

Giảm biểu hiện *Drosophila* ubiquitin carboxy—terminal hydrolase tác động đến sự điều hòa stress oxy hóa tế bào trong quá trình phát triển mắt ruồi giấm *Drosophila melanogaster*

Nguyễn Anh Tuấn^{1,2}, Nguyễn Công Minh Huy^{1,2}, Đặng Thị Phương Thảo^{1,2,3,*}

TÓM TẮT

Ubiquitin carboxyl—terminal hydrolase L1 (UCH—L1) là protein phổ biến ở tế bào thần kinh người, có chức năng giải phóng ubiquitin tự do, thuộc hệ thống phân giải protein thông qua ubiquitin. Biểu hiện bất thường của UCH—L1, bao gồm tăng và giảm biểu hiện, được ghi nhận ở một số bệnh thoái hóa thần kinh, ung thư gợi ý về vai trò quan trọng của UCH—L1 trong tế bào sống. Tuy nhiên, cho đến nay, chức năng của UCH—L1, mối liên quan giữa UCH—L1 trong sự phát triển mô và cơ thể sống vẫn chưa được hiểu rõ. Bài báo trình bày việc sử dụng mô hình ruồi giấm *Drosophila melanogaster* cùng hệ thống biểu hiện định hướng mô Gal4-UAS, để làm giảm biểu hiện protein dUCH (*Drosophila* Ubiquitin Carboxyl Hydrolase), là protein tương đồng với UCH—L1 chuyên biệt tại mô mắt ruồi và ghi nhận được việc giảm biểu hiện dUCH gây ra kiểu hình mắt bất thường ở ruồi. Đã ghi nhận được sự gia tăng của gốc oxy hóa tự do ở đĩa tiền phân sinh mắt. Song song với hiện tượng tăng gốc oxy hoá tự do, đã ghi nhận được hiện tượng giảm biểu hiện các gene kháng oxy hóa *sod2*, *gstd1*, *gstd2*. Ngoài trừ kiểu hình mắt bất thường, các ảnh hưởng gây ra bởi sự giảm biểu hiện dUCH được cải thiện khi cho ruồi ăn bằng môi trường bổ sung vitamin C ở nồng độ 2,5 mM. Kết quả cho thấy dUCH tác động đến quá trình phát triển mắt ruồi thông qua sự điều hòa quá trình stress oxy hóa. Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để có thể kết luận đây có phải là con đường tác động duy nhất của dUCH trong sự hình thành mắt ruồi.

Từ khóa: Mắt ruồi giấm *Drosophila*, dUCH, stress oxy hóa, UCH—L1

¹Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Đặng Thị Phương Thảo, Khoa Sinh học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: thaodp@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 01-10-2024
- Ngày sửa đổi: 17-11-2024
- Ngày chấp nhận: 14-12-2024
- Ngày đăng: 31-12-2024

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i4.1414>



GIỚI THIỆU

Ubiquitin cacboxy—terminal hydrolase L1, UCH—L1, là một protein chiếm 1–2% protein tổng số ở não người. UCH—L1 là một thành phần trong hệ thống phân giải ubiquitin—proteasome (UPS) của tế bào. Các sai hỏng ở protein này đã được ghi nhận trên một số bệnh nhân mắc Parkinson, thoái hóa thần kinh^{1–5}, và gần đây cũng được ghi nhận ở một số loại ung thư^{6–9}. Tuy nhiên, chức năng cụ thể của UCH—L1 trong tế bào vẫn chưa được hiểu rõ. Protein dUCH ở ruồi giấm là protein tương đồng của UCH—L1, với độ tương đồng là 43,7%¹⁰. Dòng ruồi biểu hiện bất thường dUCH ở tế bào thần kinh đã được sử dụng làm mô hình nghiên cứu bệnh Parkinson¹¹.

Stress oxy hóa là trạng thái mất cân bằng giữa việc hình thành và phân giải các gốc oxy hóa tự do (ROS) như O₂[–] và H₂O₂[–] là các sản phẩm trong quá trình hô hấp và chuyển hóa của tế bào. Rối loạn chuyển hóa ROS trong tế bào là một đối tượng nghiên cứu trong các bệnh thoái hóa tế bào thần kinh như Parkinson, Alzheimer, v.v.^{12–16}. Cùng với đó, một số nghiên cứu cho thấy sự biểu hiện bất thường protein UCH—L1 ở

người và dUCH ở ruồi giấm đều liên quan con đường điều hòa stress oxy hóa^{17–20}. Tuy nhiên, chức năng cụ thể của dUCH trong quá trình điều hòa stress oxy hóa này vẫn chưa được biết rõ.

Mắt ruồi giấm *Drosophila melanogaster* có cấu trúc phức tạp bao gồm nhiều đơn vị mắt con tạo thành. Mỗi đơn vị mắt con lại bao gồm các loại tế bào khác nhau bao gồm: 8 tế bào thần kinh thụ cảm (R1–R8), bốn tế bào nón có chức năng hình thành lớp thấu kính của cụm mắt con, hai tế bào sắc tố cùng các liên bào khác. Tương ứng với sự phức tạp trong cấu trúc, mắt ruồi giấm phải trải qua một quá trình biệt hóa gồm nhiều bước được điều hòa chặt chẽ, song song với đó là các quá trình tăng sinh và chết đi của các tế bào^{21,22}. Bởi vì các con đường tín hiệu tế bào điều hòa quá trình phát triển của mắt ruồi đã được biết khá rõ²², do đó, đây là mô hình thuận lợi để nghiên cứu vai trò chức năng của protein, gene trong quá trình phát triển của tế bào, mô.

Bài báo trình bày mô hình mắt ruồi giấm được sử dụng để khám phá mối liên quan giữa dUCH và quá trình điều hòa stress oxy hóa trong quá trình hình thành mắt ruồi.

Trích dẫn bài báo này: Tuấn N A, Huy N C M, Thảo D T P. Giảm biểu hiện *Drosophila* ubiquitin carboxy—terminal hydrolase tác động đến sự điều hòa stress oxy hóa tế bào trong quá trình phát triển mắt ruồi giấm *Drosophila melanogaster*. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024; 8(4):3238-3247.

Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



VẬT LIỆU-PHƯƠNG PHÁP

Các dòng ruồi được sử dụng

Các dòng ruồi được sử dụng bao gồm: dòng giảm biểu hiện dUCH (UAS-*duch*-IR, V26468) từ Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC). Dòng ruồi mang trình tự khởi đầu phiên mã đặc hiệu ở mắt ruồi—GMR-GAL4 trên nhiễm sắc thể X được sử dụng để định hướng mục tiêu ở mắt ruồi, như được mô tả ở một nghiên cứu khác²³. Dòng ruồi hoang dại CantonS từ Drosophila Genetic Resource Center-Kyoto (DGRC) được sử dụng làm dòng đối chứng. Các dòng ruồi được nuôi dưỡng trong môi trường thạch 0,8%, 5% glucose và 5% nấm men. 50 mL môi trường nuôi ruồi cơ bản được bổ sung 250 uL L-ascorbic acid (vitamin C, A0278, Sigma Aldrich) 500 mM để tạo môi trường 2,5 mM vitamin C. Môi trường được bảo quản ở 4°C trong điều kiện tránh sáng cho đến khi sử dụng.

Đánh giá biểu hiện dUCH bằng phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang

Đĩa mắt ấu trùng bậc ba giai đoạn muộn được tách trong PBS lạnh và ủ với PFA 4% (w/v) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu sau đó được rửa 2 lần với PBS-Triton X-100 0,3% (w/v), mỗi lần 20 phút ở nhiệt độ phòng. Mẫu mô được ủ 20 phút với huyết thanh dê (NGS) 10%, Triton X-100 0,1% trong PBS ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, mẫu tiếp tục được ủ với kháng thể thô kháng dUCH (1:250) ở 4°C trong 16 tiếng. Sau đó, mẫu được rửa 05 lần, mỗi lần 20 phút với dung dịch PBS-Triton X-100 0,3%, mẫu tiếp tục ủ 20 phút với NGS 10%, Triton X-100 0,1% trong PBS trước khi được ủ với kháng thể dê kháng kháng thể thô Alexa 488 (1:400) ở nhiệt độ phòng trong 2 tiếng, tránh sáng. Lặp lại bước rửa 05 lần với PBS-Triton X-100 0,3%. Mẫu sau đó được cố định trên lame trong dung dịch Vectashield Mounting. Kết quả được ghi nhận bằng kính hiển vi huỳnh quang Nikon ECLIPSE NI-U.

Đánh giá hàm lượng ROS bằng nhuộm H2DCF (dichlorodihydrofluorescein)

Đĩa mắt ấu trùng bậc ba giai đoạn muộn được tách trong PBS và ủ trong 300 μ L CM—H₂DCFDA (C6872, InvitrogenTM) 10 μ M trong 20 phút sau đó rửa lại 3 lần với PBS. Mẫu sau đó được ủ với PFA 4% (w/v) trong 10 phút. Tiếp theo, mẫu được đặt lên lame trong dung dịch Vectashield Mounting, kết quả được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi đồng tiêu quét laser FV110i Fluo View. Hình ảnh được xử lý bằng phần mềm ImageJ (NIH Image).

Đánh giá biểu hiện gene bằng kỹ thuật Realtime-PCR

Mỗi dòng ruồi được tách lấy 120 cặp đĩa mắt ấu trùng bậc ba trong PBS lạnh. Mẫu được tách chiết và tinh chế RNA tổng bằng TRISureTM (Meridian Bioscience). cDNA được tổng hợp từ RNA tổng bằng kit PrimeScriptTM RT Reagent (ThermoFisher). Phản ứng realtime-PCR được thực hiện bằng hóa chất SensiFASTTM HRM Kit (Meridian Bioscience) trên máy Lightcycler 96 (Roche) với 45 chu kỳ PCR. Các trình tự phiên mã mục tiêu được khuếch đại đặc hiệu bằng các cặp mồi (DRSC FlyPrimer Bank) *dRP49* F-R (5'—AGATCGTGAAGAAGCGCACC; 5'—CGATCCGTAACCGATGTTGG); *sod1* F-R (5'—GGACCGCACTTCAATCCGTA; 5'—TGGAGTCGGTGATGTTGACC); *sod2* F-R (5'—AAGTCGGGCAAACCTGCAACT; 5'—GGACGCACGTTCTTGTACTG); *gstd1* F-R (5'—CAACCGTGTCCACATTCGAG; 5'—GAGTCACCTTCTTGGCGTTC); *gstd2* F-R (5'—TATCCCCTTTCCGCACTGG; 5'—GTCGAGAAATCCAAACGCGG); *gs* F-R (5'—ATCGAAGACGGCCTTCAGTC; 5'—ACTTTGATCGTCTCCGCCAG), trong đó *dRP49* là gene tham chiếu. Các gene mục tiêu được định lượng dựa trên gene tham chiếu bằng phương pháp $2^{-\Delta Ct}$ ²⁴.

Phân tích kiểu hình mắt ruồi trưởng thành

Ruồi trưởng thành 01—03 ngày tuổi được gây mê và cố định trên lame. Hình ảnh mắt ruồi được quan sát trên kính hiển vi soi nổi ZMZ660 (Nikon) và được ghi nhận bằng máy ảnh kỹ thuật số. Đồng thời, kiểu hình mắt ruồi trưởng thành được ghi nhận chi tiết bằng kính hiển vi điện tử quét VE-7800 (Keyence Inc) trong môi trường chân không. Hình ảnh kết quả được xử lý bằng phần mềm ImageJ (NIH image).

Phân tích thống kê

Phân tích thống kê sử dụng kiểm định Student ($p < 0,05$) không bắt cặp cho các so sánh giữa 02 nhóm. Các so sánh giữa nhiều nhóm (> 2) được phân tích bằng ANOVA một chiều. Các phân tích và biểu đồ được thực hiện bằng phần mềm Graphpad Prism 9.5 (GraphPad).

KẾT QUẢ

Giảm biểu hiện dUCH gây kiểu hình mắt nhám ở ruồi giấm *Drosophila*

Để xác nhận mối tương quan giữa dUCH và quá trình phát triển mắt ruồi, đã phân tích kiểu hình mắt ruồi trong trạng thái protein dUCH bị giảm biểu hiện

bằng kỹ thuật RNAi. Dòng ruồi cái mang tổ hợp GMR-GAL4 trên nhiễm sắc thể X được lai với dòng ruồi đực mang cấu trúc UAS-*duch-IR* nhằm tạo ra dòng con F1 mang cấu trúc GMR-GAL4/+;+;*duch-IR*/+ giảm biểu hiện dUCH đặc hiệu ở mắt ruồi. Sự giảm biểu hiện của dUCH trong đĩa tiền phân sinh mắt ruồi được kiểm chứng bằng kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng protein dUCH (anti-dUCH) (Hình 1). Kiểu hình mắt ruồi sau đó được quan sát bằng kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét-SEM, độ nhám của mắt ruồi được phân tích bằng công cụ Flynotyper của phần mềm ImageJ.

Kết quả dưới kính hiển vi quang học cho thấy dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH đặc hiệu ở mắt có kiểu hình bất thường với các đặc điểm như mắt sắc tố đỏ, biến động trong cấu trúc mắt con, bề mặt mắt nhám so với dòng đối chứng (Hình 2 A, B). Kết quả hình ảnh SEM cho thấy rõ hơn sự mất cấu trúc cụm mắt con ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH, tại vùng trung tâm mắt không còn quan sát thấy cấu trúc cụm mắt con như ở dòng đối chứng (Hình 2 A', A'', B, B'). Công cụ Flynotyper trên ImageJ được sử dụng để tính điểm mắt nhám-P score²⁵, với điểm càng cao tương ứng với cấu trúc mắt bất thường càng nhiều. Kết quả cho thấy có sự khác biệt thống kê giữa hai dòng ruồi đối chứng và giảm biểu hiện dUCH (Hình 2 C). Kết quả cho thấy protein dUCH rất cần thiết cho quá trình phát triển bình thường ở mắt ruồi giấm *Drosophila*.

Giảm biểu hiện dUCH gây ra stress oxy hóa ở đĩa tiền phân sinh mắt ấu trùng bậc ba

Nghiên cứu trước đây của Huynh và cộng sự cho thấy việc giảm biểu hiện dUCH ở các tế bào thần kinh vận động làm tăng ROS dẫn tới chết tế bào do apoptosis, thoái hóa cơ, giảm khả năng vận động ở ruồi giấm²⁰. Từ các bằng chứng này, giả thuyết được đưa ra rằng việc giảm biểu hiện dUCH ở mắt ruồi cũng dẫn tới sự stress oxy hóa ở tế bào mắt. Để kiểm chứng giả thuyết trên, đĩa tiền phân sinh mắt ruồi ở giai đoạn biệt hóa ấu trùng bậc ba được nhuộm với H2DCF là một chất chỉ thị của ROS. Kết quả thí nghiệm cho thấy ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH có sự gia tăng ROS rõ rệt (Hình 3 A, B), và sự gia tăng này có ý nghĩa thống kê (Hình 3 C).

Giảm biểu hiện dUCH tác động đến biểu hiện các gene kháng oxy hóa trong tế bào

Tiếp theo, nghiên cứu tiến hành phân tích sự biểu hiện của các gene liên quan đến quá trình điều hòa ROS trong tế bào ở ruồi giấm bằng kỹ thuật real-time, PCR. Các gene được khảo sát bao gồm: *sod1*

(Superoxide dismutase 1) hoạt động ở peroxisome; *sod2* (Superoxide dismutase 2) hoạt động ở ty thể là các gene mã hóa cho enzyme phân giải các gốc ROS dạng O_2^- ; *gs* (Glutathione synthetase), *gstd1* (Glutathione S transferase D1), *gstd2* (Glutathione S transferase D2) mã hóa cho các enzyme phân giải các gốc ROS dạng $H_2O_2^-$ hoạt động ở tế bào chất.

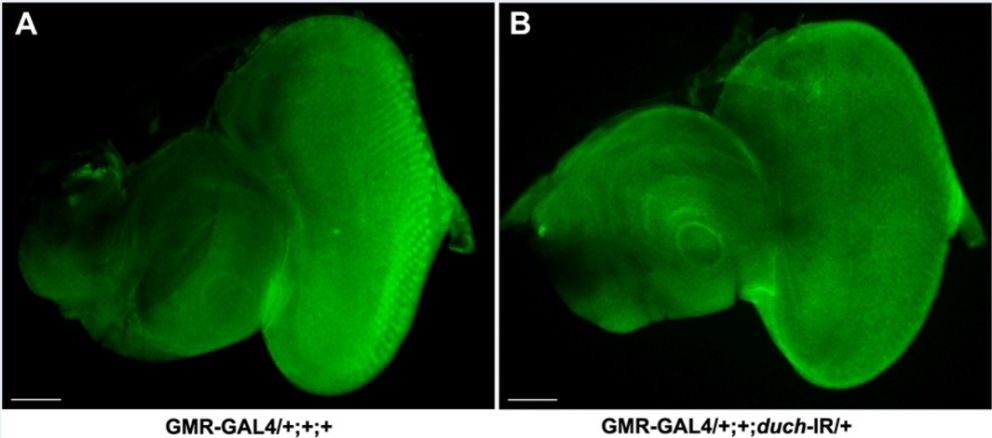
Kết quả ở Hình 4 cho thấy có sự giảm biểu hiện của các gene *sod2*, *gstd1*, *gstd2*, và *gs* ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH, với tỷ lệ biểu hiện của các gene so với dòng đối chứng lần lượt là 0,72; 0,49; 0,64 và 0,73. Trong khi đó, gene *sod1* không cho thấy có sự thay đổi giữa dòng giảm biểu hiện dUCH và dòng đối chứng. *sod1* là gene hoạt động ở tế bào chất trong khi *sod2* hoạt động ở ty thể. Sự khác nhau về ảnh hưởng của việc giảm biểu hiện dUCH đối với hai gene này gợi ý về sự hoạt động của protein dUCH ở ty thể, như được quan sát thấy ở một số nghiên cứu khác^{4,5}.

Các kết quả này cho thấy sự giảm biểu hiện protein dUCH đã làm tăng hàm lượng ROS, đồng thời làm giảm biểu hiện các gene tham gia vào quá trình phân giải các gốc O_2^- và $H_2O_2^-$ ở giai đoạn phát triển tế bào mắt ruồi.

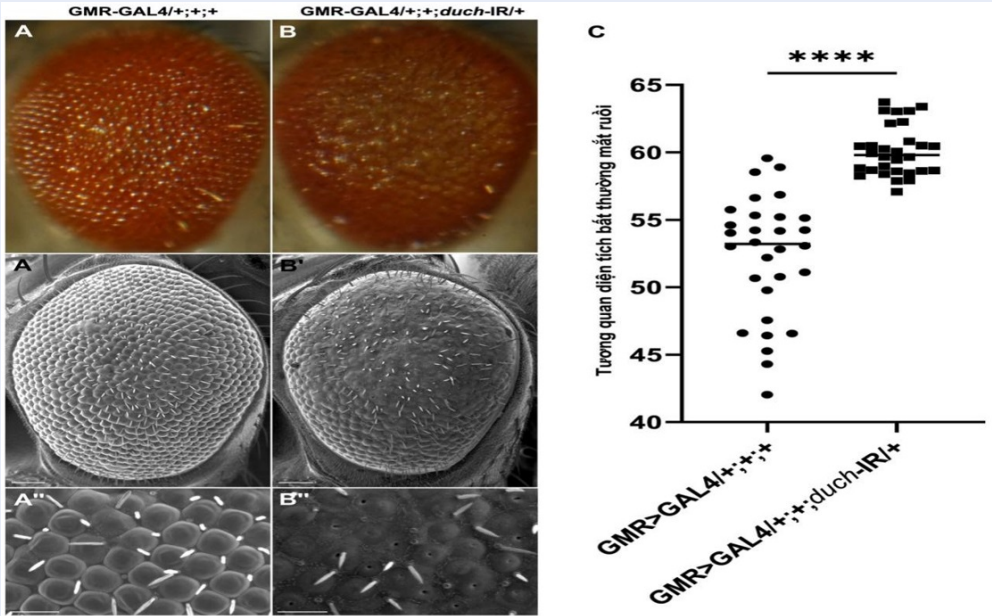
Hiện tượng gia tăng của ROS do giảm biểu hiện dUCH có thể được cân bằng bởi vitamin C

Hiện tượng gia tăng ROS trong tế bào thần kinh do sự giảm biểu hiện dUCH có thể được cân bằng khi cho ruồi ăn vitamin C đã được báo cáo^{19,20}. Do đó, việc đánh giá xem việc cho ăn vitamin C có thể làm giảm lượng ROS ở tế bào mắt ruồi giấm cũng như hồi phục cấu trúc mắt ở ruồi trưởng thành hay không. Ấu trùng ruồi giấm giảm biểu hiện dUCH đặc hiệu ở mắt được nuôi trong môi trường bổ sung vitamin C với nồng độ 2,5 mM từ giai đoạn ấu trùng mới nở cho đến giai đoạn ruồi trưởng thành. Sau đó đĩa tiền phân sinh mắt được tách và nhuộm với H2DCF như thí nghiệm ở trên. Các gene mã hóa enzyme phân giải ROS cũng được đánh giá bằng realtime-PCR. Cấu trúc mắt ruồi trưởng thành được quan sát dưới kính hiển vi quang học và SEM.

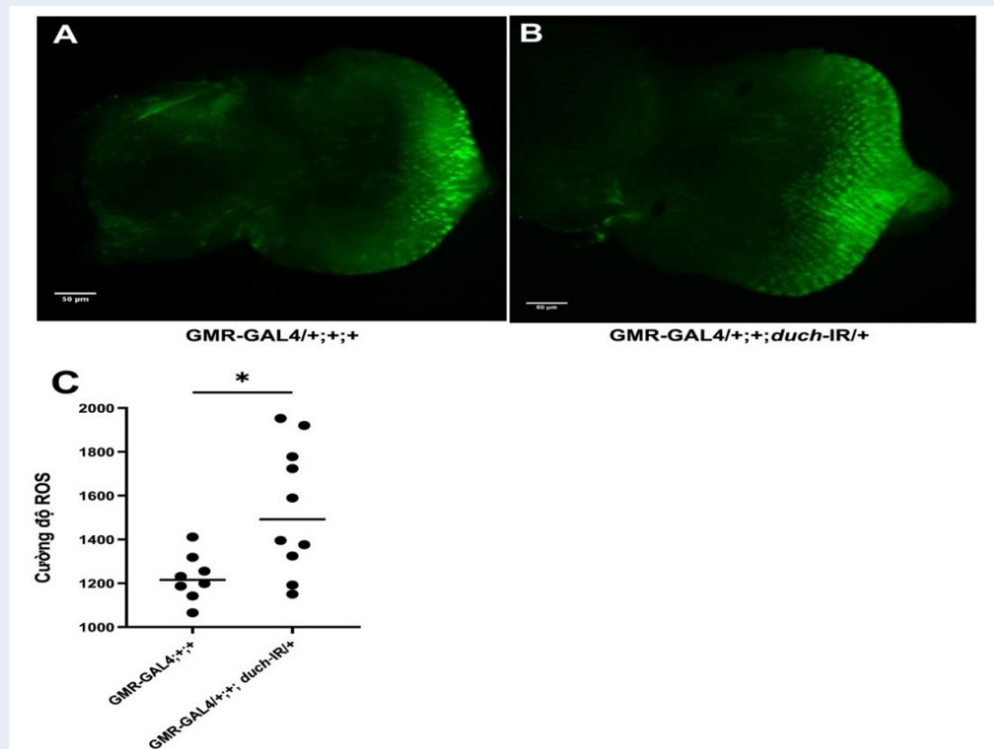
Kết quả cho thấy việc bổ sung vitamin C nồng độ 2,5 mM đã làm giảm hàm lượng ROS về mức bình thường ở dòng ruồi giảm biểu hiện protein dUCH (Hình 5 A-D). Khảo sát biểu hiện của các gene kháng oxy hóa cũng cho thấy có sự tăng biểu hiện trở lại ở các gene *sod1*, *sod2*, *gstd1* và *gstd2* với mức độ biểu hiện so với dòng đối chứng lần lượt là 1,67; 0,85; 0,89; 0,95 (Hình 6). Tuy nhiên, không có sự thay đổi trên kiểu hình mắt ruồi trưởng thành giữa dòng giảm biểu hiện dUCH có và không có bổ sung vitamin C vào môi trường (Hình 7 A–A'', B–B'', C–C'').



Hình 1: So sánh biểu hiện dUCH giữa dòng ruồi đối chứng và giảm biểu hiện dUCH. A: Dòng đối chứng; B: dòng giảm biểu hiện dUCH. Kết quả cho thấy tín hiệu dUCH giảm ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH so với dòng đối chứng. Thước đo =50 μm



Hình 2: Giảm biểu hiện dUCH gây ra kiểu hình mắt nhắm ở ruồi giấm *Drosophila*. A, B: Hình ảnh quang học của dòng ruồi đối chứng GMR-GAL4/+;+/+ và dòng giảm biểu hiện GMR-GAL4/+;+/+; duch-IR/+, tương ứng; A', B', A'', B'': Hình ảnh SEM của kiểu hình mắt ruồi đối chứng và giảm biểu hiện dUCH, tương ứng; C: Điểm số kiểu hình mắt (P-score) được tính bằng Flynotyper của hai dòng ruồi. Kiểm định thống kê Student được sử dụng, với $n_1 = 30$, $n_2 = 30$, $p < 0,0001$. Thước đo = 50 μm .



Hình 3: Giảm biểu hiện dUCH làm tăng hàm lượng ROS ở tế bào mắt ruồi. A, B: tín hiệu ROS ở đĩa mắt ruồi ấu trùng bậc ba của hai dòng ruồi đối chứng và ruồi giảm biểu hiện dUCH; C: So sánh tín hiệu ROS giữa dòng ruồi đối chứng và giảm biểu hiện dUCH. Kiểm định Student, $n_1 = 8$, $n_2 = 10$, $p = 0,01$. Thước đo = 50 μm .

Các kết quả này cho thấy sự gia tăng ROS cũng như sự giảm biểu hiện các gene có chức năng phân giải các gốc oxy hóa này ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH có thể được điều chỉnh bằng chất kháng oxy hóa vitamin C. Tuy nhiên, việc bổ sung vitamin C không giúp cải thiện kiểu hình mắt nhám ở ruồi giảm biểu hiện *duch* (Hình 7).

THẢO LUẬN

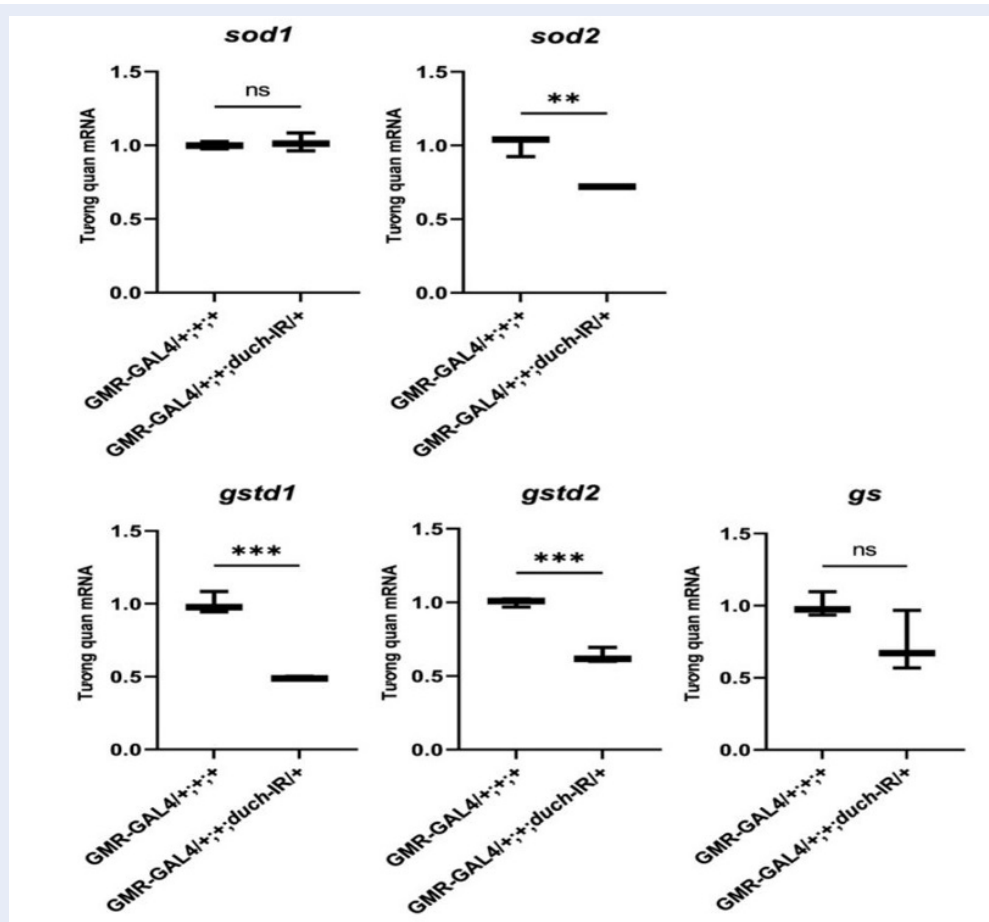
Protein UCH-L1 là một thành phần của hệ thống ubiquitin–proteasome tham gia điều hòa nhiều quá trình trong tế bào, tuy nhiên chức năng cụ thể của UCH-L1 vẫn chưa được xác định. Nhiều nghiên cứu cho thấy UCH-L1 có liên quan đến quá trình điều hòa stress oxy hóa trong tế bào. Việc khảo sát nhằm khám phá mối liên quan của protein dUCH, protein tương đồng với UCH-L1 ở ruồi giấm *Drosophila*, với quá trình stress oxy hóa trong quá trình phát triển mắt ruồi giấm.

Kết quả cho thấy việc giảm biểu hiện dUCH gây bất thường trong quá trình phát triển mắt ruồi, thể hiện ở kiểu hình mắt nhám. Đồng thời, việc giảm biểu hiện dUCH cũng gây ra sự rối loạn trong hệ thống điều hòa stress oxy hóa trong đĩa tiền phân sinh mắt. Đĩa tiền

phân sinh mắt ruồi giảm biểu hiện dUCH có sự gia tăng ROS. Đồng thời, có sự giảm biểu hiện gene của các enzyme thuộc hệ thống phân hủy ROS, bao gồm các gene *sod2*, *gstd1*, *gstd2*. Bổ sung chất kháng oxy hóa vitamin C vào môi trường nuôi ruồi cho thấy có thể làm giảm lượng ROS gây ra bởi việc giảm biểu hiện dUCH về mức bình thường, cũng như quan sát thấy sự tăng biểu hiện trở lại của các gene *sod2*, *gstd1*, *gstd2*. Tuy nhiên, kiểu hình mắt nhám không được cải thiện ở dòng ruồi giảm biểu hiện dUCH được cho ăn vitamin C.

KẾT LUẬN

Bài báo trình bày việc giảm biểu hiện dUCH, làm tăng ROS, đồng thời làm giảm biểu hiện các enzyme thuộc hệ thống phân hủy ROS ở tế bào mắt ruồi giấm. Các tác động này có thể được hồi phục một phần bởi vitamin C, một hợp chất kháng oxy hóa. Kết quả cho thấy, dUCH, ngoài tham gia vào con đường điều hòa stress oxy hóa, còn liên quan đến quá trình biệt hóa của mắt ruồi giấm *Drosophila melanogaster*.



Hình 4: So sánh mức độ biểu hiện các gene kháng oxy hóa giữa hai dòng ruồi đối chứng và giảm biểu hiện dUCH. Kiểm định Student, *sod1* ($p=0,63$), *sod2* ($p=0,002$), *gstd1* ($p=0,0003$), *gstd2* ($p=0,0004$), *gs* ($p=0,11$).

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài: 562-2024-18-09/HĐ-KHCN

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

DGRC: Drosophila Genetic Resource Center-Kyoto
 dUCH: Drosophila Ubiquitin C-terminal Hydrolase
 H2DCF: dichlorodihydrofluorescein
 NGS: huyết thanh dê
 ROS: gốc oxy hóa tự do
 SEM: Kính hiển vi điện tử quét
 UCH-L1: Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1
 UPS: hệ thống phân giải ubiquitin-proteasome
 VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

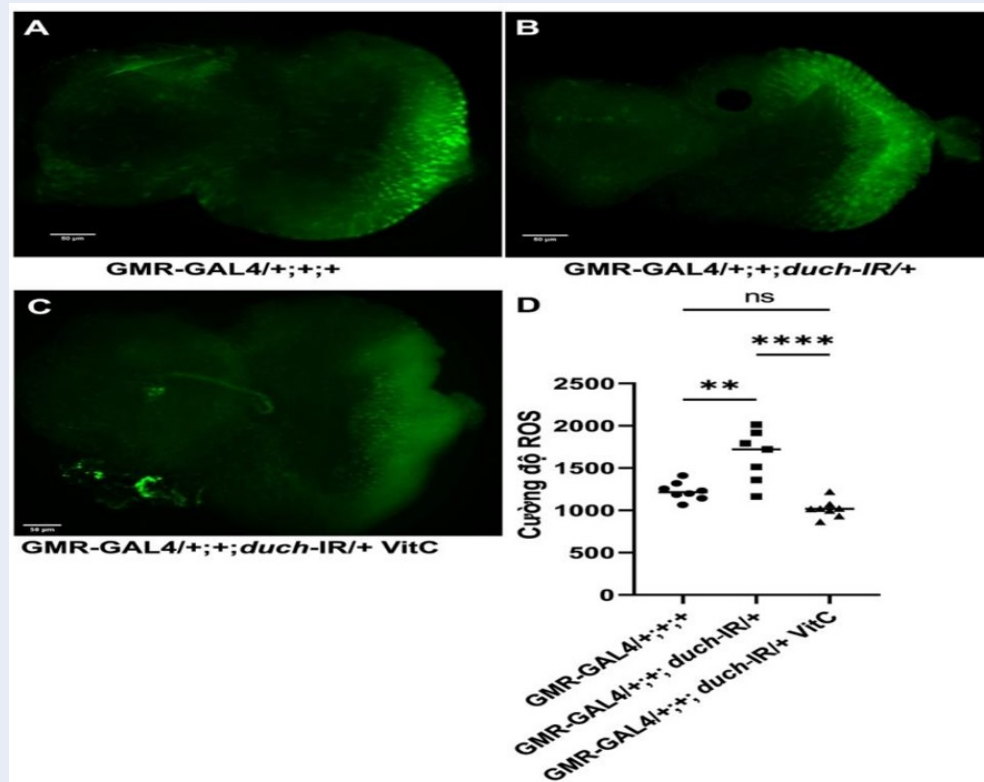
Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Đặng Thị Phương Thảo: Nêu ý tưởng nghiên cứu, hướng dẫn biên luận kết quả
 Nguyễn Anh Tuấn, Nguyễn Công Minh Huy: Thực nghiệm, biên luận kết quả
 Nguyễn Anh Tuấn, Đặng Thị Phương Thảo: Chuẩn bị bản thảo, chỉnh sửa/phản hồi phản biện, hoàn thiện bản thảo

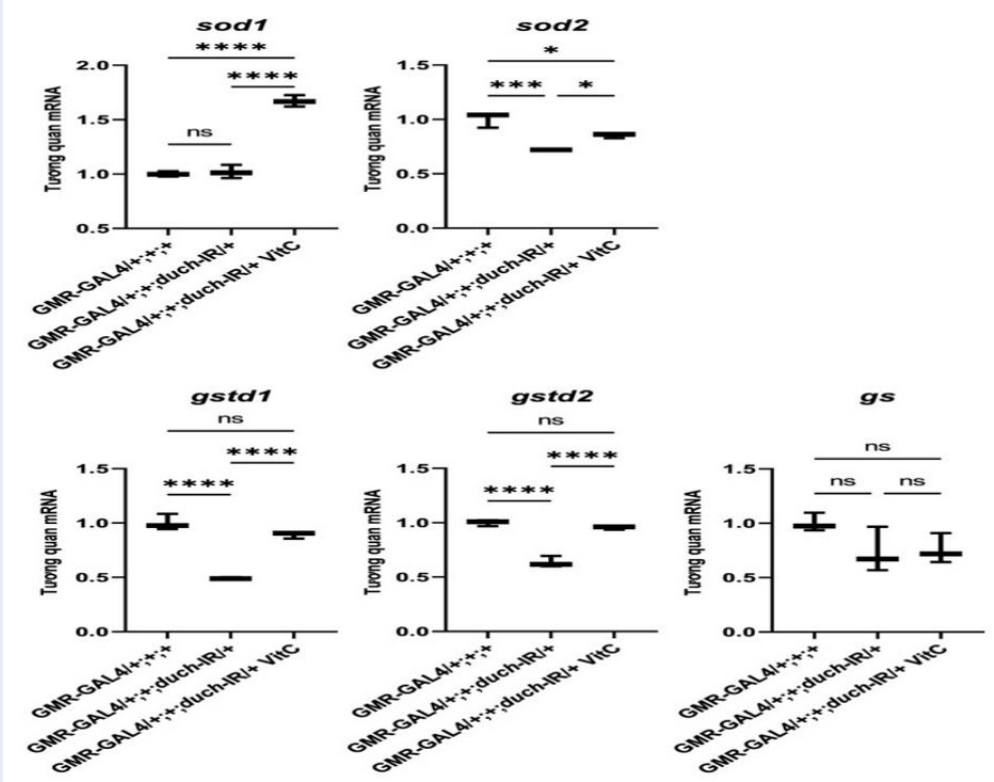
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Leroy E, Boyer R, Auburger G., The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature. 1998;395(6701):451–2;Available from: <https://doi.org/10.1038/26652>.
2. Maraganore D, Farrer M, Hardy J, Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. Neurology. 1999;53(8):1858;Available from: <https://doi.org/10.1212/WNL.53.8.1858>.
3. Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003;304(1):176–83;Available from: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00555-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00555-2).

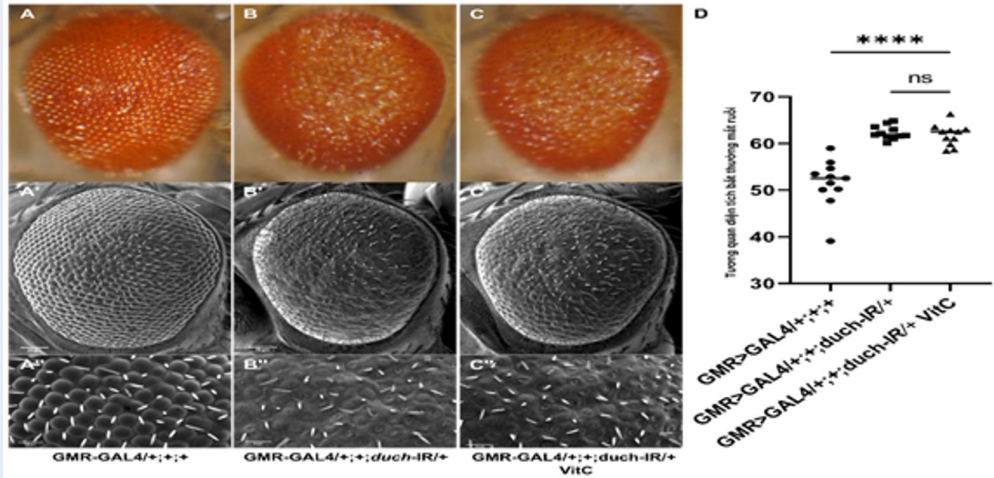


Hình 5: Vitamin C giúp cân bằng hàm lượng ROS ở dòng ruồi giảm biểu hiện duch. A, B, C: Tín hiệu ROS ở đĩa tiền phân sinh mắt của các dòng ruồi; D: So sánh tín hiệu ROS giữa các dòng ruồi. Kiểm định ANOVA một chiều, $p < 0,0001$. Thước đo = 50 μm .

4. Setsuie R, Wang Y-L, Mochizuki H, Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant. *Neurochemistry International*. 2007;50(1):119–29; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.07.015>.
5. Bilguvar K, Tyagi NK, Ozkara C, Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(9):3489–94; Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1222732110>.
6. Ummanni R, Jost E, Braig M, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Molecular Cancer*. 2011;10(1):1–13; Available from: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-129>.
7. Zhong J, Zhao M, Ma Y., UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the β -catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;30(2):430–6; Available from: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1012>.
8. Ding X, Gu Y, Jin M, et al. The deubiquitinating enzyme UCHL1 promotes resistance to pemetrexed in non-small cell lung cancer by upregulating thymidylate synthase. *Theranostics*. 2020;10(13):6048; Available from: <https://doi.org/10.7150/thno.42096>.
9. Liu S, González-Prieto R, Zhang M., Deubiquitinase activity profiling identifies UCHL1 as a candidate oncoprotein that promotes TGF β -induced breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(6):1460–73; Available from: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1373>.
10. Tran HH, Dang SN, Nguyen TT, Drosophila ubiquitin C-terminal hydrolase knockdown model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–14; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22804-w>.
11. Thao DTP. Targeting UCH in *Drosophila melanogaster* as a model for Parkinson's disease. *Frontiers in Bioscience*. 2020;25:159–67; Available from: <https://doi.org/10.2741/4800>.
12. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Medicine*. 2014;16:217–30; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8294-x>.
13. Trist BG, Hare DJ, Double KL. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell*. 2019;18(6):e13031; Available from: <https://doi.org/10.1111/acer.13031>.
14. Nandi A, Yan L-J, Jana CK, Role of catalase in oxidative stress -and age-associated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019(1):9613090; Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>.
15. Chaudhary A, Khare N, Dixit Y, Review on Parkinson's disease, a Neurodegenerative disorder and the role of ceruloplasmin protein in it. *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*. 2021;8(4):68–70.
16. Goodman LD, Bellen HJ. Recent insights into the role of glia and oxidative stress in Alzheimer's disease gained from *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*. 2022;72:32–8; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.07.012>.
17. Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-



Hình 6: So sánh mức độ biểu hiện các gene kháng oxi hóa giữa các dòng ruồi đối chứng, giảm biểu hiện *duch* và giảm biểu hiện *duch* + vitamin C. Kiểm định ANOVA, *sod1* ($p<0,0001$), *sod2* ($p=0,0005$), *gstd1* ($p<0,0001$), *gstd2* ($p<0,0001$), *gs* ($p=0,13$).



Hình 7: Vitamin C không giúp cải thiện kiểu hình mắt nhảm do giảm biểu hiện *duch* trên mắt ruồi giấm *Drosophila*. A, B, C: Hình ảnh quang học của dòng ruồi đối chứng, giảm biểu hiện *duch* và giảm biểu hiện *duch* + vitamin C, tương ứng; A', B', C': Hình ảnh SEM của kiểu hình mắt ruồi đối chứng, giảm biểu hiện *duch* và giảm biểu hiện *duch* + vitamin C, tương ứng. Thước đo = 50 μ m. (D) Điểm số kiểu hình mắt (P-score) được tính bằng Flyntyper của ba dòng ruồi. Kiểm định thống kê ANOVA được sử dụng, với n_1 ($GMR>GAL4/+;+;+$) = 11, n_2 ($GMR>GAL4/+;+; duch-IR/+$) = 11, n_3 ($GMR>GAL4/+;+; duch-IR/+ VitC$) = 11, $p_{n1,n3}<0,0001$, $p_{n2,n3}<0,92$.

- terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):13256–64;Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M314124200>.
18. Choi J-E, Lee J-J, Kang W, Proteomic analysis of hippocampus in a mouse model of depression reveals neuroprotective function of ubiquitin c-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) via stress-induced cysteine oxidative modifications. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(9):1803–23;Available from: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000835>.
 19. Man Anh H, Linh DM, My Dung V, Evaluating dose- and time-dependent effects of vitamin C treatment on a Parkinson's disease fly model. *Parkinson's Disease*. 2019;2019(1):9720546;Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/9720546>.
 20. Huynh TKT, Mai TTT, Huynh MA, Crucial roles of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 in motor neuronal health by *Drosophila* model. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2022;37(4-6):257–73;Available from: <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0057>.
 21. Cagan R. Principles of *Drosophila* eye differentiation. *Current Topics in Developmental Biology*. 2009;89:115–35;Available from: [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)89005-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)89005-4).
 22. Singh A, Kango-Singh M. Molecular genetics of axial patterning, growth and disease in the *Drosophila* eye: Springer; 2013;.
 23. Hirose F, Ohshima N, Shiraki M., Ectopic expression of DREF induces DNA synthesis, apoptosis, and unusual morphogenesis in the *Drosophila* eye imaginal disc: possible interaction with Polycomb and trithorax group proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(21):7231–42;Available from: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7231-7242.2001>.
 24. 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):402–8;Available from: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
 25. Iyer J, Wang Q, Le T, Quantitative assessment of eye phenotypes for functional genetic studies using *Drosophila melanogaster*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2016;6(5):1427–37;Available from: <https://doi.org/10.1534/g3.116.027060>.

Knockdown duch (*Drosophila* ubiquitin carboxy–terminal hydrolase) play a role on the regulation of the oxidative stress in fruit fly eye

Nguyen Anh Tuan^{1,2}, Nguyen Cong Minh Huy^{1,2}, Dang Thi Phuong Thao^{1,2,3}

ABSTRACT

UCH–L1 is a ubiquitous protein in human neurons. The abnormal expression of UCH–L1 has been reported in several neurodegenerative diseases and cancers, suggesting a cellular function of UCH–L1. However, the role of UCH–L1 in tissue development remains poorly understood. Using *Drosophila melanogaster*, this paper presented the demonstration of the loss function of dUCH, a protein that is homologous to UCH–L1. This protein could exert an abnormal eye phenotype, increase reactive oxygen species in the eye imaginal disc and decrease the expression of the sod2, gstd1 and gstd2 antioxidant genes. Except for the induced abnormal eye phenotype, the effects of the decreased dUCH expression were ameliorated by feeding flies with 2.5 mM vitamin C. The results suggested that dUCH could affect the fly eye development by regulating the oxidative stress.

Key words: *Drosophila* eye, dUCH, the oxidative stress, UCH–L1

¹Faculty of Biology and Biotechnology,
University of Science, Ho Chi Minh City

²Vietnam National University Ho Chi
Minh City

³Laboratory of Molecular Biotechnology,
University of Science, Ho Chi Minh City

History

- Received: 01-10-2024
- Revised: 17-11-2024
- Accepted: 14-12-2024
- Published Online: 31-12-2024

DOI : <https://doi.org/10.32508/stdjns.v8i4.1414>



Copyright

© VNUHCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Tuan N A, Huy N C M, Thao D T P. Knockdown duch (*Drosophila* ubiquitin carboxy–terminal hydrolase) play a role on the regulation of the oxidative stress in fruit fly eye. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.* 2024, 8(4):3238-3247.