhanasekaran SM, Engelke CG, Cao X, Robinson DR, Nesvizhskii AI, Chinnaiyan AM. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell.* 2019 Feb 7;176(4):869-881.e13.
 12. Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet.* 2019 Nov;20(11):675-691.
 13. van Rossum D, Verheijen BM, Pasterkamp RJ. Circular RNAs: Novel Regulators of Neuronal Development. *Front Mol Neurosci.* 2016;9:74. Published 2016 Aug 26.

SUMMARY

cRNA 0087207 PROMOTES APOPTOSIS IN APOPTOSIS IN LHON-HIPSC DERIVED RGCS IN LEBER'S PATIENT

Nguyen Hoang Long¹, Tran Thi Thanh Huyen¹, Phan Thi To Nhu¹,
 Nguyen Nu Hai Yen¹

¹Hanoi University of Pharmacy

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is mainly the degeneration of retinal ganglion cells (RGCs) associated with high apoptosis level caused by mutations in the subunits of complex I of the mitochondrial electron transport chain. The treatment is still infant while efforts of correcting genes or using antioxidants do not bring good and consistent results. LHON mutation carrier phenotype suggests that disease's pathogenesis is complex, in which secondary factors exist and cooperate with the primary complex I dysfunction. The feature of incomplete penetrance indicates the importance of nuclear inheritance for the LHON phenotype. We compared the NGS data of iPSC-derived RGCs, including a family of normal, ND4 mutation carriers, and ND4 mutation-patients. We found that circRNA_0087207 had the most significantly higher expression level in the patient optic ganglion cells. In addition, overexpression of circRNA_0087207 in RGCs derived from ND4 mutation carriers can increase the level of apoptosis. In particular, overexpression of circRNA_0087207 in normal RGCs does not increase the apoptosis level. Inhibiting the expression of circRNA_0087207 in the patient cells can effectively reduce cell apoptosis. ND4 mutation is a necessary primary factor for optic neuropathy. Our results show that the circRNA_0087207 upregulation cooperated with ND4 mutation to regulate apoptosis in LHON-hiPSC derived RGCs.

Keywords: cRNA 0087207, retinal ganglion cells, iPSC.