**TRANG THÔNG TIN LUẬN ÁN**

(khoảng 1 – 1.5 trang A4)

Tên đề tài luận án: Nghiên cứu các gene methylketone synthase 2 (MKS2) ở cây cà tím *Solanum melongena*

Ngành: Hóa sinh học

Mã số ngành: 62 42 01 16

Họ tên nghiên cứu sinh: Khuất Lê Uyên Vy

Khóa đào tạo: 2014-2017 (đợt 2)

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Hồng Thương và PGS.TS. Phạm Thị Ánh Hồng

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG.HCM

**1. TÓM TẮT NỘI DUNG LUẬN ÁN**:

Methylketone synthase 2 (MKS2), hay còn được gọi là acyl-lipid thioesterase (ALT) là enzyme tham gia trong con đường sinh tổng hợp 2-methylketone ở lông tiết cà chua dại *Solanum habrochaites* subsp. *glabratum*. Enzyme MKS2/ALT xúc tác phản ứng thủy phân liên kết thioester của β-ketoacyl-ACP (hợp chất trung gian trong con đường sinh tổng hợp acid béo) tạo thành β-ketoacid. Các β-ketoacid tiếp tục bị khử nhóm carboxyl bởi methylketone synthase 1 (MKS1) hoặc nhiệt độ cao trong môi trường acid để tạo thành 2-methyketone. Tùy thuộc vào chiều dài chuỗi, các hợp chất 2-methylketone có nhiều vai trò và ứng dụng khác nhau. Ở thực vật, 2-methylketone có tác dụng xua đuổi và tiêu diệt côn trùng. Ngoài ra, 2-methylketone còn được sử dụng làm hương liệu trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm; và là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất nhiên liệu sinh học. Luận án này được thực hiện nhằm mục tiêu thu nhận các thông tin dữ liệu về đặc điểm cấu trúc và chức năng của các gene mã hóa MKS2/ALT ở cà tím *Solanum melongena*. Kết quả của luận án góp phần làm sáng tỏ hơn vai trò và sự đa dạng của các gene mã hóa MKS2/ALT ở họ Solanaceae. Trong nghiên cứu này, với sự hỗ trợ của các công cụ tin sinh học kết hợp với kỹ thuật sinh học phân tử chúng tôi đã đã phân lập được ba gene (*SmMKS2-1,* *SmMKS2-2* và *SmMKS2-3*) mã hóa MKS2/ALT từ *S. melongena*. Gene *SmMKS2-1* biểu hiện phiên mã ở tất cả các mô, trong đó biểu hiện trội nhất ở mô lá già và mô quả, biểu hiện thấp nhất ở mô thân và rễ. Gene *SmMKS2-2* biểu hiện cao nhất ở mô hoa và hầu như không biểu hiện hoặc biểu hiện rất yếu ở các mô khác. Gene *SmMKS2-3* chỉ được phát hiện ở mô quả. Khi cây cà tím bị gây tạo vết thương cơ học hoặc xử lý với phytohormone MeJA hay MeSA, gene *SmMKS2-1* được cảm ứng tăng biểu hiện phiên mã tại mô lá, trong khi sự biểu hiện của SmMKS2-2 và SmMKS2-3 trong lá không bị tác động bởi các yếu tố trên. Khi được cảm ứng biểu hiện trong tế bào *E. coli* C41(DE3), enzyme SmMKS2-1 và SmMKS2-2 đều thể hiện hoạt tính thioesterase và tạo ra sản phẩm chính là β-ketoacid 14:1. Trong đó, lượng β-ketoacid 14:1 được tích lũy trong dịch nuôi cấy chủng *E. coli* C41(DE3) biểu hiện SmMKS2-2 là 62,49 ± 9,168 µg/đơn vị OD và cao hơn khoảng 37 lần so với lượng β-ketoacid 14:1 được tích lũy trong dịch nuôi cấy chủng *E. coli* C41(DE3) biểu hiện SmMKS2-1. Riêng SmMKS2-3 không thể hiện hoạt tính thioesterase khi được biểu hiện trong tế bào *E. coli* C41(DE3). Các enzyme MKS2/ALT đã được khảo sát chức năng ở thực vật, bao gồm cả SmMKS2-1, SmMKS2-2 và SmMKS2-3 trong nghiên cứu này đều chứa aspartate bảo tồn cần thiết cho hoạt tính xúc tác của các thioesterase mang gấp cuộn “hot-dog” đơn. Sự thay thế aspartate bằng glutamate (amino acid có cấu tạo tương đồng nhất với aspartate) đã làm mất hoàn toàn hoặc phần lớn hoạt tính enzyme SmMKS2-2. Điều này cho thấy aspartate bảo tồn đóng vai trò thiết yếu đối với sự thể hiện hoạt tính thioesterase của các MKS2/ALT.

**2. NHỮNG KẾT QUẢ MỚI CỦA LUẬN ÁN**:

* Cà tím *S. melongena* có 3 gene methylketone synthase 2, bao gồm *SmMKS2-1*, *SmMKS2-2* và *SmMKS2-3*. Các gene này được phân lập và gửi vào ngân hàng gene với mã số truy cập lần lượt là MK990608, MK990609 và MK990610.
* *SmMKS2-1* biểu hiện phiên mã trong tất cả các mô (lá, thân, rễ, hoa và quả), trong khi đó SmMKS2-2 và SmMKS2-3 chủ yếu biểu hiện phiên mã tương ứng ở hoa và quả.
* *SmMKS2-1* được cảm ứng biểu hiện phiên mã tại mô lá của cây cà tím bởi quá trình gây tạo vết thương cơ học hoặc xử lý với MeJA hay MeSA, còn *SmMKS2-2* và *SmMKS2-3* thì không.
* Khi được biểu hiện trong *E. coli* C41(DE3), SmMKS2-1 và SmMKS2-2 thể hiện hoạt tính thioesterase trên cơ chất cơ chất β-ketoacyl-ACP khác nhau để tạo ra các β-ketoacid bão hòa và không bão hòa tương ứng, trong đó sản phẩm chính được tạo thành là β-ketoacid 14:1. SmMKS2-2 có phổ cơ chất hẹp hơn nhưng hoạt tính trên các cơ chất này lại cao hơn so với SmMKS2-1.
* SmMKS2-3 không thể hiện hoạt tính thioesterase khi được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* C41(DE3).
* Aspartate đóng vai trò thiết yếu quyết định hoạt tính thioesterase của SmMKS2-2. Sự thay thế aspartate bằng glutamate đã làm mất hoàn toàn hoặc phần lớn hoạt tính thioesterase.

**3.** **CÁC ỨNG DỤNG/ KHẢ NĂNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC TIỄN HAY NHỮNG VẤN ĐỀ CÒN BỎ NGỎ CẦN TIẾP TỤC NGHIÊN CỨU**

Việc phân lập các gene *MKS2/ALT* từ cà tím *S. melongena* đã góp phần làm phong phú hơn bộ sưu tập các gene *MKS2/ALT* từ thực vật, tạo cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu phát triển các giống cây trồng và các chủng vi sinh vật có khả năng tổng hợp các acid béo và hợp chất dẫn xuất (2-methylketone) có khung carbon như mong muốn một cách có định hướng và hiệu quả, phù hợp với những ứng dụng khác nhau của nhóm hợp chất này.

Luận án cho thấy tính khả thi của việc áp dụng kết hợp tin sinh học, các phương pháp sinh học phân tử và phân tích sinh hóa để phát hiện, phân tích chức năng của các gene mới, đặc biệt là các gene có liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị, vốn không dễ dàng được sản xuất bằng con đường tổng hợp hóa học.

|  |  |
| --- | --- |
| **TẬP THỂ CÁN BỘ HƯỚNG DẪN**  **Nguyễn Thị Hồng Thương Phạm Thị Ánh Hồng** | **NGHIÊN CỨU SINH**  **Khuất Lê Uyên Vy** |

**XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO**

**HIỆU TRƯỞNG**

**THESIS INFORMATION**

(1 – 1.5 A4 pages)

Thesis title: Methylketone synthase 2 (MKS2) genes in eggplant (*Solanum melongena*)

Speciality: Biochemistry

Code: 62 42 01 16

Name of PhD Student: Khuat Le Uyen Vy

Academic year: 2014-2017

Supervisor: Nguyen Thi Hong Thuong, Ph.D. and Pham Thi Anh Hong, Ph.D. Associate Professor

At: VNUHCM - University of Science

**1. SUMMARY**:

Methylketone synthase 2 (MKS2), also known as acyl-lipid thioesterase (ALT), is an enzyme that is involved in the 2-methylketone biosynthetic pathway in trichomes of the wild tomato species *Solanum habrochaites* subsp. *glabratum*. The MKS2/ALT enzymes have thioesterase activity, hydrolyzing the thioester bond in 3-ketoacyl-ACPs to produce β-ketoacids, which then could be decarboxylated enzymatically by methylketone synthase 1 (MKS1) or thermally by heat treatment to form 2-methylketones. 2-Methylketones with different carbon chain lengths and degree of saturation have various applications including as defense compounds to protect plants from pests, as flavors in the food and cosmetics industry, and as feedstocks for biofuel production. The goal of this thesis is to collect data on structural and functional characteristics of genes encoding for MKS2/ALTs in eggplant *S. melongena*. The results of the thesis helps to gain insight into the catalytic diversity and biological roles of MKS2/ALTs in plants from the Solanaceae family. Here, we combined bioinformatics tools for gene prediction and molecular biology techniques to isolate three MKS2/ALT genes (namely *SmMKS2-1*, *SmMKS2-2* and *SmMKS2-3*) from *S. melongena*. Transcripts of *SmMKS2-1* were detected in all tested tissues, both aerial and root parts, but were highest in mature leaves and fruits. The highest level of *SmMKS2-2* transcripts was in floral tissues, with much lower but detectable levels in all other tissues tested. The expression level of *SmMKS2-3* transcripts was detected only at very low in fruits. In the plant, the magnitude of *SmMKS2-2* and *SmMKS2-3* expression was much lower than that of *SmMKS2-1*.

Transcriptional expression of *SmMKS2-1* gene was increased in leaves by mechanical wounding, and by methyl jasmonate or methyl salicylate, but this induction was not observed for *SmMKS2-2* and *SmMKS2-3* genes. Expression and functional characterization of SmMKS2s in *E. coli* C41(DE3) showed that SmMKS2-1 and SmMKS2-2 exhibited the thioesterase activity against different β-ketoacyl-ACP substrates to generate the corresponding saturated and unsaturated β-ketoacids, in which β-ketoacid 14:1 is the main product. The amount of β-ketoacid 14:1 produced by SmMKS2-2 was 62.49 ± 9,168 µg/unit OD and 37 times higher than the amount of β-ketoacid 14:1 produced by SmMKS2-1. Particularly, SmMKS2-3 showed no activity when expressed in *E. coli* C41(DE3). The functionally characterized MKS2/ALT enzymes in plants, including SmMKS2-1, SmMKS2-2 and SmMKS2-3 in this study, contain conserved aspartate, which is required for the catalytic activity of single "hot-dog" fold thioesterases. The replacement of the conserved aspartate with a structurally similar acidic amino acid, glutamate, can also inactivated or or reduced significantly the thioesterase activity of SmMKS2-2. This suggests that conserved aspartate plays an essential role in the catalytic function of MKS2/ALTs.

**2. NOVELTY OF THESIS**:

* Eggplant *S. melongena* has 3 methylketone synthase 2 genes, including *SmMKS2-1*, *SmMKS2-2* and *SmMKS2-3*. These genes were isolated and their nucleotide sequences were submitted into GenBank with the access numbers MK990608, MK990609 and MK990610, respectively.
* *SmMKS2-1* was expressed at a high level in leaves, stems, roots, flowers, and fruits, whereas expression of *SmMKS2-2* and *SmMKS2-3* was mainly in flowers and fruits, respectively.
* SmMKS2-1 and SmMKS2-2 exhibited the thioesterase activity against different β-ketoacyl-ACP substrates to generate the corresponding saturated and unsaturated β-ketoacids, which can undergo decarboxylation to form their respective 2-methylketone products, whereas SmMKS2-3 showed no activity when they were expressed in *E. coli* C41(DE3). SmMKS2-2 exhibited narrower substrate preferences but higher activity towards those substrates than SmMKS2-1.
* The conserved Asp77 plays an essential role in the thioesterase activity of SmMKS2-2. The substitution of this aspartate with a structurally similar acidic amino acid such as glutamate can also result in a complete or significant loss of thioesterase activity.

**3**. **APPLICATIONS/ APPLICABILITY/ PERSPECTIVE**

Isolation of MKS2/ALT genes from eggplant *S. melongena* has contributed to enriching the collection of MKS2/ALT genes from plants. These genes could be very useful for studying and developing plant varieties and microbial strains capable of synthesizing fatty acids and their derivative compounds of interest (such as 2-methylketones) in a desired and efficient manner.

The thesis demonstrates the feasibility of applying a combination of bioinformatics, molecular biology methods and biochemical analysis to detect and functionally characterize new genes, especially those related to the biosynthesis of valuable secondary compounds, which are not easily produced by chemical synthesis.

|  |  |
| --- | --- |
| **SUPERVISOR**  **Nguyễn Thị Hồng Thương Phạm Thị Ánh Hồng** | **PhD STUDENT**  **Khuất Lê Uyên Vy** |

**CONFIRMATION**

**UNIVERSITY OF SCIENCE**

**PRESIDENT**