

TẠO ĐỒNG RUỒI GIÁM CHUYỂN GEN MANG PHỨC HỢP UAS-DUCH ĐỂ NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA PROTEIN UCH-L1 ĐỐI VỚI BỆNH PARKINSON

Phao Nguyễn Thụy An¹, Đặng Thị Phương Thảo¹, Masamistu Yamaguchi², Trần Linh Thuộc¹

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Công nghệ Kyoto, Nhật Bản

TÓM TẮT

Bệnh Parkinson là bệnh thoái hóa hệ thần kinh vận động phổ biến ở người cao tuổi, nguyên nhân là do não bộ người bệnh không sản xuất được chất dẫn truyền thần kinh dopamine, dẫn đến mất khả năng kiểm soát hoạt động vận động cơ. Những nghiên cứu gần đây cung cấp nhiều bằng chứng sinh học phân tử liên quan đến cơ chế phát sinh bệnh Parkinson như sự tích tụ α -synuclein, sự thủy phân chuỗi ubiquitin trong hệ thống ubiquitin-proteasome bị sai hỏng, sự mất chức năng của ty thể và hiện tượng stress oxy hóa. Trong đó, UCH-L1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1) là một protein phổ biến ở não, có vai trò quan trọng trong hệ thống ubiquitin-proteasome nhằm phân hủy các protein gấp cuộn sai trong tế bào. Trong những năm gần đây, mặc dù nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để tìm ra mối quan hệ giữa UCH-L1 và bệnh Parkinson cũng như các bệnh thoái hóa thần kinh khác, tuy nhiên vẫn đề này vẫn còn nhiều tranh cãi. Để hiểu rõ hơn về vai trò của protein UCH-L1, chúng tôi tiến hành biểu hiện protein Duch, một protein tương đồng với UCH-L1 ở ruồi giấm, trong ruồi giám chuyển gen và nghiên cứu vai trò của nó. Bằng cách tạo vector pUAS-DUCH, vi tiêm vào ruồi giám nhằm tạo ra các dòng ruồi giám chuyển gen mang phức hợp UAS-DUCH và biểu hiện định hướng DUCH tại các mô đích thông qua phức hợp GAL4-UAS. Khi lai các dòng UAS-DUCH với dòng GMR-GAL4, DUCH được biểu hiện định hướng ở mô mắt, phân tích cho thấy protein DUCH biểu hiện mạnh ở vùng phân bào thứ cấp có vai trò quan trọng trong quá trình hình thành mắt và ở vùng dưới của đĩa tiền phân sinh mắt chứng tỏ có mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện DUCH và kiểu hình mắt ruồi. Như vậy, ruồi giám chuyển gen DUCH là một mô hình tốt để có thể nghiên cứu vai trò của protein này đối với bệnh Parkinson về sau.

Từ khóa: gen DUCH, ruồi giám GMR-GAL4, chuyển gen, biểu hiện định hướng mô mắt

GIỚI THIỆU

Bệnh Parkinson là một trong những bệnh về rối loạn thần kinh phổ biến nhất, đứng sau bệnh Alzheimer. Trong suốt thế kỷ 20, yếu tố di truyền không được xem là nguyên nhân gây nên bệnh Parkinson (Corti *et al.*, 2005). Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây đã bác bỏ quan điểm này và quan trọng hơn nữa là các nghiên cứu này đã cung cấp các bằng chứng để hiểu được cơ chế phân tử liên quan đến cơ chế phát sinh bệnh Parkinson (Gasser, 2007). Nghiên cứu chức năng và hoạt động của những gen này giúp hiểu được mối liên quan của một số cơ chế với nhau và sự liên hệ với cơ chế phát sinh bệnh Parkinson trong tế bào, như sự tích tụ α -synuclein, sự thủy phân chuỗi ubiquitin trong hệ thống ubiquitin-proteasome hư hỏng, sự sai chức năng của ty thể và hiện tượng stress oxy hóa (Dawson, Dawson, 2003).

Trong đó, UCH-L1 là một protein hiện diện rất nhiều trong não (khoảng 1% - 2%) (Wilkinson *et al.*, 1989), thuộc họ enzyme có vai trò trong việc hình thành liên kết ở đầu C của protein trong quy trình

gắn ubiquitin của những protein gấp cuộn sai, protein già cỗi không mong muốn cần phân hủy bởi proteasome (Amerik, Hochstrasser, 2004). UCH-L1 tách chuỗi ubiquitin ra khỏi protein trước khi protein vào hệ thống phân cắt proteasome, bên cạnh đó UCH-L1 còn phân tách chuỗi ubiquitin thành các monomer ubiquitin, tái sử dụng ubiquitin cho hệ thống ubiquitin-proteasome (Larsen *et al.*, 1998). Mặc dù cơ chế gây bệnh Parkinson vẫn chưa được biết rõ, nhưng hầu hết các nghiên cứu đều quy về một mối rằng sự sai hỏng hệ thống ubiquitin-proteasome và sự tích tụ những protein bị biến đổi có liên quan đến bệnh Parkinson (Hegde, Upadhyay, 2007). Protein UCH-L1 có vai trò trung tâm trong hoạt động phân hủy protein của hệ thống ubiquitin-proteasome nên các nhà nghiên cứu cho rằng UCH-L1 có liên quan đến bệnh Parkinson (Leroy *et al.*, 1998; Maraganore *et al.*, 1999; Nishikawa *et al.*, 2003), tuy nhiên vẫn đề này vẫn còn nhiều tranh cãi.

Trong nhiều thập kỷ gần đây, bệnh di truyền ở người luôn là đề tài thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học. Cùng với sự phát triển của kỹ thuật sinh

học phân tử, các công trình nghiên cứu cơ chế sinh học phân tử của bệnh được tiến hành ở các mức độ từ *in vitro*, tế bào động vật cho đến *in vivo*, động vật chuyển gen. Trong số các mô hình động vật chuyển gen, với những ưu điểm vượt trội, ruồi giấm *Drosophila melanogaster* là mô hình được chọn sử dụng phổ biến trong nghiên cứu y - sinh học hiện nay. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng mô hình nghiên cứu bệnh trên động vật chuyển gen, mô hình ruồi giấm *D. melanogaster* nhằm ứng dụng trong nghiên cứu vai trò của protein UCH-L1 đối với bệnh Parkinson. Các kết quả đạt được bao gồm tạo dòng gen dUCH vào vector pUAST và chuyển vào cơ thể ruồi giấm nhằm tạo ruồi giấm chuyển gen mang phức hợp UAS-dUCH phục vụ cho nghiên cứu vai trò của protein UCH-L1 đối với bệnh Parkinson và xem sự biểu hiện vượt mức của protein dUCH trong ruồi giấm chuyển gen.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và vector

Chủng *E. coli* DH5α (F-endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ-recA1 gyrA96 Δ lacU169 (φ80 lacZ ΔM15)) được sử dụng làm thể nhận, nhân và chọn dòng.

Vector pUAST (Chromosomal Technology Laboratory, Kyoto Institute Technology, Japan) được sử dụng chuyển gen dUCH vào ruồi giấm. Vector pUAST bao gồm đoạn UAS là trình tự gắn protein GAL4, đoạn polylinker giúp việc tạo dòng được dễ dàng và một trình tự ngừng phiên mã, tất cả được đặt trong một vector có thể chuyển vị nhờ nhân tố P, có gen Amp^r có khả năng kháng Ampicillin giúp sàng lọc trong quá trình tạo dòng.

Chủng ruồi giấm *Drosophila melanogaster*

CantonS và W1118 được sử dụng như dòng ruồi hoang dại (Bloomington, Mỹ). GMR-Gal4(X) được dùng để biểu hiện vượt mức gen dUCH ở mô mắt.

Thu nhận bộ gen ruồi giấm

Ruồi trưởng thành (10 - 15 con) được thu và giữ ở -20°C qua đêm. Sau đó, hòa trong 0,1 ml đệm ly giải và nghiền bằng chày, bổ sung 0,4 ml đệm ly giải. Hỗn hợp được bổ sung protease K 0,5 mg/ml và ủ 1 giờ ở 37°C. Sau khi ly tâm 10 phút với 10000 vòng/phút, ở 4°C, dịch nổi được bổ sung 250.250 μl

phenol: chloroform, đảo kỹ và lắc rung. Sau khi ly tâm như trên, dịch nổi được bổ sung 500 μl chloroform và đảo kỹ. Sau ly tâm như trên và dịch nổi được bổ sung 1/10 thể tích 3 M Na acetate pH 5,2 và 500 ml 99% ethanol và ủ 30 phút ở -20°C, sau đó ly tâm 30 phút với 13000 vòng/phút ở 4°C. Tủa được rửa lại bằng 500μl 70% ethanol, ly tâm 30 phút với 13000 vòng/phút ở 4°C. Tủa được để khô tự nhiên và giữ trong 50 μl MilliQ.

Thu nhận plasmid pUAST-dUCH

Plasmid pUAST-dUCH được tách chiết từ *E. coli* DH5α theo phương pháp kiểm SDS (Birnbom, Doly, 1979).

Khuếch đại gen dUCH bằng phương pháp PCR

PCR khuếch đại gen bao gồm 5 μl đệm 10x PCR, 5 μl 8 mM dNTP, 5 μl 25mM MgCl₂, 1 μl DNA bộ gen (Y ng), 1 μl 1 unit *Taq* polymerase và 1 μl mỗi mẫu (10 pmol), được bổ sung 31 μl nước cất lên thể tích cuối cùng là 50 μl. Phản ứng PCR được thực hiện theo chế độ nhiệt: 95°C/5', 30 chu kỳ (95°C/1', 55°C/1', 72°C/1'), 72°C/10'.

Thiết kế plasmid và biến nạp

Sản phẩm PCR gen dUCH được cắt với enzyme hạn chế *Eco*RI và *Xho*I, chèn vào vector pUAST tạo thành plasmid tái tổ hợp pUAST-dUCH và được biến nạp vào *E. coli* theo phương pháp shock nhiệt và CaCl₂ (Sambrook, Russell, 2001). Khung đọc của gen dUCH được kiểm tra bằng PCR, cắt hạn chế và đọc trình tự. Tất cả các thao tác gen đều thực hiện theo phương pháp cơ bản trong Sambrook và Russell (2001).

Vì tiêm

Ruồi dùng để chuyển gen phải có hai đặc điểm không mang gen mã hóa transposase và không mang chỉ thị chọn lọc (thường là ruồi đột biến mắt trắng). Ruồi được nuôi trong môi trường để trứng 2 - 3 ngày trước khi vì tiêm. Vào ngày vì tiêm, cứ cách 60 - 70 phút thay môi trường SY (5% đường, 5% nấm men, 1% agar) một lần. Trước khi tiêm phải đẻ ruồi để trứng trong 20 - 40 phút trong môi trường thạch SY. Lớp màng đáy bao quanh trứng được loại bỏ giúp cho quá trình vì tiêm dễ dàng. Helper P - element và plasmid mang nhân tố P được tiêm vào trứng cùng một lúc ở phần đuôi của trứng nơi hình thành mầm tế bào.

Trứng ruồi sau khi vi tiêm được cho trở lại môi trường SY để trứng phát triển. Mỗi kén ruồi được nuôi trong một ống môi trường, để chúng nở thành ruồi trưởng thành hoặc chờ cho đến khi kén nở thành ruồi trưởng thành thì bắt trình tự. Toàn bộ thế hệ F_0 có màu mắt trắng. Mỗi con cái F_0 được giao phối với ba con đực W1118 và mỗi con đực F_0 được giao phối với ba con cái W1118. Thế hệ F_1 có kiểu hình sau: 1. Tất cả thế hệ con F_1 có màu mắt trắng. Đây là những con ruồi không được chuyển gen. 2. Một số ruồi F_1 (khoảng 10%) mắt có sắc tố đỏ. Đây là dòng ruồi được chuyển gen. 3. Thế hệ F_1 (hơn 50%) có nhiều kiểu màu mắt khác nhau. Điều này có nghĩa là có nhiều đoạn gen đã được chuyển vào bộ gen ruồi. Ruồi có màu mắt nhạt được dùng để lai tiếp theo. Sau khi sàng lọc để thu được dòng ruồi chuyển gen, các dòng ruồi này được xác định nhằm sắc thể mang gen chèn bằng các phép lai với ruồi mang chi thị nhiễm sắc thể (balancer).

Lai Western

Mẫu protein trên gel điện di SDS-PAGE được chuyển lên màng nitrocellulose bằng tác nhân điện. Khóa màng trong dung dịch sữa gầy 5" trong PBST (80 mM Na_2HPO_4 , 25 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0,1% Tween 20), lắc nhẹ trong 1 giờ cho dung dịch tiếp xúc đều với bề mặt của màng lai. Sau đó, ngâm màng lai trong kháng thể kháng DUCH (1/10000) trong 1 giờ, đồng thời lắc nhẹ nhàng hộp. Sau đó rửa màng 5 lần trong dung dịch PBST, mỗi lần 5 phút. Tiếp tục ủ màng với kháng thể thứ cấp đánh dấu bằng HRP pha loãng trong dung dịch PBST với tỉ lệ 1/20000 trong 1 giờ, đồng thời lắc nhẹ hộp. Sau đó rửa màng bằng dung dịch PBST 5 lần, mỗi lần 5 phút. Hiện phim bằng dung dịch ECL1 và ECL2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Miễn dịch huỳnh quang (Immuno Fluorescence)

Tách đĩa tiền phân sinh mắt từ ấu trùng thứ 3 trong PBS (140 μM NaCl, 3 μM KCl, 8 μM Na_2HPO_4 , và 15 μM KH_2PO_4 , pH 7,4) trên đá. Cố định đĩa trong 2% paraformaldehyde trong PBS ở 4 °C qua đêm. Sau đó rửa 6 lần bằng PBS ở nhiệt độ phòng. Ủ với kháng thể sơ cấp α -DUCH antibody (1/10000) ở 4 °C qua đêm. Rửa 6 lần bằng PBS và ủ với kháng thể thứ cấp α -FITC antibody (1/1500) 4 giờ ở nhiệt độ phòng hoặc 4 °C qua đêm. Rửa 6 lần bằng PBS và ủ mẫu trong 100% glycerol trong 30 phút. Xem tín hiệu bằng kính hiển vi huỳnh quang.

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

Thiết kế plasmid tái tổ hợp pUAST-DUCH

Sản phẩm gen DUCH với khuôn DNA bộ gen ruồi giấm và cặp môi đặc hiệu có kích thước 980 bp đúng như thiết kế (Hình 1A, giếng 2). Sản phẩm PCR gen DUCH được tinh sạch, cắt với *EcoRI*, *XhoI*, tinh sạch và nối đầu định vào vector pUAST cũng được cắt với *EcoRI* và *XhoI*, bằng DNA 8800 bp (Hình 1B, giếng 3) tạo ra plasmid tái tổ hợp pUAST-DUCH. Plasmid được biến nạp *E. coli* DH5 α tạo ra các dòng *E. coli* DH5 α /pUAST-DUCH.

Kiểm tra khuẩn lạc bằng PCR với cặp môi *wiz1/wiz2*, các khuẩn lạc ở giếng 4, 5, 8, 9, 10 cho một băng DNA ~ 1030 bp nằm giữa 1000 bp và 1500 bp, tương ứng với sản phẩm PCR plasmid tái tổ hợp pUAST-DUCH với cặp môi *wiz1/wiz2*. Các khuẩn lạc mang pUAST-DUCH được nuôi cấy và tách plasmid bằng phương pháp SDS-kiểm để kiểm tra bằng môi đặc hiệu gen

Trong số 5 khuẩn lạc có PCR khuẩn lạc dương tính chỉ có 2 plasmid pUAST-DUCH ở giếng 5 và 6 tiếp tục cho sản phẩm PCR 980 bp với cặp môi đặc hiệu cho gen DUCH (Hình 3, giếng 2). Plasmid tái tổ hợp được cắt với *EcoRI* và *XhoI* (Hình 4, giếng 4) cho hai băng có kích thước bằng pUAST mở vòng (Hình 4, giếng 2) và băng có kích thước bằng với gen DUCH (Hình 4, giếng 3). Plasmid này cũng cho sản phẩm PCR với môi đặc hiệu của gen một băng đúng kích thước. Như vậy gen DUCH đã đồng hóa thành công vào plasmid pUAST. Plasmid pUAST-DUCH tái tổ hợp được giải trình tự kiểm tra (Macrogen, Hàn Quốc) và vi tiêm vào ruồi nhằm tạo ruồi mang phức hợp UAS-DUCH.

Biểu hiện DUCH ở các dòng ruồi chuyển gen

Sau khi chuyển gen bằng vi tiêm, các dòng ruồi chuyển gen được tuyển chọn dựa vào gen chi thị *w+* có kiểu hình mắt đỏ. Bốn dòng ruồi đực đơan có mang gen mục tiêu (thông qua mẫu mắt) #12-4, #23-4, #50-5, và #59 được làm thuần và xác định nhiễm sắc thể mang gen mục tiêu (UAS-DUCH).

Phức hợp gen UAS-DUCH trong cơ thể chuyển gen được khuếch đại PCR với cặp môi đặc hiệu bao quanh vùng gen UAS-DUCH (Hình 5A). Theo lý thuyết, dưới tác động của yếu tố chuyển vị gen P, khi plasmid pUAST-DUCH được đưa vào phôi ruồi, với hoạt động của transposase, phức hợp UAS-DUCH nằm giữa các trình tự IR của yếu tố P được chèn vào nhiễm sắc thể của ruồi giấm. Theo thiết kế thí nghiệm chuyển gen, transposase chỉ hiện diện duy

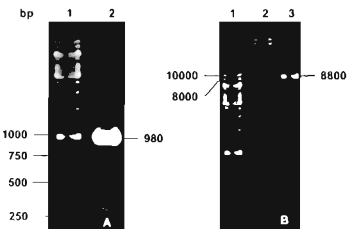
nhất trong thể hệ P (phôi ruồi) khi chuyển gen và hoàn toàn không hiện diện ở các thể hệ sau đó. Do đó, gen chèn vào nhiễm sắc thể tồn tại ổn định.

Những dòng ruồi chuyển gen và ruồi hoang dại được lai Western để kiểm tra sự biểu hiện DUCH protein trên ruồi chuyển gen (Hình 5B). Buồng trứng của các dòng ruồi chuyển gen và dòng hoang dại được thu nhận vì protein DUCH được biểu hiện mạnh ở buồng trứng ruồi. Kháng thể DUCH nhận diện được DUCH protein (~ 30 kDa) ở ruồi chuyển gen và ruồi hoang dại.

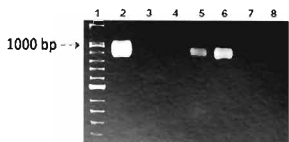
Biểu hiện định lượng tại mô mắt ở dòng ruồi GMR-GAL4

Sử dụng dòng ruồi GMR-GAL4 mang promoter chuyển biệt cho mô mắt cho phép xem xét sự biến hiện mức protein mục tiêu ở đĩa thần kinh mắt mới, hình thái mắt ở ruồi trưởng thành, cũng như phân tích sâu hơn về tác động của protein mục tiêu (UCH-L1) lên chu trình tế bào và sự biệt hóa các tế bào ở mức độ mô phân sinh.

Để thu nhận các cá thể ruồi chuyển gen mang



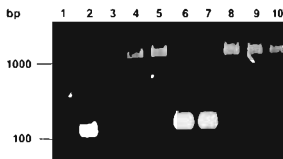
Hình 1. Sản phẩm PCR gen *DUCH* (1A), pUAST/*EcoRI*, *XhoI* (3B), pUAST (2B), thang DNA chuẩn 1 kb (1)



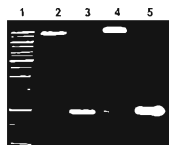
Hình 3. Sản phẩm PCR plasmid với mỗi đặc hiệu của gen *DUCH* với khuôn gen *DUCH* (2, chứng dương), khuôn pUAST (chứng âm, 3), khuôn plasmid tách từ các khuẩn lạc (4-8), thang DNA chuẩn 100 bp (1)

đồng thời hai yếu tố UAS-*DUCH* và *GMR-GAL4* trong cơ thể, mã tổ hợp gen mang promoter *GMR* và *GAL4* nằm trên nhiễm sắc thể X, cho nên ruồi đực mang phức hợp gen UAS-*DUCH* được lai với ruồi cái *GMR-GAL4*. Do cả thể ruồi cái mang *GMR-GAL4* đồng hợp tử trên nhiễm sắc thể X nên tất cả ruồi con ở thế hệ F1 đều mang *GMR-GAL4*.

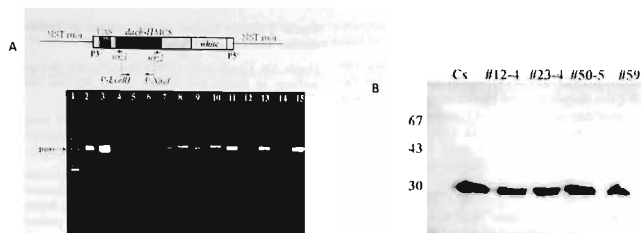
Ban đầu, mức độ biểu hiện protein *DUCH* ở ruồi chuyển gen được kiểm tra bằng lai Western giữa protein được tách ra từ các đĩa thần kinh mắt của ấu trùng thứ ba và kháng thể kháng *DUCH*, các dòng ruồi chuyển gen có sự biểu hiện vượt mức protein *DUCH* (Hình 6A). Ngoài ra, hình thái mắt của ruồi trưởng thành là kiểu hình mắt nhám (rough eye) ở các dòng ruồi chuyển gen *DUCH* so với kiểu hình mắt bình thường ở ruồi hoang dại (Hình 6B). Protein *DUCH* có thể được biểu hiện vượt mức, gây độc tế bào và gây nên sự biến đổi trong quá trình hình thành mắt. Ở các dòng ruồi chuyển gen, protein *DUCH* biểu hiện mạnh ở vùng phân bào thứ cấp, nơi dòng vào trở quan trọng trong quá trình hình thành mắt và ở vùng đuôi (posterior) của đĩa thần kinh mắt (Hình 6D).



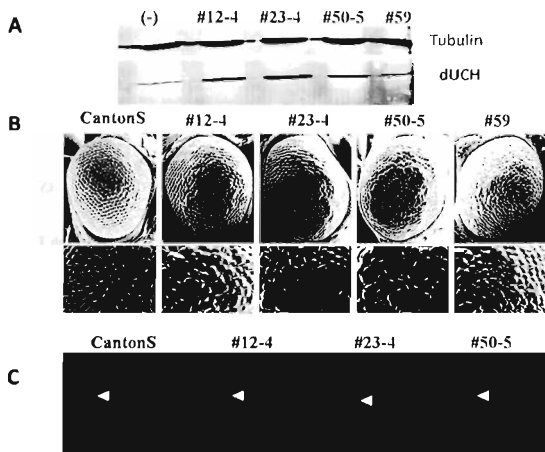
Hình 2. Sản phẩm PCR khuẩn lạc với mỗi *wiz1/wiz2* 100 bp và khuôn pUAST (chứng âm, 2), khuôn nước (3), khuôn các khuẩn lạc sàng lọc (4-10), thang DNA chuẩn (1).



Hình 4. Sản phẩm cắt bằng *EcoRI* và *XhoI* của pUAST (2), gen *DUCH* (3), pUAST-*DUCH* (4). Sản phẩm PCR của pUAST-*DUCH* bằng cặp mỗi đặc hiệu gen (5), thang DNA chuẩn 1 kb (1)



Hình 5. A Điện di đồ sản phẩm PCR gen UAS-DUCH ở các dòng ruồi chuyển gen sử dụng khuôn pUAS-DUCH (2, 3, chung dương), khuôn nước (4, 5, chung âm), khuôn bộ gen CantonS (6, 7, chung âm), khuôn bộ gen #12-4 (8, 9), khuôn bộ gen #23-4 (10, 11), khuôn bộ gen #50-5 (12, 13), khuôn bộ gen #59 (14, 15) với cặp mồi đặc hiệu plasmid (giếng chẵn) và mồi đặc hiệu gen (giếng lẻ trừ 1), thang DNA chuẩn 100 bp (1) B. Lai Western DUCH protein biểu hiện ở ruồi chuyển gen với kháng thể kháng DUCH



Hình 6 Biểu hiện DUCH định hướng tại mô mắt ở dòng ruồi GMR-Gal4. A. Mức độ biểu hiện DUCH ở đĩa tiền phân sinh mắt ở ruồi hoang dại (-) và ruồi chuyển gen DUCH. B-C. Hiện lượng mắt nhắm ở ruồi hoang dại CantonS và ruồi chuyển gen DUCH khi protein DUCH được biểu hiện vượt mức ở mắt ruồi. (B) Hàng trên và hàng dưới lượng ứng với độ phóng đại 200x và 700x (C) Nhuộm đĩa tiền phân sinh mắt của ruồi hoang dại và ruồi chuyển gen bằng kháng thể kháng DUCH (a) đĩa được chụp ở vật kính 10x; (a'): đĩa được chụp ở vật kính 40x. Mũi tên: protein DUCH được biểu hiện mạnh ở second mitotic wave và ở đuôi mắt

KẾT LUẬN

Gen dUCH đã được tạo dòng thành công vào plasmid pUAST và chuyển vào cơ thể ruồi giấm, tạo ruồi giấm chuyển gen mô hình mang gen dUCH. Kết quả bước đầu đã cho thấy mối liên quan giữa mức độ biểu hiện protein UCH-L1 và kiểu hình thái mất ruồi. Hơn nữa, mô hình này chính là nền tảng cho các thí nghiệm phân tích vai trò của protein UCH-L1 đối với bệnh Parkinson về sau.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ quỹ Nafosted và sự hỗ trợ kỹ thuật của phòng thí nghiệm kỹ thuật nhện sắc thể, Viện Kỹ thuật Công nghệ Kyoto, Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amerik AY, Hochstrasser M (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 189-207.
- Corti O, Hampe C, Darios J, Ibanez P, Ruberg M, Brice A (2005) Parkinson's disease: from causes to mechanisms. *C R Biol* 328(2): 131-142.
- Dawson TM, Dawson VL (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302(5646): 819-822.

Gasser T (2007) Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17: S343-350.

Hegde AN, Upadhyay SC (2007) The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. *Trends Neurosci* 30(11): 587-595.

Larsen CN, Kiantz BA, Wilkinson KD (1998) Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry* 37(10): 3358-3368.

Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagadda S, Chernova T, Deheja A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 395(6701): 451-452.

Maraganore DM, Farrer MJ, Hardy JA, Lincoln SJ, McDermott SK, Rocca WA (1999) Case-control study of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 53(8): 1858-1860.

Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang YL, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K (2003) Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun* 304(1): 176-183.

Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989) The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 246(4930): 670-673.

ESTABLISHED THE TRANSGENIC FLY LINES CARRYING U4S-DUCH TO INVESTIGATE THE ROLE OF UCH-L1 IN PARKINSON DISEASE

Phan Nguyễn Thụy An¹, Đặng Thị Phương Thảo^{1,*}, Masamitsu Yamaguchi², Trần Linh Thuộc¹

¹University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

²Kyoto Institute of Technology, Japan

SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative movement disorder that affects the population older than 65 years of age and the death of dopaminergic neurons in PD patients lead to the impairment of movement. Now a day, several studies have found mutant forms of genes linked to familial forms of PD which suggests that oxidative stress, mitochondrial dysfunction, impairment of the ubiquitin-proteasome system, and protein aggregation may contribute to PD pathogenesis. Among them, UCH-L1 is one of the most abundant proteins in the brain and plays an important role in ubiquitin-proteasome system in order to degrade the unfolded proteins in the cell. Despite much effort over the last decades, the relative between UCH-L1 and other neurodegenerative diseases such as PD is still unclear. In order to investigate the role of UCH-L1, we expressed dUCH, a homolog of UCH-L1 in *Drosophila*, in transgenic flies and studied its function. By constructing vector pUAST-dUCH and microinjecting into *Drosophila*, we created the transgenic fly lines carrying UAS-dUCH and expressed dUCH in specific tissue via GAL4-UAS system. Crossing UAS-dUCH lines with GMR-GAL4, we found that dUCH is overexpressed in posterior of eye imaginal disc, an

* Author for correspondence. E-mail: thaodp@chu-minh.edu.vn

important part to the eye development; therefore, the overexpression of dUCH affected the eye phenotype. Moreover, transgenic flies carrying UAS-dUCH can be a model for further investigation of Parkinson disease

Từ khóa: gene *dUCH*, *Drosophila* *GMR-GAL4*, genetic transformation, eye specific expression