

Doktori értekezés tézisei

**Deubikvitináz gének hatásának vizsgálata a
Huntington-kór Drosophila modelljében**

Farkas Anita

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2024

Bevezetés

A Huntington-kór egy dominánsan öröklődő neurodegeneratív betegség, melyet a Huntingtin gén első exonjában lévő CAG repeat kóros expanziója okoz. A képződő mutáns Huntingtin fehérje emiatt aggregációra lesz hajlamos és toxikus a sejtekre nézve. A hibás térszerkezetű fehérjék lebontása az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPS) által valósul meg, amely során a proteaszóma szubsztrátokat a sejtek ubikvitin fehérjékkel jelölik meg. Az ubikvitin ezen kívül olyan folyamatok szabályozásában is részt vesz, mint az intracelluláris fehérjetranszport, szignalizációs folyamatok, az autofágia, a transzkripció, a transláció és a DNS károsodásra adott válasz. Számos neurodegeneratív betegségre jellemző egy adott fehérjének a felhalmozódása a sejtekben, ami arra utal, hogy az UPS működésében zavar keletkezett. Amennyiben a fehérjék ubikvitinált formában felhalmozódnak, akkor a szabad ubikvitin készlet kimerülhet, ami az említett folyamatok sérülését okozhatja. Az ubikvitin eltávolítását a fehérjékről, újrahasznosításukat a deubikvitináz enzimek (DUB) végzik, melyek emellett részt vesznek az ubikvitin szintézisében is, így biztosítva, hogy az ubikvitin elérhető legyen a sejtek életéhez nélkülözhetetlen folyamatok számára.

Mivel a Huntington-kór esetében tényleges gyógymód még nem létezik és a tüneti kezelések is korlátozottak, továbbra is központi cél olyan gyógyszercélpontok felfedezése, mely segítségével stabilabb életminőség javulás érhető el. Munkánk során ilyen célpontokat igyekeztünk azonosítani Huntington-kór modellben.

Célkitűzések:

Munkánk során deubikvitináz gének hatását vizsgáltuk a Huntington-kór *Drosophila* modelljében, potenciálisan új terápiás célpontok keresésének céljából. Ehhez az alábbi kutatási célokat fogalmaztuk meg:

- 1, A Huntington-kór patomechanizmusára hatással bíró DUB-ok azonosítása *Drosophila melanogaster* modellorganizmusban.
- 2, A potenciális jelöltekkel kapott eredmények validálása funkcionálisan azonos, de független allélekkel elvégzett interakciókon keresztül.
- 3, Teszteljük, hogy a jelölt DUB okoz-e fenotípusos elváltozásokat egészséges állatokon.
- 4, Annak tisztázására, hogy a jelölt DUB hatásai általánosak-e a neurodegeneratív betegségekre, vagy csak a mHTT által kiváltott fenotípusokat befolyásolja, teszteljük a hatását az Alzheimer-kór *Drosophila* modelljében.
- 5, A jelölt DUB hatásának vizsgálata a mutáns Huntingtin (mHTT) aggregátumok mennyiségére, méreteloszlására.
- 6, Transzkriptomikai analízist végzünk a jelölt DUB molekuláris hatásainak feltárása céljából.

Alkalmazott módszerek:

1, Kísérleteink során a Huntington-kór modellezésére a humán *Huntingtin* gén első exonját expresszáltattuk patológiás (Q120) vagy normál (Q25) hosszúságú poliglutamin ismétlődésekkel ellátva. *Drosophila melanogaster* modellorganizmusban. A DUB mutációk, túltermelő, vagy RNS interferenciás konstrukciók hatásának vizsgálatára **genetikai interakciós tesztek**et hajtottunk végre a DUB törzsek és *Httex1.Q120* transzgént hordozó muslicák felhasználásával. Ennek során **életképességi** és **élettartam** vizsgálatokat végeztünk, a motoros képességek vizsgálatára **mászás tesztet**, a neurodegeneráció vizsgálatára **pseudopupíl assay** módszert alkalmaztunk. A mHtt expressziós szintjét a vizsgált genotípusokban **kvantitatív real-time QPCR módszerrel** követtük nyomon.

2, A jelölt DUB hatásának megerősítése céljából klónoztuk a *Yod1* gént és létrehoztunk egy *Yod1* túltermelő *Drosophila* törzset. A klónozás során **genomi DNS-t izoláltunk**, **PCR reakciót** hajtottunk végre a jelölt génjének amplifikálására. Azt **Gateway klónozó rendszer segítségével** helyspecifikus transzgenézisre alkalmas vektorba (pTWFattB) klónoztuk, majd a konstrukció felhasználásával *UAS-Yod1.flag* **transzgenikus muslicákat állítottunk elő**. Az létrehozott törzset **western blot** módszerrel validáltuk. Az így rendelkezésre álló *Yod1* túltermelő törzsek fenotipikus hatását teszteltük Huntington kór és Alzheimer kór (amiloid- β túltermelő) modellekben is.

3, Az aggregációs vizsgálatokat egy *UAS-HTT.96Q.Cerulean* transzgén expresszálo törzs felhasználásával, **konfokális mikroszkópiás** módszerrel végeztük el. A mikroszkópos képek **kiértékelése ImageJ Fiji software**-rel ROI manager segítségével történt.

4, A *Yod1* molekuláris hatásainak megismeréséhez különböző genotípusú muslicákból **RNS-t izoláltunk**, majd **RNS szekvenáló könyvtárakat hoztunk létre**, melyeket Illumina short-read szekvenálásnak alávetve **RNS szekvenáláson** alapuló **transzkriptomikai analízist** végeztünk. A szignifikáns expressziós változást mutató géneket DESeq2 programmal azonosítottuk, az egyes genotípusokban differenciáltan expresszált gének csoportjain FlyEnrichr programmal végeztünk dúsulás analízist.

Fontosabb eredmények, tézispontok

1, A genetikai interakciós tesztek során a *Yod1* túltermelése (*Yod1[EY07831]*) és az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsendesítése (*Usp1[JF02992]*) javította a *mHtt* által kiváltott beteg fenotípusokat.

Kísérleteink során 32 deubikvitiáz hatását vizsgáltuk meg a *Drosophila* Huntington-kór modelljében, amely során a *Yod1* túltermelése és az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsendesítése javította az állatok életképességét, motoros képességeit, megnövelte a medián élettartamukat és csökkentette a neurodegeneráció mértékét. Az *Usp1* esetében az eredményt független funkcióvesztéses mutáns alléllal (*Usp1[c05664]*) nem sikerült validálni.

2, A *Yod1* túltermelésének hatására bekövetkező pozitív hatásokat sikeresen validáltuk.

A *Yod1* túltermelés hatásainak validálásának céljából létrehoztunk egy *UAS-Yod1.flag* konstrukciót és *Drosophila* embriókba injektáltattuk. Az így létrehozott törzsben a *Yod1* túltermelése a GAL4-UAS expressziós rendszer szabályozása alatt valósult meg. A *Yod1.flag* törzssel megismételt kísérletek megerősítették a *Yod1* túltermelésének pozitív hatásait HD modellünkben. QPCR kísérletekkel igazoltuk a *mHtt* transzgen változatlan expresszióját a *Yod1*-et túltermelő állatokban a kontroll HD állatokhoz viszonyítva.

3, A *Yod1* túltermelésének nincs negatív hatása az egészséges állatok fenotípusára.

Annak vizsgálatára, hogy a *Yod1* túltermelésének van-e hatása az egészséges állatokra, a *Yod1[EY07831]* allélt és a *Httex1.Q25* transzgén hordozó állatokkal genetikai interakciós tesztekét végeztünk. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *Yod1* túltermelése nem indukál neurodegenerációs folyamatokat és nem befolyásolja az egészséges állatok fenotípusait.

4, A *Yod1* túltermelése vegyes hatással bír az Alzheimer-kór *Drosophila* modelljében.

A YOD1 deubikvitináz túltermelésének hatását az Alzheimer-kór (AD) amiloid- β fehérjét termelő *Drosophila* modelljében vizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatják, hogy az AD állatok életképességét kis mértékben rontja, a medián élettartamot szignifikánsan javítja, a mozgási képességekre nincs hatással, a neurodegenerációt pedig fokozza a *Yod1* túltermelése. Ebből arra következtethetünk, hogy a *Yod1* túltermelésének hatása specifikus a Huntington-kór patogenezisére.

5, A *Yod1* túltermelése megnöveli a nagyméretű aggregátumok arányát HD állatokban.

Az aggregációs vizsgálatokat egy *UAS-HTT.96Q.Cerulean* transzgén hordozó törzssel végeztük el. A *Yod1* túltermelése nem befolyásolta az egy sejtre jutó átlagos aggregátum számot, azonban a 2 μm -nél nagyobb aggregátumok száma szignifikánsan megnőtt a *Yod1*-et túltermelő HD állatokban a kontroll HD állatokhoz képest. A nagyméretű aggregátumok kevésbé toxikusak, mint a kisebb mHTT oligomerek, így azok megjelenése menekítő hatású lehet a mHTT toxicitásával szemben.

6, Transzkriptomikai eredmények.

A *Yod1* túltermelésének hatására 43%-kal csökkent a HD állatokban diszregulált gének száma, a kontroll HD állatokhoz képest. A HD állatokban diszregulált gének, melyeknek az expressziója helyreállt a *Yod1* túltermelésének hatására olyan biológiai folyamatokhoz köthetőek, mint az antimikrobiális védekezés, fehérjeszintézis, fehérje metabolizmus, vezikuláris transzport, neuronális fejlődés és plaszticitás, protein modifikáció, fény stimulusra adott válaszreakció.

A *Yod1*-et túltermelő muslicák mintáiban, és a HD muslicák mintáiban azonosított diszregulált gének között szignifikáns átfedést tapasztaltunk, emellett a *Yod1*-et túltermelő állatokban olyan gének megváltozott expresszióját is detektáltuk, melyek HD adatbázisokban

megtalálhatóak. Ebből arra következtettünk, hogy a YOD1 olyan molekuláris folyamatokat befolyásol, amire a mHTT is hatással van.

A *Yod1*-et túltermelő HD állatokban olyan gének megváltozott expresszióját is detektáltuk, melyek a HD állatokban nem voltak diszreguláltak, ezek megváltozott expressziója válaszreakció lehet a mHTT által kiváltott patogenezisre.

Összefoglalás

Munkánk során 32 deubikvitináz gén hatását vizsgáltuk a Huntington-kór *Drosophila* modelljében. Azonosítottuk a YOD1 deubikvitinázt, melynek túltermelése javítja a mutáns *Huntingtin* által kiváltott fenotípusokat. Az Alzheimer-kór amiloid- β_{1-42} peptid termelésén alapuló *Drosophila* modelljében nem tapasztaltuk a *Yod1* túltermelésének pozitív hatásait, így elmondhatjuk, hogy a *Yod1* hatása specifikus a HD patológiájára. A *Yod1* túltermelésével megnőtt a nagyméretű mHTT aggregátumok aránya a HD állatokban, ami menekítő hatású lehet a HD patogenezise során.

A transzkriptomikai analízis során azt tapasztaltuk, hogy a *Yod1* túltermelése a HD állatokban fellépő transzkripciós zavar jelentős enyhülését eredményezte. A *Yod1*-et túltermelő állatok mintáiban olyan gének megváltozott expresszióját is kimutattuk, melyek a HD adatbázisokban is megtalálhatóak. Ezen eredmények, illetve a *Yod1* állatokban és a HD állatokban tapasztalt transzkripciós változások nagymértékű átfedése alapján elmondható, hogy a *Yod1* olyan molekuláris útvonalakat befolyásol, melyek szerepet játszanak a HD patogenezisében. A *Yod1* túltermelésének hatására számos gén expressziója megváltozott HD állatokban, mintegy válaszreakció a mHTT toxikus hatására.

Összességében elmondhatjuk, hogy a *Yod1* túltermelésével sikeresen szupresszáltuk a humán mHTT exon1 fragmentje által okozott fenotípusokat, ezért a YOD1 egy potenciális terápiás célpont lehet a Huntington-kór kezelésében.

Summary

In our work, we investigated the effects of 32 deubiquitinase genes in a *Drosophila* model of Huntington's disease. We identified the YOD1 deubiquitinase, whose overexpression suppressed the mutant huntingtin-induced phenotypes. In a *Drosophila* model of Alzheimer's disease, which is based on the production of the amyloid- β_{1-42} peptide, we did not observe positive effects of *Yod1* overexpression, suggesting that the effect of *Yod1* is specific for HD pathology. *Yod1* overproduction increased the ratio of large mHTT aggregates in HD animals, which may play a protective role in the pathogenesis of HD.

In transcriptomic analysis, we found that overexpression of *Yod1* resulted in a significant attenuation of the transcriptional dysregulation in HD animals. The high overlap between the dysregulated genes in *Yod1*-overexpressing animals and HD animals, as well as the enrichment of genes, which were differentially expressed in *Yod1* flies, in HD datasets suggest that *Yod1* affects molecular pathways that are involved in the pathogenesis of HD. *Yod1*-overexpression resulted in altered expression of several genes in HD animals, which genes might participate in the cellular response to the toxic effects of mHTT.

Overall, we conclude that overexpression of *Yod1* successfully suppressed the phenotypes caused by the exon1 fragment of human mHTT, therefore it could be a potential therapeutic target for the treatment of Huntington's disease.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10034386

A doktori eljárás alapját képező két közlemény:

- **Farkas A**, Zsindely N, Nagy G, Kovács L, Deák P, Bodai L. The ubiquitin thioesterase YOD1 ameliorates mutant Huntingtin induced pathology in Drosophila. Sci Rep. 2023 Dec 11; 13 (1): 21951. doi: 10.1038/s41598-023-49241-8

IF: 4,6

- Zsindely N, Nagy G, Siági F, **Farkas A**, Bodai L. Dysregulated miRNA and mRNA Expression Affect Overlapping Pathways in a Huntington's Disease Model Int J Mol Sci. 2023 Jul 26;24(15):11942. doi: 10.3390/ijms241511942.

IF: 5,6

Egyéb tudományos közlemények:

- Faragó A, Zsindely N, **Farkas A**, Neller A, Siági F, Szabó M. R, Csont T, Bodai L. Acetylation State of Lysine 14 of Histone H3.3 Affects Mutant Huntingtin Induced Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2022 Dec 2;23(23):15173. doi: 10.3390/ijms232315173.

IF: 5,6

- Faragó A, Ürmösi A, **Farkas A**, Bodai L. The histone replacement gene His4r is involved in heat stress induced chromatin rearrangement. *Sci Rep.* 2021 Mar 1;11(1):4878. doi: 10.1038/s41598-021-84413-4.

IF: 4,997

- Csernetics Á, Tóth E, **Farkas A**, Nagy G, Bencsik O, Vágvölgyi Cs, Papp T. Expression of Xanthophyllomyces dendrorhous cytochrome-P450 hydroxylase and reductase in *Mucor circinelloides*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015 Feb;31(2):321-36. doi: 10.1007/s11274-014-1784-z. Epub 2014 Dec 11

IF: 1,532

- Nagy G, **Farkas A**, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Papp T. Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol.* 2014 Apr 14:14:93. doi: 10.1186/1471-2180-14-93.

IF: 2,729

Összesített impakt faktor: 25,058

Szerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Zsindely Nóra (első szerző) és Dr. Bodai László (felelős szerző, témavezető) a társ szerzőkkel (Siági Fruzsina, Nagy Gábor) kijelentjük, hogy Farkas Anita doktorjelölt disszertációjához felhasznált „*Dysregulated miRNA and mRNA Expression Affect Overlapping Pathways in a Huntington's Disease Model Int J Mol Sci. 2023 Jul 26;24(15):11942. doi: 10.3390/ijms241511942.*” című közlemény létrehozásához a jelölt jelentős mértékben hozzájárult a mir-10, mir-137 és mir-219 miRNS-ek vizsgálata során elvégzett neurodegenerációs vizsgálatokkal, továbbá az nem került más fokozatszerzési eljárásban felhasználásra.

Szeged, 2024. május 22.

.....

Dr. Bodai László

(felelős szerző, témavezető)

Tanszékvezető egyetemi docens

SZTE TTIK Biokémiai és

Molekuláris Biológiai TSZ

.....

Dr. Zsindely Nóra

(első szerző)

Adjunktus

SZTE TTIK Genetika TSZ

.....

Siági Fruzsina (társ szerző)

.....

Nagy Gábor (társ szerző)