

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 761**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2017 PCT/IL2017/050876**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.02.2018 WO18029682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2017 E 17838924 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023 EP 3497231**

54 Título: **Sistemas bacterianos para el análisis de polipéptidos ubiquitilados**

30 Prioridad:

08.08.2016 US 201662371881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.04.2024

73 Titular/es:

**TECHNOLOGY INNOVATION MOMENTUM FUND
(ISRAEL) LIMITED PARTNERSHIP (100.0%)
Ramot at Tel-Aviv University Ltd., P.O. Box 39296
6139201 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

PRAG, GALI

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 965 761 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistemas bacterianos para el análisis de polipéptidos ubiquitilados

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención versa sobre sistemas bacterianos para el análisis de polipéptidos ubiquitilados.

5 La ubiquitina (Ub) desempeña un papel fundamental en numerosos aspectos de los procesos celulares. Por lo tanto, hay aberraciones en el sistema de la Ub implicadas en gran número de patologías, incluyendo diversas formas de cáncer, como el cáncer de mama y el de colon, enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, y enfermedades infecciosas, como el VIH y el Ébola. En consecuencia, existe una necesidad crítica de una comprensión detallada del sistema de la Ub. Aunque ha habido avances significativos en la comprensión del proceso de ubiquitinación, se sabe mucho menos sobre los procesos posteriores. Estos incluyen el reconocimiento del sustrato mediante interacciones enzimáticas específicas en el sistema de la Ub, e interacciones específicas entre estas enzimas y sus sustratos. En los seres humanos, por ejemplo, hay 2 enzimas activadoras de la Ub E1, 34 enzimas conjugadoras de la Ub y más de 600 ligasas E3 de Ub. Estas enzimas actúan sobre presumiblemente varios miles de sustratos proteicos, en donde la especificidad se logra principalmente por las interacciones E2:E3 y E3:Sustratos.

15 Otro factor que impide los esfuerzos de los investigadores por caracterizar completamente las cascadas de Ub es la presencia de enzimas desubiquitinantes (DUB) que invierten rápidamente la señal de ubiquitinación. La duración de la vida media de las proteínas ubiquitiladas es, por tanto, sumamente corta. Específicamente, se ha demostrado que aproximadamente 100 DUB que existen invierten la modificación de manera altamente específica.

20 La técnica antecedente incluye Keren-Kaplan y otros, The EMBO Journal (2012) 31, 378-390 y Su y otros, J Immunol 2006;177;7559-7566.

La referencia TIMURS MACULINS Y OTROS: "A Generic Platform for Cellular Screening Against Ubiquitin Ligases", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, nº 1, 8 de enero de 2016 da a conocer un cribado farmacológico para detectar moduladores de ubiquitina ligasas de actividad autocatalítica en las células.

25 La referencia US 2007/059731 A1 da a conocer un procedimiento de selección que usa la complementación de fluorescencia mediada por ubiquitina (UbFC, por sus siglas en inglés) en células. Se genera una señal detectable mediante la complementación de los fragmentos primero y segundo de la proteína fluorescente.

Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de identificación de un agente que regula la actividad o la cantidad de una enzima ubiquitinante que comprende:

30 (a) poner en contacto una célula bacteriana con el agente, produciendo la célula bacteriana una señal detectable o seleccionable que se correlaciona con el nivel de ubiquitinación de un sustrato, siendo modificada genéticamente dicha célula bacteriana para que exprese:

(i) dicha enzima ubiquitinante;

35 (ii) la ubiquitina unida a un primer fragmento polipeptídico; y

(iii) dicho sustrato unido a un segundo fragmento polipeptídico, asociándose el primer fragmento polipeptídico con dicho segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación de dicho sustrato; y

40 (b) medir el nivel o la tasa de acumulación de la señal detectable o seleccionable, siendo indicativo un cambio en el nivel con respecto al nivel en ausencia del agente de un agente que regula la actividad o la cantidad de la enzima ubiquitinante.

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar si una enzima es capaz de ubiquitinar un sustrato de prueba, comprendiendo el procedimiento:

45 (a) expresar la enzima en una célula bacteriana;

(b) expresar la ubiquitina en la célula bacteriana, estando unida la ubiquitina a un primer fragmento polipeptídico;

50 (c) expresar el sustrato de prueba en la célula bacteriana, estando unido el sustrato a un segundo fragmento polipeptídico, asociándose el primer fragmento polipeptídico con el segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación del sustrato de prueba; y

(d) analizar la presencia del polipéptido indicador en la célula bacteriana, siendo la presencia del polipéptido indicador indicativa de que la enzima es capaz de ubiquitinar el sustrato de prueba.

ES 2 965 761 T3

Según una realización, la enzima ubiquitinante es una ubiquitina ligasa E3.

Según otra realización, la ubiquitina ligasa E3 se selecciona del grupo constituido por Siah2, Smurf1, MDM2, BRCA1, PARKIN, UBE3A, TRIM5, NEDD4, UBR5 y Huwe1.

5 Según una realización, la ubiquitina ligasa E3 se selecciona del grupo constituido por Siah2, PARKIN, Smurf1, MDM2, BRCA1, MURF1, TRIM32 ITCH, UBE3B y UBE3A.

Según una realización, el sustrato se selecciona del grupo constituido por PHD3, SPROUTY2, Mitofusina 1, 2, MIRO, NEMO, proteínas SMAD, Tpr-I, P53, S5A, HHR23, EPHEXIN5, ARC, PPAR α , ciclina-B, Cdc25C y Calmodulina.

Según una realización, el agente regulador efectúa una regulación a la baja.

Según una realización, el agente regulador efectúa una regulación al alza.

10 Según una realización, el polipéptido indicador comprende un polipéptido seleccionable.

Según una realización, el polipéptido seleccionable es un polipéptido escindido de resistencia a los antibióticos.

Según una realización, el polipéptido de resistencia a los antibióticos es DHFR o lactamasa B.

Según una realización, el primer fragmento polipeptídico está unido a la ubiquitina a través de un conector.

Según una realización, el segundo fragmento polipeptídico está unido al sustrato a través de un conector.

15 Según una realización, el polipéptido indicador es una señal detectable ópticamente.

Según una realización, el polipéptido detectable se selecciona del grupo constituido por un polipéptido fluorescente escindido, un polipéptido luminiscente escindido y un polipéptido fosforescente escindido.

Según una realización, el análisis se efectúa mediante complementación bimolecular de una proteína de resistencia a los antibióticos.

20 Según una realización, el procedimiento comprende, además, la expresión de todas las enzimas de la cascada de enzimas ubiquitinantes de la enzima.

Según una realización, el polipéptido indicador es un polipéptido detectable o un polipéptido seleccionable.

Según una realización, la enzima se selecciona del grupo constituido por ligasa E3, enzima activadora de la ubiquitina E1 y enzima conjugadora de la ubiquitina E2.

25 Según una realización, el sustrato de prueba comprende una ligasa E3 o Rpn10.

Según una realización, la enzima es una enzima activadora de la ubiquitina E1. El procedimiento comprende, además, la expresión en la célula bacteriana de una enzima conjugadora de la ubiquitina E2 y de la ubiquitina ligasa E3.

30 A no ser que se defina algo distinto, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la puesta en práctica o la prueba de realizaciones de la invención pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen procedimientos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, los procedimientos y los ejemplos son únicamente ilustrativos.

35 Breve descripción de las varias vistas de los dibujos

En los dibujos:

Figuras 1A-D: Planteamiento de genética bacteriana para la sección de proteínas ubiquitiladas.

40 (A) Un esquema demuestra el sistema construido para la sección en bacterias. El aparato de ubiquitinación se expresa a partir de dos plásmidos compatibles, cada uno de los cuales alberga una resistencia a los antibióticos y un origen de replicación diferentes, facilitando la cotransformación y la selección de los vectores con independencia de la ubiquitinación. pND-Ub denota el fragmento N-terminal de la DHFR fusionado con la Ub. pCD-Sub denota el fragmento C-terminal de la DHFR fusionado con un sustrato de ubiquitinación. Un sistema completo confiere resistencia a los antibióticos y crecimiento bacteriano en presencia de trimetoprima (TRIM). El aspa roja representa bacterias que expresan un sistema incompleto y que, por lo tanto, no son resistente a los medios selectivos.

45

ES 2 965 761 T3

- (B) Demuestra la funcionalidad del sistema. Se logra la resistencia al antibiótico (10 µg/ml de TRIM) únicamente cuando se coexpresa una cascada de ubiquitinación completa de Vps9 que incluye Uba1 de trigo, Ubc4 de levadura y Rsp5 de levadura con fragmentos escindidos de DHRF fusionados a Ub y Vps9.
- 5 (C) Muestra que la ligasa E3 afín (Rsp5) es necesaria para la ubiquitinación de Vps9 y la resistencia a los antibióticos.
- (D) La interacción no covalente entre Vps9 y Ub no confiere resistencia para concentraciones de TRIM por encima de 0,1 µg/ml. Ubiquitinación se refiere a la cascada de ubiquitinación completa; unión se refiere a la cascada de ubiquitinación incompleta ($\Delta E1, \Delta E2$).
- 10 Figuras 2A-G: Identificación y caracterización de NleG6-3 as ligasa E3.
- (A) Las bacterias que coexpresan la fusión de cDHFR a las ligasas E3 Rsp5 (representativas de la familia HECT) con su aparato afín de ubiquitinación, que incluye Ubc4, son etiquetadas como 'completas'. Se indican las delecciones de E1, E2 o Ub.
- 15 (B) Las bacterias que coexpresan la fusión de cDHFR a las ligasas E3 Siah2 (representativas de la familia RING) con su aparato afín de ubiquitinación, que incluye Ubch5a, son etiquetadas como 'completas'. Se indican las delecciones de E1, E2 o Ub o la sustitución de la Ubch5a con Cdc34. El panel de la derecha muestra la inhibición de Siah2 mediante menadiona.
- 20 (C) Muestra el alineamiento de secuencias derivado de la búsqueda con PSI-BLAST usando CHIP humana como sonda contra el proteoma EHEC. ECs3488 CSLYDKDTLVQLVETGGAHPLSREPITESMIMR - SEQ ID NO: 1; ECs2156 CTLFDDAAFSRLVGEGLPHPLTREPITASIIVK - SEQ ID NO: 2; HS_CHIP ITYDRKDIEEHLQVRVGHFDPVTRSPLTQEQLIP - SEQ ID NO: 3. La secuencia de longitud máxima de la NleG6-3 ligasa es la definida por la SEQ ID NO: 4.
- 25 (D) Escaneo de E2 de levadura para la ligasa E3 ECs3488 (NleG6-3).
- (E) Autoubiquitinación de NleG6-3 por Ubch5b/c humana.
- 30 (F) Muestra un modelo, basado en la homología, de NleG6-3 (anaranjada) superpuesta a la estructura de EHEC NleG2-3 (azul) y al complejo humano CHIP:UbchSb gris y magenta (respectivamente). Con acercamiento a la interfaz prevista con realce de los residuos de unión críticos.
- (G) Empleo del sistema de selección para el análisis mutacional de la interfaz E2:E3 prevista.
- 35 Figuras 3A-I: El sistema de selección bacteriana facilita la identificación y la caracterización de los receptores de Ub. Los UBD promueven la autoubiquitinación y, por lo tanto, pueden ser detectados por el sistema de selección bacteriana. La *cDHFR* se fusionó a diversos UBD en el pCD-Sub, y se coexpresó en el sistema de selección sin ligasa E3.
- 40 (A) La ubiquitinación promovida por Hrs se usó para validar el rendimiento del sistema.
- (B) La estructura del complejo Hrs dsUIM:Ub (código PDB 2D3G) muestra los residuos que interactúan.
- 45 (C) El análisis por inmunoelectrotransferencia demuestra la formación de un enlace covalente entre Ub y la fusión GST-dsUIM. Se coexpresó His₆-Ub con E1 y Ubc4 junto con GST-dsUIM. La proteína se purificó en perlas de GSH y, para la inmunoelectrotransferencia, fue sometida a anti GST (roja) y anti His-tag (verde). Ambos anticuerpos detectaron la banda amarilla que migró al tamaño molecular de la proteína ubiquitilada.
- 50 (D) El inhibidor E1 PYR41 atenúa el crecimiento bacteriano únicamente en las condiciones no permisivas. Las bacterias se cultivaron en placas de 96 pocillos complementadas con PYR41 y/o TRIM, según se indica. Las tasas de crecimiento relativo en la fase logarítmica se muestran con desviación típica ($n = 9$).
- (E-H) Muestran los fenotipos de crecimiento de diversos UBD en el sistema de selección. e. Rpn10 de levadura; f. STAM1-UIM humano; g. Dominio Alix-V humano; h. Dominio Hse1-VHS de levadura.
- 55 (I) En el sistema de selección se examinó la unión de Ub a los dominios VHS de STAM1, GGA1 y GGA2 humanos. Se mutaron los residuos críticos STAM1-VHS que se sabe que se unen a la Ub y se estudió el fenotipo de crecimiento.
- Figuras 4A-J: Información estructural sobre una interfaz ENTH:Ub prevista.
- 60 (A-B) El sistema de selección identificó que los dominios de epsina1-ENTH de Ent1 de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y Epn1 del pez cebra (*Danio rerio*) funcionan como UBD. La coexpresión de estos dominios ENTH con el aparato de ubiquitinación en el sistema de selección confirió resistencia a los antibióticos y promovió el crecimiento

bacteriano en condiciones no permisivas. Se presentan las estructuras de los dominios de epsina1 ENTH del pez cebra y la levadura.

5 (C-D) Muestran los mapas $2mFo-DFc$ sigma-A de las proteínas del pez y de la levadura a 2,2 y 1,8 σ (respectivamente) de los modelos refinados finales.

(E) Superposición de las estructuras ENTH del pez y la levadura encima del complejo STAM1-VHS:Ub (código pdb 3LDZ). Las desviaciones de la media cuadrática (RMSD, por sus siglas en inglés) promedio de C α son 1,5 Å y 1,7 Å, respectivamente. Los modelos se minimizaron enérgicamente y se inspeccionaron cuidadosamente.

10 (F) Ampliación de la estructura cristalina de la interfaz VHS:Ub (3LDZ).

(G-H) Modelo de los complejos ENTH:Ub.

15 (I) y (J) Muestran una ampliación de la interfaz de los complejos modelo.

Figuras 5A-I: Caracterización de la interfaz de unión ENTH:Ub. Se construyeron y caracterizaron mutantes basados en la estructura en la interfaz ENTH:Ub prevista.

(A) Fenotipos de crecimiento de los mutantes de ENTH y Ub del pez cebra en el sistema de selección.

20 (B) Curvas de crecimiento de la forma natural y de las mutantes de Ub derivadas del escaneo en lapsos de tiempo de las salpicaduras (la densidad fue analizada por Fiji).

(C) Como se muestra en b, pero para mutantes de ENTH.

25 (D) Como se muestra en b y c, pero para mutaciones recíprocas.

(E) Fenotipos de crecimiento de los mutantes de ENTH y Ub de levadura en el sistema de selección.

30 (F) Como se muestra en b, pero para mutantes de ENTH y Ub de levadura.

(G) Se evaluó el rendimiento de la ubiquitinación para la forma natural y las mutantes indicadas de la levadura His₆-MBP-ENTH. Las proteínas *apo* y ubiquitiladas se purificaron en perlas de amilasa según se ha descrito¹⁷, resueltas en SDS-PAGE y detectada por inmunoelectrotransferencia con anticuerpo anti His-tag.

35 (H) Cuantificación de los rendimientos de ubiquitinación mostrados en (G). La proporción ubiquitiladas/*apo* es presentada como un porcentaje de la proporción de la forma natural. Se promediaron valores de cuatro experimentos independientes, y se presentan barras de error de desviación típica.

40 (I) Análisis de resonancia plasmónica de superficie (SPR, por sus siglas en inglés) de la afinidad de unión de ENTH:Ub de la levadura de proteínas de la forma natural y mutantes. El ajuste a las curvas de unión se llevó a cabo con un modelo de unión a un sitio único usando el soporte lógico OriginLab. Se indican los errores estándar derivados de tres mediciones independientes.

Figuras 6A-D: Sem1 es un sustrato de ubiquitinación de Rsp5.

45 La selección de la biblioteca de fusión de levadura pCD-Sub reveló el Sem1 como un sustrato potencial de ubiquitinación de Rsp5 en el sistema de selección bacteriana.

(A) El crecimiento de las salpicaduras a las horas indicadas después de la siembra demuestra que Rsp5 promueve significativamente la ubiquitinación de Sem1 (comparar el sistema completo que contiene Rsp5 con cascadas de Δ Rsp5). En los datos complementarios se puede encontrar una película de los escaneos a lapsos de tiempo en intervalos de 30 minutos.

50 (B) Curvas de crecimiento derivadas de la cuantificación de los escaneos usando el '*Time Series Analyzer*' en Fiji. Los valores son el promedio de ocho salpicaduras con barras de desviación típica.

55 (C) Detección de la ubiquitinación de Sem1 en *E. coli*. Se resolvió en SDS-PAGE el His₆-MBP-Sem1 purificado de *E. coli* que coexpresa el aparato de ubiquitinación¹⁷ y se detectó mediante inmunoelectrotransferencia con anticuerpo anti His-tag.

60 (D) Sem1 es un sustrato de ubiquitinación de Rsp5 *in vivo* en levadura. Se expresó His₆-Sem1 a partir de un promotor inducible de Gal en células de levadura de la forma natural o *rsp5-1*. Los cultivos crecieron a 25°C (condiciones permisivas). La temperatura de inducción previa se cambió a 37°C o se mantuvo como se indica. Se purificó el His₆-Sem1 en condiciones desnaturalizadas, se resolvió y se detectó como en (C).

Figuras 7A-F: Análisis funcional del parche de unión vWA:Ub.

(A) Esquema que muestra un sistema de selección genética bacteriana para la ubiquitinación.

5 (B) Crecimiento bacteriano adicto a la ubiquitinación en placas selectivas (+Trimetoprima) o no selectivas. Se muestra un solo escaneo de las placas 98 horas después de la siembra.

10 (C) Muestra la cuantificación del crecimiento bacteriano dependiente de la ubiquitinación. Se representa gráficamente la densidad promedio de salpicaduras individuales monitorizadas mediante escaneo de las placas en intervalos de 1 hora. La eficacia se calculó con la máxima densidad de crecimiento dividida por el tiempo del crecimiento máximo medio. NSG: sin crecimiento significativo (por sus siglas en inglés).

(D) Muestra curvas representativas de SPR para el complejo vWA:Ub.

15 (E) Análisis de unión de modelo simple de mediciones de afinidad de SPR de la fn y las mutantes indicadas de Rpn10:Ub. Se indican valores K_d (derecha; NB: sin unión, por sus siglas en inglés).

(F) Comparación entre el crecimiento relativo de las salpicaduras de la fn o mutante y las constantes de asociación medidas por SPR (K_a). El coeficiente de correlación de producto-momento de Pearson es $r=0,99$ ($p < 0,001$).

20 Figuras 8A-B: Los esquemas muestran dos de los principales obstáculos que plantean retos a la hora de asignar asociaciones específicas de componentes a lo largo de cascadas de ubiquitina.

(A) Las desubiquitilasas revierten rápidamente la ubiquitinación. En el ser humano hay aproximadamente cien enzimas desubiquitinantes (DUB) que eliminan eficaz y rápidamente el resto de ubiquitina de las proteínas seleccionadas.

25 (B) Las cascadas de ubiquitinación son múltiples. Por ejemplo, para la ligasa E3 BRCA1 se encontraron ocho sustratos diferentes. De modo similar, para el ubiquitilato p53 se demostraron 7 ligasas E3 diferentes.

30 Figura 9: Arquitectura y secuencia de los conectores que conectan los fragmentos de DHFR a la Ub y a los sustratos. Ilustración esquemática de los constructos usados en el sistema de selección. Los vectores pND-Ub contienen un fragmento de DHFR N-terminal fusionado a través del conector flexible (conector 1) a la Ub. En el pCD-Sub el fragmento C-terminal de la DHFR se fusionó a través del conector flexible (conector 2) al His₆-MBP-sustrato o directamente al sustrato.

Conector1: LIKAAQRAREAERDLAAAVAQAAAGQAVPRAAPRQ - SEQ ID NO: 5

Conector2: GGSAGSGSGAGSGSGGSAGSSGSSGASSG - SEQ ID NO: 6.

35 Figura 10: Arquitectura de dominio de receptores de Ub asociados con la membrana. Los restos de Ub marcan los sitios de unión (U en un círculo anaranjado).

Figuras 11A-E: El dominio Ent1-ENTH se une directamente a la ubiquitina.

40 (A) Muestra un ensayo de reticulación del dominio Ent1-ENTH con mayores concentraciones de Ub. Se usó un reticulante suave, el suberato disuccinimidílico (DSS, por sus siglas en inglés). Las reacciones se resolvieron mediante SDS-PAGE y se tincionaron con azul de Coomassie.

(B) Muestra un ensayo de reticulación, como en (A), del dominio Ent1-ENTH con la forma natural y la mutante de Ub I44E para diversos tiempos de incubación (indicados).

45 (C) Esquema de constructos derivados de la epsina-1 en la levadura y el pez cebra.

(D) Ubiquitinación de derivados de Ent1 en la levadura.

50 (E) Ubiquitinación de derivados de Epn1 en el pez cebra. Se coexpresó His₆-Ub con E1 y Ubc4 junto con derivados de la GST-epsina1. Las proteínas se purificaron en perlas de GSH y la ubiquitinación se detectó por inmunoelectrotransferencia usando el anticuerpo anti His-tag según se describe en ¹⁷.

55 Figuras 12A-B: Divergencia estructural dentro de los dominios ENTH. Se superpusieron las coordenadas de varios dominios ENTH, incluidos la levadura (magenta), el pez cebra (blanco) y tres estructuras de dominio ENTH de rata (turquesa, rojo y amarillo). Se calcularon los ejes de la hélice 8 de cada una de las estructuras. A continuación, se compararon los ángulos entre las hélices deducidas (A). Se presentan las diferencias estructurales entre los bucles que unen las hélices números 3 y 4 en los dominios ENTH de la levadura y el pez cebra (B).

Figura 13: Los dominios ENTH/VHS pueden asociarse simultáneamente con membranas y ubiquitina. Superponer el complejo ENTH con el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato lipídico, el complejo GGA3-VHS con el terminal del receptor 6P

de la manosa y STAM1-VHS:Ub demuestra que las asociaciones con la membrana y la Ub ocurren en lados opuestos del dominio y, por lo tanto, pueden producirse simultáneamente.

Figuras 14A-C: Resonancia plasmónica de superficie (datos en bruto). Se presentan sonogramas de las respuestas de SPR de la FN y de las mutantes indicadas.

5 Figuras 15A-D: Vista esquemática del sistema de selección bacteriana de CAT escindida para la ubiquitinación.

A. Se muestra la reacción ejecutada por CAT (es decir, la transferencia del grupo acetilo de la acetilo-CoA a cloranfenicol).

10 B. Representación estructural de la CAT escindida ensamblada con cloranfenicol.

C. Representación lineal del sistema de CAT escindida.

D. Vista en boceto del sistema de selección bacteriana de CAT escindida.

Figuras 16A-D: El sistema de CAT escindida detecta la ubiquitinación.

15 A. Muestra una ubiquitinación independiente de E3 del dominio VHS de unión a Ub del Hse1 de la levadura.

B. El sistema de CAT escindida muestra una eficacia de crecimiento significativamente mayor que acorta el tiempo experimental. Se muestra la ubiquitinación de Rpn10 dependiente de BE3A en el sistema de selección de CAT y DHFR escindidas.

20 C. Mutación en la ligasa UBE3A E3 (G738E) que causa el fenotipo del síndrome de Angelman.

25 D. El sistema de CAT escindida facilita el estudio de las ligasas E3 que no pueden ser purificadas a partir de *E. coli*, como la UBE3B. Se muestra la ubiquitinación de Rpn10 dependiente de UBE3B en el sistema de CAT escindida. La mutación (G781R) del síndrome de Kaufman en UBE3B muestra un fenotipo.

Figuras 17A-B: Ilustran la secuencia de ADN y los productos de traducción de CAT₁ (Figura 17A - SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64) y los fragmentos de CAT₁ escindida (Figura 17B - SEQ ID NOs: 65-68). LA flecha marca el sitio de escisión que se eligió para los fragmentos proteicos escindidos (arriba). En los fragmentos proteicos escindidos (abajo) se muestran el codón de parada tras el residuo Q30 y el codón de iniciación antes del residuo C31.

30 Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención versa sobre sistemas bacterianos para el análisis de la ubiquitinación de polipéptidos.

35 Aproximadamente la tercera parte del proteoma eucariota experimenta ubiquitinación, pero la mayoría de las cascadas enzimáticas que conducen a la modificación del sustrato sigue siendo desconocida. Los presentes inventores han inventado una herramienta de selección genética que utiliza *E. coli*, que carece de desubiquitilasas, para identificar interacciones a lo largo de cascadas de ubiquitinación. La coexpresión de proteína escindida de resistencia a los antibióticos unida a la ubiquitina y a la diana de ubiquitinación junto con un aparato funcional de ubiquitinación da como resultado un ensamblaje covalente de la proteína de resistencia, dando lugar al crecimiento bacteriano en medios selectivos. En el presente documento se demuestra la capacidad de la herramienta de selección para 40 moduladores de moléculas pequeñas, en un formato de alto rendimiento. Además, usando una biblioteca de E2 completa en el sistema de selección, los presentes inventores identificaron y caracterizaron una ligasa E3 a partir de las bacterias patógenas EHEC. Además, los presentes inventores identificaron la ENTH como un dominio de unión a la ubiquitina sumamente débil, demostrando la gran sensibilidad de la herramienta. La cristalografía de rayos X, combinada con estudios de selección bacteriana, facilita el análisis de estructura-función de la interfaz ENTH:ubiquitina. Además, el estudio de la interacción no covalente de Rpn10:Ub (Figuras 7A-F) demostró una 45 excelente correlación entre la eficacia del crecimiento en condiciones restrictivas de la forma natural y las mutantes en el sistema de selección genética y las afinidades de unión medidas por resonancia plasmónica de superficie (SPR). La Figura 7F muestra una comparación entre la eficacia del crecimiento relativo sobre medios selectivos y las constantes (K_a) de asociación relativa medidas por SPR. La regresión lineal proporciona un coeficiente de correlación de Pearson de $r=0,99$ ($p < 0,001$).

50 Estos hallazgos demuestran que puede emplearse el sistema para descubrimiento y mejoras de fármacos (cribado sistémico de posibles prototipos), dado que el crecimiento dependiente de la ubiquitinación está muy correlacionado con las afinidades a lo largo de la cascada. Mientras simplificaban más la presente invención para su puesta en práctica, los presentes inventores construyeron y cribaron una biblioteca de fusión de levaduras y descubrieron una nueva ubiquitinación fisiológica. Colectivamente, el sistema desarrollado proporciona un planteamiento robusto de alto 55 rendimiento para estudios genéticos de cascadas de ubiquitinación.

Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de identificación de un agente que regula la actividad o la cantidad de una enzima ubiquitinante que comprende:

(a) poner en contacto una célula bacteriana con el agente, produciendo la célula bacteriana una señal detectable o seleccionable que se correlaciona con el nivel de ubiquitinación de un sustrato, siendo modificada genéticamente dicha célula bacteriana para que exprese:

(i) dicha enzima ubiquitinante;

(ii) la ubiquitina unida a un primer fragmento polipeptídico; y

(iii) dicho sustrato unido a un segundo fragmento polipeptídico, asociándose el primer fragmento polipeptídico con dicho segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación de dicho sustrato; y

(b) medir el nivel o la tasa de acumulación de la señal detectable o seleccionable, siendo indicativo un cambio en el nivel con respecto al nivel en ausencia del agente de un agente que regula la actividad o la cantidad de la enzima ubiquitinante.

El procedimiento de este aspecto de la presente invención puede buscar agentes que regulan al alza o a la baja la actividad y/o la cantidad de la enzima.

Los agentes que pueden seleccionarse incluyen agentes de moléculas pequeñas, agentes peptídicos, agentes de ácidos nucleicos, anticuerpos, proteínas, agentes quimioterapéuticos, etc.

El ensayo de selección de este aspecto de la presente invención usa bacterias que han sido modificadas genéticamente para producir una señal detectable o seleccionable que se correlaciona con el nivel de ubiquitinación de un sustrato.

La ubiquitinación tiene lugar mediante una cascada de actividad enzimática (es decir, múltiples enzimas que actúan conjuntamente para producir la misma función: la ubiquitinación). Por ejemplo, E1 activa la Ub; luego la Ub es transferida a E2. E2 junto con E3 (o en muchos casos transfiere la Ub a E3) reconocen una diana específica y ligan la Ub a la proteína diana.

A continuación, se presenta una lista de los componentes del ensayo que son expresados por las bacterias de este aspecto de la presente invención modificadas genéticamente, cada uno de los cuales se describirá en detalle a continuación en el presente documento.

1. Ubiquitina;

2. Señal detectable;

3. Al menos una enzima ubiquitinante; y

4. Sustrato (diana para la ubiquitinación).

Para este ensayo pueden usarse bacterias cualesquiera siempre y cuando carezcan de actividad de desubiquitinasa endógena y preferiblemente también de actividad de ubiquitinasa endógena. En una realización, la bacteria tiene al menos 10 veces menos de actividad de desubiquitinasa endógena y de actividad de ubiquitinasa endógena que una célula humana. En otra realización, la bacteria tiene al menos 20 veces menos actividad de desubiquitinasa endógena y de actividad de ubiquitinasa endógena que una célula humana.

Preferiblemente, las bacterias carecen de resistencia a los marcadores de selección en el sistema actual. Ejemplos de tales bacterias incluyen, sin limitación, derivados K-12 de *E. coli*, incluyendo W3110, MG1655, DH5 α , JM101, JM19, BL21, B834, XL1-azul; también pueden usarse otras bacterias que no sean *E. coli*.

Según una realización particular, las bacterias usadas en el sistema son del género *Escherichia*, como, por ejemplo, *E. coli*.

Para expresar los componentes del ensayo, preferiblemente se liga una secuencia de polinucleótidos que codifica los elementos anteriormente descritos en un constructo de ácidos nucleicos adecuado para la expresión en la célula bacteriana. Tal constructo de ácidos nucleicos incluye una secuencia de promotores para dirigir la transcripción de la secuencia de polinucleótidos en la célula de manera constitutiva o inducible.

La frase "un polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos mono o bicatenaria que está aislada y es proporcionada en forma de una secuencia de ARN, una secuencia de polinucleótidos complementaria (ADNc), una secuencia de polinucleótidos genómica y/o secuencias de polinucleótidos compuestas (por ejemplo, una combinación de las anteriores).

Tal como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos complementaria" se refiere a una secuencia que resulta de la transcripción inversa de ARN mensajero usando una transcriptasa inversa o cualquier otra ADN polimerasa dependiente de ARN. Tal secuencia puede ser amplificada subsiguientemente *in vivo* o *in vitro* usando

una ADN polimerasa dependiente de ADN; o ser sintetizada sintéticamente mediante ensamblaje a partir de oligonucleótidos cortos.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos genómica" se refiere a una secuencia derivada (aislada) de un cromosoma y, por tanto, representa una porción contigua de un cromosoma.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, la frase "secuencia de polinucleótidos compuesta" se refiere a una secuencia que es al menos parcialmente complementaria y al menos parcialmente genómica. Una secuencia compuesta puede incluir algunas secuencias exonales requeridas para codificar el polipéptido usado en la presente invención, así como algunas secuencias intrónicas interpuestas entre aquellas. Las secuencias intrónicas pueden ser de cualquier origen, incluyendo de otros genes, y normalmente incluirá secuencias de señales de empalme conservadas. Tales secuencias intrónicas pueden incluir, además, elementos reguladores de la expresión que actúan en cis.

- 15 El constructo de ácidos nucleicos (también denominado "vector de expresión" en el presente documento) de algunas realizaciones de la invención incluye secuencias adicionales que convierten a este vector en adecuado para su replicación e integración en procariontes, eucariontes o, preferiblemente, ambas (por ejemplo, vectores lanzadera). Además, un vector de clonación típico también puede contener una secuencia de inicio de transcripción y traducción, un terminador de transcripción y traducción y una señal de poliadenilación. A título de ejemplo, tales constructos incluirán normalmente una LTR 5', un sitio de unión de ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de ADN de segunda cadena y una LTR 3' o una porción de los mismos.

- 20 Promotores ejemplares contemplados por la presente invención incluyen, sin limitación, los promotores del polioma, del virus 40 del simio (SV40), del adenovirus, de los retrovirus, del virus de la hepatitis B y del citomegalovirus. Según una realización particular, el promotor es un promotor bacteriano.

Los promotores constitutivos adecuados para su uso con la presente invención son secuencias promotoras que son activas en la mayoría de las condiciones medioambientales y en la mayoría de tipos de células bacterianas, como un promotor izquierdo (pL) de bacteriófago lambda no regulado o un pTac que presente elevada permeabilidad.

- 25 Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción en hasta 1.000 veces a partir de promotores homólogos o heterólogos ligados. Los potenciadores están activos cuando están situados en sentido descendente o ascendente del sitio de inicio de la transcripción. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen una amplia gama de anfitriones y son activos en diversos tejidos. Por ejemplo, el potenciador génico temprano SV40 es adecuado para muchos tipos de células. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para algunas realizaciones de la invención incluyen las derivadas del virus del polioma, del citomegalovirus (CMV) humano o murino, la repetición terminal larga de diversos retrovirus, como el virus de la leucemia murina, el virus del sarcoma murino o de Rous y el VIH. Véase, *Enhancers and Eukaryotic Expression*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. 1983.

- 35 En la construcción del vector de expresión, el promotor se sitúa preferiblemente a aproximadamente la misma distancia del sitio de inicio de la transcripción heteróloga que del sitio del inicio de la transcripción en su entorno natural. Sin embargo, como es sabido en la técnica, puede haber cabida para cierta variación en esta distancia sin pérdida de función del promotor.

- 40 También se pueden añadir al vector de expresión secuencias de poliadenilación para aumentar la eficacia de la traducción del ARNm. Para una poliadenilación exacta y eficaz se requieren dos elementos de secuencia distintos: secuencias ricas en GU o U situadas aguas abajo del sitio de poliadenilación y una secuencia muy conservada de seis nucleótidos, AAUAAA, situada 11-30 nucleótidos aguas arriba. Las señales de terminación y poliadenilación que son adecuadas para algunas realizaciones de la invención incluyen las derivadas del SV40.

- 45 Además de los elementos ya descritos, el vector de expresión de algunas realizaciones de la invención puede contener normalmente otros elementos especializados previstos para aumentar el nivel de expresión de los ácidos nucleicos clonados o para facilitar la identificación de las células que portan el ADN recombinante. Por ejemplo, varios virus animales contienen secuencias de ADN que promueven la replicación extracromosómica del genoma viral en tipos celulares permisivos. Los plásmidos que portan estos replicones virales son replicados episomalmente, siempre y cuando los factores apropiados sean proporcionados por genes ya sea portados en el plásmido o con el genoma de la célula anfitriona.

- 50 El vector puede incluir o no un replicón eucariota. Si hay presente un replicón eucariota, entonces el vector es amplificable en células eucariotas usando el marcador seleccionable apropiado. Si el vector no comprende un replicón eucariota, no es posible amplificación episomal alguna. En vez de ello, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula modificada, en donde el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

En una realización preferida, el vector comprende una replicación bacteriana de origen.

- 55 El vector de expresión usado en algunas realizaciones de la invención puede incluir, además, secuencias polinucleótidas adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm,

tal como un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) y secuencias para la integración genómica del polipéptido quimérico promotor.

5 El uso de una arquitectura de operones bacterianos para la expresión multigénica, en donde un único promotor es seguido por varios marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés), cada uno de los cuales contiene un sitio de unión a ribosomas (secuencia Shine-Dalgarno) facilita la coexpresión del complejo multiproteico del aparato de ubiquitinación.

10 Se apreciará que los elementos individuales comprendidos en el vector de expresión pueden estar dispuestos en diversas configuraciones. Por ejemplo, los elementos potenciadores, los promotores y similares, e incluso la o las secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína de fusión pueden ser dispuestos en una configuración "de cabeza a cola", pueden presentarse como un complemento invertido, o en una configuración complementaria, como una hebra antiparalela. Aunque es más probable que se produzca tal variedad de configuración con elementos no codificantes del vector de expresión, también se contemplan configuraciones alternativas de la secuencia codificante dentro del vector de expresión.

15 En la técnica se conocen bien procedimientos ejemplares de introducción de los polinucleótidos usados en la presente invención en células procariontas; estos incluyen, sin limitación, su transformación con un vector de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o ADN de cósmido que contenga las secuencias génicas relevantes.

Aparte de contener los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada, el constructo de expresión de algunas realizaciones de la invención también puede incluir secuencias modificadas para potenciar la estabilidad, la producción o el aislamiento de los fragmentos peptídicos expresados.

20 Ejemplos de constructos bacterianos incluyen la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* (véase, por ejemplo, Studier y otros (1990) *Methods in Enzymol* 185:60-89) en la que su promotor T7 fue sustituido con el pL (promotor izquierdo) del bacteriófago activo constitutivo. Otros vectores que pueden usarse son los que pertenecen a la familia de vectores (por ejemplo, pZE21), los que pertenecen al pCloDF (que contiene un origen del pCloDF13) y al pACYC (que contiene un origen de replicación de p15A).

25 Ubiquitina

El término "ubiquitina" usado en el presente documento se refiere ya sea a ubiquitina de mamífero, que tiene una secuencia definida en la SEQ ID NO: 7, o a ubiquitina de levadura, que tiene una secuencia definida en la SEQ ID NO: 8.

Señal detectable

30 En un ejemplo, la señal detectable es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica. Proteínas ejemplares que generan una señal detectable incluyen, sin limitación, la proteína fluorescente verde (Nº de entrada de Genbank AAL33912), la fosfatasa alcalina (Nº de entrada de Genbank AAK73766), la peroxidasa (Nº de entrada de Genbank NP_568674), la etiqueta de polihistidina (Nº de entrada de Genbank AAK09208), la etiqueta Myc (Nº de entrada de Genbank AF329457), la etiqueta de biotina ligasa (Nº de entrada de Genbank NP_561589), la proteína fluorescente naranja (Nº de entrada de Genbank AAL33917), la beta galactosidasa (Nº de entrada de Genbank NM_125776), el isotiocianato de fluoresceína (Nº de entrada de Genbank AAF22695) y la estreptavidina (Nº de entrada de Genbank S11540).

35

40 En otro ejemplo, la señal detectable es una proteína luminiscente, tal como productos de los genes de la luciferasa bacteriana; por ejemplo, los genes de luciferasa codificados por *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri* y *Xenorhabdus luminescens*, el gen FFlux de la luciferasa de la luciérnaga, y similares.

En una realización, la selección es una selección dominante, que normalmente usa un fármaco para detener el crecimiento de una célula anfitriona. Sobrevivirían a la sección las células que expresaran una proteína que transmitiera resistencia al fármaco. El uso de un marcador escindido permite la detección de eventos de ubiquitinación, como se describe con mayor detalle a continuación.

45 Para producir una señal detectable o seleccionable que se correlacione con el nivel de ubiquitinación de un sustrato, los presentes inventores contemplan el uso de un polipéptido escindido, en donde un fragmento del polipéptido está ligado a la ubiquitina y el otro fragmento del polipéptido está ligado al sustrato. Cuando el polipéptido es expresado como dos fragmentos "escindidos", no hay ninguna señal detectable o seleccionable. Sin embargo, cuando los dos fragmentos se acercan lo suficiente (es decir, en la ubiquitinación del sustrato), forman una proteína funcional que emite una señal detectable o seleccionable; es decir, generan un polipéptido indicador.

50

Según una realización particular, el polipéptido escindido se combina para generar un polipéptido indicador que es fluorescente, luminiscente, fosforescente o uno que confiere resistencia a los antibióticos.

Ejemplos de polipéptidos escindidos contemplados por la presente invención incluyen, sin limitación, la beta lactamasa, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la quinasa de adhesión focal, la proteína verde fluorescente (GFP, por

sus siglas en inglés) mejorada, la peroxidasa de rábano picante, la proteína fluorescente infrarroja IFP1.4 (un dominio modificado de unión a cromóforo (CBD, por sus siglas en inglés) de un bacteriofitocromo de *Deinococcus radiodurans*), la LacZ (beta-galactosidasa), la luciferasa y la proteasa del TEV (virus de grabado del tabaco, por sus siglas en inglés).

5 Según una realización particular, el polipéptido escindido proporciona resistencia a un antibiótico cuando está combinado, pero la bacteria es susceptible al antibiótico cuando está escindido. Preferiblemente, el polipéptido escindido proporciona resistencia a un antibiótico bacteriostático cuando está combinado. Ejemplos de antibióticos bacteriostáticos incluyen, sin limitación, la trimetoprima y el cloranfenicol.

10 En el caso de la trimetoprima, puede expresarse una proteína de DHFR escindida. Específicamente, el uso de medios selectivos que carecen de timidina, glicina, serina o metionina y contienen el antibiótico trimetoprima permite la selección de genes requeridos para el proceso de ubiquitinación.

En el caso del cloranfenicol, puede expresarse una enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) escindida.

Tal como se usa en el presente documento, el término CAT se refiere a una enzima (EC 2.3.1.28) que cataliza la acetilación dependiente de la acetilo-S-CoA del cloranfenicol en el grupo 3-hidroxilo.

15 La CAT de esta realización puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica u homóloga en al menos un 90%, un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98%, un 99% o un 100% a la secuencia definida en la SEQ ID NO: 64, determinada usando el soporte lógico estándar protein-protein BLAST [blastp] del Centro Nacional Estadounidense para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). En la SEQ ID NO: 63 se define una secuencia de ADN ejemplar que codifica la CAT de longitud máxima.

20 En una realización, el fragmento N-terminal comprende una primera porción del sitio catalítico activo de la CAT; por ejemplo, el fragmento terminal N normalmente contiene los primeros 28 o 30 aminoácidos de la CAT nativa. El fragmento C-terminal comprende la segunda porción del sitio catalítico activo de la CAT; por ejemplo, el fragmento terminal C normalmente contiene el resto de la secuencia de la CAT nativa. El fragmento N-terminal se asocia con el fragmento C-terminal para generar una CAT activa que es capaz de acetilar el cloranfenicol.

25 En una realización, el extremo N del fragmento N-terminal está ligado al extremo C del sustrato o ubiquitina (preferiblemente a través de un conector).

En otra realización, el extremo C del fragmento C-terminal está ligado al extremo N del sustrato o ubiquitina (preferiblemente a través de un conector); véase, por ejemplo, la Figura 15C.

30 Preferiblemente, el primer aminoácido del fragmento C-terminal es un residuo de aminoácido pequeño; por ejemplo, cisteína o alanina. Por tanto, el fragmento terminal C puede iniciarse con cisteína 31 (siendo la numeración según la SEQ ID NO: 64), o alanina 29 (siendo la numeración según la SEQ ID NO: 64). Otros residuos de aminoácido pequeños incluyen glicina, alanina, serina, prolina, treonina, aspartato y asparagina.

Al ser pequeño, el primer aminoácido del fragmento C-terminal tras la formilmetionina hace que esta se elimine postraduccionalmente del terminal N (del fragmento terminal C), salvando así la disposición del sitio activo vista por la actividad.

35 En una realización, el fragmento N-terminal comprende/consta de la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 67.

El fragmento C-terminal comprende/consta de la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 68.

El fragmento N-terminal puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos definida en la SEQ ID NO: 65.

El fragmento C-terminal puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos definida en la SEQ ID NO: 66.

40 En la Figura 17B se ilustra la secuencia de ADN y proteínas de una CAT escindida ejemplar.

Como se ha mencionado, para generar las bacterias recombinantes de la realización anteriormente descrita, las bacterias son modificadas genéticamente para que expresen al menos dos fragmentos polipeptídicos: siendo uno de los fragmentos polipeptídicos el fragmento de polipéptido escindido ligado a la ubiquitina y siendo el otro fragmento polipeptídico el par conjugado del polipéptido escindido que está ligado al sustrato.

45 En una realización, el fragmento del polipéptido escindido está directamente ligado a ubiquitina o sustrato. En otra realización, el fragmento del polipéptido escindido está ligado a la ubiquitina o sustrato a través de un conector peptídico. El conector debería ser de una longitud y una flexibilidad que permiten la estabilidad funcional del polipéptido indicador. El conector tiene preferiblemente de 10-500 aminoácidos, más preferiblemente entre 20 y 200 aminoácidos y más preferiblemente de 20-100 aminoácidos. En las SEQ ID NOs: 5 o 6 se definen conectores peptídicos ejemplares que pueden usarse.

50

5 El primer fragmento del polipéptido indicador que está ligado a la ubiquitina puede estar codificado en el mismo constructo de ácidos nucleicos que el segundo fragmento del polipéptido indicador que está ligado al sustrato. Alternativamente, el primer fragmento del polipéptido indicador que está ligado a la ubiquitina puede estar codificado en un constructo de ácidos nucleicos diferente del del segundo fragmento del polipéptido indicador que está ligado al sustrato. Esta realización está ilustrada en la Figura 1A. Se debería tener cuidado cuando se formen los constructos para que el nivel de expresión del primer fragmento sea similar al nivel de expresión del segundo fragmento. Así, por ejemplo, el promotor que se use para expresar el primer fragmento puede ser idéntico al promotor usado para expresar el segundo fragmento.

10 En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión, dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. Específicamente, se contempla el uso de diferentes marcadores de selección (como Kan^R y Strep^R) y de un diferente origen de las replications (como ColiE1 y CloDF13).

Enzima ubiquitinante

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “enzima ubiquitinante” se refiere a enzimas activadoras (E1) de la ubiquitina, enzimas conjugadoras (E2) de la ubiquitina o ubiquitina ligasas (E3). Colectivamente, tienen EC 6.3.2.19 como número EC.

En una realización, la enzima ubiquitinante es una enzima ubiquitinante humana.

Las enzimas activadoras (E1) de la ubiquitina tienen EC 6.2.1.45 como número EC; las enzimas conjugadoras de la ubiquitina tienen EC 2.3.2.23 como número EC; y las ubiquitina ligasas tienen el número EC 2.3.2.27.

20 Las secuencias de aminoácidos de las E1 ejemplares contempladas por la presente invención incluyen, sin limitación, las SEQ ID NOs: 9-16.

Las secuencias de aminoácidos de las E2 ejemplares contempladas por la presente invención están definidas por las SEQ ID NOs: 17-36.

25 La Tabla 1 proporciona a continuación la nomenclatura y los sinónimos más comunes usados para las enzimas conjugadoras E2 de la ubiquitina. La nomenclatura de las E2 es conforme a la usada por la Organización del Genoma Humano.

Tabla 1

<i>Nomenclatura de la Organización del Genoma Humano</i>	<i>Sinónimo</i>
UBE2V2	UEV2/MMS2
UBE2D1	UBC4/5/UBCH5A
UBE2D2	UBC4/5/UBCH5B
UBE2D4	HBUCE1
UBE2D3	UBC4/5
UBE2W	FLJ11011
UBE2B	UBC2/HHR6B/RAD6B/E217K
UBE2L6	RIGB/UBCH8
UBE2N	UBC13
UBE2L3	UBCH7
UBE2G1	UBC7/E217K
UBE2H	UBC8/E220K
UBE2M	UBC12
UBE2F	NCE2
UBE2E2	UBCH8
UBE2E3	UBCH9/UBCM2
UBE2S	E224K
UBE2U	MGC35130
UBE2R1	CDC34
UBE2R2	UBC3B/CDC34B
UBE2Z	HOYS7
UBE2J2	NCUBE2
Probable enzima E2 conjugadora de ubiquitina FLJ25076	LOC134111/FLJ25076
AKTIP	FTS/FT1
UBE2J1	NCUBE1
UBE2V1	UEV1/CROC1
UBE2Q2	DKFZ/UBCI
UBE2Q1	NICES
	TSG101/VPS23/SG10

<i>Nomenclatura de la Organización del Genoma Humano</i>	<i>Sinónimo</i>
UEVLD	UEV3

En una realización, la enzima ubiquitinante es una ligasa E3.

Ligasas E3 ejemplares contempladas por la presente invención incluyen, sin limitación Siah2, Smurf1, MDM2, BRCA1, PARKIN, UBE3A, TRIM5, NEDD4, UBR5, Huwe1, Arkadia, ITCH, MuRF1, TRAF6, Trim32, UBR4, UBE3B y UBE3D.

5 Según una realización particular, la ligasa E3 se selecciona del grupo constituido por Siah2, Smurf1, MDM2, BRCA1, PARKIN, UBE3A, UBE3B, MURF1, TRIM32, TRIM5, NEDD4, UBR5 y Huwe1.

En otra realización la ligasa E3 es Siah2, Smurf1, MDM2, BRCA1, PARKIN o UBE3A.

En las SEQ ID NOs: 37-62 se definen secuencias de aminoácidos de E3 ejemplares contempladas por la presente invención.

10 A continuación, se presenta una breve descripción de ligasas E3 ejemplares contempladas por la presente invención y algunos de sus sustratos ejemplares.

Homólogo 2 de Siete en ausencia (SIAH2)

La SIAH2 es una ubiquitina ligasa de tipo dedo de RING con un dominio RING catalítico en su terminal N, seguido por dos dedos de cinc y un dominio de unión al sustrato C-terminal.

15 La Siah2 es una ubiquitina ligasa E3 implicada en procesos biológicos diversos, incluyendo vías de señalización p38/JNK/NF-κB, daños en el ADN, señalización de estrógenos, muerte celular programada, vía Ras/Raf, mitosis e hipoxia.

La Siah2 selecciona como dianas numerosos sustratos para su degradación, incluyendo TRAF2 (cetoglutarato deshidrogenasa), Spry2 (Sprouty2) y la prolil hidroxilasa PHD3.

La Siah2 también limita su propia disponibilidad mediante autoubiquitinación y degradación.

20 La Siah2 desempeña un papel clave en la hipoxia, a través de la regulación de la estabilidad y la actividad de la transcripción de HIF-1α mediante la regulación de la estabilidad de PHD3.

Factor 1 de ubiquitinación regulatoria de las proteínas Smad (Smurf1)

La Smurf1 es una ligasa E3 de la familia HECT (homóloga al terminal carboxilo de E6-AP, por sus siglas en inglés) de Clase IV similar a NEDD4 con actividad catalítica.

25 La Smurf1 ha sido relacionada con varias vías biológicas importantes, incluyendo la vía de la proteína morfogenética ósea, la vía Wnt no canónica y la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos.

30 Las Smurf poseen tres dominios funcionales: un dominio C2 relacionado con la proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) N-terminal que se une a fosfolípidos, dirigiendo a las Smurf a membranas intracelulares; una región central que contiene de dos a cuatro dominios que interactúan con proteínas WW (residuos de triptófano) que median las asociaciones ligasa-sustrato a través de interacciones con diversos motivos ricos en prolina (PPXY) y secuencias de fosfoserina/fosfotreonina que contienen prolina del sustrato proteico; y un dominio HECT C-terminal, responsable de la transferencia de ubiquitina desde un residuo de cisteína conservado en la posición 716 a un residuo de lisina en una proteína del sustrato.

35 La Smurf1 promueve la degradación de p53 potenciando la actividad de la ligasa E3 MDM2. La Smurf1 estabiliza la MDM2 mejorando la heterodimerización de MDM2 con MDMX, durante la cual Smurf1 interactúa con MDM2 y MDMX.

La Smurf1 también es un regulador negativo clave del factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés) β-vía de señalización de la proteína morfogenética ósea (BMP, por sus siglas en inglés).

Homólogo de Doble minuto murino 2 (MDM2)

40 La MDM2 también se denomina ubiquitina-proteína ligasa E3. La Mdm2 es un regulador negativo importante del supresor tumoral p53.

La proteína Mdm2 funciona a la vez como una ubiquitina ligasa E3 que reconoce el dominio de transactivación (TAD, por sus siglas en inglés) N-terminal del supresor tumoral p53 y como un inhibidor de la activación transcripcional de p53.

45 La Mdm2 contiene un dominio RING C-terminal (residuos de aminoácidos 430-480), que contiene un consenso Cis3-His2-Cis3 que coordina dos moléculas de cinc. Se requieren estos residuos para la unión a cinc, que es esencial para el debido plegamiento del dominio RING. El dominio RING de Mdm2 confiere actividad a la ubiquitina ligasa E3 y es

suficiente para la actividad de la ligasa E3 en autoubiquitinación del RING de Mdm2. El dominio RING de Mdm2 es excepcional, porque incorpora un motivo Walker de bucle A o P conservado característico de proteínas de unión a nucleótidos, así como una secuencia de localización nucleolar.

- 5 La Mdm2 es capaz de una autopoliubiquitinación, y, combinada con p300, una ubiquitina ligasa E3 cooperante, es capaz de poliubiquitinar la p53. De esta manera, la Mdm2 y la p53 son miembros de un bucle de control de retroalimentación negativa que mantiene bajo el nivel de p53 en ausencia de señales estabilizadoras de p53.

BRCA1

La BRCA1-BARD1 constituye un complejo de dedo de RING heterodimérico del complejo que contiene BRCA1BRCA2 (BRCC, por sus siglas en inglés) que contiene una actividad de ubiquitina ligasa significativa.

- 10 La BRCA1 desempeña papeles críticos en la reparación de daños cromosómicos (reparación sin error de roturas bicatenarias de ADN), inspección de puntos de control del ciclo celular, y estabilidad genómica.

La BRCA1 forma varios complejos distintos a través de su asociación con diferentes proteínas adaptadoras, y cada complejo se forma de manera mutuamente excluyente.

- 15 La BRCA1 se combina con otros supresores tumorales, con sensores de daños del ADN y con transductores de señales, formando un gran complejo proteico de subunidades múltiples denominado complejo de vigilancia del genoma asociado con BRCA1 (BASC, por sus siglas en inglés).

La proteína BRCA1 se asocia con la ARN polimerasa II y, a través del dominio C-terminal, también interactúa con complejos de histona desacetilasa. Por tanto, esta proteína desempeña un papel en la transcripción, en la reparación de ADN de roturas bicatenarias, en la ubiquitinación y en la regulación transcripcional, así como en otras funciones.

- 20 Parkin

La Parkin es una ligasa E3 de RING-entre-RING que funciona en la unión covalente de la ubiquitina a sustratos específicos.

Es conocida sobre todo por regular la eliminación de mitocondrias disfuncionales (junto con PINK1, una serina treonina quinasa) a través de la autofagia mitocondrial (es decir, la mitofagia).

- 25 Tras la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, la PINK1 se estabiliza y activa en la membrana mitocondrial externa (OMM, por sus siglas en inglés), dando lugar al reclutamiento y la activación de la Parkin.

La Parkin facilita la ubiquitinación de un amplio número de dianas expresadas en la OMM (por ejemplo, TOM20, Mitofusinas, VDAC, Fis1), dando lugar al reclutamiento de la maquinaria de autofagia, formación de autofagosomas y eliminación mitocondrial.

- 30 Además de su papel establecido en la mitofagia y el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés), la Parkin afecta a otras vías celulares neuroprotectoras, incluyendo la señalización de TNF α y la señalización de Wnt/ β catenina, y también es un supresor tumoral putativo.

UBE3A (gen que codifica la proteína asociada a E6; E6-AP)

- 35 Esta ligasa promueve la ubiquitinación y la degradación de p53. Posteriormente se demostró que la E6-AP ubiquitinaba proteínas independientes de E6 y que servía para una función secundaria independiente como coactivador transcripcional de receptores nucleares de estrógenos. La E6-AP ha sido implicada en un amplio abanico de procesos (por ejemplo, crecimiento celular, formación y función sinápticas, etc.) y se ha demostrado que tiene muchos sustratos diana diferentes (por ejemplo, HHR23A, CDKN1B, MCM7, etc.).

Motivo tripartito 5 (TRIM5)

- 40 Esta ligasa es una ligasa E3 de dedo de RING, un factor clave de restricción antiviral y está directamente implicada en la inhibición de la replicación del VIH-1.

Célula precursora neuronal 4 expresada en su desarrollo regulada a la baja (NEDD4-1)

La Nedd4-1 ubiquitina varios sustratos, incluidos ENaC, ADRB2, AMPA, Notch, pAKT, VEGFR2, EPS15, LATS1, y MDM2.

- 45 La proteína Alix clasificadora de proteínas vacuolares recluta a NEDD4 para la proteína de antígeno específico de grupo (Gag, por sus siglas en inglés) del VIH-1 para facilitar la liberación del VIH-1 a través de un mecanismo que implica la ubiquitinación de Alix.

La NEDD4 también se une y ubiquitina la proteína de membrana latente 2A (LMP2A, por sus siglas en inglés) del virus Epstein-Bar (EBV, por sus siglas en inglés) para activar la transducción de señales de los linfocitos B.

ES 2 965 761 T3

Componente n-recognina 5 de la ubiquitina-proteína ligasa E3 (UBR5)

Esta ligasa también se denomina EDD (E3 identificada por visualización diferencial), EDD1, HHYD, KIAA0896 o DD5.

La UBR5 actúa como supresor tumoral general mediante ubiquitinación, lo que aumenta los niveles de p53 e induce la senescencia celular. La UBR5 también ubiquitina la TopBP1, una topoisomerasa que interviene en la respuesta a los daños en el ADN.

5

HUWE1

La HUWE1 (también denominada ARF-BP1, MULE, LASU1 o HECTH9) es una ligasa E3 que regula la estabilidad de sustratos celulares diversos y, en consecuencia, de numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la replicación y la reparación de los daños del ADN, la proliferación y la diferenciación celulares, y la apoptosis.

10 Los sustratos de HUWE1 incluyen tanto los promotores tumorales (por ejemplo, N-MYC, C-MYC, MCL1) como los supresores tumorales (por ejemplo, p53, MYC, MIZ1).

La HUWE1 ha demostrado funciones tanto pronocogénicas como supresoras de tumores en diferentes modelos tumorales.

La HUWE1 pertenece a la familia HECT (homóloga al C-terminal de E6AP) de ubiquitina ligasas E3.

15 A continuación, en la Tabla 2, se presentan otras ligasas E3 adicionales y sus sustratos.

Tabla 2

Ligasa	Sustrato	Función
AMFR	KAI1	La AMFR también es denominada gp78. La AMFR es una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático (RE) y funciona en la degradación asociada con el RE (ERAD, por sus siglas en inglés). Se ha descubierto que la AMFR promueve la metástasis tumoral a través de la ubiquitinación del supresor metastásico, KAI1.
APC/Cdc20	Ciclina B	El complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C, por sus siglas en inglés) es un complejo multiproteico con actividad de ligasa E3 que regula el avance del ciclo celular a través de la degradación de las ciclinas y de otras proteínas mitóticas. El APC se encuentra en un complejo con CDC20, CDC27, SPATC1, y TUBG1.
APC/Cdh1	Cdc20, Ciclina B, Ciclina A, Aurora A, Segurina, Skp2, Claspina	El complejo/ciclosoma promotor de la anafase (APC/C) es un complejo multiproteico con actividad de ligasa E3 que regula el avance del ciclo celular a través de la degradación de las ciclinas y de otras proteínas mitóticas. El complejo dimérico APC/C-Cdh1 se activa durante la anafase y la telofase, y permanece activo hasta el inicio de la siguiente fase S.
C6orf157	Ciclina B	La C6orf157 también se denomina H10BH. La C6orf157 es una ubiquitina ligasa E3 que se ha demostrado que ubiquitina la ciclina B.
Cbl		La Cbl-b y la c-Cbl son miembros de la familia Cbl de proteínas adaptadoras que son expresadas altamente en células hematopoyéticas. Las proteínas Cbl poseen actividad de ubiquitina ligasa E3 que regula a la baja numerosas proteínas de señalización y receptores tirosina quinasa (RTK, por sus siglas en inglés) en varias vías, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), los receptores de linfocitos T y linfocitos B, y los receptores de integrina. Las proteínas Cbl desempeñan un importante papel en las vías de señalización de los receptores de linfocitos T.
CBLL1	CDH1	La CBLL1 también se denomina Hakai. La CBLL1 es una ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina la forma fosforilada de la E-Cadherina, causando su degradación y la pérdida de adhesiones entre células.
CHFR	PLK1, Aurora A	La CHFR es una ubiquitina ligasa E3 que funciona como proteína de punto de control del estrés mitótico que retrasa la entrada en la mitosis en respuesta al estrés. Se ha demostrado que la CHFR ubiquitina y degrada las quinasas PLK1 y Aurora A.
CHIP	HSP70/90, iNOS, Runx1, LRRK2	La CHIP es una ubiquitina ligasa E3 que actúa como proteína coacompañante e interactúa con varias proteínas de choque térmico, incluidas HSP70 y HSP90, así como las proteínas no de choque térmico iNOS, Runx1 y LRRK2.
DTL (Cdt2)	p21	La DTL es una ubiquitina ligasa E3 que se combina con Cullin4 y DDB1, y promueve la degradación de p21 después de daños por radiación UV.

ES 2 965 761 T3

Ligasa	Sustrato	Función
E6-AP	p53, Dlg	La E6-AP también se denomina UBE3A. La E6-AP es una ubiquitina ligasa E3 del dominio HECT que interactúa con la proteína central del virus de la hepatitis C (VHC) y la selecciona como diana para su degradación. La proteína central del VHC es fundamental para empaquetar el ADN viral y otros procesos celulares. La E6-AP también interactúa con la proteína E6 de los tipos 16 y 18 del papilomavirus humano, y selecciona como diana la proteína supresora tumoral p53 para su degradación.
HACE1		La HACE1 es una ubiquitina ligasa E3 y supresora tumoral. Frecuentemente se encuentra una metilación aberrante de HACE1 en los tumores de Wilms y el cáncer colorrectal.
HECTD1		La HECTD1 es una ubiquitina ligasa E3 requerida para el cierre del tubo neural y el normal desarrollo del mesénquima.
HECTD2		La HECTD2 es una probable ubiquitina ligasa E3 y puede actuar como gen de susceptibilidad para la neurodegeneración y la enfermedad priónica.
HECTD3		La HECTD3 es una probable ubiquitina ligasa E3 y puede desempeñar un papel en la regulación citoesquelética, remodelación de actinas y tráfico vesicular.
HECW1	DVL1, SOD1 mutante, p53	La HECW1 también se denomina NEDL1. La HECW1 interactúa con p53 y la proteína DVL1 de señalización de Wnt, y puede desempeñar un papel en la muerte celular mediada por p53 en neuronas.
HECW2	p73	La HECW2 también se denomina NEDL2. La HECW2 ubiquitina p73, que es un miembro de la familia p53. La ubiquitinación de p73 aumenta la estabilidad de la proteína.
HERC2	RNF8	La HERC2 pertenece a una familia de ubiquitina ligasas E3 implicada en eventos de tráfico membranal. La HERC2 desempeña un papel en la respuesta a los daños en el ADN a través de la interacción con RNF8.
HERC3		La HERC3 pertenece a una familia de ubiquitina ligasas E3 implicada en eventos de tráfico membranal. La HERC3 interactúa con hPLIC-1 y hPLIC-2 y se localiza en los endosomas tardíos y lisosomas.
HERC4		La HERC4 pertenece a una familia de ubiquitina ligasas E3 implicada en eventos de tráfico membranal. La HERC4 está altamente expresada en los testículos y puede desempeñar un papel en la espermatogénesis.
HERC5		La HERC5 pertenece a una familia de ubiquitina ligasas E3 implicada en eventos de tráfico membranal. La HERC5 es inducida por el interferón y otras citocinas proinflamatorias y desempeña un papel en la conjugación de ISG15 inducida por interferón durante la respuesta inmunitaria innata.
HUWE1	N-Myc, C-Myc, p53, Mcl-1, TopBP1	La HUWE1 también se denomina MULE. La HUWE1 es una ubiquitina ligasa E3 del dominio HECT que regula la degradación de Mcl-1 y, por lo tanto, regula la apoptosis inducida por daños en el ADN. La HUWE1 también controla la diferenciación neuronal desestabilizando N-Myc, y regula la supresión tumoral dependiente e independiente de p53 mediante ARF.
HYD	CHK2	El HYD también se denomina EDD o UBR5. El HYD es un regulador de la respuesta a los daños en el ADN y se sobreexpresa en muchas formas de cáncer.
ITCH	MKK4, RIP2, FOXP3	La ITCH desempeña un papel en la activación y la señalización de receptores de linfocitos T a través de la ubiquitinación de múltiples proteínas, incluidas MKK4, RIP2 y FOXP3. La pérdida de la función ITCH conduce a una respuesta inmunitaria aberrante y a la diferenciación de linfocitos T auxiliares.
LNX1	NUMB	La LNX1 es una ubiquitina ligasa E3 que desempeña un papel en la determinación del destino celular durante la embriogénesis mediante la regulación de NUMB, regulador negativo de la señalización de Notch.
Mahogunina		La mahogunina es una ubiquitina ligasa E3 implicada en la señalización de la melanocortina. La pérdida de la función de mahogunina conduce a la neurodegeneración y a la pérdida de pigmentación, y puede ser el mecanismo de acción en la enfermedad priónica.
MARCH-I	HLA-DRβ	La MARCH1 es una ubiquitina ligasa E3 encontrada en células que presentan antígenos (APC, por sus siglas en inglés). La MARCH1 ubiquitina proteínas MHC de clase II y regula a la baja su expresión en la superficie celular.
MARCH-II		La MARCH-II es un miembro de la familia MARCH de ubiquitina ligasas E3. Se asocia con syntaxin6 en los endosomas y contribuye a regular el tráfico vesicular.
MARCH-III		La MARCH-III es un miembro de la familia MARCH de ubiquitina ligasas E3. La MARCH-III se asocia con syntaxin6 en los endosomas y contribuye a regular el tráfico vesicular.

ES 2 965 761 T3

Ligasa	Sustrato	Función
MARCH-IV	MHC clase I	La MARCH-IV es un miembro de la familia MARCH de ubiquitina ligasas E3. La MARCH-IV ubiquitina proteínas MHC de clase I y regula a la baja su expresión en la superficie celular.
MARCH-VI		La MARCH-VI también se denomina TEB4 y es un miembro de la familia MARCH de ubiquitina ligasas E3. Se localiza en el retículo endoplasmático y participa en la degradación de proteínas asociadas al RE.
MARCH-VII	gp190	La MARCH-VII también se denomina axotrofina. La MARCH-VII se identificó originalmente como un gen de células madre neuronales, pero desde entonces se ha demostrado que desempeña un papel en la señalización de LIF en los linfocitos T a través de la degradación de la subunidad de receptores de LIF, gp190.
MARCH-VIII	B7-2, MHC clase II	La MARCH-VIII también se denomina c-MIR. La MARCH-VIII causa la ubiquitinación/degradación de B7-2, que es una molécula coestimuladora para la presentación de antígenos. También se ha demostrado que la MARCH-VIII ubiquitina proteínas MHC de clase II.
MARCH-X		La MARCH-X también se denomina RNF190. La MARCH-X es un miembro de la familia MARCH de ubiquitina ligasas E3. En la actualidad no se conoce el papel putativo de la MARCH-X.
MDM2	p53	La MDM2, una ubiquitina ligasa E3 para p53, desempeña un papel central en la regulación de la estabilidad de p53. La fosforilación de MDM2 mediada por Akt en Ser166 y Ser186 aumenta su interacción con p300, permitiendo la ubiquitinación y la degradación de p53 mediadas por MDM2.
MEKK1	c-Jun, Erk	La MEKK1 es una proteína quinasa muy conocida de la familia STE11. La MEKK1 fosforila y activa MKK4/7, que, a su vez, activa JNK1/2/3. La MEKK1 contiene un dominio de dedo de RING y presenta actividad de ubiquitina ligasa E3 hacia c-Jun y Erk.
MIB1	Delta, Jagged	El homólogo de bomba mental 1 (MIB1, por sus siglas en inglés) es una ligasa E3 que facilita la ubiquitinación y la subsiguiente endocitosis de los ligandos Notch, de Delta y de Jagged.
MIB2	Delta, Jagged	La bomba mental 2 (MIB2, por sus siglas en inglés) es una ligasa E3 que regula positivamente la señalización de Notch. Se ha demostrado que el MIB2 desempeña un papel en la diferenciación de miotubos y en la estabilidad muscular. El MIB2 ubiquitina subunidades de NMDAR para contribuir a regular la plasticidad sináptica en las neuronas.
MycBP2	Fbxo45, TSC2	La MycBP2 es una ubiquitina ligasa E3 también denominada PAM. La MycBP2 se asocia con Fbxo45 para desempeñar un papel en el desarrollo neuronal. La MycBP2 también regula la vía de mTOR a través de la ubiquitinación de TSC2.
NEDD4		La NEDD4 es una ubiquitina ligasa E3 altamente expresada en el sistema nervioso central embrionario temprano del ratón. La NEDD4 regula a la baja tanto los canales neuronales de Na ⁺ dependientes del voltaje (NaV, por sus siglas en inglés) como los canales epiteliales de Na ⁺ (ENaC, por sus siglas en inglés) en respuesta a las mayores concentraciones intracelulares de Na ⁺ .
NEDD4L	Smad2	La NEDD4L es una ubiquitina ligasa E3 altamente expresada en el sistema nervioso central embrionario temprano del ratón. Se ha demostrado que la NEDD4L regula negativamente la señalización de TGF-β al seleccionar como diana a Smad2 para su degradación.
Parkin		La Parkin es una ubiquitina ligasa E3 que ha demostrado ser un regulador clave de la vía de autofagia. Las mutaciones en Parkin pueden conducir a la enfermedad de Parkinson.
PEL1	TRIP, IRAK	La PEL1 es una ubiquitina ligasa E3 que desempeña un papel en la señalización del receptor de tipo Toll (TLR3 y TLR4) a NF-κB a través de la proteína adaptadora TRIP. También se ha demostrado que la PEL1 ubiquitina la IRAK.
Pirh2	TP53	La Pirh2 también se denomina RCHY1. La Pirh2 es una ubiquitina ligasa E3 de dominio RING. La Pirh2 se une a p53 y promueve la degradación proteosomal de p53 independiente de MDM2. La expresión del gen Pirh2 es controlada por p53, haciendo de esta interacción parte de un bucle de retroalimentación autoinhibitorio.
PJA1	ELF	La PJA1 también se denomina PRAJA. La PJA1 desempeña un papel en la regulación a la baja de la señalización de TGF-β en el cáncer gástrico a través de la ubiquitinación de la proteína adaptadora ELF de SMAD4.
PJA2		La PJA2 es una ubiquitina ligasa E3 encontrada en sinapsis neuronales. El papel exacto y los sustratos de PJA2 están poco claros.

ES 2 965 761 T3

Ligasa	Sustrato	Función
RFFL	p53	La RFFL también se denomina CARP2 y es una ubiquitina ligasa E3 que inhibe el reciclado de endosomas. La RFFL también degrada la p53 a través de la estabilización de MDM2.
RFWD2	MTA1, p53, FOXO1	La RFWD2 también se denomina COP1. La RFWD2 es una ubiquitina ligasa E3 que ubiquitina varias proteínas implicadas en la respuesta a los daños en el ADN y la apoptosis, incluyendo MTA1, p53 y FOXO1.
Rictor	SGK1	Rictor interactúa con Cullin1-Rbx1 para formar un complejo de ubiquitina ligasa E3, y promueve la ubiquitinación y la degradación de SGK1.
RNF5	JAMP, paxilina	La RNF5 también se denomina RMA1. La RNF5 desempeña un papel en la degradación asociada al RE de proteínas mal plegadas y en la respuesta al estrés del RE a través de la ubiquitinación de JAMP. La RNF5 también desempeña un papel en la motilidad celular y se ha demostrado que ubiquitina la paxilina.
RNF8	H2A, H2AX	La RNF8 es una ubiquitina ligasa E3 del dominio RING que desempeña un papel en la reparación de cromosomas dañados. La RNF8 ubiquitina las histonas H2A y H2AX en las roturas bicatenarias (DSB, por sus siglas en inglés), las cuales reclutan las proteínas reparadoras 53BP1 y BRCA1.
RNF19	SOD1	La RNF19 también se denomina Dorfin. La acumulación y la agregación de SOD1 mutante conduce a la enfermedad de ELA. La RNF19 ubiquitina la proteína SOD1 mutante, causando una disminución en su neurotoxicidad.
RNF190		Véase MARCH-X
RNF20	Histona H2B	La RNF20 también se denomina BRE1. RNF20 es una ubiquitina ligasa E3 que monoubiquitina la histona H2B. La ubiquitinación de H2B está asociada con áreas de transcripción activa.
RNF34	Caspasa-8, - 10	La RNF34 también se denomina RFI. A través de la ubiquitinación/degradación de la caspasa-8 y -10, la RNF34 inhibe la apoptosis mediada por el receptor del factor de necrosis tumoral.
RNF40	Histona H2B	La RNF40 también se denomina BRE1-B. La RNF40 forma un complejo proteico con RNF20 que da lugar a la ubiquitinación de la histona H2B. La ubiquitinación de H2B está asociada con áreas de transcripción activa.
RNF125		La RNF125 también se denomina TRAC-1. Se ha demostrado que la RNF125 regula positivamente la activación de linfocitos T.
RNF128		La RNF128 también se denomina GRAIL. La RNF128 promueve la energía de los linfocitos T y puede desempeñar un papel en la organización citoesquelética de las actinas en interacciones de linfocitos T/APC.
RNF138	TCF/LEF	La RNF138 también se denomina NARF. La RNF138 está asociada con la quinasa de tipo Nemo (NLK, por sus siglas en inglés) y suprime la señalización de Wnt/ β -catenina a través de la ubiquitinación/degradación de TCF/LEF.
RNF168	H2A, H2A.X	La RNF168 es una ubiquitina ligasa E3 que contribuye a proteger la integridad del genoma colaborando con la RNF8 para ubiquitinar las histonas H2A y H2A.X en las roturas bicatenarias (DSB) del ADN.
SCF/ β -TrCP	I κ B α , Wee1, Cdc25A, β -catenina	La SCF/ β -TrCP es un complejo de ubiquitina ligasa E3 compuesto de SCF (proteína SKP1-CUL1-F-box) y el componente de reconocimiento del sustrato, β -TrCP (también denominado BTRC). La SCF/ β -TrCP media la ubiquitinación de las proteínas implicadas en el avance del ciclo celular, la transducción y la transcripción de señales. La SCF/ β -TrCP también regula la estabilidad de β -catenina y participa en la señalización de Wnt.
SCF/FBW7	Ciclina E, c-Myc, c-Jun	La SCF/FBW7 es un complejo de ubiquitina ligasa E3 compuesto de SCF (proteína SKP1-CUL1-F-box) y el componente de reconocimiento del sustrato, FBW7. La SCF/FBW7 media la ubiquitinación de las proteínas implicadas en el avance del ciclo celular, la transducción y la transcripción de señales. Las proteínas diana para la SCF/FBW7 incluyen las formas fosforiladas de c-Myc, Ciclina E, el dominio intracelular Notch (NICD, por sus siglas en inglés) y c-Jun. Los defectos en FBW7 pueden ser una causa del cáncer de mama.
SCF/Skp2	p27, p21, FOXO1	La SCF/Skp2 es un complejo de ubiquitina ligasa E3 compuesto de SCF (proteína SKP1-CUL1-F-box) y el componente de reconocimiento del sustrato, Skp2. La SCF/Skp2 media la ubiquitinación de las proteínas implicadas en el avance del ciclo celular (específicamente la transición G1/S), la transducción y la transcripción de señales. Las proteínas diana para la SCF/Skp2 incluyen las formas fosforiladas de p27Kip1, p21Waf1/Cip1 y FOXO1.
SHPRH	PCNA	La SHPRH es una ubiquitina ligasa E3 que desempeña un papel en la replicación del ADN a través de la ubiquitinación de la PCNA. La ubiquitinación de la PCNA evita la inestabilidad genómica derivada de horquillas de replicación detenidas después de daños en el ADN.

ES 2 965 761 T3

Ligasa	Sustrato	Función
SIAH1	β -catenina, Bim, TRB3	La SIAH1 es una ubiquitina ligasa E3 que desempeña un papel en la inhibición de la señalización de Wnt a través de la ubiquitinación de la β -catenina. También se ha demostrado que la SIAH1 promueve la apoptosis a través de la regulación al alza de Bim, y que ubiquitina la proteína adaptadora de señalización TRB3.
SIAH2	HIPK2, PHD1/3	La SIAH2 es una ubiquitina ligasa E3 que desempeña un papel en la hipoxia a través de la ubiquitinación y la degradación de HIPK2. La SIAH2 también ubiquitina la PHD1/3, que regula los niveles de HIF-1 α en respuesta a la hipoxia.
SMURF1	Smads	La SMURF1 es una ubiquitina ligasa E3 que interactúa con los efectores de Smad de la vía BMP, conduciendo a la ubiquitinación y la degradación de la proteína Smad. La Smurf1 regula negativamente la diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso <i>in vivo</i> .
SMURF2	Smads, Mad2	La SMURF2 es una ubiquitina ligasa E3 que interactúa con Smads de las vías tanto de BMP como de TGF- β . La SMURF2 también regula el punto de control del huso mitótico a través de la ubiquitinación de Mad2.
TOPORS	p53, NKX3.1	La TOPORS es una ubiquitina ligasa E3 y una SUMO ligasa. La TOPORS ubiquitina y sumoila la p53, lo que regula la estabilidad de p53. También se ha demostrado que la TOPORS ubiquitina el supresor tumoral NKX3.1.
TRAF6	NEMO, Akt1	La TRAF6 es una ubiquitina ligasa E3 que funciona como proteína adaptadora en la señalización de IL-1R, CD40 y TLR. La TRAF6 promueve la señalización de NF- κ B a través de la poliubiquitinación K63 de IKK, dando lugar a la activación de la IKK. También se ha demostrado que la TRAF6 ubiquitina la Akt1, causando su translocación a la membrana celular.
TRAF7		La TRAF7 es una ubiquitina ligasa E3 y una SUMO ligasa que funciona como proteína adaptadora en el receptor de TNF y la señalización de TLR. Se ha demostrado que la TRAF7 es capaz de autoubiquitinación y que desempeña un papel en la apoptosis a través de la activación de NF- κ B mediada por MEKK3.
TRIM63	Troponina I, MyBP-C, MyLC1/2	La TRIM63 también se denomina Murf-1. La TRIM63 es una ubiquitina ligasa E3 específica a los músculos cuya expresión es regulada al alza durante la atrofia muscular. Se ha demostrado que la TRIM63 ubiquitina varias proteínas musculares importantes, incluyendo la troponina I, MyBP-C y MyLC1/2.
UBE3B		La UBE3B es una ubiquitina ligasa E3 identificada a través de un análisis de secuencias. En la actualidad se desconocen los sustratos y la función celular específicos de la UBE3B.
UBE3C		La UBE3C es una ubiquitina ligasa E3 también denominada KIAA10. La UBE3C es altamente expresada en los músculos y puede interactuar con el regulador transcripcional TIP120B.
UBR1		La UBR1 es una ubiquitina ligasa E3 responsable de la degradación proteasomal de las proteínas citoplasmáticas mal plegadas. También se ha demostrado que la UBR1 es una ubiquitina ligasa de la vía proteolítica de la regla del N-terminal, la cual regula la degradación de las proteínas de vida corta.
UBR2	Histona H2A	La UBR2 es una ubiquitina ligasa E3 que se ha demostrado que ubiquitina la histona H2A, dando lugar a un silenciamiento transcripcional. La UBR2 también forma parte de la vía proteolítica de la regla del N-terminal.
UHRF2	PCNP	La UHRF2 también se denomina NIRF. La UHRF2 es una proteína nuclear que puede regular el avance del ciclo celular a través de su asociación con Chk2. La UHRF2 también ubiquitina la PCNP y se ha demostrado que desempeña un papel en la degradación de agregados nucleares que contienen repeticiones de poliglutamina.
VHL	HIF-1 α	El VHL es el componente de reconocimiento de sustrato del complejo de ubiquitina ligasa E3 ECV (Elongina B/C, Cullen-2, VHL) responsable de la degradación del factor de transcripción HIF-1 α . La ubiquitinación y la degradación de HIF-1 α tiene lugar durante periodos de normoxia, pero no durante la hipoxia, desempeñando por ello un papel central en la regulación de la expresión génica por oxígeno.
WWP1	ErbB4	La WWP1 es una ubiquitina ligasa E3 que comúnmente se descubre que está sobreexpresada en el cáncer de mama. Se ha demostrado que la WWP1 ubiquitina y degrada la ErbB4. Curiosamente, se ha descubierto que la homóloga de WWP1 en <i>C. elegans</i> aumenta la esperanza de vida en respuesta a una restricción dietética.

Ligasa	Sustrato	Función
WWP2	Oct-4	La WWP2 es una ubiquitina ligasa E3 que se ha descubierto que ubiquitina/degrada el factor pluripotencial Oct-4 de las células madre. La WWP2 también ubiquitina el factor de transcripción EGR2, inhibiendo la muerte de linfocitos T inducida por la activación.
ZNRF1		La ZNRF1 es una ubiquitina ligasa E3 altamente expresada en células neuronales. Se encuentra la ZNRF1 en membranas vesiculares sinápticas y puede regular las transmisiones y la plasticidad neuronales.

La expresión "enzima desubiquitinante" se refiere a una enzima que escinde la ubiquitina de las proteínas.

En consecuencia, la enzima desubiquitinante es una cisteína proteasa o una metaloproteasa.

Enzimas desubiquitinantes ejemplares que pueden expresarse en el sistema incluyen la USP7, que se sabe que desubiquitina MDM2, USP47, USP2, USP7, USP15, USP9X, USP28 y USP30.

- 5 Las enzimas ubiquitinantes pueden expresarse a partir de los mismos constructos de expresión que el sustrato y la ubiquitina o en constructos separados.

Sustratos

Ejemplos de sustratos incluyen polipéptidos que se sabe que son ubiquitinados *in vivo* en seres humanos por ligasa E3 o desubiquitinados *in vivo* por enzimas desubiquitinantes.

- 10 Según una realización específica, el sustrato es uno que se sepa que es ubiquitinado de forma diferencial en una enfermedad como el cáncer.

Anteriormente en el presente documento se han descrito sustratos ejemplares que pueden ser expresados en las bacterias.

- 15 Según una realización particular, el sustrato se selecciona del grupo constituido por PHD3, SPROUTY2, Mitofusina 1, 2, MIRO, NEMO, proteínas SMAD, TBP-I, P53, SSA, HHR23, EPHEXIN5, ARC, PPAR α , ciclina-B, Cdc25C y Calmodulina.

Se apreciará que, además de expresar el sustrato y la ubiquitina (junto con el polipéptido indicador escindido), las bacterias recombinantes también deberían expresar la enzima ubiquitinante.

- 20 En una realización, las bacterias expresan al menos una enzima E1, al menos una enzima E2 y al menos una enzima E3.

Preferiblemente, la bacteria expresa la enzima E2 que es un par afín para la enzima E3.

En otra realización, pero que no forma parte de la presente invención, la bacteria expresa al menos una enzima desubiquitinante.

- 25 En la Figura 1A se ilustra un sistema ejemplar por el que las enzimas E1 y E2 son expresadas a partir del mismo constructo que la ubiquitina y la enzima E3 es expresada a partir del mismo constructo que el sustrato.

En otra realización, las enzimas E1 y E2 son expresadas a partir del mismo constructo que el sustrato y la enzima E3 es expresada a partir del mismo constructo que la ubiquitina.

En otra realización adicional, las enzimas E1 y E2 son expresadas a partir del mismo constructo que el sustrato y/o que la ubiquitina y la enzima E3 es expresada a partir de un constructo adicional de expresión.

- 30 El constructo adicional de expresión a partir del cual se expresa la ligasa E3 puede usar un marcador de selección diferente del usado para los otros constructos (por ejemplo, el marcador de selección AmpR). También puede usar un origen de replicación diferente, tal como p15A. El promotor para este constructo de expresión puede ser inducible o constitutivo. En una realización, el promotor es un promotor constitutivo débil, tal como el promotor pTac, que es permeable sin la adición de inductor (IPTG).

- 35 Los presentes inventores contemplan el uso de un equipo para la fácil preparación de la expresión. El equipo no forma parte de la presente invención.

Tal equipo puede comprender:

- 40 (i) un primer polinucleótido que codifica un primer fragmento polipeptídico que está ligado operativamente a una secuencia reguladora bacteriana, y un sitio de clonación, en donde se selecciona una posición del sitio de clonación de manera que tras la inserción de una secuencia que codifica un polipéptido de prueba (es decir, el sustrato) en el

sitio de clonación, tras la expresión en una célula bacteriana, se genera una proteína de fusión que comprende el polipéptido de prueba en el marco de lectura con el primer fragmento polipeptídico;

5 (ii) un segundo polinucleótido que comprende una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un segundo fragmento polipeptídico que está unido a la ubiquitina, estando operativamente ligada la segunda secuencia de ácidos nucleicos a una secuencia reguladora bacteriana, en donde el fragmento cebador polipeptídico se asocia con el segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador (por ejemplo, un polipéptido seleccionable, como se ha descrito adicionalmente en el presente documento anteriormente) dependiente de la ubiquitinación del polipéptido de prueba.

10 El primer polinucleótido y el segundo polinucleótido pueden estar en el mismo vector de expresión o en un vector de expresión separado. Si están presentes en vectores de expresión diferentes, entonces, preferiblemente, cada secuencia de polinucleótidos comprende un origen de replicación bacteriano.

15 El equipo puede comprender un tercer polinucleótido que codifique al menos una enzima ubiquitinante. Alternativamente, el primer polinucleótido y/o el segundo polinucleótido pueden comprender una secuencia que codifique la enzima ubiquitinante (por ejemplo, E1, E2 y/o E3).

Una vez que se haya identificado a un agente como regulador de una enzima ubiquitinante, el potencial terapéutico del mismo puede ser verificado usando otras pruebas *in vitro* conocidas. El potencial terapéutico del agente candidato también puede verificarse en modelos animales de la enfermedad relacionada (por ejemplo, cáncer).

20 Una vez que se haya corroborado su potencial terapéutico, pueden sintetizarse composiciones farmacéuticas que lo comprendan.

Se apreciará que el sistema descrito en el presente documento puede ser manipulado para determinar si una enzima es capaz de ubiquitinar un sustrato de prueba.

25 En esta realización, la enzima es expresada en una célula bacteriana, así como la ubiquitina (que está unida al primer fragmento polipeptídico (como se ha descrito anteriormente en el presente documento) y el sustrato de prueba (que está unido al segundo fragmento (como se ha descrito anteriormente en el presente documento)).

El procedimiento puede ser usado para comprobar muchas enzimas E3 diferentes en diversas combinaciones con E2 y E1.

El procedimiento pasa a analizar la presencia del polipéptido indicador en la célula bacteriana, siendo indicativa la presencia o la cantidad del polipéptido indicador de que la enzima es capaz de ubiquitinar el sustrato de prueba.

30 En otro aspecto, el sistema descrito en el presente documento puede ser usado para determinar si una enzima es capaz de ubiquitinar un sustrato de prueba.

El procedimiento de este aspecto de la presente invención comprende:

35 (a) expresar múltiples sustratos polipeptídicos candidatos en una población de células bacterianas, en donde cada uno de los sustratos polipeptídicos candidatos está unido a un primer fragmento polipeptídico idéntico (como se ha descrito anteriormente en el presente documento);

(b) expresar la enzima ubiquitinante en la población de células bacterianas;

40 (c) expresar la ubiquitina en la población de células bacterianas, en donde la ubiquitina está unida a un segundo fragmento polipeptídico (como se ha descrito anteriormente en el presente documento), en donde el segundo fragmento polipeptídico se asocia con el primer fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación del sustrato; y

45 (d) analizar en colonias bacterianas de la población de células bacterianas la presencia o la ausencia del polipéptido indicador, en donde la presencia del polipéptido indicador es indicativa de la expresión de un sustrato para la enzima ubiquitinante.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$

Los términos "comprende", "comprendiendo", "incluye", "incluyendo", "teniendo" y sus conjugados significan "incluyendo, sin limitación".

50 La expresión "constar de" significa "incluyendo con limitación".

La expresión "constar esencialmente de" significa que la composición, el procedimiento o la estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el procedimiento o la estructura reivindicados.

Tal como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales, a no ser que el contexto dicte con claridad algo distinto. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir múltiples compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

5 En toda esta solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalos. Se debería entender que la descripción en un formato de intervalos es meramente por conveniencia y brevedad y no debería ser interpretada como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, debería considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales en ese intervalo. Por ejemplo, debería considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha divulgado específicamente subintervalos tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo; por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto vale con independencia de la amplitud del intervalo.

15 Siempre que en el presente documento se indica un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número (fraccionario o entero) citado dentro del intervalo indicado. Las frases "oscilando/oscila entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "oscilando/oscila desde" un primer número indicado "hasta" un segundo número indicado son usadas en el presente documento de forma intercambiable y se entiende que incluyen los números indicados primero y segundo y todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

20 Cuando se hace referencia a listados de secuencias particulares, ha de entenderse que tal referencia también abarca secuencias que corresponden sustancialmente a su secuencia complementaria que incluye variaciones de secuencia secundarias resultantes de, por ejemplo, errores de secuenciación, errores de clonación u otras alteraciones que den lugar a sustituciones de bases, a la delección de bases o la adición de bases, siempre y cuando la frecuencia de dichas variaciones sea inferior a 1 de cada 50 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 100 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 200 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 500 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 1000 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 5.000 nucleótidos, alternativamente, inferior a 1 de cada 10.000 nucleótidos.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "procedimiento" se refiere a maneras, medios, técnicas y procesos para realizar una tarea determinada que incluyen, sin limitación, maneras, medios, técnicas y procesos conocidos o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procesos conocidos por expertos de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

30 Realizaciones y aspectos diversos de la presente invención, delineada anteriormente en el presente documento y reivindicada en la posterior sección de reivindicaciones, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que, junto con las anteriores descripciones, ilustran algunas realizaciones de la invención de manera no limitante.

35 Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, biofísicas, de genética bacteriana y de ADN recombinante. Tales técnicas son explicadas de forma exhaustiva en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y otros, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", tomos I-III, Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y otros, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y otros, 40 "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y otros (editores) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", tomos 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías definidas en las patentes estadounidenses nºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", tomos I-III, Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, Nueva York (1994), tercera edición; "Current Protocols in Immunology" tomos I-III, Coligan J. E., ed. (1994); 45 Stites y otros (editores), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994); Mishell y Shiigi (editores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles están ampliamente descritos en la bibliografía de patentes y científica; véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses nºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; 50 "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., editores (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., editores (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, Rhode Island, ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, California (1990); Marshak y otros, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos en el mismo son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Materiales y procedimientos

Construcción de plásmidos

Sistema de selección para la ubiquitinación: Se construyeron dos conjuntos de vectores de expresión compatibles con *E. coli*. Se fusionaron ubiquitina y diferentes sustratos con dos fragmentos de la *DHFR* murina, bajo control de un promotor de fago lambda constitutivo pLtetO1 (véase la Figura 1A).

- 5 El vector pND-Ub está basado en un vector pZE21 modificado en contacto con el pLtetO1. El ADNc murino del fragmento de *nDHFR* (residuos 1-108) fue amplificado mediante PCR y subclonado entre los sitios KpnI y PstI (el sitio PstI fue insertado en el vector mediante PCR) en el vector pZE21. A continuación, se construyó un conector flexible usando un procedimiento de PCR en dos etapas y se digirió con PstI y NotI (el sitio NotI fue insertado en el vector mediante PCR) y se clonó en el vector aguas abajo de pLtetO1-*nDHFR*. Se amplificaron mediante PCR casetes del aparato de ubiquitinación que contenían un His₆-Ub-E2-E1 a partir de plásmidos pGEN que expresaban diferentes E2 o mutantes de Ub y fueron subclonados como fusión al C-terminal de *nDHFR*-conector1 en los sitios de reconocimiento de endonucleasa NotI y AvrII.

- 15 El vector pCD-Sub se construyó con base en un vector pCDF-dúo. El promotor T7 fue sustituido con pLtetO1. El fragmento de *cDHFR* (residuos 109-187) fue amplificado mediante PCR y subclonado bajo el promotor pLtetO1 en los sitios de reconocimiento de endonucleasa MluI y AscI (el sitio AscI fue insertado mediante PCR). Se fusionó un segundo conector al N-terminal de la MBP y clonado en el sitio AscI. Los sustratos fueron amplificados mediante PCR y subclonados en los sitios SacII y SpeI corriente abajo y en el marco de lectura con el *cDHFR*-conector2-MBP. En algunos vectores se eliminaba la MBP. Se prepararon algunos vectores mediante ensamblaje completo de síntesis química⁴⁸.

- 20 Clonación en vectores de expresión, purificación y detección: Se subclonaron el dominio ENTH del Epn1₍₁₈₋₁₅₇₎ del pez cebra y el dsUIM del Hrs humano₍₂₅₇₋₂₇₆₎ en el vector pGST-paralela2 entre los sitios de reconocimiento de endonucleasa BamHI y EcoRI. El dominio ENTH del Ent1₍₁₋₁₅₂₎ de la levadura se subclonó en el vector pCDF-dúo fusionado a His₆-MBP como se ha descrito previamente (pCOG21¹⁷). Para la detección de la ubiquitinación en bacterias, el Sem1 de la levadura fue subclonado en el vector pCDF-dúo fusionado a His₆-MBP. Para la expresión y la purificación de la levadura, se subclonó His₆-Sem1 en pGREG600 mediante una recombinación que también eliminó la GFP del vector.

La estructura y las secuencias de todos los vectores fueron confirmadas mediante análisis de endonucleasa de restricción y secuenciación de ADN.

- 30 Mutagénesis dirigida al sitio: Se introdujeron mutaciones puntuales usando el planteamiento ExSite (Stratagene). El vector completo se amplificó utilizando ADN polimerasa Phusion. El ADN parental se digirió con DpnI y el ADN se ligó en bruto. Todos los mutantes se secuenciaron para garantizar que se introdujeran las mutaciones deseadas y que no ocurriera ninguna otra mutación.

- 35 Ensayo de crecimiento de *E. coli* dependiente de la ubiquitinación: Se cotransformó *E. coli* W3110 (del laboratorio Ezra Yagil en TAU) con el pND-Ub y los plásmidos pCD-Sub y fue colocado en placas sobre agar en LB complementado con 34 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de estreptomina. Se inocularon 5 ml del medio de LB líquido complementado con las mismas concentraciones de antibióticos con una sola colonia y se dejaron crecer durante la noche a 37°C. El cultivo se recogió y se lavó dos veces con 5 ml de medio de Davis mínimo. La densidad óptica (DO₆₀₀) fue medida y ajustada a 0,2. Se salpicaron 2,5 µl de los cultivos diluidos de cada muestra sobre placas con agar Davis que contenían 0, 0,5, 5, 10, 20 o 50 µg/ml de TRIM. Las placas fueron incubadas durante 2-3 días a 30°C y fotografiadas con una cámara de UV en condiciones idénticas. Cada ensayo de salpicadura se repitió al menos 6 veces.

- 45 Experimentos de selección en medios de crecimiento en solución: Se recogieron cultivos de una noche en un medio LB (complementado con 30 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de estreptomina) y se resuspendieron en un medio de Davis mínimo. Las células diluidas (DO₆₀₀, 0,2) se cultivaron a 30°C en placas de 96 pocillos que contenían 0,2 ml del medio de Davis complementado con 0, 1, 5, 7, 10 y 12 µg/ml de TRIM y con o sin 100 µM de Pyr-41. Las tasas de crecimiento fueron monitorizadas midiendo la densidad óptica (DO₅₉₅) usando un espectrofotómetro de microplacas. Se calculó el tiempo de duplicación para el crecimiento logarítmico temprano (DO₅₉₅ entre 0,02 y 0,2). Todos los experimentos se realizaron al menos 9 veces (n = 9).

Ensayos de selección genética para la caracterización de mutantes de base estructural.

- 50 Recopilación de datos: Se cultivó *E. coli* W3110 que expresaba los pND-Ub y los pCD-Sub (y a veces también un plásmido de resistencia a la ampicilina que expresa constitutivamente la ligasa E3) hasta la fase logarítmica a 37°C en 5 ml de un medio LB complementado con 23 µg/ml de kanamicina, 16 µg/ml de estreptomina y 33 µg/ml de ampicilina. El cultivo se recogió y se lavó una vez con 5 ml de medio de Davis mínimo. La densidad bacteriana se ajustó, a DO₆₀₀ nm, a un valor de 0,3. Se salpicaron muestras del cultivo (2,5 ml cada una) sobre placas Petri con agar Davis que contenían 10 µg/ml de trimetoprima. El cultivo en cada experimento fue salpicado habitualmente de tres a cuatro veces. La mayoría de los experimentos se repitieron al menos de tres a cuatro veces (por lo tanto, 9 < n > 16). Tuvo lugar un escaneo con un lapso temporal (30 o 60 minutos) en una incubadora a 26°C usando un escáner regular de oficina de tamaño A4/carta estadounidense (Epson Perfection V37)⁴⁰.

- 5 Análisis de imágenes: Las imágenes se leyeron en Fiji⁴¹ como una pila usando "importar -> secuencia de imágenes". La densidad de las salpicaduras se midió usando el *Time Series Analyzer V3* (Balaji J 2007; un módulo de extensión Java de tipo ARchive ImageJ/Fiji que se puede descargar e instalar desde www.rsb.info.nih.gov/ij/plugins/time-series.html). Se especificaron regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) (normalmente como óvalos de 20×20) y se integraron y trazaron sus intensidades totales (densidades bacterianas), siendo el "eje Z" el índice de tiempo de la imagen. De manera similar, el segundo plano se midió, calculó y se restó de los datos recopilados. Las regresiones logísticas de las curvas de crecimiento se calcularon usando Origin. Se calculó un único parámetro que describe la eficacia del crecimiento de la siguiente manera: se extrajo la pendiente de la curva de crecimiento en la "densidad media máxima" y se dividió por su índice de tiempo.
- 10 Purificación de proteínas: Se purificaron las proteínas de *E. coli* usando etiquetas de afinidad como se ha descrito anteriormente¹⁷. Con fines de cristalización, las proteínas se concentraron a 5-20 mg/ml usando un Centricon® (Amicon Ultra), en una solución final de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM y ditiotreitol (DTT) 5 mM.
- 15 Análisis por inmunoelectrotransferencia: Tras la separación en SDS-PAGE, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo de etiqueta de epítopo anti His de conejo (disolución 1:20.000, Rockland) o anticuerpo anti GST de ratón (1:200, Santa Cruz), y anticuerpo secundario anti-ratón de cabra acoplado con tinción infrarroja (1:12.000, LI-COR). Las manchas se escanearon usando un sistema Odyssey (LI-COR Biosciences) a 700 y 800 nm.
- 20 Cristalización y recopilación de datos: Se han documentado⁶⁰ la cristalización y la recopilación de datos y el procesamiento de Ent1-ENTH de la levadura. Se concentró Epn1-ENTH purificado de pez cebra a razón de 10 mg/ml y se cristalizó en KPO₄ 0,1M pH 7,0 y PEG 3.350 al 19% a 20°C. Los cristales se crioprotegieron con etilenglicol al 25% y se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos se recopilaron en la línea de haz ID29 (ESRF, Grenoble) y se procesaron con el soporte lógico HKL200061.
- 25 Determinación y refinamiento de la estructura: La estructura de los dominios ENTH fue resuelta por reemplazo molecular (MR, por sus siglas en inglés); se usó 1HOA³⁷ para el modelo de búsqueda con PHASER⁹². Para facilitar la búsqueda de MR, se eliminaron los primeros 17 residuos y se ejerció una reducción de la alanina en los residuos no conservados. Se llevaron a cabo la construcción y el refinamiento del modelo con PHENIX⁶³, Refmac5⁶⁴ y COOT⁶⁵.
- 30 Se purificó la Rpn10 ubiquitilada de *E. coli* y se la cristalizó como se ha descrito anteriormente^{5, 35}. Se descubrió que los cristales sumamente delgados (1-3 µm) eran muy sensibles a daños por radiación. Se usó el soporte lógico BEST, que predijo precisamente una estrategia eficaz de recopilación de datos para lograr un conjunto de datos de completitud total para estos cristales del grupo espacial C2, con solo 95 imágenes en etapas de oscilación de 1,75°. Se recopilaron los datos en la línea de haz ID14-4 (ESRF) a una longitud de onda de $\lambda = 0,93930 \text{ \AA}$ en condiciones criogénicas de 100°K. Se determinó la estructura por reemplazo molecular usando PHASER⁴², en donde se usaron el dominio Rpn10-vWA de la *S. pombe* (PDB 2XSN) y Ub (PDB 1UBQ)⁴¹ como modelos de búsqueda inicial. Se usó la construcción automática PHENIX para proporcionar un modelo inicial. La construcción y el refinamiento del modelo se llevaron a cabo con PHENIX⁴³, Refmac5⁴⁴ y COOT⁴⁵. Los parámetros de geometría del enlace isopeptídico se restringieron dentro del proceso de refinamiento en PHENIX. La estructura fue validada con PROCHECK⁴⁶ y la herramienta de validación de PDB. La estadística del análisis de Ramachandran arrojó que el 98,7% de los residuos se encontraba en las regiones más favorecidas o permitidas adicionales y que el 1,3% se encontraba en las regiones generosamente permitidas. No se encontró residuo alguno en regiones no permitidas. Se descubrió que el conector que une el dominio vWA al UIM tiene una propensión intrínseca a la escisión en el inicio de la bisagra. De hecho, el conector se cortó espontáneamente durante la cristalización. En consecuencia, la proteína cristalizada contenía el dominio vWA (residuos 1-191) y su Ub conjugada en K84. Curiosamente, las estructuras de la *apo* Rpn10 de la *S. cerevisiae* y de la *S. pombe*^{18,24} también presentan formas truncadas de la proteína en la misma ubicación.
- 35
- 40
- 45 Ensayos de reticulación: La reticulación se llevó a cabo usando suberato disuccinimidílico (DSS) 0,5 mM como ha sido descrito por ⁶⁶.
- Resonancia plasmónica de superficie: Se inmovilizaron His₆-MBP-ENTH purificados o mutantes en un chip Ni⁺² a una densidad de ~800U. Se inyectó Ub no etiquetada (analito) con un caudal de 20 ml por minuto en 150 mM de NaCl, 10 mM de HEPES pH 7,0 y polisorbato 20 al 0,010% a 24°C; se usaron 500 mM de imidazol para la regeneración de la superficie. Para evitar la inmovilización del analito agregado, la Ub purificada fue cromatografiada mediante filtración en gel y sonicada de forma breve inmediatamente antes de los experimentos de SPR. Los datos se procesaron con BioEvaluation y el ajuste se llevó a cabo como un modelo de unión a un sitio único con OriginLab. Los errores estándar se derivaron de al menos tres muestras.
- 50
- 55 Análisis de Rpn10-vWA:Ub por SPR e interacciones no covalentes de mutantes: La configuración experimental comprendió un anticuerpo α -GST inmovilizado en un chip CM5 según el protocolo del fabricante (GE Healthcare). Los ligandos (derivados de Rpn10) se expresaron y purificaron como proteínas de fusión GST y se capturaron en el chip. El analito fue mono-Ub libre. Antes de cada experimento, el ligando y las proteínas del analito fueron sometidos a cromatografía de exclusión por tamaño. Cada medición se tomó por triplicado. El experimento comprendió de 90 a 100 segundos para la unión y de 300 a 350 segundos para la disociación. Se inyectaron analitos de Ub de la forma natural y mutante a un caudal de 10 ml/min en HEPES 10 mM, pH 7,0, NaCl 150 mM y polisorbato 20 al 0,005% a

25°C. Al final de cada experimento, se eliminaron los ligandos y se logró la regeneración de la superficie haciendo fluir glicina-HCl 10 mM, pH 2,6, seguido de etapas de lavado secuenciales de 1-2 minutos con SDS al 0,1% y NaOH 10 mM. Los datos se procesaron usando el soporte lógico Biacore BIAevaluation. Se usó un modelo de unión de sitio único para el ajuste de curvas de los datos de unión (SigmaPlot). Para su representación gráfica, se cambió de escala a los datos de manera que $R_{max} = 100$.

Detección de la ubiquitinación in vivo: El plásmido pSchHis₆-Sem1 fue transformado en las cepas SEY6210, *rsp5::HIS3*, pDsRed415-*rsp5*^{WT} y *rsp5-1* (*rsp5*^{L733S}) *MATa ura3-52, his3-200, trp1-901, lys2-801, suc2-9, leu2-3* y cultivado a 26°C en 50 ml de medio YPD (2% de glucosa) complementado con 200 µg/ml de G418. En la fase logarítmica, se recogieron los cultivos y las pastas se lavaron con DDW y se transfirieron a 50 ml del medio YPD (2% de galactosa) complementado con 200 µg/ml de G418. Cada cultivo fue dividido en dos matraces y creció a temperaturas permisivas (26°C) y restrictivas (37°C) durante 4 horas adicionales. Los cultivos se recogieron y se lisaron en 2 ml de NaOH 1,85 N frío y β-mercaptoetano al 7,5% durante 10 minutos en hielo. Las proteínas se precipitaron con la adición de la mitad del volumen de TCA al 50 % (concentración final de TCA al 25 %) y se recogieron mediante centrifugación (18.000 rpm, 20 minutos). El sedimento se resuspendió y se lavó con 3 ml de acetona al 80% enfriada con hielo y se recogió mediante centrifugación (18.000 rpm, 5 minutos). A continuación, el sedimento se resuspendió en 1,5 ml de tampón de resuspensión (guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1%, pH 8,8) y se incubó a 25°C durante 1 hora mientras se lo hacía rotar. La fracción proteica se incubó durante 20 minutos a 4°C con 70 µl de resina Ni²⁺ y se lavó dos veces con tampón de resuspensión seguido de dos lavados con tampón 2 (urea 8 M, Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1%) y dos lavados con tampón 3 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM). Las perlas de Ni²⁺ se hirvieron en tampón de Laemmli y se separaron mediante SDS-PAGE seguido de análisis por inmunoelectrotransferencia con anticuerpo anti His₆.

Construcción de la biblioteca: Se agruparon ORF etiquetadas con GST de levadura (colección GE) a partir de cultivos en placas de 384 pocillos y se aislaron plásmidos como un conjunto. Los genes de fusión GST fueron amplificados mediante PCR. Los productos de PCR se fraccionaron por tamaño (350 a 3000 pb) por electroforesis en gel seguido por purificación mediante PCR usando el equipo PureLink (Invitrogen) y subclonados en el marco de lectura con cDHFR en el vector pCD-Sub mediante recombinación. La biblioteca resultante fue transformada en células DH5α y mantenida a -80°C. Los plásmidos aislados de la biblioteca se transformaron en células competentes W3110 que contenían el pND-Ub y expresaban constitutivamente plásmidos de ligasa E3. Tras la transformación, las bacterias se colocaron en placas sobre medios selectivos.

Códigos de acceso: Las coordenadas atómicas y los factores de estructura para las estructuras cristalinas de los dominios Ent1-ENTH de *Saccharomyces cerevisiae* y Epn1-ENTH de *Danio rerio* se depositaron en el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank) con los códigos de ID rcsb079376 y rcsb074441, respectivamente.

Resultados

Construcción de un sistema de selección para eventos de ubiquitinación en bacterias

Se generó un sistema para la selección genética de eventos de ubiquitinación en *E. coli*. En este sistema, dos fragmentos de un gen indicador escindido se unen a la Ub y a un sustrato de ubiquitinación y son coexpresados junto con el aparato de ubiquitinación en *E. coli* (Figura 1A). Específicamente, el fragmento terminal N de la dihidrofolato reductasa (*nDHFR*) murina se fusionó con el N-terminal de Ub (en un plásmido denotado pND-Ub) y el fragmento terminal C de *DHFR* (*cDHFR*) con el N-terminal del sustrato (en un plásmido denotado pCD-Sub). A la espera del sustrato de ubiquitinación, los dos fragmentos de *DHFR* se ensamblan en una enzima funcional que confiere resistencia a los antibióticos [trimetoprima (TRIM)] y crecimiento en medios selectivos¹⁹. Los fragmentos de *DHFR* se unieron a la Ub y al sustrato con conectores largos diseñados para conferir características flexibles pero estables que facilitaban el ensamblaje funcional del indicador (Figura 9). El sistema tiene una arquitectura policistrónica en la que el aparato de ubiquitinación y el sustrato son coexpresados a partir de dos o tres vectores compatibles (Figura 1A). Los operones sintéticos se expresan a partir de un promotor constitutivo [promotor izquierdo (pL) de fago λ no regulado], adecuado para estudios genéticos bacterianos.

Para evaluar la funcionalidad del sistema, se fusionó el receptor de Ub Vps9¹⁵⁻¹⁷, bien caracterizado, con *cDHFR* (pCD-Sub) y se coexpresó con Rsp5 (E3) y el vector pND-Ub que expresa E1 y la Ubc4 (E2) de la levadura. Se descubrió que la cepa W3110 proporcionaba el mejor entorno genético en las condiciones experimentales descritas. Las bacterias que expresaban un sistema de ubiquitinación completa para Vps9 crecieron en condiciones tanto permisivas como no permisivas (Figura 1B). Sin embargo, las cepas que carecían de Ub o E1/E2 no crecieron sobre medios selectivos. Para demostrar que el sistema desarrollado mantiene la especificidad conocida de E3:sustrato, la Rsp5 fue sustituida con Siah2, una ligasa E3 no afín. Las bacterias crecieron únicamente cuando se expresó la E3 afín (Figura 1C), aunque la Siah2 fuera funcional en el sistema de selección, ya que promovía la autoubiquitinación (Figura 2B).

El sistema de *DHFR* escindido se desarrolló originalmente para la identificación de interacciones proteína-proteína no covalentes¹⁹, lo que sugería que el sistema de selección puede detectar interacciones UBD:Ub no covalentes. Dado que los UBD presentan una afinidad bastante baja con la Ub¹⁴, se probaron diferentes concentraciones de antibióticos para identificar condiciones de crecimiento adecuadas para interacciones no covalentes de Vps9:Ub. Aunque el Vps9 presenta una de las afinidades más altas medidas de UBD:Ub^{15, 16}, el crecimiento se halló sólo a la concentración de

antibiótico de 0,1 µg/ml (Figura 1D). Dado que tal concentración de antibiótico está limitada para la selección, parece que el sistema desarrollado es selectivo únicamente para eventos de ubiquitinación.

El sistema de selección de ubiquitinación facilita la identificación y la caracterización de las E3

5 La mayoría de las ligasas E3 experimentan autoubiquitinación²⁰. Por tanto, el sistema de selección desarrollado proporciona una herramienta sencilla para su identificación y caracterización, ya que se predice que la autoubiquitinación confiere resistencia a los antibióticos. La Rsp5 de la levadura y la Siah2 humana, representativas de las ligasas de HECT y de RING, respectivamente, se fusionaron a *cDHFR*. Los fenotipos de crecimiento se observaron en condiciones no permisivas solo cuando se coexpresaron todos los componentes de ubiquitinación requeridos (Figuras 2A-B).

10 La inhibición de la Siah2 por la menadiona puede desempeñar un papel importante en la terapia contra el cáncer²¹. A medida que las bacterias modificadas se hicieron adictas a la autoubiquitinación de Siah2, se predijo que su inhibición presentaría un fenotipo de detención del crecimiento. La Figura 2B (derecha) muestra un fenotipo de detención del crecimiento en presencia de menadiona únicamente en las condiciones de adicción. De manera similar, la Cdc34, una E2 no afin, no soportaba el crecimiento. Por tanto, el sistema desarrollado podría ser empleado para la selección de fármacos potenciales. Se sugirió que algunas E3 usan una E2 para unirse a la primera Ub y una E2 diferente para construir la cadena de Ub²². El presente sistema puede facilitar la identificación de tales E2.

Identificación de una ligasa E3 novedosa y de sus E2 afines

20 Para demostrar la capacidad del sistema para identificar una ligasa E3 novedosa, los presentes inventores se centraron en una familia U-box del *E. coli* entohemorrágico (EHEC, por sus siglas en inglés) patógeno. Usaron como sonda la CHIP ligasa humana, bien caracterizada, en una búsqueda por PSI-BLAST contra el proteosoma del EHEC. La búsqueda recuperó una secuencia no caracterizada, la ECs3488, como una ligasa potencial que contenía una secuencia conservada de 35 aminoácidos con una identidad del 22% con respecto a una región hélice-bucle-hélice-beta del dominio U-box de la CHIP²³ (Figura 2C). La ECs3488, también denominada NleG6-3, ha sido postulada como una ligasa E3, pero su expresión y su función nunca han sido demostradas^{24, 25}. La ECs3488 fue clonada como una fusión con *cDHFR* y seleccionada contra una biblioteca completa de levaduras de las E2, dando lugar a la identificación de las Ubc4/5 como E2 afines para la ligasa E3 putativa (Figura 2D). A continuación, la funcionalidad de ligasa se examinó con los ortólogos de E2 humana UbcH5B/C (Figura 2E).

30 Con base en las estructuras de NleG2-3 y del complejo CHIP:UbcH5a (PDB 2KKX y 20XQ)²⁴, se construyó un modelo estructural para la interfaz ECs3488:E2 (Figura 2F) y el sistema de selección fue usado para evaluar el modelo. Los resultados corroboraron el modelo estructural, ya que los mutantes de unión a ECs3488:E2 presentaban fenotipos de detención considerable del crecimiento (Figura 2G).

Planteamiento de selección para la identificación y la caracterización de los UBD

35 Los dominios de unión a la ubiquitina (UBD) suelen unirse a mono-Ub con una baja afinidad que oscila entre 2 µM y 2100 µM^{15, 26}, lo que plantea un reto para los estudios bioquímicos y biofísicos. El sistema de selección estabiliza las interacciones no covalentes dinámicas y débiles de UBD:Ub formando un enlace covalente entre la Ub y el receptor de Ub (es decir, una ubiquitinación) en las bacterias. Los presentes inventores evaluaron la capacidad del sistema para detectar un UBD de baja afinidad uniendo el UIM de doble cara (dsUIM) de Hrs como sustrato^{27, 28} (Figura 3A). Se determinaron las estructuras de Hrs:STAM (también denominado complejo ESCRT-0) y en particular su complejo dsUIM:Ub y facilitaron evaluaciones moleculares detalladas^{29, 30}. La autoubiquitinación independiente de E3 de la mayoría de los receptores de Ub y la función promiscua de miembros de la subfamilia Ubc4/5 contribuyeron al análisis. No es preciso que los residuos de lisina disponibles para la ubiquitinación formen parte necesariamente del UBD, como se demostró para varias proteínas de UIM y UBA³¹. Se demostró que los residuos de alanina en cada cara del dsUIM interactuaban con el parche hidrófobo Ub I44 (Figura 3B). De hecho, se descubrió que el doble mutante A266Q, A268Q presentaba un fenotipo de detención del crecimiento. De modo similar, el mutante del parche I44 abolía el crecimiento bacteriano. El fenotipo de Ub-G76R demostró que el crecimiento también es dependiente de la ubiquitinación. Además, el análisis por inmunoelectrotransferencia mostró que se genera un enlace covalente entre la Ub y el Hrs (Figura 3C). Por último, se demostró que el crecimiento es dependiente de un aparato funcional de ubiquitinación omitiendo las enzimas E1/E2 (Figura 3A) o por administración del inhibidor E1 PYR-41³² (Figura 3D).

50 Se verificó/validó adicionalmente la funcionalidad del sistema con otros UBD estructuralmente diferentes, incluyendo el receptor proteasomal Rpn10, los dominios STAM1-UIM y ALIX-V humanos³³ y el dominio Hse1-VHS de la levadura²⁶, que están implicados conjuntamente en la gemación multivesicular y de retrovirus (Figuras 3E-H).

55 De forma similar a los componentes de ESCRT-0 (STAM, HRS y Hse1), las proteínas GGA también utilizan los UBD para transportar una carga ubiquitilada del aparato de Golgi al cuerpo multivesicular. Se demostró una afinidad de 2100 µM para el complejo GGA3-VHS:Ub²⁶. Se identificaron residuos críticos de triptófano y leucina en STAM1 y otros dominios VHS que se unen a la Ub en el parche I44. Además, los dominios VHS de GGA1 y 2, que carecen de manera natural de la leucina crítica, no se unen a la Ub. Se demostró que, pese a la débil afinidad, el sistema de selección distinguía entre estos fenotipos (Figura 3I).

Un beneficio de un antibiótico bacteriostático como la trimetoprima es que permite la acumulación de ensamblajes de *DHFR* funcionales, debido a la ubiquitinación, hasta un nivel umbral que es suficiente para conferir resistencia sin dañar las bacterias. Por tanto, el sistema desarrollado puede proporcionar una lectura súper sensible para la identificación y la caracterización genéticas de UBD potenciales, sin necesidad de purificarlos.

5 La ENTH es un UBD

A continuación, los presentes inventores intentaron cuestionar el sistema para detectar un nuevo UBD de afinidad ultradébil. Los dominios ENTH asumen un plegado similar al de VHS³⁴. Además, las proteínas epsina poseen una arquitectura similar a los receptores de Ub Hrs, STAM y GGA al albergar VHS/ENTH, dos parches de unión a Ub (dominios dsUIM o 2xUIM o GAT) seguidos de un conector largo flexible que contiene elementos de unión a la maquinaria endocítica, incluida una caja de enlace de clatrina (Figura 10). Por lo tanto, aunque ENTH probablemente carezca de los residuos críticos de triptófano o leucina²⁶, se especuló que también se enlaza con la Ub. Se empleó el sistema de selección y se demostró que los dominios *cDHFR*-ENTH de la levadura y el pez cebrá promueven el crecimiento en medios selectivos de manera independiente de E3 (Figuras 4A-B). Esto sugiere que estos dominios ENTH se unen directamente a Ub~E2. De hecho, los ensayos de reticulación bioquímica y la purificación/detección de derivados de Ent1 de levadura ubiquitilados de *E. coli*¹⁷ respaldan firmemente los datos genéticos que sugieren que la ENTH se une directamente a la Ub (Figura 11A-E).

La estructura del dominio ENTH proporciona información sobre el mecanismo de reconocimiento de la Ub

Para obtener información de alta resolución sobre la interacción ENTH:Ub, los presentes inventores intentaron cristalizar el complejo. Probablemente debido a la afinidad ultradébil (véase la cuantificación a continuación), únicamente se obtuvieron cristales de apo ENTH o Ub. Las estructuras de los dominios de la levadura (Sc_ENTH) y el pez cebrá (Zf_ENTH) se determinaron mediante reemplazo molecular de resoluciones 1,95 Å y 1,41 Å, respectivamente (Tabla 3 y Figuras 4C-J).

Tabla 3: Datos cristalográficos y estadísticas de refinamiento

Constructo	Z.f ENTH	S.c ENTH
Recopilación de datos		
Fuente de rayos X	ESRF ID29	ESRF ID29
Longitud de onda (Å)	0,978	0,978
Grupo espacial	P1	P 21 21 21
Dimensiones de las células		
a,b,c, (Å)	a= 42,364, b= 51,724, c= 64,639	a=32,69, b=35,46, c=110,62
α , β , γ (°)	α = 89,333, β = 76,373, γ = 79,737	α = β = γ =90
Resolución (Å)	1,4-62,79 (1,409-1,425) ^a	
<i>R</i> -fusión [¶] (%)	7,5 (3,2)	0,166
<i>I</i> / σ <i>I</i>	5,3 (4,4)	6,79 (1,50)
Completitud (%)	94,0 (88,97)	99,18 (99,58)
Redundancia	3,4 (3,0)	
Reflexiones observadas	325.868	37572
Reflexiones únicas	95136 (9256)	9806 (1429)
Refinamiento		
Resolución	1,41-62,79 ^a (1,41-1,425)	1,95-55,42 ^a (1,95-2,0)
<i>R</i> _{trabajo} / <i>R</i> _{libre}	0,1545 / 0,2015	0,1862 / 0,2364
Número de átomos	6022	1254
Proteína	5189	137
Ligando/ion	10	
Agua	823	97
Factor <i>B</i> promedio (Å ²)	17,5	19,00
Disolvente (%)	28,83	29,40
Desviaciones de la media cuadrática		
Longitudes de enlace (Å)	0,009	0,018
Ángulos de enlace (°)	1,134	1,30
Ramachandran (%)		
Favorecidas	94,1	96
Permitidas adicionales	5,7	4,0
Atípicas	0,2	0,0
No permitidas		0,0
Código PDB	5LP0	5LOZ

[¶]*R*-fusión = $\sum hkl \sum i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum i I_i(hkl)$, en donde $I_i(hkl)$ es la intensidad de la observación de la reflexión *i*-ésima *hkl* y $\langle I(hkl) \rangle$ es la intensidad media de la reflexión *hkl*.

^aEnvoltura de resolución externa

Los mapas de densidad electrónica de alta calidad (Figuras 4C-D) demostraron que, aunque estas estructuras son muy similares, pueden verse diferencias evidentes en el bucle que une las hélices 3 y 4 y en el ángulo entre la estructura de superhélices y la hélice 8 (Figuras 12A-B).

5 Para generar un modelo estructural del complejo ENTH:Ub, se superpusieron dominios ENTH sobre el complejo STAM1-VHS:Ub^{26, 35, 36}. Los modelos mostraron que los residuos de unión a Ub de STAM1 W26 y L30 se sustituyeron de manera natural por S37 y S41 en Zf_ENTH y K36 e I40 en Sc_ENTH (Figuras 4C-J). Enigmáticamente, estos modelos sugieren que las Ub R42 y R72 forman interacciones electrostáticas con E42 y D45 o E41 y E44 de Zf_ENTH y Sc_ENTH, respectivamente. Ambos modelos predijeron interacciones adicionales que parecían aportar poco a la unión.

10 Enigmáticamente, la superposición del modelo ENTH:Ub sobre la estructura del complejo ENTH con el lípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato³⁷ muestra que la ENTH se une a la Ub y al lípido de membrana en sitios opuestos (Figura 13), lo que sugiere que la ENTH puede unirse a la Ub mientras está asociada con la membrana. De manera similar, la superposición del complejo VHS:Ub sobre el complejo VHS:M6PR-terminal (señal de clasificación grupal de ácido-dileucina del receptor de manosa-6-fosfato)^{38, 39} muestra el mismo fenómeno, lo que sugiere que tanto el dominio VHS como el ENTH pueden reconocer la carga transmembrana ubiquitilada mientras está asociada a la membrana.

Planteamiento genético para la validación estructural de la interfaz ENTH:Ub

20 Los dominios ENTH carecen de la Trp o Ile crítica, lo que sugiere que las interacciones acumulativas de los residuos periféricos compensan su papel en la unión a la Ub. Para evaluar las aportaciones de residuos específicos a la interacción ENTH:Ub, se introdujeron mutaciones puntuales en la interfaz prevista. Las tasas de crecimiento fueron monitorizadas mediante el escaneo en lapsos de tiempo de las bacterias usando un escáner simple de tamaño A4/carta estadounidense con un soporte lógico de control modificado⁴⁰. Para cuantificar las tasas de crecimiento, se aplicó un simple procedimiento *Time Series Analyzer* basado en Fiji⁴¹ para medir una pila típica de 100-200 escaneos (véanse los detalles en la sección de Materiales y procedimientos) por medio de la densidad óptica (Figuras 5B-5F).

25 La mutagénesis de Ala o intercambio de carga de los residuos ácidos de Zf_ENTH demostró los fenotipos de detención del crecimiento (Figuras 5A,C,D). Se encontró un fenotipo similar, aunque menos severo para el mutante de Ub R42E, R72E cuando mutaron los residuos ácidos de la proteína de la levadura, lo que sugirió ligeras diferencias estructurales entre estos complejos. Notablemente, un ciclo de permutaciones en el que los residuos E42 y D45 de Zf_ENTH fueron sustituidos con residuos de arginina, y los R42 y R72 de Ub fueron sustituidos con residuos glutámicos, restauró el crecimiento (Figura 5D). Este resultado refleja el nivel de precisión del modelo estructural y la elevada sensibilidad del sistema de selección. Además, el mutante de Ub R42E, R72E no podría suprimir al mutante de Zf_ENTH E42A, D45A lo que significa la importancia de estas interacciones electrostáticas. Los mutantes de Zf_ENTH S37G y Y83A, de los que se había predicho que proporcionarían aportaciones menores de la unión, ciertamente produjeron fenotipos de crecimiento menores, pero significativos (Figura 5A). Tomados en conjunto, los resultados de este análisis mutacional corroboran firmemente el modelo estructural y demuestran el poder del sistema desarrollado para detectar y cuantificar diferencias relativamente menores en las interacciones proteína-proteína a lo largo de las vías de Ub.

Se cuantificaron bioquímicamente los rendimientos de la ubiquitinación de las proteínas de la forma natural y mutante de Sc_ENTH (Figuras 5G-H). Los dobles mutantes de ENTH E41R, E44R y de Ub R42E, R72E redujeron significativamente el rendimiento de la ubiquitinación en aproximadamente un 60-80%.

40 Por último, para corroborar biofísicamente los datos y cuantificar la afinidad del complejo ENTH:Ub, se realizaron mediciones de resonancia plasmónica de superficie (SPR) con Sc_ENTH inmovilizado y mono-Ub libre (Figura 5I). Se encontró una unión ultradébil con K_d de 2.300 μM para el complejo de la forma natural. Este resultado es compatible con el modelo y mediciones previas de los inventores de complejos homólogos VHS:Ub en Hrs, Vps27 y GGA3, que presentan afinidades de 1.400, 1.500 y 2.100 μM , respectivamente²⁶. Curiosamente, los mutantes Ub R42E, R72E o Sc_ENTH E41R, E44R mostraron curvas de unión de saturación que podrían ajustarse a un modelo de unión única (Figura 5I y Figuras 14A-C) con afinidades estimadas respectivas 2,6 veces y 3,5 veces menores que las de la forma natural. Notablemente, para estos mutantes, las concentraciones de Ub (analito) eran demasiado bajas para obtener valores de K_d precisos, como se refleja en los altos errores estándar. En conjunto, la correlación entre las mediciones de SPR y los datos genéticos y bioquímicos proporciona una estimación aproximada de la sensibilidad del sistema de selección en la monitorización de la unión de Ub.

45 Las interacciones proteína-proteína ultradébiles ($\sim 3.000 \mu\text{M}$) son significativas, dado que regulan diversas funciones biológicas^{42, 43}. Normalmente, las cadenas K63-tri-Ub constituyen la señal principal para el tráfico membranal de proteínas dependiente de la clatrina⁴⁴⁻⁴⁶. Por lo tanto, los receptores de Ub que decodifican esta señal suelen procesar tres parches de unión a Ub⁴⁷ (Figuras 11A-E). La avides y/o la cooperación de los UBD en tándem dan selectividad a estos receptores de Ub. Se ha estudiado exhaustivamente la aportación del dominio VHS a la afinidad total y a la selectividad de las proteínas de VHS-UIM^{26, 35}. Por lo tanto, la afinidad ultradébil descrita en el presente documento debería ser considerada en el contexto de la epsina de longitud máxima, que contiene dos UIM adicionales.

Identificación de Sem1 como diana de ubiquitinación de Rsp5

Uno de los mayores desafíos en el campo de la Ub es identificar la asociación entre las ligasas E3 y sus dianas de ubiquitinación afines (Figuras 6A-D). Para demostrar el potencial del sistema desarrollado para abordar este desafío, los presentes inventores construyeron una biblioteca de fusión de levadura de genoma completo en el marco de lectura con cDHFR y cribaron la biblioteca contra Rsp5. Se amalgamó todo el conjunto de ORF etiquetados con GST de levadura (colección de GE) y se aislaron los plásmidos como un conjunto. La biblioteca de plásmidos se amplificó mediante PCR y los productos se subclonaron en el sistema de selección desarrollado mediante ensamblaje de Gibson⁴⁸. Dado que muchos receptores de Ub pueden sufrir ubiquitinación independiente de E3, los presentes inventores esperaban obtener un crecimiento falso positivo de estos ORF y, por lo tanto, emplearon un ensayo para la ubiquitinación independiente de E3. Compararon las tasas de crecimiento de las colonias positivas con y sin Rsp5 usando el escáner como se ha descrito anteriormente. Se identificaron menos de 100 colonias positivas (de 10 placas de Petri). La mayoría de ellas mostraron tasas de crecimiento muy similares en presencia o ausencia de Rsp5. Sin embargo, la colonia de Sem1 demostró tasas de crecimiento significativamente más altas cuando se coexpresaba Rsp5. La Sem1 y su ortóloga humana DSS1 (deleción de mano dividida/pie dividido) participan en procesos críticos que incluyen el desarrollo, el ensamblaje del proteosoma, la reparación del ADN y el cáncer⁴⁹⁻⁵³. Dado que la DSS1 posee dos UBD conservados⁵⁴, se probó la Sem1 para ver si experimentaba ubiquitinación independiente de E3. Se descubrió que el Rsp5 promovía significativamente la ubiquitinación de Sem1 (Figuras 6A-B). Además, la detección de His₆-MBP-Sem1 ubiquitilado de *E. coli* mostró resultados muy similares (Figura 6C). Dado que este es el primer informe sobre la ubiquitinación de la Sem1, los presentes inventores verificaron si la Sem1 experimenta ubiquitinación dependiente de Rsp5 *in vivo* en la levadura. La ubiquitinación se detectó en extractos de levadura de la forma natural y en un alelo *rsp5* sensible a la temperatura, *rsp5-1*. La expresión de His₆-Sem1 dependiente de la galactosa a temperaturas permisivas y restrictivas mostró que Rsp5 es una ligasa genuina de Sem1, ya que, a diferencia de la fn, la ubiquitinación en *rsp5-1* se detectó a 26°C pero no a 37°C (Figura 6D).

Uso de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) como marcador de selección

Con base en la estructura cristalina de la CAT_i en su *apo* y complejo con cloranfenicol (entradas de PDB 3U9B y 3U9F), los presentes inventores diseñaron un sistema de CAT escindida. Para verificar si el sistema de CAT escindida recién diseñado puede identificar eventos de ubiquitinación, unieron una diana de ubiquitilación al fragmento nCAT y la Ub al fragmento cCAT (Figuras 15A-D). Las proteínas fusionadas se coexpresaron con su aparato de ubiquitilación afín y se salpicaron bacterias sobre medios selectivos (ricos en agar complementado con 7-10 mg de cloranfenicol por ml). Al principio, se probó una cascada de ubiquitilación simple que constaba de un receptor de Ub (una proteína que contenía el UBD de dominio de unión a Ub) como diana de ubiquitilación. Específicamente, el receptor de Ub del dominio Hse1-VHS unido a la nCAT se coexpresó con nCAT unida a Ub. También se expresaron la E1 (Uba1) de trigo y la E2 (Ubc4) de levadura. Como se muestra en la Figura 16A, la expresión de la cascada de ubiquitilación completa del dominio VHS unido al sistema de CAT escindida presentó el fenotipo de crecimiento. Sin embargo, cuando se eliminaron las enzimas de ubiquitilación E1 y E2 o Ub, se encontraron fenotipos de detención del crecimiento.

Para comparar la eficacia del crecimiento entre los sistemas de DHFR escindida y de CAT escindida, se construyó una cascada dependiente de ubiquitilación Rpn10 UBE3A (también denominada E6AP) en ambos sistemas. Se construyó una mutación K>R dentro de UBE3A que da lugar a una ligasa E3 hiperactiva constitutiva. Esta ligasa se expresó a partir de un 3^{er} vector bajo la regulación del promotor permeable pTac (es decir, sin la adición de IPTG) en bacterias que expresan Ub, Rpn10, Uba1 (E1) y UBCH7 (E2). La Figura 16B muestra una diferencia significativa en la eficacia del crecimiento entre los dos sistemas.

Para demostrar la aplicación del sistema para estudiar el efecto de mutaciones puntuales, se introdujo una mutación del síndrome de Angelman (AS, por sus siglas en inglés) en UBE3A y se analizó el crecimiento bacteriano en la forma natural (detenida de por sí), en el mutante K>R (hiperactivo) y en la mutación de AS en el entorno de la mutación K>R (Figura 16C). Se descubrió que la mutación K>R daba lugar a un fenotipo de crecimiento más eficaz, mientras que la mutación AS daba lugar a un fenotipo de crecimiento de menor eficacia que con la enzima de la FN. De manera similar, también se evaluó en el sistema la función de UBE3B, una Ub-ligasa E3 de HECT que presenta una dificultad de purificación en su forma activa y que está implicada en el síndrome de Kaufman (KS, por sus siglas en inglés; Flex y otros 2013). Usando el sistema de selección, se identificó el residuo de lisina crítico que experimenta autoubiquitilación que conduce a la restricción alostérica de la enzima y se construyó un mutante no restringido K>R. La mutación KS en el entorno de UBE3B K>R demostró ser un fenotipo de crecimiento (Figura 16D).

Referencias

1. Weissman, A.M., Shabek, N. y Ciechanover, A. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 605-620 (2011).
2. Wild, P. y otros Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333, 228-233 (2011).
3. Nalepa, G., Rolfe, M. y Harper, J.W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov* 5, 596-613 (2006).

4. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. y Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075 (2008).
5. Ciechanover, A. y Brundin, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-446 (2003).
6. Bachmair, A., Finley, D. y Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186 (1986).
7. Deshaies, R.J. y Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434 (2009).
8. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, L.A. y Rose, A.I. Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-1786 (1980).
9. Li, W. y otros Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3, e1487 (2008).
10. Wilkinson, K.D., Urban, M.K. y Haas, A.L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 255, 7529-7532 (1980).
11. Hicke, L., Schubert, H.L. y Hill, C.P. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-621 (2005).
12. Di Fiore, P.P., Polo, S. y Hofmann, K. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 491-497 (2003).
13. Hoeller, D. y otros Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 8, 163-169 (2006).
14. Hurley, J.H., Lee, S. y Prag, G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-372 (2006).
15. Prag, G. y otros Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p. *Cell* 113, 609-620 (2003).
16. Shih, S.C. y otros A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *EMBO J* 22, 1273-1281 (2003).
17. Keren-Kaplan, T. y otros Synthetic biology approach to reconstituting the ubiquitylation cascade in bacteria. *EMBO J* 31, 378-390 (2012).
18. Keren-Kaplan, T. y Prag, G. Purification and crystallization of mono-ubiquitylated ubiquitin receptor Rpn10. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 68, 1120-1123 (2012).
19. van den Bogaart, G. y otros Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. *Nat Struct Mol Biol* 18, 805-812 (2011).
20. Lorick, K.L. y otros RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-11369 (1999).
21. Shah, M. y otros Inhibition of Siah2 ubiquitin ligase by vitamin K3 (menadione) attenuates hypoxia and MAPK signaling and blocks melanoma tumorigenesis. *Pigment cell & melanoma research* 22, 799-808 (2009).
22. Windheim, M., Peggie, M. y Cohen, P. Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem J* 409, 723-729 (2008).
23. Bhavsar, A.P., Guttman, J.A. y Finlay, B.B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* 449, 827-834 (2007).
24. Wu, B. y otros NleG Type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-Box E3 ubiquitin ligases. *PLoS pathogens* 6, e1000960 (2010).
25. Tobe, T. y otros An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* 0157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14941-14946 (2006).
26. Ren, X. y Hurley, J.H. VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J* 29, 1045-1054 (2010).
27. Oldham, C.E., Mohnhey, R.P., Miller, S.L., Hanes, R.N. y O'Bryan, J.P. The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol* 12, 1112-1116 (2002).

28. Polo, S. y otros A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 451-455 (2002).
29. Hirano, S. y otros Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nat Struct Mol Biol* 13, 272-277 (2006).
- 5 30. Prag, G. y otros The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev Cell* 12, 973-986 (2007).
31. Hoeller, D. y otros E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell* 26, 891-898 (2007).
32. Yang, Y. y otros Inhibitors of ubiquitin-activating enzyme (E1), a new class of potential cancer therapeutics. *Cancer research* 67, 9472-9481 (2007).
- 10 33. Keren-Kaplan, T. y otros Structure-based in silico identification of ubiquitin-binding domains provides insights into the ALIX-V:ubiquitin complex and retrovirus budding. *EMBO J* 32, 538-551 (2013).
34. Misra, S., Beach, B.M. y Hurley, J.H. Structure of the VHS domain of human Tom1 (target of myb 1): insights into interactions with proteins and membranes. *Biochemistry* 39, 11282-11290 (2000).
- 15 35. Lange, A. y otros Evidence for cooperative and domain-specific binding of the signal transducing adaptor molecule 2 (STAM2) to Lys63-linked diubiquitin. *J Biol Chem* 287, 18687-18699 (2012).
36. Hong, Y.H. y otros Identification of a novel ubiquitin binding site of STAM1 VHS domain by NMR spectroscopy. *FEBS letters* 583, 287-292 (2009).
37. Ford, M.G. y otros Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361-366 (2002).
- 20 38. Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J.S. y Hurley, J.H. Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 415, 933-937 (2002).
39. Shiba, T. y otros Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1. *Nature* 415, 937-941 (2002).
40. Levin-Reisman, I. y otros Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nat Methods* 7, 737-739 (2010).
- 25 41. Schindelin, J. y otros Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682 (2012).
42. Vaynberg, J. y otros Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility. *Mol Cell* 17, 513-523 (2005).
43. Malovannaya, A. y otros Analysis of the human endogenous coregulator complexome. *Cell* 145, 787-799 (2011).
- 30 44. Huang, F. y otros Lysine 63-linked polyubiquitination is required for EGF receptor degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15722-15727 (2013).
45. Vina-Vilaseca, A. y Sorkin, A. Lysine 63-linked Polyubiquitination of the Dopamine Transporter Requires WW3 and WW4 Domains of Nedd4-2 and UBE2D Ubiquitin-conjugating Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 285, 7645-7656 (2010).
- 35 46. MacGurn, J.A., Hsu, P.C. y Emr, S.D. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem* 81, 231-259 (2012).
47. Rahighi, S. y Dikic, I. Selectivity of the ubiquitin-binding modules. *FEBS letters* 586, 2705-2710 (2012).
48. Gibson, D.G. y otros Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343-345 (2009).
- 40 49. Crackower, M.A. y otros Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Human molecular genetics* 5, 571-579 (1996).
50. Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M. y Kobayashi, H. Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *J Cell Sci* 117, 6447-6454 (2004).
- 45 51. Jantti, J., Lahdenranta, J., Oikkonen, V.M., Soderlund, H. y Keranen, S. SEM1, a homologue of the split hand/split foot malformation candidate gene Dss1, regulates exocytosis and pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 909-914 (1999).

52. Marston, N.J. y otros Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Biol* 19, 4633-4642 (1999).
53. Ma, Y.Y. y otros Identification of the deleted in split hand/split foot 1 protein as a novel biomarker for human cervical cancer.
- 5 54. Honda, R., Tanaka, H. y Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters* 420, 25-27 (1997).
55. Chatterjee, C., McGinty, R.K., Fierz, B. y Muir, T.W. Disulfide-directed histone ubiquitylation reveals plasticity in hDot1L activation. *Nat Chem Biol* 6, 267-269 (2010).
- 10 56. Chen, J., Ai, Y., Wang, J., Haracska, L. y Zhuang, Z. Chemically ubiquitylated PCNA as a probe for eukaryotic translesion DNA synthesis. *Nat Chem Biol* 6, 270-272 (2010).
57. Kumar, K.S., Spasser, L., Erlich, L.A., Bavikar, S.N. y Brik, A. Total Chemical Synthesis of Di-ubiquitin Chains. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 9126-9131 (2010).
58. Kamadurai, H.B. y otros Mechanism of ubiquitin ligation and lysine prioritization by a HECT E3. *eLife* 2, e00828 (2013).
- 15 59. Du, Y., Xu, N., Lu, M. y Li, T. hUbiquitome: a database of experimentally verified ubiquitination cascades in humans. *Database : the journal of biological databases and curation* 2011, bar055 (2011).
60. Scott, D.C., Monda, J.K., Bennett, E.J., Harper, J.W. y Schulman, B.A. N-terminal acetylation acts as an avidity enhancer within an interconnected multiprotein complex. *Science* 334, 674-678 (2011).
- 20 61. Otwinowski, Z. y Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymology* 176, 307-326 (1997).
62. McCoy, A.J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 63, 32-41 (2007).
63. Adams, P.D. y otros PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 58, 1948-1954 (2002).
- 25 64. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. y Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 53, 240-255 (1997).
65. Emsley, P. y Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60, 2126-2132 (2004).
- 30 66. Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N. y Komada, M. STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell* 14, 3675-3689 (2003).
67. Adhya, S.L., Court, D.L., Friedman, D.I. y Gottesman, M.E. Obituary - Amos Oppenheim (31 October 1934 to 24 September 2006). *Molecular Microbiology* 67, 685-686 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de un agente que regula la actividad o la cantidad de una enzima ubiquitinante que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una célula bacteriana con el agente, produciendo la célula bacteriana una señal detectable o seleccionable que se correlaciona con el nivel de ubiquitinación de un sustrato, siendo modificada genéticamente dicha célula bacteriana para que exprese:
- (i) dicha enzima ubiquitinante;
- 10 (ii) la ubiquitina unida a un primer fragmento polipeptídico; y
- (iii) dicho sustrato unido a un segundo fragmento polipeptídico, asociándose dicho primer fragmento polipeptídico con dicho segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación de dicho sustrato; y
- (b) medir el nivel o la tasa de acumulación de dicha señal detectable o seleccionable, siendo indicativo un cambio en el nivel con respecto al nivel en ausencia de dicho agente de un agente que regula la actividad o la cantidad de la enzima ubiquitinante.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en donde dicha enzima ubiquitinante es una ubiquitina ligasa E3.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en donde dicha ubiquitina ligasa E3 se selecciona del grupo constituido por Siah2, Smurf1, MDM2, BRCA1, PARKIN, UBE3A, TRIM5, NEDD4, UBR5 y Huwe1.
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde el sustrato se selecciona del grupo constituido por PHD3, SPROUTY2, Mitofusina 1, 2, MIRO, NEMO, proteínas SMAD, TβP-I, P53, S5A, HHR23, EPHEXIN5, ARC, PPARα, ciclina-B, Cdc25C y Calmodulina.
5. El procedimiento de la reivindicación 2 en donde dicha enzima ubiquitinante comprende, además, una ligasa E1 y una ligasa E2.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1 en donde dicho polipéptido indicador comprende un polipéptido seleccionable.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en donde dicho polipéptido seleccionable es un polipéptido escindido de resistencia a los antibióticos.
8. Un procedimiento para determinar si una enzima es capaz de ubiquitinar un sustrato de prueba, comprendiendo el procedimiento:
- 30 (a) expresar la enzima en una célula bacteriana;
- (b) expresar la ubiquitina en dicha célula bacteriana, estando unida dicha ubiquitina a un primer fragmento polipeptídico;
- 35 (c) expresar el sustrato de prueba en dicha célula bacteriana, estando unido dicho sustrato a un segundo fragmento polipeptídico, asociándose dicho primer fragmento polipeptídico con dicho segundo fragmento polipeptídico para generar un polipéptido indicador de la ubiquitinación del sustrato de prueba; y
- 40 (d) analizar la presencia de dicho polipéptido indicador en la célula bacteriana, siendo la presencia de dicho polipéptido indicador indicativa de que la enzima es capaz de ubiquitinar el sustrato de prueba.
9. El procedimiento de la reivindicación 8 en donde dicho polipéptido indicador es un polipéptido detectable o un polipéptido seleccionable.
10. El procedimiento de la reivindicación 8 en donde dicha enzima se selecciona del grupo constituido por ligasa E3, enzima activadora de la ubiquitina E1 y enzima conjugadora de la ubiquitina E2.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 9 en donde dicho polipéptido seleccionable es un polipéptido escindido de resistencia a los antibióticos.
12. El procedimiento de la reivindicación 1 u 8 en donde dicho análisis se efectúa por complementación bimolecular de una proteína de resistencia a los antibióticos.

FIG. 1A

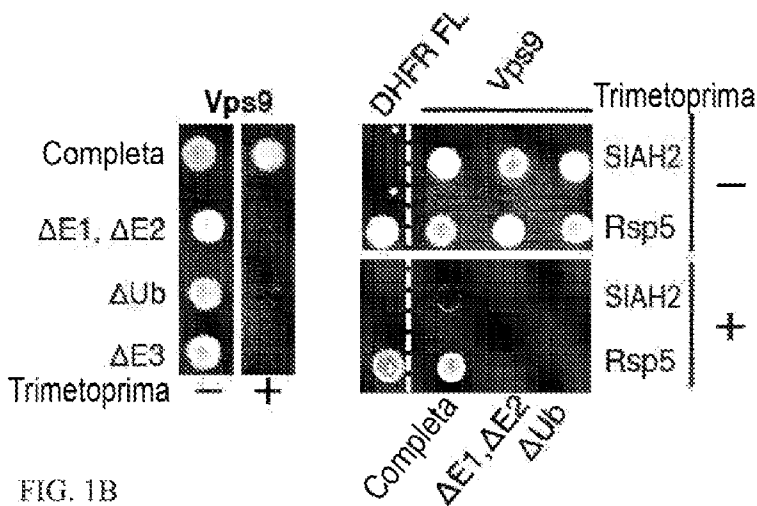
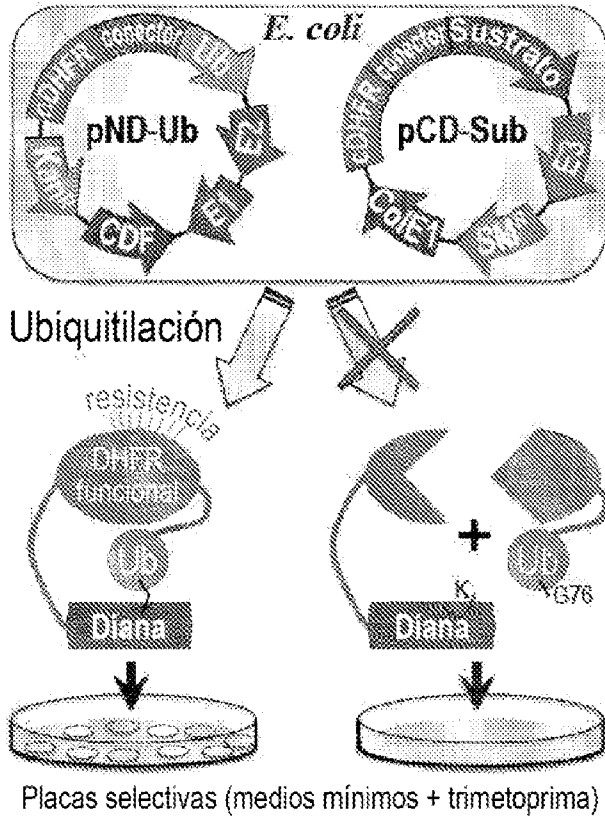


FIG. 1B

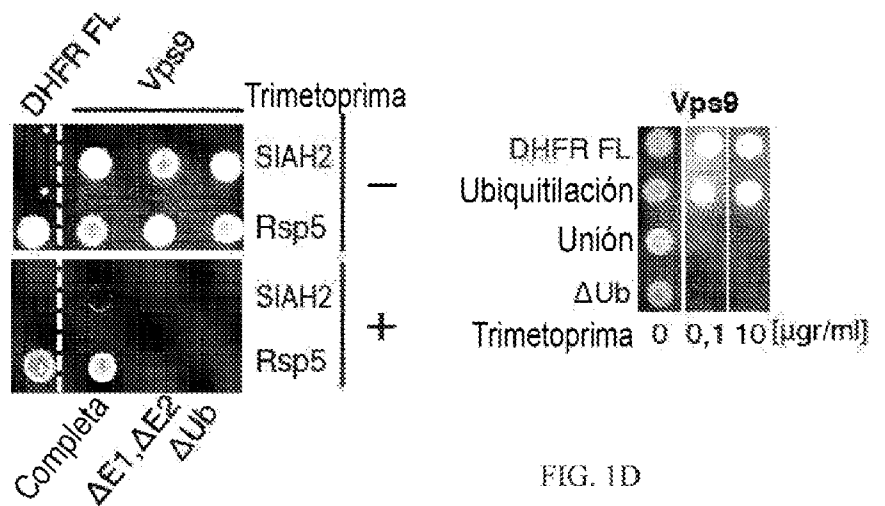
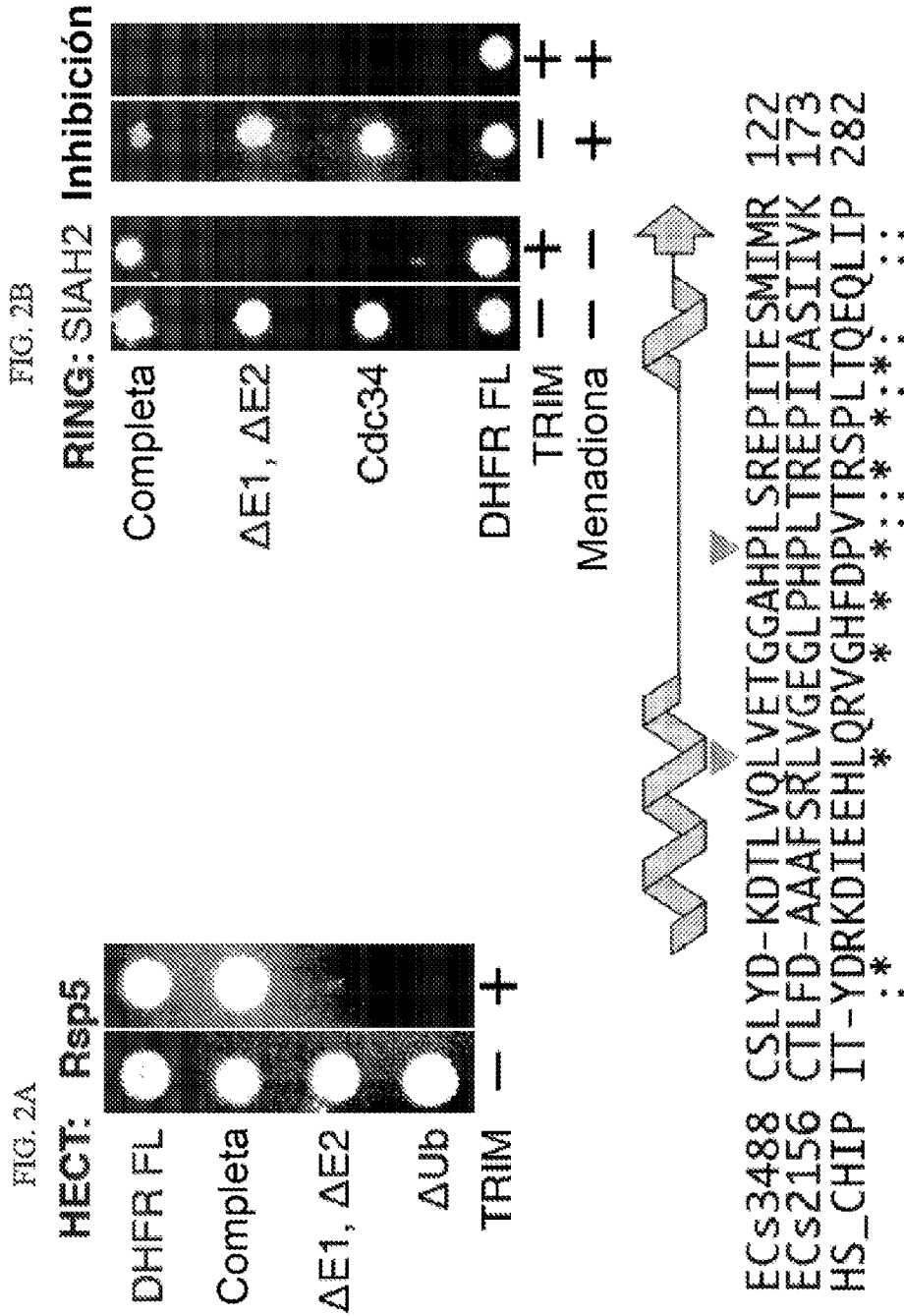


FIG. 1D

FIG. 1C



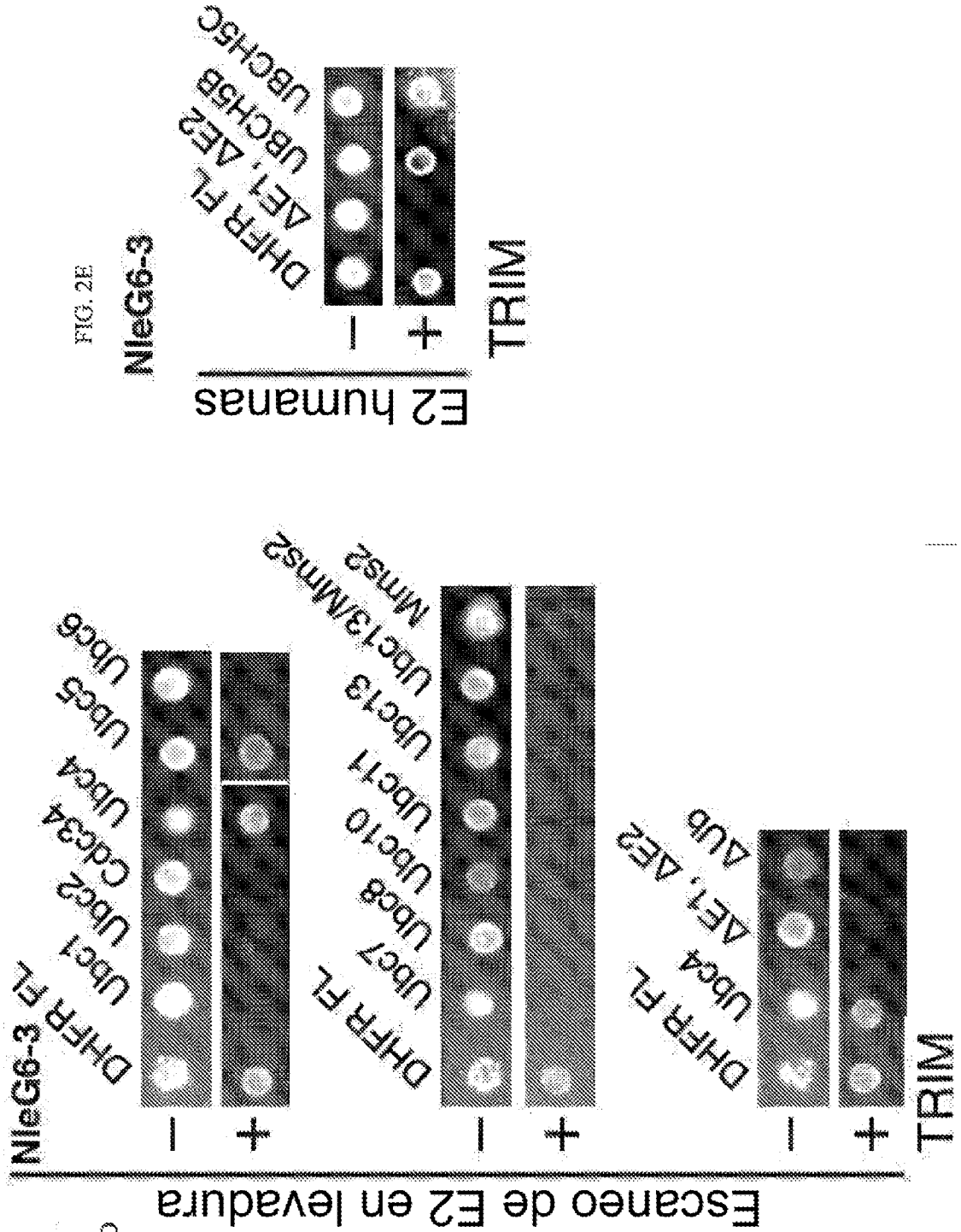


FIG. 2E

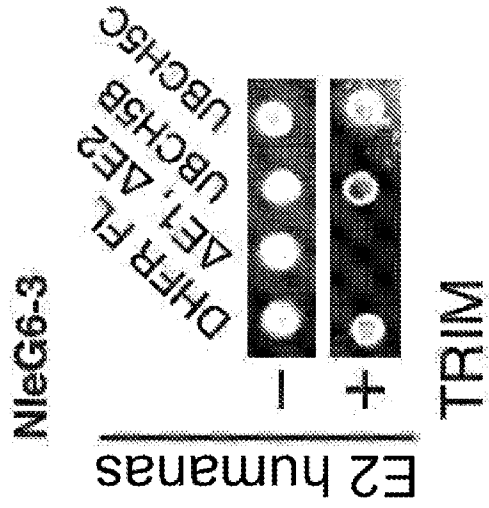


FIG. 2F

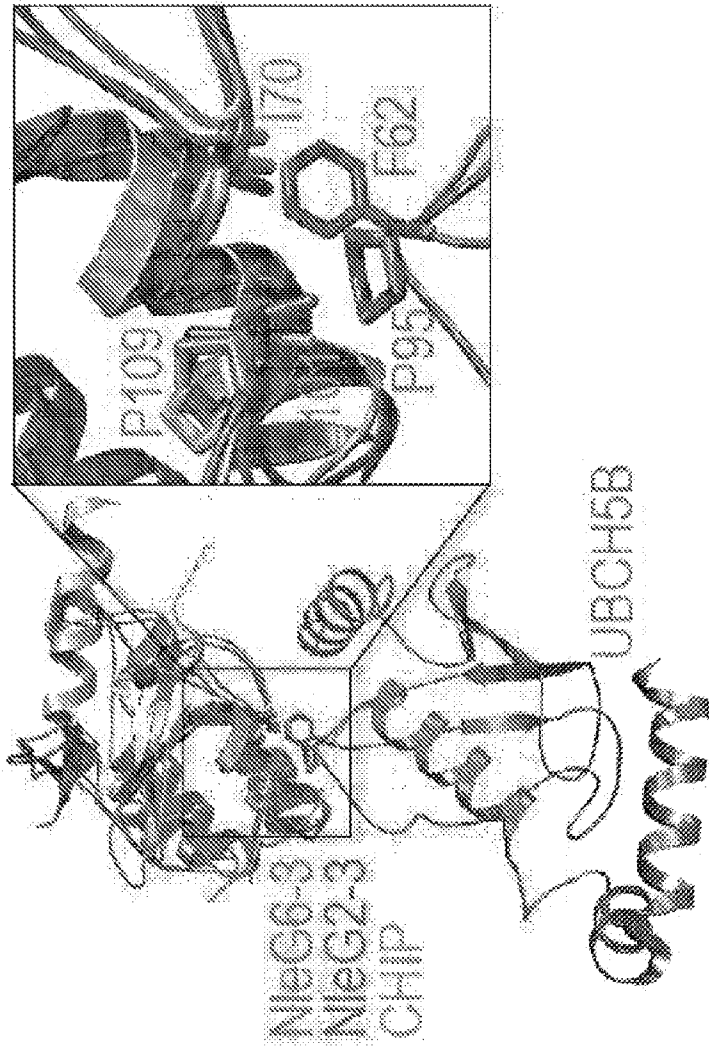


FIG. 2G

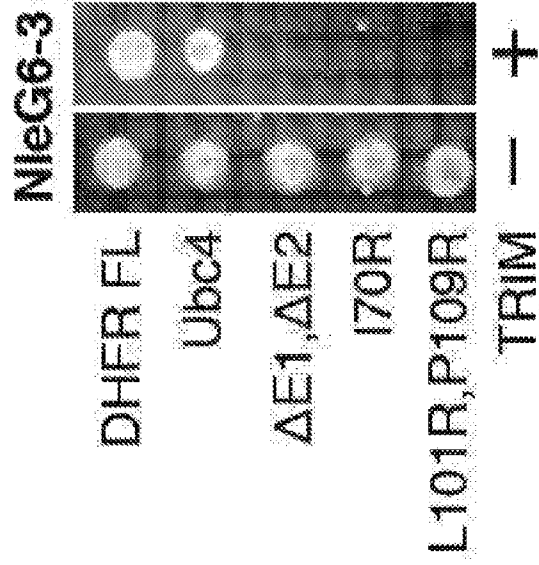


FIG. 3A

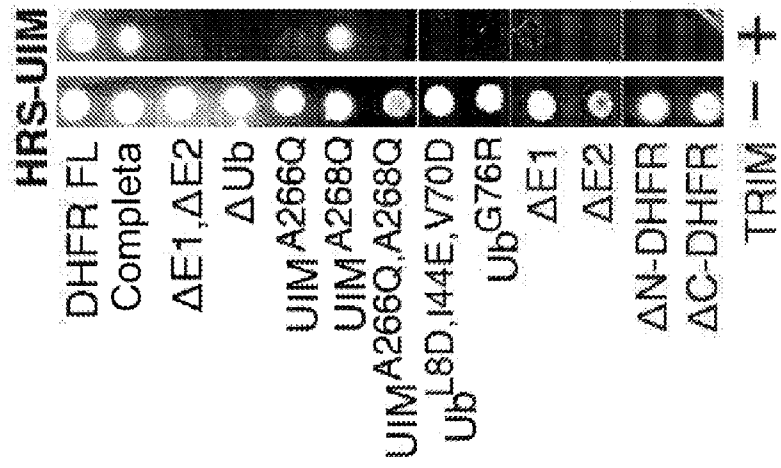


FIG. 3B

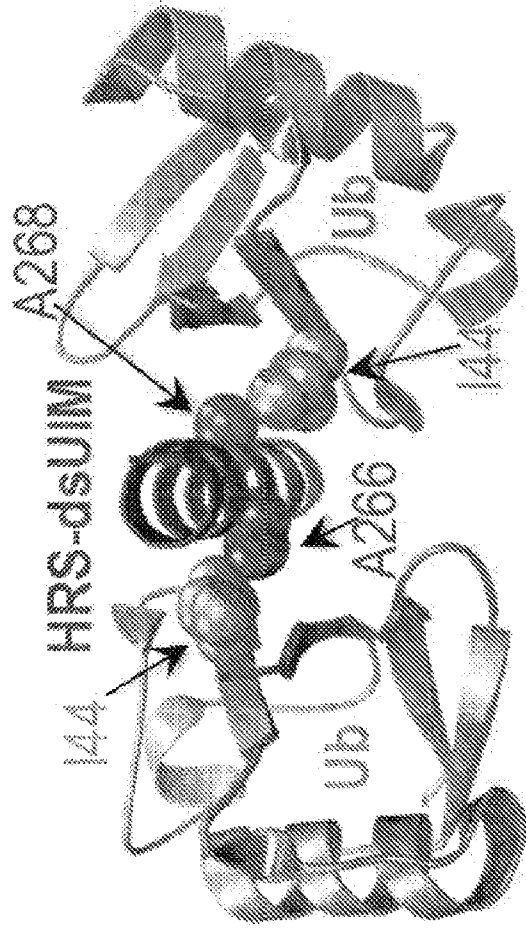


FIG. 3C

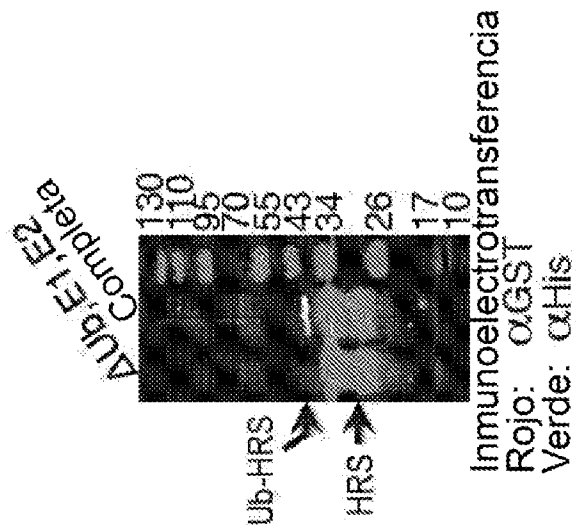


FIG. 3D

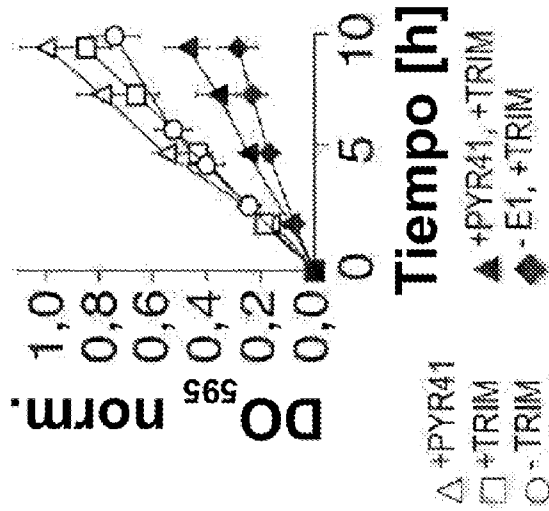
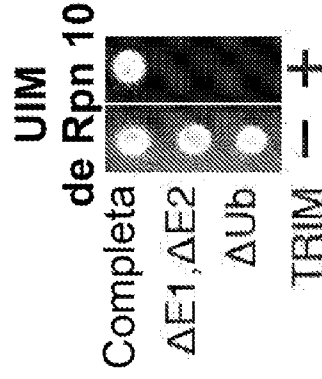


FIG. 3E



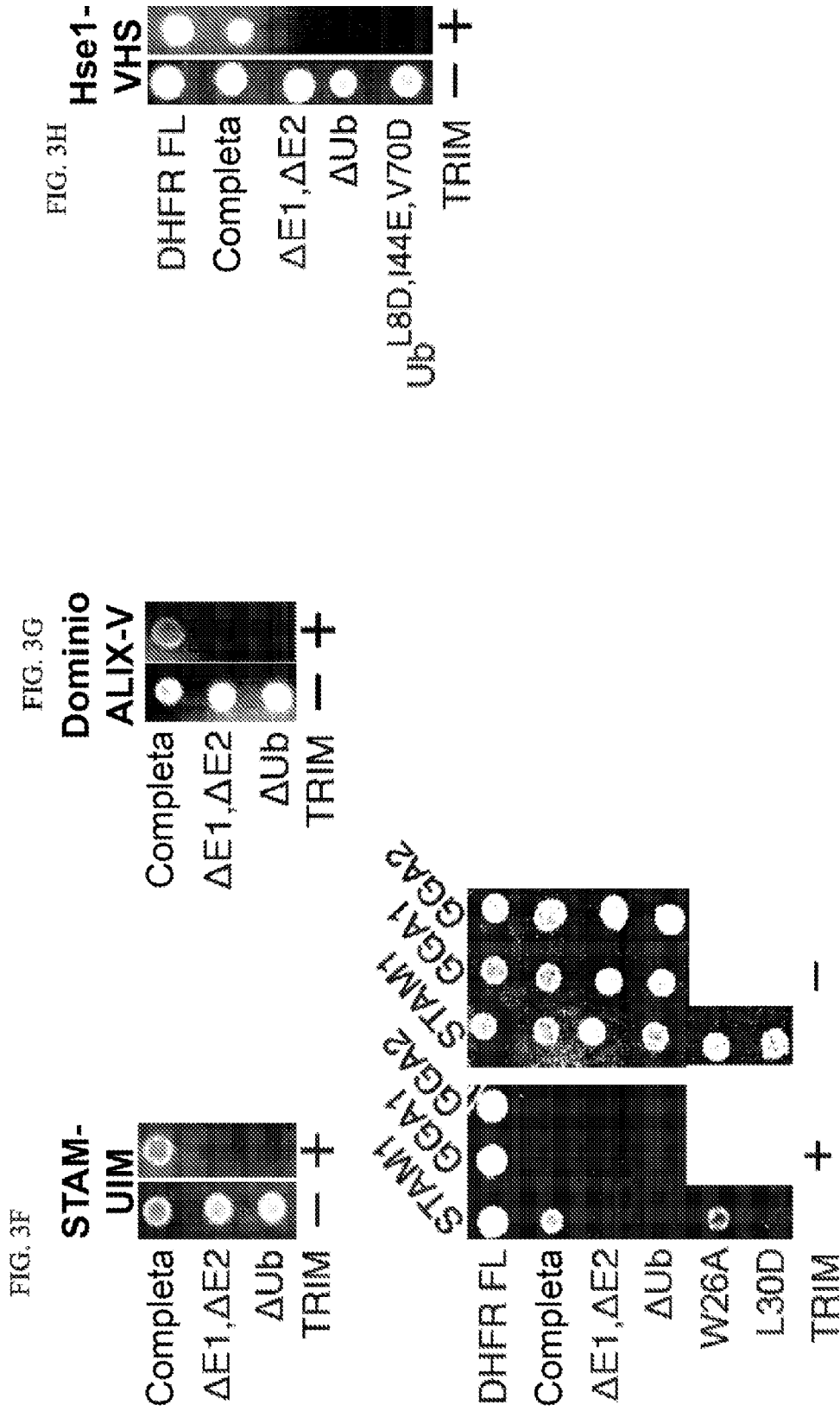
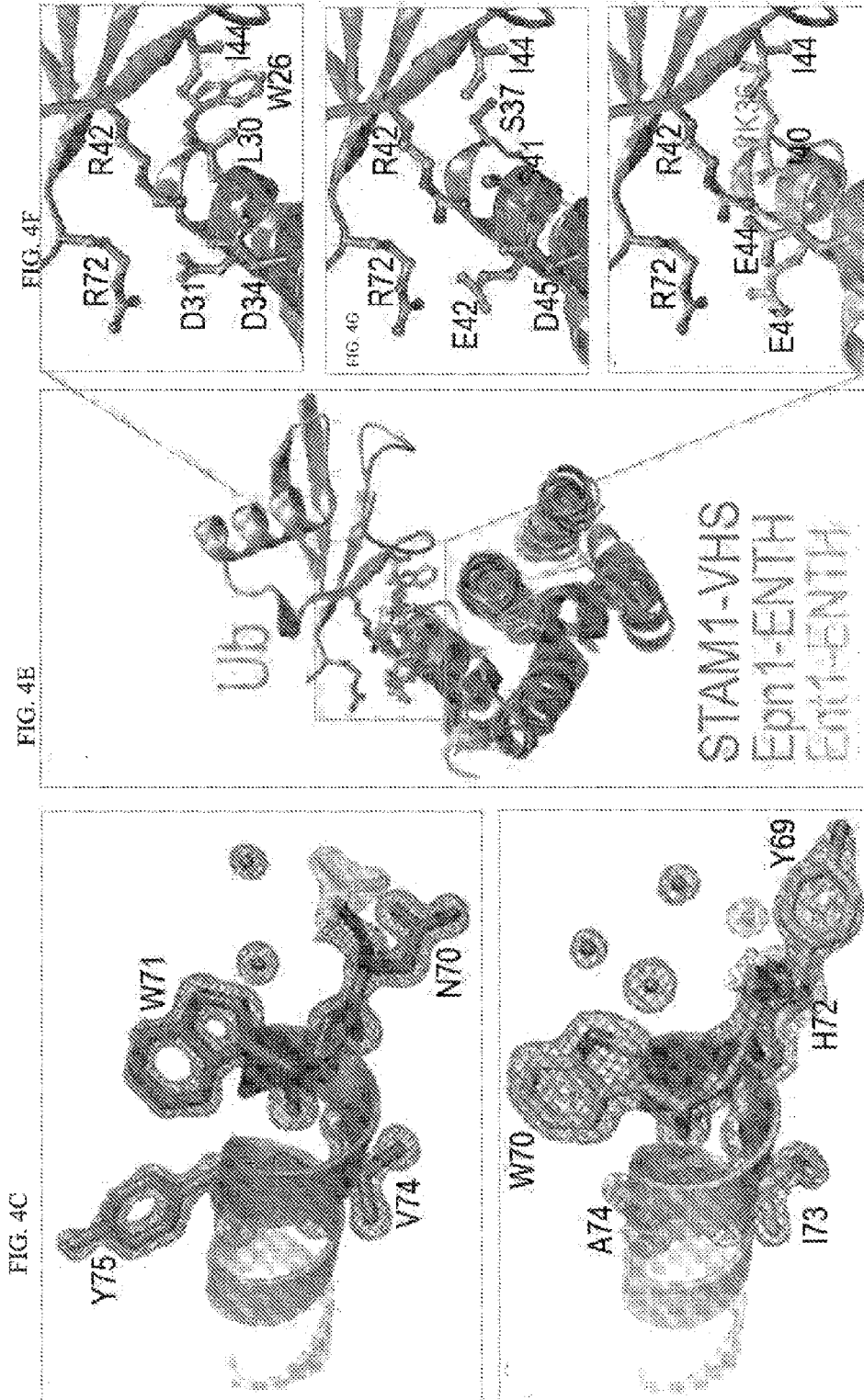


FIG. 3I





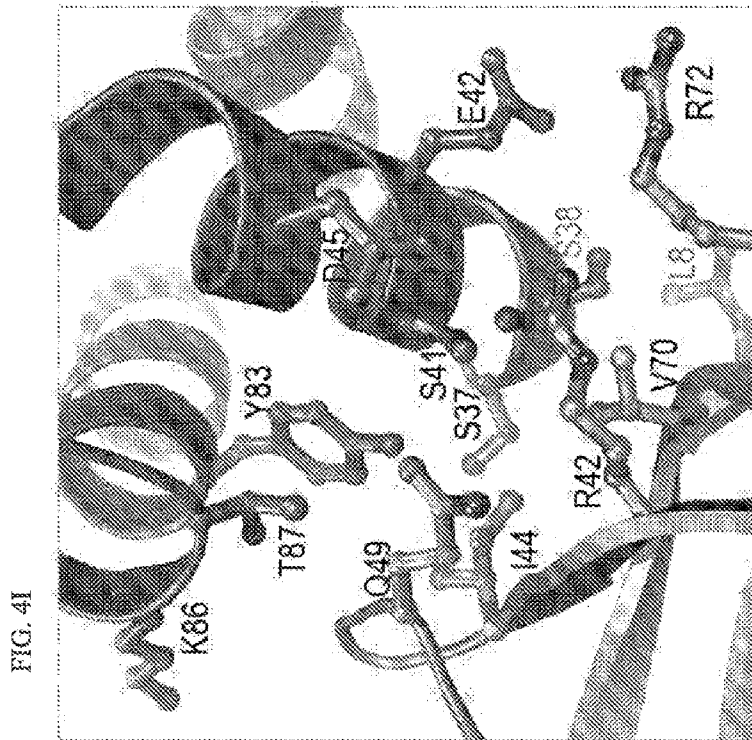
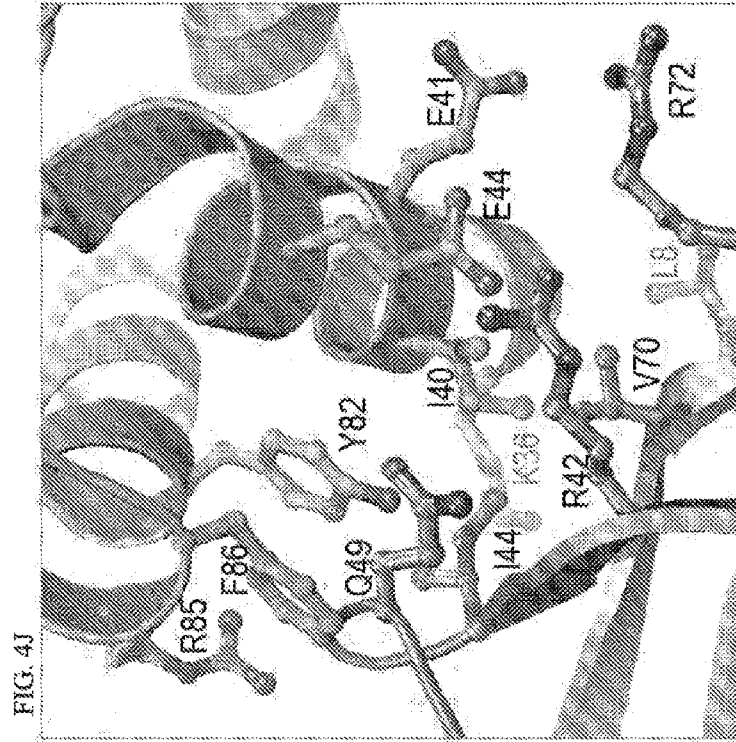
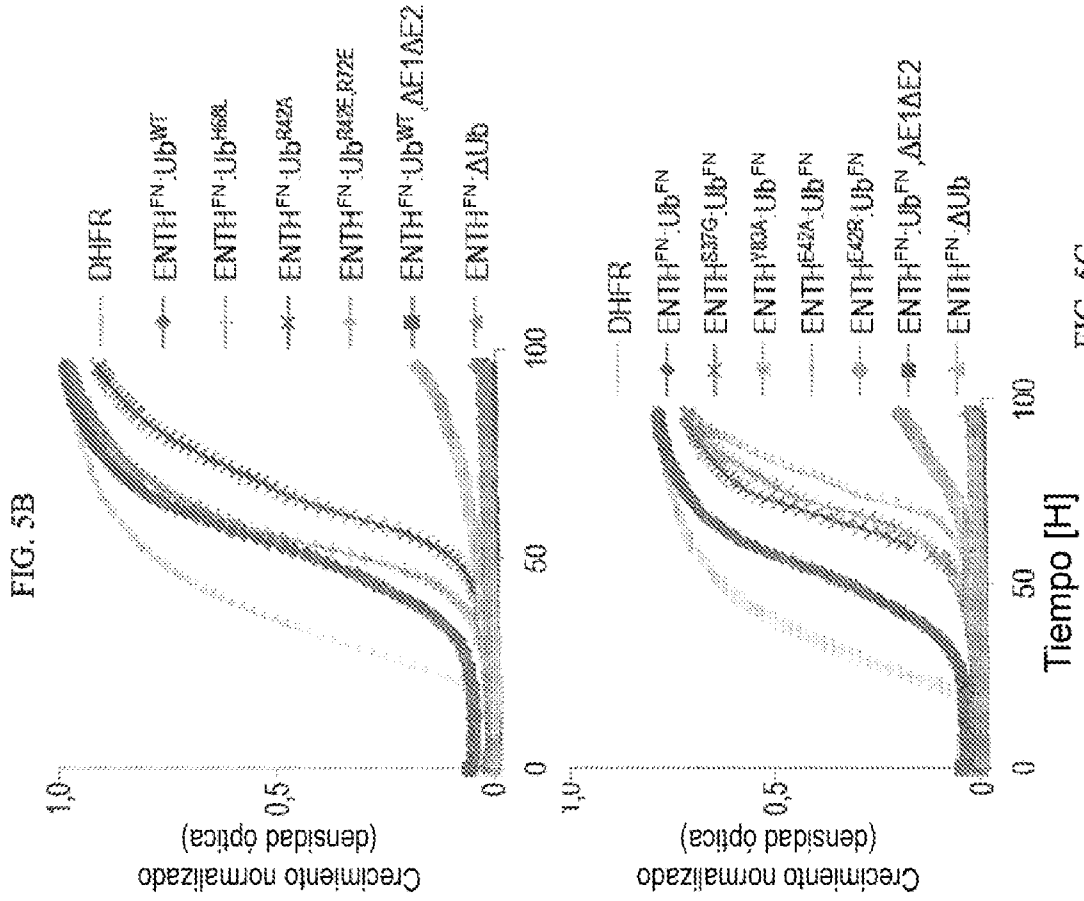
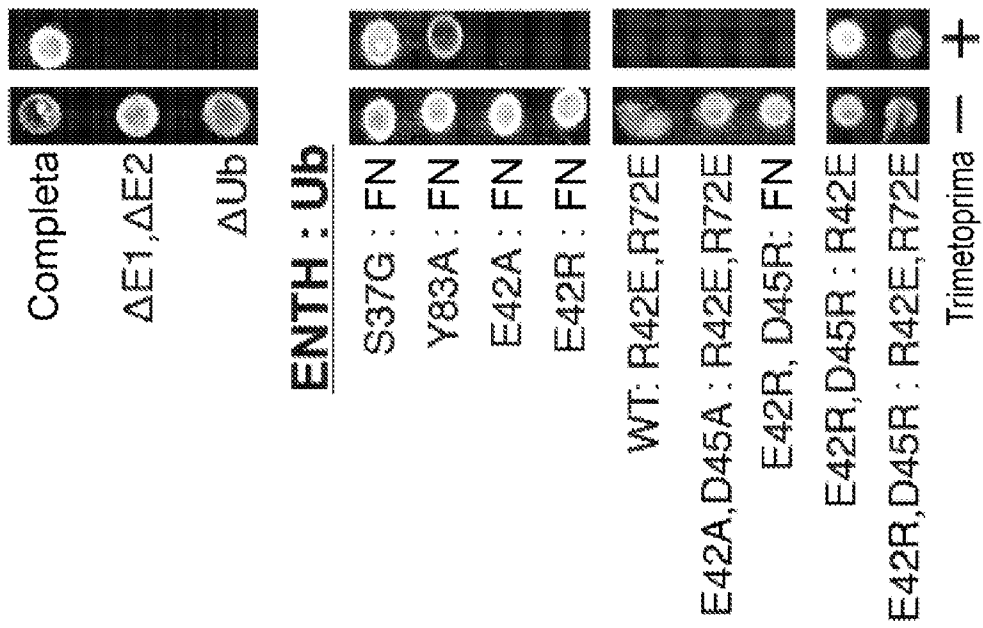
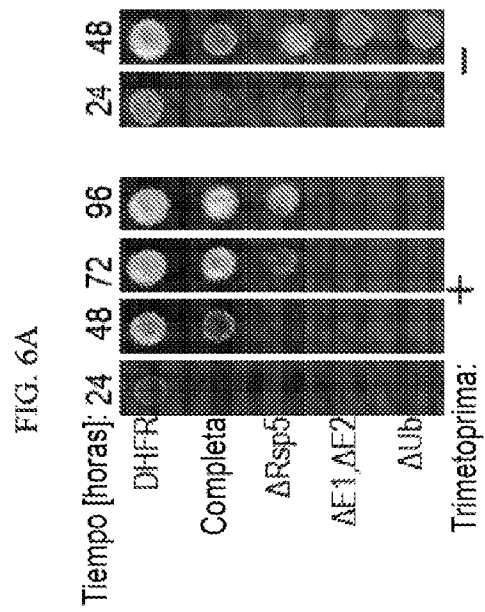
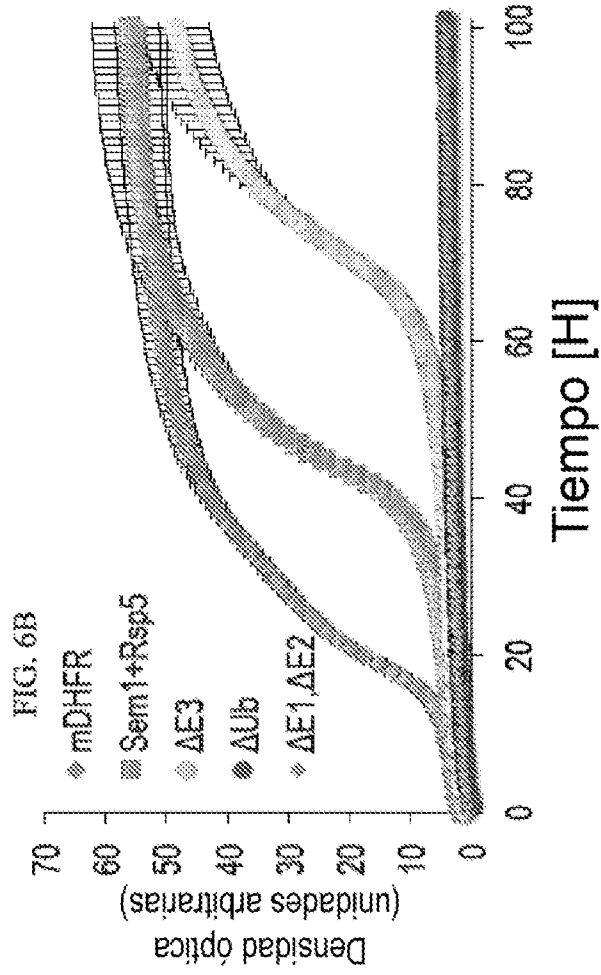


FIG. 5A
Epn1-ENTH del pez cebra





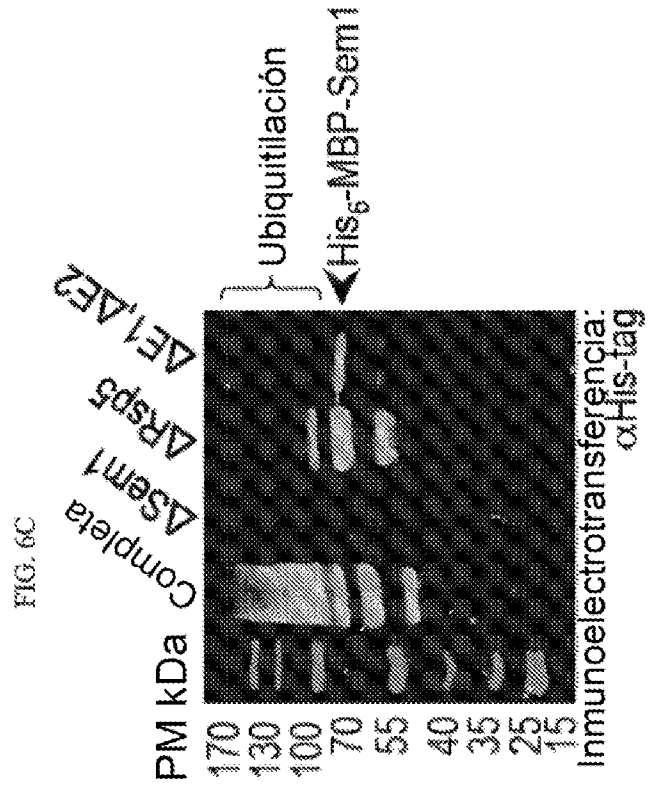
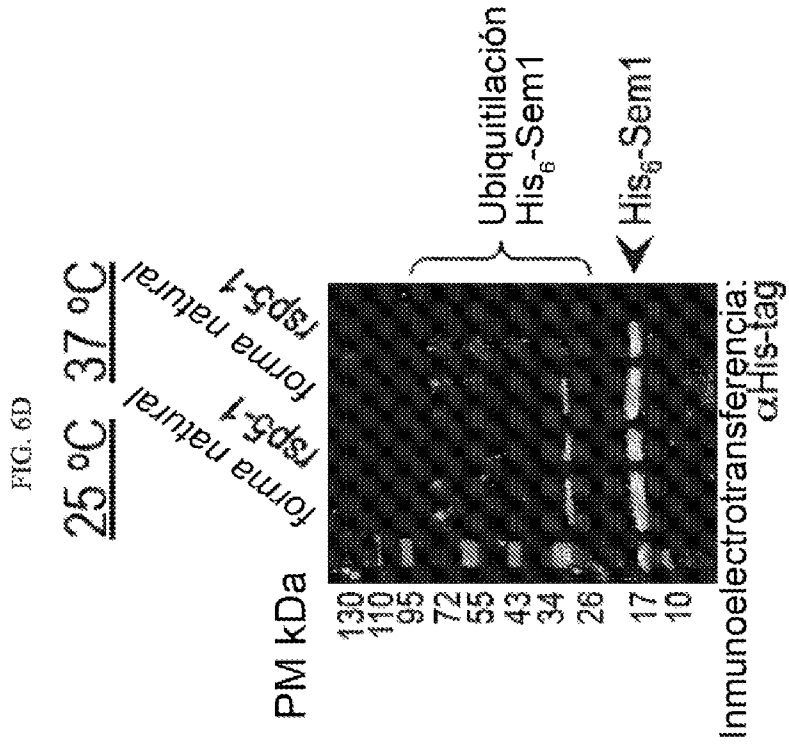


FIG. 8A

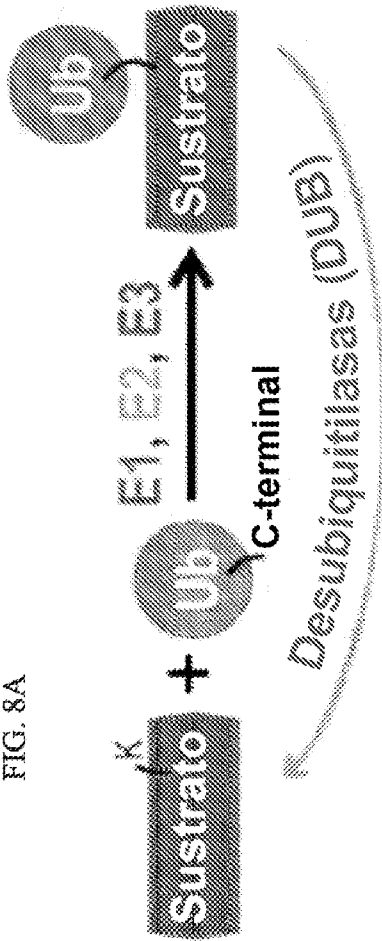
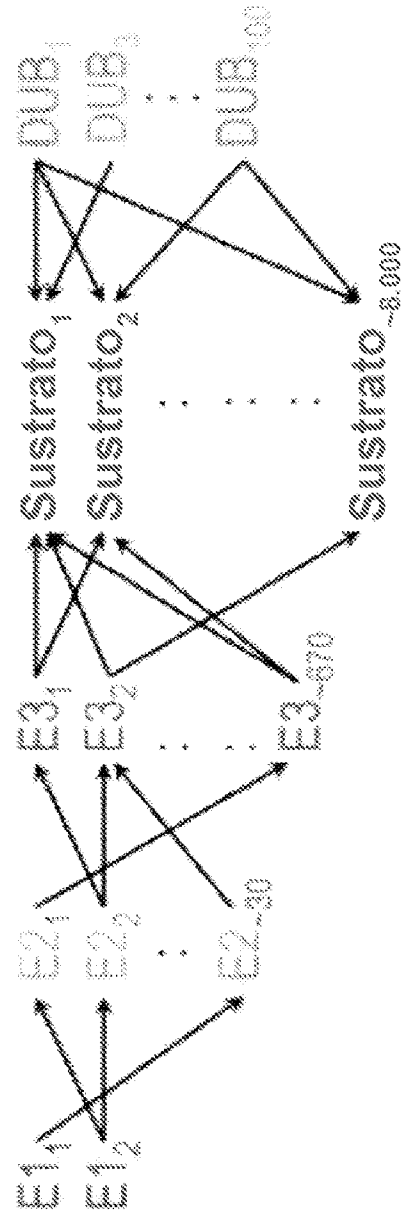


FIG. 8B



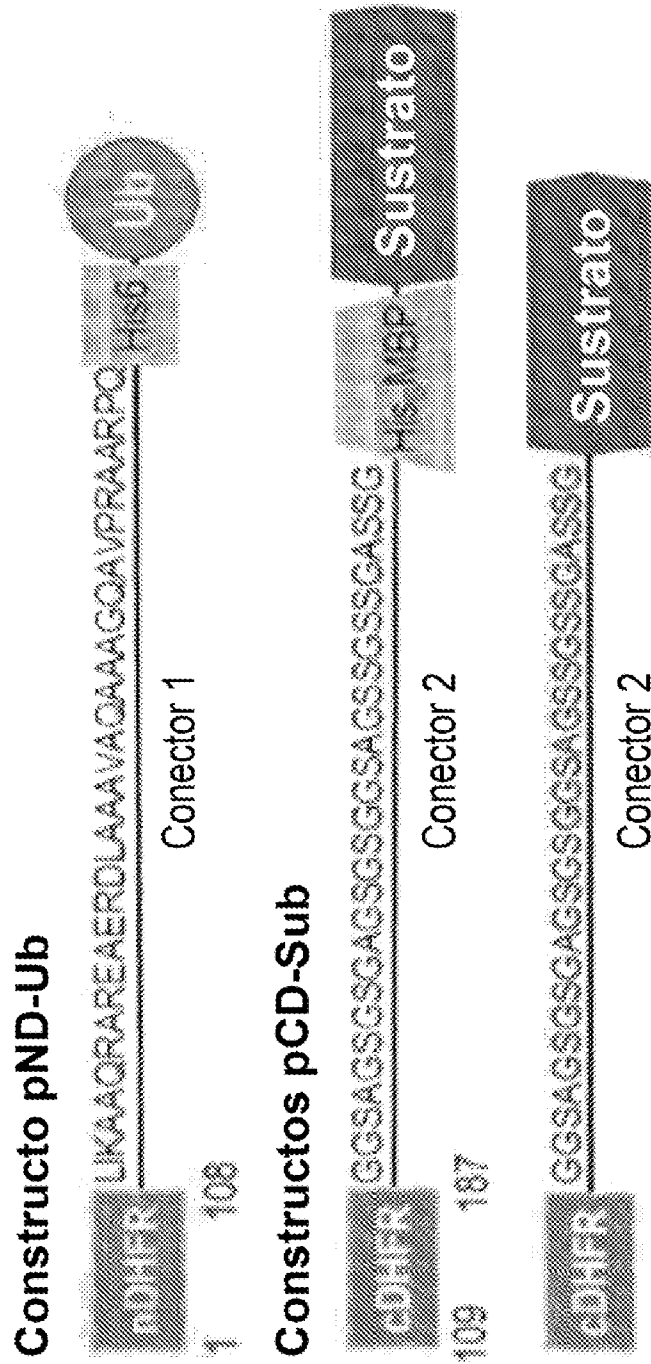


FIG. 9

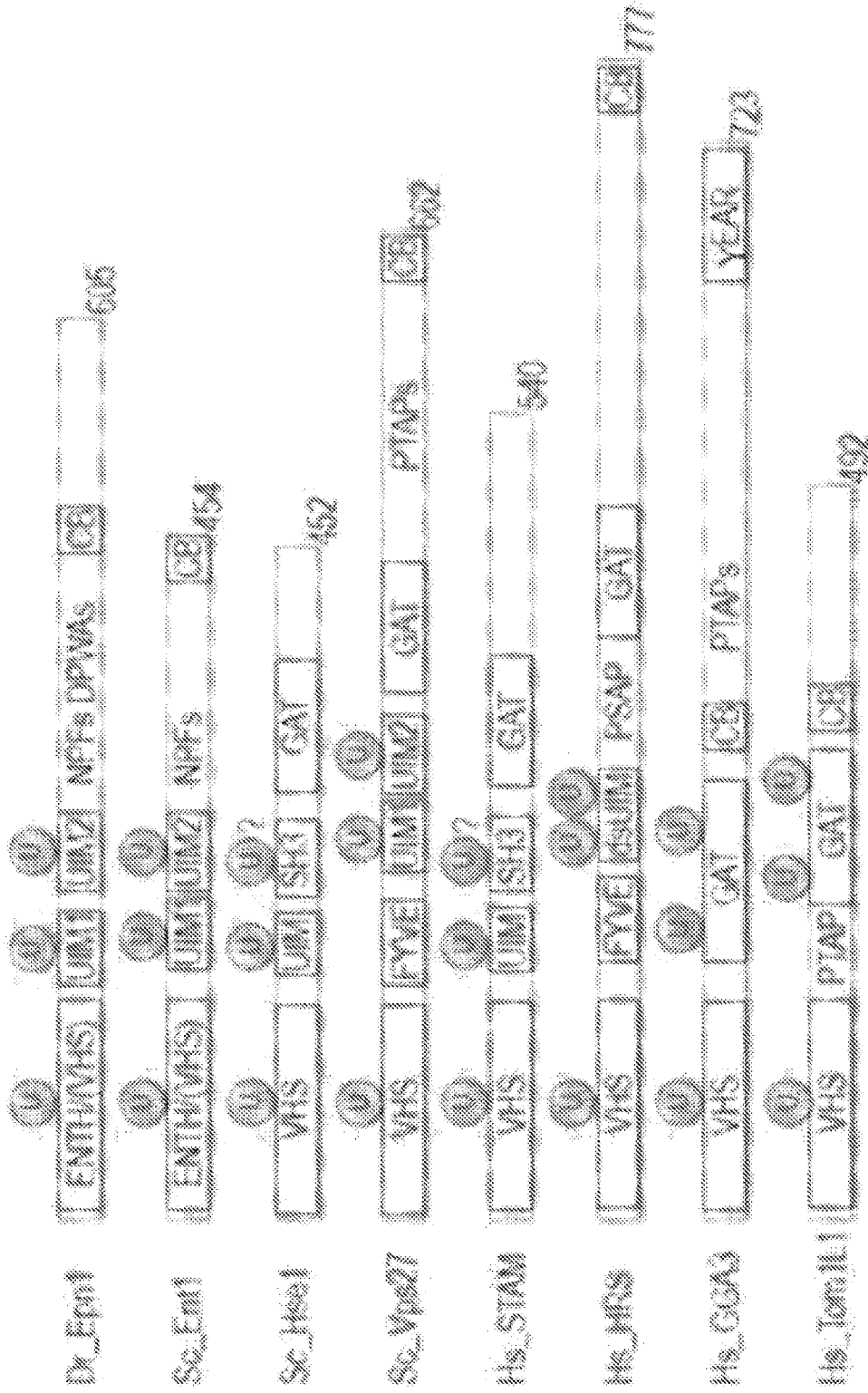


FIG. 10

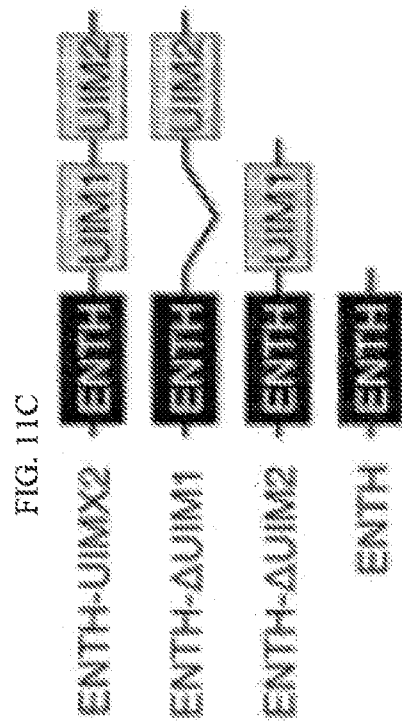
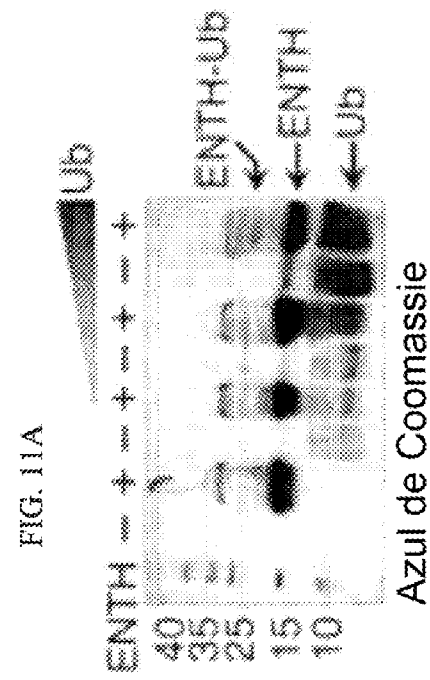
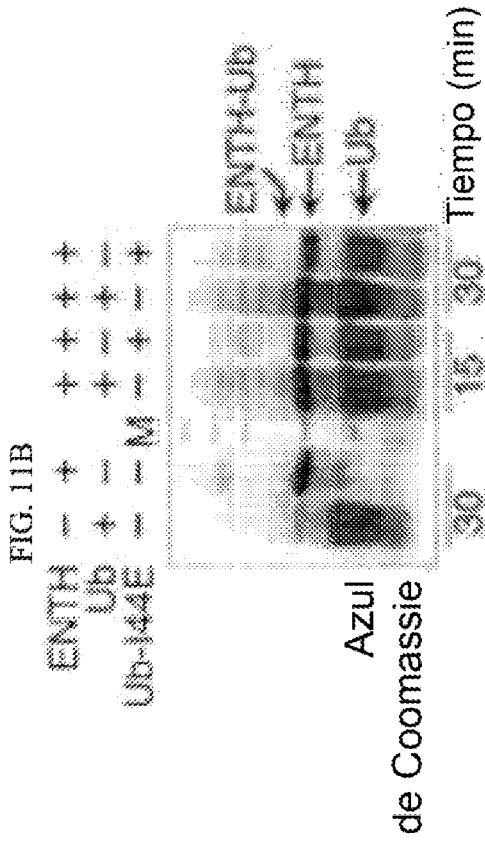


FIG. 11D

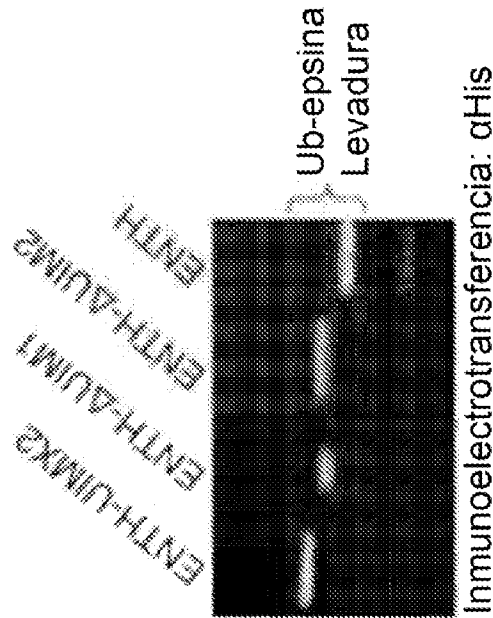
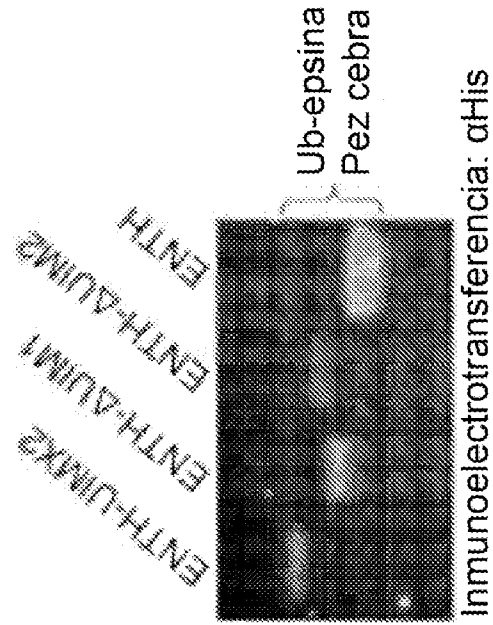
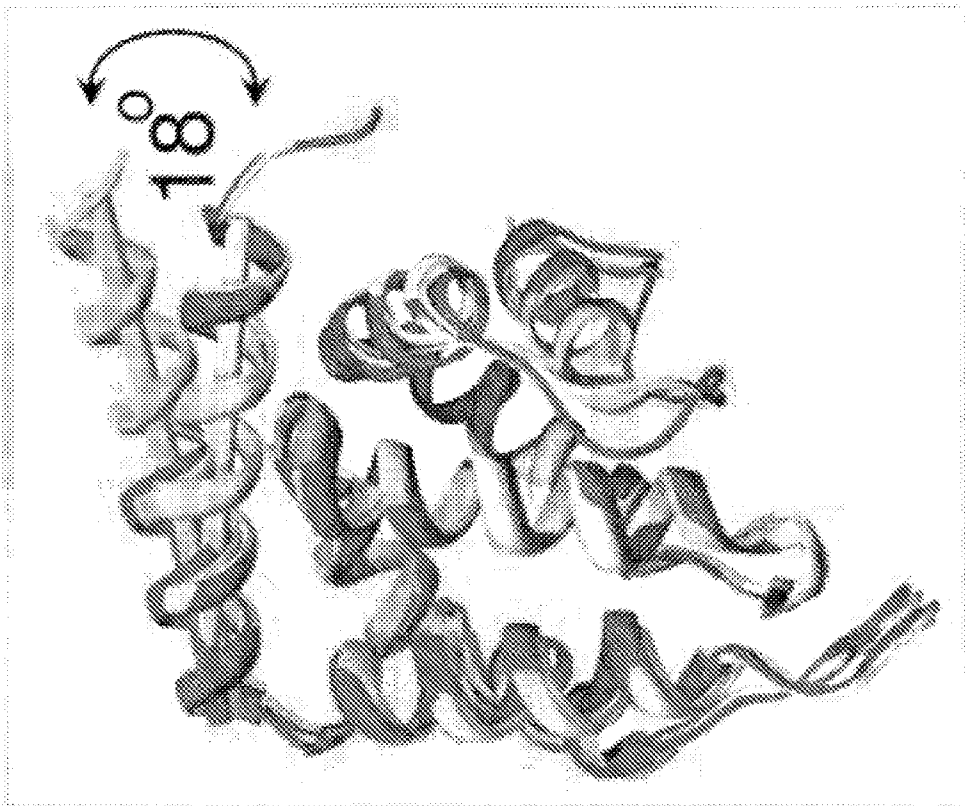
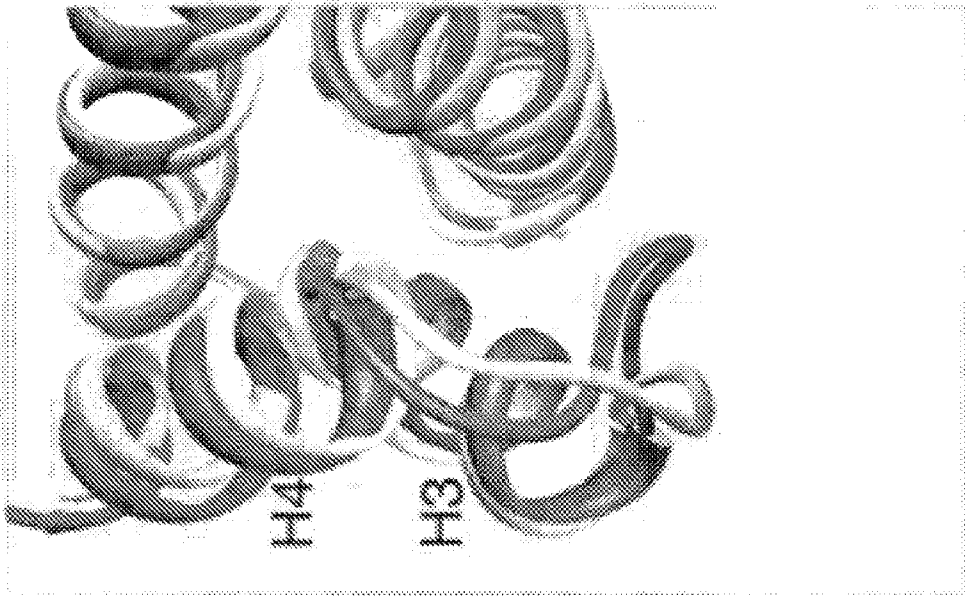


FIG. 11E





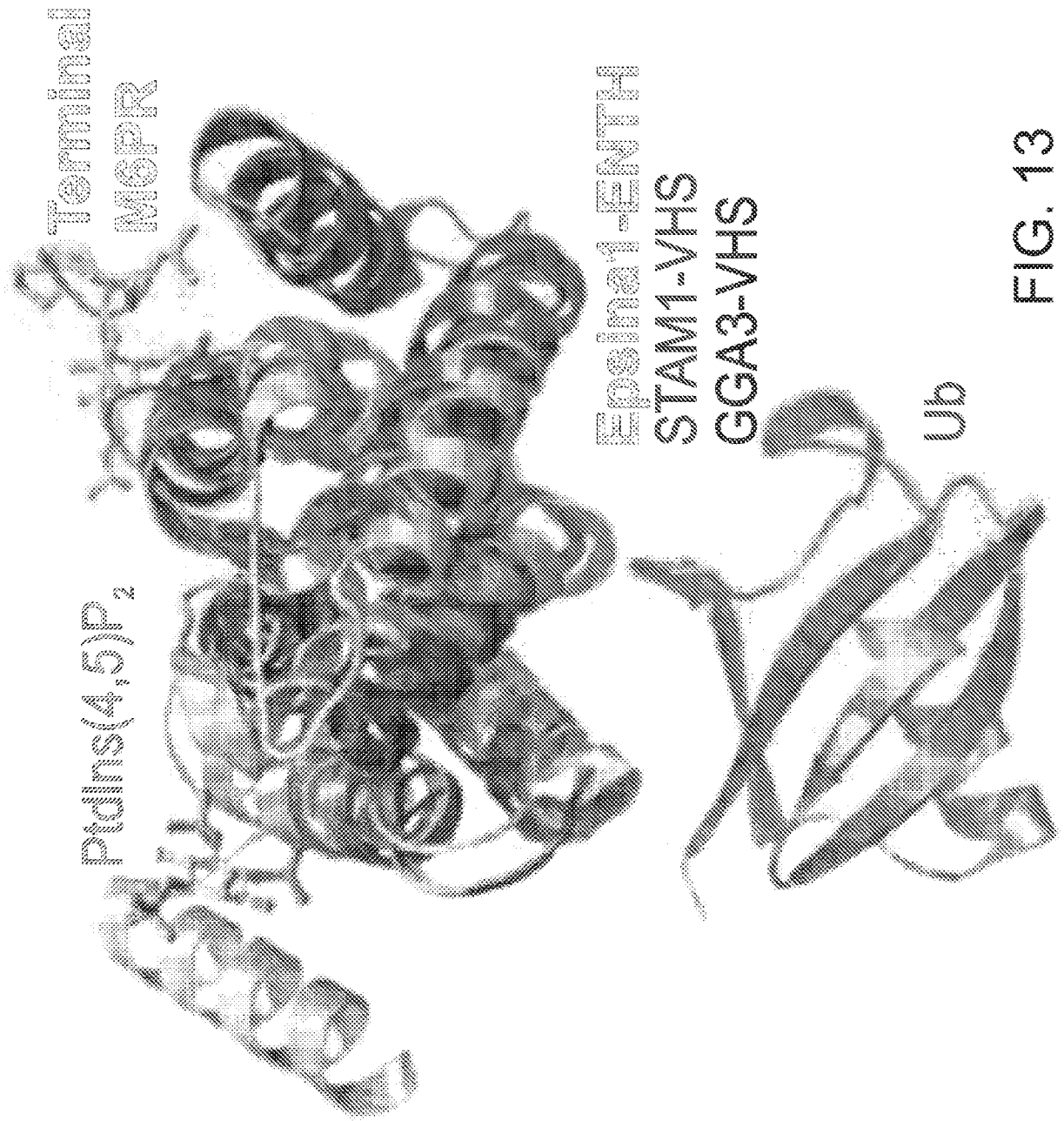


FIG. 13

FIG. 14A

Forma natural

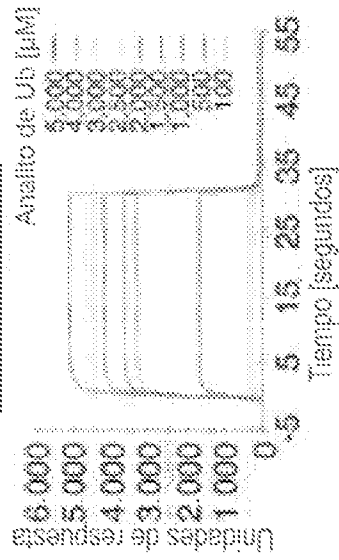


FIG. 14B

Ub R42E,R72E

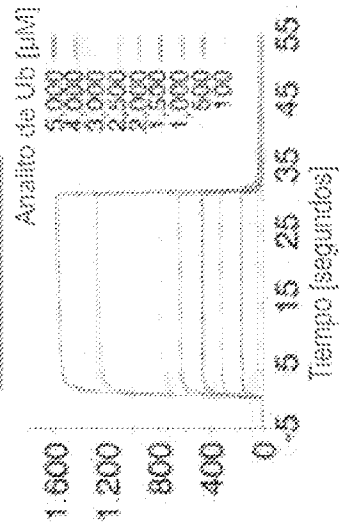
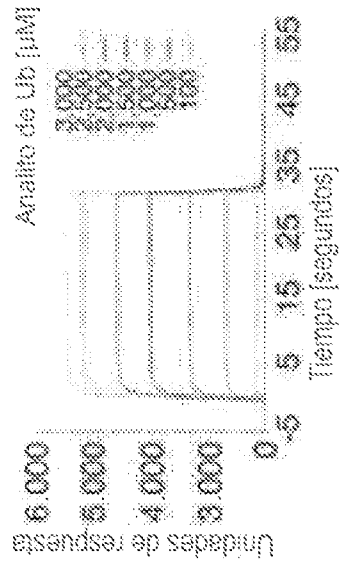
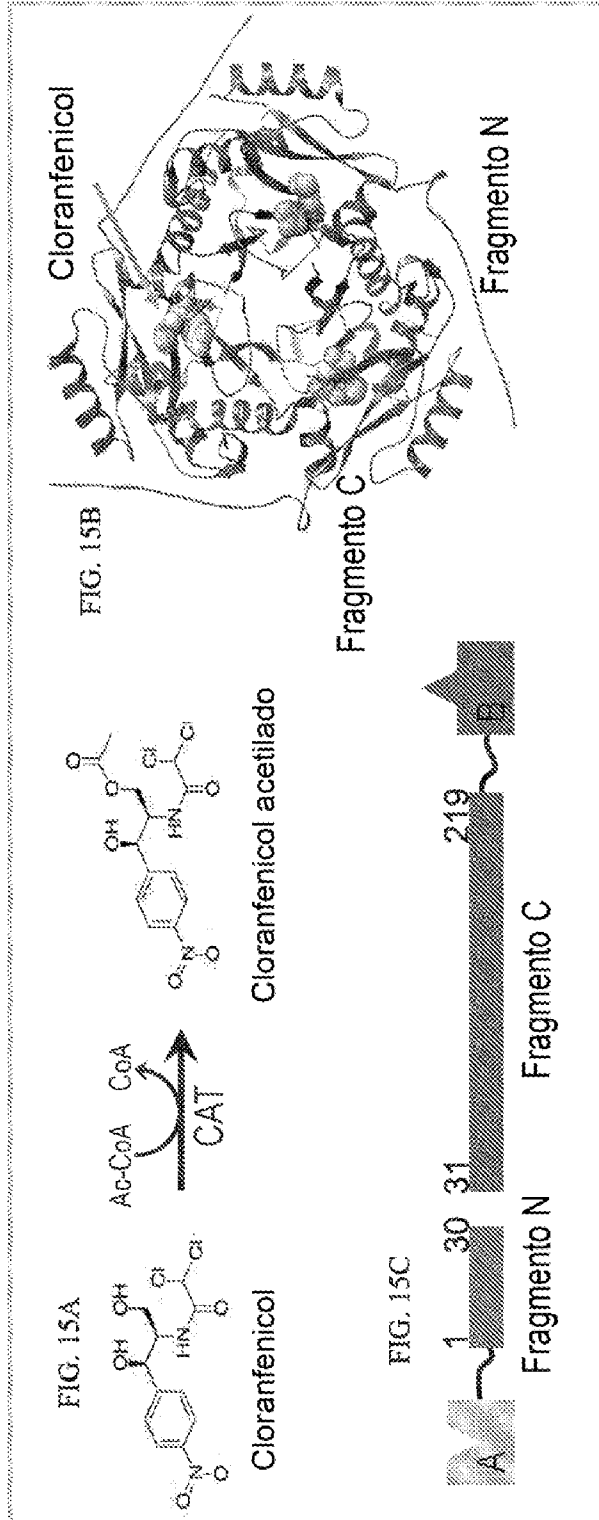


FIG. 14C

ENTHE41R,E44R





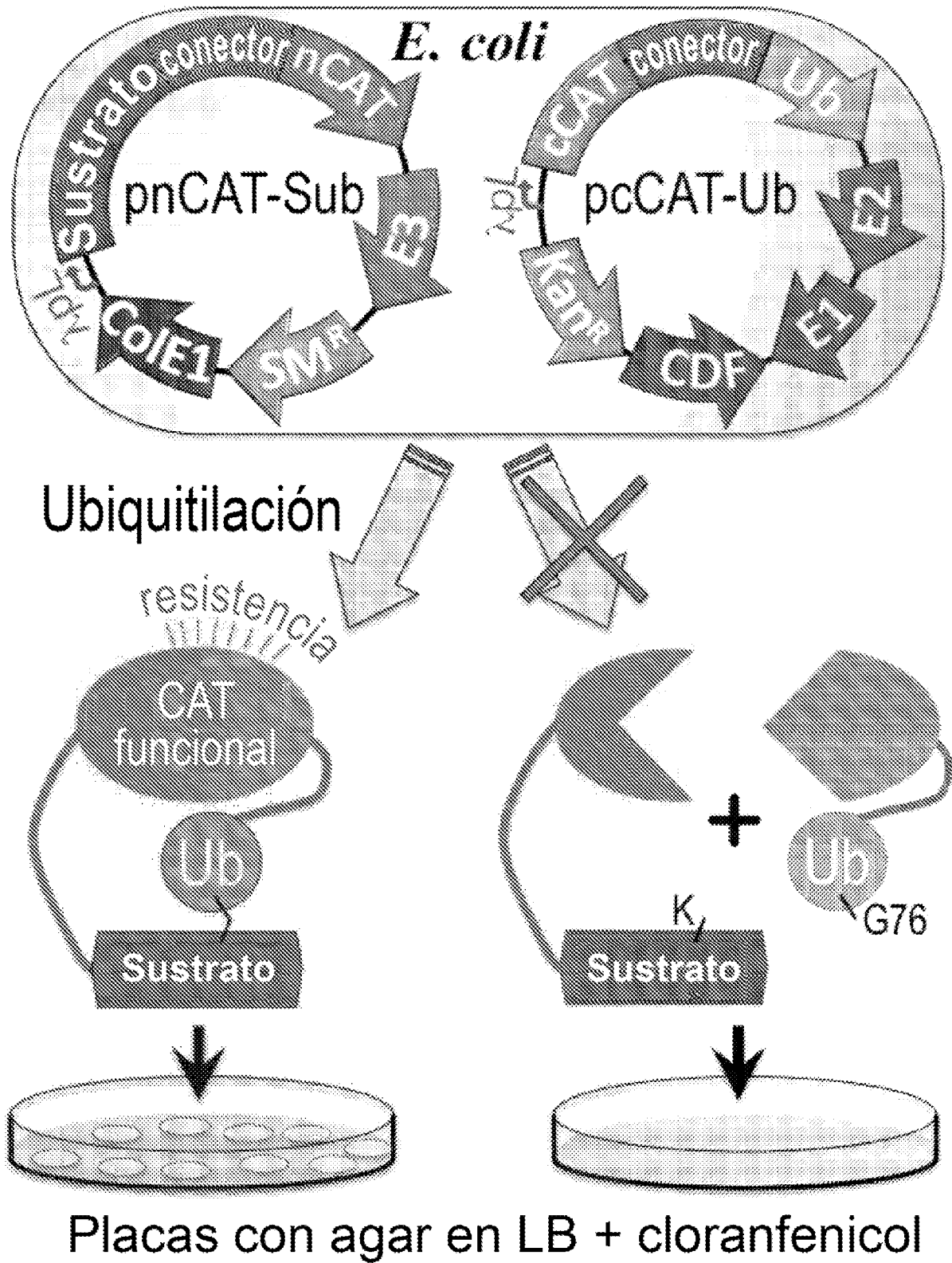


FIG. 15D

FIG. 16A

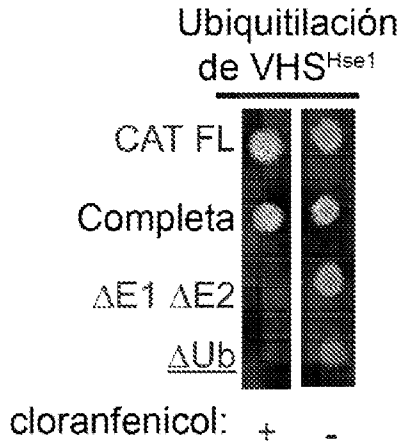


FIG. 16B

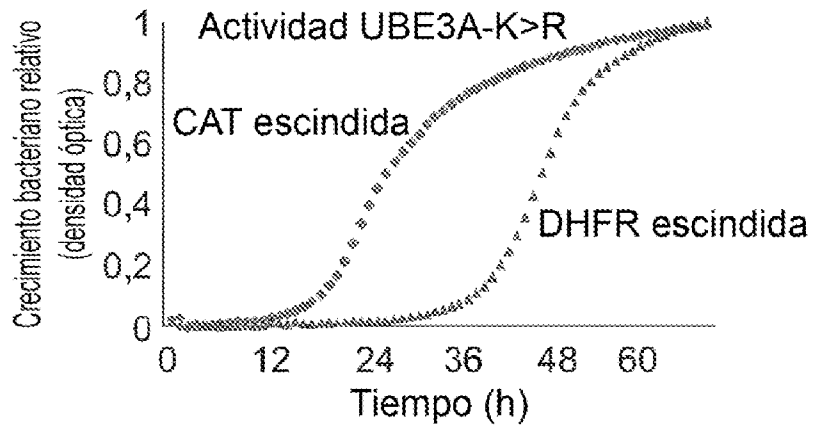


FIG. 16C

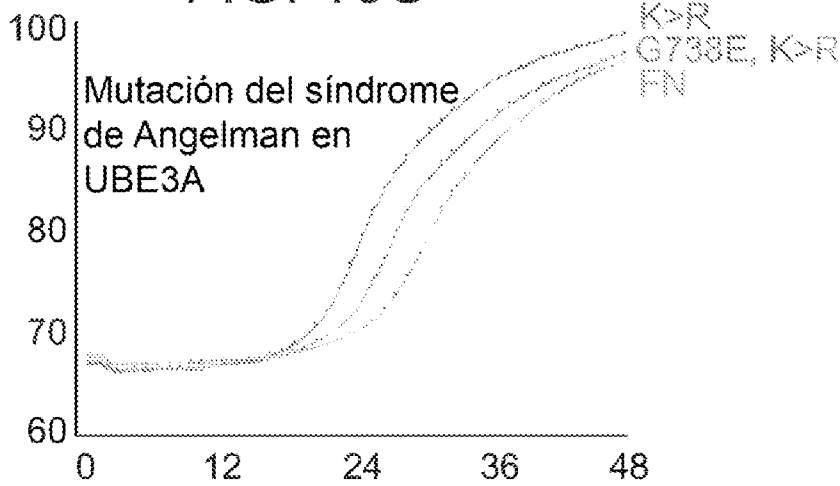


FIG. 16D

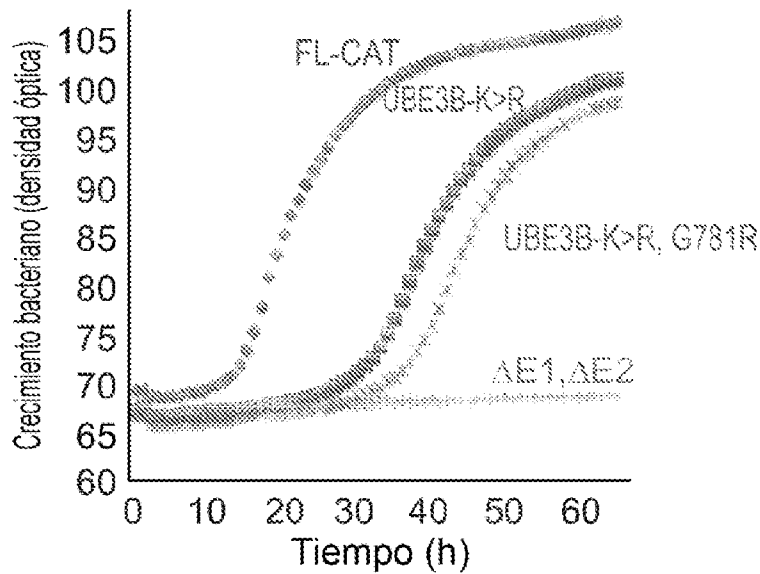


FIG. 17A

```

1 M E K K I T G Y T T V D I S Q W H R K E 20
1 A T G G A G A A A A A A A T C A C T G G A T A T A C C A C C G T T G A T A T A T C C G A A T G G C A T C G T A A A G A A 60

                Sitio de escisión ↓
21 H F E A F O S V A Q C T Y N Q T V O L D 40
61 C A T T T T G A G G C A T T T C A G T C A G T T T G C T C A A T G T A C C T A T A A C C A G A C C G T T C A C C T C G A T 120

41 I T A F L K T V K K N K H K F Y P A F I 60
121 A T T A C G G C C T T T T T A A A G A C C G T A A A G A A A A A T A A G C A C A A G T T T T A T C C G G C C T T T A T T 180

61 H I L A R L M N A H P E F R M A M K D G 80
161 C A C A T T C T T G C C C G C C T G A T G A A T G C T C A T G C C G A A T T C C G H A T G C A A T G A A A G A C C G T 240

81 E L V I W D S V H P C Y T V F H E Q T E 100
241 G A G C T G G T G A T A T G G G A T A G T G T T C A C C C T T T G T T A C A C C G T T T T C C A T G A G C A A A C T G A A 300

101 T F S S L W S E Y H D D F R O F L H I Y 120
201 A C G T T T T C A T C G C T C T G G A G T G A A T A C C A C G A C G A T T T C C G G C A G T T T C T A C A C A T A T A T 360

121 S O D V A C Y G E N L A Y F P K G F L E 140
361 T C C A A G A T G T G C C G T G T T A C C G T G A A A A C C T G G C C T A T T T C C C T A A A G G G T T T A T T G A G 420

141 N M F F V S A N P W V S F T S F D L N V 160
421 A A T A T G T T T T T C G T C T C A G C C A A T C C C T G G G T G A G T T T C A C C A G T T T T G A T T T A A A C G T G 480

161 A N M D N F F A P V F T M G K Y Y T O G 180
481 G C C A A T A T G A C A A C T T C T T G C C C C C G T T T T C A C C A T G G G C A A A T A T T A T A C G C A A G G C 540

181 D K V L M P L A I O V H H A V C D G F H 200
541 G A C A A G T G C T G A T G C C K T G G G A T T C A G G T T C A T C A T G C C G T C T G T G A T G G C T T C C A T 600

201 V G R M L N E L O O Y C D E W Q G G A * 220
601 G T C G G C A G A A T G C T T A A T G A A T T A C A C A G T A C T T C C G A T G A T T G G C A G G C G G G C C T A A 660
    
```

FIG. 17B

```

1 M E K K I T G Y T T V D I S Q W H R K E 20
1 A T G G A G A A A A A A A T C A C T G G A T A T A C C A C C G T T G A T A T A T C C C A A T G G C A T C G T A A A G A A 60

21 H F E A F O S V A Q * 30
61 C A T T T T G A G G C A T T T C A G T C A G T T T G C T C A A T A A 94 Fragmento N

1 M C T Y N Q T V O L D H 11
1 A T G T G T A C C T A T A A C C A G A C C G T T C A G T T G G A T 33 Fragmento C

12 I T A F L K T V K K N K H K F Y P A F I 31
14 A T T A C G G C C T T T T T A A A G A C C G T A A A G A A A A A T A A G C A C A A G T T T T A T C C G G C C T T T A T T 93

32 H I L A R L M N A H P E F R M A M K D G 51
94 C A C A T T C T T G C C C G C C T G A T G A A T G C T C A T G C C G A A T T C C G T A T G C A A T G A A A G A C C G T 153

52 E L V I W D S V H P C Y T V F H E Q T E 71
164 G A G C T G G T G A T A T G G G A T A G T G T T C A C C C T T T G T T A C A C C G T T T T C C A T G A G C A A A C T G A A 213

72 T F S S L W S E Y H D D F R O F L H I Y 91
214 A C G T T T T C A T C G C T C T G G A G T G A A T A C C A C G A C G A T T T C C G G C A G T T T C T A C A C A T A T A T 273

92 S O D V A C Y G E N L A Y F P K G F L E 111
274 T C C A A G A T G T G C C G T G T T A C C G T G A A A A C C T G G C C T A T T T C C C T A A A G G G T T T A T T G A G 333

112 N M F F V S A N P W V S F T S F D L N V 131
334 A A T A T G T T T T T C G T C T C A G C C A A T C C T G G G T G A G T T T C A C C A G T T T T G A T T T A A A C G T G 393

132 A N M D N F F A P V F T M G K Y Y T O G 151
484 G C C A A T A T G A C A A C T T C T T C C C C C C G T T T T C A C C A T G G G C A A A T A T T A T A C G C A A G G C 483

152 D K V L M P L A I O V H H A V C D G F H 171
514 G A C A A G T G C T G A T G C C G C T G G G A T T C A G G T T C A T C A T G C C G T C T G T G A T G G C T T C C A T 513

172 V G R M L N E L O O Y C D E W Q G G A * 190
594 G T C G G C A G A A T G C T T A A T G A A T T A C A C A G T A C T T C C G A T G A T T G G C A G G C G G G C C C T A A 573
    
```