



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Angelman Sindromearen
ikerkuntza Drosophila euliak
erabiliz**

*J. Ramirez, A. Martinez, B. Lectez,
S. Y. Lee, R. Barrio, M. Gonzalez,
M. Franco, G. Dittmar, L. Reiter
eta U. Mayor*

356-362 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.48>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



Angelman Sindromearen ikerkuntza *Drosophila* euliak erabiliz

Ramirez J.¹, Martinez A.^{2,3}, Lectez B.⁴, Lee S.Y.², Barrio R.², Gonzalez M.², Franco M.⁵, Dittmar G.⁶, Reiter L.⁷ and Mayor U.^{1,8}

¹*Biokimika eta Biologia Molekularra Saila. Zientzia eta Teknologia Fakultatea. Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Barrio Sarriena s/n, 48940, Leioa (Bizkaia).*

²*CIC bioGUNE. Bizkaia Teknologi Elkartegia, 801A eraikina, 48160, Derio (Bizkaia).*

³*University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 3BX, UK*

⁴*Turku Centre for Biotechnology. Tykistökätkatu 6, FI-20520, Turku, Finland.*

⁵*Instituto de Neurociencias, CSIC/UMH, 03550, Sant Joan d'Alacant, Alicante (Spain)*

⁶*Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (Germany)*

⁷*University of Tennessee Health Science Center, 855 Monroe Ave, Memphis TN 38163 (USA)*

⁸*Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao (Bizkaia)*

Kontakturako e-posta: juanmaramirez83@gmail.com

Laburpena

Angelman Sindromea (AS) garapen intelektualaren atzerapena dakarren gaixotasun bat da. Bere jatorria 15. kromosoman dagoen UBE3A genean gertatzen diren mutazioak dira. UBE3A-k zelularen beste zenbait proteina erregulatzen ditu, ubikitina deitutako molekula bat erantziz. Oraindik ez da ezagutzen UBE3Ak eraldatzen dituen proteinak zeintzuk diren.

Gure laborategian ubikitilazioa ikertzeko garatu dugun estrategia erabiliz, *Drosophila melanogaster* eulietan, Ube3a (UBE3A *Drosophila* homologoa) ubikitilatu dituen proteina batzuk identifikatu ditugu. Gure emaitzek entzima horrek proteasomarekin zerikusirik daukaten proteinak ubikitilatu zelularen homeostasia kontrolatzen duela adierazten dute.

Hitz gakoak: Angelman Sindromea, UBE3A, ubikitina

Abstract

Angelman Syndrome (AS) is a disorder that is characterized by an intellectual development delay. Its molecular causes are mutations that affect the UBE3A gene located on chromosome 15. UBE3A regulates the attachment of ubiquitin molecules to other proteins, changing in this way their function. The proteins regulated by UBE3A, however, are yet not known.

*Using a novel strategy to study ubiquitination, developed in our lab, and using the fly *Drosophila melanogaster*, we have identified a few proteins that are ubiquitinated by Ube3a (the *Drosophila* homolog of UBE3A). Our results show that this enzyme regulates cellular homeostasis by the ubiquitination of proteasomal related proteins.*

Keywords: Angelman Syndrome, UBE3A, ubiquitin

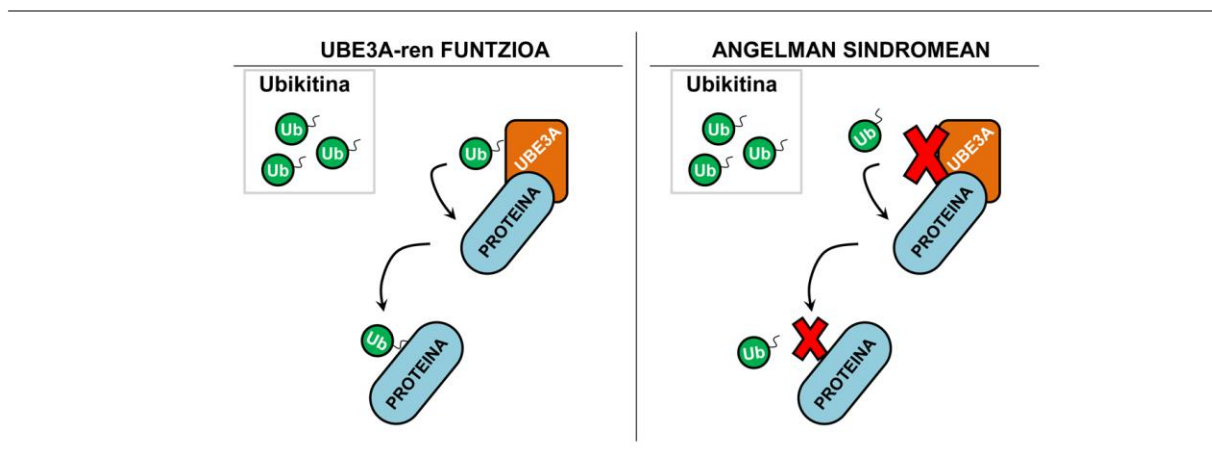
1. Sarrera eta motibazioa

Munduan jaiotako 15.000 haurretatik batek du Angelman Sindromea (AS) gaixotasuna. Umeei garapen intelektualaren atzerapena, oreka eta mugimenduaren arazoak, lo egiteko zailtasunak, epilepsia eta hitz egiteko eragozpenak izaten dituzte (Williams *et al.*, 2010). Gehienetan bi eta bost urte bitartean dituztela jasotzen dute diagnostikoa, gaitzaren ezaugarriak nabariagoak egiten direlako adin tarte horretan. Genetikaren ikuspegitik AS eragiten duten mekanismo ezberdinak dauden arren, amarengandik jasotako 15. kromosomaren delezioak adibidez (Williams *et al.*, 2010), kasu guztietan ondorioa berbera da: garunean adierazi beharko litzatekeen UBE3A deitutako genearen galera (Kishino *et al.*, 1997), eta zehazki, horrek sortutako proteinak (UBE3A deituta ere) ubikitina erantzeko daukan funtzioaren galera (1. Irudia) (Nawaz *et al.*, 1999).

Ubikitina beste proteinetan erantzten den proteina txikia da, ubikitilazioa deitutako prozesuaren bitartez (Komander eta Rape, 2012). Zelulen barruan molekula horren eranspenaren arduradunak UBE3A bezalako entzimak dira eta ubikitina E3 ligasa izen generikoarekin ezagutzen dira (Glickman eta Ciechanover, 2002). Behin proteina bat ubikitinarekin eraldatuta dagoela horren halabeharra guztiz alda daiteke: batzuetan zelularen barruan lekuz aldatzea

eragingo du, edo beste proteina batekin interakzioa izan edo besterik gabe degradatzera bidaliko da, azken hau gehien ikertu egin den ondorioa izanik (Groothuis *et al.*, 2006). Hain garrantzitsua da ubikitilazioaren bitartez kontrolatzen diren prozesuak, hau erantzean gertatzen diren akatsak zenbait gaixotasunekin zerikusirik dutela, Parkinson (Shimura *et al.*, 2000) eta AS (Kishino *et al.*, 1997) esate baterako. Edonola ere, ubikitinak kontrolatzen dituen proteinak ikertzea ez da lan erraza, normalean proteinen kopuru oso txikia ubikitilatu dagoelako (Peng, 2008); hau da, proteina baten 100 molekula zelulan baldin badaude bakarrik bost edo hamar daramate ubikitina lotuta. Hori dela eta, AS inguruan ikerketa asko egin diren arren, UBE3A ubikitilatu dituen proteinak zeintzuk diren oraindik ez dira igarri. Eta UBE3A substratu gisa aurkeztu diren zenbait proteina badira ere (Jiang *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2009; Greer *et al.*, 2010; Margolis *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2013), haien *in vivo* ubikitilazioaren frogak oraindik ez dira argitaratu.

1. Irudia. UBE3A-ren funtzioa



Gure laborategiak ubikitinak kontrolatzen dituen proteinak ikertzeko estrategia eraginkor berri bat garatu egin du (Franco *et al.*, 2011; Lectez *et al.*, 2014; Min *et al.*, 2014). Hain zuzen ere, estrategiak ubikitina biotina (H bitamina) molekularekin *in vivo* markatzean datza. Horrek biotina daukaten proteina guztiak (eta hortaz ubikitilatuak daudenak) modu erraz batean isolatzeko aukera ematen du. 2011an argitaratutako lanean (Franco *et al.*, 2011) *Drosophila melanogaster* eulietako garunean ubikitilatuak zeuden zenbait proteina identifikatu genituen, haien artean UBE3Aren homologoa den Ube3a zegoelarik. Proteina horrek ubikitinarekin eraldatzen dituen proteinen ezagutza faltak piztu egin zuen gure interesa AS-rekiko. Entzima horrek ubikitilatu dituen substratuen topaketa AS hobeto ulertzea erraztu baitezake.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

AS gaixotasunaren arduraduna den UBE3A entzima identifikatu zenetik (Kishino *et al.*, 1997) ikerketa ugari egin dira ubikitinarekin eraldatzen dituen proteinak identifikatzeko. Orain arte zenbait substratu aurkitu egin dira, p53 (Jiang *et al.*, 1998), pbl (Reiter *et al.*, 2006), p27 (Mishra *et al.*, 2009), Arc (Greer *et al.*, 2010), Ephexin 5 (Margolis *et al.*, 2010) edo ATPa (Jensen *et al.*, 2013) esate baterako, baina haien *in vivo* ubikitilazioa ez da oraindik aurkeztu. Proposatutako zenbait substratuen ubikitilazioa, aldiz, UBE3A menpean ez dagoela frogatu egin da (Kühnle *et al.*, 2013).

Gizakien zeluletan ematen diren zenbait mekanismo molekularrak ikertu eta ulertzeko *Drosophila melanogaster*-en erabilera oso hedatuta dago. Adibidez, herentzia kromosomen bitartez transmititzen dela eulietan garatu egin zen (Pandey eta Nichols, 2011). Gainera, gaitz batekin zerikusirik duten gizakien geneen %75ek bere homologoa dute eulietan, hori dela eta euliak gizakien hainbat gaixotasun ikertzeko ere erabili izan ohi dira. AS arduraduna den UBE3A genea bere homologoa dauka *Drosophila*-n (Ube3a) eta gaixotasun horren eredu diren euliak (AS euliak) sortu dira ere (Wu *et al.*, 2008). Hau ikusita, *Drosophila*-ren Ube3a substratoak identifikatzeko helburuarekin, gure laborategiak ubikitilazioa ikertzeko garatutako estrategia AS euliekin bateratzea erabaki zuen, honako helburuak planteatuz:

- AS gaixotasunaren eredu diren eta eskuragarri zeuden euliak (Wu *et al.*, 2008) gure laborategian ubikitilazioa ikertzeko garatutako strategiarekin bateratzea.

- Sortutako euli horietatik eta masa-espektrometria (MS) deitutako teknikaren bitartez Ube3a-k ubikitilutzen dituen proteinak identifikatzea.
- MS bitartez identifikatutako proteinen ubikitilazioa baieztatzea.

3. Ikerketaren muinak

3.1. Metodologia

Drosophila ^{bio}Ub euliak (ubikitilazioa ikertzeko erabiltzen ditugunak) gure laborategian sortu ziren (Franco *et al.*, 2011), Angelman sindromearen eredu diren euliak, aldiz, Dr. Janice Fischer-ek adeitasunez emandakoak dira (Wu *et al.*, 2008).

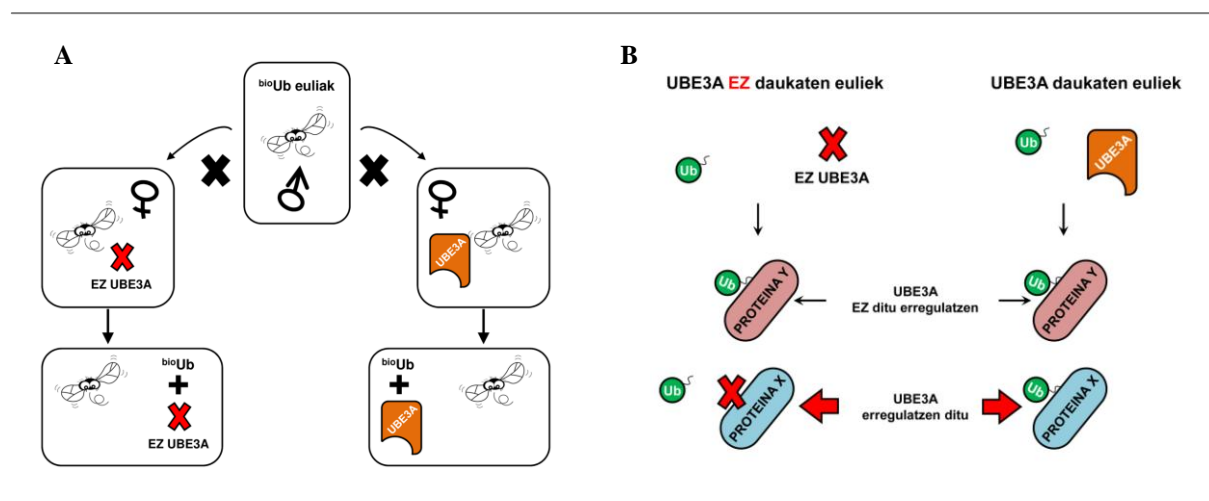
Eulietatik ubikitilatuta dauden proteinak eskuratzeko protokoloa gure laborategian garatu zen (Franco *et al.*, 2011; Lectez *et al.*, 2014) eta proteina hauek Dr. Gunnar Dittmar Max Delbrück Center for Molecular Medicine Institutuko laborategian masa-espektrometriaren bitartez aztertu egin ziren.

Substratuen ubikitilazioa baieztatzeko *Drosophila* zelulak erabili ziren, intereseko proteinak Ube3a-ren presentzian edo gabezian ekoiztuz eta ubikitilazioa western plaketaren bitartez baieztatuz (Lectez *et al.*, 2014).

3.2. Emaitzak

Drosophila melanogaster-ren nerbio sisteman ubikitilutzen diren proteinak identifikatzeko, ubikitina biotinarekin eraldatuta daukaten euli transgenikoak sortu ziren (^{bio}Ub euliak) (Franco *et al.*, 2011). Konkretuki hauek aldi berean ubikitinaren bertsio bat gehi *E.coli* bakterietan biotina jartzen duen entzima (BirA) adierazten dute. Ubikitina bertsio horrek BirA entzimak biotinilazten dituen aparteko 16 amino-azido dakartza, hortaz biak batera adierazterakoan BirA ubikitina biotinilazten du. Biotina abidina proteinarekin oso indar handiarekin ($K_d \sim 10^{-14}$) batzen denez (Marttila *et al.*, 2000), ^{bio}Ub eulietatik eskuratutako proteina nahasketa abidinarekin kontaktuan jartzerakoan biotinilatuta dauden proteina guztiak, eta kasu honetan ubikitilatuak, erraz bazter daiteke geroago masa-espektrometria (MS) teknikarekin bidez zeintzuk diren igartzeko. MS teknikak proteina nahasketa batean dauden proteinak identifikatzen ditu, haien ugaritasun erlatiboa baita ere emanez (Zhang *et al.*, 2009). Gure laborategiak estrategia horren bitartez, eulien neuronetan ubikitilatuak dauden 1000 proteina inguru isolatu eta identifikatu ditu.

2. Irudia. Erabilitako euli mutanteak



Ube3a entzimak ubikitinaren bitartez kontrolatzen dituen proteinak aurkitzeko, Dr. Janice Fischer-ren lan taldeek (Texas, USA) 2008an sortutako *Drosophila* AS euliak (Wu *et al.*, 2008) eskuratu eta ^{bio}Ub euliekin gurutzatu ziren. AS mutante hauek Ube3a genearen kopia ezabatuta edo kopia bat baino gehiago zekarren, beraz, hurrengo belaunaldian sortutako euliek biotinilatutako ubikitina Ube3a entzimaren gabezian edo gehiegizko presentzian adieraziko zuten (2. Irudia A). Horrek bi egoeratan ubikitilatuak agertzen diren proteinak konparatzeko aukera ematen du, eta horrela Ube3a adierazten duten laginetan bakarrik agertutako proteinak

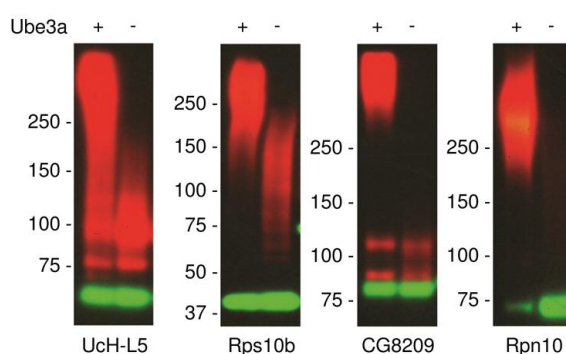
(edo ugariagoak agertutakoak) Ube3a-ren substratu hautagai bezala har daiteke (2. Irudia B). Bi baldintzetatik isolatutako proteinak MS bitartez aztertu ondoren Ube3a-ren bidez ubikitilatuak izan litekeen zenbait proteina identifikatu ziren (1. Taula). Hain zuzen ere, aurretik ezagututako Ube3a-ren bi substratu: Annexin B10 eta Rad23 (Kumar *et al.*, 1999; Shimoji *et al.*, 2009), eta beste hiru substratu berri batzuk: proteinen degradazioarekin zerikusirik daukan proteina bat (Uch-L5), proteinen sintesian parte hartzen duen beste bat (Ef1alpha100E) eta zelularen konpartimentuen pH-a kontrolatzen duen beste bat (Vha68-2).

1. Taula. MS bidez identifikatutako Ube3a-ren substratoak

Proteinen deskripzioa	Genearen izena	Gizakien genearen izena
Annexin B10	AnxB10	ANXA1
Elongation factor 1alpha100E	Ef1alpha100E	EEF1A1
Rad23	Rad23	RAD23A
Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L5 ortholog	Uch-L5	UCHL5
Vacuolar H[+] ATPase 68 kDa subunit 2	Vha68-2	ATP6V1A

Substratu hauen ubikitilazioa aztertzeko western plapaketa deitutako teknikaren bitartez egin daiteke (Mahmood eta Yang, 2012). Teknika horren arrakasta antigorputzak erantzun immunologikoa ematerakoan patogenoen proteinak detektatzeko daukaten espezifikotasunean datza. Modu berean, laborategian, proteina zehatz bat detektatzen duen antigorputza erabiliz proteina nahasketa batean dagoen ala ez ikus daiteke. Hiru substratu hauek Ube3a-ren bitartez jasaten duten ubikitilazioaren baieztapena gauzatzeko, Ube3a-ren presentzia (+) edo gabezia (-) zeukaten *Drosophila* zelulak erabili ziren. Ef1alpha100E, Uch-L5 eta Vha68-2 zelula hauetan adierazi ondoren haien ubikitilazioa aztertu egin zen. Kasu guztietan proteina hauek ubikitilatuagoak agertu ziren Ube3a zeukaten zeluletan, gabezia zeukaten zeluletan baino, entzima horren egiazko substratuak zirela baieztatuz. Aldi berean, lehenago aurkitutako (Franco *et al.*, 2011) eta laborategian eskuragarri zeuden proteinen ubikitilazioa Ube3a-ren presentzian ere aztertzea erabaki genuen, haietako batek entzima horren substratua ere izan litekeen jakiteko. Gure harridurarako, proteinen degradazioarekin eta sintesiarekin zerikusirik zuten beste hiru proteinen ubikitilazioa (Rpn10, Rps10b eta CG8209) Ube3a-ren presentzian handiagoa zela ikusi genuen, identifikatutako substratuak seira handituz (3. Irudia) (Lee *et al.*, 2014).

3. Irudia. Identifikatutako zenbait substratuen ubikitilazioa



3.3. Eztabaida

Ubikitina eta ubikitilazioa historikoki proteinen degradazioarekin lotu egin da. Gaur egun, aldiz, zelularen beste funtzio garrantzitsuak baita ere kontrolatzen dituztela ezagutzen da (Glickman eta Ciechanover, 2002). Horregatik, eraldaketa honi buruzko ikerkuntzak ezinbestekoak egiten dira zelularen funtzionamendua hobeto uler daitezen. Goian aipatu bezala proteinen frakzio txiki bat bakarrik darama ubikitina lotuta, hori dela eta, frakzio hau aberasten dituzten estrategiak erabili behar dira. Arazo honi aurre egiteko, 2011an gure lan taldeak ubikitina molekulak biotinarekin *in vivo* markatzeko estrategia diseinatu zuen eta *Drosophila*-ren neuronetan ubikitilatuak diren zenbait substratu aurkitu zituen (Franco *et al.*, 2011).

Oraingoan, Ube3a entzimaren substratuak identifikatzeko helburuarekin, ^{bio}Ub estrategia urrats bat aurrerago eraman zen orain arte ezagutzen ez ziren Ube3a-ren sei substratu berriak identifikatuz. Aipatzekoa da haietako bi, Eflalpha100E eta Rps10b, proteina berrien sorkuntzan parte hartzen duten bitartean, beste hiru (Uch-L5, CG8209 eta Rpn10) proteasoma eta proteinen degradazioarekin erlazionatuta daudela (Lee *et al.*, 2014). Proteasoma zelulen “zabortegi” bezala funtzionatzen duen estruktura bat da eta bere funtzioa zenbait proteina degradatzea da: zaharrak direnak edo gehiago erabili behar ez direnak esate baterako (Glickman eta Ciechanover, 2002). Ube3a eta proteasomaren elkar arteko erlazioa lehenagoko ikerkuntzetan argitaratu egin bada ere (Tai *et al.*, 2010), proteasomarekin zerikusirik daukaten proteinak Ube3a-ren bitartez ubikitilazten direla frogatzen den lehenengo aldia da. Hau aurkitu izanak, entzima horrek proteasomaren funtzioa erregulatzen duela adierazten du. Horren ondorioz, Angelman sindromea gaixotasuenean, non Ube3a genea falta den, proteinen degradazioa eta sintesia guztiz nahasmendua egon daiteke, zelularen homeostasian eragin kaltegarria izanez. Horrez gain, Eflalpha100E eta Uch-L5 neuronon sorkuntzarekin erlazionatuta daudela ikusi egin da (Neumüller *et al.*, 2011), beraz haien okerreko erregulazioa neuronon garapenean eragina izan dezake baita ere.

Aurkitutako substratuen artean zelularen konpartimentuen pH-a kontrolatzen duen proteina bat topatu zen ere (Vha68-2). Mota honetako proteinen mutazioak autismoarekin eta garapen intelektualaren atzerapenekin lotu egin dira (Huchtagowder *et al.*, 2009). Horrez gain, duela gutxi argitaratuko lanean Ube3a Golgi aparatuen pHa kontrolatzeko beharrezkoa dela argitaratu egin zen (Condon *et al.*, 2013). Hau guztia Ube3a-k proteinen sintesia eta degradazioa kontrolatzea ez ezik, zelularen pHa Vha68-2 ubikitilazioaren bitartez kontrolatzen duela ere iradokitzen du. Gure emaitzek, hortaz, Angelman sindromearen arduraduna den entzimak zelularen proteinen eta ioien homeostasiaren erregulazailerik bezala agerrarazten dute.

4. Ondorioak

Drosophila melanogaster eulietan zelularen proteasomarekin zerikusirik daukaten hiru proteina (CG8209, Uch-L5 eta Rpn10) Ube3a entzimak ubikitinaren bitartez kontrolatzen ditu. Horrez gain, Ube3a-k proteinen sintesian eta ioien garraioan eginkizunen bat dauka, Eflalpha100E, Rps10 eta Vha68-2 ubikitilazioaren bitartez. Hau guztia ikuspegi berri bat ireki egiten du AS arloan, emaitza hauek argi utzi dutelako Ube3a entzimak zelularen homeostasia kontrolatzen duela eta gaixotasuna hobeto ulertzeko lagunduko duen Ube3a-aren mekanismo molekularrari buruzko ideia berriak zabaltzen dituelako.

5. Etorkizuna

Euliekin izandako arrakasta ikusita, hurrengo pasua bai arratoiekin, bai gizakietatik lortutako zeluletara ^{bio}Ub estrategia eramatea da. Ubikitina biotinarekin markatuta duten arratoiak sortu ditugu jada, eta euliekin bezala ubikitilatuak dauden proteinak purifikatzea lortu egin dugu (Lectez *et al.*, 2014), beraz orain AS eredu diren arratoiekin bateratzea da gure helburu. Beste aldetik, Estatu Batuetan lan egiten duen Dr. Lawrence Reiter-ekin daukagun kolaboraziopean, AS daukaten gaixoek galtzen dituzten esne-hortzak jasotzeko programa martxan da. Dr. Reiter-ren laborategiak gaixoen hortzetatik neurona zelulak hazteko protokoloa garatu du, eta horrek gaixoetatik datozen zelulekin lan egitea posible egiten du. ^{bio}Ub estrategia erabiliz, UBE3A ubikitilazten dituen proteinak AS gaixoetatik garatutako neuronetan zuzenean aztertzea dugu helburu.

6. Erreferentziak

- Condon, K.H., Ho, J., Robinson, C.G., Hanus, C. eta Ehlers, M.D. (2013), The Angelman syndrome protein Ube3a/E6AP is required for Golgi acidification and surface protein sialylation, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, 33, 3799–3814.
- Franco, M., Seyfried, N.T., Brand, A.H., Peng, J. eta Mayor, U. (2011), A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, 10, M110.002188.
- Glickman, M.H. eta Ciechanover, A. (2002), The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction, *Physiol. Rev.*, 82, 373–428.

- Greer, P.L., Hanayama, R., Bloodgood, B.L., Mardinly, A.R., Lipton, D.M., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Griffith, E.C., Waldon, Z., Maehr, R., Ploegh, H.L., Chowdhury, S., Worley, P.F., Steen, J. eta Greenberg, M.E. (2010), The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc, *Cell*, 140, 704–716.
- Groothuis, T.A., Dantuma, N.P., Neeffjes, J. eta Salomons, F.A. (2006), Ubiquitin crosstalk connecting cellular processes, *Cell Div.*, 1, 21–28.
- Huchtagowder, V., Morava, E., Kornak, U., Lefeber, D.J., Fischer, B., Dimopoulou, A., Aldinger, A., Choi, J., Davis, E.C., Abuelo, D.N., Adamowicz, M., Al-Aama, J., Basel-Vanagaite, L.B., Fernandez, B., Grealley, M.T., Gillessen-Kaesbach, G., Kayserili, H., Lemyre, E., Tekin, M., Tükmen, S., Tuysuz, B., Yüksel-Konuk, B., Mundlos, S., Van Maldergem, L., Wevers, R.A. eta Urban, Z. (2009), Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival, *Hum. Mol. Genet.*, 18, 2149–2165.
- Jensen, L., Farook, M.F. eta Reiter, L.T. (2013), Proteomic Profiling in Drosophila Reveals Potential Dube3a Regulation of the Actin Cytoskeleton and Neuronal Homeostasis, *PLoS ONE*, 8, e61952.
- Jiang, Y.H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C.M., Noebels, J.L., Eichele, G., Sweatt, J.D. eta Beaudet, A.L. (1998), Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation, *Neuron*, 21, 799–811.
- Kishino, T., Lalonde, M. eta Wagstaff, J. (1997), UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome, *Nat. Genet.*, 15, 70–73.
- Komander, D. eta Rape, M. (2012), The ubiquitin code, *Annu. Rev. Biochem.*, 81, 203–229.
- Kühnle, S., Mothes, B., Matentzoglou, K. eta Scheffner, M. (2013), Role of the ubiquitin ligase E6AP/UBE3A in controlling levels of the synaptic protein Arc, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110, 8888–8893.
- Kumar, S., Talis, A.L. eta Howley, P.M. (1999), Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination, *J. Biol. Chem.*, 274, 18785–18792.
- Lectez, B., Migotti, R., Lee, S.Y., Ramirez, J., Beraza, N., Mansfield, B., Sutherland, J.D., Martinez-Chantar, M.L., Dittmar, G. eta Mayor, U. (2014), Ubiquitin profiling in liver using a transgenic mouse with biotinylated ubiquitin, *J. Proteome Res.*, 13, 3016–3026.
- Lee, S.Y., Ramirez, J., Franco, M., Lectez, B., Gonzalez, M., Barrio, R. eta Mayor, U. (2014), Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, 71, 2747–2758.
- Mahmood, T. eta Yang, P.-C. (2012), Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, *North Am. J. Med. Sci.*, 4, 429–434.
- Margolis, S.S., Salogiannis, J., Lipton, D.M., Mandel-Brehm, C., Wills, Z.P., Mardinly, A.R., Hu, L., Greer, P.L., Bikoff, J.B., Ho, H.H., Soskis, M.J., Sahin, M. eta Greenberg, M.E. (2010), EphB-mediated degradation of the RhoA GEF Ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation, *Cell*, 143, 442–455.
- Marttila, A.T., Laitinen, O.H., Airene, K.J., Kulik, T., Bayer, E.A., Wilchek, M. eta Kulomaa, M.S. (2000), Recombinant Neutralite Avidin: a non-glycosylated, acidic mutant of chicken avidin that exhibits high affinity for biotin and low non-specific binding properties, *FEBS Lett.*, 467, 31–36.
- Min, M., Mayor, U., Dittmar, G. eta Lindon, C. (2014), Using *in vivo* biotinylated ubiquitin to describe a mitotic exit ubiquitome from human cells, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, 13, 2411–2425.
- Mishra, A., Godavarthi, S.K. eta Jana, N.R. (2009), UBE3A/E6-AP regulates cell proliferation by promoting proteasomal degradation of p27, *Neurobiol. Dis.*, 36, 26–34.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Smith, C.L., Lev-Lehman, E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. eta O'Malley, B.W. (1999), The Angelman Syndrome-Associated Protein, E6-AP, Is a Coactivator for the Nuclear Hormone Receptor Superfamily, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1182–1189.
- Neumüller, R.A., Richter, C., Fischer, A., Novatchkova, M., Neumüller, K.G. eta Knoblich, J.A. (2011), Genome-wide analysis of self-renewal in Drosophila neural stem cells by transgenic RNAi, *Cell Stem Cell*, 8, 580–593.
- Pandey, U.B. eta Nichols, C.D. (2011), Human Disease Models in Drosophila melanogaster and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery, *Pharmacol. Rev.*, 63, 411–436.
- Peng, J. (2008). Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins, *BMB Rep.*, 41, 177–183.
- Reiter, L.T., Seagroves, T.N., Bowers, M. eta Bier, E. (2006), Expression of the Rho-GEF Pbl/ECT2 is regulated by the UBE3A E3 ubiquitin ligase, *Hum. Mol. Genet.*, 15, 2825–2835.
- Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta H., Miyamura, T. eta Shoji, I. (2009), Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation, *J. Cell. Biochem.*, 106, 1123–1135.

- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S. i, Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. eta Suzuki T. (2000), Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase, *Nat. Genet.*, 25, 302–305.
- Tai, H.C., Besche, H., Goldberg, A.L., eta Schuman, E.M. (2010), Characterization of the Brain 26S Proteasome and its Interacting Proteins, *Front. Mol. Neurosci.*, 3.
- Williams, C.A., Driscoll, D.J. eta Dagli, A.I. (2010), Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome, *Genet. Med.*, 12, 385–395.
- Wu, Y., Bolduc, F.V., Bell, K., Tully, T., Fang, Y., Sehgal, A. eta Fischer, J.A. (2008), A Drosophila model for Angelman syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 12399–12404.
- Zhang, J., Gonzalez, E., Hestilow, T., Haskins, W. eta Huang, Y. (2009), Review of peak detection algorithms in liquid-chromatography-mass spectrometry. *Curr. Genomics*, 10, 388–401.

7. Eskerrak eta aipamenak

Lan honen zenbait emaitzak *Molecular and Cell Proteomic MCP* (Franco *et al.*, 2011) eta *Cellular and Molecular Life Science* aldizkarietan argitaratu egin ziren (Lee *et al.*, 2013). J.D. Shuterland, C. Lindon eta D. Gubb emandako laguntza eskertu nahiko genuke. Larry Reiteri eskerrak ematen dizkiogu J. Ramirez bere laborategian egoteko aukera emateagatik, eta aldi berean *American Society for Biochemistry and Molecular Biology* (ASBMB) estantzia hori egiteko diru-laguntza emateagatik. Euskerara itzultzeko laguntza emateagatik Itxaso Monederori eskerrak eman nahi dizkiogu baita ere. Beste aldetik, Janice Fischer, *Bloomington Stock Center* eta *The Development Studies Hybridoma Bank-DSHB* (*University of Iowa*) eskertu nahiko genuke erabili ditugun euliak eta antigorputzengatik. Lan hau CIC bioGUNE Doktorautza egiteko bekarekin eta Eusko Jaularitzaren Ikerkuntzarako (PI2011-24) eta *March of Dimes Basil O' Connor Starter Scholar Research Award* (5-FY12-16) diru-laguntzari esker egin da.