

GIẢM BIỂU HIỆN GEN *duch* (*DROSOPHILA UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE*) VÀ NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CHỨC NĂNG CỦA *duch* TRONG MÔ HÌNH RUỒI GIẢM CHUYÊN GEN

Bđặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thước

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

UCH-L1 (ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1) là enzyme điều hòa ubiquitin tự do trong hệ thống phân giải protein ubiquitin – proteasome, liên quan đến nhiều dạng ung thư và bệnh thoái hóa thần kinh ở người. Tuy nhiên, vai trò của UCH-L1 trong cơ thể sống vẫn chưa được làm rõ. Trong một thập kỷ gần đây, mô hình ruồi giấm chuyên gen *Drosophila melanogaster* được các nhà khoa học chọn sử dụng như một công cụ nghiên cứu bệnh trên người với nhiều ưu thế. Trong nghiên cứu này chúng tôi chia và sử dụng ruồi giấm như một mô hình nhằm nghiên cứu chức năng protein UCH-L1 thông qua protein tương đồng ở ruồi giấm, UUCH. Chúng tôi thiết kế vector mang và biểu hiện RNA sợi đôi của gen *duch* và chuyên chế biến gene này vào phôi ruồi. Trong 54 dòng ruồi chuyên gen, chúng tôi sàng lọc và chọn được 2 dòng ruồi có khả năng giảm biểu hiện gen *duch*. Sự giảm biểu hiện *duch* làm mất ruồi trâu nâu nhằm do sự cản ứng apoptosis bất thường trong giao đoạn phát triển mô mắt. Các kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn về đích tác động và cơ chế tác động của *duch* trong các con đường apoptosis cũng như mở ra nhiều triển vọng cho các nghiên cứu phát triển các liệu pháp chẩn đoán mới cho các bệnh ung thư và thoái hóa thần kinh.

Từ khóa: *uch-L1*, *Drosophila* model, Gal4-UAS, cancer, neurodegenerative disease.

MỞ ĐẦU

UCH (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) là một họ protein có chức năng quan trọng đối với quá trình phân giải protein trong tế bào. Các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy UCH-L1 có vai trò thủy phân liên kết ester tại đầu C trong chuỗi poly-ubiquitin và giải phóng ubiquitin đơn phân. Mặc dù những bất thường trong sự biểu hiện UCH-L1 có liên quan đến nhiều bệnh ung thư và các bệnh thoái hóa thần kinh, nhưng vai trò thực sự của UCH-L1 trong cơ thể sống vẫn chưa được biết rõ (Kim H.J., et al., 2009). Ở bệnh nhân Parkinson, UCH-L1 được tìm thấy trong thể Lewy. Đột biến I93M làm giảm 50% hoạt tính thủy phân của UCH-L1 và được tìm thấy trong nhiều bệnh nhân Parkinson. Đột biến S18Y làm giảm các trạng thái UCH-L1 nhí phản và làm giảm nguy cơ mắc bệnh Parkinson. Tuy UCH-L1 thường được cho là có hoạt tính thủy phân và giải phóng đơn phân ubiquitin, nhưng một số nghiên cứu cũng cho thấy khi ở trạng thái nhí phản, enzyme này có hoạt tính liên kết các ubiquitin (Kim H.J., et al., 2009).

Mặt khác, các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy UCH-L1 có liên quan đến ung thư tuyến tiền liệt. Sự giảm biểu hiện UCH-L1 được quan sát thấy ở các bệnh nhân ung thư tuyến tụy, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư ruột kết, u xương ác tính, ung thư thực quản. Ngược lại, sự biểu hiện mạnh của UCH-L1 liên quan đến quá trình tạo thành các khối u, kích thước khối u và sự xâm lấn của các khối u. (Jiang M.J. Et al., 2011; Hurst-Kennedy J. Et al., 2012). Ở các bệnh nhân ung thư túi mật, có sự biểu hiện mạnh của UCH-L1 do sự giảm methyl hoá trên promoter của gen này. Sự tăng biểu hiện của UCH-L1 cũng liên quan đến quá trình di căn của tế bào ung thư (Liu X, Zeng B., et al., 2009). Mặc dù rất nhiều nghiên cứu cho thấy UCH-L1 có liên quan đến nhiều dạng ung thư khác nhau nhưng cơ chế gây ung thư và vai trò của protein này trong tiến trình phát sinh ung thư vẫn còn đang là vấn đề được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm và nỗ lực làm sáng tỏ. UCH-L1 là một protein có sự bảo tồn khá cao giữa các loài từ tôm men đến các động vật hùn nhú như người. Chính vì vậy, các nhà khoa học trên thế giới đã và đang sử dụng nhiều mô hình động vật để nghiên cứu vai trò UCH-L1 trong cơ thể sống.

Hơn hai thập kỷ qua, mô hình ruồi giấm *Drosophila melanogaster* được sử dụng như một công cụ hữu hiệu trong nghiên cứu bệnh trên người. Ruồi giấm có gen tương đồng với khoảng 70% gen gây bệnh của người. Khảo sát trên ngàn hàng protein cho thấy CG4265 ở ruồi giấm tương đồng với UCH-L1 ở người tới 75.7% và có trình tự amino acid giống UCH-L1 là 45.9%. Trong các nghiên cứu sử dụng mô hình ruồi giấm, các nhà khoa học thường sử dụng hệ thống Gal4-UAS nhằm biểu hiện các protein mục tiêu định hướng tại các mô đích. Hệ thống này bao gồm hai phần: UAS (upstream activation sequence) là trình tự hoạt hóa được thiết kế nằm trước gen mục tiêu và Gal4 là protein hoạt hóa phiên mã. Gal4 được thiết kế nằm sau promoter biểu hiện định hướng mô. Promoter này sẽ biểu hiện Gal4 ở một mô hay cơ quan chuyên biệt cho promoter đó, protein Gal4 sinh ra sẽ bám vào vùng UAS và kích hoạt quá trình phiên mã gen mục tiêu ở mô hay cơ quan chuyên biệt đó, nhờ vậy mà protein mục tiêu được biểu hiện (Feney MB., et al., 2000; Pandey UB., et al., 2011; Bhandari P. Et al., 2001; Kramer JM. Et al., 2003).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật RNAi nhằm thiết lập các dòng ruồi chuyên gen mang phức hợp tạo RNA sợi đôi, chuyên biệt cho RNA thông tin của gen *duch*. Sự giảm biểu hiện gen *duch* được định hướng tại mô mắt ruồi giấm nhờ hoạt động của hệ thống Gal4-UAS với promoter GMR. Các kết quả thực nghiệm cho thấy giảm biểu hiện *duch* cảm ứng apoptosis trong các tế bào của mô tiền phên sinh mắt.

NGUYỄN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thiết kế dòng ruồi chuyên gen tạo phức hợp RNA sợi đôi (dsRNA) đặc trưng cho mRNA của gen *duch*

450 nucleotide đầu 5' của gen *duch* được khuếch đại lứ cDNA của gen *duch* và chèn vào vector pUAST nhằm tạo vector tái tổ hợp pUAST-IR-*duch* mang hai đoạn DNA đầu 5' của gen *duch* nằm ngược chiều trên vector. Vector tái tổ hợp được đưa vào trứng ruồi giấm *Drosophila melanogaster* bằng phương pháp vi tiêm. Ruồi giấm đột biến w1118 không mang gen mã hóa transposase, mắt trắng được sử dụng làm vật chủ mang gen. Ruồi được cho giao phối và thu trứng cách 20-40 phút một lần trong quá trình thực hiện vi tiêm. Vector tái tổ hợp pUAST-IR-*duch* được tiêm vào trứng ở phần đuôi của trứng nơi hình thành mầm tế bào. Trứng ruồi sau khi vi tiêm được ủ trên môi trường SY (5% đường, 5% nấm men, 1% agar) ở 25°C. Sau 24h, thu ấu trùng ruồi và nuôi riêng biệt các ấu trùng ruồi nhằm thu nhận ruồi trinh nữ

Thể hệ ruồi này gọi là ruồi F₀, có màu mắt trắng. Mỗi ruồi F₀ được giao phối với ruồi W1118 theo tỉ lệ 1:3. Chọn các ruồi chuyển gen thể hệ F1 có kiểu hình mắt đỏ. Tiến hành đồng hợp tử hóa các dòng ruồi chuyển gen chọn được và định vị gen chèn trên nhiễm sắc thể bằng các phép lai với ruồi mang chỉ thị nhiễm sắc thể (balancer).

Định lượng mRNA

mRNA được tách chiết từ tế bào thu được, sau đó xử lý với DNase, tinh sạch và định lượng mRNA mục tiêu bằng phương pháp realtime PCR với hệ thống Biosystems 7500 Real Time PCR sử dụng Takara high fidelity RNA PCR kit (Takara) và SYBR Green I kit (Takara) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. mRNA của actin5c được sử dụng như mẫu chứng âm.

Lai Western

Protein trên SDS-PAGE được chuyển lên màng nitrocellulose bằng tác nhân điện. Khô màng trong dung dịch sửa gầy 5% trong PBST (80 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaH₂PO₄, 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, màng lai được ngâm lắc nhẹ 1 giờ trong kháng thể kháng dUCH-L1 (1:10000) hoặc kháng thể kháng α-tubulin. Sau đó màng được rửa kỹ 5x 5 phút với PBST. Tiếp tục màng được ủ, lắc nhẹ 1 giờ với kháng thể thứ cấp đánh dấu bằng HRP pha loãng trong PBST với tỉ lệ 1/20000. Sau đó màng được rửa kỹ bằng PBST 5x 5 phút. Hiện hình bằng dung dịch ECL1 và ECL2 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Nhiễm biến dịch huỳnh quang (immunofluorescence)

Tách đĩa tiền phân sinh mắt từ ấu trùng thứ 3 trong PBS (140 µM NaCl, 3 µM KCl, 8 µM Na₂HPO₄, và 15 µM KH₂PO₄, pH 7,4) trên đá. Cố định đĩa bằng 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. Quan sát tín hiệu bằng kính hiển vi huỳnh quang.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết lập các dòng ruồi chuyển gen mang phức hợp UAS-IR.dUCH và định vị phức hợp gen này trên nhiễm sắc thể ruồi giảm chuyển gen

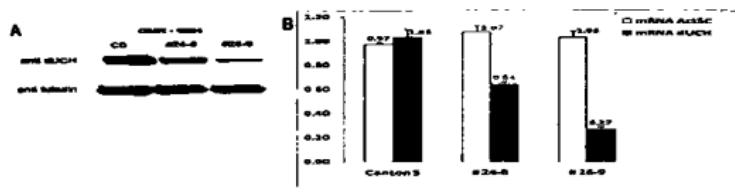
Sau khi chuyển gen bằng phương pháp vi tiêm, các dòng ruồi chuyển gen được tuyển chọn dựa vào gen chỉ thị w cho phép ruồi mang gen mục tiêu có màu mắt đỏ. Chúng tôi chọn được 54 dòng ruồi dự đoán có mang gen mục tiêu thông qua gen chỉ thị màu mắt đỏ. Trong 54 dòng này, chúng tôi chọn khảo sát 2 dòng có sức sống và khả năng sinh sản tốt (dòng #24-8 và #26-9). Các dòng ruồi dự tuyển được tiến hành làm thuần và xác định nhiễm sắc thể mang gen mục tiêu (UAS - IR.dUCH) bằng các phép lai với ruồi mang balancer. Kết quả định vị gen mục tiêu trong ruồi chuyển gen được tổng hợp trong Bảng 1 như sau.

Bảng 1. Danh sách các dòng ruồi mang phức hợp gen UAS-IR.dUCH

Dòng ruồi chuyển gen mang UAS-IR. dUCH	Nhiễm sắc thể chứa gen chèn	Kiểu gen	Kiểu hình
#24-8	III	w+; UAS-IR.dUCH	Mắt đỏ, thân dài, cánh thẳng
#26-9	III	w-; UAS-IR.dUCH/TM3 (chết khi ở trạng thái đồng hợp tử)	Mắt đỏ, thân ngắn, cánh thẳng, lông lưng ngắn

Kiểm tra hiệu quả giảm biểu hiện gen dUCH trong ruồi chuyển gen mang phức hợp UAS-IR.dUCH

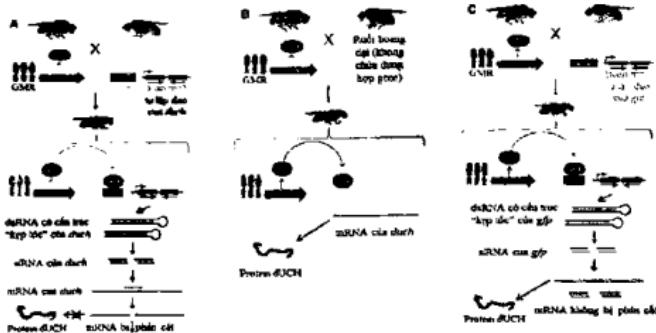
Trong các thí nghiệm kiểm tra hiệu quả giảm biểu hiện gen dUCH, chúng tôi sử dụng tổ hợp GMR-Gal4 kết hợp với phức hợp UAS-IR.dUCH nhằm biểu hiện dsRNA chuyên biệt cho mRNA dUCH trong mô mắt ruồi. Thu nhận mô tiền phân sinh mắt, tiến hành định lượng mRNA của dUCH bằng kỹ thuật real time PCR và thực hiện lai western blot với kháng thể kháng dUCH. Trong các thí nghiệm này, chúng tôi so sánh lượng mRNA dUCH trong các dòng ruồi chuyển gen với lượng mRNA dUCH trong dòng ruồi hoàng đai Canton S. Sử dụng rp49 như gen tham chiếu và act5C như đối chứng âm. Kết quả RT-PCR cho thấy lượng mRNA dUCH giảm 36% trong dòng ruồi 24-8; và giảm 73% trong dòng ruồi 26-9 trong khi đó không có sự khác biệt về lượng mRNA act5C giữa dòng ruồi hoàng đai và các dòng ruồi chuyển gen (hình 1). Kết quả western blot cũng cho thấy ở các dòng ruồi chuyển gen, sự biểu hiện protein dUCH giảm đi so với dòng ruồi hoàng đai Canton S, ở dòng 26-4 sự biểu hiện protein dUCH giảm mạnh hơn so với dòng 24-8. Các kết quả thí nghiệm cho thấy, chúng tôi đã thành công trong việc thiết lập các dòng ruồi giảm biểu hiện gen dUCH bằng kỹ thuật RNAi.



Hình 1. Hiệu quả knock-down dUCH trong các dòng ruồi chuyển gen. A. Kiểm tra sự biểu hiện protein dUCH trong các dòng ruồi chuyển gen. B. Định lượng mRNA dUCH trong các dòng ruồi chuyển gen.

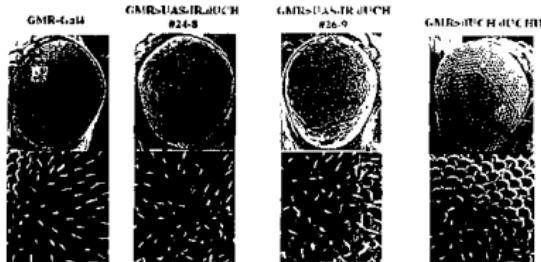
Khảo sát ảnh hưởng của giảm biểu hiện *duch* tại mô tiền phân sinh mắt lên sự phát triển của mô mắt

Nhằm giảm biểu hiện gen *duch* định hướng tại mô mắt, chúng tôi sử dụng hệ thống Gal4-UAS với promoter GMR, một promoter chuyên biệt cho mô mắt, để định hướng biểu hiện các dsRNA *duch* tại mô mắt. Ruồi lai F1 mang phức hợp GMR-Gal4>UAS-IR.dUCH (hình 2A) là các dòng nuôi ruồi giảm biểu hiện gen *duch*, các dòng GMR-Gal4 (hình 2B) và GMR-Gal4>UAS-IR.GFP (hình 2C) được sử dụng làm đối chứng trong các thí nghiệm khảo sát hiệu quả giảm biểu hiện và ảnh hưởng của việc giảm biểu hiện *duch* trong mô mắt ruồi. Các phân tích kiểu hình mắt nuôi trưởng thành dưới kính hiển vi điện tử cho thấy ruồi chuyển gen mang phức hợp GMR-Gal4>UAS-IR.dUCH có kiểu hình nhám bất thường khi so sánh với các dòng nuôi đối chứng (hình 3). Thủ vị hơn nữa, khi chúng tôi già tăng số lượng mRNA *duch* trong các dòng nuôi GMR-Gal4>IR.dUCH thông qua việc đồng biểu hiện phức hợp UAS-dUCH trong các dòng ruồi này, chúng tôi nhận thấy kiểu hình mắt nhám trong các dòng ruồi giảm biểu hiện *duch* được phục hồi. Điều đó có nghĩa là khi cân bằng lượng mRNA *duch* bị phân giải dưới tác động của RNAi bằng cách mRNA *duch* được biểu hiện từ phức hợp UAS-dUCH, các tác động do giảm biểu hiện *duch* hoàn toàn bị giải trừ. Hay nói cách khác, dữ liệu thực nghiệm cho thấy, kiểu hình mắt nhám ở ruồi giảm biểu hiện *duch* tại mô mắt là do sự giảm biểu hiện *duch* gây ra.

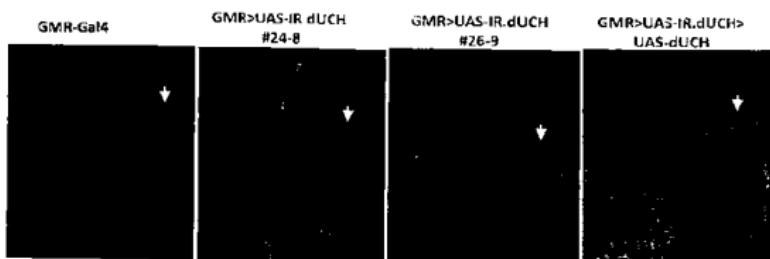


Hình 2. Chiết lược giảm biểu hiện gen *dUCH* định hướng mô mắt trong ruồi chuyển gen

Bên cạnh kết quả phân tích kiểu hình mắt ruồi, chúng tôi cũng thực hiện nhuộm miễn dịch đĩa phân sinh mắt ruồi với kháng thể kháng DUCH để kiểm tra sự biểu hiện protein DUCH. Kết quả cũng cho thấy, protein DUCH trong đĩa tiền phân sinh mắt ruồi chuyển gen mang UAS – IR. dUCH giảm nhiều so với ruồi đối chứng. Sự biểu hiện protein DUCH được khôi phục trong ruồi mang UAS- IR dUCH>UAS.dUCH (Hình 4).



Hình 3. Giảm biểu hiện DUCH gây kiểu hình mắt nhám trong ruồi chuyển gen



Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện của protein DUCH trong mô tiền phân sinh mắt ruồi

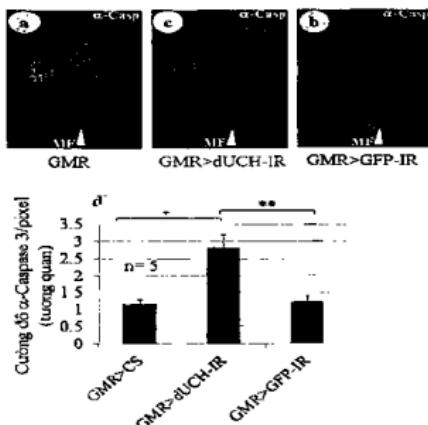
Giảm biểu hiện dUCH gây apoptosis tại giai đoạn biệt hóa của các tế bào mắt

Các kết quả nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể kháng dUCH cũng cho thấy sự giảm biểu hiện *duch* diễn ra tại vùng các tế bào biệt hóa của đĩa tiền phân sinh mắt (Hình 4). Chúng tôi tiếp tục tìm hiểu ảnh hưởng của sự giảm biểu hiện *duch* đến quá trình phát triển của các tế bào mắt tại vùng này. Các nghiên cứu trước đây cho thấy kiều hình mắt nhám ở ruồi giấm có thể do nhiều nguyên nhân tuy nhiên đã có nhiều nghiên cứu cho thấy rằng apoptosis là một trong những nguyên nhân chính (Thao DT. et al., 2012). Do vậy, chúng tôi tiến hành nhuộm đĩa tiền phân sinh mắt với kháng thể kháng caspase-3 đang hoạt hóa để kiểm tra sự apoptosis xảy ra tại đĩa tiền phân sinh mắt. Kết quả cho thấy, tại đĩa tiền phân sinh mắt của ruồi giấm biểu hiện *duch* tín hiệu caspase-3 dày đặc ngay sau vùng phân sinh (MF-morphogenetic furrow) (hình 5c) trong khi đó tín hiệu này rải rác từ MF đến posterior ở dòng 2 đồng đối chứng (hình 5a,b). Kết quả đo cường độ tín hiệu caspase-3 tại 5 đĩa tiền phân sinh mắt được chọn ngẫu nhiên từ các dòng được biểu diễn bằng biểu đồ hình 5d cho thấy tín hiệu caspase-3 của dòng giảm biểu hiện *duch* cao gấp 2 lần so với dòng đối chứng với giá trị $p < 0.05$.

Như vậy, khi giảm biểu hiện dUCH tại các tế bào thuộc vùng biệt hóa của đĩa tiền phân sinh mắt làm tăng quá trình apoptosis xảy ra tại các tế bào của vùng này từ đó ảnh hưởng đến quá trình biệt hóa của các tế bào mắt và có thể đây là một trong những nguyên nhân gây ra kiều hình mắt nhám ở ruồi trưởng thành. Ở các dòng đối chứng vẫn có tín hiệu caspase-3 là do apoptosis vẫn xảy ra một cách tự nhiên trong quá trình tăng sinh và biệt hóa của các tế bào đồng thời sự biểu hiện Gα4 cũng có thể gây apoptosis trên các tế bào này (Kramer JM. et al., 2003; Thao DT. et al., 2012).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thiết kế thành công các dòng ruồi chuyển gen giảm biểu hiện *duch*, định hướng tại mô mắt ruồi. Kết quả khảo sát cho thấy có thể giảm biểu hiện 36% mRNA *duch* trong dòng 24-8 và 73% mRNA *duch* trong dòng 26-9. Sự giảm biểu hiện *duch* cảm ứng apoptosis trong mô tiền phân sinh mắt ruồi và do đó gây kiều hình mắt nhám ở ruồi trưởng thành. Các kết quả nghiên cứu này đã bước đầu làm rõ vai trò của protein dUCH trong cơ thể sống và tạo tiền đề cho các nghiên cứu sâu hơn nhằm làm sáng tỏ chức năng của protein này.



Hình 5. Giảm biểu hiện dUCH gây apoptosis tại các tế bào đĩa tiền phân sinh mắt (a-c) Đĩa tiền phân sinh mắt của ruồi giảm biểu hiện và đối chứng nhuộm với α -caspase-3 ở độ phóng đại 400X (d) Biểu đồ cường độ tín hiệu α -caspase-3/pixel thu được với *, $p = 0.004$ ($p < 0.05$); **, $p = 0.004$ ($p < 0.05$)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kim HJ, Kim YM, Lim S, Nam YK, Jeong J, Kim HJ, Lee KJ (2009) Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene*, 28(1):117-127.
- Jang MJ, Baek SH, Kim JH (2011) UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction. *Cancer Lett.*, 302(2):128-135.
- Hurst-Kennedy J, Chin LS, Li L (2012) Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in tumorigenesis. *Biochem Res Int*, 2012:123706.
- McNaught KSP (2007) The Ubiquitin-Proteasome System in Parkinson's Disease. In: Protein Degradation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 169-194.
- Liu X, Zeng B, Ma J, Wan C (2008) Comparative proteomic analysis of osteosarcoma cell and human primary cultured osteoblastic cell. *Cancer Invest*, 27(3):345-352.
- Takase T, Hibi K, Yamazaki T, Nakayama H, Taguchi M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nagasaka T, Nakao A (2003) PGP9.5 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 50(53):1278-1280.
- Lee YM, Lee JY, Kim MJ, Bae HI, Park JY, Kim SG, Kim DS (2006) Hypomethylation of the protein gene product 9.5 promoter region in gallbladder cancer and its relationship with clinicopathological features. *Cancer Sci*, 97(11):1205-1210.
- Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404(6776):394-398.

Bhandari P, Shashidhara LS (2001) Studies on human colon cancer gene APC by targeted expression in *Drosophila*. *Oncogene*, 20(47):6871-6880.

Pandey UB, Nichols CD (2011) Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, 63(2): 411-436

Thao DT, et al., (2012) Overexpression of ubiquitin carboxyl terminal hydrolase impairs multiple pathways during eye development in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res*, 348(3): 453-63.

Kramer JM, Staveley BE (2003) GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Res*, 2(1): 43-7.

KNOCKDOWN OF *duch* (*DROSOPHILA* UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE) AND STUDY ROLES OF *duch* IN TRANSGENIC FLY MODEL

Dang Thi Phuong Thao^{1,2}, Tran Linh Thuoc^{1,2}

¹Department of Molecular and Environmental Biotechnology, University of Science

²Laboratory of Molecular Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

SUMMARY

UCH-L1 (ubiquitin carboxyl terminal hydrolase L1) is a member of DUBs (deubiquitinating enzymes) which regulates free ubiquitin mechanism of ubiquitin-proteasome system. Recently, many studies have demonstrated that *uch-l1* gene is involved in various types of human cancer and neurodegenerative disease, but its roles in living organisms are still unclear. Although the genetically modified mouse model has been widely used to study human diseases, this model has high cost and time consuming. Recently *Drosophila melanogaster* has been widely used as an effective model for human diseases with low cost and time saving. We, therefore investigate the functions of *uch-l1* through studying its homologue, *duch* in *Drosophila melanogaster*. The dsRNA of *duch* gene were designed and constructed in to pUAST vector and introduced into *Drosophila* fertilized embryo. Two lines of transgenic *Drosophila*, which carried dsRNA *duch* producing cassette gene, were screened out of 54 lines of transgenic fly. The two lines of chosen transgenic fly were checked and proved by reduction of *duch* mRNA level in eye imaginal discs. We then established transgenic flies carrying *duch* RNAi under the control of eye-specific enhancer GMR and Gal4/UAS system, which are applicable for eye-specific knockdown of *duch*. Knockdown of *duch* causes rough eye phenotype, triggers caspase-dependent cell death in eye imaginal discs. The results strongly indicate that *duch* involved in apoptotic and additionally, these results also support for further studies to discover targets of *duch* in apoptosis pathways to develop novel targeted therapies and early diagnosis for cancer and neurodegenerative diseases.

Keywords: *uch-l1*, *Drosophila* model, Gal4-UAS, cancer, neurodegenerative disease.

* Author for correspondence: Tel: +84 - 8 38307079; Email: thaodp@hcmus.edu.vn