

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 986**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07700742 .5**
96 Fecha de presentación: **11.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1977239**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2008**

54 Título: **ACTIVIDAD RELACIONADA CON UBIQUITINACIÓN Y/O DEGRADACIÓN DE SIVA Y MODULADORES DE LA MISMA.**

30 Prioridad:
12.01.2006 IL 17310406

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD.
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:
**WALLACH, David;
RAMAKRISHNAN, Parameswaran;
WANGXIA, Wang y
KOVALENKO, Andrei**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 986 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

Actividad relacionada con ubiquitinación y/o degradación de SIVA y moduladores de la misma.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a la actividad relacionada con ubiquitinación y/o degradación de un polipéptido SIVA y a agentes capaces de modular dicha actividad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 SIVA es una proteína adaptadora que se fija a la cola citoplásmica de los receptores CD27 y GTR de la familia de receptores TNF (TNFR). La misma existe como dos isoformas alternativas de corte y empalme, SIVA1 y SIVA2. SIVA1 es más larga y contiene una región de homología de dominio de muerte (DDHR) con una hélice anfipática supuesta en su parte central. SIVA2 es más corta y carece de la DDHR. Ambas isoformas contienen un dedo de anillo semejante a caja B y un dominio semejante a un dedo de cinc en sus términos C. Borden et al., 1995 proporciona datos estructurales del dominio de caja B en el factor nuclear de *Xenopus*, XNF7.

15 Se ha demostrado que la expresión forzada tanto de SIVA1 como de SIVA2 induce apoptosis (Prasad et al., 1997, Yoon et al., 1998, Spinicelli et al., 2003 (Py et al., 2004). Se ha sugerido que la apoptosis inducida por SIVA1 es efectuada por su fijación a e inhibición de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 a través de su región helicoidal anfipática (Chu et al., 2005; Chu et al., 2004; Xue et al., 2002). Consistentemente con el papel proapoptótico, SIVA es una diana transcripcional directa para los supresores de tumores p53 y E2F1 (Fortin et al., 2004). Diversas evidencias indican que SIVA es una proteína inducida por estrés y está regulada en sentido creciente en la lesión isquémica aguda (Palanilam et al., 1998), la infección de coxavirus (Henke et al., 2000), y también por tratamiento con cisplatino (Qin et al., 2002), así como la expresión de TIP30 que induce apoptosis (Xiao et al., 2000). Recientemente, se ha demostrado que los términos N y C comunes de SIVA1 y SIVA2, pero no el dominio de muerte, son suficientes y capaces de mediar apoptosis en células linfoides por activación de un camino mitocondrial dependiente de caspasas (Py et al., 2004).

25 La quinasa inductora de NF- κ B, NIK (MAP3K14) fue descubierta (Malinin et al., 1997) en un cribado de proteínas que se fijan a la proteína adaptadora asociada al receptor TNF, TRAF2. La activación acusada de NF- κ B por sobreexpresión de esta proteína quinasa, y la inhibición efectiva de la activación de NF- κ B en respuesta a una diversidad de proteína-quinasas, así como la inhibición efectiva de la activación de NF- κ B en respuesta a una diversidad de agentes inductores, después de la expresión de mutantes de NIK catalíticamente inactivos sugirieron que NIK participa en la señalización para la activación de NF- κ B (Malinin et al., 1997).

30 NIK tiene un desarrollo en los órganos linfoides (Shinkura et al., 1999). Aparte de la contribución a la regulación del desarrollo y la función del sistema inmunitario, parece ser que NIK está implicada también en la regulación de diversas funciones no inmunitarias tales como el desarrollo de las glándulas mamarias (Miyawaki et al., 1994). Estudios in vitro implicaron NIK en la señalización que conduce a la diferenciación de las células musculares esqueléticas (Cancio et al., 2001), y en la supervivencia y diferenciación de las neuronas (Foehr et al., 2006).

35 La evaluación del patrón de las especies NF- κ B en los órganos linfoides indicó que, aparte de su papel en la regulación del o de los complejos de NF- κ B constituidos por proteínas Rel e I κ B, NIK participa también en el control de la expresión/activación de otras especies NF- κ B. De hecho, se ha demostrado que NIK participa en la fosforilación de p100 de acción específica, que sirve como disparador molecular para la ubiquitinación y el procesamiento activo de p100 para formar p52. Se ha encontrado que esta actividad de procesamiento de p100 es anulada por la mutación aly de NIK (Xiao et al., 2001b).

45 En el estroma tímico, NIK es importante para la producción normal de células Treg, que son esenciales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. La mutación de NIK daba como resultado una estructura tímica desorganizada y empeoraba la producción de células Treg en los ratones aly (Kajiura et al., 2004). Consistentemente, estudios de ratones deficientes en NIK sugerían también un papel para NIK en el control del desarrollo y la expansión de las células Treg (Lu et al., 2005). Estos descubrimientos sugieren un papel esencial de NIK en el establecimiento de la autotolerancia de una manera dependiente del estroma. NIK participa también en la activación de NF- κ B como consecuencia de infección viral. La infección por el virus respiratorio sincitial da como resultado una actividad incrementada de quinasas de NIK y la formación de un complejo constituido por NIK activada, IKK1, p100 y la p52 procesada en las células a549 semejantes a alvéolos. En este caso, NIK llega a autotranslocarse al núcleo fijado a p52 y, sorprendentemente, estos sucesos preceden a la activación del camino canónico de NF- κ B (Choudhary et al., 2005). Estos descubrimientos indican que NIK actúa de hecho como mediador de la activación de NF- κ B, pero puede desempeñar también otras funciones, y que ejerce estas funciones de una manera específica de la célula y el receptor.

55 NIK puede activarse como consecuencia de fosforilación del 'bucle de activación' dentro de la molécula NIK. De hecho, la mutación de un sitio de fosforilación dentro de este bucle (Thr-559) impide la activación de NF- κ B después de sobreexpresión de NIK (Lin et al., 1999). Adicionalmente, la actividad de NIK parece estar regulada por la capacidad de las regiones situadas aguas arriba y aguas abajo de su motivo quinasa para unirse una a otra. Se ha demostrado que la región C terminal de NIK aguas abajo de su resto quinasa es capaz de fijarse directamente a IKK1

(Regnier et al., 1997) así como a p100 (Xiao et al., 2001b), y estas interacciones son necesarias aparentemente para la función de NIK en la señalización de NF- κ B. La región N terminal de NIK contiene un dominio regulador negativo (NRD), que está compuesto de un motivo básico (BR) y un motivo de repetición rico en prolina (PRR) (Xiao y Sun, 2000). El NRD N-terminal interacciona con la región C-terminal de NIK en cis, impidiendo con ello la fijación de NIK a su sustrato (IKK1 y p100). La NIK expresada ectópicamente forma de modo espontáneo oligómeros en los cuales estas uniones de las regiones N-terminales a las C-terminales en cada molécula de NIK están aparentemente rotas, y presentan un nivel elevado de actividad constitutiva (Lin et al., 1999). La fijación de la región C-terminal de NIK a TRAF2 (así como a otras TRAF's) participa muy probablemente en el proceso de activación. Sin embargo, su modo de participación exacto se desconoce.

Recientemente, ha ganado mucha atención un nuevo mecanismo de regulación de NIK. Éste se refiere a la interacción dinámica de NIK y TRAF3 que conduce a degradación de NIK mediada por proteasomas. Es interesante que se ha demostrado que los inductores del camino alternativo de NF- κ B, como CD40 y BLYS, inducen la degradación de TRAF3 y la mejora concomitante de la expresión de NIK (Liao et al., 2004).

Existe todavía información más bien limitada de los mecanismos aguas abajo en la acción de NIK. Se han presentado pruebas de que NIK, por la fijación de su región C-terminal a IKK1, puede activar el complejo I κ B-quinasa (IKK). De hecho, se ha demostrado que es capaz de fosforilar la serina 176 en el bucle de activación de IKK1 y por consiguiente su activación (Ling et al., 1998).

Se ha sugerido que NIK no participa en absoluto en el camino NF- κ B canónico, sino que más bien sirve exclusivamente para activar el camino alternativo (véase Pomerantz y Baltimore, 2002, para revisión).

Finalmente, se demostró que aunque la inducción de la degradación de I κ B en los linfocitos por TNF es independiente de NIK, su inducción por CD70, ligando CD40, y BLYS/FAFF, que inducen también el procesamiento de NF- κ B2/p100, depende de hecho de la función de NIK (Ramakrishnan et al. 2004). Tanto CD70 como TNF inducen reclutamiento del complejo de quinasas IKK en sus receptores. En el caso de CD70, pero no de TNF, este proceso está asociado con reclutamiento de NIK y va seguido por una asociación prolongada de receptores de IKK1 y NIK. El reclutamiento del complejo de IKK en CD27, pero no el de NIK, depende de la función de la quinasa NIK. Estos descubrimientos indican que NIK participa en una serie única de sucesos de señalización proximales iniciados por inductores específicos, que activan los dímeros NF- κ B tanto canónicos como no canónicos.

La familia TRAF en los mamíferos está constituida por siete miembros TRAF1-TRAF7 (Bradley y Pober 2001, Xu et al., 2004). Las TRAFs desempeñan funciones importantes tanto en la inmunidad adaptativa como en la innata, principalmente por la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP1 (Wajant y Scheurich, 2004). Todas las proteínas TRAF comparten una región de homología C-terminal denominada dominio TRAF que es capaz de fijarse a los dominios citoplásmicos de receptores y a otras proteínas TRAF. Adicionalmente, las proteínas TRAF2-TRAF7 tienen motivos con dedos de anillo y dedos de cinc en su término N que son importantes para sucesos de señalización aguas abajo.

Se establecieron ratones knock-out en genes TRAFs (revisado por Bishop 2004, Bradley 2001, y Chung 2002). Los knock-out TRAF2 mueren prematuramente, y no presentan activación alguna de JNK mediada por TNF en los fibroblastos. Los mismos presentan niveles elevados de TNF en suero y sensibilidad incrementada a la muerte inducida por TNF en timocitos y fibroblastos. Adicionalmente, dichos ratones tienen células B deterioradas en el TNF y activación NF- κ B canónica inducida por CD40. Asimismo, dichos animales presentan una degradación deficiente de TRAF3 inducida por CD40 y activación constitutiva alternativa de NF- κ B en las células B. Los knock-out TRAF3 exhiben deficiencia en todos los linajes de leucocitos periféricos. Los mismos presentan un cambio de isotipo deficiente en respuesta a los antígenos dependientes de T y señalización LMP1 deficiente en las células B.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo que tiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B que carece de histidina y que tiene actividad relacionada con ubiquitinación que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, y dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o dicho homólogo del mismo; (ii) medir el enlace de ubiquitina a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B, en donde la detección de la ubiquitina enlazada a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B es indicativa de que dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B tiene actividad relacionada con ubiquitinación.

En un aspecto adicional, y como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un método para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, y un polipéptido SIVA; (ii) y detectar si dicha ubiquitina se enlaza a dicho polipéptido SIVA, en donde la detección de ubiquitina enlazada a dicho polipéptido SIVA es indicativa de que dicho polipéptido SIVA tiene actividad relacionada con ubiquitinación.

En una realización de la invención, el método tiene por objeto la identificación de un polipéptido SIVA capaz de exhibir actividad relacionada con ubiquitinación K63.

En una realización adicional de la invención, el polipéptido de ubiquitina es ubiquitina mutada en K48.

5 En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un método para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, un polipéptido TRAF2, y opcionalmente un E3 en presencia o ausencia de un polipéptido SIVA; (ii) medir el nivel de ubiquitinación del polipéptido TRAF2 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación de TRAF2 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA, en donde el aumento en el nivel de ubiquitinación de TRAF2 en presencia del polipéptido SIVA es indicativo de que el polipéptido SIVA tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación.

En una realización de la invención, se testa la actividad relacionada con ubiquitinación K48 de un polipéptido SIVA.

10 En una realización adicional de la invención, el polipéptido SIVA consiste en SIVA2.

15 En otro aspecto adicional, la invención se refiere a un método para identificar un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo, teniendo un motivo con dedo de anillo semejante a caja B que carece de histidina y que tiene actividad relacionada con ubiquitinación, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, E2, el polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo en presencia o en ausencia de un agente candidato, en condiciones que permiten la ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un polipéptido de anillo semejante a caja B mediada por dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B; (ii) medir el nivel de ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B en presencia o en ausencia de dicho agente candidato; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación en presencia y en ausencia de dicho agente candidato, en donde un cambio en el nivel de ubiquitinación de un polipéptido que alberga un polipéptido de anillo semejante a caja B en presencia de dicho agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B.

25 En otro aspecto adicional y como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un método para identificar un agente capaz de modular una actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido SIVA, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, E2, y el polipéptido SIVA en presencia o en ausencia de un agente candidato, en condiciones que permiten la auto-ubiquitinación del polipéptido SIVA; (ii) medir el nivel de auto-ubiquitinación del polipéptido SIVA en presencia y en ausencia del agente candidato; y (iii) comparar el nivel de auto-ubiquitinación de dicho polipéptido SIVA en presencia y en ausencia de dicho agente de test, en donde un cambio en el nivel de auto-ubiquitinación de dicho polipéptido SIVA en presencia de dicho agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad de SIVA relacionada con ubiquitinación.

En una realización de la invención, la ubiquitinación es ubiquitinación mutada en K48.

En una realización adicional de la invención, el contacto de los polipéptidos se lleva a cabo dentro de células.

35 En una realización adicional de la invención, el contacto de los polipéptidos se lleva a cabo in vitro o en un sistema o ensayo exento de células.

En una realización adicional de la invención, la ubiquitinación se detecta por análisis de transferencia Western.

En otra realización adicional de la invención, dicho agente candidato se selecciona de moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas de extractos naturales, y compuestos orgánicos sintéticos.

40 La descripción se refiere al uso de un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación directa o indirecta de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia en SEQ ID NO: 6 o una secuencia homóloga de la misma, en la fabricación de un medicamento para tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección cuya patología o cuyo curso está asociado con la actividad y/o niveles de TRAF2, NIK, TRAF3 y/o SIVA.

45 La enfermedad puede ser infección viral.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido aislado constituido por una caja B de la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6.

50 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido aislado que comprende un fragmento C-terminal de un polipéptido SIVA que incluye el dedo de anillo semejante a caja B y/o los motivos con dedo de cinc excepto en lo que respecta a SIVA1 y SIVA2.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido aislado constituido por los residuos de aminoácido 58 a 110 de SIVA3 que se muestran en SEQ ID NO: 3.

- Se describe un polipéptido aislado que comprende un fragmento N-terminal de un polipéptido SIVA que carece del motivo con dedo de cinc 1-81 (SEQ ID NO: 5), o un fragmento del mismo.
- 5 Se describe adicionalmente un polipéptido aislado que comprende un fragmento N-terminal de un polipéptido SIVA que carece del motivo con dedo de Zn y el motivo con dedo de anillo semejante a caja B de SIVA 2 1-58 (SEQ ID NO: 4).
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido aislado constituido por SEQ ID NO: 3, o un fragmento del mismo.
- Se describe un polipéptido aislado que comprende un polipéptido SIVA mutado en un residuo cisteína localizado en el motivo con dedo de anillo.
- 10 En otro aspecto adicional, la invención proporciona una sal de un polipéptido de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende la secuencia tal como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.
- 15 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona una célula hospedadora que alberga un vector de acuerdo con la invención.
- 20 En otro aspecto adicional, la invención proporciona un método para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la invención y aislar el polipéptido producido.
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona un kit útil para la ubiquitinación de un sustrato proteínico que comprende E1, E2, ubiquitina y un polipéptido SIVA. Pueden proporcionarse instrucciones.
- En una realización de la invención, el sustrato proteínico se selecciona de TRAF2, TRAF3, NIK y SIVA.
- 25 En otro aspecto adicional, la invención proporciona, como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En otro aspecto adicional, la invención proporciona, como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 En otro aspecto adicional, la invención proporciona, como se define en las reivindicaciones, una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Se describe también una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitina de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia de SEQ ID NO: 6 o una secuencia homóloga de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, v.g. siendo el polipéptido que alberga el anillo semejante a caja B un polipéptido SIVA.
- 35 Se describe una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de modular la degradación de proteínas mediada por la actividad de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia de SEQ ID NO: 6 o una secuencia homóloga de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- En una realización de la invención, el polipéptido que alberga el anillo semejante a caja B es un polipéptido SIVA.
- 40 La memoria descriptiva proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de modular la actividad de ubiquitina-ligasa de un polipéptido SIVA o un homólogo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 45 Figs. 1A-1J muestran que SIVA se fija a NIK tanto in vivo como in vitro y modula su función. A. Fijación de NIK a SIVA en tests de dos híbridos en levadura. La fijación de NIK y su mutante truncado en el terminal N (NIK 624-947) a la parte terminal de SIVA (aminoácidos 123-175 en SIVA1 o 58-110 en SIVA2) o TRAF2 se valoró en levadura transformada SFY526. '++' y '+' indican el desarrollo de color intenso dentro de 1 hora y 3 horas después de la iniciación del ensayo, respectivamente, y '-' la ausencia de desarrollo de color dentro de 24 horas. B. Co-inmunoprecipitación de NIK (o de NIK en el que se había introducido una mutación sin sentido correspondiente a la encontrada en los ratones aly) con SIVA y C, SIVA con NIK de células HEK 293T transfectadas transitoriamente. D. Aumento de la expresión de NIK transfectada por co-expresión de SIVA, NIK, SIVA, IKK1 y GFP se transfectaron en ratio 1:1 y los
- 50

lisados totales se analizaron por transferencia Western 24 horas después de la transfección. E. Fijación in vitro de NIK y SIVA2. GST-SIVA2 expresado bacteriamente y NIK expresado en baculovirus sin término N se mezclaron y se incubaron a 10°C durante 30 min. El inmunoprecipitado anti-NIK se analizó por transferencia Western con anti-SIVA. F. CD70 facilita la asociación de SIVA2 con NIK. Células Ramos que expresaban constitutivamente NIK marcada con myc se trataron durante 20 min con CD70 seguido por inmunoprecipitación de NIK y análisis Western de la asociación de SIVA con el mismo. El sobrenadante de cultivo de las células HEK 293T que expresaban CD70 se utilizó a dilución de 50% para tratamiento de las células en todos los experimentos. G. El disparo de CD40L impulsa la asociación de NIK con SIVA2. Células linfoblastoides humanas BJAB que expresaban constitutivamente NIK transfectada se infectaron con un vector retroviral que expresaba SIVA2 y un marcador de selección de resistencia a puromicina. La agrupación de células resistentes a puromicina se activó durante los momentos indicados con CD4L o H. TRAIL (100 ng/ml). Se inmunoprecipitó NIK y el SIVA coprecipitado se analizó por transferencia Western. Para el tratamiento con CD40L, las células se resuspendieron en sobrenadantes de cultivo de células HEK 2931 que expresaban CD40L. I. Co-expresión de NIK y sus mutantes del dominio de fijación TRAF2 en células HeLa. (Aminoácidos NIK 304* 332-335, SVEE mutado a SVAA y aminoácidos NIK 704* 702-705, PAEE mutado a PAAA). Inmunoprecipitados anti-NIK analizados por transferencia Western para coprecipitación de SIVA2 (4 pistas de la izquierda), y lisados totales que muestran el nivel de expresión de SIVA2 (4 pistas de la derecha). J. Aumento de la activación de NF-κB mediada por NIK por SIVA co-expresado. El efecto de la sobre-expresión de NIK, sola o junto con SIVA1 o SIVA2 sobre la expresión de NF-κB luciferasa en las células HEK 293T se valoró 24 horas después de la transfección. Obsérvese que la expresión de NIK aly da también como resultado una activación significativa de NF-κB. Sin embargo, SIVA no aumenta esta activación. Los datos presentados son los valores medios de los obtenidos en dos experimentos en los cuales cada test se realizó por triplicado.

Figs. 2A-2F muestran que la región con dedo de anillo /cinc de SIVA está implicada en la modulación de la función de NIK. A. Representación diagramática de la estructura de SIVA2 y de los mutantes de delección utilizados en los experimentos. B. NIK marcado con myc y SIVA2 marcado con HIS y dos mutantes de delección C-terminales de los mismos se expresaron en células HEK 293T seguido por inmunoprecipitación de NIK y análisis por transferencia Western como se indica. C. El efecto de la sobreexpresión de NIK, sola o junto con SIVA2 y sus mutantes de delección sobre la expresión de NF-κB luciferasa en células HEK 293T se evaluó 24 horas después de la transfección. D. Efecto de la expresión de SIVA-C sobre la activación de NF-κB inducida por NIK y NIK aly, y E. Efecto de la expresión de SIVA-C sobre la activación de NF-κB inducida por CD70 en células HEK 293T transfectadas por CD27. Los datos presentados son los valores medios de los obtenidos en dos experimentos en los cuales cada test se realizó por triplicado. F. El término C de SIVA se expresó constitutivamente en células B Ramos linfoblastoides. Detección por transferencia Western de SIVA2 marcado con His (panel inferior). Se sondaron extractos nucleares con anticuerpo anti-p52 (panel superior).

Figs. 3A-3F muestran que la ubiquitinación de NIK está mediada por SIVA2. A. Plásmidos que codificaban NIK y ubiquitina se transfectaron a una ratio 1:3 en células HEK 293T. Veinticuatro horas más tarde, se prepararon lisados y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-NIK y se analizaron por transferencia Western. B. Se transfectaron células HeLa con NIK y se expusieron al inhibidor proteasómico MG132 (25 μM) durante las 4 últimas horas de la transfección de 24 horas. Se utilizó DMSO como el control de diluyente y los lisados totales se analizaron por transferencia Western utilizando anti-NIK. C. Se coexpresó NIK con mutantes de ubiquitina a una ratio 1:3 en células HEK 293T. La NIK inmunoprecipitada se analizó por transferencia Western con anticuerpo anti-ubiquitina. D. Co-transfección de NIK o NIK K670A con SIVA2 y una ubiquitina en la que 4 lisinas estaban reemplazadas por arginina para eliminar la poliubiquitinación en células HeLa. Los lisados totales de células se analizaron por transferencia Western anti-NIK. E. Co-transfección de NIK con SIVA2 y un plásmido mutante de ubiquitina marcado con HA que no puede formar cadenas de poliubiquitina K63. El inmunoprecipitado anti-NIK se analizó por transferencia Western anti-HA para monitorizar las cadenas de poliubiquitina enlazadas a K48. F. Se sobre-expresó transitoriamente NIK en células HEK 293T con SIVA1, SIVA2 o SIVA2 en la cual el dedo de anillo estaba mutado (C73A). Se inmunoprecipitó NIK de los lisados de células y se sondó respecto a conjugación de ubiquitina a NIK (panel superior) sondada respecto a la coprecipitación de las proteínas SIVA (panel inferior). G. Células Ramos que expresaban NIK transducida retroviralmente se trataron con CD70. La NIK inmunoprecipitada se analizó por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-NIK. H. Células HEK 293T que expresaban de manera estable el receptor CD27 y NIK se trataron con CD70. La NIK inmunoprecipitada se analizó por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-ubiquitina para monitorizar la ubiquitinación de NIK.

Figs. 4A-4E muestra la regulación negativa de NIK por SIVA2. A. NIK 0,5 μg y SIVA2 a las ratios indicadas se expresaron transitoriamente en células HEK 293T con una luciferasa informadora de NF-κB. Veinticuatro horas más tarde, se lisaron las células y se determinó luminométricamente su actividad de luciferasa. El resultado representa el valor medio de duplicados de uno de los tres experimentos independientes. B. NIK (0,5 μg de plásmido) sin o con SIVA2 (1,5 μg y 3 μg de plásmido) se expresó transitoriamente en células HeLa. Durante las últimas 6 horas de las 30 horas de incubación, las células se trataron con los inhibidores proteasómicos, Lactacistina 20 μM o MG132 50 μM, y los lisados totales se analizaron por transferencia Western. C. El plásmido SIVA2 (1,5 μg y 3 μg) se transfectó en células HEK 293T que expresaban establemente NIK. Treinta horas después de la transfección, los lisados totales se analizaron por transferencia Western para los niveles de NIK y SIVA2. D. Se co-transfectaron dos mutantes de delección de SIVA2 con NIK (0,5 μg) a ratios 1:3 y 1:6. Los niveles de NIK en los lisados se evaluaron 30 horas después de la transfección. El panel inferior muestra actina como control de carga. E. Se co-transfectó el plásmido NIK

(4 µg) con SIVA 1-58 o SIVA-plásmido C (8 µg) y HA-Ubiquitina K48R o el plásmido mutante K63R (6 µg) en células HeLa. Veinticuatro horas después de la transfección, se cosecharon las células, se lisaron y se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-NIK. La transferencia Western se realizó con anti-HA para detección de los conjugados de ubiquitina en NIK.

5 Figs. 5A-5F muestran que la mutación del residuo lisina 670 en NIK protege NIK contra la regulación decreciente por SIVA2. A. Tabla que muestra la extensión de ubiquitinación de diversas delecciones de NIK. B. co-expresión de NIK K670A con mutantes de ubiquitina K48R y K63R en células HEK 293T (panel derecho) comparada con la NIK de tipo salvaje (panel izquierdo). La NIK inmunoprecipitada se analizó con un anticuerpo anti-ubiquitina. C. Degradación de la NIK de tipo salvaje (0,5 µg de plásmido) comparada con el mutante NIK K670A por la concentración creciente de SIVA2 (1,0, 2,0 y 3,0 µg de plásmido) y D. por TRAF3 en células HeLa transfectadas. E. Degradación de NIK de tipo salvaje, NIK aly y NIK K670A por SIVA2C73A en células HeLa transfectadas. Los paneles inferiores en C, D y E muestran actina como control de carga. F. Coprecipitación de SIVA-C con NIK y su ubiquitinación (condiciones como en Fig. 4E).

15 Figs. 6A-6D muestran que SIVA2 es una ligasa E3. La ubiquitinación de K63 inducida por SIVA2 es inhibida por A. mutante catalíticamente inactivo Ubcl3 (C87A) y B. sobreexpresión de CYLD. Los plásmidos indicados se co-transfectaron en células HeLa y se prepararon lisados de células 24 horas después de la transfección. Se sondaron inmunoprecipitados anti-NIK en transferencia Western con anti-HA para detectar la ubiquitinación y los lisados totales con anti-NIK. C. Se co-expresó NIK (0,5 µg de plásmido) con SIVA2 (1,5 µg y 3,0 µg de plásmido) y TRAF2 (0,5 µg de plásmido) como se indica. Se prepararon lisados totales de células 30 horas después de la transfección y se sondaron con anti-NIK y anti-IKK1. D. Se incubó GST-SIVA2 con E1 (200 ng/50 µl) y E2, Ubcl3/Uev1 (500 ng/50 µl), enzimas en un ensayo de ubiquitinación in vitro. Después de una hora a 37°C, las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-GST. Tanto IP como los lisados totales se analizaron por transferencia Western utilizando anti-SIVA.

25 Figs. 7A-7H muestran que la regulación creciente o regulación decreciente de SIVA interfiere con la función de NIK. A. RT-PCR para testar la eficiencia de diversos pSUPER-siRNAs para suprimir SIVA en células HEK 293T. Se sembraron placas de 6 pocillos con 200.000 células/pocillo y se transfectaron con diversos pSUPER-siRNAs por el reactivo lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se cosecharon después de 48 horas de transfección y el RNA se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen). El panel inferior muestra GAPDH como control para la cuantificación. B. Se co-transfectaron células HEK 293T con CD27 o p55 TNFR y p35 (inhibidor de pan-caspasas para proteger las células de la muerte inducida por TNFR), informador NF-κB luciferasa y pSUPER-SIVA siRNA NC3. Veintiséis horas después, las células transfectadas CD277 se trataron con CD70 durante 4 h, seguido por evaluación de la actividad de luciferasa así como la generación de p52. C. Niveles de mRNA de SIVA en células Ramos transducidas con vector lentiviral codificante de siRNA NC3 bajo el promotor H1. D. CD70 inducía translocación nuclear de NF-κB en células Ramos en las cuales la expresión de SIVA estaba reprimida por transducción lentiviral de SIVA de siRNA. E. Células Ramos (1 x 10⁶/momento) que expresaban constitutivamente SIVA2 y células de control de vector se trataron con CD70 o TNF durante los tiempos indicados. Los extractos citoplásmicos y nucleares se analizaron utilizando los anticuerpos indicados. F. Inmunoprecipitación de FLAG-SIVA2 expresado transitoriamente a partir de células HeLa. Se aplicó MG132 a 25 µM durante las 4 últimas horas de una transfección de 24 horas. G. Se expresaron de manera estable el receptor CD27 y SIVA2 inducible por ecdisona en células 293 con el represor de ecdisona. Se sembraron placas de 6 pocillos con 200.000 células/pocillo y se indujo SIVA2 con 10 µM del análogo de ecdisona, ponasterona. Se aplicó CD70 junto con el inductor durante 12 horas o durante los 20 últimos minutos de una inducción de 12 horas. Se cosecharon las células, se prepararon extractos nucleares y citoplásmicos y se analizaron por transferencia Western. H. Muestra el efecto de la silencianción de SIVA sobre la translocación nuclear de p52 y p65 mediada por NIK en células 293-CD27 tratadas con CD70. Las células HEK 293T que expresaban NIK transducida retroviralmente se transfectaron con pSUPER SIVA o vector vacío pSUPER como control tratado con medio que expresaba CD70 durante 8 horas o se dejaron sin tratar, se prepararon extractos nucleares y citoplásmicos y se analizaron por transferencia Western con anticuerpos específicos apropiados para detección de NIK, p100, p52, y p65. Se utilizaron anticuerpos específicos de actina para detectar actina, como el control interno. Los resultados muestran que la silencianción de SIVA eleva los niveles de NIK en el citoplasma y de p52 en el núcleo.

55 Figs. 8A-8C muestran que SIVA2 puede ser posiblemente un sustrato de NIK. A. Se co-expresaron myc-NIK, HIS-SIVA2 y sus mutantes como se indica en células HEK 293T seguido por inmunoprecipitación de SIVA y reacción de quinasas in vitro. B. Se co-expresó SIVA2 con NIK de tipo salvaje o inactiva por quinasas en células HeLa. Veinticuatro horas después de la transfección se analizaron los lisados totales respecto a expresión de SIVA. El panel inferior muestra actina como control de carga. C. Ensayo de quinasas in vitro (panel superior). Se co-expresaron NIK (6 µg de plásmido) e IKK1 o IKK2 desactivadas por quinasas (6 µg de plásmido cada una) con FLAG-SIVA2 (8 µg de plásmido) en células HEK 293T. Veinticuatro horas después de la transfección, se realizó una inmunoprecipitación con anti-FLAG a partir de los lisados y se realizó un ensayo de quinasas. Los lisados totales se analizaron por transferencia Western utilizando los anticuerpos indicados para verificar el nivel de expresión de proteínas transfectadas (panel inferior).

60 Figs. 9A-9H muestran la ubiquitinación de TRAF3 y la escisión mediada por NIK cooperativamente con SIVA2. A. Se sembraron células HEL293T (200.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos y se transfectaron 24 horas más tarde

con los plásmidos siguientes como se indica en la figura: myc NIK 0,2 µg, FLAG-SIVA2 0,3 µg, HIS-TRAF3 0,3 µg y HIV-luciferasa 1,0 µg. Veinticuatro horas más tarde, se lisaron las células y se determinó luminométricamente su actividad de luciferasa. Los resultados representan el valor medio de duplicados de uno de los dos experimentos independientes. B. El plásmido TRAF3 (3,0 µg), el plásmido NIK (4,0 µg) y el plásmido ubiquitina (4,0 µg) se co-transfectaron en células HEK 293T en placas de 9 cm (1,5 x 10⁶ células/placa). Las células se cosecharon 24 horas después de la transfección y los lisados totales se analizaron por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-TRAF3. Las marcas de flecha indican formas TRAF3 modificadas. C. HEK 293T (1,5 x 10⁶ células/placa) sembradas en 9 cm se transfectaron con 4,0 µg cada una de los plásmidos indicados. Las células se cosecharon 24 horas después de la transfección y los lisados totales se analizaron por transferencia Western anti-TRAF3. D. HIS-TRAF3 (3,0 µg), FLAG-SIVA2 (6,0 µg) y HA-Ubiquitina K48R (6,0 µg) se transfectaron como en B y el inmunoprecipitado anti-HIS se sometió a transferencia Western utilizando anticuerpo anti-HA. E. Se realizaron transfecciones como en D. En la pista 4, se co-transfectaron también 4,0 µg de plásmido p35. La pista 5 se trató con 25 µM de MG132 durante las 8 horas de una incubación de 24 horas subsiguiente a la transfección. F y G. Se realizaron transfecciones como en C y 28 horas después de las transfecciones se cosecharon las células y se lisaron en tampón que contenía 1% Triton X-100 durante 20 min en hielo. El lisado se centrifugó a 10.000 g y el sobrenadante se recogió como fracción soluble en Triton. El sedimento se resuspendió en tampón de muestra y se hirvió para obtener una fracción insoluble en Triton. H. Se realizaron transfecciones como en C, y los lisados se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-FLAG para precipitar SIVA2 y se sondaron con anti-TRAF3.

Figs. 10A-10D muestran el efecto de SIVA2 sobre la activación de ligando de NF-κB en células HEK 293T, HeLa y Ramos. A. Células HeLa TREX capaces de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina (o doxiciclina) se trataron con medio enriquecido LIGHT durante 8 horas a fin de activar NF-κB. Después del tratamiento con LIGHT se lisaron las células y la fracción nuclear se aisló y se sometió a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos específicos anti-p52, RelB o p65. LIGHT inducía translocación nuclear tanto de p52 como de p65 en las células HeLa. Una inducción breve de SIVA2 mejoraba la translocación nuclear tanto de p52 como de p65, mediada por LIGHT, mientras que una inducción larga de SIVA2 interfería con la translocación nuclear tanto de p52 como de p65 mediada por LIGHT.

B. cDNA de SIVA2 clonado en el vector pIND se expresaba de manera estable en el sistema de células 293-ecr (Invitrogen). Este sistema permite la expresión inducible mediada por ecdisona (o el análogo ponasterona) de SIVA2 clonado. Estas células se trataron durante 8 horas con CD70 para inducir la activación del camino alternativo NF-κB o se dejaron sin tratar. Después del tratamiento, las células se lisaron, se fraccionaron en fracciones citoplásmica y nuclear y se sometieron a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos anti-NIK, TRAF2, TRAF3 p100 y p52. La inducción de SIVA2 por un tiempo breve, al menos durante la última hora de la inducción con CD70, reducía el nivel de TRAF2/3 y aumentaba los niveles de procesamiento de NIK y p100, dando como resultado niveles de p52 nuclear incrementados. La inducción de SIVA2 durante un tiempo largo, 8 horas junto con el tratamiento con CD70, reducía los niveles de NIK y p52 nuclear. C. Células Ramos que albergaban el sistema TREX capaces de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina (o doxiciclina) o el mutante SIVA2C73A se trataron con CD70 durante 0, 0,3 u 8 horas, y se exploró el efecto de la inducción de SIVA2 o el mutante SIVA2C73A durante largo tiempo (8 horas), un tiempo breve (1 hora) sobre la activación de NF-κB inducida por CD70. Como se indica en la figura, durante el tratamiento de 8 horas de ligando con inducción de SIVA, se aplicó doxiciclina junto con el ligando. Para 1 hora de inducción de SIVA, se añadió doxiciclina en la hora final del tratamiento de ligando de 8 horas. En el caso de tratamiento con CD70 durante tiempo breve, se añadió doxiciclina durante 8 horas o durante 1 hora y el ligando se aplicó durante las 0,3 horas finales. Las células tratadas e inducidas como se indica, se lisaron, se fraccionaron en extractos nucleares y citoplásmicos, y estas fracciones se sometieron a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos específicos anti-I-κBα, p65, p100 y p52. La inducción de SIVA2 de tipo salvaje bloqueaba la degradación de I-κBα inducida por CD70 y translocación de p65 al núcleo. La inducción del mutante de SIVA con dedo de anillo no bloqueaba la degradación de I-κBα inducida por CD70 e intensificaba la translocación nuclear de p65. La inducción de SIVA2 bloqueaba también la translocación nuclear de p52 inducida por CD70 de una manera dependiente del dedo de anillo. D. Células Ramos TREX capaces de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina o el mutante SIVA2C73A se trataron con TNF durante 0, 0,3 y 4 horas, y el efecto de la inducción durante largo tiempo (4 horas) o tiempo breve (1 hora) de SIVA2 o SIVA2C73A sobre la translocación de p65 inducida por TNF al núcleo se exploró como se ha descrito arriba. Después de los tratamientos, las células se lisaron, se fraccionaron en extractos nuclear y citoplásmico, y se sometieron a análisis por transferencia Western sondados con anticuerpos específicos anti-p65. La inducción de SIVA2 de tipo salvaje bloqueaba la translocación de p65 inducida por TNF al núcleo. La inducción del mutante SIVA con dedo de anillo no bloqueaba la translocación nuclear de p65 inducida por TNF.

Figs. 11A-11H A muestra la ubiquitinación in vitro de TRAF2 por SIVA2. Se realizaron ensayos de ubiquitinación in vitro en una reacción que contenía solamente HIS-Ubiquitina-K63 recombinante, E1, E2 (heterodímero Ubc13/Uev1) (tanto E1 como E2 se adquirieron de Boston Biochem) y de GST-SIVA o GST-SIVAC73A recombinantes con TRAF2 marcado con FLAG en un tampón que contenía 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 µg/ml creatina-quinasa y 5 µM ubiquitina-aldehído. TRAF2 marcado con FLAG se preparó por transfección de pcFLAG TRAF2 en células HEK 293T. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón de lisis que contenía 1% Triton X-100 y se inmunoprecipitaron utilizando cuentas anti-FLAG M2 (Sigma). El TRAF2 inmunoprecipitado se eluyó con el péptido FLAG y se concentró utilizando una columna Microcon (MWCO3000) y se utilizó en la reacción de ubiquitinación in vitro. Las reacciones

se incubaron a 30°C durante 1 hora. Se inmunoprecipitó TRAF2 utilizando cuentas anti-FLAG M2 durante 4 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se sometieron a transferencia Western con anticuerpo anti-TRAF2 (H249, Santa Cruz). B. Muestra que las células Ramos que se modificaron por ingeniería genética para expresar de manera estable el término C de SIVA exhiben un nivel elevado de p52 así como TRAF3 y una expresión reducida de TRAF2. C. Muestra que TRAF2 se fija a SIVA2. Se incubó TRAF2 marcado con FLAG a 30°C durante 1 hora con SIVA2 recombinante marcado con GST (expresado bacteriamente) o con el mutante SIVA2 con dedo de anillo marcado con GST. A continuación, se llevó a cabo la inmunoprecipitación con anti-FLAG para TRAF2 y se realizó el análisis por transferencia Western con anti-SIVA para detectar el SIVA coprecipitante. El SIVA2 recombinante expresado bacteriamente marcado con GST aparece como dos bandas en las transferencias Western. La mutación con dedo de anillo en SIVA2 podía causar una variación de la conformación que dé como resultado una afinidad de fijación alterada a TRAF2. Esto está en línea con la observación en Fig. 11D, donde se encontró que TRAF2 se fijaba al dedo de anillo de SIVA2. D. Muestra que el dedo de anillo de SIVA es importante para la fijación a TRAF2. Se co-transfectaron células HEK 293T con un plásmido que codificaba HIS-SIVA2 o delecciones de SIVA2, SIVA2 1-58 que carecía del dedo de anillo o SIVA1-81 y un plásmido que codificaba FLAG-TRAF2. Veinticuatro horas después de la transfección, se cosecharon y lisaron las células. Se inmunoprecipitó TRAF2 utilizando cuentas anti-FLAG-M2 y el SIVA2 coprecipitado se sondó por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-HIS. La lisis total muestra los niveles de expresión de las proteínas. SIVA no coprecipitaba con TRAF2 cuando el dedo de anillo está ausente (SIVA2 1-58) y coprecipita únicamente cuando el dedo de anillo está presente (SIVA2 intacto y SIVA2 1-81). E. Muestra que la sobreexpresión de SIVA en células HEK 293T aumenta la ubiquitinación K48 de TRAF2. Se transfectaron células HEK 293T con el plásmido codificante de FLAG2-TRAF2, HIS-SIVA2 y mutante de ubiquitina. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron, se inmunoprecipitaron, y se analizaron por transferencia Western utilizando anticuerpos específicos. Se utilizó el mutante TRAF2 con dedo de anillo (C34A) para impedir su auto-ubiquitinación. La mutación con dedo de anillo en TRAF2 impedía únicamente la auto-ubiquitinación K63. La sobreexpresión de SIVA2 aumentaba la ubiquitinación K48 de TRAF2 en función de su dedo de anillo. El mutante TRAF2 con dedo de anillo retenía su capacidad para fijarse a SIVA2. F. Muestra que SIVA2 regula la ubiquitinación de TRAF2 reclutado en el receptor CD27 en las células Ramos. El reclutamiento de TRAF2 en el receptor CD27 se inducía por estimulación con FLAG-CD70 y el TRAF2 reclutado en el receptor se inmunoprecipitó utilizando anti-FLAG. Se indujo SIVA2 durante 2 horas con 1 µM doxiciclina antes de estimulación con CD70. El reclutamiento de IKK1 en el receptor CD27 no se ve afectado por la inducción de SIVA. La cantidad de SIVA2 total expresada después de la inducción de doxiciclina se muestra en el panel inferior. La inducción de SIVA2 aumenta TRAF2 ubiquitinado en el complejo receptor de una manera dependiente del anillo en las células Ramos. G. Muestra el efecto de la silenciamiento de SIVA sobre la ubiquitinación de TRAF2 reclutado en el receptor CD27. Se transfectaron células 293-CD27 con pSUPER SIVA, y 48 horas más tarde se trataron con medio que expresaba FLAG-CD70 durante 0, 15, 30 y 60 minutos, se lisaron y el complejo receptor CD27 se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo anti-FLAG. El TRAF2 asociado al receptor se sondó con anticuerpo anti-TRAF2. El receptor CD27 e IKK1 precipitados por el ligando se muestran en los paneles inferiores. H. Muestra que SIVA facilita el reclutamiento inicial de TRAF2 en el receptor CD27, que es necesario para la degradación de TRAF2 después de estimulación de CD27. Las células pSUPER SIVA transfectadas se compararon con las células de control pSUPER transfectadas respecto al nivel de TRAF2 en el citoplasma después de estimulación con CD27. El disparo de CD70 da como resultado la degradación de TRAF2 de una manera dependiente de SIVA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se encontró, de acuerdo con la presente invención, que SIVA tiene actividad relacionada con ubiquitinación y es capaz de inducir directamente auto-ubiquitinación y ubiquitinación de TRAF2.

La ubiquitinación, denominada también ubiquitinación, hace referencia al proceso particular para los eucariotas por el cual una proteína se modifica posteriormente a la traducción por fijación covalente de una pequeña proteína denominada ubiquitina [originalmente polipéptido inmunopoyético ubiquitoso (UBIP)]. La ubiquitina-ligasa es una proteína que fija covalentemente ubiquitina a un residuo lisina en una proteína diana. La ubiquitina-ligasa está implicada típicamente en la poliubiquitinación: una segunda ubiquitina se fija a la primera, una tercera se fija a la segunda, y así sucesivamente.

La ubiquitina-ligasa se conoce como un "E3" y opera en conjunción con una enzima activadora de ubiquitina (a la que se hace referencia en esta memoria como "E1") y una enzima conjugante de ubiquitina (a la que se hace referencia en esta memoria como "E2"). Existe una enzima principal E1, compartida por todas las ubiquitina-ligasas, que utiliza ATP para activar la ubiquitina para conjugación y transfiere la misma a una enzima E2. La enzima E2 interactúa con una pareja específica E3 y transfiere la ubiquitina a la proteína diana. La E3, que puede ser un complejo multi-proteínico, es generalmente responsable de direccionar la ubiquitinación a proteínas sustrato específicas. En algunos casos, la misma recibe la ubiquitina de la enzima E2 y la transfiere a la proteína diana o la proteína sustrato; en otros casos, aquélla actúa por interacción tanto con la enzima E2 como con el sustrato.

Se ha demostrado, de acuerdo con la invención, que SIVA2 es una ligasa E3. Así, en un aspecto, la invención se refiere, como se define en las reivindicaciones, a un método para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, y un E2, con un polipéptido SIVA; (ii) y detectar si dicha ubiquitina se enlaza o se fija covalentemente a dicho

polipéptido SIVA, en donde la detección de ubiquitina enlazada a dicho polipéptido SIVA es indicativa de que dicho polipéptido SIVA tiene actividad relacionada con ubiquitinación.

El polipéptido SIVA puede ser cualquier polipéptido derivado de o basado en SIVA. Ejemplos de polipéptidos SIVA incluyen, pero sin carácter limitante, SIVA1 (SEQ ID NO: 1), SIVA2 (SEQ ID NO: 2), una muteína, proteína fusionada, derivado funcional, fracción activa, isoforma, o derivado permutado circularmente del mismo. Un ejemplo de E2 es Ubc13/Uev1.

Pueden utilizarse métodos *in vitro* o métodos basados en células para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación.

En una realización de la invención, el método es un método *in vitro* y puede llevarse a cabo como sigue. Se prepara una mezcla de reacción que comprende una ubiquitina recombinante, E1, E2 y polipéptido SIVA recombinante. La cantidad de proteína recombinante utilizada puede ser 8, 0,2, 1-2 µg/ml de ubiquitina, E1, E2 y el polipéptido SIVA, respectivamente. Las proteínas pueden encontrarse en un tampón adecuado, por ejemplo, un tampón que contenga 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 µg/ml creatina-quinasa y 5 µM ubiquitina-aldehído. La reacción se incuba a 30°C durante aproximadamente 1-4 horas. La reacción puede terminarse por adición de tampón de muestra Laemmli o diluirse hasta 1 ml con tampón que contiene 20 mM HEPES de pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 1 mM EDTA y cóctel completo de inhibidores de proteasas. SIVA se inmunoprecipita utilizando anti-SIVA o utilizando un anticuerpo contra un marcador en el caso de que el SIVA esté marcado.

Por ejemplo, SIVA marcado puede ser GST-SIVA y el anticuerpo utilizado puede ser específico para GST como en las realizaciones ilustradas más adelante. A continuación, el anticuerpo se adsorbe a cuentas de proteína G durante 4 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se someten a transferencia Western con anticuerpos específicos, por ejemplo un anticuerpo anti-ubiquitina. La ubiquitina en el método puede emplear una ubiquitina mutante en la cual todas las lisinas en la ubiquitina excepto K48 están mutadas a arginina (Boston Biochem) para identificar un polipéptido SIVA capaz de ubiquitinación K48. Alternativamente, la ubiquitina en el método puede utilizar una ubiquitina mutante en la cual todas las lisinas en la ubiquitina excepto K63 están mutadas a arginina (Boston Biochem) para identificar un polipéptido SIVA capaz de ubiquitinación K63 como en el caso de la auto-ubiquitinación.

La ubiquitina enlazada a SIVA puede detectarse, por ejemplo, por análisis mediante transferencia Western utilizando anticuerpo anti-SIVA y detección de la aparición de bandas más pesadas de SIVA y/o utilizando anticuerpos contra ubiquitina. Por ejemplo, la ubiquitina puede estar marcada con HIS o HA. SIVA puede estar marcado con GST o FLAG.

En un método de la invención, pueden utilizarse polipéptido SIVA marcado y/o ubiquitina y detectarse o inmunoprecipitarse con anticuerpos específicos para el marcador. Por ejemplo, GST-SIVA2 se incuba con E1 (v.g. 200 ng/50 µl) y E2, Ubc13/Uev1 (v.g. 500 ng/50 µl), y las enzimas HIS-Ubiquitina en el ensayo de ubiquitinación *in vitro*. Después de 1 hora a 37°C, las muestras se inmunoprecipitan con anticuerpo anti-GST. Tanto IP como los lisados totales se analizan por transferencia Western utilizando anti-SIVA, anti-ubiquitina o anti-HIS.

En un aspecto adicional, la invención proporciona, como se define en las reivindicaciones, métodos para identificar agentes candidato capaces de modular la actividad relacionada con ubiquitina de SIVA o un polipéptido SIVA, por realización del método anterior en presencia o ausencia de un agente candidato, en donde un cambio en el nivel de auto-ubiquitinación de dicho polipéptido SIVA en presencia del agente es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad de SIVA relacionada con ubiquitinación.

Se encontró que NIK sufre monoubiquitinación así como poliubiquitinaciones K48 inductoras de degradación, y K63 estabilizadoras por coexpresión transitoria con los mutantes de ubiquitina respectivos. Resulta muy interesante que una sola molécula exhibe todos los tipos conocidos de conjugación con ubiquitina. Esta diversidad de ubiquitinaciones podría ser perfectamente el determinante de la versatilidad funcional de NIK. Por exploración del papel de SIVA en la ubiquitinación de NIK, se encontró de acuerdo con la invención que la coexpresión de SIVA intensificaba la ubiquitinación de NIK tanto en K48 como en K63. Consistentemente, en experimentos de ubiquitinación *in vitro* se encontró que SIVA2 recombinante es una ligasa E3 potente dependiente con dedos de anillo es. SIVA2 es una ligasa E3 directa y específica de TRAF2.

Un polipéptido SIVA que tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación puede identificarse de acuerdo con la invención por un método que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, un polipéptido NIK, y opcionalmente un E3 en presencia o ausencia de un polipéptido SIVA; (ii) medir el nivel de ubiquitinación del polipéptido NIK en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación de NIK en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA, en donde el aumento en el nivel de ubiquitinación de NIK en presencia del polipéptido SIVA es indicativo de que el polipéptido SIVA tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación.

Por ejemplo, en un ensayo basado en células, plásmidos que codifican NIK, un polipéptido SIVA y ubiquitina marcada con HA pueden cotransfectarse en células y el inmunoprecipitado anti-NIK de las células lisadas puede analizarse por transferencia Western utilizando anticuerpos anti-HA. En una realización, las células pueden ser células

Ramos que expresan NIK transducido retroviralmente y se tratan con CD70. En otra realización, las células pueden ser células no linfoides tales como HEK 293T que expresan de manera estable el receptor CD27 y NIK que se tratan con CD70. El NIK inmunoprecipitado de los lisados de células puede analizarse por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-ubiquitina para monitorizar la ubiquitinación de NIK.

5 Asimismo, un plásmido que codifica un polipéptido SIVA puede co-transfectarse con un plásmido NIK y un plásmido codificante de ubiquitina. El polipéptido SIVA puede ser, por ejemplo, SIVA 1-58 o plásmido SIVA-C y la ubiquitina puede ser una ubiquitina marcada tal como HA-ubiquitina. La ubiquitina puede ser una ubiquitina mutante mutada en una lisina tal como el mutante K48R o K63R. La cantidad de plásmido que puede utilizarse es aproximadamente 4 µg, 6 µg y 8 µg para NIK, SIVA y el plásmido de ubiquitina, respectivamente. Las células pueden ser células HeLa.
10 Veinticuatro horas después de la transfección, las células se cosechan, se lisan y se inmunoprecipitan con anticuerpo anti-NIK. La transferencia Western puede realizarse con anti-HA para detección de conjugados de ubiquitina en NIK.

15 En uno de los métodos basados en células para identificación de un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación y/o actividad de degradación de proteínas, NIK puede co-expresarse con un polipéptido SIVA y un polipéptido TRAF2 en células. La cantidad de plásmido que puede utilizarse es aproximadamente 0,5 µg, 1,5 µg y 3,0 µg para SIVA y 0,5 µg para NIK y TRAF2. Los lisados de células totales se preparan 30 horas después de la transfección y se sondan con anti-NIK para detección de conjugados de ubiquitina en NIK o degradación de NIK.

20 En uno de los métodos basados en células para identificación de un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación, células tales como células HEK 293 se transfectan con plásmido codificante de FLAG-TRAF2, HIS-SIVA2 y ubiquitina. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisan, se inmunoprecipitan y se analizan por transferencia Western utilizando anticuerpos específicos para FLAG2 que se utilizan para detectar TRAF2 ubiquitinado. El mutante TRAF2 con dedo de anillo (C34A) puede utilizarse en lugar de TRAF2 de tipo salvaje para impedir su auto-ubiquitinación. El mutante con dedo de anillo TRAF2 retenía su capacidad para fijar SIVA2.

25 En otro ensayo basado en células, puede utilizarse TRAF2 ubiquitinado reclutado en el receptor CD27 por estimulación con FLAG-CD70 y sobreexpresión de SIVA y co-inmunoprecipitación por anti-FLAG. SIVA2 puede sobreexpresarse utilizando el sistema TREX e inducción con 1 µM doxiciclina antes de estimulación con CD70.

Pueden realizarse ensayos basados en células de ubiquitinación inducida por polipéptidos SIVA sin ubiquitina exógena y con cualquier clase de células que incluyen, pero sin carácter limitante, células HeLa, células HEK 293T, y células Ramos.

30 Pueden realizarse ensayos de ubiquitinación in vitro, empleando por ejemplo una reacción que contiene HIS-Ubiquitina recombinante, E1, E2 (heterodímero v.g. Ubc13/Uev1), un polipéptido SIVA recombinante que puede ser una proteína de fusión con GST, como por ejemplo GST-SIVA2 o GST-SIVA C73A, y un TRAF2 recombinante que puede ser un TRAF2 marcado con FLAG. Las proteínas pueden hallarse en un tampón que contiene 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 µg/ml creatina-quinasa y 5 µM ubiquitina-aldehído. Puede utilizarse anti-FLAG o anti-TRAF2 para detectar TRAF2 modificado (ubiquitinado).
35

SIVA induce la muerte celular en un camino mitocondrial dependiente de caspasas (Py et al., 2003). Consistentemente con su función supuesta como inductor de apoptosis, SIVA está regulado de modo creciente en respuesta a UV y estrés oxidante en diferentes tipos de células y es una diana transcripcional directa de los supresores de tumores p53 y E2F1 (Fortin et al., 2004). En el proceso de la apoptosis, se sabe que la caspasa 8 escinde las proteínas como NIK y reprime por consiguiente NF-κB, que juega un papel central en la supervivencia y proliferación celulares (Foehr et al., 2000). Análogamente, dosis altas de SIVA2 degradaban también la NIK coexpresada y este efecto se veía comprometido por inhibición de proteasomas. Se encontró, de acuerdo con la presente invención, que SIVA2 induce también la ubiquitinación K48 de NIK, que se reducía notablemente por mutación del residuo K670 de NIK.
40 En conjunto, estas observaciones apuntan a la regulación de NIK por SIVA2 por el camino clásico ubiquitina-proteasoma (Glickman y Ciechanover, 2002). Es interesante que tanto la ubiquitinación K48 como la degradación de NIK en respuesta a la sobreexpresión de SIVA ocurrían incluso en ausencia total de la región con dedo de anillo de SIVA2, así como con el mutante SIVA con dedo de anillo catalíticamente inactivo, lo que sugiere que SIVA puede no ser un E3 directo de NIK para inducir la ubiquitinación K48. SIVA puede requerir una proteína E3 accesoria que trabaje en tándem para mediar la ubiquitinación. Se ha demostrado que SIVA se fija a otra proteína con dedo de anillo denominada OSTL. OSTL puede ser la proteína E3 accesoria, dado que la misma contiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B y se supone que tiene un papel en la señalización de las células B y la supervivencia (Fontanari Krause et al., 2003). Análogamente, se ha informado también que TRAF3 es una enzima de ubiquitinación indirecta de NIK, causando su degradación (Liao et al., 2004). Sin embargo, se demostró de acuerdo con la invención que TRAF3 degradaba tanto NIK de tipo salvaje como el mutante de NIK K670A, con eficacia similar, lo que indicaba que los mecanismos moleculares implicados en la degradación de NIK mediada por SIVA2 y TRAF3 difieren. SIVA3 y TRAF3 puede funcionar cooperativamente para ubiquitinar NIK.
45
50
55

Sorprendentemente, se encontró de acuerdo con la invención, mientras se evaluaba la capacidad de TRAF3 para imponer la degradación de NIK, que NIK modula TRAF3 afectando a sus niveles celulares, su ubiquitinación y su

tasa de degradación. Esta modulación de TRAF3 era peculiar en el sentido de que no daba como resultado la degradación completa de TRAF3, sino más bien la acumulación de una forma distinta de peso molecular bajo de TRAF3 (dTRAF3). Es interesante que SIVA2, pero no SIVA1, aumentaba notablemente esta escisión de TRAF3 inducida por NIK. Esta es la primera observación que demuestra una diferencia funcional entre las dos variantes de corte y empalme de SIVA. Aunque la fijación directa de SIVA2 y TRAF3 ocurría sólo débilmente, la presencia de NIK de tipo salvaje o NIK desactivado por quinasas estabilizaba notablemente su interacción. Como en el caso del complejo p100-NIK-IKK1 donde la fijación no se ve influenciada por la función de quinasa de NIK (Xiao et al., 2004), también aquí parece que NIK juega el papel de una proteína adaptadora que enlaza TRAF3 y SIVA2. Esta es la primera vez que se ha observado la formación de un complejo NIK-SIVA2-TRAF3, la escisión de TRAF3 y la ubiquitinación operativa por NIK y SIVA2.

Explorando ulteriormente el tipo de ubiquitinación de TRAF3 por co-expresión de mutantes de ubiquitina, se encontró de acuerdo con la invención que TRAF3 sufre predominantemente ubiquitinación K63 y que SIVA2 genera dTRAF3 de una manera dependiente de la ubiquitinación K63. Adicionalmente, la mutación con dedo de anillo de SIVA2 bloqueaba también la generación de dTRAF3. LA formación de dTRAF3 tanto inducida por NIK como inducida por SIVA2 era bloqueada por inhibición de proteasomas y no por inhibición de lisosomas o caspasas. El procesamiento del mutante D347A de TRAF3 (Lee et al., 2001), por SIVA2 y NIK sugería también que este proceso es independiente de caspasas. Éste es un descubrimiento importante, que sugiere la implicación de la ubiquitinación K63 en el procesamiento de TRAF3 dependiente de proteasomas. SIVA2 puede ser un E3 para ubiquitinación K63 de TRAF3 y NIK puede funcionar, como adaptador o como quinasa, en el procesamiento de TRAF3. Estos descubrimientos muestran una regulación mutua de NIK y TRAF3 cooperativamente con SIVA2.

El dedo de anillo de TRAF3, aunque no contribuye a la ubiquitinación de TRAF3 por SIVA2 o la generación subsiguiente de dTRAF3, resultaba tener un impacto importante sobre la alteración inducida de la solubilidad de la proteína. Notablemente, el mutante con dedo de anillo TRAF3 sufría ubiquitinación masiva y se mantenía en el compartimiento insoluble en Triton, indicando un papel para el dedo de anillo en el tráfico de TRAF3.

Dado que se encontró de acuerdo con la invención que SIVA puede inducir la ubiquitinación de TRAF3, se describe un método para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, un polipéptido TRAF3, y opcionalmente un E3 en presencia o ausencia de un polipéptido SIVA; (ii) medir el nivel de ubiquitinación del polipéptido TRAF3 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación de TRAF3 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA, en donde el aumento en el nivel de ubiquitinación de TRAF3 en presencia del polipéptido SIVA es indicativo de que el polipéptido SIVA tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación. En el paso (i) puede añadirse un polipéptido NIK.

En un aspecto ilustrativo, se realiza un ensayo basado en células que utiliza un plásmido TRAF3, un plásmido NIK y un plásmido de ubiquitina co-transfectado en células tales como células HEK 293T. La cantidad de plásmido que puede utilizarse es aproximadamente 3, 4 y 4 µg para TRAF3, NIK y ubiquitina, respectivamente, o puede utilizarse la misma cantidad de plásmido de aproximadamente 4 µg para cada proteína. Las células se cosechan 24 horas después de la transfección y los lisados totales se analizan por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-TRAF3 para ver las formas modificadas de TRAF3 que representan TRAF3 ubiquitinado.

En otro aspecto ilustrativo, las células se transfectan con HIS-TRAF3, FLAG-SIVA2 y HA-Ubiquitina K48R, se lisan y el inmunoprecipitado anti-HIS del lisado se somete a transferencia Western utilizando anticuerpo anti-HA. La cantidad de plásmido utilizada puede ser 6, 6, y 4 µg/ml de HIS-TRAF3, FLAG-SIVA2 y HA-ubiquitina, respectivamente. Como alternativa, el lisado se inmunoprecipita con anticuerpo anti-FLAG para precipitar SIVA2 y se sonda con anti-TRAF3 en transferencias Western.

Adicionalmente, se describen métodos para identificar agentes candidato capaces de modular una actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación de un polipéptido SIVA sobre un polipéptido NIK y/o TRAF3, por realización del método anterior en presencia o ausencia de un agente candidato, en donde un cambio en el nivel de ubiquitinación de dicho polipéptido NIK y/o TRAF3 en presencia del agente candidato es indicativa de que el agente candidato es capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de SIVA sobre un polipéptido NIK y/o TRAF3. La molécula candidato puede ser una molécula pequeña.

Se ha encontrado, siguiendo la degradación de NIK y NIK K670A por el mutante SIVA con dedo de anillo, que la mutación con dedo de anillo en SIVA2 anulaba la protección de NIK conferida por su mutación lisina 670, dando como resultado una degradación efectiva del NIK K670A después de su co-expresión con el mutante SIVA2 con dedo de anillo. Una posible explicación es que existen dos tipos opuestos de ubiquitinación de NIK, mediados ambos por SIVA2. En los experimentos de ubiquitinación transitoria in vivo se ha encontrado de acuerdo con la invención que SIVA2 promueve ambos tipos K48 y K63 de ubiquitinación de NIK y que el término N de SIVA2 está implicado en la ubiquitinación K48 y la degradación de NIK. Ligando estas dos observaciones, de la ubiquitinación K63 de NIK por SIVA2 y no por SIVA2 1-58 y de la capacidad del mutante SIVA2 con dedo de anillo para interferir con la ubiquitinación de NIK, parece muy posible que el dedo de anillo esté implicado en la ubiquitinación K63. Por consiguiente, cuando NIK K670A y SIVA C73A se expresan juntos, NIK tendrá únicamente el tipo de ubiquitinación K48 en sitios distintos de lisina 670. En ausencia de la ubiquitinación estabilizadora K63, el impacto de la ubiquitinación residual

K48 prevalecerá, dando como resultado una degradación efectiva de NIK. Dicho de otro modo, la mutación con dedo de anillo en SIVA2 parece neutralizar el efecto protector que la mutación NIK K670A tiene contra la degradación de NIK por SIVA2. Una confirmación ulterior de la ubiquitinación K63 inducida por SIVA2 se obtuvo a partir de los efectos inhibidores del mutante Ubc13, un E2 específico de K63 (Deng et al., 2000), y CYLD, una desubiquitinasa específica K63 (Kovalenko et al., 2003) sobre la ubiquitinación de NIK-K63 después de coexpresión con SIVA2. Dado que la auto-ubiquitinación K63 in vitro de SIVA2 era bloqueada también por la mutación con dedo de anillo, tanto in vivo como in vitro, parece que la ubiquitinación K63 es la función exclusiva del dedo de anillo de SIVA2.

SIVA se expresa basalmente a un nivel extremadamente bajo y una posibilidad para los débiles efectos de la supresión de SIVA podría ser que SIVA ejerce su función únicamente después de regulación creciente de su nivel. Pertinentemente, se ha demostrado que SIVA es una proteína inducida por estrés y que los niveles elevados de SIVA causan la muerte celular (Fortin et al., 2004; Henke et al., 2000; Padanilam et al., 1998). En línea con esto, tanto en la expresión constitutiva como en la inducible, SIVA2 interfiere con la activación de NF- κ B inducida por CD27 y CD40. Esta inhibición del camino NF- κ B alternativo mediado por NIK refleja muy probablemente la capacidad de SIVA2 para causar la degradación de NIK. Basándose en esto, uno se siente tentado a especular que la regulación decreciente de la función pro-supervivencia de NIK por SIVA2 contribuye al papel apoptótico del último en condiciones de estrés.

SIVA es una proteína celular menor, que se expresa normalmente a un nivel extremadamente bajo y es capaz de ejercer un efecto biológico fuerte. NIK parece jugar un papel importante en la estabilización de SIVA por fosforilación directa de SIVA. Consistentemente, NIK desactivado como quinasa no lograba estabilizar la expresión de SIVA2. Ni IKK1 o IKK2 desactivados como quinasas fallaban en lo referente a interferir con la fosforilación de SIVA2 inducida por NIK en un ensayo de quinasas in vitro, demostrando que SIVA2 es un nuevo sustrato genuino de NIK. La fosforilación de muchas proteínas celulares precede a su ubiquitinación (Karin y Ben-Neriah, 2000). La fosforilación por NIK parece ser un requisito previo para la función de ubiquitinación de SIVA2.

Se muestra en esta memoria una regulación compleja de mecanismos de modificación y degradación de proteínas que, sin estar unidos por el mecanismo, pueden verse como un sistema programado de ajuste fino donde NIK, después de activación, fosforila SIVA conduciendo a su estabilización. Posteriormente, NIK utiliza SIVA para su ubiquitinación K63 inductora de estabilización y para la escisión de TRAF3, que es un inhibidor de la función de NIK. Una vez que la célula requiere la terminación de la señalización de NIK, SIVA se fija probablemente a una nueva proteína sintetizada como resultado de la activación de NF- κ B, y forma un complejo de ubiquitinación K48 que efectúa la degradación de NIK. Probablemente, esto actúa como un bucle auto-regulador que limita la señalización de NIK y, cuando el estrés regula ulteriormente en sentido creciente el nivel de SIVA, el mismo funciona para inhibir los caminos de supervivencia e inducir apoptosis. Estos resultados indican que SIVA tiene un efecto dual sobre la ubiquitinación de NIK con consecuencias opuestas. La intensificación del nivel de NIK y por consiguiente su función resultante de la co-expresión de dosis bajas de SIVA2 podría ser muy bien una consecuencia de la supresión de represores de NIK, v.g. TRAF3. Así, SIVA2 puede ubiquitinar y degradar TRAF3 in vivo, dando como resultado una elevación del nivel de NIK.

La identificación de la localización exacta de la acción de SIVA, a saber, en la membrana o en el citoplasma es también crucial para definir su función exacta. Además del receptor CD27 por el cual se identificó SIVA, se han sugerido también otros dos receptores de membrana que se fijan directamente a SIVA. Uno de ellos es GITR, un miembro de la familia TNFR expresado principalmente en las células T, implicado tanto en la apoptosis como en caminos de activación de NF- κ B (Spinicelli et al., 2002; Nocentini et al., 2005). CD4 es el tercer receptor de membrana que se ha dicho se fija a SIVA, y se sugiere que esta fijación modula la apoptosis de las células T CD4+ a través de un camino mitocondrial dependiente de caspasas (Petit et al., 2004).

Aunque se ha sugerido que SIVA se fija a los sitios de fijación de TRAF2 en CD27, GITR y OX40 (Spinicelli et al., 2002), no se ha presentado a este respecto prueba auténtica alguna. Este posible reclutamiento de SIVA en la membrana es particularmente importante por el hecho de que se ha encontrado en esta invención que el adaptador genuino de NIK, TRAF2, degrada NIK en expresión transitoria y SIVA2 protege NIK de la degradación inducida por TRAF2. Además, se ha sugerido recientemente que TRAF2 actúa como un regulador negativo del camino alternativo de NF- κ B (Grech et al., 2004). Dado que la función de NIK, una proteína interactiva con TRAF2, es crucial para el camino alternativo de NF- κ B, especulativamente, esta nueva función de TRAF2 para inhibir el camino alternativo podría ser resultado de la degradación de NIK inducida por TRAF2. Si SIVA2 juega cualquier papel a nivel endógeno en la estabilización de NIK, una vez que el mismo es reclutado en el receptor v.g. CD27, a través de TRAF2, es una cuestión fascinante. En línea con esto, el TRAF2 reclutado en el receptor CD27 se encontraba masivamente ubiquitinado, lo que le distingue del TRAF2 reclutado en el receptor TNF que no recluta NIK. Los resultados de esta memoria demuestran que SIVA2, pero no el mutante SIVA2C73A, induce directamente la ubiquitinación K63 en TRAF2. Se considera que TRAF5 es un homólogo próximo funcional y estructural de TRAF2, y ambos están implicados en la activación de NF- κ B (Chung et al., 2002). TRAF2 se asemeja a TRAF6, pero en menor grado, si bien difiere significativamente de TRAF1 y TRAF3.

Se demostró como se describe en esta memoria por ensayos de ubiquitinación in vitro realizados en un volumen de reacción de 50 μ l que contenía únicamente HIS-Ubiquitina-K63 recombinante (una HIS-Ubiquitina recombinante en la cual todas las lisinas en la ubiquitina excepto K63 están mutadas a arginina, Boston Biochem) (8 μ g), E1 (0,2 μ g),

E2 (0,5 µg) y 1-2 µg de GST-SIVA recombinante o GST-SIVAC73A con TRAF2 marcado con FLAG que TRAF2 marcado con FLAG se expresaba transitoriamente y se purificaba utilizando anti-FLAG M2. SIVA2, pero no el mutante SIVA2C73A, induce directamente la ubiquitinación K63 de TRAF2. El término C que expresa constitutivamente SIVA en las células Ramos, mimetiza la deficiencia de TRAF2 en las células B, por lo que puede utilizarse SIVA C en enfermedades asociadas con una actividad o expresión excesiva de TRAF2, o sensibles de la inhibición de TRAF2. La silenciamiento de SIVA en las células por siRNA puede utilizarse en enfermedades asociadas con actividad o expresión disminuida de TRAF2, o sensibles al aumento de TRAF2. TRAF2 se fija a SIVA2 y la fijación ocurre únicamente cuando el dedo de anillo está presente, tal como en SIVA2 y SIVA2 1-81. El mutante TRAF2 con dedo de anillo retenía su capacidad para fijar SIVA2. SIVA2 intensifica la ubiquitinación K48 de TRAF2 en HEK 293T como función de su dedo de anillo.

Se demostró que SIVA2 regula la ubiquitinación de TRAF2 reclutado en el receptor CD27 en las células Ramos. Se exploró el efecto de la silenciamiento de SIVA en la ubiquitinación de TRAF2 reclutado en el receptor CD27. Para este propósito, se transfectaron células 293-CD27 con pSUPER SIVA. Cuarenta y ocho horas más tarde, las células se trataron con FLAG-CD70 para inducir el reclutamiento de TRAF2 en el receptor CD27. Se lisaron las células y el complejo del receptor CD27 se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo anti-FLAG. El TRAF2 asociado al receptor se sondó con anticuerpo anti-TRAF2. Las células transfectadas con pSUPER SIVA se compararon con células transfectadas con pSUPER de control respecto al nivel de TRAF2 en el citoplasma después de estimulación con CD70. El disparo de CD70 daba como resultado la degradación de TRAF2 de una manera dependiente de SIVA.

Así, en otro aspecto, la descripción se refiere a un método para identificar un polipéptido SIVA capaz de inducir actividad relacionada con ubiquitinación en un polipéptido TRAF2, TRAF5 o TRAF6 que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, y un polipéptido SIVA con un polipéptido TRAF2, TRAF5 o TRAF6; (ii) y detectar si dicha ubiquitina se fija a dicho polipéptido TRAF2, TRAF5 o TRAF6 en donde la detección de ubiquitina enlazada a dicho polipéptido TRAF2, TRAF5 o TRAF6 es indicativa de que dicho polipéptido SIVA tiene actividad relacionada con ubiquitinación.

En un aspecto, se prepara la reacción siguiente. La reacción contiene HIS-Ubiquitina recombinante o HIS-Ubiquitina-K63 únicamente, E1, E2 (heterodímero Ubc13/Uev1) (tanto E1 como E2 se adquirieron de Boston Biochem) y un polipéptido GST-SIVA recombinante o GST-SIVA o mutante, con TRAF2 marcado con FLAG en un tampón que contiene 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 µg/ml creatina-quinasa y 5 µM ubiquitina-aldehído. TRAF2 marcado con FLAG puede prepararse por transfección de TRAF2 pcFLAG en células HEK 293T. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, las células se lisan en tampón de lisis que contiene 1% Triton X100 y se inmunoprecipitan utilizando cuentas anti-FLAG M2 (Sigma). El TRAF2 inmunoprecipitado se eluye con péptido FLAG y se concentra utilizando una columna Microcon (MWCO3000) y se utiliza en la reacción de ubiquitinación *in vitro*. Las reacciones se incuban a 30°C durante una hora. Se inmunoprecipita TRAF2 utilizando cuentas anti-FLAG M2 durante 4 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se someten a transferencia Western con anticuerpo anti-TRAF2 (H249, Santa Cruz).

Se describen métodos para identificación de agentes candidato capaces de modular una actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido SIVA sobre un polipéptido TRAF2, por realización del método anterior en presencia o ausencia de un agente candidato, en donde un cambio en el nivel de ubiquitinación de dicho polipéptido TRAF2 en presencia del agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de SIVA sobre el polipéptido TRAF2. La molécula candidato puede ser una molécula pequeña.

Es interesante que las proteínas SIVA poseen un dedo de anillo exclusivo semejante a caja B que carece de cualesquiera residuos His (CSSCVRAVDGKAVCGQCERALCGQCVRWCWC, SEQ ID NO: 6) y tiene un dedo de cinc en su término C (Prasad et al., 1997). El dedo de anillo amino-terminal y las estructuras de dominio carboxi-terminales del serpentín enrollado, que son características de otras proteínas que contienen caja B están ausentes en SIVA. En su lugar, el dedo de anillo semejante a caja B de SIVA tiene una región rica en Cys en el término carboxilo. El descubrimiento de los autores de la invención (conseguido por cribado de dos híbridos) fue que la región con dedo cinc/anular de SIVA se fija al término C de NIK, que ha llamado inicialmente la atención de los autores de la invención hacia la posible implicación de NIK en la señalización de CD27. Hasta ahora, no se ha adscrito función alguna al dedo de anillo semejante a caja B de SIVA, y es sumamente sorprendente que en esta década en la que la investigación de ubiquitina abre el camino del campo de señalización, se haya pasado por alto la potente actividad de 'ligasa E3' del dedo de anillo, que se encontró, de acuerdo con la presente invención, está asociada con el dedo de anillo semejante a caja B de SIVA.

Así pues, la invención se refiere a un método para testar o identificar una actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo que tiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B que carece de histidina y que tiene actividad relacionada con ubiquitinación que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, y un E2, un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo y opcionalmente TRAF2; (ii) y detectar si dicha ubiquitina se enlaza a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B o a TRAF2, en donde la detección de ubiquitina enlazada a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B o a TRAF2 es indicativa de que dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B tiene actividad relacionada con ubiquitinación. Se dice que dos o más estructuras son homólogas si las mismas son semejantes debido a una

ascendencia compartida. La homología entre proteínas y DNA se deduce a menudo sobre la base de semejanza de secuencia, especialmente en bioinformática. Por ejemplo, en general, si dos genes tienen una secuencia de DNA casi idéntica, es probable que los mismos sean homólogos. Existen muchos algoritmos para agrupar secuencias de proteínas en familias de secuencia, que son series de secuencias mutuamente homólogas. La homología de secuencias puede ser de dos tipos: ortóloga o paróloga. Dos genes similares en dos especies diferentes que se han originado a partir de un ancestro común son ortólogos. Las secuencias homólogas son ortólogas si las mismas se separaron por un suceso de especiación: si existe un gen en una especie, y dicha especie diverge en dos especies, entonces las copias divergentes de este gen en especies resultantes son ortólogos. Una segunda definición de ortólogos describe dos genes cualesquiera en dos especies diferentes con funciones muy similares. Las secuencias homólogas son parálogas si las mismas se separaron por un suceso de duplicación génica: si un gen en un organismo se duplica para ocupar dos posiciones diferentes en el mismo genoma, entonces las dos copias son parálogas. Los genes que codifican mioglobina y hemoglobina se considera que son parálogos antiguos.

Se describen métodos para identificar agentes candidato capaces de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo sobre dicho polipéptido o sobre un polipéptido TRAF2, por realización del método anterior en presencia o ausencia de un agente candidato, en donde un cambio en el nivel de ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B o de un polipéptido TRAF2 en presencia del agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo. La molécula candidato puede ser una molécula pequeña.

Ejemplos de polipéptidos que albergan un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo incluyen polipéptidos que tienen un motivo con dedo de anillo de caja B que carece de HIS.

En una realización de la invención, el polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B es un polipéptido SIVA.

Las proteínas o polipéptidos ubiquitinados pueden detectarse por transferencias Western como se ilustra en la presente invención o por cualquier otro ensayo conocido en la técnica.

Como se ha mencionado, SIVA es una proteína celular menor, que se expresa normalmente a un nivel extremadamente bajo y es capaz de ejercer un efecto biológico fuerte. NIK parece jugar un papel importante en la estabilización de SIVA. Análogamente, dosis altas de SIVA2 degradaban también el NIK coexpresado y este efecto se veía comprometido por la inhibición de proteasomas. Los autores de la invención encontraron que SIVA2 induce también ubiquitinación K48 de NIK, que se reducía notablemente por la mutación del residuo K670 en NIK. En conjunto, estas observaciones apuntan a la regulación de NIK por SIVA2 a través del camino clásico de ubiquitina-proteasoma (Glickman y Ciechanover, 2002). Es interesante que, tanto la ubiquitinación K48 como la degradación de NIK en respuesta a la sobreexpresión de SIVA, ocurrían incluso en total ausencia de la región con dedo de anillo de SIVA2 así como con el mutante SIVA con dedo de anillo catalíticamente inactivo, lo que sugiere que SIVA puede no ser un E3 directo de NIK para inducir la ubiquitinación K48. SIVA puede requerir una proteína accesoria E3 que trabaja en tándem para mediar la ubiquitinación. Se ha demostrado que SIVA se fija a otra proteína con dedo de anillo llamada OSTL. OSTL puede ser la proteína E3 accesoria, dado que contiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B y se postula que tiene un papel en la señalización y supervivencia de las células B (Fontanari Krause et al., 2003). Análogamente, se consideró también TRAF3 como una enzima ubiquitinadora indirecta de NIK, causando su degradación (Liao et al., 2004). Sin embargo, se ha demostrado en esta memoria que TRAF3 degradaba tanto NIK de tipo salvaje como el mutante NIK K670A con eficacia similar, lo que indica que los mecanismos moleculares implicados en la degradación de NIK mediada por SIVA2 y TRAF3 difieren. SIVA2 y TRAF3 pueden funcionar cooperativamente para ubiquitinar NIK.

Como se ha mencionado, se encontró como se describe en esta memoria que una concentración elevada de SIVA induce degradación de NIK, incluso en ausencia del término C de SIVA. Asimismo, se encontró de acuerdo con la invención que SIVA2, pero no SIVA1, aumentaba notablemente la escisión de TRAF3 inducida por NIK. Ésta es la primera observación que demuestra una diferencia funcional entre las dos variantes de corte y empalme de SIVA. Aunque la fijación directa de SIVA2 y TRAF3 ocurría sólo débilmente, la presencia de NIK de tipo salvaje o desactivado por quinasas estabilizaba notablemente su interacción. Como en el caso del complejo p100-NIK-IKK1 en el que la fijación no se ve influida por la función de quinasa de NIK (Xiao et al., 2004), aquí parece que NIK juega también el papel de una proteína adaptadora que enlaza TRAF3 y SIVA2. Ésta es la primera vez que se ha observado la formación del complejo NIK-SIVA2-TRAF3, la escisión de TRAF3 y la ubiquitinación cooperativa por NIK y SIVA2.

Así, se describe un método para identificar un polipéptido SIVA capaz de inducir la degradación de las proteínas que comprende poner en contacto un polipéptido SIVA con un polipéptido NIK y/o TRAF3 y detectar la degradación del polipéptido NIK y/o TRAF3, en donde la detección de la degradación total o parcial de NIK y/o TRAF3 es indicativa de la capacidad de dicho polipéptido SIVA para inducir la degradación de las proteínas.

El método puede llevarse a cabo in vitro o puede ser un método basado en células. En un aspecto ilustrativo, se aborda el método siguiente, basado en células. Se co-transfectan células con un plásmido que codifica NIK de tipo salvaje (0,5 µg de plásmido) o NIK K670A mutante y con concentración creciente de plásmido codificante de SIVA2 (v.g. 1,0, 2,0 y 3,0 µg de plásmido) y/o con plásmido codificante de TRAF3. Después de la transfección, las células

se lisan y se detecta la degradación de NIK, y/o TRAF3 por análisis mediante transferencia Western utilizando anticuerpo específico. Puede utilizarse actina como control de carga.

Adicionalmente, se describen métodos para identificar agentes candidato capaces de modular la capacidad de dicho polipéptido SIVA para inducir la degradación de proteínas, por realización del método anterior en presencia o ausencia de un agente candidato, en donde un cambio en el nivel de degradación total o parcial de NIK y/o TRAF3 en presencia del agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la degradación total o parcial de NIK y/o TRAF3 por SIVA. La molécula candidato puede ser una molécula pequeña.

Otro aspecto se refiere a la identificación de un agente capaz de modular la asociación del complejo entre NIK, TRAF3 y un polipéptido SIVA que comprende formar un complejo de NIK, TRAF3 y un SIVA en presencia o en ausencia de un agente candidato y detectar la capacidad de la molécula candidato para modular la asociación de NIK, TRAF2 y un polipéptido SIVA, en donde una molécula candidato capaz de alterar la fracción del complejo es un agente capaz de modular la asociación de NIK, TRAF3 y SIVA. Por ejemplo, pueden transfectarse células con cada uno del plásmido que codifica un polipéptido SIVA y un polipéptido TRAF con y sin un polipéptido NIK e incubarse en presencia o ausencia de un agente de test. Veinticuatro horas después de la transfección, los lisados totales pueden inmunoprecipitarse por un anticuerpo que precipita SIVA, y los inmunoprecipitados pueden sondarse en transferencia Western con anti-TRAF3. Un agente capaz de inhibir o inducir la coprecipitación de TRAF-2 mediada por SIVA y NIK es un agente que modula la formación de dicho complejo NIK-SIVA2-TRAF3. El agente puede aumentar o reducir el nivel del complejo NIK-TRAF3- SIVA.

En un aspecto adicional, se describe un complejo tripartito que comprende NIK, TRAF3 y un SIVA.

Se ha demostrado en esta memoria que una regulación compleja de los mecanismos de modificación y degradación de proteínas puede verse como un sistema programado de ajuste fino en el que NIK, después de activación, conduce a la estabilización de SIVA. Posteriormente, NIK utiliza SIVA para su ubiquitinación K63 inductora de estabilización y para la escisión de TRAF3, que es un inhibidor de la función de NIK. Una vez que la célula requiere la terminación de la señalización de NIK, SIVA se fija probablemente con una nueva proteína sintetizada como resultado de la activación de NF- κ B, y forma un complejo de ubiquitinación K48 que efectúa la degradación de NIK. Probablemente, esto actúa como un bucle autorregulador limitante de la señalización de NIK y, cuando el estrés regula ulteriormente en sentido creciente el nivel de SIVA, aquél funciona para inhibir los caminos de supervivencia e inducir apoptosis. Estos resultados indican que SIVA tiene un efecto dual sobre la ubiquitinación de NIK con consecuencias opuestas. El aumento del nivel de NIK y por consiguiente su función resultante de la co-expresión de dosis bajas de SIVA2 podría ser muy bien una consecuencia de la supresión de represores de NIK, v.g. TRAF3. Así pues, SIVA2 puede ubiquitinar y degradar TRAF3 in vivo, dando como resultado una elevación del nivel de NIK.

La identificación de la localización exacta de la acción de SIVA, es decir en la membrana o en el citoplasma, es también crucial para definir su función exacta. Además del receptor CD27 por el cual fue identificado SIVA, se ha sugerido también que otros dos receptores de membrana se fijan directamente a SIVA. Uno de ellos es GITR, un miembro de la familia TNFR expresado principalmente en las células T, implicado tanto en caminos de apoptosis como en caminos de activación de NF- κ B (Spinicelli et al., 2002, Nocentini et al., 2005). CD4 es el tercer receptor de membrana que se dice está fijado a SIVA, y se ha sugerido que esta fijación modula la apoptosis de las células T CD4+ a través de un camino mitocondrial dependiente de caspasas (Petit et al., 2004).

Basándose en los descubrimientos que se describen en esta memoria, los candidatos favoritos para ser sustratos de SIVA son NIK, TRAF2, TRAF3 y posiblemente TRAF5 y TRAF6. La actividad no regulada de SIVA, NIK, TRAF2, y TRAF3 están asociadas con ciertas enfermedades, trastornos o afecciones por ejemplo en la patología de la infección viral (TRAF2&3, NIK, SIVA), efectos secundarios de la quimioterapia (SIVA), efectos secundarios de la reperfusión de isquemia (SIVA), situaciones asociadas con la regulación creciente de SIVA, enfermedades autoinmunes asociadas con la activación del camino alternativo NF- κ B de una manera que depende de NIK (TRAF2&3, SIVA), y enfermedades asociadas con actividad no regulada de los linfocitos (NIK, SIVA, TRAF2&3). Por ejemplo, la regulación creciente/activación de TRAF2 está asociada con activación inmunitaria excesiva e inflamación. La regulación creciente/activación de NIK está asociada con condiciones autoinmunes y cáncer. La regulación creciente/activación de TRAF3 está asociada quizás con deficiencia inmunitaria. La regulación creciente/activación de SIVA está asociada con los efectos secundarios de quimio- y radioterapia y con isquemia y reperfusión isquémica. Así pues, la modulación, es decir la activación o inhibición de la actividad relacionada con ubiquitinación o relacionada con la degradación de un polipéptido SIVA o un de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo puede ser beneficiosa para tratar o prevenir dicha enfermedad, afección o trastorno.

Así pues, la memoria descriptiva se refiere al uso de un agente capaz de modular la actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia en SEQ ID NO: 6 o una secuencia homóloga de la misma, tal como SIVA, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección cuya patología o cuyo curso está asociada con la actividad y/o niveles de TRAF2, NIK, TRAF3 y/o SIVA.

La invención proporciona métodos específicos para identificar agentes candidato capaces de modular la actividad relacionada con ubiquitina de SIVA, un polipéptido SIVA o un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo.

Ejemplos de agentes de test o agentes candidato que pueden escrutarse en los métodos de la invención incluyen, pero sin carácter limitante, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos (v.g., anticuerpos), ácidos nucleídos, y moléculas de extractos naturales, carbohidratos o cualquier otra sustancia. Los agentes de test incluyen compuestos orgánicos sintéticos creados v.g. por química combinatoria. Los compuestos testados pueden obtenerse no sólo por química combinatoria, sino también por otros métodos de síntesis de alta potencia. Las técnicas automáticas permiten la síntesis rápida de bibliotecas de moléculas, grandes colecciones de compuestos discretos, que pueden cribarse. La producción de bibliotecas de compuestos mayores y más diversas aumenta la probabilidad de descubrir un fármaco útil dentro de la biblioteca. Para el cribado de alta capacidad pueden utilizarse robots a fin de testar la inhibición o la activación de una ubiquitinación mediada por SIVA y/o degradación de proteínas por miles de compuestos.

Se ha demostrado en esta memoria que las células Ramos que expresan constitutivamente el término SIVA-C mimetiza la deficiencia de TRAF2 en las células B. las células B deficientes en TRAF2 exhiben alto nivel de p52 (NF-κB alternativa constitutiva) y TRAF3 (Grech et al., 2004). Análogamente, se encontró que las células Ramos que se habían modificado por ingeniería genética para expresar de manera estable el término C de SIVA exhiben un nivel alto de p52 así como TRAF3 y una expresión reducida de TRAF2. La hiper-activación de NF-κB resultante de la expresión de SIVAc puede dar como resultado una expresión intensificada de inmunomediadores dependientes de NF-κB en las células.

Así pues, se describe el uso de un polipéptido SIVA tal como SIVAc, SIVA1-58, SIVA1-81 y SIVA 2C73A o un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitina o relacionada con degradación de proteínas de SIVA en la fabricación de un medicamento para tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección por o a través de modulación del sistema inmunitario.

Se ha encontrado que SIVA2 induce también la ubiquitinación K48 de NIK, que se reducía notablemente por mutación del residuo K670 de NIK. Así pues, dicho mutante de NIK puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección sensible a la modulación del sistema inmunitario.

Se describe el uso de un agente capaz de modular la formación del complejo NIK-SIVA-TRAF3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección inmunitaria y/o una enfermedad, trastorno o afección cuya patología o cuyo curso está asociada(o) con una expresión o actividad excesiva de NF-κB y/o una enfermedad, trastorno o afección cuya patología o cuyo curso está asociada(o) con actividad excesiva de NIK, tal como inflamación o cáncer.

La invención proporciona polipéptidos aislados tales como un polipéptido aislado que comprende un fragmento C-terminal de un polipéptido SIVA que incluye el dedo de anillo semejante a caja B y/o los motivos con dedo de cinc excepto SIVA1 y SIVA2. La invención proporciona polipéptidos aislados tales como los residuos de aminoácido 58 a 110 de SIVA2 indicados en SEQ ID NO: 3; un fragmento N-terminal de un polipéptido SIVA que carece del motivo con dedo de cinc 1-81 (SEQ ID NO: 5); un polipéptido que comprende un fragmento N-terminal de un SIVA; un polipéptido que carece del motivo con dedo de cinc y el motivo con dedo de anillo semejante a caja B de SIVA2 1-58 (SEQ ID NO: 4); un polipéptido constituido por SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; un polipéptido que comprende un polipéptido SIVA mutado en un residuo cisteína localizado en el motivo con dedo de anillo. Se describe un mutante NIK en el residuo de lisina 670, o un fragmento del mismo.

Como se utiliza en esta memoria, el término "muteínas" se refiere a análogos de una proteína, en los cuales uno o más de los residuos de aminoácido de los componentes existentes naturalmente de la proteína están reemplazados por residuos de aminoácido diferentes, o están deletados, o se añaden uno o más residuos de aminoácido a la secuencia original de la proteína, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la proteína original. Estas muteínas se preparan por técnicas conocidas de síntesis y/o de mutagénesis orientada, o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como DNA o RNA, que se hibrida al DNA o RNA, que codifica la proteína, de acuerdo con la presente invención, en condiciones severas. El término "condiciones severas" hace referencia a condiciones de hibridación y lavado subsiguientes, a las cuales se refieren convencionalmente quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica como "severas". Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook et al. (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin carácter limitante, ejemplos de condiciones severas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo del valor T_m calculado del híbrido en estudio en, v.g., 2 x SSC y 0,5% SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 37°C durante 30-60 minutos y luego, un 0,1 x SSC y 0,5% SDS a 68°C durante 30-60 minutos. Quienes poseen una experiencia ordinaria en esta técnica entienden que las condiciones de severi-

dad dependen también de la longitud de las secuencias de DNA, sondas oligonucleotídicas (tales como 10-40 bases) o sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se utilizan sondas mixtas, es preferible utilizar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

5 Cualquiera de tales muteínas tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de SIVA, de tal modo que tenga una actividad sustancialmente similar, o aún mejor, que SIVA. Por ejemplo, una actividad de SIVA es la capacidad de inducir auto-ubiquitinación o ubiquitinación de TRAF2. Ensayos para medir la ubiquitinación de SIVA y TRAF2, se describen en los ejemplos que siguen. Otra actividad de SIVA es la inducción de la ubiquitinación directa o indirecta de NIK o TRAF3 descrita en los ejemplos siguientes. Una actividad adicional de SIVA es la inducción de la degradación de proteínas, tal como degradación de NIK y/o TRAF3 (total o parcial) como se describe en los ejemplos que siguen. Con tal que la muteína sea capaz de exhibir una actividad sustancial, tal como una de las actividades de SIVA mencionadas, puede considerarse que tiene actividad sustancialmente similar a SIVA. Así pues, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene al menos sustancialmente la misma actividad que la SIVA de la presente invención por medio de experimentación de rutina como se muestra para SIVA en los ejemplos que siguen.

15 Dicha muteína puede tener al menos 40% de identidad u homología con la secuencia de aminoácidos de SIVA. Más preferiblemente, la misma tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, muy preferiblemente, al menos 90% de identidad u homología con ella.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada por comparación de las secuencias. En general, la identidad hace referencia a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o las dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Para secuencias en las cuales no existe una correspondencia exacta, puede determinarse un "porcentaje de identidad". En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir la inserción de "lagunas" en una o ambas secuencias, a fin de mejorar el grado de alineación. Puede determinarse un porcentaje de identidad a lo largo de toda la longitud de cada una de las secuencias que se comparan (denominada alineación global), que es particularmente adecuada para secuencias de la misma longitud o de longitud muy similar, o longitudes definidas más cortas (la denominada alineación local), que es más adecuada para secuencias de longitud desigual.

Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, pueden utilizarse los programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 9.1 (Devereux J et al., 1984, Nucleic Acids Res. 1984, enero de 2011; 12(1 Pt 1); 387-95.); por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos y el porcentaje de identidad y el porcentaje de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT utiliza el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (J Theor Biol. 1981, julio 21; 91(2): 379-80 y J Mol Biol. 1981 marzo 25; 147 (1): 195-7, 1981) y encuentra la región individual óptima de semejanza entre dos secuencias. Otros programas para determinación de identidad y/o semejanza entre secuencias se conocen también en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F et al., 1990 J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3): 403-10, Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jul; 87(14): 5509-13, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25(17): 3389-402, accesibles en la página digital del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, Methods Enzymol. 1990; 183: 63-98. Pearson J Mol Biol. 1998 Feb 13; 276(1): 71-84).

Las muteínas de SIVA, que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse rutinariamente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, sin experimentación excesiva, basándose en la doctrina y orientaciones presentadas en esta memoria.

45 Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de SIVA pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo preserve la función biológica de la molécula (Grantham Science, 1974, septiembre 6; 185(4154); 862-4). Está claro que pueden hacerse también inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias arriba definidas sin alteración de su función, particularmente si las inserciones o deleciones implican únicamente un pequeño número de aminoácidos, v.g., menos de 30, y preferiblemente menos de 10, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, v.g. residuos cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones están dentro del alcance de la presente invención.

55 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que pueden utilizarse para la obtención de muteínas de SIVA, para uso en la presente invención incluyen cualesquiera pasos de métodos conocidos, tales como los presentados en las Patentes US 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462. otorgadas a Mark et al; 5.116.943 a Koths et al., 4.965.195 a Namen et al; 4.879.111 a Chong et al; y 5.017.691 a Lee et al; y las proteínas sustituidas con lisina expuestas en la Patente US 4.904.584 (Shaw et al.).

En una realización de la invención, la muteína SIVA es una mutada en un residuo cisteína localizado en el dedo de anillo semejante a caja B de SIVA, preferiblemente en el residuo cisteína 73 de SIVA2.

El término "derivados funcionales" como se utiliza en esta memoria, abarca derivados de SIVA, y sus muteínas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que existen como cadenas laterales en los residuos o son adiciones a los grupos terminales N o C, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con tal que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de SIVA.

La expresión "derivados funcionales" comprende también multímeros constituidos por SIVA en los cuales se han introducido cambios en la secuencia de los aminoácidos que constituyen el SIVA por cualquier método convencional. Estos cambios pueden comprender elongación o truncación de la molécula SIVA o delección o reemplazamiento de uno o más aminoácidos del SIVA. Debe entenderse que ninguna de las técnicas anteriores puede afectar a las propiedades de ubiquitinación y/o degradación de SIVA.

Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la residencia de SIVA en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminos primarias o secundarias, derivados acilados en N de grupos amino libres de los residuos de aminoácido formados con restos acilo (v.g. grupos alcanóilo o aroílo carboxílico) o derivados acilados en O de grupos hidroxilo libres (por ejemplo el de residuos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Una "fracción activa" de acuerdo con la presente invención puede ser v.g. un fragmento de SIVA. El término fragmento hace referencia a cualquier subconjunto de la molécula, es decir, un péptido más corto que retiene la actividad biológica deseada de SIVA8. Los fragmentos pueden prepararse fácilmente por eliminación de aminoácidos de cualquier extremo de SIVA y testado del fragmento resultante respecto a su actividad en macrófagos y/o en el modelo de inflamación local. Se conocen proteasas para eliminación de un aminoácido de una vez del terminal N o el terminal C de un polipéptido, y por tanto la determinación de fragmentos que retienen la actividad biológica deseada, implica solamente experimentación de rutina.

En una realización de la invención, la fracción activa de SIVA es una correspondiente a un fragmento C-terminal de un polipéptido SIVA que incluye el dedo de anillo semejante a caja B y/o el motivo con dedo de cinc, tales como fragmentos de SIVA2 constituidos por los residuos 58 a 110 (SEQ ID NO: 3). En otra realización, la fracción activa de SIVA es una correspondiente a un fragmento N-terminal de SIVA que carece del motivo con dedo de cinc, el dedo de anillo semejante a caja B o ambos, tal como fragmentos de SIVA de los residuos 1-58 (SEQ ID NO: 4) o de los residuos 1-81 (SEQ ID NO: 5).

Como fracciones activas de SIVA, muteínas y proteínas fusionadas del mismo, la presente invención abarca adicionalmente cualesquiera fragmentos o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula proteínica sola o junto con moléculas asociadas o residuos enlazados a ellas, v.g. residuos azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos azúcar por sí mismos, con tal que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a SIVA.

La expresión "proteína fusionada" hace referencia a un polipéptido que comprende un SIVA, o una muteína o fragmento de la misma, fusionada con otra proteína, que, v.g., tiene un tiempo de residencia prolongado en fluidos corporales. Un SIVA puede estar fusionado así a v.g., una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

Las "isoformas" de SIVA son proteínas capaces de tener actividad de SIVA o fragmentos de las mismas, que pueden producirse por corte y empalme alternativos.

La expresión "derivados permutados circularmente" como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una molécula lineal en la cual los términos se han unido unos a otros, sea directamente o a través de un enlazador, para producir una molécula circular, después de lo cual la molécula circular se abre en otro punto para producir una nueva molécula lineal con términos diferentes de los términos existentes en la molécula original. Las permutaciones circulares incluyen aquellas moléculas cuya estructura es equivalente a una molécula que se ha circularizado y se ha abierto después. Así, una molécula permutada circularmente puede sintetizarse de novo como una molécula lineal sin llegar nunca a un paso de circularización y apertura. La preparación de derivados permutados circularmente se describe en WO 95/27732.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos aislados, tales como los expuestos en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, que codifican polipéptidos de acuerdo con la invención.

La expresión de un polipéptido de la invención en una célula de mamífero puede abordarse por inserción del DNA codificante del péptido en un vector que comprende un promotor, opcionalmente una secuencia intrónica y señales de corte y empalme donante/aceptor, y que comprende opcionalmente además una secuencia de terminación. Estas técnicas se describen en general en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Capítulo 16), Greene Publications and Wiley Interscience, Nueva York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Las secuencias anteriores de promotor, intrón, y de terminación son operativas en células de mamífero. El promotor es preferiblemente un promotor fuerte tal como el promotor RSV, CMV o MPSV arriba indicados. El promotor puede ser también el promotor temprano SV40 (Everett, et al. 1983), o un promotor celular, tal como el promotor beta-actina o el promotor ELF-1 (Tokushige, et al., 1997). Puede utilizarse también un promotor híbrido, tal como el híbrido entre el operador lac y el promotor ELF-1 alfa humano, como ha sido descrito por Edamatsu et al. 1997, el promotor híbrido CMV-beta actina descrito por Akagi et al (1997), o el híbrido entre las secuencias operadoras y el promotor CMV (Furth et al., 1994).

Secuencias de intrón, que pueden insertarse como secuencias completas, es decir, que incluyen los sitios de corte y empalme donantes y aceptores, pueden insertarse en la secuencia codificante del polipéptido que se desea expresar. La inserción de tales secuencias de intrón puede aumentar la estabilidad del RNA y aumentar así la producción del polipéptido deseado. Si bien en principio pueden seleccionarse secuencias de intrón adecuadas a partir de cualquier gen que contenga intrones, secuencias intrónicas ilustrativas son el intrón de beta-actina, el intrón de SV40, y el intrón receptor p55 de TNF.

La secuencia intrónica puede contener elementos intensificadores, que pueden mejorar la transcripción de los promotores arriba indicados.

A menudo, las secuencias intrónicas contienen también consecuencias de control de la transcripción o la traducción que confieren expresión específica de tejido. Por tanto, cuando se desea expresar un polipéptido de la invención de una manera específica de tejido, pueden emplearse ventajosamente tales secuencias intrónicas. Un ejemplo de un intrón que contiene elementos intensificadores específicos de tejido es el intensificador específico de los eritroides localizado en el intrón 8 del gen 2 de 5-aminolevulinato-sintasa humano (Surinya et al. 1998), y una discusión del principio de aumento de la producción de proteínas utilizando secuencias intrónicas, junto con secuencias intrónicas ilustrativas, se proporciona en Huang et al. 1990.

Pueden añadirse secuencias de terminación de la transcripción y señales de poliadenilación en el extremo 3' del DNA codificante del polipéptido que se desea expresar. Tales secuencias pueden encontrarse en muchos o incluso la mayoría de los genes. Ventajosamente, puede utilizarse la señal de poliadenilación de SV40 (Schek et al., 1992).

Podrían utilizarse vectores para la expresión de los polipéptidos de la invención en una célula de mamífero, por ejemplo el vector pcDNA 3.1 (Invitrogen), que contiene el promotor CMV para dirigir la expresión del gen que codifica el polipéptido deseado y vectores pMPSVEH con los promotores MPSV.

Pueden producirse polipéptidos recombinantes en células hospedadoras cultivadas bacterianas o eucariotas (v.g. CHO) transfectadas con vectores que codifican tales polipéptidos o en animales transgénicos. Cuando se utilizan animales transgénicos, es particularmente ventajoso producir polipéptidos heterólogos en su leche. Animales productores de leche tales como ganado vacuno, ovejas y cabras son por tanto hospedadores ilustrativos. Véanse, por ejemplo, las memorias descriptivas de patente WO 88/00239, WO 90/05188, WO 91/02318, y WO 92/11757; y U.S. Pat. Nos. 4.873.191; 4.873.316; y 5.304.489.

Los polipéptidos pueden comprender restos prolongadores de la semi-vida tales como polímeros de peso molecular alto que dan como resultado "polipéptidos o proteínas de fusión" con semi-vida prolongada en los fluidos corporales. Por ejemplo, polipéptidos de acuerdo con la invención pueden fusionarse a una proteína tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina o a un polímero de peso molecular alto, tal como polietilenglicol (PEG) o análogos.

La invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención como se define arriba, o a una sal del mismo y/o un derivado del mismo.

El término "sales" se refiere en esta memoria tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de los péptidos de la invención. Sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y análogas, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y análogas. Sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales puede tener una actividad sustancialmente similar al péptido de la invención.

La presente invención proporciona también vectores de expresión que comprenden la secuencia de DNA que codifica un polipéptido de la invención y métodos para su producción por introducción de dicho vector en células hospedadoras procariontas o eucariotas, tales como células de insecto, células de levadura, o células de mamífero tales como células HeLa, HEK 293T y CHO, cultivo de las células y aislamiento de la proteína producida.

Además, la invención proporciona un vector viral que codifica un polipéptido.

Se describe una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitina de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia de SEQ ID NO: 6 o una secuencia homóloga de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe una composición farmacéutica que comprende un agente capaz de modular la degradación de la proteína mediada por la actividad de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de la secuencia de SEQ ID NO: 6 o de una secuencia homóloga de la misma, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 De acuerdo con la invención, se ha demostrado que el fragmento C-terminal de SIVA, tal como el fragmento de SIVA que abarca los residuos 58 a 110 (SEQ ID NO: 3), tiene un efecto dominante negativo sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK y CD27 a concentraciones altas. A bajas concentraciones, y en una línea de células estable, el mismo exhibe efectos intensificadores sobre la activación de NF- κ B. Así, en otro aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido que corresponde al fragmento C-terminal de SIVA que incluye el dedo de anillo semejante a caja B y/o los motivos con dedo de cinc y un polinucleótido (o DNA) que codifica dicho polipéptido.

10 Asimismo, se ha encontrado de acuerdo con la invención, que el fragmento N-terminal de SIVA, tal como el fragmento de SIVA que abarca los residuos 1 a 58 (SEQ ID NO: 4) o 1 a 81 (SEQ ID NO: 5), al igual que SIVA intacto, puede inducir la degradación de NIK. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un polipéptido correspondiente al fragmento N-terminal de un polipéptido SIVA que carece del motivo con dedo de cinc, el motivo con dedo de anillo semejante a caja B o ambos, y a un polinucleótido (o DNA) que codifica dicho polipéptido.

15 La invención se refiere también a polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención tales como los indicados en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

20 Los polipéptidos de la invención pueden producirse, en eucariotas o sistemas de expresión eucariotas, intracelularmente, periplásmicamente, o pueden secretarse al medio. Los polipéptidos producidos de la invención pueden recuperarse en forma soluble o insoluble (cuerpos de inclusión). Un vector que comprende un polinucleótido que codifica los polipéptidos de la invención podría utilizarse para expresión de dichos polipéptidos en sistemas procariontes o eucariotas. Un vector de expresión que codifica un péptido de señalización efectivo, tal como el péptido de señal de la hormona del crecimiento humano, fusionado al polinucleótido (o DNA) que codifica los polipéptidos de la invención puede utilizarse para expresión y secreción en eucariotas.

25 La presente invención proporciona polipéptidos de la invención tales como los indicados en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 o una muteína, proteína de fusión, derivado funcional, derivado permutado circularmente o fragmento del mismo, o sal del mismo, o un polinucleótido que codifica dichos polipéptidos de la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con SIVA, NIK, TRAF2 y TRAF3 tal como la patología de infección viral, efectos secundarios de quimioterapia, efectos secundarios de reperfusión de isquemia, situaciones asociadas con regulación creciente de SIVA, enfermedades autoinmunes asociadas con activación del camino alternativo NF- κ B de una manera que depende de NIK, y enfermedades asociadas con actividad no regulada de los linfocitos.

35 Un uso terapéutico o asociado a investigación de estas herramientas necesita su introducción en células de un organismo vivo. Para este propósito, es deseable mejorar la permeabilidad de membrana de péptidos, polipéptidos y polinucleótidos.

40 La derivatización con estructuras lipófilas puede utilizarse en la creación de péptidos y proteínas con permeabilidad de membrana mejorada. Por ejemplo, puede añadirse la secuencia de un péptido membranotrópico conocido como se ha indicado arriba a la secuencia del péptido o polipéptido. Adicionalmente, el péptido o polipéptido puede ser derivatizado por estructuras parcialmente lipófilas tales como las cadenas hidrocarbonadas arriba indicadas, que están sustituidas con al menos un grupo polar o cargado. Por ejemplo, derivados lauroílo de péptidos ha sido descritos por Muranishi et al., 1991. Modificaciones adicionales de péptidos y polipéptidos comprenden la oxidación de residuos metionina para crear con ello grupos sulfóxido, como ha sido descrito por Zacharia et al., 1991. Zacharia y sus colaboradores describen también péptidos o derivados en los cuales el enlace peptídico relativamente hidrófobo está reemplazado por su isoéster cetometileno (COCH₂). Estas y otras modificaciones conocidas por las personas expertas en la técnica de la química de proteínas y péptidos aumentan la permeabilidad de membrana.

50 La orientación para utilización de vehículos de base lipídica para suministro intracelular de moléculas terapéuticas, tales como los polipéptidos de la presente invención es bien conocida en la técnica (Abra RM. et al., 2002. J Liposome Res. 12:1-3; Park JW., 2002. Breast Cancer Res.; 4(3):95-9; Bendas G., 2001. BioDrugs 15:215-24; Maruyama K., 2000. Biol Pharm Bull. 23:791-9; Hong K. et al., 1999. Ann N Y Acad Sci. 886:293-6; Margalit R., 1995. Crit Rey Ther Drug Carrier Syst. 12:233-61; Storm G. y Crommelin DJ., 1997. Hybridoma 16:119-25; Park JW. et al., 1997. Adv Pharmacol. 40:399-435).

55 Otra vía de mejora de la permeabilidad de membrana es el uso de receptores, tales como receptores virales, en superficies celulares a fin de inducir la captura celular del péptido o proteína. Este mecanismo es utilizado frecuentemente por los virus, que se fijan específicamente a ciertas moléculas de la superficie celular. Después de la fijación, la célula captura el virus en su interior. La molécula de la superficie celular se conoce como un receptor de virus. Por ejemplo, las moléculas de integrina CAR y AdV han sido descritas como receptores virales para adenovirus, véase Hemmi et al. 1998. Las moléculas CD4, GPR1, GPR15, y STRL33 han sido identificadas como receptores/correceptores para HIV, véase Edinger et al., 1998.

Así pues, la conjugación de péptidos, polipéptidos o polinucleótidos con moléculas que se sabe se fijan a receptores de la superficie celular aumentará la permeabilidad de membrana de dichos péptidos, polipéptidos o polinucleótidos. Ejemplos de grupos adecuados para formación de conjugados son azúcares, vitaminas, hormonas, citoquinas, transferrina, asialoglicoproteína, y moléculas análogas. Low et al., U.S. Pat. No. 5.108.921 describe el uso de estas moléculas para el propósito de aumentar la permeabilidad de membrana de péptidos, polipéptidos y polinucleótidos, y la preparación de dichos conjugados.

Low y sus colaboradores exponen adicionalmente que pueden utilizarse moléculas tales como folato o biotina para direccionar el conjugado a una multitud de células en un organismo, debido a la expresión abundante e inespecífica de los receptores para estas moléculas.

El uso anterior de proteínas de la superficie celular para aumentar la permeabilidad de membrana de un péptido, polipéptido o polinucleótido de la invención puede emplearse también en el direccionamiento de dicho polipéptido, o polinucleótido de la invención a ciertos tipos de células o tejidos. Por ejemplo, si se desea direccionar células de cáncer, es preferible utilizar una proteína de la superficie celular que se exprese más abundantemente en la superficie de dichas células. Ejemplos son el receptor folato, los antígenos de mucina MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, y MUC7, los antígenos de glicoproteínas KSA, el antígeno carcinoembrionario, el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), HER-2/neu, y la gonadotropina-beta coriónica humana. Wang et al., citados anteriormente, 1998, exponen el uso de folato para direccionar células de cáncer, y Zhang et al., 1998, exponen la abundancia relativa de cada uno de los otros antígenos arriba indicados en diversos tipos de cáncer y en células normales.

El polipéptido, péptido o polinucleótido de la invención puede por tanto, utilizando las técnicas de coagulación arriba descritas, direccionarse a cierto tipo de células, según sea deseado. Por ejemplo, si se desea inhibir la activación de NIK en células del linaje linfocítico, puede direccionarse un polipéptido, péptido o polinucleótido de la invención o fragmento del mismo, mutantes y derivados de la invención a dichas células, por ejemplo, utilizando las moléculas del MHC clase II que se expresan en estas células. Esto puede conseguirse por acoplamiento de un anticuerpo, o el sitio de fijación de antígeno del mismo, dirigido contra la región constante de dicha molécula del MHC clase II al polipéptido o péptido de la invención. Adicionalmente, han sido descritos numerosos receptores de la superficie celular para diversas citoquinas y otras moléculas de comunicación celular, y muchas de estas moléculas se expresan de una manera más o menos restringida respecto a un tipo de tejido o célula. Así, cuando se desea direccionar un subgrupo de células T, puede utilizarse la molécula de la superficie de las células T CD4 para producir el conjugado de la invención. Moléculas de fijación CD4 son proporcionadas por el virus HIV, cuyo antígeno de superficie gp42 es capaz de fijarse específicamente a la molécula CD4.

Las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden introducirse en las células por el uso de un vector viral. El uso del vector vaccinia para este propósito se detalla en el capítulo 16 de Current Protocols in Molecular Biology. El uso de vectores de adenovirus ha sido descrito v.g. por Teoh et al., 1998, Narumi et al., 1998, Pederson et al., 1998, Guang-Lin et al., 1998, Nishida et al., 1998, Schwarzenberger et al 1998, y Cao et al., 1998. La transferencia retroviral de secuencias antisentido ha sido descrita por Daniel et al. 1998.

Cuando se utilizan virus como vectores, se emplean generalmente proteínas de la superficie viral para direccionar el virus. Dado que muchos virus, tales como el adenovirus anterior, son más bien inespecíficos en su tropismo celular, puede ser deseable impartir especificidad adicional utilizando un promotor específico del tipo de célula o tejido. GrisCELLI et al., 1998, exponen el uso del promotor 2 de la cadena ligera de la miosina cardiaca específica del ventrículo para direccionamiento específico al corazón de un gen cuya transferencia está mediada por adenovirus.

Alternativamente, el vector viral puede modificarse por ingeniería genética para expresar una proteína adicional en su superficie, o la proteína de la superficie del vector viral puede cambiarse para incorporar una secuencia peptídica deseada. El vector viral puede modificarse así por ingeniería genética para expresar uno o más epítopes adicionales, que pueden utilizarse para direccionar dicho vector viral. Por ejemplo, epítopes de citoquinas, péptidos de fijación al MHC clase II, o epítopes derivados de moléculas Homing pueden utilizarse para direccionar el vector viral de acuerdo con la doctrina de la invención.

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una o más sustancias activas seleccionadas de uno o más polipéptidos de la invención y/o polinucleótidos o vectores que albergan sus secuencias o antisentido. La presente invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos específicos capaces de reconocer y fijarse a regiones de un polipéptido SIVA responsables de la ubiquitinación de SIVA, TRAF2, NIK y TRAF3.

Debe entenderse que la definición de "farmacéuticamente aceptable" abarca cualquier portador que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el hospedador al que se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la o las proteínas activas pueden formularse en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer.

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención pueden administrarse a un individuo de una diversidad de vías. Las rutas de administración incluyen rutas intradérmica, transdérmica, (v.g. en

5 formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, e intranasal. Puede utilizarse cualquier otra ruta de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o por terapia génica en la cual se administra al paciente una molécula de DNA que codifica el agente activo (v.g. por la vía de un vector), que hace que el agente activo se exprese y secrete in vivo. Adicionalmente, el o los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como agentes tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 Se describe el uso de anticuerpos específicos capaces de reconocer y fijarse a una región de un polipéptido SIVA responsable de la ubiquitinación de SIVA, TRAF2, TRAF3 y NIK, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad.

La memoria descriptiva se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad que implica ubiquitinación de SIVA, TRAF2, TRAF3 y/o NIK en la patogénesis de dicha enfermedad que comprende administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos específicos capaces de reconocer regiones en SIVA sensibles a la ubiquitinación, a un individuo que se halla en necesidad.

15 Para administración parenteral (v.g. intravenosa, subcutánea, intramuscular), la o las proteínas activas pueden formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (v.g. agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (v.g. manitol) o la estabilidad química (v.g. conservantes y tampones). La formulación se esteriliza por técnicas utilizadas comúnmente.

20 La biodisponibilidad del o de los polipéptidos activos de acuerdo con la invención puede mejorarse también utilizando procedimientos de conjugación que aumentan la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo enlazando la molécula a polietilenglicol, como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

25 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquélla que, cuando se administra, dichos polipéptidos, polinucleótidos o virus de la invención inducen un efecto beneficioso en la prevención o el curso de una enfermedad. La dosis administrada, en forma de dosis simples o múltiples, a un individuo puede variar dependiendo de una diversidad de factores, que incluyen la ruta de administración, condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, estado general de salud, y volumen), alcance de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de intervalos de dosificación establecidos están plenamente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

30 EJEMPLOS

MATERIAL Y MÉTODOS

35 Reactivos: mCD70, hCD40L y hBLYS/BAFF se produjeron por transfección en gran escala de células de riñón embrionario humano (HEK) 293T con los constructos de expresión relevantes (véase más adelante). TNF, un obsequio del Dr. G. Adolf, Boehringer Institute, Viena, Austria, se aplicó a las células a una concentración de 100 ng/ml. MG132 y Lactacistina se adquirieron de Calbiochem, y G418 era de Life Technologies, Zeocina era de Invivogen y Blastidina, Puromicina y Ponasterona eran de Invitrogen. TRAIL recombinante se adquirió de Alexis. La HIS-Ubiquitina recombinante K48 sola, HIS-Ubiquitina K63 sola, E1 humana, y el heterodímero Ubc13-Uev1 se obtuvieron de Boston Biochem. La ubiquitina-aldehído era de A.G. Scientific.

40 Anticuerpos: El anticuerpo anti-p52 se adquirió de Upstate Biotechnologies, los anticuerpos contra p65, p52, p50, Re1B, TRAF2, IKK1 (M280 & H744), SIVA, TRAF3, NIK (H-248) eran de Santa Cruz Biotechnology, anti-HIS, anti-FLAG, cuentas anti-FLAG M2, y anti-b actina de Sigma, anti-ubiquitina y anti-GST de Covance, anti-GFP de Roche, anti-IkBa de Transduction Laboratories. El anticuerpo monoclonal anti-NIK, NIK-81, se generó por inmunización de ratones con un péptido acoplado a KLH correspondiente a una secuencia dentro del dominio de la quinasa NIK (CRLGRGSFGEVHRMEDK aminoácidos 405-420, SEQ ID NO: 34). Los anticuerpos monoclonales anti-NIK, anti-HA y anti-myc (clon-9E10) se purificaron a partir de fluidos de ascitis de ratón en columnas de afinidad a las que se acoplaron sus péptidos correspondientes.

50 Las líneas linfoblastoides B humanas procedentes de linfoma de Burkitt, Ramos, Raji y BJAB, se cultivaron en medio RPMI. Todas las células adherentes HEK 293T, HeLa y MEF se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco. Ambos medios de cultivo se complementaron con 10% de suero de ternero fetal, 100 U/ml de penicilina, y 100 mg/ml de estreptomina.

55 Se crearon células BJAB que expresaban NIK de manera estable con un marcador TAP C-terminal (Rigaut et al., 1999), por selección con 1 mg/ml de G418 de células sometidas a electroporación. Se introdujo SIVA2 en la línea de células BJAB NIK estable por transducción retroviral seguida por selección con 1 mg/ml de puromicina. Se crearon células Ramos que expresaban de manera estable NIK marcado en el terminal N con myc (myc-NIK), por nucleofeción utilizando un dispositivo nucleofector Amaxa y selección utilizando 1 mg/ml de puromicina. Las células Ramos expresaban de manera estable HIS-SIVA2 y Ramos myc NIK.

Se crearon líneas de células 293 inducibles por ecdisona que expresaban SIVA2 siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Invitrogen), y posteriormente se introdujeron myc NIK y myc NIKK670A se introdujeron en estas células por transducción retroviral y selección con 1 mg/ml de puromicina.

5 Vectores de expresión: Los cDNAs para los dominios extracelulares de mCD70, hCD40L, se amplificaron por PCR a partir de ESTs y se clonaron en fusión con una cremallera de leucina modificada y el marcador FLAG (Fanslow et al., 1994) en pcDNA3 (Invitrogen). pCS3MTNIK y pCS3MT-NIKKK429, 430AA, vectores de expresión para NIK de tipo salvaje y NIK 'mutante sin actividad de quinasa' fusionados en el terminal N a un marcador six myc, se obtuvieron del Dr. Michael Kracht, Alemania. pEGFP se adquirió de Clontech. NIK humano con una mutación (G860R) correspondiente a la mutación aly del ratón (G856R) (Shinkura et al., 1999), y todas las restantes mutaciones puntuales descritas se generaron con un kit de mutagénesis orientada (Stratagene). El plásmido de ubiquitina para evaluar la mono-ubiquitinación (Ub KKKK 11, 29, 48, 63 RRRR) fue proporcionado amablemente por el Prof. Yosef Yarden, Instituto Weizmann de la Ciencia, Israel. La subunidad de proteasomas C8, con un marcador myc C-terminal se generó por PCR y se clonó en el vector pcDNA3 (Invitrogen).

15 NIK- pCS3MTNIK con marcador 6 myc N-terminal, NIK aly, NIK mutante sin actividad de quinasa, y NIK K670A se generaron a partir de pCS3MTNIK por mutagénesis orientada utilizando DNA-polimerasa pfu con empleo del protocolo del fabricante (Stratagene).

Un vector para expresión de NIK fusionado en el terminal N al marcador myc (EQKLISEEDL, SEQ ID NO: 35) se obtuvo del Dr. Michael Kracht, Alemania.

20 Cribado de dos híbridos en levadura: el sistema utilizado para el cribado fue la versión III de Matchmaker (Clontech). La presa era una biblioteca de médula ósea humana pre-transformada (Cat# HY4053AH) que ofrece una selección de 'dropout' cuádruple (QDO) muy severa junto con un ensayo a-gal. Clones que crecían en placas SIN LEU, TRP, HIS y ADE se reconfirmaron por un ensayo a-gal, que es mucho más específico que el ensayo usual b-gal, que sufre fugas a menudo. Se prepararon como sigue plásmidos de los clones positivos. Se inocularon clones simples en caldo líquido QDO y se dejaron crecer durante una noche a 37°C. Las células se redujeron a un sedimento a 10.000 g y se resuspendieron en 200 µl de tampón que contenía 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris de pH 8,0 y 1 mM EDTA. Los lisados se agitaron vorticialmente durante 2 minutos después de añadir 200 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de cuentas de vidrio de 600 micrómetros lavadas a los ácidos (Sigma). El sobrenadante se recogió por centrifugación a 12.000 g y el DNA se precipitó por el método de precipitación con acetato de sodio/etanol (Sambrook et al., 1989). Inserciones codificadas de los plásmidos se amplificaron por PCR con los cebadores específicos para el vector de biblioteca pACT2. Para análisis bioquímico ulterior de los clones individuales, los amplicones se clonaron directamente en el vector de expresión de mamífero marcado terminalmente con HIS, pcDNA 3.1 (Invitrogen).

35 Expresión de proteínas recombinantes: Para expresión bacteriana de las proteínas de fusión GST, se clonaron lkbA 1-54, SIVA2 y SIVA2C73A en el vector pGEX y se expresaron en células BL-21 siguiendo el protocolo del fabricante (GST Gene Fusion Systems, 3ª edición, Pharmacia Biotech). La inducción se realizó a DO600 de 0,6 con 1 mM IPTG. Para evitar la formación de proteína insoluble y cuerpos de inclusión, el cultivo bacteriano se dejó crecer a 25°C en lugar de 37°C.

Se expresó baculoviralmente HIS-NIK 338-947 en células de insecto en el laboratorio de los autores como se ha descrito anteriormente.

40 PCR y RT-PCR: Se realizaron PCRs para mutagénesis orientada y amplificación de diversos cDNAs utilizando DNA-polimerasa Pfu Turbo siguiendo las instrucciones del fabricante (Stratagene). Todas las RT-PCRs se llevaron a cabo utilizando Superscript II siguiendo el protocolo de los fabricantes (Invitrogen).

Transfecciones de plásmido, inmunotransferencia, e inmunoprecipitaciones:

Se llevaron a cabo transfecciones de plásmido por uno de los métodos siguientes:

- 45
- a. Método de precipitación con fosfato de calcio (Sambrook et al., 1989).
 - b. Nucleofección Amaxa (Amaxa Biosystems).
 - c. Gene Porter (Gene Therapy Systems)
 - d. Lipofectamina 2000 (Invitrogen)
 - e. La electroporación regular se llevó a cabo como sigue-

50 Las células (10 x 10⁶/electroporación) se lavaron una sola vez y se resuspendieron en 400 µl de medio exento de suero con 25 µg del plásmido. Las células mezcladas con DNA se transfirieron a una cubeta de 0,4 cm de abertura y se incubaron en hielo durante 10 min. La electroporación se realizó a 0,24 KV, 960 µF, y la constante de tiempo se optimizó a 40, en un instrumento BIORAD Genepulser. Después de la pulsación, las células se mantuvieron en hielo durante 5 min y se transfirieron más tarde a medio de crecimiento.

La inmunotransferencia y las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo como se ha descrito (Ramakrishnan et al., 2004). Típicamente, se sembraron 1,5 x 10⁶ células HEK 293T en placas de 10 cm. Después de un periodo de 24 horas de incubación, los cultivos se transfectaron con los plásmidos respectivos mientras se mantenía una concentración total de DNA de 15 µg por placa con adición de vector vacío.

5 Típicamente, se sembraron células HEK 293T en placas de 90 mm (1.5 x 10⁶ células/placa) y se transfectaron utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Sambrook et al., 1989) un día más tarde utilizando una cantidad total de 10 µg de DNA en 10 ml de medio DMEM con 10% de FBS. Para co-transfección se utilizó una mixtura 1:1 de los plásmidos que codificaban las proteínas testadas. Veinticuatro horas después de la transfección, se lavaron las células una sola vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en 1 ml de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) que incluía cóctel completo de inhibidores de proteasas 1' (Roche Molecular Biochemicals). Los lisados pre-aclarados se incubaron durante 2 horas a 4°C con 2 µg de anticuerpo anti-myc o anti-HIS preabsorbido en cuentas de proteína G-Sepharose (Amersham Biosciences). Las cuentas se lavaron luego con tampón de lisis, se sometieron a SDS-PAGE, y las proteínas se transfirieron a una membrana de microcelulosa y se sondaron con los anticuerpos indicados. Los anticuerpos se visualizaron con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (HRP), utilizando el sistema de detección por transferencia Western de quimioluminiscencia intensificada (ECL) (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Para preparar el lisado de células, típicamente, se cosecharon las células 24 horas después de la transfección, se lisaron luego en tampón de lisis con 1% Triton X100 [(1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-cl (pH 7,6) y 1X inhibidor completo de proteasas (Roche)]. Todas las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo por incubación durante 4 horas a 4°C con los anticuerpos específicos y cuentas de proteína G-Sepharose (Amersham Pharmacia).

La condición de lisis difiere donde se separan el extracto nuclear y el citoplásmico (Schreiber et al., 1989).

25 Ensayo de quinasas in vitro: Los ensayos de quinasas de las proteínas transfectadas y endógenas se llevaron a cabo como se ha descrito (Ramakrishnan et al., 2004).

30 Ensayo de luciferasa: Se sembraron células en placas de 6 pocillos (HEK 293T 200.000, HeLa 100.000 MEF 100.000 células/pocillo). Se transfectaron células HEK 293T y HeLa por el método de precipitación con fosfato de calcio, y las MEFs se transfectaron con un reactivo basado en liposomas (Gene therapy systems). Se utilizó cDNA de luciferasa bajo regulación del promotor NF-κB HIV-LTR (repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana) como el plásmido informador. Después de 24 horas, las células se lisaron en 120 µl de tampón de lisis como se ha descrito (Fred M. Ausubel, 1996), y se utilizaron 10-20 µl del lisado para el ensayo de luciferasa.

siRNA y transducción lentiviral: Se realizaron la expresión estable y transitoria de siRNA y las transducciones lentivirales como se ha descrito (Ramakrishnan et al., 2004).

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de SIVA1 y SIVA2 y fragmentos:

35 Secuencia de nucleótidos de SIVA1 (Acc# NM_006427) (SEQ ID NO: 10)

```
atgcccgaagcggagctgccccttcgcggacgtggccccgctacagctcaagggtccgcgtgagccagagggagttgagccg
cggcgtgtgcccggagcgtactcgcaggaggtcttcgagaagaccaagcgcactcctgttctcggggcccaggcctacc
tggaccacgtgtgggatgaaggctgtgccctcgttcacctgccagagtccccaaagcctggccctacaggggccccgagg
gctgcacgtgggcagatgctgatggaccagacggccgctgatcaggagccttgggcaggcctccgaagctgacccatc
tggggtagcgtccattgcctgttctcatgcgtgcgcagccgtggatgggaaggcgggtctgcgggtcagtgtagcgcagccc
tgtgcgggcagtggtgcccacctgctggggctggggctccgtggcctgtaccctgtgtggcctcgtggactgcagtgac
atgtacgagaaagtgtgtgaccagctgtgccatgttcgagacctga
```

Secuencia de nucleótidos de SIVA2 (Acc# NM_021709) (SEQ ID NO: 11)

```
atgcccgaagcggagctgccccttcgcggacgtggccccgctacagctcaagggtccgcgtgagccagagggagttgagccg
cggcgtgtgcccggagcgtactcgcaggaggtcttcgacccatctggggtagcgtccattgcctgttctcatgcgtgc
gagccgtggatgggaaggcgggtctgcgggtcagtgtagcgcagccctgtgcgggcagtggtgtagcgcacctgctggggctgc
ggctccgtggcctgtaccctgtgtggcctcgtggactgcagtgacatgtacgagaaagtgtgtgaccagctgtgccat
gttcgagacctgaggctggctca
```

Secuencia de aminoácidos de SIVA1: (SEQ ID NO: 1)

**MPKRSCPFDVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVFEKTKRLFLGAQAYLDHVWDEGCAVVHLPESPKPGPTGAPR
AARGQMLIGPDGRLIRSLGQASEADPSGVASIACSSCVRAVDGKAVCGQCERALCGQCVRTCWGGCGSVACTLCGLVDCSD
MYEVLCTSCAMFET**

Secuencia de aminoácidos de SIVA2: (SEQ ID NO: 2)

**MPKRSCPFDVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVFDPSGVASIACSSCVRAVDGKAVCGQCERALCGQCVRTCWGC
GSVACTLCGLVDCSDMYEVLCTSCAMFET**

Secuencia de aminoácidos de SIVAc (SEQ ID NO: 3)

5 **KAVCGQCERALCGQCVRTCWGGCGSVACTLCGLVDCSDMYEVLCTSCAMFET**

Secuencia de nucleótidos de SIVAc (SEQ ID NO: 7)

**aaggcggctctgaggcagtgagcgagccctgtgagggcagtggtgacacacctgctggggctgc
ggctccgtggcctgtaccctgtgtggcctcgtagctgacgtgacatgtacgagaagtgctgtgcaccagctgtgcat
gttcgagacc**

Secuencia de aminoácidos de SIVA2 1-58 (SEQ ID NO: 4)

MPKRSCPFDVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVFDPSGVASIACSSCVRAVDG

10 Secuencia de nucleótidos de SIVA2 1-58 (SEQ ID NO: 8)

**atgcccaagcggagctgcccttcgaggacgtggccccgctacagctcaaggctccgctgagccagagggagttgagccg
cggcgtgtgcccagcgcctactcgcaggaggtcttcgaccatctgggtagcgtccattgcctgttcctcatgctgc
gagccgtggatggg**

Secuencia de aminoácidos de SIVA2 1-81 (SEQ ID NO: 5)

MPKRSCPFDVAPLQLKVRVSQRELSRGVCAERYSQEVFDPSGVASIACSSCVRAVDG-

KAVCGQCERALCGQCVRTCWGGC

15 Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9)

**atgcccaagcggagctgcccttcgaggacgtggccccgctacagctcaaggctccgctgagccagagggagttgagccg
cggcgtgtgcccagcgcctactcgcaggaggtcttcgaccatctgggtagcgtccattgcctgttcctcatgctgc
gagccgtggatgggaaggcggctctgaggcagtgagcgagccctgtgagggcagtggtgacacacctgctggggctgc
ggc**

Secuencias de nucleótidos para mutagénesis orientada y para supresión de la síntesis de proteínas por RNA de interferencia: Se generó NIK humano con una mutación correspondiente a la de la mutación aly del ratón (G860R) con 5'-ccaagctattcaatcgtgtgaaagtccaaatac-3' de sentido (SEQ ID NO: 12)

20 y

5'-gtatttgacttcacacgattgaaatagcttg-3' antisentido (SEQ ID NO: 13)

NIK, con su secuencia alterada para hacerlo no complementario con el siRNA NIK que se utilizó, tenía generalmente sentido 5'-gagggtctggaatacctacattcccgcaggattctgcatggg-3' (SEQ ID NO: 14)

y

25 5'-cccatgcagaatcctgagggaatgtaggtattccagaccctc-3' antisentido (SEQ ID NO: 15) como cebadores.

Los motivos de fijación de TRAF2 en el término N y C de NIK se mutaron por los oligómeros siguientes:

NIK334

cadena de sentido 5'-catgagaagtttctgtggcggcataccctagtgcatgctctg-3' (SEQ ID NO: 16)

cadena antisentido 5'-cagagcatg-cactaggtatgccccacagaaaacttctcatg-3' (SEQ ID NO: 17)

NIK704

- 5 cadena de sentido 5'-gggccccggccagctgcggcgacaacaggcagagcc-3' (SEQ ID NO: 18), cadena antisentido 5'-ggctctgcctgtgtcggcagctggccggggccc-3' (SEQ ID NO: 19). Las secuencias de siRNA siguientes se introdujeron en el vector pSUPER (con la secuencia ttcaagaga como espaciador):

Para SIVA-NC3 humano, cadena de sentido

5'-gatccccgaataaacctcttatattcaagagaataataagaggtttattcattttggaaa-3' (SEQ ID NO: 20)

- 10 cadena antisentido 5'-agctttccaaaaatgaata-aacctcttatattctctgaaatataagaggtttattcaggg-3' (SEQ ID NO: 21)

SIVA131

cadena de sentido 5'-gatccccgcagtgacatgtacgagaattcaag-agattctcgtacatgtcactgcttttggaaa-3' (SEQ ID NO: 22)

cadena antisentido

5'-agctttccaaaaagcagtgacatgtacgagaatctctgaattctcg-tacatgtcactgcggg-3' (SEQ ID NO: 23)

- 15 SIVA275 cadena de sentido

5'-gatccccactgcagtgacatgtacgattcaagagatcgtacatgtcact-gcagtttttggaaa-3'
(SEQ ID NO: 24)

cadena antisentido

5'-agctttccaaaaaactgcagtgacatgtacgattctctgaatcgtacatgtcactgcagtggg-3'
(SEQ ID NO: 25)

SIVA278 cadena de sentido

- 20 5'-gatcccctagcgtccattgcctgttcttcaagagagaaacaggcaatggacgctatttttggaaa-3'
(SEQ ID NO: 26)

cadena antisentido

5'-agctttccaaaaatagcgtccattgcctgttcttcttgaagaacaggcaatggacgctaggg-3'
(SEQ ID NO: 27)

SIVA518 cadena de sentido

- 5'-gatccccgtgacatgtacgagaaagttcaagagaactttctcgtacatgtcacttttggaaa-3'
(SEQ ID NO: 28)

- 25 cadena antisentido

5'-agctttccaaaaagtg-acatgtacgagaaagttcttcttgaactttctcgtacatgtcacggg-3'
(SEQ ID NO: 29)

SIVA521 cadena de sentido

5'-gatccccccagctgtgccatg-ttcgattcaagagatogaacatggcacagctggtttttggaaa-3'
(SEQ ID NO: 30)

cadena antisentido

5'-agcttttccaaaaaccagctgtgccatgttcgatct-cttgaatcgaacatggcacagctggggg-3'

(SEQ ID NO: 31)

GFP cadena de sentido

5'-gatccccgcctacctgttccatggccattcaagagatggccatgg-aacaggtagcttttgaaa-3'

(SEQ ID NO: 32)

5 cadena antisentido

5'-agcttttccaaaaagctacctgttccatggccatctcttgaatggccatggaacaggt-agcggg-3'

(SEQ ID NO: 33)

RNAi knock-out. Se expresó siRNA en horquilla utilizando el vector pSUPER, como se ha descrito previamente (Brummelkamp et al., 2002). Resumidamente, se diseñó un oligonucleótido bicatenario que contenía las secuencias directa e inversa correspondientes a una región en la cadena antisentido del marco de lectura abierta de SIVA humano. Los dos oligonucleótidos se reasociaron y se clonaron en el vector pSUPER para expresión bajo el control del promotor de RNA H1 (Brummelkamp et al., 2002). Se realizó una transfección transitoria con hasta un exceso de 5 veces de este pSUPER-SIVA, como se describe anteriormente.

Se utilizó un vector lentiviral (como ha sido descrito previamente por Lois et al., 2002) a fin de expresar el pSUPER-SIVA constitutivamente en células Ramos. Típicamente, la casete que incluía el promotor H1 (Brummelkamp et al., 2002) y SIVA RNAi se escindió del vector pSUPER utilizando EcoRI y HindIII (ambas de New England Biolabs), se hicieron romos los extremos cohesivos utilizando DNA-polimerasa T4 (New England Biolabs), y el fragmento como se insertó en el sitio como Pacl del vector lentiviral FUGW que expresaba GFP (Lois et al., 2002). Las células transducidas se clasificaron por FACS para expresión de GFP (FACS Vantage, Becton-Dickinson). Las células clasificadas exhibían expresión de GFP y deficiencia de SIVA durante meses.

Auto-ubiquitinación in vitro: Típicamente, se realizaron ensayos de ubiquitinación in vitro en un volumen de reacción de 50 µl que contenía recombinante utilizando una HIS-Ubiquitina recombinante en la que todas las lisinas en la ubiquitina excepto K63 están mutadas a arginina (Boston Biochem) (8 µg), E1 (0,2 µg), E2 (0,5 µg) y 1-2 µg de GST-SIVA recombinante o GST-SIVAC73A en un tampón que contenía 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 µg/ml creatina-quinasa y 5 µM ubiquitina-aldehído. Las reacciones se incubaron a 30°C durante una hora. Las reacciones se terminaron por adición de tampón de muestra Laemmli o se diluyeron a 1 ml con tampón que contenía 20 mM HEPES de pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA y cóctel completo de inhibidores de proteasas. Se inmunoprecipitó SIVA utilizando anticuerpo anti-GST adsorbido a cuentas de proteína G durante 4 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se sometieron a transferencia Western con los anticuerpos indicados.

Preparación de inóculo viral. Se transfectaron células Phoenix-ampho (1,5 x 10⁶ células sembradas en placas de 9 cm) (obsequio del Prof. Gary Nolan, Universidad de Stanford) por el método del fosfato de calcio con vector SIVA2 pBABE puro (20 µg/placa) y el medio acondicionado que contenía el virus se recogió 48 horas después de la transfección. Se añadieron 5 µl de medio que contenía virus a 45 µl de medio RPMI que contenía las células BJAB (20 x 10⁶ células) y dos días más tarde se sometieron las células a selección en medio que contenía puromicina (Sigma p7255) (500 ng/ml) durante 4 días. Después de 4 días, se incrementó la concentración de puromicina (1 µg/ml) y se dejó que las células se expandieran en condiciones de cultivo.

Células Ramos que expresan constitutivamente SIVAc. Se aislaron y se dejaron crecer varios clones de células B-linfoblastoides Ramos simples que expresaban SIVA-c (transfectado constitutivamente con pSIVAc). El vector de expresión empleado para obtener los clones de células que expresaban SIVAc produce SIVAc marcado con HIS (el marcador HIS se fusiona al término C de SIVAc). Se prepararon como sigue clones de células B-linfoblastoides Ramos que expresaban SIVA-c. Las células B-linfoblastoides se transfectaron por nucleofección (Amaxa Biosystems) con pSIVAc o el vector de control pC HIS. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se seleccionaron las células en medio complementado con 1000 ng/ml de neomicina (G418, Gibco BRL 11811-03) durante 30 días. Después de la selección, se analizaron los clones de células simples por transferencia Western utilizando anti-HIS para monitorizar la expresión de SIVA-c. un clon positivo seleccionado se dejó crecer y se utilizó para los experimentos.

Ejemplo 1. NIK se fija a SIVA, una proteína adaptadora asociada con CD27.

Por cribado de una biblioteca de dos híbridos de médula ósea humana utilizando NIK como cebo, se encontró que el NIK se fija a un fragmento C-terminal de SIVA (véase Fig. 1A). Como en el caso de la fijación de NIK a TRAF2 (Malinin et al., 1997), se encontró que el fragmento de SIVA se fija a la parte C-terminal de NIK, y esta fijación era más

fuerte que la observada con la proteína NIK de longitud total (Fig. 1A), debido muy probablemente a la propensión de la parte N-terminal de NIK a fijarse a su término C y bloquear así su fijación a otras proteínas (Xiao y Sun, 2000).

Para testar si NIK puede fijar SIVA en células de mamífero, se expresó NIK con SIVA1 o SIVA2, las dos variantes de corte y empalme de SIVA conocidas (Yoon et al., 1999), en células HEK-293T transfectadas transitoriamente. Como se muestra en Figs. 1B y 1C, NIK co-precipitaba bidireccionalmente con ambas variantes de corte y empalme de SIVA procedentes de lisados de las células transfectadas.

Es interesante que los niveles celulares de SIVA1 y SIVA2 en las células transfectadas se incrementaban por la co-expresión de NIK, reflejando aparentemente la estabilización de SIVA por sus moléculas NIK asociadas. A la dosis particular de cDNA de SIVA aplicada en esta serie de experimentos, la expresión de NIK se incrementaba también por la co-expresión de cualquiera de las dos variantes de corte y empalme de SIVA. Dicho aumento no se observaba después de co-expresión de GFP o IKK1 con NIK (Figs. 1B, C y D). Es notable que, después de co-expresión con NIK aly, las dos isoformas de SIVA exhibían diferencia en efectos. Mientras que tanto SIVA1 como NIK aly se estabilizaban e interaccionaban después de su co-expresión, SIVA2 no estabilizaba la NIK aly co-expresada ni SIVA2 era estabilizada por NIK aly. Debido a esta falta de estabilización, la fijación de NIK aly a SIVA2 no pudo evaluarse (Figs. 1B y C).

Para recapitular la interacción de NIK y SIVA in vitro, se expresó SIVA2 marcado con GST en bacterias y un mutante de delección N-terminal de NIK (NIK 338-947) se expresó en baculovirus. La co-incubación de las dos proteínas, seguida por inmunoprecipitación de NIK degradaba específicamente SIVA2, reconfirmando así que su interacción in vivo es directa (Fig. 1E).

Adicionalmente, se encontró también que SIVA2 endógeno interacciona con un NIK expresado de manera estable en células Ramos después de tratamiento con el ligando CD70 (Fig. 1F). Análogamente, en células BJAB que expresaban NIK de manera estable y transducidas retroviralmente con SIVA2, estas dos proteínas interaccionaban después de tratamiento de larga duración con el ligando CD40, pero no con TRAIL, otro ligando de la familia TNF (Figs. 1G-H). En contraste, no se observó interacción alguna de SIVA1 y NIK en una línea de células estable que expresaba las dos proteínas (no representado).

Un informe previo que abordaba la interacción de SIVA con los receptores CD27 y GITR sugería que SIVA se fija a los dominios de fijación de TRAF2 en los dos receptores (Spinicelli et al., 2002). Dado que NIK es también una proteína de fijación de TRAF, podría sospecharse que SIVA y TRAF2 se fijan competitivamente a NIK. Sin embargo, dos versiones mutantes de NIK con los dominios de fijación de TRAF2 alterados en los términos N y C de NIK fijaban SIVA tan eficazmente como NIK de tipo salvaje (Fig. 1). Parece ser también que SIVA es capaz de afectar a la función de NIK. Cuando se expresaban solos, SIVA1 y SIVA2 causaban sólo una ligera activación de NF- κ B. Sin embargo, ambas variantes de corte y empalme de SIVA mejoraban significativamente la activación de NF- κ B por NIK co-expresado, si bien no tenían efecto alguno sobre la activación de NF- κ B por el mutante NIK aly (Fig. 1J).

Ejemplo 2: Un dominio en SIVA que contiene motivos semejantes a dedo de anillo y semejantes a dedo de cinc es crucial para la fijación de NIK, y contribuye a la modificación de la función de NIK inducida por SIVA.

SIVA contiene una región rica en cisteína homóloga a dedos de anillo/de cinc en su término C (Fig. 2A). Hasta ahora, no se ha atribuido función alguna a este dominio 'de anillo semejante a caja B'. El análisis por delección para definir el dominio de fijación de NIK en el anillo semejante a caja B de SIVA2 sugirió que el dominio terminal semejante a dedo de cinc es la región principal de fijación de NIK (Fig. 2B). De hecho, la fijación directa de NIK a un SIVA truncado (SIVA-C), que carece de la porción N-terminal de SIVA (desde el residuo 1 al 57, Fig. 2A) se detectó en células transfectadas transitoriamente (Fig. 2F). En línea con esto, un ensayo de gen informador mostró que una vez que se ha delecionado el dominio con dedo de cinc, SIVA2 pierde su capacidad para potenciar la activación de NF- κ B inducida por NIK (Fig. 2C). Para testar la posibilidad de que la expresión de este dominio de fijación truncado pueda comportarse como un inhibidor competitivo, fijándose a y bloqueando la función de NIK, se expresó el término SIVA-C en células junto con NIK. Es interesante que, como el SIVA2 de longitud total, asimismo el término SIVA-C a baja concentración exhibía un efecto intensificador sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK (Fig. 2D). Este efecto inhibidor se observaba también en una condición más significativa fisiológicamente, dado que el SIVA-C sobreexpresado ponía también en compromiso la activación de NF- κ B inducida por CD27, debido probablemente a fijación y bloqueo de la función de NIK (Ramakrishnan et al., 2004) (Fig. 2E). Coherentemente con esto, los clones estables de la línea de células Ramos que expresaban constitutivamente un nivel bajo de SIVA-C exhibían un nivel basal elevado de p52 (Fig. 2F); muy probablemente, por activación de la función de NIK que causaba un procesamiento mejorado de p100.

Ejemplo 3: SIVA promueve la poliubiquitinación de NIK.

NIK sufre ubiquitinación después de co-expresión con ubiquitina (Fig. 3A). La exposición de células que expresan NIK a inhibidores de proteasomas da como resultado la acumulación de NIK poliubiquitinado (Fig. 3B). Empleando diversos mutantes de ubiquitina se encontró que NIK podría conjugarse tanto a las cadenas de poliubiquitina K48 como a las K63 (Fig. 3C). Sorprendentemente, NIK exhibía también monoubiquitinación después de co-expresión con un mutante de ubiquitina cuyas lisinas estaban reemplazadas con argininas (K11, 29, 48, 63R) (Fig. 3D). En

consistencia con la monoubiquitinación, el escaneo manual de la secuencia NIK mostraba la presencia de un Motivo de Interacción con Ubiquitina [UIM, una secuencia potencial de fijación de ubiquitina (Hofmann y Farquet, 2001)]. Se encontró que la adición de SIVA2 aumentaba ambos tipos de ubiquitinación K48 y K63 de NIK (FIGs. 3E, 3A y 3B), en tanto que no tenía efecto alguno sobre la monoubiquitinación de NIK (Fig. 3D). La mera co-expresión de NIK y SIVA en células HEK 293T causaba la aparición de NIK poliubiquitinado con ubiquitina endógena (Fig. 3F). Es interesante, que las formas de peso molecular alto de NIK correspondientes a NIK conjugado con cadenas endógenas de poliubiquitina se encontraban también en las líneas de células Ramos. (Fig. 3G) y HEK 293T (Fig. 3H) que expresaban marcado NIK después de activación con CD27. Este descubrimiento, junto con el reclutamiento de SIVA2 en NIK está en línea con la posible implicación de SIVA en la función de CD27 (Prasad et al., 1997). SIVA1 inducía también ubiquitinación de NIK, pero en menor proporción comparado con SIVA2 (Fig. 3F). Dado que el motivo con dedo de anillo es importante para la actividad catalítica de las enzimas de ubiquitinación, uno de los residuos cisteína conservados en el dominio semejante a dedo de anillo de SIVA2 se mutó (SIVA2C73A) para estudiar su consecuencia sobre la ubiquitinación de NIK. Se encontró que el SIVA2 mutante con dedo de anillo exhibía una capacidad notablemente reducida de ubiquitinación de NIK, confirmando ulteriormente la especificidad de la reacción (Fig. 3F).

Ejemplo 4: SIVA2 regula negativamente la activación de NF- κ B – una actividad que refleja muy probablemente su capacidad para imponer la degradación de NIK.

SIVA es una molécula pro-apoptótica e induce la muerte celular en un camino mitocondrial dependiente de caspasas. Consistentemente con su papel fundamental en la apoptosis, SIVA se regula en sentido creciente en respuesta a UV y al estrés oxidante en diferentes tipos de células, y es una diana transcripcional directa de los supresores de tumores p53 y E2F1 (Fortin et al., 2004). En el proceso de la apoptosis, se sabe que la caspasa 8 escinde proteínas como NIK para reprimir el camino NF- κ B, un camino que juega un papel central en la supervivencia y proliferación celulares (Foehr et al., 2000). Mientras se evaluaba el efecto de la expresión de SIVA2 sobre la activación de NF- κ B inducida por NIK se encontró que, en tanto que tenía efecto estimulador a dosis bajas, SIVA2 a dosis altas suprimía por completo la activación de NF- κ B inducida por NIK (Fig. 4A). Esto estaba en buena correlación con el nivel de expresión de NIK en las células, que tenía un nivel notablemente reducido de NIK en presencia de concentraciones altas de SIVA2 (Fig. 4B, las 3 primeras pistas). Dado que SIVA2 aumenta la ubiquitinación K48 de NIK en expresión transitoria, se sugirió la hipótesis de que SIVA2 induce la ubiquitinación K48 de NIK, conduciendo a su degradación proteasómica. Consistentemente, la inhibición proteasómica con MG132 o Lactacistina protegía eficientemente NIK contra la degradación inducida por SIVA (Fig. 4B). Excluyendo la posibilidad de otros medios de degradación, la expresión del inhibidor baculoviral p55 de las pan-caspasas o el tratamiento con un inhibidor lisosómico no protegía NIK contra la degradación inducida por SIVA2 (no representado). SIVA2 sobreexpresado degradaba también el NIK expresado establemente en las células HEK 293T (Fig. 4C). En contraste, SIVA1 no exhibía capacidad para imponer degradación de NIK (no representado). A continuación, se testaron los dos mutantes de delección de SIVA2, uno sin el dedo de cinc y el otro sin ambos dedos de anillo y de cinc, en cuanto a su capacidad para degradar NIK. Es interesante que, al igual que la proteína de longitud total, ambos mutantes de delección se encontraron capaces de inducir degradación de NIK (Fig. 4D). Dado que SIVA 1-58, desprovisto del dedo de anillo y el dedo de cinc, imponía también la degradación de NIK, era tentador testar si este fragmento podría inducir también la ubiquitinación K48 de NIK. De hecho, consistentemente con su capacidad para imponer la degradación de NIK, el término N de SIVA2, aunque incapaz de fijar NIK, inducía ubiquitinación específica K48 de NIK (Fig. 4E). Este descubrimiento sugirió que SIVA no es un E3 directo de NIK que induzca ubiquitinación K48, sino parte de un complejo de ubiquitinación que requiere otros factores accesorios. Análogamente, se informó también que TRAF3 es una enzima de ubiquitinación indirecta de NIK, causando su degradación (Liao et al., 2004).

Ejemplo 5: Un residuo lisina en la posición 670 de NIK es un sitio de ubiquitinación K48 implicado en su degradación por SIVA2.

Por análisis de delección seriada se definió una región corta de NIK, los aminoácidos 640-720, como una región potencialmente capaz de ubiquitinación (Fig. 5A). Esta región alberga 3 residuos lisina conservados y la mutación de una de estas lisinas en alanina, K670A, reducía específicamente la ubiquitinación K48 de NIK (Fig. 5B, panel derecho) en comparación con la NIK de tipo salvaje (Fig. 5B, panel izquierdo). Dado que la ubiquitinación K48 es un marcador de degradación proteasómica y dado que en esta invención se encontró que SIVA2 inducía ubiquitinación y degradación proteasómica de NIK, se evaluó la degradación de NIK K670A por SIVA2. De hecho, se encontró que la sustitución de lisina en el residuo 670 de NIK protegía notablemente NIK contra la degradación inducida por SIVA (Fig. 5C). Sin embargo, a mayores concentraciones de SIVA2 y durante un periodo de cultivo prolongado, el nivel de NIK K670A comenzaba a descender en las células. Esto demuestra que lisina 670 es un residuo crucial, pero no el único residuo implicado en la ubiquitinación K48 de NIK por SIVA2, conduciendo a su degradación. La lisina 670 sirve probablemente como residuo inicial que sufre la ubiquitinación K48 por SIVA2, sensibilizando NIK para la degradación. Previamente, se informó que la sobreexpresión de TRAF3 causaba la degradación de NIK (Liao et al., 2004). Mientras se comparaba la capacidad de SIVA2 y TRAF3 para imponer la degradación de NIK K670A, se encontró que la mutación de la lisina 670 podría proteger NIK únicamente contra la degradación inducida por SIVA2 y no contra la inducida por TRAF3 (Fig. 5D). Así pues, NIK se degrada tanto en respuesta a SIVA2 como a TRAF3, pero los mecanismos moleculares implicados en los dos procesos difieren.

A continuación, dado que se observó que la mutación del dedo de anillo de SIVA (SIVA2C73A) reduce notablemente su capacidad para ubiquitinar NIK, se testó la consecuencia de la expresión de este SIVA2 mutado sobre la degra-

dación de NIK. Análogamente al tipo salvaje, el mutante SIVA con dedo de anillo2 degradaba también NIK y NIK aly. Inesperadamente, al contrario que el tipo salvaje, SIVA2C73A degradaba eficazmente el NIK K670A coexpresado (Fig. 5E).

5 Por expresión transitoria con diferentes mutantes de ubiquitina, se encontró que la región del dedo de anillo, SIVA-C sufre por sí misma ubiquitinación K63 y coprecipita con NIK (Fig. 5F). Sin embargo, al contrario que el SIVA de longitud total, se encontró que SIVA-C era incapaz de imponer la ubiquitinación K63 de NIK (Fig. 5E).

Ejemplo 6: SIVA2 es una ligasa E3 que causa ubiquitinación K63, y su dedo de anillo media esta función.

10 Las E3s son proteína-ligasas de ubiquitina que determinan la selectividad y eficiencia de las reacciones de ubiquitinación. Prácticamente la totalidad de las E3s conocidas utilizan un dedo de anillo o dominio HECT para participar en la reacción de ubiquitinación (Hofmann y Pickart, 2001). Para demostrar que el dedo de anillo de SIVA2 está involucrado de hecho en la ubiquitinación K63 de NIK, el mutante de ubiquitina K48R, que permite poliubiquitinación únicamente a través de las cadenas K63 enlazadas, se expresó en células con NIK. Como era de esperar, la adición de SIVA2 potenciaba en gran medida la poliubiquitinación K63 de NIK y la mutación con dedo de anillo en SIVA2 bloqueaba esta capacidad, demostrando la ubiquitinación K63 como una función del dedo de anillo. Anteriormente, en los cribados de dos híbridos de los autores de esta invención, una de las presas pescadas con el término C de NIK era la enzima de conjugación de ubiquitina, Ubc13. Esta E2 junto con un co-factor, Uev1, media específicamente la ubiquitinación K63 de las proteínas (Hofmann y Pickart, 2001). Para testar la implicación de Ubc13 en la ubiquitinación K63 de NIK inducida por SIVA2 y reconfirmar su especificidad, se sobreexpresó una Ubc13 catalíticamente inactiva (C87A) para bloquear este proceso (Deng et al., 2000). Consistentemente, Ubc13 C87A bloqueaba la ubiquitinación K63 de NIK inducida por SIVA2 (Fig. 6A).

20 CYLD es una enzima de desubiquitinación que direcciona las cadenas de ubiquitina enlazadas en K63 (Kovalenko et al., 2003). La co-expresión de CYLD desconjugaba fácilmente las cadenas de ubiquitina inducidas por SIVA2 en NIK, proporcionando una prueba adicional de la ubiquitinación K63 específica de NIK (Fig. 6B).

25 Adicionalmente a la ubiquitinación in vivo observada, se testó la ubiquitinación K63 de NIK in vitro. Lamentablemente, ha sido imposible obtener NIK recombinante a partir de bacterias o de células de insecto debido a la insolubilidad e inactividad de la proteína preparada en estos sistemas. Por ello, los autores decidieron utilizar NIK sobreexpresado y purificado a partir de células de mamífero o a partir de transcripción y traducción in vitro de un sistema de lisado de reticulocitos de conejo. El NIK preparado por ambos medios mostró saturación de ubiquitinación K63 cuando se incubó con E1 y E2 sin adición de E3, obstruyendo el análisis de la capacidad de SIVA2 para servir como E3 respecto a su ubiquitinación in vitro. Este descubrimiento indica que NIK expresado en sistemas de mamífero fija con avidez y abate la o las ligasas E3, efectuando su ubiquitinación in vitro. O bien, alternativamente, que NIK posee en sí mismo actividad de ligasa E3. A continuación, se utilizó un sistema de baculovirus para expresar un NIK truncado, que carecía de los 337 aminoácidos N-terminales, en células de insecto. Este NIK truncado (338-947) era más soluble que el NIK de longitud total, y se aplicó al experimento de ubiquitinación in vitro. NIK 338-947 no exhibía ubiquitinación con o sin SIVA2. Esto puede ser debido a la incapacidad de este NIK truncado para participar en el proceso. Alternativamente, ello puede sugerir que el término N de NIK es la región que sufre la ubiquitinación K63.

30 Un descubrimiento más que resulta consistente con la idea de que SIVA2 actúa para estabilizar NIK se logró en un experimento en el que TRAF2, NIK y SIVA2 se co-expresaron en células HeLa. TRAF2 inducía degradación de NIK. Como se ha indicado anteriormente, SIVA2 a dosis bajas aumenta las cantidades y la función de NIK. Adicionalmente, como se muestra en Fig. 6C, SIVA2 en dosis baja estabilizaba/protegía NIK contra la degradación inducida por TRAF2.

Es interesante que se encontró que SIVA2 recombinante propiamente dicho expresado en bacterias experimentaba en sí mismo auto-ubiquitinación K63 en una reacción de ubiquitinación in vitro con E1 y E2 añadidos (Ubc13/Uev1) estabilizándolo como una ligasa E3 potente, capaz también de inducir auto-ubiquitinación (Fig. 6D).

45 Ejemplo 7: Exploración del significado fisiológico de los descubrimientos de que la expresión inducible de SIVA2 en células interfiere con la función de NIK.

Inicialmente, se intentó estudiar la función de SIVA suprimiendo su expresión por el enfoque del RNA interferente pequeño (siRNA). Se diseñaron varios siRNAs y se clonaron en el vector pSUPER (Brummelkamp et al., 2002) y se testaron en células HEK 293T respecto a su capacidad para reducir el mensaje de SIVA. Por RT-PCR, se seleccionaron dos supresores óptimos (pSUPER-NC3 y pSUPER-275 (Fig. 7A) para experimentos ulteriores. La expresión transitoria del pSUPER-NC3 en el contexto de la activación del gen informador NF- κ B inducida por CD27 en las células HEK 293T exhibía un aumento al doble en la actividad de luciferasa (Fig. 7B). Teniendo en cuenta el descubrimiento de que SIVA puede inducir la regulación decreciente de NIK, este descubrimiento puede implicar que la disminución de los niveles de SIVA promueve la señalización inducida por CD27 por elevación de los niveles de NIK. A continuación, se intentó crear líneas de células deficientes en SIVA. Para este propósito, se preparó un lentivirus que expresaba siRNA específico de SIVA como se ha descrito (Lois et al., 2002) y se transdujeron diferentes líneas de células. Por este método no se obtuvo en absoluto una supresión completa de SIVA en células Ramos, RAJI o BJAB. Testando la señalización de CD27 en células Ramos en la que se alcanzó una reducción aproximada de 75%

en el nivel de SIVA (Fig. 7C), se encontraron únicamente diferencias menores en la translocación de p52 y p65 al núcleo comparada con las células de control (Fig. 7D). Pudieron observarse niveles ligeramente elevados de p52 y p65 en el núcleo de las células en las que se había suprimido SIVA después de la estimulación con CD70, indicando un nivel y función de NIK incrementados. Sin embargo, estas diferencias sutiles no eran suficientes para deducir conclusiones fiables.

SIVA es una proteína inducida por estrés (Fortin et al., 2004; Henke et al., 2000; Padanilam et al., 1998). Por esta razón, podría ser más razonable y factible evaluar el papel fisiológico de SIVA estudiando el efecto de niveles elevados de SIVA en lugar de hacerlo siguiendo el efecto de su supresión. En esta dirección, inicialmente, se testó la consecuencia de una expresión estable de SIVA2 en las células. En intentos repetidos, SIVA2 se expresaba constitutivamente en las células sólo durante periodos cortos, después de lo cual se perdía la expresión. Por testado de 3 clones diferentes de células Ramos que expresaban constitutivamente SIVA2 poco después de su establecimiento, se encontró que estas células expresan un nivel basal reducido de I κ B α y exhibían procesamiento reducido de p100 y translocación reducida de p52 y p65 al núcleo después de estimulación con CD70 (Fig. 7E). Para consolidación ulterior del efecto de la regulación creciente de SIVA2 sobre la activación de NF- κ B, se decidió desarrollar un sistema de expresión inducible para SIVA2. A este fin, se transfectaron células 293T Ecr inducibles por ecdisona (Invitrogen) con FLAG-SIVA2 inducible y con el receptor CD27, y los clones que expresaban ambas proteínas introducidas se identificaron por selección respecto a resistencia a los fármacos. La expresión de SIVA2 pudo detectarse después de inducción de estas células únicamente cuando las mismas se expusieron a lactacistina, un inhibidor de proteasomas, indicando que SIVA2 es una proteína de vida corta con tasa de renovación alta, que sufre degradación poco después de su síntesis. En esta condición, SIVA2 se acumulaba en las células tan pronto como 3 horas después de la aplicación del inductor. Análogamente, se observaban también ubiquitinación y potenciación extensas de la expresión de SIVA2 por los inhibidores proteasómicos en los tests de expresión transitoria (Fig. 7F). Recapitulando los experimentos realizados con SIVA2 que expresaban constitutivamente líneas de células, se encontró consistentemente que la inducción de la expresión de SIVA2 daba como resultado una reducción de p52 nuclear y también de la inducción de RelB por CD70, indicando la rotura de la función de NIK. Sin embargo, al contrario que los clones de células Ramos que expresaban constitutivamente SIVA2, el SIVA2 expresado induciblemente no afectaba de modo significativo a la translocación nuclear p65 inducida por CD70 en las células 293 (Fig. 7G).

A continuación, se exploró el efecto de la silenciación de SIVA sobre la translocación nuclear de p52 y p65 mediada por inducción con CD70 en células HEK 293T. Para este propósito, células HEK 293T que expresaban NIK transducido retroviralmente se transfectaron por el método de precipitación con fosfato de calcio con pSUPER SIVA o con el vector vacío pSUPER, vector pSUPER codificante de una secuencia inespecífica enmarañada y vector pSUPER que codificaba siRNA para secuencia GFP como control. Las células transfectadas con pSUPER SIVA o el vector de control pSUPER se trataron con medio que expresaba CD70 durante 8 horas o se dejaron sin tratar, se prepararon extractos nucleares y citoplásmicos y se analizaron por transferencia Western con anticuerpos apropiados específicos para la detección de NIK, p100, p52, y p65. Se utilizaron anticuerpos específicos de actina para detectar actina, como control interno. Los resultados demuestran que la silenciación de SIVA eleva los niveles de NIK en el citoplasma y de p52 en el núcleo (Fig. 7H).

Ejemplo 8: NIK fosforila directamente SIVA2 causando su estabilización.

Para explorar el mecanismo que da cuenta del aumento de los niveles de la proteína SIVA después de co-expresión con NIK, se investigó si esta modulación implica la función quinasa de NIK. Utilizando un ensayo de quinasas in vitro, se encontró que NIK fosforilaba fácilmente SIVA2, lo que sugería que SIVA2 puede ser un sustrato fisiológico de NIK. Se había informado previamente que SIVA sufre fosforilación en la tirosina por la quinasa ARG en Y34 (Cao et al., 2001a). Sin embargo, se demuestra en esta memoria que la fosforilación de SIVA2 inducida por NIK no se ve afectada por la mutación Y34F. Asimismo, no se observó fosforilación alguna de SIVA2 con un NIK mutante sin actividad de quinasa (Fig. 8A). Mientras se analizaban los lisados totales de las células en estos experimentos para comprobar la expresión de SIVA2, se encontró que, en tanto que NIK estabilizaba en gran parte el SIVA2 co-expresado, el NIK mutante sin actividad de quinasa carecía completamente de esta capacidad, indicando un papel de la fosforilación de SIVA2 por NIK en la estabilización de SIVA2 (Fig. 8B). Para determinar si la fosforilación de SIVA2 inducida por NIK es un suceso directo o mediado por las quinasas de aguas abajo de NIK, se testó si IKK1 o IKK2 sin actividad de quinasa pueden interferir con él. Al contrario que la fosforilación de NF- κ B p100 en la que NIK ejerce su efecto a través de IKK1 (Senftleben et al., 2001), ninguno de los mutantes de IKK1 o IKK2 tenía efecto significativo sobre la fosforilación de SIVA2 por NIK. Estos descubrimientos preliminares sugieren que la fosforilación de SIVA2 puede ser una consecuencia directa de la interacción de NIK con SIVA2 (Fig. 8C).

Ejemplo 9: SIVA2, pero no SIVA1, promueve la ubiquitinación inducida de NIK y la escisión de TRAF3.

TRAF3 funciona con un regulador negativo de NIK, induciendo su degradación mediada por ubiquitina (Liao et al., 2004). En línea con esto, la sobreexpresión de TRAF3 suprimía la actividad del informador NF- κ B inducida por NIK. TRAMP3 suprimía también el efecto intensificador de la función de NIK conferido por coexpresión de SIVA2, a niveles bajos (Fig. 9A).

En el curso de estos experimentos, se encontró sorprendentemente que NIK modula también los niveles de TRAF3 y afecta a su ubiquitinación y degradación. En presencia de ubiquitina exógena, NIK amplificaba notablemente la ubi-

quitinación de TRAF3, produciendo un patrón de bandas múltiples de TRAF3 en gel reductor. La adición de ubiquitina o NIK solos modulaba también TRAF3 en cierto grado. Un análisis cuidadoso reveló que, además de la ubiquitinación, una banda de peso molecular bajo que comprendía el dominio N-terminal (al tiempo que retenía el marcador HIS N-terminal) de TRAF3 (dTRAF3) aparecía como un producto de escisión principal (Fig. 9B).

5 A continuación, se testó el efecto de las proteínas SIVA sobre la ubiquitinación y escisión de TRAF3 inducida por NIK. Dado que la expresión de ubiquitina sola afectaba a TRAF3, este experimento se realizó sin ubiquitina exógena a fin de limitar el ruido de fondo. En esta disposición, NIK solo causaba poca modificación de TRAF3. Sin embargo, se detectó un efecto diferencial claro de SIVA1 y SIVA2 sobre la modulación de TRAF3 inducida por NIK. SIVA1 no tenía efecto alguno sobre TRAF3 por encima del que era inducido por NIK. Por el contrario, SIVA2 aumentaba significativamente la ubiquitinación y escisión de TRAF3 (Fig. 9C). Por análisis ulteriores de la clase de ubiquitinación de TRAF3 (por coexpresión transitoria con las ubiquitinas mutantes K48 y K63), se encontró que la clase principal de poliubiquitinación de TRAF3 estaba ligada a K63, mientras que la ubiquitinación ligada a K48 era mínima (Fig. 9D). Es interesante que la coexpresión de TRAF3, SIVA2 y el mutante de ubiquitina capaz de formar cadenas ligadas a K63, daba como resultado ubiquitinación y escisión de TRAF3, generando el fragmento dTRAF3 incluso en ausencia de NIK transfectado. La sustitución de SIVA2 de tipo salvaje por el mutante SIVA con dedo de anillo2 anulaba por completo la generación de dTRAF3, lo que implicaba un papel crucial del dedo de anillo de SIVA2 en el proceso. Se encontró también que la inhibición proteasómica inhibía la formación de dTRAF3 inducida por SIVA2, indicando que el proceso es ubiquitinación K63 y dependiente de proteasomas (Fig. 9E). Consistentemente, la inhibición lisosómica no impedía la escisión de TRAF3, fuese en respuesta a SIVA2 o a NIK (no representado). Un informe previo sugería una escisión similar de TRAF3 por caspasas que producían un fragmento TRAF3 N-terminal (Lee et al., 2001). Sin embargo, la mutación del residuo aspartato en el sitio de escisión por las caspasas en TRAF3 a alanina (TRAF3 D347A) no impedía su escisión en respuesta a SIVA2 (Fig. 9E). Análogamente, la escisión de TRAF3 inducida por NIK no era bloqueada tampoco por la mutación D347A, sino que aparecía intensificada, lo que indicaba que la escisión de TRAF3 inducida por NIK y SIVA2 ocurría por un mecanismo diferente, muy probablemente procesamiento proteasómico. El TRAF3 mutante con dedo de anillo era escindido también por NIK en un grado similar al de TRAF3 de tipo salvaje (Fig. 9F). Sorprendentemente, el mismo exhibía ubiquitinación notable en presencia de NIK o SIVA2 y el mutante de ubiquitina capaz de formar cadenas enlazadas K63, y estaba presente principalmente en la fracción insoluble en Triton (Fig. 9G).

30 A continuación, para saber si NIK, SIVA2 y TRAF3 funcionan realmente de modo dependiente, los autores llevaron a cabo experimentos de coprecipitación a partir de células que expresaban transitoriamente estas proteínas. De hecho existía un complejo tripartito, que era independiente de la función quinasa de NIK. En ausencia de NIK exógeno, se observaba solamente una débil interacción de TRAF3 y SIVA2, mediada probablemente por NIK endógeno. Como en el caso del complejo p100-NIK-IKK1 en el que la fijación no se ve influenciada por la función quinasa de NIK (Xiao et al., 2004), aquí también juega NIK el papel de una proteína adaptadora que enlaza TRAF3 y SIVA2 (Fig. 9H).

Ejemplo 10: La inducción de SIVA2 en células HeLa y Ramos da como resultado una activación ulterior de NF- κ B

40 Con objeto de examinar el efecto de SIVA2 sobre la activación alternativa de NF- κ B, se utilizó el sistema de clonación TREX (Invitrogen) que permite la expresión inducible por tetraciclina (o doxidoxiciclina, un análogo de tetraciclina) de los genes clonados. El gen SIVA2 se clonó en el sistema TREX y se introdujo de manera estable en células HeLa. Las células exhiben expresión inducible de SIVA2 (datos no presentados); y adicionalmente, cuando no se inducía la expresión de SIVA2 las células responden al ligando LIGHT normalmente en términos de activación de NF- κ B.

45 Células HeLa TREX capaces de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina se trataron con medio enriquecido en LIGHT durante 8 horas a fin de activar NF- κ B. Después de un tratamiento con LIGHT, las células se lisaron, se fraccionaron en fracciones citoplásmica y nuclear, y la fracción nuclear se sometió a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos específicos anti-p52, RelB o p65. Se encontró que LIGHT inducía translocación nuclear tanto de p52 como de p65, en las células HeLa. Se estudió el efecto de la inducción de SIVA2 sobre la activación de NF- κ B mediada por LIGHT. Los resultados obtenidos muestran que la inducción durante un tiempo breve de SIVA2 aumentaba la translocación nuclear de p52 y p65 mediada por LIGHT, mientras que una inducción durante largo tiempo de SIVA2 interfería con la translocación nuclear mediada por LIGHT tanto de p52 como de p65 (Fig. 10A).

50 El gen SIVA2 se clonó en el sistema de células 293-ecr (Invitrogen). Este sistema permite la expresión inducible de SIVA2 mediada por ecdisona (o el análogo ponasterona). Las células 293-ecr con el gen de SIVA2 clonadas se modificaron por ingeniería genética para expresar constitutivamente CD27. Estas células se trataron durante 0 y 8 horas con CD70 para inducir la activación del camino alternativo NF- κ B. Después del tratamiento, las células se lisaron, se fraccionaron en fracciones citoplásmica y nuclear y se sometieron a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos anti-NIK, TRAF2, y TRAF3 p100 y p52. Los resultados muestran que la inducción de SIVA2 durante un tiempo breve, en la última hora de la inducción de CD70, reducía el nivel de TRAF2/3 y aumentaba los niveles de procesamiento de NIK y p100, dando como resultado niveles nucleares incrementados de p52. La inducción de SIVA2 durante un tiempo largo, 8 horas a lo largo del tratamiento con CD70, reducía los niveles de NIK y p52 nuclear (Fig. 10B). Estos resultados indican que en las células 293 SIVA tiene efectos reguladores tanto positivos como negativos sobre NIK y la activación de NF- κ B mediada por NIK.

Células Ramos que albergaban el sistema TREX capaz de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina o el mutante SIVA2C73A se trataron con CD70 para activar NF- κ B y se estudió el efecto de la inducción de SIVA2 sobre la activación de NF- κ B inducida por CD70. Para este propósito, se trataron células Ramos con CD70 durante 0, 0,3 u 8 horas y se indujeron para expresar SIVA2 o el mutante SIVA2C73A durante largo tiempo (8 horas), corto tiempo (1 hora) o no se indujeron. Como se indica en la figura, durante el tratamiento de 8 horas de ligando con inducción de SIVA, se aplicó doxiciclina junto con el ligando. En el caso de 1 hora de inducción de SIVA, se añadió doxiciclina en la última hora de las 8 horas de tratamiento con el ligando. En el caso del tratamiento breve con CD70 se añadió doxiciclina durante 8 horas o durante 1 hora y se aplicó el ligando durante las 0,3 horas finales. A continuación, se lisaron las células, se fraccionaron en extractos nuclear y citoplásmico y se sometieron a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos específicos anti-I κ B α , p65, p100 y p52. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de SIVA2 de tipo salvaje bloqueaba la degradación de I κ B α inducida por CD70 y la translocación de p65 al núcleo (Fig. 10C). En contraste, la inducción del SIVA mutante con dedo de anillo no bloqueaba la degradación de I κ B α inducida por CD70 y aumentaba la translocación nuclear de p65. La inducción de SIVA2 bloqueaba también la translocación nuclear de p52 inducida por CD70 de una manera dependiente del dedo de anillo. Así pues, al contrario que las células adherentes, tales como HEK 293T y HeLa, en los linfocitos la inducción de SIVA durante tiempo breve no aumentaba la activación de NF- κ B, lo que indicaba que el modo de acción de SIVA en las células linfoides y no linfoides es diferente.

Células Ramos TREX capaces de expresar SIVA2 inducible por tetraciclina o el mutante SIVA2C73A se trataron con TNF y se estudió el efecto de la inducción de SIVA2 o SIVA2C73A sobre la translocación de p65 inducida por TNF al núcleo. Para este propósito, se trataron células Ramos con TNF durante 0, 0,3 y 4 horas y se indujeron para expresar SIVA2 o el mutante SIVA2C73A durante largo tiempo (4 horas) o corto tiempo (1 hora) o se dejaron sin inducción como se ha descrito arriba. Las células se lisaron, se fraccionaron en extractos nuclear y citoplásmico, y se sometieron a análisis por transferencia Western sondado con anticuerpos específicos anti-p65. Los resultados obtenidos muestran que la inducción de SIVA2 de tipo salvaje bloqueaba la translocación de p65 inducida por TNF al núcleo (Fig. 10D). En contraste, la inducción del mutante de SIVA con dedo de anillo no bloqueaba la degradación de I κ B α inducida por TNF y aumentaba la translocación nuclear de p65.

Así pues, la elevación de SIVA2 reprime la activación de NF- κ B inducida por TNF en las células Ramos.

Ejemplo 12: Ubiquitinación in vitro de TRAF2 por SIVA2.

Se analizaron ensayos de ubiquitinación in vitro en un volumen de reacción de 50 μ l que contenía únicamente HIS-ubiquitina-K63 recombinante (una HIS-ubiquitina recombinante en la cual todas las lisinas en la ubiquitina excepto K63 están mutadas a arginina, Boston Biochem) (8 μ g), E1 (0,2 μ g), E2 (0,5 μ g) y 1-2 μ g de GST-SIVA recombinante o GST-SIVAC73A con TRAF2 marcado con FLAG. TRAF2 marcado con FLAG se expresó transitoriamente y se purificó utilizando cuentas anti-FLAG M2 (Sigma) y se eluyó utilizando el péptido FLAG en un tampón que contenía 30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,2 mM DTT, 5 mM citrato de sodio, 10 mM fosfato de creatina, 0,2 μ g/ml creatina-quinasa y 5 μ M ubiquitin-aldehído. Las reacciones se incubaron a 30°C durante una hora. Las reacciones se diluyeron a 1 ml con tampón que contenía 20 mM HEPES de pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA y cóctel completo de inhibidores de proteasas. Se inmunoprecipitó TRAF2 utilizando cuentas anti-FLAG M2 durante 4 horas a 4°C. Los inmunoprecipitados se sometieron a transferencia Western con anticuerpo anti-TRAF2 (H249, Santa Cruz). Los resultados en Fig. 11A muestran que SIVA2, pero no el SIVA2C73A mutante, induce directamente la ubiquitinación K63 de TRAF2.

Ejemplo 13: Las células Ramos que expresan constitutivamente el término C de SIVA mimetizan la deficiencia de TRAF2 en las células B.

Las células B deficientes en TRAF2 exhiben un nivel alto de p52 (NF- κ B constitutiva alternativa) y TRAF3 (Grech et al., 2004). Análogamente, se encontró que las células Ramos que se modificaron por ingeniería genética para expresar de manera estable el término C de SIVA muestran un nivel alto de p52 así como TRAF3 y una expresión reducida de TRAF2 (Fig. 11B). La hiper-activación de NF- κ B resultante de la expresión de SIVAc puede dar como resultado una expresión intensificada de inmunomediadores dependientes de NF- κ B en las células.

Ejemplo 14: Fijación in vitro de TRAF2 a SIVA2

Con objeto de explorar si TRAF2 se fija a SIVA2, se inmunoprecipitó TRAF2 marcado con FLAG a partir de células 193T transfectadas utilizando cuentas anti-FLAG M2. Se eluyó TRAF2 de las cuentas utilizando el péptido FLAG. El TRAF2 marcado con FLAG eluido se incubó con SIVA2 marcado con GST recombinante (expresado bacteriamente) o con el SIVA2 mutante con dedo de anillo marcado con GST a 30°C durante una hora en un volumen de 50 μ l de tampón (30 mM HEPES de pH 7,6, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT). A continuación, la mezcla de fijación se diluyó a 1 ml para alcanzar la composición siguiente: 30 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 y 1 mM EDTA. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con anti-FLAG para TRAF2 y el análisis por transferencia Western se llevó a cabo con anti-SIVA para detectar el SIVA coprecipitante. Los resultados muestran que TRAF2 se fija directamente a SIVA2 in vitro y que el dedo de anillo de SIVA es importante para esta fijación (Fig. 11C). Lo último se confirmó en el experimento siguiente. Se cotransfectaron células HEK 293T con 12 μ g de HIS-SIVA2 o deleciones de SIVA2 que carecían del dedo de anillo (SIVA2 1-58 y SIVA1-81) y FLAG-TRAF2 por el método del fosfato

de calcio. Veinticuatro horas después de la transfección, se cosecharon las células y se lisaron en tampón de lisis que contenía 1% de Triton. Se inmunoprecipitó TRAF2 utilizando cuentas anti-FLAG M2 y el SIVA2 coprecipitado se sondó por transferencia Western utilizando anticuerpo anti-HIS. La lisis total en Fig. 11D muestra los niveles de expresión de las proteínas. Los resultados obtenidos muestran que SIVA no se coprecipita con TRAF2 cuando está ausente el dedo de anillo (SIVA2 1-58) y coprecipita únicamente cuando está presente el dedo de anillo (SIVA2 intacto y SIVA2 1-81). Estos resultados confirman que el dedo de anillo de SIVA2 es necesario para la fijación de TRAF2 y SIVA2 (Fig. 11D).

Ejemplo 15: La sobreexpresión de SIVA en las células HEK 293T aumenta la ubiquitinación K48 de TRAF2.

Se transfectaron células HEK 293T por el método del fosfato de calcio con 4 µg de FLAG-TRAF2, 6 µg de HIS-SIVA2 y 6 µg de plásmidos mutantes de ubiquitina. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron en tampón que contenía 1% de Triton X-100, se inmunoprecipitaron y se analizaron por transferencia Western utilizando anticuerpos específicos. Se utilizó el mutante TRAF2 con dedo de anillo (C34A) para prevenir su auto-ubiquitinación. La mutación con dedo de anillo de TRAF2 impedía únicamente la auto-ubiquitinación K63. SIVA2 aumentaba la ubiquitinación K48 de TRAF2 en función de su dedo de anillo. El mutante TRAF2 con dedo de anillo retenía su capacidad para fijar SIVA2 (Fig. 11E).

Ejemplo 16: SIVA2 regula la ubiquitinación de TRAF2 reclutada en el receptor CD27 en las células Ramos.

El reclutamiento de TRAF2 en el receptor CD27 se indujo por estimulación con FLAG-CD70 y el TRAF2 reclutado en el receptor se inmunoprecipitó utilizando anti-FLAG a través de FLAG-CD70 de 100 x 10⁶ células por momento puntual. Se indujo SIVA2 durante 2 horas con 1 µM doxiciclina antes de estimulación con CD70. El reclutamiento de IKK1 en el receptor CD27 no se ve afectado por la inducción de SIVA. La cantidad de SIVA2 total expresada después de inducción con doxiciclina se muestra en el panel inferior.

La inducción de SIVA2 aumenta TRAF2 ubiquitinado en el complejo receptor de una manera dependiente del anillo en las células Ramos (Fig. 11F).

Se exploró el efecto de la silenciamiento de SIVA en la ubiquitinación de TRAF2 reclutada en el receptor CD27. Para este propósito, se transfectaron células 293-CD27 en placas de 6 pocillos con 3 µg de pSUPER SIVA (2 µg de pSUPER275 + 1 µg de pSUPER NC3) por el método del fosfato de calcio. Cuarenta y ocho horas después, se trataron las células con medio de expresión de FLAG-CD70 durante 0, 15, 30 y 60 minutos para inducir el reclutamiento de TRAF2 en el receptor CD27. Las células se lisaron y el complejo del receptor CD27 se inmunoprecipitó utilizando anticuerpo anti-FLAG. Se sondó TRAF2 asociado al receptor con anticuerpo anti-TRAF2 (Santa Cruz H249). El receptor CD27 e IKK1 precipitados por el ligando se muestran en los paneles inferiores. B Se compararon las células transfectadas con pSUPER SIVA con células de control transfectadas con pSUPER respecto al nivel de TRAF2 en el citoplasma después de la estimulación con CD70. El disparo de CD70 da como resultado la degradación de TRAF2 de una manera dependiente de SIVA. SIVA facilita el reclutamiento inicial de TRAF2 en el receptor CD27, lo cual es necesario para la degradación de TRAF2 después de la estimulación con CD27.

Referencias

- Borden, K. L. B. et al. (1995). Novel topology of a zinc-binding domain from a protein involved in regulating early *Xenopus* development. *Embo J* Vol. 14, no. 23, 5947-5956.
- Bradley, J. R., and Pober, J. S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20, 6482-6491.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553. 2002.
- Bishop, G. A. (2004). The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol* 4, 775-786.
- Canicio, J., Ruiz-Lozano, P., Carrasco, M., Palacin, M., Chien, K., Zorzano, A., and Kaliman, P. (2001). Nuclear factor kappa B-inducing kinase and Ikappa B kinase-alpha signal skeletal muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 276, 20228-20233.
- Cao, C., Ren, X., Kharbanda, S., Koleske, A., Prasad, K. V., and Kufe, D. The ARG tyrosine kinase interacts with Siva-1 in the apoptotic response to oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 11465-11468. 2001
- Chu, F., Barkinge, J., Hawkins, S., Gudi, R., Salgia, R., and Kanteti, P. V. Expression of Siva-1 protein or its putative amphipathic helical region enhances cisplatin-induced apoptosis in breast cancer cells: effect of elevated levels of BCL-2. *Cancer Res* 65, 5301-5309. 2005
- Chu, F., Borthakur, A., Sun, X., Barkinge, J., Gudi, R., Hawkins, S., and Prasad, K. V. The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL and sensitize cells to UV. 2004
- Fanslow, W. C., Clifford, K. N., Seaman, M., Alderson, M. R., Spriggs, M. K., Armitage, R. J., and Ramsdell, F. Recombinant CD40 ligand exerts potent biologic effects on T cells. *J Immunol* 152, 4262-4269. 1994
- Choudhary, S., Boldogh, S., Garofalo, R., Jamaluddin, M., and Brasier, A. R. (2005). Respiratory syncytial virus influences NF-kappaB-dependent gene expression through a novel pathway involving MAP3K14/NIK expression and nuclear complex formation with NF-kappaB2. *J Virol* 79, 8948-8959.
- Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H., and Wu, H. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115, 679-688. 2002
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361. 2000
- Foehr, E. D., Bohuslav, J., Chen, L. F., DeNoronha, C., Geleziunas, R., Lin, X., O'Mahony, A., and Greene, W. C. The NF-kappa B-inducing kinase induces PC12 cell differentiation and prevents apoptosis. *J Biol Chem* 275, 34021-34024. 2000.
- Fontanari Krause et al, Abstract 3152, *Blood*, Vol: 102, 11, November 16, 2003.

Fortin, A., MacLaurin, J. G., Arbour, N., Cregan, S. P., Kushwaha, N., Callaghan, S. M., Park, D. S., Albert, P. R., and Slack, R. S. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem* 279, 28706-28714. 2004

Fred M. Ausubel, R. B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl, ed. *Current protocols in molecular biology*. 1996

Glickman, M. H., and Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428. 2002

Grech, A. P., Amesbury, M., Chan, T., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. TRAF2 differentially regulates the canonical and noncanonical pathways of NF-kappaB activation in mature B cells. *Immunity* 21, 629-642. 2004

Henke, A., Launhardt, H., Klement, K., Stelzner, A., Zell, R., and Munder, T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol* 74, 4284-4290. 2000

Hofmann, K., and Falquet, L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26, 347-350. 2001

Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 276, 27936-27943. 2001

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663. 2000

Kajiura, F., Sun, S., Nomura, T., Izumi, K., Ueno, T., Bando, Y., Kuroda, N., Han, H., Li, Y., Matsushima, A., et al. (2004). NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 172, 2067-2075.

Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., and Courtois, G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424, 801-805. 2003

Lee, Z. H., Lee, S. E., Kwack, K., Yeo, W., Lee, T. H., Bae, S. S., Suh, P. G., and Kim, H. H. Caspase-mediated cleavage of TRAF3 in FasL-stimulated Jurkat-T cells. *J Leukoc Biol* 69, 490-496. 2001

Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E. W., and Sun, S. C. Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* 279, 26243-26250. 2004

Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872. 2002

Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544. 1997

Miyawaki, S., Nakamura, Y., Suzuka, H., Koba, M., Yasumizu, R., Ikehara, S., and Shibata, Y. (1994). A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice. *Eur J Immunol* 24, 429-434.

Nocentini, G., and Riccardi, C. GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 35, 1016-1022. 2005

Padanilam, B. J., Lewington, A. J., and Hammerman, M. R. Expression of CD27 and ischemia/reperfusion-induced expression of its ligand Siva in rat kidneys. *Kidney Int* 54, 1967-1975. 1998

Petit PX, P. B., Mrugala D, Biard-Piechaczyk M, Benichou S. SIVA: A new intracellular ligand of the CD4 receptor modulating T lymphocyte apoptosis via a caspase-dependent mitochondrial pathway, Paper presented at: ISAC congress XXII (France: WILEY-LISS, DIV JOHN WILEY & SONS INC, 111 RIVER ST, HOBOKEN, NJ 07030 USA). 2004

- Pickart, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533. 2001
- Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., and Schlossman, S. F. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6346-6351. 1997
- Pomerantz, J. L., and Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10, 693-695.
- Prasad, K. V., Ao, Z., Yoon, Y., Wu, M. X., Rizk, M., Jacquot, S., and Schlossman, S. F. (1997). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6346-6351.
- Py, B., Slomianny, C., Auberger, P., Petit, P. X., and Benichou, S. Siva-1 and an alternative splice form lacking the death domain, Siva-2, similarly induce apoptosis in T lymphocytes via a caspasedependent mitochondrial pathway. *J Immunol* 172, 4008-4017. 2004
- Qin, L. F., Lee, T. K., and Ng, I. O. Gene expression profiling by cDNA array in human hepatoma cell line in response to cisplatin treatment. *Life Sci* 70, 1677-1690. 2002
- Ramakrishnan, P., Wang, W., and Wallach, D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity* 21, 477-489. 2004
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032. 1999
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F. R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. C., and Karin, M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499. 2001
- Shinkura, R., Kitada, K., Matsuda, F., Tashiro, K., Ikuta, K., Suzuki, M., Kogishi, K., Serikawa, T., and Honjo, T. Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa binding kinase. *Nat Genet* 22, 74-77. 1999
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419. 1989
- Spinicelli, S., Nocentini, G., Ronchetti, S., Krausz, L. T., Bianchini, R., and Riccardi, C. GITR interacts with the proapoptotic protein Siva and induces apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 1382-1384. 2002
- Wajant, H., and Scheurich, P. (2004). Analogies between Drosophila and mammalian TRAF pathways. *Prog Mol Subcell Biol* 34, 47-72.
- Xiao, G., Fong, A., and Sun, S. C. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 279, 30099-30105. 2004
- Xiao, G., and Sun, S. C. Negative regulation of the nuclear factor kappa B-inducing kinase by a cis-acting domain. *J Biol Chem* 275, 21081-21085. 2000
- Xu, L. G., Li, L. Y., and Shu, H. B. (2004). TRAF7 potentiates MEKK3-induced AP1 and CHOP activation and induces apoptosis. *J Biol Chem* 279, 17278-17282.
- Xue, L., Chu, F., Cheng, Y., Sun, X., Borthakur, A., Ramarao, M., Pandey, P., Wu, M., Schlossman, S. F., and Prasad, K. V. Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV. 2002
- Yoon, Y., Ao, Z., Cheng, Y., Schlossman, S. F., and Prasad, K. V. Murine Siva-1 and Siva-2, alternate splice forms of the mouse Siva gene, both bind to CD27 but differentially transduce apoptosis. *Oncogene* 18, 7174-7179. 1999

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD

WALLACH, David

WANGXIA, Wang

5 RAMAKRISHNAN, Parameswaran

KOVALENKO, Andrei

<120> ACTIVIDAD RELACIONADA CON UBIQUITINACIÓN Y/O DEGRADACIÓN DE SIVA Y MODULADORES DE LA MISMA.

<130> 1052

10 <150> 173104

<151> 12-01-2006

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
1 5 10 15

Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
20 25 30

Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Glu Lys Thr Lys Arg Leu Phe Leu
35 40 45

Gly Ala Gln Ala Tyr Leu Asp His Val Trp Asp Glu Gly Cys Ala Val
50 55 60

Val His Leu Pro Glu Ser Pro Lys Pro Gly Pro Thr Gly Ala Pro Arg
65 70 75 80

Ala Ala Arg Gly Gln Met Leu Ile Gly Pro Asp Gly Arg Leu Ile Arg
85 90 95

Ser Leu Gly Gln Ala Ser Glu Ala Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile
100 105 110

Ala Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly
115 120 125

Gln Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly
130 135 140

Cys Gly Ser Val Ala Cys Thr Leu Cys Gly Leu Val Asp Cys Ser Asp
145 150 155 160

Met Tyr Glu Lys Val Leu Cys Thr Ser Cys Ala Met Phe Glu Thr

165

170

175

ES 2 373 986 T3

<210> 2
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
 20 25 30
 Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile Ala
 35 40 45
 Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly Gln
 50 55 60
 Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Ala Cys Thr Leu Cys Gly Leu Val Asp Cys Ser Asp Met
 85 90 95
 Tyr Glu Lys Val Leu Cys Thr Ser Cys Ala Met Phe Glu Thr
 100 105 110

<210> 3
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> SIVA c.

<400> 3

Lys Ala Val Cys Gly Gln Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val
 1 5 10 15
 Arg Thr Cys Trp Gly Cys Gly Ser Val Ala Cys Thr Leu Cys Gly Leu
 20 25 30
 Val Asp Cys Ser Asp Met Tyr Glu Lys Val Leu Cys Thr Ser Cys Ala
 35 40 45
 Met Phe Glu Thr
 50

15 <210> 4
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> SIVA2 1-58

<400> 4

Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
 20 25 30

Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile Ala
 35 40 45

Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly
 50 55

<210> 5
 <211> 81
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> SIVA2 1-81
 <400> 5

Met Pro Lys Arg Ser Cys Pro Phe Ala Asp Val Ala Pro Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Lys Val Arg Val Ser Gln Arg Glu Leu Ser Arg Gly Val Cys Ala Glu
 20 25 30

Arg Tyr Ser Gln Glu Val Phe Asp Pro Ser Gly Val Ala Ser Ile Ala
 35 40 45

Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly Gln
 50 55 60

Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly Cys
 65 70 75 80

Gly

10 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> Dedo de anillo semejante a caja B
 <400> 6

Cys Ser Ser Cys Val Arg Ala Val Asp Gly Lys Ala Val Cys Gly Gln
 1 5 10 15

Cys Glu Arg Ala Leu Cys Gly Gln Cys Val Arg Thr Cys Trp Gly Cys
 20 25 30

20 <210> 7
 <211> 156
 <212> DNA
 <213> Artificial

ES 2 373 986 T3

<220>
<223> Término c de SIVA

<400> 7

aaggcggctc gcggtcagtg tgagcgagcc ctgtgcgggc agtgtgtgcg cacctgctgg 60
ggctgcggct ccgtggcctg taccctgtgt ggcctcgtgg actgcagtga catgtacgag 120
aaagtgctgt gcaccagctg tgccatgttc gagacc 156

5 <210> 8
<211> 174
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> SIVA 2 1-58

<400> 8

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgt actcgcagga ggtcttcgac 120
ccatctgggg tagcgtccat tgccctgttc tcatgcgtgc gagccgtgga tggg 174

15 <210> 9
<211> 243
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> SIVA 2 1-81

<400> 9

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgt actcgcagga ggtcttcgac 120
ccatctgggg tagcgtccat tgccctgttc tcatgcgtgc gagccgtgga tgggaaggcg 180
gtctgcggtc agtgtgagcg agccctgtgc gggcagtggtg tgcgcacctg ctggggctgc 240
ggc 243

20 <210> 10
<211> 528
<212> DNA
<213> Homo sapiens

25 <400> 10

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgt actcgcagga ggtcttcgag 120

aagaccaagc gactcctggt cctcggggcc caggcctacc tggaccacgt gtgggatgaa 180
 ggctgtgccg tcgttcacct gccagagtcc ccaaagcctg gccctacagg ggccccgagg 240
 gctgcacgtg ggcagatgct gattggacca gacggccgcc tgatcaggag ccttgggcag 300
 gcctccgaag ctgaccatc tggggtagcg tccattgcct gttcctcatg cgtgcgagcc 360
 gtggatggga aggcggctcg cggtcagtgt gagcgagccc tgtgcgggca gtgtgtgcgc 420
 acctgctggg gctgcggctc cgtggcctgt accctgtgtg gcctcgtgga ctgcagtgac 480
 atgtacgaga aagtgtgtg caccagctgt gccatgttcg agacctga 528

<210> 11
 <211> 343
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

atgcccaagc ggagctgccc cttcgcggac gtggccccgc tacagctcaa ggtccgcgtg 60
 agccagaggg agttgagccg cggcgtgtgc gccgagcgt actcgcagga ggtcttcgac 120
 ccatctgggg tagcgtccat tgcctgttcc tcatgcgtgc gagccgtgga tgggaaggcg 180
 gtctgcggtc agtgtgagcg agccctgtgc gggcagtgtg tgcgcacctg ctggggctgc 240
 ggctccgtgg cctgtaccct gtgtggcctc gtggactgca gtgacatgta cgagaaagtg 300
 ctgtgcacca gctgtgccat gttcgagacc tgaggctggc tca 343

<210> 12
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Cebador- sentido

<400> 12

15 ccaagctatt tcaatcgtgt gaaagtcaa atac

34

<210> 13
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Cebador antisentido

<400> 13

gtatttgac tttcacacga ttgaaatagc ttgg

34

<210> 14
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Cebador sentido

<400> 14

gagggtctgg aatacctaca ttcccagcagg attctgcatg gg

42

<210> 15
 <211> 42

30

	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador antisentido		
5	<400> 15 cccatgcaga atcctgcggg aatgtaggta ttccagaccc tc	42	
	<210> 16		
	<211> 42		
	<212> DNA		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido		
	<400> 16 catgagaagt ttctgtggc ggcataccta gtgcatgctc tg	42	
15	<210> 17		
	<211> 42		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador antisentido		
	<400> 17 cagagcatgc actaggtatg ccgccacaga aaacttctca tg	42	
	<210> 18		
	<211> 36		
25	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido		
	<400> 18 gggccccggc cagctgcggc gacaacaggc agagcc	36	
	<210> 19		
	<211> 36		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador antisentido		
	<400> 19 ggctctgcct gttgtcgccg cagctggccg gggccc	36	
	<210> 20		
40	<211> 64		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> siRNA SIVA- NC3- sentido		
45	<400> 20 gatcccctga ataaacctct ttatatttca agagaatata aagaggttta ttcatttttg	60	
	gaaa	64	
	<210> 21		
	<211> 64		
	<212> DNA		

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> siRNA SIVA NC3- antisentido		
	<400> 21		
	agctttttcca aaaatgaata aacctcttta tattctcttg aaatataaag aggtttattc	60	
5	aggg	64	
	<210> 22		
	<211> 64		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> siRNA SIVA131- sentido		
	<400> 22		
	gatccccgca gtgacatgta cgagaattca agagattctc gtacatgtca ctgctttttg	60	
	gaaa	64	
15	<210> 23		
	<211> 64		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> siRNA SIVA131-antisentido		
20	<400> 23		
	agctttttcca aaaagcagtg acatgtacga gaatctcttg aattctcgta catgtcactg	60	
	cggg	64	
	<210> 24		
	<211> 64		
	<212> DNA		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> siRNA SIVA275- sentido		
	<400> 24		
	gatccccact gcagtgacat gtacgattca agagatcgta catgtcactg cagttttttg	60	
	gaaa	64	
30	<210> 25		
	<211> 64		
	<212> DNA		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> siRNA SIVA275- antisentido		
	<400> 25		
	agctttttcca aaaaactgca gtgacatgta cgatctcttg aatcgtacat gtcactgcag	60	
	tggg	64	
	<210> 26		

<211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> siRNA SIVA 278-sentido
 <400> 26
gatcccctag cgtccattgc ctgttcttca agagagaaca ggcaatggac gctatttttg 60
gaaa 64

<210> 27
 <211> 64
 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA SIVA278-antisentido
 <400> 27
agctttttcca aaaatagcgt ccattgcctg ttcttcttgg aagaacaggc aatggacgct 60
aggg 64

<210> 28
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> siRNA SIVA518- sentido
 <400> 28
gatccccgctg acatgtacga gaaagtttca agagaacttt ctcgtacatg tcactttttg 60
gaaa 64

<210> 29
 <211> 64
 25 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA SIVA518-antisentido
 30 <400> 29
agctttttcca aaaagtgaca tgtacgagaa agtttcttgg aaacttttctc gtacatgtca 60
cggg 64

<210> 30
 <211> 64
 <212> DNA
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> siRNA SIVA521-sentido
 <400> 30

	gatccccca gctgtgccat gttcgattca agagatcgaa catggcacag ctggtttttg	60
	gaaa	64
	<210> 31 <211> 64 <212> DNA <213> Artificial	
5		
	<220> <223> siRNA SIVA521-antisentido	
	<400> 31	
	agctttttcca aaaaccagct gtgccatggt cgatctcttg aatcgaacat ggcacagctg	60
	gggg	64
10	<210> 32 <211> 64 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> siRNA GFP-sentido	
15		
	<400> 32	
	gatccccgct acctgtttcca tggccattca agagatggcc atggaacagg tagctttttg	60
	gaaa	64
20	<210> 33 <211> 64 <212> DNA <213> Artificial	
	<220> <223> siRNA GFP-antisentido	
	<400> 33	
	agctttttcca aaaagctacc tgttccatgg ccatctcttg aatggccatg gaacaggtag	60
25	cggg	64
	<210> 34 <211> 17 <212> PRT <213> Artificial	
30	<220> <223> Dominio de la quinasa NIK	
	<400> 34	
	Cys Arg Leu Gly Arg Gly Ser Phe Gly Glu Val His Arg Met Glu Asp	
	1 5 10 15	
	Lys	
35	<210> 35 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial	
	<220>	

<223> Marcador myc

<400> 35

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para identificar un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo que tiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B que carece de histidina y que tiene actividad relacionada con ubiquitinación, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, y dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o dicho homólogo del mismo; (ii) medir el enlace de ubiquitina a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B, en donde la detección de la ubiquitina enlazada a dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B es indicativa de que dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B tiene actividad relacionada con ubiquitinación.
- 10 2.- El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 es un polipéptido SIVA.
- 3.- El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el método tiene por objeto la identificación de un polipéptido SIVA capaz de tener actividad relacionada con la ubiquitinación K63.
- 15 4.- Un método para identificar un polipéptido SIVA que tiene actividad relacionada con ubiquitinación directa o indirecta que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, un E2, un polipéptido TRAF2, y opcionalmente un E3 en presencia o ausencia de un polipéptido SIVA; (ii) medir el nivel de ubiquitinación del polipéptido TRAF2 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación de TRAF2 en presencia y en ausencia del polipéptido SIVA, en donde el aumento en el nivel de ubiquitinación de TRAF2 en presencia del polipéptido SIVA es indicativo de que el polipéptido SIVA tiene actividad directa o indirecta relacionada con ubiquitinación.
- 20 5.- El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se testa la actividad relacionada con la ubiquitinación K48 de un polipéptido SIVA.
- 6.- El método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en donde el polipéptido SIVA consiste en SIVA2.
- 25 7.- Un método para identificación de un agente capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de un polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo que tiene un motivo con dedo de anillo semejante a caja B que carece de histidina y que tiene actividad relacionada con ubiquitinación, que comprende: (i) poner en contacto polipéptidos que comprenden una ubiquitina, un E1, E2, el polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 o un homólogo del mismo en presencia o en ausencia de un agente candidato, en condiciones que permiten la ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un polipéptido de anillo semejante a caja B mediada por dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B; (ii) medir el nivel de ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B en presencia o en ausencia de dicho agente candidato; y (iii) comparar el nivel de ubiquitinación en presencia y en ausencia de dicho agente candidato, en donde un cambio en el nivel de ubiquitinación de un polipéptido que alberga un polipéptido de anillo semejante a caja B en presencia de dicho agente candidato es indicativo de que el agente candidato es capaz de modular la actividad relacionada con ubiquitinación de dicho polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B.
- 30 8.- El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el polipéptido que alberga un anillo semejante a caja B de SEQ ID NO: 6 es un polipéptido SIVA.
- 35 9.- El método de acuerdo con la reivindicación 2 u 8, en donde la ubiquitina es ubiquitina mutada en K48.
- 40 10.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la puesta en contacto de los polipéptidos se lleva a cabo en el interior de células o in vitro.
- 11.- El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la ubiquitinación se detecta por análisis de transferencia Western.
- 45 12.- El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho agente candidato se selecciona de moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, ácidos nucleicos, moléculas procedentes de extractos naturales, y compuestos orgánicos sintéticos.
- 13.- Un polipéptido aislado constituido por una caja B de la secuencia indicada en SEQ ID NO: 6.
- 14.- Un polipéptido aislado constituido por un fragmento C-terminal de un polipéptido SIVA que incluye el dedo de anillo semejante a caja B y/o el motivo con dedo de cinc, en donde el fragmento está constituido por los residuos de aminoácidos 58 a 110 de SIVA2 indicados en SEQ ID NO: 3.
- 50 15.- Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 13 ó 14.
- 16.- Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende la secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

- 17.- Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 15 ó 16.
- 18.- Una célula hospedadora que alberga un vector de acuerdo con la reivindicación 17.
- 19.- Un método para preparación de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 18 y aislar el polipéptido producido.
- 5 20.- Un kit útil para ubiquitinación de un sustrato proteínico que comprende E1, E2, ubiquitina, y un polipéptido SIVA.
- 21.- El kit de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el sustrato proteínico se selecciona de TRAF2, TRAF3, NIK y SIVA.
- 22.- Una composición farmacéutica que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 17, un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 o una sal del mismo, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10

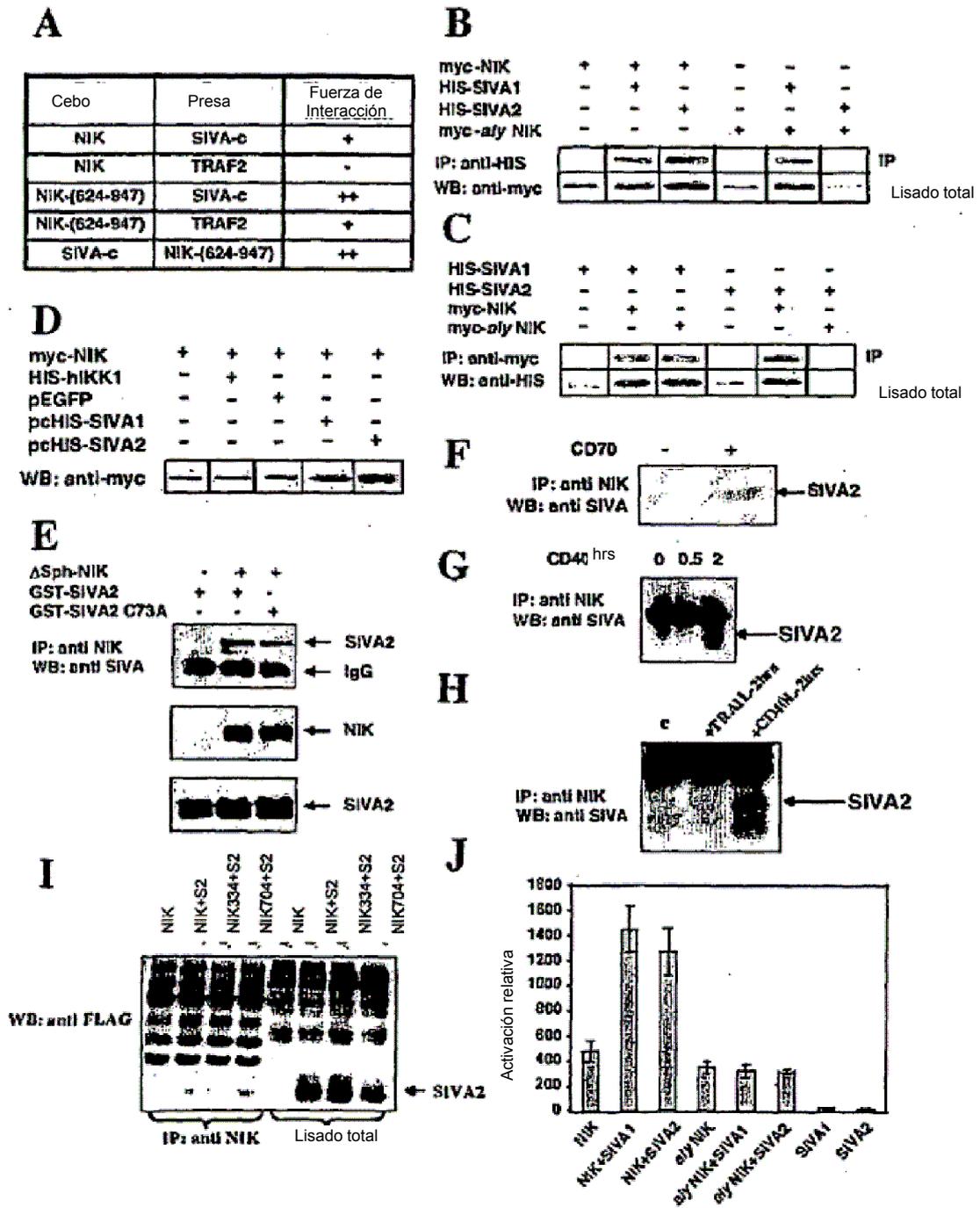


Fig. 1

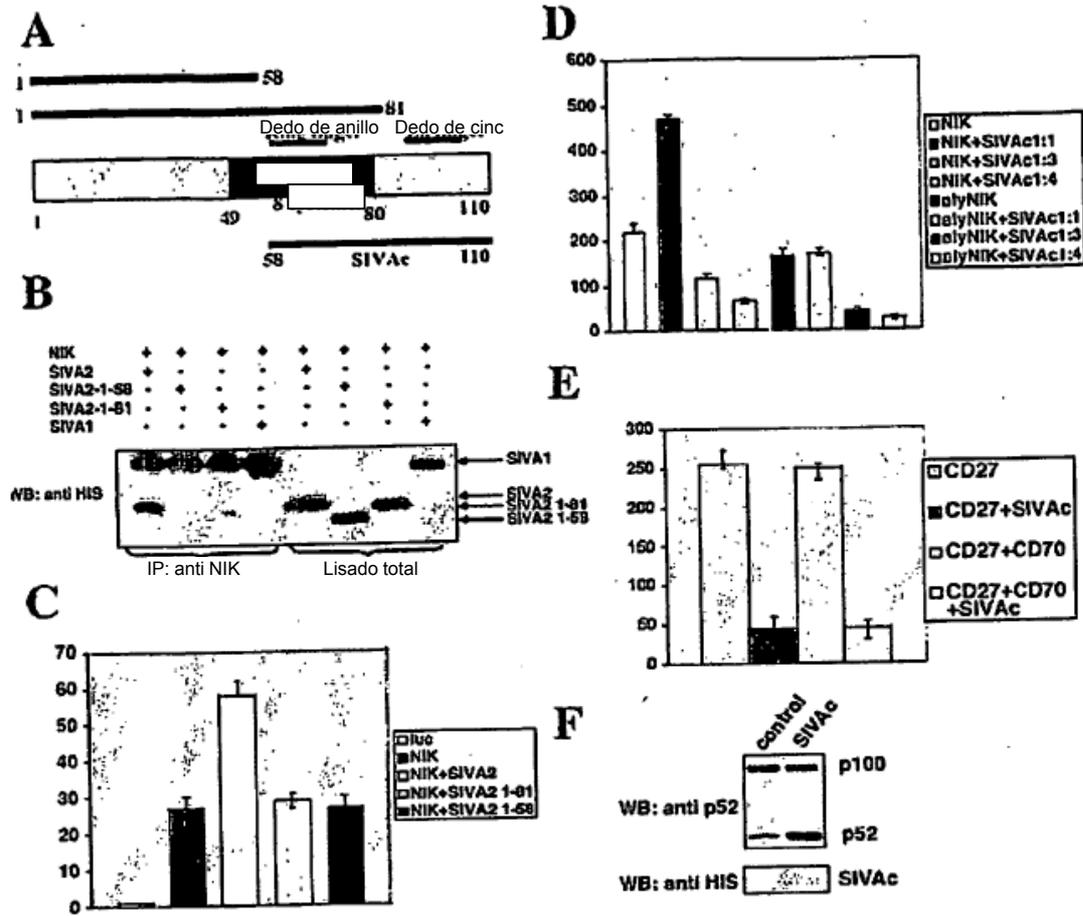


Fig. 2

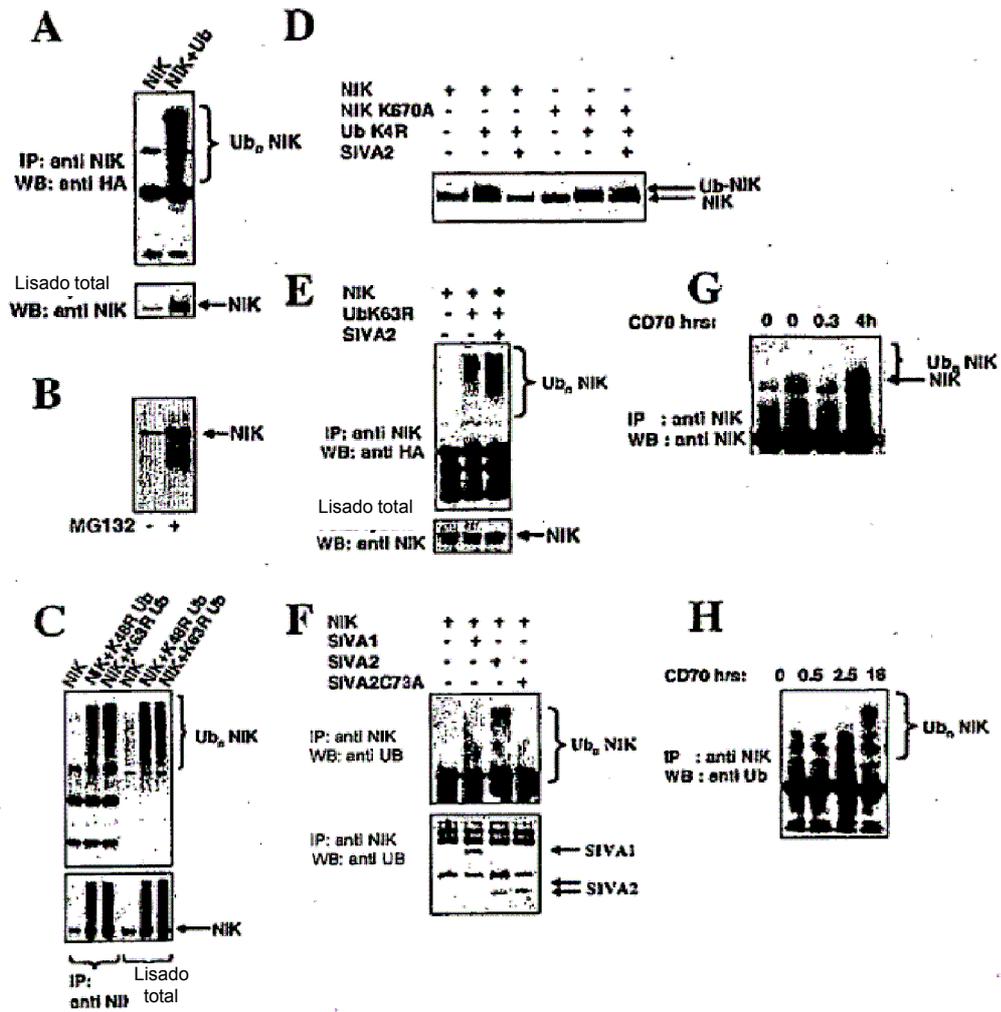


Fig. 3

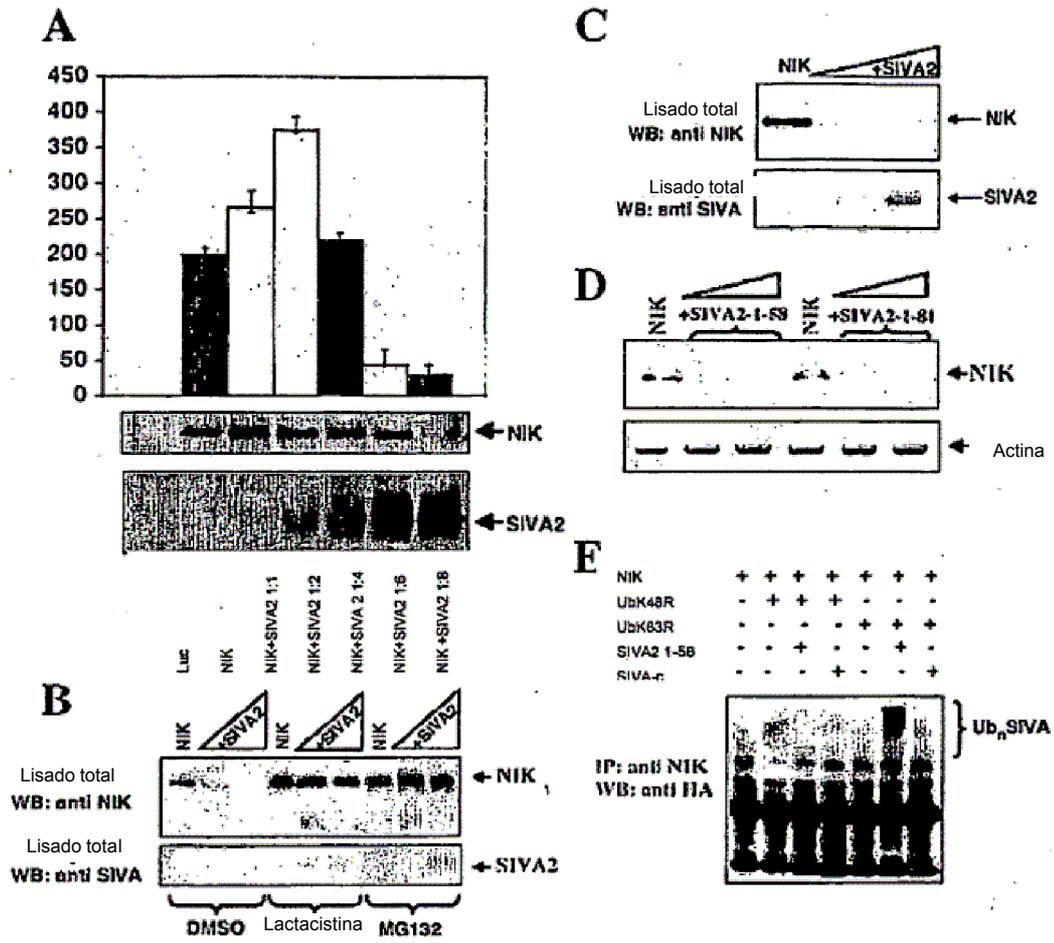


Fig. 4

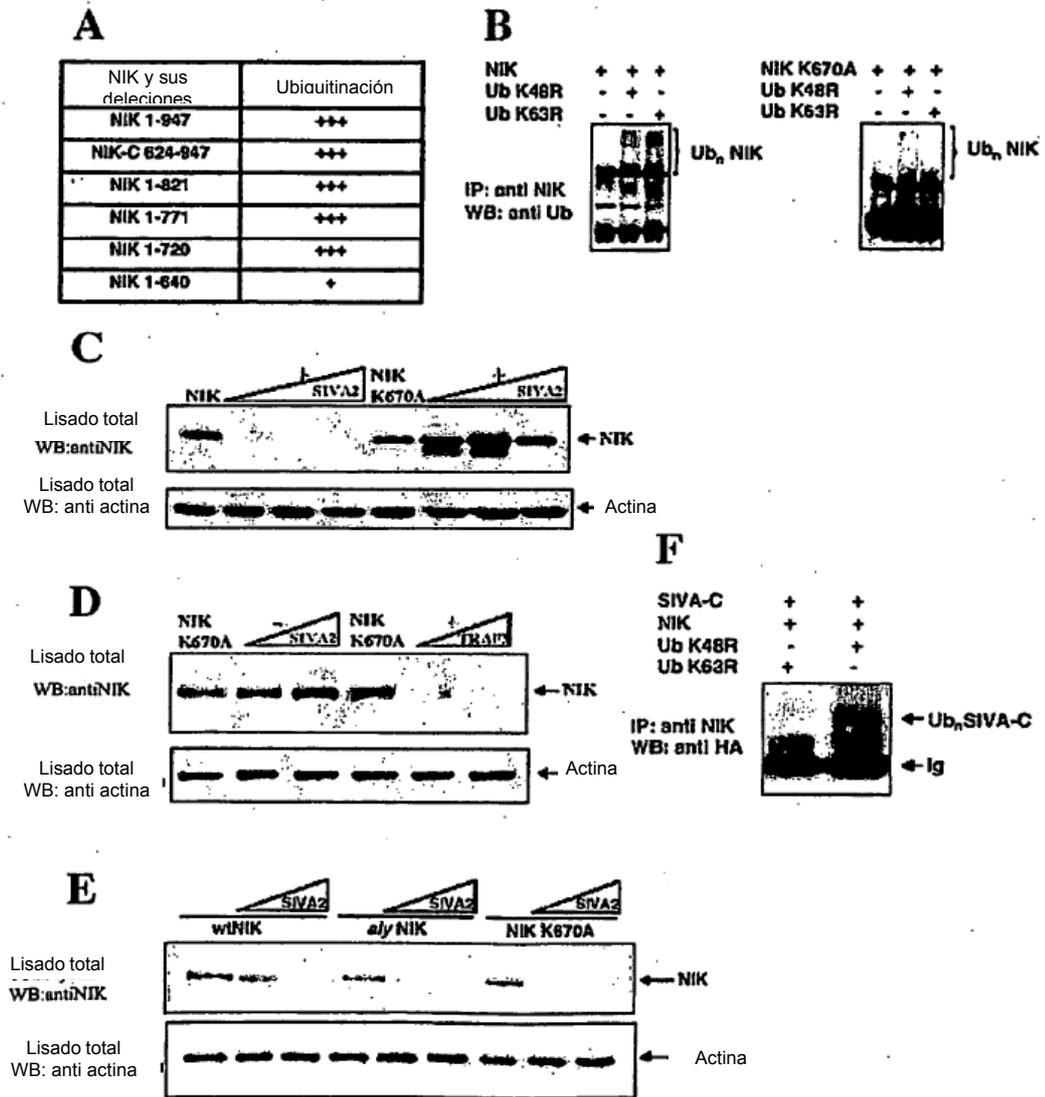


Fig. 5

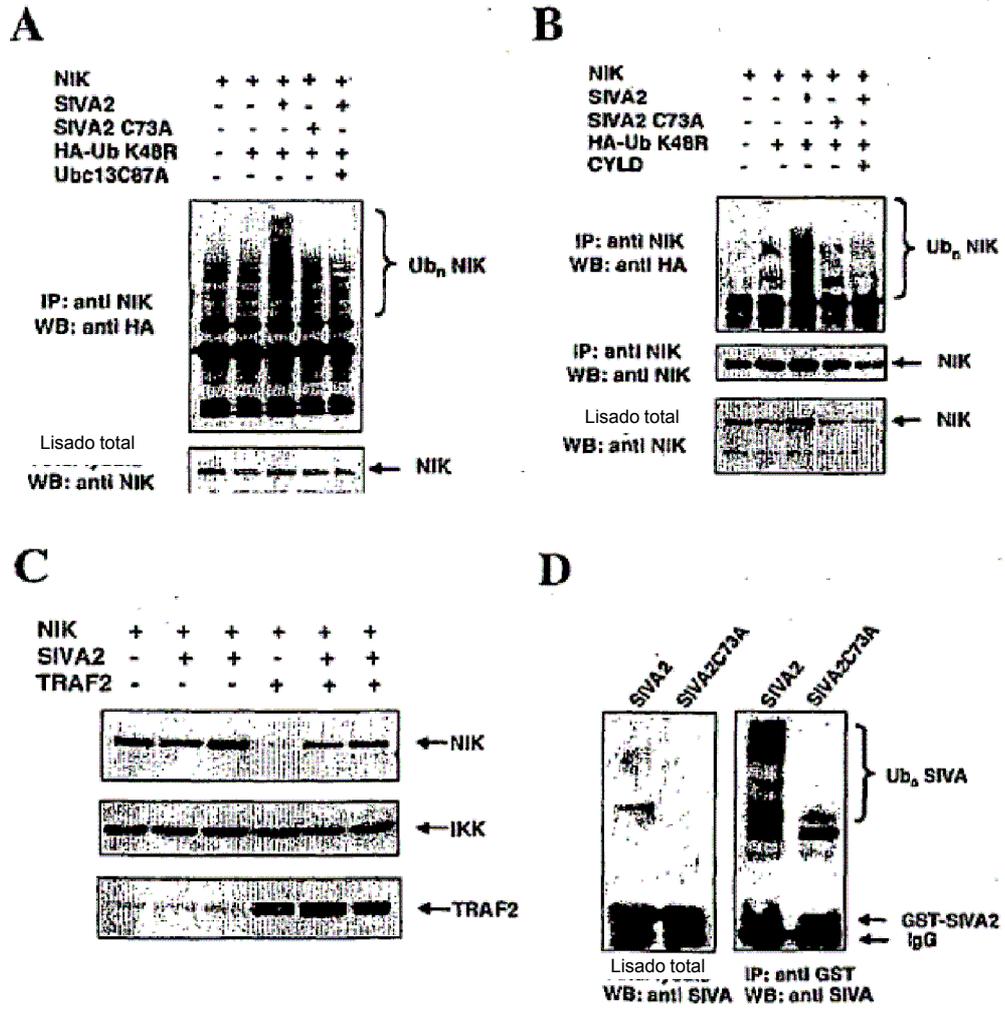


Fig. 6

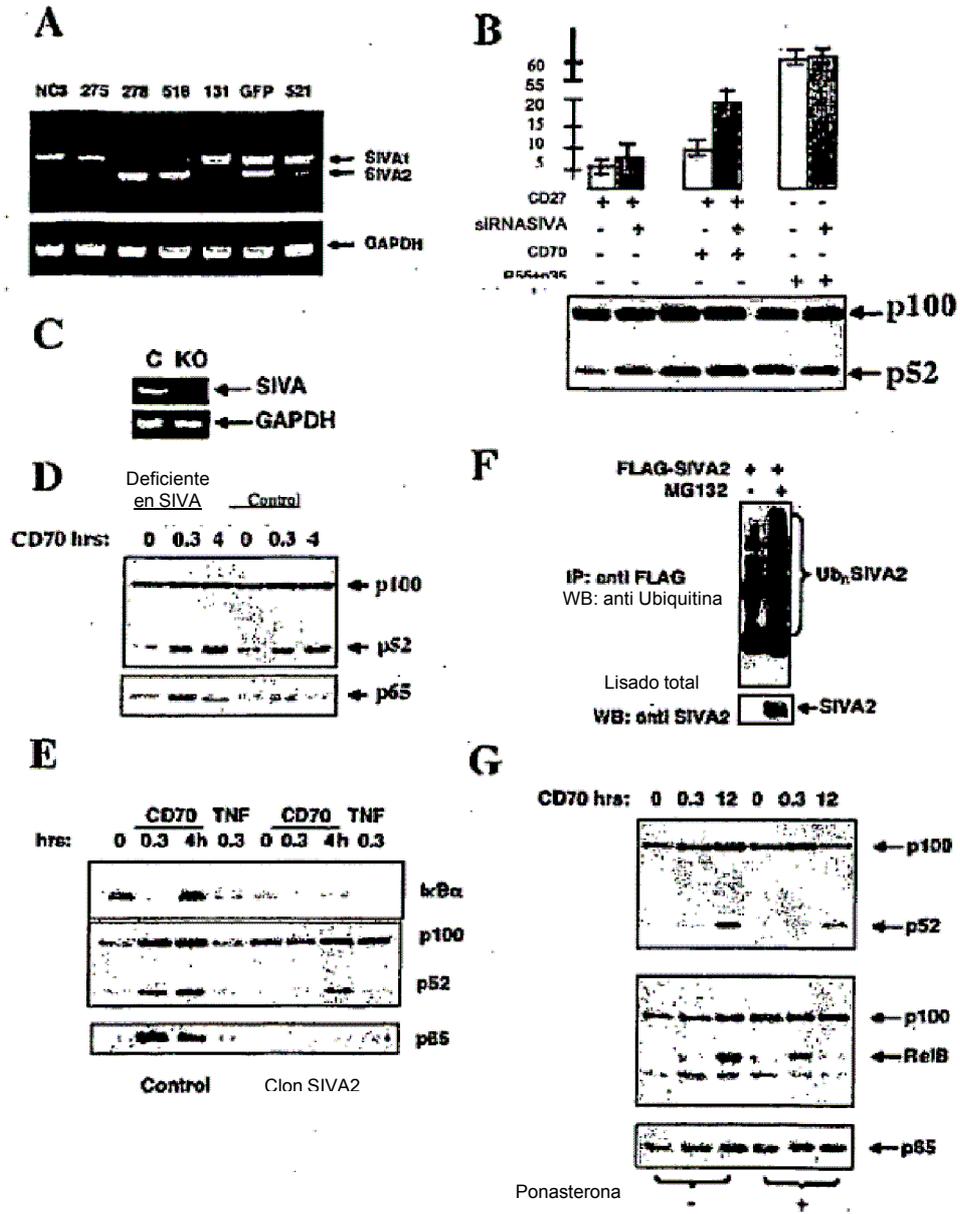


Fig. 7

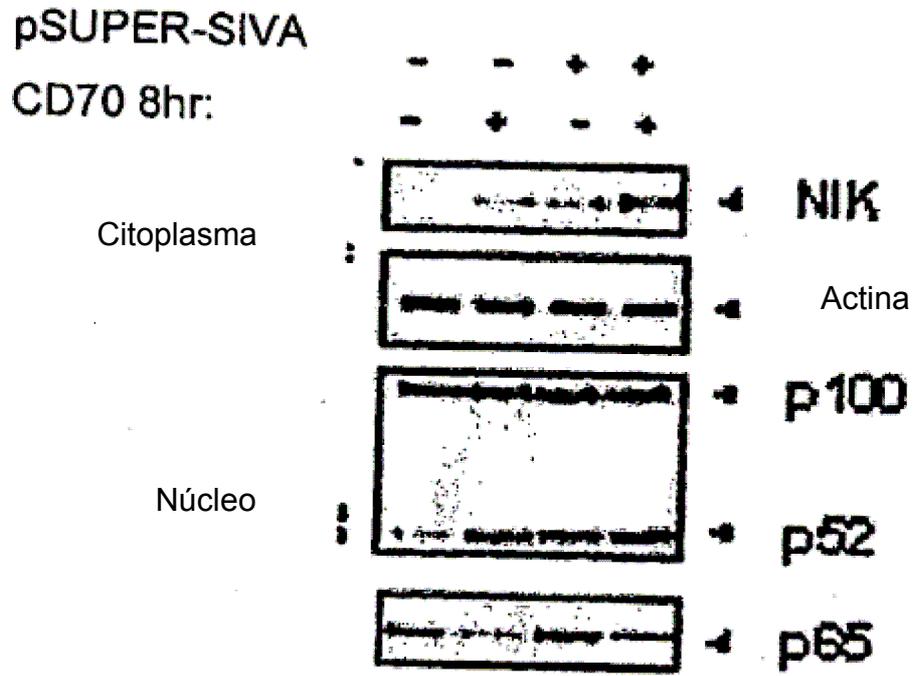
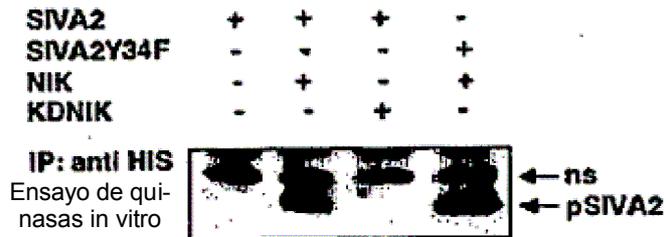
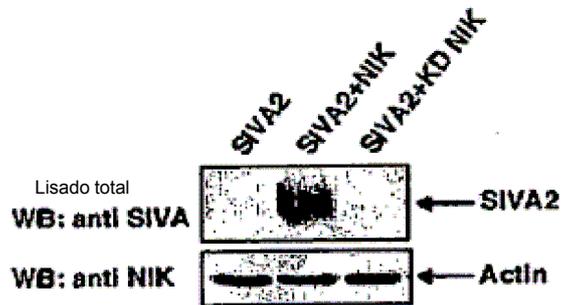


Fig 7 H

A



B



C

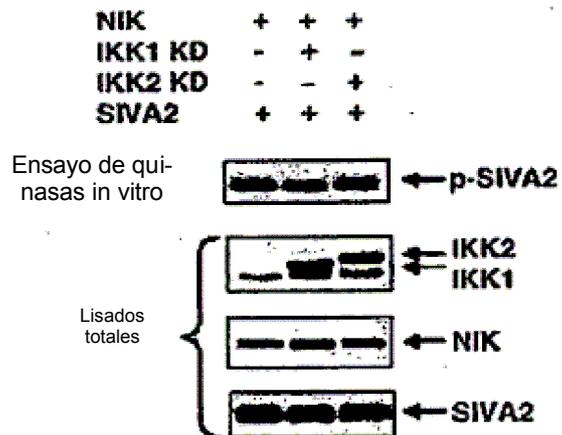


Fig. 8

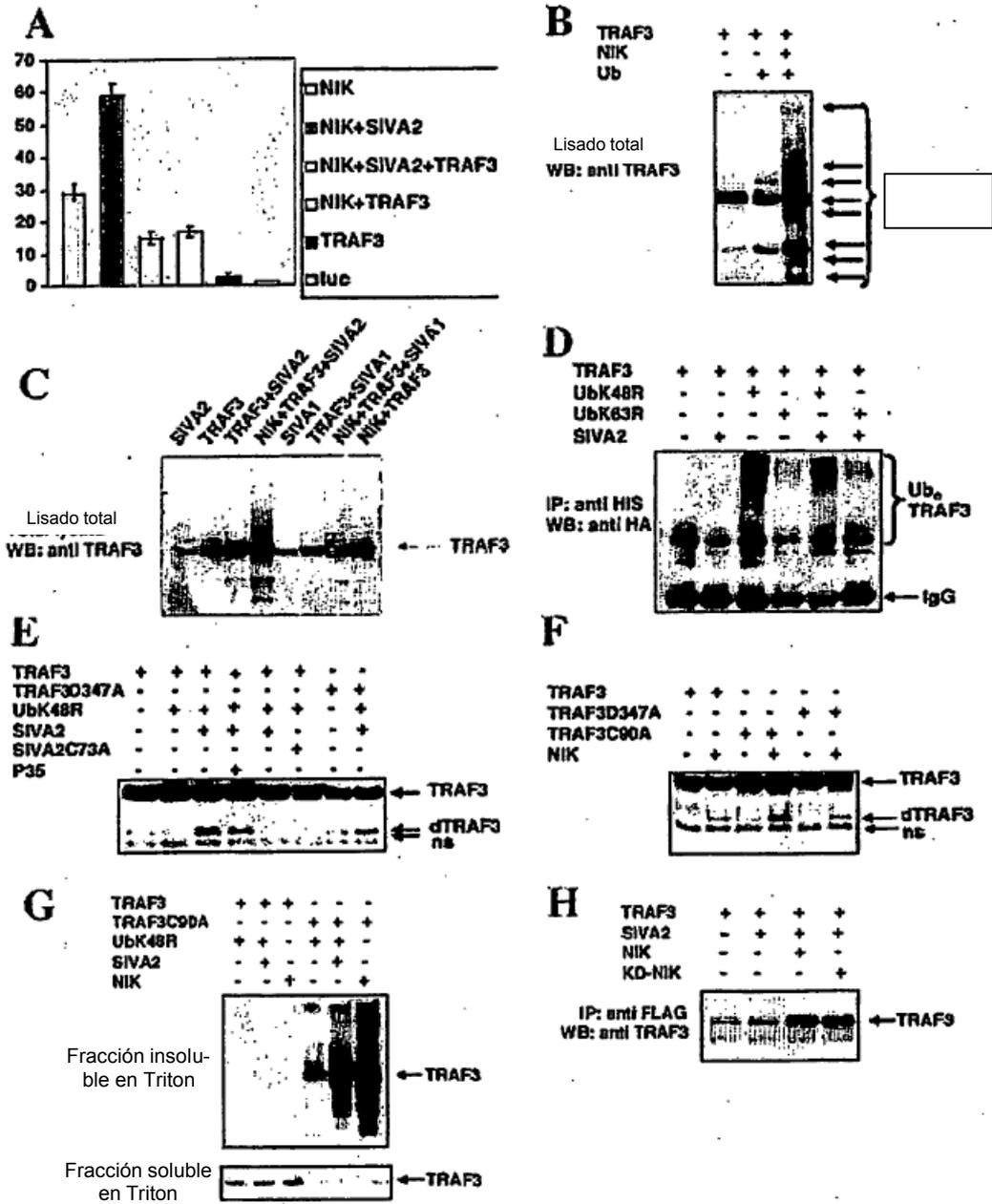


Fig. 9

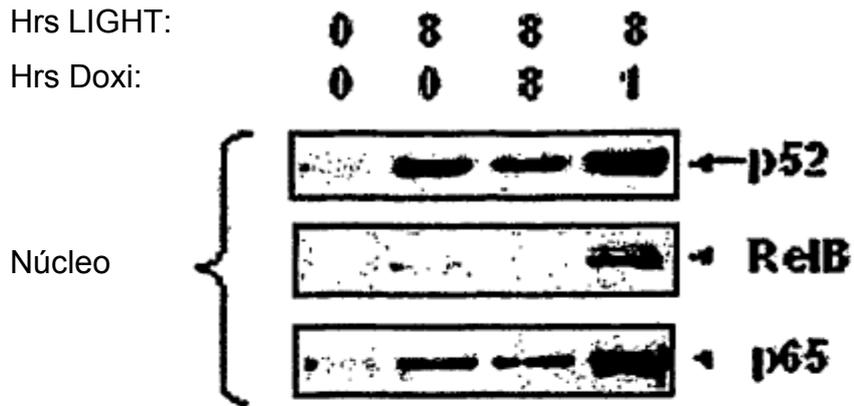


Fig. 10A

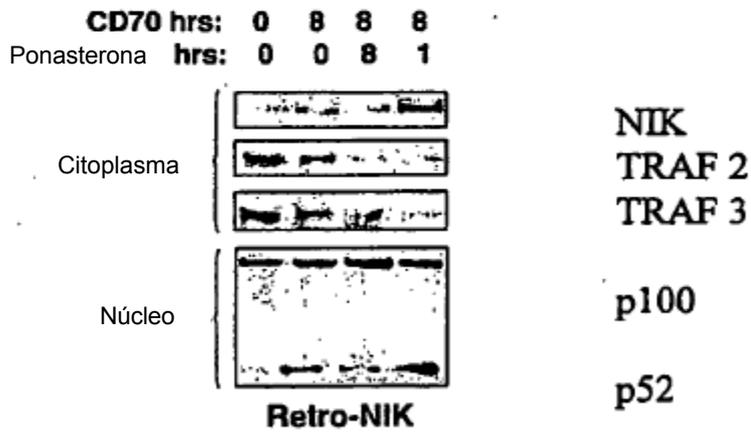


Fig. 10B

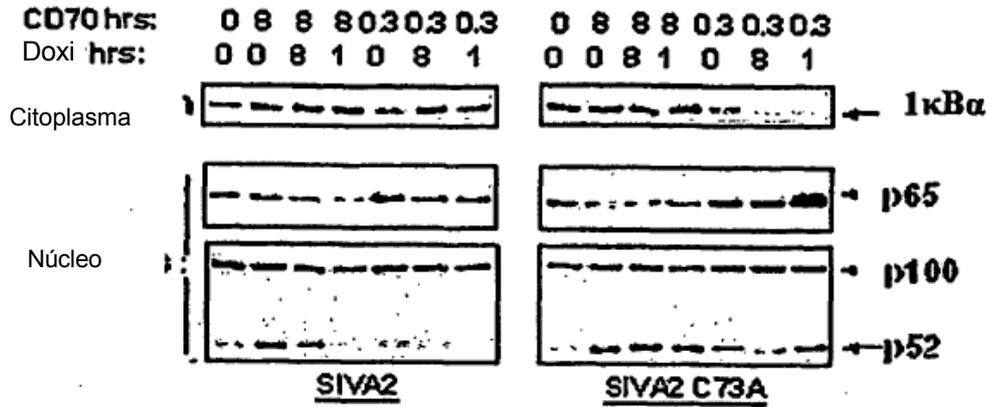


Fig. 10C

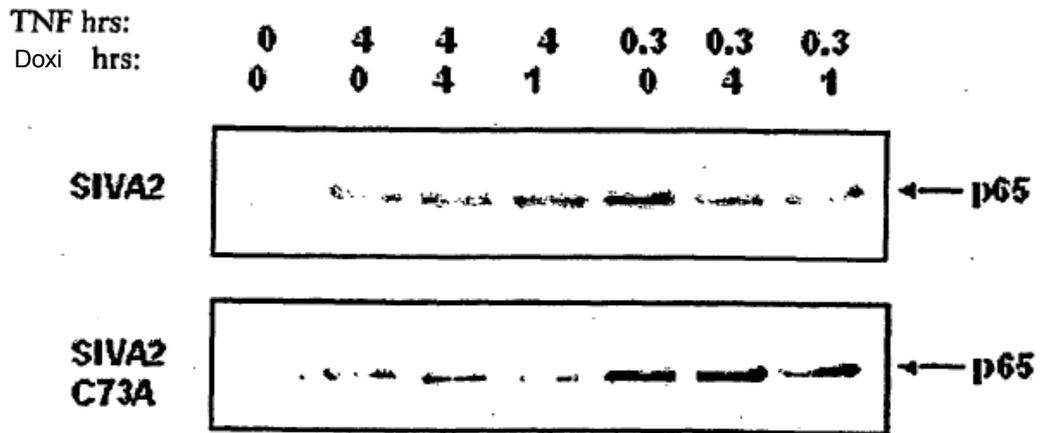


Fig. 10D

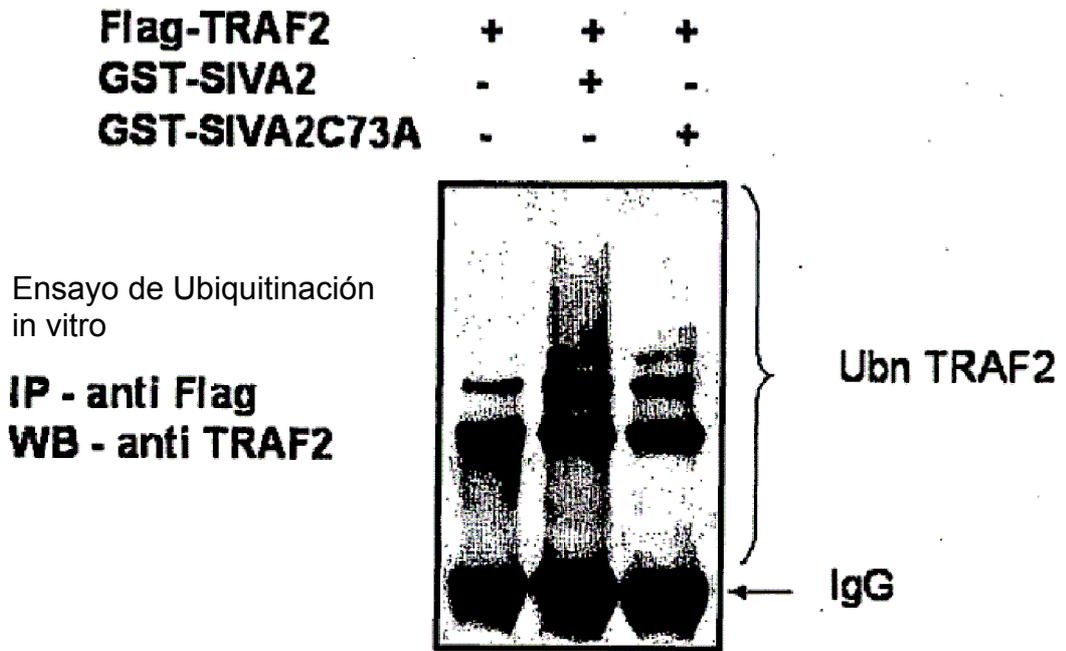


Fig. 11 A

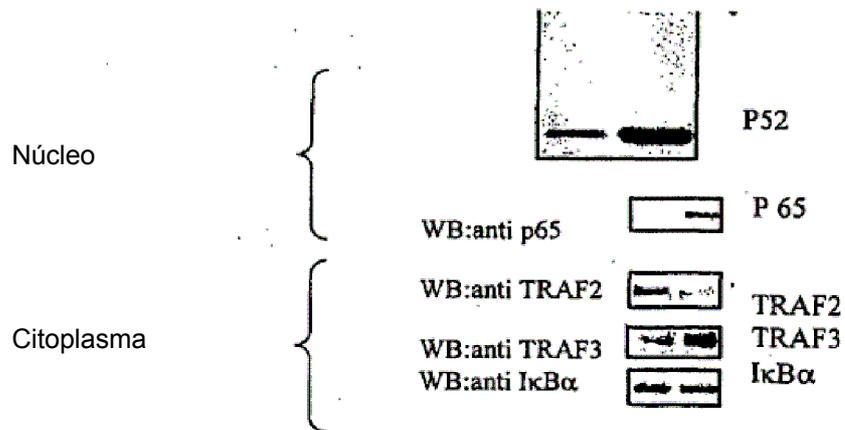


Fig. 11 B

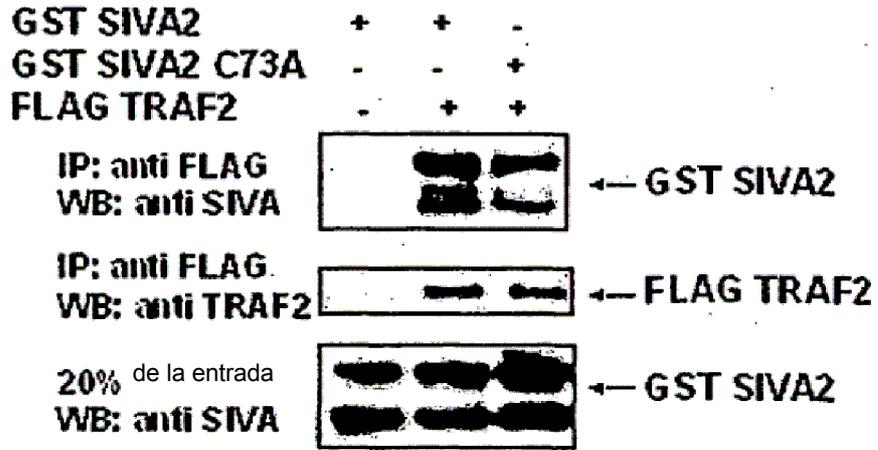


Fig. 11C

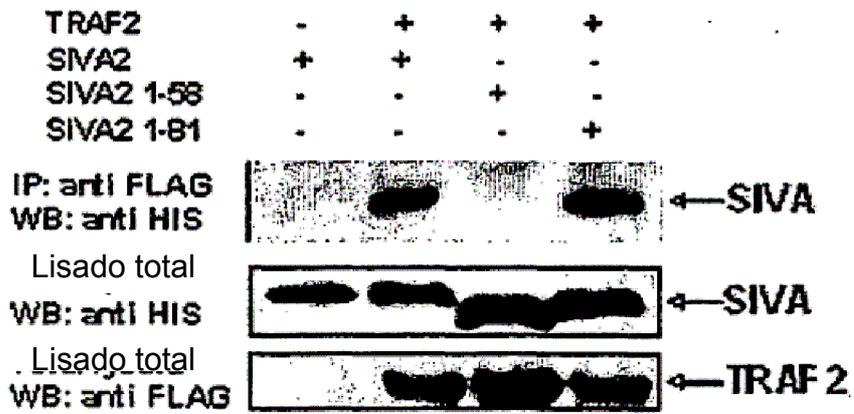


Fig. 11D

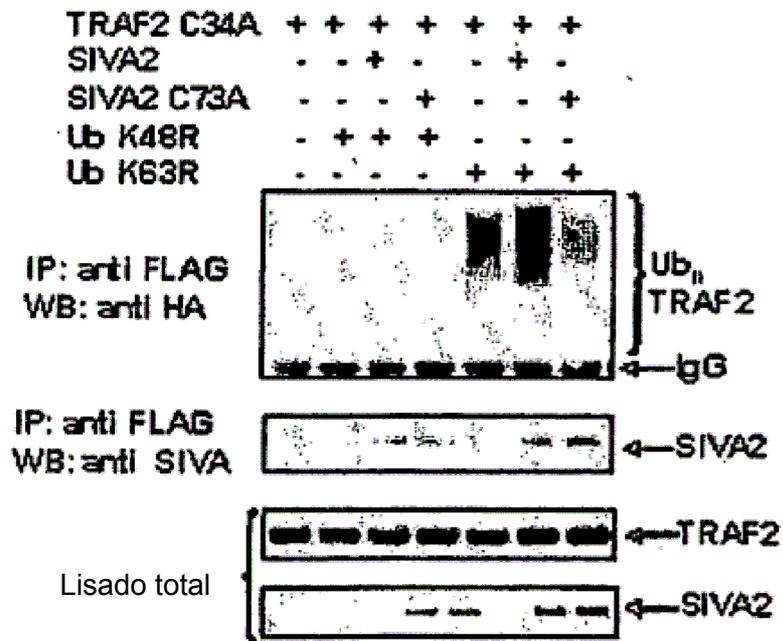
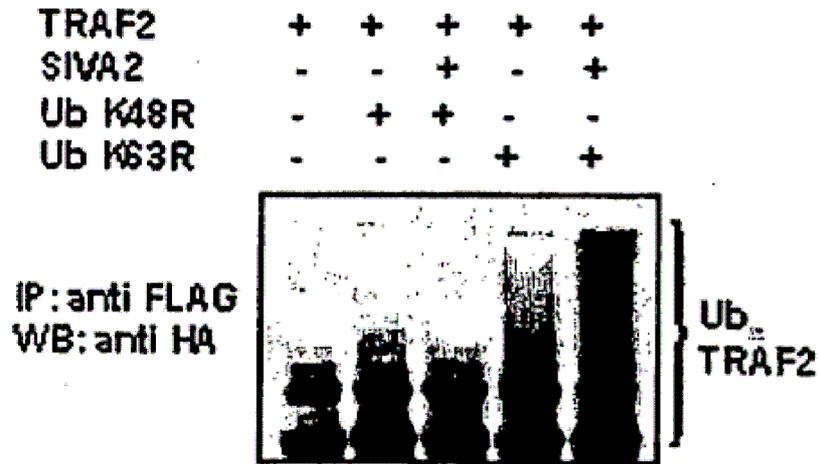


Fig. 11E

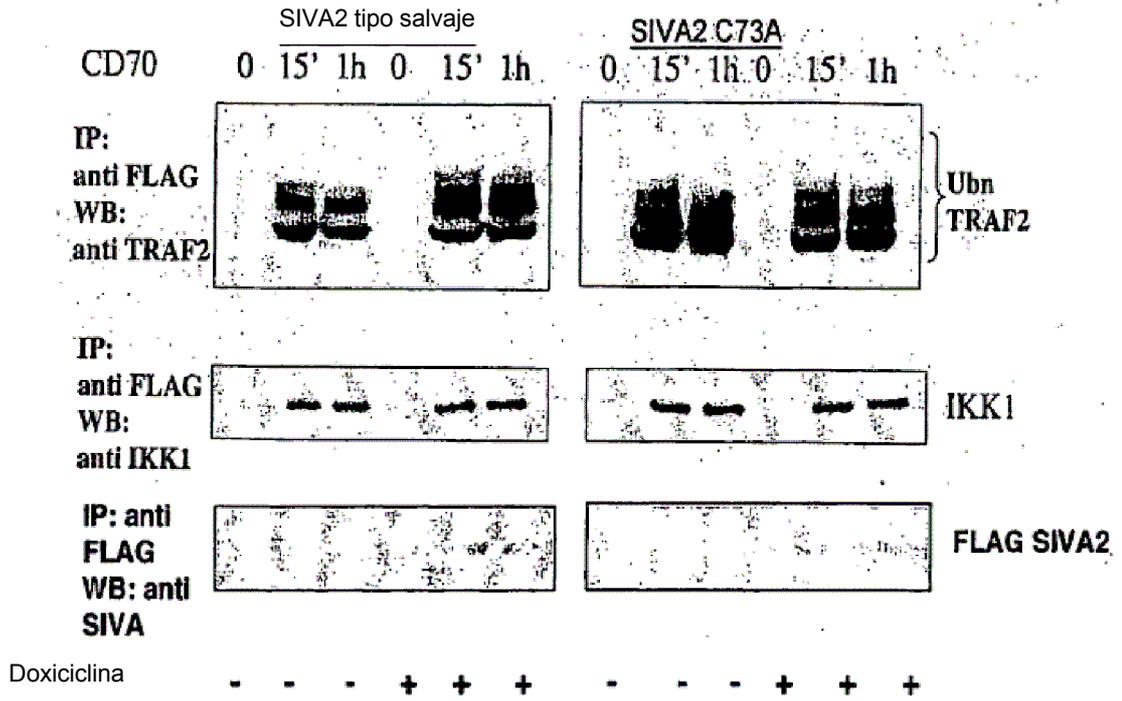


Fig. 11F

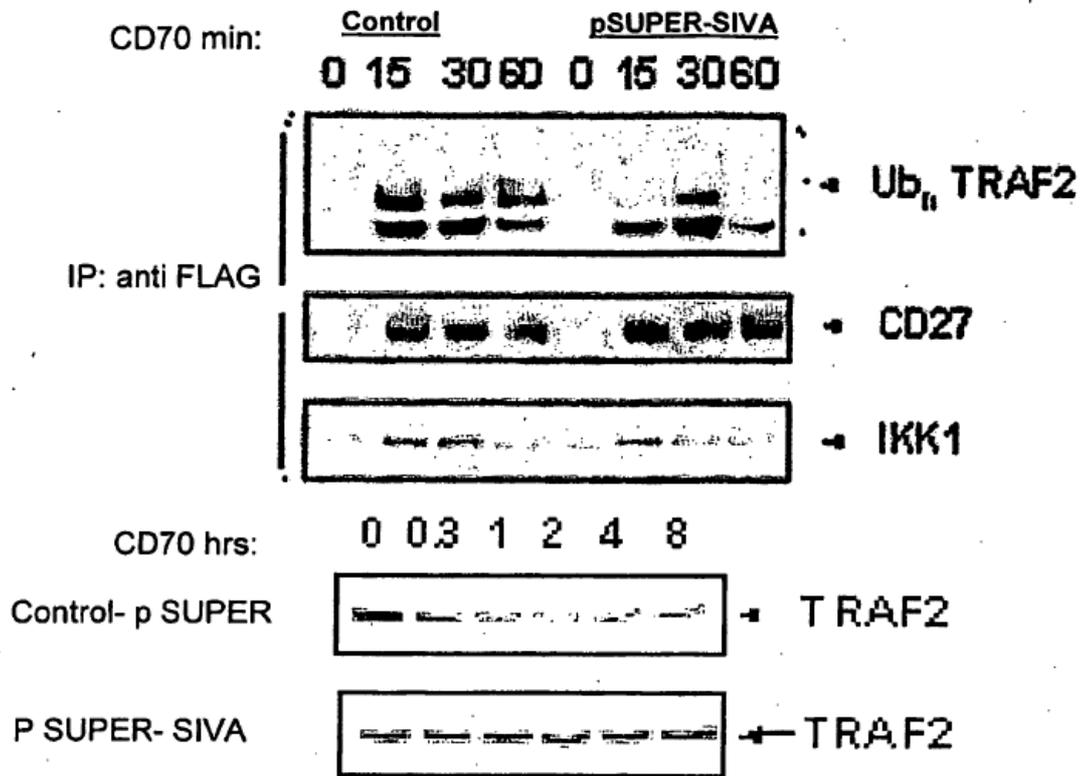


Fig. 11G