



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

### III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29  
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

#### OSASUN ZIENTZIAK

**USP9X: Angelman sindromearen  
tratamendurako itur berria ote?**

*Nagore Elu, Juanma Ramirez,  
Benoit Lectez, Nerea Osinalde eta  
Ugo Mayor*

63-69 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.08>



## USP9X: Angelman sindromearen tratamendurako iturria ote?

Elu, Nagore<sup>1</sup>; Ramirez, Juanma<sup>1</sup>; Lectez, Benoit<sup>1</sup>; Osinalde, Nerea<sup>2</sup> eta Mayor, Ugo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea,  
Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU*

<sup>2</sup>*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea,  
Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU*

<sup>3</sup>*Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo, Bizkaia  
nagore.elu@ehu.eus*

### Laburpena

UBE3A proteinaren gabeziak Angelman sindromea sortarazten du. Proteina honek zelulako beste proteina batzuk ubikuitinatzen ditu, beraien funtzioa erregulatuz. Hortaz, UBE3A falta denean, bere substratuak –DDI1 kasu– gutxiago ubikuitinatuko dira, ondorio larriak ekarriz. Horrez gain, deubikuitinasa deritzen proteinek substratuen ubikuitina kentzean, egoera larrizten da. Lan honetan DDI1 substratua deubikuitinatzen duen proteinetako bat –USP9X– identifikatu dugu eta diana terapeutiko gisa aurkeztu dugu, berau inhibitzeak DDI1 proteinaren ubikuitinazioa emendatu eta gaixotasunaren eredu diren eulien sintomatologia hobetzen baitu.

Hitz gakoak: Angelman sindromea, UBE3A proteina, ubikuitina, deubikuitinasa, farmakoa.

### Abstract

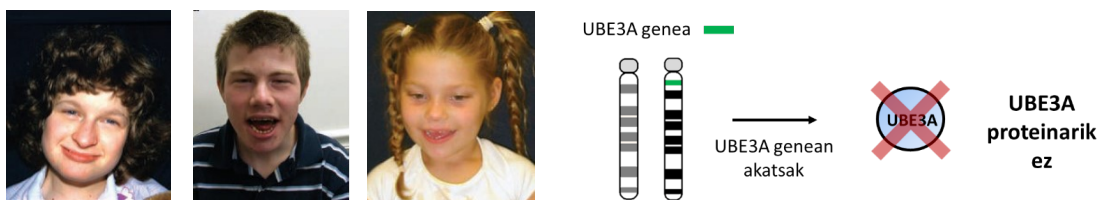
*Lack of UBE3A protein causes Angelman syndrome. This protein is in charge of ubiquitinating other proteins in the cell. Therefore, when there is lack of UBE3A, its substrates – such as DDI1 – will be less ubiquitinated, negatively affecting cell equilibrium. Moreover, proteins named deubiquitinases remove ubiquitin from the substrates, making the scenario even worse. In this work we have identified one of the proteins – USP9X – that deubiquitinates DDI1 and presented it as a therapeutic target, since its inhibition enhances DDI1 ubiquitination and improves the climbing ability of Angelman syndrome model flies.*

*Keywords: Angelman syndrome, UBE3A protein, ubiquitin, deubiquitinase, drug.*

## 1. Sarrera eta motibazioa

Gure genoma errezeta liburu bat bezalakoa da, eta zelula, berriz, sukaldaria, izan ere, genoman dagoen informazioa erabiltzen du bere langileak izango diren proteinak sortzeko. Genoman milaka gene edo errezeta ditugu, eta gene horietako bakoitzak proteina bat ekoizteko informazioa dauka. Proteina guztiek funtzio konkretu bat dute zelularen barruan. Hortaz, errezeta liburuko orriak falta badira –delezioak– edo testuan akatsak badaude –mutazioak–, litekeena da proteinarik ez sortzea edo sortuz gero, akastuna izatea. Edozein kasutan, proteinak ez du zelulan dagokion funtzioa burutuko, eta horrek maiz ondorio larriak eragiten ditu. Hain zuzen ere, hori da Angelman sindromean (AS) gertatzen dena. Burmuinean UBE3A deritzon genearen galeraren edo mutazioaren ondorioz, gene horrek kodetzen duen UBE3A proteina ez da sortzen edo akastuna da, eta horrek burmuineko funtzioetan asaldurak sortzen ditu (Kishino et al., 1997) (**1. irudia**). AS pairatzen duten banakoen ezaugarri bereizgarrienak adimen urritasuna, orekaren asaldura, hitz egiteko zailtasunak eta etengabeko irribarrea dira (Buiting et al., 2016).

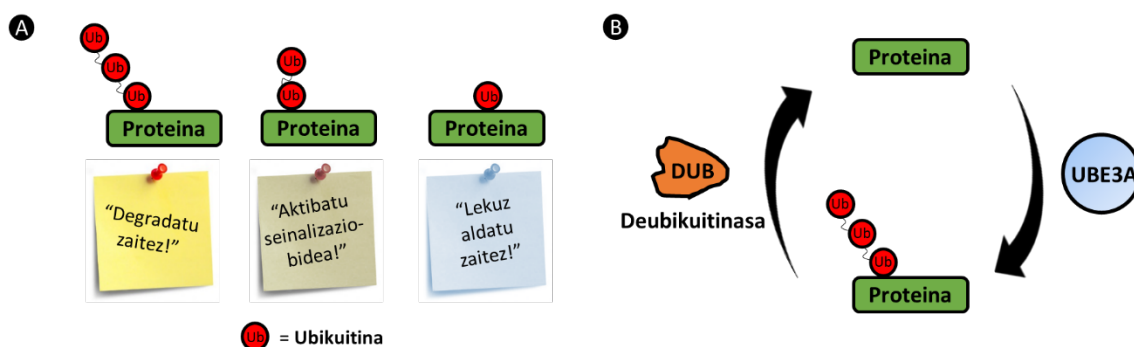
**1.irudia.** Angelman sindromea duten hiru pertsona, hain esanguratsua duten irribarrearekin. UBE3A genean mutazioak edo akatsak daudenean ez da UBE3A proteinarik sortzen, sindromea garatuz.



Baina, nola da posible proteina bakar baten faltak burmuinean horrelako eragin latza izatea? Galdera horri erantzuteko lehendabizi UBE3A proteinak zer egiten duen argitu behar da. Aurrez aipatu bezala, proteinak zelulako langileak dira, eta bakoitzak funtzio konkretu bat burutzen du. UBE3A proteina zelulako agintarietako bat da, izan ere beste proteina batzuei zein funtzio bete behar duten adierazteaz arduratzen da. Eta nola egiten du hori? Bada, proteinei *post-it* gisa funtzionatzen duen molekula bat gehituz, hots, ubikuitina gehituz. Proteina bati itsatsitako ubikuitina kantitatearen, eta horiek proteinara lotzeko moduaren arabera, proteinak jasoko duen agindua desberdina izango da (Swatek and Komander, 2016) (**2a. irudia**). Alabaina, ubikuitina bidez eman daitezkeen aginduak asko dira. Oraintsu frogatu da ubikuitinazioak proteina bat degradatu egin behar dela adierazteaz gain (Glickman and Ciechanover, 2002), zelulan lekuz aldatu behar dela (Wang et al., 2018), edo zelulako beste prozesu batzuk aktibatu behar direla (Dynek et al., 2010) esateko ere balio duela (**2b. irudia**). Hortaz, UBE3A proteina zelulako proteina ezberdinak ubikuitinatzeaz arduratzen dela jakinik, logikoa da pentsatzea bere gabeziaren ondorioz, proteina horiek agintaririk gabe gelditzen direnez zelularen oreka hautsi egiten dela.

Ildo beretik, zelulan badira UBE3A proteinaren aurkako funtzioa burutzen duten proteinak, hots, proteinei ubikuitina *post-it*-a kentzeaz arduratzen direnak. Deubikuitinasa (DUB) izenez ezagutzen dira proteina horiek (Amerik and Hochstrasser, 2004). Hortaz, baldintza osasuntsuetan, UBE3Ak eta DUBek gidatutako proteinen ubikuitinazioa eta deubikuitinazioa, hurrenez hurren, oso estuki erregulatutako prozesuak dira (**2b. irudia**).

**2. irudia.** (A) Ubikuitina bidezko mezua desberdina izan daiteke ubikuitinak lotzeko moduaren arabera. (B) Proteinaren ubikuitinazioaz arduratzen da UBE3A proteina, aldiz, alderantziz jarduten dute deubikuitinasek, ubikuitina hori gehiago behar ez denean proteinetatik kenduz.



Arestian aipatu bezala, Angelman sindromea UBE3A proteinaren faltagatik sortzen da, hortaz gaixotasuna sakon ulertzeko ezinbestekoa da ezagutzea zeintzuk diren gabezia horren ondorioz neuronetan agintaririk gabe, hots, ubikuitinatu gabe, gelditzen diren proteinak. Oraintsu ezagutu ditugu proteina horietako batzuk, eta horien artean dago DDI1 deituriko proteina (Ramirez et al., 2018).

DDI1 zelulako garbitzailea da, izan ere degradatu behar diren proteinak birziklapen-fabrikara, hau da, proteasomara, eramaten ditu (Glickman and Ciechanover, 2002). Hortaz, bistakoa da UBE3Aren gabeziaren ondorioz DDI1 proteinaren jardura ez bada egokia, zelularen birziklapen-prozesua kaltetu daitekeela. Alabaina, oraindik ez da ezagutzen UBE3A proteinak DDI1 proteina ubikuitina bidez markatzean ematen dion agindua zein den, ezta markaketa hori kentzeaz arduratzen den deubikuitinasa zein den ere.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

UBE3A proteina akastuna denean edo ekoizten ez denean, hots, AS pairatzen dutenen kasuan gertatzen den bezala, DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila behar baino baxuagoa izatea

aurreikusten da. Horrez gain, deubikuitinasek DDI1 proteinak duen ubikuitinazio gutxi hori kentzen badute, egoera are larriagoa izango da. Beraz, DUB horiek inaktibatuz DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila egokia berreskuratzea lortuko balitz, gaixotasunaren sintomatologia hobetuko litzatekeelakoan gaude. Hori kontuan izanda, gure ikerkuntzan hiru helburu ditugu:

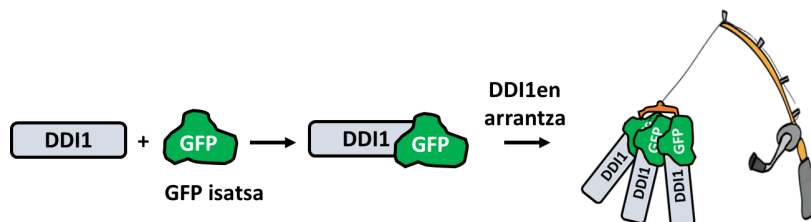
- 1) UBE3A proteinak DDI1 proteinan jarritako ubikuitina kentzeaz arduratzen den deubikuitinasa **identifikatzea**.
- 2) Deubikuitinasa hori **inhibitzen** duen farmako bat erabiliz, DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila berreskuratzen denentz aztertzea.
- 3) DUBa inhibitzen duen farmakoa erabiliz, Angelman sindromearen eredu diren eulien **sintomatologia aztertzea**.

### 3. Ikerketaren muina

#### 1) DDI1 proteinari ubikuitina kentzeaz arduratzen den DUBaren identifikazioa

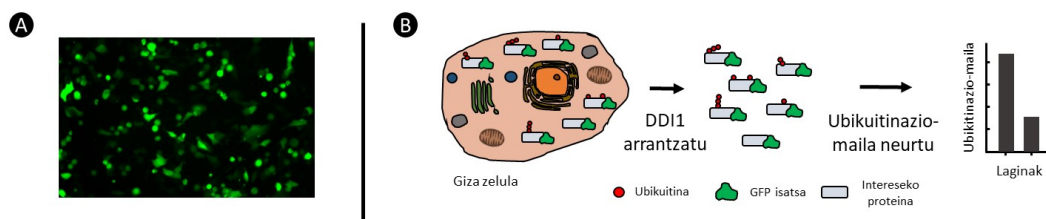
Proteinen ubikuitinazioa laborategian aztertzeko prozesu nahiko konplexua da, izan ere, ubikuitinatzen diren proteinak populazioaren gutxiengoa (%1-5) dira. Beraz, proteina konkretu baten ubikuitinazio-maila aztertu nahi bada, nahitaez proteina konkretu hori arrantzatu beharra dago ondoren sakon aztertu ahal izateko. Kasu honetan DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila neurtu nahi dugu, berau deubikuitinatzeaz arduratzen den DUBa identifikatzeko. Hortaz, DDI1 arrantzatu behar dugu. Baina nola? Bada, DDI1 proteinari GFP (*Green Fluorescent Protein*) isatsa gehituaz, eta ondoren GFParekin lotzen den amua daukan kanbera erabiliz (**3. irudia**).

**3. irudia.** DDI1 proteinari fluoreszentea den proteina bat (GFP) itsasten zaio, horren aurkako “amurekin” zelulako proteina guztien artean arrantzatu ahal izateko eta ubikuitinazio-maila neurtzeko.



Batetik, DDI1-GFP proteina fluoreszentea denez, fluoreszentsiazko mikroskopioarekin beha daiteke bere kokapena eta adierazpen-maila ezagutzeko (**4.1 irudia**). Bestetik, eta guretzako interesgarriagoa dena, isats hori harrapatzen duen “amua” daukagunez, DDI1 proteina arrantzatu dezakegu, eta ubikuitina ezagutzen duten antigorputzak erabiliz, bere ubikuitinazio-maila neurtu dezakegu (**4.2 irudia**).

**4. irudia. GFP isatsaren erabilerak DDI1 proteinan.** (A) GFP isatsari esker fluoreszentsiazko mikroskopioan beha daiteke DDI1-GFP proteinaren adierazpena HEK293T zeluletan. (B) GFP isatsarekin batzen den kanbera erabiliz, DDI1 proteina arrantzatu dezakegu. Jarraian, antigorputzen bidez proteina honen ubikuitinazio-maila ere neurtu dezakegu.



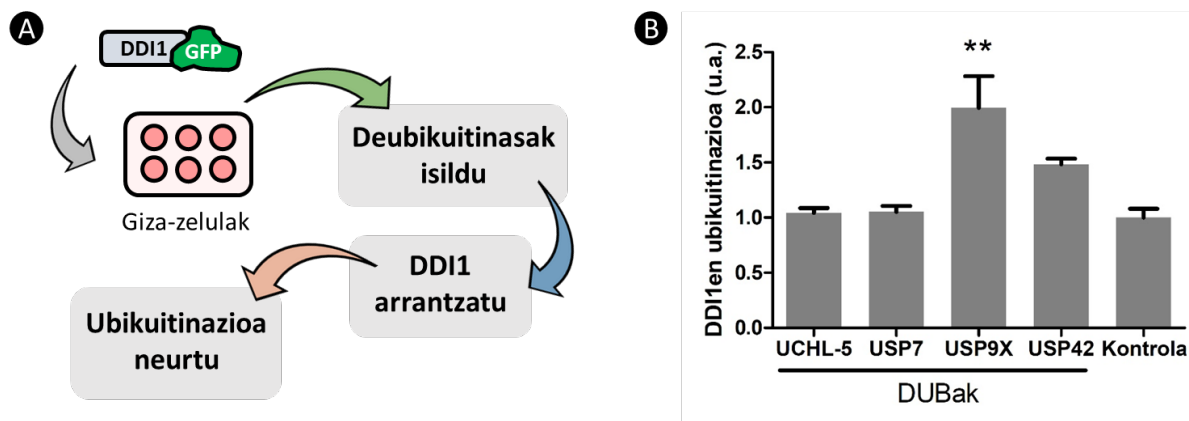
Fluoreszentzia bidezko DDI1-GFP proteinaren jarraipena

DDI1-GFP proteinaren arrantza eta ubikuitinazio-maila neurtzea

Giza zeluletan 100 DUB ezberdin inguru daude. Horietatik DDI1 proteina deubikuitinatzen duena zein den jakiteko, zelula populazio ezberdinetan DUB bana desagertuarazi edo isildu dugu. Deubikuitinasaren absentsian, bere itu proteinetan ez da ubikuitina ezabatuko, eta beraz, azken hauen ubikuitinazio-maila igo egingo da. Hortaz, DUBen bat isildu eta DDI1en ubikuitinazio-maila emendatzen dela detektatuz gero, DUB hori DDI1 deubikuitinatzeaz arduratzen dela ondorioztatuko dugu.

Esperimentu horretarako HEK293T zelulez betetako 6 putzutzoko plakak erabili ditugu, eta putzutxo bakoitzean DDI1-GFP gehitzeaz gain, deubikuitinasa bat isildu dugu dagokion siRNA erabiliz (**4a irudia**). Ondoren putzutxo bakoitzean DDI1-GFP arrantzatu, eta antigorputzen bidez bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu. Testatutako deubikuitinasen artetik lauk dute eragina DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailan: UCHL5, USP7, USP9X eta USP42. Alabaina, erreplikekin egindako bigarren esperimentu batean lau horietatik bakar baten isilpenak – USP9X– eman du DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailaren emendapen esanguratsua (**4b irudia**). Hortaz, USP9X deubikuitinasa da DDI1 proteinari ubikuitina kentzeaz arduratzen dena.

**4. irudia.** DDI1 deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB proteinaren identifikazioa. (A) DDI1-GFP gehitu dugu lagin guztietan, baina putzutxo bakoitzean deubikuitinasa ezberdin bat isildu dugu. Lagin guztietatik DDI1-GFP proteina arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu. (B) Aztertutako DUB guztietatik lauk izan duten arren eragina DDI1 proteinaren ubikuitinazioan, soilik USP9X proteinaren kasuan izan da eragina estatistikoki esanguratsua esperimentua hiru aldiz egitean [ANOVA, \*\*,  $P < 0.05$  ( $n=3$ ), u.a.= unitate arbitrarioak].



## 2) USP9X proteinaren aurkako farmakoak DDI1 proteinaren ubikuitinazio-mailan duen eragina aztertzea.

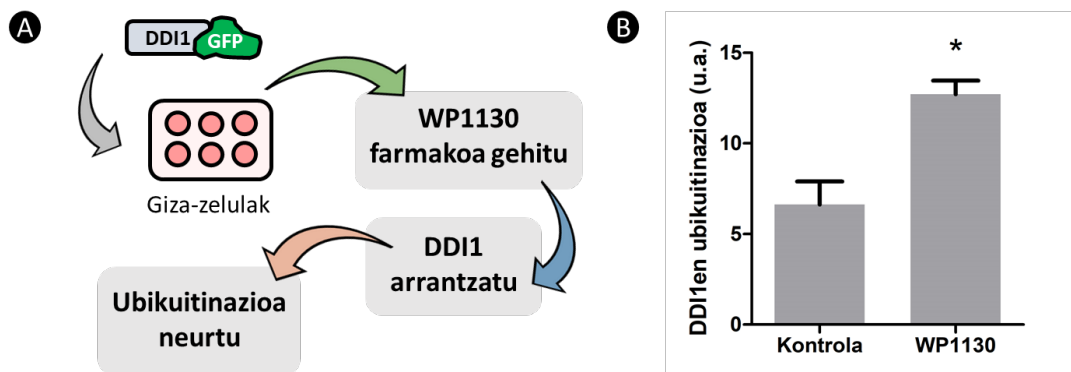
Aurreko atalean ikusi bezala, USP9X isiltzean DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila igo egiten da (**4B irudia**). Efektu hori Angelman sindromea duten pazienteentzako onuragarria suertatu daiteke, gaixoek duten DDI1 ubikuitinatu-maila baxua igotzen lagundu baitezake, beraien sintomatologia hobetuz.

Alabaina, zelulekin erabilitako isilpen teknika ezin da teknikoki pazienteetara hedatu, eta ondorioz, proteina batek jarduteari uzteko modurik erabiliena bere aurkako farmako bat erabiltzea da. Bada USP9X inaktibatzen duen merkaturatutako farmako bat, WP1130 edo degirasina deiturikoa. USP9Xren isilpenarekin lortutako emaitzak, farmako horrekin berresten zirenentz frogatzea izan da gure hurrengo helburua. Izan ere, horrek farmakoa AS tratamendu gisa erabiltzeko atea irekiko lituzke.

Horretarako, aurreko esperimentuan bezala, 6 putzutzoko plakak erabili ditugu. HEK293T zelulei WP1130 farmakoa gehitu diegu, eta beste batzuk farmakorik gabe kontrol gisa erabili ditugu. Zelulak 48 orduz farmakoarekin inkubatu ostean, DDI1-GFP proteina arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu dugu (**5a irudia**). USP9Xren isilpenarekin lortutako datuekin bat eginez, farmakoarekin ere DDI1en ubikuitinazio-maila modu esanguratsuan emendatzen

dela frogatu dugu (**5b irudia**). Beraz, WP1130 farmakoak USP9X inaktibatu, eta ondorioz DDI1en ubikuitinazio-maila emendatzeko gaitasuna duela ondorioztatu dezakegu.

**5. irudia.** WP1130 farmakoaren eragina giza-zeluletan. **(A)** DDI1-GFP proteina giza-zeluletan sartu da. Hiru putzutzokoko zelulei 0.7 mM WP1130 farmako gehitu zaie, beste hiru putzutzokoei berriz ez, beraz kontrol gisa erabili dira. Ondoren DDI1-GFP arrantzatu, eta bere ubikuitinazio-maila neurtu da. **(B)** Farmakorik gabeko kontrolarekin alderatuz, WP1130ak DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila modu esanguratsuan emendatzen du [T-testa, \*,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ , u.a. = unitate arbitrarioak].



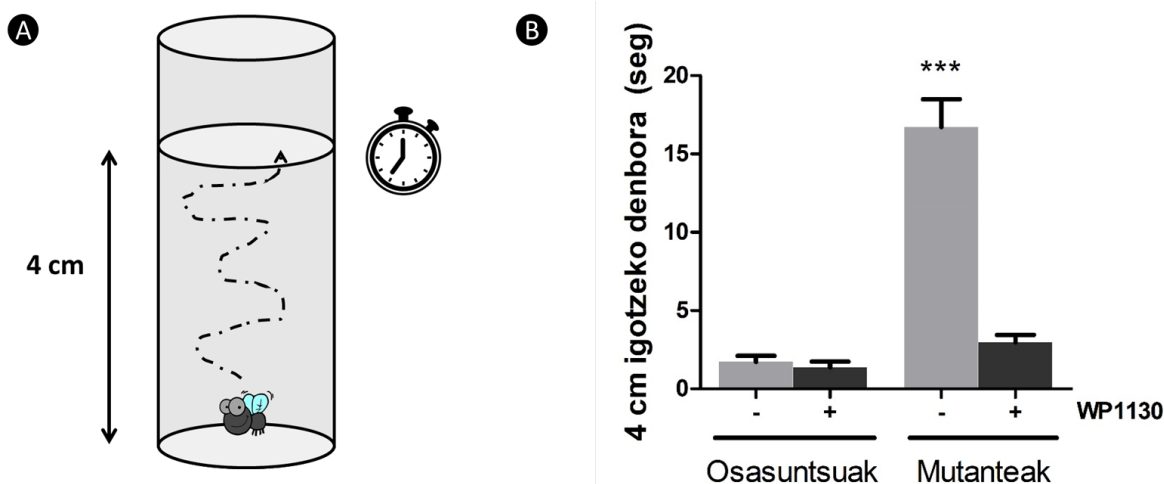
### 3) WP1130 farmakoaren erabilpena Angelman sindromearen eredu diren eulietan.

Orain arte, Angelman sindromea sendatzeko egin diren ikerketa gehienak burmuinean UBE3A funtzionala berrezartzeko saiatu dira (Meng et al., 2015). Aurrez aipatu bezala, guk uste dugu DDI1 proteinaren gutxiengo ubikuitinazio-maila mantentzeak gaixoen sintomatologia, eta ondorioz bizi-kalitatea, hobetu dezakeela. Ildo horretatik, WP1130 farmakoak DDI1 proteinaren ubikuitinazio-maila igotzeko erabilgarria dela frogatu dugu. Beraz, hurrengo pausua, farmako horrek gaixotasunaren sintomatologia hobetu dezakeen aztertzea izan da.

Atal honetan, UBE3A generik ez duen *Drosophila melanogaster* eulia erabili dugu, fruta-eulia ere deitua. Euli horiek ez dute UBE3A proteinarik, Angelman sindromea duten pazienteen antzera. Sintomatologiari dagokionez, gizakiek orekaren eta mugimenduen asaldura erakusten duten bezala, UBE3A gabeko euliek ere ohikoa duten hodian gora egiteko ahalmena gutxituta daukate, hots, euli osasuntsuek baino denbora gehiago behar dute hodiaren goiko aldera hegaz egiteko. Ikerketa honetan, UBE3Arik gabeko fruta-euliei WP1130 farmakoak gehituz gero, hodian gora egiteko duten ahalmena berreskuratzen ote duten aztertu nahi izan dugu.

Horretarako, UBE3A proteinarik ez duten euliak (mutanteak) eta euli osasuntsuak erabili ditugu. Bai euli mutanteekin, bai osasuntsuekin, talde bi egin dira. Talde bati 0.7 mM WP1130 farmako gehitu diegu dietan 24 orduz, bigarren taldeari berriz, ez (kontrol taldea). Hodian gora egiteko ahalmena testatzeko, euliak 4 cm-tako altuerara lerro bat marraztuta duten hodi garbietan sartu ditugu. Jarraian, hodi bakoitzari kolpe bat eman diogu euliak beheko aldera erori daitezela. Momentu horretatik zenbatzen hasita, lehenengo euliak lerroa gurutzatzeko behar duen denbora neurtu dugu (**6a irudia**). Espero bezala, farmakoak jaso duten eta ez duten euli osasuntsuen artean ez dugu hodian gora egiteko ahalmenean aldaketarik nabaritu (**6b irudia**). Aldiz, UBE3A proteinarik ez duten eulietan, kontrol taldeak 15-20 segundu behar izan ditu hodian gora iristeko. Aldiz, WP1130 farmakoarekin tratatutako euli mutanteek 3-4 segundu behar izan dituzte, ia euli osasuntsuen antzeko denbora (**6b irudia**). Horrek erakusten du, WP1130 farmakoari esker, Angelman sindromearen eredu diren euliek hodian gora igotzeko ahalmena berreskuratzen dutela. Horrek pentsarazten digu, USP9X ito terapeutiko egokia izan daitekeela etorkizunean Angelman sindromea pairatzen duten gaixoen sintomak tratatzeko.

**6. irudia.** WP1130 farmakoak Angelman sindromearen eredu diren eulien sintomatologian duen eragina. **A)** Hodian gora hegaz-egiteko ahalmena neurtzeko esperimentua. Hodia beheko aldetik 4 cm-tara markatzen da, bertan euliak sartu eta lehenengo euliak marra hori gurutzatzeko behar duen denbora neurtzen da. **B)** WP1130 farmakoaren bidez UBE3A proteinarik ez duten euli mutanteek hodian gora egiteko ahalmena berreskuratzen dute, ia euli osasuntsuen maila arte [ANOVA, \*\*\*,  $P < 0.0001$ ,  $n=3$ ].



#### 4. Ondorioak

Ikerketa honetan UBE3A proteinaren substratu den DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB proteina identifikatu dugu: USP9X. Proteina honen inaktibazioa pazienteen tratamendurako bidea izan daitekeen frogatzeko asmoz, batetik, isildu egin dugu giza zeluletan, eta bestetik, farmako baten bidez inaktibatu dugu. Kasu bietan DDI1 proteinaren ubikuitinazioa igo denez, hau benetan gaixotasunaren sintomak arintzeko onuragarria izan daitekeen testatu nahi izan dugu. Angelman sindromearen eredu diren euliek farmakoarekin gutxituta duten hodian gora egiteko ahalmena berreskuratu dutela ikusi dugu, eta beraz, USP9X proteina etorkizunean testatzeko diana terapeutiko egokia izan daitekeela ondorioztatu dugu.

Egia da giza genomak ehun deubikuitinasa inguru kodetzen dituela, eta beraz, DUB baten inhibizioak substratu bat baino gehiagoren ubikuitinazio-maila aldatu dezakeela, albo-kalteak eraginez. Hori ekiditeko, badira gaixotasunaren tratamendu bat lortzeko beste bide batzuk ere. Aurrez aipatu bezala, horietako batzuk UBE3A proteina garunean berrezartzea dute helburu (Meng et al., 2015). Alabaina, urteetan zehar hainbat gaixotasun neurologikoren tratamenduetarako DUBak ituratu izan dira (Osinalde et al., 2018). Horrez gain, gaur egun oraindik ez dira USP9X proteinaren substratu asko ezagutzen, eta berau inaktibatzeak ez du albo-kalte larrikeria eragin gure ikerketan. Hortaz, hori guztiori kontuan izanda, estrategia hau ASren sintomatologia hobetzeko bide egokia izan daitekeela deritzogu.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan UBE3A proteinaren substratu den DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen den DUBa inaktibatzeak, eulietan ASren antzeko sintomatologia arintzen duela frogatu dugu. Alabaina, UBE3Ak zelulako beste hainbat proteina ubikuitinatzen ditu. Modu beretsuan, DDI1 proteina deubikuitinatzeaz arduratzen diren DUB gehiago ere egon daitezke. Hortaz, beharrezkoa da proteina horiek guztiak ikertu, eta zelulan duten funtzioa argitzea benetan gaixotasunaren mekanismo molekularra ulertu ahal izateko.

Bestalde, UBE3Ak DDI1 proteina ubikuitinatzen duela dakigun arren, oraindik ez dago argi ubikuitinazio horren mezua zein den. Burutzen ari garen ikerketek erakutsi digute UBE3A bidezko DDI1 proteinaren ubikuitinazioak, DDI1 inaktibatzeako balio lezakeela. DDI1ek proteinen birziklapenean duen garrantzia aintzakotzat hartuta, pentsatzekoa da markaketa horren faltak proteinen gehiegizko birziklapena, eta ondorioz, neuronan funtzioetan asaldurak eragin

ditzakeela. Edonola ere, hori momentuz hipotesi bat besterik ez da eta beraz, frogatu beharra dago.

Azkenik, WP1130 farmakoak eulietan ASren pareko sintomen gain eragin positiboa duela frogatu dugu. Hortaz, hurrengo erronka, ikerketa honetan ikusitako efektu onuragarri hori Angelman sindromearen hurbilagoko eredu diren saguetan ere ematen dela frogatzea da, kasu honetan ager daitezkeen albo-kalteak ere aztertuz. Izan ere, horrek guztiak erakutsiko digu ea etorkizunean USP9X inhibitzen duen farmakoa ASren tratamendurako erabilgarria izan daitezkeen edo ez.

## 6. Erreferentziak

- Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1695, 189–207. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003.
- Buiting, K., Williams, C., and Horsthemke, B. (2016). Angelman syndrome — insights into a rare neurogenetic disorder. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 584–593. doi:10.1038/nrneuro.2016.133.
- D’Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* 147, 32–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.002.
- Dynek, J. N., Goncharov, T., Dueber, E. C., Fedorova, A. V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., et al. (2010). c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J.* 29, 4198–4209. doi:10.1038/emboj.2010.300.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol. Rev.* 82, 373–428. doi:10.1152/physrev.00027.2001.
- Kishino, T., Lalonde, M., and Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* 15, 70–73. doi:10.1038/ng0197-70.
- Meng, L., Ward, A. J., Chun, S., Bennett, C. F., Beaudet, A. L., and Rigo, F. (2015). Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature* 518, 409–412. doi:10.1038/nature13975.
- Osinalde, N., Duarri, A., Ramirez, J., Barrio, R., Perez de Nanclares, G., and Mayor, U. (2018). Impaired proteostasis in rare neurological diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2018.10.007.
- Ramirez, J., Lectez, B., Osinalde, N., Sivá, M., Elu, N., Aloria, K., et al. (2018). Quantitative proteomics reveals neuronal ubiquitination of Rng/Ddi1 and several proteasomal subunits by Ube3a, accounting for the complexity of Angelman syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1955–1971. doi:10.1093/hmg/ddy103.
- Swatek, K. N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26, 399–422. doi:10.1038/cr.2016.39.
- Wang, P.-Y., Chang, K.-T., Lin, Y.-M., Kuo, T.-Y., and Wang, G.-S. (2018). Ubiquitination of MBNL1 Is Required for Its Cytoplasmic Localization and Function in Promoting Neurite Outgrowth. *Cell Rep.* 22, 2294–2306. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.025.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak nire taldekide guztiei lan honetan emandako laguntza guztiagatik. Mila esker Josean Rodriguez eta Ane Olazabal DUB-en isilarazpenerako materiala uzteagatik eta zuen aholku guztiengatik. Azkenik, eskertu baita Euskal Herriko Unibertsitateari eta Eusko Jaurlaritzari, doktoretza programa batean parte hartzeko eta lan hau burutzeko aukera emateagatik.