

VAI TRÒ CỦA *GLRA2* TRONG MỐI LIÊN QUAN ĐẾN HỘI CHỨNG RỐI LOẠN PHỔ TỰ KỶ TRÊN MÔ HÌNH RUỒI GIẤM

Nguyễn Trọng Tuệ✉, Ngô Thị Huyền Linh

Trường Đại học Y Hà Nội

*Hội chứng rối loạn phổ tự kỷ (ASD - Autism Spectrum Disorder) là một tình trạng rối loạn hành vi nghiêm trọng. Bệnh đặc trưng bởi các rối loạn thần kinh bao gồm việc khó khăn trong giao tiếp, tương tác xã hội, phát triển ngôn ngữ, hành vi lặp đi lặp lại. Một số bằng chứng gần đây cho thấy gen *GLRA2* có mối liên quan tới hội chứng ASD. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống GAL4/UAS làm giảm biểu hiện gen *GLRA2* trên mô não và đánh giá mức độ ảnh hưởng của protein này lên khả năng tương tác xã hội, vận động và nhịp thức ngủ của ruồi giấm. Kết quả cho thấy khả năng vận động của ruồi giấm biểu hiện gen *GLRA2* không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Tuy nhiên, chúng lại giảm khả năng tương tác xã hội rõ rệt và có biểu hiện rối loạn nhịp thức ngủ. Điều này góp phần củng cố bằng chứng về vai trò của gen *GLRA2* với ASD, đồng thời cung cấp mô hình tiềm năng cho nghiên cứu cơ chế bệnh sinh và sàng lọc thuốc sau này.*

Từ khóa: Hội chứng rối loạn phổ tự kỷ, ruồi giấm, *GLRA2*, Glycine Alpha 2.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn phổ tự kỷ (ASD - Autism Spectrum Disorder) là một tình trạng rối loạn hành vi nghiêm trọng, nằm trong nhóm các rối loạn phát triển lan tỏa (pervasive developmental disorders). Bệnh đặc trưng bởi các rối loạn thần kinh phức tạp bao gồm việc khó khăn trong giao tiếp, tương tác xã hội, phát triển ngôn ngữ, hành vi cứng nhắc, lặp đi lặp lại.¹ Căn nguyên di truyền của ASD có cơ chế rất phức tạp. Một số bằng chứng gần đây cho thấy gen *GLRA2* có mối liên quan tới hội chứng này. Đây là một gen mã hóa cho tiểu đơn vị thụ thể Glycine alpha – 2 làm trung gian cho sự ức chế khớp thần kinh ở tủy sống, thân não và các vùng khác của hệ thần kinh trung ương.² Người ta đã phát hiện một số đột biến của gen *GLRA2* ở bệnh nhân mắc chứng tự kỷ như mất đoạn exon (Δ ex8-9) hay đột biến sai nghĩa p.R153Q và p.N163S.³

Tiếp đó, mô hình cá ngựa vằn và chuột được sử dụng để nghiên cứu về gen *GLRA2*. Kết quả cho thấy, vai trò của gen *GLRA2* liên quan đến ASD trong tính bền của khớp thần kinh, khả năng học tập, ghi nhớ và khả năng tương tác xã hội.² Việc nghiên cứu các căn bệnh thần kinh ở mức độ phân tử cũng trở nên khó khăn đối với các nhà khoa học bởi tính phức tạp và trở ngại trong việc lựa chọn và xây dựng mô hình nghiên cứu. Mô hình ruồi giấm chuyển gen là một mô hình có nhiều ưu điểm vượt trội trong việc nghiên cứu các tác động của gen lên hệ thần kinh như thiết kế đơn giản, chi phí thấp, đã lập bản đồ hệ gen chi tiết, có 70% gen bệnh tương đồng với người. Nghiên cứu này được thực hiện với các mục tiêu làm giảm biểu hiện gen *GLRA2* trên mô não ruồi giấm đồng thời phân tích các biểu hiện hành vi liên quan đến rối loạn phổ tự kỷ của ruồi giấm giảm biểu hiện gen *GLRA2*. Đây là hướng nghiên cứu hoàn toàn mới ở Việt Nam, góp phần củng cố bằng chứng về vai trò của gen *GLRA2* trong bệnh tự kỷ, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho những nghiên cứu, thử nghiệm và sàng lọc thuốc sau này.

Tác giả liên hệ: Nguyễn Trọng Tuệ

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: trongtue@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 17/03/2025

Ngày được chấp nhận: 01/04/2025

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Nghiên cứu sử dụng các dòng ruồi chuyển gen được thu thập tại trung tâm Bloomington Stock Center, bao gồm:

- Dòng ruồi có promoter *elav* giúp định hướng biểu hiện protein tại mô não (+; +; *elav* – *GAL4*).

- Nhóm đối chứng: Dòng ruồi biểu hiện dsDNA của gen *GFP* (+; *UAS* – *GFP* – *IR*; +), được sử dụng để giảm biểu hiện *GFP*.

- Nhóm nghiên cứu: Dòng ruồi biểu hiện dsDNA của gen *dGLRA2* (+; *UAS* – *dGLRA2* – *IR*; +), làm giảm biểu hiện gen *dGLRA2*.

Ruồi giấm được nuôi trong môi trường thức ăn cơ bản bao gồm 0,65% agarose, 10% glucose, 4% nấm men, 5% bột ngô và 3% bột cám gạo. Trong điều kiện nhiệt độ 25°C, thời gian chiếu sáng chu kỳ 12 giờ sáng/ 12 giờ tối.

2. Phương pháp

- *Phương pháp giảm biểu hiện gen GLRA2 trên mô não ruồi giấm*

Để giảm biểu hiện (knockdown) gen *GLRA2* trên mô não ruồi giấm chúng tôi đã sử dụng hệ thống *GAL4* – *UAS* kết hợp với kỹ thuật RNAi. Dòng ruồi bệnh lý sẽ được tạo ra từ phép lai di truyền giữa dòng ruồi mang Promoter *elav* (+; +; *elav* – *GAL4*) định hướng biểu hiện protein *GAL4* ở mô não và dòng ruồi mang gen mã hóa cho trình tự lặp đảo chiều của gen *dGLRA2* (+; *UAS* – *dGLRA2* – *IR*; +). Khi lai hai dòng ruồi

này với nhau, protein *GAL4* sẽ bám vào trình tự *UAS*, liên tục hoạt hóa quá trình phiên mã gen đích *dGLRA2* – *IR*, tạo ra sợi RNA với trình tự đảo chiều có thể bắt cặp với nhau hình thành cấu trúc “kẹp tóc”. Từ đó, hoạt hóa con đường RNAi knockdown gen đích. Ngoài ra, dòng ruồi driver (+; +; *elav* – *GAL4*) cũng được lai song song với dòng mang gen mã hóa cho trình tự lặp đảo chiều của gen *GFP* (+; *UAS* – *GFP* – *IR*; +) để tạo dòng đối chứng.

- *Phương pháp đánh giá biểu hiện gen dGLRA2 tại mô não ruồi giấm bằng kỹ thuật real-time PCR*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật real-time PCR cho mẫu cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số tách từ não của ấu trùng ruồi giấm giai đoạn 3 bằng phương pháp tủa. Sau đó, sử dụng phương pháp 2^{-(ΔΔCt)} để so sánh mức độ biểu hiện gen ở nhóm chứng và nhóm bệnh.⁴ Phản ứng real-time PCR được thực hiện với khuôn cDNA của nhóm chứng knockdown gen *GFP*, nhóm bệnh knockdown gen *GLRA2* (20 con/nhóm) sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen đích *GLRA2* và gen nội kiểm β-tubulin. Cặp mồi đặc hiệu cho đoạn trình tự gen *dGLRA2* được thiết kế và kiểm tra tính đặc hiệu bằng phần mềm NCBI BLAST. Cặp mồi β-tubulin đặc hiệu cho gen *β-tubulin 56D*, được tham khảo từ nghiên cứu trước đây.⁵ Trình tự mồi được cho trong **Bảng 1**.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu

Trình tự mồi		Kích thước
<i>dGLRA2</i> – F	5' – TTGGACGATGGGGACAGTTTG –3'	221bp
<i>dGLRA2</i> – R	5' – GGATCGAGGTATCGCATTTGGA – 3'	
<i>Tubulin</i> – F	5' – AGTTCACCGCTATGTTCA – 3'	238bp
<i>Tubulin</i> – R	5' – CTCGATCAATGTTTTGCG – 3'	

- Phương pháp đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm

Khả năng vận động của ruồi giấm được đánh giá bằng thí nghiệm leo trèo (Climbing assay), tiến hành theo nghiên cứu của Madabatura và cs (2015).⁶ Thí nghiệm này dựa trên tập tính leo ngược chiều trọng lực của ruồi giấm. Dựa trên nguyên tắc này, dòng ruồi khỏe mạnh hơn sẽ leo cao hơn trong cùng một khoảng thời gian. Thí nghiệm được tiến hành trên các cá thể ruồi giấm trưởng thành ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng (80 con/nhóm) tại các thời điểm 3 ngày tuổi, 7 ngày tuổi và 14 ngày tuổi. Các lần thí nghiệm phải cùng thời gian trong ngày, cùng địa điểm tránh tác động từ nhịp thức ngủ sinh học của ruồi. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Adobe Premier, thống kê bằng Microsoft Excel và phân tích bằng GraphPad Prism 7.

- Phương pháp đánh giá khả năng tương tác xã hội

Thí nghiệm đánh giá hành vi tương tác xã hội (Social space assay) được tiến hành theo quy trình của nhóm nghiên cứu Simon và cs (2012).⁷ Thông thường, trong một không gian hai chiều, khi được tác động một lực vừa đủ để đưa toàn bộ ruồi về cùng một điểm xuất phát, ruồi giấm có xu hướng bò ngược chiều trọng lực và di chuyển thành từng đám. Buồng thí nghiệm hình tam giác cân nằm trong hai tấm kính vuông (18cm x 18cm) được phân cách bởi một tấm đệm acrylic 0,5cm cho phép ruồi hoạt động trong không gian 2 chiều. Thí nghiệm được tiến hành song song trên các cá thể ruồi giấm trưởng thành 3 ngày tuổi ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng (40 con/nhóm). Tính khoảng cách gần nhất giữa các cá thể ruồi bằng phần mềm ImageJ sau đó thống kê và phân tích bằng phần mềm GraphPad Prism 7.

- Phương pháp đánh giá nhịp thức - ngủ của ruồi giấm

Thí nghiệm đánh giá nhịp thức ngủ (Activities

assay) được mô tả trong nghiên cứu của Wise và cs (2015).⁸ Theo đó, mỗi cá thể ruồi trưởng thành được cho vào một ống thủy tinh đường kính 5mm với một đầu có chứa thức ăn và đặt trong một thiết bị đo chuyên dụng (Activity Monitoring – Trikinetics, USA). Mỗi lần ruồi di chuyển qua tia laze sẽ được tính 1 điểm hoạt động, cứ mỗi 15 phút máy sẽ tổng hợp điểm một lần. Ruồi sẽ được theo dõi 24/24h và liên tục trong 7 – 10 ngày. Thí nghiệm được tiến hành trên các cá thể ruồi giấm trưởng thành ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng (32 con/nhóm).

Xử lý số liệu

Kết quả của thí nghiệm đánh giá hành vi tương tác xã hội, thí nghiệm đánh giá khả năng vận động được xử lý bằng phần mềm phân tích hình ảnh Image J (NIH, USA), phân tích video Adobe Premier sau đó phân tích thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 7. Kết quả của thí nghiệm đánh giá nhịp thức – ngủ của ruồi giấm được tổng hợp và phân tích bằng Microsoft Excel. Tất cả các thí nghiệm đều được lặp lại tối thiểu 3 lần. Giá trị p được tính toán sử dụng Mann-Whitney test.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu này được thực hiện hoàn toàn trên mô hình ruồi giấm và tuân thủ mọi nguyên tắc về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

III. KẾT QUẢ

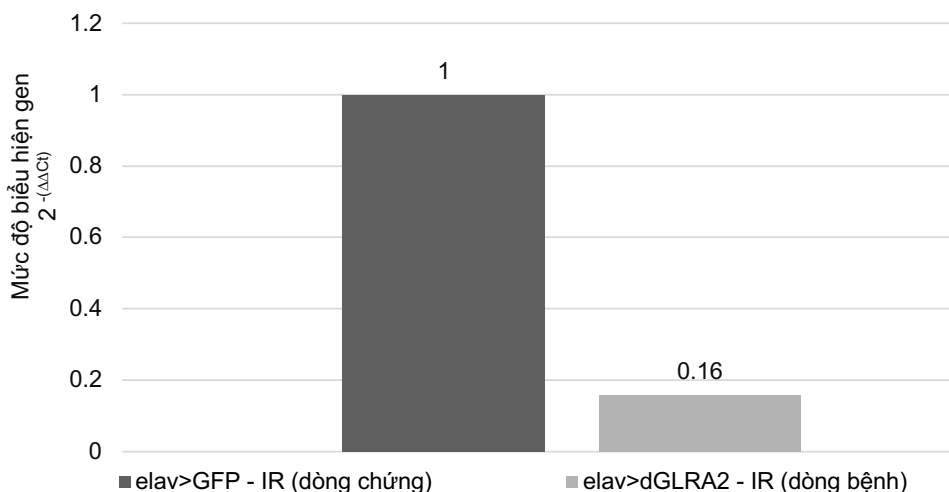
1. Mức độ tương đồng protein GLRA2 giữa người và ruồi giấm

Trình tự axit amin của protein CG6927 (mã số Q9W4G1) ở ruồi giấm được trích xuất từ cơ sở dữ liệu UniProt (<https://www.uniprot.org/>) và so sánh với trình tự của các thành viên trong họ protein GLR ở người, sử dụng công cụ FASTA và BLAST. Kết quả so sánh cho thấy, giữa protein CG6927 ở ruồi giấm và protein GLRA2 ở người có tỷ lệ tương đồng (identity) là 24,339% và mức độ giống nhau (similarity)

là 29,94%, cao nhất trong số các thành viên khác thuộc họ protein GLR. Kết quả so sánh cũng cho thấy mức độ tương đồng về cấu trúc protein GLRA2 giữa người và ruồi giấm với bốn vùng xuyên màng (TMS). Ngoài ra, các vùng chức năng này ở cả hai loài cũng được xác định với tỷ lệ tương đồng cao (TMS1, TMS2, TMS3, TMS4 có tỷ lệ tương đồng với lần lượt là 80%, 83%, 70% và 74%). Từ đó, chúng tôi gọi protein CG6927 ở ruồi giấm là dGLRA2 (*Drosophila Glycine Alpha 2*).

2. Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện gen dGLRA2 ở mô não ruồi giấm

Hiệu quả knockdown gen *dGLRA2* trên mô não ruồi giấm được thực hiện bằng kỹ thuật real-time PCR, sử dụng chất đánh dấu SYBR Green. Nghiên cứu sử dụng dòng ruồi knockdown gen *dGLRA2* 2 copies để có được hiệu quả knockdown tốt nhất, mẫu đối chứng là các dòng ruồi bị knockdown gen *GFP*. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện gen *dGLRA2* ở con bệnh giảm hơn 6 lần so với con chứng, sự khác biệt rất rõ ràng. Điều này chứng tỏ việc knockdown gen *dGLRA2* tại mô não ruồi giấm đã có hiệu quả.

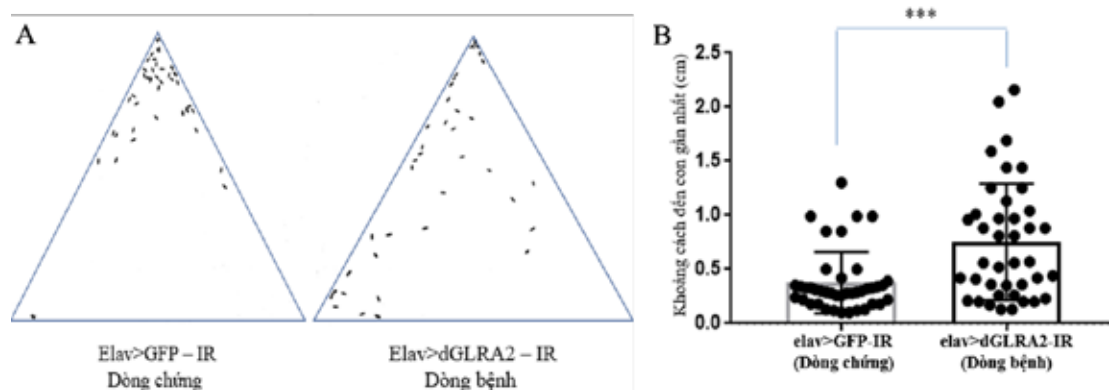


Biểu đồ 1. Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện gen dGLRA2 tại mô não ruồi giấm bằng kỹ thuật Realtime – PCR

3. Kết quả đánh giá khả năng tương tác xã hội của ruồi giấm

Ruồi giấm knockdown gen *dGLRA2* có mức độ tương tác với quần thể so với nhóm chứng giảm rõ rệt. Các cá thể ở nhóm bệnh đứng riêng lẻ và rải rác trong không gian, không có xu hướng giao tiếp hay di chuyển thành đám

như ở nhóm chứng. Trên 80% cá thể ruồi giấm knockdown gen *dGLRA2* có khoảng cách đến con gần nhất trên 1cm, trong khi ở nhóm chứng chỉ là dưới 0,5cm. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,01$.



Biểu đồ 2. Thí nghiệm đánh giá hành vi tương tác xã hội trên ruồi giấm trưởng thành

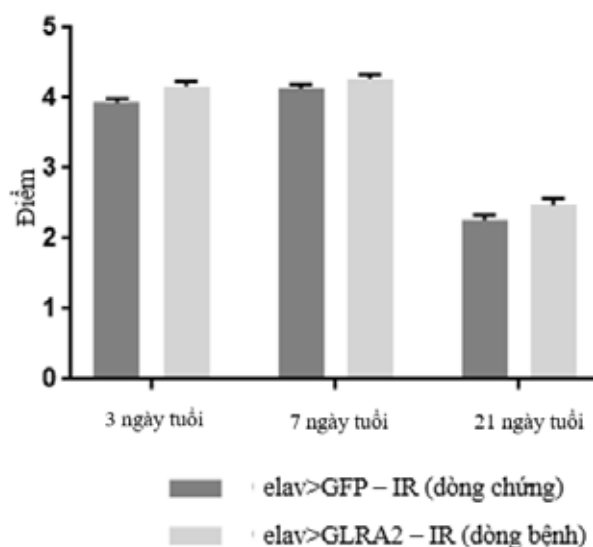
(A) Phân bố trong không gian của ruồi giấm ở dòng bệnh và dòng chứng.

(B) Kết quả phân tích khoảng cách tương tác không gian của ruồi giấm giữa dòng bệnh và dòng chứng. ($n = 40$); ***: $p < 0,01$

4. Kết quả đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm

Để khẳng định sự phân bố ngẫu nhiên rải rác trong không gian của các cá thể ruồi giấm ở nhóm bệnh không phụ thuộc vào khả năng vận động của chúng. Ruồi giấm được tiến hành đánh giá khả năng vận động bằng thử nghiệm leo trèo tại các thời điểm 3 ngày tuổi, 7 ngày tuổi

và 21 ngày tuổi. Kết quả đánh giá cho thấy, khả năng vận động của nhóm ruồi bệnh knockdown gen *dGLRA2* và nhóm chứng knockdown gen *GFP* là tương đương nhau sau nhiều ngày đánh giá.



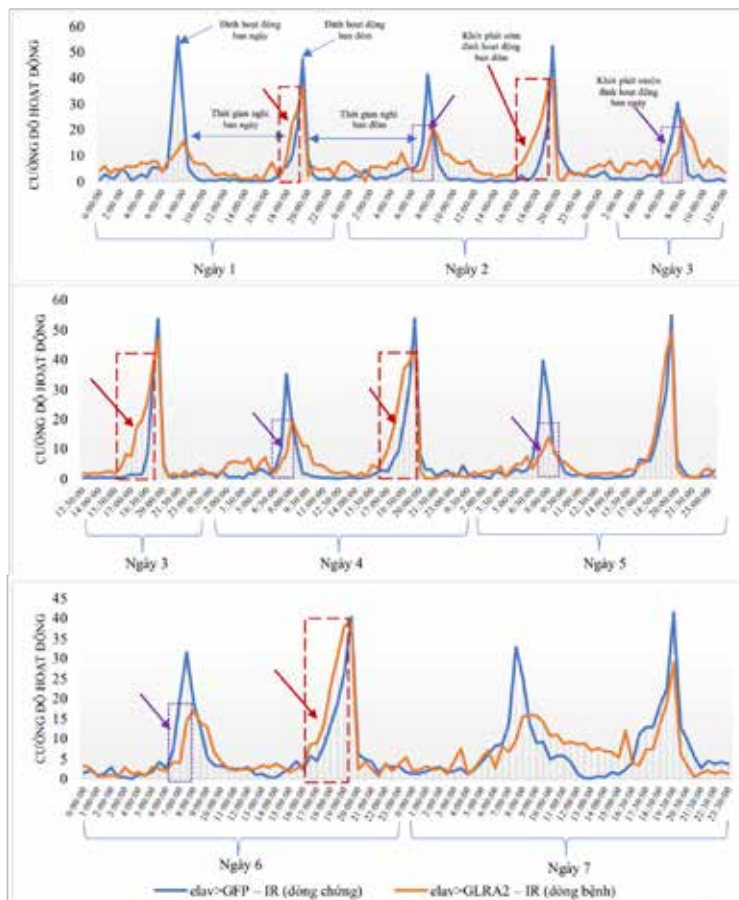
Biểu đồ 3. Kết quả đánh giá khả năng vận động của ruồi giấm trưởng thành ở thời điểm 3, 7 và 21 ngày tuổi giữa dòng bệnh knockdown gen *dGLRA2* và dòng chứng knockdown gen *GFP* ($n = 80$), $p > 0,05$)

5. Kết quả đánh giá nhịp thức ngủ của ruồi giấm

Một trong những biểu hiện đặc trưng của rối loạn phổ tự kỷ là những thay đổi trong nhịp thức ngủ. Để đánh giá sự thay đổi này chúng tôi tiến hành khảo sát tổng thời gian hoạt động trong ngày, kèm theo thời gian thức và ngủ của ruồi giấm bằng thiết bị đo chuyên dụng. Kết quả xác định nhịp thức ngủ của ruồi giấm cho thấy ruồi hoạt động chủ yếu vào hai thời điểm trong ngày tương ứng với hai đỉnh có cường độ tín hiệu cao nhất. Thời điểm từ 6h30 – 9h00 là đỉnh hoạt động ban ngày (morning peak) và thời điểm từ 18h00 – 20h00 là đỉnh hoạt động ban đêm (evening peak). Theo đó, thời gian nghỉ

ban ngày (midday siesta) được tính là khoảng thời gian giữa hai đỉnh trong cùng một ngày còn thời gian nghỉ ban đêm (night-time sleep) được tính từ đỉnh hoạt động ban đêm của ngày hôm trước đến đỉnh hoạt động ban ngày của ngày hôm sau.

Biểu đồ nhịp thức ngủ của ruồi giấm ở **Biểu đồ 4** cho thấy, ruồi bị knockdown gen *dGLRA2* tại mô não có hiện tượng khởi phát sớm đỉnh hoạt động ban đêm, khởi phát muộn đỉnh hoạt động ban ngày. Cụ thể, ruồi giấm ở dòng bệnh lý khởi phát đỉnh hoạt động ban đêm sớm hơn dòng đối chứng khoảng 1 tiếng và muộn hơn ở đỉnh ban ngày khoảng 30 phút. Hiện tượng này lặp đi lặp lại trong nhiều ngày liên tiếp.

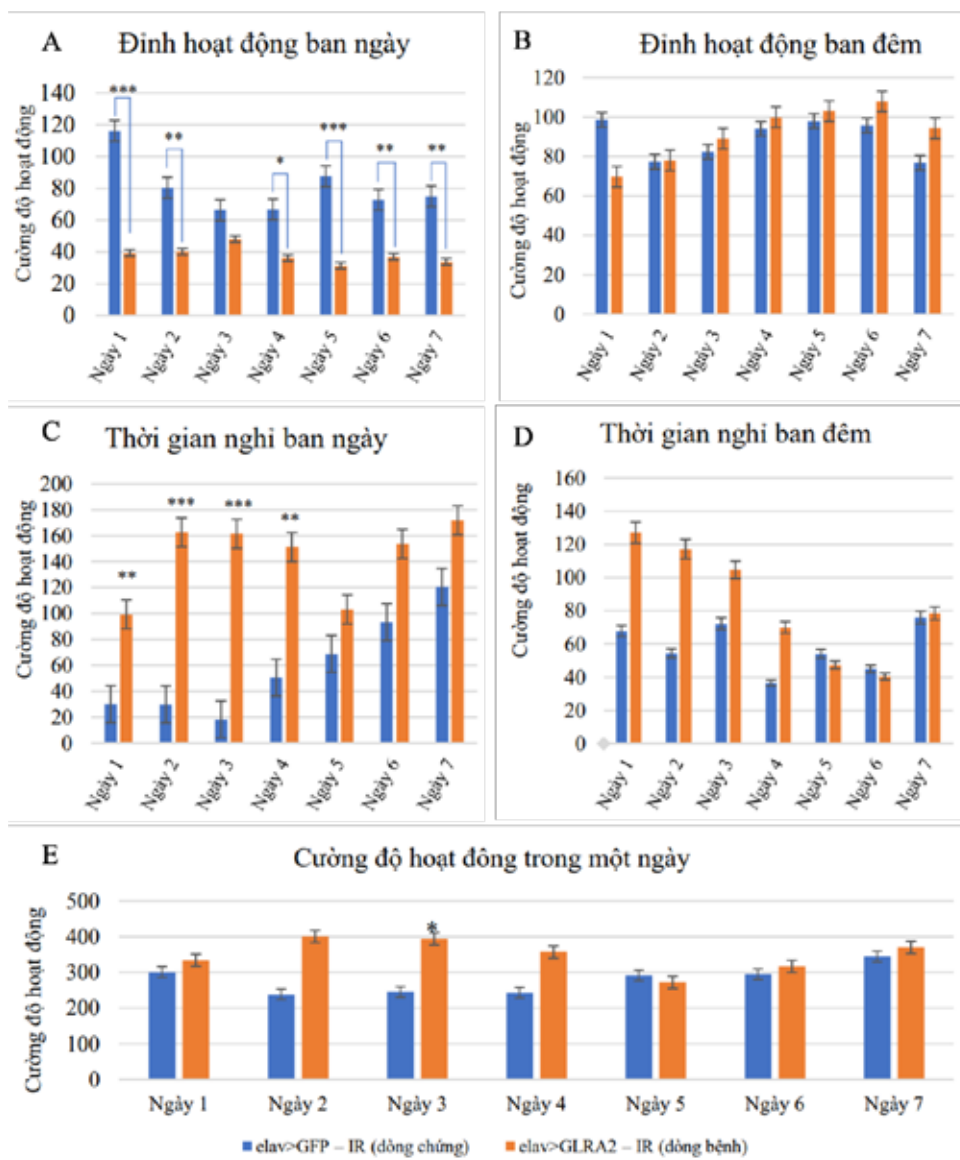


Biểu đồ 4. Đánh giá nhịp thức – ngủ của ruồi giấm

Trục hoành biểu thị các mốc thời gian trong một ngày. Trục tung biểu thị cường độ hoạt động của ruồi. Dòng bệnh *elav>dGLRA2 – IR* (đường màu cam) và dòng chứng *elav>GFP – IR* (đường màu xanh)

Khi phân tích nhịp thức – ngủ của ruồi giấm chúng tôi thấy rằng: ở thời điểm đỉnh hoạt động ban ngày (từ 6h30 đến 9h00) ruồi nhóm bệnh có cường độ hoạt động yếu hơn; ở đỉnh hoạt động ban đêm (từ 18h00 – 20h00) ruồi nhóm bệnh có xu hướng hoạt động mạnh hơn nhưng sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê;

ở thời gian nghỉ ban ngày ruồi nhóm bệnh có cường độ hoạt động mạnh hơn và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở 4 ngày đầu; ở thời gian nghỉ ban đêm ruồi nhóm bệnh có xu hướng hoạt động mạnh hơn nhưng sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê.



Biểu đồ 5. Kết quả phân tích nhịp thức – ngủ ở ruồi giấm

(A) Trung bình đỉnh hoạt động ban ngày, (B) Trung bình đỉnh hoạt động ban đêm, (C) Trung bình thời gian nghỉ ban ngày, (D) Trung bình thời gian nghỉ ban đêm, (E) Trung bình tổng thời gian hoạt động trong một ngày *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

IV. BÀN LUẬN

Dù cách xa nhau hàng triệu năm tiến hóa, tuy nhiên sự tương đồng giữa cấu trúc cơ thể người và ruồi giấm được bảo tồn một cách đáng ngạc nhiên.⁹ Đặc biệt là về cấu trúc thần kinh, khi quan sát các giây thần kinh xuất phát từ tủy sống của ruồi và người có thể thấy sự phân chia rõ ràng trong từng phần của cơ thể. Ở người và ruồi đều tồn tại hệ thần kinh trung ương ở phần đầu và hệ thần kinh tủy sống ở phần thân. Các tế bào thần kinh có chung hệ thống gen/protein chức năng và cấu trúc bởi synap. Cả hai loài đều có sự phân chia các vùng chức năng ở não tương tự nhau.¹⁰ Việc hiểu rõ cấu trúc bộ gen tạo điều kiện thuận lợi cho việc so sánh và đưa ra các bằng chứng di truyền về mối liên quan giữa người và ruồi giấm. Cũng nhờ lợi thế này việc thao tác di truyền trên mô hình ruồi giấm cũng đơn giản hơn. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng mô hình ruồi giấm để xác định những yếu tố tác động như gen hay môi trường lên hành vi, tuổi thọ, vận động và cấu trúc thần kinh của ruồi giấm. Từ năm 2015, Wise và cộng sự đã sử dụng mô hình ruồi giấm để nghiên cứu về ảnh hưởng của đột biến gen *rugose* (một gen tương đồng với gen *neurobeachin* - *NBEA* ở người) đến chứng rối loạn phổ tự kỷ. Cụ thể, ruồi bị đột biến gen *rugose* có cấu trúc thần kinh bất thường, giảm khả năng hoạt động, bị ảnh hưởng đến tập tính, cường độ hoạt động và hành vi tương tác xã hội.⁸ Nghiên cứu về họ gen *ABC* liên quan đến rối loạn phổ tự kỷ với hai nghiên cứu về gen *ABCA13* và *ABCC4* sử dụng mô hình ruồi giấm. Khi knockdown hai gen này tại mô não đã thu được ruồi giấm có kiểu hình biểu hiện của bệnh tự kỷ. Cụ thể, ruồi giảm biểu hiện gen có hiện tượng giảm khả năng tương tác xã hội, rối loạn nhịp thức ngủ và cấu trúc thần kinh cơ bị biến đổi.^{11,12}

Về mối liên quan giữa gen *GLRA2* và ASD, khi phân tích gen của một bé trai bị ASD, người

ta đã xác định được một đột biến mất đoạn exon của gen *GLRA2* (Δ ex8-9) gây mất định vị tế bào. Sau đó, nhóm nghiên cứu này cũng đã giải mã trình tự cho 400 trẻ nam mắc chứng ASD và xác định được một đột biến sai nghĩa mới (p.R153Q), đột biến này không xuất hiện trong nhóm đối chứng. Phân tích *in-vivo* đã chứng minh rằng đột biến p.R153Q gây giảm biểu hiện bề mặt và giảm rõ rệt độ nhạy với Glycine.³ Từ đó, họ tiếp tục sử dụng mô hình cá ngựa vằn và chuột để nghiên cứu. Kết quả cho thấy, khi giảm biểu hiện gen *GLRA2* ở cá ngựa vằn đã gây ra khuyết tật phân nhánh sợi trục nghiêm trọng. Chuột bị loại bỏ gen *GLRA2* biểu hiện sự thiếu hụt trong bộ nhớ nhận dạng vật thể và suy giảm khả năng ghi nhớ lâu dài ở vỏ não trước.²

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng hệ thống GAL4/UAS để làm giảm biểu hiện của gen *dGLRA2* ở mô não ruồi giấm, đồng thời sử dụng dòng ruồi giảm biểu hiện gen *GFP* làm đối chứng. Nhóm ruồi đối chứng có cùng phương thức giảm biểu hiện gen, hơn nữa *GFP* là một gen ngoại lai được cài vào hệ gen của ruồi giấm. Khi giảm biểu hiện gen này, ruồi giấm sẽ không bị ảnh hưởng về mặt chức năng, tạo ra dòng đối chứng có sự tương tự về việc giảm biểu hiện một gen trên mô não ruồi giấm. Kết quả đánh giá biểu hiện gen bằng kỹ thuật Real-time PCR đã khẳng định hiệu quả của hệ thống GAL4/UAS, khi biểu hiện gen *dGLRA2* của nhóm bệnh giảm rõ rệt so với nhóm chứng. Với những thử nghiệm hành vi tiếp theo, ruồi giấm giảm biểu hiện gen *GLRA2* cho thấy khả năng tương tác xã hội so với nhóm chứng bị giảm rõ rệt, mặc dù khả năng vận động là tương đồng. Điều này chứng minh việc phân bố trong không gian 2 chiều của ruồi không bị ảnh hưởng bởi khả năng vận động. Nhóm ruồi bệnh cũng có những biểu hiện rối loạn nhịp thức - ngủ. Những

biểu hiện trên phù hợp với những đặc điểm của hội chứng rối loạn phổ tự kỷ. Mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu này có thể tạo tiền đề cho việc xác định các gen có khả năng tương tác với *GLRA2*, từ đó tìm ra các gen (nhóm gen) có liên quan đến hội chứng rối loạn phổ tự kỷ ở người, làm sáng tỏ cơ chế sinh bệnh học, góp phần tìm ra các dấu ấn sinh học mới trong chẩn đoán và điều trị. Ngoài ra, mô hình ruồi giấm trong nghiên cứu còn có thể được sử dụng để sàng lọc và thử nghiệm thuốc sau này.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thực hiện giảm biểu hiện thành công gen *dGLRA2* ở mô não ruồi giấm bằng hệ thống GAL4/UAS. Ruồi giấm giảm biểu hiện gen *dGLRA2* có biểu hiện kiểu hình tương tự hội chứng rối loạn phổ tự kỷ như giảm khả năng tương tác xã hội và rối loạn nhịp thức ngủ. Đây là những kết quả bước đầu góp phần làm sáng tỏ vai trò của protein này trong cơ chế phân tử của bệnh, đồng thời cung cấp một mô hình tiềm năng và kinh tế cho nghiên cứu thử nghiệm và sàng lọc thuốc.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến GS Yamaguchi, Trường KIT, Nhật Bản, Ths. Trần Quốc Đạt và Ths Vũ Đức Anh, Trường Đại học Y Hà Nội đã đóng góp ý kiến quý báu giúp hoàn thiện bài báo. Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích nào liên quan đến nghiên cứu này. Không có lợi ích tài chính hoặc mối quan hệ cá nhân nào ảnh hưởng đến kết quả hoặc nội dung của bài báo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Banerjee S, Bhat M, Riordan M. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8. doi:10.3389/fncel.2014.00058.
2. Pilorge M, Fassier C, Le Corronc H, et al.

Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry.* 2016; 21(7): 936-945. doi:10.1038/mp.2015.139.

3. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature.* 2014; 515(7526):216-221. doi:10.1038/nature13908.

4. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

5. Trong-Tue N, Thao DTP, Yamaguchi M. Role of DREF in transcriptional regulation of the *Drosophila* p53 gene. *Oncogene.* 2010; 29(14): 2060-2069. doi:10.1038/onc.2009.483.

6. Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, et al. Quantitative Analysis of Climbing Defects in a *Drosophila* Model of Neurodegenerative Disorders. *J Vis Exp JoVE.* 2015; (100): e52741. doi:10.3791/52741.

7. Simon AF, Chou MT, Salazar ED, et al. A simple assay to study social behavior in *Drosophila*: measurement of social space within a group. *Genes Brain Behav.* 2012; 11(2): 243-252. doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00740.x.

8. Wise A, Tenezaca L, Fernandez RW, et al. *Drosophila* mutants of the autism candidate gene neurobeachin (*rugose*) exhibit neurodevelopmental disorders, aberrant synaptic properties, altered locomotion, and impaired adult social behavior and activity patterns. *J Neurogenet.* 2015; 29(2-3): 135-143. doi:10.3109/01677063.2015.1064916.

9. Perveen FK. *Drosophila Melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics.*; 2018. doi:10.5772/66545.

10. Prokop A. Fruit Flies in Biological Research. *Biol Sci Rev.* 2016; 28(4): 10-14.

11. Ueoka I, Kawashima H, Konishi A, et al. Novel *Drosophila* model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A. *Exp Neurol*. 2018; 300: 51-59. doi:10.1016/j.expneurol.2017.10.027.

12. Trần Quốc Đạt, Nguyễn Trọng Tuệ. Giảm biểu hiện gen ABCC4 (ATP-binding cassette subfamily C) liên quan đến rối loạn tự kỷ trên mô hình ruồi giấm. *Bản B Của Tạp Chí Khoa Học Và Công Nghệ Việt Nam*. 2020; 62(7).

Summary

THE ROLE OF *GLRA2* IN THE ASSOCIATION WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER IN A *DROSOPHILA MELANOGASTER* MODEL

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in communication, social interaction, language development, and repetitive behaviors. Recent studies have suggested a link between the *GLRA2* gene and ASD. In this study, we utilized the GAL4/UAS system to reduce *GLRA2* gene expression in the *Drosophila* brain in order to assess the role of this protein in social interaction, locomotion, and sleep-wake rhythms. The results showed that *GLRA2* knockdown did not significantly affect locomotor ability but markedly impaired social interaction and disrupted sleep-wake rhythms. These findings further support the role of *GLRA2* in ASD and provide a potential model for studying its pathogenesis and screening therapeutic interventions.

Keywords: Autism Spectrum Disorder, *Drosophila*, *GLRA2*, Glycine Alpha 2.