

# SỰ THAY ĐỔI CẤU TRÚC KHÔNG GIẢN ĐOẠN TRONG MÀNG CỦA THỤ QUAN HORMONE TĂNG TRƯỞNG TRONG QUÁ TRÌNH HOẠT HÓA

Trần Thanh Thảo<sup>1</sup>, Michael Waters<sup>2</sup> và Andrew Brook<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The binding of growth hormone (GH) molecule to its two consecutive GH receptors (GHR) will activate GHR, thus resulting in the activation of a series of relative pathways including JAK2/STAT5. This activation will induce pleiotropic actions on cellular development, metabolism and growth. BA/F3 cell lines were transduced with retroviral supernatant containing mutated GHRs on the linker containing the EED motif. Mutations were engineered by inserting 1 or 2  $\alpha$  helices (4 or 7 Alanines) after EED motif or by substitution of EED (-) by KKR (+) or AAA (nonpolar). There are 10 ways of organizing to produce transfected cell lines: (Wt-Wt), (Wt-KKR), (Wt-AAA), (KKR-KKR), (AAA-AAA), (Wt-7A), (Wt-4A), (4A-7A), (7A-7A), (4A-4A). Relative positive controls with the addition of GH were also set up. Transfected cells were harvested and observed the phosphorylation of STAT5 via Western blot method. Cell proliferation assay was also conducted. The results showed that there was an increase in the phosphorylation of STAT5 and cell proliferation at the cells transfected with (Wt-KKR) and (Wt-AAA) in comparison with other samples. This proved that any change in the polar attraction between 2 linkers of the dimeric complex would reorient the conformation of the transmembrane/cytoplasmic domain towards the realignment of JAK2 thus resulting in the activation of JAK2 or STAT5 that controlling cellular growth and maturation.

**Keywords:** growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), the linker, activation

**Title:** The conformational change of the transmembrane domain of growth hormone receptor in the activation process

## TÓM TẮT

Khi hormone tăng trưởng (Growth hormone-GH) bám vào 2 thụ quan liên tiếp của nó (Growth Hormone receptor -GHR) sẽ dẫn đến sự hoạt hóa của GHR, từ đó sẽ gây xúc tác một chuỗi các phản ứng kích thích quá trình sinh trưởng, trao đổi chất và phát triển, trong đó có chuỗi JAK2/STAT5. Sự nghiên cứu về vai trò của trình tự liên kết phía trên đoạn trên màng của receptor được tiến hành bằng cách tạo ra các dòng tế bào chuột Ba/F3 có nhiễm các retrovirus mang các đột biến tương ứng trên đoạn liên kết xung quanh trình tự EED (Axit glutamic-Axit glutamic-Axit aspartic). Đột biến can thiệp vào đoạn liên kết theo hai hướng: tăng chiều dài trình tự liên kết bằng cách thêm 1 chuỗi xoắn  $\alpha$  (4 Alanine) và 2 chuỗi xoắn  $\alpha$  (7 Alanine) sau trình tự EED, hoặc làm thay đổi điện tích âm của đoạn EED bằng điện tích dương của đoạn KKR (Lysine-Lysine-Arginine) hoặc đoạn AAA (3 Alanine) trung tính. Có 10 cách bố trí thí nghiệm để tạo các tế bào mang các receptor tương ứng trong môi trường không được bổ sung GH: (Wt-Wt), (Wt-KKR), (Wt-AAA), (KKR-KKR), (AAA-AAA), (Wt-7A), (Wt-4A), (4A-7A), (7A-7A), (4A-4A). 10 đối chứng dương tương ứng có bổ sung GH vào môi trường nuôi cũng được theo dõi. Các tế bào sau khi chuyển nhiễm sẽ được thu hoạch và kiểm tra sự phosphoryl

<sup>1</sup> Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Viện nghiên cứu sinh học phân tử, Đại học Queensland

hóa của STAT5 qua phương pháp Westernblot. Thí nghiệm theo dõi sự gia tăng số lượng tế bào cũng được tiến hành song song. Kết quả cho thấy đã có sự gia tăng lượng phosphoryl hóa của STAT5 và sự sinh trưởng các tế bào ở nghiệm thức (Wt-KKR) và (Wt-AAA) so với các nghiệm thức khác. Điều này chứng tỏ rằng lực hấp dẫn tĩnh điện giữa các trình tự liên kết của các GHR thay đổi sẽ thúc đẩy sự xoay của đoạn xuyên màng (ĐXM) hoặc đoạn trong màng (ĐTM) theo hướng hoạt hóa chuỗi JAK2/STAT5, từ đó làm tăng sinh các hoạt động sinh trưởng và phát triển của tế bào.

**Từ khóa:** *Hormone tăng trưởng (GH), thụ quan hormone tăng trưởng (GHR), đoạn liên kết, hoạt hóa*

## 1 MỞ ĐẦU

Khi hormone GH bám vào receptor của nó thì các receptor sẽ thay đổi cấu trúc sắp xếp làm cho phân tử JAK2 (Janus Kinase 2) nằm trên đoạn trong màng sẽ tiến lại gần nhau để tạo điều kiện cho phản ứng phosphoryl hóa xảy ra, từ đó kéo theo sự phosphoryl hóa của một loạt các phân tử tyrosine kinase kề bên và tạo nơi bám cho các phân tử STAT (signal transducer and activator of transcription). STAT sau khi được hoạt hóa sẽ đi vào nhân và điều hòa hoạt động của các gen có liên quan. Cấu trúc tinh thể của phức hợp GH: 2GHR đã chứng tỏ rằng trong quá trình hoạt hóa receptor, GH đã bám vào phức hợp 2 receptor liên tiếp lần lượt ở từng vị trí kết hợp với độ ái lực khác nhau trong đó vị trí liên kết sau có ái lực cao hơn vị trí đầu tiên. Cấu trúc tinh thể cũng làm sáng tỏ giữa 2 receptor này đã có sự nhị trùng hóa làm gắn kết chúng lại với nhau trước khi hormone bám vào. Vấn đề đặt ra là đoạn nào của receptor: đoạn ngoài màng (ĐNM), đoạn xuyên màng (ĐXM) hay đoạn trong màng (ĐTM) đóng vai trò then chốt và receptor đã thay đổi cấu trúc như thế nào để hoạt hóa chuỗi JAK2/STATs sau khi hormone bám vào? Do hạn chế về mặt kỹ thuật, cấu trúc của ĐTM và ĐXM trong phức hệ nhị phân vẫn chưa được tinh thể hóa. Do đó hàng loạt các giả thuyết và tranh luận đã được đưa ra để giải thích cho quá trình hoạt hóa GHR.

Trước đây, các nhà khoa học lấy sự nhị trùng hóa làm mô hình cơ bản cho sự hoạt hóa của GHR [Cunningham, B., Ultsch, M., (1991); Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., (1991)]. Tuy nhiên, các nghiên cứu sau này đã chứng tỏ sự nhị trùng hóa chỉ là điều kiện cần để khởi đầu sự hoạt hóa GHR. Harding, P.A., Wang, X., (1996) và Ross, R.J.M., Leung, K.C. (2001) lần lượt chứng tỏ rằng một số dạng GHR đột biến tuy có thể nhị trùng hóa và gắn kết GH nhưng vẫn không hoạt hóa được. Do đó, có thể nhận thấy rằng để hoạt hóa GHR, sự nhị trùng hóa phải làm thay đổi cấu trúc không gian của GHR để khởi đầu các chu trình tín hiệu tương ứng bên trong tế bào. Nói cách khác, điều quan trọng là sự nhị trùng hóa phải diễn ra như thế nào để phát tín hiệu đến các phản ứng nội bào chứ không phải bản thân sự nhị trùng hóa. Theo Rowlinson, S., Behncken, S., Rowland, J., (1998), sự thay đổi cấu trúc không gian của ĐNM trong chuỗi nhị phân có thể làm sắp xếp lại vị trí của 2 receptor trong phức hệ theo cách hoạt hóa chu trình của GH. Poger và Mark (2010) cũng ủng hộ giả thuyết này bằng cách chứng minh rằng 2 đoạn ĐNM đã xoay quanh nhau 45°-14° trong quá trình hoạt hóa của GHR.

Khi sự thay đổi cấu trúc không gian của GHR được chú trọng hơn trong cơ chế thì vai trò của từng ĐNM, ĐXM và ĐTM cũng bắt đầu được phân tích. Chen, C., Brinkworth, R., Waters, M. J. (1997) cũng nhìn nhận vai trò của ĐNM khi những đột biến xảy ra tại nơi liên kết giữa 2 receptor ở ĐNM có khả năng làm gián đoạn

sự hoạt hóa GHR. Tuy nhiên, Gent, J., Van Kerkhof, P., (2002) và Wan, Y., Zheng, Y., (2003) lại chứng minh rằng ĐNM thực sự không có vai trò then chốt trong việc duy trì trạng thái nhị phân của 2 receptor. Gent, J., *et al.* (2002) cho rằng ĐXM mới có vai trò chủ yếu trong sự nhị trùng hóa và ĐNM, còn ĐTM có chức năng hỗ trợ để sự nhị trùng hóa diễn ra thuận lợi. Điều này giải thích tại sao các đột biến liên quan tới ĐNM và ĐTM cũng làm ảnh hưởng tới sự hoạt hóa GHR.

ĐXM của GHR gồm có 24 axit amin và có cấu trúc xoắn dạng  $\alpha$ . Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về các đột biến liên quan tới ĐNM và ĐTM cùng các bệnh có liên quan, cho đến nay vẫn chưa có kiểu hình nào được xác định liên quan đến các đột biến trong cấu trúc ĐXM. Thực chất vai trò của ĐXM trong sự thay đổi cấu trúc không gian của các receptor tương ứng trong quá trình hoạt hóa của nó đã được chứng minh ở một số loại receptor như ANP (arterial natriuretic peptide) [Ogawa, H., Qiu, Y., (2004)], TGF- $\alpha$  (transforming growth factor) [Zhu, H. J., & Sizeland, A. M. (1999)], G protein couple receptor [Gether, U., Lin, S., (1997)]. Ở erythropoietin receptor, Livnah, O., Johnson, D. L., (1998) đã chứng minh rằng khi chèn thêm 30 axit amin vào đoạn liên kết nằm phía dưới ĐXM có thể hoạt hóa receptor trong điều kiện không có hormone. Tương tự, đối với GHR, Brown, R., Adams, J., (2005) cũng chứng tỏ GHR có thể hoạt hóa độc lập khi chèn thêm các axit amin Alanin vào đầu cacboxyl của chuỗi ĐXM trong đó số lượng các Alanin chèn và vị trí chèn có ảnh hưởng đến cường độ hoạt hóa.

Nghiên cứu này ủng hộ giả thuyết của sự hoạt hóa độc lập của GHR dựa vào sự xoay chuyển của các đoạn cấu trúc nằm trong phức receptor nhị phân. Trong khi sự kết hợp giữa cử động dạng kiềm và xoắn là mô hình được giả định về sự hoạt hóa của erythropoietin receptor thì sự kết hợp giữa cử động theo hướng xoay và theo chiều dọc lại là giả thuyết của Brown, R., *et al.* (2005) trong quá trình hoạt hóa GHR. Gần đây, trong một nghiên cứu khác của Rowlinson, S., Yoshizato, H., (2008), việc chèn Proline và Glycine vào đoạn liên kết giữa ĐNM và ĐXM của GHR đã dẫn đến sự thay đổi cấu trúc của chuỗi xoắn ĐXM và làm thay đổi sự hoạt hóa của STAT5/ERK về tỉ lệ.

Để nghiên cứu vai trò của ĐXM trong quá trình hoạt hóa độc lập của GHR (hoạt hóa không cần hormone gắn kết) dựa trên mô hình thay đổi cấu trúc không gian của phức nhị phân, cấu trúc của đoạn liên kết giữa ĐNM và ĐXM được thay đổi. Qua các nghiên cứu nội bộ, nhóm Waters thuộc viện Sinh học phân tử trường Đại học Queensland đưa ra giả thuyết rằng khi chưa có GH, đầu amin của các ĐXM trong phức nhị phân cách xa nhau do lực đẩy giữa 2 đoạn EED cùng mang điện tích âm của đoạn liên kết. Khi đó 2 đơn vị JAK2 trong phức hệ cũng sẽ nằm cách xa nhau. Sự bám của GH vào phức hệ nhị phân sẽ làm cho đầu amin của ĐXM tiến về nhau trong khi đầu cacboxyl cách xa nhau hơn, từ đó làm 2 đơn vị JAK2 liên kết với ĐTM tiến lại gần nhau gây hoạt hóa các tín hiệu nội bào. Do đó, nếu lực hấp dẫn giữa 2 đoạn liên kết nằm phía trên ĐXM thay đổi có thể dẫn đến sự sắp xếp lại cấu trúc tương ứng của ĐXM, từ đó gây ảnh hưởng đến sự hoạt hóa của receptor. Trong nghiên cứu này, các GHR thỏ mang đột biến tương ứng ở đoạn liên kết nằm trên ĐXM đã được tạo ra trước khi cho chuyển nhiễm vào tế bào chuột Ba/F3. Để kiểm định giả thuyết về sự xoay chuyển do lực hấp dẫn tĩnh điện giữa các ĐXM, đoạn liên kết có trình tự EED (-) sẽ được thay thế bằng đoạn axit amin tương ứng không mang điện hoặc mang điện dương. Mặt khác, giả thuyết về

sự xoay chuyển cấu trúc ĐXM theo chiều dọc cũng được kiểm chứng bằng cách chèn thêm từ 1-2 vòng xoắn  $\alpha$  vào ĐXM sau trình tự EED.

Sự thay đổi cấu trúc không gian của GHR từ quá trình hoạt hóa độc lập của nó sẽ được đánh giá gián tiếp qua cường độ phosphoryl hóa của STAT5 ở các tế bào chuột Ba/F3 mang các đột biến khác nhau. Sự hoạt hóa của GHR ở các tế bào này cũng được đánh giá qua biểu đồ về sự gia tăng số lượng tế bào quan sát được.

Qua kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy rằng đoạn liên kết giữa ĐNM và ĐXM có vai trò quan trọng trong việc truyền tải tín hiệu đến ĐXM từ đó làm xoay chuyển ĐXM theo hướng thuận lợi cho sự phosphoryl các phân tử JAK2 và hoạt hóa các tín hiệu nội bào.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được triển khai tại phòng thí nghiệm nhóm Waters, Viện sinh học phân tử (Institute for Molecular Bioscience)-trường đại học Queensland từ tháng 3 đến tháng 8 năm 2011.

### 2.2 Các phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Sự tạo các cấu trúc đột biến ở đoạn liên kết

Đoạn liên kết bao gồm 14 axit amin định vị giữa ĐNM và phần trên của ĐXM. Các đột biến ở trình tự liên kết của receptor hoang dại ở thỏ (rGHR) được cung cấp bởi nhóm Waters. Các đột biến này sẽ được chuyển nhiễm vào các dòng tế bào chuột nguyên thủy Ba/F3. Có 4 đột biến được can thiệp vào đoạn liên kết bao gồm đột biến chèn 4 Alanine và 7 Alanin sau trình tự EED, đột biến thay EED bằng KKR và AAA.

**Bảng 1: Các axit amin thao tác và điện cực tương ứng**

Tên axit amin	Ký hiệu	Điện cực
Alanine	A	Trung tính
Glutamic acid	E	Âm
Aspartic acid	D	Âm
Lysine	K	Dương
Arginine	R	Dương

EED (Glutamic acid-Glutamic acid-Aspartic acid). Điện cực (---)

KKR (Lysine-Lysine-Arginine). Điện cực (+++)

AAA (Alanine-Alanine-Alanine). Điện cực (trung-trung-trung)



**Hình 1: Đoạn liên kết giữa đoạn ngoài màng-đoạn xuyên màng cùng các đột biến được thao tác**

### 2.2.2 *Đánh giá sự tăng sinh của các dòng tế bào mang các GHR đột biến ở đoạn liên kết*

#### *Tạo các vector retrovirus bằng chuyển nhiễm*

Hòa tan Lipofectamin™ 2000 và các plasmid pQCXP-CMV/TO (chứa gen kháng puromycin) hoặc pQCXIH-CMV/TO (chứa gen kháng hygromycin) có chứa các đột biến tương ứng trong Opti-MEM 5 phút trước khi trộn với nhau và ủ hơn 20 phút. Mỗi hỗn hợp sau đó được chuyển nhiễm vào các tế bào platinum-E (Plat E) đã được nuôi ở mật độ  $1.7 \times 10^5$  tế bào/2 mL DMEM. Tế bào đã chuyển nhiễm tiếp tục được nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ sau đó trước khi dung dịch nuôi cấy được đổi mới trong 24 giờ tiếp theo. Ở ngày thứ 3, tế bào được chuyển sang nuôi cấy ở 35°C. Sang ngày tiếp theo dung dịch nuôi cấy đã chứa các retrovirus mang các plasmid đột biến và sẵn sàng cho việc tải nạp.

#### *Tải nạp kép dòng tế bào Ba/F3 đã mang đột biến có sẵn bằng các retrovirus*

Các tế bào Ba/F3 đã được tải nạp lần thứ nhất với các plasmid chứa cấu trúc đột biến sẽ được chọn lọc qua sự tồn tại của chúng trong môi trường kháng sinh tương ứng. Có 5 dòng tế bào Ba/F3 được sử dụng bao gồm dòng tế bào chứa GHR bình thường (Wt) và dòng chứa GHR mang 4 đột biến ở đoạn liên kết: 4A, 7A, KKR, AAA.

$2 \times 10^5$  tế bào Ba/F3 (5 dòng tế bào) được tiếp tục tải nạp lần thứ 2 với các dung dịch retrovirus mang các plasmid tương ứng đã được ly tâm. Hỗn hợp các tế bào và retrovirus sẽ tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường mới có bổ sung 8µg/ml polybrene và dung dịch nuôi cấy RPMI được bổ sung 4% IL-3 trong 24 giờ. Khi các tế bào Ba/F3 bắt đầu tăng sinh, các kháng sinh tương ứng (400µg/ml Hygromycin) được bổ sung để loại bỏ các tế bào chết do không tải nạp thành công. Trong quá trình nuôi cấy, tùy vào lượng tế bào chết nhiều hay ít mà dung dịch nuôi cấy có bổ sung kháng sinh sẽ được làm mới.

Sau khi tải nạp lần thứ hai các dòng tế bào này, kết quả thu được các dòng tế bào mang 2 loại cấu trúc receptor bao gồm: Wt-Wt, Wt-7A, Wt-4A, Wt-KKR, Wt-AAA, KKR-KKR, AAA-AAA, 4A-7A, 7A-7A, 4A-4A.

#### *Thí nghiệm theo dõi sự tăng sinh của tế bào*

Các dòng đột biến Ba/F3 khác nhau có khả năng kháng kháng sinh được nuôi dưỡng trong môi trường giàu dưỡng chất (RPMI có bổ sung 10% Serum supreme và 10% L-Glutamin) và sau đó được chuyển sang môi trường ít dưỡng chất hơn (RPMI có bổ sung 2.5% Serum supreme và 10% L-Glutamin) để khảo sát sự tăng sinh của chúng. Tế bào được rửa 3 lần với PBS để loại bỏ dưỡng chất trong môi trường nuôi. Khởi đầu ở mật độ bằng nhau ở  $125 \times 10^4$  tế bào, số lượng tế bào sẽ được theo dõi mỗi ngày cho đến ngày thứ 5 bằng phương pháp nhuộm Trypan blue trên buồng đếm tế bào.

### 2.2.3 *Đánh giá sự phosphoryl hóa của STAT5 trên dòng tế bào mang các receptor đột biến*

#### ***Chuyển nhiễm dòng tế bào HEK 293 (tế bào thận phôi người)***

Tế bào HEK được chọn do độ biểu hiện của GHR rất thấp và phản ứng tốt đối với GH một khi được chuyển nhiễm các cấu trúc GHR đột biến. Các tế bào được nuôi

với mật độ  $4 \times 10^5$  tế bào/2mL DMEM trong 24 giờ trước khi chuyển nhiễm với các vector pQCXIH CMV/TO mang các đột biến khác nhau. Do độ biểu hiện của STAT5 trong các tế bào sau chuyển nhiễm rất thấp nên một lượng nhỏ 250 ng/ml STAT5 ADN đã được bổ sung vào các vector đột biến để đồng chuyển nhiễm vào trong các tế bào HEK. Các tế bào đã được bỏ đói trong DMEM media không có FBS trong vòng 16 giờ trước khi thu hoạch. Sau khi bỏ đói, các đối chứng dương được bổ sung GH (200 ng/ml) trong 10 phút (37°C). Các đối chứng dương được thiết lập để so sánh sự hoạt hóa của GHR trong môi trường không có GH và có GH.

### **Western blot**

Các tế bào được rửa một lần với PBS bình thường và trong chất đệm lạnh (ice-cold buffer) (PBS được bổ sung 100 $\mu$ M NaVO<sub>3</sub>). Tế bào được thu hoạch và đem ly tâm ở tốc độ 13000 g trong 5 phút. Sau khi loại bỏ các dung dịch đệm, màng tế bào được phá vỡ bằng dung dịch RIPA buffer để giải phóng các protein. Trong dung dịch RIPA có bổ sung chất ức chế protease để protein không bị phân hủy trong quá trình thao tác. Sau khi được phân cắt bằng RIPA, tế bào có thể được bảo quản ở -80°C đến khi thao tác.

### *Đo nồng độ protein tổng thể*

Phương pháp Bradford (BCA) được sử dụng với RIPA buffer

### **SDS-PAGE**

20  $\mu$ g protein của mỗi mẫu tế bào sẽ được bổ sung thuốc nhuộm protein có chứa 5  $\mu$ l SDS và DTT. Hỗn hợp được làm nóng ở 95°C để làm biến tính protein trước khi đem ly tâm tại 13000 g /1 phút. Hỗn hợp protein-thuốc nhuộm được điện di trong 7% SDS-PAGE gel (100 V, 90 phút). Mảnh gel có chứa protein sau đó sẽ được chuyển sang lớp màng chuyên dụng PVDF (Immobilon-P, Millipore) có tắm methanol và dung dịch tải. Protein từ lớp gel sẽ được tải qua lớp màng ở hiệu điện thế 150V trong 60 phút trên một hệ thống chuyển tải chuyên dụng (Pharmacia).

### **Blocking**

Lớp màng có chứa protein sẽ được rửa sơ trong TBS (Tris Buffered Saline)-Tween 20%, sau đó được ngâm trong dung dịch TBS có chứa 5% sữa (không chất béo) trong 1 giờ. Lớp màng tiếp theo được rửa 1 lần trong TBS trước khi được ủ với các kháng thể.

### *Nhuộm kháng thể*

Lớp màng sẽ được nhuộm 2 lần trong dung dịch BSA có hòa tan kháng thể để bắt dính STAT5. Đầu tiên lớp màng được ủ với kháng thể sơ cấp (thỏ) Phospho STAT5 Y694 ở 4°C qua đêm. Kháng thể này sẽ bám vào các phân tử STAT5 đã được phosphoryl hóa. Sau đó lớp màng được rửa 1 lần với dung dịch TBS và đem ủ với kháng thể thứ cấp HRP-anti rabbit IgG trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Kháng thể thứ cấp này có tác dụng bám vào các kháng thể sơ cấp đã bám dính phospho STAT5. Cả kháng thể sơ cấp và thứ cấp đều được pha trong dung dịch BSA (Bovine serum albumin) 5% với tỉ lệ được ấn định theo nhà sản xuất.

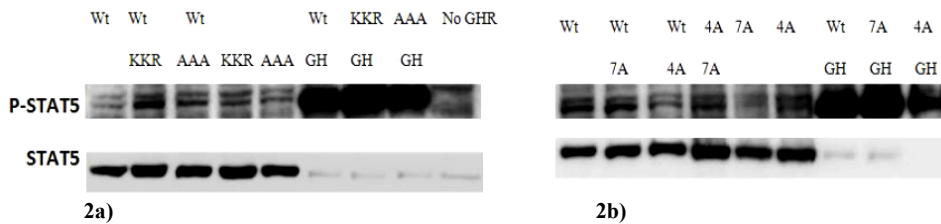
Các lớp màng sẽ được rửa 3 lần trong TBS-Tween 20% trước khi đem nhuộm với dung dịch ECL/5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó lớp màng sẽ được quan sát dưới tia X.

Sau khi quan sát lượng protein STAT5 được phosphoryl hóa (P-STAT5), tấm màng sẽ được rửa và nhuộm lần 2 để quan sát lượng STAT5 tổng. Lúc này, các kháng thể sơ cấp và thứ cấp tương ứng để dò lượng STAT5 tổng sẽ được sử dụng. Mục đích của việc quan sát lượng STAT5 tổng là để quan sát sự sai số trong việc tải cùng một lượng protein vào mỗi mẫu. Nếu lượng P-STAT5 ở 2 mẫu khác nhau và lượng STAT5 tổng biểu hiện như nhau thì chứng tỏ sự sai khác về P-STAT5 là do bản chất tế bào chứ không phải do thao tác.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Sự hoạt hóa độc lập và sự phosphoryl hóa của STAT5 trong các tế bào mang gen đột biến

Để khảo sát xem nếu những thay đổi trong trình tự đoạn liên kết có ảnh hưởng đến sự hoạt hóa của GHR, 2 loạt thí nghiệm đã được thiết lập trong đó các tế bào được nuôi trong điều kiện có và không có GH để so sánh. Các nghiên cứu trước chứng tỏ rằng sự hoạt hóa của GHR tỉ lệ thuận với mức độ phosphoryl hóa của STAT5. Kết quả thấy rằng sự can thiệp vào cấu trúc GHR có thể làm cho các phân tử này tự hoạt hóa trực tiếp mà không cần GH. Hình 2 cho thấy trong môi trường có và không có GH, sự phosphoryl hóa của STAT5 đều được quan sát ở các mức độ khác nhau. Điều này một lần nữa khẳng định sự thay đổi cấu trúc của GHR trong chuỗi nhị phân có vai trò hoạt hóa GHR trong môi trường vắng mặt GH [Brown, *et al.*, (2005)].



**Hình 2: Sự phosphoryl hóa của STAT5 (P-STAT5) của các tế bào mang các GHR đột biến khác nhau**

2a) Dòng tế bào chuyển nhiễm mang (Wt-KKR) và (Wt-AAA) so sánh với các đối chứng

2b) Dòng tế bào chuyển nhiễm mang Wt-7A) và (Wt-4A) so sánh với các đối chứng.

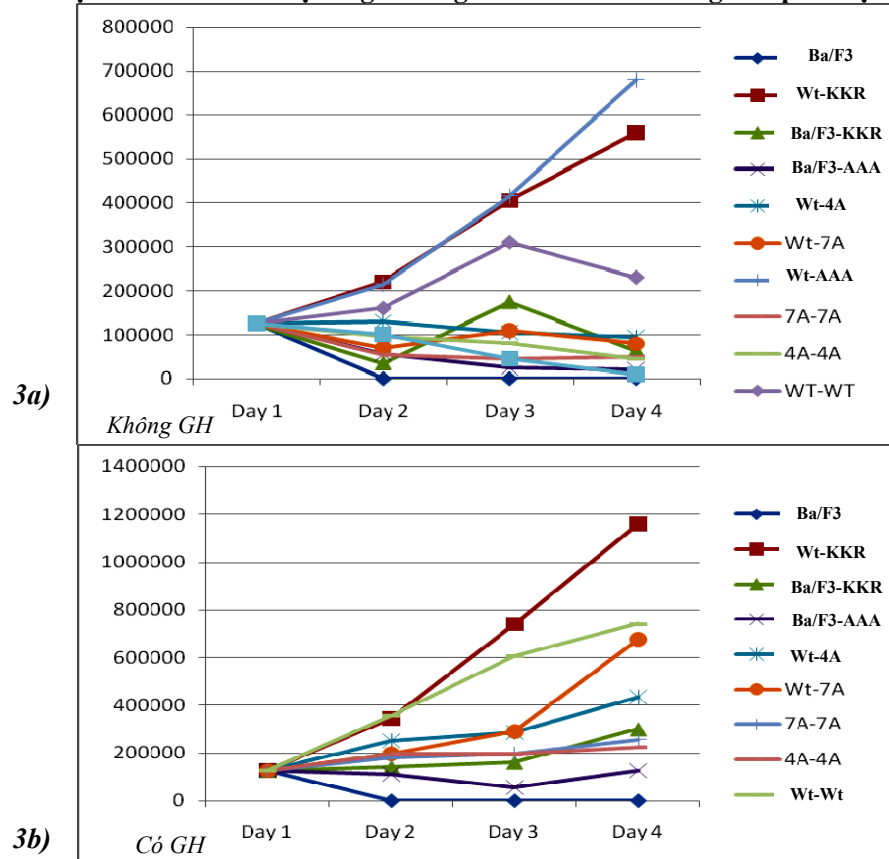
Hình 2 cho thấy đã có sự khác biệt về lượng P-STAT5 ở các tế bào mang các cấu trúc receptor khác nhau. Đặc biệt các tế bào được chuyển nhiễm để mang (Wt-KKR) có lượng P-STAT5 cao hơn so với các tế bào chỉ mang một loại receptor Wt hay KKR. Tương tự, các tế bào có mang phức hợp (Wt-AAA) cũng có lượng P-STAT5 cao hơn so với các tế bào chỉ mang một loại Wt hay AAA. Ngược lại, đối với các tế bào mang GHR trong trường hợp đoạn liên kết được bổ sung thêm vòng xoắn  $\alpha$ , hàm lượng P-STAT5 ở các tế bào mang (Wt-7A) và (Wt-4A) đã không thể hiện có sự chênh lệch rõ hơn so với các tế bào chỉ mang Wt/7A/4A tương ứng. Điều này cho thấy sự thay đổi về lực hấp dẫn giữa các phân tử trong hệ nhị phân có tác dụng rõ rệt trong việc hoạt hóa GHR hơn là sự thay đổi về chiều dài các

đoạn liên kết. Nói cách khác, khuynh hướng xoay có thể có vai trò quan trọng hơn là sự thay đổi theo chiều dọc của các phân tử receptor trong quá trình hoạt hóa.

Tế bào mang (Wt-KKR) và (Wt-AAA) có hàm lượng P-STAT5 cao hơn so với các mẫu khác trong cùng điều kiện không có GH. Điều này có thể lý giải khi lực đẩy giữa EED-EED (âm-âm) được giảm dần bằng cách thay đổi EED-AAA (âm-trung tính) và EED-KKR (âm-dương) thì lực hấp dẫn tăng dần làm rút ngắn khoảng cách giữa 2 đoạn liên kết từ đó làm cho phần trên của ĐXM tiến lại gần nhau, phần dưới xa nhau và tạo điều kiện cho sự phosphoryl hóa của JAK2 và của STAT5.

Lượng STAT5 tổng ở các dòng tế bào có bổ sung GH có sự giảm rõ rệt, cho thấy các tế bào nếu chịu tác động của GH trong một thời gian dài sẽ có sự bất hoạt STAT5. Hay nói cách khác, sự tác động dương tính của GH lên tế bào là không liên tục do phản ứng hoạt hóa sự tổng hợp STAT5 diễn ra theo chiều ngược lại dưới tác dụng của các enzyme ức chế. Điều này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Gebert và cộng sự năm 1997 và 1999 trong đó STAT5 sẽ được hoạt hóa nếu tế bào chịu sự tác động của GH ít nhất là 20 phút. Tuy nhiên, hiệu ứng sẽ diễn ra ngược lại sau 4 giờ do sự khởi động chậm của các hệ enzyme ức chế quá trình tổng hợp STAT5.

**3.2 Sự sai khác về tốc độ tăng trưởng của các tế bào mang receptor đột biến**



Ba/F3: các tế bào không được chuyển nhiễm các receptor.

**Hình 3: Sự gia tăng số lượng các tế bào trong điều kiện có GH (3a) và không có GH (3b)**



Kết quả theo dõi sự gia tăng số lượng của tế bào cho thấy rằng trong điều kiện có GH, dù với các tốc độ tăng trưởng về số lượng tế bào khác nhau nhưng tất cả các tế bào đều có khuynh hướng gia tăng về số lượng theo thời gian. Ngược lại, trong môi trường không có GH, chỉ có các tế bào mang (Wt-KKR) và (Wt-AAA) mới có có độ sống sót và tăng trưởng cao kể từ sau ngày thứ 3 trong khi các dòng còn lại thì tỉ lệ chết cao ngay sau ngày thứ 2 hoặc thứ 3.

Trong môi trường có và không có GH, đa số các dòng tế bào đều có sự giảm mạnh về số lượng sau một ngày nuôi cấy trong môi trường mới (hình 3a và 3b). Nguyên nhân của sự chết hàng loạt này là do đa số các dòng tế bào bị sốc khi chuyển sang môi trường nghèo dưỡng chất và không thích nghi kịp. Tuy nhiên, đối với dòng (Wt-KKR) và (Wt-AAA), khả năng thích nghi của tế bào này cao hơn, điều này được thể hiện qua kết quả rằng đây là 2 dòng duy nhất có sự gia tăng số lượng tế bào ở ngày thứ 2 (hình 3a).

Do các dòng tế bào được nuôi dưỡng và thay đổi dung dịch nuôi cấy mỗi ngày trong điều kiện không có kháng sinh nên đến ngày thứ 5 thì một số dòng tế bào bị nhiễm nấm, do đó kết quả chỉ được thống kê đến hết ngày thứ 4. Nghiệm thức dương có bổ sung GH của dòng tế bào (Wt-AAA) cũng bị nhiễm nấm sớm nên không được thống kê trên đồ thị. Tuy nhiên ở các lần lặp lại trước kết quả thể hiện rằng dòng (Wt-AAA) trong điều kiện có GH có tốc độ tăng rất cao và chỉ sau (Wt-AAA).

Riêng đối với dòng đối chứng âm Ba/F3 nguyên thủy, dù trong môi trường có GH hay không GH thì dòng tế bào này cũng không thích nghi nổi với môi trường mới. Điều đó cho phép suy luận rằng các dòng Ba/F3 có mang đột biến khác nhau ở GHR có hiệu ứng làm tăng tính thích nghi của tế bào trong môi trường nghèo dinh dưỡng.

Kết quả về tốc độ tăng trưởng của tế bào phù hợp với kết quả về sự phosphoryl hóa của STAT5 đối với các mẫu tế bào có mang (Wt-KKR) và (Wt-AAA). Điều đó có thể lập luận rằng khi lực hấp dẫn giữa các đoạn liên kết của 2 receptor trong hệ nhị phân thay đổi, cấu trúc không gian của ĐXM có thể được xoay chuyển theo hướng tạo điều kiện cho sự phosphoryl hóa các phân tử JAK2, từ đó dẫn đến sự hoạt hóa các phân tử STAT5 và gây các phản ứng nội bào làm tăng cường các quá trình sinh trưởng và phát triển của tế bào.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả chứng tỏ sự thay đổi cấu trúc không gian của ĐXM và ĐTM có vai trò quan trọng trong sự hoạt hóa GHR để phát hiệu lệnh điều hòa các quá trình sinh trưởng, phát triển và trao đổi chất của tế bào. Kết quả trong nghiên cứu này hỗ trợ giả thuyết ban đầu của nhóm Waters: sự xoay chuyển của các ĐXM và ĐTM trong phức hệ nhị phân có thể là cơ chế gây hoạt hóa GHR trong điều kiện không có GH.

Để làm rõ hơn vai trò của ĐXM/ĐTM và sự thay đổi cấu trúc không gian của GHR trong quá trình hoạt hóa, các đột biến khác can thiệp vào cấu trúc của đoạn liên kết (Hình 1) cần được tiến hành trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brown, R., Adams, J., Pelekanos, R., Wan, Y., McKinstry, W., Palethorpe, K., et al. (2005). Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nature structural & molecular biology*, 12(9), 814-821.

- Chen, C., Brinkworth, R., & Waters, M. J. (1997). The role of receptor dimerization domain residues in growth hormone signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(8), 5133.
- Cunningham, B., & Wells, J. (1991). Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(8), 3407.
- Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V., & Wells, J. A. (1992). Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*, 256(5064), 1677.
- Gebert, C. A., S. H. Park, et al. (1997). "Regulation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 5b activation by the temporal pattern of growth hormone stimulation." *Molecular endocrinology* 11(4): 400-414.
- Gebert, C. A., S. H. Park, et al. (1999). "Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling." *Molecular endocrinology* 13(1): 38-56.
- Gent, J., Van Kerkhof, P., Roza, M., Bu, G., & Strous, G. J. (2002). Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9858.
- Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J. A., Weinstein, H., & Kobilka, B. K. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the 2 adrenoceptor. *The EMBO journal*, 16(22), 6737-6747.
- Harding, P. A., Wang, X., Okada, S., Chen, W. Y., Wan, W., & Kopchick, J. J. (1996). Growth hormone (GH) and a GH antagonist promote GH receptor dimerization and internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6708.
- Livnah, O., Johnson, D. L., Stura, E. A., Farrell, F. X., Barbone, F. P., You, Y., et al. (1998). An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. *Nature structural & molecular biology*, 5(11), 993-1004.
- Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C. M., & Misono, K. S. (2004). Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28625.
- Poger, D., & Mark, A. E. (2010). Turning the growth hormone receptor on: Evidence that hormone binding induces subunit rotation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(5), 1163-1174.
- Ross, R., Leung, K., Maamra, M., Bennett, W., Doyle, N., Waters, M., et al. (2001). Binding and functional studies with the growth hormone receptor antagonist, B2036-PEG (pegvisomant), reveal effects of pegylation and evidence that it binds to a receptor dimer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4), 1716.
- Rowlinson, S., Behncken, S., Rowland, J., Clarkson, R., Strasburger, C., Wu, Z., et al. (1998). Activation of chimeric and full-length growth hormone receptors by growth hormone receptor monoclonal antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 5307.
- Rowlinson, S., Yoshizato, H., Barclay, J., Brooks, A., Behncken, S., Kerr, L., et al. (2008). An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway. *Nature cell biology*, 10(6), 740-747.
- Wan, Y., Zheng, Y., Harris, J., Brown, R., & Waters, M. (2003). Epitope map for a growth hormone receptor agonist monoclonal antibody, MAb 263. *Molecular Endocrinology*, 17(11), 2240.
- Zhu, H. J., & Sizeland, A. M. (1999). A pivotal role for the transmembrane domain in transforming growth factor-beta receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11773-11781