



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

**NEDD4 eta UBE3Aren arteko
elkarrekintzaren azterketa
Angelman sindromearen
testuinguruan**

*Ainhoa Atxa , Natalia Presa,
Juanma Ramirez, Irene Echezarreta,
Erik P. Barrio eta Ugo Mayor*

217-224 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.26>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintzaren azterketa Angelman sindromearen testuinguruan

Ainhua Atxa¹, Natalia Presa¹, Juanma Ramirez¹, Irene Echezarreta¹, Erik P. Barrio^{1,2}, Ugo Mayor^{1,3}.

1. *Biokimika eta Biologia Molekularreko Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Leioa.*
2. *Biokimika eta Biologia Molekularreko Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU, 48940 Vitoria-Gasteiz.*
3. *Ikerbasque, Basque Foundation for Science, 48013.*
Kontakturako e-posta: ainhoa.atxa@ehu.eus

Laburpena

Angelman sindromea (AS) neurogarapen nahasmendu konplexu eta larria da, garunean UBE3A E3 ubikitina-proteina ligasaren funtzioaren galeraren ondorioz sortzen dena. UBE3Aren substratuen identitate eta ubikitinazio patroiak ezagutzea beharrezkoa da AS hobeto ulertu eta estrategia terapeutiko berriak bilatze aldera. EAAT2 substratu potentzialaren balioztatzean lorturiko emaitzak NEDD4 eta UBE3Aren arteko erlazioa ikertuz azal daitezkeelakoan, eta honek AS hobeto ulertzen lagun dezakeelakoan, ikerketa lan honen helburua NEDD4 UBE3Aren interaktore eta substratu gisa HEK293T giza zeluletan balioztatzea da. NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintza azaltzea lortu ez den arren, lortutako emaitzek ikerketarekin jarraitzeko beharra erakusten dute.

Hitz gakoak: Angelman sindromea, ubikitinazioa, UBE3A, NEDD4, GFP pull-down.

Abstract

Angelman syndrome (AS) is a complex and severe neurodevelopmental disorder that results from the loss of UBE3A E3 ubiquitin-protein ligase function in the brain. Knowing the identity and ubiquitination patterns of UBE3A substrates is necessary for a better understanding of AS and the search for new therapeutic strategies. With the expectation that the results obtained in the validation of the potential substrate EAAT2 can be explained by investigating the relationship between NEDD4 and UBE3A, and these results may contribute to a better understanding of AS, the aim of this work is to validate NEDD4 as an interactor and substrate of UBE3A in human HEK293T cells. Although it has not been possible to explain the interaction between NEDD4 and UBE3A, there are sufficient results to continue the study.

Keywords: Angelman syndrome, ubiquitination, UBE3A, NEDD4, GFP pull-down.

1. Sarrera eta motibazioa

Angelman sindromea (AS) gutxi gorabehera 15.000 jaioberrietatik bakarrari eragiten dion neurogarapen nahasmendu larri eta bakana da (Sell & Margolis, 2015). Sindromea pairatzen dituzten sintomen artean adimenaren garapenaren atzerapena, hitz egiteko zein elikatzeko zailtasunak, epilepsia krisiak, hipotonia muskularra, eta mugimendu ataxikoak aurki daitezke. Horrez gain, etengabeko irribarrea sindrome honen ezaugarri bereizgarriena da (Buiting et al., 2016). Diagnostikoa test genetiko bidez egiten da, eta jaio aurretik burutzeko aukera dagoen arren, oro har, sindromea normalean urte bat edo bi dituzten haurretan diagnostikatzen da, sintomak urtebetetik aurrera azaltzen baitira (Beygo et al., 2019; Sell & Margolis, 2015).

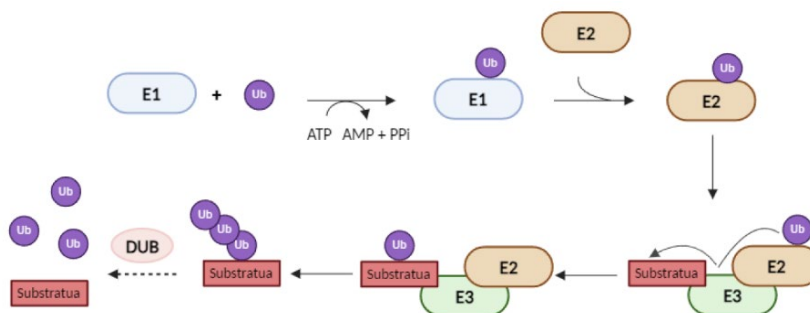
Genetikari dagokionez, AS garunean *Ubiquitin protein ligase E3 (UBE3A)* genearen funtzio galerak sortarazten du. 15q11-q13 eskualde kromosomikoan kokatzen den genea da *UBE3A*, eta ehun periferikoetan bialelikoki adierazten den arren, haren adierazpen neuronala inpronta genetikoaren menpe dago. Honen ondorioz, garunean alelo amatiarra soilik adierazten da (Copping et al., 2021). Kromosoma amatiarraren 15q11-q13 eskualdean geratzen diren 5-7 megabase-ko *de novo* delezioak dira UBE3Aren funtzio gabeziaren erantzule nagusia (%70-80). Hala ere, mutazio intragenikoek (%10-20), disomia aitatiar uniparentalak (%3-5), zein inpronta akatsek (%3-5) ere, AS eragin dezakete (L. Yang et al., 2021).

Ugo Mayor doktorearen laborategiak, UBE3A gainadierazten duen sagu modeloan oinarrituriko ikerketa proteomikoan UBE3Aren substratu neuronal potentzialen identifikazioa burutu zuen (Mayor et al., 2023). Substratu potentzialen artean, Excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) aurkitu zen, eta honen eta UBE3Aren arteko erlazioa aztertzean, Neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 4 (NEDD4) inplikaturik egon litekeela ondorioztatu zen (Echezarreta, 2024). Hau honela, EAAT2 substratu potentzialak ASn izan dezakeen papera ondo ulertzeko NEDD4 eta UBE3Aren arteko erlazioa aztertzea beharrezkoa da.

1.1 Ubikitinazioa eta UBE3A

UBE3A geneak, ubikitinazio deituriko bidezidorrean jarduten duen E3 ubikitina ligasa proteina familiako UBE3A ligasa kodetzen du (Scheffner et al., 1993). Ubikitinazioa 76 aminoazidoetako ubikitina proteina (Ub) itu substratu bati lotura kobalenteen bitartez erantzten datzan itzulpen osteko eraldaketa da, eukarioten artean oso kontserbaturik dagoena (Zheng & Shabek, 2017). Orokorrean, Ub lotura isopeptidiko bidez kanonikoki lisina hondarraren ϵ -amino taldeari batzen zaio. Gainera, ubikitinazioa Ub molekula bakar batez (monoubikitinazioa) edo hainbat Ub molekulaz (multi-monoubikitinazioa) eman daiteke. Horrez gain, ubikitina berak dituen 7 lisina eta N-terminaleko metionina bidez ubikitina kateak osa daitezke (poliubikitinazioa) (Elu et al., 2019). Ubikitinazio prozesuan entzima ubikitina-aktibatzaileak (E1) ATP menpeko erreakzio bidez ubikitinarekin tioester lotura ezartzen du, hau aktibatuz. Entzima ubikitina-konjugatzaileak (E2) ubikitina aktibatua onartu eta ubikitina-proteina ligasara (E3) transferitzen du, energia altuko tioester lotura ezarriz. Azkenik, Ub aktibatua itu substratura erantzten da E3 entzimaren laguntzaz (**1. Irudia**). Ubikitinazioa prozesu itzulgarria da, loturaren hidrolisia desubikitinasa (DUB) bidez ematen da (Ambrozkiwicz et al., 2020). Ubikitinazioak prozesu zelular ugariaren erregulazioan paper garrantzitsua du, funtzio ezagunena proteosoma bidezko degradazioa den arren (Komander & Rape, 2012), hainbat prozesu ez-proteolitiko ere burutzen ditu (Guo et al., 2023).

1. Irudia: Ubikitinazio bidezidorra.



UBE3A HECT (Homologous to E6-AP C-terminus) azpitaldeko E3 ubikitina ligasa da. Talde honetako ligasek ubikitina hartzaile zuzen gisa jokatzeko dute. Izan ere, berain C-terminaleko zisteina hondarrera lotzen dute Ub, eta bertatik transferitzen diote Ub substratuari (Komander & Rape, 2012). UBE3Ak ubikitina ligasa gisa duen aktibitatea ezaguna izan arren, UBE3Aren funtzio galerak dakartzan eta AS eragiten duten mekanismo molekularrak ikertzeke daude (Copping et al., 2021). Gaur egun ASk ez du tratamendu espezifikorik eta estrategia terapeutikoak sintomak leuntzean datza (Buiting et al., 2016). Hau honela, UBE3Aren substratu eta interaktore neuronalen identitatea zein ubikitinazio patroiak ezagutzea beharrezkoa litzateke ASren eragile diren akats neuronalen jatorria ulertu eta estrategia terapeutiko egoki bat garatze aldera.

1.2 EAAT2 eta NEDD4

EAAT2 arraidura sinaptikotik glutamatoa garbitzeaz arduratzen diren mintz garraiatzaile aktibo sekundarioen taldearen barne dago (Todd & Hardingham, 2020). Garraiatzaile hauek, glutamatoa hiru Na^+ eta H^+ ioi bakar baten kogarraioaz gradientearen aurka garraitzen dute, aurkako noranzkoan K^+ ioi bat garraiatzen delarik (Malik & Willnow, 2019). 62 kDa-eko proteina hau, zerebeloan eta erretinako astroglian ez ezik, garuneko gainerako eskualdeetan ere

glutamatoaren garraiatzaile nagusia da (Todd & Hardingham, 2020). Glutamatoa garuneko neurotransmisore kitzikatzailer nagusia den arren, honen gehiegizko isuriak neuronentzat toxikoa den hiperkitzikakortasuna eragin dezake, neuronak kaltetu eta hauen heriotza bideratuz (Pavic et al., 2019). EAAT2-ren jardura egokia nahitaezkoa da hartzaile postsinaptikoek glutamatoarekiko duten eskuragarritasuna erregulatu eta glutamatoa arraildura sinaptikotik kanpo hedatzea saihesteko (Rose et al., 2018). Gure laborategiko eta kolaboratzaileen emaitzek, EAAT2 UBE3Aren substratu zuzena izan beharrean, bere ubikitinazioa NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintzaren ondoriozkoa izan daitekeela iradokitzen dute (argitaratu gabeko emaitzak).

NEDD4 HECT domeinudun E3 ubikitina ligasa familiako partaide da eta eukariotetan kontserbaturik dago. C-terminalean katalitikoki aktiboa den HECT domeinuaz, N-terminalean kaltzio/lipido-lotura domeinuaz (C2 domeinua), eta zelulen lokalizazioaren eta substratuaren identifikazioaren ardura duten lau WW domeinuaz (substratuen PPxY motiboa ezagutzen du) osatzen da (Y. Yang et al., 2020). Bere substratuen degradazio proteasomikoaren bidez hainbat prozesu biologikotan parte hartzen du, eta gizakion hainbat gaixotasunekin erlazionaturik dagoela dioten geroz eta ebidentzia gehiago dago, gaixotasun neurologikoak barne (Wang et al., 2020).

1.3 GFP pull-down estrategia

Nahiz eta zeluletan funtsezko prozesua den, baldintza fisiologikoetan proteinen %1-5 artean soilik dago ubikitinatuta; hortaz, ubikitinazioa espermentalki aztertzea ez da lan erraza. GFP markaketan oinarrituriko isolamendu estrategiaz baliatuz, frakzio ubikitinatua aberats daiteke (Elu et al., 2020). Purifikatu nahi den substratuari proteina fluoreszente berdea (Green Fluorescent Protein, GFP) lotu ostean, GFP proteina espezifikoari ezagutzen duten GFP agarosa bihiak erabil daitezke proteinaren erauzketarako. GFP proteinaren eta bihiaren arteko lotura indartsuaz baliatuz, garbiketa baldintza oso zorrotzak aplikatu daitezke, proteina inespezifikoak baztertuz. Ubikitina bere substratuarekin lotura isopeptidiko kobalentez loturik egonez, GFPekin markaturiko itu proteinarekin batera bere frakzio ubikitinatua purifikatu daiteke. Western plapaketa bidez eraldatu gabeko proteina zein bere frakzio ubikitinatua erraz aztertu ahal izateko, zelulek GFPri loturiko intereseko proteina adierazteaz gain, ubikitinaren seinalea erraztasun handiagoarekin detektatzeko FLAG etiketa duen ubikitina proteina ere adierazten dute (Lee et al., 2014). Bestalde, E3 ligasa baten adierazpenarekin konbinatzerakoan, substratuaren ubikitinazioa E3 ligasa horren menpe dagoen baieztatu daiteke (Lee, 2014; Elu 2020). Protokoloaren garbiketa baldintzak leunduz gero, intereseko entzimaren interaktoreak identifikatu daitezke (Elu, 2022).

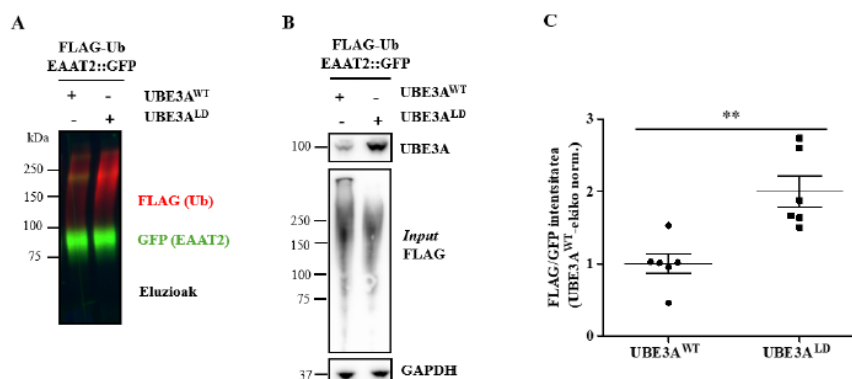
2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

UBE3A ASren eragile nagusi gisa identifikatu zenetik (Kishino et al., 1997) ikerketa ugari burutu dira bere substratuak identifikatzeko helburuz (Martínez-Noël et al., 2018; Ramirez et al., 2018). Aipatu bezala, Ugo Mayor doktorearen laborategiak, UBE3Aren substratu neuronal potentzialen identifikazioa burutu zuen (Mayor et al., 2023). Saguan lorturiko emaitzek ASren ikerkuntzan izan dezaketen ekarpena kontuan hartuz, identifikaturiko proteinak gizakietan UBE3Aren substratuak diren baieztatu izan dira. Identifikaturiko EAAT2 substratu potentziala balioztatzen saiatzean, espero gabeko emaitzak lortu ziren; katalitikoki inaktiboa den UBE3A^{LD} (LD: *ligase dead*) gainadieraztean ubikitinazio handiagoa eman zen katalitikoki aktiboa den UBE3A^{WT} (WT: *wild type*) gainadierazterakoan baino (**2. Irudia**) (Echezarreta, 2024). Emaitza hauek UBE3A EAAT2ren ubikitinazioan zeharka inplikaturik dagoela iradokitzen dute. Alde batetik, jakina da NEDD4k EAAT2 degradaziora bideratzen duela ubikitinazio bidez (Ibáñez et al., 2019; Zheng & Shabek, 2017). Bestalde, kolaboratzaile batzuek GFP *pull-down* entsegu bidez, NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintza behatu dute (oraindik argitaratu gabeko ikerketa). Hau guztia kontutan hartuta, EAAT2 eta UBE3Aren arteko lotura NEDD4 izatea posible da.

Arestian aipatutako emaitzak kontuan izanik, lan honen hipotesia UBE3Ak NEDD4 degradaziora ubikitinatzen duela da, EAAT2ren ubikitinazioa murriztuz. Hau baieztatuz gero, EAAT2rekin lorturiko emaitzak azalduko litzateke, UBE3A^{LD} erabiltzean NEDD4en ubikitinazio baxuagoa emango bailitzake, NEDD4 gutxiago degradatuko litzateke eta ondorioz EAAT2

gehiago ubikitinatuko litzateke. Hau honela, lan honen helburu nagusia NEDD4 eta UBE3Aren arteko erlazioa aztertu eta deskribatzea da, NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintza aztertu eta NEDD4 UBE3Aren substratu bezala balioztatuz.

2. Irudia: EAAT2ren balioztatzea UBE3A ligasaren substratutzat HEK293T zeluletan.



3. Ikerketaren muina

3.1 Plasmidoak eta klonazio prozedura

Ikerketa lanean erabilitako pCMV-hUBE3A^{WT}, pCMV-hUBE3A^{LD}, pCMV-FLAG-Ub, pCMV-EGFP-N1 eta pCMV-NEDD4::EGFP plasmidoak laborategian klonatu dira. Talka termiko bidez DH5 α bakterio kimiokonpetenteetan transformatu dira, hauek petri plaketan erein dira eta 24 ordu pasa ondoren DNA erauzi da. pCMV-NEDD4, pCMV-PSMA5::EGFP eta pCMV-UBE2L3::EGFP berriz Sino Biological konpainiatik lortu dira.

Karboxilo terminalean GFP etiketa daraman giza NEDD4 fusio proteina sortzeko pCMV-NEDD4 plasmidoa hartu da moldetzat, eta genea anplifikatzeko erabilitako hasleak hauek izan dira: aurreranzko 5'-TAAGCAGAATTCATGGCAACTTGCGCGGTGG-3' eta atzeranzko 5'-TGCTTAACCGGTATCAACTCCATCAAAGCC-3'. Digestiorako, EcoR1 eta AgeI errestrikzio entzimak erabili dira. PCR bidez *NEDD4* sekuentziadun plasmidorako kolonia positiboak aukeratu dira. Azkenik, Eurofins Genomics enpresaren zerbitzuari esker plasmidoaren sekuentzia egokia baieztatu da.

3.2 Kultiboak eta transfekzioa

Giza giltzurrun enbrionario zelulak (Human Embryonic Kidney 293T, HEK293T) erabili dira sistema-eredu gisa, plasmidoen transfekziorako duten erreproduzigarritasuna eta efizientzia altuak baitira. Zelulak kultibatzeko GlutaMAXdun Dulbecco-ren Eagle medium/nutrient mixture F-12 medioari (c) (Gibco) %10 behi serum fetala (Gibco) eta penizilina-estreptomizina (100 U/ml) (Invitrogen) osagaiak gehitu zaizkio. Ikerketa osoan zehar zelulak hazteko baldintza estandarrak erabili dira (37 °C eta %5 CO₂), eta zelula lerroa mantentzeko, zelulak 100mm-ko plaketan hazi dira. Prozedura esperimentalak burutzeko berriz, 6 putzutako plaketan 10⁶ zelula 2 ml DMEM/F-12 medioan erein dira. 24 h-ra, zelulen konfluentzia maila %60-80 artekoa dela baieztatu ondoren, *jetPRIME* erreaktiboa (Polyplus-transfection) erabilia zelulen transfekzioa egin da. Intereseko GFP-fusio proteinaren adierazpena behatzeko 1 μ g plasmido transfektatu dira putzu bakoitzean. GFP *pull-down* esperimenturako berriz, guztira 2 μ g plasmido transfektatu dira. Interaktoreak bilatzeko estrategia erabiltzerakoan: 1 μ g NEDD4::GFP eta 1 μ g UBE3A^{WT} edo UBE3A^{LD} plasmido; eta substratuak bilatzeko orduan, 1 μ g NEDD4::GFP, 0,5 μ g FLAG-Ub plasmido eta 0,5 μ g UBE3A^{WT} edo UBE3A^{LD} plasmido. Transfekzioa burutu eta 24 h-ra DMEM/F-12 medio aldaketa egin da, 2 ml berri gehituz, eta 48 h-ra jaso eta fosfato gatz disoluzio indargetzailearekin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) garbitu dira eta -20°C-tan mantendu dira.

3.3 Zelulen lisia eta proteina erauzketa

Interaktoreak bilatzeko estrategian, transfektaturiko zelulen lisirako putzu bakoitzean 200 µl lisi-tanpoi leuna (10 mM Tris/Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 1x Proteasa Inhibitzaile Koktel (*Protease Inhibitor Cocktail*, PIC, Roche Applied Science) eta 50 mM n-etilmaleimida (NEM, Sigma) DUB inhibitzaile) gehitu dira. NEM-en bidez ubikitinaturiko materialaren degradazio eta galera ekiditen dira. Behin lisi-tanpoia gehituta, plakak 30 minutuz izotzetan inkubatu dira. Substratuak bilatzeko estrategian berriz, zelulen lisirako, putzu bakoitzean 500 µl lisi-tanpoi (50 mM Tris/Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %0,5 Tritoi, 1x PIC, Roche Applied Science) eta 50 mM NEM) gehitu dira. Behin lisi-tanpoia gehituta, plakak 20 minutuz giro tenperaturan eta modu leunean astinduz inkubatu dira. Ondoren, bi kasuetan, zelulen lisatua 10 minutuz, 4°C-tan eta 14.000 g-ra zentrifugatu da, gainjalkina eskuratuz.

3.4 GFP pull-down estrategia

Lehenik eta behin, zelulen erauzketako gainjalkinaren 30 µl gorde dira erauzkin gordin (*input*) gisa erabiltzeko, eta 30 µl karga-tanpoi (250 mM Tris-HCl pH 7.5, %40 glizerol, %0,04 bromofenol urdin, %4 SDS eta 100 mM DTT) gehitu zaizkio. Gainerako gainjalkina 25 µl anti-GFP bihiekin (GFP-Trap® Agarose, Chromotek) inkubatu da, bihiak aldeztu aurretik diluzio-tanpoiarekin (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA) 3 aldiz garbituz.

Ondoren, interaktoreak identifikatzeko, lagin bakoitzean 300 µl diluzio-tanpoi PIC eta NEMekin gehituz, lisi-tanpoiaren detergente kontzentrazioa gutxitu eta GFP-substratuaren arteko lotura ez eragozteko lortzen da. Jarrian laginak 60 minutuz inkubatu dira noria batean, 4°C-tan eta 17 rpm-tan. Inkubazioa bukatzean, laginak 2 minutuz 2.700 g-ra eta 4°C-tan zentrifugatu dira. Bihien 3 garbiketatarako 500 µl garbiketa-tanpoi leun (10 mM Tris/Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, %0,05 Nonidet P40 substitute (NP-40)) erabili dira. Bihiak garbituta, laginei 25 µl karga-tanpoi gehitu zaizkie eta 10 minutuaz 95°C-tan inkubatu dira, GFP-substratuaren arteko lotura askatzea lortuz. Azkenik, laginak 14.000 g-ra zentrifugatu dira 2 minutuz, eta gainjalkina eskuratu da eluzio gisa. Horrela *input* eta eluzio laginak -20°C-tan gorde dira.

Protokolo zorrotzean berriz, 450 µl diluzio-tanpoi PIC eta NEM-ekin gehitu dira. Ondoren, laginak 150 minutuz inkubatu dira noria batean, giro tenperaturan eta 17 rpm-tan. Inkubazioa bukatzean, laginak 2 minutuz 2.700 g-ra zentrifugatu dira. Bihien garbiketak hiru soluzio ezberdinen 1 ml erabiliz egin dira: garbiketa bat diluzio-tanpoiaz, hiru garbiketa garbiketa-tanpoiaz (8M urea, %1 SDS PBSn), eta azken bat %1 SDS PBS soluzioa erabiliz. Bihiak garbituta, protokolo leunean jarraituriko pausuak berdin mantendu dira.

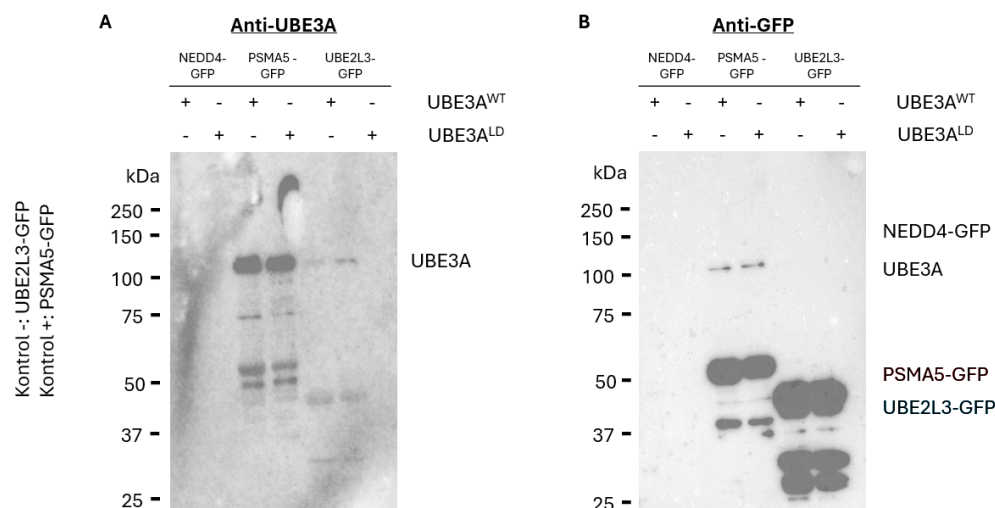
3.5 Western plapaketa

Karga-tanpoiarekin nahasturiko laginak 95°C-tan 5 minutuz inkubatu dira. SDS-PAGEa egiteko, %4-12 Bolt Bis-Tris Plus pre-cast gelak (Invitrogen) erabili dira. NEDD4::GFPri dagokion banda behar bezala ikusteko asmoz, proteinak gutxi gorabehera bi orduz utzi dira gelean migratzen (37-50 kDa markatzailea mugaraino heldu arte), hauen tamainaren ezberdintasuna hobeto ikusi ahal izateko. Proteinak PVDF-zko mintzera transferitu dira iBLOT™ sistema (Invitrogen) bidezko transferentzia lehorren bitartez. Mintzak ordubetez %5 esne hautsa PBS %0,1 Tween (PBS-T) blokeatu ondoren, antigorputz primarioekin inkubatu dira. Sagu anti-UBE3A monoklonala (Sigma-Aldrich) eta sagu anti-Flag-HRP monoklonala (Sigma-Aldrich) antigorputz primarioak 1:1000 kontzentrazioan eta %2,5 esne hautsa PBS-T soluzioan erabili dira. Sagu anti-GFP monoklonala (Roche) berriz 1:500 kontzentrazioan erabili da. Inkubazioari dagokionez, anti-Flag ordubetez giro tenperaturan inkubatu da, eta gainontzekoak gau osoz 4°C-tan. Antigorputz sekundarioa, ahuntz anti-sagu-HRP (Thermo Scientific) 1:4000 kontzentrazioan eta %2,5 esne hautsa PBST-T soluzioan eta ordubetez giro tenperaturan inkubatu da. Kimiolumineszentzia igortzeko Clarity™ Western Ecl edo SuperSignal™ West Femto kit-ak (Bio-Rad) eta seinaleak behatzeko ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) erabili dira.

3.6 NEDD4 eta UBE3A-ren elkarrekintza

NEDD4 proteinak HEK293T zeluletan adierazpen egokia duela frogatu ondoren, UBE3A^{WT} eta UBE3A^{LD} egoeren artean haren presentzia aztertu da. Horretarako anti-UBE3A eta anti-GFP antigorputzak erabili dira. Kontrol positibo gisa, PSMA5 erabili da, ezaguna den UBE3Aren interaktore bat; kontrol negatibo gisa berriz, UBE2L3a erabili da, interaktorea ez den proteina. NEDD4::GFP proteina GFP *pull-down* bidez isolatu ondoren, eluzio frakzioan (**3A Irudia**) UBE3Aekin bat egiten duen 100 kDa inguruko banda ikus daiteke PSMA5 eta UBE2L3ren kasuetan, ez, aldiz, NEDD4 laginean. GFPri dagokionez berriz, PSMA5::GFP eta UBE2L3::GFP plasmidoen bandak behatzen dira, baina NEDD4::GFP banda berriz ez da aurkitzen (**3B Irudia**).

3. Irudia: NEDD4ren balioztatzea UBE3A ligasaren interaktoretzat HEK293T zeluletan.

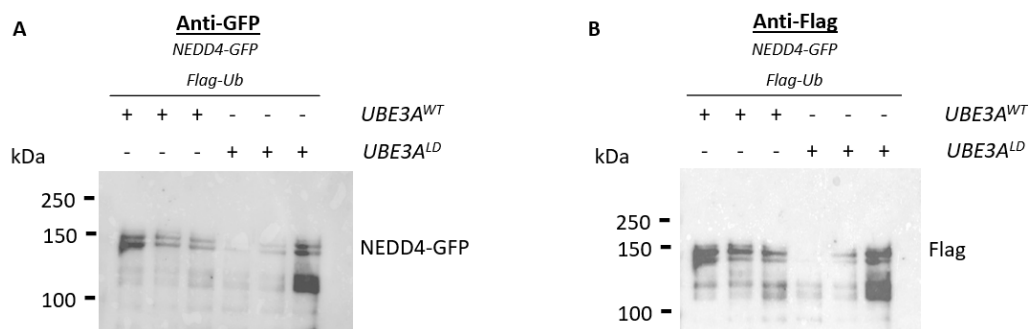


Proteina baten ubiquitinazioa, bi proteinen arteko elkarrekintza baino prozesu egonkorragoa da, eta ondorioz, ubiquitinazioa detektatzea elkarrekintza detektatzea baino errazago izan daiteke. Hau honela, NEDD4 eta UBE3Aren arteko elkarrekintza balioztatu ez den arren, NEDD4 UBE3Aren substratu gisa balioztatzen saiatu da, hau da, NEDD4ren ubiquitinazioa detektatzen.

3.7 NEDD4 UBE3A-ren substratu gisa balioztatzea

HEK293T zeluletan UBE3A^{WT} eta UBE3A^{LD} egoeren artean NEDD4en ubiquitinazio maila aztertu da. NEDD4::GFP proteina GFP *pull-down* bidez isolatu ondoren, bi antigorputzen kasuan, 150 kDa inguruan hiru banda ikus daitezke (**4. Irudia**). Anti-GFPren kasuan (**4A Irudia**), banda biziena 150 kDa azpitik dagoena da, NEDD4::GFP plasmidoari dagokiona. Anti-Flagen kasuan berriz (**4B Irudia**), NEDD4::GFP monoubikitinaturari dagokion banda, ubiquitinatu gabeko NEDD4::GFP eta poliubikitinaturikoaren artekoa.

4. Irudia: NEDD4ren balioztatzea UBE3A ligasaren substratutzat HEK293T zeluletan, NEDD4-GFPren adierazpena eta detekzioa errazten.



Emaitza hauen arabera, esan daiteke, behetik hasita, ubiquitinatu gabeko NEDD4::GFP, monoubikitinaturiko NEDD4::GFP eta ubiquitina gutxi dituen arren, bat baino gehiagodun

(poliubikitinaturiko) NEDD4::GFP ikus daitezkeela bi antigorputzekin. Hau da, baliteke ubikitinaturiko proteina kantitatea altua izatea, eta ondorioz, anti-GFP erabiltzean, ubikitinaturiko proteinen GFPa ere detektatzea. Erreplikak guztiz berdinak ez diren arren, hirutik bi laginetan UBE3A^{LD}a erabiltzean NEDD4en ubikitinazio baxuagoa ematen da UBE3A^{WT}a erabiltzean baino.

4. Ondorioak

Lortutako emaitzak erreparatuz, ezin izan da UBE3A eta NEDD4en arteko erlazioa argitu. Izan ere, ez da UBE3A eta NEDD4en arteko elkarrekintza baieztatu, ezta NEDD4 UBE3Aren substratu gisa baieztatu ere ez. Hau honela, laborategian aurretik lorturiko emaitzak ezin izan dira azaldu. Hala ere, NEDD4 UBE3Aren substratu gisa balioztatzean lortutako emaitzek erlazio hau ikertzen jarraitu behar dela iradokitzen dute, errepikakortasuna guztizkoa ez den arren, UBE3A^{LD} erabiltzean NEDD4en ubikitinazio gutxiago ematen baita, NEDD4 UBE3Aren substratu dela iradokiz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

NEDD4 eta UBE3Aren arteko erlazioa ikertzen jarraitu beharra dago. Bibliografiaren arabera elkarrekintza egon badago, eta hau deskribatu eta ulertzeak ASren ulertze prozesuan eragina esan dezake. NEDD4 UBE3Aren substratu gisa balioztatzean erabilitako baldintzak mantenduz, esperimientua lagin gehiagorekin errepikatzea pentsatu da, baita EAAT2 NEDD4ren substratu gisa balioztatzea ere. Balioztatze hauek positibo izateak, EAAT2ren ubikitinazioan UBE3Ak duen eragina aztertu eta AS ulertzeko beste pausu bat ematea ahalbideratuko luke.

6. Erreferentziak

- Ambrozkiwicz, M. C., Cuthill, K. J., Harnett, D., Kawabe, H., & Tarabykin, V. (2020). Molecular Evolution, Neurodevelopmental Roles and Clinical Significance of HECT-Type UBE3 E3 Ubiquitin Ligases. *Cells*, 9(11), 2455. <https://doi.org/10.3390/CELLS9112455>
- Beygo, J., Buiting, K., Ramsden, S. C., Ellis, R., Clayton-Smith, J., & Kanber, D. (2019). Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *European journal of human genetics : EJHG*, 27(9), 1326–1340. <https://doi.org/10.1038/S41431-019-0435-0>
- Buiting, K., Williams, C., & Horsthemke, B. (2016). Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. *Nature reviews. Neurology*, 12(10), 584–593. <https://doi.org/10.1038/NRNEUROL.2016.133>
- Copping, N. A., McTighe, S. M., Fink, K. D., & Silverman, J. L. (2021). Emerging Gene and Small Molecule Therapies for the Neurodevelopmental Disorder Angelman Syndrome. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(3), 1535–1547. <https://doi.org/10.1007/S13311-021-01082-X>
- Echezarreta, I. (2024). UBE3A entzimaren substratu potentzialak diren EAAT1 eta EAAT2ren balioztatzea Angelman sindromearen testuinguruan. UPV/EHU.
- Elu, N. (2022). Elucidating Angelman syndromes'ss molecular mechanisms by identifying the substrates, interactors and counteracting DUBs of UBE3A. In *Elucidating Angelman syndromes'ss molecular mechanisms by identifying the substrates, interactors and counteracting DUBs of UBE3A*.
- Elu, N., Lectez, B., Ramirez, J., Osinalde, N., & Mayor, U. (2020). Mass Spectrometry-Based Characterization of Ub- and UbL-Modified Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2051, 265–276. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9744-2_11
- 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(MAY). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.00534>
- Guo, H. J., Rahimi, N., & Tadi, P. (2023). Biochemistry, Ubiquitination. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556052/>
- Ibáñez, I., Bartolomé-Martín, D., Piniella, D., Giménez, C., & Zafra, F. (2019). Activity dependent internalization of the glutamate transporter GLT-1 requires calcium entry through the NCX sodium/calcium exchanger. *Neurochemistry international*, 123, 125–132. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2018.03.012>
- 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., & Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry*, 81, 203–229. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060310-170328>

- Lee, S. Y., Ramirez, J., Franco, M., Lectez, B., Gonzalez, M., Barrio, R., & Mayor, U. (2014). Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(14), 2747–2758. <https://doi.org/10.1007/S00018-013-1526-7>
- Malik, A. R., & Willnow, T. E. (2019). Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/IJMS20225671>
- Martínez-Noël, G., Luck, K., Kühnle, S., Desbuleux, A., Szajner, P., Galligan, J. T., Rodriguez, D., Zheng, L., Boyland, K., Leclerc, F., Zhong, Q., Hill, D. E., Vidal, M., & Howley, P. M. (2018). Network Analysis of UBE3A/E6AP-Associated Proteins Provides Connections to Several Distinct Cellular Processes. *Journal of molecular biology*, 430(7), 1024–1050. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2018.01.021>
- Mayor, U., Alduntzin, U., Lectez, B., Presa, N., Osinalde, N., Fernandez, M., Elu, N., Ramirez, J., Garcia-Barcena, C., Aloria, K., Frick, A., & Peñagarikano, O. (2023). Angelman Syndrome causing UBE3A ligase displays predominantly synaptic ubiquitination activity in the mouse brain. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2665803/V1>
- Pavic, A., Holmes, A. O. M., Postis, V. L. G., & Goldman, A. (2019). Glutamate transporters: a broad review of the most recent archaeal and human structures. *Biochemical Society transactions*, 47(4), 1197–1207. <https://doi.org/10.1042/BST20190316>
- Ramirez, J., Lectez, B., Osinalde, N., Sivá, M., Elu, N., Aloria, K., Procházková, M., Perez, C., Martínez-Hernández, J., Barrio, R., Šašková, K. G., Arizmendi, J. M., & Mayor, U. (2018). Quantitative proteomics reveals neuronal ubiquitination of Rng/Ddi1 and several proteasomal subunits by Ube3a, accounting for the complexity of Angelman syndrome. *Human molecular genetics*, 27(11), 1955–1971. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDY103>
- Rose, C. R., Ziemens, D., Untiet, V., & Fahlke, C. (2018). Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain research bulletin*, 136, 3–16. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2016.12.013>
- Scheffner, M., Huijbregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75(3), 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
- Sell, G. L., & Margolis, S. S. (2015). From UBE3A to Angelman syndrome: a substrate perspective. *Frontiers in neuroscience*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00322>
- Todd, A. C., & Hardingham, G. E. (2020). The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 1–32. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249607>
- Wang, Z. wei, Hu, X., Ye, M., Lin, M., Chu, M., & Shen, X. (2020). NEDD4 E3 ligase: Functions and mechanism in human cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 67, 92–101. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2020.03.006>
- Yang, L., Shu, X., Mao, S., Wang, Y., Du, X., & Zou, C. (2021). Genotype-Phenotype Correlations in Angelman Syndrome. *Genes*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/GENES12070987>
- Yang, Y., Luo, M., Zhang, K., Zhang, J., Gao, T., Connell, D. O., Yao, F., Mu, C., Cai, B., Shang, Y., & Chen, W. (2020). Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma. *Nature Communications*, 11(1), 433. <https://doi.org/10.1038/S41467-020-14324-X>
- Zheng, N., & Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annual review of biochemistry*, 86, 129–157. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060815-014922>

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa lan hau 2024an Irene Echezarreta Mendicute-k egindako Gradu Amaierako Lanaren jarraipena da, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Biokimika eta Biologia Molekularreko Sailean, Ugo Mayor doktorearen Neuronal Ubiquitin Pathways ikerketa taldean. Lan hau posible izan da Eusko Jaurlaritzaren 2024-2025 ikasturtean doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko Doktoratu Aurreko Programako laguntzari esker egin da. Bestalde, lan honek Eusko Jaurlaritzaren (IT1473-22) eta Espainiako Ministerioaren (PID2020-117333GB-I00) diru-laguntzak jaso ditu.