



Trabajo Fin de Grado / Gradu Amaierako Lana
Grado en Biología / Biologiako Gradua

Validación de la proteína PSMD4 como sustrato del enzima UBE3A y sus implicaciones en el síndrome de Angelman

Autor/a / Egilea:

Rocío García Villamor

Director/a/ Zuzendaria:

Ugo Mayor Martínez

© 2017 Rocío García Villamor

Leioa, 26 de Junio de 2017

Índice

1. RESUMEN

2. ABSTRACT

3. INTRODUCCIÓN

- a. El síndrome de Angelman
 - i. Diagnóstico fenotípico
 - ii. Diagnóstico genético
- b. Vías de regulación en la degradación de proteínas. Sistema ubiquitina-proteosoma (UPS)
- c. Gen *UBE3A* y proteína UBE3A (E6AP)
- d. Sustrato en estudio: Rpn10 en *Drosophila*, PSMD4 en humanos
 - i. Identificación del sustrato: Estrategia de biotinylation *in vivo* de la ubiquitina
 - ii. Validación del sustrato: *Pulldown* de GFP

4. OBJETIVOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

- a. Cultivo celular
- b. Transfección en las células HEK293T
- c. *Pulldown* de GFP
- d. SDS-PAGE y transferencia
- e. Western blot. Detección con anticuerpos quimioluminiscentes

6. RESULTADOS

- a. Estudio de la efectividad de la transfección
- b. Ensayo de ubiquitilación del material celular
- c. Ensayo de los *Inputs*

7. DISCUSIÓN

8. CONCLUSIONES

9. BIBLIOGRAFÍA

Resumen

El síndrome de Angelman es un trastorno neurológico caracterizado por retraso mental, disfunciones en el movimiento o en el equilibrio y limitaciones severas en el habla y en el lenguaje. La causa genética que resulta en el síndrome es la delección o mutación del gen *UBE3A* situado en la región cromosómica 15q11-13. Este gen se transcribe para producir una ligasa E3 de ubiquitina (*UBE3A* o *E6AP*) que funciona conjugando grupos de ubiquitinas a sus proteínas sustrato. El objetivo principal de este trabajo era la validación de la proteína *PSMD4*, el homólogo humano de *Rpn10* en *Drosophila*, como sustrato directo del enzima *UBE3A*. Para ello, he llevado a cabo un estudio en células *HEK293T* transfectadas con varios plásmidos independientes de forma que sobreexpresaron tres enzimas diferentes: *UBE3A*, *Parkin* y *BirA*. A continuación, he realizado un *pulldown* de GFP para purificar el sustrato en estudio, corriendo las muestras en una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y transfiriendo las proteínas a una membrana de PVDF. Por último, verifiqué la eficiencia de la transfección y visualicé los niveles de ubiquitilación mediante anticuerpos quimioluminiscentes. En los resultados he observado un aumento de material ubiquitilado tanto en el extracto del material celular como en la muestra de sustrato purificado en las células que sobreexpresaron *UBE3A*. En vista de los resultados, se puede concluir que la proteína *PSMD4* es un sustrato del enzima *UBE3A* y se proponen dos posibles hipótesis para explicar el aumento de ubiquitilación en el extracto del material celular. La identificación de todas las proteínas-sustrato de *UBE3A* constituye el punto de partida para el estudio de sus funciones y la búsqueda de mecanismos para sustituir su efecto en individuos afectados por el síndrome de Angelman.

Abstract

Angelman syndrome is a neurological disorder characterized by mental retardation, movement or balance dysfunctions, and severe limitations in speech and language. The genetic cause that results in the syndrome is the deletion or mutation of the *UBE3A* gene located in the chromosomal region 15q11-13. This gene is transcribed to produce an E3 ubiquitin ligase (*UBE3A* or *E6AP*) that works by conjugating ubiquitin groups to a single set of proteins. The main objective of this work was to validate *PSMD4*, the human homolog protein of *Rpn10* in *Drosophila*, as a direct substrate of *UBE3A* enzyme. To do this, I performed a study in *HEK293T* cells transfected with several independent plasmids so that they overexpressed three different enzymes: *UBE3A*, *Parkin* and *BirA*. I then performed a GFP-pulldown to purify the substrate under study, separating the samples by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and

then proteins were transferred to a PVDF membrane. Finally, the efficiency of the transfection was verified and the levels of ubiquitination were visualized by chemiluminescent antibodies. An increase of ubiquitinated material was observed in both the extract of the cellular material and in the sample of purified substrate in the cells that overexpressed UBE3A. In view of the results, it was concluded that the PSMD4 protein is a substrate of the enzyme UBE3A and two possible hypotheses were proposed to explain the increase of ubiquitination in the extract of the cellular material. The identification of all substrate proteins of UBE3A is the starting point for the study of their functions and the search for mechanisms to substitute their effect in individuals affected by Angelman syndrome.

Introducción

El síndrome de Angelman

El síndrome de Angelman es un trastorno del desarrollo neurológico caracterizado por retraso mental, disfunciones en el movimiento o en el equilibrio y limitaciones severas en el habla y en el lenguaje. Se observa en uno de cada 12.000 – 20.000 de la población (Williams, C.A. et al. 2010; Clayton-Smith, J. y Pembrey, M. E. 1992). El síndrome de Angelman muestra una superposición sintomática con otras enfermedades relacionadas con el desarrollo neurológico. (Sell, G.L y Margolis, S. S. 2015; Forrest et al. 2013).

Diagnóstico fenotípico

Los recién nacidos suelen tener un fenotipo normal. Los retrasos en el desarrollo se observan por primera vez alrededor de los 6 meses de edad, sin embargo, las características clínicas únicas del síndrome de Angelman no se manifiestan hasta después de la edad de 1 año y pueden transcurrir varios años hasta que el diagnóstico clínico correcto sea obvio. El diagnóstico suele basarse en primer lugar en el fenotipo del comportamiento, particularmente en los trastornos del movimiento, la ausencia del habla y la conducta feliz. (Williams, C.A. et al. 2010)

Una de las principales características del síndrome de Angelman es un perfil de desarrollo relativamente inusual en el que las habilidades cognitivas son más fuertes que las habilidades del lenguaje receptivo que a su vez son mucho más fuertes que las habilidades del lenguaje expresivo. (Tan, W.H. et al. 2014; Gentile et al. 2010).

Alrededor del 90% de las personas afectadas muestran convulsiones clínicas, de las cuales más del 60% presentan más de un tipo de convulsión. (Tan, W.H. et al. 2014; /Thibert et al., 2009).

Otra característica es la disfunción del sueño, incluyendo dificultades para dormirse y despertarse varias veces por la noche, con una prevalencia del 70-80% de los individuos afectados.

Además, otros comportamientos típicos de personas con síndrome de Angelman son: cortos periodos de atención, conductas inusualmente felices, risa provocada fácilmente, introducción de objetos en la boca y fascinación por el agua. (Tan, W.H. et al. 2014 / Angelman, H. 1965). La mayoría, disfrutan de las interacciones sociales y buscan el contacto visual con los adultos.

Diagnóstico genético

La pérdida materna de la región cromosómica 15q11-13 causa síndrome de Angelman. Aunque en esta región hay múltiples genes, es evidente que las mutaciones en *UBE3A*, un gen con impronta paterna, son suficientes para el desarrollo de la enfermedad (Sell, G.L y Margolis, S. S. 2015; Kishino, T. et al. 1997). Curiosamente, la región cromosómica 15q11-13 se encuentra duplicada en 1-2% de todos los casos de trastorno del espectro autista, lo que proporciona evidencias adicionales sobre la importancia de esta región en el desarrollo de un sistema nervioso funcional (Sell, G.L y Margolis, S. S. 2015; Cook, Jr. E. H. et al. 1997).

Mecanismos genéticos que producen el síndrome de Angelman:

- Deleción y duplicación (65-75%)

En la región 15q11-13 hay tres puntos de ruptura cromosómicos implicados en la mayoría de los eventos de deleción causantes del síndrome de Angelman: BP1 proximal, BP2 y BP3 distal cuyas deleciones se extienden 5-7 Mb. Menos del 10% de los individuos con síndrome de Angelman pueden tener deleciones que se extienden desde la región BP1/BP2 a regiones más distales como BP4 o BP5 (Figura 1) (Williams, C.A. et al. 2010).

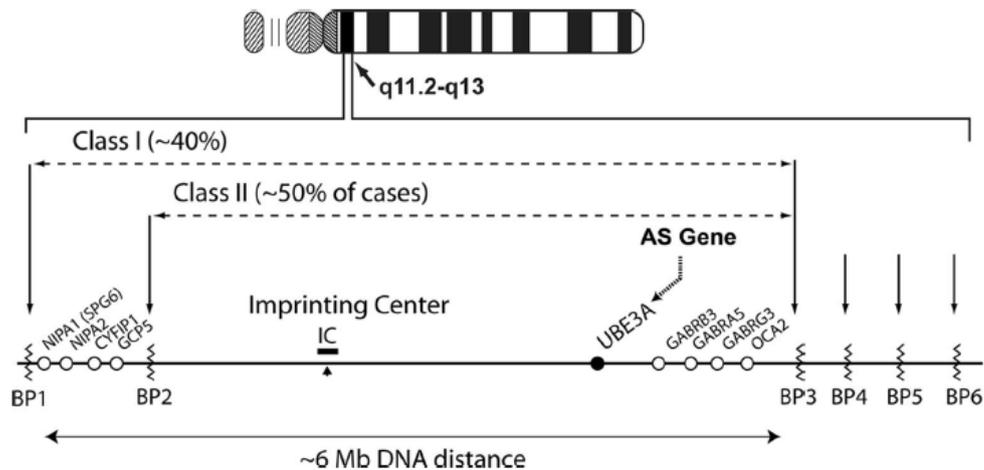


Figura 1. Detalle de la región cromosómica 15q11.2-q13, localización del gen *UBE3A*, del centro de impronta y de seis puntos de ruptura cromosómica (Williams, C.A. et al. 2010).

Los individuos que muestran duplicaciones en la región 15q11.2-q13 no presentan dimorfismo facial pero tiene déficit de aprendizaje desde leve hasta moderadamente grave y pueden tener comportamientos en el espectro del autismo (Williams, C.A. et al. 2010; Boyar, F. Z. et al. 2001).

- Mutaciones en *UBE3A* (5-11%)

Un análisis secuencial de individuos con síndrome de Angelman revela que la mayoría de las mutaciones en *UBE3A* resultan en la interrupción prematura en la transducción de la proteína, sin evidencias en la localización de ningún *hotspot*. Es posible que los individuos con mutaciones más leves puedan mostrar algunas, pero no todas las características clínicas asociadas al síndrome de Angelman (Williams, C.A. et al. 2010; Kishino, T. et al. 1997).

- Disomía uniparental paterna del cromosoma 15 (3-7%)

La disomía uniparental (UPD) es la situación en la que ambos homólogos de un par de cromosomas se han originado de un solo progenitor. La UPD15 materna se encuentra en el 25% de los pacientes con síndrome de Prader-Willi y la UPD15 paterna se encuentra en el 2% de los pacientes con síndrome de Angelman. La relativa falta de casos de UPD15 paterna en comparación con la materna parece estar relacionado con la menor tasa de no disyunción en la meiosis masculina. Sin embargo, este hecho no puede explicar la gran diferencia entre ambos casos por lo que se ha planteado una hipótesis que explica la ganancia post-zigótica del cromosoma paterno en la UPD15 paterna, responsable del desarrollo del síndrome de Angelman

(Robinson W. P. et al. 2000). Las personas con UPD paterna tienden a tener una presentación más leve de los síntomas con una menor incidencia de convulsiones (Williams, C.A. et al. 2010; Lossie, A. C. et al. 2001).

- Defectos en la impronta genética (3%)

Este conjunto de individuos con síndrome de Angelman tiene un defecto en los mecanismos implicados en el reajuste de la marca bioquímica durante la gametogénesis. Los defectos genéticos (pequeñas deleciones) y epigenéticos (patrón de metilación del DNA anormal) en el centro de impronta (IC) cambian la metilación del DNA y las huellas de expresión a lo largo de la región 15q11.2-q13. A pesar de que estos individuos tienen una herencia biparental del cromosoma 15, la región materna 15q11.2-q13 tiene un epigenotipo paterno y por lo tanto es transcripcionalmente incompetente para los genes expresados exclusivamente en la madre en esta región (Williams, C.A. et al. 2010; Buiting, K. et al. 2001).

Vías de regulación en la degradación de proteínas. Sistema ubiquitina proteosoma (UPS).

Las células necesitan una regulación estricta de la síntesis y degradación de proteínas sin la cual no sería posible la ejecución exitosa de las funciones celulares (Upadhyay, A. et al. 2017; Gallastegui, N. y Groll, M., 2010). Un gran número de chaperonas y sus cofactores ayudan a las cadenas lineales polipeptídicas recién sintetizadas a adquirir sus formas tridimensionales funcionales y las protegen contra diversos tipos de tensiones citotóxicas (Hartl, F. U, et al. 2011). Los cambios relacionados con la edad y el stress continuo causan una disminución significativa en la eficiencia de las chaperonas moleculares, lo que puede producir la acumulación de agregados proteicos en el interior celular (Tyedmers, J. et al. 2010). Para evitar dichos cambios deletéreos no deseados, las chaperonas pueden optar por degradar los agregados proteicos tóxicos acumulados en la célula por medio de sistemas proteolíticos celulares como la autofagia y el sistema ubiquitina proteosoma (UPS) (Arndt, V. et al. 2007). Ambas vías reconocen pequeñas moléculas de ubiquitina unidas a proteínas celulares como etiquetas que inician las vías de degradación. La ubiquitina es una proteína muy pequeña de 76 aminoácidos de longitud y aproximadamente 8,5 kDa de peso molecular (Upadhyay, A. et al. 2017).

La ubiquitilación es un tipo de modificación postranslacional de una proteína en la que por acción de múltiples elementos se produce una cascada de reacciones que finaliza con la unión de un resto de ubiquitina a un sustrato (Upadhyay, A. et al. 2017; Hershko, A. et al. 2000). El

proceso se lleva a cabo en varias etapas: en primer lugar, se forma un enlace tioéster entre el residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina y un residuo de cisteína presente en la enzima E1 activadora de ubiquitina, la cual activa la molécula de ubiquitina con un ATP (Upadhyay, A. et al. 2017; Haas, A. L. y Rose, I. A. 1982). Posteriormente, la ubiquitina activada se transfiere mediante transesterificación a otro residuo de cisteína presente en una clase diferente de enzimas, denominadas E2. Finalmente, la transferencia de la ubiquitina activada a la proteína diana está mediada por otro conjunto de enzimas conocidas como ligasas E3 de ubiquitina (Nakayama, K. I. & Nakayama, K. 2006) Estas enzimas unen la molécula de ubiquitina al grupo ϵ -amino de un residuo interno de lisina de la proteína sustrato o, en otros casos, a uno de los siete residuos de lisina presentes en una molécula de ubiquitina ya unida (Ciechanover, A. 1994). Después de encontrar una señal de degradación adecuada, la maquinaria proteolítica de la célula, el proteosoma 26S, degrada el sustrato en oligopéptidos más pequeños (Finley, D. 2009) (Figura 2).

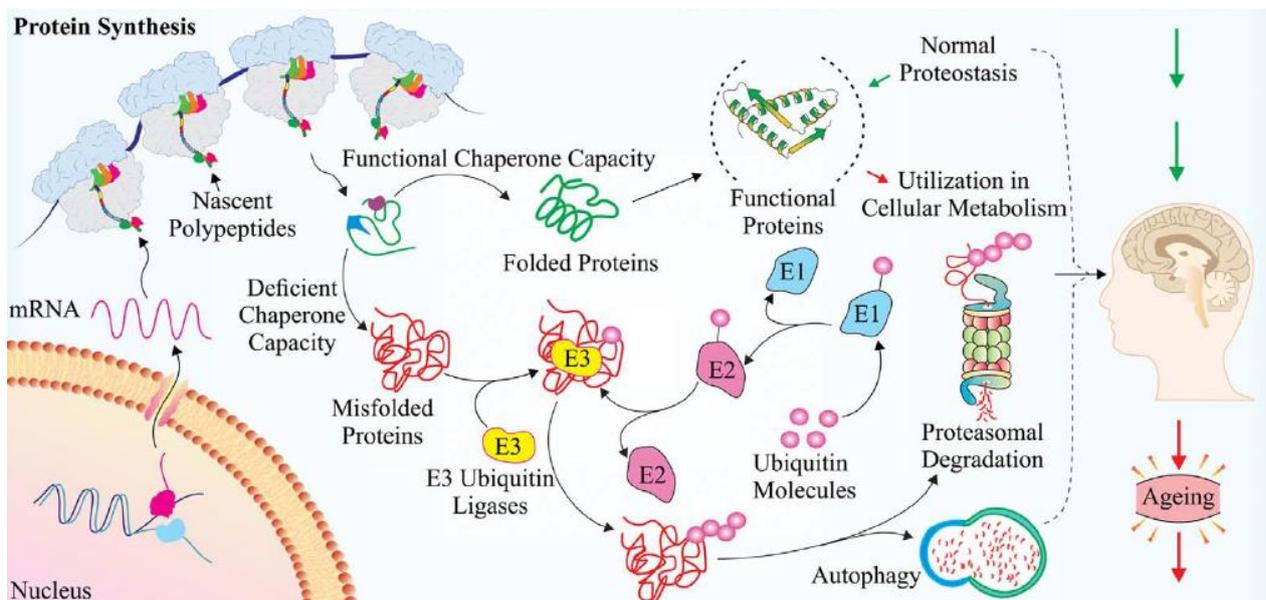


Figura 2. (Upadhyay, A. et al. 2017) Vías de regulación de la proteólisis celular. Acción de los enzimas E1, E2 y E3 para ubiquitilizar las proteínas deficientes y degradación mediante la autofagia o mediante los proteosomas (sistema ubiquitina-proteosoma: UPS).

Gen *UBE3A* y proteína UBE3A (E6AP)

El síndrome de Angelman se produce por la expresión o función deficiente del alelo heredado por vía materna del gen *UBE3A* (Williams, C.A. et al. 2010). Este gen se encuentra bajo impronta paterna en el cerebro, pero no en otros tejidos (Kishino, T. et al. 1997). Nakao, M. et

al. 1994 mostraron que el UBE3A se expresa en linfoblastos y fibroblastos en pacientes con deleciones que padecen síndrome de Angelman y síndrome de Prader Willi. Cuando la copia materna del gen está ausente, no hay actividad ubiquitina ligasa en el cerebro. El UBE3A y la vía del proteosoma 26 S son esenciales para muchas funciones celulares incluyendo la transducción de la señal y la regulación transcripcional (Williams, C.A. et al. 2010; Ciechanover, A. y Schwartz, A. L. 1998). La interrupción del *UBE3A* podría afectar a múltiples procesos neuronales como el recambio del receptor de membrana y otros mecanismos necesarios para mantener la plasticidad y la función sináptica normal.

El gen *UBE3A* produce una proteína con el mismo nombre, UBE3A, o también llamada proteína E6 asociada (E6AP) de 865 aminoácidos que pertenece a un conjunto de proteínas ligasas de ubiquitina que comparten el dominio HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) (Huibregtse, J. M. et al. 1995). El dominio HECT realiza al menos cuatro actividades bioquímicas: Se une a las proteínas E2 específicas, recibe ubiquitinas de las proteínas E2, transfiere ubiquitinas a los sustratos y añade ubiquitinas adicionales en el extremo final de las cadenas de poliubiquitinas (Huang, L. et al. 1999). Tras la fijación de una ubiquitina al sustrato, UBE3A puede añadir ubiquitinas a la primera ubiquitina para generar sustratos poliubiquitilados, los cuales pueden ser dirigidos hacia las vías de degradación a través del complejo del proteosoma 26S (Williams, C.A. et al. 2010). La secuencia del grupo NH₂-terminal del dominio HECT no está conservada y parece ser determinante para el reconocimiento específico del sustrato (Huang, L. et al. 1999). Los organismos eucariotas utilizan cientos de ligasas E3 de ubiquitina y cada ubiquitina ligasa puede tener unos pocos o cientos de sustratos. Esta compleja relación entre las ligasas E3 y los sustratos confiere especificidad en los mecanismos reguladores de la ubiquitina en la célula (Lee, S. Y. et al. 2014).

Sustrato en estudio: Rpn10 en *Drosophila*, PSMD4 en humanos.

El papel principal de Rpn10/PSMD4 es entregar proteínas poliubiquitiladas al proteosoma para su degradación. Rpn10 reconoce estas proteínas mediante una secuencia que interactúa con la ubiquitina (UIM) localizada en su parte C-terminal y asociada con el proteosoma 26S a través del dominio N-terminal von Willebrand factor A (VWA) (Lee, S. Y. et al. 2014).

- Identificación del sustrato: Estrategia de biotilación *in vivo* de la ubiquitina.

Para llevar a cabo la identificación de sustratos biológicos relacionados directamente con el UBE3A, es necesario identificar *in vivo* las proteínas cuya ubiquitilación es dependiente de UBE3A. La identificación de Rpn10 en *Drosophila* como posible sustrato de la proteína Ube3a se llevó a cabo por Juanma Ramírez et al. (Lee, S. Y. et al. 2014) mediante una estrategia novedosa para el aislamiento de conjugados neuronales de ubiquitina desarrollada por Maribel Franco et al. (Franco, M. et al. 2011).

La estrategia se basa en la biotilación *in vivo* de la ubiquitina mediante la expresión ectópica del enzima BirA de *Escherichia coli* para unir una molécula de biotina a una secuencia de reconocimiento específica (Franco, M. et al. 2011; De Boer, E. et al. 2003) en el extremo N de cada cadena de ubiquitina. Para aumentar la eficiencia de la biotilación, se aprovecha la actividad de los DUBs endógenos para digerir una molécula que contiene seis copias de ubiquitina marcada y el enzima BirA. Una vez libres, la proteína BirA añade biotinas a cada una de las ubiquitinas y las proteínas E3 ligasas añaden estas ubiquitinas marcadas a los sustratos formando moléculas poliubiquitiladas y a su vez, biotiladas. (Figura 3) Debido a la fuerza y especificidad de la interacción avidina-biotina, es posible realizar lavados muy severos para aislar y enriquecer las proteínas ubiquitiladas neuronales de un organismo y posteriormente identificarlas mediante espectrometría de masas. Al realizar este proceso en ausencia de inhibidores de proteosoma, se obtiene la información de los niveles fisiológicos de ubiquitilación de un organismo (Franco, M. et al. 2011).

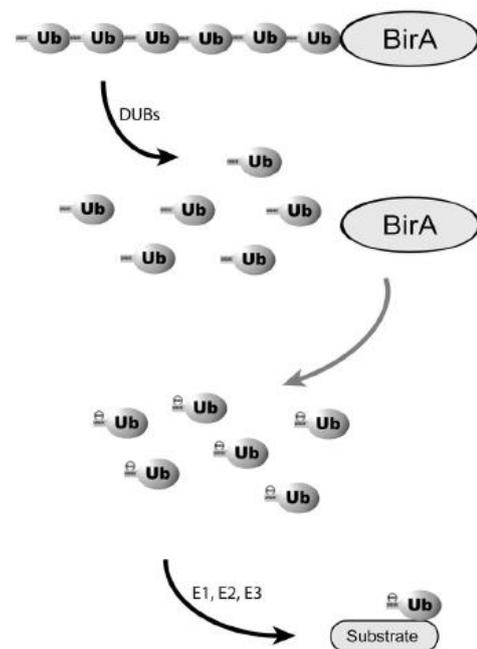


Figura 3. (Franco, M. et al. 2011) Proceso de biotilación *in vivo* de la ubiquitina.

Juanma Ramírez et al. (Lee, S. Y. et al. 2014) compararon dos condiciones; en una produjeron moscas que sobreexpresaban Ube3a y en la otra crearon moscas con delección en el gen *Ube3a*. Compararon el material ubiquitilado en ambas condiciones e identificaron Rpn10 y otros reguladores del proteosoma como sustratos directos del enzima Ube3a.

- Validación del sustrato: *Pulldown* de GFP

Para la obtención de una evidencia directa de la ubiquitilación neuronal de Rpn10 por Ube3a, Juanma et al. (Lee, S. Y. et al. 2014) aplicaron el protocolo *GFP-pulldown* a las células para aislar el sustrato Rpn10 y analizar sus niveles de ubiquitilación en presencia y ausencia de Ube3a funcional de forma aislada. En un cultivo de células neuronales de *Drosophila*, llevaron a cabo la sobreexpresión tanto de Ube3a de tipo salvaje (*wild-type* WT) como de Ube3a-C941S, una proteína inactiva por mutación de la cisteína de su centro activo, con el fin de identificar las proteínas ubiquitiladas dependientes de Ube3a. Analizaron los cultivos de células transfectadas con sustratos de ubiquitina marcados con GFP tras la sobreexpresión de Ube3a WT y Ube3a-C941S. Los resultados mostraron niveles reducidos para una de las 47 proteínas marcadas con GFP, Rpn10 en las células que mostraban una sobreexpresión de Ube3a WT. Además, en las células que mostraban una sobreexpresión de Ube3a-C941S parecía ejercer un efecto negativo dominante protegiendo al Rpn10 de la degradación. Tras aislar Rpn10 fusionado a GFP mediante un *pulldown* con anti-GFP, se monitorizó la fracción ubiquitilada en cada muestra para comparar los niveles de ubiquitilación en las distintas condiciones. El aumento de la ubiquitilación de Rpn10 en las células que sobreexpresaron Ube3a WT fue notable. Finalmente, en base a sus resultados concluyeron que el Rpn10, el homólogo de *Drosophila* de S5 α /PSMD4 está directamente ubiquitilado por Ube3a, lo que resulta en su degradación.

Adicionalmente, observaron que la sobreexpresión de una versión negativa dominante de Rpn10 que carece del dominio VWA (Rpn10DN), causa que proteínas ubiquitiladas sean atrapadas, resultando en una acumulación de material poliubiquitilado (efecto *dominant negative*).

Objetivos

Una de las causas genéticas del síndrome de Angelman es la delección o mutación del gen *UBE3A* situado en la región cromosómica 15q11-13. Este gen expresa una proteína E6 asociada (E6AP) perteneciente al grupo de proteínas conocidas como ligasas E3 de ubiquitina que participan en las rutas de degradación de proteínas mediante los proteosomas. En las personas que padecen el síndrome de Angelman, esta proteína está ausente o no se traduce correctamente, por lo que no es funcional. Debido a esto, hay un grupo de proteínas que no se ubiquitilizan o se ubiquitilizan muy poco y por tanto no participan en sus respectivas funciones. La

identificación de estas proteínas supondría un impulso en la investigación y en el desarrollo de nuevas estrategias en relación con el síndrome de Angelman.

Partiendo de los estudios realizados hasta el momento en este campo, este trabajo presenta un objetivo principal:

- Analizar las variaciones en la ubiquitilación de la proteína PSMD4 en células HEK293T humanas bajo distintas condiciones para comprobar si es o no uno de los sustratos de la proteína UBE3A (E6AP) en humanos.

Materiales y Métodos

El experimento se llevó a cabo por duplicado, obteniendo dos réplicas de todas las muestras tras realizar el *pulldown* de GFP.

Cultivo celular

En este trabajo se han utilizado las células HEK293T (Human embryonic kidney), una línea celular específica obtenida de células embrionarias de riñón humano. Las células crecieron en una placa Petri de 10mm (Biofilm) con el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Thermo Fischer Scientific) suplementado con suero bovino (FBS) al 10% (Invitrogen) y penicilina y estreptomycin al 1% (Sigma). Para preparar las células para los ensayos, se añadieron 2 mL de tripsina para romper las uniones celulares a la placa, se recogieron en 8 mL de medio DMEM y se centrifugaron 3 minutos a 1250 rpm. Tras retirar el sobrenadante, se homogeneizó el pellet en 10 mL de medio DMEM suplementado. Se llevó a cabo la cuantificación celular mediante la cámara de Neubauer y se sembraron 700.000 células por pocillo junto con 3 mL de medio DMEM en una placa de 6 pocillos. Se incubó la placa a 37°C y al día siguiente se llevó a cabo la transfección.

Transfección en las células HEK293T

Se realizaron dos réplicas en la placa de 6 pocillos, de forma que tres pocillos eran idénticos a los otros tres para obtener una mayor cantidad de células transfectadas. Los plásmidos utilizados para cada una de las tres muestras son:

1. UBE3A wild-type (WT), GFP-PSMD4 y Flag-Ubiquitina (Flag-Ub).
2. HA-Parkin, GFP-PSMD4 y Flag-Ub

3. BirA, GFP-PSMD4 y Flag-Ub

La transfección se realizó con Lipofectamina 3000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para cada uno de los pocillos se mezclaron 3 μg de DNA (1 μg de cada plásmido) con 125 μl de OptiMEM (Reduced Serum Media) (Thermo Fischer Scientific) y 5 μl de reactivo P3000 (Invitrogen) en un eppendorf y 125 μl de OptiMEM con 6 μl de lipofectamina en otro eppendorf. A continuación, se juntaron ambas mezclas, se incubaron durante 15 minutos y se añadieron de forma homogénea a cada uno de los pocillos. La placa fue incubada a 37°C durante 48 horas. Por último, se lavaron los pocillos con 1ml de 1x solución salina tamponada con fosfato – (PBS) (Termo Scientific) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Pulldown de GFP

En primer lugar, se añadieron 500 μl de tampón de lisis: 50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl (Sigma), 1mM EDTA (Gibco), 0,5% de Triton (Sigma), 1x Cocktail de inhibidor de proteasas (Roche Applied Science) y 50 mM de NEM (Sigma) a cada pocillo y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se recogió todo el contenido de los pocillos en 3 eppendorfs y se centrifugaron a 4°C y 14000 rpm durante 10 minutos. Se recogieron 30 μl del sobrenadante de cada una de las tres muestras y se guardaron como *Inputs*. A continuación, el sobrenadante de cada muestra se mezcló con 30 μl de suspensión de resina de agarosa en forma de bolas GFP-Trap-A (Chromotek GmbH) lavados previamente dos veces con un tampón de dilución: (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl (Sigma), 0,5mM EDTA (Gibco), PI 1x (Roche Applied Scienc) y 50nM NEM (Sigma)). La mezcla del sobrenadante con la resina de agarosa se diluyó con 450 μl de tampón de dilución con NEM y PI. Se introdujeron las muestras en un rotor (Stuart) a 17 rpm y se incubaron durante 2 horas y media. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras a 6049 rpm durante 2 minutos en una centrífuga Microfuge-16 (Beckman Coulter) para separar la resina del material que no se ha unido. Se guardó parte del material no unido (Flow-through, FT) y el resto se desechó. La resina remanente, se lavó una vez con tampón de dilución, tres veces con un tampón de lavado: (Urea 8M (Sigma) y SDS al 1% (Sigma) en PBS (Fisher Scientific)) y una vez con SDS al 1% en PBS. En el último lavado, se desechó el sobrenadante, se añadieron 25 μl de tampón Laemmli 4x (Tris-HCl 250 mM pH 7,5, glicerol al 40%, SDS al 4%, azul de bromofenol al 0,2%) con DDT 100 mM (Fisher Scientific) y se incubó a 95°C durante 10 minutos para liberar la proteína unida a la resina. Se centrifugaron las muestras a 14800 rpm durante 2 minutos en una centrífuga Microfuge-16

(Beckman Coulter) y se recogió el sobrenadante, para obtener una solución purificada de PSMD4 de cada una de las muestras, a la que se le ha llamado elución: (*Elution*).

SDS-PAGE y transferencia

Se ha usado la SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) o electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico para separar las proteínas de acuerdo a su masa molecular. En primer lugar, las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se cargaron en un gel vertical de poliacrilamida de 1mm de grosor 15 µl de cada muestra y 3µl de marcador Precision Plus Protein Standards (Biorad). Se aplicó una corriente de 130 V para que las muestras corriesen en el gel y se separaran en función del tamaño.

Se extrajo el gel de la cubeta y se realizó una transferencia a una membrana de PVDF mediante el iBlot (Invitrogen). Esto posibilita que las proteínas sean accesibles a la detección con anticuerpos. A continuación, se bloqueó la membrana con 10 mL de leche al 5% en PBS-Tween 0,01% durante 1 hora y se incubó la membrana en 20 mL de PBS durante toda la noche.

Western Blot. Detección con anticuerpos quimioluminiscentes

Para observar la presencia de determinadas proteínas en la membrana se utilizaron distintos anticuerpos:

- *Anti-Flag M2 HRP-conjugated* (Sigma) para detectar las moléculas de ubiquitina.
- *Anti-GFP ratón* (Roche Applied Science) para detectar el PSMD4 marcado con GFP.
- *Anti-UBE3A ratón* (Sigma) para detectar la presencia del enzima E6AP/UBE3A.
- *Anti-FK2 conejo* (Sigma) para detectar cadenas de poliubiquitina.
- *Anti-tubulina ratón* como control de carga de material celular.

A excepción del anticuerpo anti-Flag, que está directamente unido a la enzima HRP, el proceso de detección se lleva a cabo en dos pasos: unión del anticuerpo primario y unión del anticuerpo secundario. Los anticuerpos primarios y el anti-Flag se diluyeron en una solución de 2,5% de leche en PBS-Tween en las siguientes concentraciones: 1:1000 anti-Flag, anti-UBE3A y anti-tubulina y 1:500 anti-GFP y anti-FK2. Se incubó la membrana con la solución de anticuerpos durante toda la noche a 4°C. En el caso del anticuerpo anti-Flag, es suficiente con una hora de incubación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizan lavados con PBS-Tween cada 5 minutos durante una hora. A excepción del anti-Flag, el resto de anticuerpos necesitan unirse a su anticuerpo secundario para llevar a cabo la reacción de luminiscencia. Los

anticuerpos secundarios se diluyeron en una solución de leche al 2,5% en PBS-Tween en las siguientes concentraciones: 1:4000 anti-UBE3A y anti-tubulina, 1:2000 anti-GFP y 1:500 anti-FK2. Se introdujeron las membranas en la solución de anticuerpos secundarios y se dejaron incubando 1 hora. Posteriormente se realizaron lavados con PBS-Tween cada 5 minutos durante una hora. Para revelar, se activó la reacción de quimioluminiscencia de los anticuerpos, añadiendo a la membrana 400 μ l de ECL (Biorad). Se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se reveló la membrana en un revelador manual (Agfa) con el fin de captar la luz emitida por los anticuerpos en una película fotográfica.

Resultados

Para llevar a cabo la validación del PSMD4 como sustrato directo de la proteína UBE3A, se realizó un ensayo en el que se evaluaron los niveles de ubiquitilación de PSMD4-GFP en las células HEK293T transfectadas.

Estudio de la efectividad de la transfección

En primer lugar, se comprobó que la transfección se había desarrollado correctamente. La eficacia de la transfección puede variar entre los distintos plásmidos utilizados, por lo que se llevó a cabo un estudio para comprobar que los niveles de material sintetizados por las células no presentaban diferencias muy significativas entre unas muestras y otras. Una vez finalizado el tiempo de transfección y antes de lavar las células para almacenarlas a -20°C , se observó la señal de GFP unido al PSMD4 de la placa en un microscopio de fluorescencia. En la imagen se detectan múltiples células de un color verde intenso (Figura 4), lo que significa que contienen PSMD4-GFP en su interior.

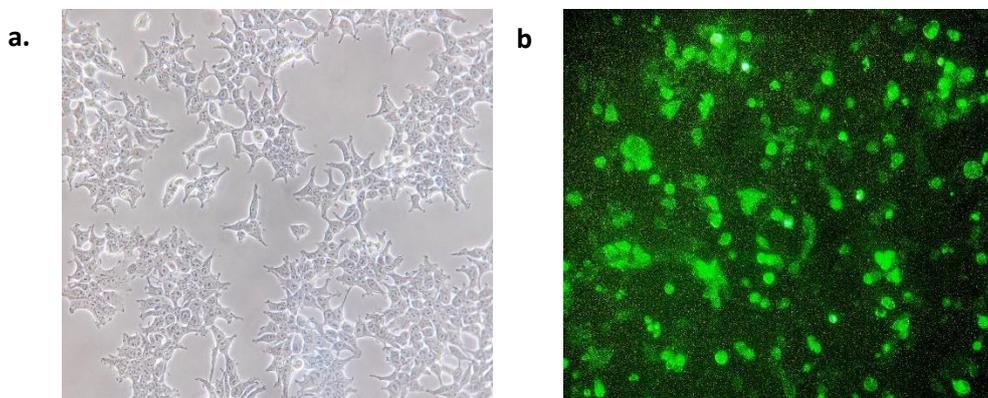


Figura 4. **4a:** Imagen de células HEK293T a través de un microscopio óptico. **4b.** Imagen de células HEK293T a través de un microscopio óptico de fluorescencia. En verde se observa el GFP intracelular.

A continuación, se lisaron las células y se realizó un *pulldown* de GFP para aislar la proteína PSMD4-GFP. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y se transfirió el contenido del gel a una membrana de PVDF para facilitar la accesibilidad de los anticuerpos a las proteínas. Para llevar a cabo la detección de los componentes en la membrana, se utilizaron anticuerpos quimioluminiscentes, los cuales en presencia del sustrato emiten luz.

Para confirmar que el protocolo del *pulldown* de GFP se realizó correctamente, se utilizó el anticuerpo anti-GFP para comprobar la presencia del sustrato PSMD4-GFP en las muestras. Tras exponer la membrana a una película fotográfica para captar la luz emitida por los anticuerpos y revelarla, se obtuvieron los siguientes resultados:

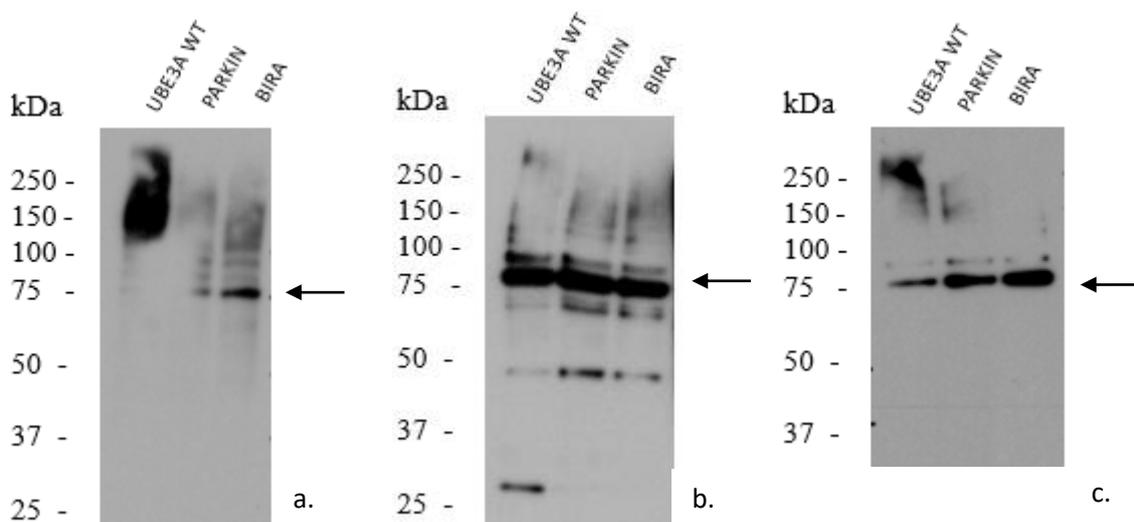


Figura 5. **5a.** Resultado de inmunotransferencia de anti-GFP en la muestra *input* de la réplica 1. **5b.** Anti-GFP en la muestra *elution* de la réplica 1. **5c.** Anti-GFP en la muestra elución de la réplica 2.

Las células fueron además transfectadas con UBE3A WT, Parkin y BirA para comparar el efecto de cada uno de éstos en la ubiquitilación de PSMD4-GFP. Se observa la presencia de PSMD4-GFP mediante una banda gruesa en un tamaño de 75 kDa (flechas) tanto en la muestra del extracto celular completo, *input* (Fig. 5a), como en el enriquecimiento mediante el GFP-*pulldown*, *elution* (Fig.5b). En el caso del *input* no se observa claramente la banda del GFP en las muestras de las células que sobreexpresaron UBE3A y Parkin, sin embargo, sí se aprecia su presencia. En la réplica 2 (Fig. 5c) se observa que hay una menor cantidad de PSMD4-GFP en la muestra de células que sobreexpresaron UBE3A WT ya que la banda es más delgada.

Posteriormente, se comprobó la presencia del enzima UBE3A en las muestras. La transfección de UBE3A (100kDa) detectada por el anticuerpo anti-UBE3A mostró altos niveles de expresión del enzima en los *inputs* de ambas réplicas. (Figura 6).

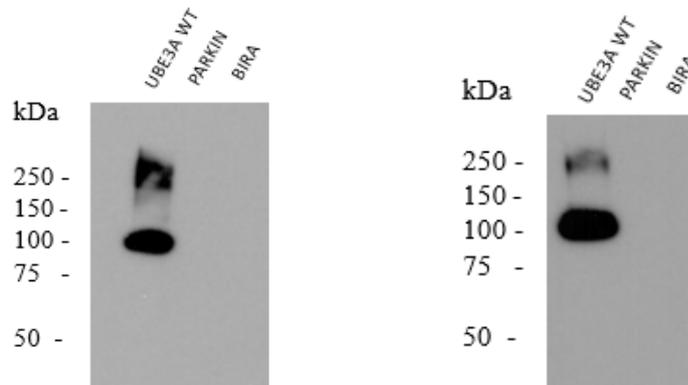


Figura 6. Resultado de inmunotransferencia de anti-UBE3A en los *inputs* de las diferentes condiciones de transfección. Réplica 1 (izquierda) réplica 2 (derecha).

Ensayo de ubiquitilación del material celular

Para llevar a cabo la validación del PSMD4 como sustrato directo del enzima UBE3A, es necesario observar la variación en los niveles de ubiquitilación del material intracelular. Se realizó un ensayo de visualización del material ubiquitilado en muestras de células transfectadas con Flag-ubiquitina, PSMD4-GFP y un enzima diferente en cada muestra de células:

- UBE3A: ligasa E3 de ubiquitina en estudio.
- Parkin: ligasa E3 de ubiquitina la cual participa también en las vías de degradación del sistema UPS.
- BirA: ligasa de biotina sin participación en el sistema UPS.

UBE3A (E6AP) es una ligasa E3 de ubiquitina por lo que, en caso de que PSMD4 fuera sustrato del enzima, esperaríamos encontrar una mayor ubiquitilación en el *elution* (PSMD4 purificado) de las células que sobreexpresaron UBE3A. Para detectar las proteínas ubiquitiladas de las muestras se utilizó el anticuerpo anti-Flag. Analizando los resultados (Figura 7), se pueden observar unos niveles mayores de ubiquitilación en las muestras de células que sobreexpresaron UBE3A.

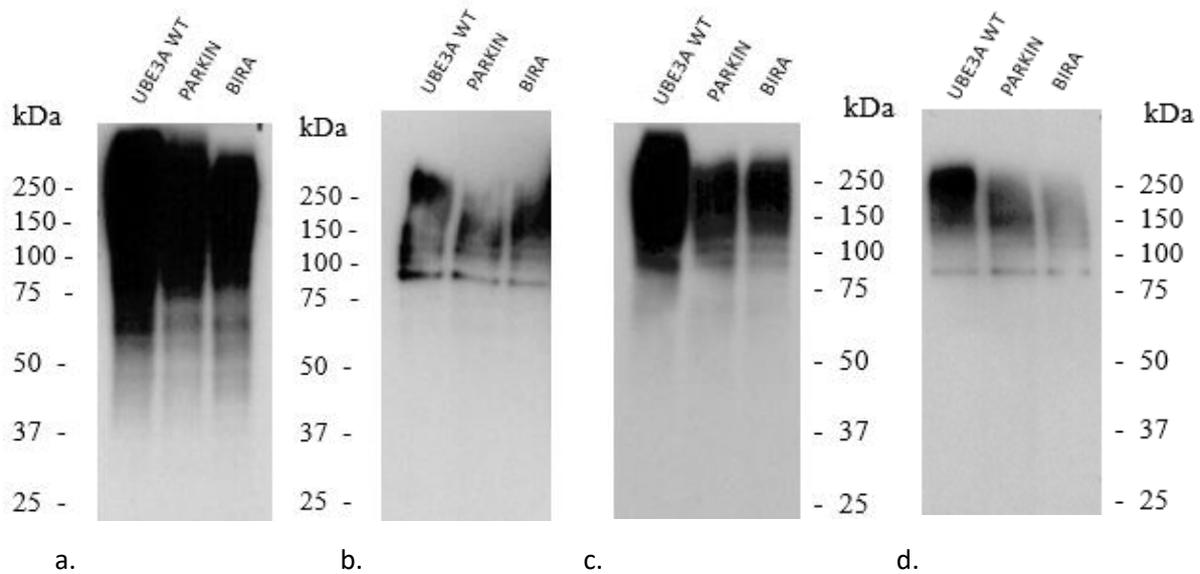


Figura 7. Resultado de inmunotransferencia de anti-Flag. **7a.** *Input* de réplica 1. **7b.** *Elution* de la réplica 1. **7c.** *Input* de réplica 2. **7d.** *Elution* de la réplica 2.

Se observaron en los *inputs* de ambas réplicas (Fig 7a y 7c), donde se encuentra todo el material intracelular, niveles mayores de ubiquitilación en la muestra de células que sobreexpresaron UBE3A. Debido a que no se esperaba esta diferencia en los *inputs*, se decidió realizar un nuevo ensayo para corroborar el aumento de material ubiquitilado.

Ensayo de los *Inputs*

Se efectuó de nuevo el experimento para obtener una tercera réplica de todas las muestras. En este caso no se aplicó el *pulldown* de GFP ya que el objeto de estudio fueron únicamente los *inputs*. Para descartar que el aumento de material ubiquitilado se debía a un aumento en el material celular, se utilizó el anticuerpo anti-tubulina. Además, se empleó el anticuerpo anti-UBE3A para confirmar su presencia en la muestra. Analizando los resultados observamos que los niveles de tubulina (flecha) (50kDa) son similares en las tres condiciones de transfección y que el enzima está presente en la muestra de células que sobreexpresaron UBE3A (Figura 8).

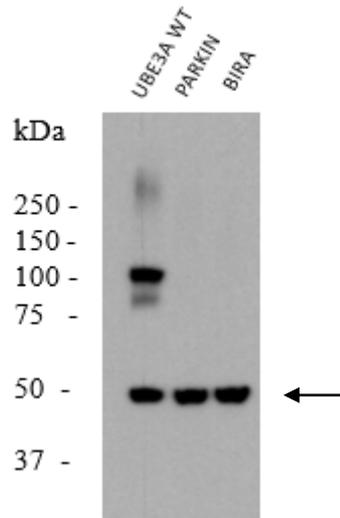


Figura 8. Resultado de inmunotransferencia de Anti-tubulina en las tres condiciones de transfección: sobreexpresión de UBE3A, Parkin y BirA.

Para detectar los elementos ubiquitilados se aplicaron dos anticuerpos: anti-Flag y anti-FK2. Ambos reconocen las sustancias mono y poliubiquitiladas y el anti-Flag detecta además la ubiquitina libre. En los resultados (Figura 9) se observa de nuevo un aumento de material ubiquitilado en la muestra de las células que sobreexpresaron UBE3A. Además, en la detección con anti-Flag (Fig. 9a) se observa también un aumento en el material ubiquitilado en la muestra de células que sobreexpresaron BirA. En el resultado de la detección con anti-FK2 (Fig. 9b) se aprecian además franjas en tamaños menores, podría tratarse de moléculas de ubiquitina formando agregados o productos de degradación del PSMD4.

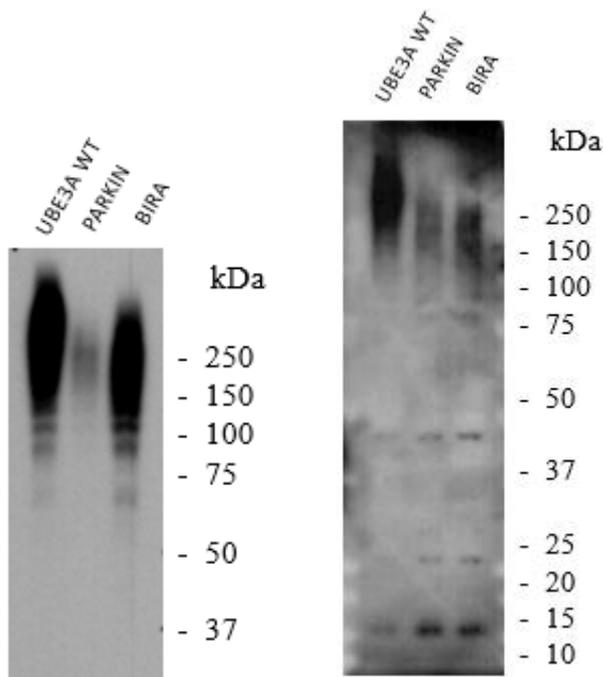


Figura 9. 9a. Resultado de inmunotransferencia de Anti-flag en las tres condiciones de transfección. **9b.** Resultado de inmunotransferencia de anti-FK2.

Discusión

Los síntomas principales del síndrome de Angelman son el resultado de una expresión o función deficiente del alelo *UBE3A* heredado por vía materna (Williams, C.A. et al. 2010). *UBE3A* se transcribe para producir una ligasa E3 de ubiquitina que funciona conjugando grupos de ubiquitinas con un conjunto único de proteínas (Huang, L. et al. 1999). Las proteínas ubiquitiladas son, en general, dirigidas a la degradación a través del sistema ubiquitina-proteosoma. Por lo tanto, se espera que el aumento del enzima *UBE3A* disminuya los niveles de sus sustratos (Sell, G.L y Margolis, S. S. 2015).

En la observación de la placa con las células en un microscopio de fluorescencia (Figura 4b) se verificó la presencia de PSMD4-GFP en el interior celular en una densidad similar en todas las muestras. Además, este resultado fue ratificado con una inmunotransferencia de anti-GFP (Figura 5) en la que la elución de la réplica 2 (Fig. 5c) mostraba una concentración menor de PSMD4 en la muestra de células que sobreexpresaron *UBE3A*. Esto puede deberse a una absorción menor del plásmido GFP-PSMD4 en la transfección, a un excesivo lavado de la resina de agarosa en el *pulldown* de GFP o a una mayor degradación por un aumento de la ubiquitinación del sustrato. Además, en la elución de la réplica 1 (Fig. 5b) se perciben franjas de menor tamaño (50 y 25 kDa) que pueden corresponderse con moléculas de sustrato degradado y moléculas libres de GFP. También se ratificó la presencia del enzima *UBE3A* en ambas réplicas mediante la utilización del anticuerpo anti-*UBE3A* (Figura 6).

Posteriormente, para llevar a cabo la validación del PSMD4 como sustrato directo de *UBE3A*, se examinó el material ubiquitilado en las distintas muestras. En caso de que PSMD4 fuera sustrato del enzima se esperaban unos niveles mayores de ubiquitilación en el sustrato purificado de las células que sobreexpresaron *UBE3A* de ambas réplicas. Al haber una mayor concentración de ligasa E3 de ubiquitina, se daría una mayor actividad de ubiquitilación y por tanto encontraríamos una señal mayor de sustrato ubiquitilado. En los resultados de las inmunotransferencias de anti-Flag (Figura 7) se confirma este aumento en los niveles de ubiquitilación en las eluciones (*elution*), sin embargo, también se observan niveles mayores en los extractos totales (*inputs*), los cuales no pueden ser explicados por el aumento de ubiquitilación del PSMD4 porque solamente constituye una pequeña proporción de todo el material celular.

A continuación, se realizó un estudio de los *inputs* para comprobar que el aumento de ubiquitilación observado no se correspondía con un mayor nivel de material celular. En las inmunotransferencias de anti-Flag (Figura 9a) y de anti-FK2 (Figura 9b) se aprecia de nuevo este incremento. Además, en los resultados obtenidos con anti-FK2 se observaron unas franjas en tamaños pequeños (15 kDa) que posiblemente corresponderían a agregados de ubiquitina. En la muestra de células que sobreexpresaron UBE3A, se encuentran niveles menores en esta franja lo que se relaciona también con que esas ubiquitinas sean utilizadas para ubiquitilizar otras proteínas. Para medir la cantidad de material celular en las muestras, se utilizó el anticuerpo anti-tubulina cuya inmunotransferencia (Figura 8) presentó niveles similares para las tres condiciones, por lo que el aumento del material celular no es la causa del incremento de la ubiquitilación.

En consecuencia, no se pudo aclarar la causa de este incremento. Una posibilidad sería que esté relacionado con una concentración mayor de moléculas de ubiquitina inicial debido a una transfección más eficiente del plásmido, lo que en un futuro proyecto podría probarse mediante la realización del experimento sin la utilización del plásmido Flag-Ub para observar únicamente la ubiquitina endógena de la célula. Sin embargo, sería poco probable que las transfecciones fuesen reproduciblemente mejores en presencia de UBE3A que en presencia de los otros enzimas. Parece mucho más probable que sea resultado de una inhibición en las vías de degradación del sistema ubiquitina-proteosoma como consecuencia de la sobreexpresión del UBE3A. Juanma Ramírez et al. (Lee, S. Y. et al. 2014) propusieron la regulación del proteosoma como uno de los principales roles llevados a cabo por el enzima Ube3a en *Drosophila*.

Conclusiones

Este trabajo tuvo como objetivo validar la proteína PSMD4 como sustrato del enzima UBE3A (E6AP). Tras el análisis de las variaciones en la ubiquitilación de la proteína PSMD4 en células HEK293T humanas bajo distintas condiciones de transfección (UBE3A WT, Parkin y BirA), podemos concluir en vista de los resultados obtenidos que PSMD4 se encuentra directamente ubiquitilado por el enzima UBE3A y que por tanto es uno de sus sustratos. En las personas que padecen síndrome de Angelman, el enzima UBE3A se encuentra ausente o no es funcional, por tanto, el conocimiento de sus proteínas-sustrato constituiría el punto de partida para el estudio de sus funciones y la búsqueda de mecanismos para sustituir su efecto. De esta forma, sería

posible el inicio de nuevas líneas de investigación dirigidas al desarrollo de nuevos tratamientos para paliar los síntomas de los pacientes o mejorar sus funciones cognitivas.

No tenemos pruebas suficientes para esclarecer las causas de la variación en los niveles de ubicuilitación en los *inputs* de las distintas muestras, sin embargo, mediante su análisis con anticuerpos quimioluminiscentes, hemos justificado que no está relacionada con el aumento del material celular. Además, hemos propuesto dos causas hipotéticas que pueden ser abordadas en estudios posteriores.

Bibliografía

Angelman, H. (1965). 'Puppet' children a report on three cases. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 7(6), 681-688.

Arndt, V., Rogon, C., & Höhfeld, J. (2007). To be, or not to be—molecular chaperones in protein degradation. *Cellular and molecular life sciences*, 64(19-20), 2525.

Boyar, F. Z., Whitney, M. M., Lossie, A. C., Gray, B. A., Keller, K. L., Stalker, H. J., Zori, R. T., Geffken, G., Mutch, J., Edge, P. J., Voeller, K. S., Williams, C. A. & Driscoll, D. J. (2001). A family with a grand-maternally derived interstitial duplication of proximal 15q. *Clinical Genetics*, 60(6), 421-43

Buiting, K., Barnicoat, A., Lich, C., Pembrey, M., Malcolm, S., & Horsthemke, B. (2001). Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 68(5), 1290-1294.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79(1), 13-21.

Ciechanover, A., & Schwartz, A. L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2727-2730.

Clayton-Smith, J., & Pembrey, M. E. (1992). Angelman syndrome. *Journal of medical genetics*, 29(6), 412.

Cook Jr, E. H., Lindgren, V., Leventhal, B. L., Courchesne, R., Lincoln, A., Shulman, C., Lord, C. & Courchesne, E. (1997). Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *American journal of human genetics*, 60(4), 928.

de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F. & Strouboulis, J. (2003). Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors

in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7480-7485.

Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry*, 78, 477-513.

Franco, M., Seyfried, N. T., Brand, A. H., Peng, J., & Mayor, U. (2011). A novel strategy to isolate ubiquitin conjugates reveals wide role for ubiquitination during neural development. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(5), M110-002188.

Gallastegui, N., & Groll, M. (2010). The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends in biochemical sciences*, 35(11), 634-642.

Gentile, J. K., Tan, W. H., Horowitz, L. T., Bacino, C. A., Skinner, S. A., Barbieri-Welge, R., Bauer-Carlin A, Beaudet A. L., Bichell T. J., Lee H. S., Waisbren S. E., Bird L. M., Peters S. U. & Sahoo, T. (2010). A neurodevelopmental survey of Angelman syndrome with genotype-phenotype correlations. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*, 31(7), 592.

Haas, A. L., & Rose, I. A. (1982). The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 257(17), 10329-10337.

Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324-332.

Hershko, A., Ciechanover, A., & Varshavsky, A. (2000). The ubiquitin system. *Nature medicine*, 6(10), 1073-1081.

Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P. M., Huibregtse, J. M., & Pavletich, N. P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, 286(5443), 1321-1326.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., & Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 2563-2567.

Kishino, T., Lalande, M., & Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature genetics*, 15(1), 70-73.

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*, 71(14), 2747-2758.

- Lossie, A. C., Whitney, M. M., Amidon, D., Dong, H. J., Chen, P., Theriaque, D., Hutson, A., Nicholls, R. D., Zori, R. T., Williams, C. A. & Driscoll, D. J. (2001). Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *Journal of medical genetics*, 38(12), 834-845.
- Nakao, M., Sutcliffe, J. S., Durtschl, B., Mutlurangura, A., Ledbetter, D. H., & Beaudet, A. L. (1994). Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Human molecular genetics*, 3(2), 309-315.
- Nakayama, K. I., & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 369-381.
- Robinson, W. P., Christian, S. L., Kuchinka, B. D., Peñaherrera, M. S., Das, S., Schuffenhauer, S., Malcolm, S., Schinzel, A., Hassold, T. J. & Ledbetter, D. H. (2000). Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clinical genetics*, 57(5), 349-358.
- Sell, G. L., & Margolis, S. S. (2015). From UBE3A to Angelman syndrome: a substrate perspective. *Frontiers in neuroscience*, 9.
- Tan, W. H., Bird, L. M., Thibert, R. L., & Williams, C. A. (2014). If not Angelman, what is it? a review of Angelman-like syndromes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 164(4), 975-992.
- Thibert, R. L., Conant, K. D., Braun, E. K., Bruno, P., Said, R. R., Nespeca, M. P., & Thiele, E. A. (2009). Epilepsy in Angelman syndrome: A questionnaire-based assessment of the natural history and current treatment options. *Epilepsia*, 50(11), 2369-2376.
- Tyedmers, J., Mogk, A., & Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(11), 777-788.
- Upadhyay, A., Joshi, V., Amanullah, A., Mishra, R., Arora, N., Prasad, A., & Mishra, A. (2017). E3 Ubiquitin Ligases Neurobiological Mechanisms: Development to Degeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10.
- Williams, C. A., Driscoll, D. J., & Dagli, A. I. (2010). Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genetics in Medicine*, 12(7), 385-395.