

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

Doktori értekezés

Farkas Anita

Témavezető: Dr. Bodai László

tanszékvezető egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1. Neurodegeneratív betegségek:	7
1.1.1. A Huntington-kór:	7
1.1.2. Az Alzheimer-kór:	11
1.2. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer	14
1.2.1. A deubikvitinázok	16
1.3. Állatmodellek a Huntington-kór tanulmányozásában	21
1.3.1. <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
1.3.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	22
1.3.3. Az egérmodellek	26
2. Célkitűzések	29
3. Anyagok és módszerek	31
3.1. A kísérletek során felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek és fenntartásuk	31
3.2. Életképességi vizsgálatok	33
3.3. Élettartam vizsgálatok	35
3.4. Mozgási képesség vizsgálata	35
3.5. Neurodegeneráció vizsgálata	35
3.6. Aggregációs vizsgálatok	36
3.7. RT-qPCR mérések	37
3.8. <i>UAS-Yod1.flag</i> transzgenikus legyek létrehozása	38
3.9. Western blot (transzgenikus törzsek validálása)	39
3.10. Transzkriptomikai analízis	40
3.10.1. A kísérlethez szükséges keresztezések sémája és az előállított utódok:	40
3.10.2. RNS szekvenáló könyvtárak létrehozása és szekvenálásuk	41
4. Eredmények és értékelésük	43
4.1. DUB mutációknak a mutáns Huntingtin által kiváltott patológiás	
fenotípusokra gyakorolt hatásának vizsgálata	43
4.1.1. A DUB gének hatása a HD muslicák életképességére	43
4.1.2. A DUB gének hatása a HD muslicák élettartamára	45
4.1.3. DUB gének hatása a HD muslicák motoros aktivitására	47

4.1.4.	DUB gének hatása a HD muslicák fotoreceptor neuronjainak degenerációjára	48
4.2.	A <i>Yod1</i> túltermelése javítja HD legyek fenotípusát	50
4.2.1.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása a HD muslicák életképességére.....	51
4.2.2.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása a HD legyek élettartamára.....	52
4.2.5.	A <i>UAS-Httex1.Q120</i> expressziójának vizsgálata <i>Yod1</i> transzgén jelenlétében	54
4.3.	A <i>Yod1</i> túltermelés hatása a vad típusnak megfelelő <i>Httex1.Q25</i> transzgént expresszáló állatok fenotípusára	55
4.3.1.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása egészséges állatok életképességére.....	55
4.3.2.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása egészséges állatok élettartamára	56
4.3.3.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása egészséges állatok motoros képességeire..	56
4.3.4.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása egészséges fotoreceptor neuronokra	56
4.4.	A <i>Sb</i> marker hatásának vizsgálata HD állatok fenotípusára	58
4.5.	A <i>Yod1</i> túltermelésének vizsgálata Alzheimer-kór modellben.....	59
4.5.1.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása AD muslicák életképességére	59
4.5.2.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása AD muslicák élettartamára.....	60
4.5.3.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása AD muslicák motoros képességeire.....	61
4.5.4.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása AD muslicák neurodegenerációs folyamataira.....	62
4.5.5.	Az <i>UAS-Abeta1-42</i> transzgén expressziójának ellenőrzése a <i>Yod1</i> -et túltermelő állatokban.....	62
4.6.	A <i>Yod1</i> túltermelésének hatása a mHTT aggregátumok képződésére	63
4.7.	Transzkriptomikai változások mHtt okozta stressz körülmények között és a <i>Yod1</i> túltermelés hatására	65
4.7.1.	A transzkriptomikai vizsgálatok összefoglaló eredményei	65
4.7.1.	A <i>mHtt</i> által kiváltott transzkriptomikai változások	68
4.7.2.	A <i>Yod1</i> gént túlműködtető muslicákban végbemenő transzkripcionális változások.....	68
4.7.3.	A <i>Yod1</i> túltermelése által kiváltott transzkripcionális változások HD állatokban	69
5.	Diszkusszió.....	72
6.	Irodalomjegyzék.....	75
7.	Tartalmi összefoglaló	94
8.	Summary.....	97
9.	Köszönetnyilvánítás	100
10.	Publikációs lista	101

11.	Függelék	102
------------	-----------------------	------------

Rövidítések jegyzéke

AAA: ATPases Associated with diverse cellular Activities

ATXN3: Ataxin3

ATXN3L: Ataxin like3

ATP: Adenosine triphosphate

AD: Alzheimer disease

APP: Amyloid-beta precursor protein

BAC: Bacterial artificial chromosome

BAP: BRCA-associated protein

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BRCA: Breast cancer susceptibility genes

CFP: Cerulean fluorescence protein

CP: Core particle (20S proteaszóma alegység)

CSN5: COP9 signalosome subunit5

CSN6: COP9 signalosome subunit6

DNS: Deoxiribonukleinsav

DUB: Deubiquitinase

EDTA: Ethylenediamine-tetraacetic acid

ER: Endoplasmic reticulum

ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation

FDA: Food and Drug Administration

GFP: Green fluorescent protein

Gly: Glycine

HD: Huntington's disease

HDh: Huntington's disease homolog

HSP: Heat shock protein

Htt: Huntingtin (gén)

HTT: Huntingtin (fehérje)

JAK-STAT: Janus kinase/signal transducer and activator of transcription

JAMM: JAB1/MPN/Mov34 metalloenzimek

JOSD: Josephin domain-containing protein

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MBD: Membrane biding domain

***mHtt*:** mutant huntingtin (gén)

MINDY: MIU-containing novel DUB family

MPN domén: Mpr1, Pad1 N-terminális domén

NF- κ .B: Nuclear factor *kappa*-light-chain-enhancer of activated B cells

OTU: OTU domain containing proteases

PD: Parkinson's disease

PCR: Polymerase chain reaction

PrP: Prion protein

RISC: RNA-induced silencing complex

RNáz: Ribonikleáz

RNS: Ribonukleinsav

RP: Regulatory particle

Rpn: Regulatory particle non-ATPase

Sb: Stubble

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

UAS: Uptream activating sequence

Ub: Ubikvitin

UCH: Ubiquitin C-terminal hydrolase

UPS: Ubiquitin-proteasome system

USP: Ubiquitin specific proteases

ZUFSP: Zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein

UBP: Ubiquitin binding protein

VEGF: vascular endothelial growth factor

WNT: Wingless and Int

YAC: Yeast artificial chromosome

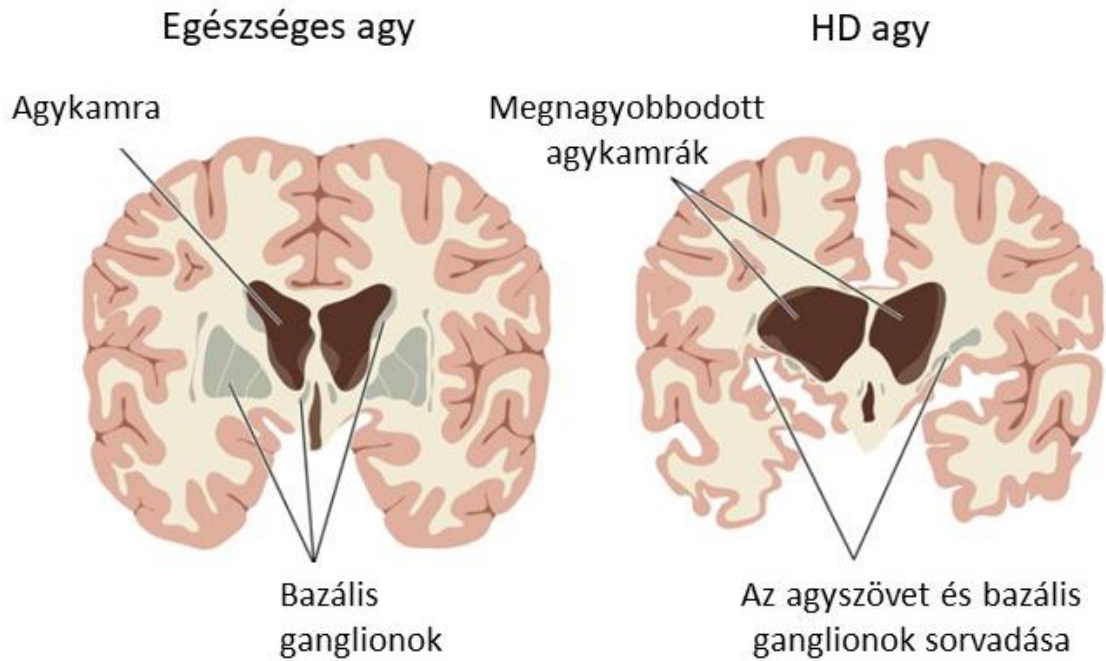
1. Irodalmi áttekintés

1.1. Neurodegeneratív betegségek:

A neurodegeneratív rendellenességek széles körben elterjedt örökletes vagy sporadikus megjelenésű betegségek, melyeket klinikai megjelenésük alapján osztályozzák. Általában kognitív és viselkedési zavarok, valamint gyakran specifikus fehérje felhalmozódás jellemző rájuk. Ilyen fehérje felhalmozódás figyelhető meg például az Alzheimer-kór (amiloid- β aggregátumok), a Parkinson kór (alfa-synuclein), a Creutzfeldt-Jakob kór (PrP) és a Huntington kór (Htt aggregátumok) esetében is ¹. Közös jellegzetességük továbbá a mitokondriális funkciók sérülése, az érintett agyterülettől függően progresszív neuronális diszfunkció, oxidatív stressz, proteotoxikus stressz, és az ezzel járó ubikvitin-proteaszóma rendszer valamint az autofagoszóma/lizoszóma rendszer működési zavara. A betegségek korai diagnosztizálására szolgáló megbízható biomarkerek keresése a mai napig intenzív kutatások részét képezi ²⁻⁷.

1.1.1. A Huntington-kór:

A Huntington-kór (HD) egy progresszív, dominánsan öröklődő neurodegeneratív betegség, melynek kezdeti tünetei általában 30-50 éves korban jelentkeznek és a tünetek megjelenését követően átlagosan 18 éven belül a beteg halálához vezetnek ^{8,9}. A Huntington-kórt önálló betegségként George Huntington írta le 1872-ben, akkor még chorea-ként említve. A chorea elnevezés a vítustáncra utal, melyet az akaratlagos izmokat érintő görcsös mozgás jellemez ¹⁰. A motoros tünetek mellett kognitív zavarok, demencia, szellemi leépülés, pszichiátriai problémák jellemzőek, a betegek gyakran szoronganak, depresszióban szenvednek ¹¹. További tünetként előfordulnak hallucinációk, ingerlékenység, következtelen szemmozgások, egyensúly- és járászavarok, késleltetett reakcióidő, általános gyengeség, beszédhibák. Ezek a tünetek hosszabb távon jelentős súlycsökkenéshez, járás- és beszédképtelenséghez vezetnek, végül a mindennapi tevékenységek önálló elvégzése lehetetlenné válik ¹². A betegségre jellemző a striátum közepes tüskés neuronjainak és a nagyagykéreg neuronjainak pusztulása ¹³ (1. ábra. ¹⁴).



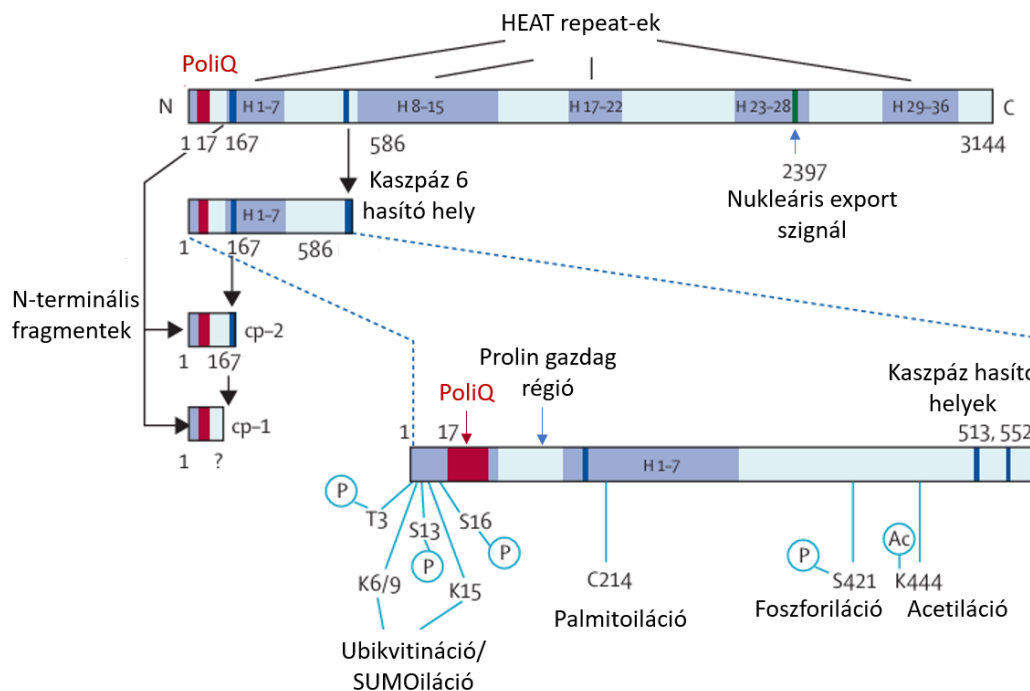
1. ábra. Az egészséges és HD agy keresztmetszeti ábrája. (Tanese, 2017 alapján ¹⁴)

A betegség a 4. kromoszómán található *huntingtin* (*Htt*) gén mutációjára vezethető vissza ^{15,16}. Az egészséges *Htt* gén első exonjában 9-35 CAG ismétlődés található. Az ennél hosszabb CAG ismétlődést hordozó génről képződő fehérje N-terminális része egy kóros poliglutamin expansziót tartalmaz ⁸. A CAG ismétlődések száma és a betegség időbeli megjelenése között szoros összefüggés van. Minél hosszabb CAG repeat található a *Htt* génben, annál fiatalabb korban jelentkeznek a kezdeti tünetek. Az esetek többségében a mutáns *Htt* (*mHtt*) heterozigóta formában van jelen, de feljegyeztek homozigóta eseteket is, ez a tünetek megjelenésének idejét nem befolyásolta. Ezek a klinikai esetek azt mutatják, hogy a *mHtt* génről képződő fehérje el tudja látni az élethez nélkülözhetetlen funkcióit ¹⁷. Egérkísérletekben a *Htt* gén teljes funkcióvesztése embrionális letalitást okozott ¹⁸, vagyis működése elengedhetetlen az embrionális fejlődés során. Egyik kópiájának deléciója nem okoz HD fenotípust ¹⁹, de ha egy *mHtt* gént vagy *mHtt* gén fragmentet bejuttattak egy egészséges egérgenomba, mely két vad típusú *Htt* allélt hordozott, jelentkeztek a jellegzetes HD tünetek ²⁰⁻²². Mindezek alapján úgy tűnik, hogy magát a betegséget nem a HTT fehérje működésének hiánya, hanem a mHTT mutáns funkció nyerése okozza.

A *Htt* gén egy 348 kDa méretű fehérjét kódol. Leginkább tanulmányozott része az N-terminális régiója, amely a poliglutamin ismétlődést hordozza. Ezt megelőzi egy 17 aminosavas szakasz, illetve közvetlen utána következik egy prolin gazdag régió. A poliQ és prolingazdag

régió nagy változatosságot mutat a humán populációban. A HTT fehérje egy HEAT repeat-ekből felépülő fehérje, mely számos kaspáz hasító helyet és poszttranszlációs módosító helyet hordoz ^{9,23,24} (2. ábra²⁵). A HEAT repeat motívumok két antiparallel alfa hélixből és az őket összekötő hurok régióból állnak, feladatuk a fehérjék rugalmasságának biztosítása. Elnevezésük négy funkcionálisan jellemzett fehérje után történt melyekben azonosították őket (Huntingtin, Elongation Factor 3, Protein phosphatase 2A, TOR1) ²⁶.

A vad típusú HTT fehérje több fontos funkciót is betölt. Kölcsönhat transzkripciós faktorokkal, szerepet játszik a transzkripció szabályozásában, például a BDNF (agyi eredetű neurotrop faktor) termelésében, ezáltal fontos szerepet tölt be a neuronok életének szabályozásában²⁷. Kapcsolatban áll az endo-exocitózis rendszerrel, így szerepe van a szinapszisok működésében, emellett a dynein, kinesin fehérjékkel is kapcsolatban áll és szerepe van az axonális transzportban. Mindezeket figyelembe véve, fontos funkciója lehet az agy fejlődésében és homeosztázisának fenntartásában ^{9,28,29}.



2. ábra. A HTT fehérje sematikus képe és poszttranszlációs módosításai. (Ross, 2011 alapján ²⁵)

A mHTT patológiás hatását valószínűleg a még nem aggregálódott szolubilis mHTT oligomerek és az aggregátumai együtt határozzák meg. A mHTT korai transzkripciósz zavart, szinaptikus diszfunkciót, proteaszóma diszfunkciót, oxidatív károsodást, mitokondriális diszfunkciót, extraszinaptikus excitotoxicitást vált ki ²⁸. A vad típusú HTT a citoplazmában lokalizálódó, szolubilis fehérje, melyeknek nagyjából a fele membrán-asszociált (plazmamembrán, endoszómák, endoplazmatikus reticulum (ER)), illetve szinaptikus helyek közelében helyezkedik el. Kimutatták, hogy nagy affinitást mutat a foszfatidil-inozitol-foszfátokhoz, így a membránok foszfolipidjeivel való interakciókon keresztül hatással van a membránok működésére ²⁴. Ahogy a vad típusú HTT, úgy a mHTT is direkt kapcsolódik a mitokondriumok külső membránjával, de utóbbi zavart okoz annak működésében ³⁰ és indukálja a mitokondriális fragmentációt ³¹.

Ahogy a szolubilis mHTT oligomerek, úgy az aggregálódott mHTT is befolyással van az idegsejtekben folyó élettani folyamatokra. A citoplazmatikus aggregátumok úgynevezett mag-héj szerveződést mutatnak. Az aggregátumok szerveződése során először kialakul a polyQ aggregátum mag, majd a perifériáján (héj) kölcsönhatásokat alakít ki citoplazmatikus fehérjékkel ³² és organelumokkal ³³. Az aggregátumok perifériáján lévő ER is szerkezeti változásokat mutat, úgynevezett rozetták alakulnak ki, melyek fehérje felhalmozódást jeleznek SER-ben. ER fehérjék nincsenek az aggregátumokban, vagyis ER fehérjéket nem köt meg, de átrendeződést vált ki az ER hálózatban. Az aggregátumok perifériáján kimutatták pl. a BiP chaperont, ami az ER fő stressz fehérjéje. Az ER működésének ilyen mértékű zavarása citotoxikus a sejtekre nézve ³³.

Az utóbbi években egyre több genetikai betegség kapcsán kaptak lehetőséget a génterápiás módszerek, így a HD-nál is biztató kísérletek folynak ezzel kapcsolatban. Több ilyen törekvés is folyamatban van. Az antiszensz oligonukleotidok alkalmazásával mRNS szinten csökkenthető a képződő mHTT, a keletkező DNS-RNS hibridben az mRNS degradációja a nukleáris RNáz H-val valósul meg ²³. A legújabb tanulmányok szerint korai HD pácienseknél pozitív hatást tudtak kimutatni a tominersen nevű antiszensz oligonukleotidokon alapuló terápiás szerrel. A Tominersen tesztelése jelenleg a második klinikai fázisban van ³⁴. Törekvések vannak siRNS általi géncsendesítésre, ami hasonló az előző technikához, de a dupla szálú RNS degradációja a RISC komplex segítségével valósul meg. Ez az eljárás a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában van. A génterápiás eljárások közül a cink-ujj terápia tűnik eddig a legbiztatóbbnak, szintén a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában van. Pozitívuma, hogy a kísérletek során a mHTT szintjét közel 50%-kal csökkentette, a vad típusú

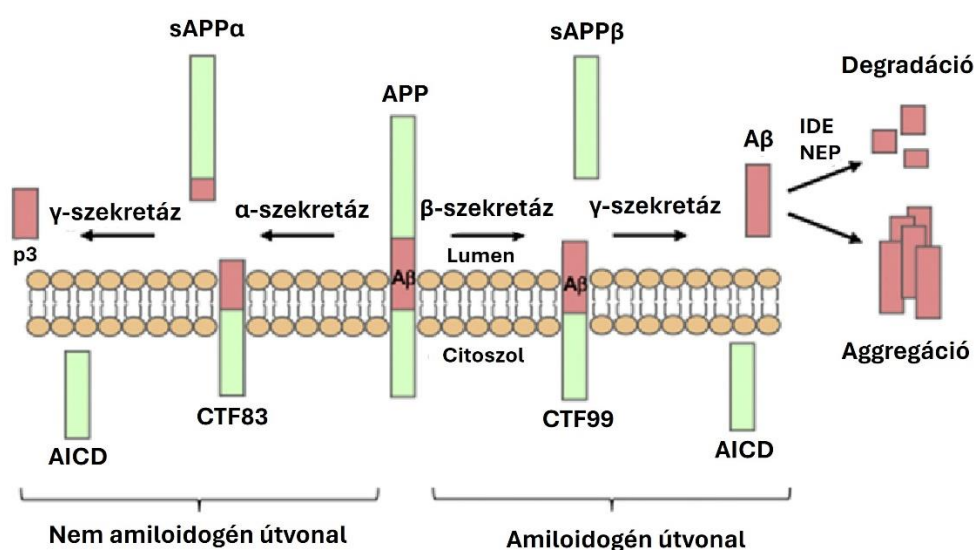
HTT szintje viszont változatlan maradt ³⁵. A cink-ujj fehérjék mesterséges fúziós fehérjék, melyek kétféle feladatot ellátó egységgel rendelkeznek. Egyrészt fel kell ismerniük egy meghatározott DNS szakaszt, ezt 3-4 cink-ujj fehérje motívum biztosítja. Másrészt hordoz egy funkcionális domént, ami a biológiai aktivitásáért felelős. Ez a domén lehet pl. DNS-t hasító nukleáz, vagy génexpressziót szabályozó transzkripció faktor. A folyamat lényeg az, hogy csökkentik a célzott gén expresszióját. Hátránya a cink-ujj fehérjéknek, hogy nem elég kiszámíthatóak, nehéz megakadályozni, hogy más génekhez is kötődjenek ^{36,37}. Az őssejtterápiában is vannak lehetőségek, egerekben sikerült őssejteket differenciáltatni tüskés neuronokká, ami az elpusztult idegsejtek pótlására lehetne megoldás, de fenotípusos javulást nem tapasztaltak ^{38,39}. Bár reményt adnak a génterápiás módszerekben rejlő lehetőségek, valódi gyógymódot ezidáig nem sikerült találni, csupán tüneti kezelések érhetőek el. Ezek leginkább antipszichotikumok, antidepresszánsok, valamint a chorea típusú mozgások gátlására szolgáló tetrabenazin ¹².

1.1.2. Az Alzheimer-kór:

Az Alzheimer-kór (AD) a legismertebb, demenciával járó neurodegeneratív kórkép, ami jellemzően 65 éves kor felett alakul ki. Általában sporadikus megjelenést mutat, de előfordulnak familiáris, öröklődő formák, melyeknél jóval korábban mutatkoznak a betegség jelei. Jellegzetes tünetei a kognitív zavarok, memóriavesztés, a tájékozódás képességének elvesztése, az új információk megjegyzésének nehézsége, viselkedésbeli változások, ami főleg agresszióban, ingerlékenységben nyilvánul meg. Kialakulását genetikai faktorok mellett környezeti tényezők is befolyásolják, mint a stressz, alvászavarok, az életmód (pl. dohányzás, fizikai aktivitás), egyéb betegségek mint a diabétesz, elhízás és a kardiovaszkuláris betegségek ^{2,40}.

A kutatások középpontjában a genetikai mutációk következtében kialakuló formák állnak, melyek az *amiloid béta prekursor protein* (APP) és *presenilin* (PS) géneket érintik ¹. Az Alzheimer-kór neuropatológiai tünetei közé tartozik az amiloid plakkok megjelenése az agyban, melynek kialakulásáért az APP protein processzálása során képződő amiloid- β peptid felhalmozódása a felelős. Az APP transzmembrán glikoprotein feldolgozása során keletkező proteinek kritikusak a normál szinaptikus plaszticitáshoz, a memória kialakításában ⁴¹ és feltételezések szerint fontos szerepük van a neuronok védelmében az öregedés során ⁴². Az APP-t a nem amiloidogén útvonalon az α -szekretáz hasítja el az amiloid- β szekvenciáján belül,

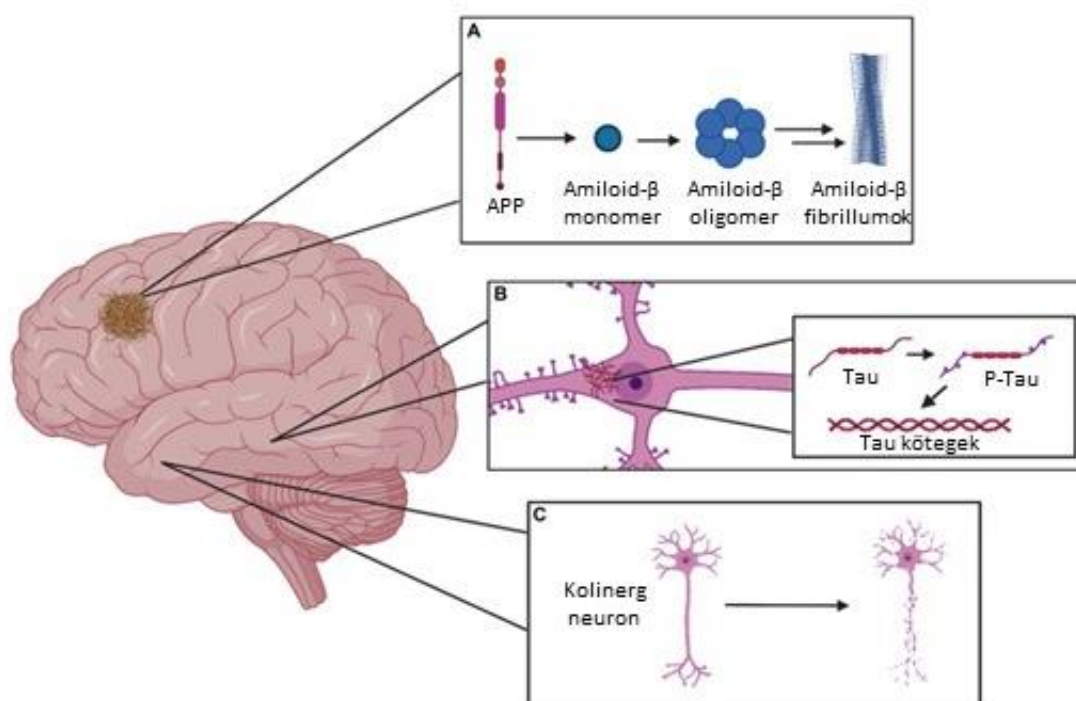
így kizárja az amiloid- β képződését. Így keletkezik egy sAPP α (α -szekretált APP) és egy CTF83 közttermék (83 aminosavas karboxiterminális fragment). A CTF83 további hasítását a γ -szekretáz végzi, így keletkezik a P3 és az AICD (APP aminoterminális intracelluláris doménje) fragment. Az APP amiloidogén útvonalon történő processzálása során a β -szekretáz hasítja el az amiloid- β szekvencián kívül, így amikor a sAPP β (β -szekretált APP) mellett keletkező CTF99 (karboxiterminális fragment 99) köztterméket a γ -szekretáz elhasítja, az AICD mellett létrejön az amiloid- β peptid (3. ábra) ^{43,44}. Az amiloid- β_{1-42} kevésbé oldható peptid és képes plakkokat képezni ^{45,46}. Egészséges körülmények között az amiloid- β_{1-42} a keletkező amiloid- β peptidek csupán 10%-át teszik ki, amit downstream proteázok elbontanak. Az APP génben történő mutációk fokozzák a beteg forma képződését ⁴⁷. A γ -szekretáz komplex Presenilin transzmembrán alegysége (PS1 és PS2) aktívan részt vesz az APP processzálásában, így a *presenilin* génekben történő mutáció a γ -szekretáz funkcionális zavarát okozza, ami számos downstream szignalizációs útvonalat érint. A nem megfelelően működő γ -szekretáz nem képes hasítani az APP fehérjét, ami egy részlegesen emésztett amiloid- β peptid keletkezéséhez vezet. Ez az APP gén mutációjával megegyező fenotípust okoz ^{48,49}.



3. ábra. Az APP protein processzálásának sematikus ábrája. (Salminen 2013. alapján⁴⁴)

Az Alzheimer-kór másik jellegzetes neuropatológiai tünete az abnormálisan hiperfoszforilált tau fehérje által alkotott intracelluláris filamentum hálózatok ⁵⁰. A tau fehérje

a mikrotubulusok összeszerelésében és fenntartásában játszik kritikus szerepet. A hiperfoszforilált tau nem képes a tubulin megkötésére, ami elengedhetetlen a mikrotubulusok összeszereléséhez, viszont az egészséges tau fehérjéhez és a mikrotubulus-asszociált fehérjékhez könnyen kötődik, ezáltal a citoszeletális mikrotubulusokat is megköti és aggregátumokat formál ⁵¹⁻⁵³. Ezen kívül ez a kóros foszforiláció befolyásolja a tau lokalizációját, amivel hozzájárul a szinaptikus diszfunkcióhoz ⁵⁴. Az Alzheimer kór jellegzetes elváltozásai a 4. ábra sematikus képén láthatóak ⁵⁵.



4. ábra. Az Alzheimer-kór okozta elváltozások az agyban. (Madnani, 2023 alapján⁵⁵)

Az Alzheimer kór hasonlóan a többi neurodegeneratív betegségekhez, gyógyíthatatlan, a beteg fokozatos állapotromlásával jár. A tünetek enyhítése céljából gyógyszeres kezelések elérhetőek, mint például a demencia elleni gyógyszerek, illetve a betegség korai stádiumában alkalmazható anti-amiloid antitestek ⁵⁶.

1.2. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer

Az egészséges sejtekben a rossz térszerkezetű, hibás fehérjék, valamint a már szükségtelenné vált fehérjék lebontását az ubikvitin-proteaszóma rendszer végzi, amit több enzimesoport összehangolt működése biztosít. A proteaszómális lebontáshoz a szubsztrátokat egy kis méretű, 76 aminosavból álló ubikvitin (Ub) fehérjével jelöli meg a sejt, amely során az ubikvitin C-terminálisának glicin oldallancán keresztül kovalensen kötődik az adott fehérje lizin aminosav oldallancához. Az Ub a hagyományostól eltérő módon is kapcsolódhat a szubsztrát fehérjéhez tioészterkötéssel cisztein, észterkötéssel szerin- és treonin aminosav oldallancokhoz vagy peptidkötéssel a fehérje N-terminálisának aminocsoportjához ⁵⁷. Az Ub jel nem csak a proteaszómális fehérjelebontáshoz szükséges, általuk számos, a sejt életéhez nélkülözhetetlen folyamat szabályozásra kerül, mint az intracelluláris fehérjetranszport, szignalizációs folyamatok, az autofágia, a transzkripció, transzláció és a DNS károsodásra adott válasz ^{58,59}. Az Ub jel sokféle lehet, így monoubikvitináció történhet a fehérje egyetlen vagy több aminosavmaradékán (ezt multiubikvitinációnak nevezik), illetve poliubikvitináció jöhet létre a célfehérjéhez kapcsolódó Ub további ubikvitinációjával. Az ubikvitin hét belső lizinnel rendelkezik (K6, K11, K27, K29, K33, K48 és K63), attól függően melyik lizinhez kapcsolódik a következő ubikvitin, más más funkciót tölt be a jel. Így például lehet az első ubikvitin 48-as lizinjén (K48), ez a jelzés a proteaszómális lebontásra jelöli ki a fehérjét ⁶⁰, a K63 kapcsolódású ubikvitinlánc kináz kaszkád útvonalakat aktiválhat ⁶¹, a K11 ubikvitináció pedig a sejtciklus során egy alternatív degradációs útvonalat indít el ⁶². Az ubikvitinek a feladatuk ellátását követően visszakerülnek a szabad ubikvitin készletbe ⁶³.

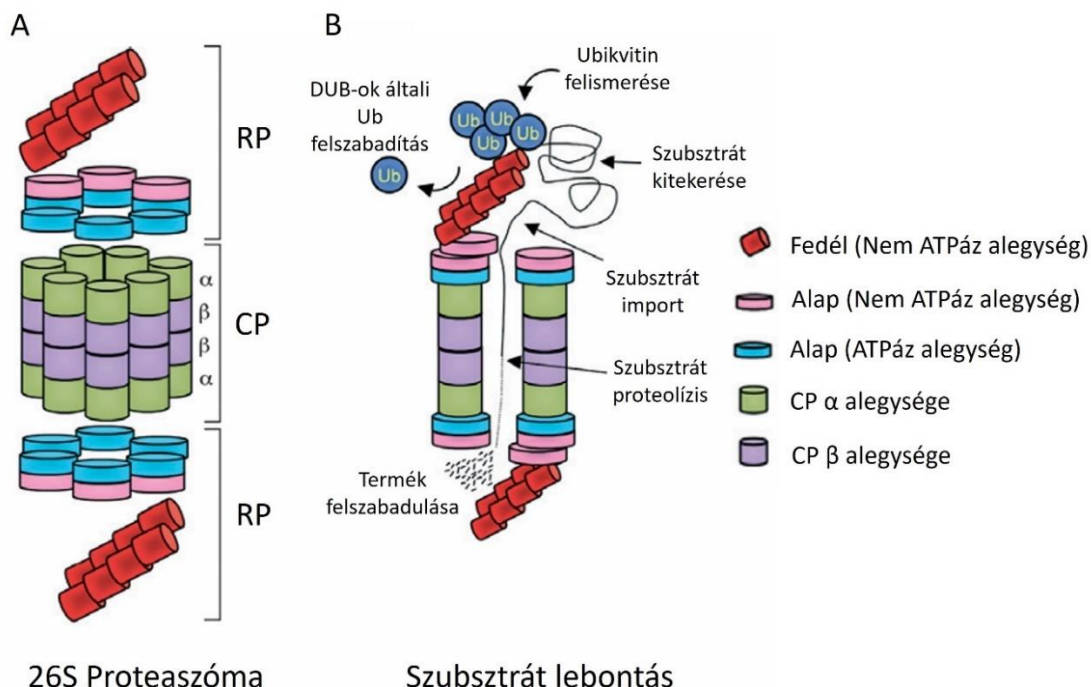
Az ubikvitinek aktiválása minden ubikvitint igénylő folyamat elengedhetetlen lépése, így a fehérjék ubikvitin-függő proteaszómális lebontása során is szükség van rá. Ezt a feladatot az ubikvitin aktiváló enzim (E1) látja el. Az ubikvitin α -karboxil csoportja ATP felhasználásával átmenetileg adenilálódik, majd az E1 enzim tiolészter kötéssel kapcsolódik az ubikvitinhez. Ezt követően az aktivált ubikvitin E1 enzimről egy ubikvitin konjugáló enzimre (E2) (másnéven ubiquitin carrier protein) kerül át transztiolációval ⁶⁴. Az ubikvitináló komplex harmadik tagjai az ubikvitin-protein ligázok (E3), melyek felismerik a szubsztrátot és adaptor funkciót is betöltenek az ubikvitin-E2 komplex és a szubsztrát közötti interakcióban ⁶⁵. Az E2 enzimek is képesek a szubsztrát felismerésére és a megkötésére, így valószínűbb, hogy az E3-mal együttesen végzik el ezt a feladatot ⁶⁴. Retikulocitákkal *in vitro* végzett kísérletek során megfigyelték, hogy bizonyos fehérjék (pl. α -globin) proteolíziséhez elegendő a monoubikvitináció ⁶⁶. Azonban más tanulmányok szerint poliubikvitin jel szükséges a

proteaszómális lebontáshoz ^{67,68}. Egyes elméletek szerint az ubikvitin jel milyensége függhet a fehérje jellegétől. Bizonyos fehérjék érzékenyebbek lehetnek a deubikvitinázokra, melyek az ubikvitineket távolítják el a fehérjékről, így szükség van a poliubikvitin láncra, hogy esélyük legyen eljutni a proteaszómához, valamint a nehezebben denaturálódó fehérjéknek legyen idejük teljesen denaturálódni a proteaszómához kötődve ⁶⁴.

Az ubikvitinekkal megjelölt fehérjéket a proteaszóma köti meg. A 26S proteaszóma egy eukariótákban erősen konzervált, 2,5 MDa tömegű multikatalikus fehérjekomplex, mely a poliubikvitinált fehérjéket kis peptidekre bontja. Két alkomplexumra osztható, a 20S (core particle, CP) alegység biztosítja a katalitikus aktivitást, a 19S (regulatory particle, RP) alegység pedig szabályozó funkcióval bír. A 19S alegység fedél és alap részekre bontható. A fedélt 8 nem ATPáz domén, az alapot 6 homológ AAA ATPáz és 3 nem ATPáz domén alkotja. 8 további nem ATPáz alegység is kapcsolódik az alaphoz, ezek dinamikusan leválnak a proteaszómáról, majd újra kapcsolódnak. A 19S alegység egyik fontos feladata felismerni az ubikvitinált fehérjéket és denaturálni azokat, ugyanis a feltekeredett fehérje nem férne be a proteolitikus csatornába. A másik feladata megnyitni a proteolitikus csatorna felé vezető utat és a kitekert fehérjét továbbítani a megnyitott csatornán keresztül a CP belsejébe ⁶⁹. A 20S CP egy 4 gyűrűből álló hordó alakú struktúra, melyet egyenként 7 alegység alkot. A két belső gyűrű tartalmazza a proteolitikusan aktív helyeket, melyeknek kaspáz-, tripszin- és kimotripszin-szerű aktivitása van ⁷⁰. A fehérje a CP lumenében végtermékké hidrolizálódik mielőtt a következő szubsztrát belépne a csatornába, így egy specifikus fehérjéből előállított peptidek mintázata időben stabil. A proteaszómából 3-23 aminosavas termékek távoznak ⁷¹, amiket a proteaszómán kívüli proteázok és aminopeptidázok bontanak le ^{72,73}. Az UPS leegyszerűsített működése az 5. ábrán látható ⁷⁴.

A Huntington-kór és Alzheimer-kór esetében is kimutatták az ubikvitinek és a proteaszóma 20S core alegységének jelenlétét a mHTT és az amiloid- β aggregátumokban ^{75,76,77}. Ez arra utal, hogy ezeket az aggregálódó fehérjéket ubikvitinekkal megjelöli a sejt a proteaszómális lebontás céljából. A poliglutamin tartalmú aggregálódó fehérjék, mint a mHTT fehérje, bizonyítottan ellenállnak a proteaszóma általi fehérje lebontásnak, ubikvitinált formában felhalmozódnak, ezáltal megakadályozzák az ubikvitinek újrahasznosítását és zavarják a proteaszóma működését ⁷⁸. Alzheimer-kór sejtkultúra modellben igazolták, hogy az amiloid- β aggregátumok jelenlétében csökken a szabad ubikvitinek mennyisége, ami számos fontos folyamat sérülését okozhatja és a neuronok életképességét jelentősen rontja ⁷⁹. Ezek

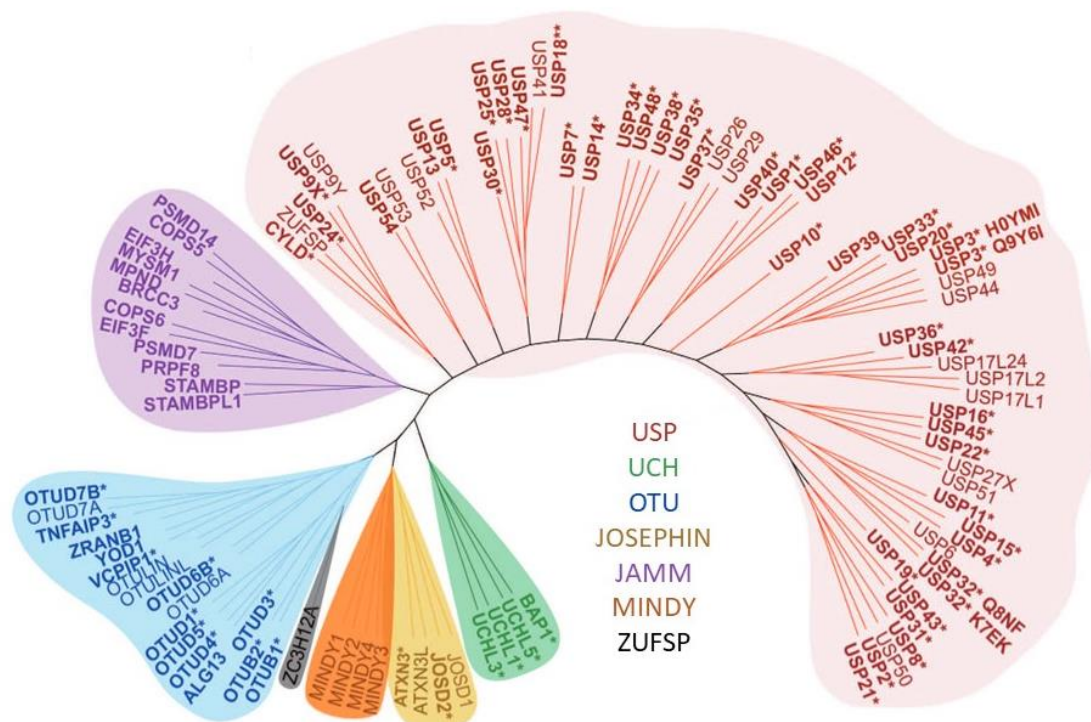
alapján elmondható, hogy a neurodegeneratív betegségek patomechanizmusában szerepet játszik az UPS működésének zavarása.



5. ábra. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer működése. A 26S proteaszóma struktúrája és szerveződése (A) valamint a szubsztrát lebontás sematikus ábrázolása (B). (Sadanandom, 2012 alapján ⁷⁴)

1.2.1. A deubikvitinázok

A fehérjék poszttranszlációs módosításai, mint az ubikvitináció fontos jelként szolgálnak a szerepük betöltéséhez. Az ubikvitin kötődése a fehérjékhez reverzibilis, vagyis ha ellátta a feladatát, felszabadul és újrahasznosul. Az ubikvitint igénylő folyamatok „versengenek” a szabad monoubikvitinekért, melyek véges számban vannak jelen a sejtekben. Ezen kis peptidek eltávolítását a fehérjékről a deubikvitináz (DUB) enzimek végzik, ezáltal kulcsszerepük van az ubikvitinek újrahasznosításában. Így azáltal, hogy a szabad ubikvitin szintet fenntartják, minden olyan folyamatban fontos szerepük van, amihez ubikvitinek is szükségesek. Így például szerepük van a jelátviteli folyamatok szabályozásában, a szinapszisok működésében ⁵⁹, a DNS-hibajavításban, a proteaszómális fehérje degradációban, a fehérjék féléletidejének szabályozásában, a fehérjék lokalizációjában, egyes enzimek aktivitásának szabályozásában és egyes élőlények esetében az ubikvitinek szintézisében. ⁶⁹.



6. ábra. Az aktív humán DUB-ok és felosztásuk. (Pinto-Fernández, 2019 alapján⁸⁰)

Közel 100 humán DUB-ot azonosítottak, melyeket szerkezetük alapján két nagy családba sorolnak. Az egyik családba a papain típusú cisztein proteázok tartoznak, ezen a családon belül a legújabb kutatások szerint hat alcsaládod különíthetünk el. Ide sorolhatóak az ubikvitin specifikus proteázok (USP) 60 humán képviselővel, az ubikvitin C-terminális hidrolázok (UCH) 4 taggal, az ovárium tumor proteázok (OTU) 17 képviselővel, a Josephin alcsalád 4 képviselővel, a nemrég azonosított MINDY alcsalád szintén 4 taggal, valamint a legutóbb felfedezett alcsalád a cink-ujj tartalmú ubikvitin peptidázok (ZUFSPs) egyetlen képviselővel. Egy önálló családot alkotnak a 12 tagot számláló cink-függő JAMM metalloproteázok^{81–83} Az 5. ábrán az aktív humán DUB-ok felosztása látható a tagokkal feltüntetve⁸⁰.

1.2.1.1. Az ubikvitin specifikus proteázok

Az USP család a DUB-ok legnépesebb családja, katalitikus doménjük erősen konzervált, egy cisztein, egy hisztidin és egy aszparaginsav alkotja. Az ubikvitin-szubsztrát izopeptidkötés elhasításához a cisztein nukleofil ágensként működik és biztosítja a reaktív tiol csoportot. A cisztein depolarizálását a hisztidin segíti, majd ezt a hisztidint a triád harmadik tagja polarizálja azáltal, hogy hidrogén kötést képez vele. A nukleofil támadás után egy tioészter

intermedier keletkezik, aminek hidrolízisével regenerálja magát az enzim ⁸⁴. Katalitikus doménjeik mellett egyéb doméneket is hordozhatnak, melyek befolyásolják az aktivitásukat és a lokalizációjukat ⁸⁵. Több képviselőjükben megtalálható egy UBP típusú cink-ujj domén, ami felismeri a Gly-Gly motívumot az ubikvitin szabad C-terminális végén, ez szelektivitást biztosít és fontos az optimális katalitikus aktivitásukért ⁸⁶.

Az USP család tagjai számos, az élethez nélkülözhetetlen folyamathoz köthetőek, mint például az USP1 a DNS repairhez ⁸⁷⁻⁸⁹. Az Usp7 (másnéven Hausp) olyan fontos jelátviteli folyamatokhoz kapcsolódik, mint a MAPK (mitogen-activated protein kinase), a JAK-STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription), a VEGF (vascular endothelial growth factor) és a WNT (wingless) útvonalak ⁹⁰. Kimutatták, hogy az Usp7 deléciója egerekben korai embrionális letalitást okoz, vagyis nélkülözhetetlen az egyedfejlődés folyamán is a proliferáció és differenciálódás során ⁹¹. Ezen kívül a *Drosophila melanogaster*-ben az Usp7 a guanozin 5'-monofoszfát szintetázzal együtt felelős a p53 tumorszupresszor és a H2B hiszton deubikvitinációjáért. Utóbbi kapcsán így fontos szerepe van az epigenetikai géncsendesítésben ⁹².

1.2.1.2. Az ubikvitin C-terminális hidrolázok

Az USP családdhoz hasonló katalitikus triád az UCH családnál is megtalálható azzal a különbséggel, hogy a katalízisben egy glutamin is részt vesz. ⁶⁹. A csoport tagjai között számos igen fontos funkcióval bíró DUB található, mint az UCH-L1, melynek egyik fő feladata az ubikvitinek visszaforgatása az UPS részeként ⁹³. Az egyes ubikvitinek C-terminálisánál hidrolizálva szabadítják fel az ubikvitin monomereket. Az UCH-L1 az agyban lévő fehérjék 1-2 %-t kiteszik, vagyis nagy számban vannak jelen. Több neurodegeneratív betegséggel is összefüggésbe hozták, leginkább hidroláz aktivitásának csökkenését emelték ki Alzheimer-kór és Parkinson-kór esetében ⁹⁴. Leírtak olyan familiáris ritka PD formát, ahol hidroláz aktivitásukban gátolt UCH-L1 formák voltak jelen ⁹⁵. Továbbá a 7-es és a 8-as exont érintő deléciós formák szintén a hidroláz aktivitását gátolják, és egy recesszíven öröklődő neurodegeneratív betegséghez vezetnek (gracile axonal dystrophy), ahol progresszív axonális degeneráció figyelhető meg ⁹⁶. Nemrégiben felfedezték, hogy Ub-Ub ligáz aktivitása is van, ami az alfa-synuclein-Ub konjugátumokhoz képes ubikvitint csatolni a 63-mas lizinen keresztül. Erről azt feltételezik, hogy gátolja a 48-as lizinen történő ubikvitinációt, ezáltal az alfa-synuclein lebomlását, és ezzel elősegíti az alfa-synuclein felhalmozódását és aggregációját

⁹⁷. Ezen kívül rákos sejtvonalakon végzett kísérletekben elősegítette a tumorok progresszióját ⁹⁸.

Az UCH család egy másik képviselője, a BAP1 (BRCA-associated protein1) tumorszuppresszorként ismert, csirkeembriókkal *in vivo* végzett kísérletekben kimutatták, hogy a BAP1 gátolja a tumor növekedését, proliferációját és az angiogenezisét ⁹⁹. Számos tumor esetében kimutatták funkcionális mutáns formáját, ami szintén alátámasztja antitumor hatásait ^{100–103}.

1.2.1.3. Az ovárium tumor proteázok

Az OTU család tagjai ovárium tumor domént tartalmaznak, innen ered az elnevezésük. Katalitikus doménjük erősen konzervált, stabilitását egy hidrogénkötő hálózat teszi lehetővé. Az ubikvitin láncok kötése tekintetében változatos specificitást mutatnak. Közülük hat DUB csak egyféle kötésre specializálódott, így a Cezanne/OTUD7B, Cezanne2 a K11 kötéseket preferálja, míg az OTUD4 és OTUB1 a K48-ra, az OTUD1 a K63-ra, az OTULIN pedig a Met1 kötésre specifikus. Négy OTU DUB kétféle szubsztrátcsoportra specializálódott, az OTUD3 a K6 és K11, az A20 és VCPIP a K11 és K48, az OTUD5 pedig a K48 és K63-mas kötéseket preferálja. A család négy tagja ennél több kötést képes felimerni, ezek az OTUD2 (YOD1), OTUD6A, OTUB2 és TRABID ¹⁰⁴.

Az OTU család tagjai a szignalizációs útvonalak regulátorai, mint az NF- κ B szignalizációs út (A20, Cezanne, OTULIN) ^{105,106}, az interferon szignalizáció (DUBA/OTUD5) ¹⁰⁷, a p97 mediálta folyamatok (YOD1/OTUD2 és VCPIP) ^{108–110} valamint a DNS károsodásra adott válaszok (OTUB1) ¹¹¹.

1.2.1.4. A Josephin család

A Josephin család másik elnevezése az MJD vagy Machado-Joseph Disease domént hordozó proteázok. Nevüket a Josephin katalitikus doménről kapták, melyet mind a négy tagja hordoz. Tagjai cisztein proteázok, a JOSD1, JOSD2 (Josephin domain-containing protein 1 és 2), Ataxin3 (ATXN3), és Ataxin3-like (ATXN3L). Legismertebb képviselőjük az Ataxin3, aminek mutációja okozza a Machado-Joseph neurodegeneratív betegséget, másnéven a spinocerebelláris ataxia 3-mat. Hasonlóan a Huntington-kórhoz, ennél a betegségnél is egy CAG expánzió alakul ki az ATXN3 génben és a róla képződő fehérje aggregátumokat képez ^{112,113}. A Josephin család másik tagja, az ATXN3L DUB potenciális terápiás célpont lehet az

emlőrák kialakulásában, ugyanis emlőrák sejtvonalakon végzett kísérletekben kimutatták, hogy az ATXN3L gátolja a Krüppel-like faktor lebomlását, ami kedvez a rákos sejtek proliferációjának ¹¹⁴.

1.2.1.5. A MINDY család

A MINDY (MIU-containing novel DUB family) egy kevésbé jellemzett új DUB család, melyet K48 kapcsolt ubikvitinekre specifikus cisztein proteázok alkotnak. Mindegyikük hordoz egy helikális struktúrával rendelkező monoubikvitin kötő MIU motívumot (motif interacting with ubiquitin)⁸¹. A MINDY 1 és a MINDY 2 kristányszerkezetét 2021-ben határozták meg ¹¹⁵.

1.2.1.6. A ZUFSP család

Az utolsó cisztein proteáz DUB csoport a ZUFSP, amit egy 2018-as tanulmányban publikáltak, mint hetedik DUB családot. Két ubikvitin kötő domént azonosítottak benne, a ZHA domént (ZFSP helikális karja), amely a disztális ubikvitineket, és egy atipikus UBZ domént ami poliubikvitin láncot köt. Mindkét domén esszenciális a K63 kötött poliubikvitin lánc szelektív hasításához. A ZUFSP a DNS sérüléseknél lokalizálódik, ahol valószínűleg szerepet játszik a genom stabilitási útvonalakban, fontos funkciót tölt be a spontán DNS károsodások megelőzésében, valamint elősegíti a sejtek túlélését az exogén DNS károsodásra adott válaszban játszott szerepével ^{116,117}.

1.2.1.7. A JAMM metalloproteázok

A JAMM domént tartalmazó család katalitikus doménjében egy cink ion foglal helyet, melynek stabilitását egy aszparagin, egy hisztidin és egy szerin biztosítja. A cisztein proteázoktól eltérően, ahol kovalens kötés jön létre a DUB és a szubsztrát között, a JAMM proteázok a cink ionhoz kötött, polarizált vízmolekula segítségével hoznak létre köztiterméket a szubsztráttal hidrogén kötéssel. A cink ion stabilitását a JAMM doménben konzervált aszparagin és két hisztidin biztosítja. Két egyedi inszerciót hordoznak (Ins1 és Ins2), melyek az ubikvitinált szubsztrát felismerésében és megkötésében vesznek részt. Jellegzetes doménjük az MPN (Mpr1/Pad1 N-terminal) domén. Attól függően, hogy JAMM motívumot tartalmaznak-e, a JAMM metalloproteázok két alcsoportba sorolhatóak. A 7 tagot számláló MPN+ csoport rendelkezik cink koordináló JAMM motívummal és izopeptidáz aktivitással (AMSH, AMSH-LP, BRCC36, siF3h, Rpn11, CSN5), míg az 5 tagú MPN- csoportra ezek nem jellemzőek (Abraxas, Abro1, CSN6, aIF3f, Rpn8) ¹¹⁸. Utóbbi csoport minden tagja valamilyen

többalegységes komplex részeit képezik és stabilizálják azokat, de a MPN+ DUB-ok többsége is nagyobb komplexek aktív részei. Például az Rpn8 és Rpn11 a 26S proteasóma^{119,120}, a CSN5 és CSN6 a COP9 szignáloszóma^{13,121}, a BRCA1 és Abro1 a BRISC komplex részét képezik¹²².

A BRCC36 két multiprotein komplex katalitikus alegysége. A BRCA1-A-nak, ami a genom integritását védi a DNS hibajavítás útvonalak szabályozása által, és a BRISC komplexnek, ami a stresszre adott sejtválaszban és az immunregulációban vesz részt, valamint szabályozza a fehérjék lebontását az endoszómális-lizoszómális útvonalakon. Mindkét komplex a K63 kötött ubikvitin láncokra specifikus¹²³. A két komplex közötti legfontosabb összetételbeli különbséget a BRCC36 két scaffold DUB partnere adja, a BRCA1-A-ban az ABRAXAS, míg a BRISC-ben az ABRO1 egészíti ki a BRCC36 működését¹²⁴.

Számos DUB deléciója letális embrionális korban, vagy egyéb komoly defektust okoznak egér modellekben⁸³. Ezzel együtt és a kiragadott példákkal jól látható, hogy a DUB-ok egy igen fontos enzimesoport, melyek nem csak a proteasóma általi fehérje degradációhoz szükségesek, hanem számos egyéb létfontosságú feladatot is ellátnak és több komoly betegségben is kiemelkedő szereppel bírnak.

1.3. Állatmodellek a Huntington-kór tanulmányozásában

A neurodegeneratív betegségek patomechanizmusának megértéséhez elengedhetetlen az állatmodellek alkalmazása. A kezdeti modellekben excitotoxicitást, és mitokondriális zavart kiváltó anyagokat alkalmaztak, mint a káinsav, a 3-nitropropionsav és a kinolinsav, melyekkel mimikálni tudták a mHTT által kiváltott molekuláris defektusokat amik neuronpusztuláshoz vezettek a striátumban¹²⁵. A *Htt* gén 1993-ban történő azonosításával megnyílt a lehetőség a transzgenikus modellek alkalmazásához. Attól függően, hogy a mesterséges *mHtt* transzgén mennyire felel meg az eredeti *mHtt* működésének, három fő modellt különíthetünk el. Vannak olyan modellek, melyek a *mHtt* gén első exonját hordozzák, különböző hosszúságú poliQ ismétlődésekkel, ami a *mHtt* toxikusságát meghatározza. Ezeknél jobban megfelelnek a valóságnak azok a modellek, melyek a teljes humán *mHtt* gént expresszálják, saját promóter és regulátor elemek szabályozása alatt. Végül léteznek knock-in modellek, ahol a modellállat *Htt* génnel azonos génlókuszába történik a betegséget okozó mutáció beinszertálása, ami lehetőséget ad a valóságnak megfelelő expressziós körülmények között kialakuló betegség tanulmányozására^{21,126}.

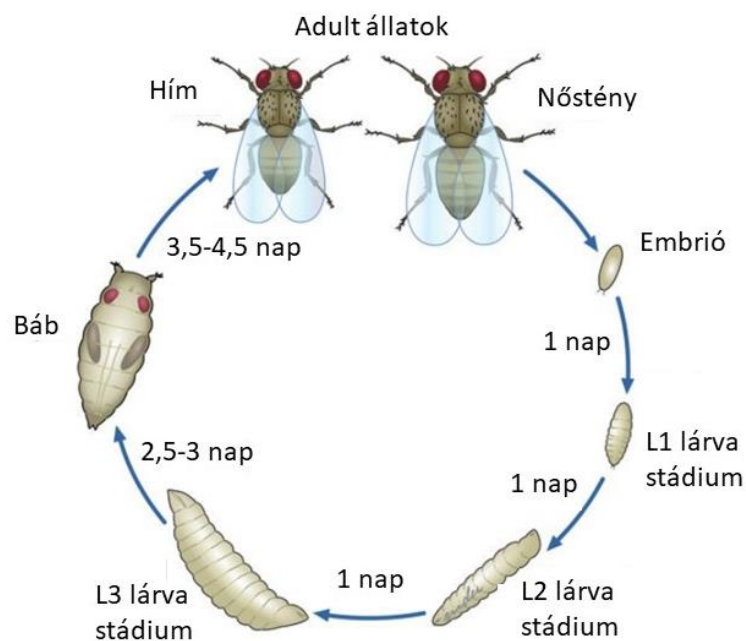
1.3.1. *Caenorhabditis elegans*

A nematódák osztályába tartozó *C. elegans* számtalan biológiai folyamat alapjainak tanulmányozására alkalmas organizmus, úgy mint az apoptózis, a gén szabályozási mechanizmusok, a sejtek metabolizmusa, az embriogenezis, a stressz útvonalak, vagy az öregedés mechanizmusa ¹²⁷. Laboratóriumi tenyésztése nagyon egyszerű, a kikelést követő három napon belül önmegtermékenyítő felnőtt állattá fejlődik, ami akár 300 utód nemzésére is képes. Genetikailag könnyen manipulálható és kiterjedt szekvenciahomológiát mutat az emlős génekkel, ami lehetőséget ad a humán betegségek tanulmányozására is. Teste átlátszó, ami megkönnyíti a fluorescens fehérjéket kódoló transzgének segítségével tanulmányozható folyamatok vizsgálatát az élő állatban. Emiatt a poliQ betegségek, mint a HD modellezésére is kiválóan alkalmas, ahol ez a tulajdonsága az aggregációs folyamatok nyomonkövetését jelentősen megkönnyíti ¹²⁸. Az első *C. elegans* transzgenikus HD modellben a *Htt* gén eltérő poliQ ismétlődést hordozó N-terminális részét expresszáltatták az ASH kemoszenzoros neuronokban. A patológiás hosszúságú (Q150) poliQ ismétlődést expresszáló ASH neuronok progresszív degenerációt és aggregátum felhalmozódást mutattak ¹²⁹.

1.3.2. *Drosophila melanogaster*

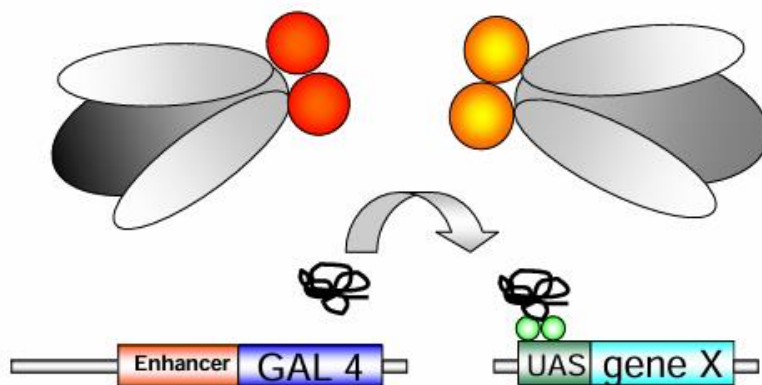
A *Drosophila melanogaster* vagy ecetmuslica a genetikusok kedvelt modellorganizmusa. A gerinctelen állatok közül a leginkább megfelelő állat a magasabbrendű állatok modellezésére. Génjeinek 50%-a hasonló a humán génekhez ¹³⁰ és a humán betegségeket okozó gének 75%-ának van *Drosophila* homológja ¹³¹. Rövid életciklusa során nagyszámú utód létrehozására képes, laboratóriumi fenntartása nem túl költséges és szobahőmérsékleten is tartható.

A *Drosophila* életciklusa 10-12 napig tart. A párzást követően a nőtény a taptalajra lerakja a megtermékenyített petéket, ami akár naponta a 100 petét is meghaladhatja nőtényenként. Nagyjából 24 óra elteltével a petékből kikelnek az L1 stádiumú lárvák, amik 4 napig csak táplálkoznak és növekednek, ezalatt keresztülmennek az L2-es és L3-mas lárvastádiumokon. Az L3 lárvák ezután megfelelő helyet keresnek a bebábozódáshoz. A bábállapot 4-5 napig tart, ezalatt a bábban a fejlődő rovar teljes átalakuláson megy keresztül, az imaginális diszkuszközből kialakulnak a felnőtt állat szervei. A kikelést követően a nőtények 24 órán belül ivaréretté válnak és nagyjából két-három hónapig élnek (7. ábra) ^{132,133}.



7. ábra. A *Drosophila melanogaster* életciklusa. (Ong 2015 alapján¹³²)

Genetikailag könnyen manipulálható, ehhez ma már sokféle technika áll rendelkezésre. Genetikailag és anatómiailag jól jellemzett organizmus, melyből számtalan mutáns elérhető. Idő- és szövetspecifikusan indukálható promóterek állnak rendelkezésre a transzgének kifejeztetésére, ami lehetőséget ad a betegségek specifikusabb modellezésére^{130,134}.



8. ábra. A GAL4-UAS rendszer sematikus ábrázolása és működése. (Jeibmann 2009 alapján¹³⁵)

Drosophila-ban a vizsgálni kívánt transzgénnek szövetspecifikus kifejeztetésére a legelterjedtebben használt eszköz a GAL4-UAS expressziós rendszer. A GAL4 egy élesztőből származó transzkripciós aktivátor fehérje, mely a DNS-en lévő UAS (upstream activating sequence) aktivátor szekvenciához kötődve indukálja az azt követő gén átírását. A módszer legnagyobb előnye, hogy a két komponens különválasztható, vagyis az egyik állat hordozza a GAL4 aktivátor szekvenciát, a másik állat az UAS szekvenciát a klónozott célgénnel. Az UAS szekvencia mögé klónozott génről mindaddig nem történik expresszió, amíg a GAL4 aktivátor nincs jelen, illetve a GAL4-et hordozó állatokban nincs célgén, amit aktiválhatna. Ez biztosítja, hogy a szülői vonalak életképesek legyenek. A két vonal keresztezéséből származó utódok mindkét komponenst hordozzák, és az aktivátor jellegétől függ, hogy mikor és milyen szövetben indul el a gén átírása. Ez a módszer lehetőséget biztosít a humán vagy *Drosophila* fehérjék irányított idő- és szövet specifikus expressziójára ¹³⁶. Így például neuronális szövetekben történő expresszióra az elav-GAL4, minden szövetre kiterjedő expresszióra a daughterless-GAL4 driver alkalmazható, a GAL80^{ts} represszor fehérjével kiegészítve a rendszert pedig hőmérséklet függő indukciót tesz lehetővé ^{137,138}. A GAL4-UAS rendszer működését a 8. ábra mutatja.

Központi idegrendszer érintő betegségek modellezése esetén az adult légy agyát és összetett szemét hatékonyan lehet tanulmányozni. Főleg az összetett szem nyújt könnyű betekintést az agyat érintő degeneratív folyamatokba, ugyanis mikroszkópban láthatóak a szemet alkotó fotoreceptor neuronok fénygyűjtő szerkezetei, melyek száma a neuronok pusztulásával látványosan csökken ¹³⁹. Minden ismert humán neurodegeneratív betegségre létezik *Drosophila* modell ¹⁴⁰. A *Drosophila* reprodukálni tudja az ezekre jellemző tüneteket, úgy mint redukált élettartam, a tünetek életkor függő megjelenése, motoros defektusok, fehérje aggregátumok megjelenése a neuronokban és neurodegenerációs folyamatok, vagyis az idegsejtek pusztulása ¹⁴¹.

Az Alzheimer-kór familiáris formájának tanulmányozására kétféle *Drosophila* modellt dolgoztak ki. Az egyik modellben az amiloid- β_{1-42} fehérje termeltetésével ¹⁴²⁻¹⁴⁵, a másik modellben pedig a hibás térszerkezet felvételére hajlamos tau fehérje kifejeztetésével vizsgálhatóak az AD-re jellemző patológiás elváltozások ¹⁴⁶.

A Parkinson-kór modellezésénél a humán alfa-synuclein dopaminerg neuronokban történő expresszáltatásával tanulmányozhatóak a PD jellegzetes elváltozásai és tünetei, mint a viselkedési zavar, a dopaminerg neuronok pusztulása és Lewy test-szerű fehérje felhalmozódások az idegrendszerben ^{147,148}.

A poliQ betegségek esetében szintén tapasztalható, hogy a patológiás hosszúságú poliQ fragment termeltetésével a humán betegségekre jellemző fenotípusok alakulnak ki ¹⁴¹. A legismertebb poliQ betegség a HD, amire számos *Drosophila* modellt létrehoztak ¹⁴⁹. A legtöbb modell a humán *Htt* gén első exonját expresszálja patológiás hosszúságú poliQ ismétlődésekkel. A modellek között elsősorban a poliQ ismétlődések száma tér el, illetve lehetőség van a *Htt*-t GFP-vel vagy egyéb protein tag-ekkel fuzionálni. Egy 2016-ban publikált tanulmányban 128 glutamint kódoló (Q128) poliQ ismétlődést tartalmazó *mHtt* modellt alkalmaztak, ahol cirkadián ritmus és viselkedésbeli zavart, a motoros képességek romlását, a neuronokban aggregátumokat valamint csökkent élettartamot figyeltek meg. A HD legelső tünetei közé tartozik az alvás-ciklus felborulása, amit ebben a *Drosophila* modellben is tanulmányoztak. A protein kináz A szignalizáció elnyomásával csökkenteni tudták a mHTT által kiváltott lárva kori letalitást és javították az alvás ciklusokban fellépő zavarokat, valamint a mHTT fehérje által redukált medián élettartamot is javítani tudták. ¹⁵⁰. Egy másik *Drosophila* HD modellben (*UAS-mRFP.Htt.ex1.138Q*) szintén leírták az említett tüneteket, illetve leírták a neuronok pusztulását az agyban és a látólebenyben, valamint a neuronok morfológiai változását is megfigyelték. Ebben a modellben a *Drosophila* c-Myc (dMyc) fehérjét azonosították, aminek túltermelése redukálta a mHTT fehérje által kiváltott citotoxicitást a hiszton acetiláció javításán keresztül, amivel a károsodott transzkripciós folyamatokat tudták javítani ¹⁵¹. Később a humán c-Myc túltermelésével is ugyanezt a hatást érték el *Drosophila*-ban ¹⁵².

Drosophila-ban azonosították a humán *Htt*-vel homológ gént (*dHtt*), melynek RNS interferenciás modelljében axonális transzportban blokkolt fenotípust figyeltek meg. Ez bizonyítja, hogy a HTT az axonális transzportban kulcsszerepet játszik ¹⁵³. A *dHtt* delécioja azonban nem okozott embrionális letalitást, így valószínűleg *Drosophila*-ban nem esszenciális az egyedfejlődés során. Azonban *dHtt*-KO legyek későn jelentkező csökkent életképességet és mozgás problémákat mutattak, valamint hőmérséklet-indukálta stressz során fototranszdukciós hiányosságokat tapasztaltak, vagyis a *dHtt* az adult élet során rendelkezhet létfontosságú funkciókkal ¹⁵⁴. Mivel a *dHtt* funkcióvesztéses mutációja az egér modellektől eltérő fenotípust mutatott, a *Drosophila Htt* funkcióvesztéses modellje alkalmatlan a humán betegség modellezésére. A funkciónyeréses, vagyis a humán mHTT fehérje termelése a humán tünetekkel sokban hasonló fenotípust okoz *Drosophila*-ban is, így a Huntington kór tanulmányozására az egérmodellektől eltekintve az ecetmuslica az egyik legalkalmasabb állat.

1.3.3. Az egérmodellek

Az emlősök közül az egér a leginkább elterjedt modellorganizmus a humán betegségek tanulmányozására. Génjeit hatékonyan lehet manipulálni, ehhez jól kidolgozott genetikai és molekuláris eszköztár áll rendelkezésre. Tartása egyszerű, költséghatékony. Számos humán betegség előfordul egerekben is, melyek patomechanizmusa nagyon hasonló. Filogenetikai rokonságuk és fiziológiai hasonlóságuk miatt kiválóan alkalmas humán betegségek modellezésére. Az első egér HD modell az R6/2 vonal volt, amiben olyan transzgént inszertáltak az egér genomba, ami a humán *Htt* promóterét és első exonját hordozta 150 CAG ismétlődéssel. Ez a modell nagyon jól demonstrálta a HD tüneteket, megfigyelhetők voltak motoros diszfunkciók, inklúziós testek és nagyjából 15 hét alatt kimúltak a kísérleti állatok^{20,155,156}. A korai halálozás miatt elsősorban a HD juvenilis formájának modellezésére alkalmas. Az R6/2 modellnél az agyban a tüskés neuronok csökkent membránkapacitást mutattak redukált K⁺ csatorna expresszió miatt¹⁵⁷. Az agykérgi neuronoknál hiperaktivitást figyeltek meg, amit motoros diszfunkció követett. A modell validitásával kapcsolatban felmerültek kérdések, pl. hogy mivel a transzgén csak az exon1-et tartalmazza, hiányoznak olyan motívumok, amiken keresztül a HTT kölcsönhatásba lép más fehérjékkel²⁶, illetve a fragment nem tartalmazza a poszttranszlációs módosításra alkalmas helyeket¹²⁶.

A következő N171-82Q egérmodell a humán *Htt* első 171 aminosavát 82 CAG ismétlődéssel tartalmazó cDNS-t hordozott egér prion promóter mögé klónozva²². Megfigyelték a striátum sorvadását, a közepes tüskés neuronok degenerációját, agykamra nagyobbodást, illetve a súlygyarapodás elmaradását^{158,159}. A beteg egereken remegés, hipokinézia, koordinációs zavarok mutatkoztak. Az előző modellhez képest később alakult ki a betegség és hosszabb ideig is éltek^{126,160}.

Az első teljes humán *mHtt* gént hordozó transzgenikus állatmodell a YAC72 és YAC128 egér modellek voltak (YAC: Yeast artificial chromosome/élesztő mesterséges kromoszóma). Ezek a modellek 72, illetve 128 CAG ismétlődést tartalmaztak. Előnyük, hogy a teljes kódoló szekvenciát és az összes humán regulátor elemet tartalmazzák¹²⁶. A mHTT fehérje szint nagyjából megegyezett az egészséges HTT fehérje szintjével. A HD egerek 2-3 hónapos korára kialakultak a jellegzetes tünetek, mint a motoros és kognitív zavarok, hiperaktivitás, majd nehézkes járás, végül hipoaktivitás. Elektrofiziológiailag megegyeztek az R6/2 egereknél tapasztaltakkal, striátum és kortikális sorvadást és a közepes tüskés neuronok pusztulását tapasztalták^{161–163}.

A BACHD egér modell hasonlóan az előzőhöz a teljes *mHtt* gént expresszálja, 97 váltakozó CAG/CAA ismétlődésekkel, saját *Htt* regulátor rendszer szabályozása alatt ¹⁶⁴. Az egerek 2-3 hónapos korukban progresszív motoros diszfunkciót, hipoaktivitást, pszichiátriai tüneteket és hízást mutattak ^{165,166}. 12 hónaposan a striátum és az agykéreg sorvadása volt megfigyelhető valamint csökkent glutamát felvétel és asztrocita fenotípus ¹⁶⁷. A mHTT csökkentésével a kortikális neuronokban vagy a közepes tüskés neuronokban javította a szinaptikus diszfunkciót, és a motoros tüneteket ¹⁶⁸, illetve a mHTT mennyiségének csökkenése az asztrocitákban javította a viselkedést ¹⁶⁹.

A legérdekesebb modellek a knock in modellek, melyeknél a humán HD mutációt beinszertálják az egér *Hdh* (a *Htt* egér homológia) génlókuszba. Mivel ez a mutáció a normál genomikus-fehérje kontextusban expresszálódik, vélhetően ezek a modellek pontosabban reprezentálják a HD genetikai alapjait. A leginkább tanulmányozott modellek ezen belül a Q140 és Q175 modell, valamint a *Hdh* (CAG) 150 egér modell ¹⁷⁰.

A Q140 modellben a humán *mHtt* első exonját integrálták az egér *Hdh* gén első exonja helyébe. A homozigóta egerek viselkedési zavarokat, motoros abnormalitást mutattak, aggregátumok jelentek meg a striátumban és a kortexben ¹⁷¹⁻¹⁷³. Ezek a tünetek 4 hónapos korukra váltak intenzívvé. A talamusz-striátum közti kommunikáció sérülése miatt a striátum működési zavarát és sorvadását figyelték meg ¹⁷⁴.

A Q175 modell gyakorlatilag megegyezik a Q140 modellel, csak a CAG ismétlődések száma több. Ebben a modellben is az előzőekhez hasonlóan viselkedési, motoros, kognitív diszfunkciókat és a cirkadián ritmus zavarát figyelték meg. A 4 hetes korú állatok járási rendellenességet és hipoaktivitást mutattak, majd 30 hetes korukra mászási nehézségek jelentkeztek. 12 hónapos korban kognitív rendellenességeket, mHTT aggregátumok megjelenését szerte az agy minden területén, a tüskés neuronok és a striátum pusztulását figyelték meg ^{175,176}. A Q140 és Q175 modellek a szinaptikus elváltozások tanulmányozására alkalmasak.

A *Hdh* (CAG)150 modell esetében az egér *Hdh* génbe csak egy 150 ismétlődéses CAG génszakasz lett beintegrálva, humán szekvenciát nem tartalmazott. A tünetek viszonylag későn, 40 hetes korukra jelentek meg, motoros defektusok pl. egyensúlyzavar és járási nehézségek, kapaszkodási defektusok és súlyvesztés mutatkozott. 24 hetes korban kognitív zavarok jelentkeztek ¹⁷⁷. 22 hónapos korban mHTT aggregátumokat detektáltak az egész agy területén és emellett transzkripcionális diszregulációt figyeltek meg ¹⁷⁸.

Az állatmodellek nagymértékben hozzájárultak a HD patológiájának megértéséhez. Bár az emlős modellek a legalkalmasabbak a humán betegségek tanulmányozására, számos hátrányuk van az alacsonyabbrendű modellállatokkal szemben. Generációs idejük hosszú, az utódok száma korlátozott és etikai engedélyek szükségesek a velük való kísérletek elvégzéséhez. Mindezeket figyelembe véve, szükség van az alacsonyabbrendű modellorganizmusok alkalmazására is, melyek mintegy előszűrőként szolgálhatnak a potenciális gyógyszercélpontok keresése során.

2. Célkitűzések

A proteopátiás neurodegeneratív betegségek, így a Huntington-kór is gyógyíthatatlan, súlyos egészségromlással jár. Léteznek terápiás lehetőségek, melyekkel a betegek életminősége javítható, azonban a legtöbb ilyen betegség halálos kimenetelű. Ezeknél a kórképeknél megfigyelhető a sejtek fehérjeháztartásának érintettsége. Az AD és a HD esetében is megfigyelték az ubikvitin-proteaszóma rendszer zavarát^{179–181}, ami miatt a szabad monoubikvitin készlet kimerülhet, ez pedig több fontos folyamat sérülését okozhatja. Az ubikvitinek eltávolítását a fehérjékről a deubikvitináz enzimek végzik, így kiemelt szerepük van többek között az ubikvitinek újrahasznosításában, hogy elérhetőek legyenek más nélkülözhetetlen folyamatok számára is⁶⁹. Mivel 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.

Mindezek ismeretében fontosnak tartottuk a deubikvitinázok hatásának vizsgálatát a Huntington-kór *Drosophila* modelljében, potenciálisan új terápiás célpontok keresésének céljából. Ehhez az alábbi kutatási célokat fogalmaztuk meg:

2.1. A Huntington-kór patomechanizmusára hatással bíró DUB-ok azonosítása *Drosophila melanogaster* modellorganizmusban.

A *Drosophila* Huntington-kór modelljében DUB mutációkat hordozó törzsek felhasználásával genetikai interakciókon keresztül vizsgáljuk a DUB-ok lehetséges hatásait. Vizsgáljuk az állatok életképességét, élettartamát, a motoros képességüket és a *mHtt* által kiváltott neurodegeneratív folyamatokat.

2.2. Független allélekkel validáljuk a potenciális jelöltekkel kapott eredményeket.

A genetikai interakciós tesztek eredményei alapján kiválasztott DUB mutációkkal funkcionálisan azonos, de független DUB mutációkat hordozó törzsekkel megismételjük a kísérleteket.

2.3. Teszteljük a jelölt hatását egészséges állatokon.

Megvizsgáljuk a jelölt és a *Htt* génre vad típusnak tekinthető *Htt.ex1.Q25* transzgént expresszáló állatokkal történő interakcióban, hogy egészséges állatokon okoz-e fenotípusos elváltozásokat.

2.4. Teszteljük a jelölt hatását az Alzheimer-kór *Drosophila* modelljében.

Annak tisztázására, hogy a jelölt más neurodegeneratív betegség modell esetén is hatással van-e a betegség lefolyására, teszteljük a jelölt hatását *Drosophila* amiloid- β_{1-42} Alzheimer-kór modellben is.

2.5. Megvizsgáljuk a jelölt hatását a mHTT aggregációs folyamataira.

A Huntington-kór neuropatológiai tünete a mHTT aggregátumok megjelenése, emiatt fontosnak tartjuk megvizsgálni a jelölt DUB hatását a mikroszkópicusan detektálható aggregátumok számára, méretére, méreteloszlására.

2.6. Transzkriptomikai analízist végzünk a jelölt DUB molekuláris hatásainak feltárása céljából.

Annak megértéséhez, hogy a jelölt milyen molekuláris folyamatok megváltoztatásával fejt ki a HD muslicák fenotípusára gyakorolt hatásait, transzkriptomikai analízist végzünk. Ennek során vizsgáljuk a *mHtt* által kiváltott stressz körülmények között fellépő, illetve a jelölt hatására HD muslicákban bekövetkező génexpressziós változásokat, valamint hogy a jelölt hatására milyen transzkriptomikai változások történnek az egészséges egyedekhez képest.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérletek során felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek és fenntartásuk

A következő törzsek a Bloomington *Drosophila* törzsközpontból (BDSC) származnak:

w[1118]; *P*{*w*[+*mGT*]=*GT1*}*Rpn11*[*BG01694*]/*CyO*, *w*[1118];
PBac{*w*[+*mC*]=*PB*}*Usp1*[*c05664*], *y*[1] *v*[1]; *P*{*y*[+*t7.7*] *v*[+*t1.8*]=*TRiP.JF02992*}*attP2*,
y[1] *w*[67*c23*]; *P*{*y*[+*mDint2*] *w*[+*mC*]=*EPgy2*}*CG4603*[*EY07831*], *w*^{*}; *P*{*w*[+*mC*]=*UAS-
HTT.96Q.Cerulean*}2, *y*[1] *M*{*RFP*[3*xP3.PB*] *GFP*[*E.3xP3*]=*vas-int.Dm*}*ZH-2A w*^{*}; *M*{3*xP3-
RFP.attP*}*ZH-86Fb*, és *w*^{*}; *PBac*{*w*[+*mC*]=*UAS-Abeta.1-42*}*VK00033*.

A következő törzsek a Bécsi *Drosophila* törzsközpontból (VDRC) származnak:

w[1118]; *P*{*GD11368*}*v21894*, *P*{*KK100532*}*VIE-260B*, *w*[1118]; *P*{*GD10916*}*v34574*,
w[1118]; *P*{*GD11489*}*v21978*, *w*[1118]; *P*{*GD3255*}*v7113*, *P*{*KK108078*}*VIE-260B*, *w*[1118];
P{*GD7628*}*v18231*, *P*{*KK100733*}*VIE-260B*, *P*{*KK108313*}*VIE-260B*, *P*{*KK102888*}*VIE-
260B*, *P*{*KK101035*}*VIE-260B*, *w*[1118]; *P*{*GD13944*}*v42609*, *w*[1118];
P{*GD5871*}*v18981/TM3*, *P*{*KK100775*}*VIE-260B*, *w*[1118]; *P*{*GD4739*}*v15340*, *w*[1118];
P{*GD14040*}*v28960*, *P*{*KK101867*}*VIE-260B*, *P*{*KK101319*}*VIE-260B*, *P*{*KK100377*}*VIE-
260B*.

Az alábbi törzsek Kyoto-i *Drosophila* törzsközpontból (KDSC) származnak:

w[1118]; *P*{*RS3*} *not*[*CB-5509-3*], *y*[*d2*] *w*[1118] *P*{*ey-FLP.N*}2 *P*{*5xglBS-lacZ.38-1*}*TPN1*;
P{*neoFRT*}82*B* *P*{*lacW*}*CSN5*[*L403*]2/*TM6B*, *P*{*Car20y*}*TPN1 Tb*[1].

A következő törzseket Dr. Deák Péter laboratóriumából (Szegedi Biológiai Kutatóközpont) kaptuk:

P elem mediálta mutagenézissel létrehozott deléciós törzsek:

- *Yod1*[*Δ101/2*]: *P*{*EPgy2*}*Yod1*[*EY07831*] P elemmel létrehozott törzs, ami egy 1347 bp-os deléciót eredményezett a gén nagy részét érintve, beleértve a START kodont is, így teljes funkcióvesztést okoz.
- *Duba*[*Δ52*]: *P*{*EP*}*Duba*[*G18421*] P elemmel létrehozott törzs, ami 2556 bp-os deléciót eredményezett és a gén nagy részét érinti a START kodonnal együtt, így teljes funkcióvesztést okoz.

- *Rpn11[Δ14/4]: P{GT1}Rpn11[BG01694]* P elemmel létrehozott törzs, az 1118 bp-os deléción a gén nagy részét érinti a START kodonnal együtt, teljes funkcióvesztést okoz.

CRISPR–Cas9 mutagenézissel létrehozott deléciós törzsek (teljes funkcióvesztéssel járnak):

- *CG3251 [CRISPR 11/2]* allél egy 22 bp-os deléciót hordoz a második exonban, ami frameshiftet és korai transzkripció terminációt okoz.
- *Usp10 [CRISPR 12/2]* allél egy 2 bp-os deléciót és 12 bp-os inszerciót tartalmaz az első exonban, ami frameshiftet és korai transzkripció terminációt okoz.
- *Usp47 [CRISPR 28/2]* allél 7 bp-os deléciót hordoz az első exonban, frameshiftet és korai transzkripció terminációt okoz.
- *puf [CRISPR 9/2]* allél 1 bp-os inszerciót tartalmaz a hatodik exonban, ami frameshiftet és korai transzkripció terminációt okoz a transzkript felénél.
- *Uch-L5 [CRISPR 5/1]* allél 4 bp-os deléciót tartalmaz a második exonban, ami frameshiftet és korai transzkripció terminációt okoz.

A *w; UAS-Httex1.Q120* törzs, mely a humán *huntingtin* gén első exonját hordozza patológiás hosszúságú poliglutamin (Q120) ismétlődésekkel, és a *w; UAS-Httex1.Q25* törzs, ami a humán *huntingtin* első exonját hordozza egészséges hosszúságú poliglutamin (Q25) ismétlődésekkel, J. Lawrence Marsh laboratóriumából származik (University of California, Irvine, CA, USA). A transzgének a második kromoszómán találhatóak és az expressziójukat az UAS-GAL4 rendszer teszi lehetővé.

A *P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155] w; Sb[1] / TM6 Ubx* driver törzs a Bloomington törzsközpontból származó *P{GawB}elavC155* törzs 3. kromoszómás balanszeres változata, mely *Sb* (*Stubble* – rövid szőrzet) és *Ubx* (*Ultrabithorax* – szőrös és pigmentált billér) markereket hordoz.

A *P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155] w; Sp / SM6 b* driver törzs szintén a Bloomington törzsközpontból származó *P{GawB}elavC155* törzs 2. kromoszómás balanszeres változata, mely *Sp* (*Sternopleural* – szenzoros sörték számának növekedése), *Cy* (*Curly* – pörge szárny), és *Roi* (durva szem) markereket hordoz.

A törzsek és keresztezések fenntartása hagyományos *Drosophila* táptalajon történt (3% szárított élesztő, 4% kukoricadara, 2% búzaliszt, 9% glükóz, 0,7% agar, 0,15% tegosept) 18 °C-on és 25 °C-on. A keresztezésekhez fiolánként 6-8 szűz nőtényt és 4-6 hím állatot használtunk fel. Kísérleteinkben az UAS-GAL4 expressziós rendszert használtuk, mely lehetőséget biztosít a transzgének szövetspecifikus kifejeztetésére. A keresztezéseink során az *elav-GAL4* vagy *elav-GAL4; Sb/TM6 Ubx* vagy *elav-GAL4; Sp/SM6b* driver törzseket használtuk, melyek neuron specifikus génexpressziót tettek lehetővé.

3.2. Életképességi vizsgálatok

Attól függően, hogy az adott DUB gén/ transzgén a *Drosophila* második vagy harmadik kromoszómáján található, az alábbi keresztezési sémák szerint állítottuk elő a vizsgált utódokat:

Harmadik kromoszómás DUB gének tesztelése mutáns Htt-t expresszáló legyekben

- 1. *elav-GAL4; +; Sb/ TM6 Hu* ♀ x *w; +; DUB* ♂
 - *elav-GAL4; +; Sb/DUB* ♂
- 2. *w; UAS-Httex1.Q120* ♀ x *elav-GAL4; +; Sb/ DUB* ♂
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q120/ DUB* ♀
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q120/ +* ♀
 - *w; UAS-Httex1.Q120/ DUB* ♂
 - *w; UAS-Httex1.Q120/ +* ♂

Harmadik kromoszómás DUB gének tesztelése vad típusú Htt-t expresszáló legyekben

- 1. *elav-GAL4; +; Sb/ TM6 Hu* ♀ x *w; +; DUB* ♂
 - *elav-GAL4; +; Sb/DUB* ♂
- 2. *w; UAS-Httex1.Q25* ♀ x *elav-GAL4; +; Sb/ DUB* ♂
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q25/ DUB* ♀
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q25/ +* ♀
 - *w; UAS-Httex1.Q25/ DUB* ♂
 - *w; UAS-Httex1.Q25/ +* ♂

Második kromoszómás DUB gének tesztelése mutáns Htt-t expresszáló legyekben

- 1. *elav-GAL4; Sp/ SM6b; + ♀* x *w; DUB; + ♂*
 - *elav-GAL4; Sp/ DUB; + ♂*
- 2. *w; UAS-Httex1.Q120 ♀* x *elav-GAL4; Sp/ DUB; + ♂*
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q120/ DUB ♀*
 - *elav-GAL4; UAS-Httex1.Q120; Sp ♀*
 - *w; UAS-Httex1.Q120/ DUB ♂*
 - *w; UAS-Httex1.Q120/ Sp ♂*

Harmadik kromoszómás DUB gének tesztelése mutáns amiloid-β peptidet expresszáló legyekben

- 1. *elav-GAL4; +; Sb/ TM6 Hu ♀* x *w; +; DUB ♂*
 - *elav-GAL4; +; Sb/DUB ♂*
- 2. *w; UAS-Abeta₁₋₄₂ ♀* x *elav-GAL4; +; Sb/ DUB ♂*
 - *elav-GAL4; UAS-Abeta₁₋₄₂/ DUB ♀*
 - *elav-GAL4; UAS-Abeta₁₋₄₂/ + ♀*
 - *w; UAS-Abeta₁₋₄₂/ DUB ♂*
 - *w; UAS-Abeta₁₋₄₂/ + ♂*

A második vagy harmadik kromoszómás DUB mutánsokat *elav-GAL4; Sp/SM6b* vagy *elav-GAL4; Sb/ TM6 Hu* szüzekkel kereszteztük, majd a keresztezésből származó *elav-GAL4; DUB/Sp* vagy *elav-GAL4; DUB/Sb* F1 hím utódokat *w; UAS-Httex1.Q120* vagy *w; UAS-Httex1.Q25*, vagy *UAS-Abeta₁₋₄₂* szüzekkel kereszteztük. A keresztezéseket 25°C-on tartottuk, majd 7 nap elteltével a szülőket átráztuk új fiolákba. A kikelő F2 utódokat 5 napon keresztül számoltuk és a nőstényeket genotípusonként (*elav-GAL4 > mHtt DUB* nőstények és *elav-GAL4 > mHtt* kontroll nőstények, *elav-GAL4 > Abeta DUB* nőstények és *elav-GAL4 > Abeta* kontroll nőstények) külön fiolákba gyűjtöttük élettartam vizsgálathoz. Statisztikai szignifikanciát páros T-tesztelssel számoltunk, miután a nőstények számát normalizáltuk a genotípusuknak megfelelő hímek számával.

3.3. Élettartam vizsgálatok

Az élettartam vizsgálatokat 25 °C-on végeztük, mely során naponta feljegyeztük a túlélő egyedek számát és heti 2-3 alkalommal friss fiolába ráztuk őket. A statisztikai analízisek az OASIS 2 (Online Application and Screening Information System)¹⁸³ online alkalmazással készültek. Az online felületen elérhető tesztek közül a Fisher-egzakt tesztet használtuk, ami több időpontban is összehasonlítja a vizsgált genotípusok túlélési arányait, az eredményeknél P értéket 50%-os mortalitásra adtuk meg.

3.4. Mozgási képesség vizsgálata

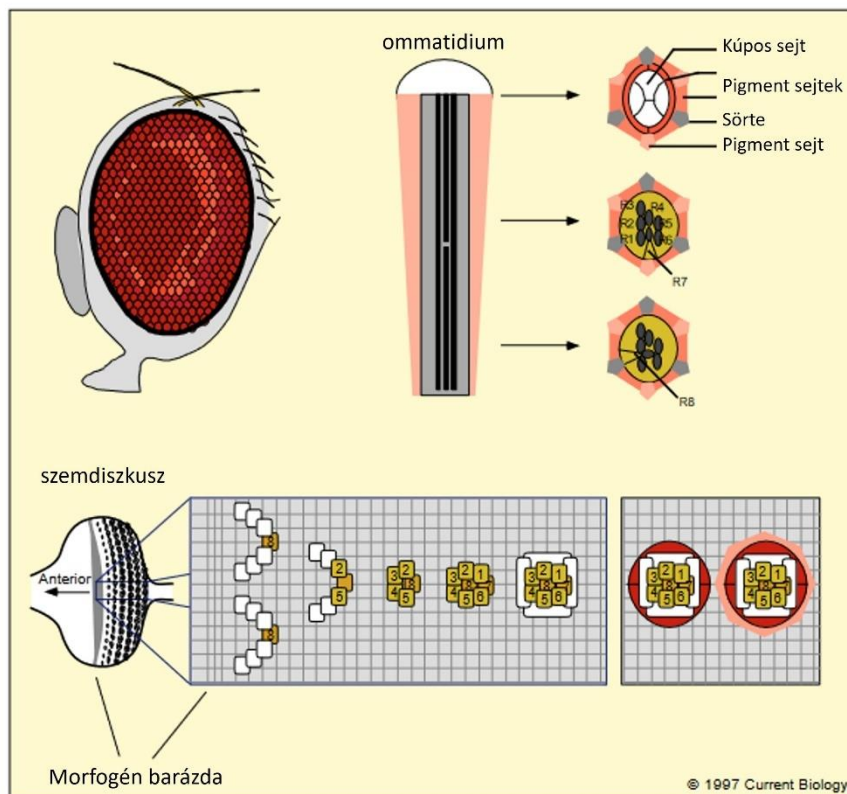
Az állatok motoros képességeinek vizsgálatát az úgynevezett mászás teszt segítségével végeztük el, amely az adult legyekre jellemző negatív geotaxison alapul. Ennek során az állatok függőleges felületen felfelé másznak, így az adott idő alatt megtett út mérésével könnyen összehasonlíthatóak a vizsgált genotípusok motoros képességei. A teszteket három napos nőstény állatokon végeztük el, genotípusonként külön fiolákban, fiolánként maximum 25 léggel. A mászás tesztről videó felvételt készítettünk egy Canon PowerShot ELPH 300 HS típusú kamerával. A legyeket 15 másodpercenként leráztuk és a lerázást követő 5 másodperc alatt megtett utat a videofelvétel vizsgálatával meghatároztuk. Statisztikai szignifikanciát Wilcoxon tesztel (Wilcoxon Rank Sum Test) számoltunk R program segítségével.

3.5. Neurodegeneráció vizsgálata

A neurodegeneráció mértékét a fotoneuronok pusztulásán keresztül vizsgáltuk. Az egészséges *Drosophila* összetett szem körülbelül 750-800 egyedi egységet, ommatidiumot tartalmaz. Mindegyik ommatidium hat külső és két belső fotoreceptorral rendelkezik, melyek fénygyűjtő struktúráit rhabdomereknek nevezzük. A 7-es és 8-as fotoreceptorok egymással fedésben állnak, ezért fénymikroszkóppal egy egészséges szemben minden ommatidiumban 7 rhabdomer látható. (8. ábra, ¹⁸⁴). A módszer alapját az adja, hogy az idegsejtek pusztulásával a fotoreceptor neuronok fénygyűjtő struktúráinak száma is csökken.

A 7 illetve 15 napos legyeket dekapitáltuk egy csipesz segítségével, majd a fejeket egy tárgylemezre rögzítettük áttetsző körömlakkal 45 fokos szögben, hogy a fény át tudja világítani a szemüket. A körömlakk megszáradását követően immerziós olajat (Merck) cseppentettünk a mintára, majd a szemet Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal 50X nagyítású immerziós lencsével vizsgáltuk.

Genotípusonként legalább 10 állatot, és minden állat esetében legalább 20 ommatidiumot számoltunk meg. Ezeknek az átlaga adta az adott genotípusra jellemző értéket, amely vad típusú legyekben kivétel nélkül 7.



9. ábra. A *Drosophila* összetett szemének fejlődése és felépítése.

(Klambt 1997 alapján¹⁸⁴)

3.6. Aggregációs vizsgálatok

A kísérlethez szükséges keresztezések sémája:

- 1. *elav-GAL4*; +; *Sb*/ *TM6 Tb* ♀ x *yw*; +; *Yod1*[*Ey07831*] ♂
 ➤ *elav-GAL4*; +; *Yod1*[*Ey07831*]/ *TM6 Tb* ♂
- 2. *w*; *UAS-HTT.96Q.Cerulean* ♀ x *elav-GAL4*; +; *Yod1*[*Ey07831*]/ *TM6 Tb* ♂
 ➤ *elav-GAL4*; *UAS-HTT.96Q.Cerulean* ; *Yod1*[*Ey07831*]♀

A kontroll minta előállítása:

- *w; UAS-HTT.96Q.Cerulean* ♀ x *elav-GAL4; +; +* ♂
 ➤ *elav-GAL4; UAS-HTT.96Q.Cerulean* ♀

A huntingtin aggregátumok vizsgálatát egy CFP-vel fúzionáltatott HTT fehérjét expresszáló *Drosophila* törzs segítségével végeztük el (*UAS-HTT.96Q.Cerulean*), így a HTT aggregátumok immunfestés nélkül láthatóak voltak. Vándorló L3 lárvák nyálmirigyét preparáltuk 1x PBS-ben, majd tárgylemezre helyeztük és Olympus Fluoview Fv10i konfokális mikroszkóppal 60x oil objektívvel vizsgáltuk őket. Nyálmirigyenként 10-12 optikai szeletről készítettünk fotót (szeletvastagság = 1.54 µm). Az aggregátumokról készült fotókat ImageJ Fiji software-rel ROI manager segítségével, sejtenként elemeztük ki. Genotípusonként 10-10 nyálmirigyet fotóztunk, *HttQ96-CFP; Yod1[Ey07831]* esetében 96db sejtet vizsgáltunk meg, a kontroll *HttQ96-CFP* esetében 74 db sejtet.

3.7. RT-qPCR mérések

Célgén	forward primer (5'-3')	reverz primer (5'-3')	koncentráció
<i>UAS-Htt</i>	GCCTCTGCACCGACCAT AA	TGCTCCCATTCATCA GTTCCA	100 nm
<i>UAS-abeta</i>	AGCAACAAGGGTGCCA TCAT	TCACACCACAGAAGT AAGGTTCC	200 nm
<i>α-tubulin</i>	TGTCGCGTGTGAAACA CTTC	AGCAGGCGTTTCCAATC TG	200 nm

1. táblázat. A kvantitavív real-time PCR kísérleteink során felhasznált primer szekvenciák az alkalmazott végkoncentrációkkal.

A totál RNS izolátumokat 3 napos nőstény fejből állítottuk elő TRI reagens (Zymo Research) segítségével a gyártó protokollja szerint. Minden mintához 20 db állat fejt használtunk fel. Az izolált RNS-ek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértük meg. Az RNS-ek koncentrációját a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján határoztuk meg, fehérje szennyezettségét 260 nm és 280 nm-en mért fényelnyelés hányadosával, szerves oldószer szennyezettségét pedig a 260 és 230 nm-en mért fényelnyelés

hányadosával jellemeztünk. Ezután a genomi DNS szennyezés elkerülése érdekében a mintákat RNáz mentes DNáz I-el (Thermo Scientific) kezeltük a gyártó által mellékelt protokoll alapján. A DNáz I inaktiválását 1 µl 50 mM-os EDTA hozzáadásával 10 percig 65 fokon végeztük el. A reverz transzkripció 500 ng RNS-ből TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Thermo Scientific) és random hexamer primerek felhasználásával történt, a gyártó utasításait követve. A qPCR reakciókat Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs) és a vizsgálni kívánt génekre tervezett primerek (táblázat) segítségével, a gyártó által mellékelt protokoll szerint futtattuk le 8 µl végtérfogatban PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific) készülékben az alábbi PCR programmal:

- Kezdeti denaturáció: 10 perc 95 °C
- Denaturáció 15 mp 95 °C
- Annealing és elongáció 1 perc 60 °C 40× ismételve
- Fluoreszcencia mérés
- Melting Curve analízis 60 → 95 °C
- Tárolás ∞ 20 °C

A kiértékelés során egy 4 lépcsős kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg az egyes Ct értékekhez tartozó templát koncentrációkat és tubulin háztartási génre normalizálva határoztuk meg a minták relatív expressziós értékeit. A primerek hatékonysága minden esetben 85% felett volt, R^2 értéke pedig legalább 0,98. Minden qPCR méréshez három biológiai replikátumot készítettünk az egyes genotípusokból, melyeket szükség szerint többször is lefuttattunk.

3.8. *UAS-Yod1.flag* transzgenikus legyek létrehozása

A *Yod1* gén kódoló szekvenciáját *Drosophila* cDNS-ről sokszoroztuk fel Q5 DNS polimeráz (NEB) és a génre tervezett primerek segítségével, a start kodonnal indítva a stop kodont megelőző nukleotiddal bezárólag.

Yod1 klónozásához használt primer szekvenciák:

Yod1_entr_F: GGTACCAAATGACGGGTTCGTTCA

Yod1_entr_R: GAATTCGCAATCTCTCCAAAGTTCT

Az alkalmazott PCR program a következő volt: 98 °C 10 másodperc; 65 °C 30 másodperc; 72 °C 1perc 15 másodperc (35 ciklus). A PCR termékeket MN Gel&PCR Clean Up Kittel tisztítottuk és CloneJET PCR Cloning Kitet (Thermo Fischer) alkalmazva pJET1.2 blunt end klónozó vektorba ligáltuk a gyártó utasításai szerint. Ezt követően kompetens DH5α *Escherichia coli* baktériumokba transzformáltuk.

A klónozás további lépéseit a Gateway klónozó rendszer¹⁸⁵ segítségével végeztük el. A pJET1.2 transzformáns telepekből plazmidot izoláltunk NucleoSpin Plasmid EasyPure kittel (Macherey-Nagel) a gyártó protokollja szerint, majd a génre tervezett primereken elhelyezett restriktációs endonukleáz (KpnI, EcoRI) felismerő helyeknek megfelelő enzimekkel kivágtuk az adott gént és az ugyanezen enzimekkel felnyitott pENTR 3C vektorba ligáltuk. Az inszertek és plazmidok ligálásához T4 ligázt (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártó ajánlása alapján¹⁸⁶. A ligálást követően DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk a plazmidokat, majd a szelektív táptalajon felnőtt telepekből plazmidot izoláltunk. A kapott Entry klónokat felhasználva LR reakcióval rekombinációt hajtottunk végre a végső pTWF-attB (módosított pTWF Gateway destination vektor, amely tartalmazza a φC31 attB régiót) expressziós vektorunkkal. Az így létrehozott konstrukciót Sanger szekvenálással (DeltaGene, Szeged) ellenőriztük. Az ellenőrzött konstrukcióból NucleoBond Xtra Midi kittel (Macherey-Nagel) injektálásra alkalmas plazmid preparátumot készítettünk, majd azt *y[1] M{RFP[3xP3.PB] GFP[E.3xP3]=vas-int.Dm}ZH-2A w**; *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb Drosophila* embriókba injektáltattuk (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet). A transzgén φC31 mediált helyspecifikus integrációval a harmadik kromoszómán lévő ZH-86Fb dokkoló helyre épült be. A törzsbeállítás során a pTWF-attB vektor szekvencián lévő *mini-white* marker gén segítségével követtük nyomon a transzgéneket.

3.9. Western blot (transzgenikus törzsek validálása)

A transzgének validálásához a megfelelő genotípusú állatokat a következő keresztezési séma szerint állítottuk elő:

w; +; UAS-Yod1.flag ♂ x *elav-GAL4; +; +* ♂

➤ *elav-GAL4; +; UAS-Yod1.flag* ♀

➤ *w; +; UAS-Yod1.flag* ♂

A fehérje izolátumok elkészítése 2 napos állatokból történt. Mintánként 20 db fejet használtunk fel, melyeket 25 µl szonikációs pufferben (50 mM Tris-HCl pH7,9, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 1x PIC, 10 mM Na-butirát) homogenizáltunk. A minták koncentrációját Qubit protein assay kittel (Invitrogen) határoztuk meg a gyártó utasításait követve Qubit 2.0 készülékkel. Ezután a minták térfogatával megegyező mennyiségű Laemli puffert (20% glicerin, 100 mM Tris-HCl pH 6,4, 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% brómfenolkék, 5% β-merkaptotanol) adtunk a fehérje mintákhoz és 98 fokon 5 percig denaturáltuk. Felhasználás előtt centrifugáltuk (10 perc, 13000 rpm, 4 °C) a sejttörmelékek kiülepítése céljából.

A fehérjeanalízishez azonos mennyiségű mintákat választottunk el 10%-os SDS-PAGE-dzsel, majd 0,45 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra (GE Healthcare Life Sciences) blottoltuk (40 V, 2 óra, 4 °C,) 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,01% SDS és 15% metanol tartalmú transzfer pufferben. Ezután a membránokat 5% tejport tartalmazó TBST oldatban (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) egy éjszakán át blokkoltuk 4 °C-on.

Az immunreakcióhoz az ellenanyagokat 1% tejport tartalmazó TBST oldattal hígítottuk. A flag taggel jelölt fehérjék kimutatására anti-FLAG (M2 Sigma-Aldrich F3165, monoklonális, 1:4000, 2 óra szobahőn), a kontrollként használt tubulin fehérjére anti-tubulin (E7, DSHB, 1:1000, O/N 4 °C) elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk a mintákat. A fehérjékhez kötődő elsődleges ellenanyagok kimutatásához torna peroxidázzal kapcsolt egér IgG elleni másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk (RAM-HRP Dako, 1:5000, 1 óra szobahőn). Az ellenanyagokkal történt kezeléseket követően 2x5 percig és 1x15 percig TBST oldattal mostuk a membránt, majd Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) reagenssel inkubáltuk 5 percig szobahőn. A keletkezett kemilumineszcens jelet C-DiGit Blot Scannerrel detektáltuk.

3.10. Transzkriptomikai analízis

3.10.1. A kísérlethez szükséges keresztezések sémája és az előállított utódok:

- 1. *elav-GAL4*; +; + ♂ x *w[1118]* ♂
 - *elav-GAL4*; +; + ♀
- 1. *elav-GAL4*; +; + ♂ x *w*; +; *Yod1[EY07831]* ♂
 - *elav-GAL4*; +; *Yod1[EY07831]* ♀

- 1. *elav-GAL4*; +; *Sb/TM6 Hu* ♀ x *w*; +; *Yod1[EY07831]* ♂
 - *elav-GAL4*; +; *Sb/Yod1[EY07831]* ♂
- 2. *w*; *UAS-Httex1.Q120* ♀ x *elav-GAL4*; +; *Sb/Yod1[EY07831]* ♂
 - *elav-GAL4*; *UAS-Httex1.Q120/Yod1[EY07831]* ♀
 - *elav-GAL4*; *UAS-Httex1.Q120*/+ ♀

3.10.2. RNS szekvenáló könyvtárak létrehozása és szekvenálásuk

Az RNS szekvenáló könyvtárak létrehozásához totál RNS-t izoláltunk 5 napos nőstény fejekből Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs, NEB) segítségével a gyártó utasításait követve. Mintánként 50 db fejet használtunk fel, minden genotípus (*elav-GAL4*/+, *elav-GAL4*/+; *Httex1.Q120*/+, *elav-GAL4*/+; *Yod1[EY07831]*/+, and *elav-GAL4*/+; *Httex1.Q120*/+; *Yod1[EY07831]*/+) esetében 3 biológiai replikátumot készítettünk. Az RNS kivonatok tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel mértük meg, az integritását és koncentrációját Agilent 2100 Bioanalyzer kapilláris gélelektroforézis készülékkel Agilent RNA 6000 nano kit felhasználásával határoztuk meg a gyártó útmutatását követve. A polyA-RNS mintákat 800 ng totál RNS-t felhasználva készítettük el NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) segítségével, végül a szálspecifikus, indexált RNS szekvenáló könyvtárakat NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep kit és NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB) adapterek felhasználásával készítettük el a gyártó által mellékelt protokollok szerint. A szekvenáló könyvtárak koncentrációjának és fragmentek hosszúságának ellenőrzése Agilent High Sensitivity DNA Kit felhasználásával 2100 Bioanalyzer (Agilent) kapilláris gélelektroforézis berendezéssel történt. A könyvtárakat 10 nM koncentrációra hígítottuk, majd egyesítettük és denaturáltuk. Végül 15 pM-os hígításban MiSeq Reagent Kit v3-150 kit (Illumina) segítségével MiSeq System (Illumina) készülékben szekvenáltuk, 3 technikai replikátummal. A FASTQ szekvencia fájlokat a MiSeq Reporter 2.6.2.3 szoftverrel állítottuk elő. Az átlagos leolvasások száma 4,3 millió volt biológiai replikátumonként, melyek minőségi vágása TrimGalore/Cutadapt eszközzel történt. A szekvenciák illesztését a *Drosophila melanogaster* referencia genomhoz (r6.45) ¹⁸⁷ HISAT2 algoritmussal végeztük el. A génspecifikus leolvasások számát R programban számoltuk (Bioconductor csomag summarizeOverlaps funkciójával). A differenciális génexpresszió elemzés DESeq2 ¹⁸⁸ alkalmazással történt. A dúsulásanalízist FyEnrichr online eszközzel hajtottuk végre ¹⁸⁹ a következő génkönyvtárak alkalmazásával: Human_Disease_from_FlyBase_2017,

GO_Biological_Process_2018, és KEGG_2019. A korrigált P értékeket Benjamin-Hochberg korrekciójának alkalmazásával számoltuk.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. DUB mutációknak a mutáns Huntingtin által kiváltott patológiás fenotípusokra gyakorolt hatásának vizsgálata

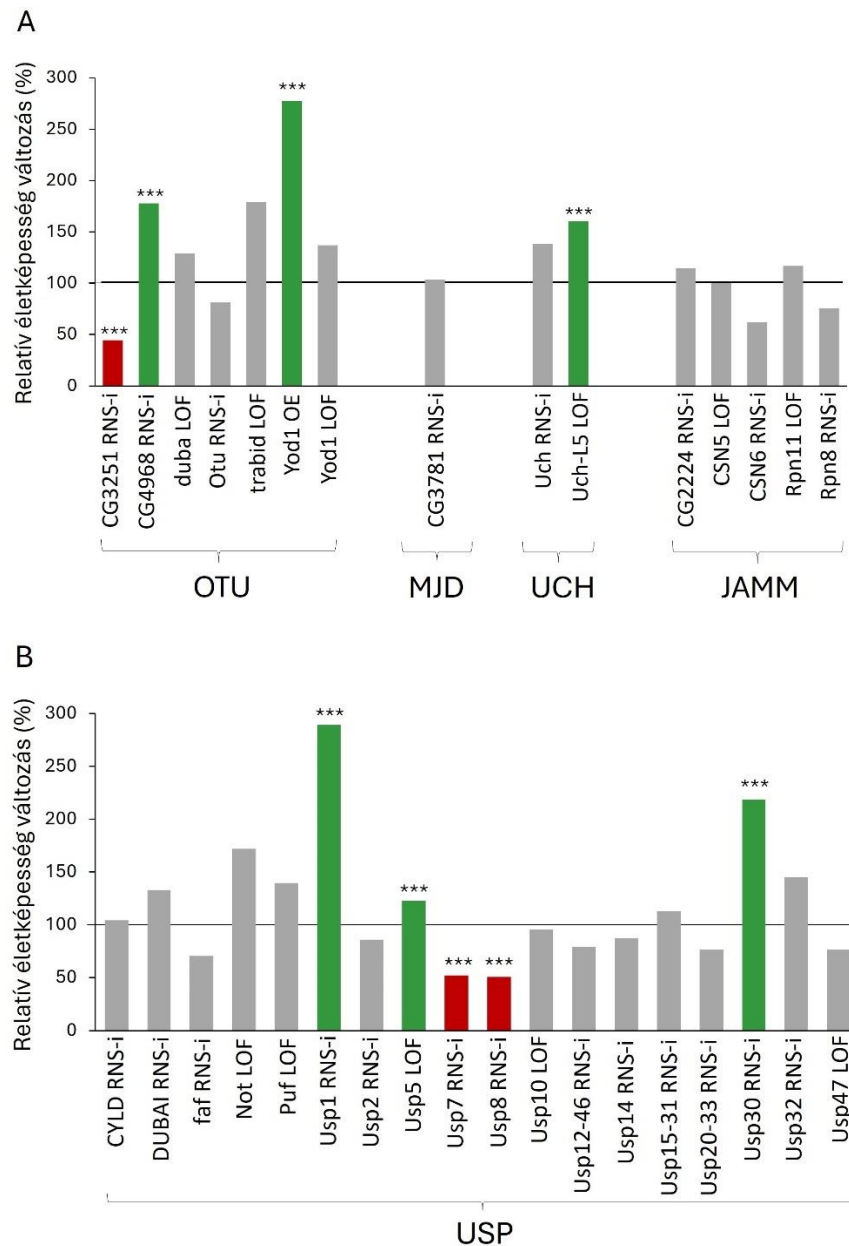
A DUB mutációk hatásának vizsgálatára genetikai interakciós tesztek hajtottunk végre. Ennek során olyan testvér állatokat állítottunk elő, melyek egyik csoportja a humán *huntingtin* (*Htt*) gén első exonját expresszálták patológiás hosszúságú polyQ ismétlődésekkel (*Httex1.Q120*), a másik csoport emellett az adott DUB mutációt vagy transzgént is hordozta. Az UAS szekvenciával rendelkező transzgének idegrendszerben történő expresszióját az elav-GAL4 neuronspecifikus driver biztosította. A kísérletek során 32 deubikvitináz vizsgáltunk, néhány DUB esetében több mutáns allél is a rendelkezésünkre állt. A vizsgált DUB gének közül hat az OTU család tagja (*CG3251*, *CG4968*, *Duba* (*Deubiquitinating enzyme A*), *Otu* (*Ovarium tumor protease*), *trbd* (*trabid*), *Yod1*, egy az MJD családba tartozik (*CG3781*), 18 az USP család képviselője (*CYLD* (*Cylindromatosis*), *DUBAI* (*Deubiquitinating apoptotic inhibitor*), *faf* (*fat facets*), *not* (*non-stop*), *puf* (*puffyeye*), *Usp1* (*Ubiquitin specific protease 1*), *Usp2*, *Usp5*, *Usp7*, *Usp8*, *Usp10*, *Usp12-46*, *Usp14*, *Usp15-31*, *Usp20-33*, *Usp30*, *Usp32*, *Usp47*), kettő az UCH családba sorolható (*Uch* (*Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase*), *Uch-L5*), és öt a JAMM metalloproteáz család tagja (*CG2224*, *CSN5* (*COP signalosome subunit 5*), *CSN6*, *Rpn8* (*Regulatory particle non ATPase 8*) és *Rpn11*).

A *mHtt* neuronális expressziója az életképesség és motoros képességek romlását, neurodegenerációt és élettartam rövidülést okoz¹⁹⁰. Mindezek ismeretében teszteltük a deubikvitinázok hatásait a HD állatok életképességére, élettartamára, mozgási képességére illetve a neurodegenerációjukra. A tesztek eredményeinek összefoglaló táblázatai a függelék fejezetben találhatóak (F1. táblázat és F2. táblázat).

4.1.1. A DUB gének hatása a HD muslicák életképességére

Az életképesség vizsgálata során az anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján elvégzett keresztezésekkel kikelt állatok számát genotípusonként meghatároztuk és az egyik transzgént sem expresszáló kontroll hímekekre normalizáltuk. A keresztezéseinkből származó két nőstény utódkategória közül az egyik önmagában expresszálja a *Httex1.Q120* transzgént (HD), a másik kategória expresszálja a *Httex1.Q120* transzgént, és emellett hordozza az adott DUB

mutáns allélt, transzgént, vagy RNS interferenciás konstrukciót is (HD+DUB). A DUB gének HD muslicák életképességére gyakorolt hatása a 10. ábrán látható.

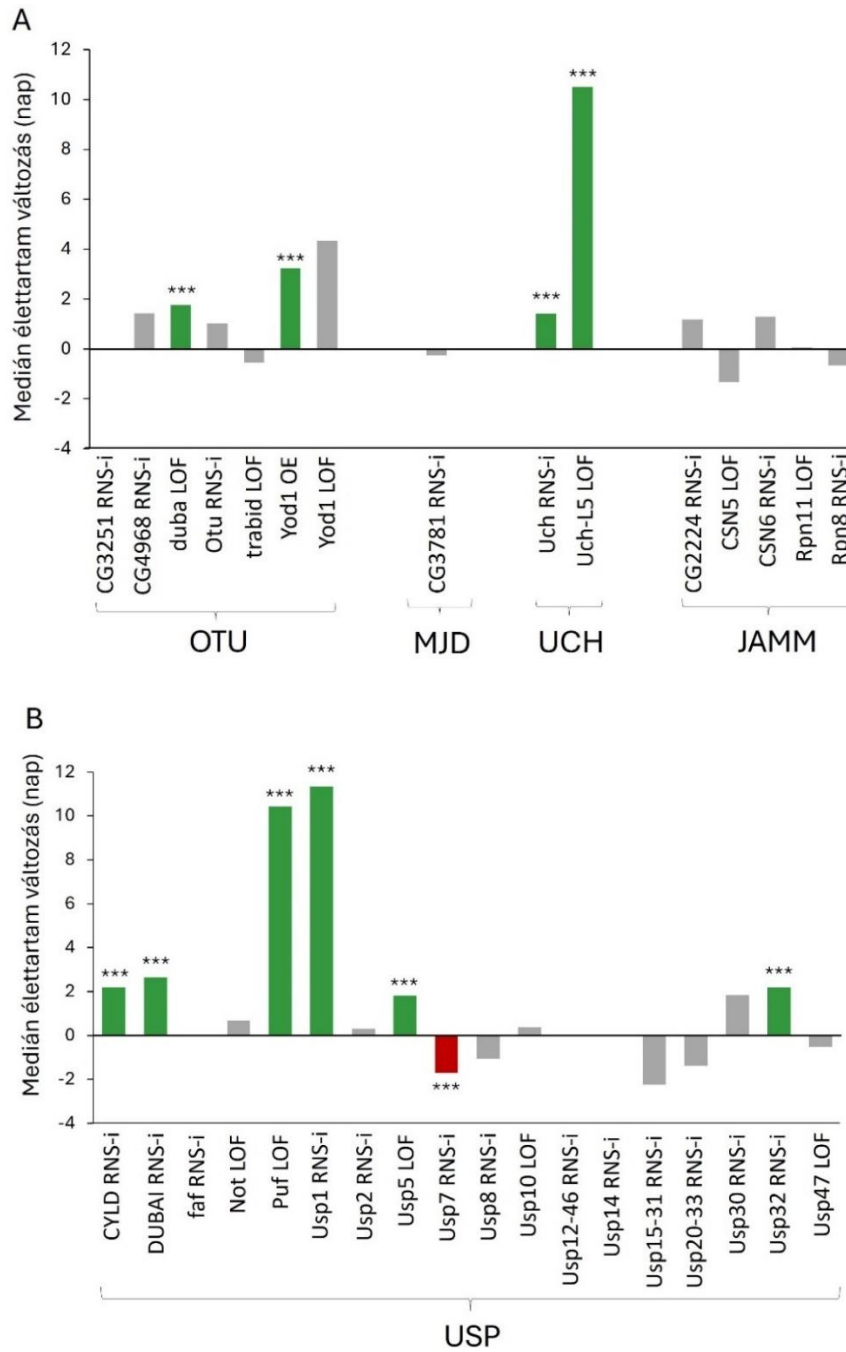


10. ábra. A DUB gének HD muslicák életképességére gyakorolt hatása. A: Az OTU, MJD, UCH és JAMM DUB családokból tesztelt DUB-ok hatása a HD állatok életképességére. B: Az USP DUB családból tesztelt DUB-ok hatása a HD állatok életképességére. RNS-i: RNS interferenciás allél, LOF: Loss of function (funkció vesztékes mutáció), OE: Overexpressziós allél. A grafikonok a relatív életképesség változást mutatják %-ban kifejezve. A vízszintes vonal a 100% értéket jelöli, ami alatt romlást, felette javulást láthatunk a HD muslicák életképességében. A szignifikancia értékeket páros T-tesztel számoltuk. ***= $P < 0,001$.

Az eredmények azt mutatják, hogy a *Yod1* túltermelése (életképesség 75% szemben a HD nőstényeknél 27%, $P= 2 \times 10^{-3}$), a *CG4968* (életképesség 64% szemben a HD nőstényeknél 36%, $P= 1,9 \times 10^{-4}$), *Usp1* (életképesség 78% szemben a HD nőstényeknél 27%, $P= 3,7 \times 10^{-8}$) és *Usp30* (életképesség 59% szemben a HD nőstényeknél 27%, $P= 1,9 \times 10^{-5}$) RNS interferenciás allélja, az *Usp5* (életképesség 27% szemben a HD nőstényeknél 22%, $P= 3,1 \times 10^{-10}$) és *Uch-L5* (életképesség 77% szemben a HD nőstényeknél 48%, $P= 1,02 \times 10^{-5}$) funkcióvesztéses mutációja szignifikánsan javítja a *mHtt* által redukált életképességet, míg a *CG3251* (életképesség 25% szemben a HD nőstényeknél 56%, $P= 1,2 \times 10^{-7}$), *Usp7* (életképesség 26% szemben a HD nőstényeknél 5%, $P= 3,7 \times 10^{-5}$) és *Usp8* (életképesség 29% szemben a HD nőstényeknél 57%, $P= 3,62 \times 10^{-5}$) RNS interferenciás alléljai esetében szignifikáns romlás figyelhető meg.

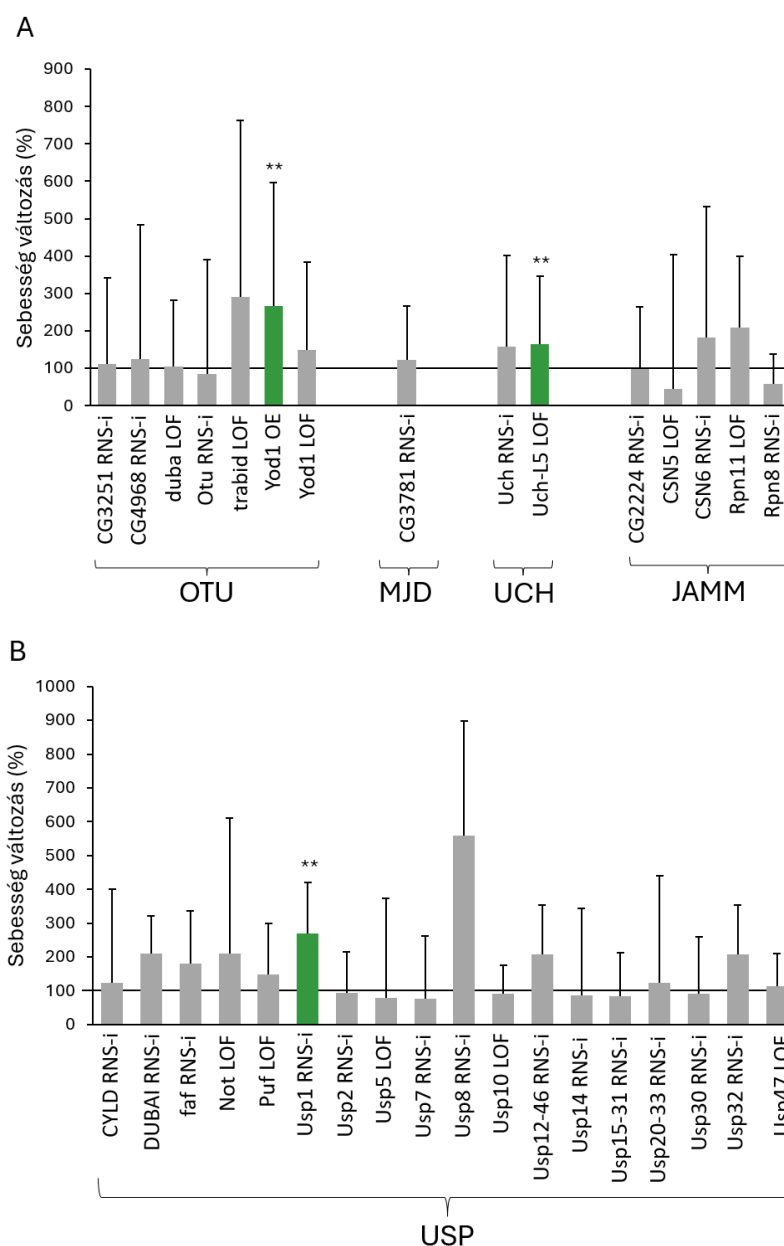
4.1.2. A DUB gének hatása a HD muslicák élettartamára

Az élettartam vizsgálatok során 7 napig követtük nyomon az állatok túlélését, statisztikai szignifikanciát 50%-os mortalitásnál számoltunk. Az egészséges állatok akár 70-80 napig is élnek, ezzel szemben a *mHtt*-t expresszáló állatok maximális élettartama nagyjából 10-12 napra tehető. Kísérleteinkben ezt a jelentős redukciót javította a *Yod1* túltermelése (medián élettartam 8,87 nap szemben a HD nőstényeknél 5,63 nap, $P= 4,8 \times 10^{-9}$) és a *duba* (medián élettartam 7,45 nap szemben a HD nőstényeknél 5,69 nap, $P= 3 \times 10^{-4}$), *CYLD* (medián élettartam 9,83 nap szemben a HD nőstényeknél 7,64 nap, $P= 5 \times 10^{-4}$), *DUBAI* (medián élettartam 7,7 nap szemben a HD nőstényeknél 5,06 nap, $P= 6,4 \times 10^{-13}$), *puf* (medián élettartam 16,93 nap szemben a HD nőstényeknél 6,5 nap, $P= 2 \times 10^{-13}$), *Usp1* (medián élettartam 16,57 nap szemben a HD nőstényeknél 5,23 nap, $P= 3 \times 10^{-13}$), *Usp5* (medián élettartam 7,62 nap szemben a HD nőstényeknél 5,81 nap, $P= 5 \times 10^{-4}$), *Usp32* (medián élettartam 7,22 nap szemben a HD nőstényeknél 5,04, $P= 3,4 \times 10^{-10}$), *Uch* (medián élettartam 7,93 nap szemben a HD nőstényeknél 6,52 nap, $P= 5,9 \times 10^{-6}$), és *Uch-L5* (medián élettartam 17,38 nap szemben a HD nőstényeknél 6,88 nap, $P= 3,8 \times 10^{-6}$) RNS interferenciás alléljai. Szignifikáns medián élettartam rövidülést az *Usp7* (medián élettartam 6,62 nap szemben a HD nőstényeknél 8,33 nap, $P= 1 \times 10^{-4}$) RNS interferenciával történő csendesítése esetében figyeltünk meg. A DUB gének HD muslicák medián élettartamára gyakorolt hatását a 11. ábra mutatja.



11. ábra. A DUB gének hatása a HD muslicák medián élettartamára. A: Az OTU, MJD, UCH és JAMM DUB családokból tesztelt DUB-ok hatása a HD muslicák élettartamára. B: Az USP családból tesztelt DUB-ok hatása a HD muslicák élettartamára. RNS-i: RNS interferenciás allél, LOF: Loss of function (funkció vesztéses mutáció), OE: Overexpressziós allél. A grafikonok a medián élettartamban történt változás mértékét mutatják napokban kifejezve. A pozitív értékek a javulást, a negatív értékek a medián élettartamban történő romlást mutatják. A szignifikancia értékek meghatározása az OASIS2 online alkalmazás segítségével, Fisher egzakt teszttel történt. ***: $P_{50\%} < 0,001$.

4.1.3. DUB gének hatása a HD muslicák motoros aktivitására



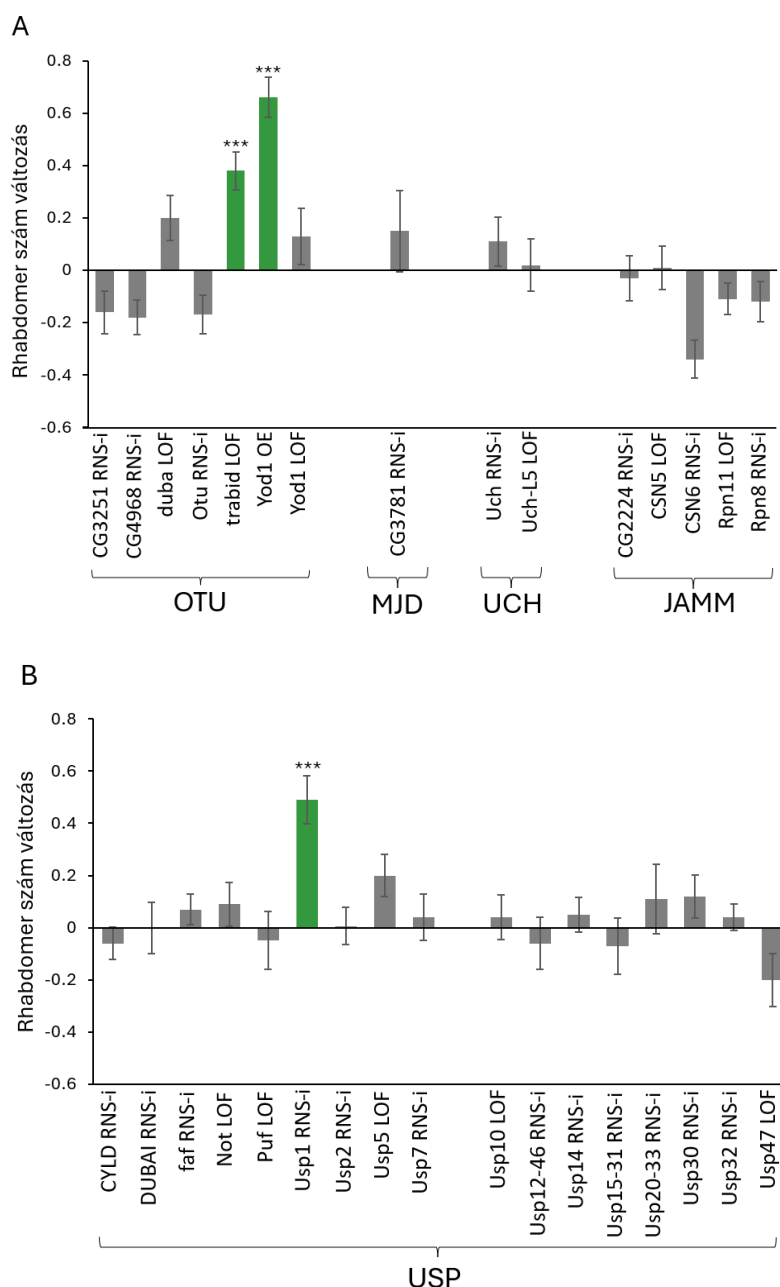
12. ábra. A DUB gének hatása a HD muslicák mozgási képességeire. A: Az OTU, MJD, UCH és JAMM DUB családokból tesztelt DUB-ok HD állatok motoros képességeire gyakorolt hatása. B: Az USP DUB családból tesztelt DUB-ok HD állatok motoros képességeire gyakorolt hatása. RNS-i: RNS interferenciás allél, LOF: Loss of function (funkció vesztéses mutáció), OE: Overexpressziós allél. A grafikonok a mm/s-ban megadott sebesség %-os változását mutatják a HD nőstényekhez viszonyítva. 100% alatt a motoros képességek romlása, felette a javulása látható (+szórás). A szignifikancia értékeket R programban Wilcoxon rank sum test segítségével határoztuk meg. **: $P < 0,03$.

A motoros képességek vizsgálata mászás teszttel történt, ami alapján elmondható, hogy a *Yod1* túltermelése (sebesség 4,7mm/s szemben a HD nőstényeknél 1,76mm/s, $P= 1,3 \times 10^{-3}$), az *Uch-L5* (sebesség 4,9 mm/s szemben a HD nőstényeknél 3 mm/s, $P= 3,7 \times 10^{-3}$) és az *Usp1* (sebesség 3,3 mm/s szemben a HD nőstényeknél 1,2 mm/s, $P= 0,029$) RNS interferenciával történő géncsendesítése szignifikánsan javítja a HD legyek mozgási képességeit (12. ábra)

4.1.4. DUB gének hatása a HD muslicák fotoreceptor neuronjainak degenerációjára

A neurodegenerációs folyamatokat az úgynevezett pseudopupil assay módszerrel vizsgáltuk¹⁹¹ minden DUB esetében 7 napos korban. Ennek során az idegsejtek pusztulására a szemben fénymikroszkóppal is látható fotoreceptor neuronok fénygyűjtő szerkezeteinek (rhabdomerek) számából következtethetünk. Egészséges állatok esetében minden ommatídiumban 7 rhabdomer látható, a HD állatokban azonban ennek az átlagértéke lecsökken körülbelül 5,8-ra. A neurodegenerációs vizsgálatok összefoglaló eredményei a 13. ábrán láthatóak.

Szignifikánsan nagyobb értékeket kaptunk a *Yod1* túltermelésével (átlagosan 6,47 rhabdomer ommatídiumonként szemben a HD nőstényeknél 5,81 rhabdomer/ommatídium, $P= 9,7 \times 10^{-12}$), valamint a *trbd* (átlagosan 6,28 rhabdomer ommatídiumonként szemben a HD nőstényeknél 5,9 rhabdomer/ommatídium, $P= 2,7 \times 10^{-8}$) funkcióvesztéses és *Usp1* (átlagosan 6,4 rhabdomer ommatídiumonként szemben a HD nőstényeknél 5,91 rhabdomer/ommatídium, $P= 1,13 \times 10^{-6}$) RNS interferenciás alléljaival.



13. ábra. A DUB gének hatása a HD muslicák fotoreceptor neuronjainak degenerációjára. A: Az OTU, MJD, UCH és JAMM DUB családokból tesztelt DUB-ok HD állatok neurodegenerációs folyamataira gyakorolt hatása. B: Az USP DUB családból tesztelt DUB-ok hatása a HD állatok neurodegenerációjára. RNS-i: RNS interferenciás allél, LOF: Loss of function (funkció veszteses mutáció), OE: Overexpressziós allél. A grafikonok az ommatidiumonkénti átlag rhabdomer számban történt változás mértékét mutatják a HD nőstényekhez képest ($\pm$ standard error). A pozitív értékek a javulást, a negatív értékek a romlást mutatják a fotoreceptor neuronok pusztulásában. A szignifikancia értékek meghatározása T-tesztel történt. ***: $P < 0,001$.

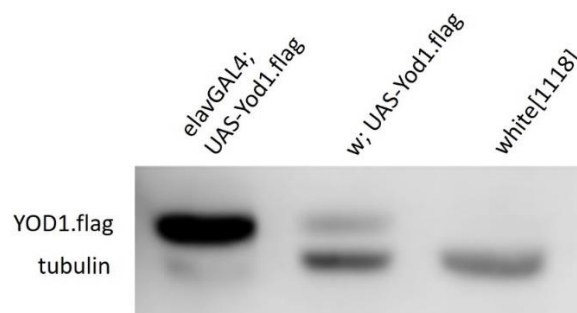
Eredményeink alapján a *Yod1* overexpressziója és az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsökkentése volt mind a négy kísérlet során jelentős javító hatással *mHtt* kiváltotta patológiás fenotípusra. A *Yod1* az OTU DUB családba sorolt dYOD1 ubikvitin hidroláz enzimet kódolja, mely a humán YOD1 ortológja (szekvencia azonosság: 42%, hasonlóság: 58%). A *Yod1*[*EY07831*] allél ami szupresszálja HD indukálta fenotípusokat, egy P{EPgy2} elem inszerciót hordoz a gén 5'-UTR régiójában, ami GAL4 driver jelenlétében fokozza a *Yod1* gén expresszióját.

Az *Usp1* az USP családba sorolt Ubikvitin specifikus proteáz1-et kódolja, melynek humán ortológja az *Usp1* (szekvencia azonosság: 24%, hasonlóság: 38%). A tesztek során használt *Usp1*[*JF02992*] transzgenikus vonal a *P{TRiP.JF02992}* transzgént hordozza, ami az *Usp1* GAL4 driver függő géncsökkentését teszi lehetővé RNS interferencia révén.

Az eredmények megerősítésének céljából megismételtük a kísérletsorozatot mindkét DUB esetében a vizsgált *Yod1*[*EY07831*] allél és az *Usp1*[*JF02992*] transzgén hatásával megegyező, de eltérő genetikai konstrukciókat hordozó törzsekkel. Az *Usp1* esetében egy PBac transzpozon indukálta funkcióvesztéses mutáns alléllal (*Usp1*[*c05664*]) ismételtük meg a kísérleteinket. Az *Usp1*[*c05664*] allél vizsgálatával kapott eredmények nem erősítették meg az *Usp1*[*JF02992*] transzgénnel kapott pozitív hatásokat, ezért az *Usp1* vizsgálatát nem folytattuk tovább. Az eredményeket bemutató ábrák a függelék fejezetben találhatóak (F1-F4. ábra).

4.2. A *Yod1* túltermelése javítja HD legyek fenotípusát

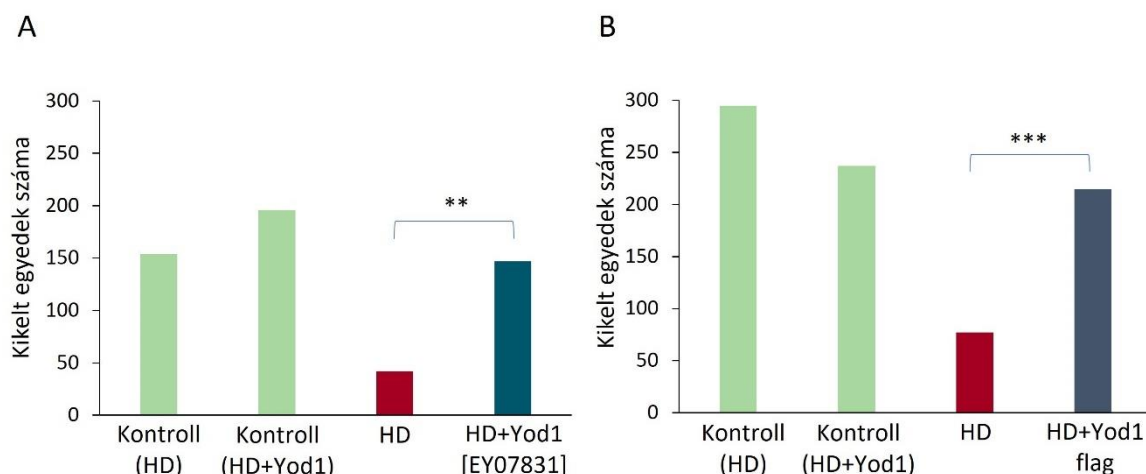
A YOD1 DUB esetében létrehoztunk egy *UAS-Yod1.flag* konstrukciót, melyet *Drosophila* embriókba injektáltattunk. Az így létrehozott törzsben a 3. kromoszómába épült transzgén az GAL4-UAS expressziós rendszer szabályozása alatt áll. A transzgént hordozó és expresszáló törzsek validálása western blottal történt a C-terminális FLAG-tagre specifikus ellenanyag felhasználásával (14. ábra). Az *UAS-Yod1.flag* transzgént expresszáló nőstények mintájában határozott erős jelet kaptunk, vagyis a transzgén működik és nem hordoz frame-shift mutációt. A transzgént hordozó, de elav-GAL4 drivert nem hordozó hímek mintájában is megjelent egy halványabb jel, de ez nem befolyásolta a kísérleteinket, ez csupán a transzgén enyhe szivárgását mutatja. A negatív kontroll *white*[*1118*] állatok mintájában nem kaptunk FLAG specifikus jelet.



14. ábra. Az *UAS-Yod1.flag* törzs validálása Western blottal. A validálás során a *UAS-Yod1.flag* expresszáló nőstényeket, a *UAS-Yod1.flag* konstrukciót hordozó, de azt nem expresszáló hímeket, és negatív kontrollként a transzgént nem hordozó *white¹¹¹⁸* állatokat használtunk. Referenciafehérjénk (loading control) a tubulin volt.

4.2.1. A *Yod1* túltermelésének hatása a HD muslicák életképességére

A *Yod1* túltermelés HD legyek életképességére gyakorolt hatását az 15. ábra mutatja. A *Yod1[EY07831]* allélt hordozó HD legyek életképessége jelentős javulást mutatott ($P=2 \times 10^{-3}$) (15/A ábra) amit *Yod1.flag* transzgént expresszáló állatokkal is megerősítettünk ($P=3,3 \times 10^{-5}$) (15/B ábra). Mindkét interakció esetében elmondható, hogy hatásukra nagyjából háromszorosára növekedett a HD legyek életképessége, ami statisztikailag szignifikánsnak is bizonyult.

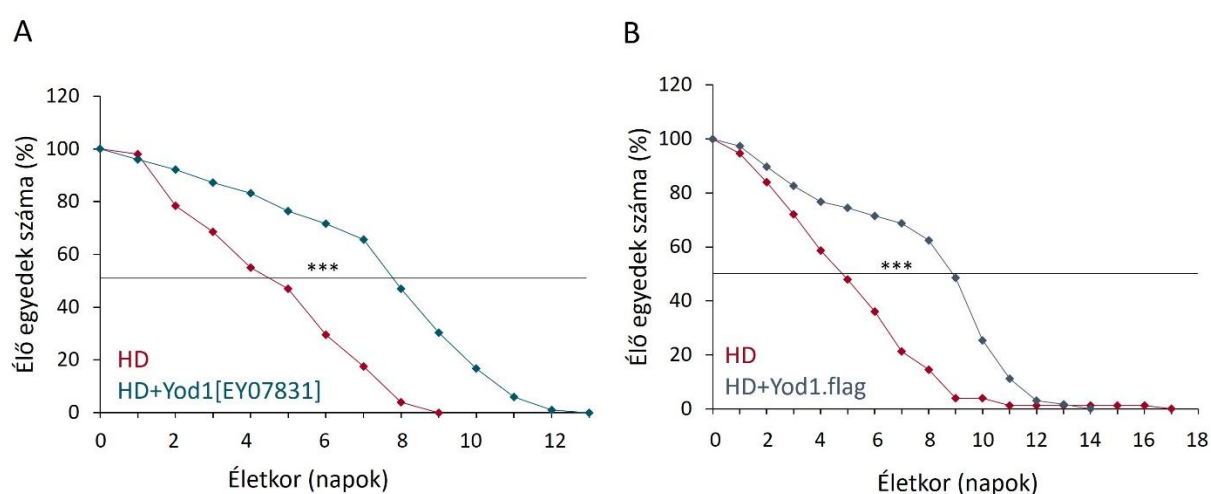


15. ábra. A *Yod1* túltermelésének HD muslicák életképességére gyakorolt hatása.

A: A *Httex1.Q120* – *Yod1[EY07831]* interakciós keresztezésből kikelt egyedek száma genotípus kategóriánként. B: A *Httex1.Q120* – *Yod1.flag* interakciós keresztezésből származó egyedek száma. Zöld színnel a kontroll hímeket jelöltük, melyek hordozzák, de nem expresszálják a transzgént. **: $P < 0,03$, ***: $P < 0,001$.

4.2.2. A *Yod1* túltermelésének hatása a HD legyek élettartamára

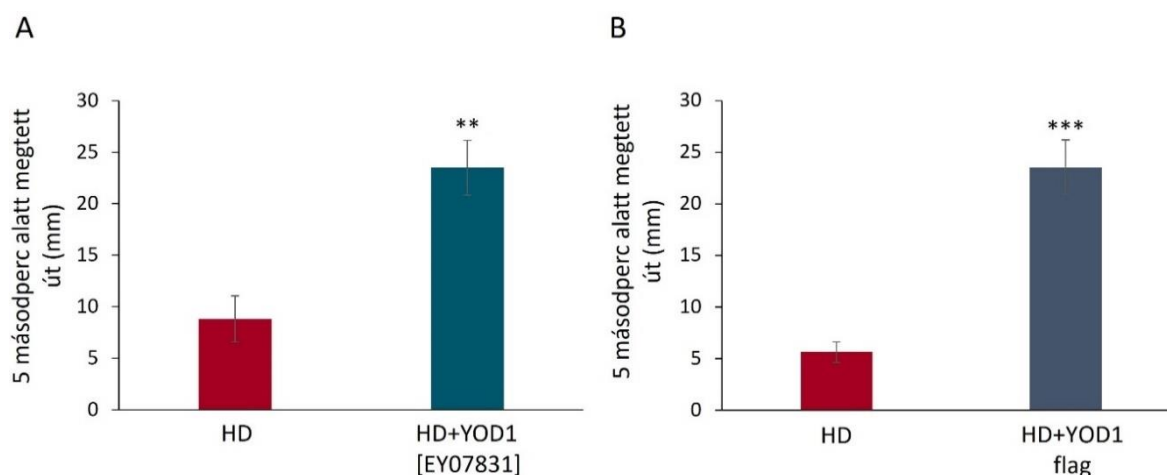
Vizsgáltuk a *Yod1* túltermelésének az élettartamra gyakorolt hatását a HD modellben. A nőstény állatok túlélését addig kísértük figyelemmel, amíg nem maradt élő egyed egyik kategóriában sem. A *Yod1*[*EY07831*] törzzsel végzett kísérletnél ez 14 (16/A ábra), a *Yod1*.*flag* törzsnél 19 nap volt (16/B ábra). A HD legyek medián élettartama mindkét kísérletben 6 nap volt, ezzel szemben a *Yod1*[*EY07831*] allél hatására a medián élettartam 9 napra ($P=4,8 \times 10^{-9}$), a *Yod1*.*flag* túltermelés hatására 10 napra ($P=8,9 \times 10^{-13}$) növekedett. A két interakciós kísérletben nagyon hasonló eredményt kaptunk, a *Yod1* túltermelése mindkét esetben megnövelte HD legyek élettartamát.



16. ábra. A *Yod1* túltermelésének HD legyek élettartamára gyakorolt hatása. A túlélési görbék az élő egyedek százalékos arányát mutatják a napokban kifejezett életkor függvényében. A: *Httex1.Q120* – *Yod1*[*EY07831*] interakció túlélési görbéje ($n_{HD}=51$ és $n_{HD+Yod1}=102$). B: *Httex1.Q120* x *Yod1*.*flag* interakció túlélési görbéje ($n_{HD}=75$ és $n_{HD+Yod1}=224$). ***: $P<0,001$.

4.2.3. A *Yod1* túltermelésének hatása HD legyek mozgási képességeire

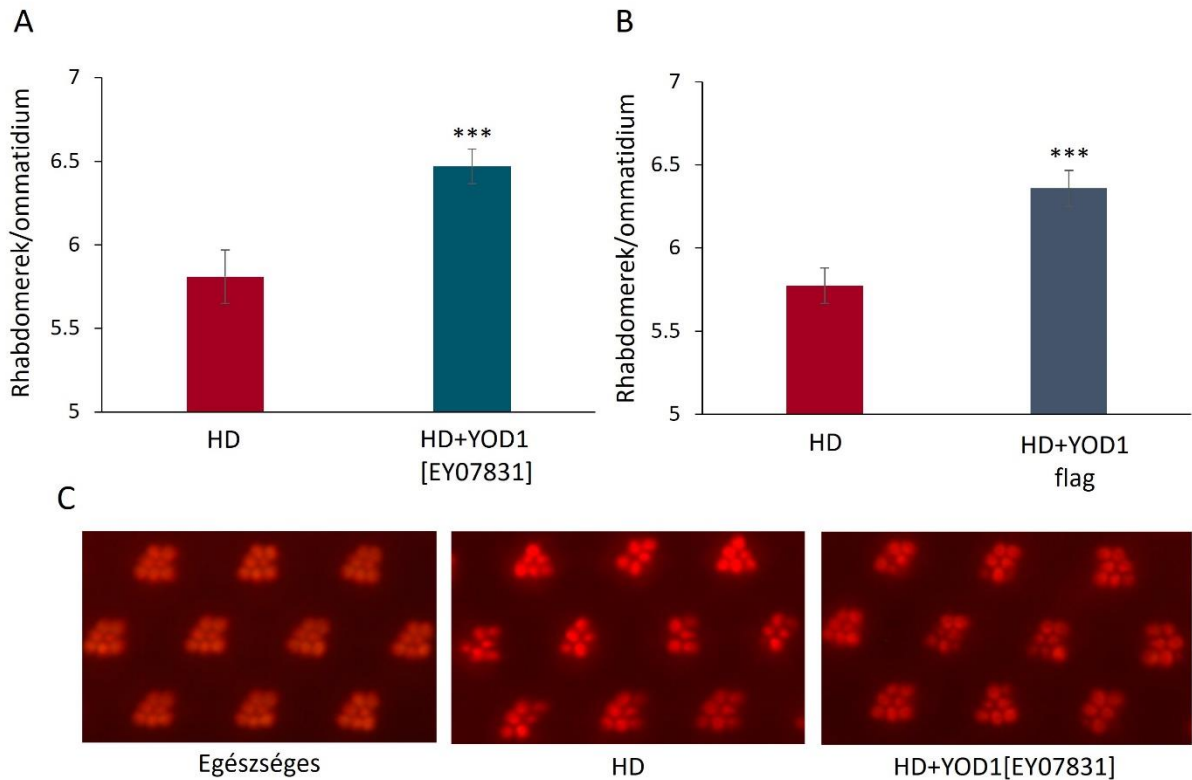
Vizsgáltuk a *Yod1* túltermelésének hatását 3 napos HD állatok mozgási képességeire. Ehhez mászás tesztet hajtottunk végre, melynek során az 5 másodperc alatt megtett vertikális távolságokat elemztük ki. A *Yod1*[*EY07831*] allélt expresszáló HD legyek mintegy háromszor ($P=0,019$), a *Yod1*.*flag* transzgént expresszáló állatok mintegy négyszer akkora távolságot tettek meg ($P=4,08 \times 10^{-6}$), mint a *Yod1*-re vad típusú HD állatok. Ez alapján elmondható, hogy *Yod1* túltermelése javítja HD-ban leromló motoros képességeket (17. ábra).



17. ábra. *Yod1* túltermelésének HD legyek mozgási képességeire gyakorolt hatása. A: *Httex1.Q120* – *Yod1[EY07831]* interakciós keresztezésből származó egyedek által 5 másodperc alatt átlagosan megtett távolságok $\pm$ szórás ($n_{HD} = 23$ és $n_{HD+Yod1} = 52$). B: *Httex1.Q120* x *Yod1.flag* interakciós keresztezésből származó egyedek által megtett átlagos út $\pm$ szórás 5 másodperc alatt ($n_{HD} = 75$ és $n_{HD+Yod1} = 83$). **: $P < 0,03$, ***: $P < 0,001$.

4.2.4. A *Yod1* túltermelésének hatása a HD legyek fotoreceptor neuronjainak degenerációjára

A neurodegenerációs folyamatok vizsgálatát *Yod1* törzsekkel végzett genetikai interakciós keresztezésekből származó 7 napos utódokon végeztük el. A 18. ábrán látható, hogy a *Yod1[EY07831]* allélt, illetve a *Yod1.flag* transzgént a *Httex1.Q120* transzgénnel ko-expresszálo állatokban csökkent neuronpusztulás figyelhető meg a kontroll HD állatokhoz képest. Az eredmények mindkét interakcióban szignifikánsnak bizonyultak. Az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomer szám HD állatoknál 5,8 volt, míg HD+*YOD1[EY07831]* állatoknál 6,47 ($P = 9,7 \times 10^{-12}$). A másik kísérlet során a HD legyek átlag rhabdomerszáma 5,77, a HD+*YOD1.flag* állatoknál számolt átlag rhabdomerszám 6,36 volt ($3,5 \times 10^{-10}$).



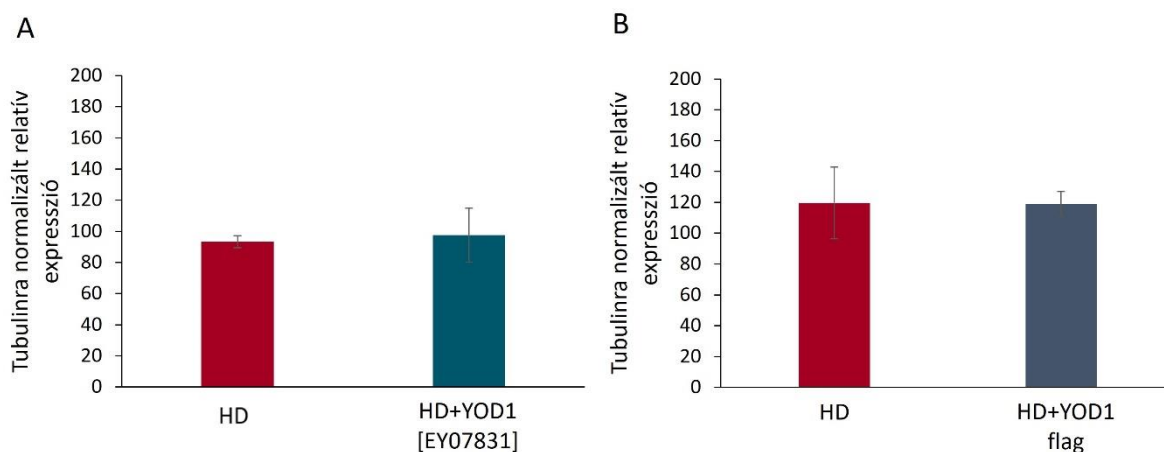
18. ábra. A *Yod1* túltermelésének HD legyek neurodegenerációjára gyakorolt hatása.

A: *Yod1*[EY07831] allél hatása HD legyek neuronpusztulására ($n_{HD} = 10$ és $n_{HD+Yod1} = 15$). B: *Yod1*.flag transzgén hatása HD legyek neurodegenerációjára ($n_{HD} = 10$ és $n_{HD+Yod1} = 10$). A grafikonokon az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomerszám $\pm$ szórás látható. C: Fénymikroszkópiás felvételek a fotoneuronreceptorok fénygyűjtő szerkezeteiről (rhabdomerek). ***: $P < 0,001$.

4.2.5. A *UAS-Httex1.Q120* expressziójának vizsgálata *Yod1* transzgén jelenlétében

A *Yod1* túltermelése a *Httex1.Q120* – *Yod1*[EY07831] és a *Httex1.Q120* x *Yod1*.flag interakció esetében is jelentősen javította a HD legyek fenotípusát. Kísérleteink során minden transzgén GAL4-UAS rendszerben működött, ezért ellenőriztük, hogy a *Httex1.Q120* transzgén expressziója változott-e abban az esetben, ha a *Yod1*[EY07831] túltermelő mutánst, vagy a *Yod1*.flag transzgént hordozták mellette az állatok. Egyes transzgének előtt több UAS szekvencia található, melyek elvonhatják a GAL4 drivert a rendszerből, ezáltal egy másik transzgén expresszióját csökkenthetik. Reverz transzkripciót követő kvantitatív real-time PCR kísérletekkel igazoltuk, hogy a *Yod1* törzsek esetében nincs erről szó, a *Httex1.Q120*

expressziós szintje nem csökken, így a fenotípusos javulás valóban *Yod1* túltermelésének köszönhető (19. ábra).



19. ábra. A *mHtt* relatív expressziós szintje nem változik a *Yod1*-et is túltermelő állatokban a HD kontrollhoz képest. Az ábrák a *mHtt* relatív expressziós szintjeit ($\pm$ szórás) mutatják α -tubulin *at 84B* háztartási génre normalizálva. A *Yod1*[EY07831] túltermelő mutáns (A, $n_{HD} = 3$ és $n_{HD+Yod1} = 3$) és *UAS-Yod1.flag* (B, $n_{HD} = 3$ és $n_{HD+Yod1} = 3$) transzgén esetén is változatlan *mHtt* expressziót mértünk.

4.3. A *Yod1* túltermelés hatása a vad típusnak megfelelő *Httex1.Q25* transzgént expresszáló állatok fenotípusára

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy HD legyen fenotípusos javulása *Yod1* túltermelés hatására következett be, megvizsgáltuk, hogy egészséges állatokban túlműködtetve okoz-e fenotípusos változásokat, esetleg van-e káros hatása. Ehhez *Httex1.Q25* transzgént hordozó állatokat használtunk, mely megegyezik a *Httex1.Q120* konstrukcióval, csupán a *Htt* első exonjában lévő poliglutamin ismétlődések száma 25, ami megfelel az egészséges formával. A keresztezéseket *Yod1*[EY07831] allélt expresszáló törzzsel állítottuk össze ugyanúgy, mint az előző kísérletsorozatokban.

4.3.1. A *Yod1* túltermelésének hatása egészséges állatok életképességére

Az életképességi vizsgálatok során nagyjából azonos számban keltek ki a transzgéneket expresszáló nőstény kategóriák, így elmondhatjuk, hogy egészséges egyedekben a

Yod1[EY07831] allélnak nem volt negatív hatása az egészséges állatok életképességére ($P=0,81$)(20/A ábra).

4.3.2. A *Yod1* túltermelésének hatása egészséges állatok élettartamára

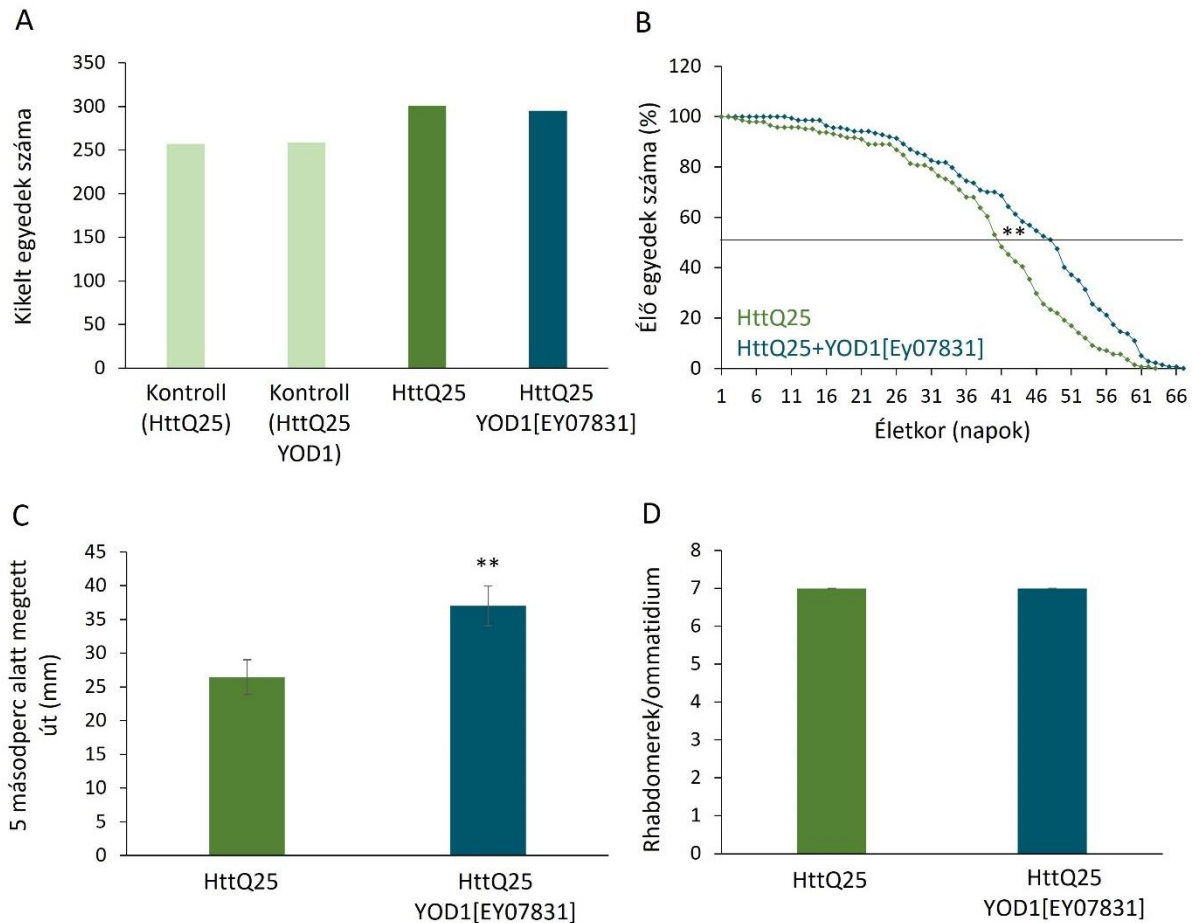
Az élettartam vizsgálatok 66 napig folytak, az utolsó egyed haláláig. A túlélési görbén (20/B ábra) jól látható, hogy a Q25+YOD1 állatokat prezentáló görbe kissé végig a Q25 állatok görbéje felett járt, a különbség Fisher egzakt teszttel 50%-os mortalitásnál szignifikáns volt ($P=6,7 \times 10^{-3}$).

4.3.3. A *Yod1* túltermelésének hatása egészséges állatok motoros képességeire

A mászás teszt során háromnapos nőtény állatokat vizsgáltunk, mindkét kategóriából 50-50 egyedet. Az eredményeket az 20/C ábra mutatja. A *Yod1*-et túltermelő állatok szignifikánsan jobb mászási képességekkel rendelkeztek, mint a kontroll Q25 állatok ($P=8 \times 10^{-3}$).

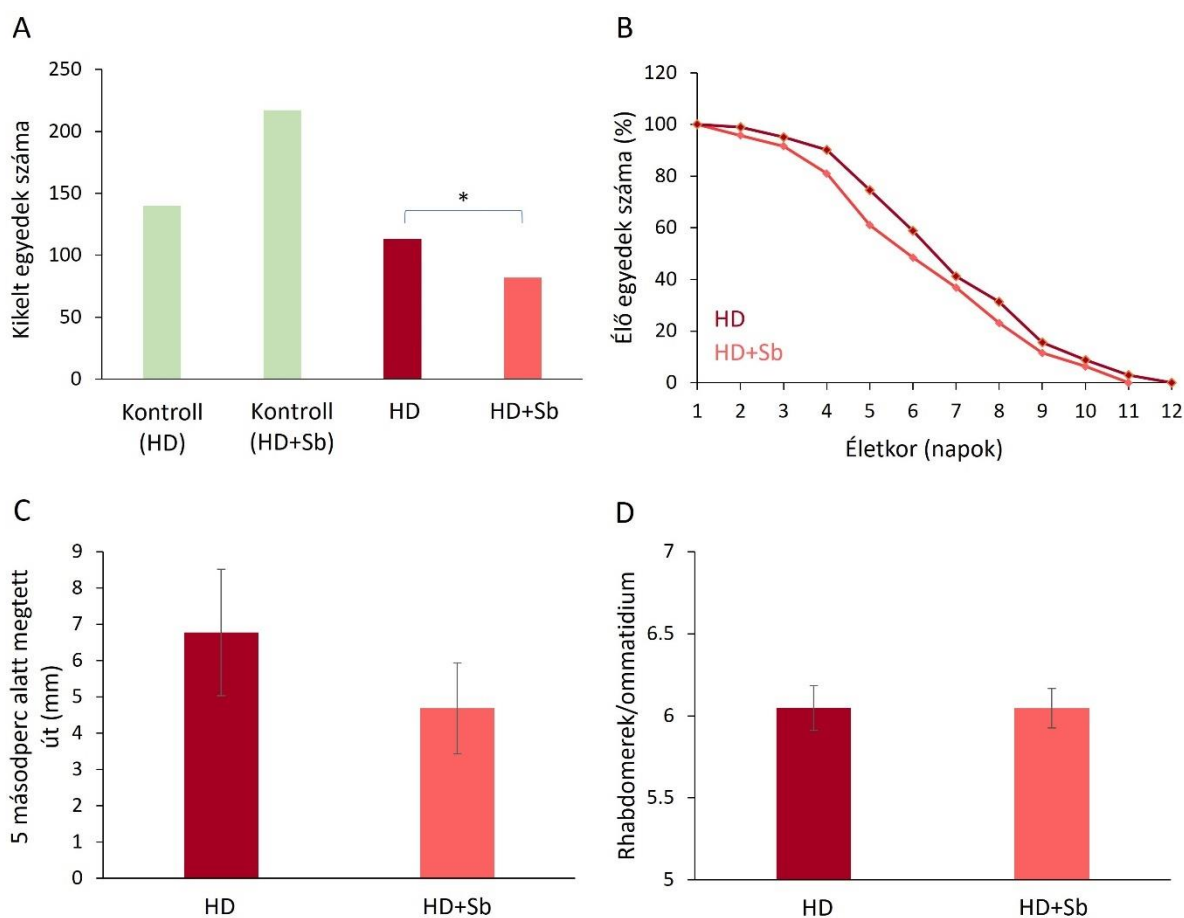
4.3.4. A *Yod1* túltermelésének hatása egészséges fotoreceptor neuronokra

A fotoreceptor neuronok vizsgálatát 7 napos nőtényeken végeztük el, ilyen korú állatoknál már jelentkeznek az esetleges negatív hatások. Ahogy az ábrán is látható, minden egyed szeme megfelelt a vad típusú legyekre jellemző 7-es rhabdomer/ommatidium átlagnak, a mikroszkópban nem volt látható ettől eltérő ommatidium. Elmondhatjuk, hogy a *Yod1* túltermelése nem idéz elő mikroszkóppal vizsgálható neurodegeneratív folyamatokat egészséges állatokban (20/D ábra).



20. ábra. A *Yod1*[MY07831] allél expressziójának egészséges állatok fenotípusára gyakorolt hatása. A *Yod1* túltermelés hatása Httex1.Q25 expresszáló állatok életképességére (A), élettartamára (B), mozgási képességeire (C) és az összetett szem ommatidiumaiban látható rhabdomerek számára (D). Az (A) ábra az interakciós keresztezésből származó utódkategóriákba eső egyedek számát mutatja, a (B) ábra a túlélő egyedek százalékos arányát ábrázolja a napokban kifejezett életkor függvényében ($n_{HD} = 148$ és $n_{HD+Yod1} = 141$), a (C) ábra az 5 másodperc alatt megtett átlagos vertikális távolságot ($\pm$ szórás, $n_{HD} = 50$ és $n_{HD+Yod1} = 50$), a (D) ábra az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomerszámot ($\pm$ szórás, $n_{HD} = 10$ és $n_{HD+Yod1} = 10$) mutatja. ** $<0,03$.

4.4. A *Sb* marker hatásának vizsgálata HD állatok fenotípusára



21. ábra. A *Sb* (*Stubble*) markergén mutációjának hatása HD legyek fenotípusára. *Sb* marker hatása HD legyek életképességére (A), élettartamára (B), motoros képességeire (C) és a fotoreceptor neuronok degenerációjára (D). Az (A) ábra a keresztezésekből származó utódkategóriákba eső egyedek számát mutatja, a (B) ábra a túlélő egyedek százalékos arányát ábrázolja a napokban kifejezett életkor függvényében ($n_{HD} = 102$ és $n_{HD+Sb} = 95$), a (C) ábra az 5 másodperc alatt megtett átlagos vertikális távolságot ($\pm$ standard error, $n_{HD} = 28$ és $n_{HD+Sb} = 26$), a (D) ábra az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomerszámot ($\pm$ szórás, $n_{HD} = 10$ és $n_{HD+Sb} = 10$) mutatja. *: $P < 0,05$.

Kísérleteink során a *Yod1* allél és transzgén nyomon követése a *Sb* markergén mutációval történt, ami megrövidült szőr fenotípust okoz. Annak tisztázására, hogy HD állatokban a *Yod1* túltermelés hatására bekövetkező fenotípus javulást milyen mértékben befolyásolta, hogy a kontroll HD csoport hordozta ezt a markermutációt, megvizsgáltuk *Sb*

marker hatásait HD állatokban. Ehhez a keresztezéseket ugyanúgy végeztük el, mint az előzőeket, csak az első keresztezés során nem egy DUB mutációt hordozó *Drosophila* törzset, hanem vad típusú *w[1118]* állatokat használtunk. Így a vizsgált nőstény utódok egy része *elavGAL4; Httex1.Q120; +* genotípusú, másik része *elavGAL4; Httex1.Q120; Sb/+* genotípusú volt. Az eredményeket a 21. ábra mutatja.

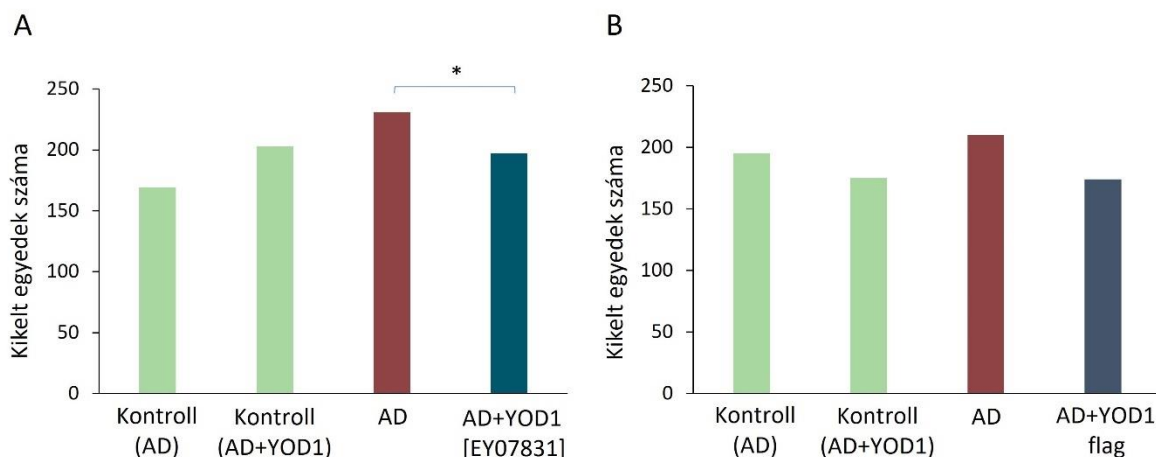
A *Sb* markermutáció enyhe romlást okoz az életképességben ($P=0,04$), de az élettartamra ($P=0,56$), motoros képességekre ($P=0,45$) és a fotoreceptor neuronok degenerációjára nem volt szignifikáns hatással ($P=0,96$), így összességében elmondható, hogy a HD legyek fenotípusos javulása a *Yod1* túltermelésének köszönhető. Azonban a *Httex1.Q25* állatokkal elvégzett interakció esetén tapasztalt enyhébb eltéréseket okozhatta a *Sb* markergén mutációja.

4.5.A *Yod1* túltermelésének vizsgálata Alzheimer-kór modellben

Eredményeinkből látható, hogy *Yod1* túltermelésével javítani tudtuk a HD által kiváltott beteg fenotípusokat. Annak tisztázására, hogy ez a pozitív hatás általános a neurodegeneratív folyamatokra, vagy specifikusan a mHTT túltermelés esetében figyelhető meg, a YOD1 deubikvitináz túltermelésének hatását megvizsgáltuk az Alzheimer-kór *Drosophila* modelljében. A humán amiloid- β_{1-42} peptidet expresszáló modell a kísérleti körülményeink között gyengébb fenotípust mutat, mint a Huntington-kór modellünk, de neurodegeneratív folyamatok itt is megfigyelhetők. Az amiloid- β_{1-42} az APP (amiloid prekursor protein) fehérje ú.n. amiloidogén processzálása következtében jön létre, a mHTT-hez hasonlóan aggregációra hajlamos és jelentős szerepet játszik az AD patogenezisében^{192,193}. Kísérleteinket a laborunkban végzett előzetes AD tesztek alapján végeztük el, az egyes vizsgálatok optimális idejének meghatározása ezek alapján történt.

4.5.1.A *Yod1* túltermelésének hatása AD muslicák életképességére

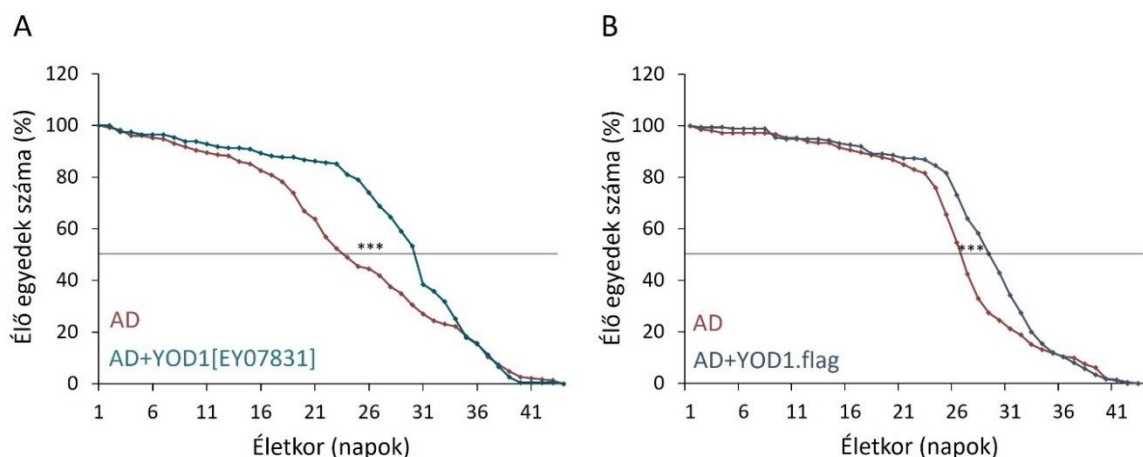
AD modellben az életképességben nincs különbség a vad típusú állatokhoz képest, vagyis nem figyelhető meg az az erőteljes életképesség romlás, mint a HD állatoknál. A tesztek eredménye a 22. ábrán látható. Enyhe életképesség romlást tapasztaltunk a *Yod1[EY07831]* allél hatására AD állatoknál ($P=0,047$), azonban a *Yod1.flag* transzgén esetében ezt nem tapasztaltuk ($P=0,62$).



22. ábra. *Yod1* túltermelés AD legyek életképességére gyakorolt hatása. (A) a *Yod1*[*EY07831*] allél, és a (B) *Yod1*.flag transzgén hatása AD legyek életképességére. Az ábra a keresztezésekből származó utódkategóriákba eső egyedek számát mutatja. *: $P < 0,05$.

4.5.2. A *Yod1* túltermelésének hatása AD muslicák élettartamára

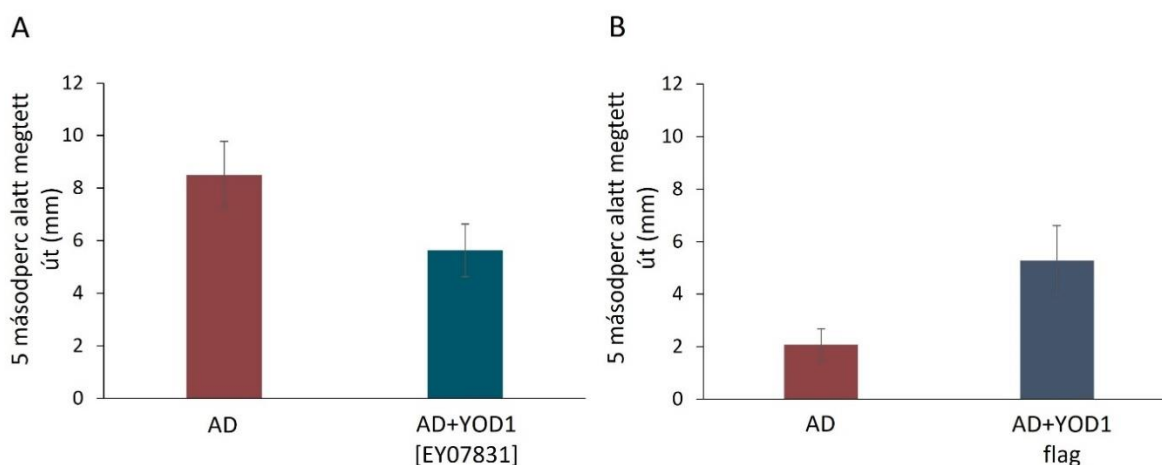
Vizsgáltuk a *Yod1* túltermelés élettartamra gyakorolt hatását az AD modellben. Az egészséges *Drosophila* egyedek medián élettartama 40-50 napra tehető, ezzel szemben az AD muslicák esetében ez 25-27 napot jelent. A muslicák túlélését addig kísértük figyelemmel, amíg nem maradt élő egyed egyik kategóriában sem. Ez a *Yod1*[*EY07831*] allélnál 43 nap, a *Yod1*.flag konstrukció esetében 42 nap volt. Összességében elmondható, hogy *Yod1* túltermelésének enyhe élethossznyújtó hatása volt, ami a túlélési görbe felénél látszódik, vagyis a medián élettartamot növelte meg. A *Yod1*[*EY07831*] allél ($P = 2,7 \times 10^{-6}$) és a *Yod1*.flag transzgén ($P = 2,8 \times 10^{-8}$) medián élettartama esetében is szignifikáns különbséget kaptunk a kontroll AD testvéreikhez viszonyítva (23. ábra).



23. ábra. A *Yod1* túltermelésének AD legyek élettartamára gyakorolt hatása. Az ábra az élő egyedek százalékos arányát mutatja a napokban kifejezett életkor függvényében. (A) *Yod1*[EY07831] allél élettartamra gyakorolt hatása AD állatokban ($n_{AD}=229$ és $n_{AD+Yod1}=195$). (B) *Yod1*.flag transzgén hatása AD állatok élettartamára ($n_{AD}=212$ és $n_{AD+Yod1}=175$). ***: $P<0,001$.

4.5.3. A *Yod1* túltermelésének hatása AD muslicák motoros képességeire

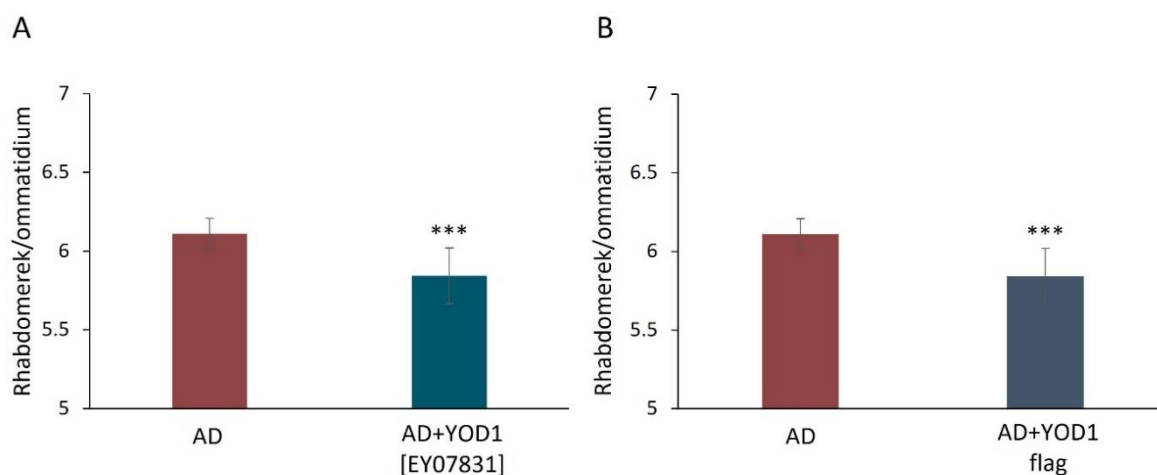
A mászás teszteket az AD gyenge fenotípusa miatt az eddiektől eltérően 15 napos állatokon végeztük el. A *Yod1* túltermelése egyik interakciós keresztezés esetében sem eredményezett szignifikáns változást az AD kontroll állatokhoz képest (24. ábra).



24. ábra. A *Yod1* túltermelésének hatása AD legyek motoros képességeire. (A) A *Yod1*[EY07831] allél hatása AD legyek motoros képességeire ($n_{AD}=79$ és $n_{AD+Yod1}=94$). (B) A *Yod1*.flag transzgén hatása AD legyek mozgására ($n_{AD}=69$ és $n_{AD+Yod1}=47$). Az ábra az 5 másodperc alatt megtett átlagos vertikális távolságot ($\pm$ standard error) mutatja.

4.5.4. A *Yod1* túltermelésének hatása AD muslicák neurodegenerációs folyamataira

A neuronok pusztulása az AD legyekben nem olyan kifejezett, mint a HD legyekben és az öregedésük során nem is romlik jelentősen, ezért már a kikelést követő tizedik napon elvégeztük rajtuk a neurodegenerációs vizsgálatokat. Az *Abeta₁₋₄₂* – *Yod1*[EY07831] interakciós kísérletben az AD legyek átlag rhabdomer száma ommatidiumonként 6,3 volt, az AD+YOD1 legyeké pedig 6 ($P=1,05 \times 10^{-4}$). Az *Abeta₁₋₄₂* – *Yod1*.flag interakciós kísérletben a HD legyeknél 6,1, míg a HD+YOD1.flag legyeknél 5,8 ommatidiumonkénti átlagos rhabdomerszámot ($P=5,8 \times 10^{-4}$) állapítottunk meg. Az eredmények mindkét esetben a *Yod1* túltermelésének negatív hatását mutatják, vagyis a *Yod1* erősíti az AD modellben fellépő neurodegenerációt (25. ábra).

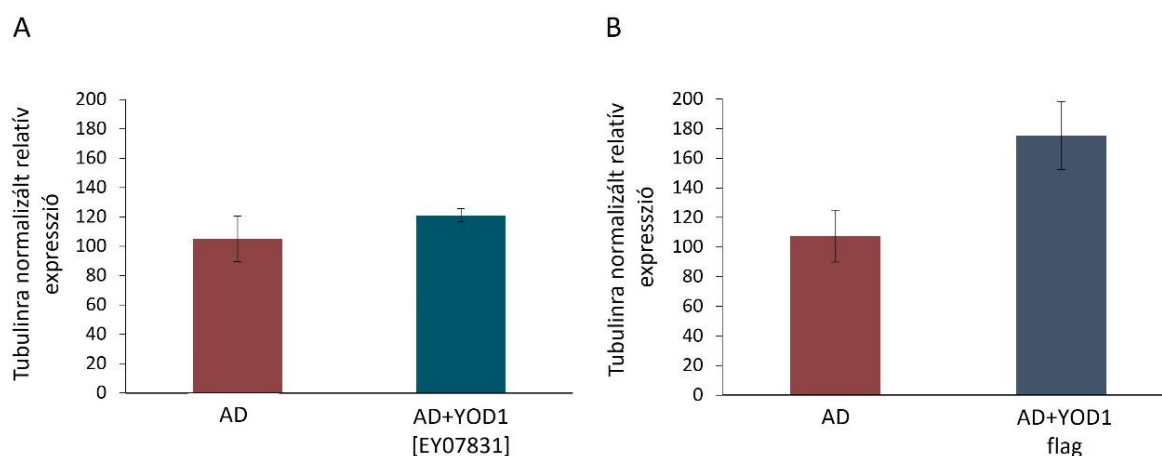


25. ábra. A *Yod1* túltermelésének AD muslicáknál megfigyelhető neurodegenerációra gyakorolt hatása. (A) A *Yod1*[EY07831] allél hatása AD legyek neurodegenerációjára ($n_{AD}=10$ és $n_{AD+Yod1}=10$). (B) A *Yod1*.flag transzgén hatása az AD modellben tapasztalt neurodegenerációra ($n_{AD}=10$ és $n_{AD+Yod1}=10$). Az ábra az ommatidiumonkénti átlagos rhabdomer számot ($\pm$ szórás) mutatja. ***: $P < 0,001$.

4.5.5. Az *UAS-Abeta₁₋₄₂* transzgén expressziójának ellenőrzése a *Yod1*-et túltermelő állatokban

Hogy ellenőrizzük az eredmények valóságát, RT-qPCR eljárásban megvizsgáltuk, hogy az *UAS-Abeta₁₋₄₂* transzgén expressziójában történt-e változás a *Yod1*-et túltermelő allél/transzgén jelenlétében. Az 26. ábrán láthatóak az *α -tubulin at 84B* háztartásai génre normalizált, relatív *Abeta₁₋₄₂* expressziós értékek, ami alapján elmondható, hogy a *Yod1* allélt/transzgént

hordozó állatokban a kontroll csoporthoz képest nem változott szignifikáns mértékben az *Abeta₁₋₄₂* mRNS mennyisége.



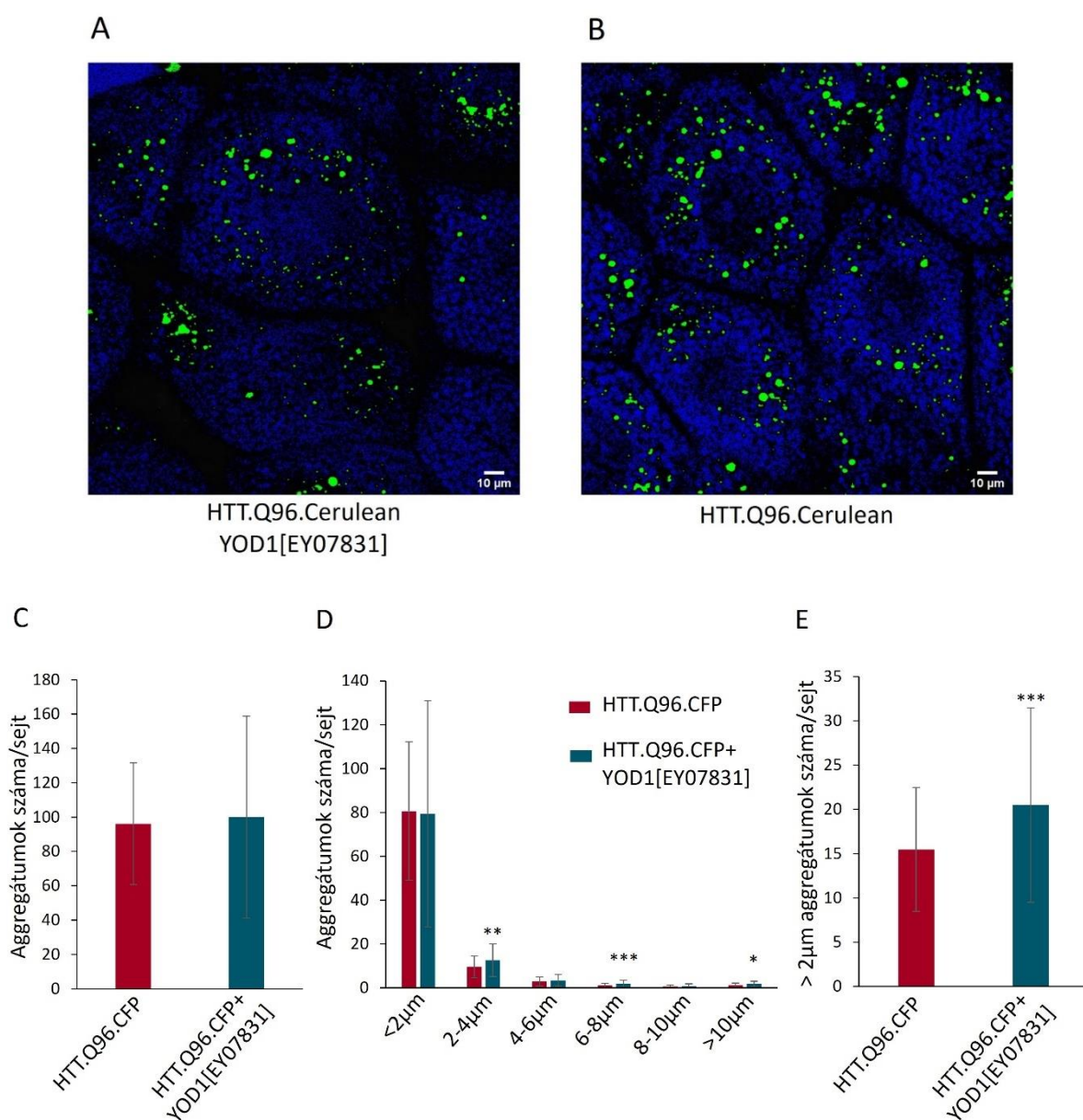
26. ábra. *Amiloid- β_{1-42}* transzgén expressziója nem csökkent le a *Yod1* allél/transzgén hatására. Az ábra az *α -tubulin at 84B* háztartásai génre normalizált relatív expressziós értékeket mutatja %-ban kifejezve ($\pm$ szórás). (A) *Abeta₁₋₄₂+Yod1[EY07831]* interakciós keresztezésből származó utódokban mért *Amiloid- β_{1-42}* expresszió ($n_{AD}=3$ és $n_{AD+Yod1}=3$). (B) *Abeta₁₋₄₂+Yod1.flag* interakciós keresztezésből származó utódokban mért *amiloid- β_{1-42}* expresszió ($n_{AD}=3$ és $n_{AD+Yod1}=3$).

Az eredményeket összegezve látható, hogy a *Yod1* overexpressziója vegyes hatással volt az AD modell fenotípusaira, szemben a HD modellel, ahol a *Yod1[EY07831]* allél és az *UAS-Yod1.flag* transzgén esetében is valamennyi vizsgálatban pozitív eredményeket kaptunk. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a YOD1 deubikitináz túltermelésének hatása specifikus a mutáns *Htt* kiváltotta patológiás folyamatokra *Drosophila melanogaster*-ben.

4.6. A *Yod1* túltermelésének hatása a mHTT aggregátumok képződésére

A mHTT okozta patológiás folyamatok egyik jellemzője a mHTT aggregátumok képződése. A mikroszkóppal vizuálisan detektálható méretű HTT.Q96-Cerulean aggregátumokat vándorló L3 lárvák nyálmirigyében vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok reprezentatív felvételei a 27/A és 27/B ábrán láthatóak. Az eredményeink azt mutatják, hogy *Yod1* túltermelése nem okoz drámai változást az aggregátumok számában (27/C ábra). Mivel a HTT.Q96-Cerulean aggregátumok széles mérettartományban mozogtak, így

méret szerint kategóriákba rendeztük az aggregátumokat, ezeknek az összehasonlítása a 27/D ábrán látható.



27. ábra. A *Yod1* túltermelésének hatása az mHtt aggregációjára L3 stádiumú lárvák nyálmirigyében. Konfokális mikroszkópiás felvételek (A) *HTT.Q96-Cerulean*+*YOD1* és (B) *HTT.Q96-Cerulean* genotípusú lárvák nyálmirigy sejtjeiről (zöld: *HTT.Q96-Cerulean*). (C) A megszámlolt összes aggregátum egy sejtre átlagolva ($n_{HD+YOD1} = 96$, $n_{HD} = 74$, $P = 0.48$). D: Az aggregátumok méreteloszlása egy sejtre átlagolva. E: A 2µm-nél nagyobb aggregátumok száma egy sejtre átlagolva ($P = 5 \times 10^{-6}$, Wilcoxon Sum of Ranks test). *: $P < 0,05$, **: $P < 0,03$, ***: $P < 0,001$.

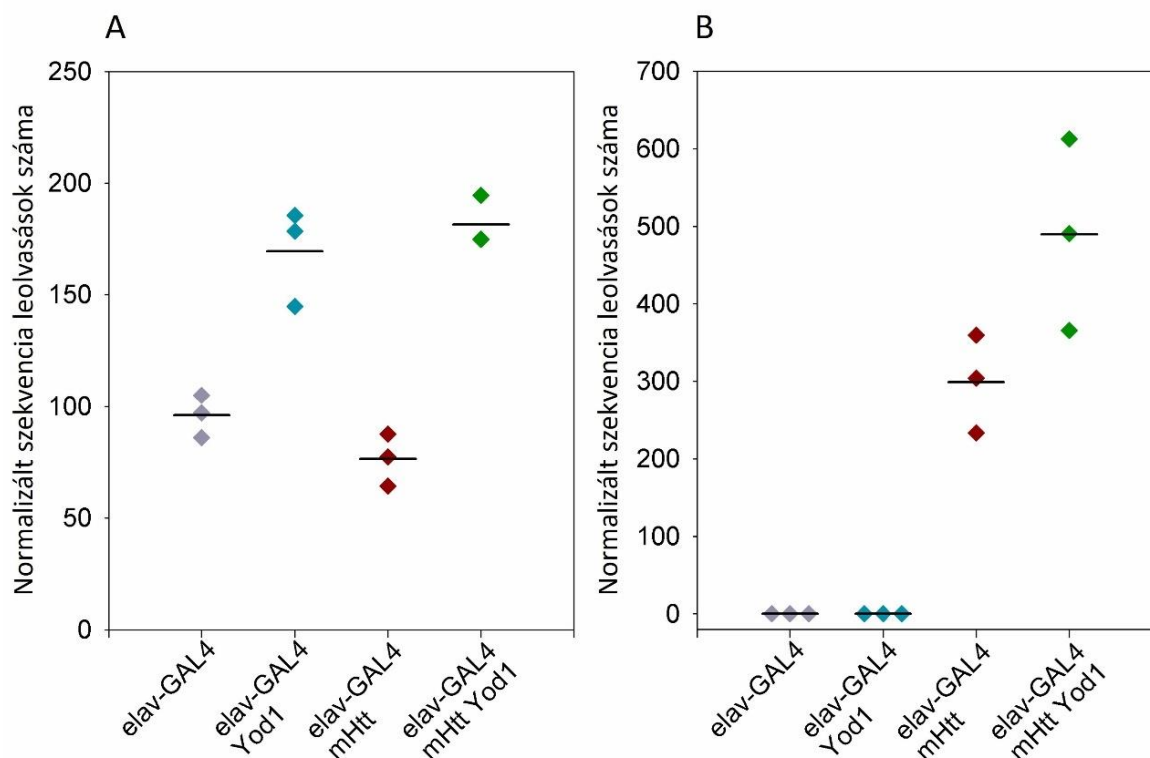
Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a 2-4 μ m ($P=1,15 \times 10^{-2}$), a 6-8 μ m ($P=3,9 \times 10^{-4}$) és a 10 μ m-nél nagyobb ($P=4,6 \times 10^{-2}$) aggregátumok esetében szignifikánsan több aggregátumot számoltunk a HTT.Q96-Cerulean+YOD1 lárvák nyálmirigy sejtjeiben a HTT.Q96-Cerulean lárvákhoz képest. A 27/E ábrán az előzőleg felosztott 2 μ m-nél nagyobb mérettartományba eső aggregátumok összesített, egy sejtre átlagolt száma látható, ahol szintén szignifikánsan több aggregátumot számoltunk a HTT.Q96-Cerulean+YOD1 lárvák esetében a HTT.Q96-Cerulean lárvákhoz viszonyítva. Egy 2013-ban megjelent tanulmányban kimutatták, hogy a nagyobb méretű mHTT aggregátumok kevésbé toxikusak, mint a mHTT oligomerek, melyek kapcsolatba léphetnek az UPS komponensekkel, transzkripció faktorokkal és károsítják azok működését¹⁹⁴. A *Yod1* túltermelésének hatására tapasztalt változások az aggregátumok méreteloszlásában menekítő hatású lehet a mHTT okozta toxicitással szemben.

4.7. Transzkriptomikai változások mHtt okozta stressz körülmények között és a *Yod1* túltermelés hatására

4.7.1. A transzkriptomikai vizsgálatok összefoglaló eredményei

Annak tisztázására, hogy a *Yod1* túltermelése milyen folyamatok befolyásolásával éri el pozitív hatásait a HD állatok fenotípusára, RNS szekvenáláson alapuló transzkriptomikai vizsgálatokat végeztünk HD (elav-GAL4/+; UAS-Httex1.Q120/+), *Yod1*-et túltermelő (elav-GAL4/+; *Yod1*[EY07831]/+) és HD+YOD1 (elav-GAL4/+; UAS-Httex1.Q120/+; *Yod1*[EY07831]/+) állatokban. Kontrollként elav-GAL4 állatokat használtunk, így az elav-GAL4 háttér esetleges hatásait kizártuk. Megvizsgáltuk, hogy a mutáns *huntingtint* expresszálo HD állatokban milyen transzkriptomikai változások következnek be az egészséges elav-GAL4 állatokhoz képest; megállapítottuk, hogy a *Yod1* overexpressziója milyen gének transzkripcióját befolyásolja egészséges állatokban; valamint megvizsgáltuk, hogy a *Yod1* túlműködtetése milyen transzkriptomikai változásokat idéz elő HD állatokban.

A kísérletek validitása szempontjából fontos, hogy a transzkriptomikai adatok elemzésével igazoltuk a *Yod1* emelkedett expresszióját a YOD1 és a HD+YOD1 állatokban a *Yod1*[EY07831] allélt nem hordozó elav-GAL4 állatokhoz képest; valamint hogy igazoltuk, hogy a *Httex1.Q120* transzgén nem downregulálódik a YOD1+HD állatokban a HD állatokhoz képest. A *Yod1* és a *mHtt* transzgén expressziós szintjeit a 28. ábra mutatja.

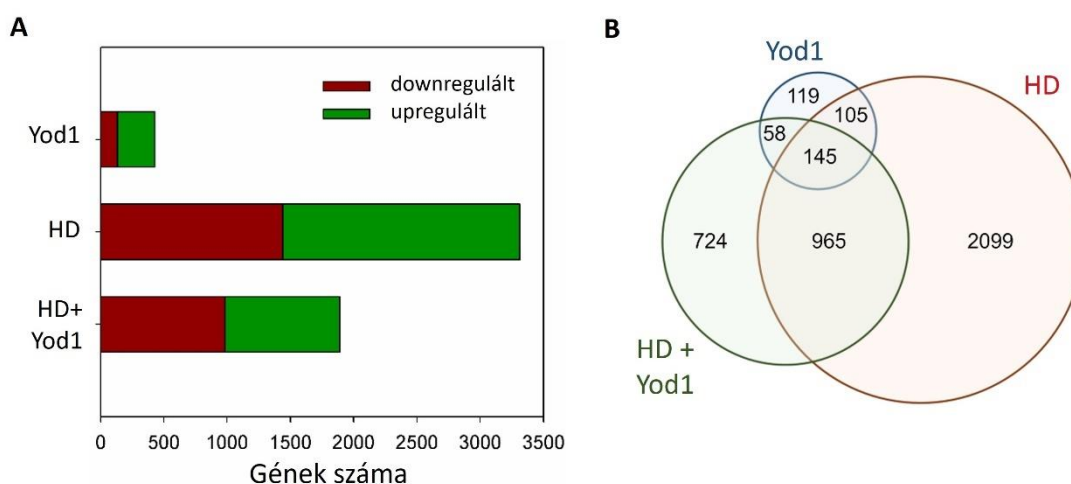


28. ábra. *Yod1* és *mHtt* transzkripció szintjei az RNS szekvenálás alapján. (A) A *Yod1* expressziója szignifikánsan megnövekedett az *elav-Gal4; Yod1[EY07831]* ($P=0,0011$), és az *elav-GAL4; Httex1.Q120; Yod1[EY07831]* állatokban ($P=0,0004$) a kontrollhoz képest. Ahogy fentebb kvantitatív real-time PCR eljárással is kimutattuk (23. ábra), a *mHtt* transzgén expressziós szintje nem csökkent le *Yod1*-et túltermelő állatokban (B). Az adatpontok a biológiai ismételések normalizált szekvenálási leolvasásszámát mutatják, a vízszintes vonalak az átlagértékeket jelölik.

A transzkriptomikai analízis összefoglalását a 29. ábra mutatja. A szekvenálási adatok alapján a *Yod1* túltermelésének hatására 427 gén expressziója változott meg, ezek többsége upregulálódott (292 gén), kisebb része downregulálódott (135 gén) az *elav-GAL4* kontrollhoz képest. A *mHtt* által kiváltott stressz hatására összesen 3314 gén transzkripciója változott meg a kontroll állatokhoz képest, ezek közel fele upregulálódott (1873 gén), fele downregulálódott (1441 gén). A HD muslicákban diszregulált gének számához viszonyítva a *Yod1*-et túltermelő HD állatokban 43%-kal, 1892-re csökkent a diszregulált gének száma (29/A ábra). Azaz a *Yod1* túltermelése a HD modellben megfigyelhető transzkripció zavar jelentős enyhülését eredményezte.

Az egyes genotípusok közti átfedő, transzkripciós változást mutató gének számát a 29/B ábra mutatja. A kizárólag a YOD1 állatokban változást mutató gének száma 119, a kizárólag a HD+YOD1 állatokban diszregulált gének száma 724, míg a kizárólag a HD állatok mintáiban transzkripciós változást mutató gének száma 2099 volt. Az elav-GAL4 kontrollhoz képest 145 gén expressziója változott meg mindhárom genotípusban.

A *Yod1*-et túltermelő egészséges állatokban 105 olyan gén expressziója mutatott változást, ami a HD állatokban is megváltozott transzkripciót mutatott de nem változott HD+YOD1 állatokban és 58 olyan gén transzkripciója változott meg ami HD+YOD1 állatokban is megváltozott de nem mutatott változást HD állatokban. Ezen kívül 965 olyan gén expressziós változásait mutattuk ki HD és HD+YOD1 állatokban, amik nem mutattak változást YOD1 állatokban.



29. ábra. A transzkriptomikai vizsgálatok összefoglaló ábrája. Az ábra (A) az elav-GAL4 kontrollhoz képest szignifikánsan ($P < 0,05$) csökkent expressziót (downregulált, pirossal jelölve), illetve megnövekedett expressziót (upregulált, zölddel jelölve) mutató gének számát; (B) és az egyes genotípusokban az elav-GAL4 kontrollhoz viszonyítva differenciáltan expresszált gének halmazainak átfedéseit mutatja (B).

A YOD1 állatok mintáiban összesen 250 olyan gén megváltozott expresszióját mértük, melyek a HD állatok mintáiban is változást mutattak. Ez arra utal, hogy a *Yod1* túltermelése olyan gének expresszióját befolyásolja, melyekre a mHTT jelenléte is hatással van. A HD

állatok és a HD+YOD1 állatok mintáiban is megváltozott transzkripciót mutató gének száma 1110 volt, szemben a HD állatokban összesen megfigyelt 3314 gén megváltozott expressziójával az elav-GAL4 kontrollhoz viszonyítva. Ebből arra következtethetünk, hogy a *Yod1* túltermelésével a HD állatokban diszregulált gének közül 2204 gén expressziója helyreáll a normál állapotra HD+YOD1 állatokban. A *Yod1* túltermelése olyan folyamatokat befolyásolhat, amik ezen gének megváltozott expresszióját eredményezik. A *Yod1* túltermelésének HD állatok beteg fenotípusára gyakorolt pozitív hatásait részben ezen gének transzkripciójának helyreállításával érheti el.

4.7.1. A *mHtt* által kiváltott transzkriptomikai változások

Szekvenálási eredményeinket a FlyEnrichr online géncsoport dúsulásanalízis (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) alkalmazás segítségével elemeztük ki¹⁸⁹. A HD legyekben végbemenő transzkripcionális változások szignifikáns dúsulást mutattak olyan géncsoportokban, amik neurodegeneratív betegségmodellek adatkészleteiben is megtalálhatóak, úgy mint a Parkinson-kórban ($P=7.49 \times 10^{-8}$), tauopátiában ($P=1.22 \times 10^{-6}$), valamint a Huntington-kórban is ($P=6.37 \times 10^{-8}$). Ezek az eredmények a HD modellünk hitelességét igazolják.

A HD legyekben fokozott transzkripcionális aktivitást mutatott gének olyan biológiai folyamatokhoz köthetőek (Gene Ontology Biological Process (GO BP) kategóriák alapján), mint az antimikrobiális védekezés, kromatin összeszerelődés, protein szintézis, protein metabolizmus és clearance. (30/A ábra).

A HD állatokban a kontroll állatokhoz képest alacsonyabb expressziót mutatott gének (GO BP alapján) a neuronális fejlődésben és plaszticitásban, a fehérje modifikációban, a fény stimulációra adott válaszban és a vezikuláris transzportban vesznek részt. (30/B ábra).

4.7.2. A *Yod1* gént túlműködtető muslicákban végbemenő transzkripcionális változások

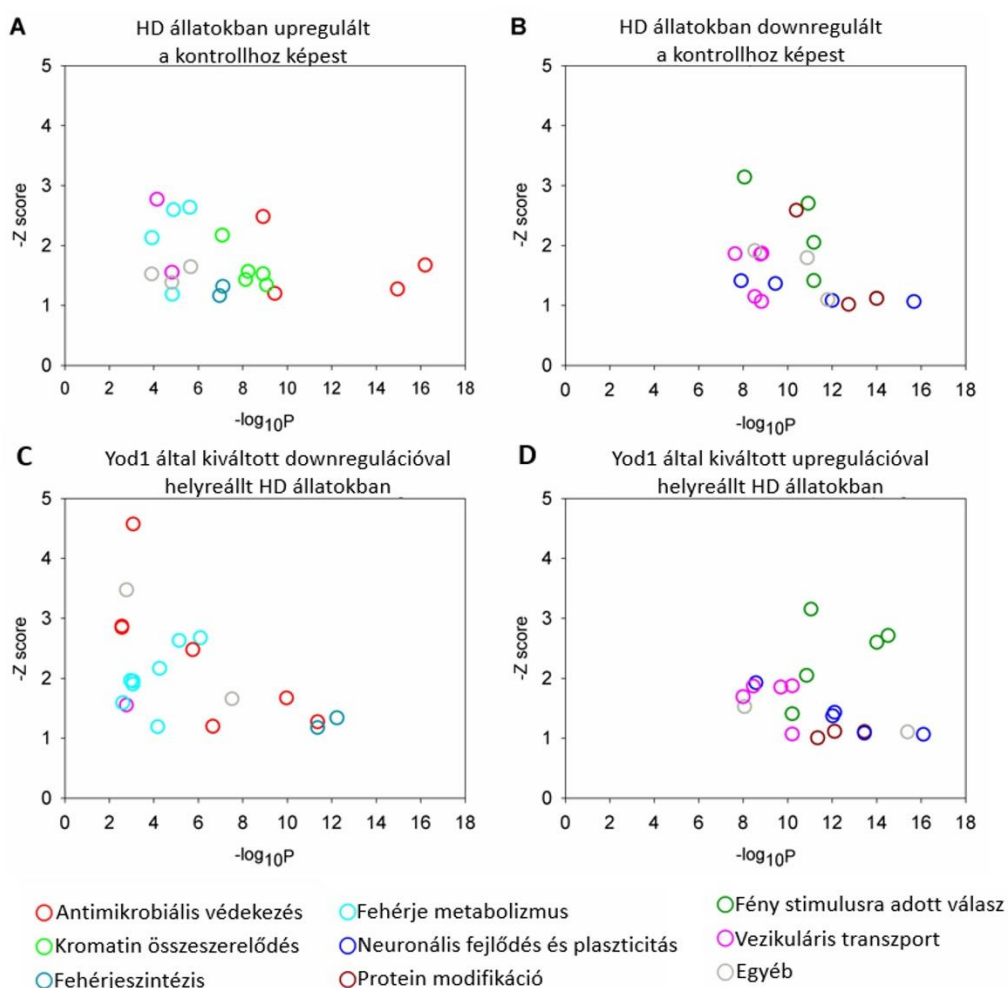
A dúsulásanalízis eredményei azt mutatják, hogy a *Yod1* túltermelésével leginkább olyan gének transzkripciója változott, amik a fehérjebioszintézisben és foldingban játszanak szerepet. A GO BP elemzések alapján dúsulást mutató gének a citoplazmatikus transzlációhoz ($P=5.58 \times 10^{-44}$), a riboszóma összeszerelődéshez ($P=9.43 \times 10^{-7}$), a „de novo” poszttranszlációs fehérje foldinghoz ($P=4.37 \times 10^{-5}$), a ribonukleoprotein komplex összeszerelődéséhez

($P=4,47 \times 10^{-4}$), a topológiai rossz fehérjékre adott sejtválaszhoz ($P=0,0012$) valamint az unfolded protein response-hoz ($P=0,0012$) köthetőek. A *Yod1*-et túltermelő állatokban olyan gének transzkripcionális változásait is kimutattuk, melyek szignifikáns dúsulást mutatnak két humán neurodegeneratív betegségmodell adatkészleteiben, a HD-ben ($P=0.017$) és Spinocerebelláris ataxia3-ban (Machado-Joseph disease, $P=0,041$).

Ezek az adatok, illetve a YOD1 állatokban tapasztalt transzkripcionális változások jelentős átfedése a HD állatokban bekövetkezett transzkripcionális változásokkal arra utalnak, hogy a *Yod1* túltermelése olyan molekuláris útvonalakat befolyásol, melyek szerepet játszanak a HD patogenezisében.

4.7.3. A *Yod1* túltermelése által kiváltott transzkripcionális változások HD állatokban

A transzkriptomikai analízisek során vizsgáltuk a *Yod1* túltermelés transzkripcionális hatásait HD állatokban. Ennek során összehasonlítottuk a HD és a HD+YOD1 állatok szekvenálási adatait. A *Yod1* túltermelése összesen 1674 gén szignifikáns ($P<0,05$) downregulációját és 1381 gén upregulációját okozta HD+YOD1 állatokban a HD állatokhoz viszonyítva. A változást mutató gének 59,3%-a esetében a *Yod1* túltermelés hatására részben, vagy teljesen helyreállt a HD muslicákban diszregulált mRNS szint az egészséges kontrollnak (elav-GAL4) megfelelő szintre. Ezek közül 748 olyan gén volt, amely downregulált volt a HD állatokban az elav-GAL4 kontrollhoz képest, a *Yod1 mHtt*-vel történő ko-expressziója hatására pedig emelkedett expressziót mutattak. Ezen gének dúsulásanalízis alapján a fényre adott válaszreakcióval, a neuronális fejlődéssel és plaszticitással, a fehérjemodifikációval és a vezikuláris transzporttal kapcsolatos GO BP kategóriákkal függnek össze (30/D ábra). További 1065 gén HD-ban upregulált volt és downregulációjukat figyeltük meg a *Yod1* túltermelés hatására a HD állatokban. E gének az antimikrobiális védekezés, a fehérjeszintézis, valamint a fehérje anyagcserével és fehérje lebontásával kapcsolatos GO BP kategóriákkal asszociáltak (30/C ábra).

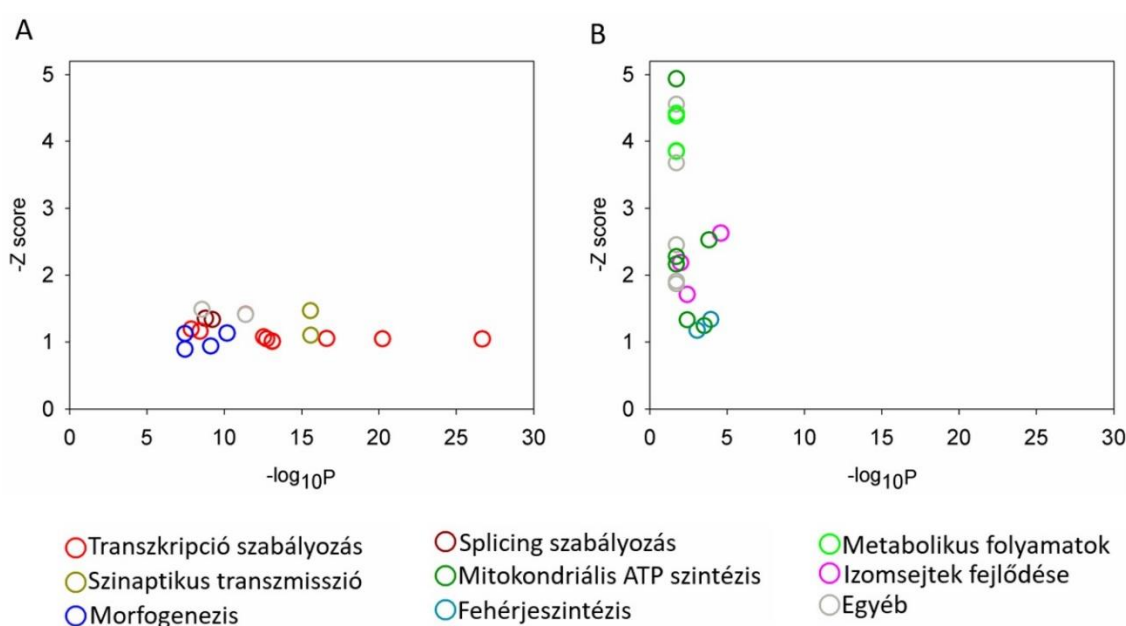


30. ábra. A *Yod1* overexpresszió hatására részben helyreállított biológiai folyamatok

HD állatokban. Az elav-GAL4 kontrollhoz képest HD állatokban upregulált génekhez (A) és a HD állatokban downregulált génekhez köthető biológiai folyamatok (B), valamint azon génekhez köthető biológiai folyamatok melyek upreguláltak voltak HD-ben és kifejeződésük downregulációval helyreállt a *Yod1* túltermelésének hatására (C), illetve azon génekhez köthető biológiai folyamatok melyek downreguláltak voltak HD-ben és kifejeződésük upregulációval helyreállt a *Yod1* túltermelésének hatására (D). Az dúsulásanalízisek FlyEnrichr applikációval készültek GO BP (2018) adatbázis felhasználásával, melyből az első 20 leginkább szignifikáns biológiai folyamatot gyűjtöttük ki. A P értékek Benjamin-Hochberg módszerrel korrigáltak, a z-score a rangsorban várt pozíciótól való eltérésnek felel meg.¹⁹⁵

A HD+YOD1 állatokban *Yod1* hatására helyreállt expressziót mutató gének mellett olyan géneket is azonosítottunk, melyek a HD legyekben nem mutattak változást a kontroll

mintához képest. 615 ilyen gén expressziója növekedett meg a *Yod1* túltermelés hatására HD állatokban, melyek a transzkripció szabályozással, az mRNS feldolgozással, a morfogenezissel és a szinaptikus transzmisszióval kapcsolatos GO BP kategóriákban mutattak dúsulást (31/A ábra). Emellett 545 gén downregulációját figyeltük meg a *Yod1*-et túltermelő HD legyekben, ezen gének a fehérjeszintézissel, a mitokondriális-ATP szintézissel, metabolikus folyamatokkal és az izomsejtek fejlődésével kapcsolatos GO BP kategóriákban dúsultak fel (31/B ábra). A *Yod1* túltermelés hatására HD állatokban megfigyelt fenotípus javulás feltehetően ezen gének expressziójának megváltozásával összefüggésben áll.



31. ábra. Azon génekhez köthető biológiai folyamatok, melyek nem diszreguláltak HD állatokban, de YOD1+HD állatokban megváltozott expressziót mutattak. A *Yod1* túltermelésének hatására upregulált (A) és downregulált (B) génekhez kapcsolódó biológiai folyamatok (GO BP alapján), melyek hozzájárulhatnak a HD által kiváltott fenotípusok javulásához. Az ábrán a 20 leginkább szignifikáns változást mutató biológiai folyamat van feltüntetve, melyekben expressziójukban megváltozott géneket detektáltunk. A színek az egyes funkcionális kategóriákat jelölik. A dúsulásanalízis FlyEnrichr segítségével készült, a P értékek Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltak. A z-score a rangsorban várt pozíciótól való eltérésnek felel meg¹⁸⁹.

5. Diszkusszió

Számos neurodegeneratív betegségre jellemző egy adott fehérjének a felhalmozódása, ami plakkokat, aggregátumokat képez a központi idegrendszerben ¹. Ez a jelenség arra utal, hogy a fehérjeanyagcserében zavar keletkezett. A fő fehérjelebontási útvonal a sejtekben az ubiquitin-proteaszóma rendszer (UPS) által valósul meg, melyben több enzim, enzimesoport együttműködve látja el ezt az összetett feladatot. Az UPS kulcsfontosságú enzimeit a deubikvitinázok (DUB), melyek a felhasznált ubiquitineket visszaforgatják a rendszerbe, így nem merül ki az ubiquitin készlet és minden folyamat számára elérhető marad ⁶⁴. A szakirodalomban több tanulmány is alátámasztja a DUB-ok jótékony hatásait a HD modellekben. Az Usp14 DUB-ról kiderült, hogy túltermelése csökkenti a mHTT aggregátumok számát és védi a neuronokat a degenerációtól ¹⁹⁶, az UCHL-1 szerepet játszik a HD patogenezisében ¹⁹⁷, a YOD1 csökkenti a mutáns huntingtin által okozott neurotoxicitást humán sejt kultúrában ¹⁹¹, továbbá az Usp12 neuroprotektív hatását is bizonyították humán neuronális sejt vonalakban és *Drosophila* HD modellben ¹⁹⁸.

Munkánk során 32 DUB gén hatását vizsgáltuk meg a Huntington-kór *Drosophila melanogaster* modelljében, és az eredményeink hasonlóan a fent említett példához azt mutatják, hogy a *Yod1* túltermelésével mérsékelhetőek a *mHtt* kiváltotta patológiás folyamatok. A *Yod1* túltermelése esetén javulást tapasztaltunk a HD legyek életképességében, élettartamában, motoros képességeiben, és csökkent neurodegenerációt figyeltünk meg. Az Alzheimer-kór amiloid- β_{1-42} peptid túltermelésén alapuló *Drosophila* modelljében nem tapasztaltuk a YOD1 túltermelésének pozitív hatásait, így elmondhatjuk, hogy a *Yod1* hatása specifikus a HD patológiájára.

A *Drosophila* YOD1 humán ortológja az OTU DUB családba tartozó YOD1/OTUD2 cisztein proteáz (fehérjeazonosság: 42%, hasonlóság: 58%), mely K11, K48 és K63 kötésű ubiquitinre specifikus aktív DUB ¹⁹⁹. Emlős sejteken végzett kísérletekben bizonyították, hogy a humán YOD1 szerepet játszik az endoplazmatikus retikulum asszociált degradációban (ERAD) és az ER stressz válaszban, amit az ER-ben felhalmozódó hibás térszerkezetű fehérjék (ERAD szubsztrátok) indukálnak ^{108,200,201}. Ezek a fehérjék még az ER-ben ubiquitinálódnak, ez az ubiquitin jel pedig kettős szereppel bír az ERAD folyamata során. Egyrészt lehetőséget biztosít egy ER fehérjének, a P97 AAA ATP-áznak (másnéven VCP for valosin-containing protein vagy CDC48), hogy az ubiquitineken keresztül kapcsolatba lépjen ezen ERAD

szubsztrátokkal és segítse retrotranszlokációjukat a citoplazma irányába ²⁰². Másrészt miután ezek a fehérjék kijutottak az ER-ből, az ubikvitin jelnek köszönhetően a proteaszóma felé irányítódnak.

A proteaszóma és a P97 is kapcsolatba lép DUB-okkal, és a P97-tel interakcióban lévő DUB-ok egy része pozitívan szabályozza az ERAD-ot ^{203,204}. A humán YOD1 is ilyen pozitív szabályozó szereppel bír, segíti a P97-et az ERAD szubsztrátok ER-ből történő kijuttatásában. Az ERAD folyamatában a P97 általi retrotranszlokáció előtt szükség lehet deubikvitinációs lépésre, ebben játszhat szerepet a YOD1 azáltal, hogy eltávolítja a K11 és K48 kötésű ubikvitineket a fehérjékről ²⁰⁵. Aktivitása nem függ a P97 általi ATP hidrolízistől, így valószínűleg a P97 általi retrotranszlokáció előtt vagy vele párhuzamosan hat ¹⁰⁸. A YOD1 a nem ubikvitinált ERAD szubsztrátokkal is képes kapcsolatba lépni és gátolja azok retrotranszlokációját. Ezen szubsztrátok nem függenek a P97 általi retrotranszlokációtól, P97 független módon jutnak ki a citoszolba. Ilyen szubsztrát pl. a koleratoxin A, melynek kijutása az ER-ből a toxicitásának kritikus lépése. A YOD1 gátolja a koleratoxin A kijutását az ER-ből, valószínűleg a toxin retrotranszlokációját normál esetben elősegítő ubikvitinált ERAD komponensek deubikvitinálásával és inaktiválásával ¹⁹¹. Kimutatták, hogy a YOD1 inaktiválása gátolja az ERAD szubsztrátok retrotranszlokációját és lebomlását, amik így részben poliubikvitinált formában halmozódnak fel az ER-ben. Ez alapján elmondható, hogy a YOD1 aktivitása nélkülözhetetlen a hibás térszerkezetű fehérjék P97 általi diszlokációjához az ER membránon keresztül ^{108,109}. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják a YOD1 ERAD-ban betöltött szabályozó szerepét.

Az aggregációs vizsgálatok során a *Yod1* túltermelésének hatására a nagyméretű aggregátumok számában növekedést tapasztaltunk a HD állatok nyálmirigy sejtjeiben a *Yod1*-re vad típusú HD állatokhoz képest. Leitman és munkatársai sejtvonalakon végzett kísérletek során kimutatták, hogy a mHTT monomer és oligomer formái gátolják az ERAD folyamatát, ezáltal az ERAD szubsztrátok felhalmozódnak, ami ER stresszhez, majd apoptotikus folyamatok elindulásához vezet. A nagyméretű aggregátumok megjelenésével ez a stressz csökkenő tendenciát mutat. A kialakult nagy aggregátumokba könnyen csapdázódnak a mHTT monomerek és kisebb oligomereket, melyek a toxikus oligomerek forrásaként szolgálhatnak ¹⁹⁴. Egy másik tanulmányban kimutatták a HTT fehérje jelenlétét az ER-ben ²⁰⁶, így feltételezhetjük, hogy a mHTT ERAD szubsztrát. A *Yod1* túltermelésével talán fokozható a mHTT ER-ből a citoplazmába történő retrotranszlokációja, így a mHTT megnövekedett szintje a citoplazmában eredményezheti a nagyobb aggregátumok kialakulását. A nagyméretű

aggregátumok menekítő hatásával magyarázható a HD modellünkben tapasztalt neurodegeneráció csökkenése a *Yod1* túltermelés hatására.

Transzkriptomikai eredményeink alapján a *Yod1*-et túltermelő állatokban diszregulált gének között dúsulást mutattak azok, amelyek az UPR-ben (Unfolded protein response), vagyis a hibás térszerkezetű fehérjék felhalmozódására adott sejtválaszban játszanak szerepet, emellett a HD muslicákban a *Yod1* helyreállította olyan gének expresszióját, melyek a fehérjeanyagcseréhez és a fehérjék eliminálásához köthetők. Ez összhangban van a szakirodalommal, hiszen a YOD1 deubikvitinázra szükség van a hibás térszerkezetű ERAD szubsztrátok proteaszómához irányításához és az ER-ben történő felhalmozódásuk megakadályozásához, ami ER stresszhez vezetne. Emellett a *Yod1*-et túltermelő állatokban olyan gének megváltozott transzkripcióját észleltük, amik dúsulást mutatnak a Human_Disease_from_FlyBase_2017 adatbázisban a HD-re jellemző génhalmazzal. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a *Yod1*-nek szerepe lehet a HD által kiváltott patomechanizmusok kivédésében és a mHTT által kiváltott citotoxicitás csökkentésében. Hatását valószínűleg azon gének transzkripciójának megváltozásán keresztül éri el, melyek a HD állatokban diszreguláltak voltak és a *Yod1* túltermelésével helyreállt a transzkripciójuk úgy, mint a neuronális fejlődésben, kromatin összeszerelésben, vezikuláris transzportban, fehérjemetabolizmusban szerepet játszó gének, illetve azon géneken keresztül, melyek a HD állatokban nem mutattak transzkripcionális változást, de a *Yod1*-et és a *mHtt*-t koexpresszáló állatokban megváltozott az expressziójuk mértéke. Ezen gének többek között a transzkripcionális szabályozáshoz, morfogenezishez, fehérjék éréséhez köthetők. Összességében elmondhatjuk, hogy kísérleteink során a humán *Htt* gén mutáns formája által kiváltott fenotípusokat sikeresen szupresszáltuk a YOD1 deubikvitináz túltermelésével, ami egy esetleges terápiás lehetőséget rejthet magában a Huntington-kór kezelésében.

6. Irodalomjegyzék

1. Masters, C. L. & Beyreuther, K. Science, medicine, and the future: Alzheimer's disease. *BMJ* **316**, 446–448 (1998).
2. Ahmad, K. *et al.* Commonalities in Biological Pathways, Genetics, and Cellular Mechanism between Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Diseases: An In Silico-Updated Overview. *CAR* **14**, (2017).
3. Dugger, B. N. & Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a028035 (2017).
4. Meem, T. M. *et al.* A Comprehensive Bioinformatics Approach to Identify Molecular Signatures and Key Pathways for the Huntington Disease. *Bioinform Biol Insights* **17**, 11779322231210098 (2023).
5. Jiao, L.-L. *et al.* The potential roles of salivary biomarkers in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease* **193**, 106442 (2024).
6. Gijis, M. *et al.* High levels of mutant huntingtin protein in tear fluid from Huntington's Disease Gene Expansion Carriers. *JMD* (2024) doi:10.14802/jmd.24014.
7. Lapp, H. S. *et al.* Troponin T is elevated in a relevant proportion of patients with 5q-associated spinal muscular atrophy. *Sci Rep* **14**, 6634 (2024).
8. Kremer, B. *et al.* A worldwide study of the Huntington's disease mutation. The sensitivity and specificity of measuring CAG repeats. *N Engl J Med* **330**, 1401–1406 (1994).
9. Saudou, F. & Humbert, S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**, 910–926 (2016).
10. Huntington, G. On Chorea. *JNP* **15**, 109–112 (2003).
11. Conneally, P. M. Huntington disease: genetics and epidemiology. *Am J Hum Genet* **36**, 506–526 (1984).
12. Dhingra, H. & Gaidhane, S. A. Huntington's Disease: Understanding Its Novel Drugs and Treatments. *Cureus* (2023) doi:10.7759/cureus.47526.

13. Zhang, H. *et al.* The crystal structure of the MPN domain from the COP9 signalosome subunit CSN6. *FEBS Lett* **586**, 1147–1153 (2012).
14. Yu, M. S. & Tanese, N. Huntingtin Is Required for Neural But Not Cardiac/Pancreatic Progenitor Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells In vitro. *Front Cell Neurosci* **11**, 33 (2017).
15. Gusella, J. F. *et al.* A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**, 234–238 (1983).
16. Gusella, J. F. & MacDonald, M. E. Huntington's disease. *Semin Cell Biol* **6**, 21–28 (1995).
17. Lee, J.-M. *et al.* CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* **78**, 690–695 (2012).
18. Nasir, J. *et al.* Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* **81**, 811–823 (1995).
19. Duyao, M. P. *et al.* Inactivation of the Mouse Huntington's Disease Gene Homolog *Hdh*. *Science* **269**, 407–410 (1995).
20. Mangiarini, L. *et al.* Exon 1 of the HD Gene with an Expanded CAG Repeat Is Sufficient to Cause a Progressive Neurological Phenotype in Transgenic Mice. *Cell* **87**, 493–506 (1996).
21. Rubinsztein, D. C. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends in Genetics* **18**, 202–209 (2002).
22. Schilling, G. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin [published erratum appears in Hum Mol Genet 1999 May;8(5):943]. *Human Molecular Genetics* **8**, 397–407 (1999).
23. Gusella, J. F., Lee, J.-M. & MacDonald, M. E. Huntington's disease: nearly four decades of human molecular genetics. *Human Molecular Genetics* **30**, R254–R263 (2021).
24. Kegel-Gleason, K. B. Huntingtin Interactions with Membrane Phospholipids: Strategic Targets for Therapeutic Intervention? *Journal of Huntington's Disease* **2**, 239–250 (2013).

25. Ross, C. A. & Tabrizi, S. J. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology* **10**, 83–98 (2011).
26. Andrade, M. A. & Bork, P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**, 115–116 (1995).
27. Zuccato, C. *et al.* Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. *Science* **293**, 493–498 (2001).
28. Alkanli, S. S., Alkanli, N., Ay, A. & Albeniz, I. CRISPR/Cas9 Mediated Therapeutic Approach in Huntington's Disease. *Mol Neurobiol* **60**, 1486–1498 (2023).
29. Reiner, A., Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Goldowitz, D. Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol* **28**, 259–276 (2003).
30. Choo, Y. S. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human Molecular Genetics* **13**, 1407–1420 (2004).
31. Song, W. *et al.* Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med* **17**, 377–382 (2011).
32. Qin, Z.-H. & Gu, Z.-L. Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease. *Acta Pharmacol Sin* **25**, 1243–1249 (2004).
33. Riguet, N. *et al.* Nuclear and cytoplasmic huntingtin inclusions exhibit distinct biochemical composition, interactome and ultrastructural properties. *Nat Commun* **12**, 6579 (2021).
34. Estevez-Fraga, C., Tabrizi, S. J. & Wild, E. J. Huntington's Disease Clinical Trials Corner: August 2023. *JHD* **12**, 169–185 (2023).
35. Marxreiter, F., Stemick, J. & Kohl, Z. Huntingtin Lowering Strategies. *IJMS* **21**, 2146 (2020).
36. Wild, E. J. & Tabrizi, S. J. Therapies targeting DNA and RNA in Huntington's disease. *The Lancet Neurology* **16**, 837–847 (2017).
37. Klug, A. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 213–231 (2010).

38. Victor, M. B. *et al.* Generation of Human Striatal Neurons by MicroRNA-Dependent Direct Conversion of Fibroblasts. *Neuron* **84**, 311–323 (2014).
39. Zayed, M. A. *et al.* Stem-Cell-Based Therapy: The Celestial Weapon against Neurological Disorders. *Cells* **11**, 3476 (2022).
40. Zhang, X.-X. *et al.* The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. *J Prev Alz Dis* 1–9 (2021) doi:10.14283/jpad.2021.15.
41. Puzzo, D. *et al.* Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Annals of Neurology* **69**, 819–830 (2011).
42. Soucek, T., Cumming, R., Dargusch, R., Maher, P. & Schubert, D. The Regulation of Glucose Metabolism by HIF-1 Mediates a Neuroprotective Response to Amyloid Beta Peptide. *Neuron* **39**, 43–56 (2003).
43. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. & Gleichmann, M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromol Med* **12**, 1–12 (2010).
44. Salminen, A. *et al.* Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Progress in Neurobiology* **106–107**, 33–54 (2013).
45. Breijyeh, Z. & Karaman, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* **25**, 5789 (2020).
46. Roher, A. E. *et al.* beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10836–10840 (1993).
47. Tcw, J. & Goate, A. M. Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a024539 (2017).
48. De Strooper, B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease: Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Reports* **8**, 141–146 (2007).
49. Hutton, M. & Hardy, J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1639–1646 (1997).

50. Crowther, R. A. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2288–2292 (1991).
51. Alonso, A. C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5562–5566 (1994).
52. Bamberg, J. R. & Bloom, G. S. Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. *Cell Motil. Cytoskeleton* **66**, 635–649 (2009).
53. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4913–4917 (1986).
54. Hoover, B. R. *et al.* Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* **68**, 1067–1081 (2010).
55. Madhani, R. S. Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician. *Front. Neurol.* **14**, 1178588 (2023).
56. Teipel, S. *et al.* Alzheimer Disease: Standard of Diagnosis, Treatment, Care, and Prevention. *J Nucl Med* **63**, 981–985 (2022).
57. McDowell, G. S. & Philpott, A. Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**, 1833–1842 (2013).
58. Komander, D. & Rape, M. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203–229 (2012).
59. Mabb, A. M. & Ehlers, M. D. Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 179–210 (2010).
60. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425–479 (1998).
61. Chen, Z. J. & Sun, L. J. Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell* **33**, 275–286 (2009).

62. Wickliffe, K. E., Williamson, A., Meyer, H.-J., Kelly, A. & Rape, M. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends in Cell Biology* **21**, 656–663 (2011).
63. Pickart, C. M. & Rose, I. A. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem* **260**, 7903–7910 (1985).
64. Hochstrasser, M. UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN DEGRADATION. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405–439 (1996).
65. Hershko, A. & Ciechanover, A. THE UBIQUITIN SYSTEM FOR PROTEIN DEGRADATION. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761–807 (1992).
66. Shaeffer, J. R. & Kania, M. A. Degradation of monoubiquitinated alpha-globin by 26S proteasomes. *Biochemistry* **34**, 4015–4021 (1995).
67. Chau, V. *et al.* A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein. *Science* **243**, 1576–1583 (1989).
68. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94–102 (2000).
69. Glickman, M. H. & Ciechanover, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews* **82**, 373–428 (2002).
70. Groll, M. & Huber, R. Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**, 33–44 (2004).
71. Kisselev, A. F., Akopian, T. N. & Goldberg, A. L. Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem* **273**, 1982–1989 (1998).
72. Beninga, J., Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* **273**, 18734–18742 (1998).

73. Yao, T. & Cohen, R. E. Giant proteases: Beyond the proteasome. *Current Biology* **9**, R551–R553 (1999).
74. Sadanandom, A., Bailey, M., Ewan, R., Lee, J. & Nelis, S. The ubiquitin–proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist* **196**, 13–28 (2012).
75. DiFiglia, M. *et al.* Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain. *Science* **277**, 1990–1993 (1997).
76. Gutekunst, C.-A. *et al.* Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington’s Disease: Relationship to Neuropathology. *J. Neurosci.* **19**, 2522–2534 (1999).
77. Sieradzan, K. A. *et al.* Huntington’s Disease Intranuclear Inclusions Contain Truncated, Ubiquitinated Huntingtin Protein. *Experimental Neurology* **156**, 92–99 (1999).
78. Cummings, C. J. *et al.* Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* **19**, 148–154 (1998).
79. Park, C.-W., Jung, B.-K. & Ryu, K.-Y. Reduced free ubiquitin levels and proteasome activity in cultured neurons and brain tissues treated with amyloid beta aggregates. *Mol Brain* **13**, 89 (2020).
80. Pinto-Fernández, A. *et al.* Comprehensive Landscape of Active Deubiquitinating Enzymes Profiled by Advanced Chemoproteomics. *Front. Chem.* **7**, 592 (2019).
81. Abdul Rehman, S. A. *et al.* MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Molecular Cell* **63**, 146–155 (2016).
82. Buneeva, O. & Medvedev, A. Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1 and Its Role in Parkinson’s Disease. *IJMS* **25**, 1303 (2024).
83. Clague, M. J. *et al.* Deubiquitylases From Genes to Organism. *Physiological Reviews* **93**, 1289–1315 (2013).
84. Keijzer, N. *et al.* Variety in the USP deubiquitinase catalytic mechanism. *Life Sci. Alliance* **7**, e202302533 (2024).

85. Komander, D. & Barford, D. Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. *Biochem J* **409**, 77–85 (2008).
86. Reyes-Turcu, F. E. *et al.* The Ubiquitin Binding Domain ZnF UBP Recognizes the C-Terminal Diglycine Motif of Unanchored Ubiquitin. *Cell* **124**, 1197–1208 (2006).
87. Jang, S. W. & Kim, J. M. Mutation of aspartic acid 199 in USP1 disrupts its deubiquitinating activity and impairs DNA repair. *FEBS Letters* **595**, 1997–2006 (2021).
88. Lee, K. *et al.* Human ELG1 Regulates the Level of Ubiquitinated Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) through Its Interactions with PCNA and USP1. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10362–10369 (2010).
89. Rennie, M. L., Arkinson, C., Chaugule, V. K., Toth, R. & Walden, H. Structural basis of FANCD2 deubiquitination by USP1-UAF1. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 356–364 (2021).
90. Ying, H., Zhang, B., Cao, G., Wang, Y. & Zhang, X. Role for ubiquitin-specific protease 7 (USP7) in the treatment and the immune response to hepatocellular carcinoma: potential mechanisms. *Transl Cancer Res* **12**, 3016–3033 (2023).
91. Kon, N. *et al.* Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene* **29**, 1270–1279 (2010).
92. Van Der Knaap, J. A. *et al.* GMP Synthetase Stimulates Histone H2B Deubiquitylation by the Epigenetic Silencer USP7. *Molecular Cell* **17**, 695–707 (2005).
93. Setsuie, R. & Wada, K. The functions of UCH-L1 and its relation to neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International* **51**, 105–111 (2007).
94. Choi, J. *et al.* Oxidative Modifications and Down-regulation of Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L1 Associated with Idiopathic Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 13256–13264 (2004).
95. Leroy, E. *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* **395**, 451–452 (1998).
96. Saigoh, K. *et al.* Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet* **23**, 47–51 (1999).

97. Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. A., Liu, Z. & Lansbury, P. T. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* **111**, 209–218 (2002).
98. Lee, J. E., Lim, Y. H. & Kim, J. H. UCH-L1 and UCH-L3 regulate the cancer stem cell-like properties through PI3 K/Akt signaling pathway in prostate cancer cells. *Animal Cells and Systems* **25**, 312–322 (2021).
99. Ferreira, J. C. C. *et al.* Targeting Lysosomes in Colorectal Cancer: Exploring the Anticancer Activity of a New Benzo[a]phenoxazine Derivative. *IJMS* **24**, 614 (2022).
100. Chen, Y. *et al.* Methylthioadenosine Phosphorylase and Breast Cancer 1 Protein-Associated Protein 1 as Biomarkers for the Peritoneal Mesothelioma. *Cancer Control* **30**, 10732748231220805 (2023).
101. Lee, J., Turetsky, J., Nasri, E. & Rogers, S. C. Complete clinical remission of malignant peritoneal mesothelioma with systemic pemetrexed and bevacizumab in a patient with a BAP1 mutation. *BMJ Case Rep* **16**, e255916 (2023).
102. Sturgill, I. R., Raab, J. R. & Hoadley, K. A. *Expanded Detection of BAP1 Alterations in Cancer and Tumor Type-Specific Expression Score Comparison*.
<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.11.21.568094> (2023)
doi:10.1101/2023.11.21.568094.
103. Yu, L. *et al.* Hybrid Metabolic Activity-Related Prognostic Model and Its Effect on Tumor in Renal Cell Carcinoma. *Journal of Healthcare Engineering* **2022**, 1–17 (2022).
104. Mevissen, T. E. T. *et al.* OTU Deubiquitinases Reveal Mechanisms of Linkage Specificity and Enable Ubiquitin Chain Restriction Analysis. *Cell* **154**, 169–184 (2013).
105. Hymowitz, S. G. & Wertz, I. E. A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **10**, 332–341 (2010).
106. Keusekotten, K. *et al.* OTULIN Antagonizes LUBAC Signaling by Specifically Hydrolyzing Met1-Linked Polyubiquitin. *Cell* **153**, 1312–1326 (2013).

107. Kayagaki, N. *et al.* A Deubiquitinase That Regulates Type I Interferon Production. *Science* **318**, 1628–1632 (2007).
108. Ernst, R., Mueller, B., Ploegh, H. L. & Schlieker, C. The Otubain YOD1 Is a Deubiquitinating Enzyme that Associates with p97 to Facilitate Protein Dislocation from the ER. *Molecular Cell* **36**, 28–38 (2009).
109. Liu, Y. & Ye, Y. Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 436–446 (2012).
110. Wang, Y., Satoh, A., Warren, G. & Meyer, H. H. VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97–p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *The Journal of Cell Biology* **164**, 973–978 (2004).
111. Nakada, S. *et al.* Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* **466**, 941–946 (2010).
112. Ferreira, A. F. *et al.* Tissue-Specific Vulnerability to Apoptosis in Machado-Joseph Disease. *Cells* **12**, 1404 (2023).
113. Pereira Sena, P. *et al.* Implications of specific lysine residues within ataxin-3 for the molecular pathogenesis of Machado-Joseph disease. *Front. Mol. Neurosci.* **16**, 1133271 (2023).
114. Ge, F. *et al.* Ataxin-3 like (ATXN3L), a member of the Josephin family of deubiquitinating enzymes, promotes breast cancer proliferation by deubiquitinating Krüppel-like factor 5 (KLF5). *Oncotarget* **6**, 21369–21378 (2015).
115. Abdul Rehman, S. A. *et al.* Mechanism of activation and regulation of deubiquitinase activity in MINDY1 and MINDY2. *Molecular Cell* **81**, 4176-4190.e6 (2021).
116. Haahr, P. *et al.* ZUFSP Deubiquitylates K63-Linked Polyubiquitin Chains to Promote Genome Stability. *Molecular Cell* **70**, 165-174.e6 (2018).
117. Kwasna, D. *et al.* Discovery and Characterization of ZUFSP/ZUP1, a Distinct Deubiquitinase Class Important for Genome Stability. *Molecular Cell* **70**, 150-164.e6 (2018).

118. Pan, X. *et al.* Structural and Functional Basis of JAMM Deubiquitinating Enzymes in Disease. *Biomolecules* **12**, 910 (2022).
119. Dambacher, C. M., Worden, E. J., Herzik, M. A., Martin, A. & Lander, G. C. Atomic structure of the 26S proteasome lid reveals the mechanism of deubiquitinase inhibition. *eLife* **5**, e13027 (2016).
120. Verma, R. *et al.* Role of Rpn11 Metalloprotease in Deubiquitination and Degradation by the 26 S Proteasome. *Science* **298**, 611–615 (2002).
121. Liu, Y. *et al.* COP9-Associated CSN5 Regulates Exosomal Protein Deubiquitination and Sorting. *The American Journal of Pathology* **174**, 1415–1425 (2009).
122. Zeqiraj, E. *et al.* Higher-Order Assembly of BRCC36-KIAA0157 Is Required for DUB Activity and Biological Function. *Mol Cell* **59**, 970–983 (2015).
123. Rabl, J. *et al.* Structural Basis of BRCC36 Function in DNA Repair and Immune Regulation. *Molecular Cell* **75**, 483–497.e9 (2019).
124. Hu, X. *et al.* NBA1/MERIT40 and BRE Interaction Is Required for the Integrity of Two Distinct Deubiquitinating Enzyme BRCC36-containing Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 11734–11745 (2011).
125. Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V. & Santamaría, A. 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington’s Disease: Past, Present and Future. *Molecules* **15**, 878–916 (2010).
126. Kaye, J., Reisine, T. & Finkbeiner, S. Huntington’s disease mouse models: unraveling the pathology caused by CAG repeat expansion. *Fac Rev* **10**, 77 (2021).
127. Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R. Introduction to *C. elegans*. in *C. elegans II* (eds. Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 1997).
128. Corsi, A. K. A biochemist’s guide to *Caenorhabditis elegans*. *Anal Biochem* **359**, 1–17 (2006).

129. Faber, P. W., Alter, J. R., MacDonald, M. E. & Hart, A. C. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 179–184 (1999).
130. Rubin, G. M. *et al.* Comparative Genomics of the Eukaryotes. *Science* **287**, 2204–2215 (2000).
131. Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**, 1114–1125 (2001).
132. Ong, C., Yung, L.-Y. L., Cai, Y., Bay, B.-H. & Baeg, G.-H. *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology* **9**, 396–403 (2015).
133. Stocker, H. & Gallant, P. Getting Started: An Overview on Raising and Handling *Drosophila*. in *Drosophila* (ed. Dahmann, C.) vol. 420 27–44 (Humana Press, Totowa, NJ, 2008).
134. Venken, K. J. T. & Bellen, H. J. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* **6**, 167–178 (2005).
135. Jeibmann, A. & Paulus, W. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases. *IJMS* **10**, 407–440 (2009).
136. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
137. Hawley, H. R., Roberts, C. J. & Fitzsimons, H. L. Comparison of neuronal GAL4 drivers along with the AGES (auxin-inducible gene expression system) and TARGET (temporal and regional gene expression targeting) systems for fine tuning of neuronal gene expression in *Drosophila*. *MicroPubl Biol* **2023**, (2023).
138. McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K. & Davis, R. L. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765–1768 (2003).
139. Jackson, G. R. *et al.* Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* **21**, 633–642 (1998).

140. Jeibmann, A. & Paulus, W. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases. *IJMS* **10**, 407–440 (2009).
141. Marsh, J. L., Pallos, J. & Thompson, L. M. Fly models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* **12**, R187–R193 (2003).
142. Finelli, A., Kelkar, A., Song, H.-J., Yang, H. & Konsolaki, M. A model for studying Alzheimer's A β 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Neuroscience* **26**, 365–375 (2004).
143. Iijima, K. *et al.* Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila* : A potential model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 6623–6628 (2004).
144. Iijima, K. & Iijima-Ando, K. *Drosophila* Models of Alzheimer's Amyloidosis: The Challenge of Dissecting the Complex Mechanisms of Toxicity of Amyloid- β 42. *JAD* **15**, 523–540 (2008).
145. Yamaguchi, H. *et al.* Ultrastructural localization of Alzheimer amyloid β /A4 protein precursor in the cytoplasm of neurons and senile plaque-associated astrocytes. *Acta Neuropathol* **85**, 15–22 (1992).
146. Wittmann, C. W. *et al.* Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293**, 711–714 (2001).
147. Feany, M. B. & Bender, W. W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**, 394–398 (2000).
148. Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M. & Ihara, Y. Lewy bodies are ubiquitinated: A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* **75**, 345–353 (1988).
149. Rosas-Arellano, A., Estrada-Mondragón, A., Piña, R., Mantellero, C. A. & Castro, M. A. The Tiny *Drosophila Melanogaster* for the Biggest Answers in Huntington's Disease. *Int J Mol Sci* **19**, 2398 (2018).

150. Gonzales, E. D., Tanenhaus, A. K., Zhang, J., Chaffee, R. P. & Yin, J. C. P. Early-onset sleep defects in *Drosophila* models of Huntington's disease reflect alterations of PKA/CREB signaling. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 837–852 (2016).
151. Singh, M. D., Raj, K. & Sarkar, S. *Drosophila* Myc, a novel modifier suppresses the poly(Q) toxicity by modulating the level of CREB binding protein and histone acetylation. *Neurobiol Dis* **63**, 48–61 (2014).
152. Raj, K. & Sarkar, S. Transactivation Domain of Human c-Myc Is Essential to Alleviate Poly(Q)-Mediated Neurotoxicity in *Drosophila* Disease Models. *J Mol Neurosci* **62**, 55–66 (2017).
153. Gunawardena, S. *et al.* Disruption of Axonal Transport by Loss of Huntingtin or Expression of Pathogenic PolyQ Proteins in *Drosophila*. *Neuron* **40**, 25–40 (2003).
154. Zhang, S., Feany, M. B., Saraswati, S., Littleton, J. T. & Perrimon, N. Inactivation of *Drosophila* Huntingtin affects long-term adult functioning and the pathogenesis of a Huntington's disease model. *Disease Models & Mechanisms* **2**, 247–266 (2009).
155. Li, J. Y., Popovic, N. & Brundin, P. The use of the R6 transgenic mouse models of Huntington's disease in attempts to develop novel therapeutic strategies. *NeuroRx* **2**, 447–464 (2005).
156. Sathasivam, K. *et al.* Transgenic models of Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 963–969 (1999).
157. Ariano, M. A. *et al.* Striatal Potassium Channel Dysfunction in Huntington's Disease Transgenic Mice. *Journal of Neurophysiology* **93**, 2565–2574 (2005).
158. Gardian, G. *et al.* Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 556–563 (2005).
159. Yu, Z.-X. *et al.* Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* **23**, 2193–2202 (2003).

160. Li, Q. *et al.* Resting-state functional MRI reveals altered brain connectivity and its correlation with motor dysfunction in a mouse model of Huntington's disease. *Sci Rep* **7**, 16742 (2017).
161. Hodgson, J. G. *et al.* A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* **23**, 181–192 (1999).
162. Slow, E. J. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics* **12**, 1555–1567 (2003).
163. Van Raamsdonk, J. M. *et al.* Cognitive Dysfunction Precedes Neuropathology and Motor Abnormalities in the YAC128 Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **25**, 4169–4180 (2005).
164. Gray, M. *et al.* Full-Length Human Mutant Huntingtin with a Stable Polyglutamine Repeat Can Elicit Progressive and Selective Neuropathogenesis in BACHD Mice. *Journal of Neuroscience* **28**, 6182–6195 (2008).
165. Hult Lundh, S., Nilsson, N., Soylu, R., Kirik, D. & Petersén, Å. Hypothalamic expression of mutant huntingtin contributes to the development of depressive-like behavior in the BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* **22**, 3485–3497 (2013).
166. Pouladi, M. A. *et al.* Marked differences in neurochemistry and aggregates despite similar behavioural and neuropathological features of Huntington disease in the full-length BACHD and YAC128 mice. *Human Molecular Genetics* **21**, 2219–2232 (2012).
167. Spampinato, J., Gu, X., Yang, X. W. & Mody, I. Progressive synaptic pathology of motor cortical neurons in a BAC transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience* **157**, 606–620 (2008).

168. Estrada-Sánchez, A. M. *et al.* Cortical Efferents Lacking Mutant huntingtin Improve Striatal Neuronal Activity and Behavior in a Conditional Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **35**, 4440–4451 (2015).
169. Wood, T. E. *et al.* Mutant huntingtin reduction in astrocytes slows disease progression in the bachd conditional huntington's disease mouse model. *Human Molecular Genetics* (2018) doi:10.1093/hmg/ddy363.
170. Menalled, L. B. Knock-in mouse models of Huntington's disease. *Neurotherapeutics* **2**, 465–470 (2005).
171. Dorner, J. L., Miller, B. R., Barton, S. J., Brock, T. J. & Rebec, G. V. Sex differences in behavior and striatal ascorbate release in the 140 CAG knock-in mouse model of Huntington's disease. *Behav Brain Res* **178**, 90–97 (2007).
172. Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S. & Chesselet, M.-F. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* **465**, 11–26 (2003).
173. Rising, A. C. *et al.* Longitudinal behavioral, cross-sectional transcriptional and histopathological characterization of a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *Experimental Neurology* **228**, 173–182 (2011).
174. Deng, Y. P., Wong, T., Bricker-Anthony, C., Deng, B. & Reiner, A. Loss of corticostriatal and thalamostriatal synaptic terminals precedes striatal projection neuron pathology in heterozygous Q140 Huntington's disease mice. *Neurobiology of Disease* **60**, 89–107 (2013).
175. Heikkinen, T. *et al.* Characterization of Neurophysiological and Behavioral Changes, MRI Brain Volumetry and ¹H MRS in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* **7**, e50717 (2012).
176. Peng, Q. *et al.* Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* **11**, e0148839 (2016).

177. Brooks, S. P., Betteridge, H., Trueman, R. C., Jones, L. & Dunnett, S. B. Selective extra-dimensional set shifting deficit in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin* **69**, 452–457 (2006).
178. Kuhn, A. *et al.* Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human Molecular Genetics* **16**, 1845–1861 (2007).
179. Bennett, E. J. *et al.* Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* **448**, 704–708 (2007).
180. Ortega, Z. & Lucas, J. J. Ubiquitin-proteasome system involvement in Huntington's disease. *Front Mol Neurosci* **7**, 77 (2014).
181. Xiong, J., Pang, X., Song, X., Yang, L. & Pang, C. The coherence between PSMC6 and α -ring in the 26S proteasome is associated with Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* **16**, 1330853 (2024).
182. Barbaro, B. A. *et al.* Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* **24**, 913–925 (2015).
183. Han, S. K. *et al.* OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget* **7**, 56147–56152 (2016).
184. Klämbt, C. *Drosophila* development: A receptor for ommatidial recruitment. *Current Biology* **7**, R132–R135 (1997).
185. Reece-Hoyes, J. S. & Walhout, A. J. M. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harb Protoc* **2018**, pdb.top094912 (2018).
186. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Russell, D. W. & Green, M. R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

187. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **37**, 907–915 (2019).
188. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550 (2014).
189. Kuleshov, M. V. *et al.* modEnrichr: a suite of gene set enrichment analysis tools for model organisms. *Nucleic Acids Res* **47**, W183–W190 (2019).
190. Barbaro, B. A. *et al.* Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics* **24**, 913–925 (2015).
191. Bernardi, K. M., Williams, J. M., Inoue, T., Schultz, A. & Tsai, B. A deubiquitinase negatively regulates retro-translocation of nonubiquitinated substrates. *MBoC* **24**, 3545–3556 (2013).
192. Butterfield, D. A., Swomley, A. M. & Sultana, R. Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**, 823–835 (2013).
193. Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury, P. T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693–4697 (1993).
194. Leitman, J., Ulrich Hartl, F. & Lederkremer, G. Z. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun* **4**, 2753 (2013).
195. Kuleshov, M. V. *et al.* modEnrichr: a suite of gene set enrichment analysis tools for model organisms. *Nucleic Acids Research* **47**, W183–W190 (2019).
196. Hyrskyluoto, A. *et al.* Ubiquitin-specific protease-14 reduces cellular aggregates and protects against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of the proteasome and ER stress-activated kinase IRE1 α . *Hum Mol Genet* **23**, 5928–5939 (2014).

197. Xu, E., Tang, Y., Li, D. & Jia, J. Polymorphism of HD and UCHL-1 genes in Huntington's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* **16**, 1473–1477 (2009).
198. Aron, R. *et al.* Deubiquitinase Usp12 functions noncatalytically to induce autophagy and confer neuroprotection in models of Huntington's disease. *Nat Commun* **9**, 3191 (2018).
199. Tanji, K. *et al.* YOD1 attenuates neurogenic proteotoxicity through its deubiquitinating activity. *Neurobiology of Disease* **112**, 14–23 (2018).
200. Claessen, J. H. L., Mueller, B., Spooner, E., Pivorunas, V. L. & Ploegh, H. L. The Transmembrane Segment of a Tail-anchored Protein Determines Its Degradative Fate through Dislocation from the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 20732–20739 (2010).
201. Sasset, L., Petris, G., Cesaratto, F. & Burrone, O. R. The VCP/p97 and YOD1 Proteins Have Different Substrate-dependent Activities in Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD). *Journal of Biological Chemistry* **290**, 28175–28188 (2015).
202. DeLaBarre, B., Christianson, J. C., Kopito, R. R. & Brunger, A. T. Central Pore Residues Mediate the p97/VCP Activity Required for ERAD. *Molecular Cell* **22**, 451–462 (2006).
203. Araki, K. & Nagata, K. Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a007526–a007526 (2011).
204. Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Defining the Human Deubiquitinating Enzyme Interaction Landscape. *Cell* **138**, 389–403 (2009).
205. Qu, J., Zou, T. & Lin, Z. The Roles of the Ubiquitin–Proteasome System in the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *IJMS* **22**, 1526 (2021).
206. Atwal, R. S. *et al.* Kinase inhibitors modulate huntingtin cell localization and toxicity. *Nat Chem Biol* **7**, 453–460 (2011).

7. Tartalmi összefoglaló

A Huntington-kór egy progresszív neurodegeneratív betegség, ami motoros és kognitív tünetekkel jár, majd a tünetek megjelenését követő néhány éven belül a beteg halálához vezet. A betegséget a *huntingtin* gén CAG ismétlődő szakaszában kialakult mutáció okozza, ami a róla képződő fehérje N-terminális részén egy kóros poliglutamin expansziót eredményez. Emiatt a kialakuló hibás térszerkezetű fehérje könnyen aggregátumokat képez az agyban. A mutáns HTT fehérje citotoxikus hatással bír a sejtekre a szolubilis mHTT oligomerek formájában és a mHTT aggregátumokkal egyaránt. Az idegsejtek ennek hatására elpusztulnak, ami jellemzően a striátum tüskés neuronjait érinti. Bár léteznek tünetei kezelése, ezidáig nem sikerült valódi gyógymódot kifejleszteni. A hibás térszerkezetű, illetve a feleslegessé vált fehérjék lebontását a sejtekben az ubikvitin-proteaszóma rendszer végzi, mely több enzimescsoport és fehérjekomplex összehangolt működését igényli. A rendszer egyik kulcsfontosságú komponense az ubikvitin, mellyel a sejt megjelöli a proteaszómális lebontásra célzott fehérjéket. Az ubikvitinek miután betöltötték szerepüket, újrahasznosulnak. Az ubikvitin számos más folyamathoz is elengedhetetlen, úgy mint a transzport folyamatok, vagy enzimek aktivitásának szabályozása. Ezek a kis méretű fehérjék korlátozott mennyiségben állnak rendelkezésre a sejtekben, így az egyes folyamatok versengenek a szabad ubikvitinekért. A neurodegeneratív betegségeknél gyakran megfigyelhető az adott betegségekre jellemző fehérjék felhalmozódása, aggregálódása, ami jelzés, hogy az UPS nem működik megfelelően. A mHTT által képződő aggregátumokba beleragadnak a citoplazmában található fehérjék, velük együtt az UPS tagjai is, mint a proteaszóma komponensek illetve az ubikvitinek.

Az ubikvitinek újrahasznosítását, vagyis a rendszerbe történő visszaforgatását az UPS rendszer egy másik fontos komponensei, a deubikvitináz enzimek végzik. A DUB-ok olyan fontos folyamatok szabályozásában vesznek részt mint a DNS repair (Usp1) vagy jelátviteli utak szabályozása (Usp7). Számos súlyos betegséggel összefüggéssbe hozták a DUB-okat. Rákos folyamatokban tumorszupresszor szerepet tölthetnek be (BAP1), mutációik lehetnek letálisak és vezethetnek komoly betegségekhez, mint például a spinocerebelláris ataxia3 (Ataxin3). Más neurodegeneratív betegségekből is kimutatták szerepüket, főleg Alzheimer- és Parkinson-kórban.

Munkánk során az USP, UCH, OTU, MJD és JAMM metalloproteáz DUB család összesen 32 képviselőjének hatását vizsgáltuk meg a *Drosophila melanogaster* Huntington-kór

modelljében. Minden vizsgált DUB-nak van humán ortológja, ezáltal potenciális terápiás célpontként szolgálhatnak a Huntington-kór kezelésében. Kísérleteinkben a *UAS.Httex1.Q120* transzgént hordozó *D. melanogaster* törzzsel dolgoztunk, mely a humán *Htt* gén első exonját expresszálja patológiás hosszúságú poliglutamin ismétlődésekkel UAS-GAL4 expressziós rendszer szabályozása alatt. A transzgént expresszáló állatokra jellemző az életképesség és motoros képességek romlása, neurodegeneratív folyamatok és élettartam rövidülés. Kísérleteink során az USP DUB családba sorolt *Usp1* RNS interferenciával történő géncsendesítése és az OTU DUB családba tartozó *Yod1* túltermelése jelentősen javította a mHTT által kiváltott beteg fenotípusokat. Az *Usp1* esetében nem sikerült másik alléllal megerősíteni az eredményeinket. A *Yod1* esetében létrehoztunk egy overexpressziós, flag taggal jelölt *UAS-Yod1.flag* vonalat, mellyel megerősítettük a screenben tesztelt *Yod1[EY07831]* allél pozitív hatásait. A *Yod1* túltermelése javította az állatok életképességét és motoros képességeiket, csökkentette a neurodegeneráció mértékét és meghosszabbította az állatok élettartamát. Megvizsgáltuk a *Yod1* túltermelésének hatását az Alzheimer-kór amiloid- β expresszió alapuló *Drosophila* modelljében, ahol a négy fenotípus vizsgálata során vegyes hatást tapasztaltunk a *Yod1[EY07831]* allél és a *Yod1.flag* transzgén esetében is. Míg az életképességre és a motoros képességekre nem volt hatással a *Yod1* túltermelése, az élettartam vizsgálatokban pozitív hatása volt, a neurodegenerációt viszont tovább fokozta az AD állatokban. Az eredményeink arra utalnak, hogy a *Yod1* túltermelésének hatása specifikus a Huntington-kór patomechanizmusára. Vizsgáltuk a *Yod1* overexpresszió hatását a mikroszkópián látható aggregátumok számára, méretére, méreteloszlására. Ehhez a kísérlethez *UAS-HTT.96Q.Cerulean* transzgént expresszáló törzset használtunk, ami egy fuzionáltatott fluoreszcens taggal tette lehetővé a mHTT aggregátumok mikroszkópos vizsgálatát. Kísérleteinkből kiderült, hogy a *Yod1* túltermelése az aggregátumok összes számát nem befolyásolja, a méreteloszlást tekintve pedig egy enyhe eltolódást figyeltünk meg a nagyobb aggregátumok irányába, ami menekítő hatású lehet a toxikusabb mHTT oligomerekkel szemben.

Annak felderítésére, hogy a *Yod1* milyen folyamatok révén váltja ki pozitív hatásait, transzkriptomikai analízist végeztünk. Ennek során vizsgáltuk a *mHtt* által kiváltott transzkripció változásokat és a *Yod1* túltermelés hatására bekövetkező változásokat a kontroll elav-GAL4 állatokhoz képest, illetve vizsgáltuk a *Yod1* direkt hatásait *mHtt*-t és *Yod1*-et koexpresszáló állatokban a HD állatokhoz képest. A kontroll mintákhoz viszonyítva a HD legyekben upregulált gének az antimikrobiális védekezéshez, a kromatin összeszereléshez, a

protein szintézishez és a protein metabolizmushoz köthetőek, a HD-ban downregulált gének a neuronális fejlődésben és plaszticitásban, a fehérjemodifikációban, a fényre adott válaszban és a vezikuláris transzport folyamatokban vesznek részt.

A *Yod1* overexpressziójának hatására a citoplazmatikus translációhoz, a riboszóma összeszerelődéshez, a foldinghoz, a ribonukleoprotein komplex összeszerelődéséhez, a topológiailag rossz fehérjékre adott sejtválaszhoz valamint az unfolded protein response-hoz köthető gének transzkripcionális változásait mutattuk ki a kontroll elav-GAL4 állatokhoz képest.

A HD állatokban megváltozott kifejeződésű gének közül számos gén transzkripciója részlegesen vagy teljesen helyreállt a *Yod1*-et túltermelő HD állatokban, így pl. a kromatin összeszerelődésben, a fehérjeszintézisben, a neuronális fejlődésben és plaszticitásban, a fehérje modifikációban, a protein metabolizmusban, a vezikuláris transzportban, a fény stimulusra adott válaszban és az antimikrobiális védekezésben szerepet játszó gének. Ezen kívül a *Yod1* túltermelésének hatására HD állatokban olyan gének is mutattak transzkripcionális változásokat, melyek a HD állatokban nem mutattak megváltozott transzkripciót az elav-GAL4 kontrollhoz képest. Ilyenek pl. a transzkripció szabályozásban, a mRNS feldolgozásban, a morfogenezisben, a szinaptikus transzmisszióban, a fehérjeszintézisben, a mitokondriális ATP szintézisben, metabolikus folyamatokban és az izomsejtek fejlődésében szerepet játszó gének.

A YOD1 DUB a P97 ATPáz mediálta ER retrotranszlokáció fontos komponense, mely az ERAD folyamatában segíti a lebontásra ítélt fehérjék ER-ből történő eltávolítását. A YOD1 kritikus szereppel bír az ERAD ezen lépésében, nélküle nem valósul meg a retrotranszlokáció és a hibás térszerkezetű fehérjék felhalmozódnak az ER-ben, ami ER stresszhez vezethet. Transzkriptomikai vizsgálatainkban a *Yod1* túltermelés hatására a fehérjék metabolizmusában és UPR-ben szerepet játszó gének dúsulást mutattak, ami összhangban van a szakirodalommal. Ezen kívül olyan gének transzkripciójában is változásokat detektáltunk, melyeket korábban a HD-vel asszociáltként írtak le. A kísérleteinkben a *Yod1* túltermelés hatására bekövetkezett jelentős fenotípusos javulás valószínűleg azon gének működésén keresztül valósul meg, melyek transzkripciója helyreállt a *Yod1*-et és *mHtt*-t koexpresszáló állatokban a HD állatokhoz képest, illetve melyek a *Yod1* hatására megváltozott expressziót mutattak, de HD állatokban nem voltak diszreguláltak. A *Yod1* túltermelésének pozitív hatásait specifikusan a HD állatokban figyeltük meg és a transzkriptomikai vizsgálataink is megerősítik, hogy a *Yod1*-nek hatása lehet a mHTT által kiváltott patomechanizmusok kivédésében, melyeket *Yod1* túltermelésével sikeresen szupresszáltunk.

8. Summary

Huntington's disease (HD) is a dominantly inherited neurodegenerative disorder associated with the gradual degeneration of neurons in the striatum and cerebral cortex. Its symptoms are usually characterized by a triad of motor, cognitive, and psychiatric abnormalities. The disease is caused by the expansion of a CAG repeat in the *huntingtin* gene, which leads to the production of mutant Huntingtin (mHTT) protein that due to misfolding can easily form aggregates. Both the soluble and the aggregated form of the mutant HTT protein has cytotoxic effects. Although symptomatic treatments exist, no real cure has yet been developed. The degradation of misfolded or redundant proteins in cells is carried out by the ubiquitin-proteasome system (UPS), which requires the coordinated action of several groups of enzymes and protein complexes. Ubiquitin is an important component of the UPS, which is used in cells to label proteins targeted for degradation by the proteasome. Once ubiquitin has fulfilled its role, it is recycled. Ubiquitin is also essential for many other processes, such as protein transport or regulating the activity of enzymes. This small protein is present in cells in finite numbers, so processes compete for free ubiquitins. The accumulation and/or aggregation of disease-specific proteins can be observed in several neurodegenerative diseases, indicating that the UPS is not functioning properly. The aggregates formed by mHTT trap proteins in the cytoplasm, including members of the UPS, such as proteasome components and ubiquitin.

The recycling of ubiquitin to the free ubiquitin pool is carried out by another important components of the UPS system, the deubiquitinase enzymes (DUBs). DUBs are involved in the regulation of important molecular processes, such as DNA repair (Usp1) or regulating signaling pathways (Usp7). DUBs have been linked to a number of serious diseases. They may play a tumor suppressor role in cancer development (for example BAP1), and their mutations can be lethal, or lead to devastating diseases such as spinocerebellar ataxia3 (Ataxin3). They also have been shown to play a role in neurodegenerative diseases, notably Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease.

In our work, we have investigated mutations of 32 members of the USP, UCH, OTU, MJD and JAMM metalloproteases DUB families in a *Drosophila melanogaster* model of Huntington's disease. All the DUBs we tested have human orthologues, making them potential therapeutic targets for the treatment of Huntington's disease. Our experiments were performed with a *Drosophila* strain carrying the *UAS.Httex1.Q120* transgene, which expresses the first exon of the human *Htt* gene with a polyglutamine repeat of pathological length under the control

of the GAL4-UAS system. Animals expressing the transgene are characterized by reduced viability, impaired motor skills, neurodegenerative processes, and shortened lifespan.

In our experiments, silencing of *Usp1* (member of USP DUB family) by RNA interference and overexpression of the OTU DUB family member *Yod1* significantly improved mHTT-induced abnormal phenotypes. Unfortunately, in the case of *Usp1* we were unable to confirm our results with an independent allele. In the case of *Yod1*, we generated an *UAS-Yod1.flag* transgenic line to verify the positive effects of the *Yod1[EY07831]* allele tested in the screen. Overexpression of *Yod1* by either overexpressing allele/transgene improved the viability and motor abilities of HD flies, reduced neurodegeneration and prolonged the lifespan of the animals.

We also investigated the effects of *Yod1* overexpression in an amyloid- β model of Alzheimer's disease. In this disease model we observed mixed effects for both overexpression allele/transgene. While overexpression of *Yod1* did not lead to a change in the viability and motor abilities of AD flies, it had a positive effect in lifespan studies, while neurodegeneration was further enhanced in AD animals. Our results suggest that the effect of *Yod1* is specific for the pathomechanism of Huntington's disease.

Next, we investigated the effect of *Yod1* overexpression on the aggregation property of mHTT. For this experiment, we used a *UAS-HTT.96Q.Cerulean* transgene expressing strain, which allowed microscopic examination of aggregates mHTT fused to a fluorescent protein. Our experiments indicate that overexpression of *Yod1* does not affect the number of aggregates, while a slight shift towards larger aggregates was observed. Large mHTT aggregates may play a protective role in the pathogenesis of HD.

We performed transcriptomic analysis to identify the molecular pathways that *Yod1* might modulate in HD flies. This involved examining mHtt-induced transcriptional changes and *Yod1* overexpression-induced changes compared to control *elav-GAL4* animals, and examining the direct effects of *Yod1* overexpression in flies co-expressing *mHtt* and *Yod1* compared to HD flies.

Based on Gene Set Enrichment Analysis we found that the most significantly affected biological processes by *Yod1* overexpression are related to protein biosynthesis and folding. We detected transcriptional changes in genes related to cytoplasmic translation, ribosome assembly, protein folding, ribonucleoprotein complex assembly, cellular response to topologically misfolded proteins and unfolded protein response upon *Yod1* overexpression compared to control *elav-GAL4* animals.

Compared to control samples, upregulated genes in HD flies are involved in antimicrobial defense, chromatin assembly, protein synthesis, and protein metabolism. Downregulated genes in HD flies are involved in neuronal development and plasticity, protein modification, light response, and vesicular transport processes.

In HD animals, nearly 60% of genes showing transcriptional changes were partially or fully restored upon overexpression of *Yod1*. The genes with restored transcriptional activity are involved in chromatin assembly, protein synthesis, neuronal development and plasticity, protein modification, protein metabolism, vesicular transport, response to light stimuli and antimicrobial defense. In addition, overexpression of *Yod1* in HD animals also resulted in transcriptional changes in some genes that did not show altered transcription in HD animals compared to *elav-GAL4* controls. These genes are involved in transcriptional regulation, mRNA processing, morphogenesis, synaptic transmission, protein synthesis, mitochondrial ATP synthesis, metabolic processes and muscle cell development.

YOD1 is an important component of the P97 ATPase-mediated retrotranslocation step of ERAD, which helps to remove proteins destined for proteasomal degradation from the ER. YOD1 plays a critical role in this step of ERAD, in its absence retrotranslocation does not occur and misfolded proteins accumulate in the ER, which can lead to ER stress. In our transcriptomic studies, *Yod1* overexpression also resulted in the enrichment of genes involved in protein metabolism and UPR, which is in agreement with the literature. In addition, we detected changes in the transcription of genes that also show enrichment in HD related gene sets.

The significant phenotypic improvement in our experiments as a result of *Yod1* overexpression is likely to be through the function of genes whose transcription was restored in animals co-expressing *Yod1* and *mHtt* compared to HD animals, and/or genes whose expression was altered by *Yod1* but were not dysregulated in HD animals. The positive effects of *Yod1* overexpression were observed specifically in HD animals and our transcriptomic studies confirm that *Yod1* has an ameliorating effect on *mHtt*-induced pathomechanisms, which were successfully suppressed by *Yod1* overexpression.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálával tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bodai Lászlónak** a lelkiismeretes irányításért, hogy megosztotta velem széleskörű elméleti és gyakorlati szaktudását, hogy mindvégig segítette és támogatta a dolgozatom elkészülését.

Szeretném megköszönni kutatócsoportunk egykori és jelenlegi tagjainak, **Dr. Zsindely Nórának, Dr. Faragó Anikónak, Dr. Varga Júliának, Siági Fruzsínának, Kovács Mercédesznek és Nagy Gábornak** a hasznos tanácsaikat, technikai segítségüket és barátságukat, amivel segítették a mindennapi munka során felmerülő problémák átvészelését.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék egykori és jelenlegi munkatársainak, kiváltképp **Kóra Zitának és Dr. Dugmonits Krisztinának**, akik technikai segítségük mellett barátságukkal is támogattak a dolgozat elkészüléséhez vezető hosszú úton.

Külön köszönet illeti **Dr. Hermeszt Editet**, aki segített rátalálni erre az útra.

Hálával tartozom a Mikrobiológiai Tanszék egykori és jelenlegi munkatársainak, **Dr. Papp Tamásnak, Dr. Nyilasi Ildikónak, Dr. Csernetics Árpádnak és Dr. Nagy Gábornak** a tanszéken töltött idő alatt megszerzett tudásért.

Köszönettel tartozom **Dr. Deák Péternek** és kutatócsoportjának, hogy a rendelkezésünkre bocsátották a kísérleteinkhez szükséges DUB mutációkat hordozó *Drosophila melanogaster* törzseket.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, akik végig támogattak és mellettem álltak a nehéz időszakokban.

A dolgozat megvalósításához hozzájárultak a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által támogatott **GINOP-2.3.2-15-2016-00032** és **GINOP-2.3.2-15-2016-00034** pályázatok.

10. Publikációs lista

A doktori eljárás alapját képező publikációk:

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 Dec11; 13 (1): 21951. doi: 10.1038/s41598-023-49241-8

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.

További publikációk:

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.

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.

Csernetics Á, Tóth E, **Farkas A**, Nagy G, Bencsik O, Vágvolgyi 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

Nagy G, **Farkas A**, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Nyilasi I, Vágvolgyi 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.

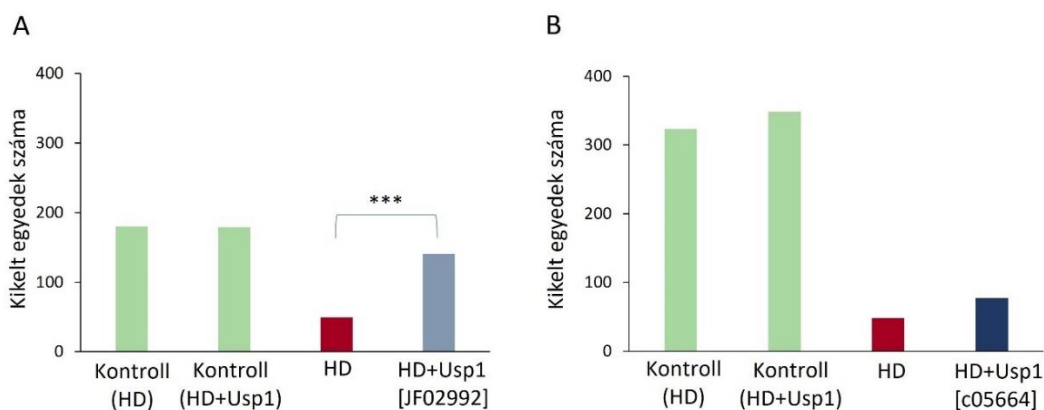
11. Függelék

DUB	Allél	Mutáció típusa	Humán ortológok	Élet-képesség	Élettartam	Mászás teszt	Neuro-degeneráció
OTU család							
CG3251	34574	RNS-i	OTUD4	1.20E-07	2.24E-02	0.96	0.01
CG4968	21978	RNS-i	OTUB1	1.90E-04	1.70E-03	0.68	0.82
duba	delta52	LOF	OTUD5	0.11	3.00E-04	0.73	0.16
otu	108845	RNS-i	OTUD4	0.23	0.36	0.96	0.01
trabid	HR	LOF	ZRANB1	2.19E-03	0.14	0.076	2.70E-08
Yod1	EY07831	OE	YOD1	5.29E-07	4.80E-09	0.0013	9.70E-12
Yod1	delta101/2	LOF	YOD1	0.12	8.51E-02	0.24	8.00E-02
MJD család							
CG3781	7113	RNS-i	JOSD1	0.84	0.59	0.29	0.2
UCH család							
Uch	26469	RNS-i	UCHL3	0.02	5.90E-06	0.18	0.135
Uch-L5	CRISPR	LOF	UCHL5	1.02E-05	3.80E-06	3.70E-03	0.75
JAMM metalloproteázok							
CG2224	108622	RNS-i	STAMPB	0.39	2.60E-03	0.19	0.62
CSN5	L4032	LOF	COPS5	0.92	6.28E-02	0.18	0.88
CSN6	105385	RNS-i	COPS6	0.0025	0.05	1	0.0037
Rpn11	BG01694	LOF	PSMD14	0.17	0.81	0.14	0.021
Rpn8	108573	RNS-i	PSMD7	0.15	0.85	0.5	0.034

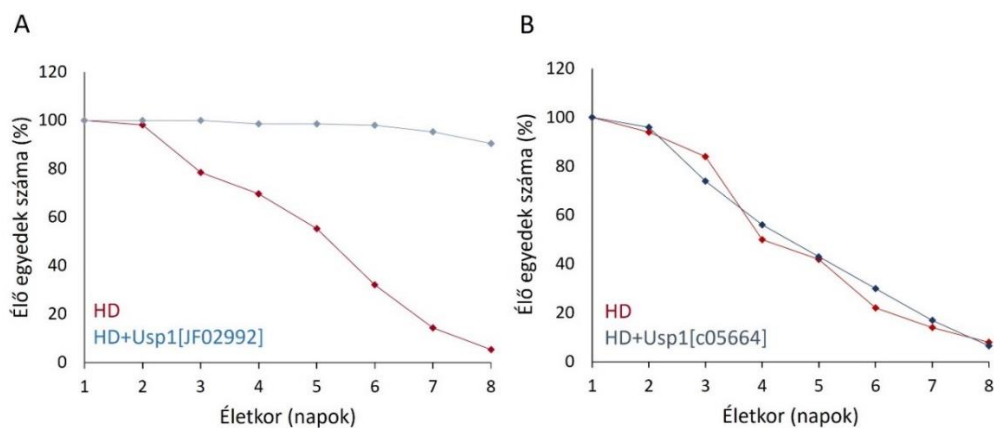
F1. táblázat. Az *UAS-Httex1.Q120* - DUB interakciós tesztek összefoglaló táblázata. RNS-i: RNS interferenciás vonal, LOF: Loss of function (funkció vesztéses mutáció), OE: Overexpressziós vonal. Pirossal jelöltük a DUB mutáció hatására bekövetkező szignifikáns fenotípus romlást, zölddel jelöltük a szignifikáns fenotípus javulást. Az egyes tesztek oszlopaiban a szignifikancia értékek vannak feltüntetve, ami az életképességi és neurodegenerációs vizsgálatoknál páros T-teszt ($P < 0,001$), az élettartamnál Fisher egzakt teszt 50%-os mortalitásnál számolva ($P < 0,001$), a mászás teszt esetében pedig Wilcoxon teszt ($P < 0,03$) alapján készült.

DUB	Allél	Mutáció típusa	Humán ortológok	Életképesség	Túlélés	Mászás teszt	Neuro-degeneráció
USP család							
CYLD	15340	RNS-i	CYLD	0.83	5.00E-04	0.66	0.2
DUBAI	28960	RNS-i	USP35	0.13	6.40E-13	0.03	0.98
faf	107716	RNS-i	USP9X	0.04	2.46E-02	0.056	0.16
Not	CB55093	LOF	USP22	0.06	0.14	0.08	0.53
puf	CRISPR	LOF	USP34	0.37	2.00E-13	0.14	0.48
Usp1	JF02992	RNS-i	USP1	3.70E-08	3.00E-13	0.029	1.13E-06
Usp2	104382	RNS-i	USP2	0.37	0.65	0.35	0.9
Usp5	delta2	LOF	USP5	3.12E-10	5.00E-04	0.86	1.70E-03
Usp7	18231	RNS-i	USP7	3.70E-05	1.00E-04	0.59	0.56
Usp8	107623	RNS-i	USP8	3.62E-05	2.60E-02	0.57	-
Usp10	CRISPR	LOF	USP10	0.7	0.45	0.71	0.48
Usp-12-46	100586	RNS-i	USP46	0.17	1	0.031	0.4
Usp14	110227	RNS-i	USP14	0.37	0.62	0.5	0.32
Usp15-31	103553	RNS-i	USP31	0.5	5.40E-03	0.54	0.36
Usp20-33	42609	RNS-i	USP20	0.038	1.95E-02	0.56	0.16
Usp30	7090	RNS-i	USP30	1.98E-05	9.80E-03	0.85	0.06
Usp32	18981	RNS-i	USP32	0.023	3.40E-10	0.031	0.3
Usp47	CRISPR	LOF	USP47	0.21	0.4	0.56	0.015

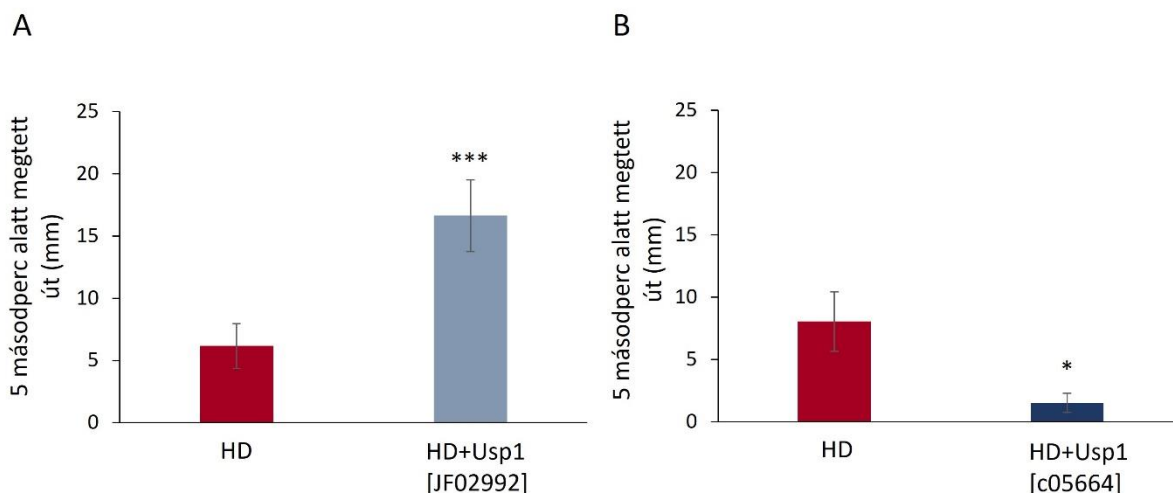
F2. táblázat. Az UAS-Httex1.Q120 - DUB interakciós tesztek összefoglaló táblázata. RNS-i: RNS interferenciás vonal, LOF: Loss of function (funkció veszteséges mutáció), OE: Overexpressziós vonal. Pirossal jelöltük a DUB mutáció hatására bekövetkező szignifikáns fenotípus romlást, zölddel jelöltük a szignifikáns fenotípus javulást. Az egyes tesztek oszlopaiban a szignifikancia értékek vannak feltüntetve, ami az életképességi és neurodegenerációs vizsgálatoknál páros T-teszt ($P < 0,001$), az élettartamnál Fisher egzakt teszt 50%-os mortalitásnál számolva ($P < 0,001$), a mászás teszt esetében pedig Wilcoxon teszt ($P < 0,03$) alapján készült.



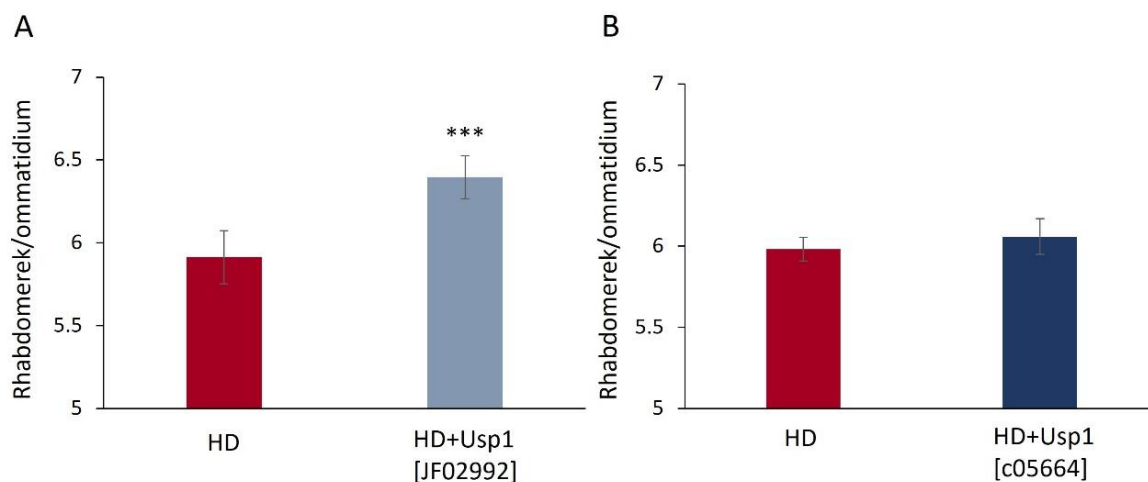
F1. ábra. Az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsökkentésének és funkcióvesztéses mutációjának hatása a HD állatok életképességére. Az ábrán az *Usp1[JF02992]* – *Httex1.Q120* (A) és az *Usp1[c05664]* – *Httex1.Q120* (B) interakciós keresztezésekéből származó utódok száma van genotípus kategóriáknként feltüntetve. Zöld színnel a kontroll hímekeket jelöltük, melyek csak hordozzák, de nem expresszálják a transzgéneket. Az *Usp1[JF02992]* RNS interferenciás allél hatására egy erősen szignifikáns javulás látható ($P=3.70 \times 10^{-8}$) szemben az *Usp1[c05664]* alléllal, ami nem okozott jelentős változást HD állatok életképességében ($P=0.24$). ***: $P<0,001$.



F2. ábra. Az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsökkentésének és funkcióvesztéses mutációjának hatása a HD legyek élettartamára. A túlélési görbék az élő egyedek százalékos arányát mutatják az életkor (napok) függvényében. A: A *Httex1.Q120* – *Usp1[JF02992]* interakciós keresztezésből származó utódok ($n_{HD}=148$ és $n_{HD+Usp1}=56$) túlélési görbéje. B: A *Httex1.Q120* – *Usp1[c05664]* interakciós keresztezésből származó utódok ($n_{HD}=50$ és $n_{HD+Usp1}=77$) túlélési görbéje. Az *Usp1[c05664]* allél nem befolyásolta a beteg állatok élettartamát ($P^{50\%}=0,88$), szemben a *Usp1[JF02992]* alléllal, ahol jelentős mértékű javulást láthattunk ($P^{50\%}=3 \times 10^{-3}$).



F3. ábra. Az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsendesítésének és funkcióvesztéses mutációjának hatása a HD legyek mozgási képességeire. A két alléllal elvégzett kísérlet során eltérő eredményeket kaptunk. A: *Httex1.Q120* – *Usp1*[JF02992] interakciós keresztezésből származó állatok ($n_{HD} = 21$ és $n_{HD+Usp1} = 24$) által 5 másodperc alatt megtett út átlaga $\pm$ standard error. B: A *Httex1.Q120* – *Usp1*[JF02992] interakciós keresztezésből származó állatok ($n_{HD} = 20$ és $n_{HD+Usp1} = 19$) által 5 másodperc alatt megtett út átlaga $\pm$ szórás. *: $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$. A *Httex1.Q120* – *Usp1*[JF02992] interakció esetében a HD nőstények átlagosan 6,1 mm-t, a HD+*Usp1*[JF02992] nőstények 16,6 mm-t tettek meg ($P = 9 \times 10^{-3}$) (16/A ábra), míg a *Httex1.Q120* – *Usp1*[JF02992] interakciónál a HD nőstények átlagosan 8 mm-t, a HD+*Usp1*[c05664] nőstények 1,5 mm utat tettek meg 5 másodperc alatt ($P = 0,046$) (16/B ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy az *Usp1*[JF02992] konstrukció szignifikánsan javította, viszont az *Usp1*[c05664] allél tovább rontotta a HD állatok alapvetően rossz mozgási képességeit.



F4.ábra. Az *Usp1* RNS interferenciával történő géncsendesítésének és funkcióvesztéses mutációjának hatása HD állatok neurodegenerációjára. A: *Usp1*[JF02992] konstrukció hatása HD legyek neurodegenerációjára ($n_{HD} = 10$ és $n_{HD+Usp1} = 12$). B: *Usp1*[c05664] allél hatása HD legyek neurodegenerációjára ($n_{HD} = 11$ és $n_{HD+Usp1} = 11$). ***: $P < 0,001$. Az első interakciós kísérletben a HD legyek átlag rhabdomer száma ommatídiumonként 5,9 míg a HD+*Usp1*[JF02992] állatoknál 6,4 volt. Ehhez képest a második interakciós keresztezésből származó HD legyek átlagos rhabdomerszáma 5,9, míg a HD+*Usp1*[c05664] legyek rhabdomerszáma 6 volt. Az eredmények azt mutatják, hogy a *Usp1*[JF02992] allél szignifikánsan ($P = 1,13 \times 10^{-6}$) javított a neurodegeneráció mértékén, a *Usp1*[c05664] allél azonban nem okozott statisztikailag szignifikáns változást.