Appendices

English summary
Dutch summary
Curriculum vitae
PhD portfolio
Publication list
List of abbreviations
Dankwoord

English Summary

The overall objective of this thesis is to try and understand the role of the Ubiquitin Proteasome pathway in two neurodevelopmental disorders. The Ubiquitin proteasome pathway is known for tagging proteins destined for degradation. The ubiquitination of a protein is a three-step process initiated with the E1 ubiquitin-activating enzyme. In the second step the activated ubiquitin is transferred to the E2 conjugating enzyme. Finally the E2 enzyme ubiquitin complex than transfers the activated ubiquitin to an E3 ligase-substrate complex. This thesis focuses on the UBE2A and UBE3A protein; both these proteins are associated with neurodevelopmental disorders. UBE2A is an E2 conjugating enzyme mutation/deletion cause UBE2A deficiency syndrome. UBE3A is an E3 ubiquitin ligase and mutation/deletion cause Angelman syndrome.

UBE2A deficiency syndrome (also known as X-linked intellectual disability type Nascimento) is an intellectual disability syndrome characterized by prominent dysmorphic features, impaired speech and often epilepsy. The syndrome is caused by Xq24 deletions encompassing the UBE2A (HR6A) gene or by intragenic UBE2A mutations. UBE2A encodes an E2 ubiquitin conjugating enzyme involved in DNA repair and female fertility. A recent study in Drosophila showed that dUBE2A binds to the E3 ligase Parkin, which is required for mitochondrial function and responsible for juvenile Parkinson's disease. In addition, these studies showed impairments in synaptic transmission in dUBE2A mutant flies. However, a causal role of UBE2A in cognitive deficits has not yet been established. In Chapter 2 we show that *Ube2a* knockout mouse has a major deficit in spatial learning tasks, whereas other tested phenotypes, including epilepsy and motor coordination, were normal. Results from electrophysiological measurements in the hippocampus showed no deficits in synaptic transmission nor in the ability to induce long-term synaptic potentiation. However, a small but significant deficit was observed in mGLUR-dependent long-term expression, a pathway previously implied in several other mouse models for neurodevelopmental disorders. Our results indicate a causal role of UBE2A in learning and mGLUR-dependent long-term depression, and further indicate that the *Ube2a* knockout mouse is a good model to study the molecular mechanisms underlying UBE2A deficiency syndrome.

Angelman syndrome (AS) is a severe neurodevelopmental disorder characterized by intellectual disability, happy demeanor, seizures and movement and balance disorders. The prominent movement and balance impairments are widely considered to be due to defects of cerebellar origin. In **Chapter 3** of this thesis, using the cerebellar-specific vestibulo-ocular reflex (VOR) phase-reversal paradigm, we determined that cerebellar function is only mildly impaired in the *Ube3a*$^{m-/p+}$ mouse model of AS. VOR phase-reversal learning was singularly impaired in these animals and correlated with reduced tonic inhibition between Golgi cells and granule cells. Purkinje cell physiology, in contrast, was normal in AS mice as shown by synaptic plasticity and spontaneous firing properties that resembled those of controls. Accordingly, neither VOR phase-reversal learning nor locomotion was impaired following selective deletion of *Ube3a* in Purkinje cells. However, genetic normalization of αCaMKII inhibitory phosphorylation fully rescued locomotor deficits despite failing to improve cerebellar learning in AS mice, suggesting extra cerebellar circuit involvement in locomotor learning. We confirmed this hypothesis through cerebellum-specific reinstatement of *Ube3a*, which ameliorated cerebellar learning deficits but did not rescue locomotor deficits. This double dissociation of locomotion and cerebellar phenotypes strongly suggests that the locomotor deficits of AS mice do not arise from impaired cerebellar cortex function.

Being an E3 ligase UBE3A should bind and tag proteins for degredation. Recently *Promyelocytic Leukemia (PML)* was identified as a target of the ubiquitin ligase UBE3A, we hypothesized that either reduced or increased expression of PML may result in cognitive deficits. *PML* is a tumor suppressor gene associated with PML nuclear bodies, which can be found in almost all tissues, and is deregulated in many cancer types. In addition, PML has been shown to be important for normal development of the neocortex. To test this directly, in Chapter 5 we assessed spatial learning and memory, reversal learning and context discrimination in heterozygous and homozygous *Pml* mouse mutants. In addition we tested the role of PML in synaptic plasticity. We found that homozygous or heterozygous loss of PML does not result in spatial learning or synaptic plasticity deficits. To test whether PML levels are increased in the brain of a mouse model of AS, and whether reducing PML expression in AS mice can rescue the behavioral phenotype of AS mice, we crossed heterozygous *Pml* mice with *Ube3a* mice. However, we did not find increased levels of PML in AS mouse brains. Moreover, reducing PML levels did not affect the AS phenotype.

In conclusion, our results suggest that PML is not essential for normal spatial learning or hippocampal synaptic function in mice, and does not play a significant role in the pathophysiological mechanism underlying AS.

AS results from loss of function of the maternal ubiquitin protein ligase E3A (UBE3A) allele. Due to neuron-specific imprinting, the paternal *Ube3a* copy is silenced. Previous studies in murine models have demonstrated that strategies to activate the paternal *Ube3a* allele are feasible; however, a recent study showed that pharmacological *Ube3a* gene reactivation in adulthood failed to rescue the majority of neurocognitive phenotypes in a murine AS model. In Chapter 6 of this thesis, we performed a systematic study to investigate the possibility that neurocognitive rescue can be achieved by reinstating *Ube3a* during earlier neurodevelopmental windows. We developed an AS model that allows for temporally controlled Cre-dependent induction of the maternal *Ube3a* allele and determined that there are distinct neurodevelopmental windows during which *Ube3a* restoration can rescue AS-relevant phenotypes. Motor deficits were rescued by *Ube3a* reinstatement in adolescent mice, whereas anxiety, repetitive behavior, and epilepsy were only rescued when *Ube3a* was reinstated during early development. In contrast, hippocampal synaptic plasticity could be restored at any age. Together, these findings suggest that *Ube3a* reinstatement early in development may be necessary to prevent or rescue most AS-associated phenotypes and should be considered in future clinical trial design.

Taken together these results have provided novel insights into the pathophysiology of Angelman syndrome and UBE2A deficiency syndrome, and open up new research opportunities to seek treatments for these disorders.

Dutch Summary

In dit proefschrift wordt de rol van de ubiquitine-proteasoom route in twee erfelijke ontwikkelingsstoornissen beschreven. De ubiquitine-proteasoom route identificeert en markeert eiwitten die bestemd zijn voor afbraak. De ubiquitinering van een eiwit is drie-staps proces dat start met een E1-ubiquitine-activerend enzym. In de tweede stap wordt geactiveerde ubiquitine overgebracht naar het E2-conjugerende enzym. Tenslotte brengt het E2 enzym complex de geactiveerde ubiquitine over op de E3 ligase substraat-complex. Dit proefschrift richt zich op het UBE2A en UBE3A eiwit; Beide eiwitten zijn geassocieerd met neurologische ontwikkelingsstoornissen. UBE2A is een E2 enzym, en inactiverende mutaties in het UBE2A gen veroorzaken UBE2A deficiëntie syndroom. UBE3A is een E3 ubiquitine ligase en inactiverende mutaties in het UBE3A gen veroorzaken Angelman syndroom.

UBE2A deficiëntie syndroom (ook bekend als Nascimento-type X-gebonden verstandelijke handicap) is een syndroom dat gekenmerkt wordt door prominente dysmorfie, verstoorde spraak en vaak epilepsie. Het syndroom wordt veroorzaakt door Xq24 deleties die het UBE2A (HR6A) gen omvatten of door mutaties in het UBE2A gen zelf. UBE2A codeert voor een E2 enzym, dat betrokken is bij DNA-herstel en vrouwelijke vruchtbaarheid. Een recente studie toonde aan dat in Drosophila dUBE2A bindt aan de E3 ligase Parkin, dat nodig is voor mitochondriale functie en verantwoordelijk is voor de juveniele vorm van Parkinson. Bovendien toonden deze studie stoornissen in synaptische transmissie aan in dUBE2A mutant vliegen. Echter, een causale rol van UBE2A in cognitieve dysfunctie is nog niet vastgesteld. In hoofdstuk 2 laten we zien dat de *Ube2a* muismutant een probleem heeft met ruimtelijke leertaken, terwijl andere geteste fenotypes, zoals epilepsie en motorische coördinatie, allemaal normaal waren. Elektrofysiologische metingen in de hippocampus vertoonden geen gebreken in synaptische transmissie of het vermogen om langdurige synaptische potentiëring te induceren. Er werd een klein maar significant verschil waargenomen in mGluR-afhankelijke synaptische depressie, een defect eerder geïmpliceerd in verscheidene andere muismodellen voor ontwikkelingsstoornissen. Onze resultaten wijzen op een causale rol van UBE2A voor leren en mGluR-afhankelijke synaptische depressie, en daarmee tonen we aan dat het *Ube2a* muismodel een goed model is om de moleculaire mechanismen UBE2A deficiëntiesyndroom te bestuderen.

Angelman syndroom (AS) is een ernstige neurologische aandoening gekenmerkt door een verstandelijke handicap, epileptische aanvallen en bewegings- en evenwichtsstoornissen. De geldende opinie is dat de prominente bewegingen en evenwichtsstoornissen een cerebellaire oorsprong hebben. In hoofdstuk 3 van dit proefschrift, hebben we met behulp van het cerebellum-specifieke Vestibulo-oculaire reflex (VOR) paradigma vastgesteld dat de cerebellaire functie slechts mild verstoord is in het *Ube3a* muismodel van AS. Het leren van de VOR fase verschuiving was echter duidelijk verstoord in deze dieren en hangt mogelijk samen met een verminderde tonische remming van de Golgi cellen op de Granulaire cellen. Purkinje celfysiologie zoals synaptische plasticiteit en spontaan vuurgedrag was normaal in deze muizen. en een selectieve verwijdering van *Ube3a* gen in Purkinje cellen had geen effect op het leren van de VOR fase verschuiving noch op de motoriek. Dit geeft aan dat de Purkinje cellen geen noemenswaardige rol spelen in de motorische en cerebellaire problemen van *Ube3a* muizen. De motorische problemen konden verholpen worden door normalisering van αCaMKII activiteit, maar dit had geen effect op de problemen met het leren van de VOR fase verschuiving. Dit suggereert dat een extra-cerebellair circuit betrokken is bij de motor problematiek. We bevestigden deze hypothese door middel van cerebellum-specifiek herstel van *UBE3A*, die de problemen met het cerebellaire leerparadigma (VOR fase verschuiving) verbeterde, maar geen effect had op de problemen met het bewegingsapparaat. Deze dubbele dissociatie van de motoriek en cerebellaire fenotypes wijst er sterk op dat de motorische problemen van AS muizen niet het gevolg zijn van een verminderde cerebellaire (cortex) functie.

Omdat UBE3A een E3 ligase is, kan dit enzym 'target' eiwitten markeren voor afbraak. Onlangs werd *Promyelocytic leukemie (PML)* geïdentificeerd als een 'target' van de ubiquitine ligase UBE3A. Hierdoor veronderstelden we dat een verminderde afbraak van PML kan leiden tot cognitieve problemen. *PML* is vooral bekend als een tumor-suppressor gen. Het eiwit is geassocieerd met PML-bevattende eiwit aggregaten die gebonden zijn aan de nucleaire matrix. Deze PML aggregaten zijn aanwezig zijn in bijna alle weefsels en ontregeld zijn in vele kankersoorten. Bovendien is aangetoond dat PML van belang is voor de normale ontwikkeling van de neocortex. Om dit direct te testen, hebben we in hoofdstuk 5 de cognitieve vaardigheden van heterozygote en homozygote *Pml* muismutanten getest. Daarnaast hebben we de rol van PML in synaptische plasticiteit getest. We vonden dat homozygoot of heterozygoot verlies van PML

niet leidt tot leerproblemen of problemen met synaptische plasticiteit. Om te testen of vermindering van het PML eiwit in AS muizen de gedragsfenotype van AS muizen kan verbeteren, brachten we de heterozygote *Pml* mutatie aan in *Ube3a* muizen. Echter, het verminderen van PML eiwit had geen invloed op het AS fenotype. Concluderend suggereren onze resultaten dat PML geen belangrijke rol speelt in de door ons gebruikte leertesten, en ook geen belangrijke rol speelt in het pathofysiologische mechanisme dat ten grondslag ligt aan AS.

AS wordt specifiek veroorzaakt door mutaties in het maternaal overgeërfde UBE3A gen. Als gevolg van neuron-specifieke imprinting, is de paternale UBE3A kopie niet actief. Eerdere studies in muismodellen hebben aangetoond het mogelijk is om het paternaal overgeërfde *Ube3a* gen te activeren. Echter uit een recente studie is gebleken dat farmacologische *Ube3a* gen activatie op volwassen leeftijd de meeste neurocognitieve fenotypes van een AS muismodel niet kan herstellen. In hoofdstuk 6 van dit proefschrift hebben we een systematische studie gedaan, om te kijken of er neurocognitief herstel kan worden bereikt door het *Ube3a* gen tijdens de ontwikkeling te activeren. We hebben daartoe een AS model ontwikkeld waarmee we het *Ube3a* gen kunnen activeren op ieder gewenst moment. We vonden dat er verschillende periodes zijn waarbij *Ube3a* activatie bepaalde fenotypes kan verbeteren. Het motorische fenotype was het langst herstelbaar. Op cellulair nivo vonden we dat hippocampale synaptische plasticiteit op iedere geteste leeftijd hersteld kon worden. Tezamen suggereren deze bevindingen dat *UBE3A* activatie idealiter zo vroeg mogelijk moet plaatsvinden om een groot effect te sorteren.

De in dit proefschrift beschreven bevindingen hebben ons meer inzicht gegeven in de pathofysiologie van UBE2A deficiëntie syndroom en Angelman syndroom, en we hopen dat deze resultaten zullen bijdragen tot het ontwikkelen van een therapie voor deze ernstige aandoeningen.

Curriculum Vitae

Personalia

Naam:	Caroline Frédérique Bruinsma
Geslacht:	Vrouw
Geboortedatum:	09-12-1985
Geboorteplaats:	Delft
Nationaliteit:	Nederlandse

Opleidingen:

09/2009 tot 02/2014	*Promotie traject: Neurowetenschappen aan het Erasmus MC*
09/2008 tot 09/2009	*Honours exchange master (VU en EUR)*
09/ 2007 tot 09/2009	*Master of Neuroscience aan het Erasmus MC*
09/2004 tot 03/2016	*Geneeskunde aan het Erasmus MC (Doctoraal 2008)*
	Keuzevakken:
	Forensische psychiatrie (ter afsluiting review geschreven)
	Bloedstolling (ter afsluiting review geschreven)
09/1998 tot 09/2004	Twee-talig Atheneum te Oss
	Vakkenpakket: Standaard + Natuur en Gezondheid: (Biologie 1+2, Wiskunde B1, Natuurkunde 1, Scheikunde 1) + Economie 1 + Management & Organisatie + International Baccalaureate (advanced English)

Werkervaring

03/2014 tot 02/2016	Co-assistent
09/2009 tot 02/2014	Onderzoeker in opleiding
09/2007 tot 09/2009	Master stage

Extra Curriculair:

9/2012 tot heden	Commandante Do-club Roterdamsche Manege
09/2009 tot 09/2011	ONWAR retraite commissie organisatie
2/2005 tot 2/2009	Penningmeester Studentenschermvereniging Tyr
12/2008	VU: Cursus in-vivo Neurophysiology
09/2008	VU: Cursus Advanced Neurogenomics
8/2006 tot 8/2007	Jaarvertegenwoordiging Geneeskunde jaar 3 Voorzitter

Talenkennis:

Nederlands:	moedertaal
Engels:	gesproken en geschreven vloeiend (English A2 Harford Level)
Duits:	gesproken en geschreven voldoende
Frans:	gesproken en geschreven matig
Italiaans:	gesproken en geschreven matig

PhD portfolio

Name PhD student:	Caroline Frédérique Bruinsma
Erasmus MC Department:	Neurosciences
Research school:	ONWAR
PhD period:	2009-2014
Promotor:	Prof.dr. Ype Elgersma

	Year	Workload
1. PhD training		
General academic skills		
- Art. 9 laboratory animal science	2009	1.5
Specific courses		
- SNP's and human disease	2010	1.0
- Poster making course	2011	1.0
(inter)national conferences		
Neuroscience department seminar series Rotterdam, The Netherlands	2007-2014	2.0
8th Dutch Endo-neuro-psycho meeting (oral) Doorwerth, The Netherlands	2009	0.5
16th Annual ONWAR PhD meeting (poster) Zeist, The Netherlands	2009	1.0
17th Annual ONWAR PhD meeting (poster) Zeist, The Netherlands	2010	1.0
7th FENS Forum of European Neurosciences, Amsterdam, The Netherlands	2010	1.0
18th Annual ONWAR PhD meeting (poster pitch) Zeist, The Netherlands	2011	1.0
19th Annual ONWAR PhD meeting (oral) Zeist, The Netherlands	2012	1.0
Society for neuroscience annual meeting (poster) San Diego, USA	2014	1.5
2. Teaching		
Medical curriculum: 'Functional anatomy of the neuromuscular system'	2009-2013	10

Neurocscience master summerschool	2009-2013	2
Workshop mice behavior	2010-2013	2
Minor kinderneurologie	2013	0.5

Supervising

High school thesis	0.5
Bachelor thesis S. Savelberg	1.0
Bachelor thesis L. de Vreede	1.0
Master thesis J. Hakonen	1.5

Other

Organizing committee 16th and 17th Annual ONWAR PhD meeting	4

A

Publication list

Bruinsma CF, Savelberg SM, Kool MJ, Jolfaei MA, Van Woerden GM, Baarends WM, Elgersma Y. An essential role for UBE2A/HR6A in learning and memory and mGLUR-dependent long-term depression. Hum Mol Genet. (2016) 25 (1): 1-8

Bruinsma CF, Schonewille M, Gao Z, Aronica EM, Judson MC, Philpot BD, Hoebeek FE, van Woerden GM, De Zeeuw CI, Elgersma Y. Dissociation of locomotor and cerebellar deficits in a murine Angelman syndrome model. J Clin Invest. (2015) 125(11): 4305-15

Goorden SM, Abs E, Bruinsma CF, Riemslagh FW, van Woerden GM, Elgersma Y. Intact neuronal function in Rheb1 mutant mice: implications for TORC1-based treatments. Hum Mol Genet. (2015) 24(12): 3390-8.

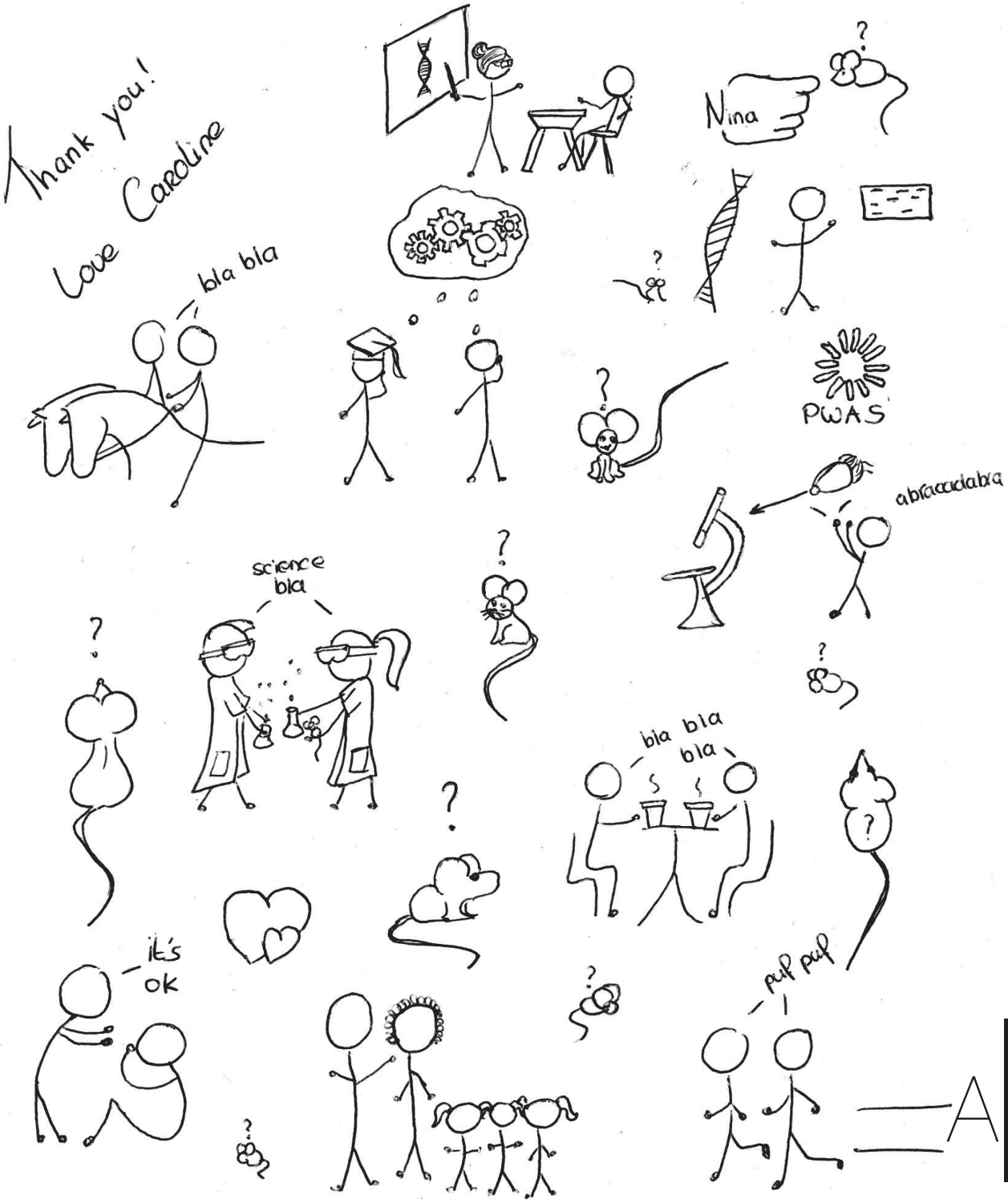
Silva-Santos S, Bruinsma CF, van Woerden GM, Mientjes E, Jolfaei MA, Distel B, Kushner SA, Elgersma Y. Ube3a reinstatement identifies distinct developmental windows in a murine Angelman syndrome model. J Clin Invest. (2015) 125(5):2069-76.

Abs E, Goorden SM, Schreiber J, Overwater IE, Hoogeveen-Westerveld M, Bruinsma CF, Aganović E, Borgesius NZ, Nellist M, Elgersma Y. TORC1-dependent epilepsy caused by acute biallelic Tsc1 deletion in adult mice. Ann Neurol. (2013) 74(4): 569-79.

List of abbreviations

Abbreviation	*Description*
ABC	Avidin-biotin-immunoperoxidase complex
ACSF	Artificial cerebral spinal fluid
AD	Alzheimer disease
ADP	Adenosine diphosphate
AKT	v-Akt murine thymoma viral oncogene homologue 1
ALS	Amyloid lateral sclerosis
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	Analysis of variance
APE1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1
APF-1	ATP-dependent proteolysis factor 1
ARC	Activity-regulated-cytoskeleton associated protein
AS	Angelman syndrome
ASO	Anti-sense oligonucleotides
ATF4	Activating transcription factor 4
ATP	Adenosine triphosphate
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
CaMK2A	Alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2
CF	Climbing fiber
CREB	cAMP response element binding protein
CS	Conditioned stimulus
CV	Coefficient of variation
DNA	Deoxyribonucleic acid
DUB	Deubiquitinating enzyme
E6-AP	E6 associated protein
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEG	Electroencephalogram
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMG	Electromyography
eNaC	Endothelial Na+ channel
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinases
FBXO40	F-box protein 40
FC	Fear conditioning
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GCL	Granule cell layer
HD	Huntington disease
HECT	Homologous to E6AP carboxyl-terminus
HIF1-α	Hypoxia inducible factor 1-α
HPV	Human papilloma virus
HR6A	Human homologue to RAD6A
HR6B	Human homologue to RAD6B
ID	Intellectual disability
IHC	Immunohistochemistry
KCC2	Potassium-chloride contransporter
KOS	Kaufman oculocerebrofacial syndrome
Limk1	Lysophospholipase 1
L-LTP	Late long term potentiation
LTD	Long term depression

LTF	Long term facilitation
LTP	Long term potentation
Mdm2	Mouse double minute 2
mGLuR	Metabotropic glutamate receptor
ML	Molecular layer
MOV10	Moloney leukemia virus 10
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NAC1	Nucleus accumbens-associated protein 1
NEDD4	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NF-kB	Nuclear-factor kB
NICHD	National institute of child health and human development
NMDA	N-Methyl-D-aspartic acid
OCD	Obsessive compulsive disorder
OKR	Optokinetic reflex
PARK	Parkinsonism associated deglycase
PCL	Purkinje cell layer
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD	Parkinson disease
PF	Parallel fiber
PKA	cAMP-dependent protein kinase A
PML	Promyelocytic leukemia
PP1	serine/threonine protein phosphatase
PPF	paired-pulse facilitation
PSD	Post-synaptic density
PSD95	Post-synaptic density protein 95
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
RFWD2	Ring finger and WD repeat domain 2
RING	Really interesting new gene
RISC	RNA induced silencing complex
RPT6	Proteasome regulatory particle
SEM	Standard error of the mean
SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein N
SNURF	SNRPN upstream reading frame
TSC	Tuberous sclerosis 1
UBE2A	Ubiquitin protein ligase E2A
UBE3A	Ubiquitin protein ligase E3A
UBE3A-ATS	Ubiquitin ligase E3A antisense transcript
UBIP	Ubiquitous immunopoietic polypeptide
UCH	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase
UCH-L3	Ubiquitin C-terminal hydrolase L3
UFD2	Ubiquitin fusion degradation protein 2
UPD	Uniparental disomy
UPP	Ubiquitin proteasome pathway
US	Unconditioned stimulus
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
VOR	Vestibular ocular reflex
VVOR	Visually enhanced VOR
WT	Wild type
YFP	Yellow fluorescent protein


Thank you!
Love Caroline
bla bla
Nina
PWAS
abracadabra
science bla
bla bla bla
it's ok
pup pup