



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

UBE3A ubikitina ligasaren funtzioa indargabetzen duten deubikitinak identifikatzea eta inhibitzea Angelman sindromea tratatzeko estrategia terapeutiko gisa

Erik Paco Barrio, Juanma Ramirez, Nerea Osinalde, Natalia Presa, Ainhoa Atxa eta Ugo Mayor

161-168 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.19>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



UBE3A ubikitina ligasaren funtzioa indargabetzen duten deubikitinusak identifikatzea eta inhibitzea Angelman sindromea tratatzeko estrategia terapeutiko gisa

Erik Paco Barrio^{1,2}, Juanma Ramirez¹, Nerea Osinalde², Natalia Presa¹, Ainhoa Atxa¹, Ugo Mayor^{1,3}

1 Biokimika eta Biologia Molekularreko saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 48940 Leioa, Espainia.

2 Biokimika eta Biologia Molekularreko saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 01006 Vitoria-Gasteiz, Espainia.

3 Ikerbasque, Basque Foundation for Science, 48013 Bilbo, Espainia.
Kontakturako e-posta: erik.paco@ehu.eus

Laburpena

Angelman Sindromea (AS) gaixotasun bakana da, UBE3A genea garunean adierazten ez denean edo kodetzen duen proteina akastuna denean garatzen dena. UBE3A E3 ubikitina ligasa bat da, alegia, bere ituei ubikitina deitzen den proteina txiki bat itsasteaz arduratzen da. AS gaur egun sendabiderik ez duen gaixotasuna denez, tratamendu berri bat lortzea da gure helburu nagusia. Horretarako, UBE3Aren kontrako funtzioa du(t)en deubikuitinasa(k) (DUBak) identifikatu eta inhibituko ditugu. DUB horiek identifikatzeko bi hurbilketa proposatzen ditugu: (i) eulien garunean UBE3Aren elkarrekiten duten proteinak identifikatzea, eta (ii) AS sagu ereduen burmuinean UBE3Aren substratuak identifikatzea. Behin DUBa(k) identifikatuta, inhibituko dira, ASren sintomak leheneratu diren egiaztatzeko.

Hitz gakoak: Angelman Sindromea, ubikitinazioa, deubikitinusak, inhibitzioa

Abstract

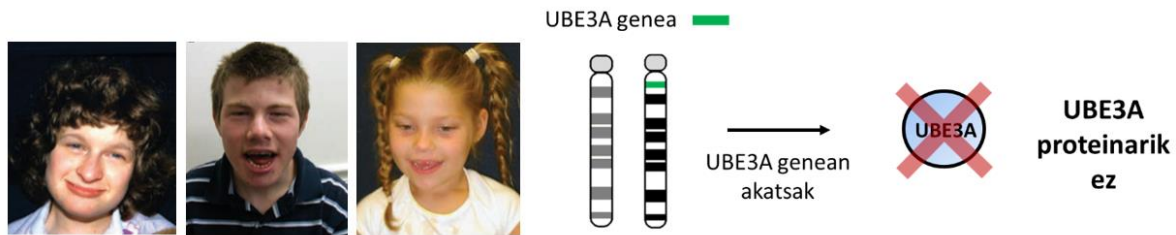
Angelman Syndrome (AS) is a rare disease that develops when the UBE3A gene is not expressed in the brain or the protein it encodes for is defective. UBE3A E3 is a ubiquitin ligase, that is, it is responsible for attaching to its targets a small protein called ubiquitin. As AS is currently a disease that has no cure, our main objective is to develop a new treatment. In order to do so, we will identify and inhibit deubiquitinase(s) (DUBs) which have an opposite function to UBE3A. To find those DUBs, we propose the following two approaches: (i) identifying the proteins that interact with UBE3A in the fly brain, and (ii) the identification of UBE3A substrates in the brain of an AS mouse model. Once candidate DUB(s) are identified, they will be inhibited in AS mice models to assess their impact on AS symptomatology.

Keywords: Angelman Syndrome, ubiquitination, deubiquitinases, inhibition

1. Sarrera eta motibazioa

Angelmanen sindromea (AS) gaixotasun neurologiko arraroa da, jatorri genetikokoa, jaiotako 15.000 haurretatik 1ek pairatzen duena. Erasandako pazienteen ezaugarri nagusiak hauek dira: garapen-atzerapen larria, adimen-desgaitasuna, mugimendu- eta oreka-arazoak, epilepsia, hitz egiteko zailtasuna, hiperaktibitatea eta erraz kitzikatzen den nortasuna, bai eta itxuraz zoriontsua (Margolis et al., 2015). Gaur egun, badakigu gaixotasun hori UBE3A genearen funtzionamendu okerragatik garatzen dela (Kishino et al., 1997). Diagnostikorako irizpide klinikoak ere zehaztasunez ezarri dira (Angelman, 1965). Hala ere, oraindik ez da ezagutzen zein den UBE3A garunean duen zeregin zehatza, eta haren gabeziak nola eragin dezakeen horren koadro kliniko konplexua (Williams et al., 2010). Gaur gaurkoz, ez dago tratamendu espezifikorik ASrentzat, eta horrek agerian uzten du UBE3Aren mekanismo molekularren inguruko ikerketaren beharra.

1. irudia. Angelman sindromea duten hiru pertsona, hain esanguratsua duten irribarrearekin. UBE3A genean mutazioak edo akatsak daudenean ez da UBE3A proteinarik sortzen, sindromea garatuz.



Arestian esan bezala, UBE3A akastunak AS eragiten du, eta akats mota ezberdinak deskribatu dira. UBE3A inpronta genetikoa duen genea da, hau da, gurasoengandik jasotako bi kopietatik, neuronetan, bakarrik amarena adierazten da, aitarena isilarazita baitago. AS kasu gehienetan, amarengandik jasotako kopia akastuna da (kasuen $\sim 80\%$), baina gerta daiteke ere amarengandik kopiari ez jasotzea (kasuen $2-7\%$) edo inpronta prozesuan arazoak egotea (kasuen $3-5\%$). Gainera, AS mota horiek gaixotasunaren larritasunarekin lotu daitezke. Esaterako, amarengandik kopia jasotzen ez duten pazienteek fenotipo larriagoa pairatzen dute (Yang et al., 2021).

UBE3A geneak ubikitina E3 ligasa bat kodetzen du, UBE3A izenekoa, proteinen ubikitinazio-prozesuan parte hartze garrantzitsua duena. Ubikitinazioa hiru entzimek gauzatzen dute. Hasteko, E1 ubikitina aktibatzaile bat arduratzen da ubikitina aktibatzeaz. Ondoren, aktibatutako ubikitina E2 entzima konjugatzaile batera transferitzen da. Azkenik, E3 ubikitina ligasa baten parte-hartzearekin, ubikitina, oro har, itu proteinaren lisina batera lotzen da. E3 ligasek prozesu horretan guztian duten funtzio nagusia erreakzioari espezifiktasuna ematea da, aldi berean elkarrekiten baitute E2ekin eta eraldatu beharreko substratuekin (Metzger et al., 2014). Beraz, ez da harrizkoa E3 ligasaren gabeziak edo funtzionamendu desegokiak eragin larria izatea haren substratuen ubikitinazioan, eta horren ondorioz, fenotipo patogenikoa azaltzea (Osinalde et al., 2019).

Ubikitina 76 aminoazidoko proteina da, 7 lisina dituen, eta horiek ere, N-muturreko metioninarekin batera, ubikitinatu daitezke. Hain zuzen ere, ubikitina molekulak elkarrekin lotzeko moduaren arabera, arkitektura desberdineko ubikitina-kateak era daitezke. Beraz, ubikitinak eragindako erantzun zelularrak ere ubikitina-kateen topologiaren arabera dira (Akutsu et al., 2016). Adibidez, K48 bidezko ubikitina-kateek eraldatutako proteina proteasomara ituratzen dute bertan degradatua izan dadin. Aldiz, K63ren bidez eratutako kateek mintzeko hartzaileen barneratzea bideratzen dute (Swatek & Komander, 2016).

Itzulpen ondoko aldaketetan ohikoa den bezala, ubikitinazioa prozesu itzulgarria da. Deubikitinasek (DUB) ubikitina-substratua eta ubikitina-ubikitina loturak hidrolizatzeaz gain, ubikitinaren polipeptido aitzindariak ere prozesatzen dituzte (Komander et al., 2009). Giza genomak ia ehun DUB kodetzen ditu, eta egiturari dituzten antzekotasunen eta sekuentziaren arabera, zazpi familiatan sailkatzen dira. Ondo definitutako gune aktiboak dituzten entzimak direnez, DUBek potentzial terapeutiko handia dute. Hala ere, gaur arte, DUBen inhibitzaile selektiboen garapena mugatua izan da, neurri batean, entzima horien biologiari buruzko ezagutza eskasagatik (Harrigan et al., 2018). DUB desberdinen substratuak identifikatzea, beraz, baliabide baliotsua izan liteke farmako berriak garatzeko (Elu et al., 2022).

Orain arte, ASa tratatzeko ikertzen ari diren terapiak 3 taldeetan bana daitezke. Terapiak genikoak falta den genea zuzenean pazienteari eskuratzean datza, birusen erabilerari esker (Tsagkaris et al., 2020). Berraktibazio terapiak garunean aitaren kopia, akats gabea dena, aktibatzen saiatzen dira (Dindot et al., 2023). Azkenik, bidezidor interbentzio terapiak ASaren sintomak arintzen saiatzen dira, medikamendu beraren funtzioa ASaren testuinguruan ezezaguna bada ere (Keary et al., 2023). Hurbilketa guzti horiek ikerketa bidean daudenez, guk laugarren alternatiba bat proposatzen dugu: UBE3A indargabetzen duten DUBak inhibitzea.

Horrela, UBE3A substratuen ubikitinazioa iraultzen duten DUBak identifikatuz gero, DUBak inhibitzeko farmakoak gara litezke. Tratamendu horren helburua litzateke UBE3Aren substratuen ubikitinazio-mailak berrezartzea, AS duten pazienteetan oso murriztuta baitaude. Zentzu horretan, duela gutxi DUB bat aurkitu dugu, UBE3Aren jarduera partzialki indargabetzen duena, eta hura isiltzeak nabarmen hobetzen du ASren ereduazko euliek duten mugitzeko gaitasuna

(argitaratu gabeko datuak). Ildo beretik jarraituz, UBE3Aren jarduera indargabetzen duten DUBen aurkikuntzak ASaren tratamendu espezifikorako bidea izan daiteke. Edonola ere, argi dago gaixotasunen arraroen inguruko ikerkuntza sakontzea beharrezkoa izango dela etorkizunerako.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Egun, ASrako tratamendu espezifikorik ez dago, beraz, gaixo horien bizi kalitatea hobetzeko tratamenduak garatzea ezinbesteko erronka da. ASren oinarrian UBE3A akastuna dago, eta, horrenbestez, proteinen ubikuitinazio-patroi ezegokia dagoela kontuan hartu, proposatzen duguna ondokoa da: UBE3Aren substratuei ubikitina kentzeaz arduraren diren DUBak aurkitzea, eta, ondoren, horiek inhibitzea. BbioHelburu hori buruan izanda, UBE3Aren kontrako funtzioa duten DUBak aurkitzeko bi hurbilketa proposatzen ditugu: (i) UBE3Aren interaktoreen artean bilatzea, eta (ii) UBE3Aren substratuetatik abiatuta aurkitzea.

Bi hurbilketa horiek aurrera eramateko, bi estrategia erabiliko ditugu, hurrenez hurren; eta bioUb, biak *E.coli*-ren BirA entziman oinarrituak. BioIDk intereseko proteinetatik hurbil dauden proteinak biotinilatzea ahalbidetzen du (Roux et al., 2012). BioUb, bere aldetik, itu proteinetara lotzen diren ubikitinak biotinilatzen ditu (Franco et al., 2011). Gure laborategiak esperientzia handia du bi metodo horiek erabiltzen. Izan ere, bioID estrategia masa-espektrometriarekin konbinatuta, berriki CaMKII kinasaren interaktoma definitu dugu (artikulua prestatzen). Era berean, arrakastaz baieztatu dugu bioUb estrategia masa espektrometriarekin akoplatzea bideragarria dela E3 ligasen substratu espezifikokoak identifikatzeko bai giza zelula kultibotan (Sala-Gaston et al., 2022), bai *in vivo* eulietan (Ramírez et al., 2021), bai saguen burmuinetan (Lectez et al., 2014).

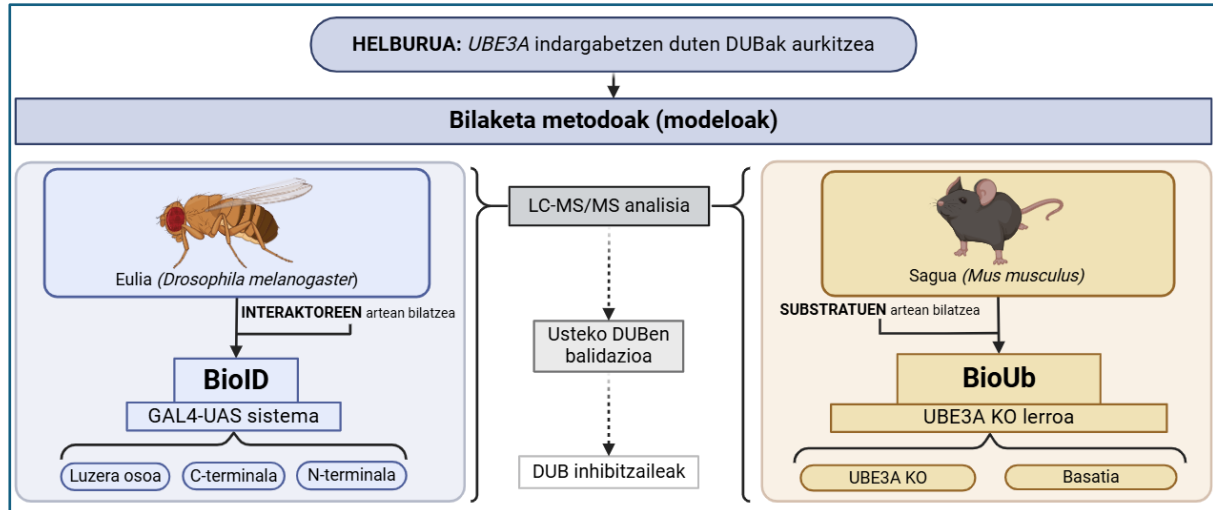
Horrela, proiektu honen helburu nagusiak dira, batetik, UBE3A inplikaturik dagoen mekanismo molekularren ezagutzan sakontzea, eta, bestetik, AS tratatzeko estrategia terapeutiko gisa UBE3Aren funtzioa indargabetzen du(t)en deubikuitinasa(k) aurkitzea. Horretarako, proposamen hau aurrera eramateko ezarritako helburuak honako hauek dira:

- 1) *Drosophila melanogaster* eulien garunetik abiatuta, UBE3A-ren interaktoreak identifikatzea: *In vivo* biotinilizazio-estrategiekin dugun esperientzian oinarrituta (bai eulietan, bai saguetan), bioID sistema erabiltzeko asmoa dugu (Kim et al., 2014; Mehus et al., 2016; Roux, 2013; Roux et al., 2012). Hori guztia ASren patologia gakoaren entzima nola erregulatzen den ulertzen lagunduko digu.
- 2) UBE3Aren substratuak identifikatzea WT eta UBE3A KO saguen ubikitomaren azterketaren bidez: Duela gutxi, UBE3Aren substratu neuronalak identifikatu ditugu, ubikitina ligasa eta bioUb sistema gain-adierazten zuten saguak erabiliz (artikulua errebisioan). Proiektu honetan proposatzen duguna da prozedura bera erabiltzea sagu basatiak eta UBE3A KO saguen neuronetako ubikuitinazio-patroia aztertzeko, elkarren artean alderatu ahal izateko eta ondorioztatu ahal izateko ze proteinen ubikuitinazio-maila murrizten den UBE3Aren ausentzian.
- 3) UBE3Aren funtzioa indargabetzen duten DUBak identifikatzea eta baliozkotzea: Aurreikus daiteke UBE3Ak bideratutako ubikuitinazioa iraultzen duten entzimak, hots, deubikuitinasak 1. eta 2. helburuetan planteatutako interaktoma edo/eta ubikitinoma azterketetan identifikatuko direla, hurrenez hurren. Kasu horretan, hautagai diren DUBak balidatuko dira inhibituz edo siRNA bidez isilaraziz, eta Western blot bidez neurtuz UBE3Aren substratuen ubikuitinazio-maila. Izan ere, substratuen ubikuitinazio mailak gora egin beharko luke berau deubikuitinatzeaz arduratzen den DUBa inhibituz edo isilaraziz gero.
- 4) UBE3Aren funtzioa *in vivo* indargabetzen duten DUBen inhibizioaren efektua karakterizatzea: Behin UBE3Aren ubikuitinazioa iraultzen duten DUBak identifikatuta inhibituz egingo dira, eta horrek maila fisiologikoan dituen ondorioak aztertuko dira. Proiektu honetan, DUBen inhibitzailearekin tratatu diren UBE3A KO saguak karakterizatzea proposatzen da, AS sagu ereduaren deskribatutako sintomak arintzen diren frogatzeko.

3. Ikerketaren muina

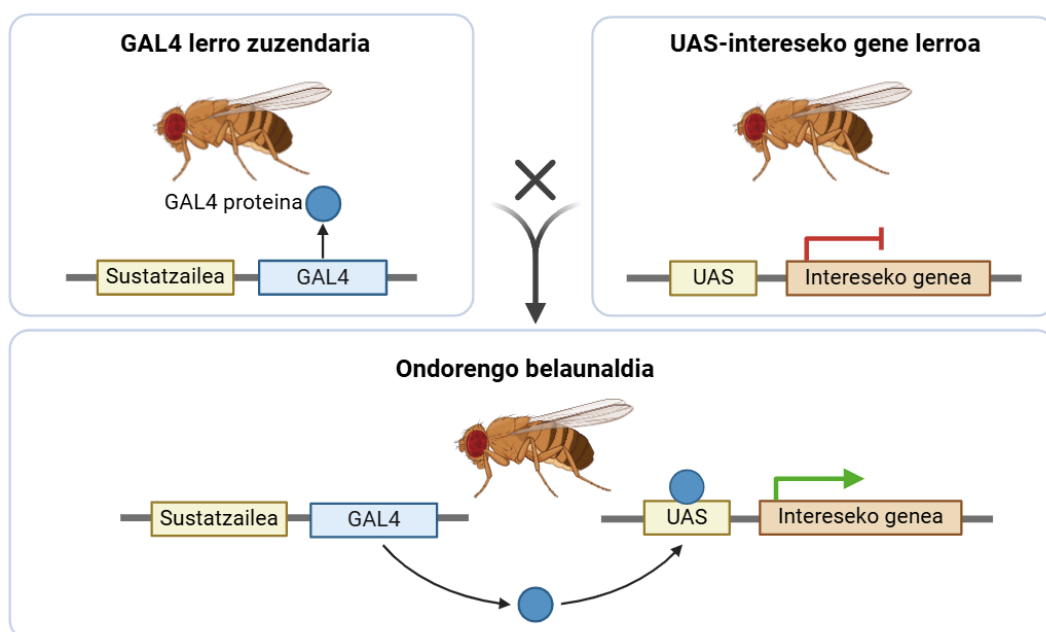
Proposatutako helburuak betetzeko, bi sistema biologikorekin egingo dugu lan, hots, euliekin eta saguekin. Euliekin UBE3Aren interaktoreak identifikatuko ditugu, eta saguekin haren substratuak. 2. irudian laburbiltzen da horretarako jarraituko den lan-eskema.

2. irudia. Proiektuaren lan-eskema orokorra



Eulien kasuan, GAL4-UAS sistema erabiliko da BioID (BirA-UBE3A fusio proteina) modu kontrolatuan adierazteko (3.irudia). GAL4-UAS sistemak bi osagai ditu; batetik, GAL4 proteina aktibatzailea adierazten duen genea, eta, bestetik, UAS sekuentzia erregulatzaila. UAS sekuentzia erregulatzailari esker intereseko proteina kodetzen duen genearen transkripzioa (BirA-UBE3A fusio proteina) soilik aktibatuko da baldin eta GAL4 proteina lotzen bazaio. GAL4 proteinaren adierazpena ahalik eta eraginkorrena izateko, GAL4 genea 3 sustatzaile desberdinen kontrolpean jarri dugu: nSyb (*neuronal Synaptobrevin*), GMR (*glass multiple reporter*) eta ple (*pale*), horiek baitira GAL4 genea eraginkorren aktibatzen dutenak. Azkenik, GAL4-UAS sistemadun euliak lortzeko, GAL4 proteina adierazten duten euliak UAS-BirA-UBE3A duten euliekin gurutzatuko dira.

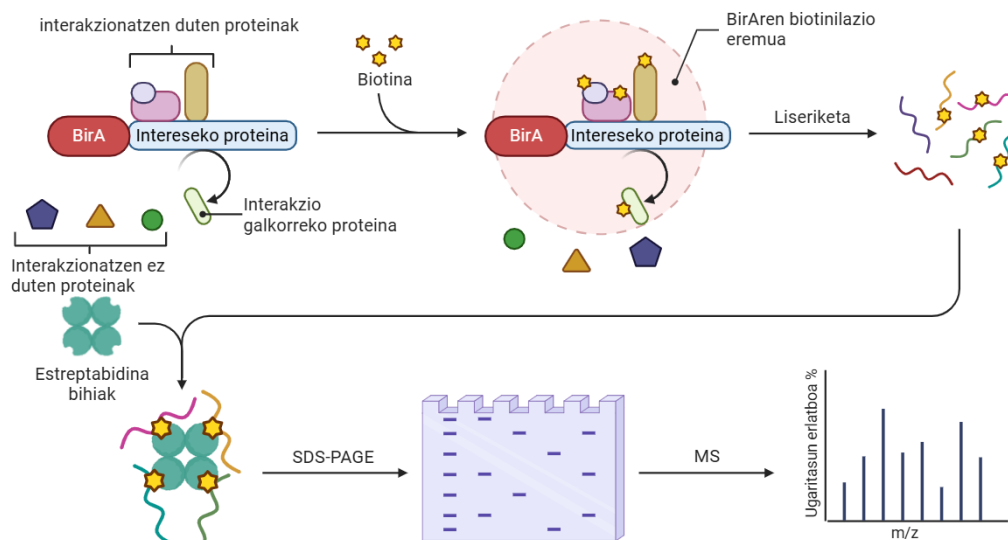
3. irudia. Eulien GAL4-UAS sistemaren funtzionamenduaren eskema



BioID sistemak, bere aldetik, gure intereseko proteinarekin (UBE3A) interakzionatzen duten proteinak isolatzea ahalbidetzen digu. 4.irudian azaltzen den bezala, sistema horren muinean BirA entzima dago, zeina gure intereseko proteinari lotuta dagoen. Horrela, BirA entzimak biotina

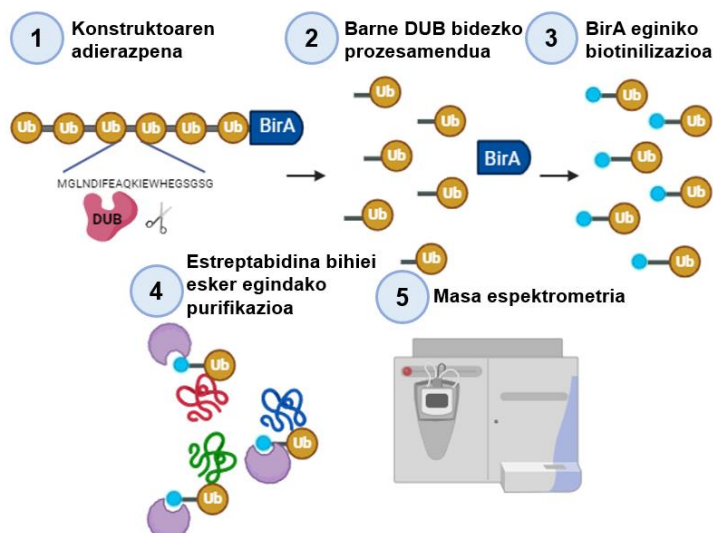
atxikituko dio UBE3Atik gertu dagoen edozein proteinari. Azkenik, estreptabidina bihiak erabiliz biotina duten, eta, ondorioz, UBE3Aren elkarrekiten duten proteinak isolatuko ditugu eta masa espektrometria identifikatuko dira.

4. irudia. Eulien BioID sistemaren funtzionamenduaren eskema



Saguei dagokionez, UBE3A adierazten ez duen (KO, *knock out*) sagu eredu bat sortzen ari gara, bioUb sistema adieraziko duena. BioUb sistema, eulietan erabili dugun bioID bezala, proteinen biotina markaketan oinarritzen da. Izan ere, bioUb sistemari esker, 6 ubikitina eta BirA entzima daraman genea adierazten da. Ubikitina horiek barne DUBei esker banatu ostean, BirAk biotinarekin markatuko ditu. Hurrengo pausuetarako bioIDren kasuan erabilitako estrategia bera aplikatuko dugu: estreptabidina bihiak bidezko biotinilitatuko, hots, ubikitinatutako proteinen purifikazioa, eta masa espektrometria bidezko identifikazioa (5.irudia).

5. irudia. Saguena BioUb sistemaren funtzionamenduaren eskema



Sagu basatietatik eta UBE3A KO saguetatik isolatutako proteinen intentsitateak alderatuz, E3 ubikitin ligasaren substratuak detektatu ahal izango ditugu, UBE3Aren ausentzian beraien ubikitinazio-maila urriagoa izango delako. Substratu interesgarrienak hautatuko dira, eta haien ubikitinazioa sakon aztertutako da; zehazki ubikitinatzen diren aminoazidoak identifikatuko dira, bai eta zer ubikitinazio mota sortzen den ere (Akimov et al., 2018; Trulsson et al., 2022).

Euliekin zein saguekin egindako esperimientuen datu proteomikoak MaxQuant softwarearen bidez aztertuko dira, Andromeda bilatzailearekin eulien eta saguaren datu-baseak erabiliz, hurrenez hurren (Elu et al., 2019). Kontuan hartuko dira baldintza bakoitzeko 3 erreplika biologikoetatik gutxienez bitan detektatu diren proteinak, eta soilik ratio jakin bat gainditzen

dutenak kontsideratuko dira UBE3Aren substratu edo interaktore posibletzat. Tresna bioinformatikoak erabiliko dira, hala nola DAVID, Panther eta String, identifikatutako proteinen izaera biologikoa ezagutzeko.

Bide batetik zein bestetik, UBE3Aren kontrako funtzioa duen DUBen bat identifikatzea espero dugu. Hurrengo urratsa, DUB horren inhibizioak ASaren sintomatologia hobetzen duen aztertzea izango da. Gure taldean badugu horretan esperientzia. Izan ere, aurreko proiektu batean identifikatu genuen USP9X deubikitinasa UBE3Aren substratu baten ubikitinazioa erregulatzen duela. DUB hori inhibituz, frogatu genuen UBE3A KO eulien mugikortasun arazoak nabarmen arintzen zirela (argitaratu gabeko emaitzak). Proiektu honetan, antzeko esperimenduak egitea aurrekusten dugu. Alegia, identifikatuko dugun DUBa inhibitu, eta euli zein saguen portaera (mugikortasuna, aktibitate neuronal, etab.) aztertu.

4. Ondorioak

Azaldutako planteamenduarekin, UBE3Aren interakzionatzen duten proteina mordoa detektatzeko gai izango gara, eta baliteke horien artean UBE3A indargabetzen duen DUBen bat agertzea. Dena den, masa espektrometria bidez DUBen bat detektatuz gero, emaitzak balidatu beharko ditugu benetan UBE3Aren aurkako funtzioa betetzen duen ala ez jakiteko.

UBE3Aren kontrako funtziodun DUBik identifikatu eta balidatuz gero, hurrengo urratsa siRNA bidez bere adierazpena murriztu eta horrek euli zein saguetan duen efektua aztertzea litzateke. Euli eta sagu modelo horien inhibizio bidezko tratamenduaren karakterizazioari esker jakingo dugu ea gaixotasunaren sintomak leuntzen dituen eta zenbateraino.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunerako erronkak hobeto ulertzeko, aurretik bertan aurkeztu den lanaren mugak ulertu behar dira. Alde batetik, kontuan izan behar dugu nerbio-sistemari eragiten dioten gaixotasunak ikertzeko maiz ezin dugu lana zuzenean pazienteetan egin. Horri aurre egiteko esperimenduak egiteko animalia modeloak garatu behar dira. Gure kasuan, AS antzeratzen duten euli eta sagu modeloekin egiten dugu lan, baina hauek ez dira zertan guztiz errealistak izan behar. Modeloak aukeratzeko orduan, gizakiekiko gertutasuna eta lan erosotasuna hartzen dira kontuan gehien bat, baina, askotan, guk alde aurretik estimatutako gertutasuna errealtatetik urrun dago. Gure euli eta sagu modeloak aurretik arrakastatsuak izan badira ere, datuak giza pazienteei estrapolatzeko orduan arazoak gerta daitezke.

Bestalde, proposatutako sistemek, bioID eta bioUb, ez dute zertan DUB potentzial guztiak harrapatzeko gaitasuna izan behar. Ideala izango litzateke UBE3A indargabetzen duen DUB bakarra egotea hura identifikatu eta inhibituz gero pazienteen ubikitinazio-patroia berrezarri ahal izateko. Baina kontrakoa ere gerta daiteke; UBE3A partzialki indargabetzen duten DUB asko egotea. Lehenengo kasuan, lana erlatiboki erraz bideratu liteke, eta potentzial handiko inhibitzaileak garatu. Aitzitik, bigarren kasuan, DUB bakar bat inhibitzearen eragina partziala litzateke, eta gaixotasunaren sintomatologia leuntzeko aukerak murriztagoak. Hori bada kasua, beste bide osagarrien bat bilatu beharko genuke inhibizio terapia eraginkorra izateko.

Lanaren mugak ulertuta, etorkizunerako norabideaz eztabaida dezakegu. Hainbat alditan azaldu den moduan, UBE3A indargabetzen duten DUBak aurkitu ostean, haiek inhibitzeko konposatu espezifikoak diseinatu beharko lirake. Konposatu horien ezaugarri farmakologikoak, bereziki segurtasuna eta erabilgarritasuna, ezagutzea beharrezkoa izango da gizakiei administratzeko. Mota horretako tratamenduak erlatiboki denbora tarte laburrean garatu daitezkeenez, ASri aurre egiteko lehen mailako tratamendu bilakatzeko aukerak izan ditzake. Halere, gaixotasunaren ezaugarriak direla eta, beste ikuspuntuetatik diseinatutako tratamenduen ikerkuntza beharrezkoa izango da gaixotasunari modu eraginkorrean aurre egiteko.

6. Erreferentziak

- Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S. V. F., Hallenborg, P., Pedersen, A.-K., Bekker-Jensen, D. B., Puglia, M., Christensen, S. D. K., Vanselow, J. T., Nielsen, M. M., Kratchmarova, I., Kelstrup, C. D., Olsen, J. V., & Blagoev, B. (2018). UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0084-y>
- Akutsu, M., Dikic, I., & Bremm, A. (2016). Ubiquitin chain diversity at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(5), 875-880. <https://doi.org/10.1242/jcs.183954>
- Angelman, H. (1965). 'Puppet' Children A Report on Three Cases. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 7(6), 681-688. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1965.tb07844.x>
- Dindot, S. V., Christian, S., Murphy, W. J., Berent, A., Panagoulas, J., Schlafer, A., Ballard, J., Radeva, K., Robinson, R., Myers, L., Jepp, T., Shaheen, H., Hillman, P., Konganti, K., Hillhouse, A., Bredemeyer, K. R., Black, L., Douville, J., FIRE consortium, & FIRE Consortium. (2023). An ASO therapy for Angelman syndrome that targets an evolutionarily conserved region at the start of the UBE3A-AS transcript. *Science Translational Medicine*, 15(688), eabf4077. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf4077>
- Elu, N., Osinalde, N., Beaskoetxea, J., Ramirez, J., Lectez, B., Aloria, K., Rodriguez, J. A., Arizmendi, J. M., & Mayor, U. (2019). Detailed Dissection of UBE3A-Mediated DDI1 Ubiquitination. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00534>
- Elu, N., Osinalde, N., Ramirez, J., Presa, N., Rodriguez, J. A., Prieto, G., & Mayor, U. (2022). Identification of substrates for human deubiquitinating enzymes (DUBs): An up-to-date review and a case study for neurodevelopmental disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 132, 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.01.001>
- Franco, H. L., Dai, D., Lee, K. Y., Rubel, C. A., Roop, D., Boerboom, D., Jeong, J.-W., Lydon, J. P., Bagchi, I. C., Bagchi, M. K., & DeMayo, F. J. (2011). WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(4), 1176-1187. <https://doi.org/10.1096/fj.10-175349>
- Harrigan, J. A., Jacq, X., Martin, N. M., & Jackson, S. P. (2018). Deubiquitylating enzymes and drug discovery: Emerging opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.152>
- Keary, C., Bird, L. M., de Wit, M.-C., Hatti, S., Heimer, G., Heussler, H., Kolevzon, A., Mathews, A., Ochoa-Lubínoff, C., Tan, W.-H., Yan, Y., & Adams, M. (2023). Gaboxadol in angelman syndrome: A double-blind, parallel-group, randomized placebo-controlled phase 3 study. *European Journal of Paediatric Neurology: EJPn: Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 47, 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2023.07.008>
- Kim, D. I., KC, B., Zhu, W., Motamedchaboki, K., Doye, V., & Roux, K. J. (2014). Probing nuclear pore complex architecture with proximity-dependent biotinylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), E2453-E2461. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406459111>
- Kishino, T., Lalande, M., & Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genetics*, 15(1), 70-73. <https://doi.org/10.1038/ng0197-70>
- Komander, D., Clague, M. J., & Urbé, S. (2009). Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrm2731>
- Lectez, B., Migotti, R., Lee, S. Y., Ramirez, J., Beraza, N., Mansfield, B., Sutherland, J. D., Martinez-Chantar, M. L., Dittmar, G., & Mayor, U. (2014). Ubiquitin profiling in liver using a transgenic mouse with biotinylated ubiquitin. *Journal of Proteome Research*, 13(6), 3016-3026. <https://doi.org/10.1021/pr5001913>
- Margolis, S. S., Sell, G. L., Zbinden, M. A., & Bird, L. M. (2015). Angelman Syndrome. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 12(3), 641-650. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0361-y>
- Mehus, A. A., Anderson, R. H., & Roux, K. J. (2016). BioID Identification of Lamin-Associated Proteins. En *Methods in Enzymology* (Vol. 569, pp. 3-22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.008>
- Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E., & Weissman, A. M. (2014). RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(1), 47-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.026>
- Osinalde, N., Duarri, A., Ramirez, J., Barrio, R., Perez de Nanclares, G., & Mayor, U. (2019). Impaired proteostasis in rare neurological diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 93, 164-177. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.10.007>

- Osinalde, N., Sanchez-Quiles, V., Akimov, V., Guerra, B., Blagoev, B., & Kratchmarova, I. (2015). Simultaneous dissection and comparison of IL -2 and IL -15 signaling pathways by global quantitative phosphoproteomics. *PROTEOMICS*, 15(2-3), 520-531. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400194>
- Ramírez, J., Morales, M., Osinalde, N., Martínez-Padrón, I., Mayor, U., & Ferrús, A. (2021). The ubiquitin ligase Ariadne-1 regulates neurotransmitter release via ubiquitination of NSF. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100408. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100408>
- Roux, K. J. (2013). Marked by association: Techniques for proximity-dependent labeling of proteins in eukaryotic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), 3657-3664. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1287-3>
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M., & Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 801-810. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112098>
- Sala-Gaston, J., Pedrazza, L., Ramirez, J., Martinez-Martinez, A., Rawlins, L. E., Baple, E. L., Crosby, A. H., Mayor, U., Ventura, F., & Rosa, J. L. (2022). HERC2 deficiency activates C-RAF/MKK3/p38 signalling pathway altering the cellular response to oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(11), 548. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04586-7>
- Swatek, K. N., & Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, 26(4), 399-422. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.39>
- Trulsson, F., Akimov, V., Robu, M., van Overbeek, N., Berrocal, D. A. P., Shah, R. G., Cox, J., Shah, G. M., Blagoev, B., & Vertegaal, A. C. O. (2022). Deubiquitinating enzymes and the proteasome regulate preferential sets of ubiquitin substrates. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30376-7>
- Tsagkaris, C., Papakosta, V., Miranda, A. V., Zacharopoulou, L., Danilchenko, V., Matiasova, L., & Dhar, A. (2020). Gene Therapy for Angelman Syndrome: Contemporary Approaches and Future Endeavors. *Current Gene Therapy*, 19(6), 359-366. <https://doi.org/10.2174/1566523220666200107151025>
- Williams, C. A., Driscoll, D. J., & Dagli, A. I. (2010). Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 12(7), 385-395. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181def138>
- Yang, L., Shu, X., Mao, S., Wang, Y., Du, X., & Zou, C. (2021). Genotype–Phenotype Correlations in Angelman Syndrome. *Genes*, 12(7), 987. <https://doi.org/10.3390/genes12070987>

7. Eskerrak

Lan hau posiblea izan da Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) ikertzaileen prestakuntzarako kontratatzeko bekari esker.