



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Angelman Sindromearen oinarriak
ikertzen: Zein da UBE3Aren
biktima?**

*Nagore Elu, Juan Manuel Ramirez,
Benoit Louis Philippe Lectez, Nerea
Osinalde eta Ugo Mayor*

60-66 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.09>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Angelman Sindromearen oinarriak ikertzen: Zein da UBE3Aren biktima?

Elu N.¹, Ramirez J.¹, Lectez B.¹, Osinalde N.², Mayor U.¹.

¹*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU, 48940 Leioa, Bizkaia*

²*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV-EHU, 01006 Gasteiz, Araba*
nagoelu@gmail.com

Laburpena

UBE3A proteinak berebiziko garrantzia dauka garunaren garapen eta funtzionamenduan, eta berau falta denean Angelman Sindromea (AS) deritzon gaitz latza garatzen da. UBE3A-ren betebeharrak proteinei ubikuitina deitzen den molekula txiki bat txertatzea da. UBE3A-ren biktima edo ituak diren proteina gutxi batzuk identifikatuta dauden arren, oraindik ez dira egiaztatu. Ikerketa honetan proteina horietako bat – DDII – UBE3A-ren substratu dela ziurtatu da. Bestalde, UBE3A-ren aurkako funtzioa burutuz DDII deubikuitinatzeaz arduratzen diren lau proteina kandidatu identifikatu dira. Lan honek etorkizunerako ikerketa bide berriak irekiko ditu, gaixotasunaren oinarria hobeto ulertzen laguntzen baitu.

Hitz gakoak: Angelman Sindromea, ubikuitinazioa, substratua, UBE3A.

Abstract

The UBE3A protein is a critical enzyme required for appropriate brain development and function, whose lack in the brain causes the Angelman Syndrome (AS). The role of UBE3A consists on adding ubiquitin molecules to target proteins. Although some proteins have been identified as UBE3A substrates, none of them have been validated yet. In this research, one of those proteins – DDII – has been validated as a UBE3A substrate. Additionally, four UBE3A counteracting proteins have been identified as putative DDII deubiquitinases. This study will open new research lines, as it helps to understand the basis of the disease.

Keywords: Angelman disease, ubiquitination, substrate, UBE3A.

1. Sarrera eta motibazioa

Angelman Sindromea (AS) adimen urriko gaixotasun neurologiko bat da, autismoaren antza daukana. Gaixotasun arraroen taldean dago sailkatua, izan ere bere intzidentzia 1:20,000koa baita. Gaixoek epe-luzeko zaintza behar izaten dute eta momentuz gaitz honek ez dauka sendabiderik eta sintomak arintzeko tratamenduak murrizak dira.

Gaixotasun honen ezaugarrien artean, garapenaren atzerapena, mugimendu eta orekaren asaldura eta hitz egiteko zailtasunak aurkitzen dira. Azpimarratu behar da sindrome hau duten hurrek oso ordu gutxi egiten dituztela lo, eguneko 4 edo 5 ordu soilik (Angelman Sindromearen Elkarteko gurasoen komunikazio pertsonala), gurasoentzako eta zaintzaileentzako presio handia suposatzen duelarik.

Angelman Sindromearen jatorria UBE3A proteina kodetzen duen genean dago. Garunean gene honen aitaren aleloa inaktiboa da, hortaz, amaren aleloa falta denean edota mutaturik dagoenean, UBE3A proteina aktiboaren maila behar baino baxuagoa da eta gaixotasuna garatzen da (Kishino et al., 1997; Matsuura et al., 1997).

UBE3A-ren funtzioa proteinei ubikuitina deitzen den tamaina txikiko proteina bat gehitzea da. Prozesu honi ubikuitinazio deritzo eta proteinen hainbat aspektu erregulatzen ditu, besteak beste degradazioa eta aktibitatea. Bistakoa da UBE3A-k garunean betetzen duen funtzioak berebiziko garrantzia duela kontuan izanda bere gabeziak sortzen duen gaitzaren larritasuna. Hala ere, oraindik argitzeko dago UBE3A-ren galerak nola eragiten duen garunaren funtzioan.

UBE3A-ren jarduera estuki erregulatuta dago beste proteina ezberdinekin dituen elkarrekintzen ondorioz (Kuhnle et al., 2011; Mortensen et al., 2015). Hau da, UBE3A eta bere kontrako jarduera burutzen duten deubikuitinasak, DUB bezala ere ezagunak, elkarrengandik gertu aritzen dira modu koordinatuan proteinen ubikuitinazio-maila erregulatuz. Alabaina, oraindik ez da ezagutzen zeintzuk diren UBE3A-k *in vivo* ubikuitinatzen dituen proteinak (UBE3A-ren substratuak), ezta proteina horiek deubikuitinatzeaz arduratzen diren DUB-ak zeintzuk diren ere.

Zeluletan oinarritutako ikerketetan hainbat proteina proposatu dira UBE3A-ren substratu gisa (Sell eta Margolis, 2015). Are gehiago, gure laborategian garatutako metodologia masa espektrometria analisiekin uztartuz, hainbat proteina UBE3A-ren substratu gisa identifikatu ditugu *Drosophila melanogaster* eulian (Lee et al., 2014; Ramirez et al., 2015). Hala ere, identifikatutako proteina horiek benetan UBE3A-ren substratu direnentz ez da oraindik egiaztatu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aurrez esan bezala, AS sendabiderik ez duen gaixotasuna da eta bere sintomak arintzeko tratamenduak oso urriak dira. Gaixotasunaren eragilea UBE3A-ren gabezia dela jakina den arren, oraindik ez dago argi zer gertatzen den garunean. AS-arekin erlazionatutako garuneko proteinak identifikatuz eta ikertuz, hain latza den gaixotasun honen tratamendurako edota sintomak arintzeko bide berriak ireki daitezkeelakoan gaude.

Ikerketaren helburuetako bat gure taldean bertan UBE3A-ren substratu gisa identifikatutako proteina bat, zehazki DDI1 delakoa, benetan UBE3A-ren substratua dela egiaztatzea da. Proteina honek zein prozesutan parte hartzen duen jakinez gero, tratamendu posible baterako aukerak emendatuko lirateke.

Bigarren helburua UBE3A-ren substratu gisa identifikatutako DDI1 proteinari ubikuitina kentzen dion deubikuitinasa edo DUB-a zein den identifikatzea da. UBE3A ez daukaten gaixoetan DUB hori inhibituz, beraien substratua den proteinaren ubikuitinazio-maila berrezarriko litzateke neurri batean behintzat. Hori horrela izanik, hein batean gaixotasunaren sintomak arindu litezkeelakoan gaude.

3. Ikerketaren muina

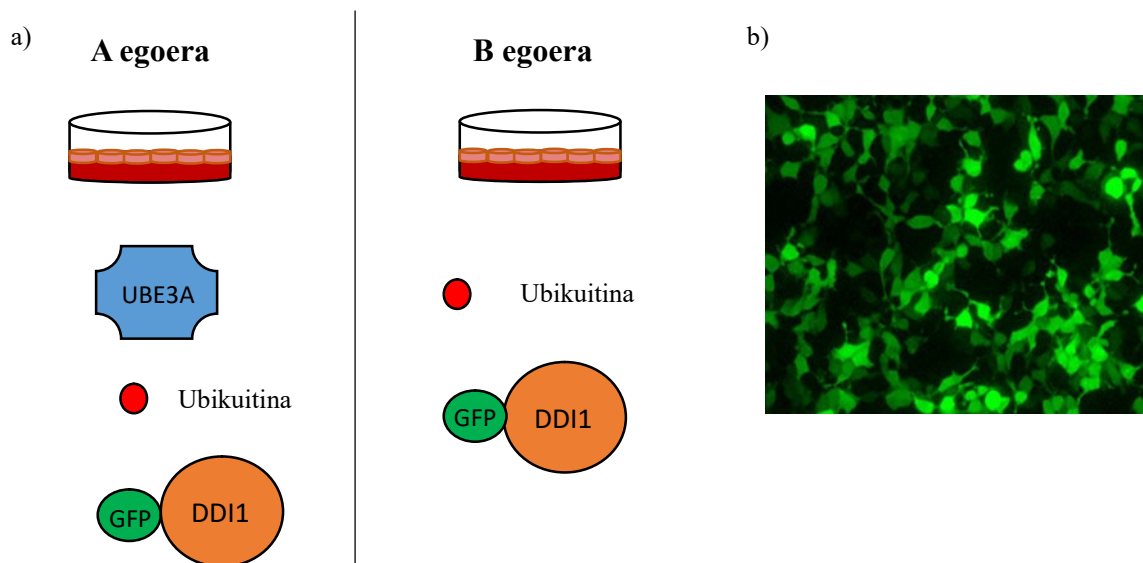
A. Identifikatutako UBE3A-ren substratu baten egiaztatpena

Angelman Sindromeari aurre egiteko tratamendu berriak diseinatzeko bidean, UBE3A-ren substratuak zeintzuk diren identifikatu eta egiaztatzea ezinbestekoa da sistema bere osotasunean ulertu ahal izateko. Aurreko ikerketa batean gure taldeak UBE3A-ren substratu posible batzuk identifikatu zituen *Drosophila melanogaster* eulian (Ramirez, 2015). Alabaina, beste teknika bat erabiliz egiaztatu behar da substratuaren identifikazioa zuzena dela.

Egiaztapen horretarako jarraian azaltzen den **ubikuitinazio-entsegua** erabili dugu. Metodo hau substratuaren ubikuitina kantitatea (ubikuitinazio-maila) neurtzean oinarritzen da. Proteina bat UBE3A-ren substratu baldin bada, UBE3A-k ubikuitinak gehituko dizkio, eta beraz, bere presentzian ubikuitinatuago egongo da. Aldiz, proteina hori ez bada UBE3A-ren substratua, UBE3A-rekin nahiz UBE3A-rik gabe proteina horren ubikuitinazio-maila berdina izango da.

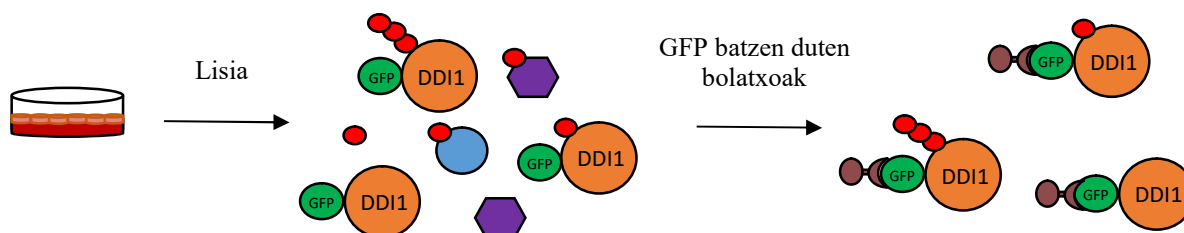
Hau horrela izanik, ubikuitinazio-entsegua bi egoera ezberdin aztertzen dira (1.a irudia): batean zelulek UBE3A kantitate gehiago dute eta bestean berriz ez. Gainera, bi egoeretan ubikuitina eta egiaztatu nahi den proteina (kasu honetan DDI1) adierazten dira zeluletan. DDI1 proteina honek molekula bat du atxikituta, GFP deiturikoa (green fluorescent protein). Molekula hau fluoreszentea denez, esperimentuaren hasieran mikroskopia bidez ikusi daiteke zelulek egiaztatu nahi dugun proteina hori adierazten dutela (1.b irudia).

1. irudia. Ubikuitinazio-entsegua burutzeko planteatutako bi egoerak eta mikroskopia fluoreszentez ikusi daitekeen substratuaren adierazpena.



Behin zelulek dagozkien proteinak adierazten dituztela frogatuta (1.b irudia), DDI1en ubikuitinazio-maila aztertzeke nolabait “arrantzatu” egin behar da. Horretarako, bi egoeretako zelula multzoak liseritu egiten dira, hots, mintza apurtzen zaie zelulako proteina guztiak kanporatzeko (2. irudia). Proteina multzo handi horretan, DDI1 proteinak (2. irudia, laranja) bakarrik dauka GFP atxikituta (2. irudia, berdez), molekula hau ez baita ugaztun zeluletan azaltzen. Horregatik, espezifikoiki GFP-rekin batzen diren bolatxoak (2. irudia, marroiz) erabiltzen dira intereseko proteina “arrantzatzeko”. Bolatxoaren eta intereseko proteinaren GFP-aren artean sortzen den lotura oso sendoa da. Horri esker hainbat garbiketa zorrotz eginez, gainerako proteina ez-espezifiko guztiak (2. irudia, urdinez eta moreaz) baztertzen dira. Jarraian, lagina irakinez bolatxoaren eta GFP molekulen arteko loturak apurtzen dira eta intereseko proteina (DDI1-GFP) isolatzea lortzen da. Aipatu beharra dago proteinekin ubikuitina (2. irudia, gorri) bat baino gehiago lotzeko gaitasuna dutenez, DDI1en forma ubikuitinatu guztiak (ubikuitina batekin, birekin, hirurekin...) isolatu daitezkeela prozedura honekin.

2. irudia. Substratua isolatzeko erabilitako metodologiaren urratsak.

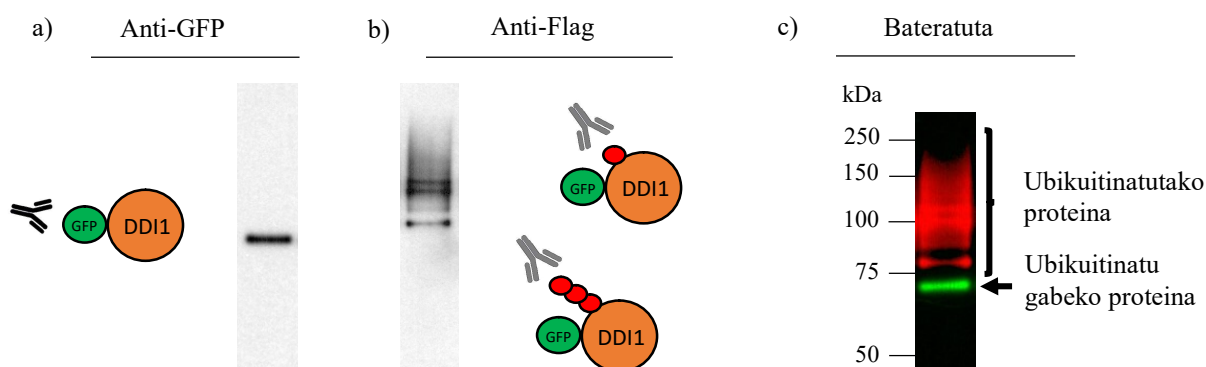


Behin DDI1 arrantzatuta, bai detektatzeko, baita bere ubikuitinazio-maila aztertzeke, antigorputzak erabiltzen dira, hots, proteina konkretuak oso modu espezifikoan ezagutzen dituzten molekulak (3. irudia). Horretarako, proteinak beraien pisu molekularren arabera banatzen dira mintz batean eta mintz hori antigorputzekin inkubatzen da. Antigorputzak ezagutzen duten proteinari batzen direnean, eta errektibo jakin bat gehitzean, argia emititzen dute. Errebelatzeko mintzak erabiliz, argi

horrek arrasto beltz bat uzten du proteina dagoen lekuan (3.a eta 3.b irudiak) eta seinale hori begi bistaz ikusi daiteke (oinarria argazkiak errebelatzeko metodologiaren berdina da).

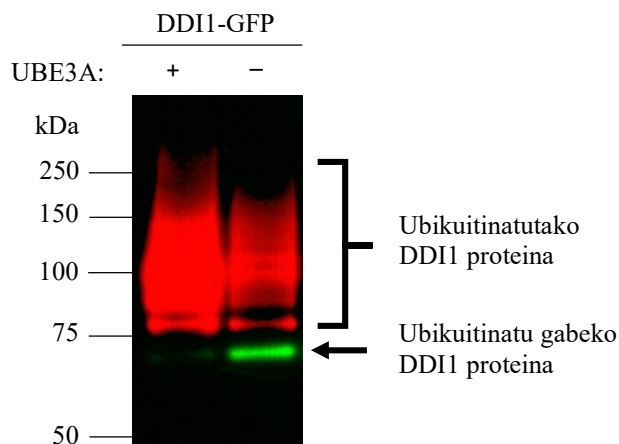
Batetik, GFP molekula ezagutzen duen antigorputz bat (anti-GFP) erabiltzen da lagin guztietan substratua badagoela ziurtatzeko. Zelulako substratu gehiena ubikuitinatu gabe dagoenez, antigorputz honekin tamaina konkretu bateko banda bakarra detektatzen da (3.a irudia). Bestalde, substratuaren ubikuitinazio-maila detektatzeko ubikuitina ezagutzen duen antigorputza erabiltzen da (anti-Flag, zehazki ubikuitinak itsatsita daukan Flag etiketa ezagutzen duelako). Arestian aipatu bezala, proteinek, hala nola DDI1ek, hainbat ubikuitina izan ditzakete (bakarra, bi, hiru etab). Ondorioz, forma horietako bakoitzari dagokion banda guztiak detektatu daitezkeenez, tamaina ezberdin askotako bandez osatutako arrasto luze bat detektatzen da antigorputz honekin (3.b irudia). Anti-GFP eta anti-Flag bidez lortutako irudi biak gainjarri egin daitezke, bakoitzari kolore bat emanez; gorriz, detektatutako ubikuitinaren arrastoa ikusten da, eta berdez, ubikuitinatu gabeko proteina (3.c irudia).

3. irudia. Substratuaren eta bere ubikuitinazio-patroiaren detekzioa antigorputzen bidez.



Prozedura hau guztia UBE3A gainadierazten duten eta ez duten zelulekin gauzatu da (1.irudia). Laburki, kasu bietan DDI1 intereseko proteina isolatu da GFP-ari lotzen diren bolatxoak erabiliz eta antigorputzen bidez DDI1en ubikuitinazio-maila neurtu da. 4. irudian ikus daitekeen bezala, UBE3A gainadierazten den kasuan detektatutako ubikuitinaren arrastoa askoz intentsoagoa da UBE3A-rik adierazi ez den laginarekin konparatuz. Ondorioz, DDI1en ubikuitinazioa UBE3A-ren menpekoea denez, **DDI1 UBE3A-ren substratu dela** kontsideratu daiteke.

4. irudia. DDI1en ubikuitinazio patroia UBE3A-rekin (+) eta UBE3A-rik gabe (-).



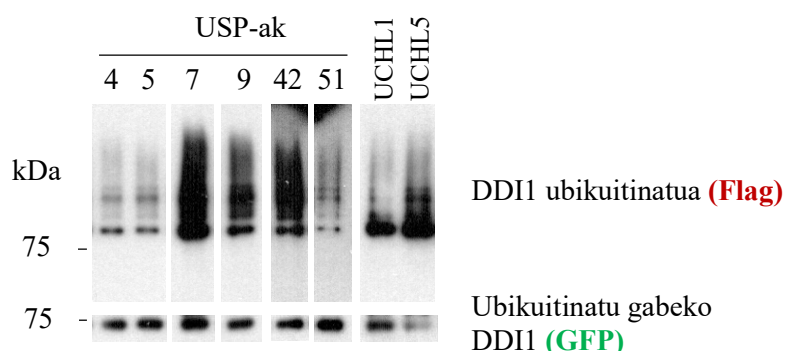
B. Egiaztatutako DDI1 substratuarekin interakzionatzen duen DUB-a aurkitzea

DDI1 proteina UBE3A-ren substratua dela egiaztatuta, hurrengo urratsa DDI1 proteinari ubikuitina(k) kentzen di(zki)on deubikuitinasa(k) (DUB-a) aurkitzea da. Zelulan DDI1 proteina ubikuitinatua kantitate egokia egon behar da, ubikuitinatutako proteina horrek funtzio konkretu bat izango baitu. AS-dun pazienteetan UBE3A kantitate oso gutxi dagoenez, DDI1en ubikuitinazio-maila oso baxua izango da, bere funtzioan eraginez eta zelula barneko oreka hautsiz. DUB-a(k) aurkitzea garrantzitsua izango da, hau(ek) inhibituz DDI1 ubikuitinatua maila mantendu ahal izango baita, zelularen barneko oreka berreskuratuz.

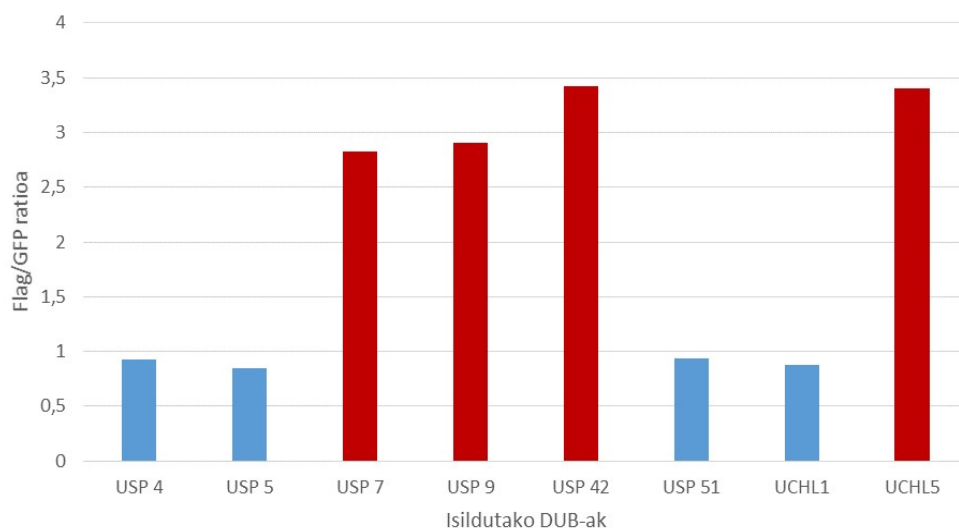
Ildo horretatik eta aurreko metodologian oinarrituz, beste ikerketa bat burutu da. DDI1en deubikuitinazioa gauzatzen duen DUB-a aurkitzeko, zelulan existitzen diren DUB ezberdinak banaka isilarazi dira eta horrek DDI1en ubikuitinazio-mailan nola eragiten duen aztertu da. DDI1 deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB-en bat isilaraziz gero, DDI1en ubikuitinazio-maila handitu egingo dela aurre ikusi daiteke. Aldiz, DDI1-i eragiten ez dion DUB-en bat isilduz gero, DDI1en ubikuitinazio-mailan ez da aldaketarik espero.

Giza zeluletan familia ezberdineko ia 100 DUB deskribatu dira (USP, OTUD, UCHL...) eta momentuz horietako 38 isilarazi ditugu zeluletan. Arestian azaldutako metodologia erabiliz DDI1-GFP eta bere ubikuitinazio-maila detektatu dira anti-GFP eta anti-Flag antigorputzen bidez, hurrenez hurren (5. irudia).

5. irudia. DUB ezberdinak isilaraziz, anti-GFP eta anti-Flag bidezko DDI1en eta bere ubikuitinazio-mailaren detekzioa, hurrenez hurren.



1. grafika. DDI1en ubikuitinazioaren kuantifikazioa, giza DUB ezberdinak isilaraziz eta lau aldaketa nabarmenenak gorritz markaturik.



Antigorputzen bidezko detekzioarekin lortutako emaitzak (5. irudia) kuantifikatu egin dira eta lau emaitza esanguratsuenak errepresentatu dira (1. grafika – barra gorriak), inolako aldaketarik erakusten ez duten beste lau kasurekin batera (1. grafika – barra urdinak). Ikusten da **USP7**, **USP9**, **USP42** eta **UCL5** deubikuitinasak isilarazi direneko kasuetan DDII-en ubikuitinazioa nabarmen emendatu dela (5. irudia eta 1. grafika – barra gorriak). Hortaz, oraindik egiaztatzeaz dauden emaitza hauen arabera, lau deubikuitinasa hauek lirarteke UBE3A-ren aurkako funtzioa izanik DDII deubikuitinatzeaz arduratuko lirartekeenak.

4. Ondorioak

Ikerketa honen bidez DDII proteina UBE3A-ren substratu dela egiaztatu da. Honek etorkizunean burutu daitezkeen hainbat ikerketa lerro zabaltzen ditu, UBE3A-ren gabeziak Angelman Sindromea sortzen duela jakina den arren, horretarako mekanismoetako bat DDII-en erregulazioa izan baitaiteke. Bestalde, DDII-en ubikuitinazio-maila aldatzen duten lau DUB (**UCL5**, **USP7**, **USP9** eta **USP42**) kandidatu identifikatu dira. UBE3A, DDII eta DUB hauen artean lotura bat ezartzea oso garrantzitsua izango da, etorkizunean tratamendu posible baterako bideak irekiko baititu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Angelman Sindromearen mekanismo molekularrak ulertzera bidean DDII proteina UBE3A-ren substratua dela egiaztatzea aurrerapauso handia da. Jakina da UBE3A-ren gabeziak sortzen duela gaixotasuna, baina oraindik ez da ezagutzen gabezia horrek nola sortzen duen gaixotasunaren koadro klinikoa.

Aurrez aipatu bezala, DDII identifikatu izanak hurrengo ikerketetarako bideak irekitzen ditu. Orain badakigu UBE3A-ren funtziotako bat DDII ubikuitinatzea dela. Ubikuitinazio hori degradazio-seinale bat izan daiteke, baina ubikuitinazio-kate motaren arabera, beste hainbat funtziotarako marka ere izan daiteke. Beraz, pentsatzekoa da UBE3A falta denean DDII ez dela ubikuitinatuko, eta posible dela bete beharko lituzkeen funtzio batzuk bete ezin izatea, neuronetan arazoak sortuz. Ideia horretatik abiatuz, ubikuitinatutako DDII proteinak zein bide jarraitzen duen aztertuko da etorkizunean (degradatu egingo den, seinalizazio bideak aktibatuko dituen...). Horrez gain, DDII proteina karakterizatuko da (kokapena, sortzen diren ubikuitinazio kate-motak...) izan ere honek guztiak gaixotasunaren mekanismo molekularra argitzen lagunduko baitigu. Bestalde, DDII deubikuitinatzen duten DUB kandidatuak identifikatu diren arren, aldaketa nabarmenenak erakutsi dizkiguten DUB-ak (1. grafika, gorriz) egiaztatu egin behar dira. Horretarako, alderantzizko estrategia erabiliko da; DUB-a isilarazi beharrean, gainadierazi egingo da. DDII deubikuitinatzeaz arduratzen den DUB-a baldin bada, DDII-en ubikuitinazio-maila jaitsi egingo da, ubikuitinak kenduko baitizkio. Efektu hau gainerako DUB-ekin gertatzen ez bada, DDII-ekiko espezifikoa den DUB-a aurkituko da.

UBE3A-ren aurkako funtzioa betetzen duen DUB-a identifikatzea interesgarria da etorkizunean drogen itua gisa erabili baitaiteke. Angelman Sindromea UBE3A-ren gabeziaren ondorioz sortzen da, entzima honen substratuak ez direlako behar bezala ubikuitinatzen. Pentsa liteke, substratu hauen ubikuitinazio-maila areagotuz gaixotasun honen sintomak baretzea ekarriko lukeela. Printzipioz hori lortzea posible litzateke UBE3A-ren kontrako funtzioa betetzen duen DUB-a isilaraziz. UBE3A-rik ez duten saguetan DUB jakin bat inhibitu eta azaltzen duten portaera eta sintomatologia aztertzea litzateke hurrengo pausua. Guzti honek oraindik urrun dagoen tratamendu posible baterako bideak irekiko dituela uste dugu.

6. Erreferentziak

Kishino T., Lalande M., Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. (1997). *Nat Genet.* 15(1):70-3.

- Kühnle S., Kogel U., Glockzin S., Marquardt A., Ciechanover A., Matentzoglou K., Scheffner M. Physical and functional interaction of the HECT ubiquitin-protein ligases E6AP and HERC2. (2011). *J Biol Chem.* 286(22):19410-6.
- Lee S.Y., Ramirez J., Franco M., Lectez B., Gonzalez M., Barrio R., Mayor U. Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. (2014). *Cell Mol Life Sci.* 71(14):2747-58.
- Matsuura T., Sutcliffe J.S., Fang P., Galjaard R.J., Jiang Y.H., Benton C.S., Rommens J.M., Beaudet A.L. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. (1997). *Nat Genet.* 15(1):74-7.
- Mortensen F., Schneider D., Barbic T., Sladewska-Marquardt A., Kühnle S., Marx A., Scheffner M. Role of ubiquitin and the HPV E6 oncoprotein in E6AP-mediated ubiquitination. (2015). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(32):9872-7.
- Ramirez J., Martinez A., Lectez B., Lee S.Y., Franco M., Barrio R., Dittmar G., Mayor U. Proteomic Analysis of the Ubiquitin Landscape in the Drosophila Embryonic Nervous System and the Adult Photoreceptor Cells. (2015). *PLoS One.* 10(10):e0139083.
- Sell G.L. eta Margolis S.S. From UBE3A to Angelman syndrome: a substrate perspective. (2015). *Front Neurosci.* 9:322.

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.